

Cromatografía

Bibliografía:

- Técnicas instrumentales de análisis en Bioquímica. García-Segura JM, Gavilanes JG, Martínez del Pozo A, Montero F, Oñaderra M, Vivanco F., Ed Síntesis, Ciencias Químicas (1996).
- Physical Biochemistry: Applications to Biochemistry and Molecular Biology. David Freifelder, 2nd Edition, Editorial Freeman (1982).
- Técnicas Instrumentales en Bioquímica y Biología. Francisca Barcelo Mairata. Volumen 105 Colección de Materiales Didácticos de la Universidad de las Islas Baleares (2003).

Recursos web:

<http://biomodel.uah.es/biomodel-misc/anim/inicio.htm>

<http://www.biology.ualberta.ca/facilities/multimedia/?Page=333>

Introducción

Bajo la denominación de cromatografía, se engloban aquellos procesos en los que los componentes de una mezcla, disueltos en una *fase móvil*, se van desplazando con diferente velocidad a través de una *fase estacionaria*.

Clasificación:

Según el estado de las fases estacionaria y móvil:

Cromatografía líquido-líquido (CLL)

Cromatografía líquido-sólido (CLS)

Cromatografía gas-líquido (CG)

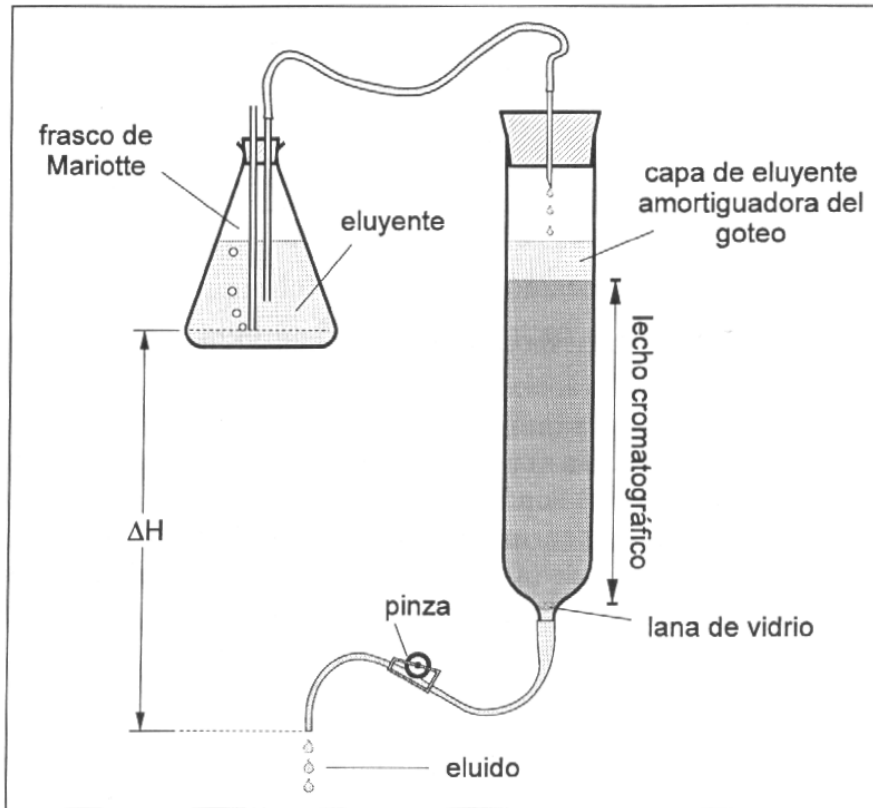
Según sea la causa por la cual los solutos resultan retrasados en su avance:

CUADRO 6.1
Tipos de Cromatografías

	Clase de Reparto/Interacción	Tipo de cromatografía	Fase Estacionaria	Subtipo
Reparto	Solubilidad	REPARTO	Polar Apolar	FASE NORMAL FASE INVERSA
	Tamaño	PENETRABILIDAD		
Interacción	Electrostática	INTERCAMBIO IÓNICO	Aniónica Catiónica	DE CATIONES DE ANIONES
	Hidrofóbica	INTERACCIÓN HIDROFÓBICA		
	Afinidad Biológica	AFINIDAD		
	Inespecífica	ADSORCIÓN		ej.: Cromat. sobre Hidroxiapatito o Cromat. sobre colorantes inmovilizados

A su vez, las diferentes cromatografías se pueden desarrollar en superficies planas (cromatografía en papel y TLC) o en columna.

Cromatografía en columna



Los pasos a seguir para realizar una cromatografía en columna son:

- hinchado (si es un gel)
- lavado
- empaquetado
- lavado
- equilibrado. Unas 5 veces el volumen total del lecho cromatográfico
- aplicación de la muestra
- elución
- regeneración

<http://www.youtube.com/watch?v=HGGT5Mo-wPI>

Conceptos:

Tiempo de retención, t_R , tiempo al que sale el soluto desde la aplicación de la muestra

Volumen de elución, V_e , volumen al que sale el soluto desde la aplicación de la muestra

Volumen de exclusión o volumen muerto, V_0, V_M , volumen del lecho, no ocupado por la fase estacionaria

Volumen de lecho (“bead volume”), volumen de la fase estacionaria más el líquido que contiene (V_M)

Selectividad de la columna

Eficiencia de la columna

Factores termodinámicos

k o **factor de capacidad**, que se define como:

$$k = \frac{t_R - t_M}{t_M}$$

donde t_R es el tiempo de retención del soluto, y t_M el tiempo de salida de la columna de un soluto que no quede retenido (equivale a V_M).

Teniendo en cuenta la relación entre tiempo y volumen:

$$V = F \cdot t$$

donde F es el flujo de la fase móvil (ml/min), se deduce que:

$$V_R = V_M (1+k)$$

Para dos solutos distintos, convendrá unos V_R lo más diferentes posibles. Esta diferencia dependerá de la que haya entre los factores de capacidad de los solutos.

$V_{R2} - V_{R1} = V_M(k_2 - k_1)$. Un intervalo bueno para separar sería con k comprendidas entre 1 y 10, que equivale a V de elución entre $2V_0$ y $11V_0$.

