



TÉCNICAS DE SEPARACIÓN: LA CROMATOGRAFÍA

beatriz.matute@eurecat.org

¿QUÉ ES ...?

La cromatografía es una técnica de separación utilizada para analizar, identificar o purificar compuestos en una mezcla.



¿Para qué utilizamos la cromatografía?

SEPARACIONES PREPARATIVAS

- Información cualitativa
- Limpiar y simplificar la matriz de la muestra

SEPARACIONES ANALÍTICAS

- Información cuantitativa
- Separar y determinar los componentes de una muestra

TÉCNICAS DE SEPARACIÓN: LA CROMATOGRAFÍA

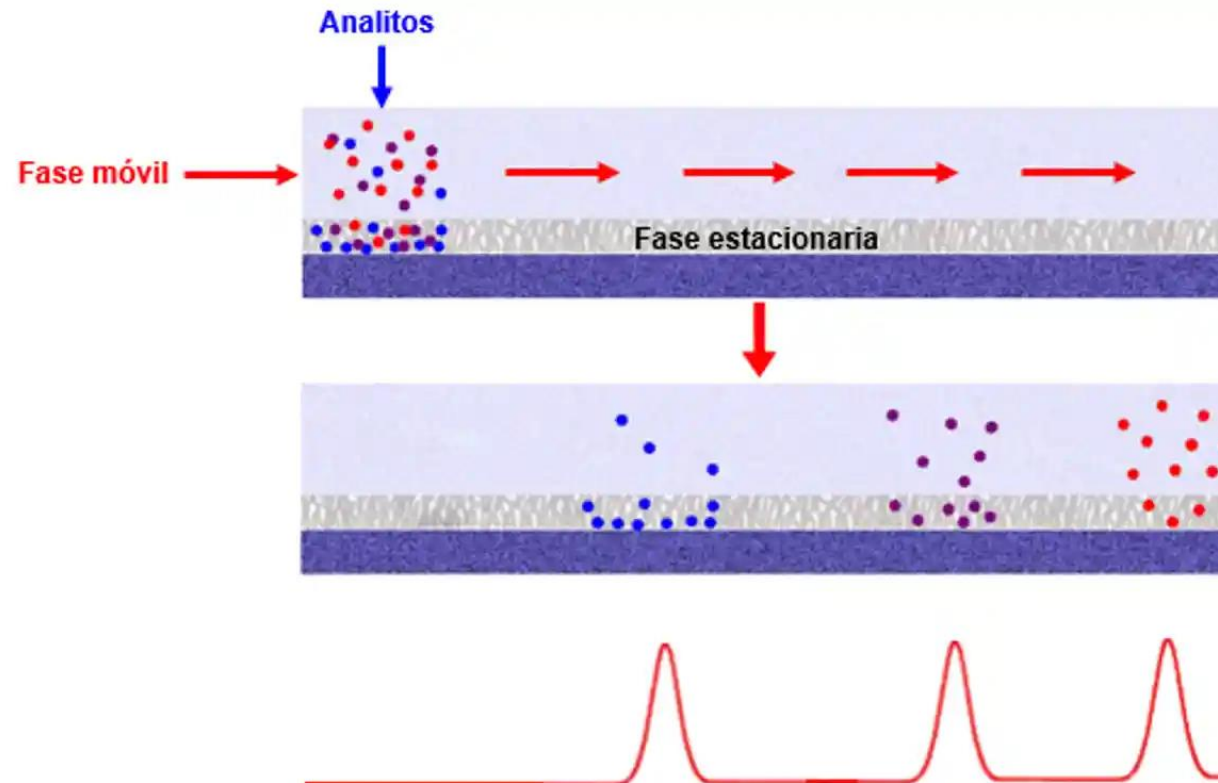
Se fundamenta en la distribución de los componentes de una mezcla entre una fase estacionaria (que no se mueve) y una fase móvil (que fluye a través de la estacionaria).

FASE ESTACIONARIA

El objetivo de la fase estacionaria es retrasar el paso de los componentes de la muestra

FASE MÓVIL

El objetivo de la fase móvil es transportar/arrastrar los analitos a través de todo el sistema



PROCESO ANALÍTICO:

PLANTEAMIENTO DEL
PROBLEMA

1. Modelización del problema (selección
del método)

2. Toma de muestra

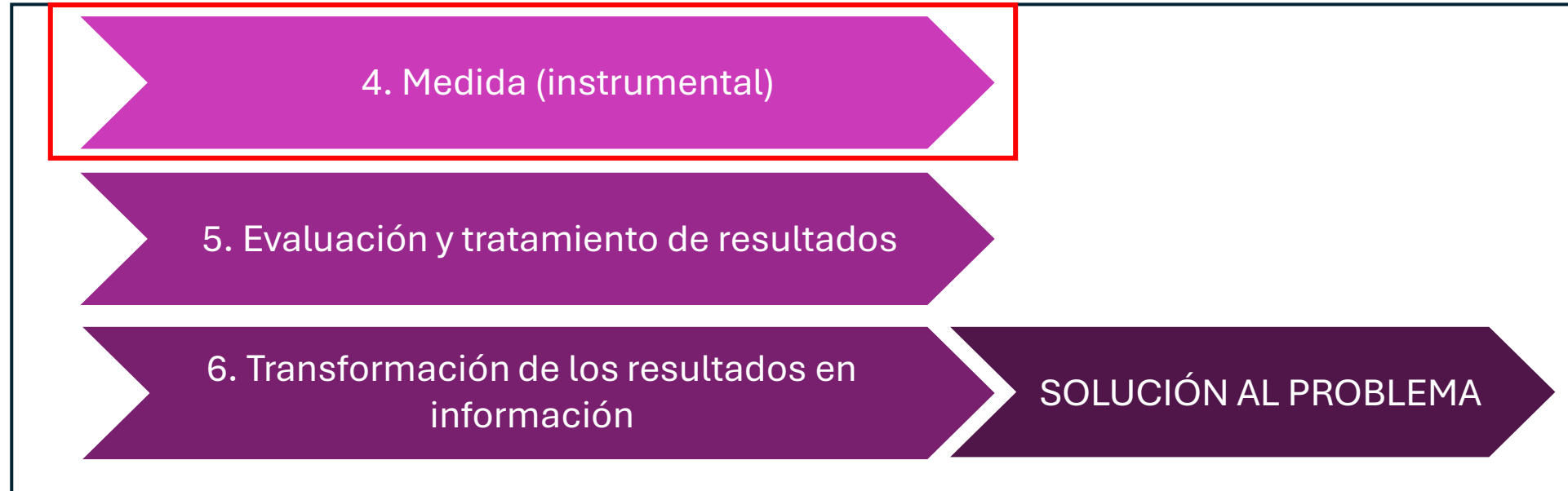
3. Preparación de la muestra

4. Medida (instrumental)

5. Evaluación y tratamiento de resultados

6. Transformación de los resultados en
información

SOLUCIÓN AL PROBLEMA



CARACTERÍSTICAS DE LA CROMATOGRAFÍA:

- Adaptabilidad de la técnica:
 - Aplicable tanto a moléculas pequeñas como grandes
 - Aplicable tanto a compuestos volátiles como no volátiles
- Capacidad de carga: del orden de mg-ng
- Capacidad de fraccionamiento: Muy elevada
- Selectividad: Elevada. Muy marcada por los detectores utilizados
- Velocidad: generalmente rápida
- Otros: El coste depende del tipo de cromatografía
 - Gases: más utilizados por compuestos volátiles
 - Líquidos: más utilizados para compuestos polares



PARÁMETROS CARACTERÍSTICOS DE LA SEPARACIÓN CROMATOGRÁFICA

1 Parámetros de retención:

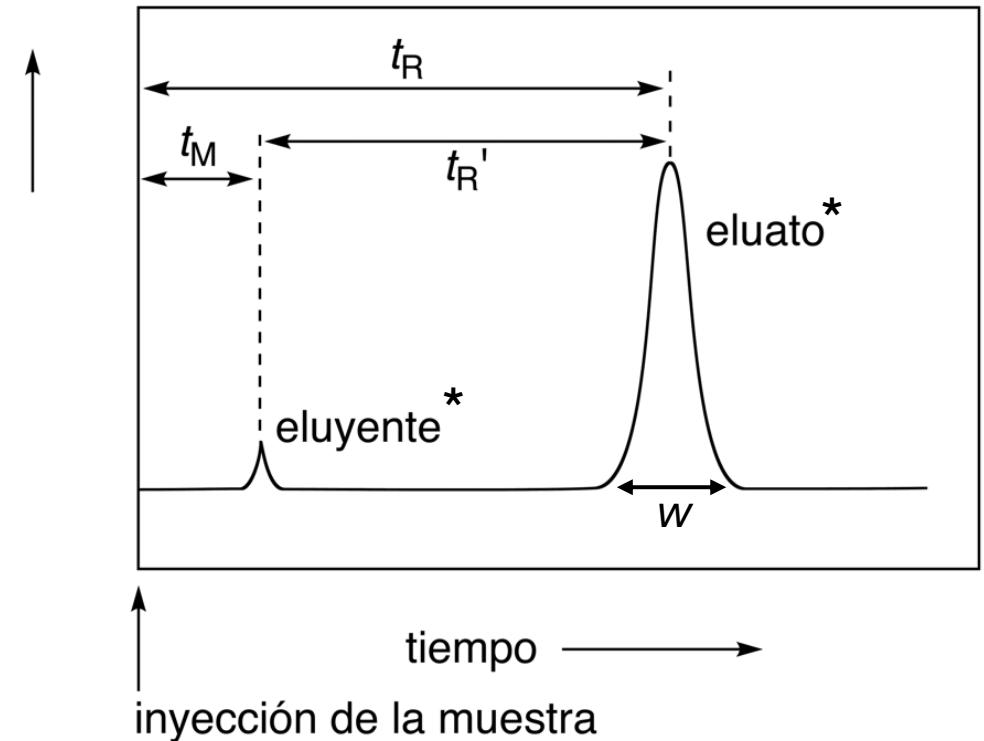
- Tiempo de retención (t_R) en cromatografía de columna
 - R_f (Factor de retención) en cromatografía plana
- Volumen de retención
- Ancho de referencia
- Tiempo muerto (t_M)
- Tiempo de retención ajustado (t'_R)
- Factor de capacidad (K)
- Factor de selectividad (α)
- Velocidad media de la fase móvil (μ)

2 Eficiencia

3 Resolución

1 PARÁMETROS DE RETENCIÓN

- Los **compuestos eluidos** son transportados por la fase móvil a un detector que los registra en forma de curvas gaussianas. Esta señal se denomina pico y el conjunto de picos se denomina cromatograma.
- **Cromatograma:** Diagrama donde se representan los resultados de la separación de una mezcla mediante técnicas cromatográficas.
- **Ancho de referencia (w):** Anchura de la banda cromatográfica de un soluto, medida en la línea de base.
- **Volumen de retención (V_T):** Volumen de la fase móvil necesario para mover el soluto desde el punto de inyección hasta el detector.



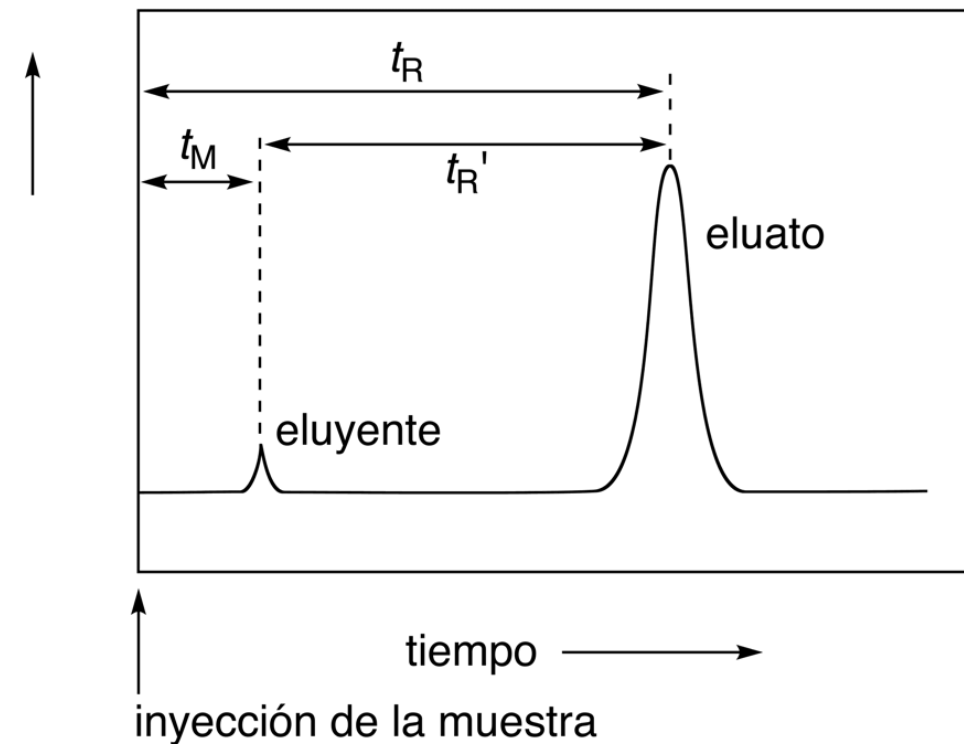
***Eluato:** Compuesto que ha sido eluido de la columna cromatográfica → ha salido de la columna (y llegado al detector). Son los analitos o compuestos que se quieren determinar.

***Eluyente:** Compuesto que propicia que el eluato salga de la columna cromatográfica → fase móvil

1 PARÁMETROS DE RETENCIÓN

- **Tiempo de retención (t_R) o factor de retención (R_f):** Es el tiempo que transcurre entre que metemos la muestra (analito) en la columna y el detector da señal sobre ella.
- **Tiempo muerto (t_M):** Es el tiempo que tardan los analitos que no han sido retenidos en la fase estacionaria en llegar al detector. Van a la misma velocidad que la fase móvil.
- **Tiempo ajustado (t'_R):** Tiempo en que un determinado analito pasa por la fase estacionaria. Nos da una idea del tiempo que necesita un determinado soluto para viajar por la fase estacionaria.

$$t'_R = t_R - t_M$$

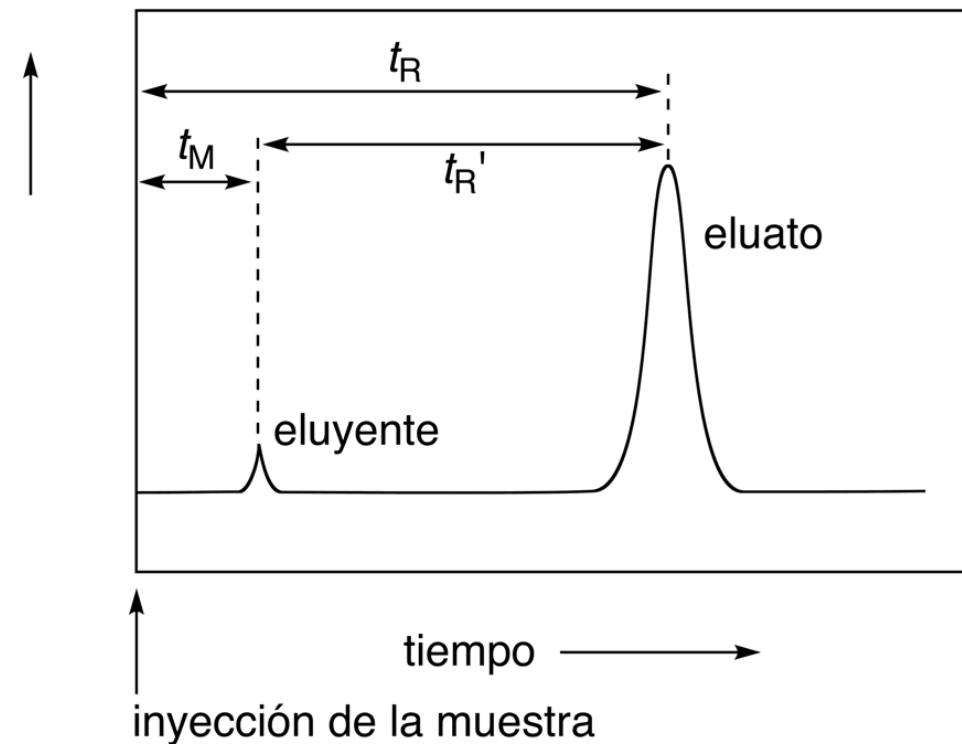


1 PARÁMETROS DE RETENCIÓN

- **Factor de capacidad (K):** Medida de la intensidad con que la fase estacionaria retiene un soluto. Es el tiempo que un soluto está en la fase estacionaria respecto al tiempo que el soluto está en la fase móvil.

$$K = \frac{t_R - t_M}{t_M}$$

$$\left\{ \begin{array}{l} K \ll 1 \rightarrow \text{Elución rápida} \\ K = 0 \rightarrow \text{El compuesto no está retenido} \\ K > 20 \rightarrow \text{Elución muy lenta} \end{array} \right.$$



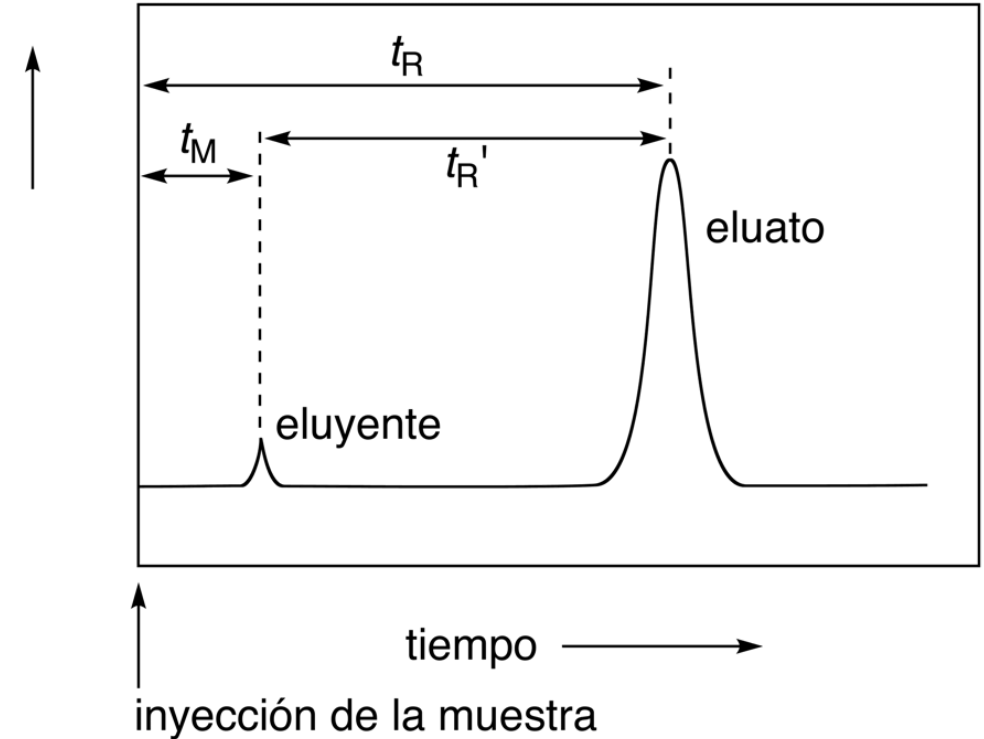
1 PARÁMETROS DE RETENCIÓN

- **Factor de selectividad (α):** Indica la separación que hay entre dos máximos.

