

LA CROMATOGRFÍA Y SUS APLICACIONES A LA BIOLOGÍA*

Dra. MARGARITA CORDIER

Miembro correspondal de la Real Academia de Medicina de Barcelona

LA cromatografía es un método de análisis que goza actualmente de un favor considerable, lo cual se explica por los resultados sumamente notables, y quizá podría decirse espectaculares, que con ella se han obtenido en todos los dominios de la química y tal vez de una manera más especial en los de la química biológica.

Con el nombre de cromatografía se comprenden procedimientos bastante distintos; GORDON, MARTÍN y SYNGE dieron de ella, en 1944, la siguiente definición: *procedimiento técnico en análisis por percolación de un líquido a través de una materia finamente dividida o porosa, sin distinción de los procesos fisicoquímicos que conducen a la separación de las sustancias del aparato.*

Este procedimiento se empleó, en realidad, en el año 1906, en que el botánico ruso TSWETT lo aplicó para separar los distintos constituyentes de la clorofila. Para ello hizo pasar una solución de materias colorantes de plantas verdes a través de una columna de carbonato de calcio; en ésta aparecieron varios discos distintamente coloreados: los pigmentos se habían separado unos de otros. Desgraciadamente, el trabajo de TSWETT, publicado en lengua rusa, fué poco conocido y puede decirse que no volvió a emplearse hasta 1931 en que KUHN y LEDERE lo utilizaron para la separación de los carotenos y de los xantófilos, empleando para ello una columna de alúmina activada por varias suspensiones en agua, separadas mediante diversos secados. Estos trabajos fueron desarrollados también por WALKER y KARRER que llegaron por este procedimiento a la identificación de más de 40 carotenoides distintos, mientras que WILLSTATER no había aislado más que 5. Este procedimiento constituye la llamada cromatografía en columna; el proceso fisicoquímico que se emplea en él lo constituye la diferencia de los coeficientes de absorción del sólido para los diferentes constituyentes de la mezcla. Los mayormente absorbidos, es decir, aque-

* Conferencia pronunciada el 28 de abril en la Real Academia de Medicina de Barcelona. Presidencia: Dr. COROMINAS.

llos que se fijan más fácilmente en la superficie del sólido, quedan retenidos en la parte alta de la columna, mientras que los menos absorbidos quedan fijados más abajo.

A este procedimiento inicial se hicieron diferentes modificaciones por REICHSTEIN en 1938 y, sobre todo, por TISELIUS en 1940-43 con su método de análisis frontal, que consiste en hacer caer continuamente la solución estudiada a través de la columna, recoger fracción por fracción la solución que la ha atravesado, y medir las concentraciones de las sustancias en las diferentes porciones por un procedimiento u otro, por ejemplo midiendo su índice de refracción.

Pero el paso más importante fué dado en 1941 por MARTÍN y SYNGE con la cromatografía de partición. Su principio es muy distinto del de la absorción. En efecto, para ello se pone la mezcla que deba estudiarse en presencia de dos disolventes distintos; cada uno de los constituyentes de la mezcla tiene un determinado coeficiente de solubilidad en cada uno de los dos disolventes y, por consiguiente, un coeficiente de partición característico: se llama coeficiente de partición de una sustancia dada entre dos disolventes a la relación de sus coeficientes de solubilidad en aquellos dos disolventes.

La propiedad física fundamental empleada para la separación de los constituyentes de la mezcla es, pues, la desigualdad de los coeficientes de partición de las sustancias constituyentes.

Prácticamente, uno de los disolventes es siempre el agua, y el otro un disolvente orgánico; el agua es sostenida por un gel de sílice o de almidón impregnado y dispuesto en una columna; las propiedades absorbentes de la sílice o del almidón no deben intervenir; las sustancias que deben separarse se vierten sobre una columna, disueltas en un disolvente orgánico no miscible con el agua. En estas condiciones, es natural que las sustancias más solubles en el agua quedarán retenidas en la parte alta de la columna, mientras que las más solubles en el disolvente orgánico llegarán más abajo. El disolvente empleado suele ser el butanol o una mezcla cloroformo-butanol de concentración mayor o menor en este último cuerpo. Se emplea también la mezcla ciclohexanol-isopropanol. Una de las grandes ventajas de este método es que una sustancia dada es siempre eliminada, es decir, arrastrada por el disolvente de igual manera, independientemente de los demás constituyentes de la mezcla, cosa que no ocurre con el método de adsorción.

