

CATEDRA DE TECNICA FISICA Y FISICOQUIMICA APLICADA

Prof. Dr. D. J. THOMAS GOMEZ

SEPARACION CROMATOGRAFICA DE NUCLEOTIDOS
ADENINICOS PARA EL ESTUDIO DE SU
DEGRADACION HIDROLITICA

J. M. ALVAREZ PEZ y J. THOMAS GÓMEZ

I.—ANTECEDENTES BIBLIOGRAFICOS

Las técnicas de cambio iónico descritas en la bibliografía para este tipo de separaciones son abundantes. Así, COHN y CARTER (1) consiguen buenas separaciones de adenina, AMP, ADP y ATP, mediante resina Dowex 1 × 8 de 200-400 mallas. Este método descrito ha sido profusamente empleado en numerosos trabajos. MORENO FRIGOLS (2), estudia estas separaciones mediante una resina fuertemente básica, Amberlita CG-400, de 200-400 mallas.

No obstante las buenas separaciones conseguidas mediante las técnicas descritas (especialmente de la Cohn y Carter), en los últimos años se ha desviado la atención hacia geles de cambio iónico obtenidos a base de celulosas modificadas y Sephadex también modificado, en los que a partir del soporte neutro de celulosa o Sephadex, se introducen grupos iónicos (aniones o cationes) como resultado intercambiadores catiónicos o aniónicos, débiles o fuertes, según el radical introducido. Así la casa Whatman (3) proporciona un método simple en columna para la separación de nucleótidos mediante celulosas modificadas. La bibliografía que poseemos de separaciones en columna mediante Sephadex modificado es mucho más amplia, quizá por la ventaja que tiene de no necesitar un preciclado previo. Se pueden citar entre los numerosos autores que han utilizado el Sephadex de cambio iónico a I. C. CADWELL (4) que emplea DEAE-Sephadex-A-25 para cromatografía de nucleótidos en extracto de tejidos; Th. WIWLAND y H. DETERMANN (5) separan nucleótidos adenínicos; P. A. OCKERMAN (6) utiliza DEAE-Sephadex-A-25 para separación de este tipo de nucleótidos. G. W. RUSHIZKY, E. BARTOR y H. A. SOLER (7) separan mezclas de oligonu-

cleótidos. ROSETT y colaboradores (8) distinguen AMP cíclico, 5'-AMP, 5'-ADP y 5'-ATP con DEAE-Sephadex-A-25; mientras que D. G. RANFMAN y J. W. GRISHAM (9) utilizan el cambiador catiónico QAE-Sephadex para similares separaciones. Nosotros hemos adoptado el método que proporciona Pharmacie Fine Chemicals (10) por considerarlo de los más sencillos.

Hemos empleado también, en nuestro trabajo, la cromatografía de intercambio iónico en capas delgadas de DEAE-celulosa, ya que existen amplias ventajas de este intercambiador respecto a otros: ECTEOLA-celulosa, PEI-celulosa, como indica K. RANDEATH en su libro "Thin Layer Chromatography" (11). Hemos seguido la técnica descrita por K. JAROSZEWICZ, M. J. DEGNELDRE-GUILLAME y C. LIEBECQ (12), tomando también indicaciones de E. STALL (13)

La valoración cuantitativa de las concentraciones de cada nucleótido se ha seguido mediante espectroscopía ultravioleta a 260 nm.

II.—PARTE EXPERIMENTAL

II-1.—Método de valoración

En primer lugar, se han estudiado los espectros U V de adenina, 5'-AMP, 5'-ADP y 5'ATP a distintos pH. Se ha escogido la longitud de onda de 260 nm como la más característica en la mayoría de las condiciones empleadas por nosotros.

