

# 11. Separación de aminoácidos por cromatografía en capa fina y detección mediante reacción con ninhidrina

**Jesús V. Jorrín Novo, M<sup>a</sup> Nieves Abril Díaz,  
José A. Bárcena Ruiz**

*Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Campus Universitario de Rabanales,  
Edificio Severo Ochoa, 14071-Córdoba*

## RESUMEN

La cromatografía en capa fina es un caso de cromatografía de reparto en la que los componentes de una mezcla se separan por diferencia de solubilidad entre dos sistemas disolventes. Los elementos del sistema cromatográfico son: soporte, fase estacionaria (disolvente A), y fase móvil o eluyente (disolvente B). Es una técnica simple en cuanto al equipamiento necesario (placa y tanque cromatográfico) y de fácil desarrollo. El parámetro experimental asociado a la técnica es el  $R_f$  (coeficiente de reparto), relacionado con la solubilidad relativa de un compuesto entre la fase estacionaria y fase móvil, y que depende de su estructura química y su hidrosolubilidad/liposolubilidad. A modo de ejemplo, y dentro de la presente práctica, se llevará a cabo la separación de una mezcla de aminoácidos, que se revelarán e identificarán mediante la reacción con la ninhidrina.

*Palabras clave:* análisis cualitativo, biomoléculas, coeficiente de reparto, reacciones coloreadas.

*Abreviaturas empleadas.* CCF: cromatografía en capa fina; TLC: thin layer chromatography.

## 1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

### 1.1. Separación de moléculas por cromatografía

El estudio y caracterización de las distintas biomoléculas (azúcares, lípidos, proteínas, ácidos nucleicos, etc.) requiere en numerosos casos su aislamiento y purificación a partir de mezclas complejas como son los preparados de cualquier material biológico. Una de las técnicas bioquímicas más clásicas y utilizadas para dicho fin es la cromatografía. La cromatografía incluye una amplia gama de técnicas, que se pueden clasificar atendiendo al fundamento físico-químico en el que se basa la separación (cromatografía de adsorción, de reparto, de cambio iónico, de filtración molecular, hidrofóbica y de afinidad), o al material sobre el que se lleva a cabo (cromatografía en papel, capa fina, en columna y de gases).

Todas las técnicas intentan explotar las diferencias físicas, químicas y biológicas de las distintas biomoléculas para llevar a cabo su separación y aislamiento. Entre dichas propiedades podríamos citar:

- i) Diferencias en solubilidad en diferentes solventes, tanto orgánicos como acuosos.
- ii) Diferencias en tamaño y forma.
- iii) Diferencias en carga.
- iv) Diferencias en afinidad por otras biomoléculas.

Todas estas propiedades y, por tanto, la separación de diferentes compuestos están influenciadas por las condiciones del medio de separación, pH, temperatura, fuerza iónica e hidrofobicidad.

De forma general, en las técnicas cromatográficas existe una distribución de las moléculas entre dos fases, la fase estacionaria o parte del sistema separador que permanece fija en el espacio, y la fase móvil que circula sobre la fase estacionaria en íntimo contacto con ésta.

## **1.2. Cromatografía de reparto**

En la presente práctica llevaremos a cabo una cromatografía de reparto, en capa fina, para la separación de aminoácidos. En la cromatografía de reparto 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 y viene determinado por el coeficiente de reparto, que es la relación entre las concentraciones del soluto, en el equilibrio, en las dos fases. En la cromatografía de reparto tenemos un soporte inerte al que está unida la fase estacionaria líquida. La mezcla a separar junto con la fase móvil se hace avanzar a lo largo de la fase estacionaria por capilaridad. En dicho avance, la fase móvil arrastrará consigo un porcentaje de moléculas de cada componente a separar de acuerdo con los respectivos coeficientes de reparto. La distancia recorrida por cada uno de los componentes de la muestra dependerá de la cantidad de solvente o eluyente que se haga pasar y de los coeficientes de reparto, de manera que si éstos son diferentes aquélla también lo será, siendo posible la separación si se utiliza el volumen de eluyente apropiado. En su desplazamiento, las moléculas de soluto se distribuirán no puntualmente, sino formando un área debido a que son parcialmente solubles en las dos fases y a otros fenómenos tales como la difusión.

