

LABORATORIO: LA CROMATOGRAFIA COMO UN INSTRUMENTO DE ANALISIS BIOLOGICO.

Por: L.A. Urán (1)
y G. Bedoya (2)

INTRODUCCION

El análisis cromatográfico fué utilizado por primera vez en 1903 por el botánico ruso Tswett para separar los componentes de pigmentos vegetales utilizando una columna adsorbente. Este método resurgió en 1931 cuando Kuhn y Lederer lo emplearon en la separación de carotenos y xantofilas, usando alúmina en la columna de adsorción (Savidan, 1963).

Gordon, Martin y Synge propusieron en 1941 una modificación a los métodos anteriores usando pliegos o tiras de papel como adsorbente. (Willard, Furman y Bricker, 1961). Este método se llamó cromatografía en papel.

La cromatografía es un método físico para la separación de componentes de una mezcla. Los componentes de la mezcla se distribuyen entre dos fases: una, la *Estacionaria*, que permanece quieta, ejemplo, el papel cromatográfico y la otra, la fase móvil, que como su nombre lo indica, se filtra o se mueve a través de los intersticios de toda la fase estacionaria. La fase estacionaria puede ser un sólido o un líquido y la móvil un líquido o un gas. Durante el movimiento hay una migración diferencial de los componentes de la mezcla gracias a la acción del solvente o *Eluyente*. Los procesos fundamentales responsables de la separación cromatográfica son la *Adsorción* y la *Separación* ó *Partición*. La adsorción es la deposición de una sustancia sobre la superficie de otra, generalmente en estado sólido y por acción de fuerzas intermoleculares. La buena escogencia del sólido permite una adsorción apropiada de un determinado compuesto de una mezcla, ya que la intensidad de la adsorción depende de las propiedades de la superficie. Pueden, así, separarse varios solutos que tienen diferentes coeficientes de adsorción ante un determinado sólido. La separación es

la deposición diferencial de los solutos sobre la superficie de la fase estacionaria. La separación de los componentes en zonas depende de los coeficientes de partición de cada uno de ellos.

La cromatografía se divide en : cromatografía en fase líquida y en fase gaseosa. La primera se subdivide en cromatografía por adsorción, cromatografía de partición en columna y cromatografía en papel y en placa.

La cromatografía en papel es un método de partición que utiliza este material como fase estacionaria. La mezcla a analizar se deposita en uno de los extremos de la hoja o tira de papel desde donde el solvente sube o desciende por capilaridad o por acción de la gravedad y aparecen, después del desarrollo completo, numerosas manchas a diferentes niveles. El análisis e interpretación de esto se indicará en el contenido mismo de esta práctica.

Los resultados son mejores con papeles de filtro de buena calidad, entre los cuales los más usados corrientemente son el "Whatman" y similares. Los solventes más usados para análisis cromatográficos en papel requieren una cierta solubilidad en agua y por ello, se usa con frecuencia un compuesto polar. Los más usados son butanoles, fenol y sus homólogos, bencina de petróleo, éter, acetona, etc..

La visualización o revelado de las manchas que dejan los solutos sobre la fase estacionaria se hace de diferentes modos, dependiendo de la naturaleza de los componentes a separar. Las sustancias coloreadas dejan manchas visibles, como en el caso de las clorofilas. Hay otras que son invisibles, y requieren un tratamiento químico para convertirlas en sustancias coloreadas. Los aminoácidos por ejemplo, se deben *revelar* por acción de ninhidrina. Hay otros métodos

(1) Profesor Depto. de Biología, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.

(2) Profesor Depto. de Biología, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.

como la irradiación ultravioleta, la acción de cultivos microbianos, la radioactividad, la autorradiografía, etc.; que se emplean según las circunstancias. El conjunto de manchas reveladas sobre la fase estacionaria se llama *Cromatograma*.

La cromatografía en fase gaseosa emplea una serie de técnicas y aparatos muy perfeccionados que permiten análisis muy precisos. No obstante lo anterior, en este laboratorio se trabajará con cromatografía en papel, debido principalmente a su facilidad en materiales, equipo y técnicas, lo que permitirá a profesores y alumnos un mejor éxito en este tipo de análisis.

Entre las múltiples aplicaciones de la cromatografía vale la pena destacar las siguientes: separaciones de solutos químicos orgánicos e inorgánicos, análisis cualitativos y cuantitativos de componentes de mezclas. En el campo de la biología es útil en el análisis de pigmentos vegetales, aminoácidos, proteínas, azúcares etc.

MATERIALES Y EQUIPO. (Por cada 4 estudiantes).

