

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE SAN LUIS POTOSI

ESCUELA DE CIENCIAS QUIMICAS



EX-LIBRIS



INSTRUMENTACION EN CROMATOGRAFIA
EN CAPA DELGADA

TRABAJO RECEPCIONAL

QUE PARA OBTENER
EL TITULO DE
QUIMICO INDUSTRIAL
PRESENTA

MARIA DEL ROSARIO ROBLEDO TORRES

DEDICO ESTE TRABAJO

Con todo mi amor y gratitud eterna a mis queridos Padres:

FRANCISCO ROBLEDO CISNEROS

JUANITA TORRES DE ROBLEDO

A mis queridos hermanos:

Francisco

Rogelio

Angélica

Ana

A LA ESCUELA DE CIENCIAS QUIMICAS

A MIS MAESTROS

A MIS COMPAÑEROS Y AMIGOS

Deseo hacer presente mi agradecimiento a INTERNACIONAL CIENTIFICA y en especial al ING. MANUEL NUÑO por haberme permitido reportar este trabajo.

A JORGE con amor.

A la personita más bella:

Mi hijo HUGO.

OBJETIVO

Este reporte tiene por objeto presentar los avances que se han tenido en la instrumentación en la técnica de - CROMATOGRAFIA EN CAPA DELGADA, las ventajas de ellos y se halar que un instrumento automático no solo ahorra trabajo y tiempo al químico, sino que muchas veces análisis que no son posibles con equipos sencillos dan resultados mucho más satisfactorios con instrumentos más completos.

Las ilustraciones fueron obtenidas por cortesía de las citadas compañías. Debido a la gran variedad del equipo y manufacturas de los productos, este reporte se ve limitado a aquellos que presentan los más recientes avances.

La mención de una compañía en particular no deberá interpretarse como una recomendación, asimismo el hecho de que no se mencionen otras marcas no quiere decir que éstas no sean recomendables.

INSTRUMENTACION EN CROMATOGRAFIA EN CAFA DELGADA

TEMARIO

I. PRINCIPIOS

Definición
Principios
Técnica

II. INSTRUMENTACION

Instrumentación en la preparación de cromatoplacas
" " " aplicación de la muestra
" " el desarrollo cromatográfico
" " la visualización
" " análisis cuantitativo

III. APLICACIONES PRACTICAS

Preparación de cromatoplacas
Separación de vitaminas
Identificación de analgésicos
Cuantificación de fenilalanina por Densitometría
Cuantificación de colorantes por Elución y Densitometría.

IV. CONCLUSIONES

V. OBSERVACIONES

VI. BIBLIOGRAFIA.

CAPITULO I

PRINCIPIOS

DEFINICION : La Cromatografía puede definirse como una técnica de separación analítica efectuada en un sistema formado por tres componentes : Una fase móvil, una fase estacionaria y la sustancia a ser separada. (1)

La Cromatografía en capa delgada en particular, se define como un método de separación fisicoquímica donde la mezcla en solución es transportada por un solvente sobre una capa delgada de adsorbente. Durante el arrastre los componentes que constituyen la mezcla quedan retenidos a diferentes distancias. (2)

PRINCIPIOS : Durante la separación cromatográfica, las distintas moléculas que forman la mezcla son arrastradas sobre el adsorbente o fase estacionaria por el solvente o fase móvil a diferentes velocidades dando como resultado zonas bien definidas y separadas entre sí.

Los fenómenos que intervienen durante el desarrollo son : Los fenómenos de adsorción, de partición y en algunos casos intercambio iónico, al predominar uno u otro tipo se clasifica la Cromatografía en :

- a). Cromatografía de adsorción
- b). Cromatografía de partición
- c). Cromatografía de intercambio iónico

En cualquiera de los casos, el grado de separación depende de cuatro propiedades del sistema :

- Velocidad de flujo del solvente
- Solubilidad de las sustancias
- Fenómenos de adsorción
- Fenómenos de partición

La velocidad de flujo del solvente es igual para todos los compuestos presentes, depende solo del poder de elución del solvente y de la naturaleza del adsorbente.

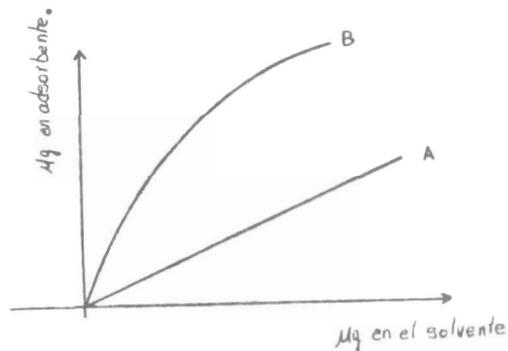
La solubilidad de los componentes en el solvente es uno de los factores que intervienen en la separación. Si un compuesto es muy soluble en el solvente se desplazará rápidamente y aparecerá en la parte superior del cromatograma cerca del frente del solvente, y si por el contrario es relativamente insoluble se quedará cerca de la aplicación de la muestra.

El fenómeno de partición consiste en el reparto de un compuesto entre dos solventes que no son miscibles, repartiéndose de acuerdo a su solubilidad en cada uno de ellos. En una separación cromatográfica se efectúa un gran número sucesivo de repartos.

Por adsorción se entiende físicamente, el fenómeno de enriquecimiento de una sustancia gaseosa o en solución sobre la superficie límite de una fase, por ejemplo sobre la superficie de un sólido. En este tipo de Cromatografía la fase estacionaria es un sólido y solo se tiene un sistema de solventes. (3)

CROMATOGRAFIA DE ADSORCION.

En Cromatografía de adsorción, el proceso de adsorción se completa cuando existe un equilibrio que depende de la temperatura, concentración y de la Presión en el caso de los gases. En Cromatografía de capa delgada el proceso se puede considerar a temperatura constante. El proceso de adsorción se representa mediante una isoterma de adsorción, que es la curva obtenida al graficar la concentración en la fase estacionaria Vs. la concentración en la fase móvil.



ISOTERMA DE ADSORCION.

La curva presenta un tramo lineal a bajas concentraciones. En esta zona el coeficiente de adsorción permanece constante.

$$(Ec. 1) \quad \frac{C_A}{C_S} = K$$

donde C_A y C_S son las concentraciones en el adsorbente y en el solvente respectivamente, y K significa el coeficiente de adsorción.

La sustancia en cuestión se desplaza una distancia que depende de la inclinación de la curva de adsorción. El proceso total está fundado en un cambio de adsorción y desorción. Si la curva está próxima al eje de las abscisas, el desplazamiento de la sustancia es rápido, si se aproxima al eje de las ordenadas, entonces la sustancia se desplazará lentamente y quedará cerca del lugar de la aplicación.

Cada adsorbente tiene una determinada capacidad de adsorción. Con cantidades de muestra superiores al límite de adsorción se obtienen manchas alargadas en dirección al origen. Esta formación de "cola" es menor cuanto menos sustancia se aplica.

En este tipo de Cromatografía, las diversas sustancias del sistema compiten por los sitios de adsorción, por eso aquí las velocidades de desplazamiento dependen mucho más de las impurezas más comunes es el agua porque ésta ocupa los sitios de adsorción, por tal razón las placas usadas deberán calentarse a 100-110 °C para eliminar el agua. A este proceso se le llama "Activación".

Entre mayor sea el grado de actividad del adsorbente mayor será su poder de adsorción. En algunos casos en los cuales es necesario un determinado grado de actividad, la capa de adsorbente se pone en contacto con vapores de agentes deshidratantes como el ácido sulfúrico. (4)

La Cromatografía de adsorción es especialmente útil para las separaciones de la mayoría de los compuestos de naturaleza lipofílica, como por ejemplo: Aceites esenciales, ácidos grasos, antioxidantes, aldehídos aromáticos, colorantes compuestos heterocíclicos oxigenados, compuestos orgánicos sulfurados, esteroides, fenoles, mezclas de lípidos del suero, glicéridos, triglicéridos, fosfolípidos nucleótidos, algunos pesticidas fosforados, vitaminas liposolubles, etc. (5,9)

CROMATOGRAFIA DE PARTICION.

En Cromatografía de partición predomina fundamentalmente el fenómeno de reparto, las fases móvil y estacionaria están constituidas por dos sistemas de solventes. En este caso el sólido adherido a la placa de vidrio funciona únicamente como medio de sostén a la fase estacionaria que generalmente es un líquido polar. Cuando la fase estacionaria es un solvente no-polar como por ejemplo una parafina, la Cromatografía se denomina "de partición de fase inversa ó invertida".

El equilibrio de reparto de un compuesto está determinado por la ecuación de Nernst, la cual establece que :

$$(Ec.2) \quad \frac{C_1}{C_2} = \alpha$$

donde : C_1 y C_2 son las concentraciones de reparto en las dos fases y α es una constante ó coeficiente de reparto, del cual depende la velocidad de desplazamiento.(4)

Por Cromatografía de reparto suelen separarse un gran número de compuestos hidrofílicos como por ejemplo : Acidos carboxílicos, alcoholes, aminas alifáticas, aminoácidos y derivados, analgésicos, antibióticos, carbohidratos mono y disacáridos, algunos esteroides, nucleótidos y oligonucleótidos, vitaminas hidrosolubles, etc. (5, 9)

Para la selección de adsorbentes y solventes, o sea del tipo de Cromatografía para una separación en particular es importante tomar en cuenta las propiedades más sobresalientes de la mezcla a separar.

CONSIDERACIONES ACERCA DE LA MUESTRA.

Las sustancias adsorbidas o adsorbatos, se ligan a la superficie del adsorbente por medio de fuerzas electrostáticas. En el adsorbente, la red cristalina se encuentra unida también por fuerzas electrostáticas, las cuales actúan en parte hacia afuera constituyendo así los sitios activos de adsorción. Por lo tanto, la polaridad de las moléculas determinan la afinidad del adsorbente por los compuestos.

La afinidad del adsorbente por los compuestos aumenta en el siguiente orden :

Compuestos con doble ligadura, halogenados, cetonas, ésteres, aminas, aminoácidos, éteres, alcoholes, ácidos carboxílicos, etc.

De manera que los hidrocarburos saturados son poco o nada adsorbidos, aumentando su afinidad con la introducción de enlaces dobles, tanto más cuanto mayor es el número debido a que aumenta la facultad de polarización.

En una molécula con varios grupos funcionales, cada grupo hace su propia contribución a la afinidad total, aun que la magnitud de la contribución dependerá de las posiciones de los grupos. Así, si los grupos están alejados, la contribución de un grupo menos polar no producirá una diferencia apreciable en la afinidad de la molécula por el adsorbente. Si los grupos están cerca entre sí, la afinidad de la molécula será igual a la suma de las contribuciones individuales.

Además de la polaridad de la molécula, son importantes el peso molecular y la distribución geométrica en el espacio. Cambios en el peso molecular afectan muy poco la afinidad del compuesto por el adsorbente, pero sí tiene una gran influencia en la solubilidad de las moléculas en el solvente. Por otra parte, cambios en la distribución geométrica sí afecta la afinidad de adsorción, porque el proceso de adsorción que involucra el empaquetamiento de moléculas sobre la superficie del adsorbente es una cuestión de geometría.

De acuerdo con lo anterior y dentro de ciertos límites es posible predecir qué adsorbentes y medios de elución son adecuados para la separación de una determinada sustancia.

Generalmente si se utiliza un adsorbente fuerte (muy activo) se requiere un eluyente de fuerte poder de elución y viceversa.

Aunque el número de adsorbentes es relativamente limitado, es posible obtener diferentes grados de adsorción con un tratamiento previo adecuado. Por otra parte, existe un gran número de medios de elución que son usados. (6)

CONSIDERACIONES ACERCA DEL ADSORBENTE.

En Cromatografía en capa delgada puede usarse cualquier adsorbente de los usados en Cromatografía de columna pero con tamaños de partícula mucho menores.

Los adsorbentes más comunes son: La sílicagel o ácido silícico, óxido de aluminio o alúmina, kieselguhr, celulosa, algunos otros menos usados como los polvos de polímeros

da, polvos de intercambio iónico, florisil, sulfato de calcio, polietileno, hidroxilapatita, sephadex, y otros.

Los adsorbentes algunas veces se usan puros, pero generalmente se usan combinados con distintos materiales que actúan como aglutinantes, para alterar las propiedades físicas y químicas de los adsorbentes, como llenadores, visualizadores, etc.

La sílicagel probablemente es el adsorbente más usado tanto para Cromatografía de adsorción, de partición y de la fase reversible, puede usarse en cualquiera de las siguientes variedades : sílicagel con aglutinante, con agentes fluorescentes, acidificada, básica o bien conteniendo agentes complejantes.

La alúmina se usa generalmente para la separación de mezclas no polares básicas o neutras. Por ejemplo, terpenos, alcaloides, esteroides, etc. Y al igual que la sílicagel pueden usarse diferentes modificaciones.

El Kiéselguhr adsorbe más débilmente que la sílicagel y que la alúmina, es apropiado para separaciones de mezclas polares, especialmente para mezclas de azúcares y de ácidos carboxílicos fenólicos.

La celulosa se usa principalmente como soporte para la fase estacionaria líquida. Existen varias clases de polvos de celulosa usadas como intercambiadores de iones.

El sephadex o dextran gel es un polímero preparado con residuos de glucosa. Se usa para separar sustancias de acuerdo a su peso molecular, por un método mejor conocido como Cromatografía en gel. Existen diferentes tipos de sephadex dependiendo de la cantidad de agua que son capaces de absorber para obtener un grado de esponjamiento adecuado en la separación de compuestos de diferentes pesos moleculares. (3)

CONSIDERACIONES ACERCA DEL SOLVENTE .

El número de solventes que se pueden usar en Cromatografía en capa delgada es muy grande comparada con la cantidad de adsorbentes existentes.

El tipo de solvente usado dependerá primeramente del tipo de Cromatografía y por supuesto de la naturaleza de la muestra a separar. En Cromatografía de adsorción sólo la fase móvil es un solvente y su poder de elución sigue normalmente las series elutrópicas que se mencionan con

Bastante frecuencia en la literatura. La Cromatografía de partición requiere dos tipos de solventes inmiscibles entre sí, en los cuales la muestra tendrá coeficientes de -- partición convenientes, normalmente la fase estacionaria es un líquido polar y la fase móvil un solvente no polar. En la Cromatografía de fase inversa, la fase estacionaria es un solvente no polar y la fase móvil uno polar.

En algunos casos, la mezcla de dos o tres solventes de diferentes polaridad da a menudo una mejor separación que algunos solventes puros. Existen también series alutrópicas de mezclas de solventes. (3, 4, 7)

TECNICA GENERAL.

La técnica puede resumirse en los siguientes pasos:-

- 1.- Preparación de las cromatoplasacas.
- 2.- Aplicación de la muestra.
- 3.- Desarrollo de la Cromatografía.
- 4.- Identificación cualitativa.
- 5.- Evaluación cuantitativa.

1.- PREPARACION DE LAS CROMATOPLACAS.

En esta técnica se usan cromatoplasacas de 20 x 20 cm, 10 x 20 cm y en algunas ocasiones de 5 x 10 cm., hechas de un adsorbente finamente dividido como la sílicagel, alúmina, celulosa, tierra de diatoméas o kieselguhr, sephadex, etc.

En un vaso de precipitados se mezcla el material adsorbente con agua destilada u otra solución, hasta obtener una pasta de consistencia de atole espeso, mezclando con suavidad para evitar la formación de burbujas. La relación adsorbente agua viene especificada en el producto comercial modificándose ligeramente con disminución o adición de agua hasta obtener la consistencia adecuada. Rápidamente se coloca la pasta en el recipiente del equipo para preparar las cromatoplasacas.

La capa de adsorbente debe ser uniforme sin irregularidades que provoquen distorsiones en las separaciones, (si no salen perfectas no deben usarse, se lavan las placas de vidrio) y se colocan sobre una superficie perfectamente horizontal. Es recomendable dejarlas reposar 12 hrs.

Antes de usarse, las placas se preacondicionan, esto puede consistir en la activación por calentamiento directo en una estufa durante un tiempo determinado, o bien se colocan las placas en contactos con vapores de reagentes deshidratantes o con algún solvente o solución.

Por último, es recomendable recortar dos cm. de adsorbente en la parte superior de la placa y un cm. en cada lado con el objeto de facilitar su manejo, ésto hacerlo con la ayuda de una regla y una espátula.

2.- APLICACION DE LA MUESTRA.

Se coloca la cromatoplaca preparada, activada o no activada, sobre una guía de aplicación que permite espaciar y colocar perfectamente las muestras.

Sin excepción. Las muestras deben aplicarse en solución a concentraciones comprendidas entre .1, 1 o 5% del compuesto, de acuerdo con el tipo de sustancia a separar.

