

LA CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA: APLICACIÓN DE LA TLC A LA SEPARACIÓN DE COLORANTES

M.C. Gutiérrez*

0.1. Resumen

Se describen las principales modalidades de cromatografía líquida, siguiendo tres clasificaciones distintas: según la fase estacionaria, según los fenómenos que intervienen en la separación y según el método de operativo. Se estudia con más detalle la cromatografía en capa fina (TLC) por tratarse de una técnica muy simple, tanto desde el punto de vista de procedimiento experimental como del equipo y material requerido.

Se aplica la cromatografía en capa fina (TLC) a la separación de los diversos colorantes contenidos en 6 tintes comerciales con eluyentes específicos de los diversos grupos tintóreos. Los resultados obtenidos indican que la mayoría de los tintes estudiados están compuestos por mezclas de 3-5 colorantes, principalmente de tipo disperso.

Esta técnica cromatográfica es una herramienta útil desde el punto de vista cualitativo. También permite, en algunos casos concretos, seleccionar el eluyente más adecuado para un posterior análisis cuantitativo por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

Palabras clave: Cromatografía, cromatografía líquida, cromatografía de capa fina, TLC, (thin layer chromatography), tintes, colorantes, colorantes dispersos

0.2. Summary: LIQUID CHROMATOGRAPHY. APPLICATION OF TLC TO THE SEPARATION OF DYES

The main types of liquid chromatography are described, following three different classifications: according to the stationary phase, according to the phenomena which occur in the separation and according to the operative method. The thin layer chromatography (TLC) is studied in more detail since it is a very simple technique from the point of view of experimental procedure as also from the equipment and material required.

The thin layer chromatography (TLC) is applied to the separation of the diverse dyes

contained in 6 commercial tints and to the identification of the dyeing group of the dyes. The results obtained indicate that most of the studied tints are constituted by 3-5 dyes, mainly of disperse type.

This chromatographic technique is a useful tool from the qualitative point of view. In some cases, it also allows to select the most appropriate eluent for a later quantitative analysis using high resolution liquid chromatography (HPLC).

Key words: Chromatography, liquid chromatography, thin layer chromatography, TCL, tints, dyes, disperse colorants

0.3. Résumé: LA CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE. APPLICATION DE TLC À LA SÉPARATION DE COLORANTS

Les principales modalités de chromatographie en phase liquide sont décrites, en suivant trois classifications différentes: d'après la phase stationnaire, d'après les phénomènes qui interviennent dans la séparation et d'après la méthode d'opération. La chromatographie sur couche mince (TLC) est étudiée avec plus de détail, car il s'agit d'une technique très simple, tant du point de vue de procédure expérimentale comme de l'outillage employé.

La chromatographie sur couche mince (TLC) est appliquée à la séparation de divers colorants contenus dans 6 teintures commerciales et à l'identification du groupe de teinture de ces colorants. Les résultats obtenus indiquent que la plupart des teintures étudiées sont composées par 3-5 colorants, principalement de type dispersé.

Cette technique chromatographique est très utile du point de vue qualitatif. Aussi, dans quelques cas concrets, elle permet de sélectionner l'éluant le plus approprié pour une analyse quantitative postérieure par chromatographie liquide à haute résolution (HPLC).

Mots clés: Chromatographie, chromatographie liquide, chromatographie sur couche mince, TCL, teintures, colorants dispersés

* M.C. Gutiérrez Bouzán, Dra. en Química, Investigadora de la Universidad Politécnica de Catalunya, en el Laboratorio de Control de la Contaminación Ambiental, INTEXTER (U.P.C.)

1. INTRODUCCIÓN

La cromatografía es un método de análisis rápido que permite separar los constituyentes de una mezcla utilizando las diferencias de estas sustancias entre sus constantes de equilibrio durante su distribución entre una fase móvil y una fase denominada estacionaria que ejerce sobre ellas un efecto retardador.