Para separar dos sistemas de analitos determinados necesitan presentar una diferencia de retención entre ambos compuestos.

$$\alpha = \frac{K_A}{K_B} = \frac{t'_{RB}}{t'_{RA}} \quad t'_{RB} > t'_{RA}$$

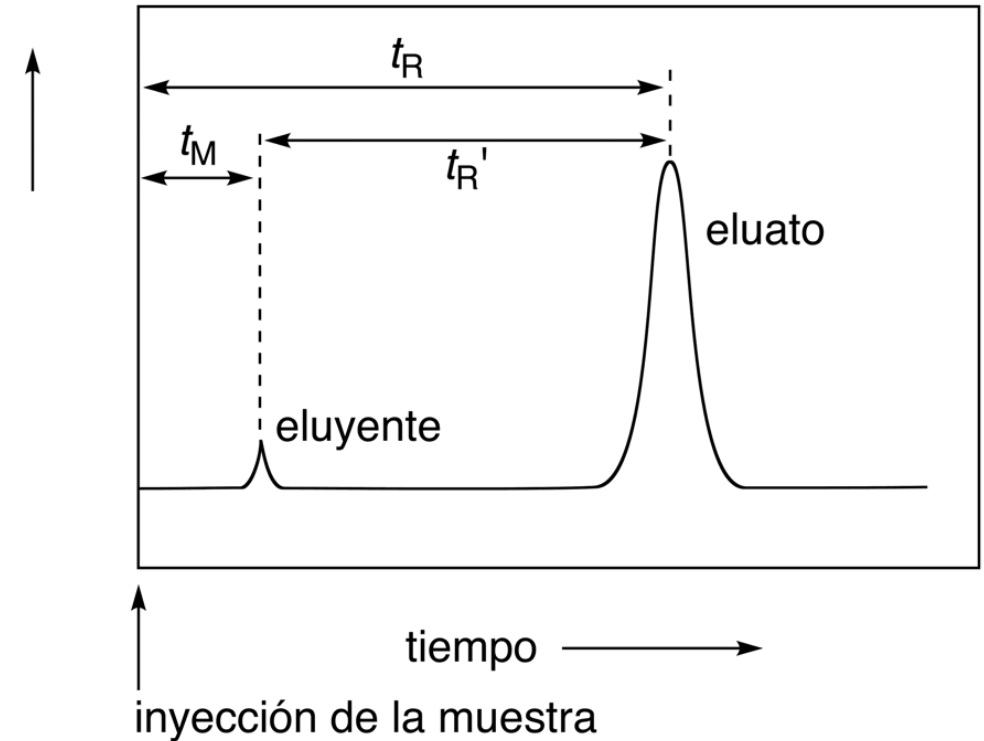
$$\left\{ \begin{array}{l} \alpha = 1 \rightarrow \text{Los dos tiempos de retención son iguales} \\ \alpha \gg 1 \rightarrow \text{Mayor es la diferencia en el tiempo de retención} \end{array} \right.$$



1 PARÁMETROS DE RETENCIÓN

- **Velocidad media de la fase móvil (μ):** Cuanto mayor sea la velocidad, menor será el tiempo de retención (t_R). Esto puede suponer que, si aumentamos mucho la velocidad, dos picos bastante separados acaben relativamente juntos.

$$\mu = \frac{L}{t_M} \quad cm/s$$



2 EFICIENCIA

Mide el grado de ensanchamiento de las bandas (picos) a medida que los analitos avanzan a través del sistema cromatográfico.

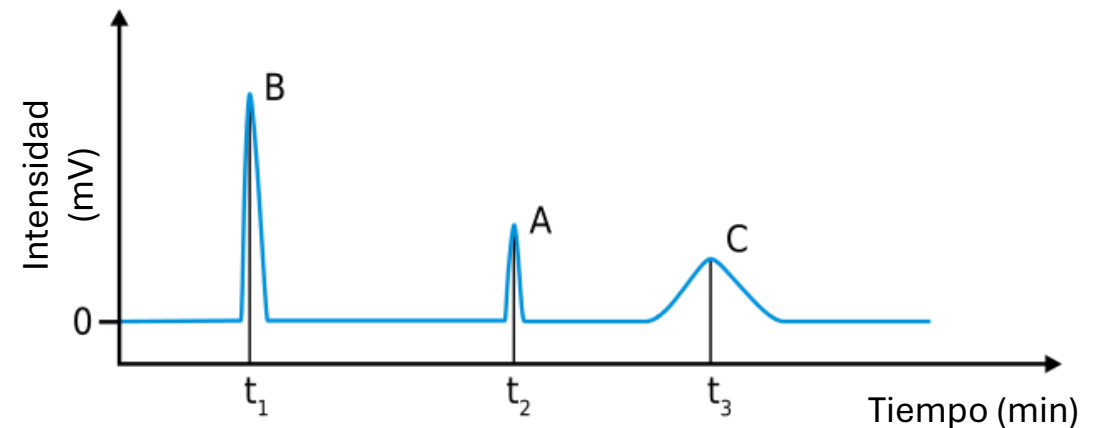
Cuanto más tiempo pase el analito en la fase estacionaria, más amplio será el pico, debido a que con el tiempo aumenta la difusión de la banda móvil del analito.

El ensanchamiento de las bandas es:

- Directamente proporcional al tiempo de residencia en la columna
- Inversamente proporcional a la velocidad de la fase móvil

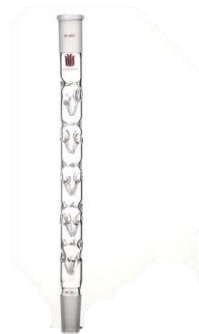
¿Cómo se mide?

- Teoría de los platos
- Teoría de las velocidades



2 EFICIENCIA

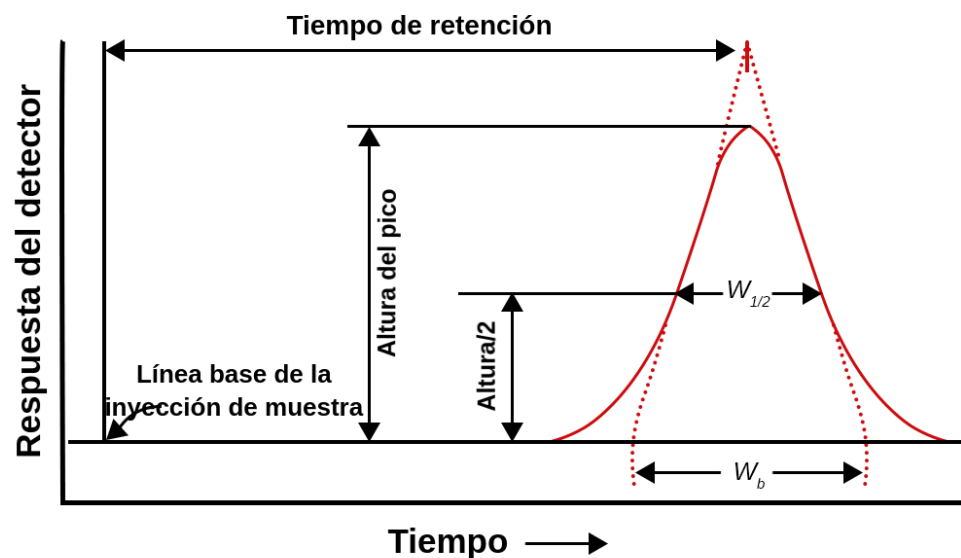
TEORÍA DE LOS PLATOS



Columna de destilación



Columna cromatográfica



$$H = L/N$$

$$N_h = 16 \left(\frac{t_R}{W} \right)^2$$

$$N_h = 5.54 \left(\frac{t_R}{W_{1/2}} \right)^2$$

Plato: Equilibrio de distribución

H: Altura de los platos

N: Número de platos

W: Anchura en la base línea

$W_{1/2}$: Anchura de pico a media altura

L: Longitud de la columna

N_h : Eficiencia

2 EFICIENCIA

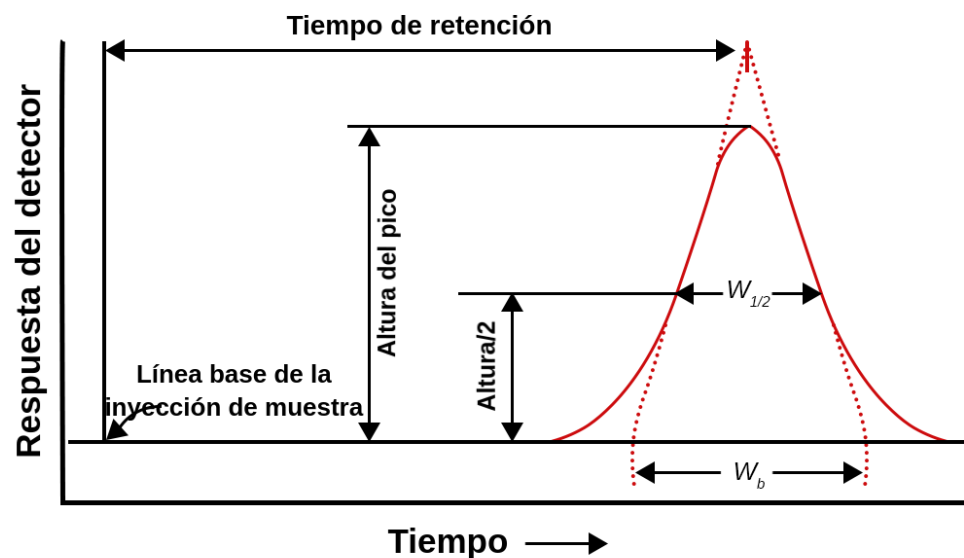
TEORÍA DE LOS PLATOS



Columna de destilación



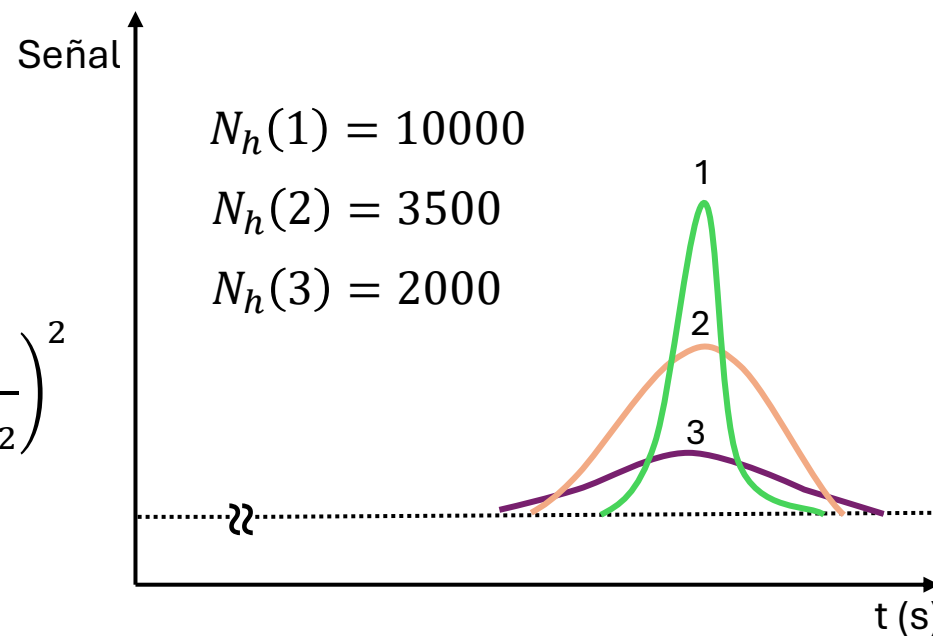
Columna cromatográfica



$$H = L/N$$

$$N_h = 16 \left(\frac{t_R}{W} \right)^2$$

$$N_h = 5.54 \left(\frac{t_R}{W_{1/2}} \right)^2$$



2 EFICIENCIA

TEORÍA DE LAS VELOCIDADES:

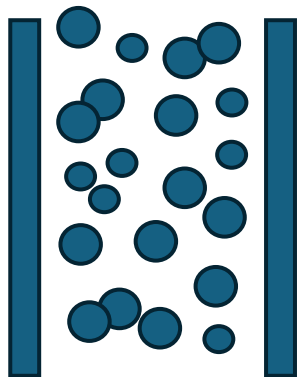
$$H = A + \frac{B}{\mu} + C\mu$$

Ecuación de Van Deemter

Término A → Difusión de Eddy:

Debida a que cada molécula puede seguir un flujo diferente como fruto de la diferencia del tamaño de partícula, la forma de las partículas, la calidad del empaquetamiento de la columna, ...

<https://www.youtube.com/watch?v=p2KvzK81s2g&list=PLmRp0x9aPBrL3ha0tZ15HyDQTlo27W59V>



Término B → Difusión longitudinal:

Este término hace referencia a la difusión de moléculas individuales de analito en la fase móvil a través de la dirección longitudinal de la columna.