En la cromatografía de reparto se suelen utilizar diversos materiales como soportes: almidón, celulosa, gel de sílice, óxido de aluminio, etc. 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. La fase estacionaria se forma suspendiendo o embebiendo el soporte con el solvente adecuado; éste recubre las partículas del soporte y es retenido por adsorción y/o capilaridad. El espacio entre las partículas del soporte será utilizado por la fase móvil para su desplazamiento. Debemos de tener en cuenta que como fase móvil se suelen utilizar solventes hidrófobos cuando haya que separar compuestos no polares y solventes acuosos cuando haya que separar sustancias polares. Por su parte, la fase estacionaria, que debe ser al menos parcialmente inmisible con la móvil, suele ser por lo general hidrofílica, aunque también pueden utilizarse compuestos hidrófobos.

### **1.3. Cromatografía en capa fina**

En la cromatografía en capa fina, CCF o TLC ("thin-layer chromatography, en la terminología inglesa) se puede utilizar como soporte cualquier sustancia que pueda dividirse en partículas finas y distribuirse uniformemente en forma de láminas. Esto incluye sustancias inorgánicas (gel de sílice, óxido de aluminio, tierra de diatomeas, silicato de magnesio, etc) y orgánicas (celulosa, poliamida, polietileno, etc). La utilización de soportes hidrófobos facilita la separación de compuestos no polares (lípidos, por ejemplo). En la CCF, la fase estacionaria es una lámina de 0,25-0,50 mm de espesor, extendida de forma uniforme sobre la superficie de una placa de vidrio o plástico. Aunque muchas casas comerciales suministran placas ya preparadas, éstas pueden hacerse en el laboratorio con aparatos especiales que permiten extender sobre la placa de vidrio o plástico la "papilla" formada por la suspensión del material en un disolvente adecuado (generalmente agua). La placa ha de dejarse secar antes de su utilización.

Para el desarrollo de la cromatografía, las muestras, en un disolvente adecuado, se aplican puntualmente con la ayuda de jeringas, micropipetas o capilares en un extremo de la placa. El volumen de muestra a aplicar es crítico, ya que va a afectar a la resolución (separación de los componentes de una mezcla compleja), y depende de la concentración del compuesto o compuestos de interés en la muestra. Para soluciones concentradas bastará una cantidad muy pequeña (rango de  $\mu\text{l}$ ) para aplicar suficiente cantidad de los solutos a separar sin llegar a saturar la capacidad de resolución de la placa cromatográfica. Para soluciones muy diluidas, deberá aplicarse un volumen suficiente (de hasta varios ml) para asegurar una cantidad detectable de soluto o solutos de interés. En este caso conviene hacer la aplicación en pequeños volúmenes fraccionarios, no procediéndose a una nueva adición hasta haberse secado totalmente la precedente (de lo contrario la superficie de aplicación se haría muy grande, distando mucho de la situación ideal de concentración de la muestra en un solo punto de aplicación). Una vez aplicada y seca la muestra, la placa se introduce en un recipiente cerrado (tanque cromatográfico) y uno de los extremos (el más próximo a la línea de aplicación) se sumerge en un disolvente apropiado (fase móvil), cuyo nivel en el fondo del tanque debe quedar por debajo de la línea de aplicación. El solvente se desplaza a través del soporte por capilaridad provocando un reparto de los solutos entre él y la fase estacionaria de acuerdo con sus solubilidades relativas (coeficientes de reparto). Una vez que el solvente haya alcanzado un punto próximo al otro extremo de la placa, ésta se saca del tanque y se seca. Las manchas correspondientes a cada compuesto, si

no son visibles, se pueden revelar mediante técnicas analíticas concretas. Se determina la posición de cada mancha relativa al frente alcanzado por el solvente, calculándose el correspondiente valor de  $R_f$ . La detección de los compuestos una vez realizada la cromatografía se puede llevar a cabo en base a sus propiedades espectroscópicas, fluorimétricas, haciéndolos reaccionar con reactivos específicos, radioisotópicamente, etc. La identificación de tales compuestos se suele realizar comparando sus  $R_f$  con los de compuestos de referencia (patrones) de naturaleza química conocida. Alternativamente, los diferentes compuestos, una vez localizada su posición por un método no destructivo, pueden eluirse de la placa raspando las zonas correspondientes y extrayendo el polvo obtenido con un solvente adecuado.