- Flores
- Hbjas verdes
- Tinta o anilina.
- Agua destilada
- Solución 0.1 M de CaCO_3
- Alcohol Etilico
- Eter de Petróleo
- Bencina de Petróleo
- Acetona
- 2 vasos de precipitado de 250 ml para hervir una solución (u otro recipiente para tal efecto).
- 1 vaso de precipitados de 100 ml
- 1 vaso de precipitados de 50 ml
- 1 Embudo
- 1 Gradilla
- 3 Tubos de ensayo
- 2 Pipetas una de 1 ml y otra de 10 ml
- 1 Probeta de 50 ml
- 2 Frascos para guardar extractos uno de ellos de color oscuro
- 1 Tijeras
- 1 Cuchilla de afeitar
- 1 Pincel ordinario para colocar las muestras
- 3 Tapones de corcho para los tubos de ensayo
- 1 Termómetro de 0°C a 110°C
- 1 Regla o tirilla de papel milimetrado
- 3 Tirillas de papel cromatográfico (Whatman No.1)
- 1 Mortero (u otro instrumento para triturar hojas).

PROCEDIMIENTO

a) *Cromatografía de Pigmentos Vegetales.*

Existen varios métodos para la extracción de los pigmentos vegetales debido a que unos son más solubles en un disolvente que en otro. Tal es el caso de ciertos

pigmentos más solubles en agua como las antocianinas, por lo cual se les denomina pigmentos hidrosolubles.

Método 1.

Para pigmentos hidrosolubles: Tome varias flores y retire sus pétalos, colóquelos en un recipiente con agua para hervir (beaker, olla etc....); deje hervir de 5 a 10 minutos. Procure que la coloración de la solución resultante sea lo más intensa posible. Para ello varíe el tiempo de ebullición y la cantidad de agua. Decante y guarde el líquido en un frasco para realizar posteriormente el cromatograma.

Método 2.

Para pigmentos no hidrosolubles (clorofilas, xantofilas y carotenos). Tome varias hojas y colóquelas en un recipiente con solución 0.1 M de CaCO_3 ; déjelas hervir de 5 a 10 minutos con el fin de ablandarlas y retirar los pigmentos hidrosolubles. Retire las hojas, séquelas al sol o con papel absorbente (toallas de papel, papel facial, higiénico, de filtro, etc...). Tritúrelas en un mortero adicionando alcohol etílico. Procure que el alcohol sea lo más puro posible. Decante y filtre. Repita el procedimiento hasta que haya extraído la máxima cantidad de pigmentos. Guarde el extracto (filtrado) en un recipiente de color oscuro en un lugar fresco y protegido de la luz.

Técnica del Cromatograma en Papel.

Corte una tira de papel cromatográfico Whatman No.1, como muestra la figura 1. La anchura debe ser menor que el diámetro del tubo de ensayo que va a utilizar. Coloque en una gradilla el tubo en el que previamente debió colocar 2 ml de solvente (eluyente). Utilice agua para los pigmentos hidrosolubles y una mezcla de éter de petróleo o bencina 92o/o y acetona 8o/o para los no hidrosolubles. Coloque sobre el papel, utilizando un pincel u otro instrumento, una banda horizontal de la solución que se va a separar en sus pigmentos (Fig.2). La banda de solución no debe quedar muy cerca de la punta del papel con el fin de que no toque el eluyente al colocarlo en el tubo de ensayo.

Con una cuchilla haga una ranura en la superficie inferior de un tapón de corcho y ensamble en ella la parte superior del papel cromatográfico como muestra la figura 3. Coloque el conjunto tapón papel cromatográfico en el tubo de ensayo, (Fig.4). Deje que el eluyente se difunda hasta 1 ó 2 cm del tapón, retire luego el conjunto tapón papel, marque con un lápiz la posición de los distintos pigmentos y el punto hasta donde subió el eluyente (frente del solvente). Espere a que el papel se seque. Haga observaciones durante el transcurso de la experiencia.

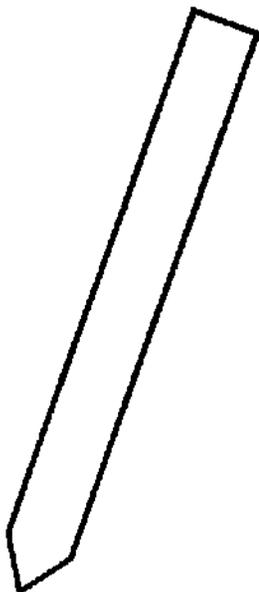


Fig. 1. Forma en que se debe cortar la tira de papel cromatográfico.

