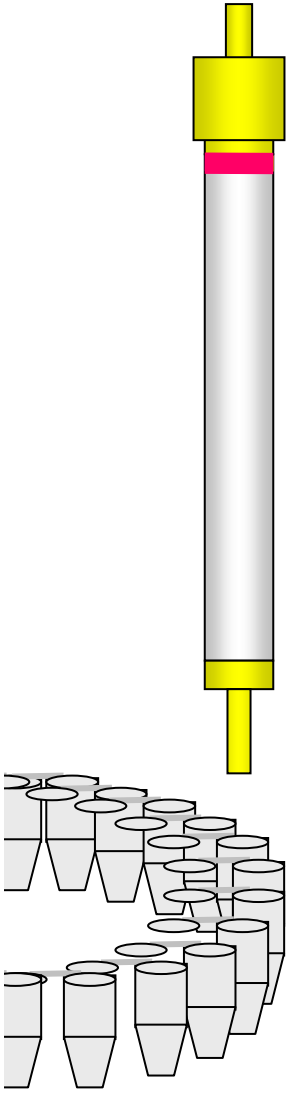
Tipos de Cromatografía Líquida (LC)

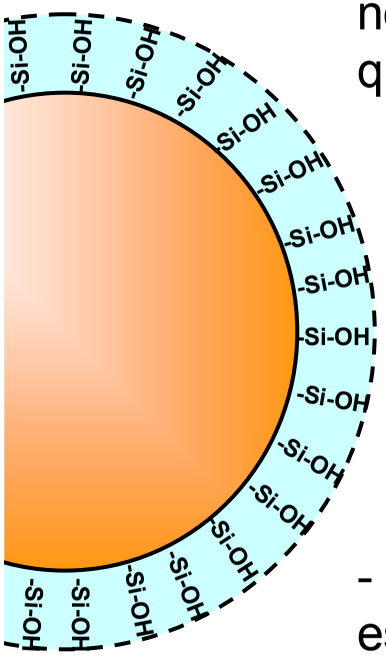


- Cromatografía de reparto
  - En fase normal
  - **En fase reversa**
- Cromatografía de exclusión molecular

- Cromatografía quiral

-Cromatografía de adsorción
- Cromatografía de intercambio iónico (IEX)
  - Aniónica
  - Catiónica
- Cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC)
- **Cromatografía de afinidad**

Cromatografía de reparto



- El soporte tiene naturaleza inerte. Los compuestos de la muestra no interaccionan con la matriz sino con el fluido que la solvata, que es la verdadera fase estacionaria.

  - *C. líquido-líquido*. La fase estacionaria líquida se retiene sobre la superficie del soporte por adsorción física.

  - *C. de fase unida químicamente.* La fase estacionaria se une químicamente a la superficie del soporte.

- El material de partida soporte para preparar la fase estacionaria es sílice. Partículas mecánicamente resistentes, porosas y uniformes de diámetro de 3, 5 o 10 µm.

- La sílice se hidroliza para liberar grupos silanol, que se pueden derivatizar fácilmente.

En general la derivatización no es total por impedimento estérico. Los grupos –OH libres se pueden bloquear con moléculas pequeñas para evitar efectos relacionados con la polaridad.

Cromatografía de reparto en fase normal

- Uso de fase estacionaria polar y de un disolvente apolar como fase móvil.

- Los rellenos comerciales de fase normal unida químicamente tienen como grupo orgánico en la cadena del siloxano un grupo funcional polar: ciano < diol < amino

- El componente menos polar eluye primero debido a que relativamente es más soluble en la fase móvil.

-El orden de polaridades para los grupos funcionales más comunes en los analitos es:

hidrocarburo < éter < cetona < aldehído < amina < alcohol < carboxílico

- Un aumento de la polaridad de la fase móvil provoca la disminución del tiempo de elución.

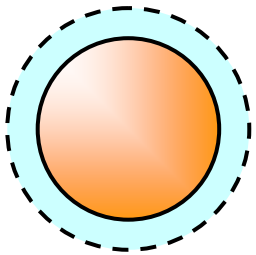
- Los disolventes utilizados como fase móvil son muy apolares como cloroformo, dietileter, hexano.

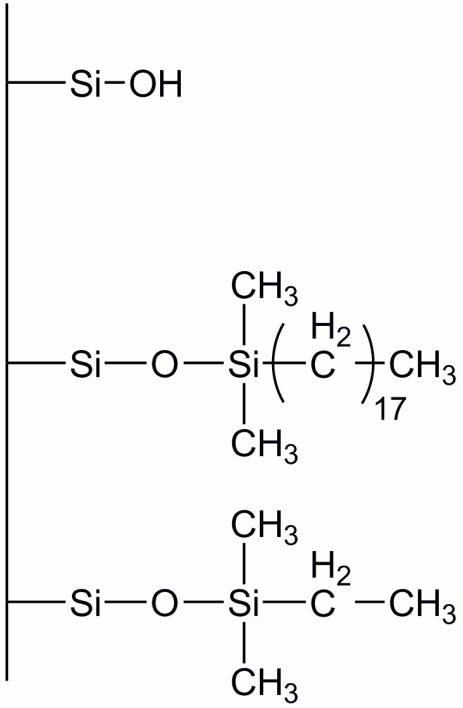
Cromatografía de reparto en fase reversa

-El 75% de toda la cromatografía de alta eficacia se realiza con esta técnica.

- La fase estacionaria es más hidrofóbica que la fase móvil.

- En rellenos $\mathbf{C_8}$ (octilo) y $\mathbf{C_{18}}$ (octadecilo) los grupos hidrocarburo se alinean uno junto a otro y en perpendicular a la superficie de la partícula, dando lugar a una estructura similar a una brocha.





Grupo silanol libre

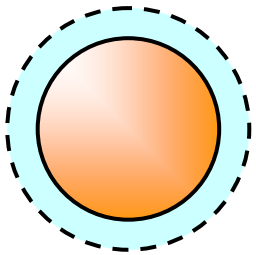
Grupo octadecilo

Bloqueo de grupos silanol

La hidrólisis del xiloxano ocurre a valores de pH por encima de 7.5

Cromatografía de reparto en fase reversa

- El recubrimiento enlazado se puede tratar como si fuera un líquido convencional retenido físicamente similar a una fase estacionaria de líquido-líquido ordinaria (C. de reparto).



-Los disolventes más utilizados como fase móvil son agua con proporciones variables de acetonitrilo y/o metanol.

-El componente más polar de la muestra eluye primero

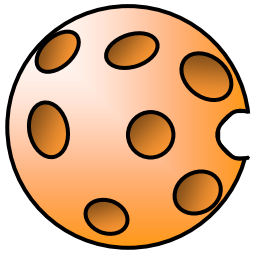
- Modificar el **factor de retención, *k'*** es lo normal para mejorar la resolución de la separación. Ello se hace variando la polaridad de la fase móvil, con la proporción de disolventes polares/apolares. Una disminución de la polaridad de la fase móvil provoca la disminución del tiempo de elución.

- Uso de **gradientes** de proporción de disolvente orgánico, desde un alto contenido acuoso en condiciones iniciales a mayor contenido orgánico para facilitar la elución de los compuestos más apolares. Ajusta los t_R y disminuye el ensanchamiento de banda.

- La **temperatura** es otro factor crítico en cromatografía en fase reversa. La viscosidad de la fase móvil disminuye con mayores temperaturas de columna, y por ello la transferencia de masa entre la fase móvil y la estacionaria es mejor y la resolución aumenta. La temperatura de la columna se controla y fija.

- Las aplicaciones de esta técnica son muchas, pero en general se aplica al análisis de moléculas pequeñas, incluyendo metabolitos o fármacos.