Por ello, se define un **factor de separación o selectividad, α** :

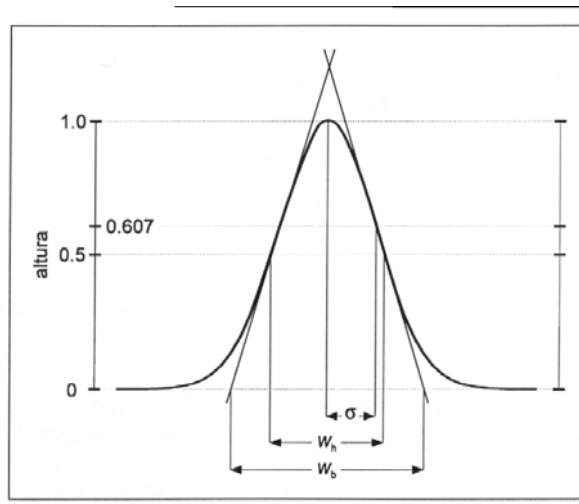
$$\alpha = k_2/k_1 \text{ (entre 1 y 2 normalmente)}$$

Factores cinéticos

La anchura de un pico cromatográfico se define por el parámetro w_h , o **anchura a mitad de altura**.

La anchura de las mismas está relacionada con la desviación estándar de la curva según:

$$w_h = 2.354 \cdot \sigma \quad \text{para picos gaussianos}$$



La **resolución** de dos picos cromatográficos se define como:

$$R_s = \frac{t_{R2} - t_{R1}}{\frac{1}{2}(w_{b2} + w_{b1})}$$

Una resolución de 1.5 ya es buena.

Donde w_b es la **anchura de los picos en su base**, y equivale a:

$$w_b = 4 \sigma \text{ para picos gaussianos}$$

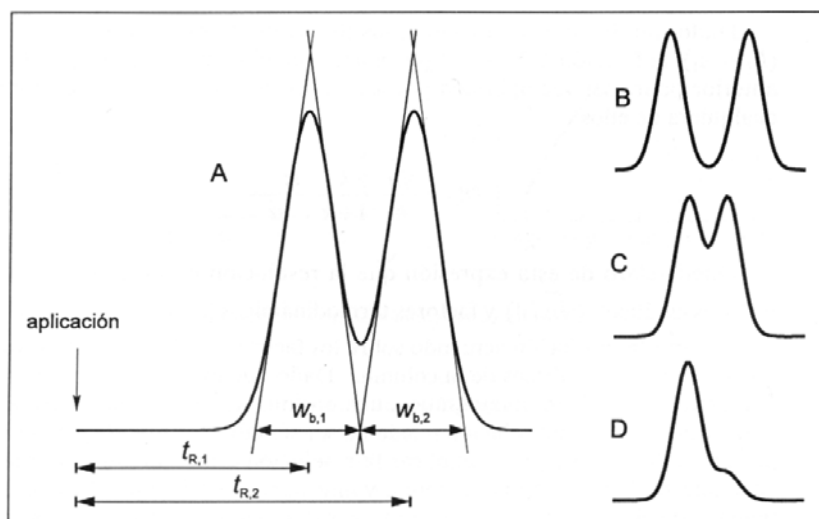


FIGURA 6.7. Resolución cromatográfica. (Parte A), perfil correspondiente a una resolución de 1,0, para dos solutos a la misma concentración; se especifican los parámetros cromatográficos que se emplean en el cálculo de R_s , según la expresión (6.16). (Parte B, C), se representan los perfiles correspondientes a R_s de 1,5 y 0,75, respectivamente, para la misma mezcla de solutos anterior. (Parte D), corresponde a una resolución de 0,75 para una mezcla en la que del soluto de mayor t_R hay sólo la cuarta parte que del soluto de menor t_R .

La resolución depende de factores cinéticos (las anchuras de los picos), y termodinámicos (los tiempos de retención).

Se ha demostrado que lo mejor es trabajar con sistemas cromatográficos que proporcionen valores de k comprendidos entre 1 y 10, lo que supone trabajar con intervalos de volumen de $2 \cdot V_M$ hasta $11 \cdot V_M$. Para ello hemos de elegir la fase móvil y estacionaria adecuadas.

Variar la longitud de la columna también mejora la resolución, pero hemos de aumentar mucho la longitud para mejorar poco la resolución.

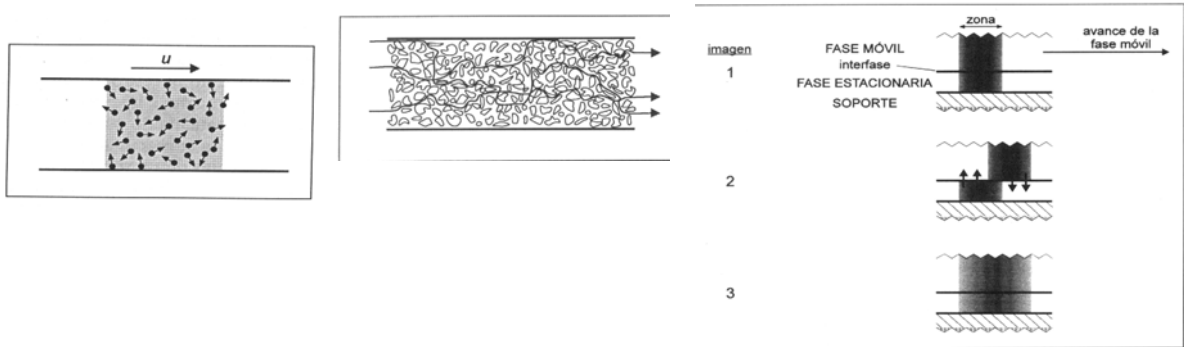
En cualquier caso es muy importante para tener buena resolución empaquetar bien el lecho cromatográfico y que éste esté formado por partículas pequeñas y homogéneas.