En los primeros análisis practicados por cromatografía, se trataba de separar sustancias coloreadas, por lo cual se dió aquel nombre al método; por él podían fácilmente distinguirse los constituyentes del producto examinado, que aparecían en la columna que los había retenido. Pero poco

a poco, vistos los primeros éxitos obtenidos se pensó en realizar el análisis de sustancias incoloras, lo cual hacía necesario el empleo de diversos artificios para poner en evidencia los productos separados. Son varios los que pueden emplearse: en primer lugar, antes de proceder al análisis, se pueden transformar los cuerpos en derivados coloreados: así, se transforman los fenoles en azóicos coloreados mediante el empleo de la paranitranilina diazoada; en segundo lugar, se puede añadir a la columna un indicador coloreado, de acidez (es decir, de ph) conveniente, como el metil naranja o el antociano, que dan a la columna un color uniforme: los diferentes constituyentes de la mezcla, que tienen ph distintos, comunicarán al indicador coloreado matices diferentes con lo cual podrán separarse uno de otro. Otro método es el llamado del pincel; cuando el líquido objeto de análisis se ha vertido sobre la columna se saca ésta del tubo que la contenía y se traza de arriba abajo de la misma una raya con un pincel mojado en un reactivo convenientemente escogido como, por ejemplo, permanganato de potasio; este reactivo toma un color distinto al ponerse en contacto con cada una de las sustancias que se encuentran fijadas en la columna. En algunos casos, la comprobación viene facilitada por los mismos cuerpos, cuando son fluorescentes, como los ácidos aminados o las pterinas; basta pues iluminar la columna con un foco de luz ultravioleta para que las sustancias fijadas se manifiesten por sí mismas; en algunas ocasiones se impregna la columna, antes de verter en ella la materia objeto de examen, de una sustancia fluorescente, que suele ser una solución de sulfuro de cinc a 2,5 %.

Mediante estos métodos se han podido obtener resultados muy notables: pocos miligramos de proteína bastan para separar hasta 8 ácidos animados neutros. Se han separado los esteres naturales de la vitamina A extraída de los aceites de hígado de pescado. Para este objeto MÜLLER se servía de una columna de alúmina de tres actividades distintas, es decir, de cualidades de adsorción diferentes. Este método se utilizó también para separar unas de otras hormonas que en estado natural se hallan asociadas, como la estrona, el estriol y el estradiol; para la separación y purificación de antibióticos, como la estreptomycin; ésta, en solución metanólica ácida se fija por adsorción en alúmina ácida y se la separa con el metanol acuoso; la estreptomycin va acompañada, en los medios de cultivo, por otro antibiótico, la espretotricina, que se purifica sobre alúmina o carbón; la penicilina fué purificada por ABRAHAM y CHAIN por cromatografía sobre alúmina; de esta manera se la separa de los pigmentos amarillos y de las sustancias pirógenas que la acompañan; FISCHBACH y sus colaboradores emplean para esta purificación la cromatografía de partición sobre gel de sílice impregnada con un tampón de fosfato de pH igual a 6,4; se limpia con

éter saturado de agua; la penicilina se dosifica por yodometría y, por este procedimiento, la penicilina K, que es la menos hidrófila, es la que aparece primero.

El estudio de los líquidos ha dado lugar a numerosos trabajos de los cuales citaremos en particular la separación de los glicéridos sobre columnas de alúmina, de tierras ácidas o de gel de sílice; la alúmina absorbe bien los glicéridos de peso molecular elevado y la gel de sílice los de peso molecular más bajo. TISCHER y ILLNER han estudiado la cera de abejas que, por cromatografía, puede neutralizarse y decolorarse; REICHSTEIN ha hecho numerosos trabajos por el método llamado de cromatograma líquido en esteroides, en los constituyentes de la suprarrenal y en los ácidos biliares. DOBRINER y sus colaboradores han estudiado sistemáticamente los cetoesteroides de la orina por cromatografías repetidas, que han hecho necesarias de 100 a 200 separaciones sobre alúmina y sobre silicato de magnesia: por este medio han aislado 42 sustancias diferentes.