El volumen de muestra a aplicar puede ser desde 0.5 hasta 5 μ l cuidando que el tamaño de la mancha de la aplicación no sea mayor de 0.5 cm. con lo que se asegura zonas compactas y mejores separaciones.

La cantidad de compuesto que puede ser separado difiere en cada caso, depende sobre todo del medio de adsorción, tamaño de la placa, su grosor, la facilidad de separación y del tipo de Cromatografía. En trabajos preparativos se pueden separar cantidades entre 10²-100 mg. en un cromatograma individual.

En realidad, la manera más fácil y precisa de determinar la cantidad de muestra que debe ser aplicada, se obtiene por experimentación con los componentes en cuestión. Cada componente de una mezcla deberá ser investigado a varias concentraciones.

La cantidad de muestra debe ser lo suficientemente grande para ser visualizada sin dificultad y mostrar trazas de impurezas, y lo suficientemente pequeña para dar manchas discretas con un mínimo de cooleado.

3.- DESARROLLO DE LA CROMATOGRAFIA

El desarrollo consiste en el paso del solvente a través de la cromatoplaca. Es la parte del proceso en la cual tiene lugar la separación cromatográfica de los componentes, basándose en los principios ya descritos.

El proceso puede llevarse a cabo de diferentes maneras dependiendo de la dirección de flujo del solvente y de la posición de la cromatoplaca. Según la posición, la Cromatografía puede ser:

- a). Ascendente.
- b). Descendente.
- c). Horizontal.

Además, según el flujo puede ser:

- a). Bidimensional.
- b). Escalonada.
- c). Pasos Múltiples.

Más adelante se tratará con más detalle cada uno de estos tipos de desarrollo, cuando se hable de la instrumentación, ya que ésta será diferente en cada caso

Para ejemplificar, se mencionará el tipo más sencillo que es la Cromatografía ascendente: Se utiliza un tanque o cámara de las utilizadas en Cromatografía de papel, en dicha cámara se coloca 0.5 cm. de altura (aprox. 50ml.) del solvente, se introduce la placa en forma vertical o inclinada y se inicia el desplazamiento del solvente hacia arriba - debido al fenómeno de capilaridad.

El tiempo de desarrollo adecuado para la separación es muy variable y dependerá de cada separación en particular; - pero generalmente 60 minutos son suficientes. Durante este tiempo el solvente recorre una distancia entre 10 y 18 cm. - Después que alcanzó la altura adecuada, la cromatoplaca se saca del tanque, se marca el frente formado por el solvente y se deja evaporar.

4.- VISUALIZACION.

El proceso de visualización es necesario cuando las sustancias separadas no son visibles a simple vista. Este se puede efectuar de diferentes maneras, clasificandose en:

a). METODOS QUIMICOS. Los metodos químicos consisten - en rociar la cromatoplaca con algún reactivo cromógeno después del desarrollo, el cual al reaccionar con el grupo específico del compuesto a ser visualizado dará una coloración característica, la aplicación del reactivo químico puede - efectuarse por: Nebulización, exposición a gases y vapores - y por inmersión.

En algunas ocasiones, para que se efectúe la reacción-colorida es necesario calentar la cromatoplaca a una temperatura determinada durante algún tiempo.

Los reactivos reveladores pueden clasificarse en dos tipos principalmente:

- * Reactivos corrosivos universales.
- * Reactivos reveladores específicos.

Los reactivos corrosivos son fuertemente deshidratantes u oxidantes. Su acción se basa en la conversión de compuestos orgánicos a carbón sobre placas inorgánicas, por lo tanto son considerados también como reactivos destructivos. Los más usados son: El ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido crómico ó una mezcla de estos.

Con respecto a los reactivos reveladores específicos existe una enorme cantidad de éstos citados en la literatura, y en general reaccionan químicamente con el compuesto de interés. (3)

b). METODOS FISICOS.- Estos se basan en las propiedades que tienen algunos compuestos para absorber o emitir energía después de hacerles incidir luz ultravioleta. por ejemplo, las sustancias con dobles ligaduras conjugadas absorben mejor la luz UV. apareciendo como zona oscuras de colores característicos después de exponerlas bajo esta luz a 254 mμ; algunas sustancias orgánicas por ejemplo las vitaminas presentan fluorescencia al iluminarlas con luz UV. de onda larga (360 mμ). En este método de visualización se usan cromatoplacas que contienen sustancias fluorescentes como indicadores.

c).- METODOS RADIOACTIVOS.- Estos métodos se usan en caso de sustancias marcadas con trazas radioactivas, se localizan las manchas por medio de una película fotográfica de rayos X o bien con un contador geiger portátil. (4)

5.- EVALUACION CUALITATIVA.

En esta técnica la identificación se basa en la distancia de migración de los compuestos utilizando un factor llamado "Rf", que literalmente significa: Relación de frentes. Este factor es considerado como una constante característica de un compuesto en determinadas condiciones de operación. Es calculado a partir de la siguiente Ec. :

$$(Ec. 3) \quad R_f = \frac{D_a}{D_s}$$

Donde D_a es la distancia que se desplazó el compuesto (a) desde el lugar de aplicación de la muestra y D_s es la distancia que viajó el frente del solvente también desde el lugar de la aplicación de la muestra. El procedimiento para la evaluación es el siguiente: Las manchas del cromatograma se delinearán cuidadosamente con la punta de un lápiz, esto es recomendable también en el caso de que se deseen conservar ya que la mayoría de las coloraciones de los compuestos suelen

ser inestables con el tiempo; se marcan los centros y con la ayuda de una regla, se mide la distancia de migración desde el punto de aplicación de la muestra hasta el centro de la mancha. La línea formada por el solvente se marca inmediatamente después que la placa es sacada de la cámara de desarrollo y se mide su distancia.

Los valores de R_f son calculados por la relación de las distancias de migración.

En algunos casos en que se deja fluir el solvente por toda la placa, los valores de R_f se calculan en relación con la migración de alguna otra sustancia corrida en la misma muestra.

Los valores de R_f y R_x son ampliamente citados en la literatura científica, pero es importante hacer notar que la identificación basándose en tablas solo es válida si la separación se ha efectuado en condiciones idénticas a las mencionadas en la literatura. (5)

Otro método de identificación consiste en cromatografiar muestras estándar de los compuestos puros en la misma cromatoplaca. Este método supone que los valores de R_f de los compuestos puros difieren sólo ligeramente de los valores de R_f de los compuestos en una muestra.

6._ ANALISIS CUANTITATIVO.

El análisis cuantitativo puede ser efectuado por los dos métodos siguientes :

- a)._ Método directo sobre la cromatoplaca
- b)._ Método de Elución.

METODO DIRECTO SOBRE LA CROMATOPLACA. El método directo sobre la cromatoplaca, (in Situ) se basa en la medición de la cantidad de luz reflejada por la mancha cuando la cromatoplaca es colocada en un Densitómetro. Al cuantificar por este método es necesario contar con un registrador para expresar los resultados en forma de pico. El área comprendida bajo el pico es directamente proporcional a la concentración del compuesto.

Los métodos usuales para medir áreas bajo los picos son los siguientes :

* El método de pesadas que consiste en cortar y pesar el papel que representa el área del pico.

*El uso del planímetro, accesorio usado en ingeniería aunque su sensibilidad es muchas veces insuficiente para propósitos analíticos.

* El uso de integradores, que pueden ser mecánicos y automáticos, los integradores electrónicos imprimen automáticamente la medida del área del pico, es el método más — preciso y exacto.

METODO DE ELUCION. Este método consiste en lavar o eluir la zona coloreada de la cromatoplaca, con un solvente adecuado y leer fotométricamente la densidad óptica. El método requiere de un blanco y de curvas estándar preparadas.

En la actualidad, éste método de cuantificación ha alcanzado un alto grado de precisión con el uso del Eluchrom de Camag, ya que la elución es programada y automática, — gracias a lo cual, la Cromatografía en capa delgada se considera ahora como una técnica altamente sensible y satisfactoria para análisis cuantitativo.

La Cromatografía en capa delgada se ha desarrollado ampliamente sobre todo en la introducción de una modificación llamada CROMATOGRAFIA DE ALTA RESOLUCION EN CAPA DELGADA (C.A.R.C.D.).

En la C.A.R.C.D. se presentan las siguientes variaciones con respecto a la Cromatografía en capa delgada tradicional :

- a). _ Se usan cromatoplasmas de 50 x 50 mm.
- b). _ Materiales adsorbentes con un poder de separación mucho mayor que el usado en Cromatografía en capa delgada.
- c). _ Nuevo método de preacondicionamiento de la cromatoplaca.
- d). _ Un método de dosificación más preciso y en general un mejor sistema de procesamiento.

TECNICA DE LA C.A.R.C.D.

El paso previo para cualquier preacondicionamiento de la Cromatoplaca consiste en hacer pasar aire o nitrógeno a través de la cámara para mantener una atmósfera inerte.

Para controlar la humedad relativa se hace pasar aire a través de un recipiente que contiene una mezcla de ácido sulfúrico-agua o bien preacondicionándola con vapores de un solvente determinado.

Durante el desarrollo, la cromatoplaca C.A.R.C.D. des^ucansa con su capa adsorbente hacia abajo sobre el cuerpo de la cámara ^{2u}2. El solvente de elución es alimentado - en el centro de la cromatoplaca por medio de un capilar - de platino-iridio de 0.2 mm de diámetro interior. La fase vapor producida en el exterior pasa por la cámara hacia la cromatoplaca por medio de un canal y sale por un orificio que se encuentra en el centro de la cámara. (Fig. 20)

CARACTERISTICAS DE LA C.A.R.C.D.

Las siguientes características en realidad pueden -- considerarse como ventajas sobre la cromatografía en capa delgada normal.

1.- Tiene una extraordinaria capacidad d^e separación ya que en condiciones óptimas pueden separarse más de 40 sustancias en un solo desarrollo. Como técnica de rutina se pueden analizar más de doce muestras usando la técnica microcircular y más de cuarenta muestras con la técnica lineal.

2.- En análisis cualitativo en el intervalo de valores de 0.0-0.5, los valores de R_f tienen una desviación - estándar de ± 1 % cuando se usa la cámara "U".

3.- En análisis cuantitativo con la técnica lineal en el intervalo de nanogramos se obtienen desviaciones - estándar relativas de ± 2 % y con la técnica circular en placas de 100x100 mm se obtienen desviaciones de 1.5 - 1 %. Se pueden detectar compuestos en proporciones de 1: 10,000 ya que el método tiene un potencial de operación a nivel de fentogramos.

4.- En la dosificación de las muestras en el intervalo de 0-100 nanolitros se tienen precisiones de 99 % -- del volumen aplicado.

5.- El tiempo promedio para una separación es de - 120 segundos por analisis. (10)

APLICACIONES DE LA CROMATOGRAFIA EN CAPA DELGADA

La Cromatografía en capa delgada es una técnica importante y versátil, su capacidad de aplicación es mayor que la de otras técnicas cromatográficas. Por ejemplo, por - Cromatografía de gases solo pueden analizarse compuestos volátiles, no existiendo tal limitación para la Cromatografía en capa delgada. Para dar una idea de la amplitud de aplicaciones se muestra la siguiente tabla.

TABLA DE APLICACIONES DE LA CROMATOGRAFIA EN
CAPA DELGADA

Acidos orgánicos (5,9,11,12,13)
 Acidos alifáticos (5,9,11,12,13)
 Acidos aromáticos (5,9,11,12,13)
 Acidos fenólicos (5,9,11,12,13)
 Cetoácidos (5,9,11,12,13)
 Hidroxiácidos (5,9,11,12,13)
 Acidos nucleicos (5,9,11,12,13)
 Aceites esenciales (5,9,11,12,13)
 Alcaloides (5,9,14,15,16)
 Alcoholes (5,9,17,18,19)
 Aldehídos (5,9,20,21,22)
 Aflatoxinas (23,24,25,26,27,28)
 Amidas (29,30,31)
 Aminas (5,9,29,30,31)
 Aminoácidos (5,9,32,33,34)
 Aminoazúcares (5,9,35,36,37)
 Analgésicos (5,9,38,39,40)
 Antibióticos (5,9,38,39,40)
 Barbituratos (5,9,39,39,40)
 Carbohidratos (5,9,35,36,37)
 Cetonas (5,9,20,21,22)
 Colorantes (5,9,41,42,43)
 Compuestos azo (5,9,29,30,31)
 Compuestos inorgánicos (5,9,44,45,46)
 Compuestos organometálicos (5,9,47,48,49)
 Drogas (5,9,50,51,52)
 Derivados de alcoholes (5,9,17,18,19)
 Esteroides (5,9,68,69,70)
 Fármacos (5,9,50,51,52)
 Glicósidos (5,9,35,36,37)
 Insecticidas, pesticidas (5,9,53,54,55)
 Lípidos (5,9,56,57,58)
 Plásticos (5,9,59,60,61)
 Resinas (5,9,59,60,61)
 Vitaminas (5,9,62,63,64)
 Péptidos (5,9,32,33,34)
 Proteínas (5,9,32,33,34)
 Terpenos (5,9,65,66,67)

La Cromatografía en capa delgada ha sido usada también en combinación con Cromatografía de columna y Cromatografía de gases, ya que es posible hacer separaciones que en estas técnicas aparecen como una sola fracción. En algunos casos es posible seguir el curso de una reacción especialmente de tipo enzimático porque separa e identifica los compuestos secundarios de una reacción.

CAPITULO II

AVANCES EN LA INSTRUMENTACION

Aunque la Cromatografía en capa delgada no se considere como una técnica nueva, no tuvo un desarrollo notable en lo que respecta a instrumentación hasta los años 50, -- cuando Ego Sthal propuso el uso de placas de tamaño estándar. A partir de entonces empezaron a salir al mercado equipos para la separación de cromatoplasmas.

Actualmente la casa CAMAG en Suiza es una de las más prestigiadas dedicadas a la fabricación de instrumentos y accesorios para Cromatografía en capa delgada.

ADSORBENTES

Los adsorbentes más recientes y que van al frente por su alta resolución son los sililados, designados comercialmente por Analabs Inc. de E.M. Laboratories con las siglas RP-2, RP-8, RP-18. Son útiles en Cromatografía de fase reversible y de partición donde los compuestos polares tienen valores de R_f más altos. Con adsorbentes sililados se tiene mayor resolución debido a que es más densa la capa de adsorbente y más uniforme el tamaño de partícula.

Los adsorbentes pueden ser sililados con diclorometilsilano (RP-2), diclorometilooctilsilano (RP-8) o con diclorometilooctadecilsilano (RP-18). Estas cromatoplasmas pueden adquirirse de Analabs Inc. de E.M. Laboratories, Brinkman Instrument Incorporated. Bio-Rad Laboratories se especializa en adsorbentes usados en separaciones biológicas. Pharmacia Fine Chemicals ofrece el sephadex para Cromatografía de gel en capa delgada. Waco Chemical Industries se especializa en cromatoplasmas de todos los tipos. Camag Muttenz ofrece una amplia variedad de adsorbentes y de cromatoplasmas de alta resolución.

EQUIPO PARA LA PREPARACION DE CROMATOPLACAS

Preparando el técnico sus propias cromatoplasmas se tiene un ahorro considerable de dinero y además está en libertad de seleccionar tanto el adsorbente como el líquido (ácido, base, amortiguador, nitrato de plata, etc.) para preparar la suspensión. Puede seleccionarse también cualquier espesor de acuerdo al tipo de Cromatografía y determinación.

APLICADOR MANUAL. El equipo (fig.2) consta de una base metálica (a) con una guía por medio de la cual las placas de vidrio son empujadas con el dedo índice suave y uniformemente, un recipiente flotante (b), una barrera fija para espesores de 300 y 500 micras y una barrera móvil con un calibrador para diferentes espesores (c).

Puede utilizarse en la preparación de cromatoplasmas analíticas y también para Cromatografía preparativa, el espesor de la capa no se afecta por el grosor de la placa de vidrio y pueden prepararse cualquier número de cromatoplasmas en un lote.

El aplicador para cromatoplasmas automático es recomendable cuando se requiere un alto grado de estandarización de las cromatoplasmas.