Cromatografía de exclusión molecular / filtración en gel



- Cromatografía de reparto en la que la fase estacionaria está constituida por el líquido atrapado en los poros de la matriz.

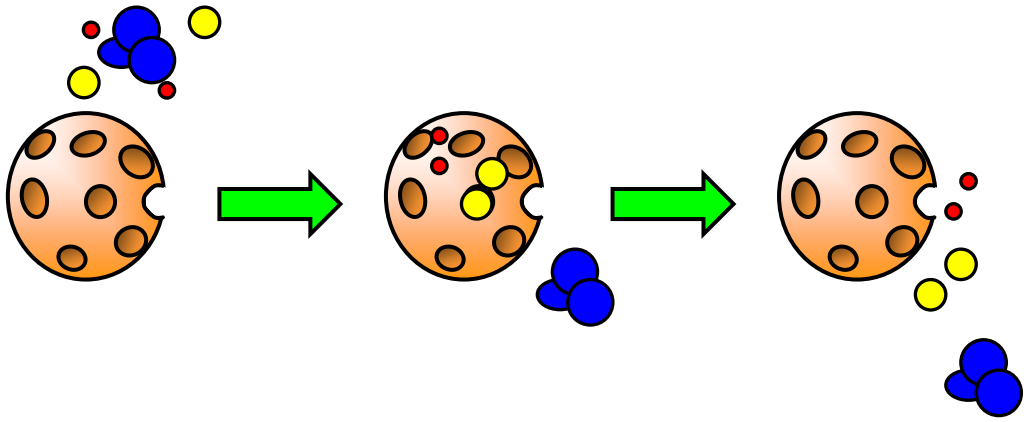
-No hay interacción con la matriz de ningún tipo por lo que la composición de la fase móvil no es tan determinante como en otras técnicas.

-Elución isocrática. Para evitar interacciones inespecíficas se suele añadir NaCl. Condiciones normales son tampón fosfato sódico 20 mM, pH 7.0, con NaCl 0.15 M.

- Uso de disoluciones tamponadas para la separación de macromoléculas (proteínas) en función del tamaño.

- Las separaciones se pueden llevar a cabo en la presencia de iones metálicos esenciales o cofactores, y usando detergentes, urea o guanidina. También se puede variar la concentración de sales o la temperatura en función del experimento.

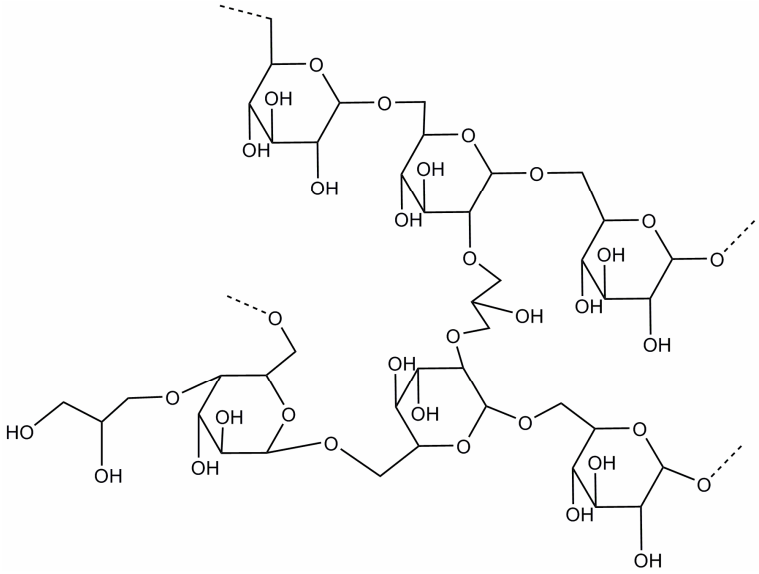
Cromatografía de exclusión molecular / filtración en gel



-Los componentes más grandes de la muestra eluyen primero al no penetrar en los poros. Los más pequeños pasan por todos los poros y su tiempo de elución (t_R) es mayor.

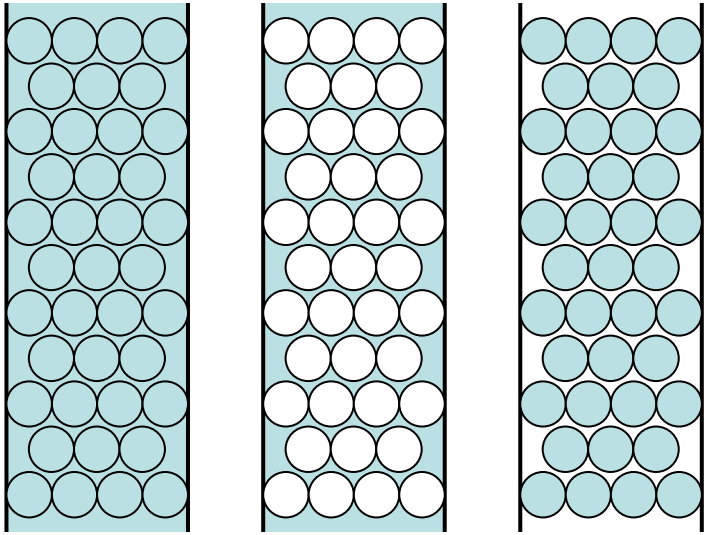
Fraccionamiento de proteínas en función de su tamaño.

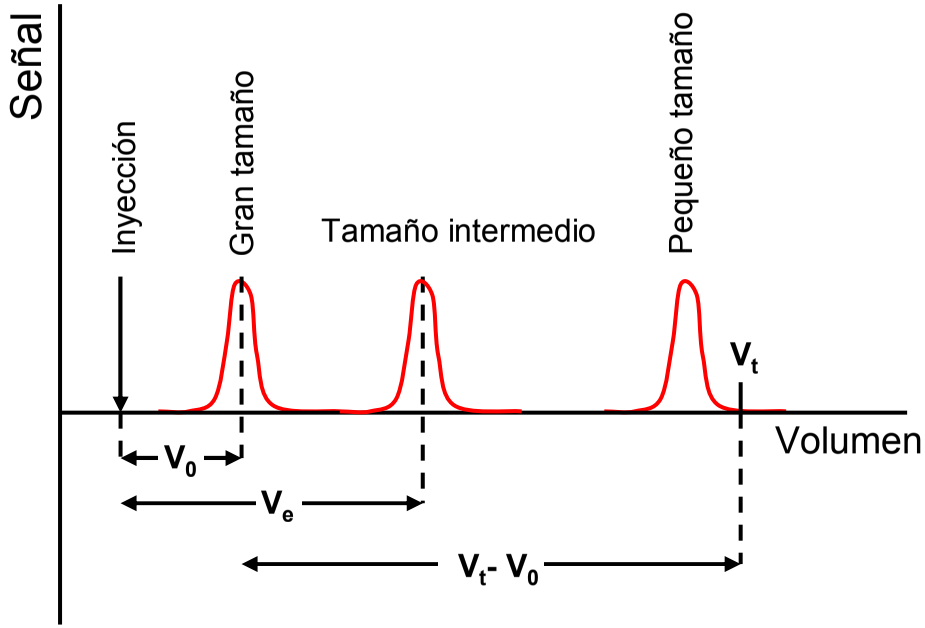
-La matriz más habitual es dextrano entrecruzado.