Uno de los factores más críticos en este tipo de cromatografías es la elección de la fase móvil, que, básicamente, suele estar formada por una mezcla de un solvente orgánico con agua y algunas sustancias adicionales tales como ácidos, bases, agentes acomplejantes, etc., cuya finalidad es aumentar o disminuir la solubilidad de algunos compuestos. Además de en una sola dirección, la CCF puede también realizarse bidimensionalmente. En este caso sólo se aplica una única muestra, que se dispone en uno de los vértices de la placa y se eluye dos veces, normalmente con solventes diferentes, y en direcciones perpendiculares.

La CCF presenta una serie de ventajas respecto a cromatografías alternativas, como es la de papel, tales como las siguientes:

- i) Una mayor resolución, obteniéndose por lo general manchas más pequeñas.
- ii) Una mayor velocidad de separación.
- iii) Pueden utilizarse un gran número de materiales como soportes y disolventes.
- iv) Los compuestos pueden ser detectados con facilidad y su recuperación es muy simple.

La mayor resolución obtenida por CCF se debe a que pueden formarse partículas muy finas del soporte, por lo que la relación superficie/volumen es muy elevada, proporcionando una gran área superficial por unidad de longitud. Esto se traduce en que la cantidad de muestra que se puede aplicar es mayor y la difusión es mucho menor. La ventaja respecto a la cromatografía en papel es que éste tiene una estructura fibrosa y la capilaridad asociada a las fibras tiende a aumentar la difusión de las moléculas.

#### **1.4. Reacciones coloreadas de aminoácidos**

Los métodos colorimétricos de determinación de aminoácidos se basan en la reacción específica de éstos con determinados compuestos, dando derivados coloreados. La formación de color se toma como resultado positivo e indica su presencia, mientras que el no desarrollo de color es indicativo de que no está presente. Para cada prueba se utilizará un control negativo, también denominado blanco de la reacción, en el que el reactivo se añadirá a agua destilada (o solvente adecuado). Aunque en la presente práctica se llevará a cabo la determinación cualitativa de aminoácidos (ausencia o presencia de dichos compuestos), las reacciones coloreadas pueden también ser utilizadas para la determinación cuantitativa de dichas biomoléculas.

Hay una amplia gama de métodos colorimétricos que permiten la determinación cuali- y cuantitativa de aminoácidos. Aunque son métodos muy generales, algunos de ellos permiten discriminar entre diferentes tipos de estos compuestos. Así, hay métodos de determinación de aminoácidos con el grupo amino libre (método de la ninhidrina), de aminoácidos con núcleos aromáticos (reacción xantoproteica), de los que poseen un grupo indólico (triptófano; reacción con el ácido glicólico), un anillo fenólico (tirosina; reacción de Millon), de aminoácidos azufrados (cisteína; reacción con nitroprusiato sódico). En todos los métodos, el aminoácido reacciona con otro compuesto formando derivados coloreados que se pueden determinar cuantitativamente por espectroscopía visible.

