

Tema 1: Cromatografía

La terminología, definiciones y clasificaciones se basan en las recomendaciones de la IUPAC, disponibles en <http://www.merck.de/english/services/chromatographie/iupac/chrnom.htm>

Hay **material adicional** en la página web de la asignatura (se accede desde la página del Departamento: <http://www.uah.es/otrosweb/bioquimica>)

Definición:

La **cromatografía** es un método físico de separación en el que los componentes que se han de separar se distribuyen entre dos fases, una de las cuales está en reposo (**fase estacionaria, F.E.**) mientras que la otra (**fase móvil, F.M.**) se mueve en una dirección definida.

Otras definiciones (en la web): cromatograma, cromatografiar, cromatógrafo, fase ligada, fase inmovilizada, eluir, efluente, muestra, componentes de la muestra, soluto, disolvente, zona.

Otros términos: columna, lecho cromatográfico, empaquetamiento.

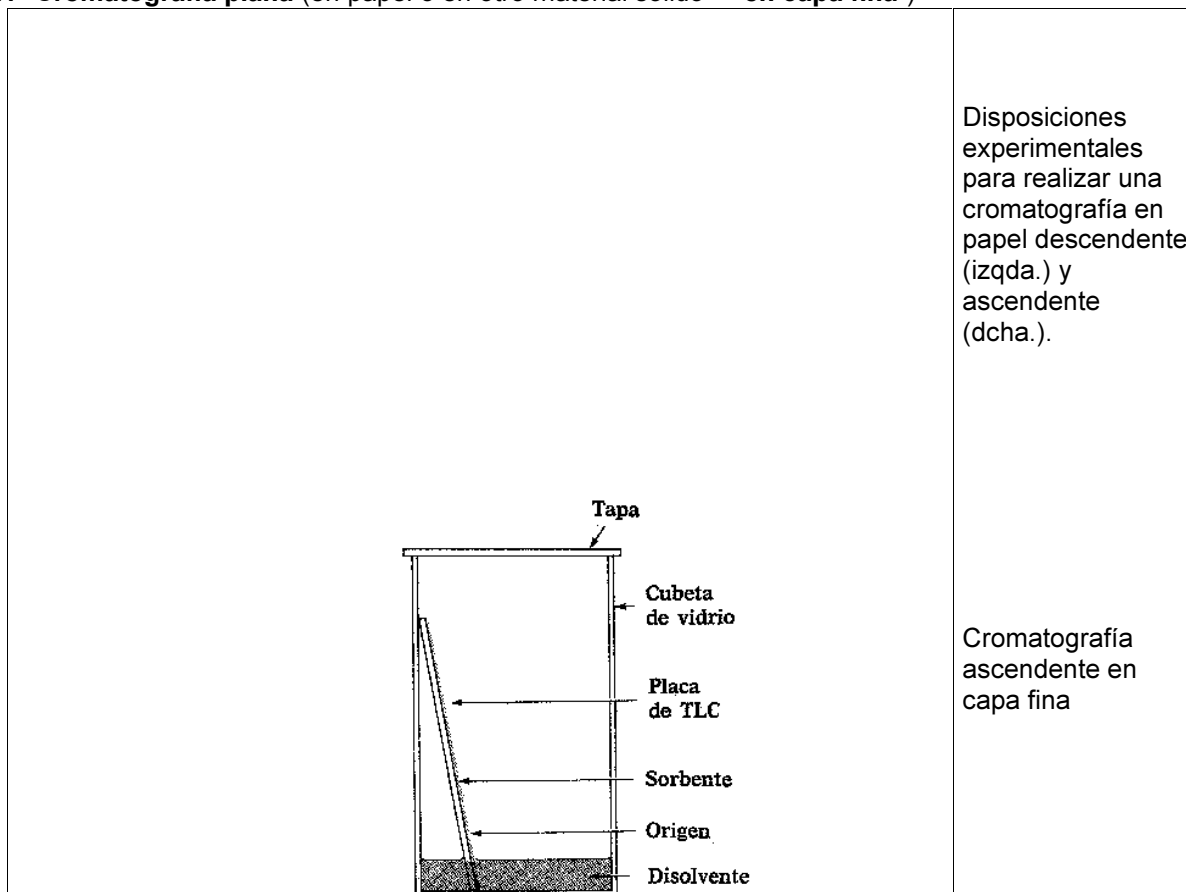
✦ Material en web: Definiciones y clasificación.

