

La Cromatografía

LUIS MARIO SCAVINI

Vamos a considerar previamente algunos conceptos generales, intentar definir la cromatografía es algo difícil por extensión pero podemos entender por cromatografía todos aquellos procesos que permiten la resolución de una mezcla por separación efectiva de algunos o todos sus componentes en fases de concentración distintas de aquella en la cual se encontraban independientemente.

Los procesos cromatográficos pueden clasificarse en dos grandes grupos según Cassidy (2)

A) Cromatografía de adsorción
fase sólida más fase líquida
fase sólida más fase gaseosa

B) Cromatografía de partición
fase líquida más fase líquida
fase líquida más fase gaseosa

En el grupo A) la polaridad se debe a la disposición de las moléculas en el espacio y a los diferentes grupos funcionales, prin-


cipalmente de adsorbente, hay competición entre solvente y adsorbente de la que resulta una separación de los compuestos según la forma en que son extraídos, las sustancias donantes de uniones hidrógeno son fuertemente adsorbidas.

La adsorción está favorecida por la alta polaridad, incremento en el número de grupos funcionales polares o de núcleos aromáticos, (para muestra no polar se usa adsorbente activo y para polar adsorbente inactivo).

El material adsorbente más usado es el óxido de aluminio y se observó que los alcoholes, aminas, aldehidos son fuertemente adsorbidos en una capa monomolecular por ser donantes del hidrógeno.

En el grupo B) la separación resulta de una pequeña pero bien definida diferencia de solubilidad en las dos fases, una fase fija constituida por agua retenida sobre un soporte inerte y una fase móvil formada por solvente orgánico. El proceso es similar al que ocurriría en un extractor continuo li-

TABLA 1

No polares	Solventes	D (constante dieléctrica)	Orden de alteración de la polaridad
 polares	hexano N	1.9	-Cl
	Eter petróleo	2.0	-H
	ciclo hexano	2.0	-OCH ₃
	Cl ₄ C	2.2	-NO ₂
	Benceno	2.3	-N(CH ₃) ₂
	Tolueno	2.4	-CO-CH ₃
	Tri Cl etileno	3.4	
	Eter dietílico	4.3	-N H ₂
	Cloroformo	4.8	-NH-CO-CH ₃
	Acetato de etilo	6.0	
	Piridina	12.3	-OH
	Isopropanol	18.3	
	Acetona	20.7	-CO-N H ₂
	propanol N	20.1	
	Etanol	24.3	-COO H
Metanol	32.0		
Acetato de etilio	37.0		
Agua	78.5		

$$K = \text{cte.}$$

$$\frac{1}{n} = \text{cte.}$$

$$x = \frac{x^t}{1 + K}$$

x: = posición media.

Isoterma de Langmuir
$$\frac{x}{m} = \frac{K_1 \cdot K_2 \cdot C}{1 + K_1 \cdot C}$$

k1 = cantidad de sustancia que saturaría un área del adsorbente con una película monomolecular.

k2 = capilaridad de la sustancia adsorbida.

Para explicar el fenómeno cromatográfico Sevidan L. (15) considera el movimiento de una zona de siembra a través de la columna. Sea h el espesor de dicha zona, al t = 0 y x = 0.

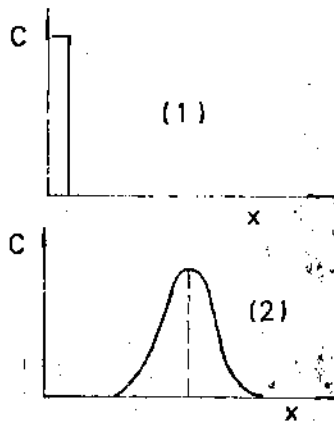
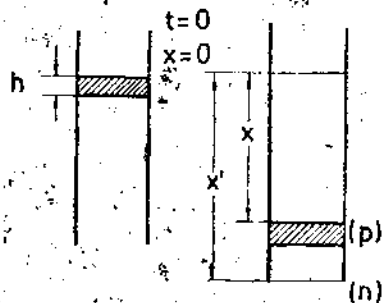


Fig. 1. Mecanismo de funcionamiento de una columna cromatográfica sembrada con una muestra que se desplaza a posiciones x y x'. Representando la concentración de eluido en función del desplazamiento tenemos los gráficos (1) y (2).

t = tiempo
x = desplazamiento de la muestra

Se añade luego el solvente para el que existe la siguiente relación:

$$Q_f = k \cdot Q_m$$

$$K = \frac{Q_f}{Q_m}$$

$$Q = Q_f + Q_m$$

Qf: = moléculas disueltas en la fase fija
Qm: = moléculas disueltas en la fase móvil

K: = coeficiente de distribución

$$t_f = k \cdot t_m$$

$$t = t_m + t_f$$

$$t_m = \frac{t}{1 + K}$$

El coeficiente de partición tiene mucha importancia pues si tenemos k, k', k'', etc. coeficientes, las distancias recorridas serán:

$$\frac{1}{1 + K} \quad \frac{1}{1 + K'} \quad \frac{1}{1 + K''}$$

CROMATOGRAFIA EN COLUMNA POR TAMICES MOLECULARES

El uso de esta técnica para la separación de moléculas de diferentes tamaños Flodin P. (5), (6) y su utilidad en la desalinización de proteínas Porath J. y col. (12) y el fraccionamiento de las mismas.

mas han sido de gran utilidad en los últimos años. Para ello se utilizaron partículas de distinto tamaño como los que se observan en la tabla 2.

