

## PRÁCTICA No. 2: Cromatografía en Papel II<sup>1</sup>.

### Análisis Cualitativo de Aminoácidos por Cromatografía en Papel.

**Palabras Clave:** *Cromatografía de Reparto, Aminoácidos, Cromatografía en dos Dimensiones, Cromatografía en Plano.*

#### Introducción:

La cromatografía en papel es un tipo de **Cromatografía de Reparto**, en donde los componentes de una mezcla se separan en base a una distribución diferente entre la fase móvil y la fase estacionaria. El movimiento relativo de las moléculas a lo largo del sistema cromatográfico es el resultado de un equilibrio entre las fuerzas de transmisión o arrastre ejercido por la fase móvil en su desplazamiento sobre la fase estacionaria y las fuerzas que tienden a frenar dicho desplazamiento. Las fuerzas de frenado pueden ser tanto de reparto (basado en criterios de solubilidad) como de adsorción.

La teoría de la cromatografía de reparto se basa en que, en general, si dos fases inmiscibles se encuentran en contacto una con otra y si una de las dos fases contiene un soluto, éste se distribuirá entre ambas de acuerdo con sus solubilidades relativas. Dicho fenómeno se denomina reparto.

En la cromatografía de reparto se suelen utilizar diversos materiales como soportes: almidón, celulosa, gel de sílice, óxido de aluminio, etcétera. Aunque en teoría se consideran inertes, pueden generar diferentes procesos de adsorción, por lo que la separación ocurrirá también, en parte, debido a la interacción entre las moléculas a separar con dicho soporte, la cual actuaría como fuerza de frenado. Tanto la cromatografía en papel como su análoga en capa fina están comprendidas en la descripción de **Cromatografía en Dos Dimensiones**, debido a las dos dimensiones espaciales que son el ancho y el largo que son características de una **Cromatografía en Plano**.

#### Fundamento:

El uso de la cromatografía en papel para la separación e identificación de aminoácidos es de gran importancia desde que fue introducida por Martin<sup>1</sup> en 1944, la fase móvil empleada generalmente es una mezcla de *n*-butanol/ácido acético/agua o dilución acuosa de fenol (polar y ácida), estas combinaciones de fases móviles poseen densidad mayor que otros sistemas de solventes y requiere de por lo menos de 2 a 3 horas para que el frente del solvente alcance una distancia prudente en una placa relativamente larga. Sin embargo en un experimento descrito por Gabriel<sup>2</sup> en 1968 se estudio la alternativa de emplear acetonitrilo y un buffer (polar y ácida o alcalina dependiendo el pH del buffer) obteniéndose buenos resultados en el tiempo de desarrollo (40 minutos) sin necesidad de que se preequibre el papel<sup>1</sup>.

Si bien, el empleo de acetonitrilo reduce el tiempo experimental, este incrementa la toxicidad y por lo tanto deben emplearse las medidas pertinentes. El empleo de las soluciones tampón o buffer se asocia a que las características químicas de los aminoácidos cambian con el valor de potencial de hidrógeno de trabajo, de esta manera estos pueden desplazarse más cuando las condiciones de la fase móvil (cuyo efecto es predominante) así se lo permiten.

Lo anteriormente expuesto ilustra como los procesos cromatográficos tanto instrumentales como no instrumentales (en cualquiera de sus variantes) son receptivos a nuevas alternativas metodológicas y continuamente sufren cambios que benefician en aspectos como resolución, separación, empleo de recursos y tiempo por mencionar algunos.

---

<sup>1</sup> Actualizada por Jorge Reyes y William Quiroa.

Lea acerca de la química de los aminoácidos en el fundamento de la práctica de Análisis Cualitativo de Aminoácidos por Electroforesis de este manual y visite la tabla relacionada en la sección de Apéndices.

**Objetivos:**

1. Emplear la técnica de cromatografía en papel para separar y aislar aminoácidos.
2. Estudiar alternativas metodológicas que permitan optimizar tiempo y recursos.
3. Comprender los mecanismos y principios implicados en la cromatografía en papel.

**Materiales:**

- Papel filtro Watman Qualitative No.3 o No.1.
- Cámara Cromatográfica (puede ser un beacker, cuando sea necesario).
- Capilares adelgazados para aplicar muestras.
- Tijeras.
- Estufa eléctrica o plancha para aplicación de calor.
- Papel pH escala 1 a 14.
- Pipetas Pasteur.
- Bulbo para pipetas Pasteur.
- Probeta de 100 y 10 mL.