Es importante también señalar la cromatografía sobre cambiador de iones. Se da este nombre a sustancias, que pueden ser ácidas a básicas, que cambian fácilmente su hidrógeno o sus metales o sus grupos ácidos con los cuerpos con que entran en contacto. En 1935 ADAMS y HOLMES pudieron lograr la fabricación de la primera resina sintética cambiante.

Más tarde pudieron prepararse muchos más cuerpos de esta naturaleza. La condensación de un formol con un polifenol de grupo sulfónico da una resina cambiante de cationes, mientras que la condensación de un formol con un polifenol de grupo amina produce una amina cambiante de aniones; el cuerpo obtenido es muy esponjoso y el cambio de los iones se hace por todo el volumen de aquel. Actualmente existe gran diversidad de resinas presentadas bajo marcas registradas (Amberlitas, Wolfatitas, Fluoridinas, Permutitas, etc.) que tienen caracteres distintos y permiten resolver problemas muy diversos.

En el dominio de la biología se ha podido realizar la separación de ácidos aminados, incluso de los más próximos entre sí: los ácidos aminados básicos, lisina, arginina, histidina, son absorbidos por resinas ácidas (fluoridina XXF-H) o por la alúmina llamada básica, es decir, que contiene iones Na; la citrulina de la sangre queda retenida por una columna de amberlita IRI-100; los ácidos aminados ácidos, como los ácidos aspárticos y glutámico, así como la cistina, se separan por un cambiador de aniones, tal como la alúmina tratada por el ácido clorhídrico normal, que ha quedado cargada de iones Cl (alúmina ácida). Los ácidos aminados neutros tienen, en el alcohol de 90°, una carga negativa, por lo cual pueden fijarse sobre alúmina ácida; pero, además, un simple tratamiento por el formol a 10 % hace que estos cuerpos sean suficientemente ácidos para ser separa-

dos por aquel mismo absorbente: tal ocurre con la glucocola, la serina y la treonina. Pueden emplearse también para las separaciones el carbón y el gel de sílice.

El proceso real por el cual tienen lugar las separaciones no está completamente aclarado, pero se sabe que la cantidad de iones que se fija en la resina aumenta con la concentración de aquellos en la solución; por otra parte, el cambio de iones va acompañado de un aumento de volumen de la resina, y parece que la afinidad de un ion dado para la resina se halla en relación directa con el cambio de volumen de la misma. El cambio parece ser debido, en parte, a un fenómeno de absorción y, por otra parte, a la atracción electrostática que se ejerce entre el cuerpo examinado, por ejemplo la proteína, y la resina; esta atracción depende de la carga total de la proteína y, en menor parte, de la distribución de esta carga; por esta razón, será posible separar proteínas que tengan, o bien la misma carga total y configuraciones diferentes (lisocima y citocromo C), o bien cargas diferentes y el mismo peso molecular (carboxihemoglobina del buey y la de carnero fetal).

Citaremos también la separación de los azúcares fosfatados. La solución que deba analizarse se filtra por un cambiador de cationes y luego por un cambiador de aniones, por lo cual las impurezas pasan al producto filtrado; se recuperan los cuerpos fijados haciendo pasar alcohol por la columna de resina. Este método es aplicable para todos los fosfatos orgánicos.

Por este procedimiento puede realizarse un análisis cuantitativo: una vez fijados en la columna los constituyentes de la mezcla, se vierten sobre aquella los disolventes que arrastran los productos fijados: a este procedimiento se le llama *elución*; se recogen los eluidos centímetro cúbico por centímetro cúbico; se analizan éstos cuantitativamente por los procedimientos clásicos, y la suma de todas las cantidades encontradas en los eluidos sucesivos, da la composición total de la mezcla analizada.

Pero la técnica más interesante y que ha dado a la cromatografía su extraordinario desarrollo, es el método llamado de cromatografía en papel. Es debido a los autores ya citados: J. P. MARTÍN, Director del Servicio de Química Física del Instituto de Investigaciones Médicas de Londres y R. L. M.; y SYNGE, bioquímico del Instituto de Investigaciones Rowett (Aberdeen Shire) que lo fijaron en 1944 y que valió a sus autores la atribución del premio Nobel en Química de 1952.

