

Técnicas

La cromatografía líquida rápida: sus posibilidades y ventajas

LILA CASTELLANOS

Los laboratorios dedicados a la síntesis orgánica, y los dedicados a la extracción de productos de fuentes naturales invierten una enorme proporción del tiempo de trabajo en los procesos de purificación de los productos. En muchas ocasiones el tiempo destinado a la purificación de un intermediario es mucho mayor que el tiempo invertido en su síntesis. Entre las técnicas más utilizadas para la purificación en gran escala se encuentra, sin dudas, la cromatografía preparativa en columna.

En los últimos años se han realizado esfuerzos encaminados a acortar el tiempo de purificación en las columnas preparativas. Ello ha sido posible gracias a que hoy día se dispone de adsorbentes de alta calidad, los cuales presentan una gran uniformidad en el tamaño de sus partículas y al mismo tiempo presentan diámetros muy pequeños.

Entre los adsorbentes que más se han perfeccionado en los últimos años se destaca el gel de sílice. Estos avances en la preparación de los adsorbentes han permitido la elaboración de procedimientos rápidos para la purificación preparativa en columnas. Estos procedimientos se conocen en la literatura como cromatografía rápida (*flash chromatography*), cromatografía en columnas cortas y cromatografía de filtración rápida. Todos estos procedimientos tienen en común los rasgos siguientes:

1. Utilizan adsorbentes con partículas de pequeño diámetro y de tamaño muy uniforme;
2. Se busca una mayor rapidez en el proceso de purificación, aproximándose en su concepción al trabajo en la cromatografía de capa delgada.

Cromatografía rápida en columna

Este método, descrito en 1967 (Hunt, 1967), utiliza gel de sílice de cromatografía en capa delgada tipo 60 G. Las columnas cromatográficas poseen diámetros entre 3 y 10 cm y longitudes que varían entre 7 y 15 cm. Cuando se desea purificar grandes cantidades de productos (del orden de los 30 g) se utilizan columnas de hasta 30 cm de longitud. Las columnas pueden construirse utilizando un tubo de vidrio al cual se le une en un extremo un vidrio fritado, seguido de una llave esmerilada, y en el extremo superior se dispone de una boca esmerilada preferiblemente No. 29. Entre las columnas más populares de este tipo se encuentran las confeccionadas utilizando un embudo separador cilíndrico. Antes de rellenar el embudo separador con el adsorbente, se cubre el acceso interior a la llave esmerilada con un tapón de algodón.

A continuación se vierte arena fina lavada, hasta rellenar la parte cónica del embudo y se deposita el gel en el interior de la parte cilíndrica.

Empaquetamiento de la columna

El gel de sílice se mezcla en una proporción de 3,5 ml de solvente orgánico por gramo de adsorbente. La mezcla se deja reposar con eventual agitación suave para facilitar la desgasificación. El gel se vierte lentamente sobre la capa de arena en el caso de preparar la columna utilizando un embudo separador, o bien sobre un papel de filtro que cubre el vidrio fritado, si se prepara en una columna con fritada. Es necesario cuidar que la superficie de la arena, en el caso de existir, no se perturbe durante la adición del gel. Terminada la adición se procede a cubrir el gel de sílice con 2 ó 3 cm de solvente y se aplica una presión suave procedente de una fuente de aire comprimido o de nitrógeno a través de la parte superior de la columna. Se procede a eluir el solvente que cubre el gel para facilitar la compactación de éste y se repite el proceso adicionando volúmenes sucesivos de solvente hasta lograr la adecuada compactación del adsorbente. Terminado el empaquetamiento, se cubre la superficie del gel de sílice con papel de filtro y a continuación con una capa fina de arena.

Aplicación de la muestra

Se recomienda utilizar una proporción de 33 g de gel de sílice por gramo de muestra, para la mayoría de las separaciones. Para las separaciones difíciles se recomienda una proporción de 100 g de gel de sílice por cada gramo de muestra. La muestra se deposita sobre la superficie de la arena utilizando el mínimo de disolvente. A continuación se aplica una ligera presión de aire hasta lograr su introducción total en el adsorbente. Se efectúan lavados con pequeños volúmenes de solventes, para limpiar las paredes y la arena hasta lograr que todo el producto se encuentre depositado en la superficie del gel de sílice.

