

INTRODUCCIÓN

CROMATOGRAFIA (*chroma*-color y *graphein*-escribir)

Separación de biomoléculas...

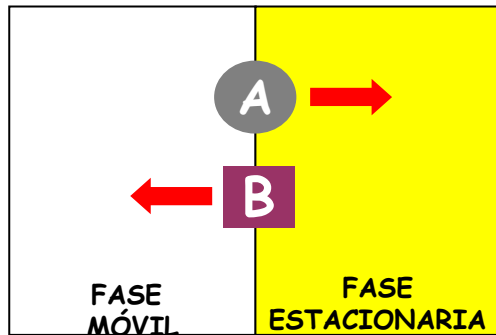


- proteínas
- péptidos
- aminoácidos
- lípidos
- ADN/ARN ...



análisis y
purificación

... en función de su diferente
distribución en dos FASES
(¡siempre!)



F. MÓVIL:
(solvente)

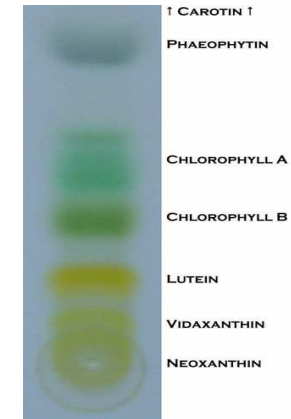
F. ESTACIONARIA:

líquido
gas

sólida
líquida



Mikhail Tswett
1906



- Separación de los componentes de una muestra.
- Los componentes de una mezcla son distribuidos entre dos fases: una es estacionaria, mientras que la otra es móvil.
- La fase estacionaria puede ser un sólido o un líquido soportado en un sólido o en un gel (matriz).
- La fase estacionaria puede ser empaquetada en una columna, extendida en una capa, distribuida como una película, etc...

- Separación entre dos sustancias comienza cuando una es retenida más fuertemente por la fase estacionaria que la otra, que tiende a desplazarse más rápidamente en la fase móvil.
- Las retenciones pueden tener su origen en dos fenómenos de interacción que se dan entre las dos fases:
- *Adsorción*: que es la retención de una especie química por parte de los puntos activos de la superficie de un sólido quedando delimitado el fenómeno a la superficie que separa las fases o superficie interfacial.
- *Absorción*: que es la retención de una especie química por parte de una masa y debido a la tendencia que esta tiene a formar mezcla o a reaccionar químicamente con la misma.

- Sistema de separación dinámica, porque continuamente se producen equilibrios entre los componentes de la mezcla a separar y las fases móvil y estacionaria.
- La fase estacionaria consiste en partículas, generalmente sólidas, pequeñas y con una superficie microporosa, de forma que presenta un amplio desarrollo superficial. Puede estar empaquetada en forma de columna o extendida en forma de capa
- La fase móvil puede ser un líquido o un gas, y su función es transportar a los componentes de la mezcla a través del sistema cromatográfico.

- **Separación** : competición entre la fase móvil y la fase estacionaria por el componente, partición del componente distribuido entre las dos fases.
- Se establece un **equilibrio** entre la concentración del componente presente en la fase móvil y la concentración presente en la fase estacionaria.
- La diferencia dependerá de las propiedades físicas y químicas de los componentes. El mayor o menor avance en el sistema cromatográfico dependerá de la **afinidad** del componente y la fase estacionaria.
- Componente con menor afinidad por la fase estacionaria en presencia de una fase móvil llamada eluyente será eluido en primer lugar, y por tanto se desplazará con mayor **velocidad** por el sistema cromatográfico.

CLASIFICACIÓN

3 CRITERIOS

1_ Según el estado físico de la fase móvil:

FASE MÓVIL líquido → Cromatografía de LÍQUIDOS
gas → Cromatografía de GASES

2_ Según la **causa por la que se separan los componentes de la muestra (relacionado con las propiedades físicas de las biomoléculas):**

- Solubilidad
- Tamaño
- Carga
- Hidrofobicidad
- Interacciones por afinidad biológica
- Interacciones inespecíficas

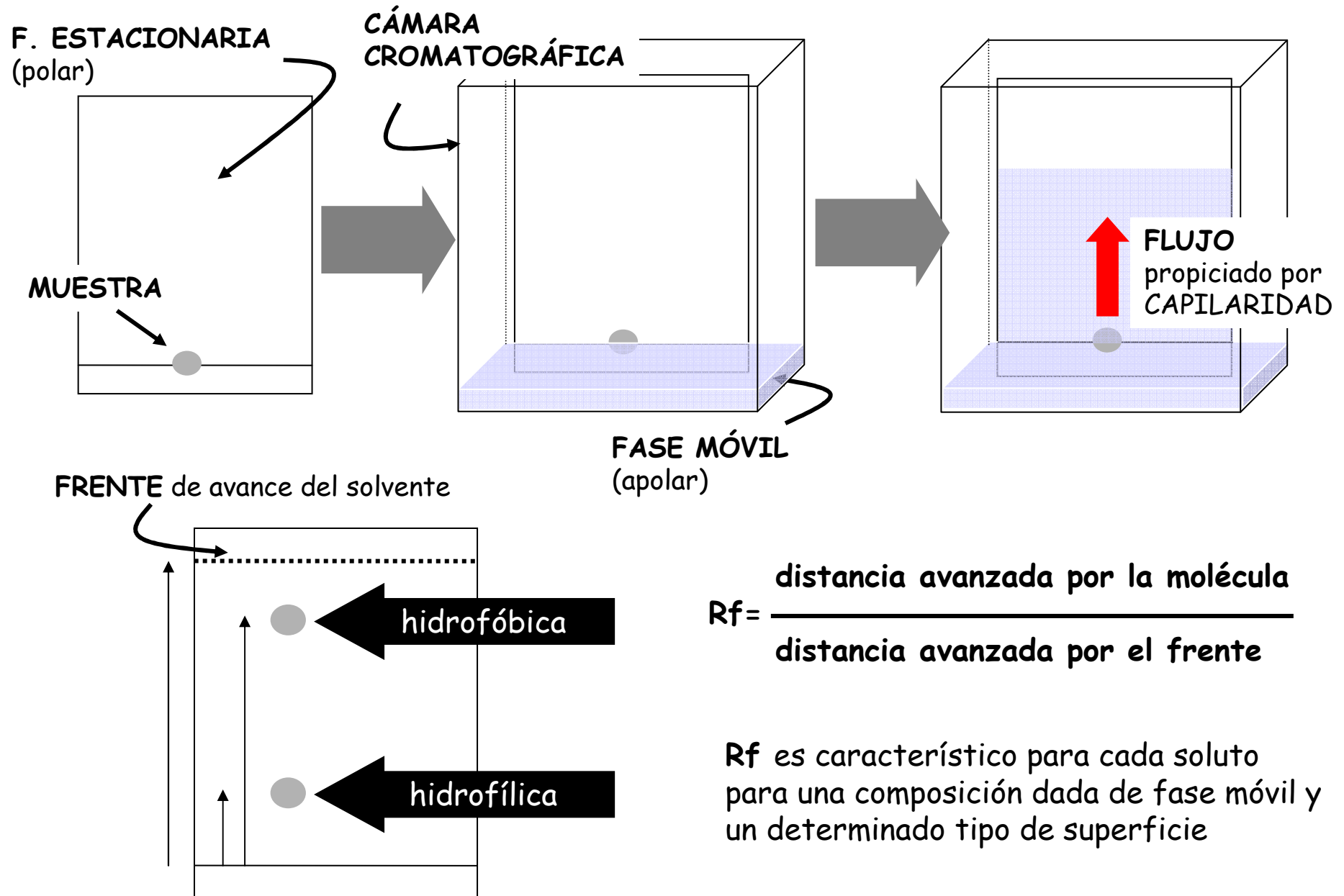
3_ Según la metodología utilizada para el desarrollo de la cromatografía (relacionado con la fase estacionaria):

