

Trabajos de Revisión

CATEDRA DE TECNICA FISICA Y FISICO-QUIMICA

Prof Dr. JOSÉ M^a CLAVERA ARMENTEROS

Acta Pharm., 1, (n.º 1) 1960

Principios teóricos de la electroferesis sobre papel. Electroferesis de alcaloides

IESUS THOMAS GOMEZ

Prof. Adjunto

1. Las primeras experiencias relativas a la emigración, dentro de un campo eléctrico, de partículas disueltas o en suspensión, fueron hechas por Quincke en el año 1861. Unos años antes, en el 1808, Reuss había observado la corriente de agua que se origina a través de la arcilla (electro-ósmosis), así como la emigración de ésta en sentido contrario (1).

Se supone que fue Lodge (2), en el año 1886, el primero que utilizó la gelatina provista de un indicador para medir la velocidad iónica, y posteriormente Whetham midió esas velocidades en solución libre. Sin embargo, fue Helmholtz quien realizó los estudios más importantes al respecto en el período 1879-1888.

Kendall (3) efectuó la separación de las tierras raras por medios electroforéticos con substratum de gel de agar. Field y Teague (4), en el año 1907, aprovecharon las distintas velocidades de emigración, dentro de un campo eléctrico, para separar la toxina y la antitoxina diftericas.

Tiselius, en el año 1925, dio un impulso grande a los estudios electroforéticos al asociar las mezclas de sustancias a una solución tampón, colocadas ambas en un tubo en forma de U de Nerst (5), con lo que

consiguió controlar la movilidad de las proteínas que constituían la mezcla gracias a las diferencias de refrangibilidad de las distintas zonas. Estos estudios de Tiselius fueron desarrollados posteriormente por Thovert-Svensson (6) (7), Philpott (8), y por Longsworth (9). Se hicieron nuevas aportaciones a la técnica de Tiselius cuando se incluyeron los métodos interferométricos de Jamin y Michelson en el registro de los rayos luminosos.

El empleo del papel de filtro como soporte se debe a König (10), quien conjuntamente con Klobusitzky (11), aisló un pigmento amarillo del veneno de ciertos ofidios al utilizar como soporte electroforético el papel de filtro.

Entre los años 1947 y 1949 nuevos investigadores desarrollaron independientemente diversos métodos de la técnica electroforética sobre papel, con lo que se establecieron los principios básicos experimentales aún no modificados hoy día (12). Block, en 1948, y Bull, en 1949, sucesivamente realizaron valoraciones cuantitativas de las sustancias sometidas a electroforesis. Cremer en el 1950, y Turba en el mismo año, establecieron métodos de elución para la valoración cuantitativa de las manchas proteínicas. La valoración fotocolorimétrica directa se debe a Gasmann en el año 1950.

2. Los fenómenos de disociación iónica son los responsables de la conductividad eléctrica de las soluciones, así como también de las anomalías que se presentan al determinar el descenso crioscópico o la elevación del punto de ebullición de las mismas. Cuando una corriente eléctrica circula por un circuito resulta que el potencial aplicado es directamente proporcional a la intensidad de dicha corriente

$$\frac{E}{I} = R$$

siendo E el potencial medido en voltios, I la intensidad en amperios, y R la resistencia del circuito medida en ohmios.

En medidas cuantitativas se utiliza la *resistencia específica* o *resistividad*, que es la resistencia de un conductor de 1 cm. de longitud y 1 cm² de sección.

Se emplea también, en las medidas de la conducción eléctrica por parte de las soluciones, la *conductividad específica*, que viene dada por la expresión

$$\lambda = k \cdot v$$

siendo v el volumen de la solución en que está contenido un equivalente gramo.

Las medidas de conductividad se efectúan empleando corriente alterna, para evitar los fenómenos de polarización, y la solución se coloca en una vasija que posee electrodos de platino platinado. Para cada vasija en particular se establece experimentalmente un factor de corrección que se denomina usualmente *constante de la vasija*, y que se puede fácilmente determinar midiendo con ella las conductividades, de soluciones N/10 de ClK, conductividades que han sido calculadas por diversos autores y que vienen expresadas en cualquier agenda química.

Muchas de las propiedades de los iones, en cuanto a la conductividad de las soluciones se refiere, son de gran interés para poder explicar los fenómenos de electroforesis sobre papel.

La conductividad, debida a los iones contenidos por la solución, varía muy apreciablemente con la temperatura. En la tabla adjunta puede apreciarse que para soluciones N/10 de ClK el valor de la conductividad a 0° viene a ser un 50% de la que corresponde a 25° C

Conductividad de la solución N/10 de ClK

<u>Temperaturas</u>	<u>Conductividades</u>
0°	0,007129
10°	0,009316
18°	0,011163
25°	0,012852

Cuando se miden las conductividades específicas a distintas diluciones se encuentra un aumento progresivo de la conductividad equivalente conforme la dilución aumenta, siendo máximo ese incremento para la dilución infinita.