Migración cromatográfica: conceptos cinéticos

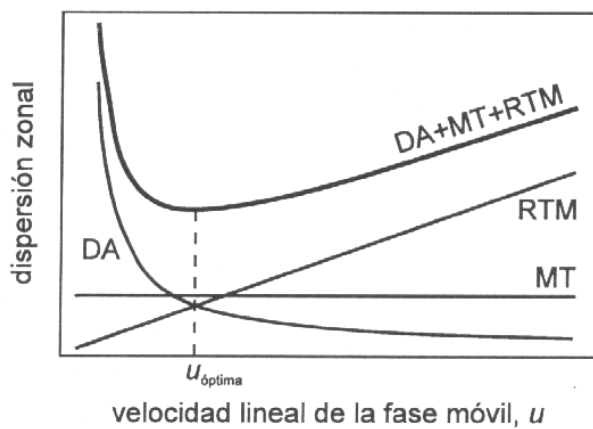
Difusión axial

Multiplicidad de trayectos

Resistencia a la transferencia de masa



La dependencia de los tres factores antes comentados con el flujo de la fase móvil se resume en el siguiente gráfico:

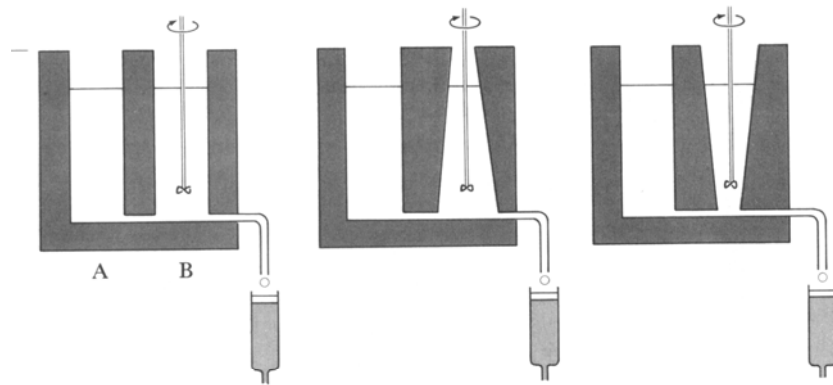


Elución

Elución isocrática

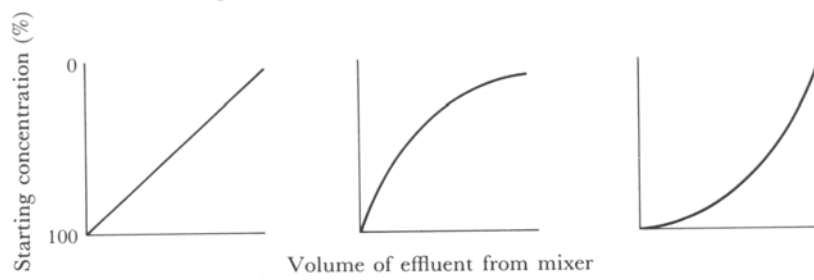
Elución escalonada o por pasos

Elución en gradiente



A = Added solvent in reservoir

B = Starting concentration in mixing chamber



Soportes

La forma de las partículas se describe por el término “beaded” y el tamaño por “mesh size”. Los fabricantes recomiendan determinados tamaños para las diferentes aplicaciones:

- 50-100 mesh: Flujos altos en aplicaciones preparativas
- 100-200 mesh: materiales estándar para trabajos analíticos
- 200-400 mesh: alta resolución en trabajos analíticos
- >400 mesh: para muy alta resolución y HPLC

Geles:

Dextrano: es un polisacárido de glucosa, producido por la fermentación de sacarosa por el microorganismo *Leuconostoc mesentero* Sephadex (Pharmacia Fine Chemicals, Inc.). Estos geles no valen para moléculas de más de 6×10^5 de peso molecular y entonces se puede usar Sephacryl, que es una variante del anterior.

Agarosa: es un polímero lineal de galactosa y anhidrogallactosa, que gelifica al enfriarse Sepharose. (DNA, y grandes proteínas)

Poliacrilamida se preparan por entrecruzamiento de acrilamida y bisacrilamida,. Se usan como alternativa al dextrano y el más conocido es el Bio-gel P (Bio-Rad Laboratories).

Sephadex metilado, dextranos derivados con hidroxipropil (Sephadex LH), etc.