FASE ESTACIONARIA → Sobre superficie plana: **planar**
→ En **columna**

TIPOS DE CROMATOGRAFÍA

Fase móvil	Fase estac.	Clase	Tipo (propiedad)	Nombre	Ejemplo
Líquida	Líquida	Reparto	Solubilidad	Fase normal	EN PAPEL
				Fase inversa	
	Líquida		Tamaño	Exclusión	GEL FILTRACIÓN
	Sólida	Adsorción (¡NO absorción!)	Interacciones electrostáticas	Intercambio iónico	INTERCAMBIO IÓNICO
			Hidrofobicidad	Interacción Hidrofóbica	EN CAPA FINA o TLC HIDROFÓBICA
			Interacciones por afinidad	Afinidad	AFINIDAD (GST)
			Interacciones inespecíficas	Adsorción	HIDROXIAPATITO

CROMATOGRAFÍA EN SUPERFICIE PLANA



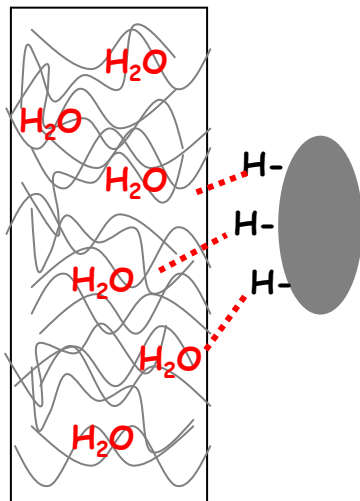
CROMATOGRAFÍA EN PAPEL

PROPIEDAD: Solubilidad

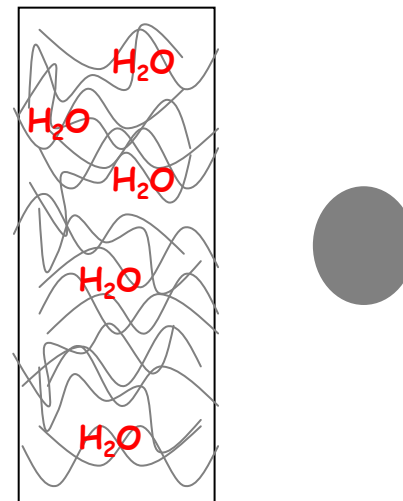
SOPORTE → celulosa del papel

F. ESTACIONARIA → (LÍQUIDA) H_2O absorbida en la celulosa.

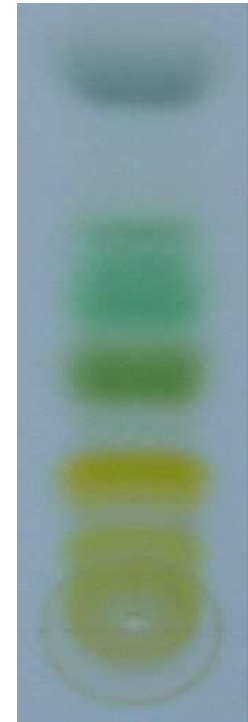
F. MÓVIL → (LÍQUIDA) Disolvente orgánico

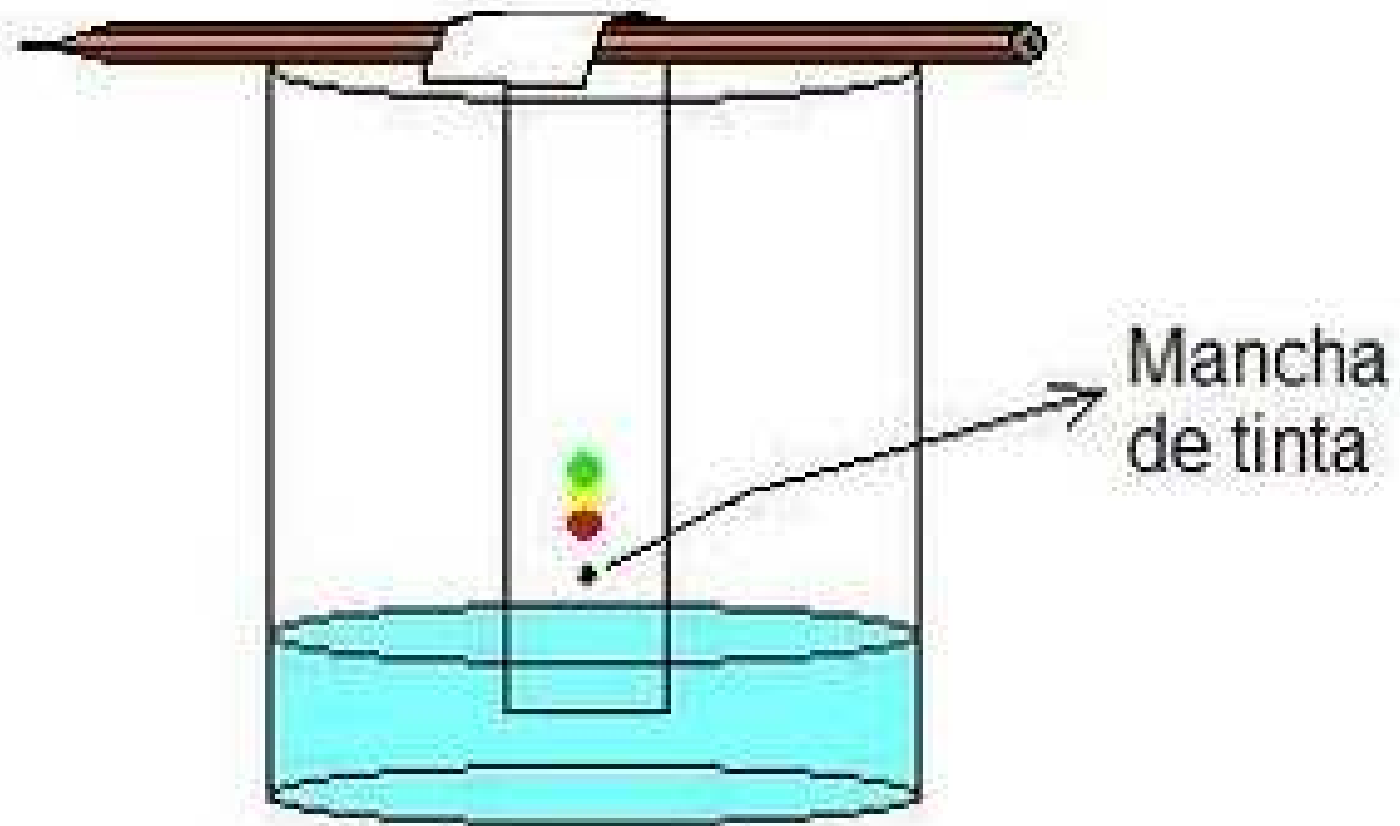


Molec. Hidrofílica → LENTA
Retenida por f.estacionaria



Molec. Hidrofóbica → RÁPIDA
Disuelta en f. móvil





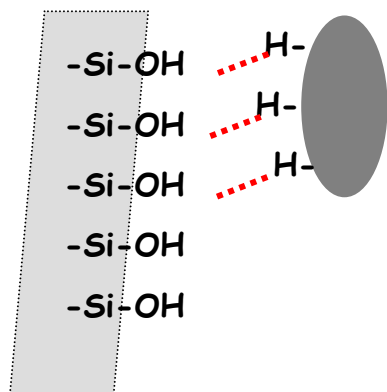
CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA (TLC)