Elución

La selección del solvente de elución se efectúa evaluando un cromatograma en capa delgada de la mezcla de productos a separar. Una vez que se encuentra un solvente que logra una resolución adecuada, se reduce la proporción del componente más polar a la mitad de su valor en la mezcla eluotrópica utilizada en cromatografía en capa delgada. En este trabajo los autores fundamentan la rapidez de esta técnica en la selección de solventes para la elución de la columna, que permitan obtener R_f elevados en la cromatografía en capa delgada. De esta forma los volúmenes de solventes requeridos son usualmente un décimo de los necesarios en columnas tradicionales. Velocidad de flujo: las velocidades de flujo a las que se trabaja son inferiores a las utilizadas en columnas tradicionales siempre que se trabaje sin presión; un valor típico es de 3,3 a 6 ml por minuto, utilizando benceno en una columna de 10 cm de alto por 6 cm de diámetro, pero debido a los altos valores de R_f , la separación se efectúa con gran rapidez.

Este procedimiento, que hemos resumido brevemente, ha continuado desarrollándose. Así, en 1978 Still, Kahn y Mitra publican su trabajo denominado *Técnicas de cromatografía rápida para las separaciones preparativas con resolución moderada* (Still, 1978). El principio del procedimiento radica en la utilización de adsorbentes de gran calidad y la operación de la columna a una presión moderada, la cual se logra mediante el suministro de aire comprimido o bien de nitrógeno comprimido. Este procedimiento también es designado como cromatografía "instantánea" o "*flash chromatography*". El procedimiento de la cromatografía instantánea es básicamente una mezcla del procedimiento de purificación a presión moderada, y el procedimiento

de cromatografía en columnas cortas que acabamos de resumir anteriormente, el cual ha sido mejorado para lograr separaciones con gran rapidez. Los autores encontraron que el gel de sílice 60 del tipo 70-230 mesh (63 a 200 μm) ofrece la peor resolución de todas las sílices estudiadas en las condiciones de trabajo a presión moderada. Los resultados mejores se logran con gel de sílice de 40 μm de diámetro de partícula. Asimismo se evidenció que la operación de las columnas con adsorbentes de diámetros de partículas inferiores a 40 μm no ofrece mejoría en la resolución con respecto a las partículas de diámetros de este tamaño.

En lo que respecta a la velocidad de flujo, estos autores señalan que la eficiencia de la separación es dependiente de la velocidad de la elución y se logran los mejores resultados con flujos del eluyente relativamente elevados. Se recomienda trabajar con velocidades lineales de flujo de 5 cm de disolvente por minuto. El equipo requerido para esta técnica consiste en una columna cromatográfica con las mismas características referidas en el trabajo precedente, y además, una válvula para controlar el flujo de aire o de nitrógeno. Como válvula de control de flujo se puede disponer de una tapa esmerilada unida a una llave de Teflón, con una salida lateral para regular la entrada de aire o nitrógeno.

El procedimiento de operación de estas cromatografías rápidas a presión moderada es el siguiente:

Se selecciona un disolvente que ofrezca una buena separación y que logre un valor de R_f en placas de cromatografía de capa delgada de 0,35. Se selecciona entonces una columna del diámetro adecuado y esta se rellena hasta una altura de 15 cm con gel de sílice de tipo 40 a 60 μm . La columna se llena a continuación con solvente y se suministra presión para eliminar rápidamente el aire del gel de sílice; la muestra se aplica en la superficie de la columna y ésta se cubre con el solvente de elución efectuándose la elución a una velocidad lineal de 5 cm/min. Los tiempos requeridos para eluir los componentes deseados de la columna, generalmente son muy cortos; muchas veces es posible lograr la purificación del producto en 10 minutos, por lo cual se hace innecesaria la utilización de colectores de fracciones. Para muestras de 200 miligramos de producto se recomienda utilizar columnas de 20 mm de diámetro y 15 cm de altura de adsorbente con una velocidad lineal de flujo de 5 cm/min.

