

10. Cromatografía en papel de aminoácidos

José Peinado Peinado, Fermín Toribio Meléndez-Valdés

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

RESUMEN

Se llevará a cabo la separación de mezclas de aminoácidos mediante cromatografía en papel. Se revelará la presencia de los mismos en el papel mediante reacción con ninhidrina y se identificarán en el cromatograma por comparación con la posición de los correspondientes patrones preparados al efecto.

Palabras clave: fase estacionaria, movilidad, solubilidad en las fases, solvente.

Abreviaturas empleadas.

1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

La cromatografía se engloba dentro de las llamadas técnicas de separación y permite el análisis de mezclas complejas de compuestos muy estrechamente relacionados químicamente. Son varias las modalidades usadas y se clasifican según la fase móvil (de gases, líquida) y por el tipo de soporte (columna, capa fina, papel) usados.

La separación se lleva a cabo según la distinta interacción que presenta cada uno de los componentes de una muestra respecto a dos fases: una estacionaria y otra móvil que fluye sobre ella. Esta interacción puede ser de varios tipos que a su vez dan lugar a distintas subclases de cromatografía: de absorción, de reparto, de cambio iónico, de afinidad, etc.

En esta práctica, vamos a usar la más simple de ellas, la cromatografía ascendente sobre papel. La fase estacionaria es la celulosa del papel y la móvil una mezcla de disolventes orgánicos y agua. La celulosa retiene una cierta cantidad de agua entrelazada entre sus fibras y puede dar lugar a un mecanismo de reparto de los componentes de una muestra aplicados sobre ella cuando se hace fluir un disolvente de polaridad distinta de la del agua. Según la solubilidad que tengan los componentes de la muestra respecto de las dos fases así será su movilidad.

2. LISTADO DEL MATERIAL NECESARIO

2.1. Equipamiento

Tanque cromatográfico.

2.2. Material

Papel cromatográfico Whatman nº1
Tubos eppendorf.
Puntas de micropipetas.
Pulverizador.

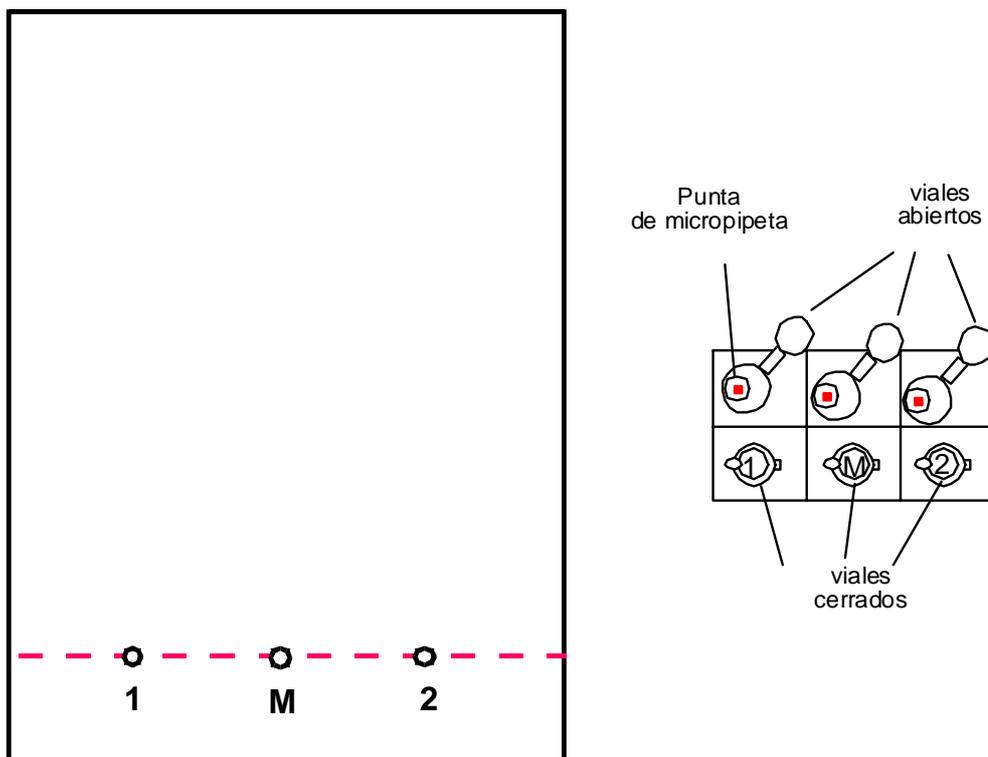
2.3. Reactivos

Soluciones patrón al 0,5% de aminoácidos.
Fase móvil, n-butanol:acético glacial:agua (12:3:5).
Solución de Ninhidrina al 0,1% en etanol con 2 ml de piridina.

3. PROTOCOLO A REALIZAR

Se trata de identificar el contenido en aminoácidos de una muestra (M) cuya composición desconocemos.

