

CROMATOGRAFÍA EN COLUMNA

OBJETIVO:

Identificar el pigmento que le da color al chile guajillo por medio de una cromatografía en columna y capa fina.

RESUMEN:

Se dejó macerar chile guajillo con tolueno y se trituró para poder extraer la mayor cantidad de pigmento. Después se hizo una extracción con agua y se agregó Na_2SO_4 como desecante para así contener el tolueno con el pigmento lo más puro posible. Para asegurarnos de que solo se trataba de chile guajillo se llevaron muestras a una cromatografía en columna y capa fina.

INTRODUCCIÓN:

Se obtendrá una mejor identificación del pigmento cuando se encuentre el sistema de resolución adecuado de eluyentes para la cromatografía de capa fina y, se comprobó al llevar estos eluyentes a la cromatografía en columna.

La Cromatografía en columna es un proceso de separación donde la mezcla fluye hacia debajo de una columna rellena con absorbente.

En todos los casos la separación que se produce mediante esta técnica, es con frecuencia comprobable con la obtenida en la cromatografía de capa fina.

En este caso la fase móvil se llama eluyente, que es el que nos ayudará en la separación de componentes de una mezcla y este se selecciona según su polaridad.

El requerimiento básico para la cromatografía en columna es disponer de un cilindro hueco (preferentemente de vidrio, un reservorio que contenga el solvente revelador, un buen adsorbente y los medios mediante los cuales los componentes separados se puedan recoger a medida que aparezcan en el fondo de la columna.

Los usos de este tipo de cromatografía son:

- en la separación de grandes cantidades de material
- monitorea la separación de la mezcla.

EN DONDE

EUYENTE COLUMNA ELUATO

ENTRA SALE

Las cromatografías son un grupo de técnicas de separación selectiva de moléculas, en las que los componentes de una mezcla compleja de componentes pueden ser identificados y/o purificados. Existen varios tipos de cromatografías, según los criterios que se usan para hacer los análisis, pero todas consisten de una fase estacionaria y una móvil.

En la cromatografía de columna las moléculas de una mezcla son separadas en base a la afinidad de las

moléculas por la fase estacionaria o por la fase móvil. Si una molécula A tiene más afinidad por la fase estacionaria que la B, B bajará más rápido que A. Existen muchos tipos de cromatografía de columna.

A. Filtración en gel: En esta las moléculas son separadas por su tamaño. El gel consiste de una cama de esferas con poros de un tamaño dado. El gel se conoce como sefadex, el cual viene con poros de distintos tamaños. Las moléculas de igual o menor tamaño que el poro entran a las esferas mientras que las moléculas más grandes pasan rápidamente por la columna. Las moléculas de tamaño intermedio pueden entrar las esferas pero pasan menos tiempo en ellas. Las moléculas salen en orden de tamaño por el eluido. Aunque para efectos de este laboratorio las muestras que usaremos están coloreadas, al hacer esta cromatografía en la vida real hay que usar otras pruebas para determinar qué fracciones contienen las muestras de interés, las cuales suelen ser proteínas. Estas pruebas pueden ser mediciones fotométricas, SDS-PAGE o ensayos enzimáticos. Una vez tenemos identificadas las fracciones con las muestras, podemos hacer un "profile" de elución con concentración en Y y el volumen de elución en X. El volumen inicial es el "void volume" de la columna. Lo que contiene es el amortiguador que estaba dentro de la columna al empezar. Las moléculas más grandes salen inmediatamente después.

El material que se escoja para la fase estacionaria dependerá del tipo de muestra que estemos corriendo. Cada tipo de gel presenta poros de distinto tamaño.

B. Intercambio iónico: Se usa para purificar proteínas. Separa moléculas en base a su carga iónica. La fase estacionaria presenta una matriz con carga. Al eluir una muestra, las moléculas de igual carga salen con el amortiguador. Las moléculas de carga opuesta se adhieren al material de empaque con distintos grados de afinidad. Para desprender las proteínas adheridas se usa una solución alta en cloruro de potasio o de sodio. Esto puede hacerse usando soluciones con incrementos moderados de salinidad, o de un solo paso, echando la solución de mayor concentración de sal primero. Al subir la concentración poco a poco podemos recolectar las muestras desde las que menos afinidad por la columna tiene hasta las de mayor afinidad. Durante la elución, la sal va compitiendo con la proteína por las cargas de la matriz de la columna, hasta que la desprende.

La columna puede ser de matriz negativa (intercambio catiónico) o positiva (intercambio aniónico). El tipo de empaque dependerá de qué queremos aislar. En este tipo de columna el pH es importante porque puede alterar la carga de la columna.

- Fase inversa: Esta es una cromatografía de interacción en la que la fase estacionaria, con moléculas hidrofóbicas, interactúa con moléculas hidrofóbicas en la muestra. La matriz consiste de fibras de silicato con cadenas de hidrocarburos. Estas atraerán a las moléculas hidrofóbicas de la muestra mientras que las hidrofílicas salen con el amortiguador. Las moléculas son eluidas de la columna lavando con soluciones de distinta concentración de alcohol o cualquier otro solvente no polar.

MATERIAL:

bureta de 25 ml

algodón

frascos

soporte universal

pinzas dobles

embudo de separación

papel filtro

porta objetos

capilares

10 tubos de ensayo

parrilla de calentamiento

aluminio

pipita volumétrica de 5 ml

perilla

etiquetas

vaso de precipitados de 100 ml

lámpara de rayos UV

gradilla

PROCEDIMIENTO:

- **PREPARACIÓN DE SÍLICE GEL PARA LA COLUMNA**

En un frasco se mezcla sílice gel con benceno, de tal forma que quede una papilla no muy floja.