Si los componentes presentes en la mezcla tienen R_f muy cercanos en cromatografía en capa delgada, se puede mejorar la separación utilizando columnas que contengan una capa de adsorbente hasta los 30 cm de altura y utilizando un disolvente menos polar para la elución. Tal disolvente puede ser seleccionado de manera que se logre la migración del producto en el cromatograma en capa delgada a un valor de R_f 0,25. En estos casos se recomienda evitar una carga excesiva de la columna con la mezcla a separar para poder mantener la velocidad lineal de flujo en el valor aconsejado de 5 cm de eluyente por minuto.

Otros procedimientos desarrollados recientemente, extienden la técnica de la cromatografía "instantánea", a la utilización de otros adsorbentes, así en 1983 Kühler y Lindsten presentaron un método que aplica la cromatografía "instantánea" a las técnicas de purificación preparativa en fase inversa (Kühler, 1983). El sistema recomendado por los autores consta de 3 partes: una bomba impulsora del disolvente, una columna y un inyector unido a un detector. El sistema de columna y el inyector han sido diseñados con componentes fácilmente accesibles; la columna se construye utilizando un tubo con uniones de rosca a ambos extremos, que facilita el ensamblaje a los demás componentes. El extremo superior de la columna se une al inyector, el cual se construye mediante una llave de 3 pasos, unida a un pequeño embudo de vidrio, las otras dos salidas de la llave de 3 pasos se conectan respectivamente a la columna y a la bomba con el recipiente de solvente. La muestra se aplica mediante gravedad. La salida inferior

de la columna se conecta al sistema de detección. Este procedimiento fue investigado en relación con el tamaño de partículas y la velocidad de flujo estudiando la resolución, el factor de selectividad y el factor de capacidad del sistema. Para esta investigación los autores seleccionaron fases de gel de sílice modificadas con N-octadecil triclorosilano. Los mejores resultados, en cuanto al diámetro de partícula del adsorbente, se encontraron utilizando fases modificadas de 40 a 63 μm de diámetro de partícula, tanto para las columnas analíticas como para el trabajo de la escala preparativa.

La velocidad de flujo recomendada es de 68 ml/min, la cual corresponde a un flujo lineal de 7,5 cm/min, tanto en las separaciones analíticas como en las purificaciones preparativas, por tanto una separación preparativa completa puede ser efectuada en 5 a 15 minutos, lo cual es comparable con la velocidad alcanzada en los análisis por HPLC.

La cromatografía rápida a presión moderada, o la cromatografía "instantánea", constituye sin lugar a dudas una simplificación del procedimiento de purificación con notable ahorro de tiempo de trabajo y de disolvente. Por último, es importante señalar que actualmente estos procedimientos se están extendiendo a la cromatografía líquida de alta eficiencia, en lo que se ha llamado alta velocidad -HPLC (high speed HPLC). Los procedimientos permiten análisis de mezclas en columnas cortas con una duración de menos de 1 minuto (Ver por ejemplo, Anderson, 1983).

Estos métodos aun cuando no suministren productos de un notable grado de pureza sí resultan muy interesantes cuando se trata de lograr purificaciones de intermediarios sintéticos en las que no se requiere un grado de pureza extrema o bien cuando el producto obtenido por este método de purificación será sometido con posterioridad a una purificación mediante cromatografía de alta eficacia a presión (HPLC). Por todo ello las técnicas rápidas de purificación en columnas cortas continuarán utilizándose y desarrollándose intensamente en los años próximos.

REFERENCIAS

- ANDERSON, J. M. (1983). *Data Acquisition and processing for High Speed Liquid Chromatography*. J. Liq. Chrom. **6**, (14), 2809-2828.
- HUNT, B. y W. RIGBY (1967). *Short Column Chromatography*. Chem. and Industry, noviembre 4, 1868-1869.
- KUHLER, T. y G. LINDSTEN (1983). *Preparative reversed phase chromatography*. J. Org. Chem. **48**, 3589-3591.
- STILL, C.; M. KAHN y A. MITRA (1978). *Rapid Chromatographic technique for preparative separations with moderate resolution*. J. Org. Chem. **43**, (14), 2923-2925.