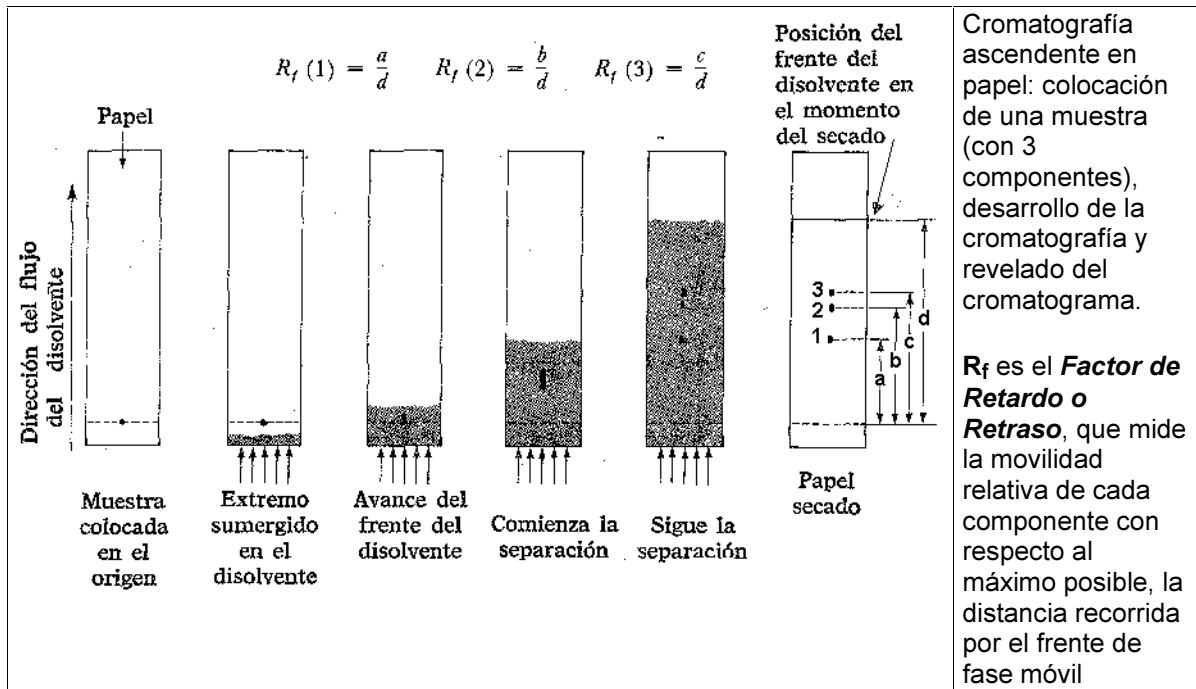
Hay 3 métodos principales de cromatografía: frontal, de desplazamiento y de elución. Sólo consideraremos este último, que es el más habitual, al menos en Bioquímica y Biología Molecular.

Clasificación de las técnicas cromatográficas:

1. De acuerdo con la forma del lecho cromatográfico:

1.1 Cromatografía plana (en papel o en otro material sólido = "en capa fina")





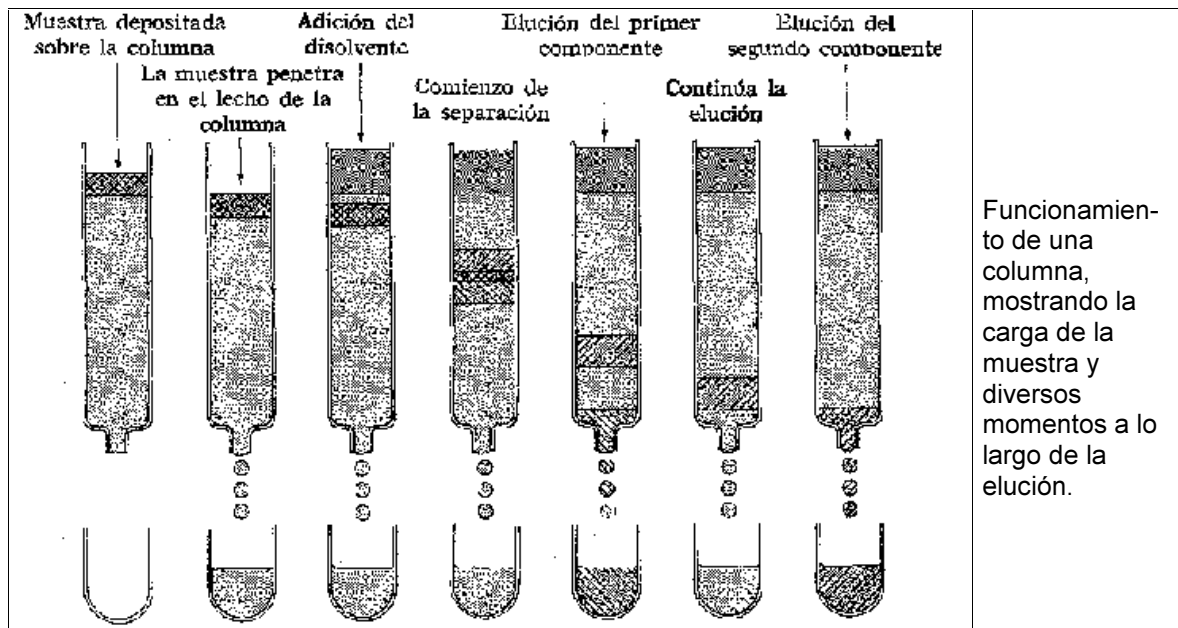
1.2 Cromatografía en columna

F.M. líquida, F.E. sólida: columnas de varios mm diámetro y varios cm longitud.

F.M. gas, F.E. sólida: columnas de unos 5 mm diámetro y 1-20 m longitud.

F.M. gas, F.E. líquida: columnas "capilares", menor diámetro y 30-100 m (incluso más) de longitud.

Material en web: Animación del avance de las moléculas por la columna.



2. De acuerdo con el estado físico de las fases:

2.1 **Cromatografía de gases** (fase móvil gaseosa) { Cromatografía gas-líquido
Cromatografía gas-sólido

2.2 **Cromatografía líquida** (fase móvil líquida) { Cromatografía líquido-líquido
Cromatografía líquido-sólido

2.2.1 **HPLC = Cromatografía líquida de alta presión o de alta eficacia** (cuando se emplean partículas de fase estacionaria muy pequeñas y una presión de entrada relativamente alta)

3. De acuerdo con el mecanismo de separación:

3.1 Cromatografía de adsorción (¡ojo! aDsorción, no aBsorción)

Diferente afinidad de adsorción de los componentes de la muestra sobre la superficie de un sólido activo. La adsorción es la capacidad de las superficies para fijar moléculas.

La F.E. es siempre sólida. Ejemplos: alúmina, gel de sílice, carbón activo, fosfato cálcico, hidroxiapatito...

3.2 Cromatografía de reparto

Diferente solubilidad de los componentes de la muestra en la fase estacionaria (caso de la cromatografía de gases), o diferentes solubilidades de los componentes en las fases móvil y estacionaria (caso de la cromatografía líquida).

La F.E. es siempre líquida.

Ejemplos: en cromatografía plana, la F.E. es el agua o disolvente asociados a la celulosa (papel) o al soporte sólido que forma la capa fina; en columna, como F.E. se usan tierra de diatomeas, gel de sílice, celulosa en polvo...

🌟 Material en web: Animación (Amersham-Pharmacia)

3.3 Cromatografía de intercambio iónico

Diferente afinidad para el intercambio de iones de los componentes de la muestra. ¿Qué significa intercambio de iones? La F.E. posee carga eléctrica y por ello interacciona con los componentes de la muestra que tienen carga opuesta.

- Intercambio aniónico: F.E. con carga positiva, une aniones, bien los del disolvente (F.M.) o bien los de la muestra (de ahí la palabra intercambio).
- Intercambio catiónico: F.E. con carga negativa, une cationes, bien los del disolvente (F.M.) o bien los de la muestra.

Ejemplos de grupos funcionales intercambiadores (unidos covalentemente a la F.E. sólida):