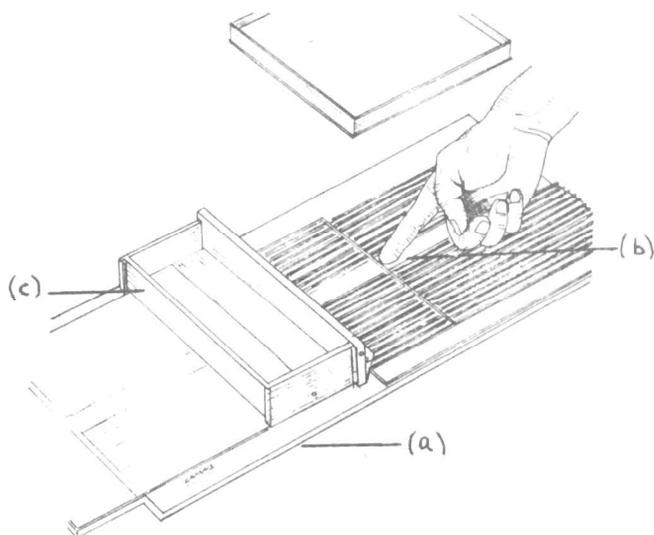


Fig. 2 APLICADOR MANUAL

APLICADOR AUTOMATICO. Mostrado en la fig. 3, consta de un motor (a) que mueve las placas de vidrio a una velocidad constante bajo el recipiente flotante (b), y ya preparadas corren a lo largo de un portaplacas (c). En un mismo lote todas las placas de vidrio deben ser de un mismo grosor. El equipo viene también con una barrera móvil para capas de diferentes espesores.

Después de preparadas las cromatoplasmas hasta antes de su uso deben almacenarse cuidadosamente para la conservación en buen estado, para esto se cuenta con : Soportes para secado y gabinetes para almacenado.

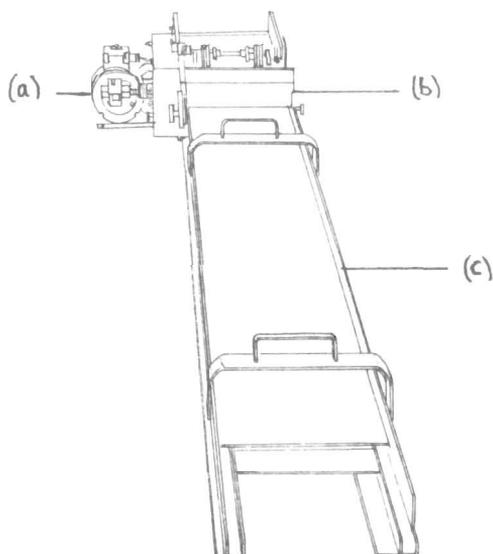


Fig. 3 APLICADOR AUTOMATICO

SOPORTES PARA SECADO. El soporte (fig. 4) consta de diez charolas individuales de aluminio, las cuales pueden estar acomodadas una sobre otra para formar una unidad compacta o bien pueden usarse por separado para actuar las cromatoplasmas.

GABINETES PARA ALMACENADO. Tienen una capacidad para diez cromatoplasmas, pueden ser usados también como soporte de secado, gabinete para guardar o para transportar ya que tienen agarradera y como cámara cuando se va a efectuar el desarrollo de varias cromatoplasmas a la vez, las cromatoplasmas con la muestra se colocan en el gabinete se quita la tapa del fondo y sobre ésta se coloca el solvente, el cuerpo del gabinete con las cromatoplasmas se po-

ne sobre el solvente en posición vertical y se tapa la parte superior con una placa de vidrio o con la cubierta de plástico. (fig. 5)

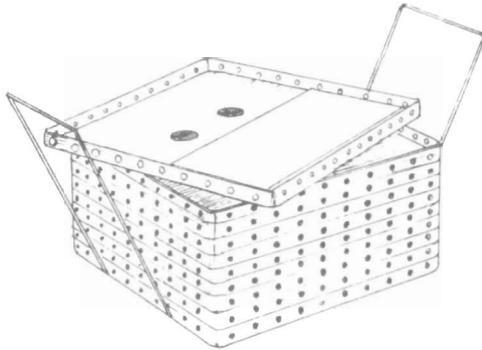


Fig. 4 SOPORTE DE SECADO

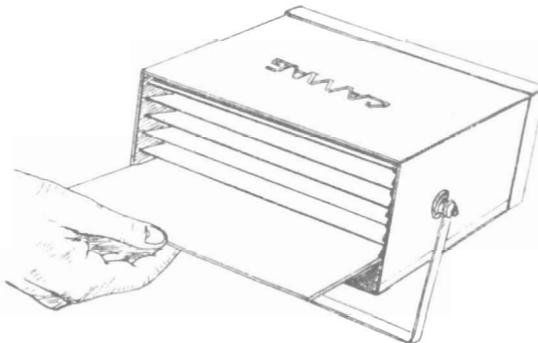


Fig. 5 GABINETE PARA ALMACENADO

EQUIPO PARA LA APLICACION DE LA MUESTRA

El tipo de analisis a efectuar determina la manera de aplicaci3n de la muestra. Asi, en analisis cualitativo - donde se hacen aplicaciones de 2-10 μ l pueden usarse micro pipetas capilares (Fig. 6); en analisis cuantitativo las - muestras son aplicadas ya sea en forma de bandas angostas o manchas, la aplicaci3n en forma de bandas angostas propo- ciona separaciones mejor definidas y facilita el cuanteo. En este tipo de analisis pueden usarse microjeringas (Fig. 7) o aplicadores como el Tasomat (Fig. 8). En Cromatografia - preparativa las muestras son aplicadas en forma de bandas lar- gas usando el Chromatocharger (Fig. 9)

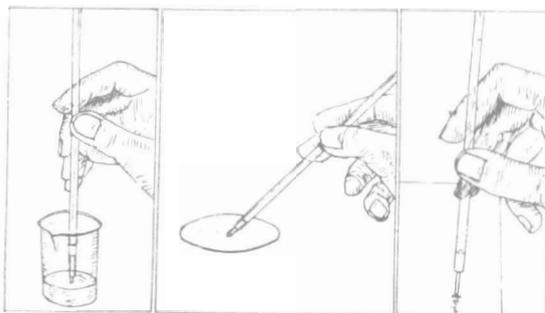


Fig. 6 MICROPIPETAS CAPILARES

MICROPIPETAS CAPILARES. Mostradas en la Fig. 6, con- tan de un mango y de una punta capilar de medici3n, las dos partes son conectadas por una uni3n de vidrio esmerilado. Se coloca la punta sobre la soluci3n muestra y se llena au- tom3ticamente por acci3n capilar, se limpia con un papel -- filtro el exceso y se hace la aplicaci3n.

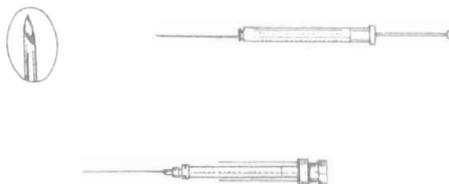


Fig. 7 MICROJERINGAS

MICROJERINGAS. En la actualidad se cuenta con jeringas (Fig. 7) con émbolos de acero inoxidable o teflón y con agujas hipodérmicas intercambiables, las hay de 1-500ul, las más usadas son de 1, 2.5 y 5 ul. La exactitud y reproducibilidad de estas jeringas es de 99%. Es recomendable el uso de jeringas con guía, especialmente en caso de que la persona se esté iniciando en la técnica.

APLICADOR TASOMAT DESAGA. El aplicador automático de Desaga (Fig 8) es un instrumento que emplea una combinación de principios de separación, además de la separación cromatográfica. Consta de una unidad de control que permite la aplicación directa después de una destilación, sublimación o pirolisis de la muestra; la cromatoplaque se mueve a lo largo de la salida del capilar. Después del desarrollo de la cromatoplaque se obtiene el llamado "termofractograma".

Por este procedimiento primeramente se fraccionan los productos y salen de acuerdo a su presión de vapor y/o su estabilidad térmica, y la cromatografía en sí separa a los componentes de acuerdo a sus propiedades cromatográficas.

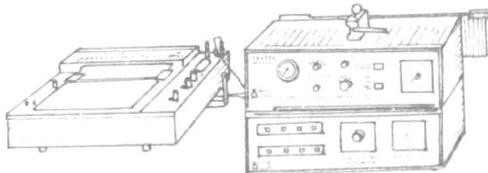


Fig. 8 APLICADOR TASOMAT DESAGA

CHROMATOCHARGER. El instrumento (Fig. 9) proporciona aplicaciones de muestra perfectamente uniformes, la aplicación puede hacerse en forma de bandas largas en Cromatografía preparativa o en bandas cortas en aplicaciones cuantitativas. Para su uso se coloca la cromatoplaque sobre la base del Chromatocharger, se ajusta la posición vertical de la jeringa y la punta de la aguja a 1-3 mm sobre la superficie de la cromatoplaque. El ancho de la banda se ajusta con dos topes y la cantidad de muestra se controla por medio de la inclinación del dosificador. Cualquier exceso de solución que quede en la aguja cuando llega al final de la barra se elimina colocando un papel filtro entre la placa y la aguja.

Cuando la aplicación se hace con una micropipeta o una microjeringa es necesario usar una guía de aplicación Fig. 10)

GUIA DE APLICACION. Con la guía (Fig 10) se obtiene una

aplicación adecuada y precisa de las muestras sobre la cromatoplaaca sin dañarla; las hay de 20 cm con 11 hendiduras y también de 10 cm,

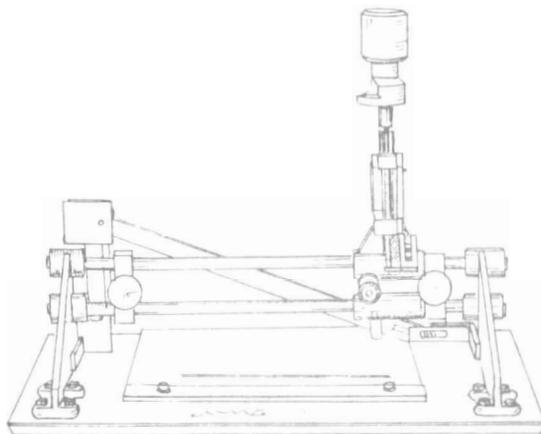


Fig. 9 CHROMATOCHARGER

GUIA DE APLICACION MULTIPLE. La guía de aplicación múltiple (Fig. 11) consta de una base (a), una reglilla (b), una espátula (c) y un lápiz con punta metálica (d). Uno de los lados de la reglilla se usa para una aplicación exacta de la muestra cuando la cromatoplaaca va a desarrollarse en la cámara V-ri-KS, para la aplicación de 10 muestras la pipeta se coloca en las hendiduras y si la aplicación es de solamente 5 muestras, la pipeta se guía por los orificios.

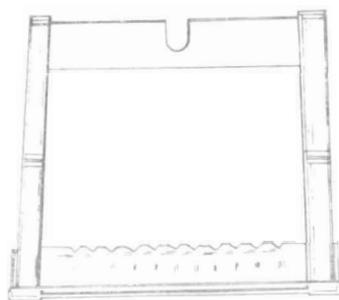


Fig. 10 GUIA DE APLICACION

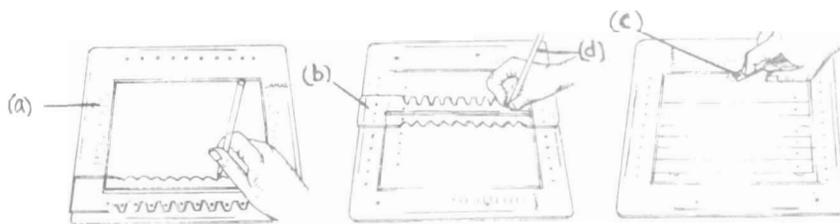


Fig. 11 GUIA DE APLICACION MULTIPLE

La línea para limitar la distancia de recorrido del solvente y entre un solvente y otro cuando se usa la cámara Vario MS, se traza a lo largo de la rendija de la guía de aplicación.

EQUIPO PARA EL DESARROLLO CROMATOGRAFICO.

El desarrollo cromatográfico es el paso del solvente a través de la cromatoplaca, puede efectuarse en varios tipos de cámaras. La cámara clásica corresponde al tipo más sencillo.

CAMARA CLASICA. En la cámara clásica (Fig. 12) el cromatograma se desarrolla bajo condiciones de saturación parcial o total, el grado de presaturación de la cromatoplaca no puede controlarse. Durante el desarrollo la cromatoplaca se sumerge del lado de la aplicación en el solvente apropiado, el cual asciende por capilaridad. Cuando el solvente alcanza la altura adecuada el desarrollo ha terminado.

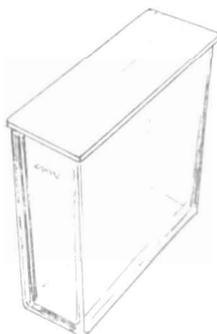


Fig. 12 CAMARA CLASICA

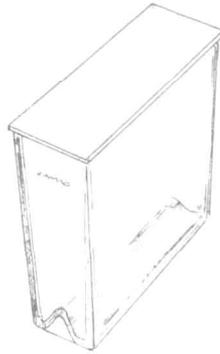


Fig. 13 CAMARA DE DESAPROLLO GEMELA

CAMARA GEMELA. La cámara gemela difiere de la clásica únicamente por su doble compartimento para el solvente es recomendable su uso cuando es necesario procesar dos cromatoplasas en las mismas condiciones.

CAMARA SANDWICH. Al usar la cámara Sandwich la cromatoplasa debe raspase de tres de sus orillas ya que se sujeta con otra placa de vidrio por medio de unos clips y con un separador de cartón. Las placas ya sujetas se introducen en el recipiente del solvente através de una abertura de la tapa metálica.

Al usar esta cámara, los resultados de la separación son semejantes que al usar la cámara clásica, el tiempo de separación es también parecido, la ventaja se tiene en el ahorro considerable de solventes.

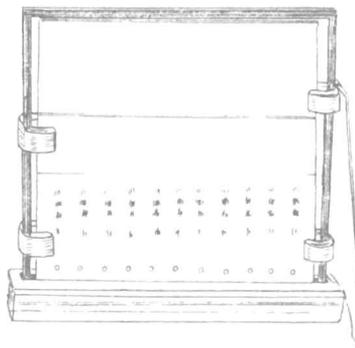


Fig. 14 CAMARA SANDWICH

CAMARA DE DESARROLLO VP DESAGA. Esta cámara (Fig.15) permite controlar y variar el vapor ambiental con objeto de mejorar las separaciones. La cámara VP consta de un bloque de metal con 21 compartimentos cada uno de los cuales puede llenarse con un líquido diferente formando 21 tipos de vapores ambientales. El solvente de desarrollo es alimentado por medio de una mecha de papel filtro su-
mergida en el recipiente del solvente. La cámara cuenta con un sistema refrigerante en la parte inferior y en algunas ocasiones la evaporación se incrementa haciendo circular aire caliente. La cámara es similar en su constitución a la cámara Vario-KS y cuando en esta última se habla de preacondicionamiento con vapores de solventes, en la cámara VP se trata de programación de vapor, pero pueden usarse indistintamente.

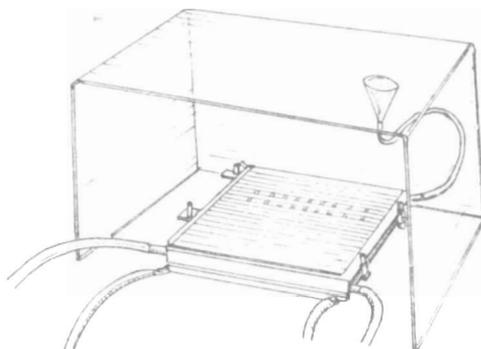


Fig. 15 CAMARA DE DESARROLLO-VP DESAGA

CAMARA DE DESARROLLO MULTIPLE PROGRAMADO (DMP). En la cámara DPM (Fig. 16) las cromatoplacas se desarrollan repetidamente un número determinado de veces de una manera automática por medio de un programador. El sistema es manufacturado y vendido por Regis Chemical Company. En cada desarrollo se le permite al solvente que avance más arriba para evitar que los componentes con valores altos de R_f queden con el frente del solvente, al final de cada ciclo el frente del solvente es forzado a retroceder por evaporación mientras la cromatoplaca está aún en contacto con el recipiente del solvente. La evaporación se incrementa por medio de energía radiante y/o un flujo de gas inerte, mientras el flujo capilar hacia arriba continúa. Este efecto de concentración ocurre dos veces durante cada ciclo, una vez cuando el solvente sube y otra cuando -desciende a través del componente, lo cual ocasiona un incremento en la resolución.

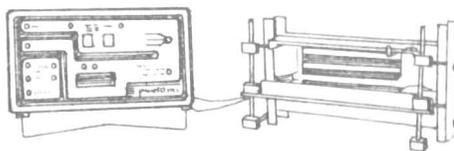


Fig. 16 CAMARA DE DESARROLLO MULTIPLE PROGRAMADO

CAMARA VARIO-KS. Con la cámara Vario-KS (Fig.17) es posible establecer un determinado grado de actividad o bien precondicionar las cromatoplacas con algún solvente adecuado. La cromatoplaca raspada de tres de sus lados se coloca con la capa de adsorbente hacia el cuerpo de la cámara y se pone en contacto con vapores de los solventes de precondicionamiento colocados en una charola.