De todos los métodos reseñados, el más general y utilizado es el de la reacción con la ninhidrina. La ninhidrina (hidrato de tricetohidrendeno) reacciona con aminoácidos que tengan el grupo amino libre, dando lugar a la formación de amoniaco y anhídrido carbónico, con reducción del reactivo (ninhidrina) a hidrindantina (Figura 1). La hidrindantina reacciona a su vez con el amoniaco y otra molécula de ninhidrina para dar un compuesto de adición doble que presenta una coloración azul-púrpura, con la excepción de la prolina que da una coloración amarillenta (recordar que en la prolina el grupo amino está sustituido). El derivado coloreado presenta máximo de absorción en torno a 570 nm. La reacción se lleva a cabo en caliente y a valores de pH comprendidos entre 4 y 8. Las aminas primarias ( $R-CH_2-NH_2$ ) dan también positiva la prueba de la ninhidrina, aunque en este caso no se libera  $CO_2$ . La técnica es muy sensible, por lo que es ideal para detectar concentraciones bajas de aminoácidos, utilizándose para revelar su presencia en cromatogramas y fracciones procedentes de otras técnicas de separación. La presencia de aldehídos resultantes de la degradación de la ninhidrina por reacción con los aminoácidos modifica, bajo ciertas condiciones, el color formado, lo que sirve para identificar el tipo de aminoácido.

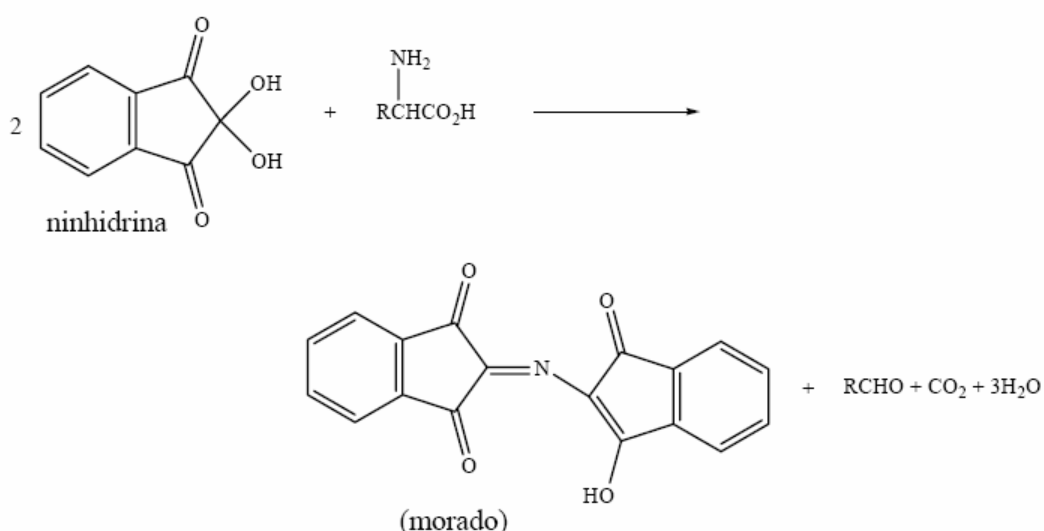


Figura 1. Reacción de aminoácidos con la ninhidrina.

## 1.5. Objetivos

- i) Separación de aminoácidos por cromatografía en capa fina sobre gel de sílice.
- ii) Revelado de los aminoácidos mediante la reacción coloreada con la ninhidrina.
- iii) Cálculo del valor de Rf para cada uno de los aminoácidos. Justificación de las diferencias en Rf de los distintos aminoácidos.
- iv) Identificación de la naturaleza de aminoácidos desconocidos.

## **2. LISTADO DEL MATERIAL NECESARIO**

Se incluye tanto el material de uso particular para cada grupo como el de uso general, así como reactivos. En la Figura 2 se muestra una fotografía del material de uso particular y en la Figura 3 la fórmula de los aminoácidos empleados.

### **2.1. Equipamiento**

Secador de pelo.  
Placa de silicagel para cromatografía en capa fina.  
Agitador de tubos.  
Tanque cromatográfico.

### **2.2. Material**

Gradillas con tubos de ensayo.  
Juego de pipetas (0,5, 1,0, 2,0, 5,0, 10,0 y 25,0 ml).  
Propipetas.  
Probetas (100 y 250 ml).  
Vasos de precipitado (100 y 500 ml).  
Frasco lavador con agua destilada.  
Recipientes de muestras biológicas de 50 ml.  
Papel de filtro.  
Capilares para aplicar muestras.  
Papel de parafilm.  
Rotulador de vidrio.  
Pipetas Pasteur de plástico.  
Guantes de látex.  
Frascos pulverizadores.  
Tijeras.