Esta operación elemental de distribución se repite un gran número de veces de una forma continua. Bajo la influencia de dos efectos antagónicos, efecto de arrastre ejercido por la fase móvil y efecto de retención ejercido por la fase estacionaria, los constituyentes de la mezcla se desplazan a velocidades diferentes y se separan.

Los métodos cromatográficos se dividen en dos grandes grupos: cromatografía líquida, si la fase móvil es un líquido (denominado eluyente) y cromatografía de gases, cuando la fase móvil es un gas. Mucho más reciente y menos extendida es la cromatografía de fluidos supercríticos, en la cual el fluido trabaja por encima de su presión y temperatura críticas.

La cromatografía líquida fue la primera en aparecer cronológicamente. Fue utilizada por primera vez en 1903-1906 por el botánico ruso Mikhail Tswett para separar los componentes coloreados de un extracto de plantas. Pero tuvieron que pasar 25 años para que este descubrimiento fuera plenamente apreciado y desarrollado. En las primeras aplicaciones, el procedimiento se limitó a la separación de sustancias coloreadas, de ahí el nombre de la técnica.

La cromatografía líquida se puede clasificar de tres maneras diferentes:

1) Según la naturaleza de las fases estacionarias

La fase estacionaria puede ser un sólido con propiedades adsorbentes (CLS: cromatografía líquido-sólido), un líquido que impregna un sólido (CLL: cromatografía líquido-líquido), un líquido que solvata un sólido formando parte integrante de él (CLG: cromatografía líquido-gel), o bien un sólido en cuya superficie se enlazan químicamente las moléculas apropiadas (BPC: cromatografía de fases químicamente ligadas o "bonded phase chromatography").

2) Según la naturaleza de los fenómenos que intervienen en la separación

- Cromatografía de adsorción cuando la fase estacionaria es un sólido adsorbente (CLS) y la separación se basa en las diferencias de adsorción de las moléculas en esta fase.
- Cromatografía de reparto cuando la separación se basa en las diferencias de solubilidad de las moléculas a separar en la fase líquida que impregna la sólida (CLL) o bien en las diferencias de interacción con las moléculas ligadas sobre el sólido (BPC).
- Cromatografía de intercambio iónico: la fase estacionaria es un sólido capaz de intercambiar

iones de su estructura por otros iones de la fase móvil.

- Cromatografía de par iónico (PIC): se forman pares de iones entre los constituyentes (ionizados) de la mezcla a separar y un contra-ión adecuado que se añade a la fase móvil. Los pares iónicos formados son los que se distribuyen entre la fase móvil y la estacionaria.
 - Cromatografía de intercambio de ligandos. La fase estacionaria contiene una especie capaz de formar complejos con los solutos a separar.
 - Cromatografía de exclusión denominada también cromatografía de permeación sobre gel (GPC): La fase estacionaria es un sólido poroso cuya dimensión de los poros es similar a las dimensiones de ciertas moléculas a separar. Las moléculas grandes no pueden penetrar en los poros y se excluyen de la fase estacionaria, siendo eluidas primero. Las que pueden penetrar en los poros se eluyen más tarde.
- 3) Según el método de operativo
- Cromatografía en columna clásica
 - Cromatografía de superficie (cromatografía de capa fina y cromatografía sobre papel).
 - Cromatografía líquida de alta resolución (CLAR o HPLC, "high performance liquid chromatography"). Se utilizan bombas de alta presión para impulsar la fase móvil líquida a través de la fase estacionaria dispuesta en columnas relativamente cortas rellenas con partículas de pequeño tamaño. La resolución que se consigue con esta técnica es muy elevada, aunque la instrumentación requerida es mucho más compleja y costosa.

1.1. La cromatografía de capa fina

Esta técnica es un tipo de cromatografía líquida en la cual la fase estacionaria es una capa uniforme y homogénea aplicada sobre un soporte inerte (generalmente plástico). También se utiliza el término de "cromatografía plana" que engloba la cromatografía de capa fina y la cromatografía en papel. Normalmente se emplean adsorbentes como fases estacionarias, aunque también se pueden emplear fases químicamente ligadas. Actualmente, se suelen utilizar placas prefabricadas de dimensiones 20 cm x 20 cm. Son láminas relativamente rígidas que se recortan con tijeras a la medida requerida.