TABLA 2

Sephadex tipo	Diámetro partícula (μ)	Agua de recuperación mlH ₂ O/g de Sephadex seco	Volumen de lecho en ml/g de Sephadex seco	Rango de Fraccionamiento	
				péptidos y proteínas globulares	Dextranes
Sephadex G-10	40-120	1.0 ± 0.1	2-3	700	700
Sephadex G-15	40-120	1.5 ± 0.2	2.5-3.5	1500	1500
Sephadex G-25 grueso	100-300	2.5 ± 0.2	4-6	1000-5000	100-5000
Sephadex G-25 medio	50-150	2.5 ± 0.2	4-6	1000-5000	100-5000
Sephadex G-25 fino	20-80	2.5 ± 0.2	4-6	1000-5000	100-5000
(fines preparativos)					
Sephadex G-25 super fino	10-40	2.5 ± 0.2	4-6	1000-5000	100-5000
(alta resolución)					
Sephadex G-50 grueso	100-300	5.0 ± 0.3	9-11	1500-3000	500-10000
Sephadex G-50 medio	50-150	5.0 ± 0.3	9-11	1500-3000	500-10000
Sephadex G-50 fino	20-80	5.0 ± 0.3	9-11	1500-3000	500-10000
(fines preparativos)					
Sephadex G-50 super fino	10-40	5.0 ± 0.3	9-11	1500-3000	500-10000
(alta resolución)					
Sephadex G-75	40-120	7.5 ± 0.5	12-15	3000-70000	1000-50000
Sephadex G-75 super fino	10-40	7.5 ± 0.5	12-15	3000-70000	1000-50000
Sephadex G-100	40-120	10.0 ± 1.0	15-20	4000-150000	1000-100000
Sephadex G-100 super fino	10-40	10.0 ± 1.0	15-20	4000-150000	1000-100000
Sephadex G-150	40-120	15.0 ± 1.5	20-30	5000-400000	1000-150000
Sephadex G-150 super fino	10-40	15.0 ± 1.5	20-30	5000-400000	1000-150000
Sephadex G-200	40-120	20.0 ± 2.0	30-40	5000-800000	1000-200000
Sephadex G-200 super fino	10-40	20.0 ± 2.0	30-40	5000-800000	1000-200000

Estos datos han sido suministrados por Pharmacia AB, Uppsala.

El gel consiste en pequeños granos hidrofílicos de una sustancia hecha insoluble por encadenamiento cruzado del polisacárido dextran, ello consiste en una trama tridimensional con carácter no iónico y las propiedades polares se deben enteramente al contenido de grupo hidroxilos con carga negativa.

Al variar los grados de encadenamiento cruzado varía la porosidad de la trama, un alto grado de entrecruzamiento en la estructuras compactos produce baja polaridad, y un pequeño entrecruzamiento de estructuras mayor polaridad.

Por su carácter hidrofílico tiene gran afinidad por el agua. Cuando se pone en agua se hincha y su grado de hinchamiento está determinado por la porosidad de la trama.

El gel con un grado de entrecruzamiento

determinado aloja una cantidad de agua llamada a de-recuperación o sea gm agua/gm sustancia seca.

El gel es estable en soluciones alcalinas y ácidas débiles, en ácidos fuertes y en caliente se hidroliza la unión glicosídica.

TABLA 3

Tipo de Sephadex	Tiempo mínimo de hinchamiento	
	a temp. ambiente	en agua caliente
G-10, G-15, G-25, G-50	3 h.	1 h.
G-75	24 h.	3 h.
G-100, G-150, G-200	3 d.	5 h.

Puede esterilizarse por autoclavado a 100°C-40 min. Si se calienta a más de 120°C puede comenzar a caramelizarse.

La capacidad fundamental de esta resina es excluir solutos de gran peso molecular y de permitir la difusión de moléculas pequeñas.

En las columnas empaquetadas el agua está en dos porciones: interna y externa. La primera es V_i (volumen de agua interna) y la otra V_o (volumen de agua externa).

$$V_t = V_o + V_i + V_g$$

V_o : volumen de agua externa o volumen muerto

V_i : Volumen de agua interna

V_g : volumen gel hidratado.

Esto nos da el volumen total de la columna empaquetada. El coeficiente de distribución para soluto entre el agua en las granos del gel y el agua circundante se llama K_d . si el $K_d = 0$ la sustancia es excluida del gel $K_d = 1$ adsorción total al gel.

$$K_d = \frac{V_o - V_e}{V_i} = \frac{V_e - V_o}{a \cdot W_r}$$

V_e : Volumen de elución, o sea volumen eluyente para mover una sustancia de la parte superior a la inferior de la columna.

a : Peso seco de la muestra.

W_r : agua de recuperación.

El volumen de elución (V_e) se puede expresar como la velocidad lineal de un líquido en la resina:

$$V_e = \frac{\text{Volumen}}{\text{tiempo} \times \text{sección}} = \frac{\text{cm}^3 \text{ pesados/seg}}{\text{cm}^2} = \frac{\text{cm}}{\text{seg}}$$

Cuando queremos separar dos sustancias con V_e' y V_e'' distintos debemos aplicar la siguiente relación

$$\begin{aligned} V_e' &= V_o + K_d' \cdot V_i \\ V_e'' &= V_o + K_d'' \cdot V_i \end{aligned}$$

$$\text{Restando} = V_e' - V_e'' = V_i (K_d' - K_d'')$$

Luego dos solventes con los coeficientes de distribución K_d'' y K_d' no pueden ser introducidos en el lecho del gel en un volumen mayor al que da $(K_d' - K_d'')$. V_i cuando quieren ser separados completamente, o sea debe cumplirse la siguiente relación:

$$V_m < V_s \quad V_s < V_i (K_d' - K_d'')$$

El factor principal que determina el coeficiente de distribución es el volumen de las moléculas de soluto.

Para moléculas muy grandes como proteínas con $K_d = 0$ y solutos de pequeño peso molecular como glucosa y cloruro de sodio con $K_d = 0.7$ a 1.0 . Se pueden usar columnas con pequeños números de platos y conseguir una buena resolución. (Fig. 2).