Después del precondicionamiento se coloca una placa metálica entre la cromatoplaca y los vapores del solvente, y se inicia el desarrollo usando una mecha de papel para hacer contacto.

COMPONENTES DE LA CAMARA VARIO-KS. La cámara consta de cuatro diferentes recipientes con subdivisiones que varían en geometría y tamaño que pueden colocarse en forma paralela o en ángulo recto a la Cromatografía (a), tres placas de aislamiento (b) parcial o total, el recipiente del solvente (c) y el cuerpo de la cámara (d).

La placa con ventana se usa para checar la influencia del tiempo en el precondicionamiento. La placa plana permite el reemplazamiento del recipiente sin quitar la cromatoplaca.

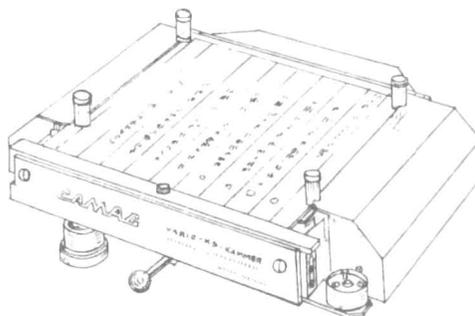


Fig. 17 CAMARA VARIO-KS

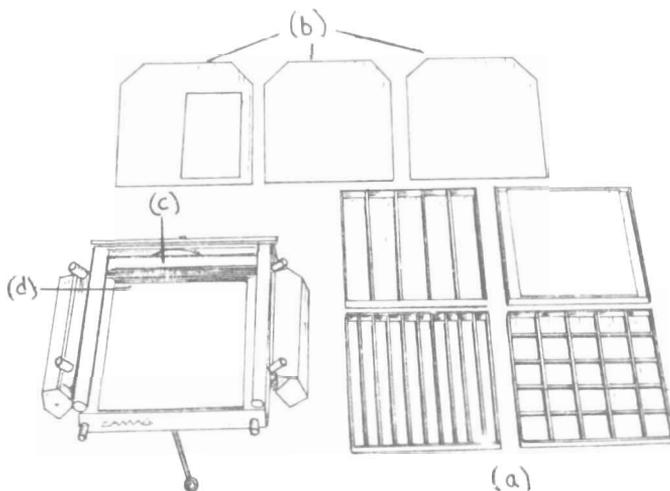


Fig. 18 COMPONENTES DE LA CAMARA VARIO-KS.

CAMARA "U". En la actualidad la cámara "U" (Fig. 19) es la más moderna utilizada en la técnica de Cromatografía de alta resolución en capa delgada, se encuentra formando parte del primer cromatógrafo de capa delgada, junto con el nanomat, una unidad de control, un anillo portaplacas y un block para la aplicación de la muestra (Fig. 20).

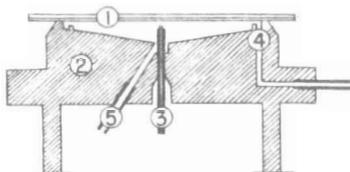


Fig. 19 ESQUEMA DE TRABAJO DE LA CAMARA "U".

La cromatoplaaca de alta resolución se coloca en el anillo portaplacas para la aplicación de la muestra, eeseguida se pone en la cámara en "U" con la capa adsorbente hacia abajo (1), el solvente de elución es alimentado hacia el centro de la cromatoplaaca por un capilar de platino-iridio (3) de

0.2 mm de diámetro interno. La fase vapor producida en el exterior pasa por la cámara hacia la cromatoplaaca por medio de un canal circular para salir por medio de un orificio que se encuentra en el centro de la cámara (5).

Las cromatoplacas en el portaplacas pueden evaluarse automáticamente, después de la separación, la cromatoplaaca se seca y se coloca en un accesorio del densitómetro quedando lista para la cuantificación.

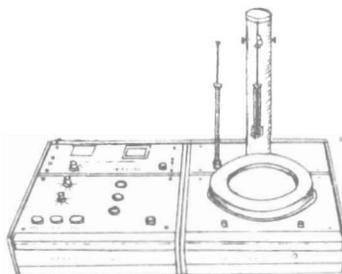


Fig. 20 CROMATOGRAFO DE CAPA DELGADA

CROMATOGRAFO DE CAPA DELGADA. Con este sistema (Fig 20) es posible tener un control completo sobre las fases - (estacionaria, móvil y vapor) del proceso cromatográfico, una alimentación de la fase móvil con una velocidad de flujo constante, separaciones con mayor resolución y por lo tanto, valores de R_f más reproducibles.

La información obtenida con este sistema puede ser transformada a datos aplicables en Cromatografía de columna y Cromatografía de líquidos de alta resolución.

El tiempo requerido para el desarrollo de un cromatograma varía de 1-4 minutos y el consumo de solvente entre 0.07 y 0.2 ml.

EQUIPO PARA LA VISUALIZACION DEL CROMATOGRAMA

El método más común consiste en rociar la cromatoplaaca con un reactivo químico usando un simple atomizador de vidrio (Fig. 21)

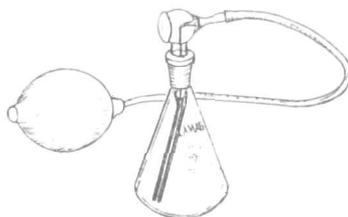


Fig. 21 ATOMIZADOR DE VIDRIO

ATOMIZADOR DE VIDRIO. Consta de un matraz erlenmeyer de 120 ml (a), una cabeza rociadora con un tubo que se introduce en la solución reveladora (b), con uniones esmeriladas y una perilla de hule (c). Proporciona un fino spray, puede usarse cualquier reactivo y es especialmente útil si se trabaja con reactivos corrosivos.

Debe tenerse especial cuidado con la cabeza rociadora después de cada uso debe lavarse perfectamente con un solvente que elimine cualquier residuo del material utilizado.

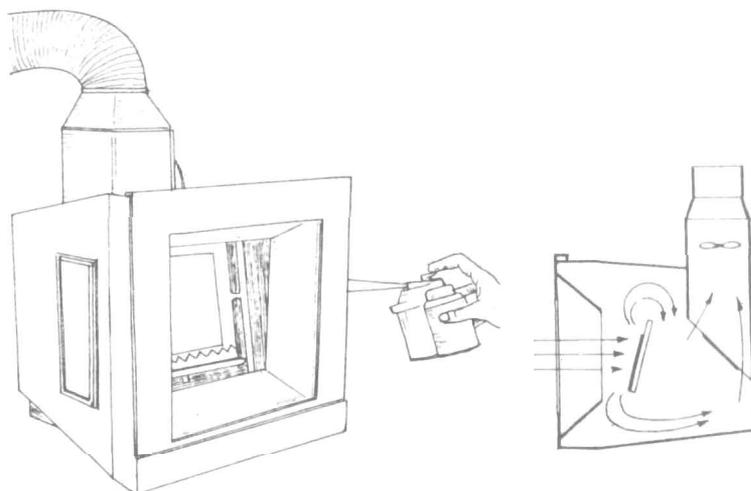


Fig. 22 GABINETE PARA GASES Y VAPORES

GABINETE PARA GASES Y VAPORES. El gabinete para gases y vapores (Fig. 22) es de gran utilidad para evitar la contaminación del laboratorio ya que elimina perfectamente todo el exceso del reactivo en spray. Puede considerarse indispensable en un laboratorio donde se trabaja con la técnica cromatográfica debido a que una campana de extracción normal no es suficiente y expone al operador a peligros de contaminación.

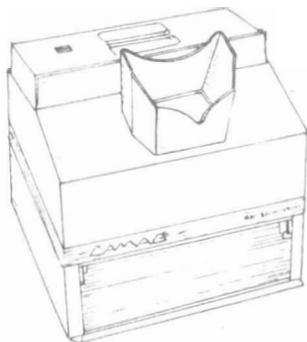


Fig. 23 LAMPARA DE UV.

LAMPARA UV. Las sustancias orgánicas que absorben o emiten luz UV, pueden detectarse usando la lámpara de luz ultravioleta para Cromatografía en capa delgada (Fig. 23)

La longitud de onda larga (366 nm) se usa para identificar sustancias con fluorescencia inherente o inducida. Con longitud de onda corta (254) nm, pueden visualizarse sustancias que absorben a esa longitud de onda apareciendo como manchas oscuras sobre un fondo brillante cuando la cromatoplaaca contiene un indicador fluorescente.

En la evaluación de cromatogramas es esencial tener una lámpara con las dos longitudes de onda.

Los cromatogramas se colocan en el interior del gabinete, lo cual evita que penetre la luz exterior, además un filtro de vidrio impide el paso de luz ultravioleta protegiendo los ojos durante la inspección del cromatograma.

EQUIPO PARA LA DOCUMENTACION DE LOS CROMATOGRAMAS

En un gran número de casos es necesario archivar los resultados de una separación; guardar las cromatoplasmas no resulta conveniente ya que la mayoría de las cromatoplasmas se deterioran con el tiempo, además de que las coloraciones tienden a desaparecer, lo más conveniente es : a). _ usar un papel delgado y sacar una copia de la separación, - b). _ sacar una fotocopia y c). _ sacar una fotografía.

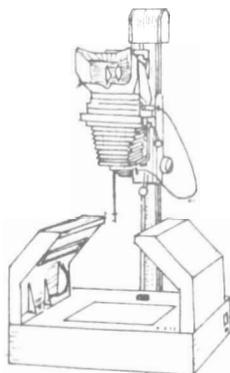


Fig. 24 CAMARA REPOSTAR.

CAMARA FOTOGRAFICA REPOSTAR. La cámara Reprostar (Fig. 24) asegura fotografías perfectas de separaciones cromatográficas bajo luz visible, bajo luz UV de onda corta y de onda larga.

Consta de una base que tiene en su interior cuatro fuentes de luz visible, dos tubos fluorescentes para longitud de onda larga y uno para longitud de onda corta, un filtro de luz, dos reflectores que pueden ser acomodados para luz visible, una columna que sirve para sostener la cámara y una cámara polaroid.

Después de colocar la cromatoplasma sobre la base y seleccionar el tipo de luz, se coloca la cámara a una altura correcta. Después de la exposición, si se usa una cámara polaroid la fotografía está lista en unos cuantos segundos.

EQUIPO PARA ANALISIS CUANTITATIVO

Existen dos métodos generales para cuantificación:

a) Método directo sobre la cromatoplaca

En este procedimiento se utilizan los llamados Scanners que acoplados con espectrofotómetros o fluorómetros son una especie de densitómetros, pero más sofisticados y precisos - como el Scanner Camag (Fig. 25) que combinado con un fluorómetro Turner permite el cuanteo de compuestos que absorben en la región visible, U.V y sustancias fluorescentes nativas o inducidas.

Los Scanner han sido usados con gran éxito especialmente en la Industria químico-farmacéutica en análisis rutinarios de vitaminas, drogas, esteroides, etc. En trabajos de investigación es un aparato valiosísimo, lo mismo en trabajo biomédico y clínico.

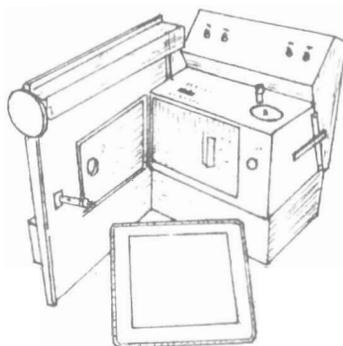


Fig. 25 SCANNER CAMAG ACOPLADO A UN FLUOROMETRO

Al cuantear por este método es necesario contar con un registrador (Fig. 26) el cual hace que la señal del detector amplificada sea representada en forma de picos o cromatogramas.

Una vez que los resultados se tienen en un cromatograma es necesario usar los métodos normales para la medición de áreas, como son:

a) El método de pesadas que consiste en cortar y pesar el papel bajo el pico, este método es medianamente exacto ya que puede haber errores debido al contenido de humedad y variación en el grosor del papel.

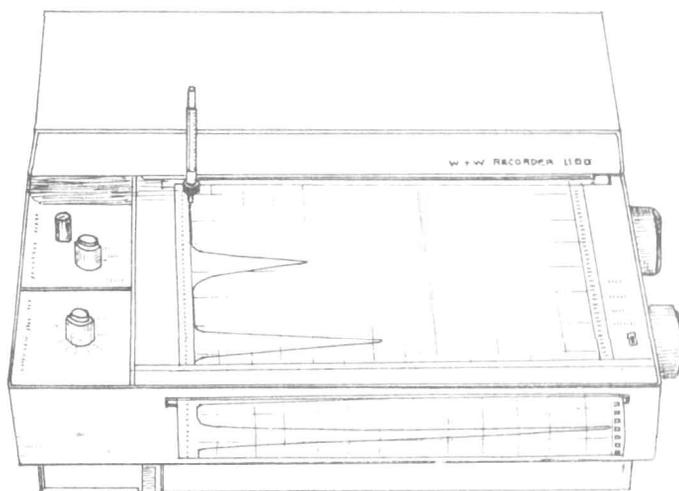


Fig. 26 REGISTRADOR

b) El método de triangulación basado en la medición del área de un triángulo si el pico es simétrico.

c) el método de integración usando integradores mecánicos o automáticos, entre los mecánicos se tiene el integrador de disco, éste es un accesorio que se adapta directamente al registrador. cuando la plumilla del registrador empieza su trazado simultáneamente la plumilla del integrador empieza a efectuar una serie de trazos en un extremo de la escala y exactamente abajo de cada pico que dan una serie de líneas. A cada línea se le da un viaje y se le ha dado un valor arbitrario de 100 "cuentas" a cada viaje, de manera que el número de cuentas bajo un pico expresa la concentración del compuesto correspondiente -- (Fig 27). De esta manera los resultados cuantitativos son obtenidos rápida y fácilmente.

Los integradores electrónicos son mecanismos que --- imprimen automáticamente el área del pico o la concentración, además de ofrecer una gran precisión, los integradores electrónicos automatizan la operación.

SCANNER LB-276. Shandon Southern Instruments Inc. - ha introducido el Scanner LB-276 (Fig. 28) que permite -- la evaluación cuantitativa en una y en dos dimensiones. el sistema cuenta las partículas beta que son emitidas -- por los compuestos isotópicamente lábiles con un contador de flujo que mide las descargas por minuto y puede detec-

tar cantidades tan pequeñas como 100 dpm's de carbón. la salida del medidor está unida a un registrador con escala xy en la cual se registra la posición de la sustancia en el cromatograma para medir los valores de Rf con mayor exactitud en el registro.

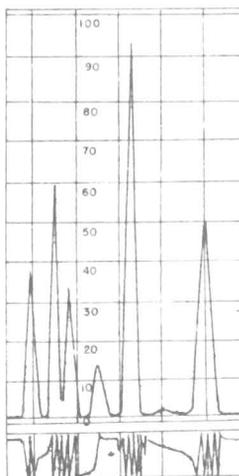


Fig. 27 INTEGRADOR DE DISCO

Carl Zeiss, Inc. ha actualizado los espectrodensitómetros, por ejemplo el modelo KM-3 hace mediciones de transmitancia y reflectancia simultáneamente, suaviza la línea base y corrige las fluctuaciones debidas a las dispersiones de las manchas, minimiza el ruido e incrementa la precisión y los límites de detección, además usa escala de expansión en el registrador.

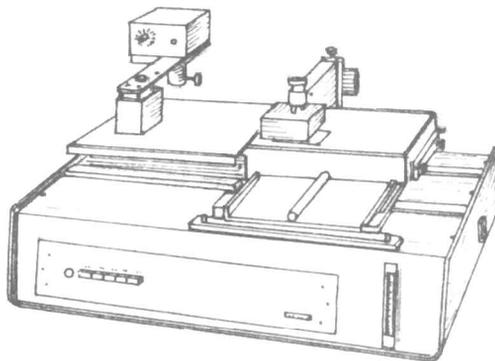


Fig. 28 SCANNER LB-276

Actualmente Schoeffet Instrument Corporation ha introducido al Scanner un monocromador con posibilidades de barrido que permite obtener el espectro de emisión de fluorescencia y de absorción de los compuestos separados directamente de la cromatoplaca.

SISTEMA INTEGRADO KONTES. La Compañía Kontes Glass ha diseñado un sistema cromatográfico para análisis cuantitativo, consta de un aplicador y un densitómetro (Fig. 29). El equipo aplica pequeñas cantidades de muestra y mantiene el tamaño de la mancha pequeño por medio de una rápida evaporación del solvente haciendo pasar una corriente de gas inerte, y con reproducibilidades del 98 %. Después del desarrollo convencional y del secado, se pasa al densitómetro que puede medir reflectancia, transmitancia o fluorescencia de la muestra. Emplea filtros de 200-750 nm, la salida del densitómetro se conecta a un corrector de la línea base y enseguida a un registrador o al integrador digital Kontes con impresor. El modelo K-21 tiene un sistema de computación con memoria permanente que permite cálculos subsecuentes.