El grado de disociación del electrólito, α , puede conocerse, para una determinada concentración, mediante la fórmula

$$\alpha = \frac{\lambda'}{\lambda_{\infty}}$$

en la que λ' representa la conductividad equivalente de la solución, y λ_{∞} la correspondiente a dilución infinita.

Para el caso de una solución N/10 de ClK resulta que la conductividad específica a 18° C es 0,0112, la conductividad equivalente 112 y

el grado de disociación aparente 0,862, ya que la conductividad equivalente a dilución infinita vale 129,9. Resulta, por tanto, que el ClK, en solución N/10 se encuentra disociado tan sólo en un 86%.

Esta incompleta disociación en soluciones concentradas ha sido estudiada por Debye y Hückel, y también por Onsager, quienes explican el fenómeno admitiendo que alrededor de cada ión se forma la llamada *atmósfera iónica*, integrada por iones de carga opuesta al central, resultando como consecuencia que los iones quedan frenados en su movimiento por los que constituyen su correspondiente atmósfera iónica. Los trabajos de electroforesis sobre papel confirman muchos de estos resultados.

Según se puso de manifiesto por Kohlrausch la conductividad equivalente a dilución infinita, λ_{∞} , resulta ser, para una sal, la suma de las conductividades equivalentes de los iones. Así tenemos que

				Diferencias debidas a la distinta velocidad del K^+ y Na^+
λ_{∞} (ClK)	130,1	λ_{∞} (ClNa)	108,99	21,11
λ_{∞} (NO_3K)	126,5	λ_{∞} (NO_3Na)	105,33	21,17
Diferencias debidas a las distintas velocidades de Cl — y NO_3 —				3,66

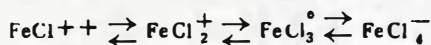
En consecuencia, resulta que las movilidades de los iones pueden ser conocidas a partir de las conductividades equivalentes a dilución infinita de las sales en que intervengan dichos iones. Así se ha podido comprobar que los iones de igual carga difieren poco en su movilidad, siendo en los monovalentes aproximadamente la mitad que en los divalentes.

A partir de las concentraciones de la solución en las proximidades de los electrodos y en las partes alejadas de los mismos puede establecerse otro concepto interesante conocido por *número de transporte*.

$$\text{Número de transporte} = \frac{\text{Caída de concentración alrededor del cátodo (o ánodo)}}{\text{Caída de concentración alrededor del cátodo y ánodo}}$$

La velocidad de un ión se expresa en tanto por ciento de la corriente transportada por ambos iones. El ClK, NO_3NH_4 , $CINH_4$ y NO_3K son sales que tienen aproximadamente igual velocidad.

Independientemente de la atmósfera iónica de Debye y Hückel existen otros hechos que significan una reducción de la movilidad de los iones. Tal es el caso de la formación de complejos metálicos, los cuales poseen una carga relativamente alta en un volumen iónico pequeño. En soluciones de ClH no puede existir libre el catión Fe^{+++} , pero en soluciones débiles aparecen, $FeOH^{++}$ y $Fe(OH)_2^+$ como formas del hierro trivalente, y a altas concentraciones de ClH hay una transición gradual de complejos clorhídricos.



tal como se ha podido comprobar por estudios espectroquímicos y de equilibrio.

Otro es el caso de los ácidos y bases débiles, en los que existirán dos partes, una disociada y otra sin disociar, influyendo esta última sobre la movilidad de la primera. La relación que hay entre el pH del electrólito y la constante de disociación viene dada por la ecuación de Henderson-Hasselbach

$$pH = pK + \log \frac{[\text{disociada}]}{[\text{sin disociar}]}$$

También es digno de tenerse en cuenta el caso de los aminoácidos. Estos son cuerpos que poseen grupos ionizables de carácter ácido y básico, y que presentan un movimiento catiónico y otro aniónico, de acuerdo con el pH del electrólito. El pH para el que el aminoácido no presenta carga se llama punto isoelectrico. En estos aminoácidos el movimiento catiónico corresponde al ión más básico, y el aniónico al más ácido. No existirá posibilidad de separación de dos sustancias de la misma movilidad y de la misma constante de disociación, por lo menos teóricamente, a no ser por la distinta adsorción que presenten frente al papel electroforético.