La técnica operativa consiste en los siguientes pasos:

- 1) Recortar la placa a la medida adecuada.
- 2) Depositar sobre la placa una gota de los componentes a separar con la ayuda de un capilar a una distancia de 1 cm del extremo de la placa. Esta operación es particularmente delicada, pues es importante que la gota depositada no se extienda. También debe tomarse la precaución de no tocar la fase estacionaria con el extremo del capilar para no

separarla del soporte. Si la muestra a analizar es muy diluida, se coloca una gota encima de otra, sucesivas veces, hasta alcanzar una mayor concentración. Debe tenerse la precaución de dejar evaporar el disolvente entre cada aplicación. El secado puede acelerarse mediante un secador de mano, si los componentes a analizar no son volátiles.

- 3) Introducir la placa en un recipiente hermético, previamente acondicionado con el eluyente seleccionado. Generalmente, se trata de cámaras de vidrio rectangulares diseñadas para este fin, en las cuales las placas se depositan de forma ligeramente inclinada. Algunas de ellas disponen de un soporte que permite mantener las placas totalmente verticales. Se mantiene la placa en la cámara el tiempo necesario para que se produzca la elución de la muestra.
- 4) Se extrae la placa de la cámara y se deja secar al aire.
- 5) Si las diferentes sustancias separadas son incoloras, debe procederse a determinar su posición relativa mediante un método de revelado (con luz ultravioleta o con reactivos químicos específicos para las sustancias analizadas). En el caso de colorantes, este paso se omite.
- 6) En caso necesario, se procede a la determinación del R_f de las sustancias separadas, parámetro que caracteriza la migración de un soluto (abreviación de "factor rate") definido por:

$$R_f = \frac{\text{distancia recorrida por el soluto}}{\text{distancia recorrida por el frente del disolvente}}$$

El R_f de las sustancias separadas permite la identificación de las mismas por comparación con el R_f correspondiente a los patrones de los compuestos identificados.

2. EXPERIMENTAL

Como eluyentes, se prepararon las siguientes mezclas:

- A) acetato de butilo - piridina - agua 40+40+20
- B) n-propanol - hidróxido amónico 60+30
- C) n-butanol - etanol - agua 90+10+10
- D) cloroformo - acetona 90+10
- E) cloroformo- metanol 95+5

Se estudió el comportamiento frente a estos eluyentes de 6 tintes comerciales, constituidos por diferentes mezclas de colorantes. En todos los casos, se emplearon placas cromatográficas comerciales recubiertas con sílica gel G. La separación se llevó a cabo en un recipiente de vidrio previamente acondicionado. Se depositaron las gotas de los 6 tintes sobre cada una de las placas y se secaron con la ayuda de un secador,

para evitar su extensión. Las placas se colocaron dentro del recipiente en posición vertical con una muy ligera inclinación. Una vez finalizado el proceso cromatográfico, se dejaron secar al aire y se procedió a la comparación de los resultados. No se determinó el R_f de cada uno de los colorantes separados, por no disponer de patrones de los mismos.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las diferentes separaciones cromatográficas obtenidas se muestran en las figuras 1-5.

Con el eluyente A (adecuado para colorantes ácidos) la distancia recorrida por los colorantes es casi idéntica al frente del eluyente (figura 1). A pesar de que la separación obtenida es muy baja, se puede apreciar la presencia de 2-4 colorantes en cada tinte. El tinte 2 presenta una separación mejor que los demás tintes.