3.1. Se traza a 1,5 cm del borde inferior de la tira de papel Whatman una línea con lápiz y sobre ella se marcan 3 puntos a 1,5, 3,0 y 4,5 cm, escribiendo debajo de cada uno de ellos 1, M y 2, tal como se indica en la figura. Hay que evitar poner los dedos en la parte central del papel ya que al final saldrían nuestras huellas dactilares.



3.2. Aplicar sobre cada uno de los puntos, con la punta de micropipeta, cada una de las respectivas soluciones de forma que se forme una mancha de unos 5 mm de diámetro. La solución 1 contiene una mezcla patrón de lisina, prolina y fenilalanina. La solución M es la muestra cuyo contenido en aminoácidos pretendemos determinar y la solución 2 es un patrón que contiene ácido glutámico, valina y leucina.

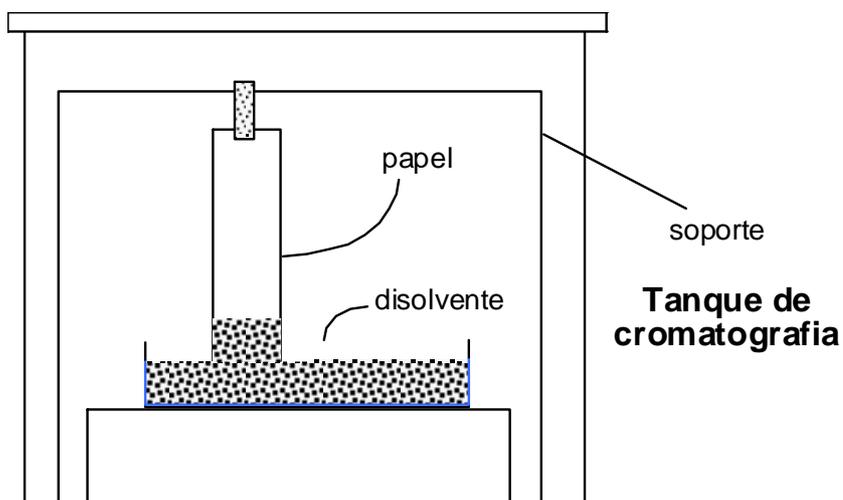
3.3. Se introduce el papel en el tanque de forma que el líquido no moje la línea y cerramos la tapa para que la atmósfera se sature del vapor de la fase móvil.

3.4. Se deja al menos 30 minutos para que se desarrolle el proceso.

3.5. Se sacan las tiras antes que el disolvente moje la pinza de sujeción y se marca el punto alcanzado por la fase móvil.

3.6. Se secan en corriente de aire caliente hasta que no se aprecie olor a butanol.

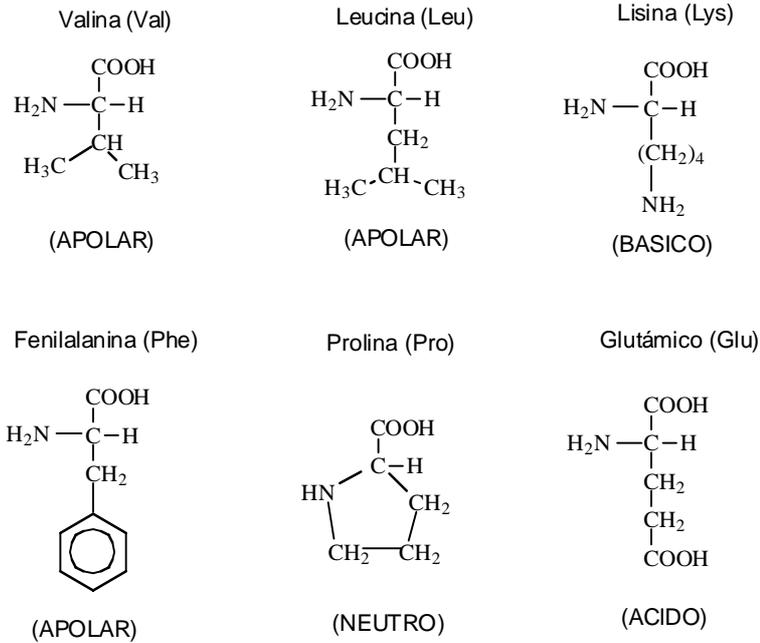
3.7. Se pulveriza con la solución de ninhidrina y se seca para que tenga lugar el desarrollo de color.