Ante las discrepancias observadas en la bibliografía (13) (14) (15) (16) (17), en cuanto al valor del coeficiente de extinción molar para la adenina y sus nucleótidos, y la necesidad de obtener un valor de ϵ para cada uno de esos compuestos, medido a pH 8,3 que es el más utilizado en nuestros trabajos, hemos optado por calcularlo para cada uno de los compuestos mencionados dándonos los valores siguientes:

$$\epsilon (\text{Adenina}) = 13,294 \text{ cm}^2. \mu \text{ mol}^{-1}$$

$$\epsilon (\text{AMP}) = 14,585 \text{ cm}^2. \mu \text{ mol}^{-1}$$

$$\epsilon (\text{ADP}) = 14,469 \text{ cm}^2. \mu \text{ mol}^{-1}$$

$$\epsilon (\text{ATP}) = 15,086 \text{ cm}^2. \mu \text{ mol}^{-1}$$

Todas las medidas efectuadas a pH 8,3 ($\lambda = 260 \text{ nm}$).

II-2.—Método de identificación

Hemos empleado la cromatografía de cambio iónico en capa delgada. El material utilizado fue DEAE-celulosa DE 41 de la casa Whatman y como soporte se usó celulosa CG 41 de la misma casa.

Para la preparación de las placas se suspendieron 8 g de DEAE-celulosa en 250 ml de ClH 1 M y se agitó durante unos minutos; se filtra seguidamente con ayuda de un buchner y bomba de vacío y se lava el filtrado con agua desionizada; se vuelve a suspender el material resultante en 250 ml de ClH 1 M y se lava posteriormente con agua, repitiendo la operación unas cinco veces. En el último lavado se adicionan 2 g de celulosa CC 41. La pasta resultante se agita vigorosamente (mediante agitador eléctrico) y se le adiciona cantidad suficiente de agua para que resulte una suspensión idónea para extenderla sobre las placas. Efectuada la extensión por el procedimiento habitual se dejan secar totalmente a la temperatura ambiente. Posteriormente se activan a 50°C durante 40 minutos. Las muestras se añadieron con una micro-jeringa, Chemetron, que por medio de un tornillo micrométrico aparecía 0,0005 ml.

Se han realizado desarrollos monodimensionales con disoluciones de ClH 0,01 M, 0,02 M y 0,03 M.

La identificación de las manchas se hizo con una lámpara U V con emisión intensa de radiación de 256 nm de longitud de onda.

De los tres eluyentes empleados, el que suministró una separación más nítida fue el ClH 0,01 M. La prueba se realizó cromatografiando ocho manchas que estaban compuestas por la mezcla siguiente:

Mancha n.º	Mezcla agregada	Mancha n.º	Mezcla agregada
1	Adenina	5	Ad. AMP ADP ATP
2	AMP	6	ATP
3	Ad. AMP ADP ATP	7	Ad. AMP ADP ATP
4	ADP	8	Ad. AMP ADP ATP

La figura 1 expresa el resultado de la separación y las características de ésta.