- **EMPAQUE DE LA COLUMNA**

Se coloca la bureta de 25 ml en un soporte universal, y se le agregan 10 ml de benceno, y se le introduce un pequeño cacho de algodón, de tal forma que quede y se moje con benceno en la parte inferior de la bureta y posteriormente se le agrega 1 cm aproximadamente de NaCl.

Cuando este paso se haya realizado, con la ayuda de un embudo se agrega la papilla de sílice gel dentro de la bureta.

NOTA: cuando se realice este paso se tendrá que verificar que no exista burbuja de aire alguna, cuando este el sílice gel dentro de la bureta.

Se le agrega otro centímetro de NaCl.

- **ADICION DEL CHILE CON TOLUENO**

Posteriormente se procede a agregar en la parte superior una muestra de .2 ml de chile con tolueno

El eluato se recibirá en una vaso de precipitados de 100 ml y el eluyente se adicionara con la ayuda de un embudo de separación de 125 ml. (en este caso benceno)

Se espera a que se comience a observar la separación de los componentes del chile con tolueno.

Cuando comience la separación. Se tratará de recolectar dichas separaciones en los tubos de ensayo y se tendrán que enumerar según el orden vayan saliendo.

- **PREPARACIÓN DE CAMARAS DE ELUSIÓN**

En un frasco de boca ancha, se coloca un rectángulo considerable de papel filtro.

En la campana de ventilación, con la ayuda de pipeta volumétrica se agrega una mezcla de metanol con benceno 9:1, este nos servirá para revelar las cromatoplasmas que se realizarán sobre los compuestos separados en los tubos de ensayo.

- **CROMATOGRAFÍA EN CAFA FINA.**

Cuando se haya terminado de separar los componentes del chile con tolueno, se realiza una CCF con cada uno de los eluatos obtenidos.

Una vez realizado el procedimiento para la CCF (práctica antes hecha), con la ayuda de una lámpara UV se observará que fue lo que sucedió en la cromatoplasma después de salir de la cámara de elusión, esto para identificar que compuestos son iguales y cuales son diferentes.

DIAGRAMA

RESULTADOS:

De la cromatografía en columna se obtuvieron 8 tubos de ensayo con distintos tonos de color. Y no se pudieron concluir las elusiones ya que la columna se partió.

En la cromatografía de capa fina se eluyeron los distintos compuestos que tenía la muestra de chile guajillo.

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

De acuerdo a los resultados obtenidos durante el proceso de separación por medio de cromatografía en columna, se pudo observar que en lo que fue la separación, se obtuvieron 8 tubos de ensayo con diferentes productos y con diferentes tonalidades de color, esto no garantiza que todos sean diferentes, por lo cual se realizó la cromatografía en capa fina con estos dichos productos, obteniendo así:

Las siguientes tablas muestran que productos de los tubos de ensayo fueron iguales y cuales fueron diferentes:

DE TUBO DE ENSAYE
1 2 3 4 SON IGUALES
9 10 11 SON IGUALES

DE TUBO DE ENSAYE
6 DIFERENTE
7 DIFERENTE
8 DIFERENTE

La elusión en la columna no se terminó ya que en la columna se formaron burbujas de aire y la silica gel se seco y estrello.

CONCLUSIONES

Mediante el análisis de resultados podemos concluir que la prueba en cromatografía en columna para la separación de componentes de una mezcla de chile guajillo con tolueno fue en parte satisfactoria, por que se obtuvieron buenos resultados en cuanto a los productos contenidos en los tubos de ensaye, aunque no todos nos garantizaban que todos los compuestos contenidos en ellos eran iguales, pero mediante la identificación de un eluyente adecuado (benceno – metanol 9:1) para esta separación y una cromatografía en capa fina pudimos identificar 5 componentes diferentes de esos tubos de ensaye. Solo que al romperse la columna no se pudo terminar de eluir toda la muestra.

Al identificar estos 5 compuestos diferentes de dicha mezcla de chile se puede decir que no hubo demasiados errores en la elaboración de dichos experimentos. Aunque si llevan algo de tiempo y de cuidados al trabajar con cromatografía en columna.

BIBLIOGRAFÍA:

FIESER, LOUIS

EXPERIMENTOS ORGANICOS

Barcelona 1967

ED. Reverté

pp.3-20

BREWSTER, Q, Ray

CURSO PRACTICO DE QUÍMICA ORGANICA

ESPAÑA 1979.

ED. Alambra

pp.27,43,257,258

Harries, Daniel

QUÍMICA ANALÍTICA CUALITATIVA

pp.

CROMATOGRFÍA Principios y técnicas

Manual Moderno, S.A., México 1975

VOGEL, i Arthur

QUÍMICA ANALÍTICA CUALITATIVA

Buenos Aires

ED. Kapeluz

pp.279

REACTIVOS

sílice gel

acetato de etilo

tolueno

NaCl

benceno

metanol

PREPARACIÓN DE COLUMNA

(sílice gel)

CROMATOGRAFÍA EN COLUMNA

Adición del eluyente

(benceno)

Agregar muestra de chile con tolueno

CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA

Recolectar los eluatos

En los tubos de ensayo

Preparación de la cámara de elusión con el eluyente elegido en la CCF ya antes realizada

Preparación de las cromatoplas

Comparar las cromatoplas

Realización de esta técnica para identificar los diferentes eluatos obtenidos

Definir cuantos compuestos se separaron de la mezcla