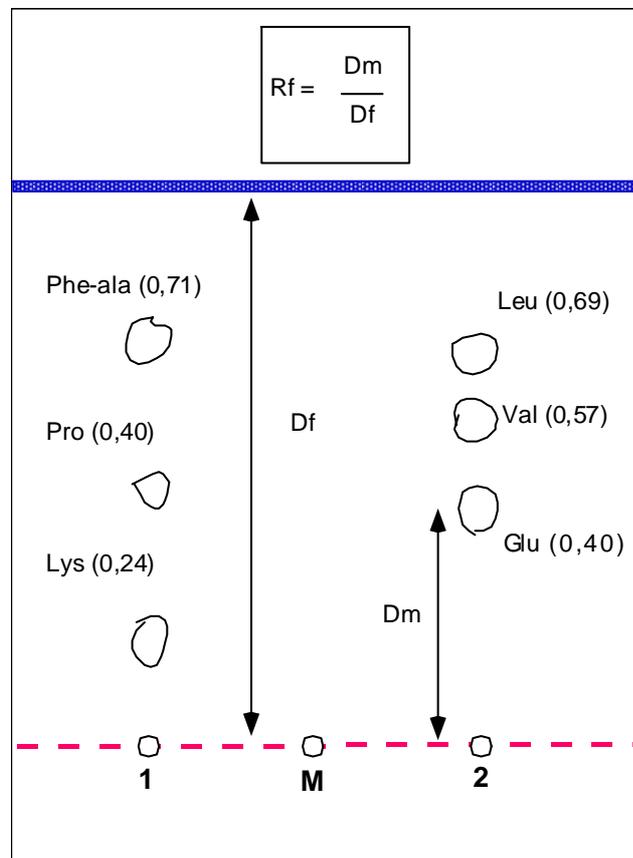
3.8. Se mide la distancia desde la línea de aplicación de las muestras hasta cada mancha y se calculan los valores del factor de resolución (R_f) para cada aminoácido. Los valores estimados se incluyen en la figura y habrá que calcularlos en cada experimento.

4. RESULTADOS ESPERADOS

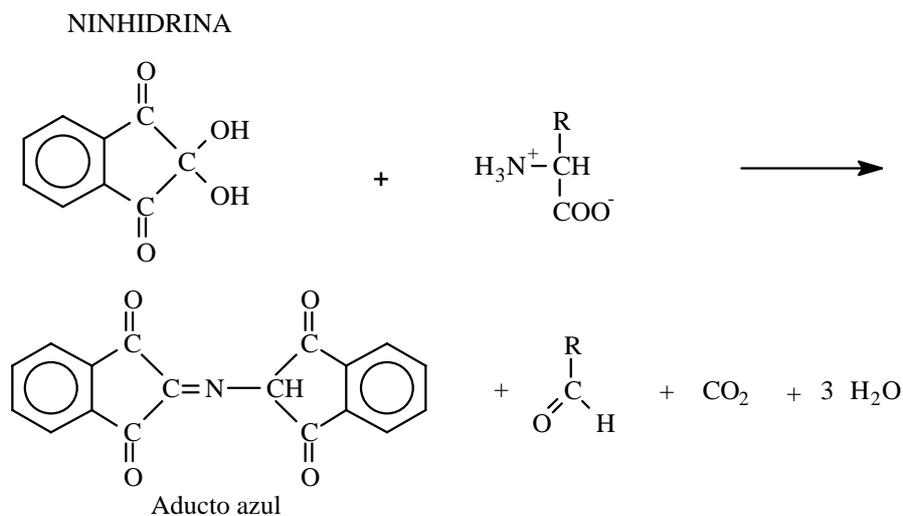
El reparto de los aminoácidos en el papel se debe a su naturaleza química. Las fórmulas de los compuestos usados como patrón son:



El reparto que se obtiene es el siguiente: los aminoácidos apolares son los que mejor interaccionan con el solvente y son arrastrados por él; la lisina presenta la menor movilidad debido a que al pH del solvente, este aminoácido presenta sus dos grupos amino cargados positivamente por lo que interacciona mal con el solvente, mayoritariamente apolar (n-butanol). Los demás aminoácidos se separan entre los aminoácidos apolares y el básico.



La posición del aminoácido se revela con ninhidrina, apareciendo una mancha de coloración azul-violeta. La ninhidrina reacciona con los aminoácidos formando aductos coloreados según la reacción:



5. DISCUSIÓN Y COMENTARIOS

Esta técnica de separación cromatográfica es de las más simples, aunque también de las más didácticas, ya que los alumnos deben preparar y cortar el papel, aplicar la muestra y revelar la posición de los aminoácidos.

La reacción de los aminoácidos con ninhidrina se debe a la presencia del grupo α -NH₂ en los mismos. La prolina no tiene dicho grupo libre, sino -NH- ya que forma parte del anillo de pirrolidina, y al reaccionar con ninhidrina se forma un color amarillo.

6. BIBLIOGRAFÍA COMENTADA

Stryer L, Berg JM, Tymoczko JL (2003) Estructura y función de las proteínas. En: "Bioquímica", 5ª ed. Editorial Reverté (Barcelona, España), pp. 41-76. Muestra las características de los aminoácidos: estructura, variación de su carga con el pH, etc.