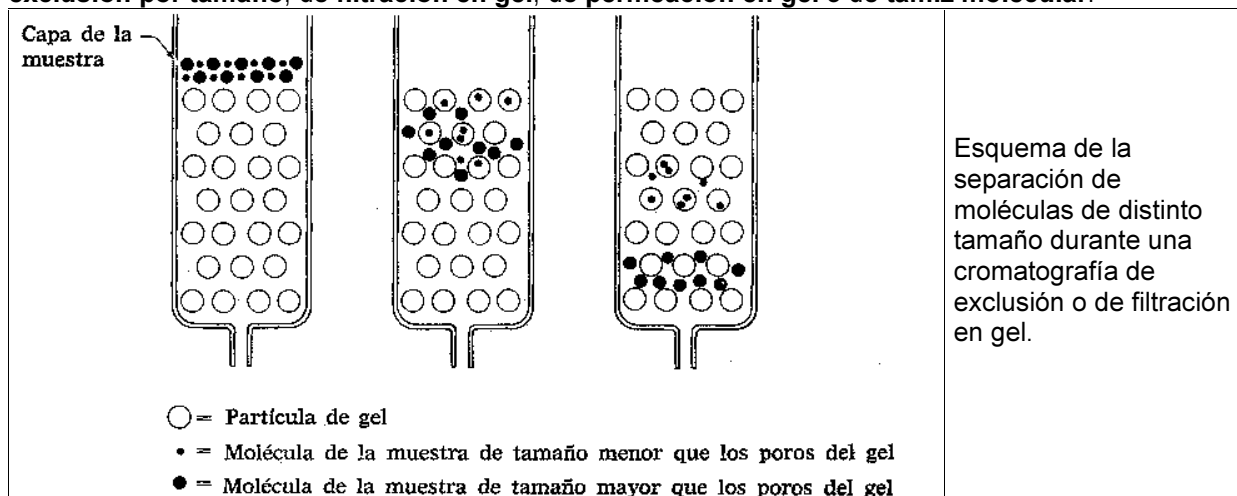
<i>intercambiadores catiónicos</i>	<i>intercambiadores aniónicos</i>
carboximetilo (CM)	dietilaminoetilo (DEAE)
sulfopropilo (SP)	dietil-(2-hidroxipropil)aminoetilo
fosforilo	polietilenimina
sulfonato	
carboxilato	

La F.E. suele llamarse "resina" (de intercambio iónico)

🌟 Material en web: Animación (Amersham-Pharmacia)

3.4 Cromatografía de exclusión

También se llama **de exclusión molecular**. Estrictamente, se basa en diferencias de tamaño, forma o carga entre las moléculas de los distintos componentes de la muestra, pero lo más habitual es aprovechar las diferencias de forma y tamaño. En este caso, se la llama también **cromatografía de exclusión por tamaño**, de **filtración en gel**, de **permeación en gel** o de **tamiz molecular**.



🌟 Material en web: 2 animaciones (una en Amersham-Pharmacia)

Ejemplos: para la separación de proteínas y polisacáridos se usan como F.E. polímeros lineales entrecruzados (es decir, que forman enlaces transversales). Los más comunes son dextranos (marca

comercial: *Sephadex*), agarosa (*Sepharosa* y *Biogel-A*) y poliacrilamida (*Biogel-P*). Estos materiales, en forma de pequeñas esferas, se expanden o hinchan al sumergirlos en disoluciones acuosas, generando un retículo o matriz tridimensional, con poros de tamaño definido

Aplicaciones:

- Para la purificación de una proteína (al igual que otras técnicas cromatográficas).
- Se puede establecer una correlación entre el tamaño molecular y la movilidad en la columna de exclusión, por lo que esta técnica se emplea para determinar masas moleculares.
- Para eliminar sustancias de pequeño tamaño molecular de una muestra proteica (p.ej., las sales inorgánicas en un "desalado" de la muestra, eliminación del exceso de reactivos tras tratar una proteína en el laboratorio, eliminación de inhibidores enzimáticos,...). El resultado es similar a una diálisis, pero más rápido.
- (más aplicaciones en Freifelder, 1991)

3.5 Cromatografía de afinidad

Variedad particular de cromatografía en la que la separación se basa en la especificidad biológica singular de interacción entre un componente de la muestra y otra molécula unida a la F.E.; los ejemplos más comunes son las interacciones enzima-sustrato, antígeno-anticuerpo y ligando-receptor.

F.E.: un soporte inerte (microesferas de vidrio o plástico, gel de agarosa, ...) al que se une covalentemente el ligando de afinidad. Ejemplos de este ligando: sustrato, inhibidor o cofactor de una enzima, anticuerpo, antígeno, hapteno, sustancia transportada, hormona, oligosacáridos, lectinas (proteínas con afinidad por oligosacáridos)...

✧ Material en web: 2 animaciones (una en Amersham-Pharmacia)

Nota: Ésta es una clasificación conceptual; en la práctica, el mecanismo que rige la separación puede ser mixto; p.ej., adsorción+reparto.

4. Algunas técnicas especiales:

4.1 Cromatografías de fase normal y de fase invertida

Fase normal: cuando la F.E. es más polar que la F.M.

Fase invertida: cuando es más polar la F.M.

[Nota: se suele ver el término "fase reversa", expresión incorrecta que debe evitarse (la normativa IUPAC indica que en inglés debe decirse *Reversed Phase* y no *Reverse Phase*).]

