

SEPARACION CUANTITATIVA DE ESTERES FOSFORICOS  
DE LA GUANOSINA POR TECNICAS DE CROMATOGRAFIA  
DE CAMBIO IONICO

JOSÉ M.<sup>a</sup> ALVAREZ PEZ y ANSELMO GARCÍA FERNÁNDEZ

I.—ANTECEDENTES BIBLIOGRAFICOS

Los métodos de cambio iónico para la separación de nucleótidos son muy numerosos, tanto en papel, como en capa fina y columna. Entre los primeros podemos citar los preconizados por Paolini y Serlupi-Crescendi (1) utilizando papel Whatman DE 81, y los de Sanger, Browlee y Barrel (2) que describen fraccionamientos bidimensionales en acetato de celulosa. Mucho más numerosas son las publicaciones utilizando técnicas de capa fina. Nosotros hemos puesto en marcha un método siguiendo indicaciones de K Randerath (3), K. Jaroszewicz, M. J. Degneldre-Guillaume y C. Liebecq (4) y E. Stall (5) que nos ha proporcionado desarrollos con gran nitidez habiéndolos utilizado como método de identificación de los nucleótidos estudiados. Aunque como queda dicho son muchas las descripciones técnicas mencionadas, la cuantificación de las manchas, tanto en papel como en capa fina, viene acompañada de un gran error, es por ello, que hemos escogido la cromatografía en columna como técnica fundamental en nuestras experiencias. Dentro de este grupo de técnicas son también muchos los trabajos descritos aunque la mayoría de ellos se pueden agrupar en tres secciones, según el tipo de intercambiador utilizado. Unos emplean polímeros de estireno y divinilbenceno, como son las resinas Dowex y Amberlita (6), (7). Otros, celulosas modificadas como intercambiadores aniónicos (8) y otros, en fin, describen separaciones utilizando Sephadex modificado con grupos dietilamino-etanol e incluso carboximetil (9), (10), (11), (12), (13), (14), (15).

Ante resultados previos obtenidos con otro tipo de nucleótidos, hemos optado por adoptar un método descrito por nosotros (16) a la separación de nucleótidos de la Guanosina y su base. Siendo la ventaja del mismo el poder eliminar la influencia de aniones extraños a las sustancias estudiadas y que en futuros trabajos se pondrá de manifiesto su procedencia de los catalizadores empleados en el estudio de reacciones hidrolíticas.

## II.—MATERIAL Y METODOS

### II. 1.—METODO DE VALORACION

La valoración cuantitativa de las concentraciones de cada nucleótido se ha seguido mediante espectrofotometría UV a 260 nm. Se han aceptado los valores de coeficientes de extinción molar de la Guanina y sus nucleótidos preconizados en la bibliografía (17).

### II. 2.—METODOS DE IDENTIFICACION

Empleamos la cromatografía en capa fina de intercambio iónico. El material utilizado fue DEAE-celulosa-DE 41 de la casa Whatman a la que se agrega celulosa Whatman CC 41 para dar consistencia a la pasta formada para su extensión. El grosor de las placas es de 0,25 mm. La activación a 50°C durante 40 minutos. Las muestras se añadieron con una microjeringa Chemetron, que aprecia 0,0005 ml.

Se efectuó desarrollo monodimensional con disolución de ClH 0,01 M a temperatura constante de 4°C provocando un desplazamiento del frente de elución de unos 16 cm. La identificación se hizo con lámpara UV de 256 nm de longitud de onda.

### II. 3.—METODO DE SEPARACION

Se ha empleado la cromatografía en columnas con intercambiador del tipo DEAE Sephadex A-25, el hinchamiento del intercambiador, así como el equilibrado de la columna se ha realizado con tampon tris-ClH, 0,1 M en tris, de pH 8,3; la columna empleada tiene  $1 \text{ cm}^2 \times 20 \text{ cm}$  de altura; la compactación de ésta se consigue por la presión debida a una altura de 10 cm de tampón sobre la superficie del intercambiador. La elución se efectúa

a base de un gradiente continuo de fuerza iónica, provocado por la mezcla con el tampón, de una solución de ClNa. La velocidad de flujo fue de 1 ml cada 5 minutos, regulándose mediante bomba LKB Variocperpex 12.000. Se han recogido fracciones de 5 ml en un colector Gilson modelo miniescargot.

La cantidad de sustancia aparecida en cada pico de elución se evalúa con la expresión:

$$\text{Número de } \mu\text{moles} = \frac{5}{\epsilon m} \sum E_i$$

siendo  $\sum E_i$  la suma de las absorciones espectrofotométricas de cada una de las fracciones que componen el pico de elución de una sustancia.  $\epsilon$  Es el coeficiente de extinción molar de dicha sustancia en  $\text{cm}^2/\mu\text{mol}$ . El número 5 es debido a que el volumen de cada fracción es de 5 ml.  $m$  es el espesor de la cubeta en cm.