Hemos visto que MARTÍN y SYNGE habían imaginado la cromatografía de partición empleando columnas de gel de sílice; luego utilizaron las de almidón y después de celulosa. Entonces se les ocurrió la idea de emplear la celulosa, no ya en forma de columnas, sino simplemente en forma de

una hoja de papel de filtro. Este procedimiento se reveló enseguida como muy interesante. Pero se ha de tener en cuenta que ha de emplearse papel de filtro de grano absolutamente regular, del cual existen hoy varias marcas que se adaptan a los diferentes casos que puedan presentarse; citaremos, entre otros, el papel Whatman números 1, 3, 4, etc., etc., el Schleicher y Schüll número 597 y el Durieux número III. Una de las cualidades más notables de este procedimiento es la de que permite la separación de numerosos constituyentes con una cantidad sumamente pequeña de materia prima, por ejemplo algunas milésimas de miligramo.

He aquí, rápidamente, una descripción de este método. La dimensión de la hoja de papel depende del experimento que deba hacerse; su anchura puede variar entre unos pocos centímetros hasta 50 centímetros. Se marca, a pocos centímetros de uno de los bordes, un trazo con lápiz. En un punto de este trazo se deja caer con una micropipeta, por ejemplo una de las que sirven para el recuento globular, una cantidad conocida de la solución que se ha de estudiar; generalmente basta una sola gota; si no es así, después de dejar caer una gota se seca el papel antes de poner una segunda gota, con el objeto de que la mancha obtenida no sea demasiado grande. Luego, sosteniendo el papel verticalmente, se sumerge su parte inferior en una extensión de dos o tres centímetros, en la solución que se ha elegido como disolvente; ésta es una mezcla de agua con un líquido no soluble en la misma, pero que se sabe se pueden disolver los supuestos constituyentes de la mezcla. Todo esto se coloca en una caja de vidrio o de materia plástica, bien cerrada, de manera que su atmósfera esté constantemente saturada de vapor de agua y de vapor de disolvente. El solvente sube poco a poco por el papel, pasa por la mancha, la disuelve y arrastra sus constituyentes; pero cada uno de éstos tiene una velocidad particular de difusión en el papel impregnado de agua, y así quedan separados los diferentes constituyentes. Cuando se ve que el solvente ha alcanzado casi la extremidad superior de la hoja de papel lo cual requiere por lo general algunas horas, se suspende la operación, se saca la hoja de papel, y se seca a la temperatura del ambiente con un ventilador eléctrico o en una estufa alrededor de los 100°.

El proceso físico químico que da lugar a la separación es, indudablemente, muy complejo, hasta el punto de que los autores no han podido ponerse de acuerdo sobre su naturaleza; pero, en general, se considera que se trata de un fenómeno de partición entre los dos disolventes.

Otros creen que se trata de cierta analogía con una destilación fraccionada con reflujo total; partiendo de esta idea, MARTÍN y sus colaboradores han propuesto fórmulas que parecen ser sancionadas por la experiencia.

Cualquiera que sea el proceso y su interpretación teórica, los hechos

subsisten; cada constituyente de la mezcla se detiene en cierto punto del papel y se puede caracterizar por lo que se llama su Rf., que es la relación entre la distancia recorrida por el constituyente, considerada a partir de la mancha inicial y la distancia recorrida por el disolvente. Como se comprende, el Rf no es una constante absoluta de un cuerpo dado, sino que depende de la naturaleza del papel empleado, del disolvente, de la concentración ácida de éste y de la temperatura. Hemos de hacer notar que este último factor tiene gran importancia, que para un experimento muy delicado es conveniente colocar la caja en un termostato, con el objeto de que la temperatura del papel sea rigurosamente constante, y que, en términos generales, sin que sea necesaria tal precisión, importa que, por lo menos, la temperatura del ambiente no varíe más que de pocos grados mientras dure el experimento, sin lo cual éste carecería de sentido. Pero, para un papel determinado para un disolvente dado, y a cierta temperatura, el Rf de un cuerpo dado es constante y, por consiguiente, característico del mismo.

Se comprende, pues, que si se ha practicado un número suficiente de experimentos preliminares en condiciones perfectamente conocidas, se hayan podido medir los Rf de muchos cuerpos. Luego, podrán reconocerse éstos en las mezclas sometidas al análisis por la sola posición que ocupan en el papel.