<https://www.youtube.com/watch?v=wG5nDzKuGDU&list=PLmRp0X9aPBrL3ha0tZ15HyDQTlo27W59V&index=3>



2 EFICIENCIA

TEORÍA DE LAS VELOCIDADES:

$$H = A + \frac{B}{u} + C\mu$$

Ecuación de Van Deemter

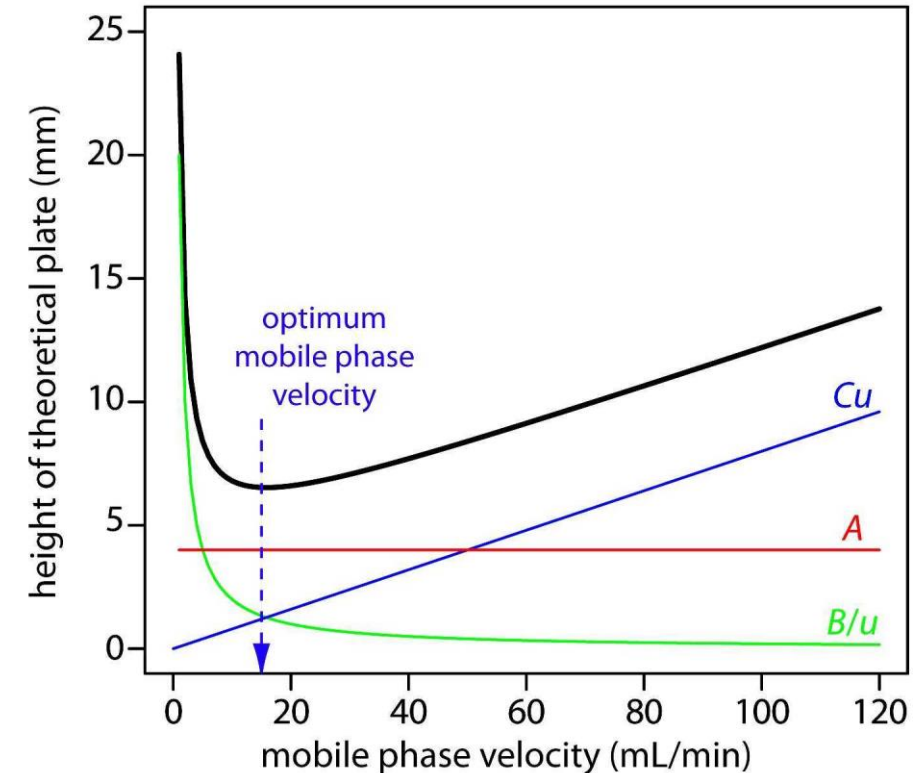
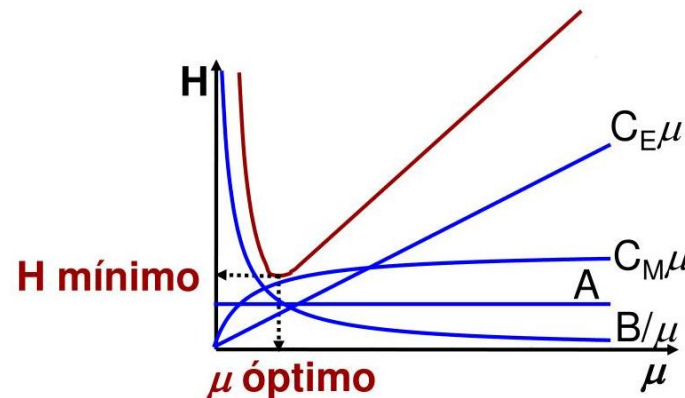
Término C → Resistencia a la transferencia de masa:

Este término hace referencia a la transferencia de masa de los componentes de muestra entre la fase estacionaria y la fase móvil durante la separación.

Hay dos términos separados de transferencia de masa:

- C_M : Describe la contribución de la anchura de pico en la fase móvil
- C_E : Describe la contribución de la anchura de pico en la fase estacionaria

$$H = A + \frac{B}{u} + C_E\mu + C_M\mu$$



[Fundamentals of HPLC 32 - Describing Mass Transfer](#)

[Fundamentals of HPLC 33 - Mass Transfer and Flow](#)

[Fundamentals of HPLC 34 - A Happy Medium](#)

[Fundamentals of HPLC 35 - Optimising Velocity in HPLC](#)

3 RESOLUCIÓN

Indica la **SEPARACIÓN** entre dos picos consecutivos:

- Si la relación de alturas es similar

$$R = \frac{t_{R,B} - t_{R,A}}{(w_A + w_B)/2}$$

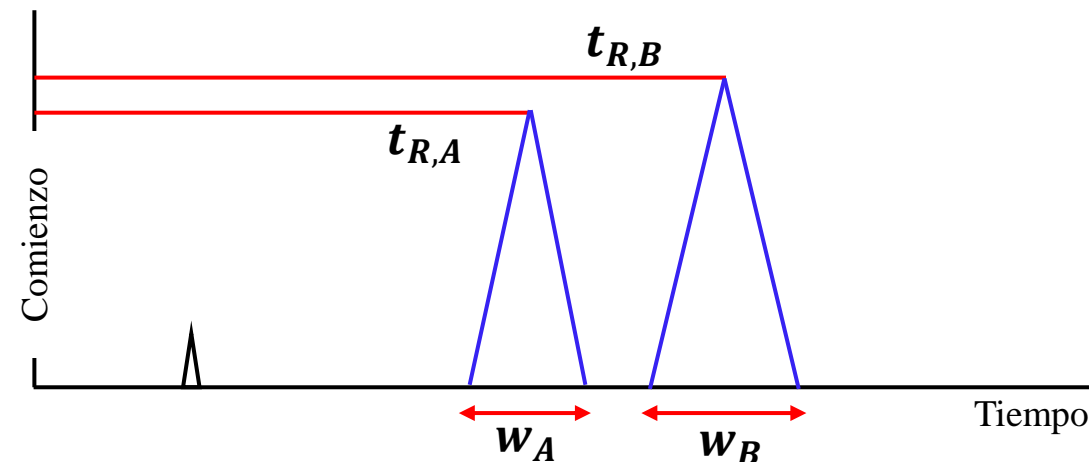
$R = 1.5 \rightarrow$ Buena separación (solapamiento de sólo un 0.3%)

$R = 1.0 \rightarrow$ Solapamiento de un 4%

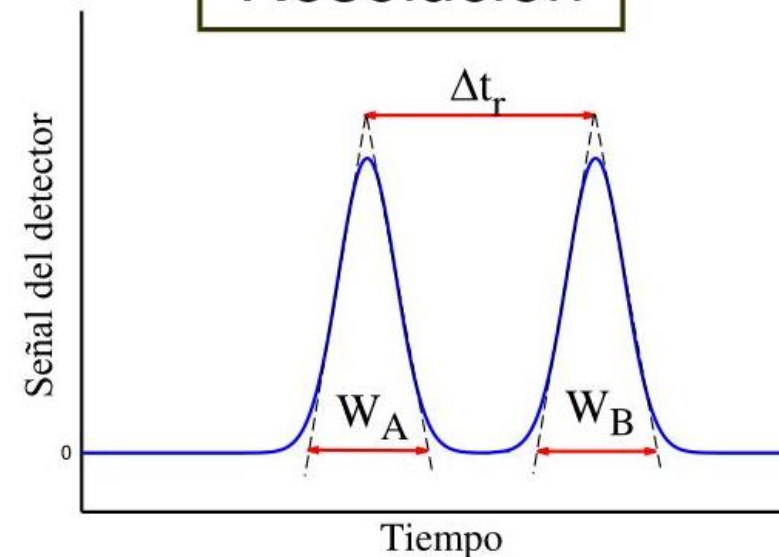
$R = 0.75 \rightarrow$ Separación mala

- Si los picos tienen alturas muy diferentes

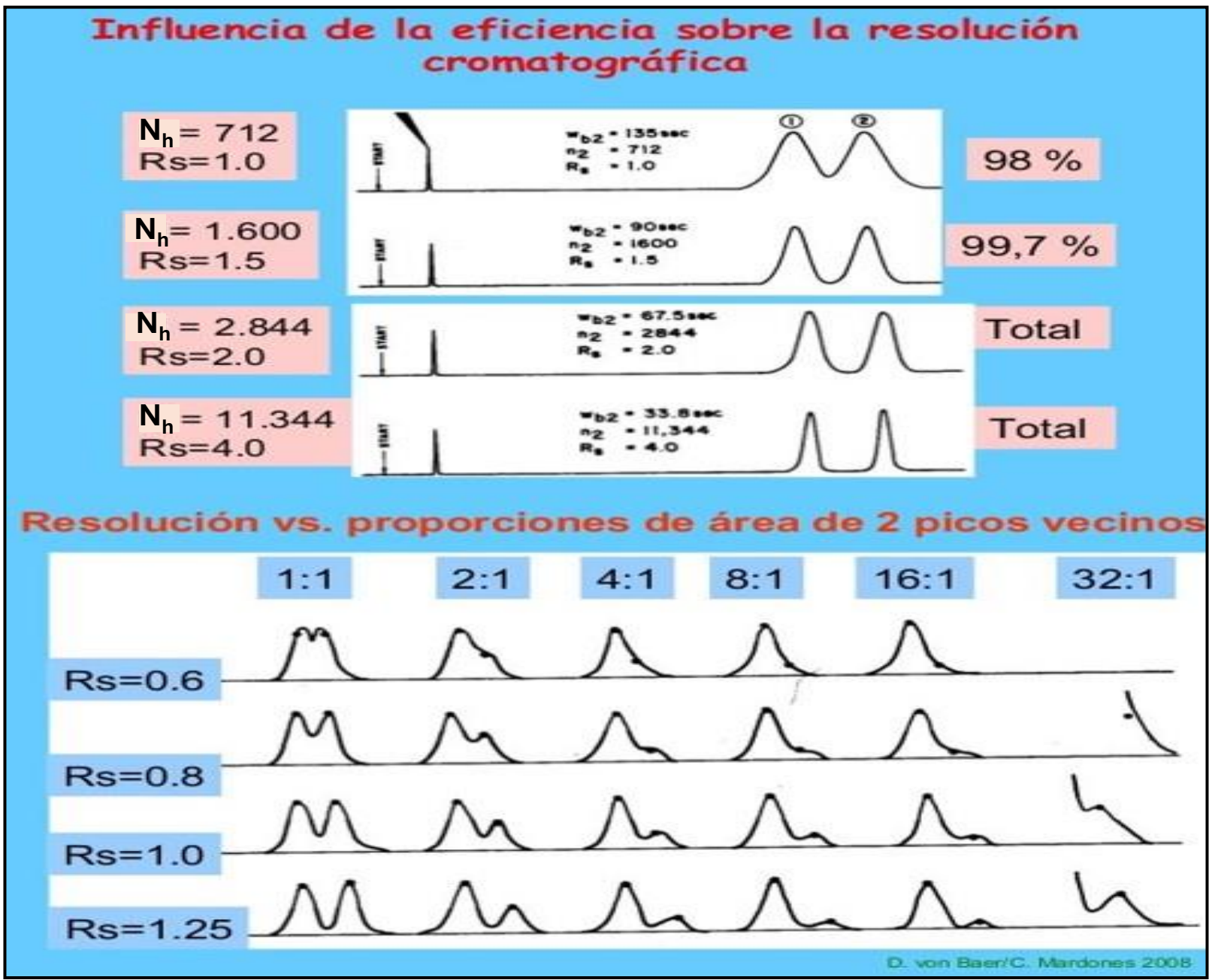
$$R = \frac{\sqrt{N}}{4} \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \left(\frac{K'_B}{1 + K'_B} \right)$$



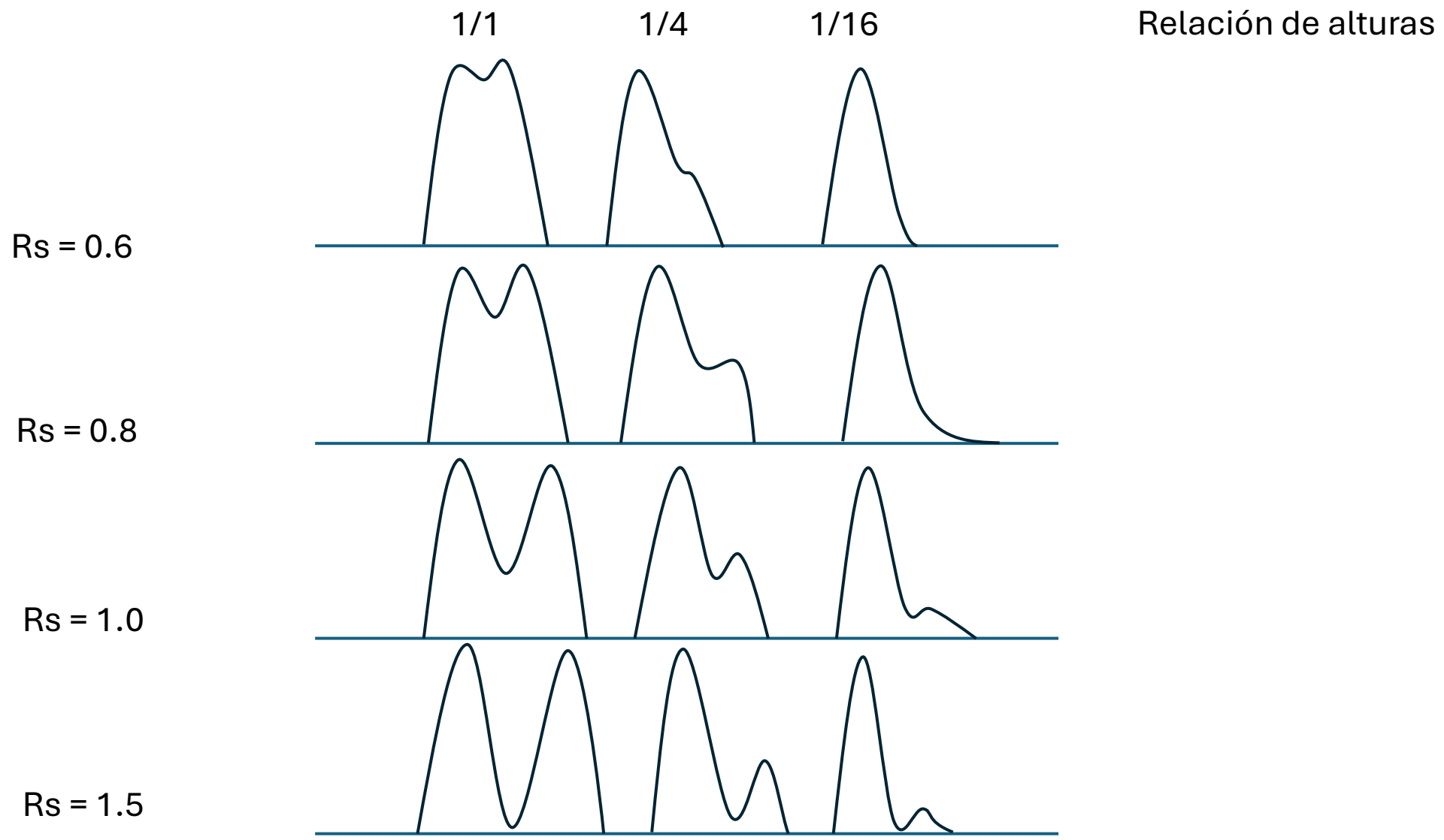
Resolución



3 RESOLUCIÓN



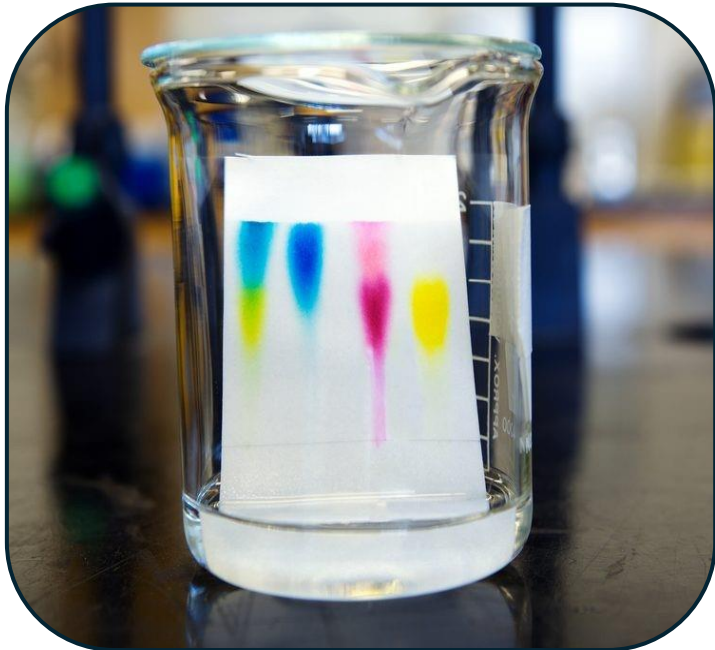
3 RESOLUCIÓN



TIPOS DE CROMATOGRAFÍA

1 CROMATOGRAFÍA PLANA

- Cromatografía en papel
- Cromatografía en capa fina



2 CROMATOGRAFÍA EN COLUMNA

- Cromatografía líquida (LC)
- Cromatografía de gases (GC)
- Otros: GC-MC



Liquid Chromatography (LC)

