

# CROMATOGRAFIA EN COLUMNA

## I. OBJETIVOS

- a) Conocer la cromatografía en columna como técnica de separación de mezclas de sustancias, sus características y los factores que en ella intervienen.
- b) Utilizar la cromatografía en columna para la purificación de una sustancia contaminada con un colorante.
- c) Controlar con cromatografía en capa fina el proceso de separación de mezclas por cromatografía en columna.

## II. MATERIAL

(Equipo para dos alumnos).

Columna para cromatografía	1	Pipeta de 5 ml *	2
Matraz redondo fondo plano 125 ml	1	Probeta de 25 ml *	2
T de destilación	1	Piseta de 125 ml c/eluyente	1
Refrigerante p/agua c/mangueras	1	Espátula	1
Colector	1	Frasco p/cromatografía c/tapa	3
Tapón esmerilado	1	Portaobjetos	6
Vaso de pp. de 100 ml	2	Tubos capilares	4
Vaso de pp. de 150 ml *	2	Frascos "viales"	8
Vidrio de reloj	1	Embudo de vidrio	1
Agitador de vidrio	1	Pinza de tres dedos con nuez	3
		Recipiente eléctrico para B.M.	1
* Graduados			

## III. SUSTANCIAS

Acido benzoico, azul de metileno, gel de sílice para columna, gel de sílice para cromatografía en capa fina, acetato de etilo, hexano, sulfato de sodio anhidro, yodo.

## IV. INFORMACION

- a) En la cromatografía en columna, las sustancias de diferente polaridad tienen diferente grado de elución.
- b) Existe una relación entre el orden de elución de una sustancia

en cromatografía en capa fina y el orden de elución de la misma en cromatografía en columna.

- c) El proceso de cromatografía en columna se controla por cromatografía en capa fina, ya que muchas sustancias son incoloras y sólo revelando se tiene mejor información de la separación.

## **V. PROCEDIMIENTO**

Se le proporcionará **0.4 g** de una mezcla sólida, de la cual separará el producto principal, por Cromatografía en Columna.

Para empacar la columna sujétela en el soporte con las pinzas. Engrase la llave y manténgala en posición de cerrado. Introduzca hasta el fondo un pequeño pedazo de algodón ayudándose con la varilla de vidrio, agregue 8 ml de acetato de etilo y presione suavemente el algodón para que quede bien colocado y sin burbujas (nota 1).

Prepare una suspensión de **10 g** de Gel de Sílice para columna en 40 ml de acetato de etilo y agite durante 5 minutos para eliminar las burbujas.

A través del embudo vierta la suspensión en la columna golpeando ligeramente con los dedos para que el empacado sea uniforme (nota 2).

Abra la llave para eliminar el exceso de disolvente teniendo cuidado de no dejar secar la Gel de Sílice (nota 3).

En el vaso de 100 ml disuelva la mezcla problema con la mínima cantidad de Acetato de Etilo (4 ó 5 ml) y ayudándose con el agitador viértala con cuidado, para que quede colocada uniformemente por encima de la Gel de Sílice, abra la llave para que salga eluyente y se adsorba la muestra aplicada, cuidando que no se seque la Gel de Sílice, eluya la mezcla con Acetato de Etilo.

Colecte fracciones (elutos) de 8 ml en los frascos viales y controle la separación, haciendo cromatografía en capa fina a cada una de las fracciones ante una muestra de referencia (testigo).

Eluya las cromatoplasas en mezcla de Hexano-Acetato de Etilo (1:1), revele con luz U.V.

En cada cromatoplasa observe el cambio de la intensidad de coloración de la mancha del producto principal.

La elución y separación termina en el momento en que no aparece mancha.

En un matraz reuna las fracciones que contengan la misma sustancia (nota 4). Para recuperar la sustancia destile el exceso de disolvente utilizando una destilación simple, calentando el matraz con un baño maría eléctrico, deje en el matraz un residuo de 5 ml aproximadamente y viértalo en un vaso, para que termine de evaporarse en la campana.

Pese el producto recuperado, calcule el rendimiento y entréguelo al maestro.

### **NOTAS.**

1) La columna se puede preparar agregando 10 ml del eluyente indicado y después colocar en el fondo de la columna un pedazo de algodón o fibra de vidrio ayudándose con una varilla de vidrio presionando suavemente sin apretar el algodón.

Otra alternativa para colocar el algodón o fibra de vidrio en la columna es con la ayuda del vacío.

2) La columna también se puede empacar agregando primero el disolvente a la columna y después la gel de sílice.

3) Mantenga siempre el nivel del eluyente 2 cm por arriba del nivel de la gel de sílice.

4) Reuna las fracciones que no contienen producto principal, en el frasco que le indique el maestro.

### **VI. ANTECEDENTES**

a) La cromatografía en columna, sus características y aplicaciones. Cromatografía de adsorción. Cromatografía de partición.

b) Técnicas de separación cromatográfica por elución, por adición y por desplazamiento.

c) Eluyentes y soportes para cromatografía en columna.

d) Factores que influyen en una separación por cromatografía en columna.

- e) Consulte los antecedentes de Cromatografía en capa fina.

## **VII CUESTIONARIO.**

- a) ¿Porqué el producto principal eluyó y el colorante se adsorbió en la fase estacionaria?
- b) Sí se desea recuperar el colorante adsorbido, ¿qué debe hacerse?
- c) ¿Qué debe hacerse para encontrar el eluyente adecuado para una sustancia en una cromatografía en columna?
- d) La recuperación cuantitativa del producto principal, sería más completa sí se recogieran fracciones mayores o menores de 10 ml ¿porqué?
- e) ¿Qué tratamiento debe darse a residuos de disolvente orgánico como Acetato de Etilo, para desecharlos?
- f) Es recuperable la gel de sílice para columna?

## **VIII. BIBLIOGRAFIA**

- a) Moore J.A. and Dalrymple D.L.  
Experimental Methods in Organica Chemistry  
Second Edition, W.B. Saunders Co., Philadelphia, 1976.
- b) Brewster R.Q., Vander Werf C.A. y Mc Ewen W.E.  
Curso Práctico de Química Orgánica  
2ª. Ed. Ed. Alhambra S.A., Madrid, 1979
- c) Roberts R.M., Gilbert J.C. and Rodewald L.B.  
Modern Experimental Organic Chemistry, Third Edition,  
Holt, Rinehart and Winston, N.Y. 1979.
- d) Abbott D. y Andrews R.S.  
Introducción a la Cromatografía  
3ª. Ed. Alhambra S.A., Madrid, 1970.