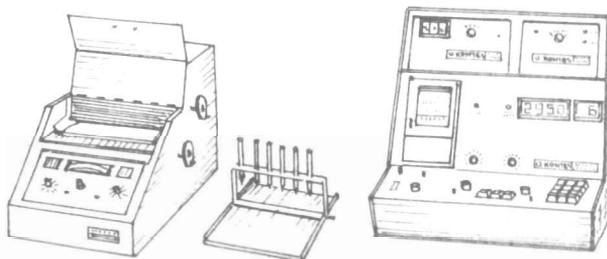


Fig. 29 SISTEMA INTEGRADO KONTES

B) Determinación por elución.

Para cuantificación, los resultados más precisos se obtienen por elución de los compuestos con un solvente adecuado y posteriormente determinar su concentración por fotometría. El Eluchrom Camag está diseñado para la elución automática cuantitativa de las zonas directamente de la cromatoplaca sin tener que raspar el adsorbente.

ELUCHROM. El equipo (Fig. 30) consta de seis jeringas que se llenan con el solvente de elución con válvu-

las individuales conectadas al recipiente que contiene el solvente(a). Una base donde se coloca la cromatoplaaca (b), Una placa que se coloca abajo de la cromatoplaaca y que ayuda a presionarla (c), cabezales de plástico donde entra el líquido de elución y sale la sustancia eluida (d), un soporte que se coloca sobre los cabezales (e), y tubos de vidrio donde son recogidas las muestras eluidas (f).

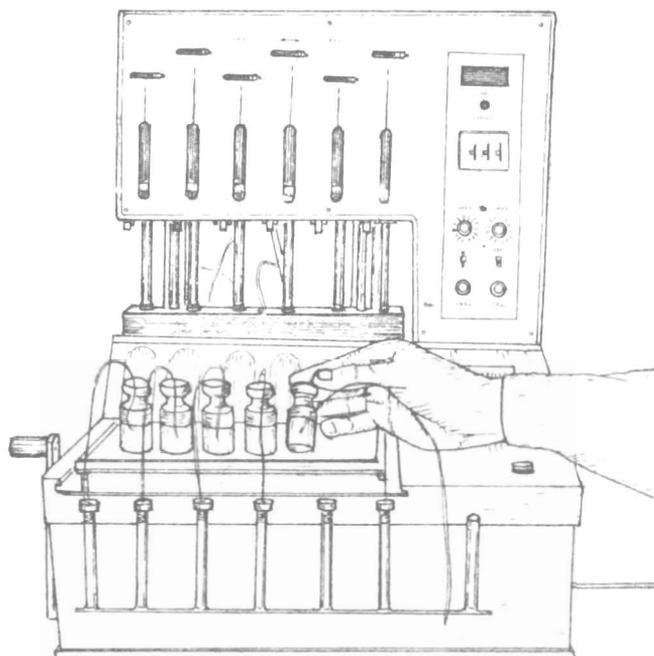


Fig. 30 ELUCHROM

Como requisitos para la elución las sustancias deben estar separadas una distancia mayor de 2.5 cm una de otra y su diámetro no debe ser mayor de 2 cm para cada zona eluida.

Después de la elución, las cubetas con los extractos se separan del Eluchrom para su medición fotométrica. Dependiendo de la velocidad de elución seleccionada, un ciclo completo tarda aproximadamente 30 minutos.

CAPITULO III

DETERMINACIONES EXPERIMENTALES

PREPARACION DE CROMATOPLACAS DE CELULOSA

En el comercio se encuentran disponibles cromatoplasmas de muy variados tipos, así como los materiales adsorbentes para su preparación. Preparándolas en el laboratorio además del ahorro en dinero, pueden seleccionarse de una manera más amplia los materiales y reactivos para la preparación de cromatoplasmas más adecuadas para un determinado método.

Material y equipo:

- a) Aplicador manual para cromatoplasmas
- b) Placas de vidrio de 20 x 20 cm y de 10 x 20 cm
- c) Celulosa microcristalina DS-5, Camag (45 g)
- d) Acetona o alcohol etílico (25 ml)
- e) Agua destilada
- f) Vaso de precipitados
- g) Agitador de vidrio

Procedimiento:

Se probarán espesores de 0.5 y 0.3 mm. Se lavan perfectamente las placas de vidrio con agua y jabón, se secan y se limpian con acetona o alcohol etílico para eliminar cualquier vestigio de grasa. Por otra parte se prepara la pasta en el vaso de precipitados mezclando 45 de celulosa con 220 ml de agua obteniéndose una pasta ligeramente espesa. Se pasa rápidamente la pasta al recipiente del aplicador habiendo seleccionado previamente el espesor con la barra fija (0.3 y 0.5 mm). Antes de pasar la pasta al recipiente se acomodó una placa abajo de él. Enseguida se empujan las placas de vidrio una tras otra de una manera rápida y uniforme.

Resultados:

Las cromatoplaques de 0.3 mm son irregulares en la capa de adsorbente y no pueden usarse.

Las cromatoplaques de 0.5 mm son satisfactorias.

Conclusiones:

El espesor mínimo adecuado para cromatoplaques de celulosa con este tipo de adsorbente y con este aplicador es de 0.5 mm.

Observaciones:

La celulosa tiende fácilmente a sedimentarse, por lo que se recomienda mezclar la pasta inmediatamente antes de pasarla al recipiente del aplicador.

SEPARACION DE VITAMINAS HIDROSOLUBLES EN UN COMPLEJO VITAMINICO

El uso de la cromatografía en capa delgada en la Industria Farmacéutica es una de las aplicaciones más importantes de la técnica, ya que este tipo de industria tiene el compromiso legal y moral de llevar un control total de calidad de sus productos y de mejorar la sensibilidad de sus métodos analíticos. En este aspecto, sobre todo en los últimos 10 años la Cromatografía en capa delgada ha sido firmemente aceptada como un método de rutina universal.

El producto a analizar contiene las siguientes vitaminas:

Mohidrato de tiamina, Vit. B₁
Riboflavina, Vit. B₂
Nicotinamida
Pantotenato de calcio
Clorhidrato de piridoxina, Vit. B₆
Cianocobalamina, Vit. B₁₂
Acido ascórbico, Vit C

Material y equipo:

- a) Cromatoplaques de silicagel con indicador UV sin activar
- b) Guía de aplicación de 20 cm
- c) Microjeringa de 2 ul
- d) Cámara de desarrollo clásico
- e) Lámpara de UV de 254 y 366 nm
- f) Nebulizador de vidrio
- g) Campana de extracción

Reactivos:

- a) Metanol puro
- b) Solución eluyente: Benceno, metanol, acetona, ác. acético glacial (70:20:5:)
- c) Solución de yodoplatinato de potasio. Se mezclan 45 ml de solución al 10 % de yoduro de potasio con 5 ml de cloruro de platino al 5 % y se afora a 100 ml.
- d) Solución al 0.1 % de clorimida de dicloroquinona en etanol.
- e) Ninhidrina al 0.5 % en etanol.

Preparación de la muestra:

Se tritura una grajea en un mortero, se disuelve en 5 ml de metanol puro y se filtra. Los preparados de cápsulas se disuelven directamente en el metanol.

Procedimiento:

Se hacen aplicaciones de 0.5 µl de soluciones estándar de cada vitamina y cuatro aplicaciones de muestra de 2 µl. Después de la aplicación se deja evaporar el solvente por unos minutos y se inicia el desarrollo en una cámara clásica - sin saturar. El trayecto del solvente debe ser de 18 cm en la oscuridad.

Se saca la cromatoplaque, se deja evaporar 15 minutos en la campana de extracción y 10 minutos en la estufa a 90°C.

Visualización:

La vitamina B₂ se reconoce bajo luz UV de longitud de onda larga como una mancha amarillo fluorescente.

Las vitaminas B₁, C y la nicotinamida son visibles como manchas oscuras sobre un fondo fluorescente al observarse bajo luz UV de longitud de onda corta (254 nm).

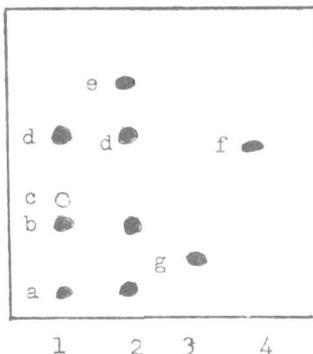
Para la identificación de la biotina, se rocía con la solución de yodoplatinato de potasio una banda tapando el resto de la cromatoplaque. La biotina aparece blanca sobre un fondo rosa después de media hora, se ven además la vitamina B₁ de color gris, la nicotinamida débilmente amarilla y la vitamina C de amarillo más intenso.

Otra banda se usa para la identificación de la vitamina B₆, se rocía la banda con la solución de clorimida de dicloroquinona, se deja reposar 10 minutos y se expone a vapores de amoníaco, la biotina se revela como una mancha de color azul.

Después se calienta el cromatograma a 160 °C durante 30 minutos y se rocía en caliente la otra banda con la solución de ninhidrina al 0.5 % en etanol, se vuelve a calentar durante un período más corto y el pantotenato de calcio se revela como una mancha violeta.

Resultados:

La separación obtenida se muestra en el siguiente esquema:



SEPARACION CROMATOGRAFICA DE VITAMINAS

Valores de Rf.

- a).- Vitamina B₁ - 0.000
- b).- Vitamina C¹ - 0.272
- c).- Vitamina B₂ - 0.315
- d).- Nicotinamida - 0.580
- e).- Biotina - 0.758
- f).- Pantotenato de calcio - 0.520
- g).- Vitamina B₆ - 0.120

Conclusiones:

En algunos casos la visualización de una separación cromatográfica, es necesario recurrir a varios métodos de detección o también a una combinación de ellos.

Observaciones:

Cuando se emplean varios métodos o reactivos de detección como en el ejemplo, se hacen varias aplicaciones y se visualiza en bandas, una para cada método. Sobre todo para análisis cuantitativo.

IDENTIFICACION DE ANALGESICOS

La Cromatografía en capa delgada se utiliza también en la Industria Farmacéutica de una manera semicuantitativa, por ejemplo, se checa que una impureza conocida se mantenga abajo de ciertos niveles de la siguiente manera: Se cromatografía la muestra y el estándar por separado en la misma cromatoplaque y después del desarrollo se compara el tamaño de las manchas para juzgar si la impureza excede o no los límites establecidos.

La muestra a analizar contiene los siguientes analgésicos:

Cafeína
Fenacetina
Acido acetilsalicílico

Material y equipo:

- a) Cromatoplaques de silicagel con aglutinante e indicador
- b) Guía de aplicación de 20 cm
- c) Microjeringa de 5 μ l
- d) Cámara de desarrollo Sandwich
- e) Lámpara ultravioleta de onda corta (254 nm)

Reactivos:

- a) Metanol
- b) Solución de desarrollo: Benceno, éter etílico, ácido acético glacial, metanol (120:60:18:1)

Preparación de la muestra:

La muestra se tritura en un mortero, se disuelve en 5 ml de metanol y se filtra.

Procedimiento:

En una cromatoplaque se aplican cada uno de los estándares (1 μ l) y en otra se aplican distintas cantidades de muestra para checar variaciones en los valores de R_f con distintas cantidades de muestra, 0.5, 1.0, 1.5 y 2.5 μ l. Se deja evaporar el solvente de la muestra, se forma el sandwich - con otra placa de vidrio, se sostiene con pinzas y se introduce el el recipiente del solvente.

El desarrollo tarda entre 45 y 60 minutos, viajando el solvente una distancia de 12 cm. se saca la cromatoplaque,

se deja evaporar el solvente y se observa bajo luz ultravioleta de onda corta (254 nm). Los compuestos aparecen como zonas oscuras.

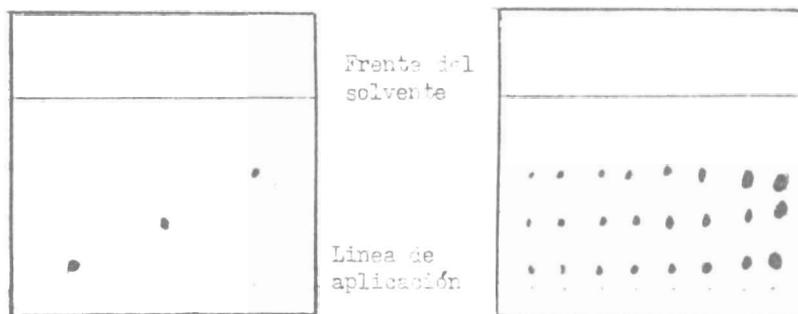
Visualización:

Los tres compuestos son visualizados observando la cromatoplaaca bajo luz UV de 254 nm.

Después de la separación y visualización, se calculan los valores de Rf y se procede a la identificación de los componentes por medio de tablas o cromatografiando compuestos estándar.

Resultados:

La separación cromatográfica obtenida se representa en el siguiente esquema:



Valores de Rf

Cantidad de muestra (ul)	Cafeína	Fenacetina	Ac acetilsalicílico.
0.5	0.115	0.388	0.630
1.0	0.115	0.384	0.630
1.5	0.115	0.384	0.630
2.0	0.115	0.400	0.634
2.5	0.115	0.404	0.638
5.0	0.115	0.408	0.638
7.5	0.123	0.415	0.623
10.0	0.130	0.415	0.615

Conclusiones:

Los valores de Rf varían ligeramente con la cantidad de muestra empleada. El modo de variación depende del tipo de compuesto. Por lo tanto, si cabe alguna duda con respecto a la identificación por medio de los valores de Rf, es recomendable comprobarla por medio de compuestos estándar.

Observaciones:

Antes de observar bajo luz UV es recomendable eliminar primero todos los vapores del solvente, de otra manera suelen aparecer dos frentes del solvente o puntos fluorescentes en la cromatoplaca. El doble frente puede ser debido también a que la proporción de solventes en el sistema de desarrollo no es correcta.

SEPARACION Y CUANTIFICACION DE FENILALANINA EN UNA MEZCLA DE AMINOACIDOS

La determinación de aminoácidos contenidos en las proteínas de los alimentos es de gran interés, especialmente en los últimos años después de reconocer su importancia con respecto a la especificidad nutritiva que juegan ciertos aminoácidos en el crecimiento, en la reproducción, en la lactancia del hombre y de otros animales. Actualmente el análisis de aminoácidos es común en alfalfa, algodón, arroz, avena, cacahuete, carne, cebada, centeno, trigo etc.

Los aminoácidos pueden analizarse por Cromatografía de papel, de capa delgada, de gases (formando derivados previamente), de líquidos de alta presión, etc. Por Cromatografía en capa delgada se obtienen separaciones con buena resolución y alta reproducibilidad, la técnica es bastante sencilla y actualmente es posible obtener resultados cuantitativos con la exactitud y precisión que los obtenidos por técnicas más sofisticadas como la Cromatografía de líquidos de alta presión.

Material y equipo:

- a).- Cromatoplacas de celulosa microcristalina DS-0 Camag de 0.5 mm de espesor y de 20 x 20 cm.
- b).- Cámara de desarrollo clásica
- c).- Guía de aplicación
- d).- Microjeringa de 5 ul
- e).- Nebulizador de vidrio
- f).- Estufa de secado
- g).- Densitómetro
- h).- Registrador
- i).- Integrador de disco

Reactivos :

- a) Soluciones estándar de fenilalanina de 0.2, 0.4, 0.8, 1.2, 1.6 y 3.2 % en isopropanol al 10%
- b) Solvente I: Cloroformo, metanol, hidróxido de amonio al 17% de NH_3 (2:2:1)
- c) Solvente II: Metanol, agua, piridina (20:5:1)
- d) Revelador: Ninhidrina al 0.3% en n-butanol con 3 ml de ácido acético glacial
- e) Isopropanol al 10%
- f) Solución de elución: 5 mg de sulfato de cobre se disuelven en 100 ml de etanol al 80%

Procedimiento :

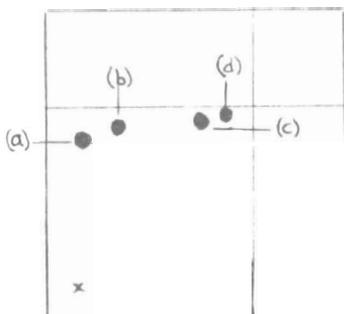
En una de las cromatoplasmas se hacen aplicaciones de fenilalanina de 5 , 10, 20, 30, 40 y 80 μg , se deja evaporar el isopropanol y se coloca en la cámara de desarrollo saturada por una hora con el solvente I. Cuando el frente del solvente recorre una distancia de 12cm se saca la cromatoplasma, se deja evaporar el solvente a temperatura ambiente durante 15 minutos y luego se calienta a 90°C durante 15 minutos para completar la evaporación.