PROPIEDAD: Hidrofobicidad

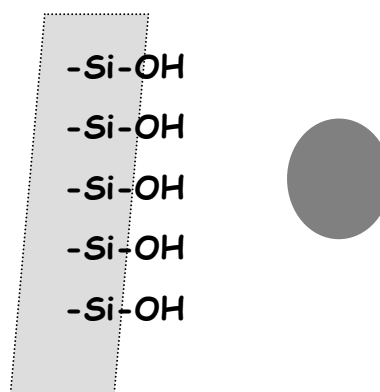
SOPORTE → plancha de metal o vidrio

F. ESTACIONARIA → (SÓLIDA) sólido pulverizado sobre plancha de metal o vidrio. El más usado es el gel de sílica.

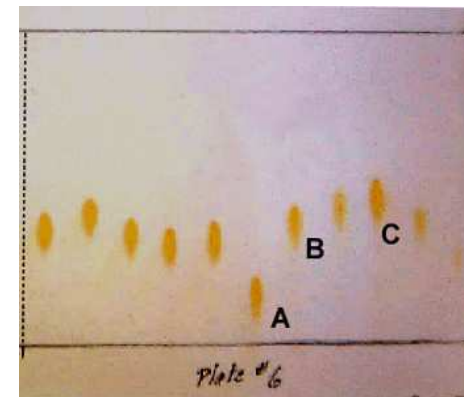
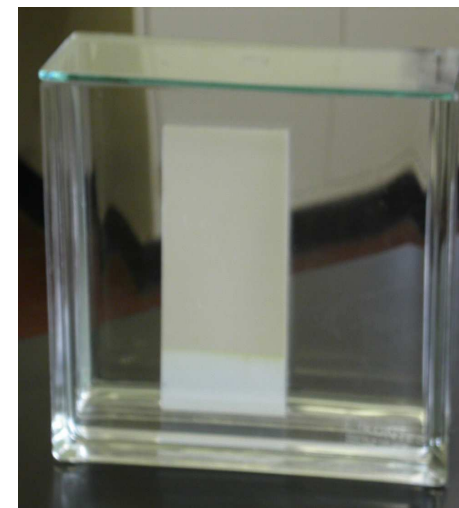
F. MÓVIL → (LÍQUIDA) Disolvente orgánico



Molec. Hidrofílica → LENTA
Retenida por f. estacionaria



Molec. Hidrofóbica → RÁPIDA
Disuelta en f. móvil



- Adsorbente: cuanto más finamente dividido esté mayor será su adhesión al soporte.
- Se le puede añadir un adherente (yeso).
- Adsorbentes más utilizados son:
 - Celulosa
 - Almidón
 - Azucares
 - Gel de sílice (silicagel)
 - Óxido de aluminio (alúmina)
 - Carbón activo (carbón en polvo)

- Gel de sílice o silicagel es uno de los más utilizados.
- pH entre 4-5
- tamaño del grano de 10 a 40 μ
- tamaño de poro de 20 a 150 Å
- Agente aglomerante: yeso (sulfato de cálcico) proporciona firmeza al adsorbente
- Adsorbente polar
- Puede ser tratado con hidrocarburos para neutralizar los grupos -OH de forma que se haga apto para separar componentes lipofílicos (esteroides, ácidos grasos, ceras, vitaminas liposolubles). Proceso llamado cromatografía de fase reversa

- La alúmina u óxido de aluminio
- Adsorbente ligeramente **básico** debido a la presencia de moléculas de hidróxido de aluminio adheridas a la alúmina.
- Puede ser tratada químicamente para conseguir alúminas ácidas, básicas y neutras.
- Puede contener aglomerantes y/o indicadores ultravioletas.
- adsorbente de **carácter polar**, retendrá con mayor avidez a los componentes polares.

- El adsorbente se prepara en agua destilada. Proporción : dos partes de agua y una de adsorbente. Ver fabricante
- Soporte del adsorbente láminas de vidrio
- El espesor de la placa en general suele ser de:
- 0.1-0.2 mm. para separaciones **analíticas**
- 0.5- 2 mm. para separaciones **preparativas**
- La placa debe quedar libre de grumos y rugosidades
- Se dejan reposar
- **Activar** el adsorbente: dejar las placas reposar toda la noche a temperatura ambiente o calentar 30 minutos a 105-110 °C

- **Aplicación de la muestra**
- Los compuestos a separar se disolverán en un solvente orgánico no polar que tenga un punto de ebullición lo suficientemente bajo para que se evapore después de la aplicación
- mezcla cloroformo: metanol (1:1)
- disoluciones al 1% de las muestras, aplicar 2 μ l, carga 20 μ g de producto sólido
- Siembra: micropipetas y tubos capilares
- Se realiza tocando con la punta del capilar sobre la placa preparada dejando una distancia al borde inferior y entre muestras de un centímetro aproximadamente
- Se deja secar para evaporar el disolvente, de forma que en la placa solo quedará la muestra a analizar

- La elección del eluyente o fase móvil dependerá lógicamente del componente que se va a separar y del material en que la separación se lleva a cabo.
- Principales eluyentes en orden **creciente de polaridad**:
- Eter de petróleo
Eter dietílico
Ciclohexano
Acetato de etilo
Tetracloruro de carbono
Piridina
Benceno
Etanol
Cloroformo
Metanol
Diclorometano
Agua
Ácido acético

- Desarrollo de la cromatografía
- **Ascendente**: el eluyente asciende por una placa vertical, por la acción de la capilaridad
- La cromatografía se realiza en una **cuba**. El eluyente se introduce en la cámara una hora antes del desarrollo, para permitir la **saturación** de la atmósfera.
- El **tiempo** de desarrollo suele ser corto en analítica, en una cromatografía preparativa puede llevar horas.
- Las placas pueden desarrollarse durante un tiempo prefijado o hasta que se alcance una línea dibujada a una distancia fija desde el origen para estandarizar los valores de **RF**.
- El **frente** del eluyente nunca debe llegar a tocar el borde de la placa.
- Se deja **secar** la placa por acción del aire

- **Localización de sustancias o revelado**

- Si los compuestos separados no son coloreados es necesario revelar la posición de dichos compuestos:

- Métodos químicos
- Métodos físicos

- **Métodos químicos**

- Reacción química entre un reactivo revelador y los componentes separados.
- Se pulveriza la placa con los reactivos reveladores en posición horizontal y bajo campana.
- En cromatografía en capa fina no puede realizarse el bañado del cromatograma, en cromatografía en papel sí.