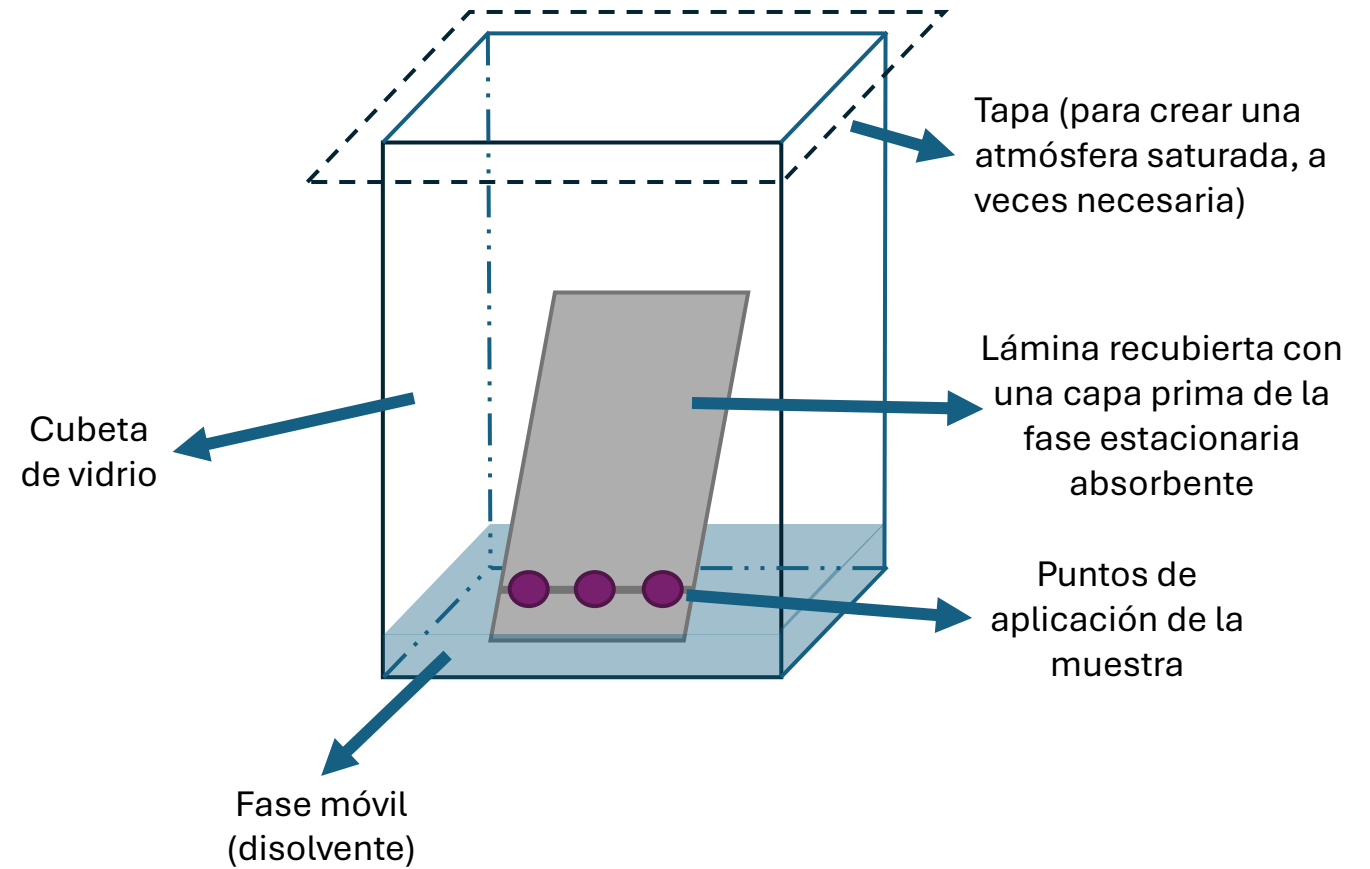
Gas Chromatography (GC)

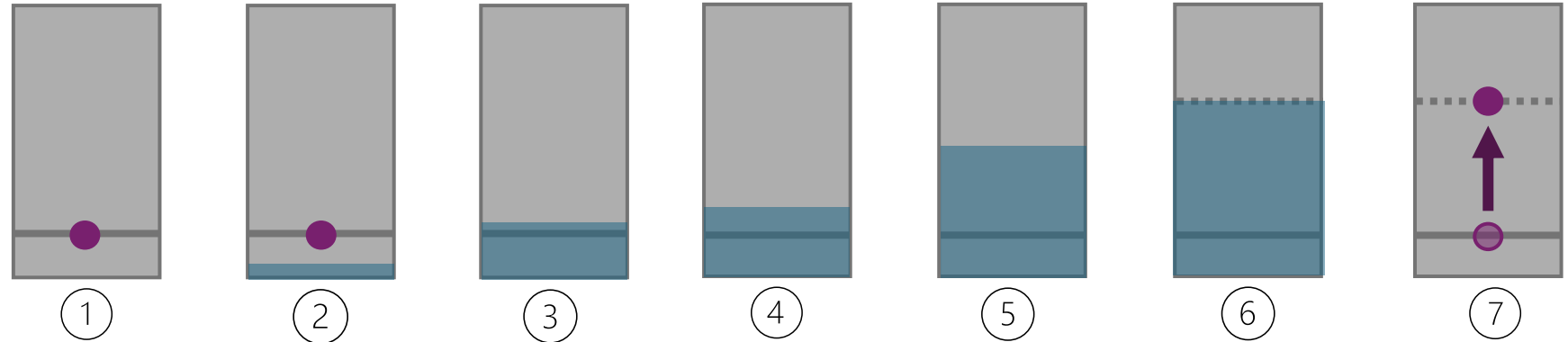
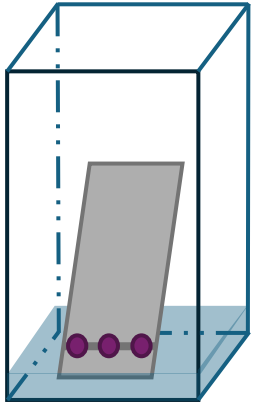
1 CROMATOGRAFÍA PLANA

Cromatografía en papel



Cromatografía de capa fina



1 CROMATOGRAFÍA PLANA

① Aplicación de la muestra

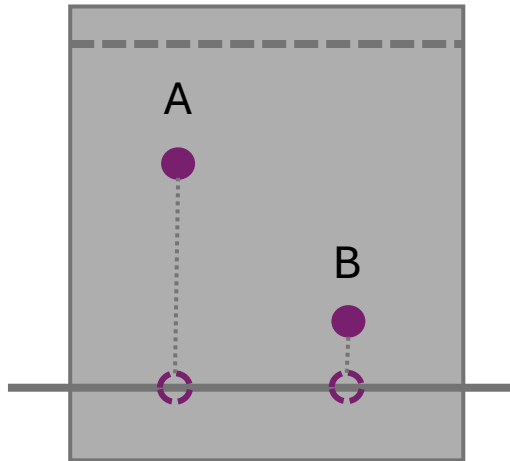
② Se sumerge el extremo inferior en la fase móvil

③ - ⑤ La fase móvil asciende por capilaridad y se va produciendo la separación de los componentes

⑥ Se marca el frente de avance del disolvente y se deja secar la placa

⑦ Se revela el avance de cada componente

1 CROMATOGRAFÍA PLANA



A → Analito con menos interacciones con la fase estacionaria. Por tanto, la fase móvil lo arrastra mucho

B → Analito con gran interacción con la fase estacionaria. Por tanto, es poco arrastrado por la fase móvil

$$R_f = \frac{\text{Distancia recorrida por la sustancia}}{\text{Distancia recorrida por el frente del disolvente}}$$

SOPORTE

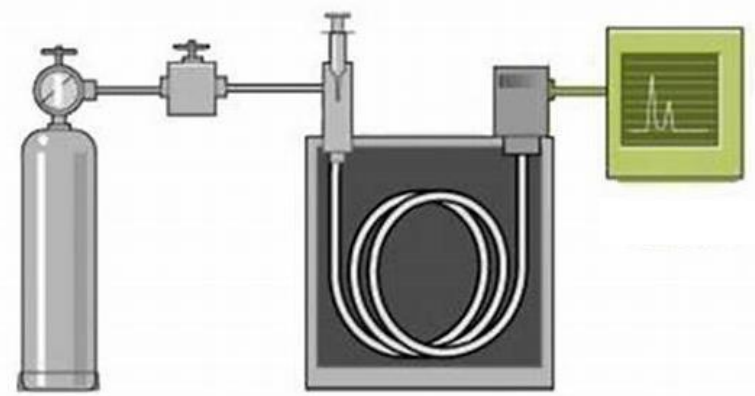
- Soporte de **VIDRIO**
- Soporte de **PLÁSTICO**
- Soporte de **METAL**

ADSORBENTES

- Sílica gel
- Alúmina
- Celulosa
- Poliamidas

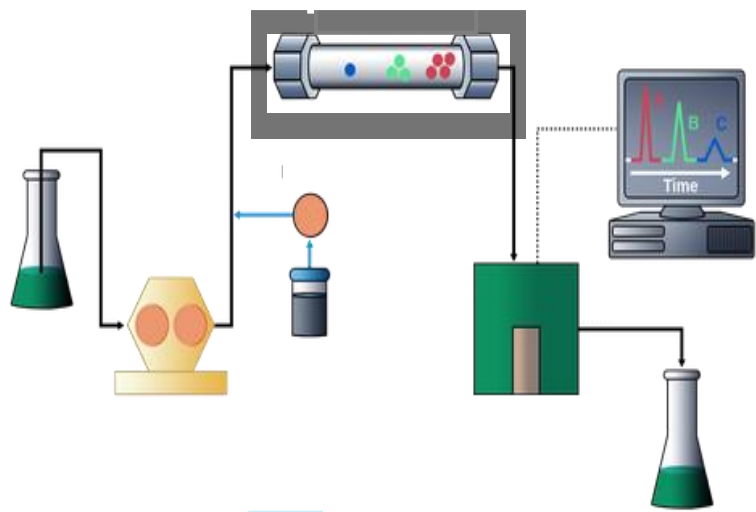
2 CROMATOGRAFÍA EN COLUMNA

Cromatografía de Gases (GC)

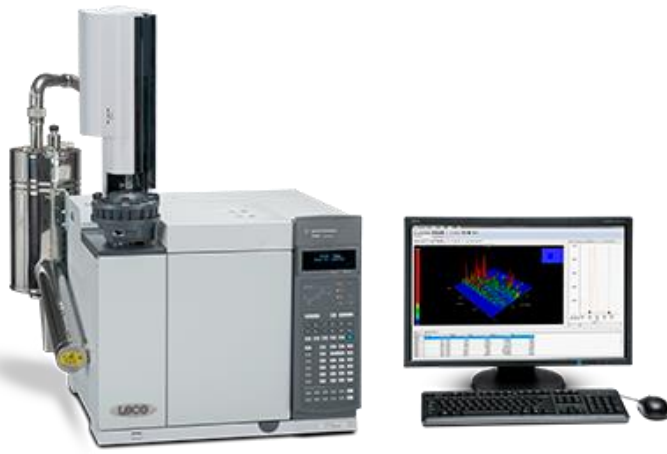


E
S
Q
U
E
M
A

Cromatografía de Líquidos (LC)



E
S
Q
U
E
M
A



E
Q
U
I
P
O



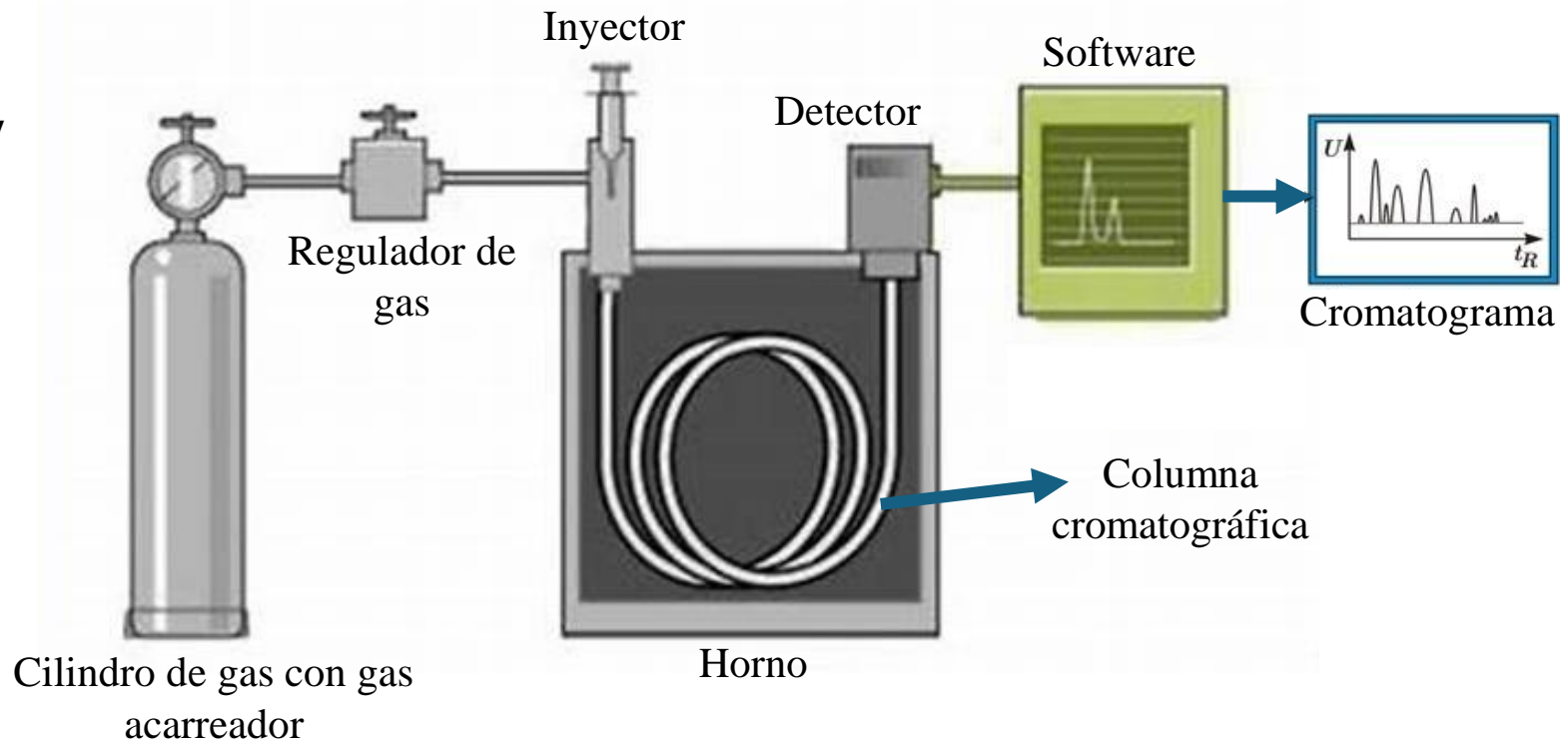
E
Q
U
I
P
O

2 CROMATOGRAFÍA EN COLUMNA: CROMATOGRAFÍA DE GASES (GC)

- Separación de **sustancias volátiles** y térmicamente estables

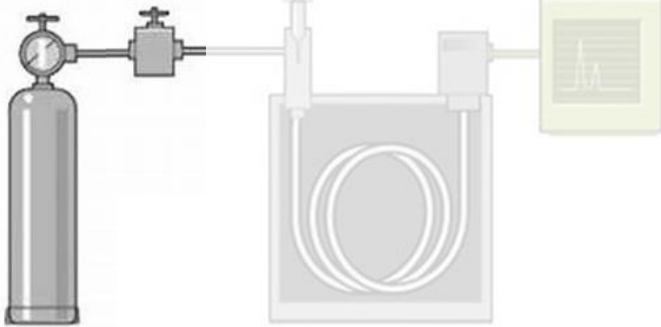
$$T_{eb} \approx 450^{\circ}$$

$$PM < 1000$$



2 CROMATOGRAFÍA EN COLUMNA: CROMATOGRAFÍA DE GASES (GC)

Regulador de gas

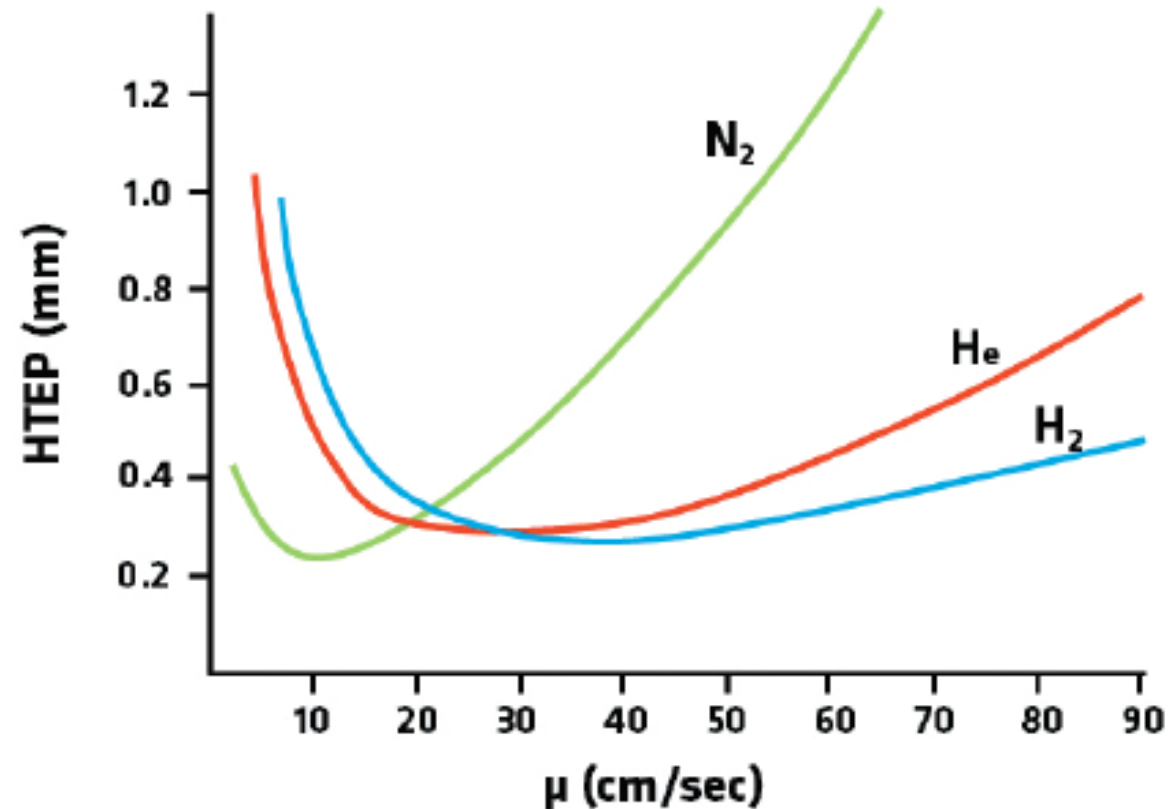


Cilindro de gas con
gas acarreador

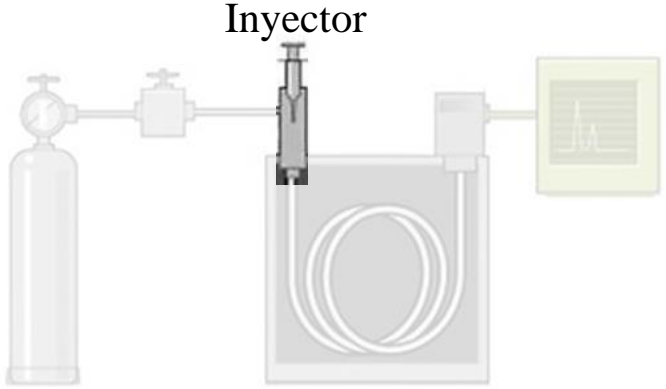
Gases utilizados:

- Hidrógeno (H_2)
- Helio (He)
- Nitrógeno (N_2)
- Argón (Ar)
- Dióxido de carbono (CO_2)

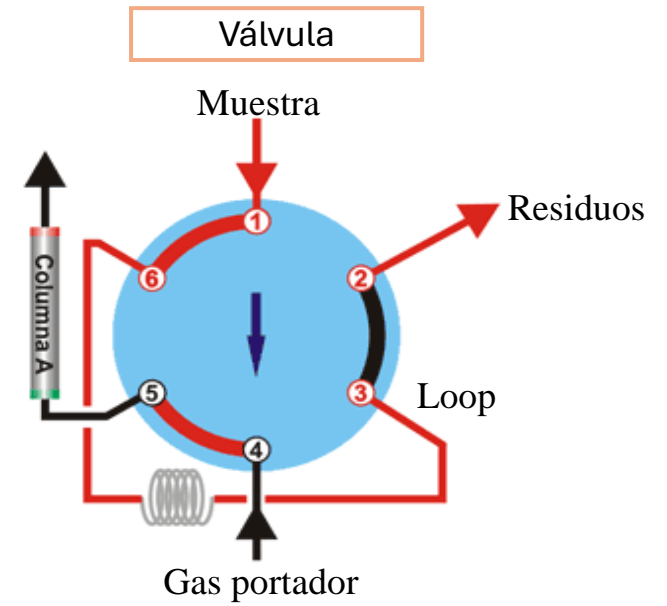
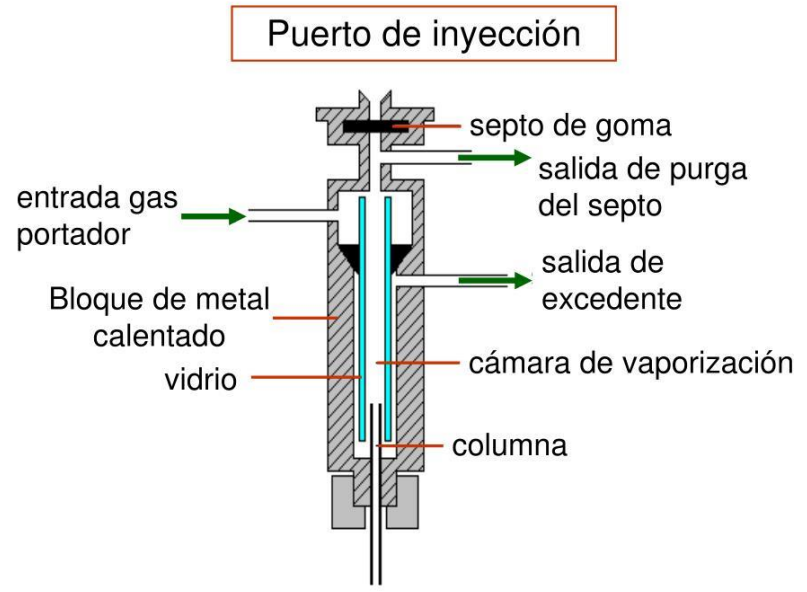
El gas portador (fase móvil): Tiene la función de transportar el/los analito/s, a través de la columna hasta el detector



2 CROMATOGRAFÍA EN COLUMNA: CROMATOGRAFÍA DE GASES (GC)



Inyección de la muestra a ser analizada.



Dispositivo de cogida de muestra +

- Microjeringas
- Válvulas
- ...

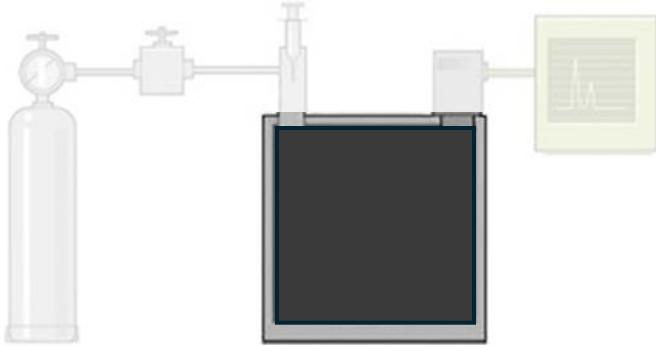
Puerto de inyección

- Inyector Split-Splitless
- Inyector on-column
- ...

[Split vs. Splitless Injection](#)

$$Split\ ratio\ (s.r.) = \frac{Flujo\ válvula\ de\ división}{Flujo\ columna}$$

2 CROMATOGRAFÍA EN COLUMNA: CROMATOGRAFÍA DE GASES (GC)

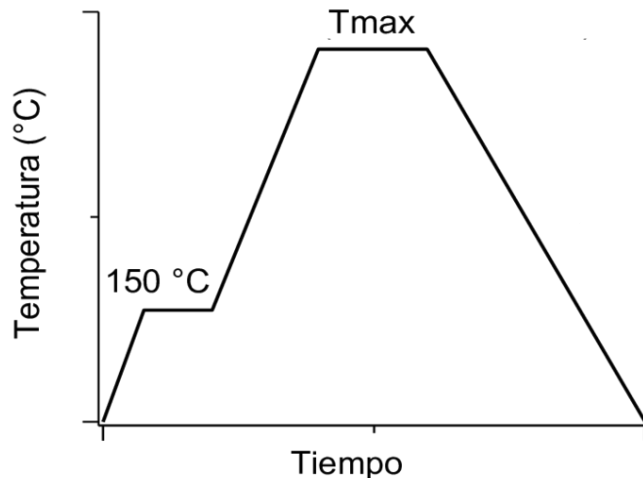


Horno con temperaturas programadas

La temperatura modifica la separación cromatográfica

- Temperatura mínima: temperatura de ebullición de los analitos y solventes
- Temperatura máxima: Estabilidad térmica de analitos y fase estacionaria

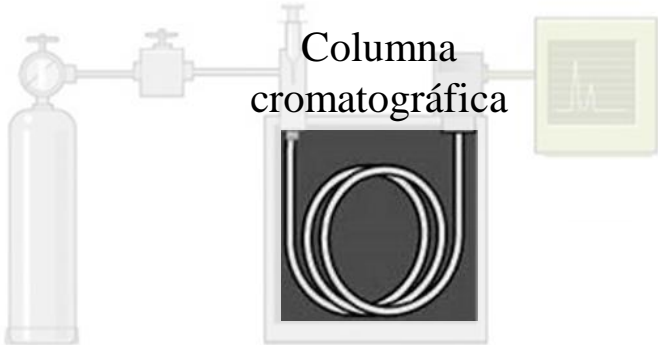
Rampa de temperatura



Tipos de elución:

- Isotérmica (separación isotérmica)
- Con programación de temperatura → Separar mezclas de analitos con características muy diferentes

2 CROMATOGRAFÍA EN COLUMNA: CROMATOGRAFÍA DE GASES (GC)

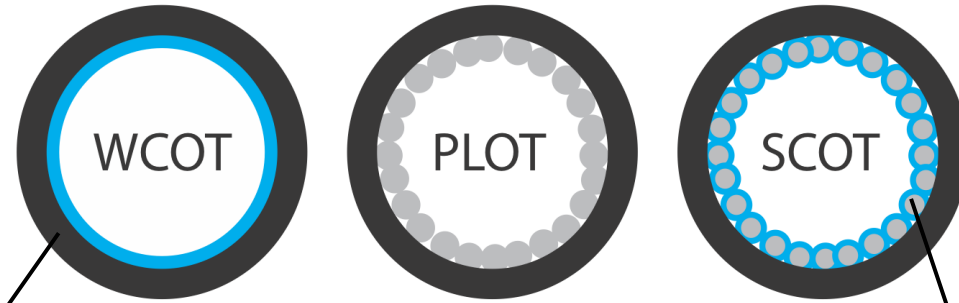
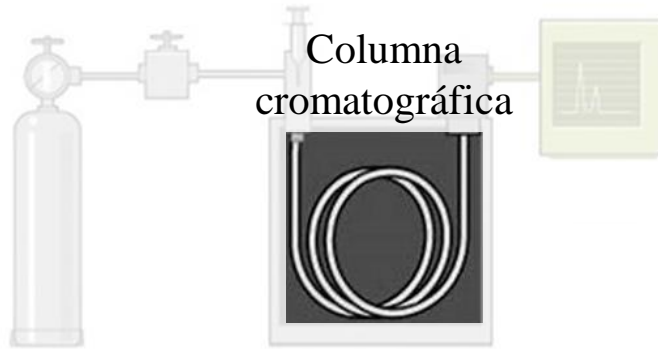


Tipos de columnas:

- Columnas rellenas
- Columnas abiertas (capilares)

	RELLENAS	CAPILARES ABIERTOS
Longitud (m)	0.5 – 5	5 – 100
Diámetro interno (mm)	2 – 4	0.1 – 0.53
Flujo (ml/min)	10 – 60	0.5 – 15
Presión de cabeza	10 – 40	3 – 40
Número de platos	4000	250000
Espesor de película (µm)	1 – 10	0.1 – 8

2 CROMATOGRAFÍA EN COLUMNA: CROMATOGRAFÍA DE GASES (GC)



- Columna capilar
- Fase estacionaria líquida
- Soporte sólido poroso
- Soporte sólido poroso cubierto con fase estacionaria líquida

Materiales de la columna:

- Aluminio
- Sílice fundida (columnas capilares)
- Acero inoxidable (columnas rellenas)

Soportes:

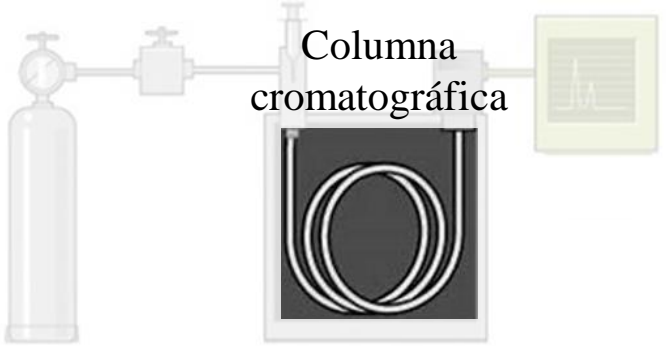
- Tierras de diatomeas (90% SiO_2)
- Soportes de síntesis con 99% SiO_2
- Polímeros orgánicos

WCOT: Wall-Coated Open Tubular

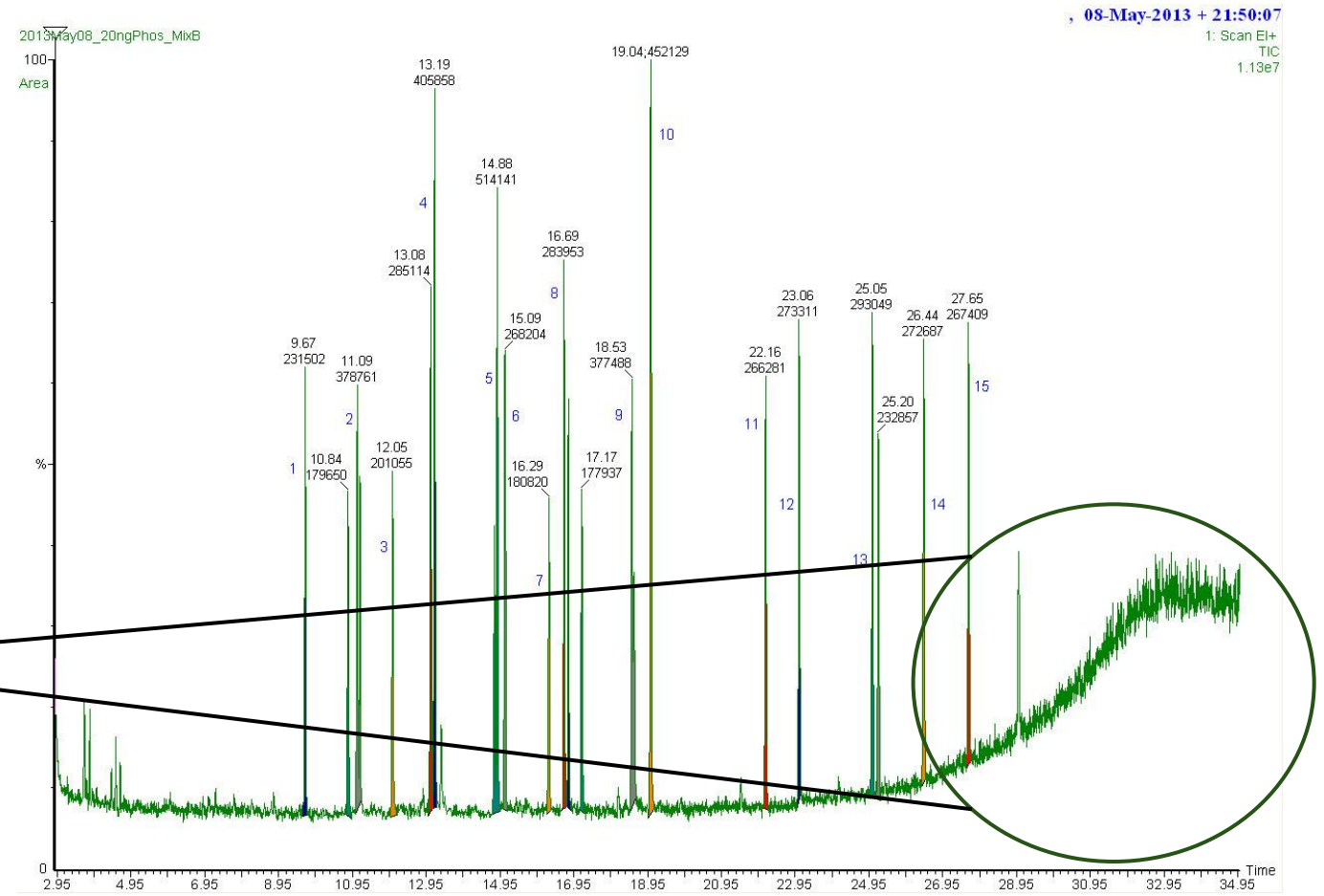
PLOT: Porous Layer Open Tubular

SCOT: Support-Coated Open Tubular

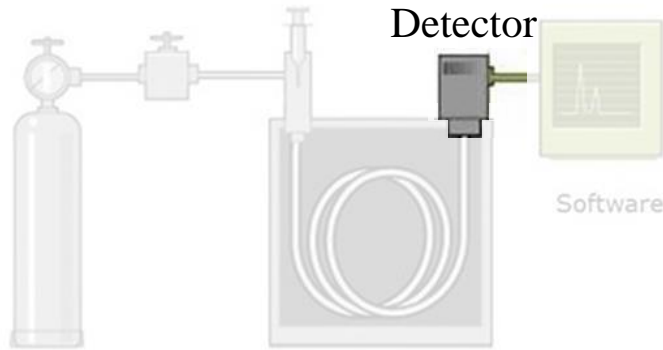
2 CROMATOGRAFÍA EN COLUMNA: CROMATOGRAFÍA DE GASES (GC)



✗ SANGRADO!!