**Reactivos:**

- Aminoácidos (proporcionados por el instructor).
- Acetato de Amonio.
- Acetonitrilo.
- Ácido Acético 50%.
- Ninhidrina en solución: 1 mg Ninhidrina /mL Acetona(Proteger de la luz solar)

**Procedimiento:**

- **Preparación de Fase Móvil.**
  1. Preparar 100 mL de una solución de acetato de amonio 0.1 M. a partir de reactivo sólido y agua. El peso molecular del acetato de amonio es 77.08 g/mol.
  2. En recipientes debidamente rotulados haga mezclas de acetonitrilo/acetato de amonio 0.1 M 7:3, (fase móvil A), agregar a fase A 1 mL de Ácido Acético Glacial y relación 6:4 (fase móvil B), agregar a fase A 1 mL de Ácido Acético Glacial. Verifique el pH de las soluciones y repórtelo al instructor.
  3. Separe en dos porciones las fases móviles A y B y cambie el pH de una de cada una usando unas cuantas gotas de ácido acético glacial o diluido. Ahora cuenta con 4 Fases móviles. Su instructor le dirá como organizarse en equipos de trabajo.
  4. Ejecute inmediatamente la Preparación de Cámara de Desarrollo que se describe más adelante.
- **Preparación de Fase Estacionaria.**
  1. Sobre un trozo de papel Watman No. 3 de 8 x 8 cm se traza con un lápiz una recta paralela a uno de los bordes y a una distancia de éste de 1 cm.
  2. Sobre esta línea se pone 6 puntos equidistantes entre si y sobre los bordes.

3. En cada punto (identificados con el nombre de cada uno de los aminoácidos) se aplicarán tres gotas de la solución de aminoácidos y solución problema (un aminoácido en cada punto y en el último la solución problema). Se utiliza un capilar para aplicar la muestra gota a gota (hacerlo con mucho cuidado). Se seca con un secador de pelo después de haber aplicado cada gota. Se marca con lápiz, y en el extremo opuesto de la placa, algún indicativo del grupo que realiza la cromatografía.

- **Preparación de Cámara de Desarrollo.**

1. Coloque 10 ml de Fase Móvil dentro de la cámara (beacker 100 mL) y tápelo por medio de una pieza de papel aluminio que no permita la salida de los vapores.
2. Deje reposar la cámara durante 15 minutos antes de proceder al Desarrollo Cromatográfico que se describe más adelante.

- **Procedimiento de Sembrado en Cromatografía en papel:**

1. Llevar a cabo la técnica correspondiente al sembrado en la página de la sección de técnicas complementarias al inicio de este manual.
2. Pida a su instructor la muestra desconocida MDAA01 y siémbrela en el papel.

- **Desarrollo Cromatográfico:**

1. Colocar el papel cuidadosamente dentro de la cámara de desarrollo a manera tal que se sumerja uniformemente dentro del solvente y no un extremo primero.
2. Dejar que la fase móvil trepe por el papel hasta que alcance a un cálculo estimado de 1 cm del borde del papel.
3. Cuando lo anterior suceda saque el papel y marque el frente del solvente con un lápiz. Luego seque el papel y rocíe por medio de un atomizador el reactivo ninhidrina de manera que se cubra completamente la placa.
4. Por medio de una estufa seque el papel (sin dejar que se quemé) hasta que se hagan visibles las marcas de aminoácidos (algunas veces café y por lo regular púrpura)
5. Efectúe las marcas pertinentes para el cálculo de los factores correspondientes.

**Resultados:**

1. Hallar los valores de factor de retención para cada aminoácido.
2. Calcular el factor de retención relativo para aquellas muestras a las que se le compare con un patrón de referencia.

**Análisis de Resultados:**

Explicar el desplazamiento de los compuestos utilizando desde el punto de vista de la afinidad a la fase estacionaria y móvil de cada compuesto y tomando algunas de las características físicas y químicas de las moléculas, tales como la solubilidad, polaridad, efecto de potencial de hidrógeno, entre otros que considere pertinentes.

**Cuestionario:**

1. Los aminoácidos son sustancias que dependiendo del valor del potencial de hidrógeno se comportan de manera diferente. ¿Cuál es el valor del potencial de hidrógeno de la fase móvil?
2. ¿En que forma se encuentran los aminoácidos en el potencial de hidrógeno de trabajo?
3. ¿Es posible explicar la elusión de los aminoácidos en función de su peso molecular?
4. ¿Es posible llevar a cabo esta técnica por cromatografía en papel?
5. ¿Existen otros reveladores aparte de la ninhidrina para revelar las posiciones de los analitos analizados en ésta práctica?

**Bibliografía:**

1. Heimer, E. P. Journal of Chemical Education Vol. 49, Number 8, August 1972. pg. 547
2. Gabriel, T. F. Journal of Chromatography. Vol. 36 1968. pg. 518
3. Pavia, D.L., Lampman, G.M., Kriz, G.S. and Engel, R.G. "Introduction to Organic Laboratory Techniques - a Microscale Approach", 2nd Ed., Saunders Publishers (1995).  
Pasto, D., Johnson, C. and Miller, M. "Experiments and Techniques in Organic Chemistry, 1st Ed., Prentice Hall (1992).
4. Skoog, D. A.; Holler, F. J. & Nieman, T. A. *Principios de Análisis Instrumental*. 5ta Edición McGraw-Hill/Interamericana de España, S. A. España, 2001, xxv + 1028