- Reveladores generales

- **Reactivo yodo:** forma complejos coloreados con los componentes orgánicos (con tonos amarillo-marrón). Las manchas desaparecen con el tiempo con lo que es conveniente señalar las manchas aparecidas: **reversible y no destructivo**
- **Acido sulfúrico:** reacciona con los componentes orgánicos produciendo manchas negras: **Irreversible y destructivo**

- Reveladores específicos

- **2,4 - dinitrofenilhidracina:** para aldehidos y cetonas
- **Verde de bromocresol:** para ácidos carboxílicos
- **Paradimetil aminobenzaldehido:** para aminas
- **Ninhidrina:** para aminoácidos

- **Métodos físicos**

- El más común: añadir al adsorbente un indicador fluorescente.

Al colocar la placa bajo una lámpara ultravioleta, y dependiendo del indicador y de la longitud de onda, aparecen manchas fluorescentes en las zonas en las que hay componentes, o en otros casos aparece toda la placa fluorescente excepto donde hay componentes.

- Constantes R_f y R_x

- **RF (Ratio of Front)** es una manera de expresar la posición de un compuesto sobre una placa como una fracción decimal, mide la retención de un componente.
- Se define como:

$$R_F = \frac{\text{distancia recorrida desde el origen por el compuesto}}{\text{distancia recorrida desde el origen por el frente del eluyente}} = \frac{X}{Y}$$

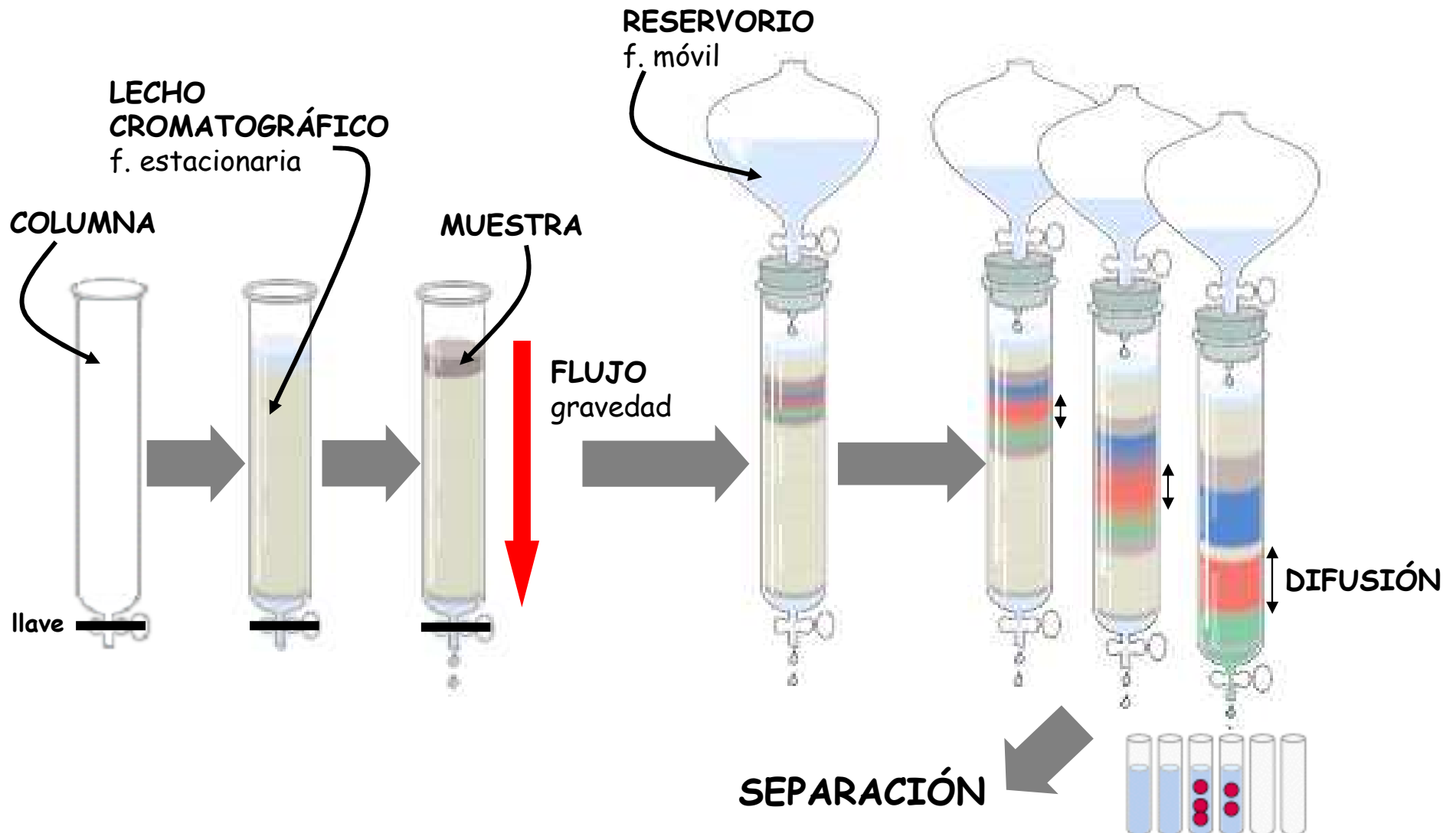
- La distancia recorrida por el compuesto se mide generalmente desde el centro de la mancha.
- **RF reproducibles:** deben fijarse Espesor de la placa, fase móvil, fase estacionaria, cantidad de muestra.
- máximo valor de RF : es de 1, lo ideal es un **RF entre 0.65 y 0.7.**