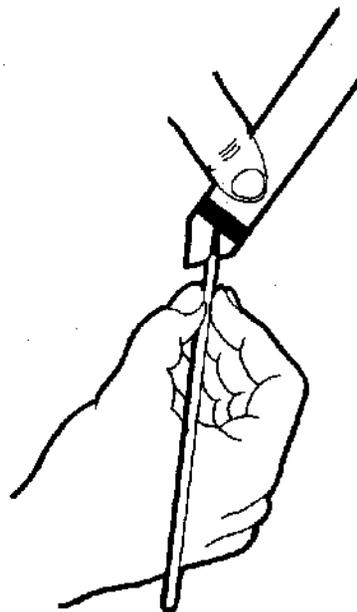


Fig. 2. Indica la forma como se debe colocar el pigmento en la tira de papel cromatográfico.

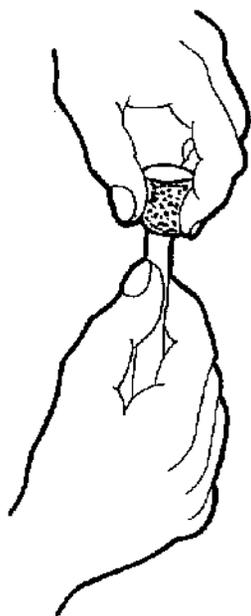


Fig. 3. Manera de colocar el papel cromatográfico en una ranura de un tapón de corcho.

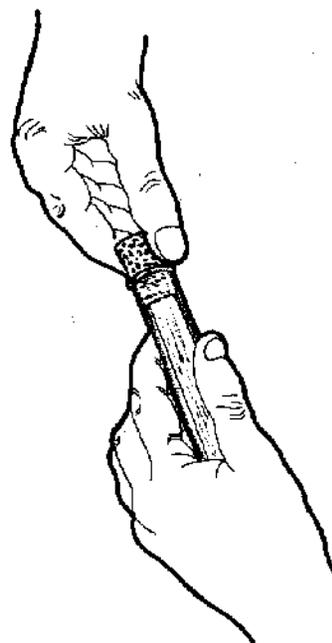


Fig. 4. Forma de ensamblaje del conjunto: corcho—tira de papel y tubo de ensayo con el solvente.

Análisis del Cromatograma.

Mida con una regla, o con una tirilla de papel milimetrado, la altura alcanzada por cada pigmento y por el disolvente. La medición se hace desde el centro de la banda de la solución hasta el punto máximo que al-

cance el pigmento, (Fig. 5). Para cuantificar la información obtenida en un cromatograma se usa la relación:

$$R_f \text{ (tasa de flujo)} = \frac{\text{distancia recorrida por cada componente}}{\text{distancia recorrida por el solvente.}}$$

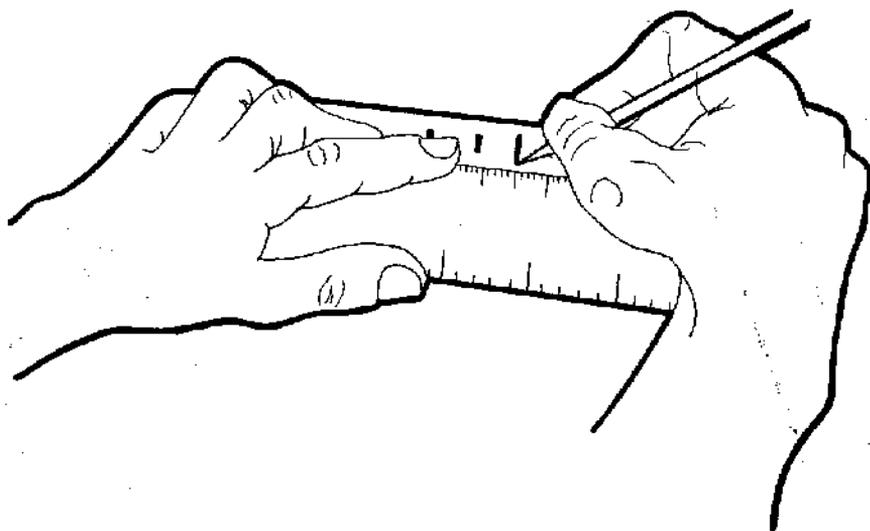


Fig. 5. Manera de medir el recorrido de los componentes de la mezcla (sustancia problema) y del eluyente.

Con los datos obtenidos construya la tabla siguiente:

TABLA I. Datos obtenidos en el cromatograma.

Pigmento	Color	Distancia recorrida (cm)	Tasa de Flujo	Observaciones
A				
B				
C				
D				
Eluyente				

b) *Cromatografía de Tinta.*

Técnicas del Cromatograma en Papel.

Use como solvente agua destilada y siga los pasos de la cromatografía para pigmentos vegetales. Coloque sobre la tira de papel cromatográfico la muestra de tinta (o anilina) que quiere analizar. Cuando el eluyente alcance la altura deseada retire el papel, marque con un lápiz las manchas dejadas sobre el papel y déjelo secar.

Análisis del Cromatograma.

En forma similar a la empleada para análisis de pigmentos vegetales y utilizando los datos obtenidos, elabore una tabla como la que hizo en el experimento anterior (Tabla I).