### III.—RESULTADOS EXPERIMENTALES Y DISCUSION

Se ha estudiado la separación de la base Guanina y de sus tres ésteres fosfóricos, siguiendo la técnica anteriormente descrita. En cuanto a la resolución de la técnica cromatográfica empleada puede apreciarse por observación de la figura 1 que la base Guanina y sus tres mononucleótidos resultan perfectamente diferenciables. En esta gráfica se ha hecho representación del pico de máxima absorción, tomando una escala adicional de factor 1/10 para facilitar así la representación de las fracciones de absorción espectrofotométrica elevada.

TABLA I  
CUANTIFICACION DEL PROCESO

GMP añadido ... ..	1,900 $\mu\text{moles}$
GDP añadido ... ..	1,210 $\mu\text{moles}$
GTP añadido ... ..	1,340 $\mu\text{moles}$
Total añadido ... ..	4,450 $\mu\text{moles}$
Guanina recuperada ... ..	0,184 $\mu\text{moles}$
GMP recuperado ... ..	2,168 $\mu\text{moles}$
GDP recuperado ... ..	1,177 $\mu\text{moles}$
GTP recuperado ... ..	0,947 $\mu\text{moles}$
Total ... ..	4,434 $\mu\text{moles}$

Error relativo porcentual 0,05 %

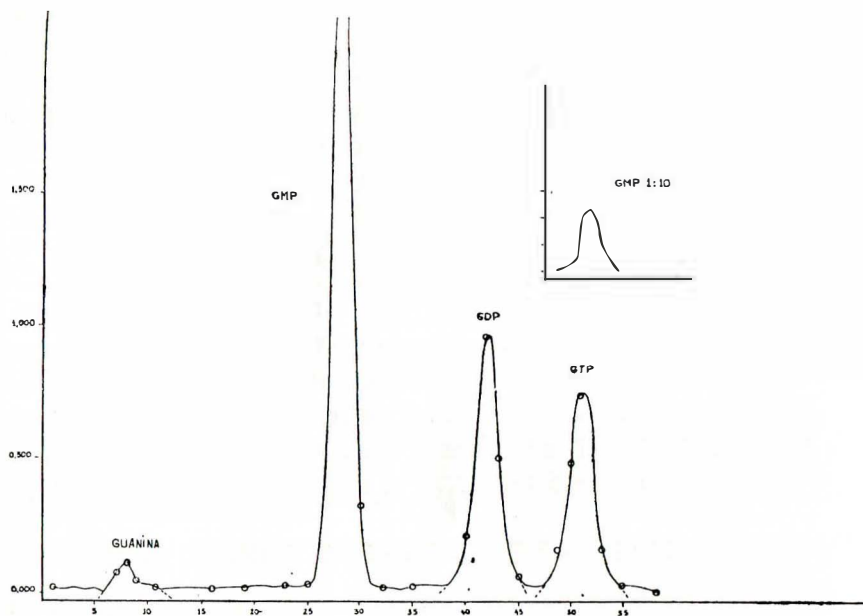


FIGURA 1  
separación de guanina, GMP, GDP, GTP

El error obtenido en la cuantificación del 0,5 % hace pensar en una más que aceptable puesta a punto del método de separación.

La aparición de guanina, el descenso en los valores de las concentraciones de GTP y GDP recuperado y el aumento en el GMP nos hizo pensar en la existencia de fenómenos hidrolíticos no achacables al proceso cromatográfico. Esto nos llevó a cromatografiar nucleótidos puros comparando este fenómeno hidrolítico y cuantificando el % de hidrólisis en los mismos mediante la planimetría de las curvas.

TABLA II

GTP añadido ... ..	2,3305 μmoles
GMP recuperado ... ..	0,0949 μmoles
GDP recuperado ... ..	0,3995 μmoles
GTP recuperado ... ..	1,7930 μmoles
Total recuperado ... ..	2,2874 μmoles

TABLA III

GTP	GDP	GMP
17,2	2,6	0,7
17,2	2,6	0,7
17,1	2,5	0,7
17,2	2,6	0,7
17,2	2,6	0,7
$\bar{S} = 17,2$	$\bar{S} = 2,6$	$\bar{S} = 0,7$

Del GTP utilizado, el 12,6 % pasó a GDP y el 3,6 % al GMP

TABLA IV

GDP añadido ... ..	4,50 $\mu$ moles
Guanina recuperada ... ..	0,2109 $\mu$ moles
GMP recuperado ... ..	0,3025 $\mu$ moles
GDP recuperado ... ..	3,7404 $\mu$ moles
Total recuperado ... ..	4,2538 $\mu$ moles