CROMATOGRAFÍA EN COLUMNA

EMPAQUETADO
COLUMNA

APLICACIÓN
MUESTRA

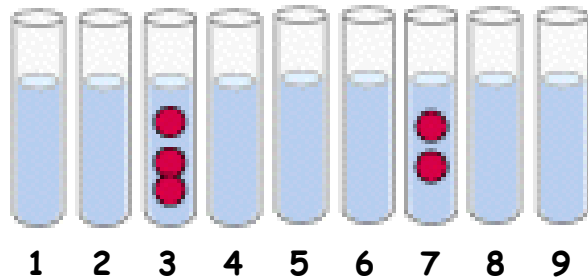
ELUCIÓN Y RECOGIDA DE FRACCIONES



CROMATOGRAFÍA EN COLUMNA

PERFIL DE ELUCIÓN

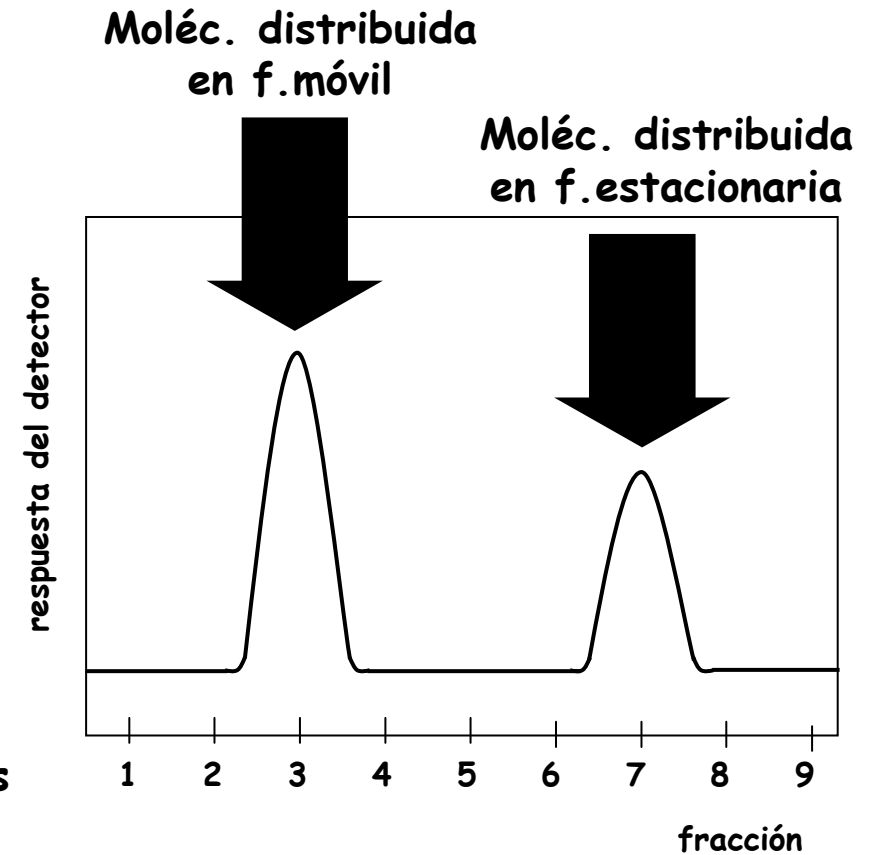
FRACCIONES



ANÁLISIS DEL
CONTENIDO DE LAS
FRACCIONES

Espectrofotométrico

Abs 280nm - Proteínas
Otras Abs - Colorantes



CROMATOGRAFÍA DE GEL FILTRACIÓN

PROPIEDAD: Tamaño (y forma)

SOPORTE → Resina de micropartículas esféricas formadas por **polímeros hidrofílicos**: dextrano, agarosa, poliacrilamida o mezcla de ellos

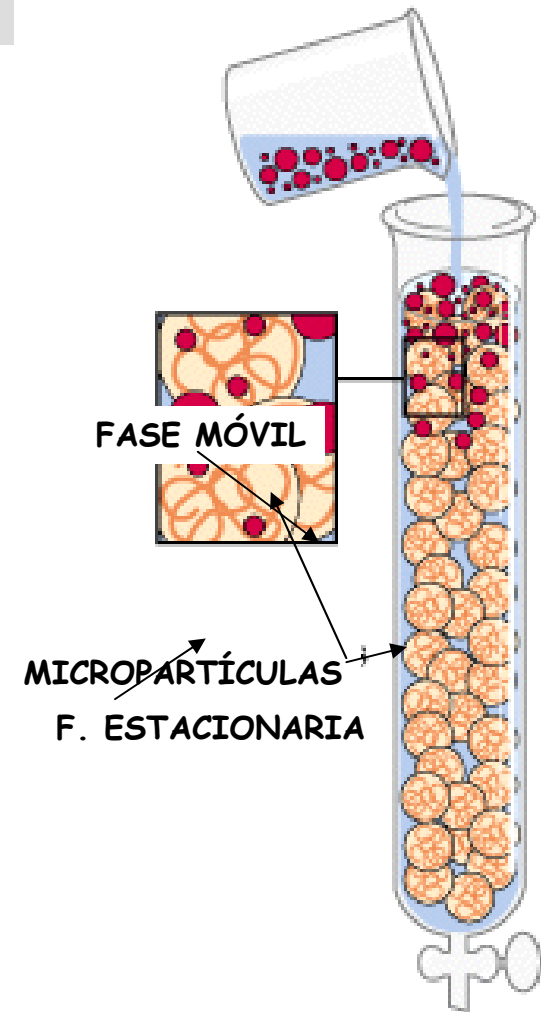
Tamaños de poro → intervalo o rango de fraccionamiento.

Sephadex G25: 1000 - 5000 Da

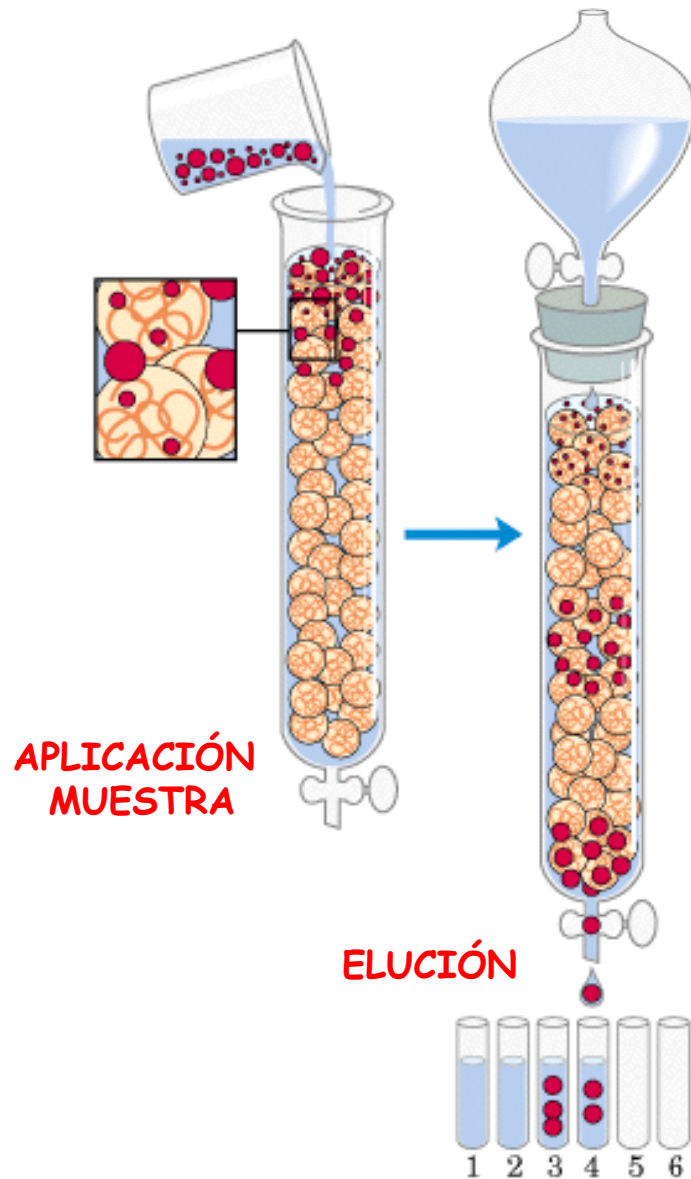
Sephadex G200: 5000 - 250000 Da

F. ESTACIONARIA → **LÍQUIDA** solvente acuoso (el mismo que el de la fase móvil) que se encuentra dentro de micropartículas.

F. MÓVIL → **LÍQUIDA** solvente acuoso que atraviesa la columna por los espacios intersticiales (entre las micropartículas).