Cromatografía de exclusión molecular / filtración en gel

Aplicación. Determinación del peso molecular de proteínas





$V_t = V_0+V_i+V_g$

V_i (Vol. interno)

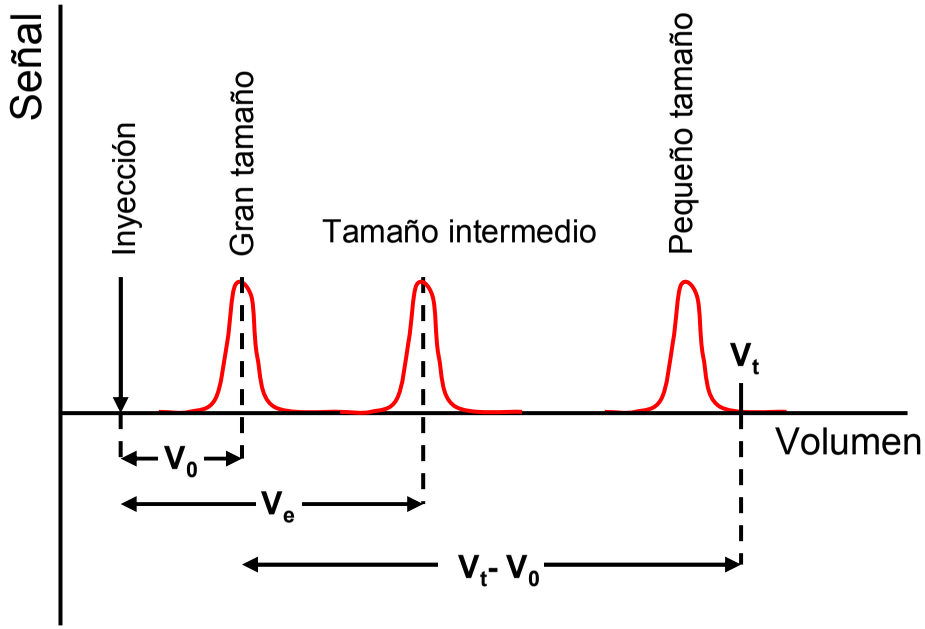
V_g (Vol. del gel/matriz)

$V_e = V_0+K_d \cdot V_i$

$K_d = (V_e-V_0)/V_i=c_S/c_M$

Cromatografía de exclusión molecular / filtración en gel

Aplicación. Determinación del peso molecular de proteínas



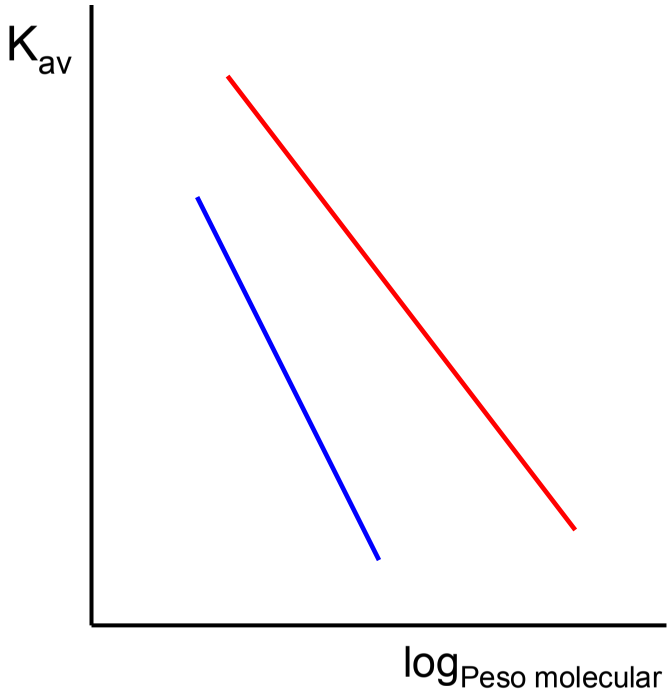
$$K_d = \frac{V_e - V_0}{V_t - V_0 - V_g} = \frac{V_e - V_0}{V_i}$$

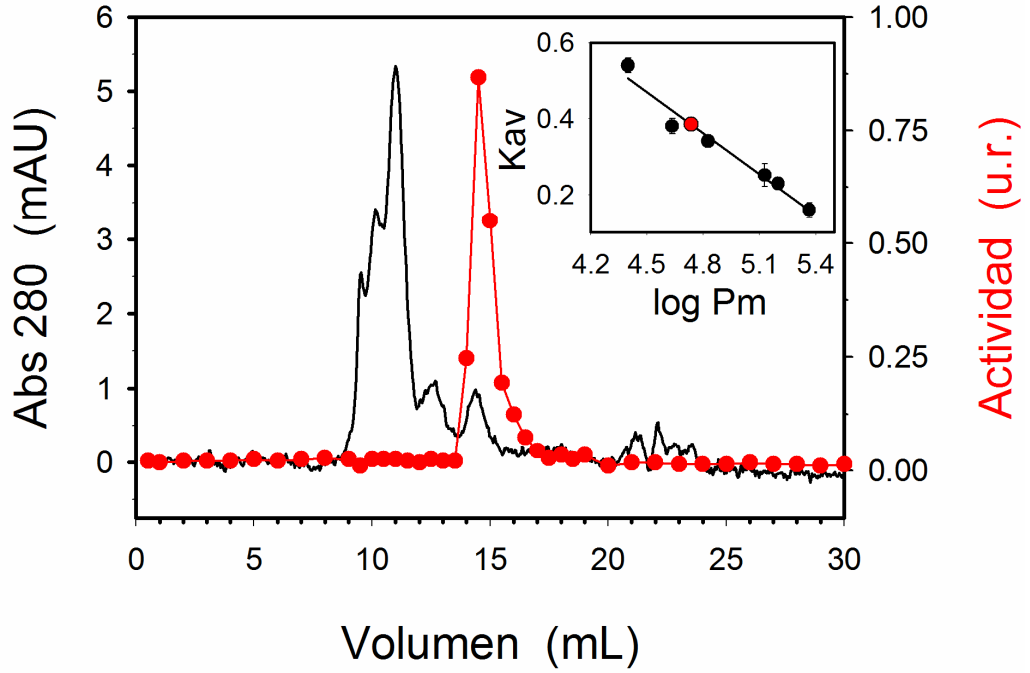
$$K_{av} = \frac{V_e - V_0}{V_t - V_0}$$

K_{av} es fácilmente calculable y permite la determinación de pesos moleculares sólo midiendo los volúmenes de elución de la muestra y estándares (incluyendo para **V_0** y **V_t**).

Cromatografía de exclusión molecular / filtración en gel

Aplicación. Determinación del peso molecular de proteínas

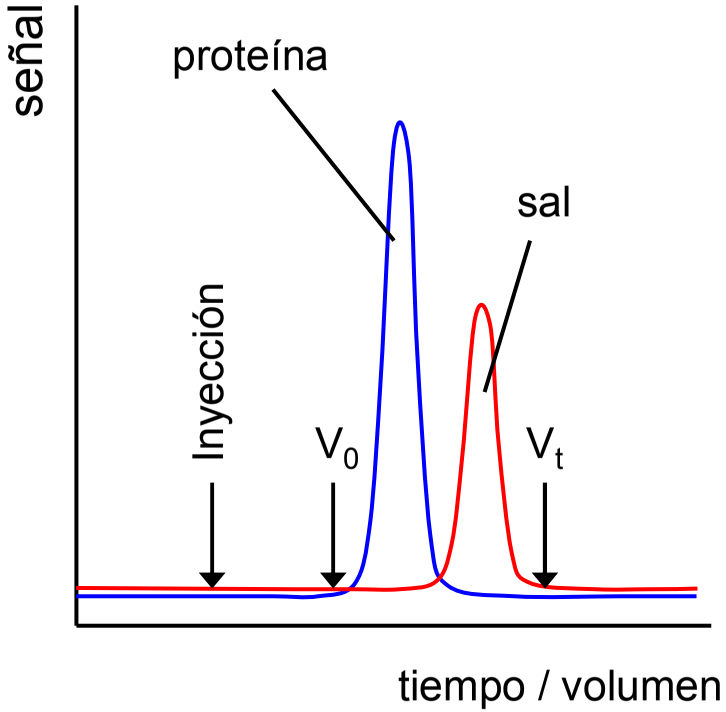




Purificación de una enzima por cromatografía de filtración en gel en dextrano entrecruzado.