Debe tener en cuenta que la información obtenida en el cromatograma de tinta, depende del tipo de tinta, color, etc..

DISCUSIONES DE ALGUNOS CONCEPTOS FUNDAMENTALES EN CROMATOGRAFIA

Las pruebas siguientes permitirán al profesor organizar con los alumnos, discusiones tendientes a determinar el efecto del solvente y de la fase estacionaria sobre el cromatograma.

Efecto del Solvente.

Prueba A. Análisis de material inorgánico.

Equipo:

- 6 tubos de ensayo con tapones de corcho
- 1 gradilla para tubos de ensayo
- 6 tirillas de papel cromatográfico (Córtelos como indica la figura 1). Puede usar otro tipo de papel (filtro, etc.). Las 6 tirillas deben ser iguales.
- 1 marcador de tinta, preferiblemente verde.

Solventes:

- a) Solución de HCl 0.1 M en agua
- b) Solución de NH_4OH al 100/o en agua
- c) Bencina de petróleo más metanol, 1:1 en volumen
- d) Metanol
- e) Etanol
- f) Agua destilada

Procedimientos:

Tome 6 tirillas de papel cromatográfico (o su equivalente). Trace en cada tirilla una raya con el marcador (Fig.6). Coloque sendas tiras en los tubos de ensayo que contienen cada un solvente diferente. Sitúelos en la gradilla. Haga observaciones y discuta los resultados en función del solvente.

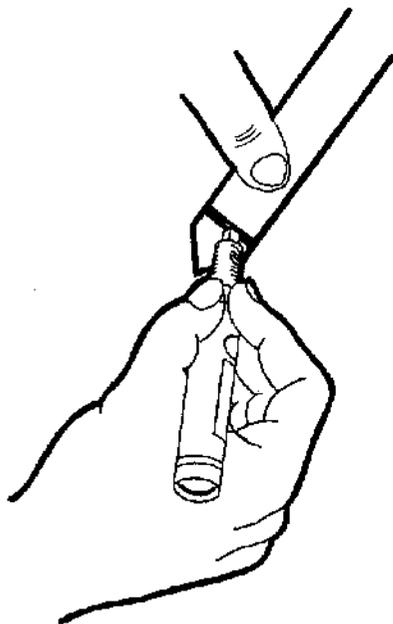


Fig. 6. Manera de hacer el extendido para el análisis cromatográfico de la tinta de un marcador.

Prueba B: Análisis de Material Orgánico.**Equipo:**

- 6 tubos de ensayo con tapones de corcho
- 6 tirillas de papel cromatográfico o su equivalente.
- 1 gradilla.
- extracto de hojas verdes maceradas. (Hojas de novio o geranio, *Pelargonium* sp.; puede utilizar también otras hojas).

Solventes:

- a) Bencina de petróleo
- b) Acetona
- c) Metanol
- d) Bencina 92o/o más acetona 8o/o en volumen
- e) Bencina más metanol, 1:1 en volumen
- f) Agua destilada.

Procedimiento:

Elabore 6 cromatogramas del extracto de hojas de *Pelargonium* sp. con los 6 solventes diferentes. Haga observaciones y discuta los resultados obtenidos.

Efecto de la Fase Estacionaria.**Análisis de Material Orgánico.****Equipo:**

- 6 tubos de ensayo con tapones de corcho
- 1 tirilla de papel de filtro
- 1 tirilla de papel de filtro de otro tipo
- 1 tirilla de papel cromatográfico Whatman No. 1 o de otra clase
- 1 tirilla de papel periódico blanco
- 1 tiza blanca
- 1 varilla o lámina delgada de vidrio impregnada con lechada de cal

Nota: Puede ensayar otros materiales como fase estacionaria.

- 1 gradilla
- extracto de hojas verdes maceradas (*Pelargonium* sp).

solvente: Eter de petróleo o bencina 92o/o y acetona 8o/o.

Procedimiento:

Elabore seis cromatogramas del extracto de hojas de *Pelargonium* sp. con las diferentes fases estacionarias y el mismo solvente. Haga observaciones y discuta los resultados obtenidos.

BIBLIOGRAFIA

- Savidan, L. *La Cromatografía*, Buenos Aires. Ed. Universitaria 2da. Ed, 1963.
- Universidad de Antioquia, Departamento de Química. Copias Mimeo-grafiadas de Fundamentos de Análisis Instrumental. Cromatografía, 1970.
- Universidad de Antioquia, Departamento de Química. Copias Mimeo-grafiadas de Laboratorio de Química Orgánica II, 1974.
- Willard, H. Hobart y otros. *Análisis Químico Cuantitativo*. México, Ed. Marín, 1961.
- Actualidades Biológicas. Vol.4, No.12