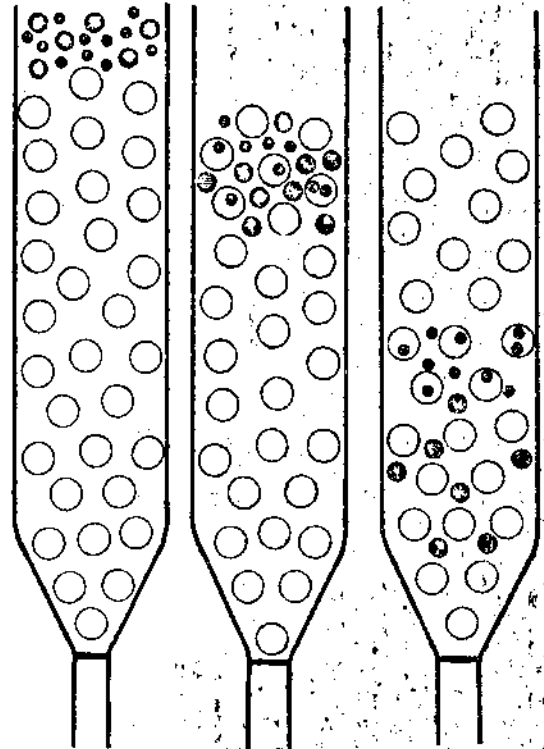


Fig. 2

Tres etapas de la separación simple por filtración en gel de Sephadex. Los puntos gruesos representan moléculas de alto peso molecular y los pequeños moléculas de bajo peso molecular. Como las moléculas pasan a través del gel a distintas velocidades emergen al final de la columna separadas una de otras.

Determinaciones analíticas a efectuar a las resinas

1) *Humedad* — Es la cantidad de agua que posee una muestra de resina. Para la determinación de la misma se toma una cantidad de muestra. Se pone en un cris-

talizador pesado previamente y se vuelve a pesar. Se calienta en estufa 12 h. a 105° - 110°C y se coloca en un desecador con anhídrido fosfórico, se deja enfriar y se pesa repitiéndose la operación hasta conseguir constancia de peso. Dicho valor restado del valor obtenido anteriormente y multiplicado por 100 nos da el % humedad.

2) **Capacidad** — Son los números de sitios intercambiables de una resina y se expresa como mili Equivalente (mEq)/gm resina. Influye en este cálculo la velocidad de intercambio y el equilibrio. Para esta técnica se toma 1 g de resina más 200 ml de HONa IN más ClNa al 5% se deja una noche y se valora por retorno el H+ con una solución de HONa 0.05 N.

$$\text{m EqH+ / g resina} = \frac{\text{ml. HONa} \times \text{N} \times \text{f} \times 20}{\text{peso muestra seca}}$$

Ejemplo: Para 2 g de muestra llevé a volumen y tome 50 ml y en la titulación gasté 10,2 ml de HONa 0.05 N f = 1.050

$$\text{m Eq.H+ / g resina} = \frac{10.2 \times 0.05 \times 1.050 \times 20}{2 \text{ gm resina seca}} = 5.3$$

2 gm resina seca

En el caso que la resina sea aniónica el cálculo es similar aplicando para titular el HO- librado la siguiente ecuación:

$$\text{m Eq HO / gm resina} = \frac{\text{ml. HCl} \times \text{f} \times 20}{\text{peso muestra seca}}$$

peso muestra seca

3) **Coefficiente de distribución**. — Como se ha visto anteriormente el coeficiente de distribución Kd mide la relación entre

la fase móvil y la fase fija
(x) móvil y la (x) fija (7)

$$Kd = \frac{(x) \text{ fija}}{(x) \text{ móvil}} = pK \frac{V_e - V_o}{V_i} = \frac{V_e - V_o}{V_e - V_o}$$

$$V_g = \frac{V_t - V_o - m \cdot g \cdot V_g}{V_g} = 0.6$$

$$Kd = \frac{1}{a \cdot W_r} [V_e - V_t + a (W_r + 1)] \cdot d$$

Si queremos calcular el coeficiente de partición entre la fase líquida y la fase del gel podemos hacerlo aplicando la siguiente relación

$$K_{aV} = \frac{V_e - V_o}{V_t - V_o}$$

Este coeficiente es independiente de la compactación del gel.

Se llama volumen libre de una resina a los intersticios de la misma, siendo aproximadamente un 40% para los tipos de Sephadex G-25, G-50, G-75 y un 30% para G-100, G-200.

4) **Adsorbentes**. — Pueden ser de dos tipos polares y no polares. Entre los polares tenemos la sílice, óxido de aluminio, tierra de infusorios, carbonato de calcio, óxido de calcio, etc. Estos compuestos absorben moléculas ionizables cuanto mayor es la constante de disociación. Absorben ácidos, amidas, alcoholes, aminas, ésteres, derivados nitrados, éteres, hidrocarburos no saturados y saturados. Los no polares, carbón activo, talco, las moléculas que forman mejor puentes de H-H serían igual en todo lo demás, las menos adsorbidas.

En las macromoléculas hay disminución de la adsorción con el incremento de la molécula y el equilibrio entre el soluto y el solvente se establece luego de cierto período.

Ultimamente han aparecido una serie de sustancias con propiedades de intercambiadores catiónicos usados para intercambiar iones de soluto con carga positiva entre ellos, carboximetil celulosa (CMC) Sulfo etil celulosa (SEC), celulosa fosforilada (CP) Sulfometil celulosa (SMC). Igualmente existen del mismo tipo pero del grupo de resinas Sephadex, CMC-Sephadex, DEAE Sephadex, SE Sephadex. (3).

Entre los intercambiadores aniónicos, usados para la adsorción de sustancia con carga neta negativa Dietilamino etil celulosa (DEAE) Trietilamino etil celulosa (TEAE celulosa). Esteola celulosa, guanidino celulosa (GC) para aminó guanil celulosa (PABC). Igualmente las del tipo Sephadex con los mismos grupos básicos. (Tabla 4). Si la información indica que la molécula tiene más carga

TABLA 4
Intercambiadores iónicos de Sephadex *

Sephadex tipo	Grupo iónico	Forma contra ión	Capacidad total mEq/g	Capacidad de Hemoglobina g/g	Volumen del lecho ml/g
DEAE A-25	C_2H_5 — C_2H_4 — N — H ⁺	cloruro	3.5 ± 0.5	ca. 0.5	5-9
DEAE A-50	C_2H_5	cloruro	3.5 ± 0.5	ca. 3	25-33
CMC — 25	—	sodio	4.5 ± 0.5	ca. 0.4	6-10
CMC — 50	— CH ₂ — COO	sodio	4.5 ± 0.5	ca. 7	32-40
SEO — 25	—	sodio	2.3 ± 0.3	ca. 0.2	5-9
SEC — 50	— C_2H_4 — SO ₃ O	sodio	2.3 ± 0.3	ca. 3	30-33

* Datos tomados de informes suministrados por Pharmacie AB, Uppsala.

negativas que positivas a valores de pH competibles con la estabilidad, debe ser usado intercambiador de aniones, en caso contrario usaremos intercambiador catiónico.