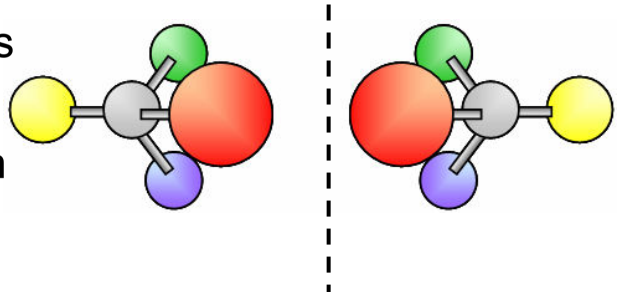
Cromatografía de exclusión molecular / filtración en gel

Aplicación. Eliminación de tampones y sales (desalting)

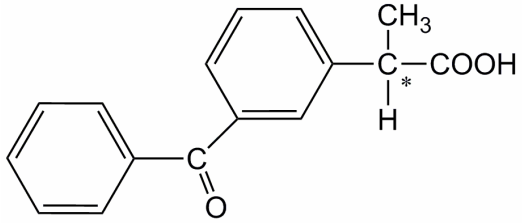


- Separación en grupos, moléculas pequeñas frente a macromoléculas, sin un fraccionamiento de las mismas.
- Utilidad en "**desalar**" muestras biológicas, para eliminar rápidamente tampones o sales provenientes de pasos de extracción o purificación.
- Las matriz más utilizadas es sefarosa entrecruzada.

Cromatografía quiral

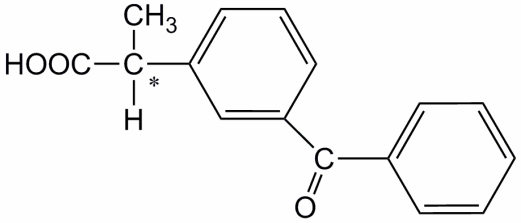


- Separación de moléculas ópticamente activas (con centros quirales).
- Quiral es aquella molécula no superponible con su imagen especular.
- Importancia bioquímica y por ello, en la industria farmaceútica. El 60% de los medicamentos son quirales, y de ellos el 45% se venden como racematos.
- Las únicas diferencias entre enantiómeros se observan en **entornos quirales**.
- Para la separación cromatográfica se necesita una fase estacionaria quiral.



S-quetoprofeno

Analgésico, antiinflamatorio



R-quetoprofeno

Previene pérdida
de hueso periodontal

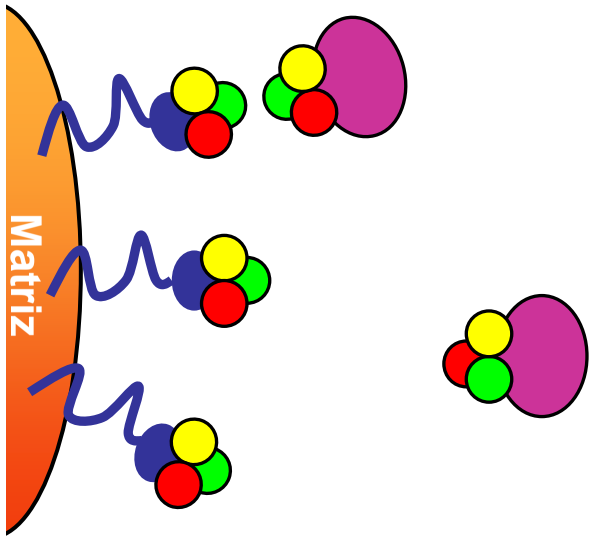
Cromatografía quiral

- Inmovilización de una molécula quiral que interacciona con la muestra.

- El reconocimiento implica interacciones de puente de hidrógeno, dipolares, transferencia de carga y/o de bloqueo estérico.

Ejemplos

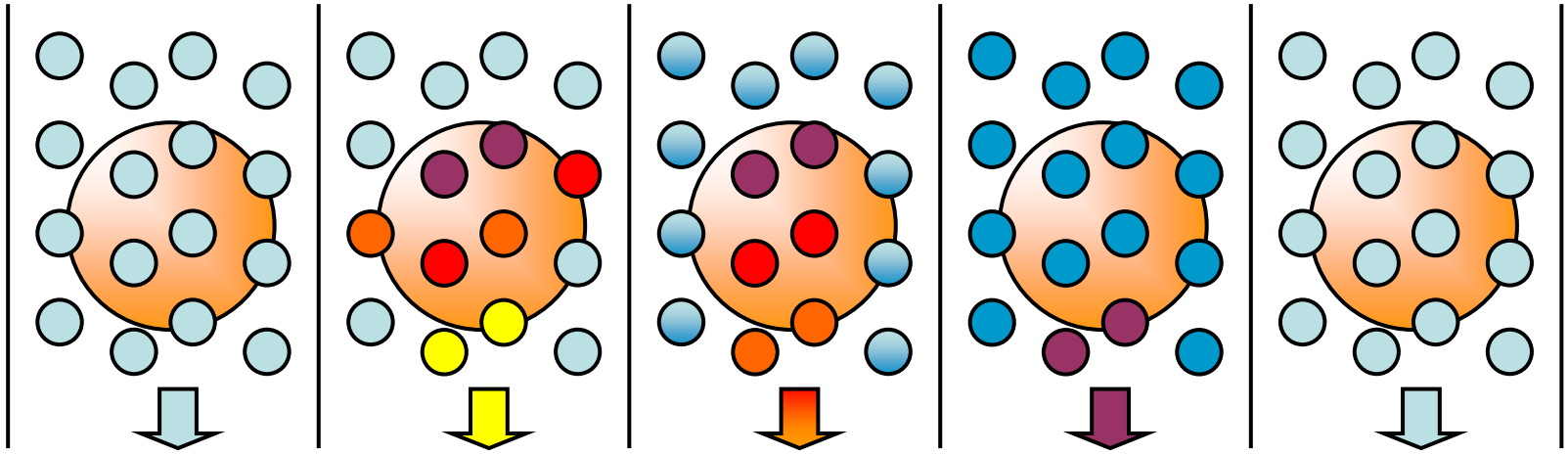
Componente quiral	Aplicación
(R)-fenilglicina (R)-naftilglicina	ésteres, amidas, alcoholes, cetonas
(S)-valina (S)-leucina	ác. carboxílicos
(S)-prolina (S)-indoline-carboxílico	aminas, amidas, amino alcholes



Cromatografía de adsorción

- La matriz interacciona reversiblemente con todos o parte de los componentes de la muestra.
- Técnicas diferentes en función del tipo de interacción que se utilice.