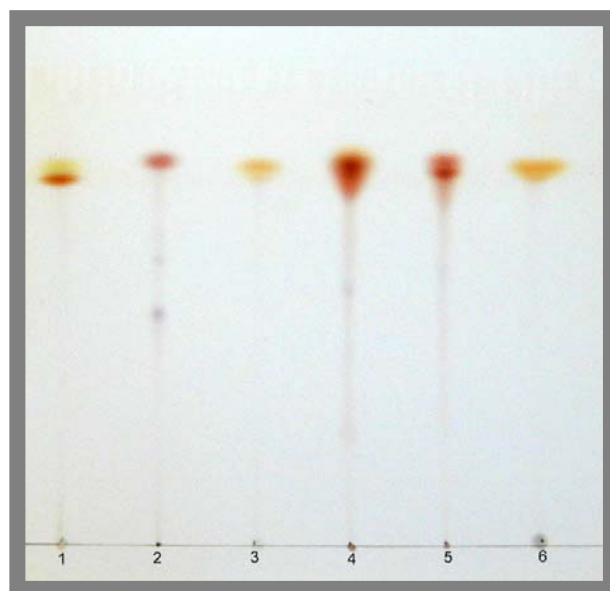


FIGURA 1: Separación de los colorantes mediante el eluyente A

El eluyente B (para colorantes directos) muestra también una falta de selectividad para los diferentes tintes (figura 2). Nuevamente, es el tinte 2 el que tiene un comportamiento diferenciado del resto, ya que se aprecia una mejor separación de sus componentes.

El eluyente C (adecuado para separar colorantes básicos) no mejora los resultados obtenidos en los dos casos anteriores (figura 3).

Al observar todas las placas obtenidas, se observa que las mejores separaciones las proporcionan los eluyentes D y E (figuras 4 y 5). Estos dos eluyentes son apropiados para separar colorantes dispersos. A su vez, la separación de los distintos componentes de los tintes es mejor con el eluyente D que con el E.

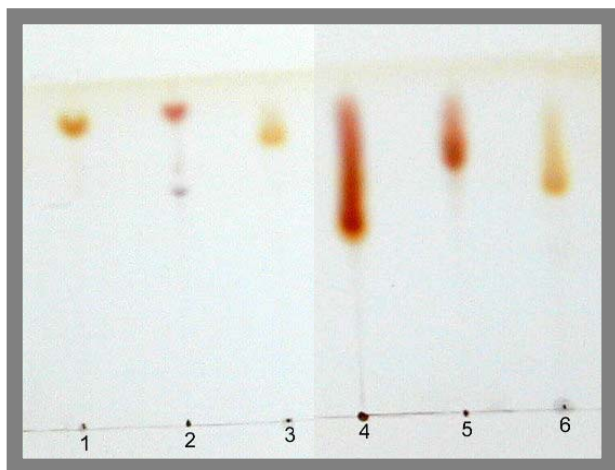


FIGURA 2: Separación de los colorantes mediante el eluyente B



FIGURA 5.: Separación de los colorantes mediante el eluyente E

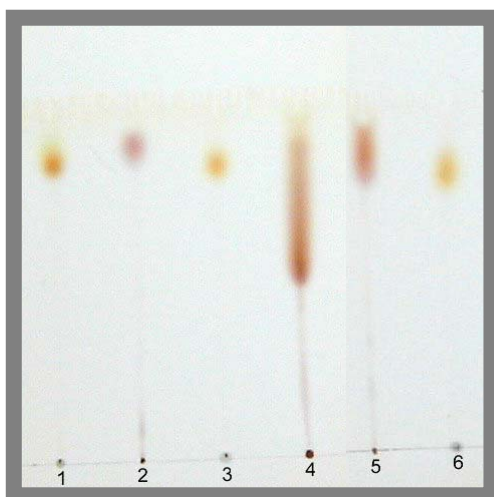


FIGURA 3: Separación de los colorantes mediante el eluyente C



FIGURA 4: Separación de los colorantes mediante el eluyente D

La información obtenida a partir de los distintos eluyentes se recopila en la tabla 1. Se observa que los tintes están compuestos como mínimo por 3 colorantes (tinte 6), aunque en algunos se consiguen separar hasta 6 colorantes distintos (tinte 4). En los demás tintes, se detecta la presencia 4-5 colorantes.