Previo a su uso los adsorbentes celulósicos deben ser lavados muy bien. Si son aniónicos se sumergen primero en NaOH 0.5N se filtra por buchner, se lava con agua destilada hasta que el agua de lavado sea incolora, se añade luego Acido Clorhídrico 0.5N hasta hacer la suspensión ácida se lava con abundante agua destilada, y se equilibra con el buffer deseado, se controla el pH y la concentración del contra ión en el líquido de lavado.

En los intercambiadores catiónicos se usa un orden inverso en la sucesión de lavados. Primero con HCl 0.5N, luego con una base que contiene el contra ión deseado, generalmente Na⁺

El objeto de esos lavados es eliminar los metales pesados que pudieran tener ligada la resina y que pueden influir en la inactivación de enzimas o de sustancias fácilmente alterables.

5) Siembra de la columna

Se pueden usar los siguientes métodos.

a) separar el buffer de la parte superior del gel por succión, cerrar la columna y pipetear con cuidado la muestra en la superficie, abrir la salida del líquido y una vez

que la muestra se introdujo en la resina se lavan las paredes con un poco de buffer, se añade más buffer y se conecta a un reservorio donde haya mayor cantidad del mismo. Jamás hacer correr la resina en seco.

b) En los procesos de separación de proteínas se puede dejar una pequeña cantidad de buffer en la parte superior y aplicar la muestra en esta capa por medio de una jeringa o una pipeta. El volumen de muestra a aplicar debe ser pequeño reservando lo que queda para los procesos de reabsorción. Para aumentar la densidad de la muestra a sembrar se suele añadir sacarosa, úrea, glucosa u otra sustancia inerte de bajo peso molecular.

c) Con un adaptador que posee en la parte inferior un tamiz de 400 mallas se puede colocar la muestra en la parte superior de la columna y hacerla llegar hasta la superficie de la resina.

Para propósitos analíticos donde se desea obtener una buena separación la zona de siembra debe ser lo más estrecha posible y por ello sembrar la cantidad de muestra más pequeña para lograr una buena separación.

Las cantidades podrían ser del orden de 0.3-0.5 ml. pero columnas de 15 mm. de alto y 1.3 ml. para columnas de 25 mm.

Cuando se usan adsorbentes del tipo de intercambio iónico se debe equilibrar la

muestra con buffer de menor molaridad usando suficientes volúmenes previo a su introducción en la columna, ello se consigue por diálisis durante 24 h. a 4°C con agitación magnética.

En estos casos se aconseja luego de introducir la muestra en la columna aplicar una pequeña presión de aire en la parte superior del recipiente (2 lib./p²) y se aumenta luego hasta (5 lib./p²) durante el relleno del 10-15% de la columna.

En algunos casos se dejan sedimentar las 2/3 partes de la columna por acción de la gravedad y luego se aplica una débil presión por medio de una bomba en la parte superior.

En el caso de compactar sin presión la columna resulta menos estable físicamente y la resolución perjudicada por el gran volumen de líquido intersticial.

Respecto al volumen ocupado por los diferentes tipos de resinas, para:

DEAE celulosa de 40-100 mallas es de 10 ml/gm resina.

CM celulosa de 40-100 mallas es de 7-8 ml/gm resina

Ectoelea celulosa de 40-100 mallas es de 6 ml/gm resina.

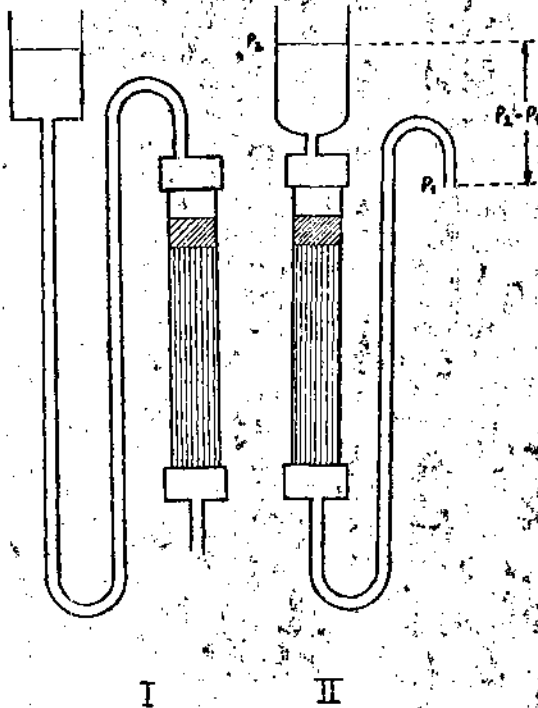
6) *Tamaño de las columnas.* — Puede ser variado dentro de amplios límites la relación altura: diámetro no es crítica pero valores de 1:10 a 1:20 son preferidos. En procedimientos analíticos como desproteinización de un volumen de 1 ml de suero se prefiere una columna de 5 ml, mientras para propósitos preparativos con volúmenes de 500 ml deben usarse columnas de 2 a 3 litros. Es de hacer notar que el manejo de las columnas grandes es tan sencillo como el de las pequeñas. Fahy, J. L. y col. (4).

7) *Empaquetado.* — Para obtener buenos resultados es importante cuidar bien que el lecho esté uniforme, para ello pesada una cantidad de muestras seca se agita en un vaso de precipitación con solución salina bufferada diluida produciendo una dispersión de los granos del gel.

Después de sedimentar y decantar se eliminan las partículas finas y la suspensión se transfiere por medio de una varilla larga a una columna cromatográfica en cuya parte inferior se ha colocado lana de vidrio, sílice o resina de grano grueso.

