

Química Biológica I TP 12 Cromatografía planar en capa fina o TLC

OBJETIVO:

-Separar mediante cromatografía de adsorción en placa delgada los lípidos de una muestra de cerebro de vaca.

FUNDAMENTO:

Es una técnica muy importante para la separación rápida y el análisis cualitativo de muestras en pequeña cantidad. El solvente asciende por capilaridad por un soporte de vidrio (cromatoplaque) que tiene adherido el adsorbente de espesor variable según la placa sea analítica o preparativa.

En un extremo de la placa se siembra la muestra: en forma puntual si es analítica y en banda si es preparativa. En ambos casos pueden hacerse varias siembras superpuestas para aumentar la cantidad de muestra.

La placa se introduce en una cuba que contiene el solvente de desarrollo el cual asciende y permite que se lleven a cabo los equilibrios de adsorción- desadsorción. La placa se deja hasta que el solvente llegue al extremo superior. Terminado el desarrollo, se retira la placa, se seca, revela y evalúa.

Fase estacionaria

Sílica Gel 60 (granulometría menor de 10 a 40 μm de diámetro) G (con agregado de yeso al 12% que permite que el adsorbente se adhiera al soporte).

Fase móvil

Mezcla de solventes tal que los componentes de la muestra no corran con el frente del solvente, ni queden retenidos en el lugar de siembra. Los R_f ideales serán entre 0,25 y 0,75.

Es fundamental el uso de solventes anhidros y miscibles.

La cuba cromatográfica deberá estar saturada con la fase móvil antes de introducir la placa, de lo contrario el solvente en vez de ascender por capilaridad continuamente, tenderá a evaporarse de la capa de adsorbente para equilibrar al líquido con su presión de vapor. Eso implicaría un ascenso no homogéneo del frente del solvente.

ETAPAS DEL PROCESO

Siembra:

Se disuelve la muestra en un solvente adecuado y volátil y la siembra se efectúa con un capilar cargado a 2 cm del borde inferior y de los bordes laterales de la placa. Se hace un toque, se

seca, se hace otro toque, cuidando de que el diámetro no supere los 3mm. Las muestras deben estar separadas 1 cm entre sí.

Desarrollo:

La placa sembrada se introduce en la cuba previamente saturada con el solvente (15 minutos), de modo que el solvente toque la placa, pero no la zona de siembra. La cuba se tapa y se deja que el solvente ascienda por capilaridad hasta 2cm antes del borde superior de la placa. Se retira y se deja secar.

Revelado:

Si las manchas no son visibles hay que revelarlas.

Luz UV: se observará fluorescencia.

Yodo: revelador universal. Se observarán manchas marrones o amarillas. Al quitar la placa del contacto con los vapores las manchas se decoloran.

Sulfúrico con calor: método destructivo. Se rocía la placa con sulfúrico al 50% y se coloca en estufa a 120 °C por unos minutos. Aparecerán manchas marrones, pardas, rojizas, opacas.

Reactivos de color: específicos para cada grupo químico o compuesto.

Si la placa es preparativa no pueden usarse reveladores destructivos.

Evaluación:

Calculando los Rf característicos para cada sustancia en idénticos sistemas cromatográficos.

Parte Experimental:

Separación de lípidos de diferentes muestras por TLC

Muestra 1: lípidos de cerebro: pesar 2 g de sesos de vaca, agregar 5 ml de éter etílico: etanol (1:3). Agitar y reposar 30 minutos. Separar la fase eterea.

Muestra 2: lípidos de maní (o palta, aceituna): pesar 5 g, triturar y agregar 10 ml de cloroformo: metanol (1:1) Agitar y reposar 30 minutos. Separar la fase cloroformica.

Sembrar en forma puntual 3 gotas

Testigo colesterol: solución al 1%. Sembrar 3 gotas.

Fase móvil: hexano : éter etílico: ácido acético (80:20:1)

Revelado: Vapores de yodo: colocar la placa en una cuba seca con cristales de yodo y tapar. Se observarán manchas marrones que se marcarán con lápiz negro para saber su ubicación.

Rf de los lípidos en silicagel:

Esteres de colesterol: 0,75 – 0,80

Triglicéridos: 0,40- 0,45

Acidos grasos: 0,20

Colesterol: 0,05