CROMATOGRAFÍA DE GEL FILTRACIÓN



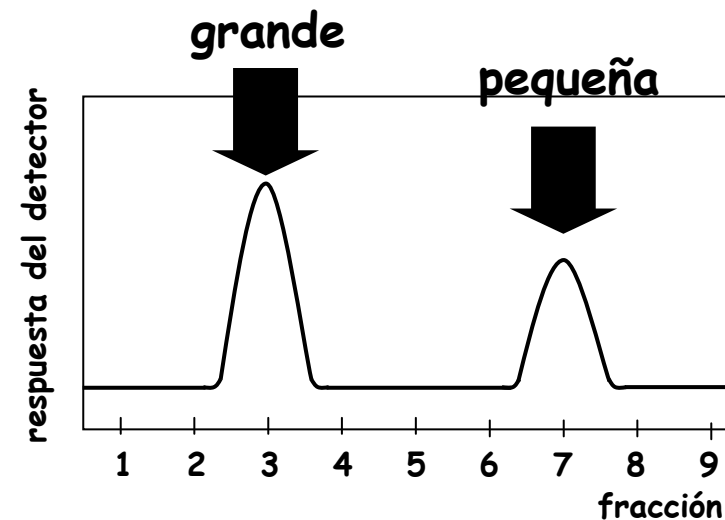
Molec. GRANDES → RÁPIDAS

Avanzan con mayor velocidad a través de los espacios intersticiales: afinidad con fase móvil

Molec. PEQUEÑAS → LENTAS

Son retenidas por las fibras de las micropartículas y avanzan con menos velocidad: afinidad con fase estacionaria

PERFIL DE ELUCIÓN



CROMATOGRAFÍA DE INTERCAMBIO IÓNICO

PROPIEDAD: Interacciones electrostáticas (carga)

SOPORTE → Resina de micropartículas formadas por polímeros sintéticos o naturales (dextranos, celulosas, agarosa).

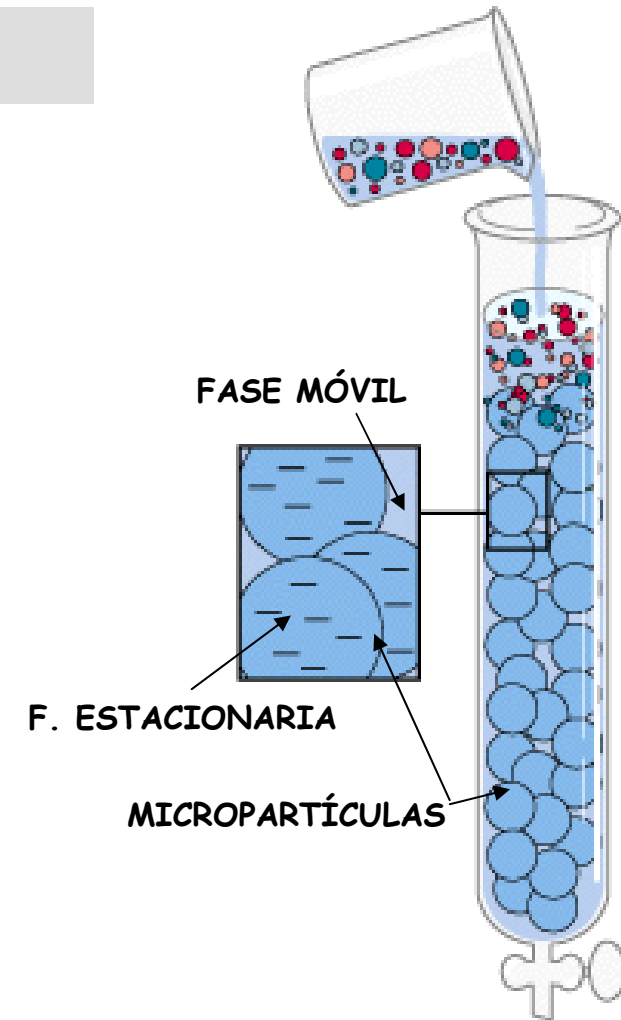
F. ESTACIONARIA → **SÓLIDA** Grupos con cargas iónicas unidos al soporte

Carga positiva (+) → intercambiadores de aniones (-):
cromatografía intercambio aniónica

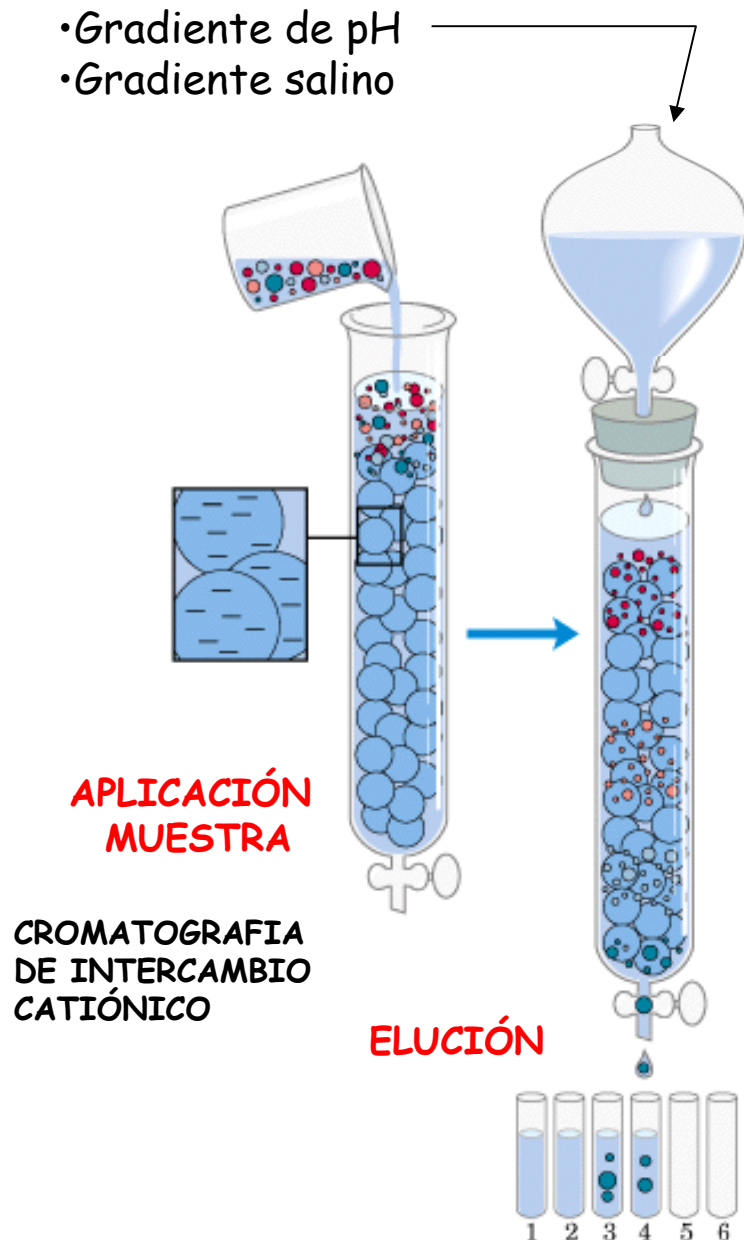
Carga negativa (-) → intercambiadores de cationes (+):
cromatografía intercambio catiónica

F. MOVIL → **LÍQUIDA** Solvente que anula la interacción electrostática.

2 posibilidades: **Gradientes de pH** → cambio de carga de las moléculas de la muestra
Gradientes iónicos (salinos) → competencia por grupos electrófilos