No es conveniente una placa filtrante puesto que puede retener ciertas sustancias y provocar obstrucción a la salida de líquidos.

El empaquetado ideal se obtiene si la columna se mantiene en posición vertical cerrada la llave inferior y se llena con la resina disuelta en buffer a temperatura ambiente, pues si el buffer es frío las burbujas de aire se formarán sobre los granos del gel y producirán disturbios al empaquetamiento. Cuando se ha formado una capa de 3 a 5 cm de altura el orificio de salida se abre, para permitir la salida del buffer, una idea del buen empaquetamiento de la resina se tiene cuando se hace en forma de superficie horizontal y lisa. (Ver gráfico I y II).



En la parte superior se coloca un papel de filtro circular o un tamiz de 400 mallas, ambos evitan deformaciones en el lecho de la resina cuando se siembra la muestra.

Al disminuir el tamaño de las partículas aumenta la resistencia al flujo y por lo tanto se obtiene menor velocidad de flujo, por ello es necesario lograr un equilibrio entre el tamaño de las partículas y la velocidad de flujo. Las partículas

gruesas dan separaciones rápidas con mala resolución cosa contraria ocurre con las partículas finas.

Para Sephadex G-200 no pasar de 150 mm, para G-75, G-100 y G-150 puede ser mayor.

Antes de comenzar la experiencia se debe observar si el empaquetamiento es homogéneo haciendo pasar una sustancia coloreada a través del gel, como Azul Dextran con un peso molecular de 40.000 aproximadamente, ello además nos permite determinar el valor del V_0 .

- 8) *Determinación del volumen muerto de la columna (V_0).* — Una vez empaquetada una columna debe ser determinado su V_0 para tener una idea de las condiciones del empaquetamiento, esto se realiza colocando una zona angosta de una sustancia de alto peso molecular en la parte superior de la misma y eluyendo con el buffer. Leach, A. A. y col. (8).

El volumen de elución o (V_e) de la sustancia es el V_0 . Tinta china diluida, azul dextran a Hemoglobina son recomendadas para este ensayo. Para una columna perfecta la zona de elución debería ser angosta y simétrica. Con los datos del volumen total del lecho (V_t), el agua adsorbida (W_r), densidad del gel hinchado (d) y el peso seco (a) se puede calcular el V_0 .

$$V_0 = V_t - \frac{a(1 + W_r)}{d}$$

- 9) *Determinación del volumen interno (V_i)*
Si la densidad del agua se considera

la unidad el volumen interno es: $V_i = a W_r$.

Se puede calcular también el mismo indirectamente si el peso seco del material del lecho es desconocido.

$$V_i = (V_t - V_0) \cdot \frac{W_r \cdot d}{1 + W_r}$$

$$V_i = \frac{a(W_r + 1) - V_g}{d}$$

Cuando se usa una columna largo tiempo suele disminuir la altura de la misma y su V_t debido a un empaquetamiento más cerrado de las partículas del gel.

El V_i permanece constante, pero hay una disminución del V_0 .

Para evitar todos esos inconvenientes se usa un tubo accesorio y se equilibra la columna a una diferencia de presión que es un 10% del volumen total de la misma. Una columna manejada con cuidado puede usarse varias veces hasta cien veces, en algunos casos debido a las impurezas puede disminuir la velocidad de flujo, esas contaminaciones bacterianas o micóticas pueden evitarse añadiendo azida sódica al 0.02 %, clorhexidina al 0.002 por ciento, cloretona al 0.1% o cloroformo saturado a temperatura ambiente. No usar agentes oxidantes.

También es útil el procedimiento de lavado en contracorriente y luego dejar asentar el gel hasta obtener un empaquetamiento uniforme. Si uno desea almacenar el gel lo hace con añadido de un agente bacteriostático de los anterior-

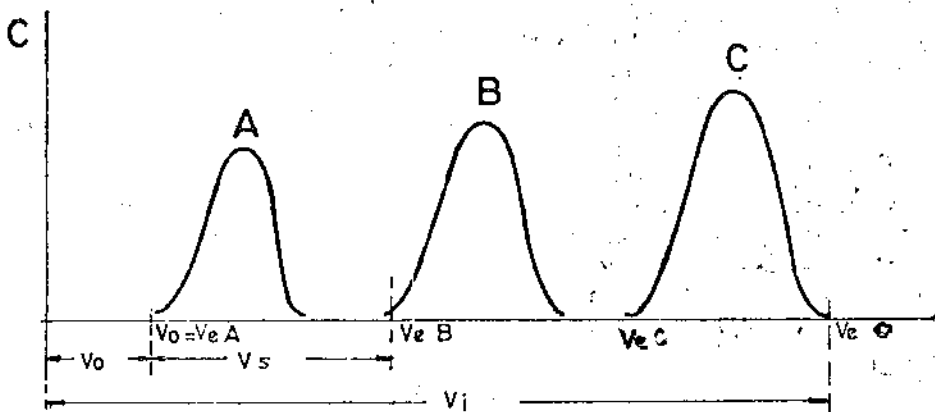


Fig. 3. Curvas de elución para muestras de diferente tamaño molecular en Sephadex G-200. El V_0 representa el volumen muerto de la columna, el V_s representa el volumen de separación. De acuerdo a esta representación se logra separar tres sustancias, A, B y C.

mente citados y luego deja a 4°C. Si se quiere secar el gel se lava sobre un buchner con exceso de agua para remover sales y disminuir los contaminantes del gel, añadir alcohol a intervalos y con lenta succión, luego secar a 60-80°C, el hecho de que aparezcan grumos no es un inconveniente para la dispersión posterior. (Fig. 3).

10) Determinación del agua de absorción

Se deja el gel pesado previamente con agua 24 h. se toman 10 ml y se transfiere a un adaptador pesado que se coloca en un tubo de centrifuga.

Durante la centrifugación se cubre el tubo de centrifuga con una goma. El líquido en el espacio muerto es centrifugado a 1000-2000 r.p.m. por 20' (radio 15 cm). El adaptador con su contenido es pesado nuevamente y transferido a un vaso de precipitados y secado a una temperatura de 105°C. El agua de absorción es expresada como gm agua embebida/gm. gel.