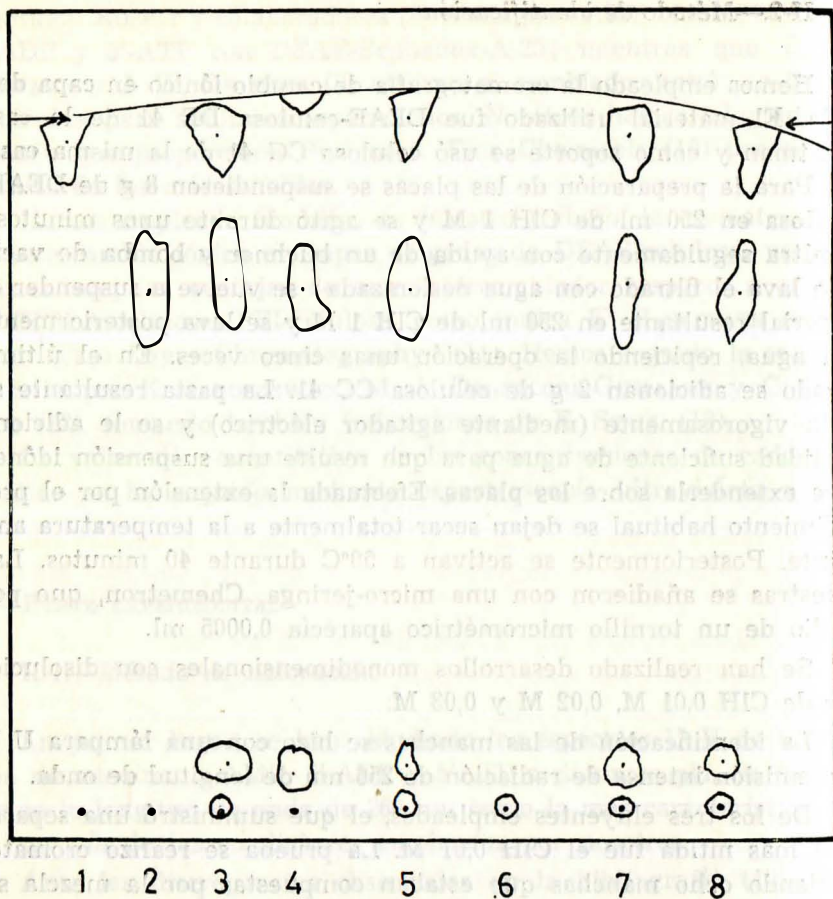


Figura 1

Cromatografía en capa delgada de una mezcla de Adenina, AMP, ADP y ATP

Desplazamiento del eluyente 15,8-16,2 cm.

Eluyente empleado: CIH 0,01 M.

Temperatura: 4°C.

<u>Nucleótidos</u>	<u>Rf obtenido</u>
Adenina	0,960
AMP	0,730
ADP	0,055
ATP	0,010

En la mancha n.º 4 se observa que el ADP de partida está parcialmente hidrolizado. Se realiza el desarrollo a temperatura constante (4°C) con objeto de conseguir una mejor separación y que la hidrólisis, durante el desarrollo, sea prácticamente nula al ser baja la temperatura.

En posteriores experiencias, se ha intentado cuantificar esta técnica por el método del raspado de la mancha y suspensión del material resultante en disolución de C1Na 2 M. Esta desplaza a los nucleótidos y la adenina de la DEAE-celulosa, por lo que una vez filtrada, la disolución debe contener solo el nucleótido. Sin embargo, la cuantificación no ha dado resultados satisfactorios, por lo que la técnica se ha reservado para identificar la pureza de fracciones obtenidas por cromatografía en columna, sin más que tamponar la placa, antes de realizar el desarrollo, con el mismo tampón en el que se obtiene la separación en columna.

II-3.—Métodos de separación

Los métodos de separación empleados han sido diversas técnicas de cromatografía de cambio iónico en columna.

Según se expuso en el apartado I, se ha utilizado resina Amberlita CG 400 de 200-400 mallas. Se han realizado numerosas experiencias según la técnica que recomienda J. L. MORENO (2), pero los resultados son sólo satisfactorios cuando la separación se efectúa mediante disoluciones de nucleótidos en agua alcalinizada con NH_4OH . Cuando en las disoluciones existen iones que provengan de la catálisis ácida sobre la reacción hidrolítica de los nucleótidos, estos aniones perturban las separaciones conseguidas y hacen que el estudio de la hidrólisis ácida de nucleótidos en disolución, dé resultados dudosos. Además, las separaciones conseguidas mediante estas resinas, aún cuando no existan iones extraños a los que se van a separar, no son lo precisas que las conseguidas mediante otros tipos de intercambiadores iónicos; el motivo es la inespecificidad de este tipo de resinas hacia la sustancia a separar.