CROMATOGRAFÍA DE INTERCAMBIO IÓNICO



Molec. CARGA (-) → NO SE RETIENEN

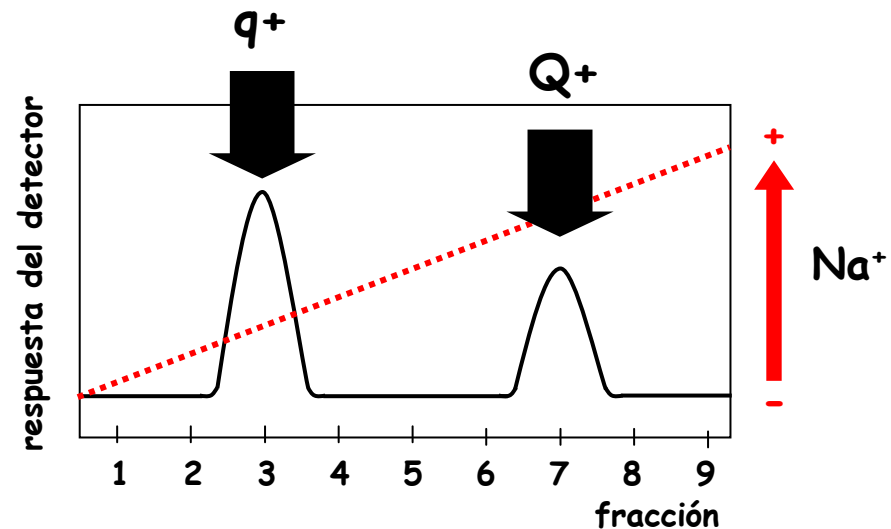
Molec. MENOR CARGA (+) → RÁPIDAS

Son desplazadas más fácilmente por la fase móvil

Molec. MAYOR CARGA (+) → LENTAS

Son retenidas por los grupos cargados iónicamente de la fase estacionaria

PERFIL DE ELUCIÓN



CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD

PROPIEDAD: Interacciones específicas entre dos moléculas
hormona-receptor
proteína-metal o cofactores como ATP
antígeno-anticuerpo

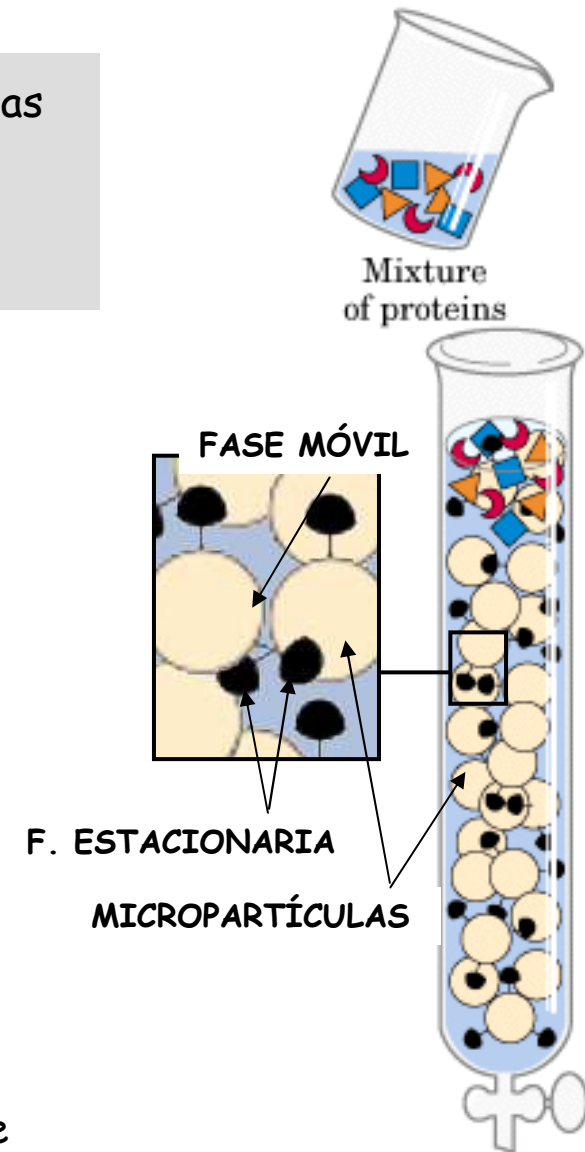
SOPORTE → Matriz de micropartículas hidrofílicas sin carga, con rigidez, inerte y estable (agarosa, acrílica).

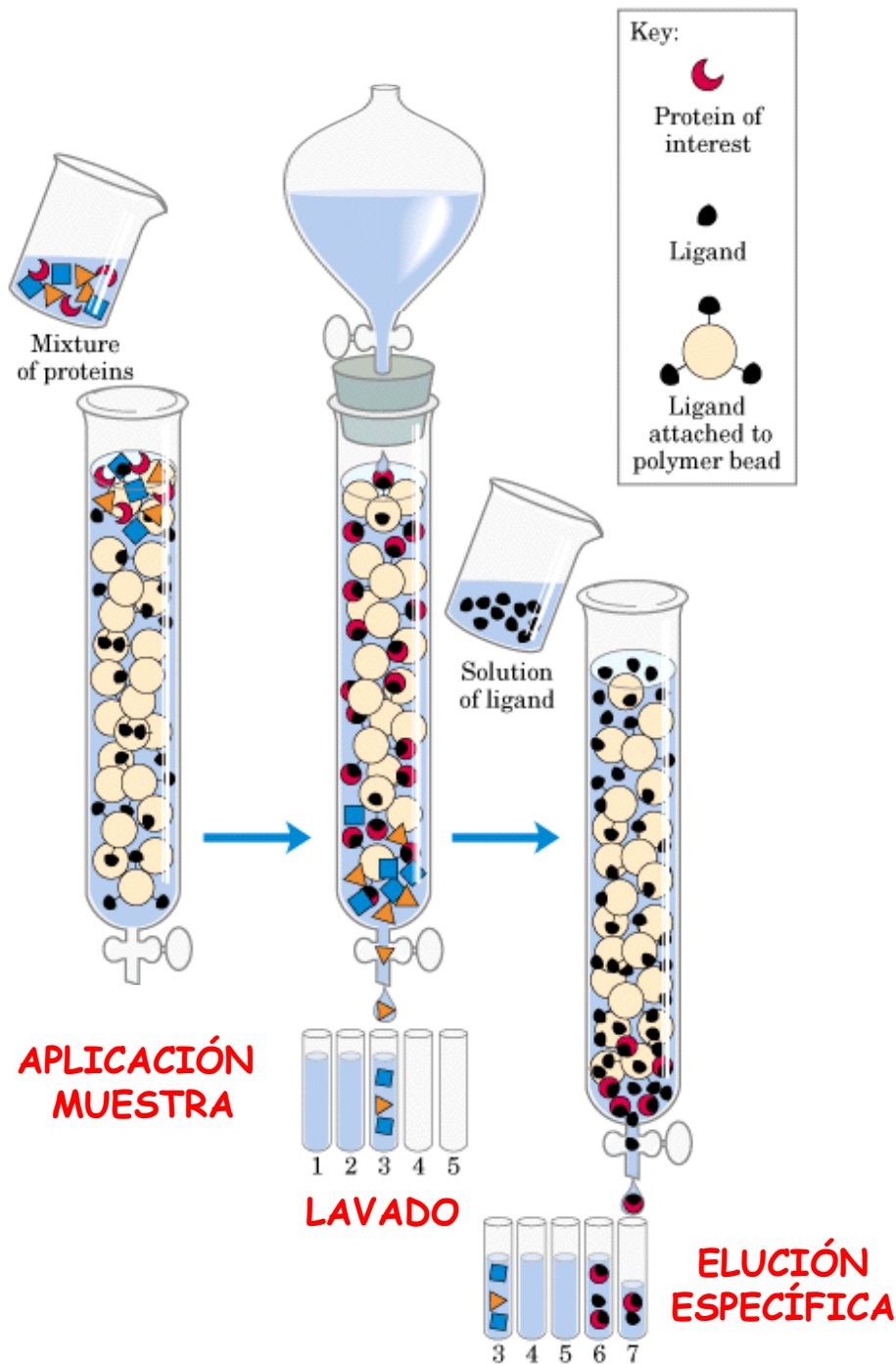
F. ESTACIONARIA → **SÓLIDA** Ligandos (grupos químicos) específicos unidos a la matriz