Estas consideraciones han sido desarrolladas matemáticamente por Conden, Cordon y Martín (13), para el caso de los ácidos débiles o de otros electrólitos. Sean dos ácidos, AH y BH, con constantes de disociación K_a y K_b y movilidades iónicas U_a y U_b (14)

$$U_a = \frac{u_a [A^-]}{[AH] + [A^-]} = \frac{U_b K_a}{[H^+] + K_a}$$

y la diferencia de movilidades

$$U_a - U_b = \frac{U_a K_a}{[H^+] + K_a} - \frac{u_b K_b}{[H^+] + K_b}$$

Esta diferencia es máxima cuando

$$(H^+) = \sqrt{K_a K_b} \left[\frac{\sqrt{\frac{u_a}{u_b}} - \sqrt{\frac{K_a}{K_b}}}{1 - \sqrt{\frac{u_a K_a}{u_b K_b}}} \right]$$

$$\text{o bien: } \text{pH} = \frac{\text{p}K_a + \text{p}K_b}{2} - \log \left[\frac{\sqrt{\frac{u_a}{u_b}} - \sqrt{\frac{K_a}{K_b}}}{1 - \sqrt{\frac{u_a K_a}{u_b K_b}}} \right]$$

En el supuesto de que K_a sea mayor que K_b , ($\text{p}K_a < \text{p}K_b$), y a excepción de que K_a/K_b esté comprendido entre los valores u_a/u_b y U_b/U_a , al emplear un pH óptimo adecuado, la máxima diferencia de movilidad viene dada por

$$U_a - U_b = \frac{u_b \left(\sqrt{\frac{u_a K_a}{u_b K_b}} - 1 \right)^2}{\frac{K_a}{K_b} - 1}$$

Otro es el caso de las partículas coloidales dotadas de carga eléctrica. Las moléculas coloidales, tales como las proteínas y las mucinas, poseen numerosos grupos aminos y carboxilos, determinantes de una densidad de carga neta que motiva la emigración de la molécula de proteína en una dirección y con una velocidad que dependen del signo y de la magnitud de la densidad de carga. La carga no es fija, sino que a su vez depende del pH y de la fuerza iónica del disolvente. Además, la partícula está constantemente cediendo o tomando cargas, de manera que durante un instante la carga de la partícula es un múltiplo entero de la carga iónica y en un tiempo medio es una fracción de la misma. La introducción de partículas coloidales en electrólitos homogéneos motivará una redistribución de los iones. Si se supone que la partícula es esférica y que lleva una carga negativa surgirá una concentración de los iones positivos en la región que rodea la partícula, de manera que la carga total sea cero. Helmholtz supone que estos iones

positivos se concentran en una capa, a una distancia definida de la superficie de la partícula, apareciendo una diferencia de potencial entre esta superficie y la de la capa. Las consideraciones de Debye y Hückel relativas a la atmósfera iónica se pueden hacer extensivas al caso de las partículas coloidales, pero como éstas son de superior tamaño, la atmósfera iónica será mayor, con una gran concentración iónica. Es la conocida por *capa iónica doble*. Esta partícula coloidal con su capa iónica doble forma una unidad electrocinética, y el movimiento del coloide dependerá de la carga de esa unidad, y no de las cargas de superficie de dicha partícula. La carga de las partículas coloidales se expresa generalmente en una unidad llamada *potencial zeta*, que se define por el trabajo necesario para llevar la unidad de carga desde la superficie al infinito.

La densidad de carga de la atmósfera iónica decrece rápidamente cerca de la superficie, y se aproxima asintóticamente a cero a una distancia infinita de ella. Se puede medir cuantitativamente el potencial en un punto determinado de la atmósfera iónica. La diferencia de potencial entre la partícula de radio r_1 y la capa de Helmholtz de radio r_2 , es la siguiente :

$$V_1 - V_2 = \int_{r_1}^{r_2} \frac{Q}{Dr_1 r_2} dr = \frac{Q (r_2 - r_1)}{Dr_1 r_2}$$

siendo Q la carga de la partícula, y D la constante dieléctrica.

Refiriéndonos ahora a un tipo general de partícula, admitamos que posee una carga Q , y que se encuentra dentro de un campo de intensidad X . La fuerza que obra sobre la partícula es $Q.X$. Esta partícula se moverá dentro del campo en una dirección determinada, y hasta tanto la fuerza de fricción del medio, o viscosidad, termine por frenarla

$$Q.X = 6\pi\eta av$$

siendo η el coeficiente de viscosidad, a el radio, y v la velocidad.

Further introduce el concepto de movilidad

$$u = \frac{v}{X} = \frac{Q}{6\pi\eta a}$$

Esta movilidad está determinada por el tamaño de la partícula y por su carga, y es independiente de la forma (15).

Alexander y Johnson establecen ecuaciones parecidas a las anteriores, pero hacen variar el coeficiente 6 por 4 ó 8, según las partículas.