### **2.3. Reactivos**

Glutamato.  
Glicina.  
Lisina.  
Prolina.  
Leucina.  
Solución problema de aminoácidos.  
Etanol.  
Hidróxido amónico.  
Ninhidrina.



Figura 2. Material empleado en la práctica.

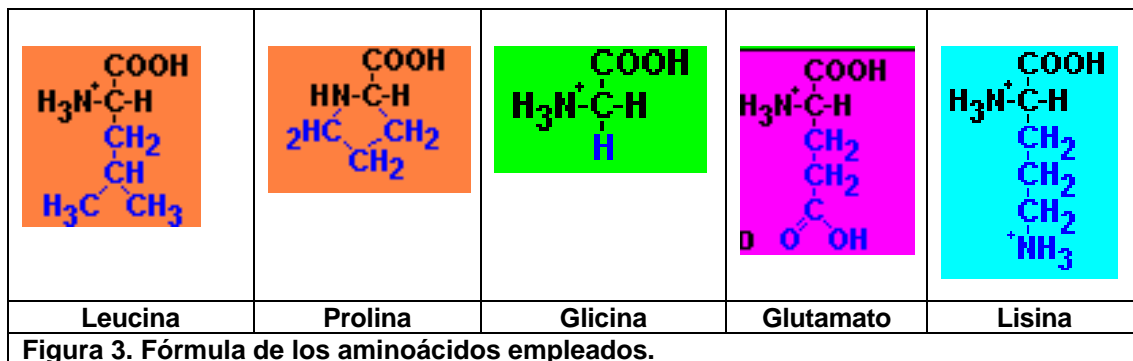


Figura 3. Fórmula de los aminoácidos empleados.

### 3. PROTOCOLO A REALIZAR

Los distintos pasos del procedimiento se ilustran en la Figura 4.

#### 3.1. Paso primero

Sobre una placa de silicagel de 20 x 20 cm se traza con un lápiz una recta paralela a uno de los bordes y a una distancia de éste de 2 cm. Sobre esta línea se pone 6 puntos equidistantes entre si y sobre los bordes.

**ADVERTENCIAS:** No hay que tocar la parte del silica gel de la placa con las manos, ya que la contaminaríamos con aminoácidos procedentes de nuestras manos. No utilizar nunca bolígrafo ni rotulador. No horadar la placa cuando la marquéis.

#### 3.2. Paso segundo

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.