TABLA 1

Colorantes separados en el análisis de los tintes por capa fina (TLC).

TINTE	A	B	C	D	E
1	Rojo Amarillo Pardo	Amarillo Pardo	Amarillo Pardo	Violeta Amarillo Azul Pardo Naranja	Rojo Amarillo Pardo Naranja
2	Rojo Azul Violeta	Rojo Rojo Violeta	Rojo Azul	Azul Rojo Azul Violeta Rojo	Rojo Rojo
3	Naranja Amarillo	Naranja Amarillo	Amarillo Naranja	Amarillo Rojo Naranja	Rojo Amarillo Amarillo Naranja
4	Amarillo Pardo Naranja Azul	Rojo Pardo Amarillo	Amarillo Pardo	Azul Rojo Amarillo Pardo Violeta Naranja	Azul Rojo Amarillo Pardo Naranja
5	Rojo Pardo Azul	Rojo Pardo	Pardo Rojo	Rojo Azul Rojo Pardo	Rojo Rojo Azul Naranja Pardo
6	Naranja Amarillo	Naranja Amarillo	Naranja Amarillo	Amarillo Rojo Naranja	Rojo Amarillo Naranja

Se puede apreciar además que los tintes 3 y 6 tienen una composición bastante similar, aunque en el primero se identifica una pequeña cantidad de un amarillo adicional.

Por otra parte, algunos de los colorantes separados son comunes a varios tintes, ya que el color de la mancha obtenida y su posición en la placa cromatográfica es la misma.

En lo que respecta a la clase tintórea de los colorantes que componen los tintes estudiados, es muy probable que se trate mayoritariamente de colorantes dispersos, pues la separación obtenida es notablemente mejor con los eluyentes específicos de este tipo de colorantes (D y E). Sin embargo, los componentes del tinte 2 muestran también una separación aceptable con los eluyentes A y B, por lo que podrían contener colorantes ácidos y/o directos.

Nota: Pueden solicitarse copias de las figuras en color en la siguiente dirección de correo electrónico: gutierrez@intexter.upc.es

3.1. Extrapolación de los resultados de cromatografía en capa fina a HPLC

Al comparar la cromatografía en capa fina con la cromatografía líquida de alta resolución, se aprecia que ambas técnicas presentan unas características muy diferenciadas:

- La cromatografía en capa fina es una técnica muy sencilla, para la cual sólo se requiere en general un material elemental, muy asequible económicamente, mientras que la instrumentación utilizada en cromatografía líquida de alta resolución es mucho más compleja y en consecuencia, notablemente más costosa.
- En HPLC, el gasto de eluyente es mucho mayor, ya que éste fluye continuamente a través de la columna, la cual debe acondicionarse antes del análisis y limpiarse al final del mismo. En cromatografía de capa fina, las cantidades de eluyente empleadas son de unos pocos mililitros. Además, se pueden analizar varias muestras simultáneamente, tantas como permita la anchura de la placa.
- En contrapartida, el análisis cuantitativo es mucho fácil en HPLC, ya que la cuantificación en cromatografía de capa fina presenta dificultades considerables.
- Así mismo, la HPLC es una técnica más automatizada, mientras que la capa fina es un método en el cual sólo se pueden automatizar cada una de las etapas individualmente.

Es evidente que, en general, las prestaciones de la HPLC son mayores que las de la cromatografía en capa fina. Sin embargo, en muchas ocasiones resulta más ventajoso recurrir a esta última técnica, ya que, como se ha indicado anteriormente, el material requerido es extremadamente simple. Además, la existencia en

el mercado de capas finas de sílice químicamente ligadas ("bonded phases") ha ampliado notablemente el campo de aplicación de esta modalidad de cromatografía, puesto que ya no sólo pueden efectuarse separaciones por cromatografía de adsorción, sino también por cromatografía de reparto y por cromatografía de pares iónicos.