- Comerciales: Concavalina A → une glicoproteínas
 Proteína A → une IgG (anticuerpos)
- No comerciales: anclaje covalente ligando - matriz

F. MÓVIL → **LÍQUIDA** Solución que anula o disminuye la afinidad con el ligando de la fase estacionaria.

- Solución con el propio ligando → Molécula + ligando libre
- Solución con algo que interacciona con el ligando → Molécula





CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD

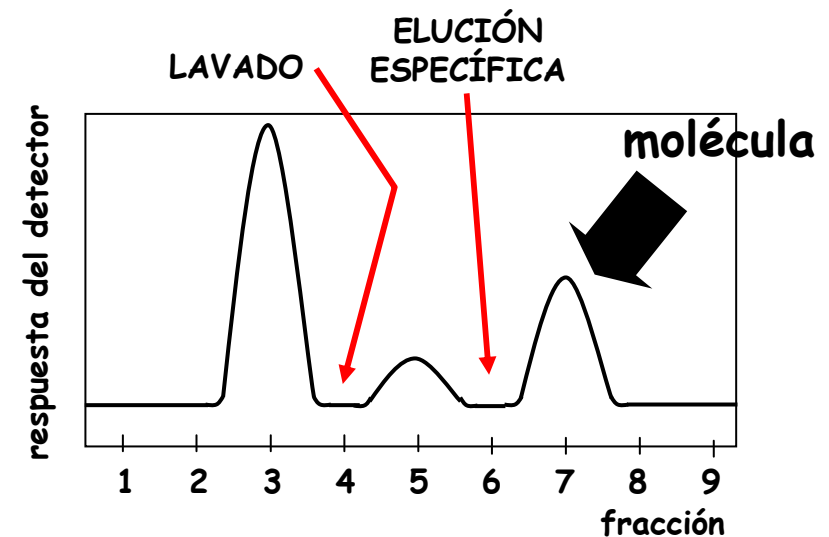
Molec. NO INTERACCIÓN → RÁPIDAS

No se unen al ligando de la fase estacionaria

Molec. INTERACCIÓN → LENTAS

Se unen al ligando de la fase estacionaria
Elución específica.

PERFIL DE ELUCIÓN



CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD

Sistema GST (Glutación-S-Transferasa)

Purificación de PROTEÍNAS RECOMBINANTES

Cualquier proteína marcada con etiqueta GST

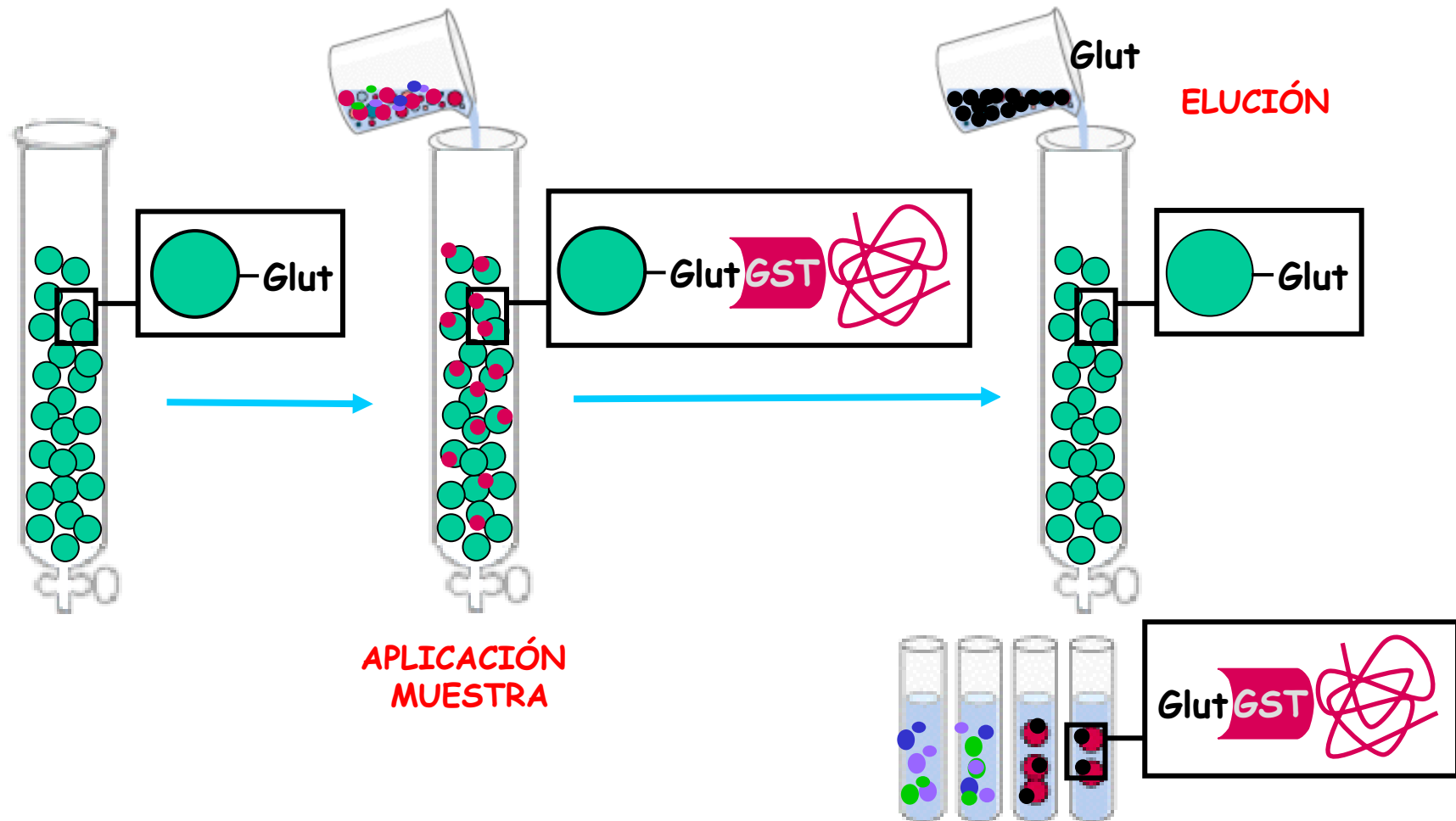
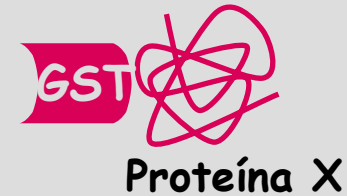


table 5-5

A Purification Table for a Hypothetical Enzyme*

Procedure or step	Fraction volume (ml)	Total protein (mg)	Activity (units)	Specific activity (units/mg)
1. Crude cellular extract	1,400	10,000	100,000	10
2. Precipitation with ammonium sulfate	280	3,000	96,000	32
3. Ion-exchange chromatography	90	400	80,000	200
4. Size-exclusion chromatography	80	100	60,000	600
5. Affinity chromatography	6	3	45,000	15,000

*All data represent the status of the sample *after* the designated procedure has been carried out. Activity and specific activity are defined on page 137.