Se ha ensayado gran número de disolventes, pero, en definitiva, no se emplean más que unos pocos: en primer lugar el fenol, que debe ser muy puro, y el butanol; se emplean también mezclas, como, por ejemplo, la siguiente: normal-butanol, ácido acético, agua, en las proporciones respectivas de 40, 10, 50, en volúmenes; bases pirídicas, sobre todo la colidina, piridina y acetona.

Para localizar las manchas obtenidas, que, por lo general, son incoloras y por consiguiente invisibles, puede procederse de diferentes maneras: puede pulverizarse sobre el papel o extender con el pincel un reactivo que dará una reacción coloreada con cada uno de los cuerpos fijados en el papel; se usa mucho la minhidrina, que da con los ácidos aminados compuestos de color generalmente azul púrpura, algunas veces amarillo o rojo; el nitrato de plata, que con los azúcares reductores como la glucosa, da un precipitado de plata reducida negro; en muchos casos, se utiliza la fluorescencia de los productos depositados, ácidos aminados, nucleoproteidos o pterinas; es decir, que basta, después de secada la hoja, examinar ésta a la luz ultravioleta para que aparezcan las manchas.

La técnica descrita corresponde a la cromatografía en una sola dimensión; pero se puede perfeccionar el sistema y obtener una mejor separación de los constituyentes practicando una cromatografía bidimensional. Se practica una primera operación siguiendo el esquema antes ex-

puesto; una vez desecada la hoja, se le da una vuelta de 90° se practica un nuevo trazo con el lápiz y se sumerge la hoja en un segundo disolvente; éste, al encontrar cada uno de los cuerpos separados, los arrastra de nuevo y perfecciona la primera separación; a menudo se emplea como primer solvente el fenol o butanol, y como segundo, la colidina. Se ha propuesto otra técnica, llamada del disco, descrita por primera vez en 1953 por M. H. HACK al practicar un análisis de líquidos. De una hoja de papel se corta un disco de 5,5 cm. de diámetro y se marca el centro del mismo. Se coloca este disco sobre una caja de Petri de 5 cm.; en el centro del papel se deja caer con una micropipeta, una gota de la solución de los lípidos que dejan analizarse en metanol, benceno o acetona, el diámetro de la mancha no debe de exceder de 8 mm.; se deseca mediante una corriente de nitrógeno; se añaden una o dos gotas de disolvente hasta que la mancha se ensanche hasta llegar a 10 mm. Se añade entonces el eluyente escogido en cantidades tales que el diámetro de la mancha aumente de 2 mm. por segundo; los mejores eluentes son la acetona, el benceno, el cloroformo o el metanol absolutamente anhidros; toda la operación se hace en cinco minutos. Después de desecar el papel por una corriente de nitrógeno, se le trata por los colorantes correspondientes, por ejemplo la sal de Reinach, y de esta manera van apareciendo en círculos concéntricos los diferentes componentes. Esta técnica, que es muy elegante, no parece, sin embargo, dar tan buenos resultados como se esperaba de ella.

Todo lo que hemos descrito hasta ahora hace referencia al análisis cualitativo; pero la cromatografía permite practicar también análisis cuantitativos; un trabajo muy cuidado de FISHER, PARSONS y MORRISON ha permitido encontrar una relación entre el diámetro de una mancha y la concentración de la solución inicial en la substancia fijada en esta mancha: la longitud de la mancha en el sentido del desplazamiento y la superficie de la misma son proporcionales al logaritmo de la concentración; parece que se obtienen mejores resultados con la superficie, por lo cual se procederá a medir ésta con un planímetro; si mediante estudios previos se ha podido trazar una curva superficie-logaritmo de la concentración, el conocimiento de la superficie permite determinar la concentración. Las cantidades absolutas de ácidos aminados fijadas en una mancha son del orden de 0,3 a 3 microgramos; este método de dosificación es, pues, comparable en sensibilidad a los métodos microbiológicos.