Al modificarse el pH se modifica la carga de la partícula, Q , y varía la movilidad de la misma. Si se cambia la fuerza iónica del electrólito se altera también el valor de d , o espesor de la capa iónica en el sentido de que al aumentar la primera se reduce la segunda, y al mismo tiempo disminuye el potencial zeta. La relación entre este último y la fuerza iónica, a 25°C, es la que sigue:

$$\text{Potencial zeta} = \frac{4 \pi \sigma}{D} \cdot \frac{1}{0,33 \cdot 10^8 \sqrt{\mu}}$$

en donde σ representa el valor de la carga eléctrica de la superficie de la partícula, D la constante dieléctrica, y μ la fuerza iónica. el potencial zeta es proporcional a la movilidad

$$u = \frac{K \cdot 4 \pi \sigma}{D} \cdot \frac{1}{0,33 \cdot 10^8 \sqrt{\mu}}$$

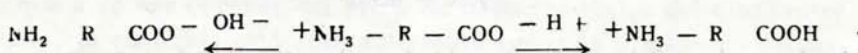
y por ello podemos conseguir que la movilidad aumente al disminuir la fuerza iónica.

El valor de la fuerza iónica viene dado por la expresión

$$\mu = \frac{\Gamma}{2} = \frac{1}{2} \sum_1^s c_i L_i^2$$

donde s representa el número de iones tipo contenidos en la solución, c_i la concentración, expresada en moles por litro, y L_i la valencia.

En los cuerpos anfólitos, tales como los péptidos y proteínas, la influencia del pH es decisiva en sus movilidades. Los ácidos y las bases actúan sobre el anfólito según el siguiente equilibrio:



Si el pH corresponde al campo ácido, entonces el anfólito adquiere una carga neta positiva y emigra hacia el cátodo. El caso opuesto ocurre en medio alcalino. Por otra parte, la composición química del electrólito influye también sobre la movilidad de la partícula. La influencia de los iones adsorbidos por la partícula no es sólo cuantitativa sino que también interviene la valencia, como es de esperar a partir de la fór-

mula que nos da el valor de la fuerza iónica. En medidas experimentales, como sucede en la electroforesis sobre papel, se aconseja utilizar iones monovalentes.

Un fenómeno interesante desde el punto de vista teórico, y de importancia decisiva en la práctica, es el que ha venido recibiendo la denominación de *electroósmosis*. Consiste en el movimiento del electrólito en un determinado sentido. Cuando las partículas coloidales se mantienen fijas, como ocurriría en el caso de que se colocara una red constituida por un gel o por un polímero de celulosa, entonces el líquido que rodea al gel se moverá para conseguir termodinámicamente las mismas condiciones electroforéticas. Esta electroósmosis (16) viene dada por la fórmula

$$u_o = \frac{v_o}{X} = \frac{\zeta D}{4 \pi \eta}$$

donde u_o representa la movilidad osmótica, ζ el potencial zeta, y D la constante dieléctrica del medio.

En el caso de las medidas electroforéticas con substratum de papel de filtro, la electroósmosis es una consecuencia de la carga eléctrica negativa que adquiere el papel frente al líquido tampón. El papel representa la fase estacionaria, y el efecto se transmite a la solución tampón, que a su vez adquiere carga positiva con emigración hacia el cátodo.

Para contrarrestar la electroósmosis se procura en la electroforesis sobre papel que el líquido no sifone a través del substratum, por lo que los dos compartimientos habrán de mantenerse rigurosamente al mismo nivel. Además habrán de emplearse papeles tupidos, con poca capacidad de absorción de la humedad, que eviten corrientes del líquido. Por otra parte el papel se le puede proveer de carga positiva, de igual signo, por tanto, que la solución.

Como consecuencia del paso de la corriente a través de la solución tampón, se produce una evaporación del solvente de la misma, fenómeno que resulta también de gran importancia práctica, ya que origina una cierta corriente líquida. Macheboeuff (17) pone de manifiesto que si la tira de papel se suspende libremente, la evaporación es mayor en la extremidad sumergida en la solución tampón, decrece hacia la parte media, y es nula en la parte suspendida. Estos hechos motivan una

corriente de líquido en el sentido del punto de máxima evaporación al punto de evaporación nula. Si se coloca una partícula, sin electrólito, sobre el papel electroforético, sucede que emigra en virtud de la corriente motivada por la evaporación del líquido, y se traslada hasta una zona un poco anterior al punto de evaporación nula. Esa zona ha sido llamada línea de *flujo nulo*. De acuerdo con lo expuesto una partícula emigrará el ánodo con una velocidad que será la diferencia entre la movilidad de la partícula y la suma de los efectos electrosmótico y de evaporación del disolvente

$$V = \epsilon \quad (e + E)$$

La partícula se detendrá en el punto en que ϵ sea igual a $(e + E)$. Con este fundamento Macheboeuff estableció una técnica conocida por *electrorreoforesis* (18), en la que la zona alcanzada por la partícula es independiente del punto de partida.