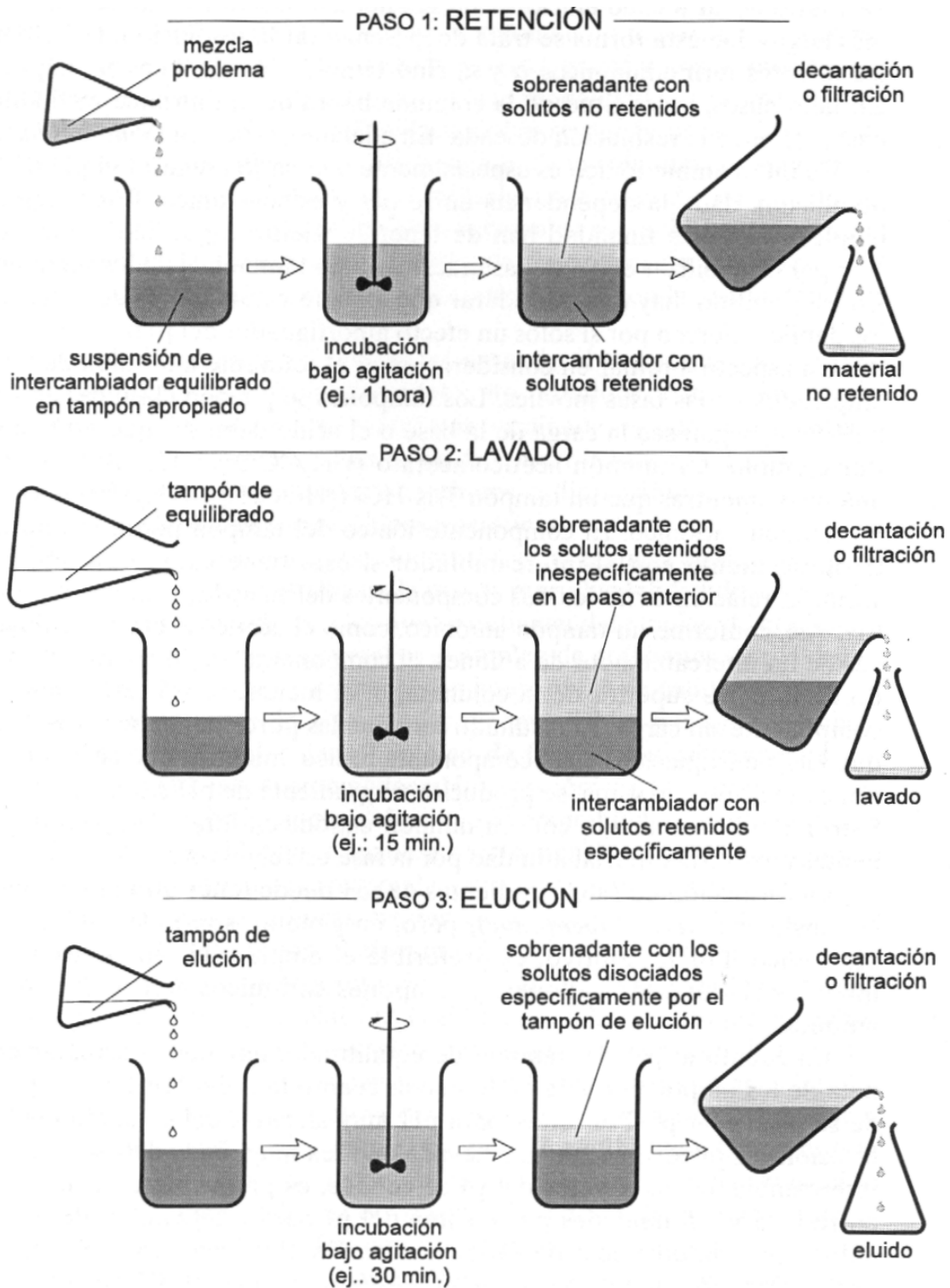
Capacidad del gel: máximo número de gramos de una molécula en particular que puede penetrar en los poros de una determinada cantidad de gel. Las moléculas en exceso pasarán con el volumen de exclusión. Este factor, limitará la cantidad de muestra que podemos pasar por el gel.

Materials Commonly Used in Gel Chromatography.

Material and trade name	Fractionation range* (molecular weight)
<i>Dextran</i>	
Sephadex G-10	0–700
Sephadex G-25	1000–5000
Sephadex G-50	1500–30,000
Sephadex G-75	3000–70,000
Sephadex G-100	4000–150,000
Sephadex G-150	5000–300,000
Sephadex G-200	5000–800,000
<i>Polyacrylamide</i>	
Bio-gel P-2	100–1800
Bio-gel P-6	1000–6000
Bio-gel P-60	3000–60,000
Bio-gel P-150	15,000–150,000
Bio-gel P-300	60,000–400,000
<i>Agarose</i>	
Sepharose 2B	2×10^6 – 25×10^6
Sepharose 4B	3×10^5 – 3×10^6
Sepharose 6B	10^4 – 20×10^6
Bio-gel A-0.5 M	10,000–500,000
Bio-gel A-15 M	40,000– 15×10^6
Bio-gel A-150 M	1×10^6 – 150×10^6

* The molecular weights listed are for globular proteins when the molecular weight is less than 10^6 and for viruses and large protein aggregates for higher molecular weights. The upper limits actually depend on the excluded volume rather than on the molecular weight so that for fibrous proteins the upper limits are smaller. For double-stranded DNA, the upper limit is about $\frac{1}{2}$ the value indicated; for single-stranded nucleic acids, the limits are approximately those given.

Operación por tandas o “batch operation”



Cromatografía de reparto

Se basa en que, si dos fases están en contacto y una contiene un soluto, éste se distribuirá entre las dos fases, con un coeficiente de partición, que es la relación entre las concentraciones del soluto en las dos fases una vez alcanzado el equilibrio

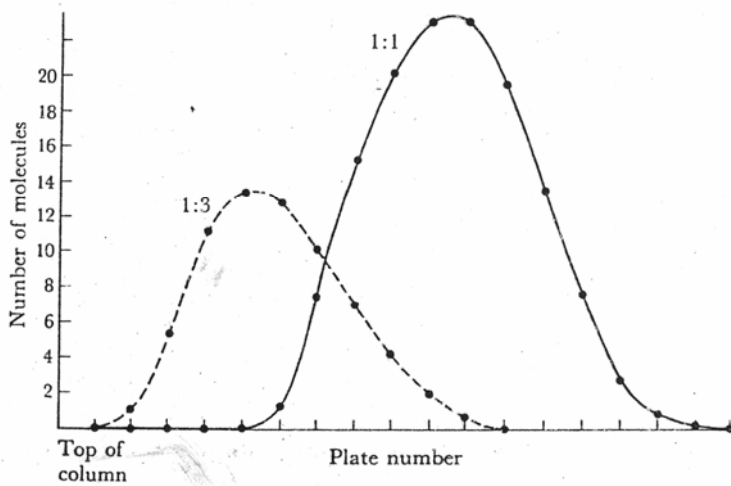
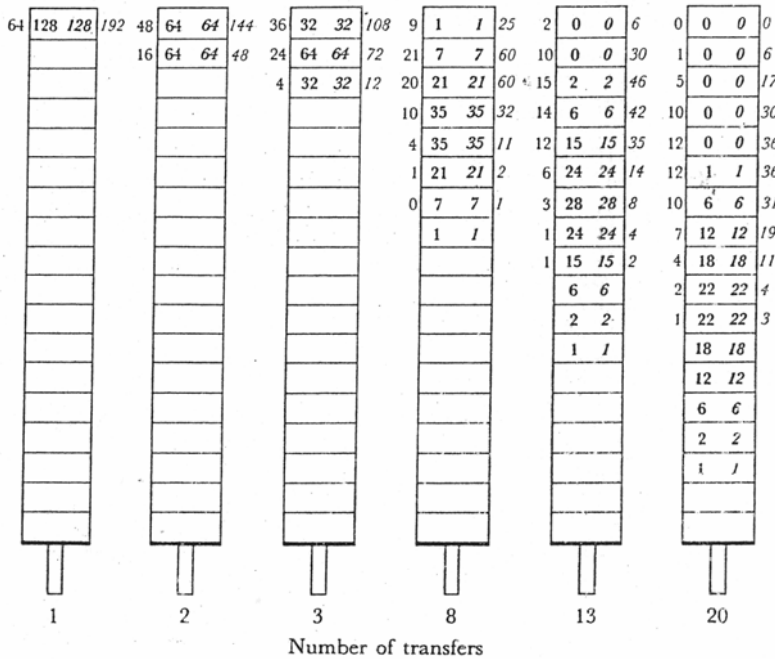