Otro procedimiento de dosificación consiste en medir la intensidad de la coloración adquirida por la mancha bajo la acción de un reactivo colorante; es evidente que esta coloración es proporcional a la cantidad de substancia fijada; se corta, pues, con precaución la mancha, se la coloca en un pequeño tubo de ensayo y se la trata primero, en el caso de los ácidos ami-

nados, por una solución de 5 % de minhidrina en agua de pH 7, saturada de butanol normal. Se calienta el tubo a 55° por espacio de cinco minutos y luego se le lleva a 80° durante uno o dos minutos más; dejado enfriar a la temperatura del ambiente, se extrae el color con una solución de acetona en agua a la concentración de 75 %; la intensidad del color se mide con un absorbímetro de Hilger utilizando microcélula (método de Naftalin).

Puede medirse también la intensidad de las manchas directamente sobre el mismo papel por medio de fotocolorímetro, más o menos precisas. Existen fotocolorímetros registradores, que permiten obtener una curva de los porcentajes de luz transmitida a través del papel, en función de la distancia medida a lo largo de la tira de papel. Se inscribe así exactamente la posición de las manchas y, por integración, se puede determinar su absorción total.

Otro método muy distinto es el de la retención: se funda en la formación sobre la hoja de papel de un complejo entre un reactivo y las sustancias que se hallan fijadas en las manchas; por ejemplo, los ácidos aminados forman complejos con el cobre; obtenido un cromatograma de tales ácidos aminados y una vez desecado, se le sumerge verticalmente a una profundidad de 3 cm. en una solución de acetato de cobre (adicionada de ácido acético para impedir la hidrólisis); la solución de sal de cobre asciende progresivamente por la hoja tiñéndola de color azul; pero donde hay un ácido aminado, se forma con la sal de cobre un complejo, lo que hace que por cierto espacio de tiempo se detenga la ascensión de dicha sal por la hoja de papel; esto hace que por encima de cada mancha de ácido aminado se forme una mancha blanca, cuya superficie es proporcional a la cantidad de ácido aminado situada inmediatamente por debajo de la misma.

Debemos citar todavía otro método de macrodosificación empleado en particular por ANDERSON y LEDERER: estos autores emplean una tira de pulpa de papel filtro de 4 a 5 mm. de grosor, cuya parte superior se moja con la solución que deba analizarse; ésta desciende progresivamente por el papel y el disolvente se recoge en la parte inferior en un cristizador; recogiendo por porciones sucesivas, se llegan a separar cuantitativamente elementos muy próximos unos a otros.

Veamos ahora algunas aplicaciones prácticas del método que acabamos de describir; diremos ante todo que el número de trabajos que emplean la cromatografía en papel es considerable y que no podremos exponer más que algunos de ellos.

En el terreno de la química biológica, este método de análisis, muy preciso y muy sensible, ha permitido la separación de muchos cuerpos próximos unos a otros, constitutivos de las proteínas, de los azúcares, de los nucleoproteidos, etc., lo cual informa, no solamente sobre su constitu-

ción química propiamente dicha, sino que permite seguir sus transformaciones en los organismos vivos, es decir, conocer mejor su metabolismo.

Este método fué aplicado por primera vez por MARTÍN y SYNGE para la separación de los ácidos aminados de ciertos péptidos obtenidos por hidrólisis parcial de las proteínas. De esta manera lograron identificar los numerosos ácidos aminados de un hidrolizado de lana (unos 40 péptidos distintos); identificaron las sustancias que pueden formarse a partir de la cistina en los tratamientos químicos de la lana. Otros autores aislaron los dieciséis ácidos aminados que forman las albúminas del suero sanguíneo y se identificaron los diecinueve dipéptidos de los ácidos aspárticos y glutámico. DENT ha estudiado los orines patológicos para conocer la suerte de las proteínas después de la digestión; ha identificado, por comparación, más de 60 ácidos aminados; en colaboración con SPEPTKA y STEWARD en 1947 ha estudiado los extractos alcohólicos de patatas por cromatografía bidimensional empleando como disolvente el fenol y la colidina; encontraron en ellos 21 ácidos aminados; en el momento de efectuarse la síntesis de las proteínas en el tubérculo, casi todos estos cuerpos desaparecen, excepto la glutamina, la asparagina, el ácido glutámico y el ácido aspártico.