Kunkel y Tiselius (19) trabajaron en la separación de proteínas séricas, a un pH = 8,8, empleando tampones barbitúricos de fuerza iónica 0,1, y atribuyeron el movimiento electrosmótico a las cargas negativas del papel de filtro. Este contiene grupos COOH, que para el pH = 8,8 se encuentran muy ionizados. Para medir el movimiento electrosmótico colocaron en el papel una mancha de dextrano, polisacárido neutro que se tiñe igual que las proteínas, con el azul de bromofenol. Se hizo notar que en los papeles gruesos y espesos la emigración del dextrano era superior que en los finos.

La emigración de una proteína específica, por ejemplo la albúmina, se calcula por la fórmula

$$- u_{alb} = \frac{d_{alb} + d_{dex}}{F \cdot t}$$

donde d es la distancia recorrida, F la intensidad del campo, y t el tiempo.

El movimiento electrosomótico se calcula por :

$$u_{el} = \frac{d_{dex}}{F \cdot t}$$

y dividiendo

$$\frac{ddex}{dalb + ddex} = - \frac{uel}{ualb}$$

La relación $\frac{uel}{ualb}$ y $\frac{ddex}{dalb}$ no deben variar con la distancia recorrida, ni con el tiempo y valor del campo eléctrico, en aparatos en los que se evite la sifonación y la evaporación del líquido, pero varía mucho con la carga y porosidad del papel.

Estos hechos se han confirmado empleando distintas clases de papeles, como papeles Munktell 20, papel Ford, y papel suave espeso.

Otro aspecto de la electroforesis sobre papel es el concerniente a la determinación de la velocidad de los iones. Hemos dicho anteriormente que la movilidad de los iones viene dada por $u = \frac{v}{X}$, siendo v la velocidad y X el campo eléctrico aplicado.

Llevando ésto a la electroforesis sobre papel.

$$u = \frac{dl}{tV}$$

en la que d es la distancia recorrida, V el voltaje, l longitud de la tira, y t el tiempo. También puede tomar esta otra expresión siendo q la

$$u = \frac{dqK}{ti}$$

sección transversal del área del papel, K la conductividad, i la intensidad de la corriente, y t el tiempo.

Sin embargo, estas dos ecuaciones no pueden aplicarse al movimiento en el interior del papel, puesto que d es la longitud sobre el papel, y ese valor no corresponde al trayecto real que la partícula recorre a lo largo de los canalículos del papel en su red fibrosa, ni tampoco l es la longitud total del papel por razones análogas a la anterior.

Una partícula en solución libre emigra una distancia $d = u \cdot t \cdot \frac{V}{e}$ y sobre el papel la emigración será $d' = u \cdot t \cdot \frac{V}{e'}$

A partir de estas igualdades, de $l' = l (l'/l)$ y de $d' = d (l'/l)$ se podrá escribir: $d \cdot l'/l = \frac{utU}{I \cdot l'/l}$ y $d = u \cdot t \cdot v/l \cdot (l'/l)^2$.

Teniendo en cuenta que en solución libre la partícula emigra una distancia $d = \frac{uti}{qK'}$ en el papel será $d' = \frac{uti}{q_a K}$ siendo q_a el área de una sección del mismo

$$d' = d \cdot (l'/l) \quad d \cdot l'/l = \left| \frac{uti}{q_a K} \right| \quad d = \frac{uti}{q_a K} \cdot (l'/l)$$

Las expresiones obtenidas para las distancias recorridas en el papel difieren de las correspondientes a la electroforesis libre en el término l'/l que representa un factor de corrección para calcular la movilidad en el papel.

Este factor se puede calcular también utilizando esta otra expresión: $l' = Rq_a K$, siendo R la resistencia de la tira.

El empleo de papel de filtro en la electroforesis de las sustancias implica una determinada adsorción de éstas por parte de aquél. La adsorción ha sido estudiada por muchos métodos, especialmente en el caso de las proteínas. Michl (20) aplica proteínas a distintas clases de papel, y encuentra una adsorción muy variable de unas muestras comerciales a otras.

En un trabajo de Kunkel y Tiselius, y en un posterior trabajo de Kunkel (21) se describen tres métodos para investigar la adsorción por parte del papel: a) La sustancia se hace discurrir a lo largo de éste mediante líquido fluyente (tal como en el desarrollo cromatográfico), y la mancha formada con aspecto de cometa ilustra acerca de la adsorción en las condiciones utilizadas. b) La electroforesis bidimensional pone de manifiesto a algunos materiales que no discurren en forma de mancha redondeada sobre el papel, sino como trazas, empleando el buffer en las dos direcciones. c) Las bandas electroforéticas se colocan primero en una dirección, y luego por inversión de la corriente retornan al punto de partida.