Proceso general:



1. Equilibrado. Condiciones iniciales para que interaccionen las moléculas de la muestra

2. Aplicación y Adsorción. Los componentes que no se unen son lavados de la columna.

3. Desorción. Condiciones de elución que perjudican la interacción con la matriz. Pasos o gradiente.

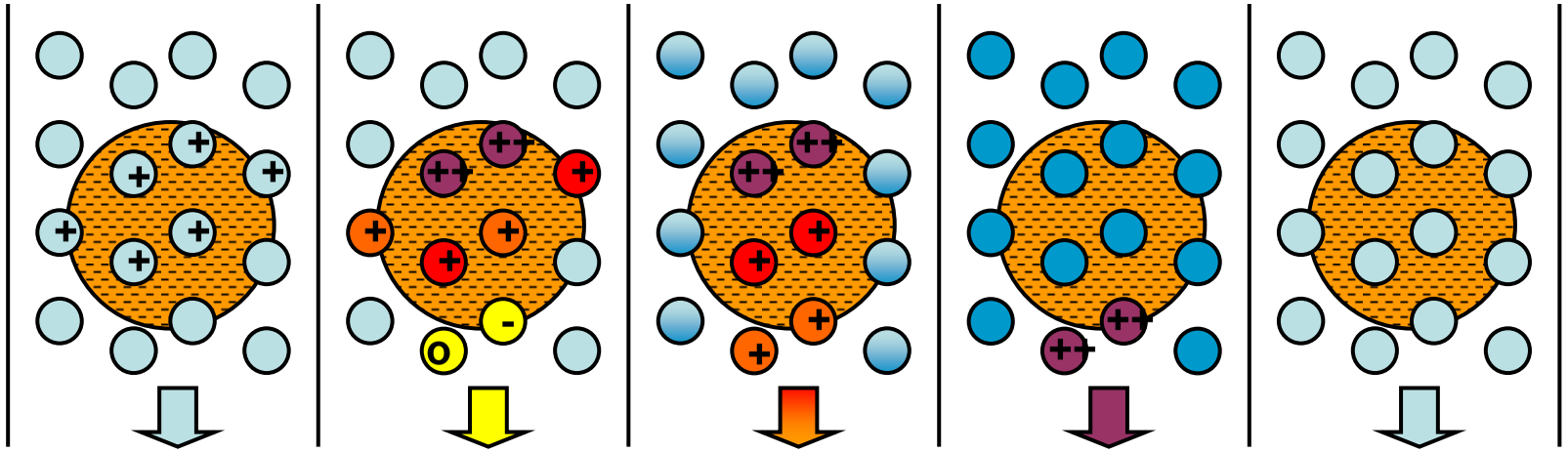
4. Lavado. Condiciones de elución más drásticas para que eluya el resto de componentes.

5. Regeneración. Re-equilibrado de las condiciones iniciales para la siguiente separación cromatográfica.

Cromatografía de intercambio iónico (IEX)

- Es una cromatografía de adsorción que se basa en las fuerzas electrostáticas creadas entre las especies de la muestra y la fase estacionaria.
- La separación depende de la adsorción reversible de las moléculas cargadas de soluto en los grupos intercambiadores de iones de carga opuesta.

Proceso:



1. Equilibrado. **2. Aplicación y Adsorción.** **3. Desorción.** **4. Lavado.** **5. Regeneración.**

Cromatografía de intercambio iónico (IEX)

-Puesto que la separación depende de la carga, el pH de la fase móvil es un factor crítico en IEX.

Para las moléculas de la muestra, la carga es mayor cuanto más alejado esté el pH de la fase móvil del valor de su punto isoeléctrico:

$$pH = pI \rightarrow z = 0$$

$$pH < pI \rightarrow z = (+)$$

$$pH > pI \rightarrow z = (-)$$

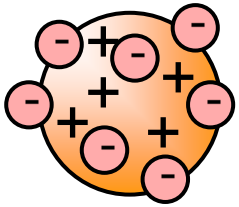
-Los disolventes más utilizados como fase móvil son agua con sustancias tamponadoras a baja concentración (20-50 mM) al pH elegido para las condiciones iniciales.

-La elución de las especies retenidas se puede llevar a cabo cambiando el pH del medio o aumentando la fuerza iónica (generalmente). El uso de sales aporta los contra-iones necesarios para la fase estacionaria. Así compiten con las cargas de los componentes de la muestra.

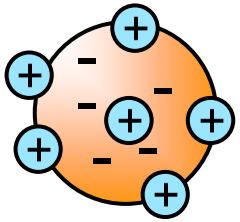
- El componente que tenga mayor carga contraria a la fase estacionaria queda más retenido y eluye más tarde.

Cromatografía de intercambio iónico (IEX)

Matrices: IEX aniónica y catiónica



Intercambiador aniónico,
con contraiones



Intercambiador catiónico,
con contraiones

Intercambiadores aniónicos	**Grupo funcional**
Dietilaminoetil (DEAE)	$-O-CH_2-CH_2-N^+H(CH_2CH_3)_2$
Amonio cuaternario (Q)	$-O-CH_2-CHOH-CH_2-O-CH_2-CHOH-CH_2-N^+(CH_3)_3$
Intercambiadores catiónicos	**Grupo funcional**
Carboximetil (CM)	$-O-CH_2-COO^-$
Metilsulfonato (S)	$-O-CH_2-CHOH-CH_2-O-CH_2-CHOH-CH_2SO_3^-$

Intercambiadores fuertes (Q y S)

- Interacción más fuerte
- Sufren menos variaciones en su capacidad de carga en función del pH
- Rango mayor de pH de trabajo

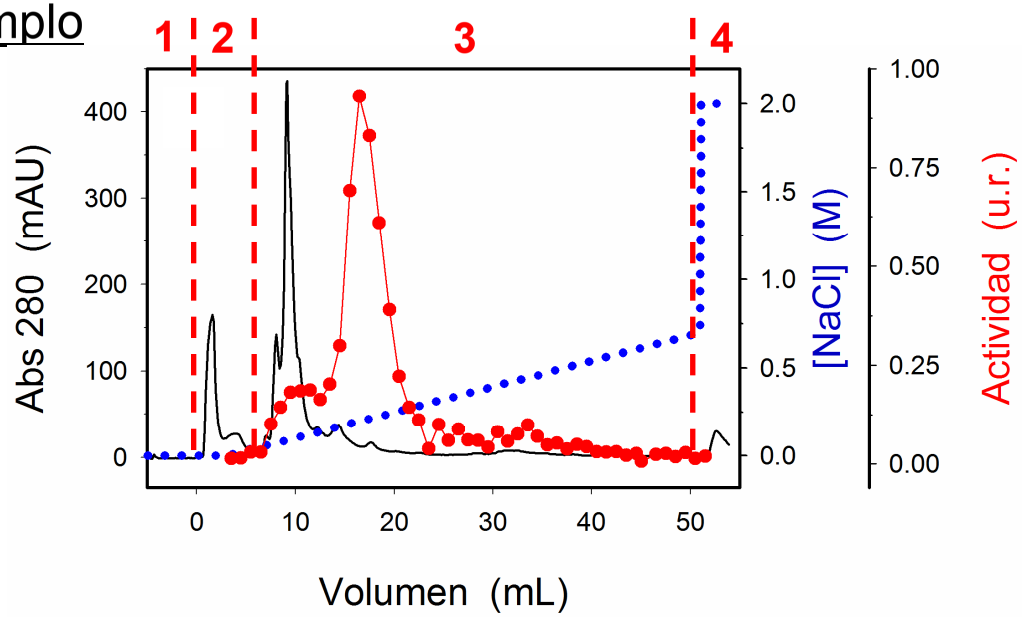
Cromatografía de intercambio iónico (IEX)

Aplicaciones

- Es la técnica cromatográfica más frecuente en la en la separación y purificación (fácilmente escalable a escala semi-preparativa) de proteínas, polipéptidos, ácidos nucleicos y otras biomoléculas cargadas.

- Se suele utilizar como primer paso en una estrategia combinada de purificación de proteínas por su alta capacidad de carga y limitado efecto en la estructura / actividad.