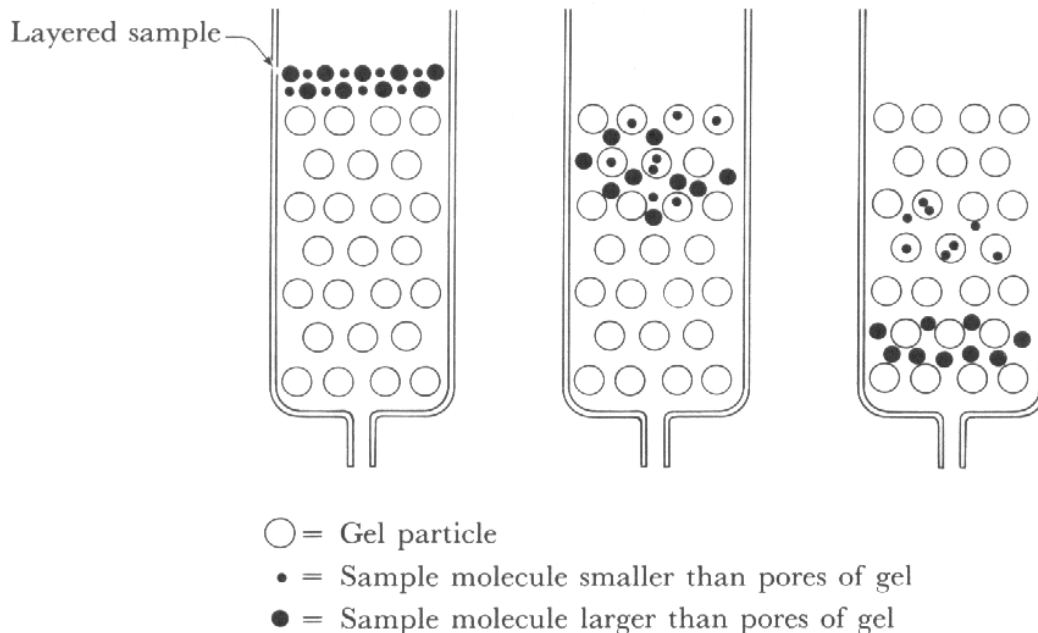
Figure 8-1

Principle of operation of a column in which separation is based on partition. The column has arbitrarily been divided into eighteen theoretical plates. Five hundred twelve molecules are loaded onto the column. Two hundred fifty-six of these (bold type) distribute equally between mobile phase (roman type) and stationary phase (italic); they are the 1:1 class. The 1:3 class (light type) distribute so that 25% are in the mobile phase and 75% in the stationary phase. A transfer means that all molecules in the mobile phase advance to the next plate. Following each transfer the number of molecules of each class redistributes according to the 1:1 or 1:3 rule. The graph shows the distribution of each after twenty transfers. Note that the 1:3 class moves more slowly through the column.

Cromatografía de penetrabilidad

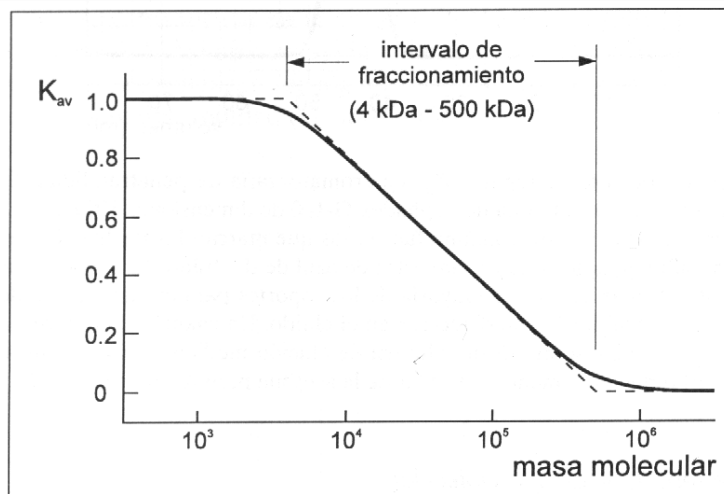
También se la conoce como cromatografía de filtración en gel, cromatografía de permeación en gel, cromatografía de tamizado molecular y cromatografía de exclusión por tamaño.

http://www.youtube.com/watch?feature=player_embedded&v=oV5VB5kO3tQ



El parámetro importante en este caso es el **diámetro hidrodinámico del soluto**, que depende de la forma y tamaño del mismo, y que determina cuándo eluirá el soluto.

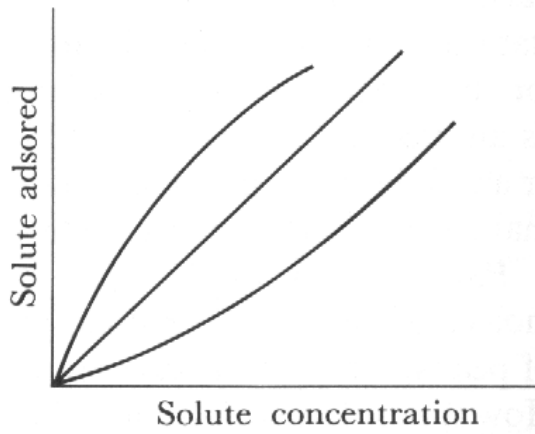
Intervalo de fraccionamiento del gel: intervalo de pesos moleculares que el gel es capaz de resolver



Materiales: dextrano, para separar DNA, agarosa y poliacrilamida para solutos hidrofílicos, poliestireno para solventes orgánicos no polares, y para solventes orgánicos polares sephadex metilado. Derivado de dextrano con hidroxipropilo (Sephadex LH se puede usar con solventes polares y no polares para separar lípidos, ácidos grasos y esteroides.