TABLA V

GDP	GMP
$3,5 \times 10$	1,45
$3,5 \times 10$	1,45
$3,5 \times 10$	1,40
$3,5 \times 10$	1,50
$3,5 \times 10$	1,45
$\bar{S} = 35,00$	$S = 1,45$
% c = 96 %	% c = 4 %

TABLA VI

GMP añadido ... ..	1,5177 $\mu$ moles
Guanina recuperada ... ..	0,2753 $\mu$ moles
GMP recuperado ... ..	1,2151 $\mu$ moles
Total recuperado ... ..	1,4904 $\mu$ moles

TABLA VII

GMP	Guanina
10,6	1,2
10,7	1,2
10,6	1,2
10,5	1,2
10,6	1,2
$\bar{S} = 10,6$	$\bar{S} = 1,2$
% c = 89,8	% c = 10,2

Las separaciones y su posterior cuantificación han resultado altamente satisfactorias, tanto en la cromatografía de la mezcla de nucleótidos, figura 1, como en el proceso cromatográfico de los nucleótidos puros, realizado para comprobar el % de hidrólisis espontánea de los mismos.

## RESUMEN

Se ha estudiado la separación de la base Guanina y de sus tres ésteres fosfóricos siguiendo una técnica de cromatografía de cambio iónico en columna, empleando un intercambiador DEAE-Sephadex A-25.

La identificación del eluato se realizó por cromatografía de cambio iónico en capa fina con desarrollo monodimensional.

La cuantificación del proceso se verificó por espectrofotometría UV a 260 nm obteniéndose un error relativo porcentual que oscila entre 0,5 y 1,84 por 100.

Se observó la existencia de una hidrólisis espontánea posiblemente no achacable al proceso cromatográfico, procediéndose a su cuantificación.

## SUMMARY

The separation of the guanosine (base) and his three phosphoric esters has been investigated by column ionic exchange chromatography, making use of an interchanger Sephadex DEAE A-25.

The eluate identification was made by ionic exchange thin layer chromatography with monodimensional developement. The process quantification was done by UV spectroscopy at 260 nm and the relative error of measurements was between 0,5 % and 1,84 %.

A spontaneous hydrolysis, no due to the chromatographic process, was observed and determined his quantification.

## RESUME

On a étudié la separation de la base guanosine, et de ses trois esteres phosphoriques, suivant une technique de chromatographie de change ionique en colonne, employant un échangeur DEAE-Sephadex A-25.

L'identification de l'elué à été réalisée par chromatographie d'échange ionique en couche mince avec un developpement monodimensionnel.

La cuantification du procès a été effectuée par espectrophotométrie UV a 260 nm obtenant un erreur relative porcentuel qui varia entre 0,5 et 1,84 %.

On a observé l'existence d'une hydrolyse spontanée, qui possiblement n'est pas attribuable au procès chromatographique et on a procédé a sa cuantification.

## BIBLIOGRAFIA

- (1) PAOLINI, C., y SERLUPI-CRESCENDI, G.: T. Anal. Biochem., 23, 263 (1968).
- (2) SANGER, BOOWLEE y BARREL: J. Mol. Biol., 13, 373-398 (1965).
- (3) RANDEATH. K.: «Thin Layer Chromatography» Academic Press, New York (1963)
- (4) JAROSZEWICZ, K.; DEGNELDRE-GUILLAUME, M. J., y LIEBEQC, C.: J. Chromatog., 24, 279 (1966).
- (5) STAHL, E.: «Thin Layer Chromatography», Academic Press, Inc., New York y London R. G.
- (6) COHN, W. E., y CARTER, C. E.: J. Am. Chem. Soc., 72, 4273 (1950).
- (7) MORENO FRIGOLS, J. L.: Tesis Doctoral, Granada, marzo (1970).
- (8) WHATMAN DATA SHEET DS. 13, Ltd., Maidstone, Kent, England.
- (9) CALDWELL, I. C.; J. Chromatog, 44, 331-41 (1969).
- (10) WIELAND, TH., y DETERMANN, H.: Experientia, 18, 431 (1962).
- (11) OCKERMAN, P. A.: Biochim. Biophys. Acta, 74, 588 (1963).
- (12) RUSHIZKY, G. W.; BATOS, E. M., y SOBER, H. A.: Biochemistry, 3, 626 (1964).
- (13) ROSETT, T.; SMITH, JR.; MATSNO, I., y colaboradores: J. Chromatog., 49, 308-12 (1970).
- (14) KAUFMAN, D. G., y GRISHAM, I. W.: J. Chromatog., 57, 275 (1971).
- (15) Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Sweden.
- (16) ALVAREZ PEZ, J. M., y THOMAS GÓMEZ, J.: Ars. Pharmac., XVI, 3, 379-392 (1975).
- (17) Biochemica Catalogue, Mannheim, Alemania.