Algunas huellas que quedan remanentes son debidas a la adsorción por el papel, lo que es considerado por Kunkel como una limitación a los métodos electroforéticos sobre papel. Por el contrario, se conocen muchas sustancias que no dejan rastro en su emigración. Es el caso de las experiencias hechas con razas radioactivas de determinados

iones, alcaloides sensibles a la luz ultravioleta, ciertos péptidos y aminoácidos, etc., que se han evidenciado en forma de mancha redondeada, sin efecto de cometa.

Desde un punto de vista práctico la adsorción no interfiere los resultados, pues normalmente se recurre a métodos standard, como es el caso de las medidas que usualmente se hacen con proteínas séricas. Sin embargo, no ocurre así en el caso del examen y análisis de mezclas de proteínas desconocidas, en las que existe la posibilidad de interferencias, pues suelen ponerse de manifiesto separaciones aparentes cuando en realidad puede tratarse de adsorciones diferentes por el papel a pesar de tener velocidades idénticas.

3. Son numerosos los estudios realizados sobre el comportamiento de los alcaloides en su desplazamiento electroforético sobre papel.

Todos los alcaloides se comportan como cationes a pH ácido, mientras que en medio neutro o básico se pueden comportar como aniones, como consecuencia de ciertas funciones, tales como los grupos oxhídricos, lactónicos, hidrógenos ácidos, etc.

La separación de los alcaloides se ha realizado a pH diferentes para valores también distintos de pK, pero puede también efectuarse para alcaloides de pK próximos y velocidades máximas de desplazamiento diferentes.

La movilidad de un alcaloide no depende sólo del pH del medio y del campo eléctrico aplicado, sino también del flujo electroosmótico, de la fuerza iónica, y de la corriente del líquido desde la extremidad hacia el centro del papel, consecuencia ésta de la evaporación debida al efecto Joule (22).

Las experiencias electroforéticas se han aplicado tanto a mezclas de alcaloides puros, como a la separación de éstos de las drogas que los contienen.

Deckers y Schreiber (23) separan la escopolamina y la hiosciamina empleando tampón boratado N/5, a pH = 8,6, durante dos horas, y la brucina y estricnina con tampón de ácido cítrico a pH 3,5, y revelan con el reactivo de Dragendorff. También estos mismos autores utilizan la técnica de electroforesis continua para la separación de la escopolamina y hiosciamina, operando a 60 voltios, con tampón veronal, pH 8,6, durante 40 horas.

Scholz y Hagedorn (24) separan alcaloides de extractos vegetales, operando a 110 voltios, con disolución de NaOH N/10, durante tres

horas. En sus investigaciones utilizan las siguientes tinturas: Aesculus, Abies, Nigra, Apocynum, Bactísia, Cactus, Abrotanus, Allium, Aloe, Frangula, Hydrastris, revelando las manchas de alcaloides a la luz ultravioleta. Las tinturas que contienen alcaloides como la de Berberis y Quina, las estudian en medio ácido. La disociación de la cafeína-quinina la hacen con disolución electrolítica de sulfúrico N/10, y el revelado con solución de I_2 N/50.

Burna (25) examina numerosos alcaloides a distintos pH, sin obtener resultados del todo concluyentes. Según este autor las discrepancias que parecen presentarse en la electroforesis sobre papel de los alcaloides hacen necesario la reunión de los mismos en diversos grupos, análogos por su comportamiento electroforético, si bien ni aún en los incluidos en el mismo grupos se consigue la separación en condiciones idénticas. El método empleado por este autor es el de Cramer, y revela con luz ultravioleta de 2537 Anstrong. De este modo, por fluorescencia, detecta alcaloides como la quinina, quinidina, cinconidina, y pavaverina. En otros, utiliza la técnica, por él descrita, de Holiday y Johnson. Las muestras las disuelve en sulfúrico N/10. Como solución tampón emplea cítrico-fosfato, y corriente de 220 voltios. Para pH comprendido entre 2 y 10, dice el autor que todos los alcaloides se mueven hacia el electrodo negativo, de acuerdo con su carácter básico. Para pH básicos encuentra más de una mancha para cada alcaloide, que las atribuye a la formación de bases libres, sales disociadas y no disociadas, etc. Al incrementar el pH encuentra que la movilidad del alcaloide empieza a disminuir, siendo este hecho muy apreciable en los alcaloides de la quina, y menos en los del opio y strychnos. De los cinco alcaloides del opio que ha estudiado, son la narcotina y la narceína los que menos movilidad poseen. Sólo consigue la separación de la papaverina a un pH 8, debido a su pequeña solubilidad en los álcalis. En términos generales afirma que los alcaloides de las quinas se desplazan más fácilmente en medio ácido que los del opio y strychnos.