En otra cromatoplasma, en el extremo inferior izquierdo se aplica la solución mezcla conteniendo fenilalanina, histidina, lisina y leucina. La aplicación se hace de 2.5 μl de la solución de concentración desconocida. Se coloca la cromatoplasma en la cámara de desarrollo saturada por una hora con el solvente de primera dimensión, se deja que el solvente suba una distancia de 12cm marcada con anterioridad. Después de terminado el desarrollo se deja evaporar calentando cuidadosamente y se inicia el segundo desarrollo en dirección perpendicular al primero.

El revelado se hace rociando la cromatoplasma con la solución de ninhidrina, de una manera uniforme a una distancia de 30 cm aproximadamente. Las zonas de los aminoácidos se revelan como manchas de color violeta después de calentamiento a 110°C durante 20 minutos.

RESULTADOS :

La separación obtenida se ilustra en el esquema de separación bidimensional de aminoácidos.



SEPARACION BIDIMENSIONAL DE AMINOACIDOS

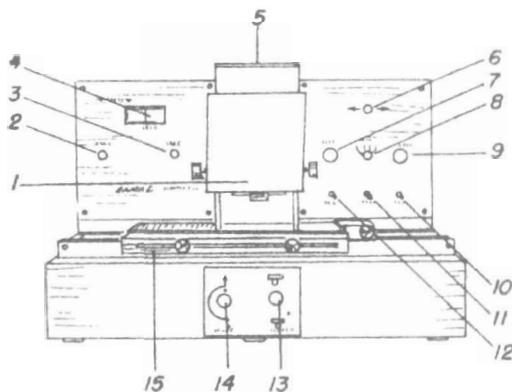
VALORES DE R_f

1a. Dimensión	2a. Dimensión
a) Lisina - 0.836	Lisina = 0.030
b) Histidina - 0.865	Histidina - 0.255
c) Fenilalanina - 0.943	Fenilalanina- 0.721
d) Leucina - 0.952	Leucina - 0.824

CUANTIFICACION POR DENSITOMETRIA

La Densitometría es un método en el cual, la absorción o fluorescencia de una sustancia puede ser determinada directamente de la cromatoplaca. En cuantificación de sustancias coloreadas pueden utilizarse un densitómetro que mida la absorción de luz en la región visible.

El densitómetro usado se ilustra en el siguiente esquema :



DENSITOMETRO

(1) Protector de luz, (2) Botón para la colocación del cero, (3) Botón para la colocación del 100% A, (4) Medidor para la colocación del cero, (5) Compartimiento para la fuente de luz, sistema óptico y fotosensor, (6) Selector para la dirección de barrido, (7) Botón para finalizar el barrido, (8) Selector de la velocidad, (9) Botón para iniciar, (10) Interruptor maestro, (11) Interruptor para el retorno automático de la placa, (12) Interruptor para el cruce automático de la placa, (13) Botón para fijar y soltar la cromatoplaca, (14) Botón de enfoque, (15) placa móvil.

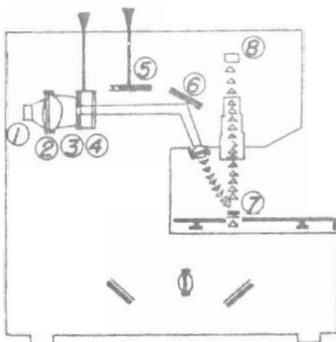


DIAGRAMA DEL SISTEMA OPTICO

(1) Fuente de luz, (2) Colimador, (3) Apertura de la rendija, (4) Filtro, (5) Espejo rotatorio, (6) Espejo fijo, (7) Cromatoplaca, (8) Fotosensor.

Procedimiento :

1._ Se conecta el interruptor maestro, se hace móvil la placa de barrido y se empuja hacia la derecha.

2._ Se selecciona la ranura adecuada dependiendo del tamaño de la mancha, y se inserta en el portafiltro colocándose con la ranura hacia la fuente de luz.

3._ Se enfoca la imagen de la ranura sobre la cromatoplaca usando el botón de enfoque.

4._ Determinar el origen del barrido empujando la placa hacia la izquierda hasta que la ranura atraviesa una área blanca a pocos mm de la 1a. mancha a ser analizada. -- Se selecciona la dirección del barrido.

5._ Seleccionar la velocidad deseada de barrido .
(3 cm/min.)

6.- Se ajusta el cero con la ranura en una zona blanca de adsorbente y el 100% con la mancha de coloración más intensa.

Se selecciona la velocidad del papel en el registrador (20 mm/min).

Se presiona el botón de empezar.

Resultados:

El cromatograma obtenido muestra picos de diferentes áreas y cuentas con el integrador de disco correspondientes a las diferentes cantidades de muestra aplicada. (Crom. No 1)

Conclusiones:

Gracias al uso del integrador de disco se obtienen resultados aceptables a pesar de que los picos en el cromatograma no tienen una forma completamente regular. Por métodos manuales el error en la determinación se vería aumentado.

Observaciones:

Los aminoácidos también pueden determinarse por elución usando como solución eluyente 5 mg de sulfato de cobre en 100 ml de etanol al 80% y leyendo la densidad óptica a 510 nm.

Para la cuantificación densitométrica, es recomendable guardar las cromatoplasmas en la oscuridad y con algún protector desecante si la determinación no se hace enseguida de la visualización. De esta manera, los colores permanecen estables por algunas semanas.

CUANTIFICACION DE COLORANTES POR DENSITOMETRIA Y POR ELUCION.

Una gran cantidad de agentes colorantes naturales y sintéticos se han usado como aditivos en los alimentos para mejorar su apariencia, generalmente en cantidades que varían de 1-300 ppm. En años recientes, en la 8a. sesión de la FAO/WHO el comité de expertos en aditivos de los alimentos, examinó desde el punto de vista toxicológico los 160 colorantes y los clasificó en diferentes categorías, de manera que actualmente la lista de colorantes permitidos en alimentos está limitada a unos cuantos. Como son la tartrazina (10140), el amarillo FCF (15985) y el purpúreo (16185).

Material y equipo:

a).- Cromatoplasmas de sílicagel activada por 60 minutos a 170°C

- b).- Cámara de desarrollo clásica
- c).- Guía de aplicación
- d).- Microjeringas de 2 y 5 ul
- e).- Densitómetro Camag
- f).- Registrador
- g).- Integrador de disco
- h).- Eluchrom de Camag
- i).- Fotómetro Linson 5

Reactivos:

- a).- Solvente de desarrollo: benceno
- b).- Solución de elución: Metanol
- c).- Mezcla de colorantes: p-dimetilaminoazobenzol, aminoazobenzol-azo-naftol (Sudan III), benzoquinona-p-hidroxifenilamina (Indofenol), aminoazotoluol.

Procedimiento:

Se hacen aplicaciones de 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, y 2.5 ul de la mezcla estándar de colorantes sobre cromatoplacas de silicagel. La proporción de cada colorante en la mezcla es la misma. El desarrollo se efectúa en una cámara clásica usando benceno como solvente durante 30-40 minutos aproximadamente. La separación es bien definida.

Determinación densitométrica:

Condiciones:

- a).- Filtro K_3 para las fracciones rojas y amarillas y K_4 para las fracciones azules
- b).- Velocidad de la cromatoplaca- 3 cm/min
- c).- Salida al registrador- 100 mV
- d).- Velocidad de la carta - 20 mm/min

Se analiza cada colorante por separado y se obtienen sus respectivos cromatogramas donde cada pico corresponde a una determinada cantidad de colorante.

El procedimiento es el descrito en la determinación de fenilalanina.

RESULTADOS: (Cromatogramas 3 y 4)

Cantidad de muestra (ul)	Cuentas	
	p-dimetilaminoazobenzol	Indofenol
0.5	1400	100
1.0	1630	650
1.5	1900	800
2.0	2120	1030
2.5	2300	1240

Determinación por elución:

1.- Después del desarrollo, las manchas de los compuestos se aíslan del resto de la cromatoplaca por medio de un accesorio (751000-5) de un diámetro igual o mayor al de la cabeza de elución.

2.- La cromatoplaca se coloca sobre la mesa del Eluchrom y sobre cada mancha se acomodan las cabezas de elución, es importante que no tengan contacto con el adsorbente. Sobre las cabezas se pone un puente, enseguida se baja la palanca sujetando con fuerza la cromatoplaca contra las cabezas. Los tubos capilares se introducen en las cubetas para recolectar la solución.

3.- Se conecta el switch general, las jeringas se llenan con el líquido de elución y se inicia la elución a la velocidad más baja, presionando el botón de inicio. Cuando aparece la primera gota de solución se presiona el botón que pone en cero el medidor. Se selecciona el volumen total de elución así como la velocidad y se vuelve a presionar el botón de inicio. La elución se detiene automáticamente cuando se ha llegado al volumen marcado.

Condiciones:

Volumen de elución - 2.5 ml
velocidad de elución - 0.05 ml/min

Lecturas fotométricas en absorbancias:

microgramos	p-dimetilaminoazobenzol	Indofenol
0.125	0.006	0.015
0.250	0.011	0.031
0.375	0.023	0.046
0.500	0.035	0.060
0.625	0.046	0.074
Muestra	0.005	0.017

Las curvas de calibración obtenidas se muestran en seguida:

RESULTADOS: Comparación de resultados

Método	p-dimetilaminoazobenzol	Indofenol
Densitometría	0.024 ug/ul	0.156 ug/ul
Elución	0.100 "	0.1405 "

Con aplicaciones de 1 ul de solución muestra.

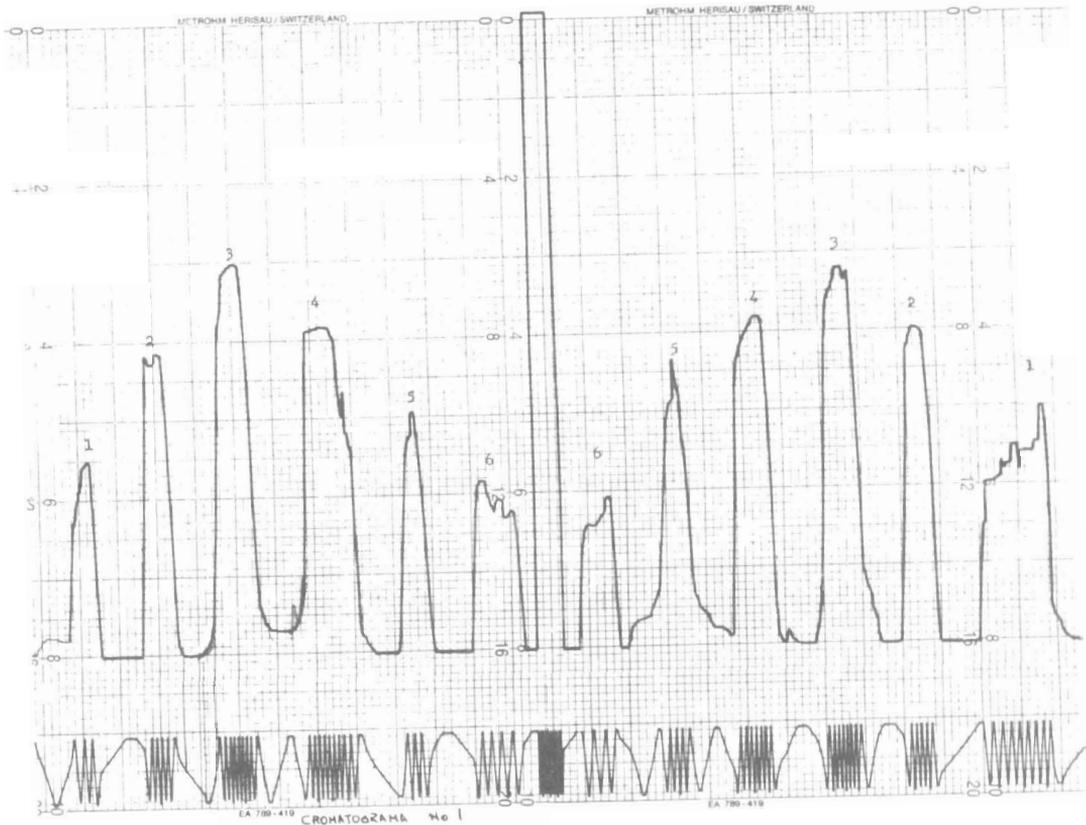
CONCLUSIONES:

En esta separación los dos métodos tiene aplicabilidad similar.

OBSERVACIONES:

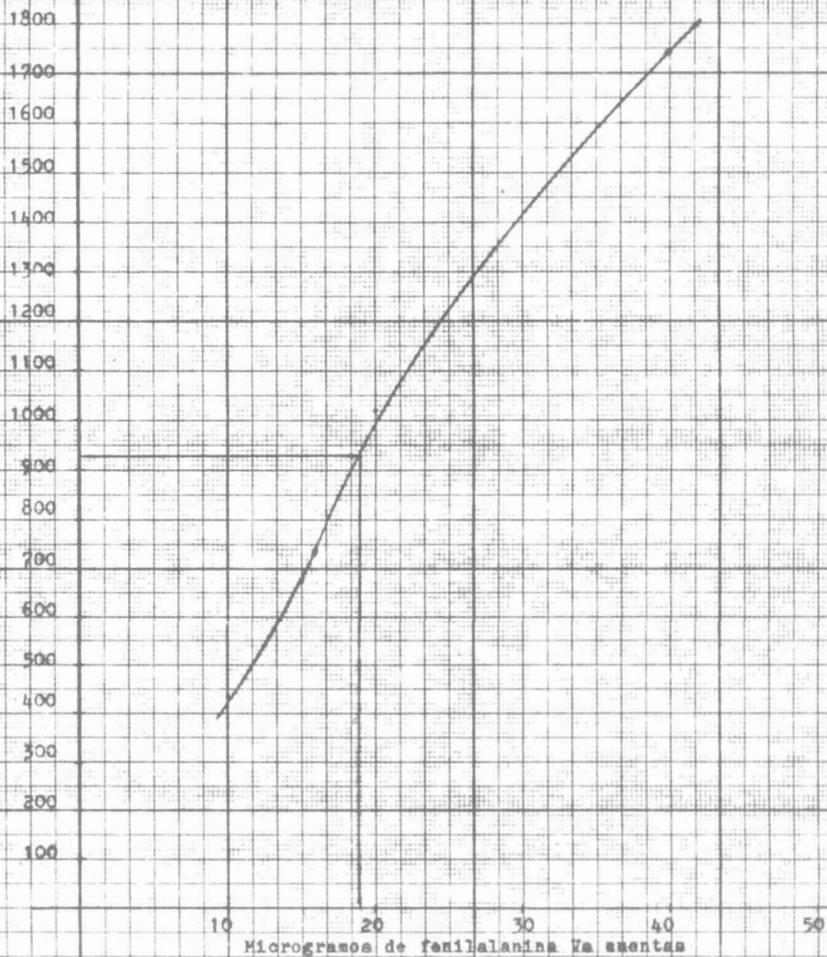
Puede usarse el método de Elución siempre y cuando -- las manchas estén completamente separadas entre sí y de un tamaño menor que el diámetro de las cabezas de elución.

El método densitométrico es más útil en aquellos casos en donde la separación no es perfecta y es indispensable cuando las aplicaciones se han hecho en forma de banda, además es más sencillo y rápido.