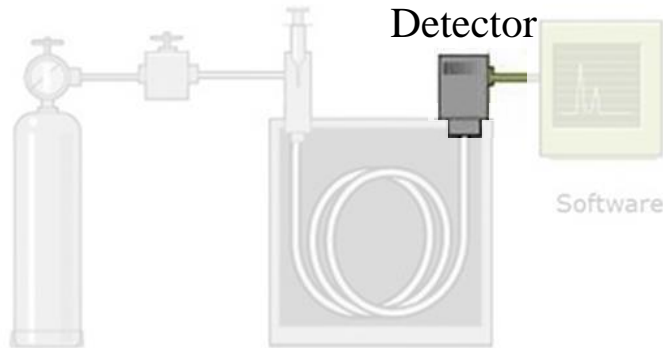
2 CROMATOGRAFÍA EN COLUMNA: CROMATOGRAFÍA DE GASES (GC)



Clasificación de detectores según su fundamento físico:

- Conductividad térmica
 - TCD (Thermal Conductivity Detector)
- Ionización
 - FID (Flama Ionization Detector)
 - NPD (Nitrogen-Phosphorus Detector)
 - ECD (Electron Capture Detector)
- Electroquímicos
- Espectroscópicos
 - MSD (Mass Spectrometry Detector)

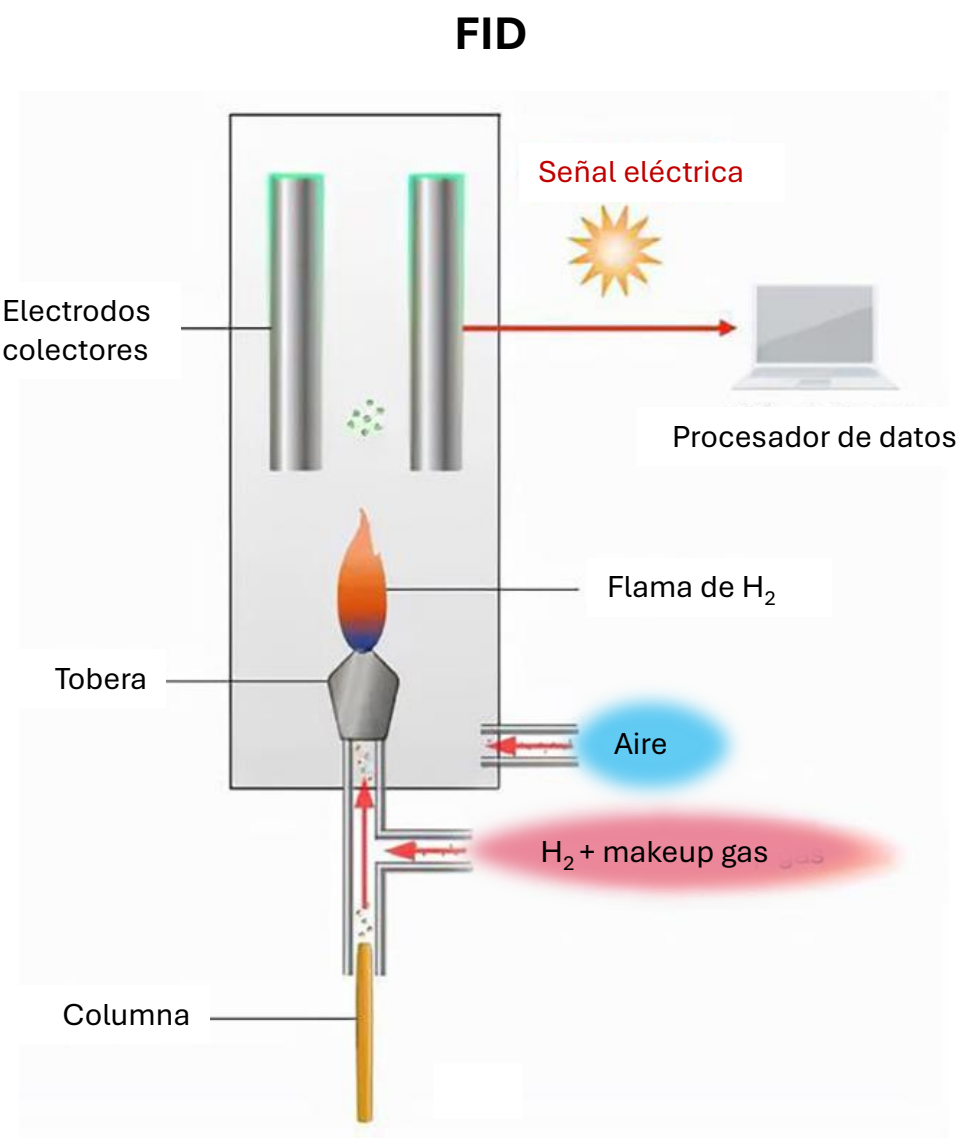
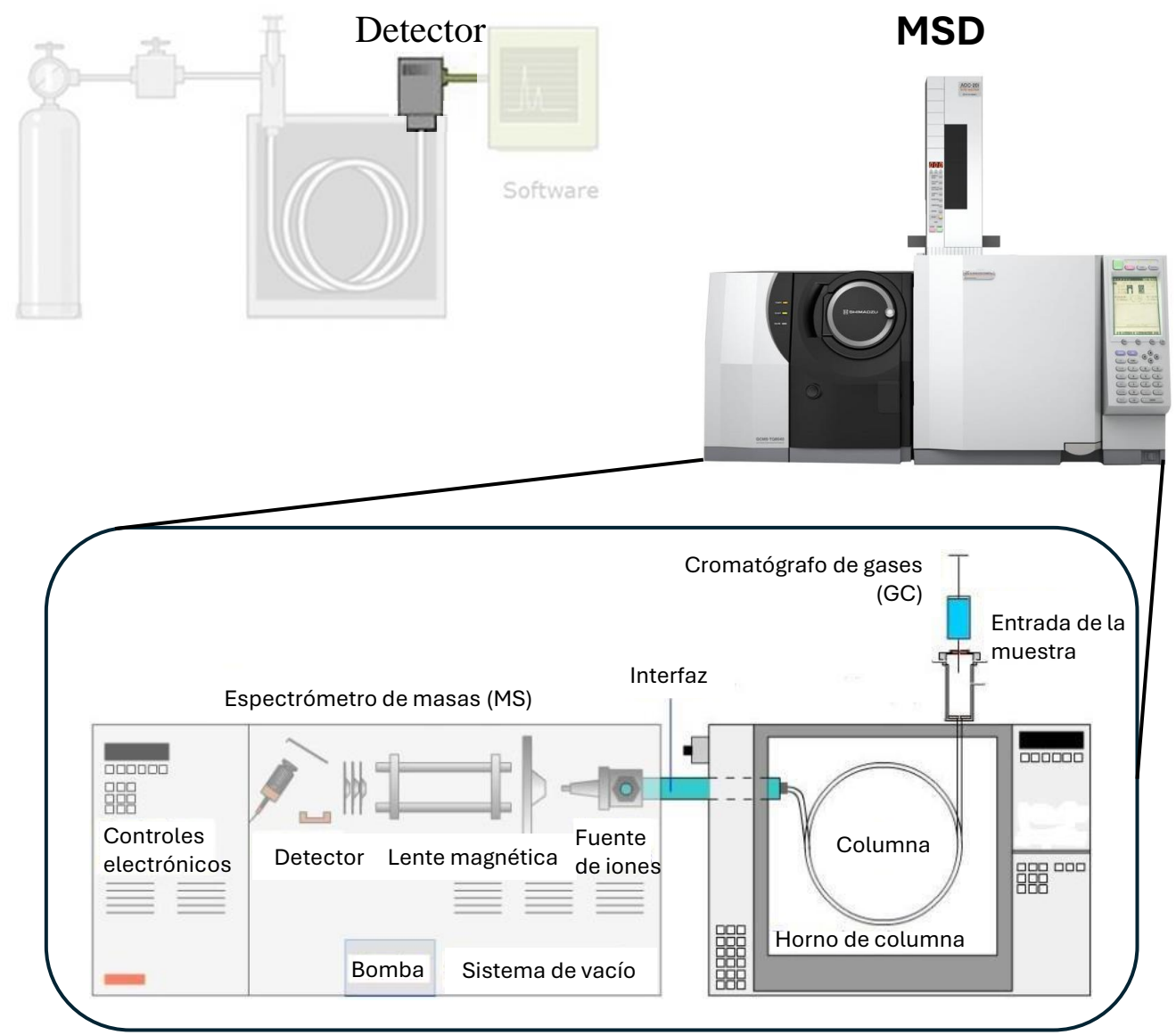
2 CROMATOGRAFÍA EN COLUMNA: CROMATOGRAFÍA DE GASES (GC)



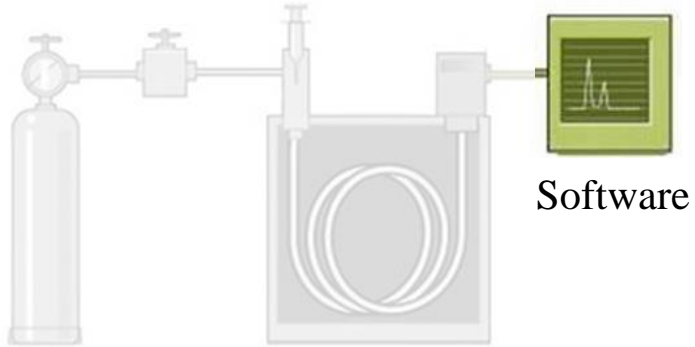
Clasificación de detectores según su fundamento físico:

- Conductividad térmica
 - TCD (Thermal Conductivity Detector)
- Ionización
 - FID (Flama Ionization Detector)
 - NPD (Nitrogen-Phosphorus Detector)
 - ECD (Electron Capture Detector)
- Electroquímicos
- Espectroscópicos
 - MSD (Mass Spectrometry Detector)

2 CROMATOGRAFÍA EN COLUMNA: CROMATOGRAFÍA DE GASES (GC)



② CROMATOGRAFÍA EN COLUMNA: CROMATOGRAFÍA DE GASES (GC)



Modos de adquisición de datos (en MS):

- **Full-SCAN**
 - Permite obtener el espectro
 - Análisis CUALITATIVO y CUANTITATIVO
- **SIM**
 - No permite obtener el espectro
 - Análisis CUANTITATIVO

② CROMATOGRAFÍA EN COLUMNA: CROMATOGRAFÍA DE GASES (GC)

Variables que afectan a la separación cromatográfica:

Variables fijas:

- Tipo de gas portador
- Tipo y espesor de fase estacionaria
- Dimensiones columna
- Temperatura inyector
- Volumen muestra

Variables a optimizar:

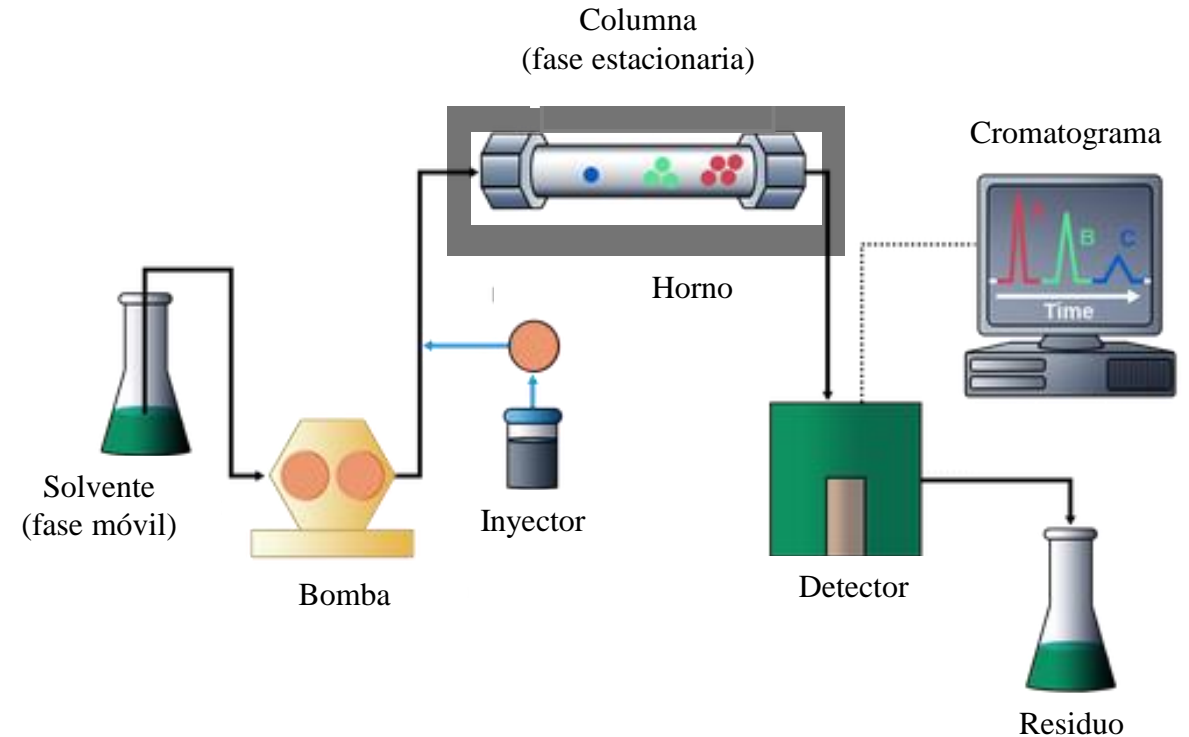
- Temperatura del horno
- Flujo de gas portador

2 CROMATOGRAFÍA EN COLUMNA: CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS (LC)

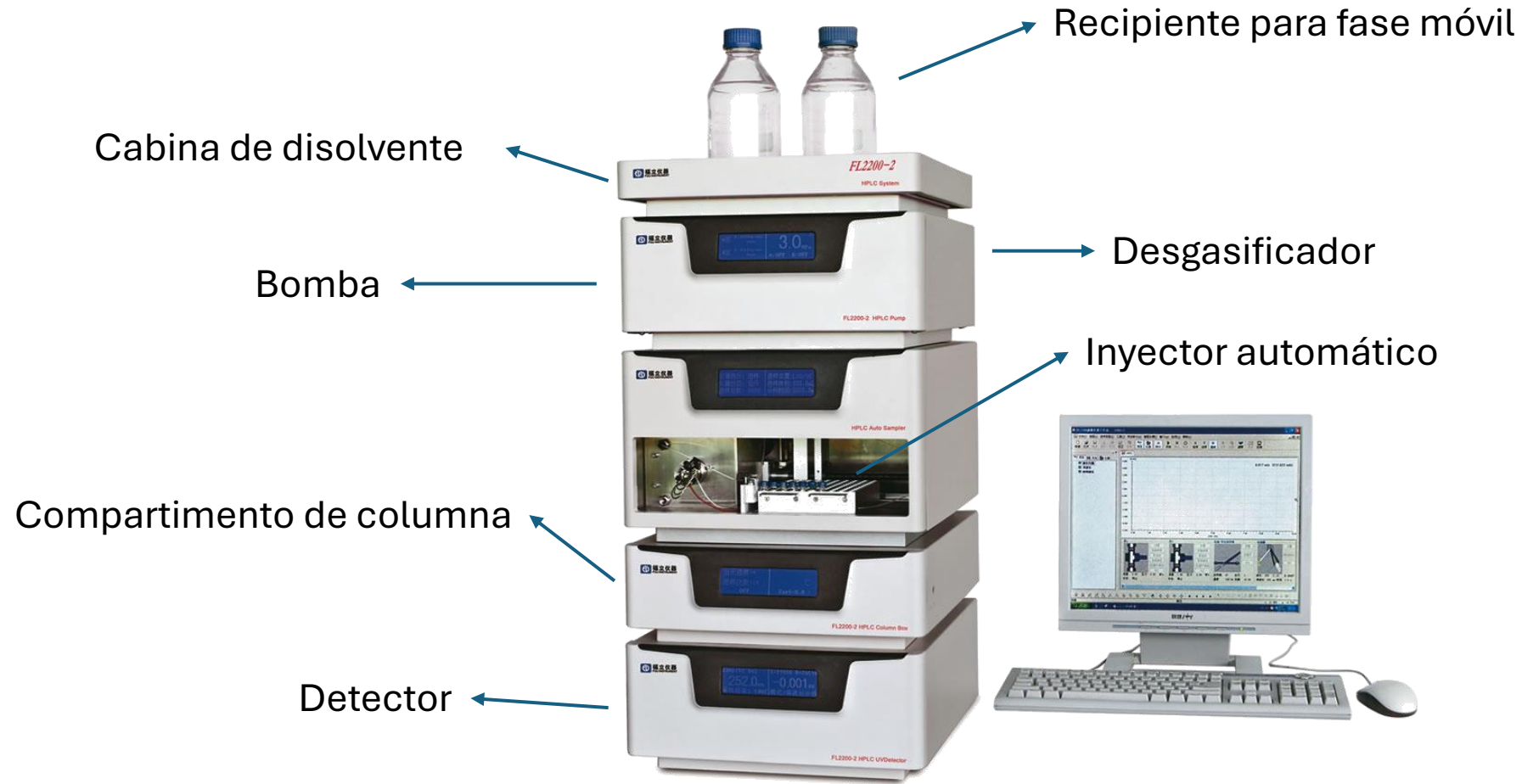
Separación de sustancias polares.