Ejemplo



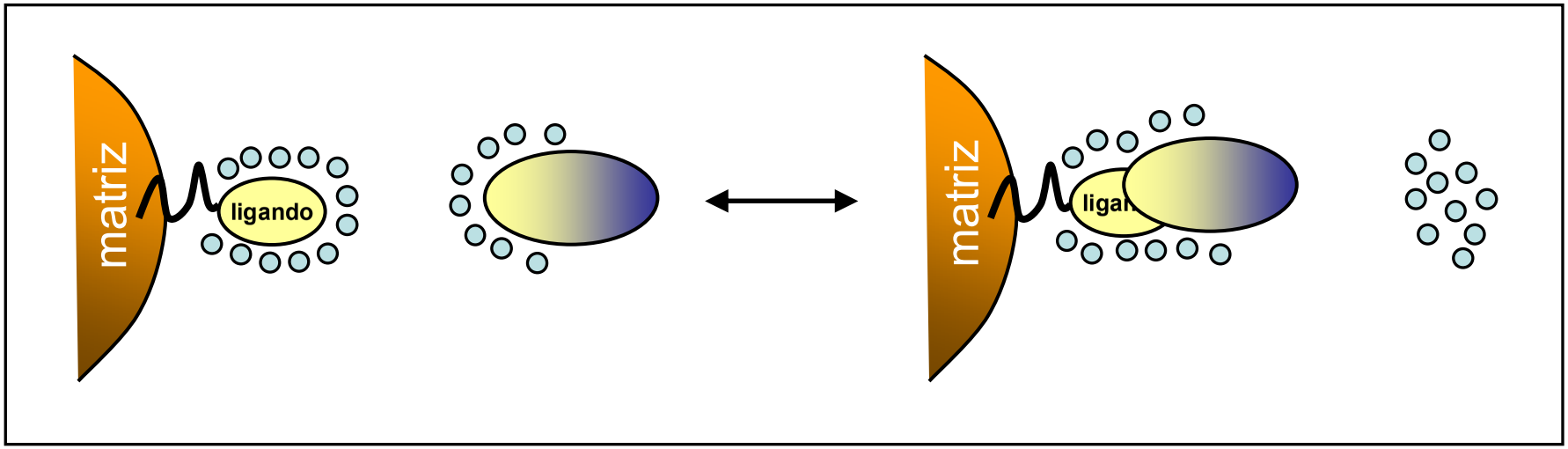
Purificación de una enzima por cromatografía de intercambio aniónico, en una columna de matriz de poliestireno y divinilbenzeno (15 µm de tamaño de partícula) derivatizada con grupos trimetilamonio (Q).

Cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC)

- Cromatografía de adsorción que se basa en las interacciones hidrofóbicas creadas entre las especies de la muestra y una fase estacionaria hidrofóbica.

- La separación depende de la adsorción reversible de las partes hidrofóbicas de las moléculas (“parches hidrofóbicos” en el caso de proteínas).

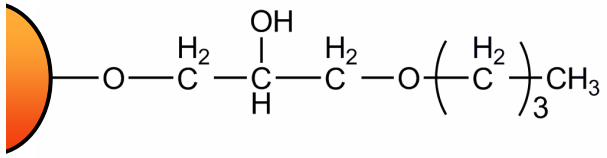
- Adsorción propiciada por sales anti-caotrópicas (propician el orden en las moléculas de agua y estabilizan interacciones intramoleculares de tipo no covalente y no iónico: hidrofóbicas, van der Waals y puentes de hidrógeno), que son formadoras de estructuras. Son las mismas sales responsables del efecto “salting-out” en la precipitación fraccionada de proteínas.

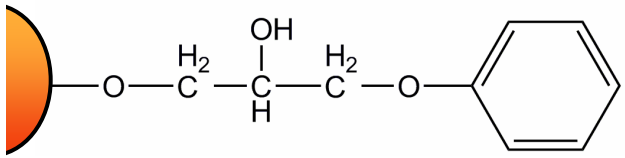


Cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC)

-Matriz

- La separación depende de la adsorción reversible de las moléculas a la matriz que está derivatizada con grupos hidrofóbicos alquilo o arilo.
- En general, cadenas lineales hidrocarbonadas (alquilo) muestran un carácter hidrofóbico puro, mientras que los ligando tipo arilo tienen un tipo de comportamiento mixto donde las interacciones arométicas se suman a las hidrofóbicas.





-La capacidad de carga aumenta con la longitud de la cadena carbonada, para un mismo grado de sustitución.

- La elección entre ligandos alquilo o arilo es empírica y debe ser estudiada para cada separación cromatográfica.

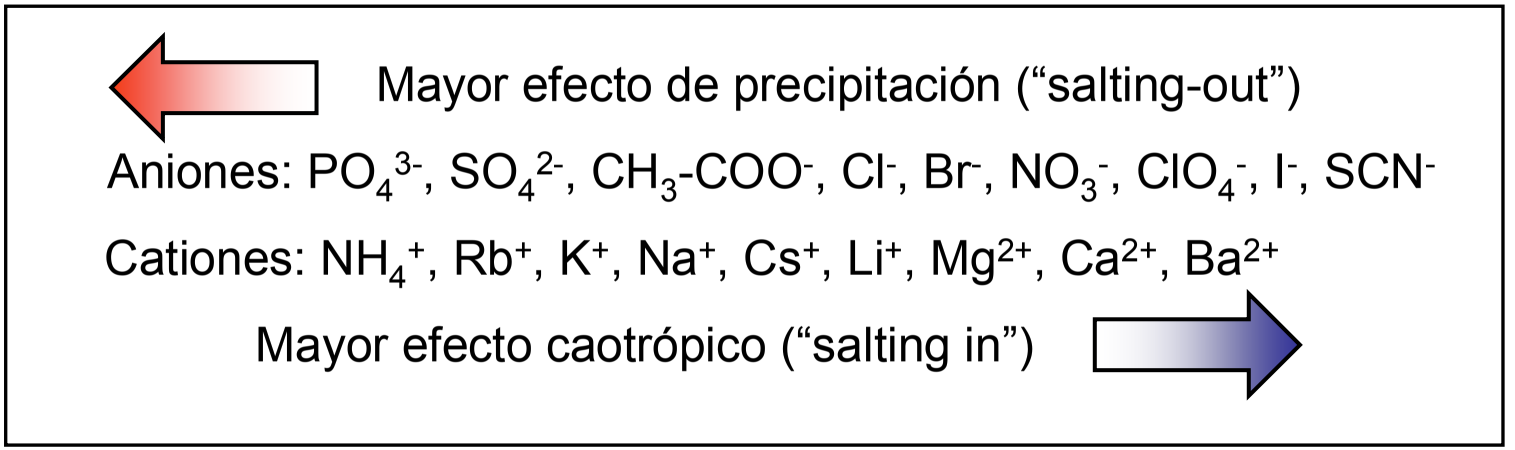
Cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC)

- Fase móvil

- La adición de sales anticaotrópicas (‘‘salting out’’) al tampón de equilibrio y a la muestra antes de su inyección, promueven las interacciones entre las moléculas de la muestra y el ligando de la matriz.

- En el caso de proteínas, el aumento en la concentración de sales provoca un aumento en la cantidad de proteína unida de manera lineal hasta una concentración de sal, y a partir de ahí el aumento continúa de manera exponencial a la concentración de sal.