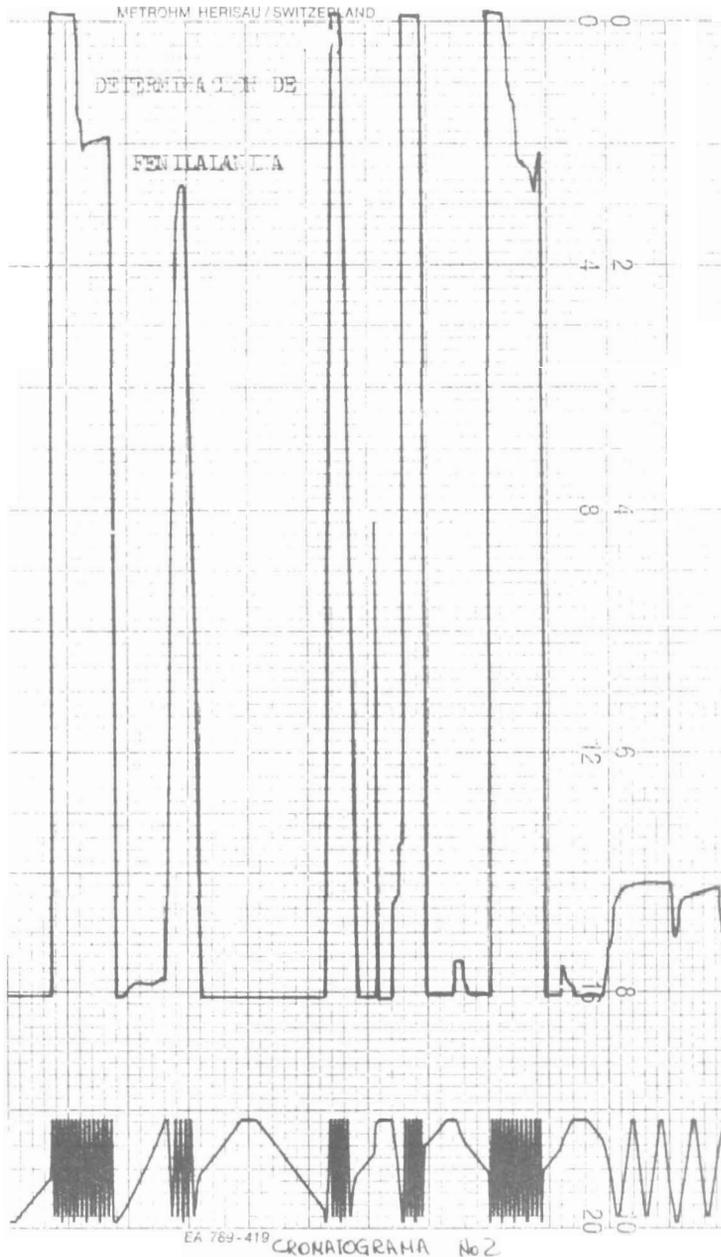


No. de aplicación	cuentas	cantidad de muestra
1	540	10 ug
2	1020	20
3	1750	40
4	2020	50
5	650	15
6	940	25

CURVA DE CALIBRACION PARA LA DETERMINACION DE FENILALANINA

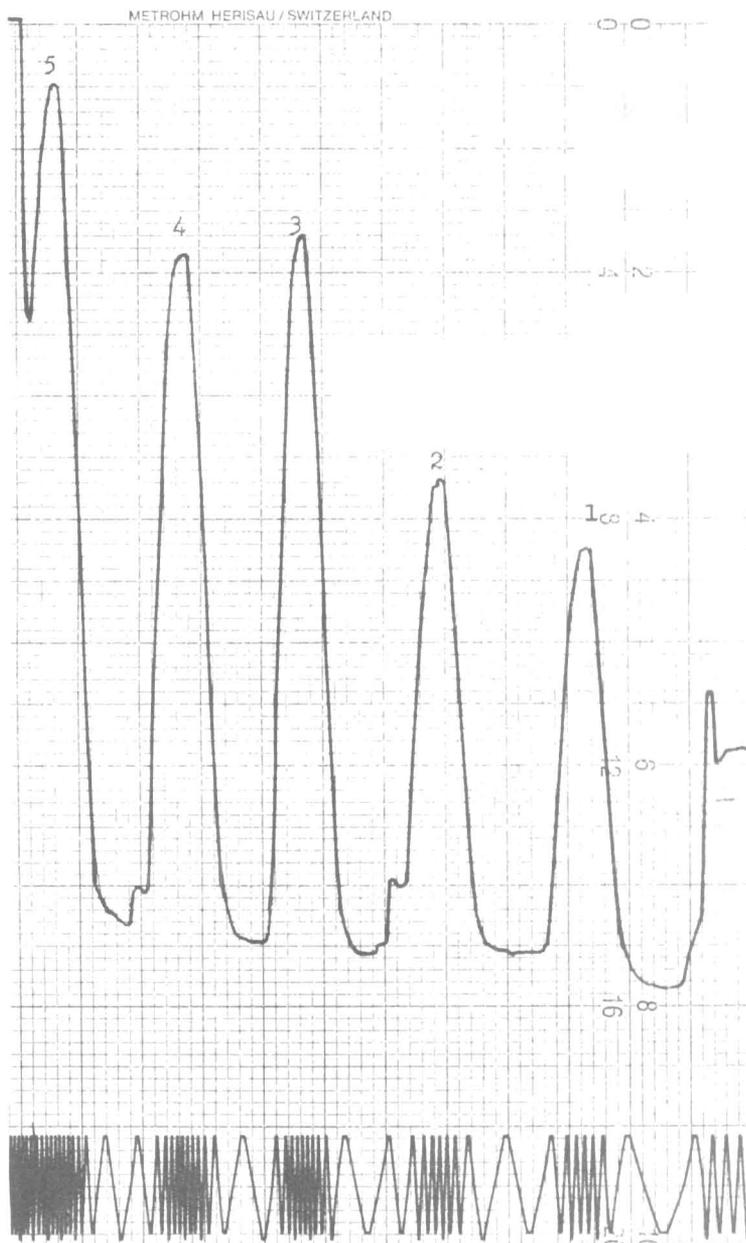


Gráfica No 1



CRONATOGRAMA DE UNA MEZCLA DE AMINOACIDOS

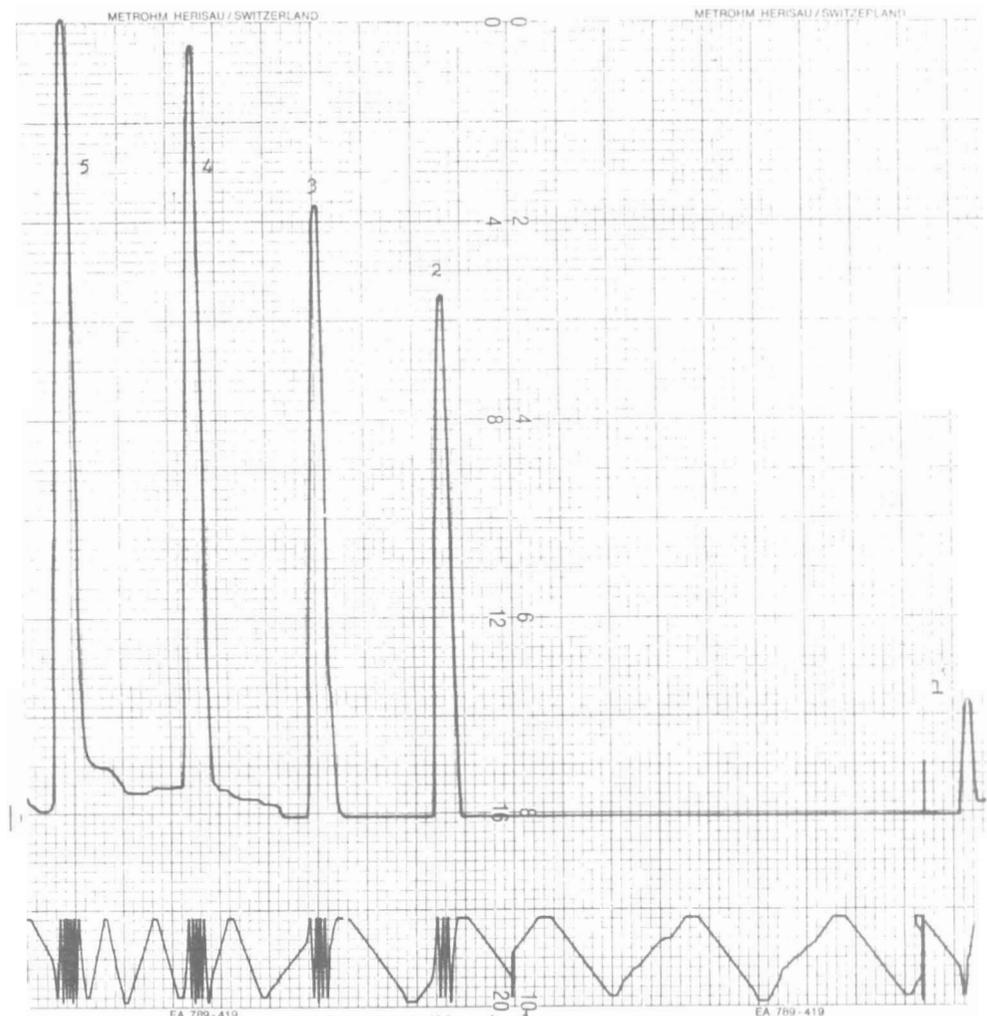
De la curva de calibración estándar se obtiene para 970 cuentas la cantidad de 19 ug . Si se aplicaron 2.5 ul de solución, se tiene una concentración de $19/2.5 = 7.6$ ug/ul o sea 0.76 %.



CROMATOGRAMA No 3

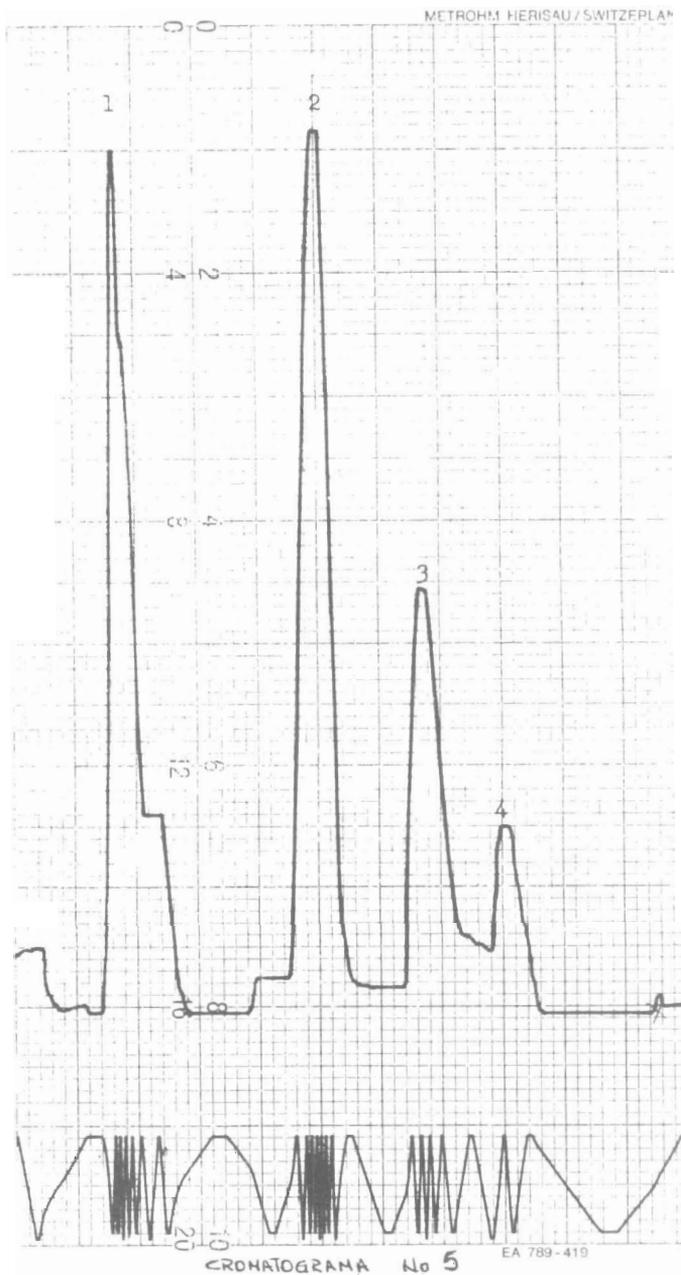
CROMATOGRAMA DEL p-DIETILAMINOAZOBENZOL

	µg	Cuentas	
1.-	0.125	1400	4.- 0.500 - 2120
2.-	0.250	1630	5.- 0.625 - 2300
3.-	0.375	1900	



CROMATOGRAMA DEL BENZOQUINONA-p-HIDROXIFENILAMINA (INDOPENOL)

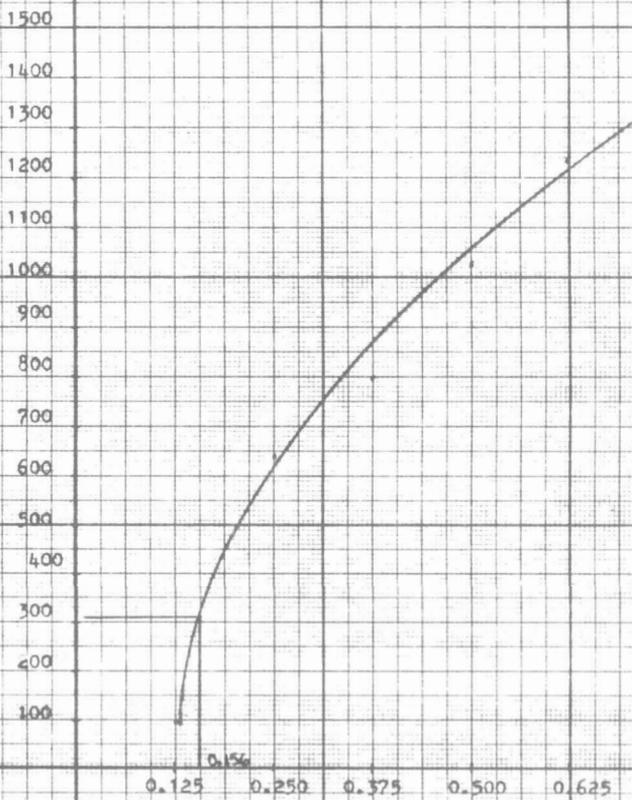
- 1.- 0.125 ug - 100 cuentas
- 2.- 0.250 ug - 650
- 3.- 0.375 ug - 800
- 4.- 0.500 ug - 1030
- 5.- 0.750 ug - 1240



CROMATOGRAMA DE UNA SOLUCION DE COLORANTES PROBLEMA

- 1.- p- Dimetilaminoazobenzol - 1350 cuentas
- 2.- Aminoazotoluol - 1440
- 3.- Aminoazobenzol-azo-naftol - 770
- 4.- Benzoquinona-p- hidroxifenilamina - 310

DENSITOMETRIA
CURVA DE CALIBRACION ESTANDAR PARA DETERMINACION DE INDOFENOL
(BENZOQUINONE-p-HIDROXIFENILIMINA)

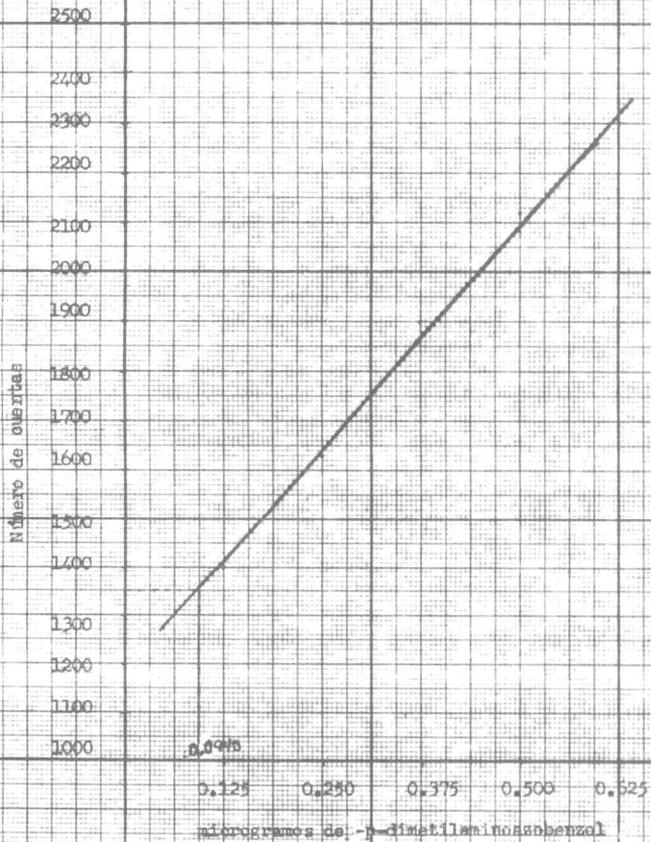


Microgramas de indofenol Vs cuentas

Gráfica No 2

DETECTOMETRIA

CURVA DE CALIBRACION ESTANDAR PARA DETERMINACION DE p-DIMETILAMINAZOBENZOL



Gráfica No 3

DETERMINACION POR ELUCION
CURVA DE CALIBRACION ESTANDAR DEL p-DIMETILAMINOBENZOL

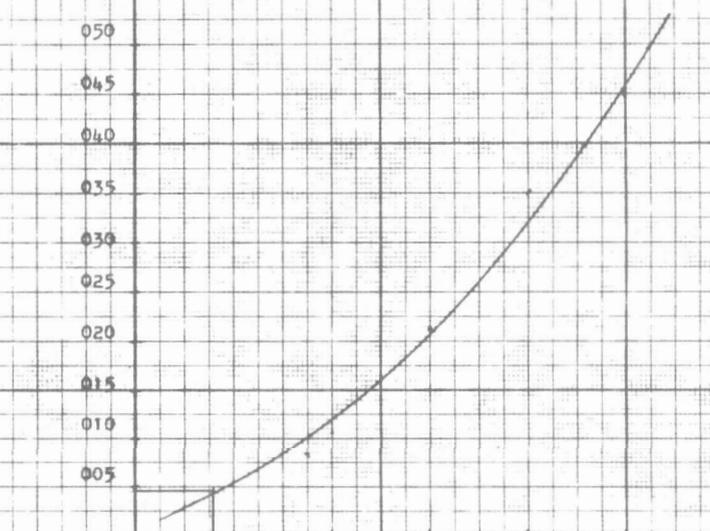
ABSORBANCIA

050
045
040
035
030
025
020
015
010
005

0.125 0.250 0.375 0.500 0.625

Microgramas de p-dimetilaminobenzol

Gráfica No 4



(68)