### 3.3. Paso tercero

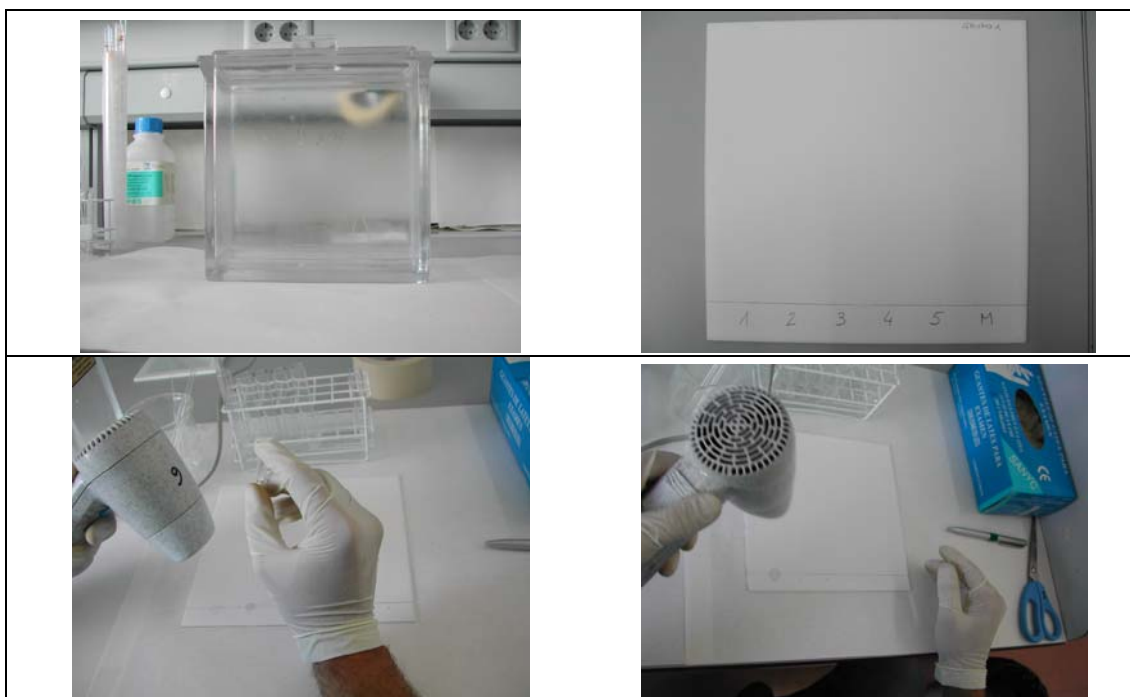
Se añade al tanque cromatográfico eluyente hasta una altura aproximada de 1 cm y sin que éste alcance la zona de aplicación de las muestras. Se mete la placa en el tanque, se tapa y se deja desarrollar la cromatografía hasta que el eluyente alcance el borde superior, sin llegar a sobrepasarlo (2-3 h aproximadamente).

**ADVERTENCIA:** Se opera en la campana extractora de gases, ya que el eluyente es tóxico.

### 3.4. Paso cuarto

Terminada la cromatografía se saca la placa, se marca la distancia recorrida por el eluyente, se seca dentro de la campana de gases con la ayuda de un secador de aire y se rocía con un pulverizador que contiene la solución reveladora (en la campana de gases). La placa se secará haciéndole llegar aire caliente con el secador.