-Serie de ***Hofmeister*** para la precipitación de proteínas:



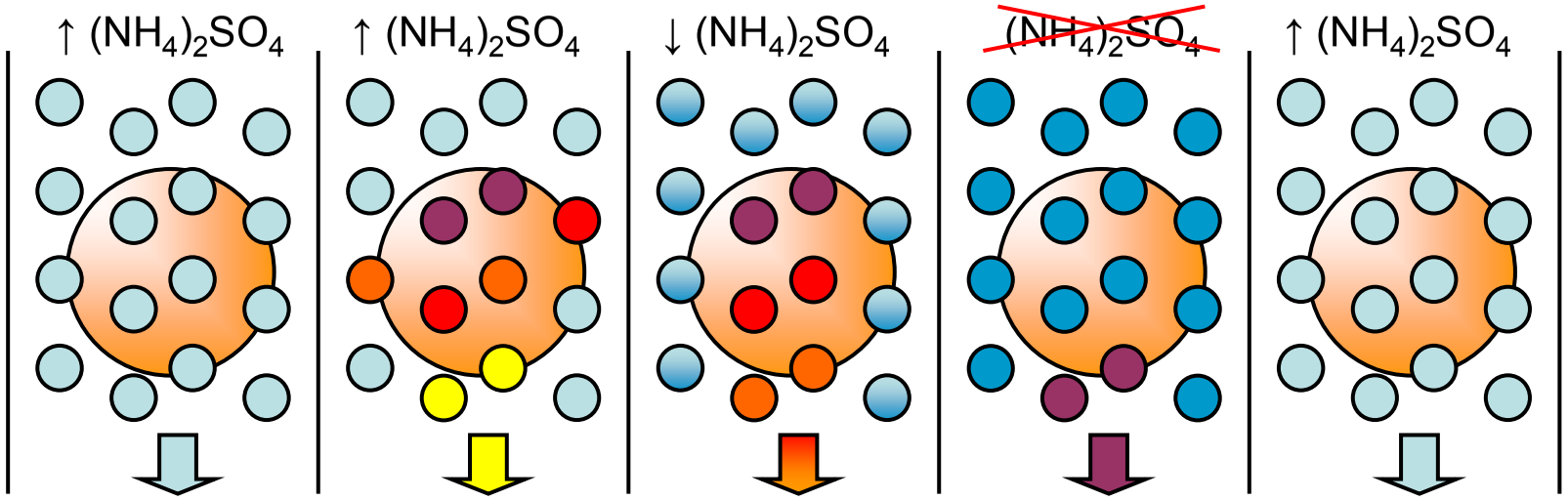
Cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC)

- Adsorción propiciada por las sales “salting out”.

-La elución se provoca con un descenso en la concentración de la sal de la fase móvil.

- Separación de los componentes de la muestra en función de los grupos hidrofóbicos expuestos en la superficie.

- Atención en el trabajo con proteínas para evitar condiciones muy drásticas (tipo de ligando principalmente) que afecten irreversiblemente a la estructura de la proteína (desnaturalización).

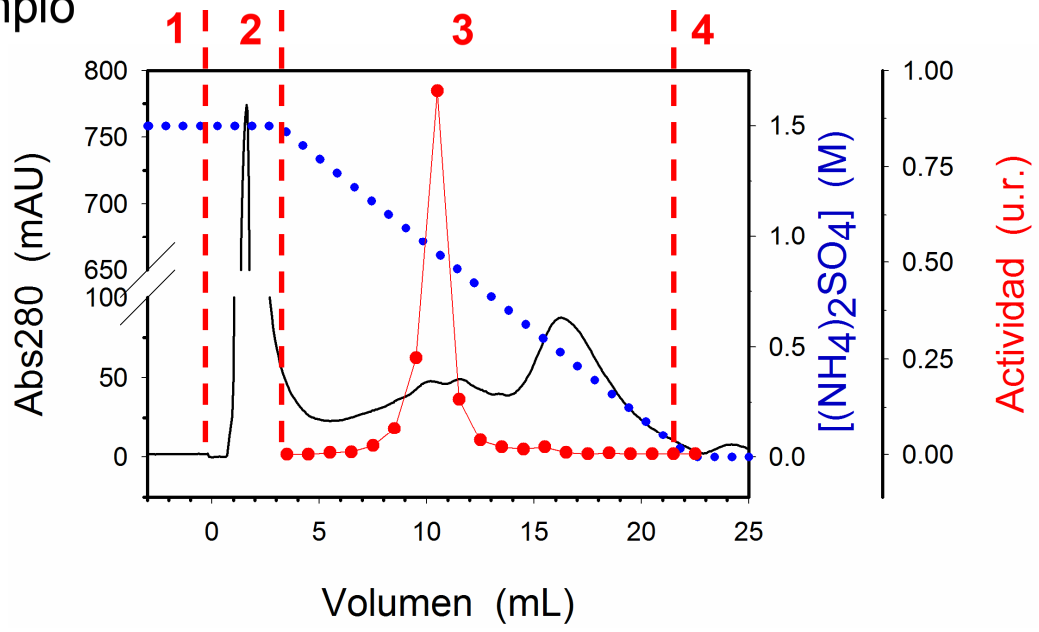


Cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC)

- La base para al adsorción de biomoléculas a los medios de cromatografía de interacción hidrofóbica es complementaria a los de la cromatografía de intercambio iónico y filtración en gel. Por ello puede utilizarse en estrategias combinadas de purificación.

- HIC es lo suficientemente sensible como para ser influenciada por la presencia de grupos no-polares normalmente escondidos en la estructura terciaria de proteínas pero que pueden ser expuestos si la cadena polipeptídica no está correctamente plegada.

Ejemplo



Purificación de una enzima por cromatografía de interacción hidrofóbica, en una columna de matriz de poliestireno y divinilbenzeno (15 µm de tamaño de partícula) derivatizada con grupos isopropilo (ISO).

Cromatografía de afinidad

- Separar biomoléculas (proteínas) en base a una interacción reversible entre una proteínas (o grupo de proteínas) y un ligando específico acoplado a una matriz cromatográfica.

-La técnica es ideal para la captura de biomoléculas siempre que exista un ligando disponible para la proteína de interés.

- Tiene muy alta selectividad y por ello alta resolución. Así mismo suele tener gran capacidad de carga de la proteína de interés, alto rendimiento y muy alta purificación de la muestra.

-Las proteínas objetivo se recogen en una forma purificada y concentrada.

-Las interacciones entre la proteína y su ligando pueden ser el resultado de interacciones electrostáticas, hidrofóbicas, de fuerzas de van der Waals y/o puente de hidrógeno.

Cromatografía de afinidad

-Una purificación exitosa requiere un ligando bio-específico que pueda ser unido covalentemente a una matriz cromatográfica.

- El ligando acoplado a la matriz debe retener su capacidad de unión específica por las moléculas objetivo y, después de lavar el material que no ha interaccionado, la unión entre el ligando y la proteína objetivo debe ser reversible para permitir eluir a la proteína en una forma activa.

- Cualquier componente se puede usar como ligando para unir a una pareja.

- Interacciones biológicas típicas usadas en cromatografía de afinidad son:

- Enzima ↔ análogo de sustrato, inhibidor, cofactor
- Anticuerpo ↔ antígeno, virus, célula
- Lectina ↔ polisacárido, glicoproteína, receptor de superficie celular, célula
- Ácido nucleico ↔ secuencia complementaria, histonas, polimerasa, proteína de unión al ADN
- Hormona, vitamina ↔ receptor, proteína transportadora
- Glutatión ↔ proteínas de fusión GST o glutatión-S-transferasa
- Iones metálicos (Ni) ↔ proteínas de fusión Poly-His, proteínas nativas con histidinas cisteínas y/o triptófanos en su superficie.

Cromatografía de afinidad

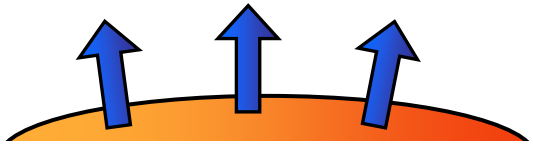
Proceso

- Adsorción propiciada por un tampón de unión ("binding buffer") que fomenta la interacción.