DETERMINACION POR ELUCION

CURVA DE CALIBRACION ESTANDAR DE BENZOQUINONA-p-HIDROXIFENILIMINA

(INDOFENOL)

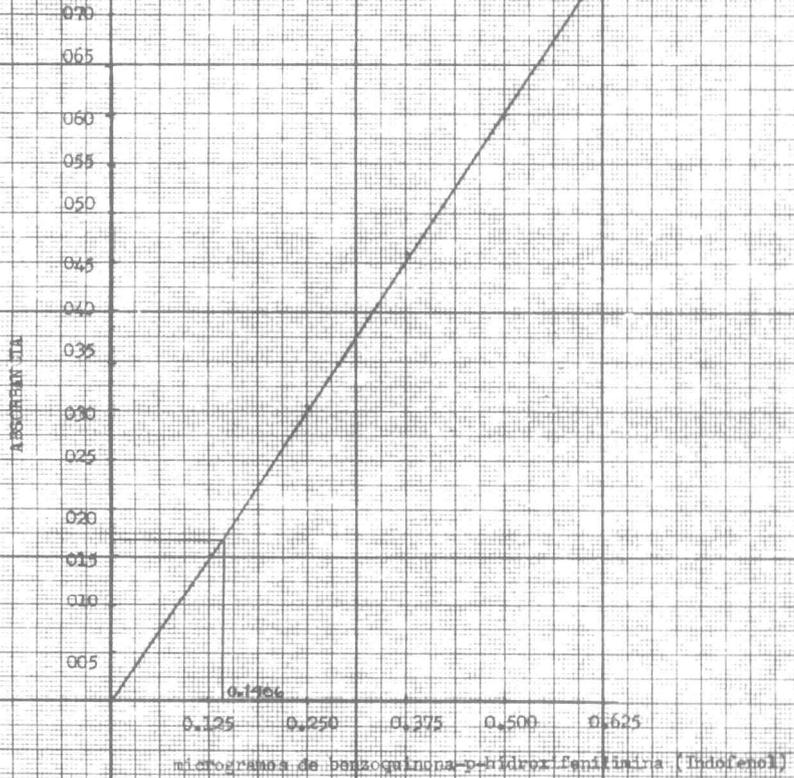


Gráfico No 5

CAPITULO IV

CONCLUSIONES

Actualmente con los avances obtenidos en la instrumentación, la Cromatografía de capa delgada es una técnica - con enormes posibilidades de separación teniendo como consecuencia un extenso campo de aplicaciones.

Usando por ejemplo la Cromatografía de capa delgada - de alta resolución pueden separarse hasta 40 componentes - obteniéndose resultados altamente reproducibles controlando electrónicamente todas las condiciones de operación, lo cual es una gran ventaja, ya que al igual que en cualquier otra técnica, la principal razón de una reproducibilidad pobre en los resultados es la falta de control durante el proceso.

El control en las operaciones abarca desde la preparación de las cromatoplasmas que deben tener un grado de consistencia uniforme para obtener reproducibilidad, ya que de otra manera, el frente del solvente no viaja horizontalmente uniforme. Usando preferentemente el aplicador automático se obtienen cromatoplasmas estandarizadas de alta calidad.

La aplicación de la muestra es un importante factor - en análisis cuantitativo ya que influye en la linealidad de las curvas de calibración, el equipo que ha demostrado tener una mayor precisión y exactitud es el Linomat III - que aplica la muestra en forma de un fino spray ya sea como mancha redonda o como bandas. El Chromatocharger es - más útil en caso de análisis cualitativo aplicando la muestra en forma de bandas largas.

En lo que se refiere al desarrollo de la Cromatografía, el método más satisfactorio y que presenta un campo

de aplicación todavía mayor es la Cromatografía circular - de alta resolución en la cual se obtienen resultados similares a los proporcionados por la Cromatografía de líquidos de alta resolución con la ventaja del bajo consumo de solvente, solo se necesita 1/1000 de la cantidad normal, y del material adsorbente solo se usa 1/60 de la cantidad en Cromatografía convencional y del corto tiempo de análisis.

En aquellos casos en que se desconocen las cantidades óptimas es útil el uso de la cámara Vario-KS ya que pueden probarse diferentes sistemas de solventes simultáneamente, diferentes grados de actividad y establecer gradientes de preacondicionamiento en dirección paralela o perpendicular a la Cromatografía.

En separaciones más sencillas, en las cuales las condiciones de operación han sido estandarizadas y es necesario un control moderado sobre el proceso, puede recurrirse a la cámara Sandwich preferentemente a la cámara clásica ya que usa solo 1/4 del solvente necesario en la cámara clásica. El grado de separación, la reproducibilidad y los tiempos de análisis son muy parecidos en estas dos cámaras.

En visualización, la escasa fluorescencia propia de los adsorbentes inorgánicos facilita la identificación de las sustancias observándolas bajo luz UV.

Para la determinación cuantitativa por densitometría es necesario que las sustancias tengan propiedades ópticas adecuadas. Se mide absorbancia si la longitud de onda adecuada está entre 200-750 nm, fluorescencia si la longitud de onda de la luz emitida después de la excitación está entre 405-750 nm, y disminución de la fluorescencia cuando la capa contiene un indicador fluorescente, el cual es excitado con luz de onda corta (254 nm) y las sustancias que absorben a 254 nm son determinadas por la supresión de la emisión a 540 nm.

Aquellos compuestos que pueden ser determinados por medición de la absorbancia o de la fluorescencia, es recomendable lo último por su mayor sensibilidad y reproducibilidad. El tiempo requerido para un análisis densitométrico es de solo unos minutos, con reproducibilidades de 95-97 %.

Por el método de elución pueden cuantificarse todas las sustancias que puedan ser completamente eluidas o extraídas del adsorbente y que puedan ser determinadas posteriormente. Prácticamente siempre es posible usar este método. El tiempo requerido es de 2-5 minutos y se obtienen reproducibilidades de 99 %.

El equipo disponible comercialmente se perfecciona cada vez más y hoy en día, es posible el intercambio de datos con la Cromatografía de líquidos de alta resolución.

CAPITULO V

OBSERVACIONES

La Cromatografía en capa delgada es una técnica importante, sobre todo si se usa en combinación con otras técnicas cromatográficas. Por lo que se recomienda que sean estudiadas y evaluados en forma conjunta. La Cromatografía en capa delgada puede evaluarse con las siguientes características:

a). _ Simplicidad:

El equipo utilizado es sencillo y relativamente barato, la técnica es simple y pueden obtenerse resultados buenos aún por operadores no experimentados.

b). _ Resolución:

La resolución obtenida es realmente buena, sobre todo en la cromatografía de capa delgada de alta resolución, -- donde se tienen separaciones hasta de 40 componentes en una distancia de 5 cm. En Cromatografía convencional, donde la resolución es menor, logran separarse 10 compuestos en 5 cm.

c). _ Sensibilidad:

Usando el método de detección apropiado, es posible - detectar cantidades del orden de femtogramos y picogramos por alta resolución, por el método convencional pueden detectarse cantidades de 0.001 nanogramos. Aunque cada sustancia tiene un límite de detección propio, estos por lo general son muy bajos.

d). _ Escala:

Aunque el proceso es esencialmente una microtécnica, el tamaño de la muestra es perfectamente manejable. Además los intervalos de concentración varían ampliamente y en una misma cromatoplaça pueden separarse desde 0.5 µg - hasta 5 mg.

e). _ Precisión:

En condiciones de operación óptimas y usando ya sea el método "in situ" o el método de elución pueden obtenerse reproducibilidades mayores del 99 %.

CAPITULO VI

BIBLIOGRAFIA

- 1.- MANUEL NUÑO, Cromatografía de Gases; Ed. Internacional Científica (1978).
- 2.- EDUARDO D.I.; Cromatografía, Principios y Técnicas; El Manual Moderno (1975)
- 3.- BOBBITT JAMES M. ; Thin Layer Chromatography.; 3a edición; Reinhold Publishing Corporation; (1966).
- 4.- BANDERATH KURT.; Cromatografía de Capa Delgada; Urmo; (1974).
- 5.- ZWIG GUNTHER, SHERMA JOSEPH.; Handbook of Chromatography; Chemical Rubber Co.;(1970).
- 6.- E. VERNON TRUTER.; Thin Film Chromatography; Cleaver Bume Press; (1963).
- 7.- ABBOTT DAVID y R.S. ANDREWS.; Introducción a la Cromatografía; Versión Española de Miguel Fernandez España; 3a. edición; Editorial Alhambra; (1973).
- 8.- E. MEREK AB. DARNSTADT.; Reactivos de coloración para Cromatografía de Capa Delgada y papel; 2a. edición.
- 9.- DOMINGUES XORGE A.; Métodos de Investigación Químico; 1a. edición; Editorial Limusa; (1973)
- 10.- A. ZLATKIS.; HPTLC High Performance Thin Layer Chromatography; Elsevier Scientific Publishing Company; (1977).
- 11.- J.A.W. GOSSELE.; Modified TLC separation of preservatives; J. Chromatog. 63; 433-437 ; (1971).
- 12.- H. VAN DEN BERG, F.A. HOMMES.; Thin Layer Chromatography detection of some N-acil-glycine conjugates in urine; J. Chromatog.

104; 219-222; (1975).

- 13.- C.J. LUPTON.; Qualitative analysis of carboxylic acids by partition thin layer chromatography; J. Chromatog. 104; 223-224 (1975).
- 14.- J.T. TRAXLER.; Piperanine, a pungent component of black paper; J. Agric. Food Chem; 19; 1135-1138; (1971).
- 15.- S. KEIPERT, R. VOIGT.; Quantitative TLC of ergot alkaloids; J. Chromatog. 64; 327-340; (1972).
- 16.- J.D. PHILIPSON, S.R. HEMINGWAY.; Chromatographic and spectroscopic methods for the identification of alkaloids from herbarium samples of the genus *Uncaria*; J. Chromatog. 105; 163-178 (1975).
- 17.- A. RAO, S. SINGH.; Thin layer chromatographic separation and detection of alcohols as cobalt xantate complexes; *Analyt Chem.* 268; 128; (1974).
- 18.- D.W. CONNELL, C.R. STRAUSS.; Chromatographic examination of the p-nitrobenzoates and α -naphthylurethans of the lower aliphatic alcohols; J. Chromatog. 72; 391-394; (1972).
- 19.- V.D. CANIC, I.V. PERISIO JANJIC, M.J. BABIN.; Separation of the 3,5-dinitrobenzoates of lower alcohols by TLC on starch and cellulose plates; *Analyt Chem.* 264; 415-416; (1973).
- 20.- J. BLASS, J. VERRIEST, A. LEAU.; Analysis of glutaraldehyde solutions by thin layer chromatography; J. Chromatog. 197; 383-387; (1975).
- 21.- I.W. RUNDIGER, R. NIKISH, F.W. GOEDDE.; TLC separation of the ¹⁴C-labelled branched-chain α keto acids and hydroxamic acids derived from the corresponding enzymatically formed acyl-CoA compounds; J. Chromatog. 61; 373-375; (1975).
- 22.- K. HERRMANN.; Quantitative determination of catechins and hydrocinnamic acids in vegetable foodstuffs; *Anal Chem.* 361-36 ; (1973)
- 23.- GDETTE L. SHOTTELL.; Note on the natural occurrence of ochratoxin; *A.J.A.-soc. Off. Anal Chem* 52,1 (1969).
- 24.- Z.H. EBEDI.; Detection of toxicity of aflatoxins sterimatozystan and other fungal toxins by lethal action on zebra fish larvae; *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 53; No. 5; (1970).
- 25.- D.H. LIEM.; Note on rapid determination of aflatoxins in peanuts products. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 53; No.5; (1970).
- 26.- WALTER A. PONS.; Rapid quantitative TLC method for determining aflatoxins in cottonseed products; *J. Assoc. Off. Anal.* 55; No. 4; (1972).
- 27.- ROBERT D. STUBLEFIELD.; Aflatoxin M₁, analysis in dairy products and distribution in dairy foods from artificially contaminated milk; *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 57; No. 4; (1974).

- 28.- BENEDIC HALD.; Confirmation of citrini in barley; J. Assoc. O-f
A-al. Chem. 56; No. 6; (1973).
- 29.- G.C. BOFFEY, G.M. MARTIN. A new solvent system for the thin la
yer chromatography separation of the dansyl derivatives of so-
me biogenic amines; J. Chromatog. 90; 178-180; (1974).
- 30.- N. SEILER.; Identification and quantitation of amines by thin -
layer chromatography; J. Chromatog. 63; 97-112; (1971).
- 31.- J.P. SHARMA, S. AHUJA.; Separation and identification of aroma
tic amines by two dimensional TLC of charge transfer complexes;
Analyt Chem. 267; 368; (1973).
- 32.-Z. PROSTENIK, B. SVIGIR-STENL, Z. STEFANA C. Quantitative thin la
yer chromatographic assay of aminoacids decarboxy-lase activity
J. Chromatog. 105; 418-423; (1975).
- 33.- P.-J. PETERSON, J. HENDTLASS, J.C. MACRAE, P.D. PEARCE.; Extrac
tion and analysis of free aminoacids from sheep digesta; J. --
Sci. Food Agric. 22; 548-550; (1971).
- 34.- A.S. INGLIS, P.W. NICHOLLS, L.G. SPARROW.; detection of sug nano
mole amounts of phenylthiohydantoin of aminoacids. J. Chromatog
90; 362-364; (1974).
- 35.- S.A. HANSEN.; Thin layer chromatographic method for identifica
tion of oligosaccharides in starch hydrolyzates; J. Chromatog.
105, 388-390; (1975).
- 36.- . KARTING, G. WEGSCHAIDER; Identification of sugars in micro-
amounts of glycosides or sugar mixtures; J. Chromatog. 61; 375-
377; (1971).
- 37.- K. EBERLEIN, G. GERCKEN.; T-in layer chromatographic separation
of gangliosides. J. Chromatog. 106; 425-427; (1975).
- 38.- V. NEKOLA.; Quantitative method TLC for the determination of gra
micidin; Analyt Chem. 268; 272-274; (1974).
- 39.- F. FROES, P. VALDEVOUSEF.; Antibiotic identification in animal
foodstuffs by TLC; J. Chromatog. 87; 300-304; 1973).
- 40.- A.E. BIRD, A. L. MARSHALL.; R-versed- phase TLC and partition cog
efficient of penicillins; J. Chromatog. 63; 313-319; (1971).
- 41.- E. PHILIP.; Nature of carotenoid esterification in citrus fruits
J. agric. Food Chem. 21; 964-966; (1973).
- 42.- T. HAD.; Carotenoid constituents of pyrethrum flower; J. agric.
Food Chem. 21; 999-1001; (1973).
- 43.- E. PHILIP.; Nature of xanthophyll esterification in grapefruit.;
J. agric. Food Chem. 21; 963-964; (1973).
- 44.- T. SHIMIZU, A. NENO. Thin Layer chromatographic separations of

Esta Tesis se Imprimió en Noviembre de 1979
empleando el sistema de reproducción Foto-Offset;
en los Talleres de Impresos Offsali-G, S. A., Av.
Colonia del Valle No. 535 (Esq. Adolfo Prieto),
Tels. 523-03-33 y 523-21-05 México 12, D. F.
Representante en San Luis Potosí: Alejandro Ramírez G.
Quintana Roo 105 Tel. 3-04-22

Esta Tesis se Imprimió en Noviembre de 1979
empleando el sistema de reproducción Foto-Offset;
en los Talleres de Impresos Offsali-G, S. A., Av.
Colonia del Valle No. 535 (Esq. Adolfo Prieto),
Tels. 523-03-33 y 523-21-05 México 12, D. F.
Representante en San Luis Potosí: Alejandro Ramírez G.
Quintana Roo 105 Tel. 3-04-22