Cromatografía de adsorción

Isoterma de adsorción, característica de la molécula y el sorbente



Los adsorbentes más utilizados son:

Table 8-1
Common Materials Used in Adsorption Chromatography.

Material	Substances separated
Alumina	Small organic molecules, proteins
Silica gel	Sterols, amino acids
Activated carbon	Peptides, amino acids, carbohydrates
Calcium phosphate gel	Proteins, polynucleotides
Hydroxyapatite	Nucleic acids

Cromatografía de intercambio iónico

En este tipo de cromatografía, la fase estacionaria tiene grupos cargados que interaccionan electrostáticamente con iones de signo contrario de la fase móvil.

Matrices: polímeros sintéticos, también llamadas **resinas**, y matrices basadas en **polímeros naturales**.

Resinas: poliestireno entrecruzado con divinilbenzeno.

Aplicaciones: pequeñas moléculas, como aminoácidos, oligonucleótidos, péptidos pequeños

Polímeros naturales: agarosa, celulosa y dextrano.

Aplicaciones: purificación de biopolímeros, debido a su elevada hidrofilia.

Hay dos tipos de cromatografía de este tipo: **aniónica** y **catiónica**.

Intercambiador aniónico: carga positiva, por lo que intercambia aniones

Intercambiador catiónico: carga negativa, por lo que intercambia cationes

La carga de los grupos anclados a la fase estacionaria dependerá del carácter ácido o básico de los mismos, pudiendo ser asimismo **fuertes** o **débiles**. Los primeros pueden manejarse en un amplio intervalo de pH (2-12), mientras que para los segundos el intervalo está restringido a 5.5-12 para los intercambiadores de cationes y 2-8.5 para los de aniones.

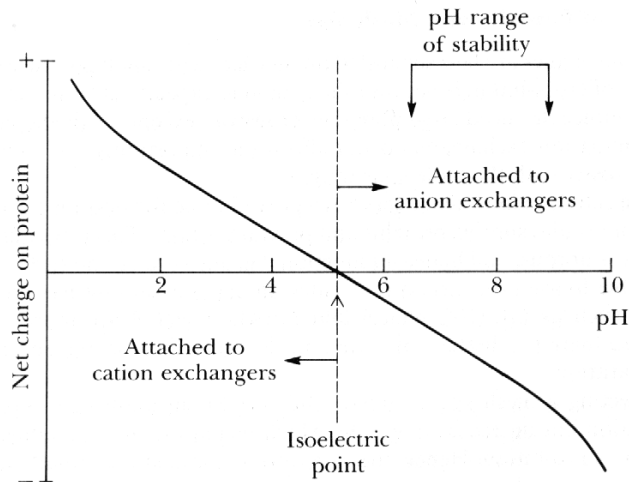
Properties of Various Ion Exchangers.

Matrix	Exchanger*	Functional group	Trade name
Dextran	SC	Sulfopropyl	SP-Sephadex
	WC	Carboxymethyl	CM-Sephadex
	SA	Diethyl-(2-hydroxypropyl)-aminoethyl	QAE-Sephadex
	WA	Diethylaminoethyl	DEAE-Sephadex
Cellulose	C	Carboxymethyl	CM-cellulose
	C	Phospho	P-cel
	A	Diethylaminoethyl	DEAE-cellulose
	A	Polyethyleneimine	PEI-cellulose
	A	Benzoylated-naphthoylated, diethylaminoethyl	DEAE(BND)-cellulose
	A	<i>p</i> -Aminobenzyl	PAB-cellulose
Styrene-divinylbenzene	SC	Sulfonic acid	AG 50
	SA	Tetramethylammonium	AG 1
	SC } + SA†	Both of the above	AG 501
Acrylic	WC	Carboxylic	Bio-Rex 70
Phenolic	SC	Sulfonic acid	Bio-Rex 40
Epoxyamine	WA	Tertiary amino	AG-3

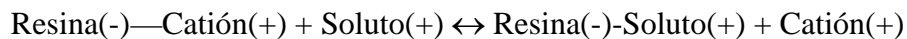
* C, cationic; A, anionic; S, strong; W, weak.

† Mixed-bed resin.

La separación de biopolímeros es compleja puesto que suelen tener muchas cargas, tanto positivas como negativas, que les hacen comportarse como cationes o como aniones, dependiendo de que el pH del medio sea inferior o superior a su pI respectivamente.



El **equilibrio** que se establece entre la resina y el soluto viene definida por:



Las **afinidades** vienen determinadas por la carga del ion, **su radio de solvatación y su polarizabilidad**.

Variando el pH del medio y, por tanto, alterando la carga, modificamos el equilibrio, haciendo que quede retenido o no un soluto determinado

Por tanto, el **pH** y **la fuerza iónica** de los eluyentes son las variables experimentales a controlar.

<http://www.youtube.com/watch?v=q3fMqgT1do8&feature=relmfu>

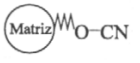

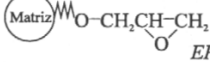
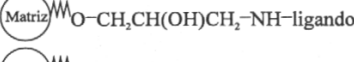
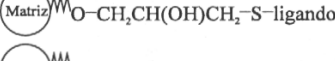
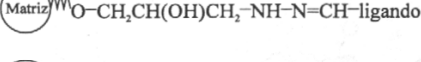
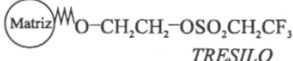
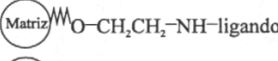

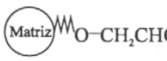
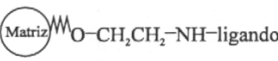
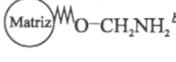
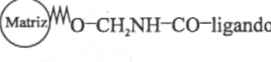
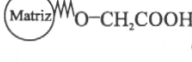
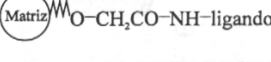
Cromatografía de afinidad

Está basada en la unión bioespecífica de los solutos con grupos anclados covalentemente a la matriz cromatográfica. En algunos casos lo que se retiene son los solutos no deseados.