**ADVERTENCIA:** Esta operación debe de hacerse en la campana extractora de gases.





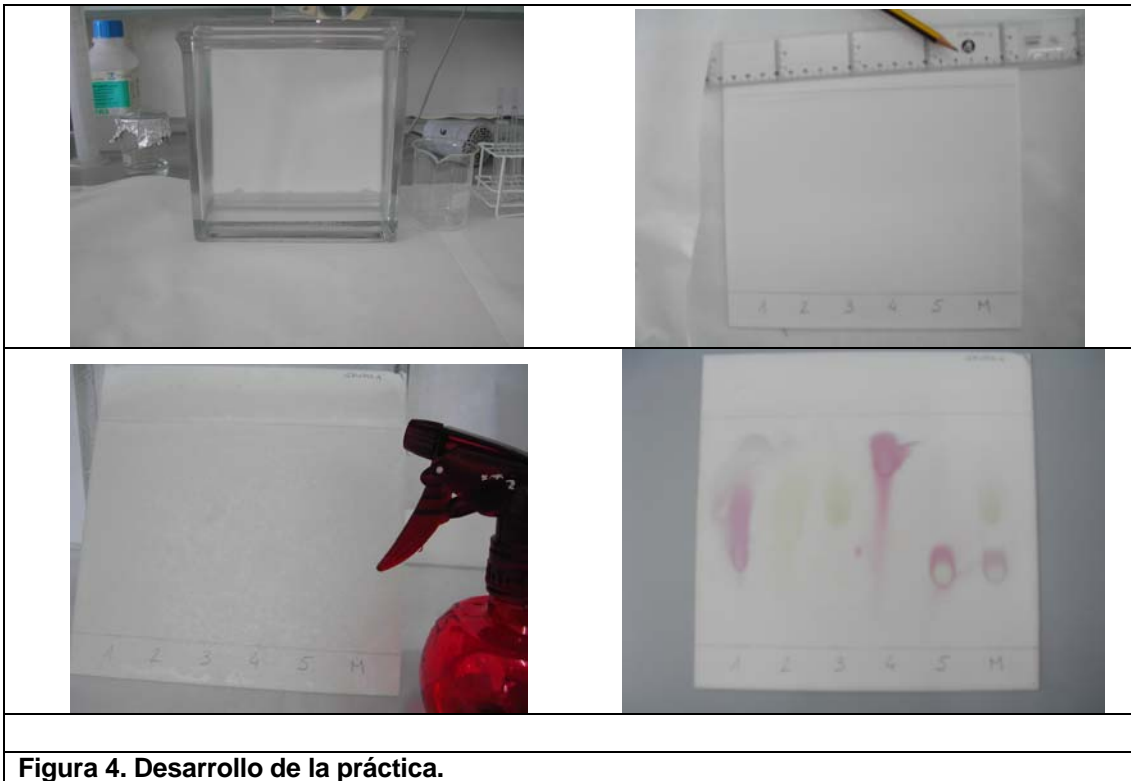


Figura 4. Desarrollo de la práctica.

#### 4. RESULTADOS

4.1. Se representan en una figura, similar a la de la Figura 5, los resultados obtenidos.

4.2. Se indican los valores de distancia recorrida por cada uno de los aminoácidos en una tabla y se calculan los correspondientes valores de  $R_f$ .

4.3. Se indica la composición de la solución problema, justificando la conclusión a la que se ha llegado.

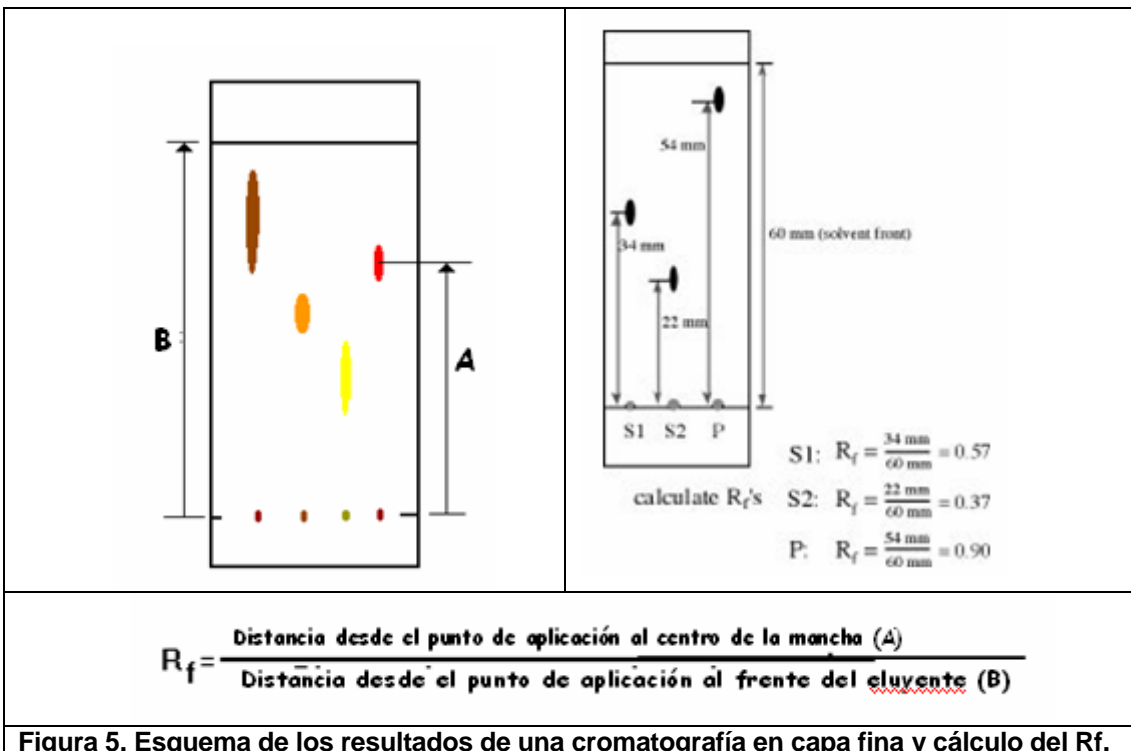


Figura 5. Esquema de los resultados de una cromatografía en capa fina y cálculo del  $R_f$ .