CONDSEN y sus colaboradores establecieron la constitución de la gramicidina S, polipéptido antibiótico: para ello separaron sobre papel los péptidos resultantes de una hidrólisis parcial, hidrolizaron luego separadamente cada uno de los péptidos y analizaron el hidrolizado sobre otra hoja de papel; de esta manera encontraron cuatro dipéptidos, tres tripéptidos, reconocieron que este producto era un ciclopéptido y determinaron el encadenamiento de sus ácidos aminados constituyentes.

En 1953 STAGNO y ALCONTRES estudiaron la protamina del polen de *Lycopodium C clavatum*; esta protamina, bien aislada y purificada, tiene un peso molecular próximo a 32.000; se hidroliza por el ácido clorhídrico seis veces normal; una cromatografía bidimensional permite la identificación de los ácidos aminados siguientes: arginina, adenina, valina, prolina, alanina, serina e histidina; es decir, permite afirmar la existencia de la protamina; este trabajo es muy interesante porque demuestra la presencia de protaminas en el sistema reproductor de las plantas, cosa que hasta ahora no se había podido encontrar más que en las cabezas de los espermatozoides de los peces, es decir, en el sistema reproductor animal.

El estudio de los azúcares, tan difícil de llevar a cabo por los procedimientos hasta ahora tenidos por clásicos de la química biológica, ha hecho, de algunos años a esta parte, importantes progresos. Las cetosas se revelan mediante calefacción con ácido tricloracético; se forman derivados del furfural que se caracterizan mediante las reacciones coloreadas habituales con los fenoles. Se han hecho diversos estudios con los azúcares cons-

titutivos de los diferentes jugos de frutas; en 1953 WYKES ensayó un estudio de la composición de los néctares de flores para determinar si existía alguna relación entre la constitución de los mismos y la atracción que ejercen sobre las abejas; de sus primeros trabajos parece desprenderse que puede deducirse que las abejas son atraídas principalmente por la mezcla de sucrosa, glucosa y fructosa.

Otro estudio sumamente interesante para el conocimiento del metabolismo vital es el estudio de los nucleoproteidos, constituyentes fundamentales de los núcleos de las células y cuya composición es sumamente compleja. Los primeros trabajos respecto a este particular fueron los de VISCHER y SHARGAFF en 1947 mediante el empleo, como fase móvil, de la colidina; previa hidrólisis, las purinas y pirimidinas obtenidas se transforman sobre el papel cromatográfico en derivados mercurícos insolubles, se trata luego por el sulfuro de amonio, que da lugar a la aparición de manchas negras de sulfuro mercuríco y permite localizar exactamente los diferentes constituyentes de la mezcla; a partir de otro cromatograma idéntico, pero no tratado por el mercurio, se recuperan los cuerpos separados y se identifican por espectrografía.

Citaremos también el estudio de los ácidos orgánicos no volátiles y solubles en el agua, como los ácidos málico, tartárico y cítrico, que se cromatografían con una mezcla ácido acético-butanol; otros ácidos de punto de fusión bajo se transforman en sal de potasio y se cromatografían luego empleando como disolvente butanol saturado de amoníaco; el potasio se cambia con el amonio; se revela con una solución acuosa o alcohólica de 40 miligramos de bromocresol en 100 centímetros cúbicos; los aniones de los ácidos dan lugar a la formación de manchas amarillas.

Otro ejemplo interesante es el de separación de los éteres fosfóricos; en efecto, es sabido que estos desempeñan un papel muy importante en los fenómenos vitales como la respiración y la fermentación; y todo progreso en el conocimiento del mecanismo de estos fenómenos depende estrechamente de los progresos realizados en el conocimiento de la estructura de aquellos cuerpos.

Citaremos, como recordatorio, los trabajos sobre los lípidos, sobre las pterinas que son constituyentes de los colores de las alas de las mariposas, y sobre las cumarinas; estos últimos cuerpos fueron estudiados principalmente por T. SWAIN en 1953; se encuentran en muchos cuerpos de origen vegetal y se forman en la transformación de los compuestos polifenólicos bajo la influencia del enzima de la patata.

Este procedimiento se emplea también para el control de síntesis y de preparaciones, en particular de la penicilina y la estreptomina. GOOVALL y LEVI separan las penicilinas por cromatografía en papel impregnado de

un tampón de fosfato de pH 6'7 empleando como disolvente el éter etílico saturado de agua.