También se han usado resinas Dowex 1 \times 2 y Dowex 1 \times 8, ambas de 200-400 mallas. En ensayos preliminares nos hemos inclinado a utilizar esta segunda por tener el 8 % de divinil-benceno libre, lo que aumenta la selectividad hacia moléculas del tipo estudiado aquí. La técnica seguida está basada en la original de COHN y CARTER (1), a la que se le han aplicado ligeras modificaciones,

como son disminución de la fuerza iónica del eluyente de adenina y la eliminación del colector de fracciones.

Citamos una experiencia en la que se cromatografía una mezcla compuesta de Adenina, AMP, ADP y ATP en NH_4OH 1 M.

Se han preparado disoluciones extemporáneas de los cuatro compuestos en NH_4OH 1 M y se ha medido su concentración en un espectrofotómetro Beckman DU. 1 ml de cada una de las disoluciones preparadas, disuelto en 99 ml del eluyente que lo extrae (se hace así con objeto de eliminar la influencia del pH en el coeficiente de extinción), han dado las siguientes absorciones espectrofotométricas: Adenina, 0,330; AMP, 0,180; ADP,

A continuación se ha pasado por las columnas (de un total de 10) la mezcla compuesta por 1 ml de cada una de las disoluciones primitivas. Se ha eluido con 100 ml de las disoluciones siguientes: ClNH_4 0,009 M, que eluye la adenina; ClH 0,003 M, para AMP; ClNa 0,02 M en ClH 0,01 M, para el ADP; y ClNa 0,2 M en ClH 0,1 M, para el ATP. Los resultados espectrofotométricos del desarrollo cromatográfico se expresan en la tabla I. En determinadas columnas

TABLA I

Columnas	Mezcla incorporada formada por	E del eluyente de la muestra	E del eluyente de adenina	E del eluyente AMP	E del eluyente ADP	E del eluyente ATP
1	Ad,AMP,ADP,ATP	0,020	0,355	0,160	0,300	0,160
2	AMP,ADP,ATP	0,005	0,035	0,155	0,310	0,175
3	Ad, ADP,ATP	0,010	0,345	0,015	0,295	0,165
4	Ad,AMP, ATP	0,010	0,360	0,150	0,020	0,160
5	Ad,AMP,ADP,	0,005	0,355	0,165	0,305	0,005
6	Ad,AMP,ADP,ATP	0,015	0,355	0,165	0,310	0,170
7	AMP,ADP,ATP	0,000	0,040	0,155	0,315	0,160
8	Ad, ADP,ATP	0,015	0,340	0,020	0,305	0,160
9	Ad,AMP ATP	0,010	0,360	0,155	0,030	0,155
10	Ad,AMP,ADP,	0,010	0,350	0,160	0,300	0,010

se omite la adición de algunos de los nucleótidos o la base, con objeto de observar la posible interacción en la separación de los otros componentes de la mezcla. El 100 por ciento de la separación se consigue cuando la absorción del eluido corresponde con el valor de la absorción de las disoluciones control mencionadas anteriormente.

El problema planteado a continuación es la adaptación de la técnica para cuando en la disolución existen aniones que proviene de la catalisis efectuada por ácidos en las reacciones hidrolíticas de nucleótidos.

Se han hecho pruebas con dos aniones: el Cl- y tricloroacetato el primero se empleó por ser el agente hidrolítico habitual, y el tricloroacético por servir para defecar proteínas y purificar de esta forma extractos de tejidos.

Lo primero que se ha calculado es la capacidad de cambio de la Dowex 1 × 8, para nucleótidos disueltos en NH_4OH 1M. Se realizó por el procedimiento de "cromatografía en baño" y dió una capacidad efectiva de 1,4 mleq/g.