Matrices: polímeros hidrofílicos sin carga, inertes, con rigidez mecánica y estables (agarosa)

Activación: con o sin brazo espaciador

Grupos de activación y ligandos en cromatografía de afinidad

MATRIZ CROMATOGRÁFICA ^a Grupos de Activación o Funcionalización	Grupo reactivo	LIGANDO	FASE ESTACIONARIA RESULTANTE
 <i>CIANO</i>	NH ₂	Proteínas, péptidos aminas	
 <i>EPOXI</i>	NH ₂	Proteínas, péptidos aminas	
	SH	Tioles	
	CHO ^c	Hidratos de carbono, glicoproteínas	
 <i>TRESILO</i>	NH ₂	Proteínas, péptidos aminas	
	SH	Tioles	
 <i>FORMILO</i>	NH ₂	Proteínas, péptidos aminas	
 <i>AMINO</i>	COOH	Ácidos, proteínas	
 <i>CARBOXILO</i>	NH ₂	Aminoácidos, aminas, proteínas	

^a , brazo espaciador opcional.

^b Requiere el empleo de carbodiimidas.

^c Requiere una reacción previa con hidrazina.

Lavado: se elimina el exceso de ligando y reactivos por decantación o filtración del sobrenadante más lavado con tampón

Bloqueo: aminas o ácidos en concentraciones de 0.1-1M

Aplicación de la muestra: alta fuerza iónica; condiciones que favorezcan la unión

Elución específica, en la que algún agente compite con el soluto por unirse al ligando anclado, o **inespecíficas,** mediante la variación de alguna característica del eluyente (pH, fuerza iónica, etc.)

CUADRO 6.6
Ligandos para cromatografía de afinidad específica de grupo

Ligando	Aplicación
2',5'-ADP	Deshidrogenasas dependientes de NADP ⁺
5'-AMP	Deshidrogenasas dependientes de NAD ⁺
Arginina	Serín-proteasas
Benzamidina	Serín-proteasas
Calmodulina	Quinasas, proteínas dependientes de calmodulina
Concanavalina A (ConA)	Glicoproteínas, polisacáridos
DNA	DNA y RNA polimerasas, DNasas
Gelatina	Fibronectina
Heparina	Factores de coagulación, lipoproteínas, enzimas específicas de DNA y RNA
Lectinas	Glicoproteínas, polisacáridos
Lisina	Plasminógeno, rRNA
Proteína A	Anticuerpos (IgG)
Proteína G	Anticuerpos (IgG)
Poli-(U)	Poli-(A), mRNA
Poli-(A)	Poli-(U)

Cromatografía de afinidad sobre metales inmovilizados

Interacción entre la fase estacionaria y proteínas capaces de formar compuestos de coordinación con metales de transición (ej. Cu²⁺, Zn²⁺, Ni²⁺, Co²⁺). Son las cadenas laterales de histidina, cisteína y triptófano, las principales responsables de esta interacción

Matrices: matrices con ácido iminodiacético (IDA) o el nitrilotriacético (NTA)

Carga de la matriz: tampón con el catión de interés a pH neutro y elevada fuerza iónica.

Elución: específica (imidazol, histamina o glicocola) con gradiente o sin él, o inespecífica (gradiente de pH).

Aplicaciones: proteínas recombinantes con colas de histidina

Cromatografía de afinidad por unión covalente

Unión covalente entre el soluto y la fase estacionaria, mediante puentes disulfuro, siendo por tanto un proceso reversible.

Fase estacionaria: matriz con grupo tiopropilo o glutatión

Elución: condiciones reductoras suaves (DTT, 2-mercaptoetanol 5-20 mM)

Aplicaciones: proteínas con grupos SH, y otros compuestos tiólicos, proteínas de fusión con GST

Cromatografía de afinidad a células

Interacción entre la superficie celular y la fase estacionaria

Fase estacionaria: matrices cromatográficas de poro grande con ligandos unidos, capaces de interactuar con receptores de membrana, o con glicoproteínas de membrana (ej. ConA), o con anticuerpos unidos a la superficie celular (ej. Proteína A).

Condiciones: compatibilidad con la viabilidad celular.

Elución: específicas para no alterar la viabilidad celular

Cromatografía hidrofóbica

Como su nombre indica, en esta cromatografía se aprovechan las interacciones hidrofóbicas entre los solutos y la fase estacionaria. Se trata de interacciones superficiales con lo que en el caso de los biopolímeros, implicaría sólo a los residuos apolares que queden en su superficie

Matrices: polímeros hidrofílicos (agarosa, polímeros acrílicos), con grupos metilo, butilo o fenilo.

Condiciones: alta fuerza iónica, (NaCl 4M o $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2 M) y pH neutro.

Elución: gradientes de fuerza iónica decreciente o de pH, en el sentido de aumentar la carga de los solutos, haciéndolos más hidrofílicos. Disminuir la temperatura.

Aplicación: purificación de proteínas

Cromatografía sobre hidroxipatito

Forma cristalina de fosfato cálcico, que funciona por intercambio iónico de los grupos Ca^{2+} y $(\text{PO}_4)^{3-}$. Posiblemente también se formen compuestos de coordinación con el Ca^{2+} , e incluso restricciones estéricas, aunque se cataloga como cromatografía de adsorción.

Equilibrado: tampón fosfato (negativo) para proteínas básicas, de NaCl para las neutras y de MgCl_2 ó CaCl_2 (positivo) para las ácidas.

Elución: aumentando la fuerza iónica, o cambiando la carga de la columna adicionando iones Ca^{2+} o Mg^{2+} con los mismos tampones de equilibrado pero usados de forma inversa. El de fosfato se usa para el DNA, pues compite con los grupos fosfato del mismo.