| <b>Tabla 1. Distancia recorrida por cada uno de los aminoácidos y cálculo del Rf</b> |                                 |           |
|--|---------------------------------|-----------|
| <b>Aminoácido</b>  | <b>Distancia recorrida (cm)</b> | <b>Rf</b> |
| Glutamato  |                                 |           |
| Glicina  |                                 |           |
| Lisina   |                                 |           |
| Prolina  |                                 |           |
| Leucina  |                                 |           |

## 5. DISCUSIÓN Y COMENTARIOS

Se deben justificar las diferencias en los valores de Rf para cada uno de los aminoácidos, así como las formas de la mancha, tipo de color e intensidad. A partir de la estructura química hay que relacionar el mayor o menor valor de Rf con la mayor o menor solubilidad en las fases estacionaria y móvil.

A tenor de los resultados obtenidos, se deben responder las siguientes cuestiones:

¿Qué se podría decir de la resolución de la técnica y cómo podría aumentarse ésta?

¿Qué ocurriría si la longitud de la placa se incrementara de 20 a 100 cm ó si se aumentara el tiempo cromatográfico de 2 a 20 horas?

Añadir los comentarios adicionales que se crean convenientes y procedentes.

## 6. BIBLIOGRAFÍA COMENTADA

Es importante hacer hincapié en la importancia de consultar la bibliografía recomendada con el fin de un mejor aprendizaje y para presentar y discutir correctamente los resultados obtenidos en el cuaderno de prácticas. Es importante, así mismo, conocer la estructura y propiedades químicas de los compuestos que se van a utilizar, en este caso los aminoácidos, por lo que se recomienda consultar las notas de clase o algún libro de texto de bioquímica general.

Luisot P (1982). "Bioquímica Estructural", 2ª Ed. Editorial AC.

Excelente libro de bioquímica estructural. En el capítulo de aminoácidos se describen con detalle sus propiedades físicas y químicas.

Smith I, Feinberg JG (1965) "Paper & Thin Layer Chromatography and Electrophoresis". Shandon Scientific Company Ltd.

Desarrollo histórico de la técnica y aplicaciones.

Bermúdez A, Bernal J, Espinosa E, Cornejo W, Briceño I, Prieto JC, Arrieta L  
Propuesta para un protocolo de diagnóstico de homocistinuria.

<http://med.javeriana.edu.co/publi/vniversitas/serial/v44n3/0023%20propuesta.pdf>

## ANEXO 1: SOLUCIONES

### 1. Soluciones de los distintos aminoácidos (glutamato, glicina, lisina, prolina y leucina) al 1%

| Solución de aminoácido al 1 % |              |
|-------------------------------|--------------|
|                               | 100 ml       |
| Aminoácido                    | 1 g          |
| n-Propanol                    | 10 ml        |
| Agua destilada                | Hasta 100 ml |

### 2. Solución de eluyente

#### 2.1. Solución de hidróxido amónico al 34 %

| Solución de hidróxido amónico |              |
|-------------------------------|--------------|
|                               | 100 ml       |
| Hidróxido amónico             | 34 g         |
| Agua destilada                | Hasta 100 ml |

#### 2.2. Solución de eluyente (etanol: hidróxido amónico, en una proporción 7:3)

| Solución de eluyente          |        |
|-------------------------------|--------|
|                               | 200 mL |
| Etanol                        | 210 mL |
| Solución de hidróxido amónico | 90 mL  |

### 3. Solución reveladora (se prepara el día de uso)

| Solución de ninhidrina |              |
|------------------------|--------------|
|                        | 100 ml       |
| Ninhidrina             | 0,2 g        |
| Agua detilada          | Hasta 100 ml |