Se han calculado el núm. de mleq de anión tricloroacetato que se precisa añadir a la columna número que depende de la molaridad del ácido catalizador de la hidrólisis y del volumen de muestra añadido a la columna. Asimismo se fijó en 0,01 mleq la cantidad de nucleótido a añadir, la cantidad de mleq de resina cubiertos por el TCA- y nucleótidos se estimó de 0,5 mleq aproximadamente. Es norma habitual que la cantidad de mleq a intercambiar por una resina se multiplique por un factor que oscila entre 5 y 10, y puesto que los aniones TCA- tienen gran afinidad por la resina empleada, hemos estimado como 3 g la cantidad de resina necesaria. El único inconveniente que se puede derivar del empleo de tal cantidad es la disminución del flujo en la columna; este inconveniente se evitó utilizando columnas recientemente construidas y compactadas bajo la presión hidrostática de una columna de agua de sólo 2 cm.

A continuación (tabla II) se expone los resultados obtenidos en una serie de diez columnas en las que los derivados adenínicos se agregan disueltos en una disolución 0,05 M en tricloroacetato amónico y 1 M en NH_4OH .

Esta molaridad respecto al tricloroacetato amónico es consecuencia de los estudios prácticos realizados, que hacen aconsejable la disminución del TCA- añadido, a pesar de que en teoría esa con-

centración se podría llevar hasta un límite superior con columnas formadas por 3 g de resina.

Se cromatografía una mezcla formada por 1 ml de la disolución de cada derivado adenínico, empleándose para eluir las disoluciones ya mencionadas.

TABLA II

Columnas	Mezcla incorpo- rada formada po	E del eluyente de la muestra	E del eluyente de adenina	E del eluyente AMP	E del eluyente ADP	E del eluyente ATP
1	Ad,AMP,ADP,ATP	0,050	0,405	0,225	0,180	0,205
2	AMP,ADP,ATP	0,025	0,020	0,230	0,175	0,210
3	Ad, ADP,ATP	0,035	0,420	0,220	0,180	0,210
4	Ad,AMP, ATP	0,038	0,410	0,210	0,005	0,210
5	Ad,AMP,ADP,	0,045	0,400	0,215	0,175	0,015
6	Ad,AMP,ADP,ATP	0,040	0,405	0,225	0,185	0,215
7	AMP,ADP,ATP	0,030	0,030	0,210	0,180	0,205
8	Ad, ADP,ATP	0,040	0,390	0,015	0,180	0,205
9	AMP,ADP,ATP	0,035	0,025	0,225	0,175	0,225
10	Ad, ADP,ATP	0,045	0,405	0,005	0,180	0,200

Las disoluciones originales de adenina, AMP, ADP y ATP, diluidas 100 veces, presentan las siguientes absorciones espectrofotométricas 0,415, 0,245, 0,190, 0,210.

Se puede observar la validez de esta técnica aún cuando en la disolución existan otros tipos de aniones que posean la afinidad del TCA-. Sin embargo la técnica no es aplicable cuando existen iones Cl- por su mayor afinidad que otro anión de los habituales. Se han realizado pruebas, no resultando ninguna de ellas positiva. Una vía probable de estudio es utilizar resina Dowex pero en la forma formiato, o incluso hidróxido.

Nosotros para obviar estos inconvenientes de una forma sencilla y dar una pauta para cualquier tipo de anión presente en la disolución (que quiere decir para cualquier ácido que catalice la hidrólisis) hemos dirigido nuestra atención para el Sephadex de cambio iónico.

Teniendo en cuenta el método propuesto (10) hemos conseguido buenas separaciones de los derivados adenínicos estudiados. Las separaciones se han efectuado en DEAE-Sephadex-A-25; el hincha-

miento del intercambiador, así como el equilibrado de la columna se ha realizado con tampón tris-ClH, 0,1M en tris de pH 8,3; la columna empleada tiene $1 \text{ cm}^2 \times 20 \text{ cm}$ de altura; la compactación de esta se consigue por la presión hidrostática 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 conseguido mediante dos frascos A y B, conectados entre sí, uno encima del otro. El superior (frasco A) contiene una disolución, en el tampón equilibrante, de ClNa de molaridad variable según la separación a efectuar. El frasco inferior (B) contiene tampón equilibrante y está comunicado con la columna cromatográfica y con un agitador magnético. Con esta disposición cada salida de líquido desde B hasta la columna hace verter igual volumen desde A hacia B y allí es bien mezclado gracias al agitador.