T. Kariyone, J. Hashimoto, I. Mori y M. Kimura (26) realizan una investigación intensa con alcaloides comunes, y obtienen diversas separaciones en distintas condiciones de experimentación. Para ello emplean tampón de ácido acético 5 N, a 750 voltios y 0,5 mA/cm. durante dos horas.

Marini y Lederer (27) estudian los alcaloides del curare y los derivados del Strychnos Trinerva. El revelado de las manchas lo hacen

con sulfato cérico o con luz ultravioleta, y como solución tampón ácido acético 5 N o bórax al 2%, a 300 voltios, y durante una hora.

Graf y List (28) consiguen la separación de la morfina y chelidonia. Paris y Faugueras (29) operan con el aparato de Machebouef y papel Arches n.º 301, a la temperatura de 20°C, a 10 voltios/cm. y 0,5 mA/cm. Como única variable modifican el tiempo, en relación a la temperatura del electrólito. Consideran que los ácidos minerales y sus sales no constituyen soluciones tampón adecuadas, ya que producen rápidamente una variación del pH a nivel del papel. Hablan a favor de los ácidos orgánicos, acético y fórmico, y de las soluciones constituidas por veronal sódico o fosfatos, que poseen gran estabilidad tal como se pone de manifiesto al invertir el sentido de la corriente. En la mayoría de sus trabajos utilizan solución 2N de ácido fórmico, pH 1,5, en el que afirman que los alcaloides se encuentran disociados en sus formas simples. Por otra parte consideran que este ácido es fácilmente volatizado y se elimina al secar la banda, no interfiriendo el revelado de la mancha. En otras ocasiones cambian el pH, como es el caso de la separación de la lupanina, lupinina y cistina, que al pH anterior dan una mancha común para los tres, lo que evitan a pH=8,6. Utilizan pipetas de 25 mm.³, graduadas en fracciones de 2,5 mm.³, y colocan una gota en la línea media del papel, que resulta a concentración de 0,05 y 0,5%. Para el revelado de la mancha utilizan el método de Dragendorff (5 grs. de carbonato de bismuto, 50 c.c. de agua, 10 c.c. de ClH puro. Añadir 25 grs. de IK, y comprobar a 100 c.c. con agur destilada). En el momento de su empleo se diluye la solución a 1/25 con ClH N/10. Este método lo consideran sólo útil para las investigaciones cualitativas, ya que para las cuantitativas las manchas son débiles para las medidas fotocolorimétricas, y demás resultan de distinto color para cada alcaloide. También emplean el revelado con iodo, y tratamiento posterior con almidón una vez eliminado el exceso de aquél. El iodo lo emplean en solución clorofórmica al 1%. Para que no se destruya la coloración añaden al almidón un estabilizador, ácido salicílico en medio ácido. Después de la desecación de la banda y eliminación del iodo en exceso, la empapan con el siguiente reactivo: almidón de trigo, 2 grs., agua, 200 c.c., y hierven durante 10 minutos añadiendo 0,30 grs. de a. salicílico. Después de enfriar añaden en el momento de su empleo 0,50 c.c. de IK al 1% y 1 c.c. de ClH puro.

Siguiendo este método han estudiado diversos órganos vegetales de los géneros *Anagyris*, *Cytius*, *Genista*, *Lupinus*, *Sarathamnus*, *Spar-*

tium y Ulex, haciendo las experiencias comparativamente con alcaloides puros. Toman arbitrariamente como unidad de desolazamiento el correspondiente a la esparteína. En el *Sarathamnus scoparius* y *Genista purpúrea* encuentran que los alcaloides del fruto maduro son distintos a los de los tallos y flores. En la maduración encuentran un proceso de transformación de la esparteína en lupanina.

Marini y Bettolo y Coch Frugoni (30) ha nrealizado un extenso estudio con unos 70 alcaloides contenidos en extractos, empleando para ello un voltaje de 10 voltios/cm. durante hora y media, y utilizan el tampón de Britton a distintos pH y diferentes fuerzas iónicas, preparado según las tablas de Coch-Frugoni (31).

Gormann y Salisbury (32) estudian la emigración de la brucina y estricnina en célula electroforética, empleando pH comprendidos entre 5 y 6, cuya influencia observan, así como la relación entre la presencia del anión acompañante al alcaloide, y la movilidad del mismo.

RESUMEN

Se hace una reseña inicial de la evolución de los métodos electroforéticos sobre papel. Se revisan los principios fisico-químicos del método, conductividades eléctricas de electrolitos débiles y fuertes, aminoácidos y partículas coloidales, en función de su densidad de carga, así como la influencia del pH del medio sobre el desplazamiento dentro del campo eléctrico. Se estudian también el comportamiento de los alcaloides, y las técnicas utilizadas par su separación e identificación.