La densidad del gel húmedo se determina pesando el gel centrifugado previamente

en un psicnómetro que es llenado de agua eliminando el aire y vuelto a pesar. Un método rápido de determinación del agua de absorción es poniendo en una probeta una cantidad de resina añadir agua y leer el volumen de sedimento luego de 24 hs. de absorción.

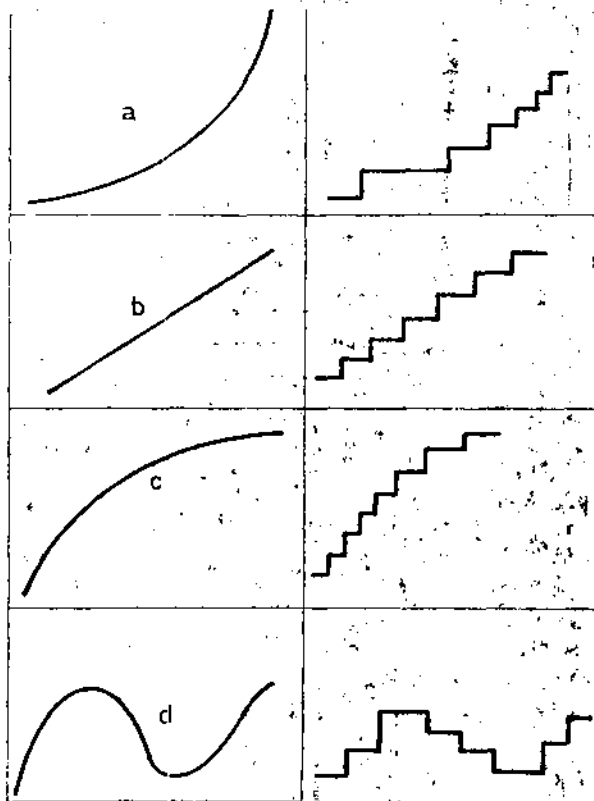
11) Desarrollo cromatográfico

La elución tiene por objeto, disminuir el número de cargas de la molécula de proteína a través de cambios de pH adecuados o decreciendo la efectividad de las uniones presentes por un aumento de la concentración de sal.

En la cromatografía de proteínas en columnas de intercambio de iones comprende primeramente el establecimiento de uniones electrostáticas múltiples entre sitios cargados en la molécula de adsorbente y entre moléculas proteicas, las proteínas que difieren significativamente, deben diferir en sus exigencias para una elución adecuada.

La distribución de la carga puede también ser considerada un factor importante, pero es el efecto total de ellos el que determina la afinidad de una proteína por el adsor-

Fig. 4 Distintos tipos de diagrama producidos por los gradientes continuo o discontinuo. El a cóncavo, b lineal, c convexo y d complejo.



bente, en algunos casos las fuerzas no electrostáticas pueden jugar un papel importante.

Si el volumen de eluyente V_e para eluir un componente durante la separación, se dibuja en función del volumen de eluato E que deja la columna, el gradiente puede ser descripto como *continuo* (gradiente de elución continuo o *descontinuo* (gradiente de elución escalonada. (Fig. 4).

a) *Gradiente discontinuo*. Sober, H. A. y col. (16).

Como existe entre las mezclas de proteínas amplio rango de afinidad es necesario usar una mezcla de diluyentes.

Quando se tiene que aislar una sola actividad enzimática de impurezas afines al adsorbente se pueden usar cambios arbitrarios en la composición del diluyente a pequeños intervalos de volúmenes para diluir la proteína rápidamente y en una concentración relativamente alta.

Un análisis cuantitativo de las fracciones para la actividad en estudio, revelará el procedimiento adecuado.

Las fracciones obtenidas pueden ser purificadas posteriormente por otros métodos, incluyendo una recromatografía en otros adsorbentes. En los procedimientos de elución discontinuos la resolución que se obtiene es menor que la que se alcanza por gradientes de elución continuo, la aplicación de cada nuevo diluyente dá por resultado la desadsorción más o menos simultánea de todas las proteínas que tiene requerimientos de elución no satisfechos por el eluyente precedente, pero que son excedidos por el que se está aplicando y estas emergerán en un pico.

La amplitud y a menudo el resto de una banda que se mueve despacio, puede aparecer en dos picos si el próximo cambio de solvente no se efectúa cuidadosamente. Aún más el cambio en las condiciones reduce probablemente la capacidad del adsorbente para algunas proteínas que quedan fuertemente adsorbidas, ensanchando sus bandas.

Sin embargo cuando se cromatografian muestras relativamente similares o cuando la proteína que se va a aislar difiere bastante de los otros componentes en su comportamiento cromatográfico, es posible idear escalas o diagramas de elución que liberen

separadamente los componentes individuales o mezclas de ellos de la columna.

b) *Gradiente continuo*. Peterson, E. A. y Sober, H. A. (16).

Si se aumenta en forma gradual y pareja el poder eluyente de buffer los picos resultantes de la proteína pueden ser interpretados con mucha mayor facilidad que los obtenidos por el procedimiento anterior aunque aún el gradiente de elución no está completamente libre de impurezas.

Estas características recomiendan trabajar con un gradiente de elución que tenga por objeto distribuir la proteína en tantos tipos cromatográficamente distintos como sea posible por un simple pasaje a través de la columna con el fin de examinar toda la proteína que pueda ser abarcada en un sistema complejo.

Por esta razón constituye el método apropiado para estudios de heterogeneidad molecular en agentes enzimáticos y para las últimas etapas de purificación de una determinada enzima.

Un gradiente adecuado conduce gradualmente a un equilibrio de adsorción de las proteínas firmemente adsorbidas, a medida que el movimiento de la fase líquida es más lento que el de la banda, el poder eluyente del líquido que rodea a la proteína aumenta continuamente y como consecuencia se acelera el movimiento de la banda. Finalmente, si la columna es lo suficientemente larga la banda se moverá a la misma velocidad que la fase móvil, y la fracción de migración total bajo las condiciones de equilibrio de adsorción debe ser determinada por el gradiente, para que a mayor velocidad de aumento de poder eluyente durante la migración, más pronto se alcancen las condiciones que impidan la readsorción.

c) *Dispositivo de gradientes*.