Tanto el volumen de tampón inicial en B, como la molaridad de ClNa, son variables según que la separación a efectuar necesite una mayor o menor pendiente en el gradiente de fuerza iónica.

La velocidad de flujo se ha regulado con bomba LKB varioperpex 12.000. Para las separaciones que vamos a describir se ha utilizado un flujo de 1 ml cada 5 minutos; pero se consiguen buenas separaciones con velocidad más altas como 5 ml cada 15 m.

La recogida de muestras se ha realizado en un colector de fracciones Gilson modelo mini-escargot. Para conseguir una gran sensibilidad, ha bastado recoger fracciones de 5 ml.

La cuantificación de la técnica se ha realizado mediante la aplicación de la expresión:

$$\begin{aligned} & \text{n.º de } \mu \text{ moles existentes en cada pico de elución} = \\ & = \frac{5 \text{ ml. } E_1}{1 \text{ cm. } \epsilon \text{ cm}^2 / \mu \text{ mol}} + \frac{5 \text{ ml. } E_1}{1 \text{ cm. } \epsilon \text{ cm}^2 / \mu \text{ mol}} + \dots + \frac{5 \text{ ml. } E_1}{1 \text{ cm. } \epsilon \text{ cm}^2 / \mu \text{ mol}} = \\ & \frac{5}{\epsilon} \sum E_i \mu \text{ moles} \end{aligned}$$

Siendo $\sum E_i$ las sumas de las absorciones espectrofotométricas de cada una de las fracciones que componen el pico de elución de una sustancia. es el coeficiente de extinción molar de dicha sustancia. El n.º 5 es debido a que el volumen de cada fracción es de 5 ml.

El n.º de μ moles así calculado debe ser el mismo que haya sido agregado al comienzo de la columna.

Se han mezclado disoluciones de adenina, AMP, ADP y ATP, conteniendo 1,31 μ moles de adenina; 1,302 μ moles de AMP; 1,589 μ moles de ADP y 1,955 μ moles de ATP; ocupando dicha mezcla un volumen de 4 ml; el disolvente empleado fue tampón tris-ClH 0,1 M, pH 8,3

Dicha disolución se agregó a la columna dejándola fluir con más lentitud que en la posterior elución; a continuación se conecta el dispositivo productor del gradiente y la bomba de flujo constante. Se obtuvieron 60 fracciones. Las dos primeras corresponden al fluyente de la mezcla añadida y al lavado de las paredes de la columna con tampón. Las absorciones espectrofotométricas de cada fracción se han llevado al gráfico de la figura 2.