Las tiras de papel filtro se colocan luego sobre agar sembrado con un microorganismo sensible a la penicilina y se identifica ésta al observarse una inhibición de crecimiento; por este procedimiento se ha podido averiguar que hay ocho penicilinas distintas.

Pueden estudiarse también los líquidos fisiológicos, como el suero sanguíneo, y de una manera especial la orina. De esta manera pueden comprobarse las transformaciones sufridas en el organismo por las amidas y los ácidos hidrogenoicos (H. G. BRAY y colaboradores, 1950), por el ácido nicotínico (H. K. REDDI y E. KODICEK, 1953), en el hombre y en el ratón; J. E. FALK y AMY BENSON (1953) estudiaron la separación de porfirinas libres, lo cual les permitió descubrir en orinas patológicas porfirinas que no eran conocidas.

Para terminar, quisiéramos describir un método que parece dar excelentes resultados para el estudio de líquidos biológicos: es el de la electrocromatografía. Ya es sabido que sus trabajos sobre la electroforesis le valieron a TISELIUS la atribución del premio Nobel en 1948; la electrocromatografía no es más que una electroforesis aplicada al papel cromatográfico; sobre una tira de papel se deja caer, hacia el centro de la misma y de uno a otro borde, un poco de la solución objeto de examen; los dos extremos del papel se sumergen en una solución tampón cuyo pH está en relación con el punto isoelectrico del cuerpo que se estudia; se hacen comunicar los dos recipientes de solución tampón con un generador de corriente que dé una diferencia de potencial comprendida entre 300 y 1.000 voltios, pero que debe permanecer absolutamente fija mientras dure el experimento; la corriente que atraviesa es del orden de 300 miliamperios; en estas condiciones, se produce en el papel una electroforesis, pues ya es sabido que muchos componentes de los cuerpos biológicos, en particular los ácidos aminados, llevan cargas eléctricas; los que tienen cargas negativas, como la esparragina y el ácido glutámico, se dirigirán hacia el ánodo, mientras que los cargados positivamente, como la lisina y la arginina, se dirigirán hacia el cátodo; los neutros, no sufrirán ninguna influencia. Como las cargas de los diferentes cuerpos son distintas unas de otras, las velocidades de migración en el papel serán diferentes, lo cual da lugar a una separación de los constituyentes de la mezcla. Este experimento dura, por lo general, algunas horas. El aparato que se ha de emplear debe reunir ciertas condiciones de construcción para que la elevación de temperatura debida al paso de la corriente no determine ningún cambio en la concentración de la solución tampón, pues, de lo contrario, se modificarían las velo-

ciudades de migración y, por consiguiente, se dificultaría la separación. Una vez terminado el experimento, se seca la tira de papel, se tiñe por un colorante apropiado, como el azul de bromefenol, el rojo carmín, el negro de anilina o el negro de naftalina.

Por comparación con electrocromatogramas de cuerpos conocidos se pueden ir determinando los diferentes constituyentes. Para dosificarlos, es decir, para hacer un análisis cuantitativo, se emplean los mismos procedimientos que para la cromatografía simple: ya sea el estudio directo del papel con el fotocolorímetro, ya el corte del papel en diferentes tiras cada una de las cuales comprenda un constituyente, la elución del colorante y su dosificación.

Algunos autores (HANGAARD y KRONER) han empleado la combinación de la cromatografía ascendente y una electroforesis practicada en ángulo recto con aquélla.

Como hemos dicho, la electrocromatografía parece prestarse muy bien para el estudio de los líquidos biológicos, suero sanguíneo y orina; los líquidos normales dan electrocromatogramas que difieren por su aspecto de los de los líquidos patológicos, y éstos difieren también unos de otros, según la naturaleza de la enfermedad; de esta manera, el solo examen del aspecto del cromatograma puede dar una indicación para facilitar un diagnóstico; como, por otra parte, el análisis es muy rápido y no requiere más que una cantidad muy pequeña de líquido, se comprende el interés que tiene semejante método.

En pocos años, los métodos cromatográficos han permitido progresos muy considerables en la resolución de problemas analíticos delicados tanto en química mineral como en química orgánica y biológica; parece ser que, en este último terreno, los resultados más sensacionales los ha dado principalmente la cromatografía en papel por su sensibilidad y su finura.