Se han descripto muchos modelos de estos dispositivos, uno de los más simples de construir consiste en dos recipientes uno colocado sobre el otro con una conexión desde el extremo inferior del recipiente de arriba que contiene la solución más concentrada del buffer, hasta el recipiente de abajo que tiene el buffer inicial de menor concentración.

El líquido que drena del recipiente inferior y cuyo contenido se agita continuamente es automáticamente reemplazado por

el contenido del buffer del recipiente superior, causando un aumento de concentración de acuerdo a la ecuación.

$$(1) \quad C = C_2 - D \cdot e^{-k} \quad \text{donde}$$

C : concentración de la solución que dre-
na del aparato inferior.

C₂: concentración buffer superior.

D : diferencia entre las concentraciones
iniciales de las soluciones de buffer
superior e inferior,

k : relación del volumen de líquido que
ha pasado hasta ese momento al volu-
men de solución colocado en el reci-
piente inferior.

La forma convexa del gradiente es general-
mente desventajosa pero el hecho de que
la pendiente se puede cambiar en cualquier
momento, reemplazando la solución en el
recipiente superior, esto es a menudo valio-
so en experiencias cromatográficas prelimi-
nares.

Un procedimiento que emplea una serie
de gradientes así obtenidos resulta ser in-
termedio entre elución fraccionada y gra-
diente de elución y posee algunas de las
ventajas y desventajas de ambos. Sin em-
bargo, es necesario un gradiente simple y
continuo sin aumento en la pendiente.

Para muchos propósitos un gradiente li-
neal simple es satisfactorio, este se produ-
ce rápidamente usando 2 recipientes idé-
nticos montados al mismo nivel y conectados
por tubos de modo de mantener el equili-
brio hidrostático.

Los gradientes simple son a veces inadecu-
ados para separar mezclas de muchos
componentes por los requerimientos de elu-
ción de las proteínas están rara vez distri-
buidos dentro de un rango semejante a
aquej en el que estos gradientes proporcio-
nan el poder de elución. Generalmente, se
necesita un gradiente compuesto para una
resolución satisfactoria de tales mezclas y
su forma debe ser determinada por una
sucesión de pruebas.

Ejemplo: al comienzo de la cromatografía
Buffer superior 0.30M V₁ = 500 ml.
Buffer inferior 0.01M V₂ = 1000 ml.

$$C_2 = 0.30 \text{ M}$$

$$k = \frac{0}{1000} = 0$$

Aplicando la fórmula (1)

$$C = 0.30 - 0.29 \cdot e^{-0} ; e^{-0} = 1$$

$$C = 0.01$$

Al final de la cromatografía

$$C_2 = 0.30$$

$$k = \frac{1000}{1000} = 1$$

según fórmula (1)

$$C = 0.30 - 0.29 \cdot e^{-1} ; e^{-1} = 0.37$$

$$C = 0.30$$

La adaptación del gradiente a los requere-
mientos particulares de una mezcla dada
de proteína y de la columna, se puede lo-
grar por medio de un procedimiento que
consiste en una serie de cubas interconec-
tadas y de iguales dimensiones cada una
equipada con un agitador y llenada con una
solución mantenida en un equilibrio hidros-
tático con la de las otras cubas.

A medida que el líquido va pasando des-
de la cuba que está en un extremo de la
serie, su concentración cambia de una for-
ma que está determinada por las concen-
traciones y posiciones de las soluciones ini-
ciales.

12) Elección de buffers

Es muy importante la buena elección de
buffers para la cromatografía de enzimas
pues en tales casos pueden producir una
inhibición de la actividad por ciertos iones.

La concentración del buffer inicial es
usualmente baja (aproximadamente 0.01M -
0.005M) con el objeto de promover la fija-
ción de las proteína de modo que son neces-
arios buffers con un pK vecino al pH
inicial, para proporcionar una capacidad
suficiente y eliminar inconvenientes que
puedan resultar de modificaciones del pH
por una interacción del buffer con un ad-
sorbente incompletamente titulado.

Si estos inconvenientes no se subsanan pueden dañar la resolución en las primeras porciones del cromatograma o provocar poca definición de los picos causando una apreciación errónea de los mismos.

El buffer de fosfato es excelente para cromatografía a pH = 7.0 inicial, el tris (hidroximetil amino metano) para pH = 8.0 y el acetato para valores de pH = 5.0.

Las combinaciones de tris-fosfato, tris-succinato son excelentes buffers dentro de un amplio rango de pH.

Generalmente, un ión del buffer que lleva la misma carga que la del adsorbente da mejor control de pH que aquel de carga opuesta.

Si se van a efectuar medidas de radiactividad en porciones del efluente se pueden usar sales volátiles tales como las amonio o carbonato. A valores de pH en los que estas no son efectivas como buffers, esta función la puede cumplir una baja concentración constante de otro ión. Ejemplo: Fosfato 0.005 M a 0.01 M que no interfiere materialmente con la radiación.

Los cambios de pH son también efectivos para aumentar el poder eluyente generalmente como consecuencia de cambios en el número de cargas de la proteína, luego una proteína adsorbida en un intercambiador de cationes se puede eluir por aumento del pH ya que su liberación de un intercambiador de aniones se logra por una disminución del pH.

Los efectos de aumento en la molaridad de la sal parecen ser más acentuados que los cambios de pH.

13) Flujo de la columna. Oh y Sanders (9).

La elección de las velocidades de flujo se determina principalmente por consideraciones hidrodinámicas, al menos en los que concierne a la cromatografía de proteínas con DEAE celulosa, porque las velocidades de flujo más altas se obtienen a 100 ml/h por cm² y no perjudican la resolución.

La efectividad de la Ecteola - celulosa dependen más estrechamente de la velocidad de flujo. El tamaño de la partícula del adsorbente es el factor más importante.

