CROMATOGRAFIA EN PAPEL DE CARBOHIDRATOS

INTRODUCCION

Entre los métodos cualitativos y cuantitativos para determinación de carbohidratos, se encuentra la cromatografía. Esta técnica es de considerable importancia ya que su efectividad radica en hacer separaciones de sustancias mucho muy semejantes entre sí estructuralmente, como son los isómeros y los estereoisómeros; así como separar sustancias diferentes.

La cromatografía se define como un método de análisis adecuado para la separación de los componentes de una muestra por percolación de un líquido sobre un material poroso (papel) ó finamente dividido (sílica gel), produciendose así un intercambio entre las fases. De esta forma, los constituyentes de la mezcla se separarán debido a la diferencia en sus velocidades de migración.

Se conocen distintos tipos de cromatografía:

a) DE ADSORCION: Equilibrio entre un sólido adsorbente y una solución
b) DE PARTICION: Partición entre dos solventes ó entre un gas y un solvente
c) DE INTERCAMBIO IONICO: Utilizando resinas intercambiadoras de cationes ó de aniones, y un eluente.

Para identificar las sustancias en el papel, se ha introducido una relación conocida como "Rf" ó Relación de Frentes, que es una relación entre la distancia recorrida por una sustancia y la distancia migrada por el solvente. El Rf es un valor característico de cada compuesto, y depende tanto del solvente utilizado como de las condiciones empleadas para la cromatografía.

OBJETIVO

Pretendemos en este experimento aprender el procedimiento para trabajar la técnica de cromatografía en papel, y al mismo tiempo identificar él ó los azúcares presentes en una muestra que les será proporcionada. Se empleará la cromatografía descendente y ascendente para tal propósito.

FUNDAMENTO

La cromatografía consiste en efectuar una partición de la muestra (en este caso carbohidratos), en dos fases,; la fase estacionaria que es el papel y la fase móvil que es eluente donde se desarrolla el cromatograma.

El agua del solvente forma complejos con las fibras de celulosa del papel ; y a estos complejos formados se pueden unir los azúcares mediante interacciones no covalentes como son los puentes de hidrógeno, fuerzas de Van der Waals ó intercambio de iones. A este procesose le considera Adsorción,

por este motivo en la cromatografía en papel intervienen dos fenómenos, la adsorción y la partición.

La fase móvil migra por capilaridad sobre la fase estacionaria, separando los componentes de la muestra. Una vez que ésto ha terminado, se utiliza un revelador apropiado, que reacciona específicamente con los azúcares poniéndolos de manifiesto en forma coloreada, obteniéndose de esta manera un cromatograma.

MATERIAL POR EQUIPO DE 4 PERSONAS

6 tubos de ensaye de 13 x 100
1 gradilla
6 tubos capilares etiquetados
Cuba para cromatografía
Atomizador
Papel Whatman No. 1
Lápiz, regla e Hilo
Cinta Scotch

REACTIVOS

1.-SOLUCIONES al 1% DE DIFERENTES AZUCARES: Pesar 1 gramo del azúcar, y disolverlo en 100 ml de agua destilada.

2.-ELUENTES RECOMENDADOS: Mezcle las partes indicadas de los componentes:

a) Butanol: Acético: Agua (4: 1: 5)
b) Isopropanol: Acético: Agua (3: 1: 1)
c) Butanol: Piridina: Agua
d) Cloroformo: Acético: Agua (30: 35: 5)

3.-REVELADORES:

a) Disolver 0.1 ml de anilina (ó 0.93 gramos), y 1.7 gramos de ácido ftálico en 100 ml de butanol. Calentar a 100°C por 10 minutos y dejar enfriar.

b) Mezclar 80 ml de solución I, y 20 ml de Solución II
SOLUCION I: $NaIO_4$ al 2% : Disolver 2 gramos de peryodato de sódio en 100 ml de agua

SOLUCION II: $KMnO_4$ al 1% en Na_2CO_3 al 2%: Disolver 1 gramo de permanganato de potasio en 100 ml de carbonato de sodio al 2% el cual previamente se preparó disolviendo 2 gramos de Na_2CO_3 en 100 ml de agua.

PARTE EXPERIMENTAL

PARA LA CROMATOGRAFIA ASCENDENTE:

1.-Corte el papel Whatman no. 1 en un cuadro de 25 cm x 25 cm

2.-A 2.5 cm del margen de uno de los lados, trazar con el lápiz una delgada - línea tranversal, y marcar 6 puntos separados entre sí por una distancia de 3.5 cm.

3.-A 4 cm de la parte superior de la hoja, trace otra línea horizontal, la cual nos indicará la distancia hasta donde deberá migrar el solvente.

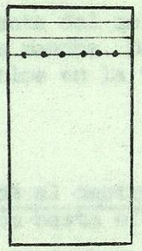
PARA LA CROMATOGRAFIA DESCENDENTE:

1.Corte la hoja de papel Whatman No. 1 en un rectángulo de 25 cm x 50 cm

2.- Con un lápiz trazar 3 lineas horizontales separadas por una distancia de 2.5 cm , y en la tercera línea colocar 6 puntos equidistantes.

UNA VEZ HECHO LO ANTERIOR, LOS CROMATOGRAMAS DEBERAN APARECER COMO SE MUESTRA EN LA SIGUIENTE FIGURA; Y LUEGO CONTINUE CON LOS SIGUIENTES PASOS PARA AMBOS CASOS.

CROMATOGRAFIA ASCENDENTE



CROMATOGRAFIA DESCENDENTE

I.-Sobre cada uno de los puntos coloque 5 gotas de las soluciones de carbohidratos utilizando un capilar para cada azúcar. Antes de aplicar la gota siguiente, espere que la anterior se haya secado. El tamaño de la gota debe ser pequeño por lo que se debe evitar que la gota tome un diámetro muy grande. En cada ocasión que aplique su muestra, limpie la punta del capilar.

II.-En una cuba para cromatografía ascendente, colocar 100 ml del eluente utilizado, y tápela herméticamente, dejándola en estas condiciones durante 15 minutos para saturar la atmosfera interna.

Para la cromatografía descendente,deposite eluente en la tapa de una caja de petri colocada en el fondo de la cuba, tape herméticamente y deje - saturar como se indicó anteriormente.