ZUSAMENFASSUNG

Man beginnt mit einem Berichte über die gesiechtliche Entwicklung der papierelektrophoretischen Methoden. Es folgen die physiko-chemische Grundzätze des Methodes, elektrischen Leitungsfähigkeiten der schwachen und starken Electrolyten, Amino-säuren und Kolloidallen Partikeln in Verbindung mit ihren elektrischen Dichte, Ladung sowie die Einflüssung des pH der Umgebung oder über die Verschiebung im elektrischen Feld. Es werden auch das Verhalten der Alkaloiden und die gebrauchten Techniken für ihre esperimentalle Festellung und Abtrennung studieren.

R É S U M É

On y trait une compilation initiale de l'évolution des méthodes électrophorétiques sur papier. On révisé aussi les principes physico-chimiques de la méthode, conductibilités électriques d'électrolytes faibles et forts, amino-acides et particules colloïdaux, en fonction de leur densité et charge aussi bien que l'influence de pH du milieu sur le déplacement dans le champ électrique. On fait aussi une étude sur le comportement des alcaloïdes et les techniques utilisées pour leur identification et séparation expérimentale.

BIBLIOGRAFIA

1. DAN H. MOORE *Physical Methods of Organic Chemistry*. Col. I, Part. II, pág. 1.686
2. O. LODGE, *Brit. Assoc. Reports*. 39 (1886).
3. J. KENDALL y J. F. WHITE, *Proc. Nat. Acad. Sci. Wash.* 10,458 (1924).
4. G. FIELD y S. TEAGUE, *J. Exp. Med.*, 9, 86, 225 (1907).
5. TISELIUS, *Trns. Faraday Soc.* 33, 524 (1937).
6. 7. J. THOVERT, *Ann. Physik.* 2, 369 (1914) y H. SVENSON, *Koll. Z.* 87, 181 (1939).
96, 141 (1940).
8. J. ST. PHILIPOTT, *Natura*, 41, 283 (1938).
9. L. LONGSWORTH, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 39, 105 (1939)
10. P. KONIG, *Actas III Congr. Sud-Americ. Química*, 2, 334 (1937).
11. D. VON KLOBUSITZKY y P. KONIG, *Arch. exp. Pathol. Pharmacol.* 192, 271 (1939).
12. HAUGARD y KRONER, 1948. Wieland, 1948. Durrum, 1949. Garrison, 1949.
13. R. CONSDEN, A. H. GORDON, and R. J. P. MARTIN, *Biochem. J.* 40, 33 (1946).
14. R. J. BLOCK, E. L. DURRUM, G. ZWEIG. *A. Manual of Paper Chromatography and Paper Electrophoresis*. N. Y. 1955, pág. 340.
15. H. A. ABRAMSON, *J. Phys. Chem.* 35, 289 (1931).
16. A. E. ELEXANDER and P. JOHNSON, *Colloid, Scienc. Oxford* (1949).
17. M. MACHEBEUFF, P. REBEYROTTE, J. DUBERT y M. BRUMIER, *Bulle Soc. Chim. Biol.* 35, 334 (1953).

18. M. MACHEBOEUFF, *Chem. Weckbland*, 49, 237 (1953).
19. H. KUNKEL y A. TISELIUS, *J. Gen. Physiol.* 35, 89 (1951).
20. H. MICHL, *Monatsh*, 83, 210 (1952).
21. H. KUNKEL, *Methods of Biochemical Analysis*, New York (1954).
22. M. BETTOLO y J. A. COCH FRUGNI, *Gaz. Chim. Ital.* 86, 1325 (1956).
23. W. DECKERS y J. SCHREIBER, *Naturwiss*, 40, 553 (1953).
24. E. SCHOLZ y P. HAGEDORN, *Dtsch. Apoth. Z.* 3, 81 (1953).
25. D. BURNA, *Naturwiss*, 41, 19 (1954).
26. T. KARIYONE, H. HASHIMOTO, I. MORI y M. KIMURA, *J. Pharm. Soc. Japan*, 73, 805 (1953).
27. G. B. MARINI-BETTOLO y M. LEDERER, *Natura*, 174, 133 (1954).
28. E. GRAF y D. P. H. LIST, *Arzneimittelforsch.* 4, 450 (1954).
29. M. M. PARIS y G. FAUGUERAS, *Ann. pharm. franc.* 13, 359 (1955).
30. G. B. MARINI BETTOLO, y JUAN A. COCH FRUGONI, *Gaz. Chim.*, 7, 329 (1957).
31. J. A. COCH FRUGONI, *Gaz. Chim. Ital.* 87, 403 (1957).
32. W. G. GORMANN y R. SALISBURY, *Journ. Am. Pharm. Assoc.* 46, 476 (1957).