Clasificación:

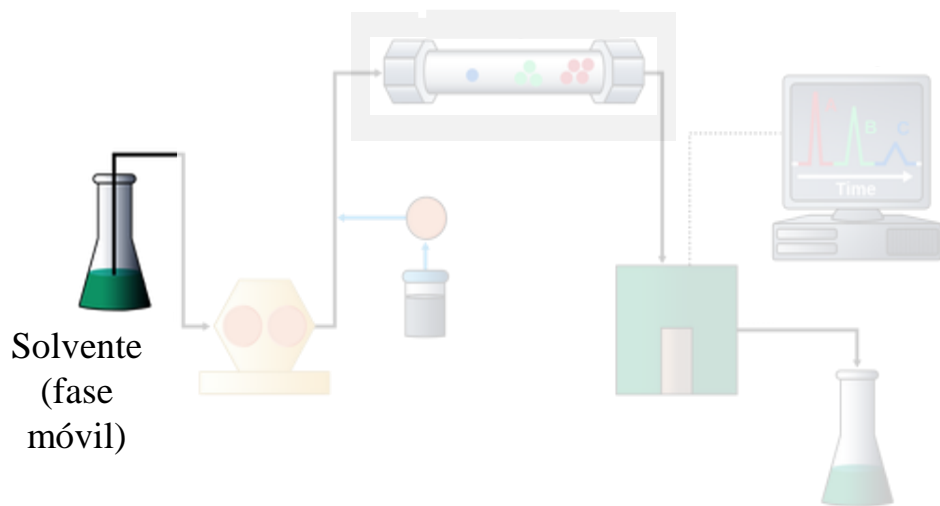
- Según el equilibrio:
 - Partición
 - Adsorción
 - Intercambio iónico
 - Exclusión
 - Afinidad
- Según la forma:
 - Plana
 - Columna:
 - Liquid Chromatography (LC)
 - High Performance Liquid Chromatography (HPLC)
 - Ultra High Performance Liquid Chromatography (UHPLC)



2 CROMATOGRAFÍA EN COLUMNA: CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS (LC)



2 CROMATOGRAFÍA EN COLUMNA: CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS (LC)



- **Fuerza del disolvente:** Se puede medir cuantitativamente como un índice de polaridad.

$$P' = \log(K_e) + \log(K_d) + \log(K_n)$$

e: etanol, aceptor de protones

d: 1,4-dioxano, dador de protones

n: nitrometano, interacciones dipolares

- **Selectividad:** Capacidad de inducir dipolos y formar enlaces.

- Carácter aceptor de protones: $X_e = \frac{\log(K_e)}{P'}$

- Carácter dador de protones: $X_d = \frac{\log(K_d)}{P'}$

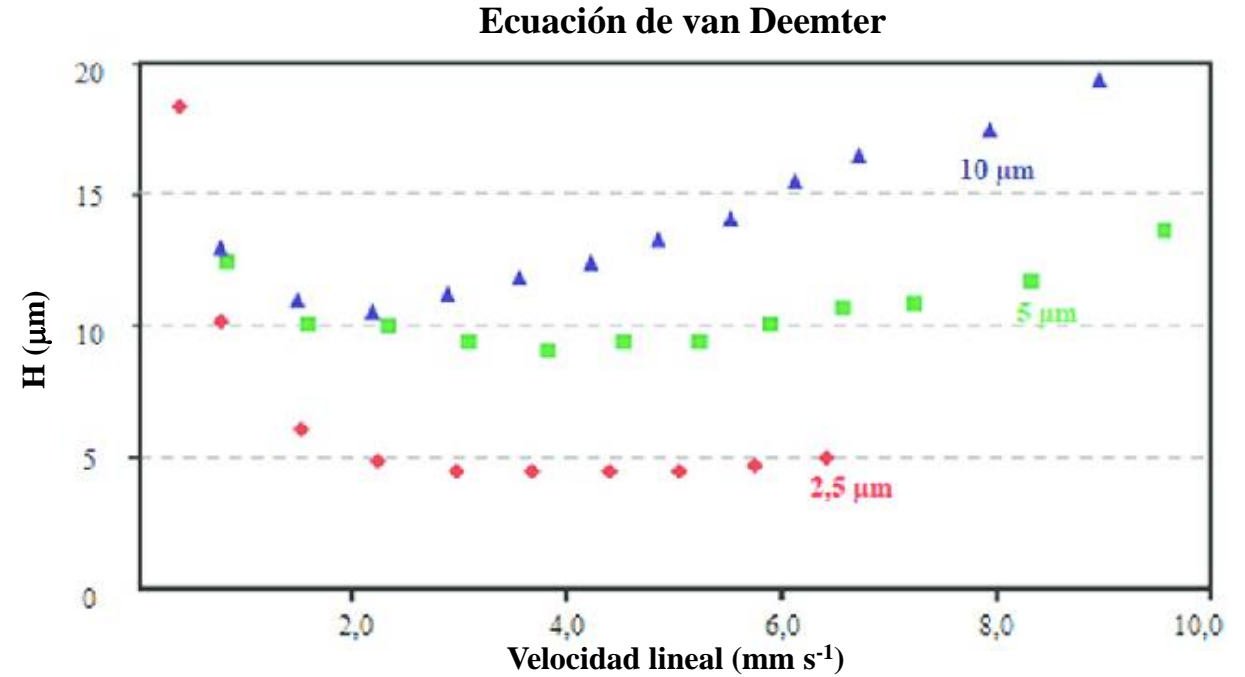
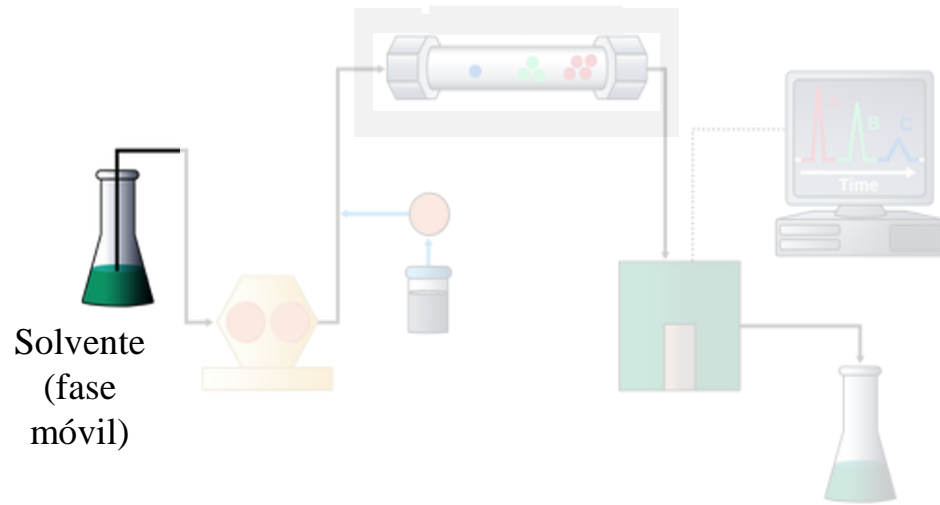
- Carácter dipolar: $X_n = \frac{\log(K_n)}{P'}$

$$X_e + X_d + X_n = 1$$

SOLVENTES MÁS EMPLEADOS EN HPLC

- | | | | |
|----------------|--------------------|---------------------|-----------------|
| • Agua | • Tetrahidrofurano | • N-Heptano | • Diclorometano |
| • Metanol | • N-Hexano | • Dietileter | • Cloroformo |
| • Acetonitrilo | • Isopropanol | • Metil-t-butileter | |

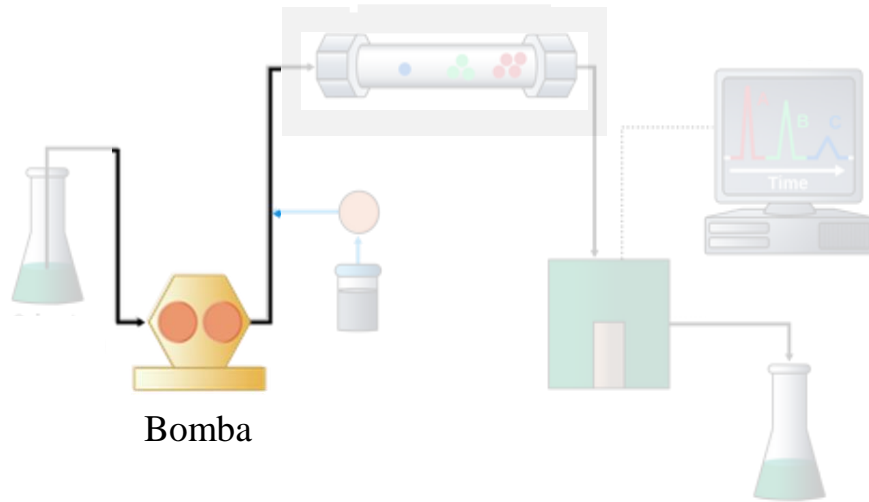
2 CROMATOGRAFÍA EN COLUMNA: CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS (LC)



SOLVENTES MÁS EMPLEADOS EN HPLC

- Agua
- Metanol
- Acetonitrilo
- Tetrahidrofurano
- N-Hexano
- Isopropanol
- N-Heptano
- Dietileter
- Metil-t-butileter
- Diclorometano
- Cloroformo

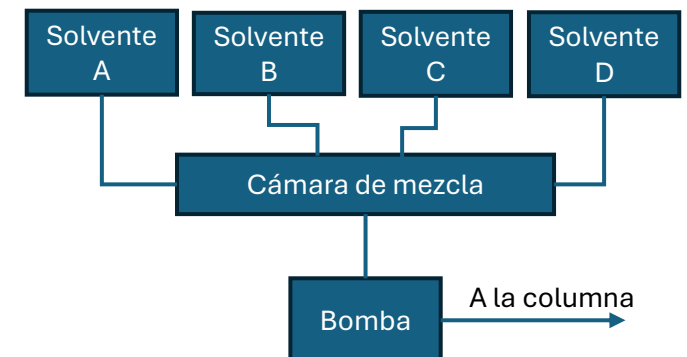
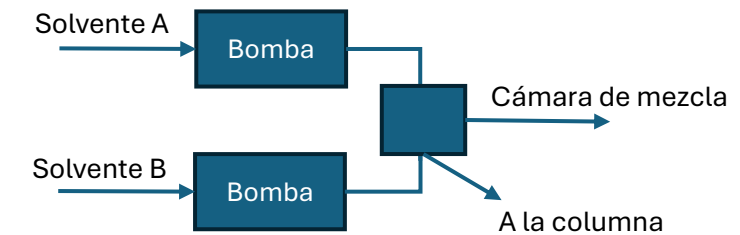
2 CROMATOGRAFÍA EN COLUMNA: CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS (LC)



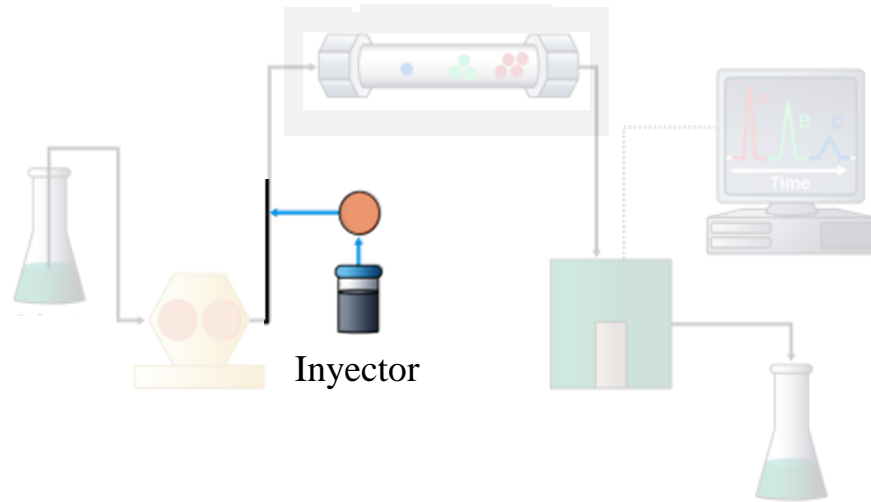
Se encarga de pasar la fase móvil a elevada presión y a un flujo controlado a través de la columna.

Configuración:

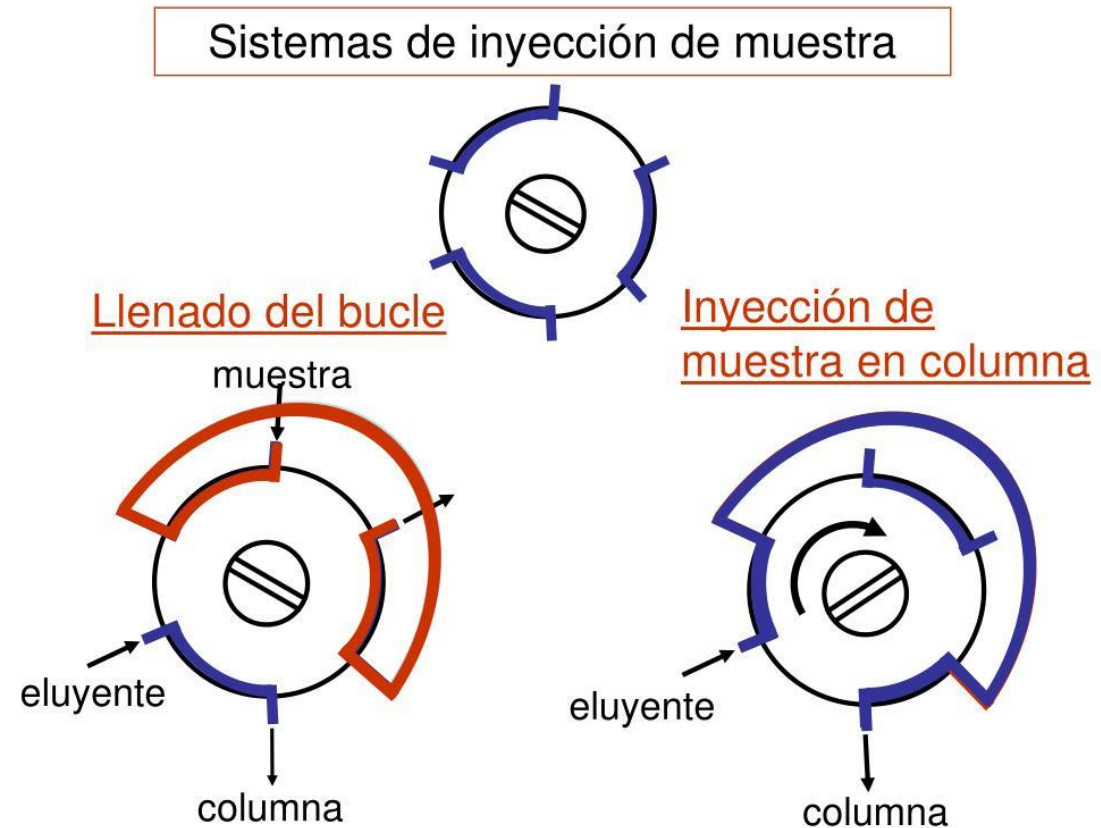
- Bomba isocrática:
 - Régimen isocrático
- Dos bombas:
 - Régimen isocrático
 - Régimen gradiente
- Distribuidor y una bomba:
 - Régimen isocrático
 - Régimen gradiente



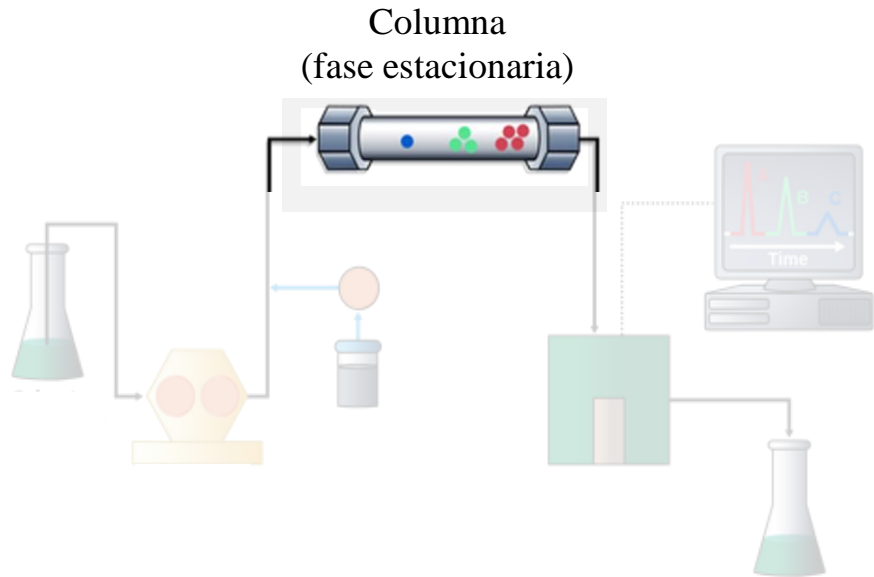
2 CROMATOGRAFÍA EN COLUMNA: CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS (LC)