4.2 Análisis isocrático

La composición de la fase móvil permanece constante a lo largo del proceso de elución.

4.3 Elución con gradiente

La composición de la fase móvil se cambia, de forma continua o en etapas, a lo largo del proceso de elución (respectivamente, **gradiente continuo** y **gradiente escalonado o en etapas**).

4.4 Cromatografía bidimensional

Una vez separados los componentes de la muestra, parte de ellos o todos se someten a etapas adicionales de separación bajo diferentes condiciones, en otra columna o, en el caso de la cromatografía plana, en dirección perpendicular.

Ejemplo: Huellas dactilares estudio de proteínas (Freifelder-193ss)

Etapas en la realización de una cromatografía

Cromatografía en columna

- 1.- Preparación del soporte y fase estacionaria.
 - 1.1.- Equilibrado de la columna.
- 2.- Aplicación de la muestra.
- 3.- Elución:
 - a) Lavado de componentes no retenidos.
 - b) Liberación, desplazamiento o elución propiamente dicha de los componentes retenidos.
- 4.- Recolección de fracciones o análisis del efluente en continuo.
- 5.- Análisis, cuantificación o revelado.
- 6.- Regeneración de la fase estacionaria.

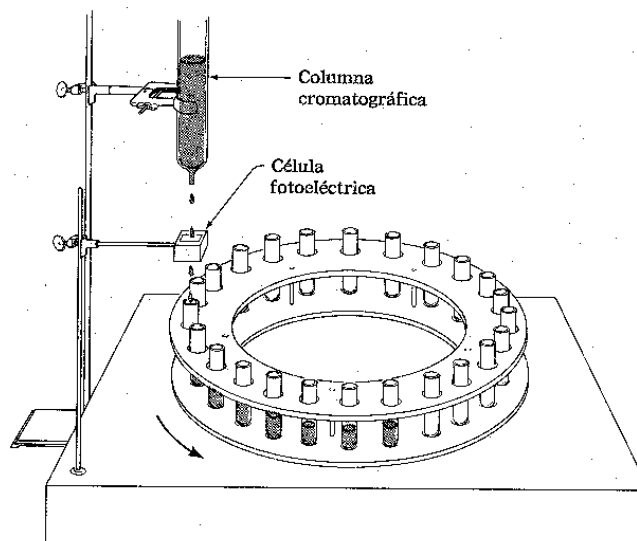
Cromatografía plana (papel o capa fina)

- 1.- Preparación del soporte y fase estacionaria.
- 2.- Aplicación de la muestra.
Secado.
- 3.- Desarrollo de la cromatografía.
- 4.- Secado de la placa.
- 5.- Revelado y cuantificación en su caso.

Recogida del efluente

El efluente de una columna se suele recoger en forma de pequeñas porciones o **fracciones**, comúnmente con la ayuda de un dispositivo mecánico llamado **colector de fracciones**.

Esquema de un colector de fracciones. En cada tubo cae un número determinado de gotas o un cierto volumen. A continuación el soporte gira, de modo que el tubo siguiente queda colocado bajo la salida del efluente. Las gotas se detectan mediante una célula fotoeléctrica; cada gota interrumpe el haz de luz y así se cuenta.



Detección

Los componentes de la muestra separados se detectan en el efluente:

- a) Mediante su análisis en continuo. Por ejemplo:
 - midiendo absorbancia a 280 nm para proteínas
 - midiendo absorbancia a 260 nm para ácidos nucleicos
 - midiendo radiactividad
- b) O bien mediante el análisis de las fracciones una vez recogidas.
 - cualquier tipo de análisis (absorbancia, radiactividad, ensayo enzimático, ensayo biológico...)

Bibliografía específica

Alberts, B.; Bray, D.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K. y Watson, J. D. (1996). Biología molecular de la célula, 3ª ed. Omega. Biblioteca: 576.3ALB p.176-9

Alberts, B.; Bray, D.; Johnson, S.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K. y Walter, P. (1999). Introducción a la biología celular, Omega. Biblioteca: 576.3ALB p.164

Freifelder, D. (1991). Técnicas de bioquímica y biología molecular. Reverté. Biblioteca: 577.1FRE Cap. 8.

Mathews, C. K. y Van Holde, K. E. (1998). Bioquímica, 2ª ed. McGraw-Hill Interamericana. Biblioteca: 577.1MAT p.166-8

Stryer, L. (1995). Bioquímica, 4ª ed. Reverté. Biblioteca: 577.1STR p.49-50.