Aplicación: Purificación de anticuerpos monoclonales y la separación de diferentes formas de DNA

Cromatografía sobre colorantes inmovilizados

Estos colorantes son capaces de retener algunas proteínas de forma bastante específica, aunque se considera una cromatografía de adsorción

CUADRO 6.9
Colorantes empleados en cromatografía

Colorante	Aplicación
Cibacron Blue F3G-A	Albúmina, enzimas dependientes de NAD^+
Procion Red HE-3B	Enzimas dependientes de NADP^+
Procion Yellow H-A	Lactato deshidrogenasa
Procion Green H-E4BD	Proteínas dependientes de CoA, deshidrogenasas
Procion Blue H-B	Proteínas que interaccionan con ácidos nucleicos, quinatas, deshidrogenasas

Equilibrado: pH neutro y baja fuerza iónica.

Elución: inespecífica, mediante la variación de la fuerza iónica o el pH, o bien de forma específica con algún ligando específico de la proteína de interés.

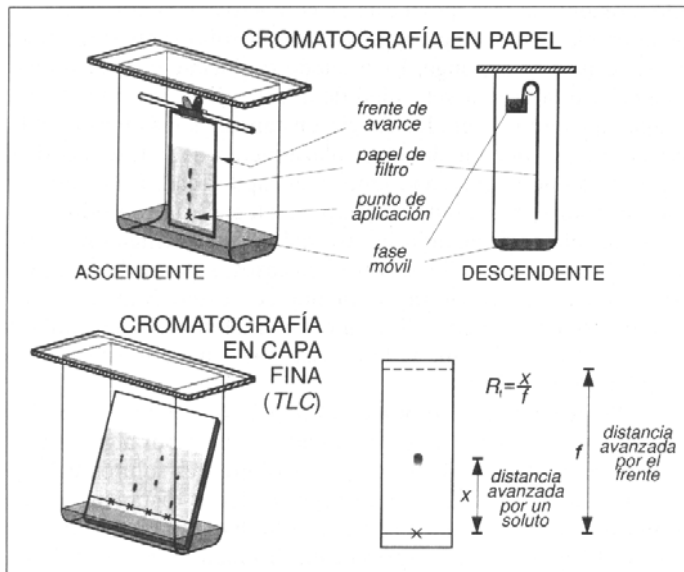
Cromatografía en capa fina (TLC)

Cromatografía de adsorción en superficie plana en la que la fase estacionaria es un sólido pulverizado sobre una plancha de vidrio, metal o plástico, por lo que la superficie específica (m^2/g) es muy elevada, mejorando así la resolución respecto a la cromatografía en papel.

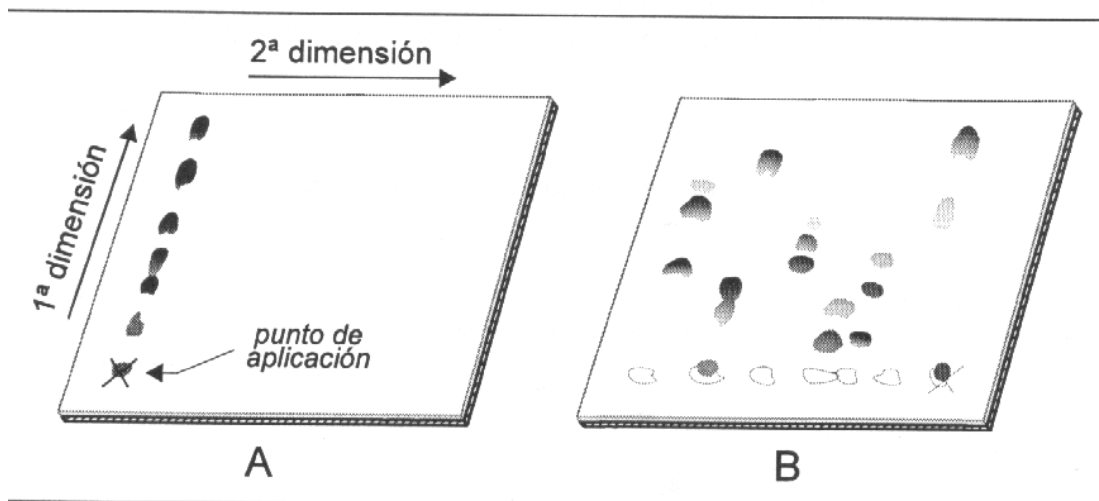
Fases Móviles: distintos solventes orgánicos de diferente polaridad

Fase estacionaria: celulosa, poliamida, alúmina o gel de sílice.

R_f = distancia avanzada por un soluto / distancia avanzada por el frente



Desarrollos bidimensionales



Detección de los solutos:

CUADRO 6.3
Métodos de Detección en Cromatografía de Capa Fina

Método	Aplicación	Color
<i>Inespecífico</i> Vapores de iodo Ác. sulfúrico conc. + calor	Compuestos orgánicos Compuestos orgánicos	Pardo-amarillento (reversible) Negro (carbonización)
<i>Específico</i> 2,4-dinitrofenilhidrazina AgNO ₃ /OH ⁻ Ácido iodoplátinico Verde de bromocresol Ninhidrina Rodamina 6G	Compuestos carbonílicos Compuestos carbonílicos Bases Ácidos Aminas primarias (aminoácidos) Aminas secundarias Lípidos	Naranja Marrón Púrpura-negro Verde-amarillento Azul-violáceo Marrón Fluorescencia amarillo-rosácea ($\lambda_{exc} = 366 \text{ nm}$)

Aplicaciones: aminoácidos, azúcares, oligosacáridos, lípidos, esteroides y otras pequeñas moléculas.

Cromatografía en papel

Cromatografía de reparto y de superficie plana en la que la fase estacionaria es el agua que queda retenida entre las fibras de celulosa del papel

Matriz: papel de filtro libre de contaminantes

Fase móvil: disolvente orgánico o mezcla de disolventes

Factor de retraso

Rf = distancia avanzada por un soluto / distancia avanzada por el frente