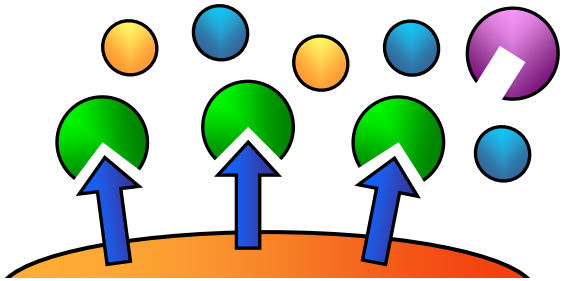
-Muestra aplicada en las mismas condiciones. La molécula objetivo se une al ligando.

- La molécula objetivo se recupera cambiando las condiciones para favorecer la elución. Puede ser una elución específica usando un ligando competitivo o inespecífica, cambiando el pH, fuerza iónica o polaridad. La muestra se recoge purificada y concentrada.

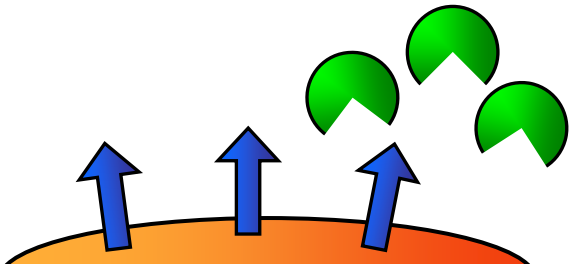
1. Equilibrado.



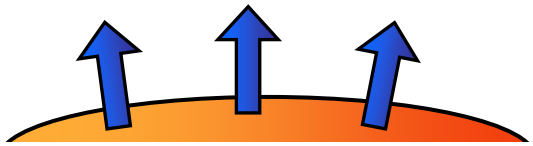
2. Aplicación y Adsorción.



3. Desorción.



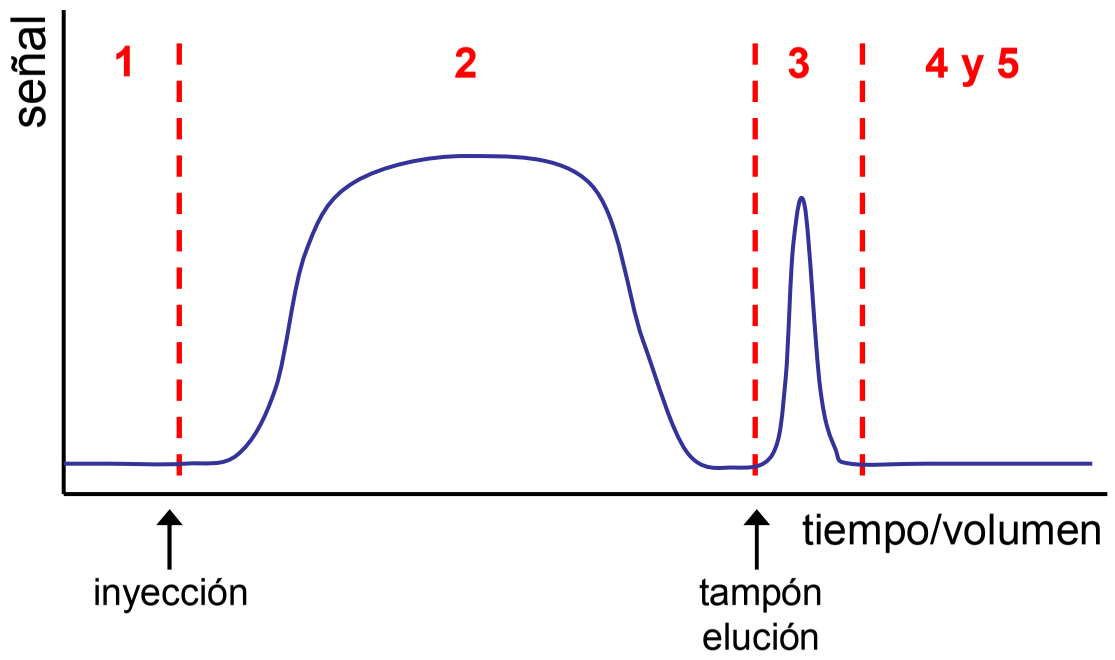
5. Regeneración.



Cromatografía de afinidad

- En un solo paso, la purificación por afinidad puede ofrecer un gran ahorro de tiempo sobre una estrategia en varios pasos con técnicas menos selectivas.
- El efecto concentrador permite procesar grandes volúmenes de muestra
- Las moléculas objeto de la purificación se pueden obtener de mezclas biológicas complejas, y pequeñas cantidades se pueden purificar de gran cantidad de sustancias contaminantes.

Modelo

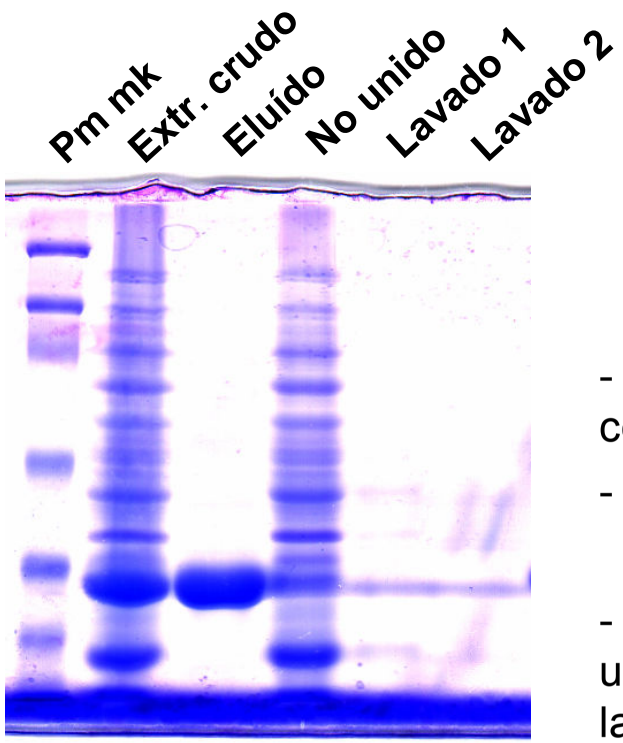


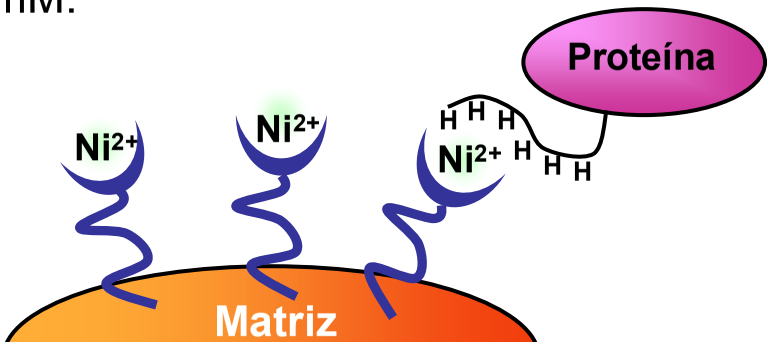
Después de la elución de la muestra (paso 3) se procede a regenerar la columna o volver a las condiciones iniciales en las que volverá a interactuar más muestra por afinidad (paso 5).

Cromatografía de afinidad

Ejemplo: Purificación de proteínas de fusión Poly-His

- El ligando son cationes divalentes de Ni^{2+} o Cu^{2+}.
- Condiciones nativas normales son adsorción y lavado con tampón fosfato pH 8.0, 50 mM, con NaCl 0.3 M y elución con el mismo tampón incluyendo imidazol 250 mM.





- Purificación de proteínas de fusión recombinante con cola de histidinas (poly-His).
- Matriz de agarosa con quelante para Ni^{2+}.

- Ejemplo: Proteína recombinante expresada en E. coli, utilizando directamente el extracto celular para purificar la proteína objetivo.