A una velocidad del flujo algo menor las dimensiones de la columna pueden sin embargo permanecer iguales durante toda la

experiencia sin que se encuentre dificultad alguna.

Con el propósito de inducir el flujo del buffer a través de la columna y el del recipiente colocado por encima de ésta, los cambios en la velocidad se pueden inducir sabiendo a bajando el recipiente en relación al extremo inferior de la columna. Se puede mantener una presión constante sin tener en cuenta la reducción del nivel en el recipiente a medida que el líquido va saliendo, cerrando la abertura del mismo con un tapón atravesado por un tubo de Mariotte. Para determinar la presión se mide la distancia desde el extremo superior de la columna hasta el extremo inferior del tubo de Mariotte lleno de aire, suponiendo así que la columna líquida es continua.

14) Examen de los eluidos. Peterson, E. A. (11).

La resolución cromatográfica de cualquier mezcla depende de la perfección de la recolección y del examen del poder resolvente del sistema columna-buffer empleado.

En los procedimientos de fraccionamiento principalmente cuando se emplean para el enriquecimiento preliminar de una enzima cruda, la colección de fracciones grandes puede justificarse aunque se pierde algo de resolución en tales casos.

Por otra parte los procedimientos cromatográficos ideados para proveer un alto poder de resolución requieren la recolección de efluente en muchas fracciones pequeñas, el análisis de éstas para proteínas, actividad enzimática, etc., deben ser acompañadas por métodos elegidos en base de economía de muestra y reactivo.

La medida más conveniente y menos destructiva del contenido proteico de una solución es la determinación espectrofotométrica a 280 mμ, sin embargo esto se puede usar solo para una determinación semicuantitativa de los picos de proteína en el cromatograma porque los coeficientes de extinción de las proteínas a esa longitud de onda varían ampliamente dependiendo de su contenido en grupos aromáticos. Un análisis cuantitativo por este método requiere conocimiento de estos coeficientes para todos los componentes, así como una completa separación y es impracticable en un cromatograma complejo.

Más aún las proteínas con un contenido extremadamente bajo en residuos de aminoácidos aromáticos pueden escapar a la detección. Sin embargo, la absorbancia a 280 m μ es el método más usado.

Los análisis químicos de proteínas por métodos del Biuret, Lowry, Folin, etc. dependen de la cantidad de muestra que se tenga. La modificación del método Folin por Lowry tiene la ventaja de ser 10 a 20 veces más sensible que la absorción a 280 m μ .

15) Concentración de las fracciones

Las fracciones pueden ser concentradas convenientemente por preevaporación a través de bolsas de celofán de 1/2 de pulgada montadas en una cámara de vacío de modo que haga una diferencia de presión entre el interior de la bolsa abierta al exterior y el espacio vacío que rodea la misma.

Se puede adoptar para estos fines un desecador pequeño que soporte una serie de unidades. Cuando se emplea liofilización o preevaporación se forman pequeñas cantidades de proteínas insolubles y la concentración de la sal no aumenta mucho.

Aplicaciones de la Cromatografía en Columna

Es una técnica de aislamiento de componentes puros de mezclas complejas y su uso se ha generalizado en los laboratorios ya sea para separar fracciones del suero, de extractos tisulares, de antígenos de transplante, de enzimas, de fragmentos bacterianos, de virus, hongos, etc. Porter R. (13).

En el caso que utilizemos la filtración en gel con Sephadex G-200 con un suero total y representando el Volumen de elu-

ción en función de la Densidad Óptica a 280 m μ , obtendremos cuatro picos a saber: el primero constituido por macroglobulinas: α^2 M, IgM y Lipoproteínas. El segundo pico comprende IgG, IgA, transferrina, ceruloplasmina, etc. El tercer pico tiene albúmina, haptoglobina, glicoproteína. El cuarto pico formado por prealbúmina.

Si utilizamos resinas de Intercambio iónico Sela M. y col. (14) obtendremos mayor cantidad de picos pero debemos hacer uso de un gradiente de pH y concentración de sal para la desadsorción.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BOVEY, F. A. and YANAR, S. S. in BOYER, P. D. and MIRBACK (editors). *The Enzymes* vol. 4, Academic Press, 1960, pág. 63.
2. CASSIDY, E.: *Technique of Organic Chemistry Adsorption and Chromatography*, Vol. V, pág. 208, 1951.
3. WEAVER, V. C. C.: *Chromatographic and Electrophoretic Techniques*, Vol. 1, Smith Ivor, pág. 747, 1969.
4. FAHEY, L.: *J. Clin. Inv.* 37: 272, 1958.
5. FLODIN, P.: *"Dextran Gels and their applications in gel filtration"*, Pharmacia AB, Uppsala, Sweden, 1962.
6. FLODIN, P.: *Commun. 5th International Congr. Biochem. Moscow 1961*, pág. 520.
7. CELOTTE, B.: and PORATH J. in HEFTMANN (editor). *"Chromatography"*, Reinhold Publishing Corporation, New York, pág. 343, 1967.
8. LEACH, A. A. and O'SHEA, P. C.: *J. of Chromatography*, 17: 245, 1965.
9. OH, H. Y. and SANDERS, E. B.: *Analytical Biochem.* 15: 232, 1966.
10. PETERSON, E. A. and SOBER, H. A.: in Colowick S. P. and Kaplan N. O. *Methods in Enzymology*, vol. 5, pág. 5, Academic Press, New York, 1962.
11. PETERSON, E. A.: *Fed. Proc.* 17: 116, 1959.
12. FORATH, J. and FLODIN, P.: *Nature*, 183: 1657, 1959.
13. PORTER, R. R., PUTNAM, F. W.: *The Plasma Proteins*, Vol. 1, pág. 241, Academic Press, 1960.
14. SELA, M.; GIVOL, D. and MOZES, E.: *Biochem. Biophys. Acta* 78: 649, 1963.
15. SEVIDAN, L. *La cromatografía*, editor Eudeba 1966, Argentina.
16. SOBER, H. A.; GUTTER, E. J.; WYCKOFF, M. and PETERSON, E. A.: *J. Am. Chem. Soc.* 78: 751, 1956.