En consecuencia, frente a una mezcla de compuestos desconocidos o bien cuando se trata de mezclas muy complejas, antes de proceder a una separación por HPLC puede resultar muy útil un estudio inicial por cromatografía de capa fina. La extrapolación de resultados de una técnica a otra ha sido comprobada en numerosas separaciones.

Cualitativamente, es posible calcular a priori los tiempos de retención de HPLC a partir de los valores de R_f de capa fina. Para ello, es necesario calcular previamente el coeficiente de extrapolación, analizando una misma sustancia patrón con las dos técnicas.

Sin embargo, para que esta extrapolación sea cuantitativa es necesario que numerosas condiciones sean respetadas (fases estacionarias y móviles rigurosamente idénticas, separación de solutos de una misma familia química, condiciones de saturación de las placas reproducible, etc). Por todo ello, la extrapolación debe plantearse únicamente desde un punto de vista cualitativo, como una etapa previa para facilitar la selección de la fase móvil.

En el caso de los tintes estudiados, una separación por HPLC permitiría cuantificar cada uno de los colorantes separados, a condición de disponer de patrones de los mismos. Si se utiliza una columna de sílica gel y uno de los eluyentes estudiados (D o E, preferentemente) se obtendría un cromatograma con tantos picos como colorantes identificados por capa fina. El área de los picos cromatográficos sería función del flujo de eluyente que pasa a través de la columna y de la longitud de onda seleccionada en el detector (cuando se emplea un detector de absorbancia). Si se requiere un análisis de todos los colorantes, debe seleccionarse una longitud de onda común a todos ellos (probablemente 254nm, ya que son compuestos aromáticos). En caso de superposición de picos o de concentraciones de colorante muy bajas, puede ser interesante efectuar también otras detecciones adicionales a las longitudes de onda del espectro visible características de los propios colorantes a analizar. Otra opción mejor consiste en utilizar un detector "diode array", el cual registra el espectro completo de UV-visible en cada punto del cromatograma.

4. CONCLUSIONES

4.1. La cromatografía de capa fina (TLC) es una técnica muy simple, que presenta una gran utilidad en separaciones de compuestos para llevar a cabo un análisis cualitativo.

4.2. Resulta particularmente útil en la separación de colorantes, puesto que al tratarse de sustancias detectables a simple vista, no se requiere la etapa de revelado de las manchas.

4.3. En los tintes comerciales estudiados, esta técnica ha permitido detectar la presencia de hasta 6 colorantes distintos en una misma formulación y comparar los constituyentes de los diferentes tintes.

4.4. Dado que la cuantificación de los compuestos separados por TLC presenta una dificultad notable, los resultados obtenidos por esta técnica pueden emplearse como etapa previa a un estudio por HPLC.

5. AGRADECIMIENTOS

La autora agradece a la Sra. Montserrat Raspall la realización de las fotografías de las placas cromatográficas.

6 BIBLIOGRAFÍA

1. R.Rosset, M.Caude, A.Jardy. *Manuel pratique de chromatographie en phase liquide*. Masson, París, 374p. (1982)
2. M. López-Mesas. Tesis doctoral. Universitat Politècnica de Catalunya (UPC), Terrassa (2002).
3. J.M.Casas, J.García, J.M:Guadayol, J.Olivé. *Anàlisi instrumental 2: Cromatografia i electroforesi*. Edicions UPC, Barcelona, 250p.(1994).
4. E.Stahl. *Thin- Layer Chromatography: A Laboratory Handbook*. Springer-Verlag, Berlin, 1041p. (1969).
5. J.Sherma. *Thin-Layer Chromatography*. In R.A. Meyers. *Encyclopedia of analytical Chemistry*. Wiley, Chichester (2002).
6. T.Cserhati, E.Forgacs. *Trends in Thin Layer Chromatography*. J.Chromatogr. Sci., 35, 383-391 (1997).