Volumen de inyección: 5-100 μL



2 CROMATOGRAFÍA EN COLUMNA: CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS (LC)

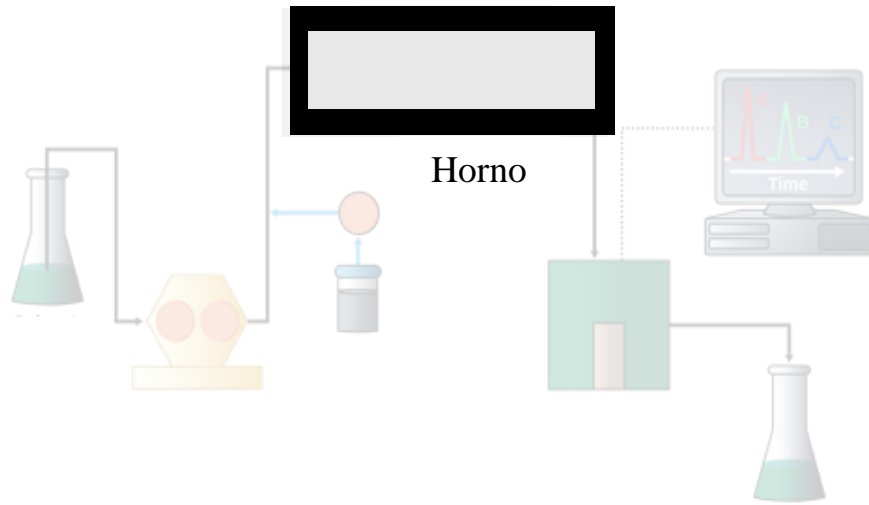


	Convencionales (HPLC)	UHPLC, RPLC o UPLC
Longitud	5 – 25 cm	1.5 – 15 cm
Diámetro interno	2.1 – 4.6 mm	1 – 4.6 mm
Tamaño partícula	3 – 5 μm	1.7 – 1.9 μm

Fase Estacionaria:

- Sólido activo {
 - Crom. de Adsorción
 - Crom. de Intercambio iónico
 - Crom. de Afinidad
- Sólido inerte de porosidad → Crom. de Exclusión controlada
- Líquido retenido en un sólido → Crom. de Partición poroso e inerte

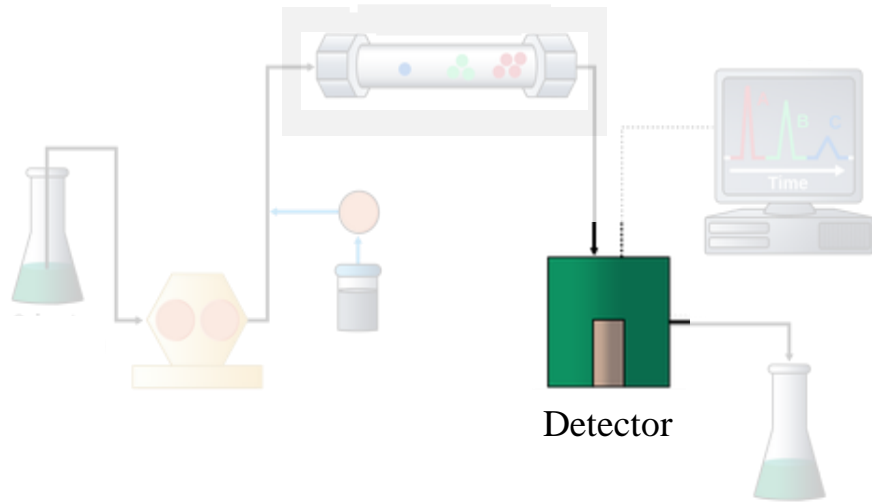
2 CROMATOGRAFÍA EN COLUMNA: CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS (LC)



Control de temperatura:

- Importante para asegurar reproducibilidad de tiempos de retención
- Separaciones complejas pueden optimizarse variando la temperatura
- **Temperaturas habituales de trabajo: 25°C - 60°C**

2 CROMATOGRAFÍA EN COLUMNA: CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS (LC)

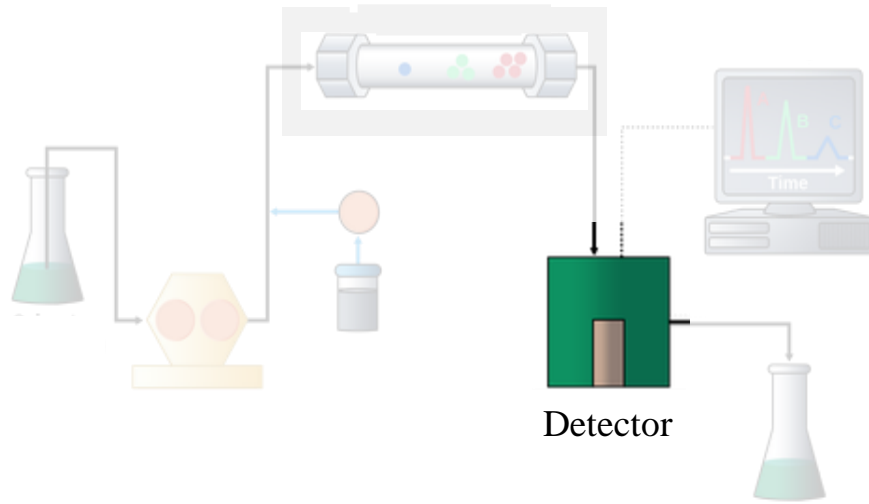


Objetivo: reconocer cuando una sustancia eluye de la columna

Detectores más comunes:

- Absorbancia ultravioleta-visible
- Fluorescencia
- Amperométrico
- Índice de refracción
- Conductividad
- Dispersión de luz
- Espectrometría de masas
- Otros: Espectrometría infrarroja, absorción y emisión atómica, coulombimetría, viscosidad,...

2 CROMATOGRAFÍA EN COLUMNA: CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS (LC)

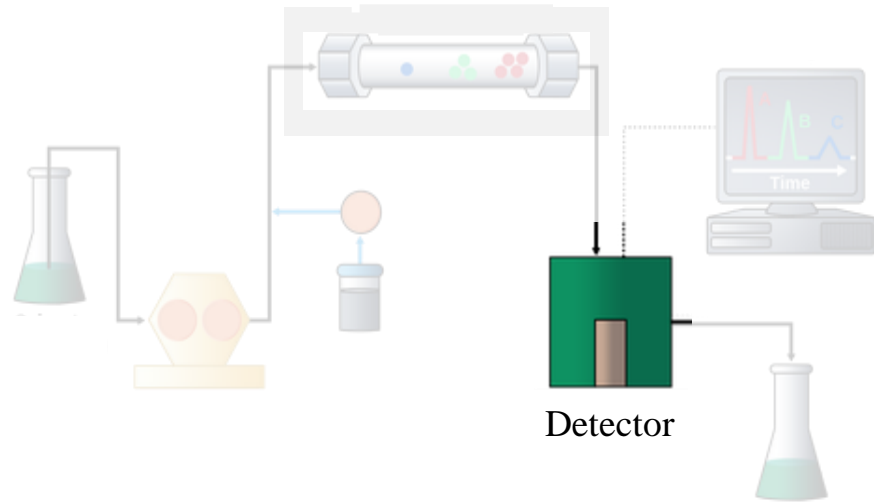


Objetivo: reconocer cuando una sustancia eluye de la columna

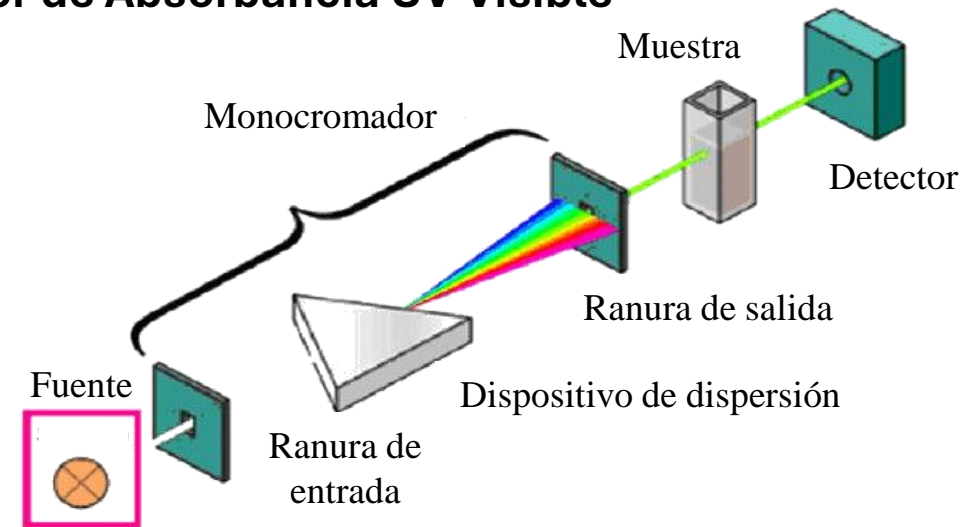
Detectores más comunes:

- Absorbancia ultravioleta-visible *El más empleado!!!!*
- Fluorescencia
- Amperométrico
- Índice de refracción
- Conductividad
- Dispersión de luz
- Espectrometría de masas
- Otros: Espectrometría infrarroja, absorción y emisión atómica, coulombimetría, viscosidad,...

2 CROMATOGRAFÍA EN COLUMNA: CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS (LC)



Detector de Absorbancia UV-Visible



LEY DE LAMBERT Y BEER

La ley explica que hay una relación exponencial entre la transmisión de luz a través de una sustancia y la concentración de la sustancia, así como también entre la transmisión y la longitud del cuerpo que la luz atraviesa.

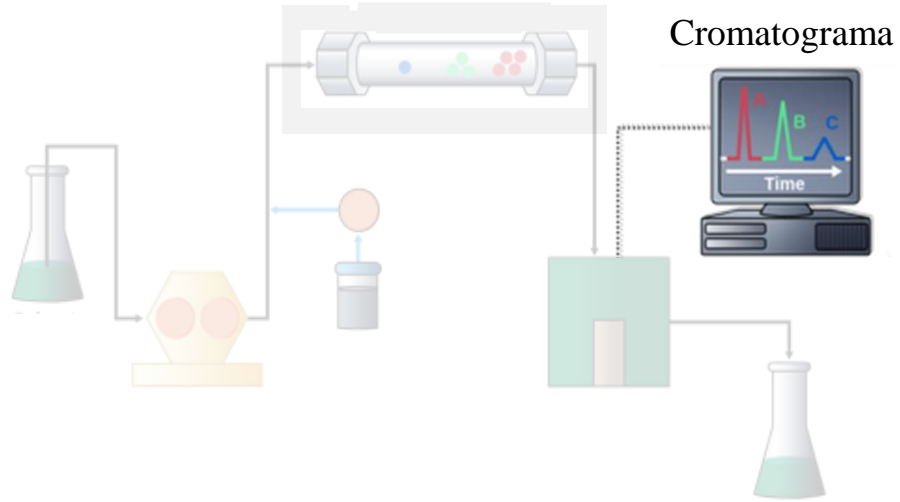
$$A = \epsilon \cdot c \cdot l$$

Donde: A = absorbancia;
 ϵ = Coeficiente de extinción molar;
 l = longitud de la celda.

Espectrofotómetro



2 CROMATOGRAFÍA EN COLUMNA: CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS (LC)



Software:

- Adquisición de datos
- Control de instrumento

2 CROMATOGRAFÍA EN COLUMNA: CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS (LC)

Variables que afectan a la separación cromatográfica:

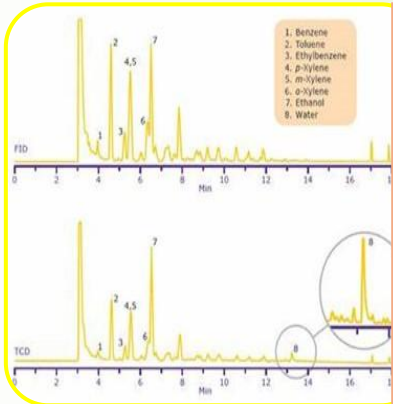
- Columna cromatográfica
 - Fase móvil
 - Temperatura
 - Tipo de elución
 - Isocrático: composición de la fase móvil constante
 - Gradiente: composición de la fase móvil variable
- } Depende del tipo de cromatografía

TÉCNICAS DE SEPARACIÓN: LA CROMATOGRAFÍA.

APLICACIONES PRÁCTICAS

Ciencias:

- Análisis de componentes en alimentos (aditivos, contaminantes)
- Control de calidad de fármacos
- Identificación de metabolitos en biología



Industria:

- Separación de mezclas complejas
- Monitoreo ambiental (detección de pesticidas, contaminantes...)

Criminología:

- Identificación de sustancias en investigación forense



PRÁCTICA INDIVIDUAL: CROMATOGRAFÍA EN PAPEL

La **cromatografía en papel con tinta negra** es un experimento que demuestra cómo los diferentes pigmentos en una mezcla se separan según sus propiedades químicas.

Materiales necesarios:

- Papel filtro (papel de cromatografía o un filtro de café puede funcionar)
- Tinta negra de un bolígrafo, rotulador o marcador (mejor si es a base de agua, no permanente)
- Solvente:
 - Agua para tintas solubles en agua
 - Alcohol (etanol o isopropanol) si usas tinta permanente
- Vaso de precipitados o un recipiente de vidrio pequeño
- Lápiz (no usar bolígrafo)
- Regla
- Pinza de ropa o clip (opcional, para sujetar el papel)
- Gotero o pajita (opcional, para añadir solvente con precisión)



PRÁCTICA INDIVIDUAL: CROMATOGRAFÍA EN PAPEL**1 PREPARAR EL SOPORTE:**

- ① Cortar el papel filtro en tiras rectangulares de unos 2-3 cm de ancho y aproximadamente 10 cm de largo.
- ② Dibuja una línea de base:
 - Usa un lápiz para trazar una línea horizontal (aproximadamente a 1-2 cm del borde inferior del papel)
 - Marca un punto pequeño en el centro de la línea; este será el lugar donde colocarás la tinta

2 APLICAR LA MUESTRA DE TINTA:

- ① Colocar una pequeña gota de tinta negra en el punto marcado en la línea
 - Usa un bolígrafo o rotulador con cuidado para evitar que la mancha sea muy grande
- ② Deja que la tinta se seque antes de continuar

3 PREPARAR EL SOLVENTE:

- ① Llena el vaso o recipiente de vidrio con un poco de solvente (agua o alcohol)
 - La cantidad debe ser suficiente para cubrir el fondo, pero no tanto como para tocar la línea de base cuando introduces el papel

PRÁCTICA INDIVIDUAL: CROMATOGRAFÍA EN PAPEL**4 COLOCAR EL PAPEL EN EL SOLVENTE:**

- ① Introduce la tira de papel en el vaso de manera que el extremo inferior quede sumergido en el solvente
 - Asegúrate de que el solvente no toque la línea de base ni la mancha de tinta.
- ② Si es necesario, usa una pinza o un clip para sujetar el papel a un soporte y mantenerlo vertical

5 OBSERVA LA SEPARACIÓN:

- ① Deja que el solvente suba por el papel filtro por capilaridad
- ② A medida que el solvente pasa por la mancha de tinta, observarás que los pigmentos se separan en diferentes colores
 - Esto ocurre porque cada pigmento tiene una afinidad distinta por el solvente y el papel:
 - Los pigmentos más solubles se moverán más rápido
 - Los menos solubles quedarán cerca del punto de origen

PRÁCTICA INDIVIDUAL: CROMATOGRAFÍA EN PAPEL

4

6 DETENER EL EXPERIMENTO:

- ① Cuando el solvente esté cerca del borde superior del papel (sin llegar a él), retira cuidadosamente la tira
- ② Marca con un lápiz la línea donde llegó el solvente (llamada “frente del solvente”)
- ③ Deja que el papel se seque

7 ANALIZA LOS RESULTADOS:

- ① Observa las bandas de color que se formaron.
 - Cada banda representa un pigmento diferente presente en la tinta negra
 - Por ejemplo, puedes ver tonos azul, verde, morado, rojo, etc.
- ② Si deseas, mide la distancia recorrida por cada pigmento y calcula el factor de retención (Rf):

$$Rf = \frac{\text{Distancia recorrida por el pigmento desde la línea de base}}{\text{Distancia recorrida por el solvente desde la línea de base}}$$

PRÁCTICA INDIVIDUAL: CROMATOGRAFÍA EN PAPEL*Notas y Consejos:*

- 1 Si trabajas con alcohol, recuerda hacerlo en un lugar bien ventilado
- 2 Si no observas separación:
 - Prueba con una tinta diferente
 - Cambia el solvente (agua o alcohol)
- 3 Si usas tinta permanente y no ves colores separados, es posible que los pigmentos no sean solubles en el solvente utilizado