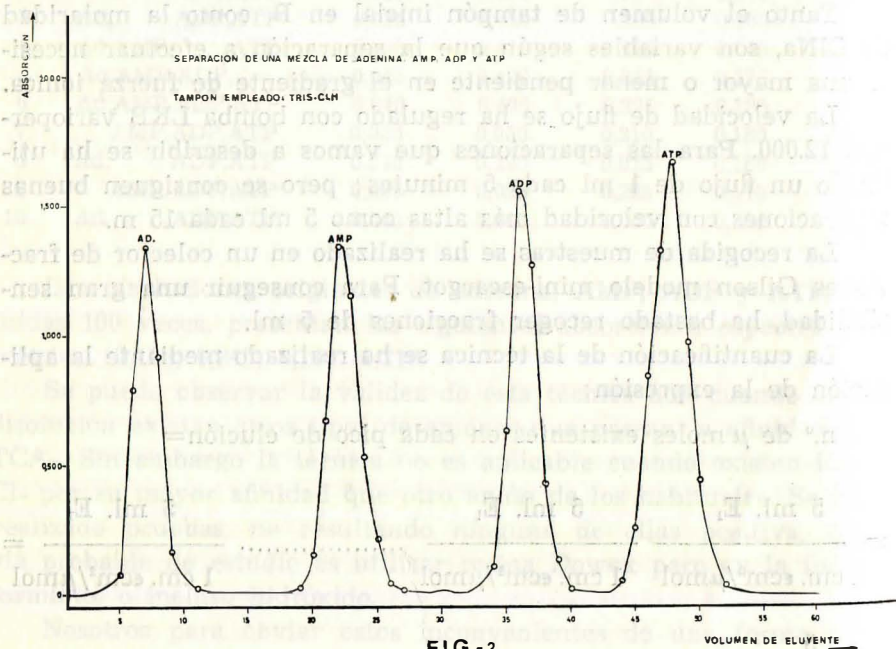


FIG.-2

El gradiente se logró a partir de 500 ml de ClHNa 0,5 M (en tampón tris-ClH) sobre 500 ml de tampón.

Realizados los cálculos oportunos se aprecia una recuperación de 1,286 μ moles para la adenina; 1,422 μ moles de AMP; 1,447 μ moles de ADP y 1,899 μ moles de ATP.

El total de μ moles añadido es 6,156 μ moles; el total de μ moles recuperados es 6,054 μ moles, lo que corresponde a un error relativo porcentual de 1,65%.

Se observa una recuperación ligeramente superior para el AMP, mientras que la correspondiente al ADP, está disminuída; este hecho se ha relacionado con la hidrólisis del ADP de partida, hidrólisis que se nos manifestó claramente por cromatografía en capa delgada.

Se ha comprobado la pureza de cada fracción por la mencionada técnica de capa delgada; las manchas obtenidas tienen idéntico Rf que los nucleótidos y base conjuntamente cromatografiados para efectuar la comparación.

Obtenidas así estas separaciones hemos introducido una variación en el tampón equilibrante, con la finalidad de hacer el método aprovechable para el estudio de la cinética de hidrólisis catalizada por ácido tricloroacético. Con objeto de que el anión tricloroacetato no interfiera en la separación cromatográfica, se ha establecido que el mismo anión que acompaña al protón catalizador de la reacción sea parte integrante del tampón.

Se ha estimado que con el tampón formado por tricloroacetato amónico-amoniaco de fuerza iónica 0,1 puede conseguirse un pH entre 8 y 8,5 necesario para que los derivados adenínicos sean absorbidos por el cambiador y disocien fácilmente de éste al aumentar la fuerza iónica.

Según la ecuación simplificada de Henderson-Hasselbach

$$\text{pH} = \text{pK}_w - \text{pK}_b + \log \frac{\text{base}}{\text{sal}}$$

y la que expresa la fuerza iónica: $\mu = \frac{1}{2} \sum C_i \cdot Z_i^2$

y sustituyendo los valores adecuados en ambas ecuaciones, resulta:

$$\text{base} = 0,00929 \quad \text{y} \quad \text{sal} = 0,09071.$$

Con este tampón y en parecidas condiciones que en la separación anterior se han realizado cromatografías de las cuatro tancias, resultando igualmente exactas que las conseguidas con tris-ClH.

La primera operación a realizar consiste en cambiar el contraión Cl-, con el que se presenta al mercado el DEAE-Sephadex, por el tricloroacetato, por acción durante dos días de una disolución de tricloroacetato amónico. La cantidad de dicha disolución a em-

plear se calcula según la cantidad de material embebida y la capacidad de cambio de éste. Una vez hinchado el cambiador, se decanta repetidas veces con el tampón. Las otras modificaciones se refieren al gradiente continuo de fuerza iónica que es necesario realizar con una pendiente más suave, conseguida con 500 ml de ClNa 0,15M sobre 500 ml de tampón. La velocidad de flujo utilizada es de 5 ml cada 15 m. Un ejemplo de este tipo de separaciones nos lo dá los resultados representados en la figura 3.

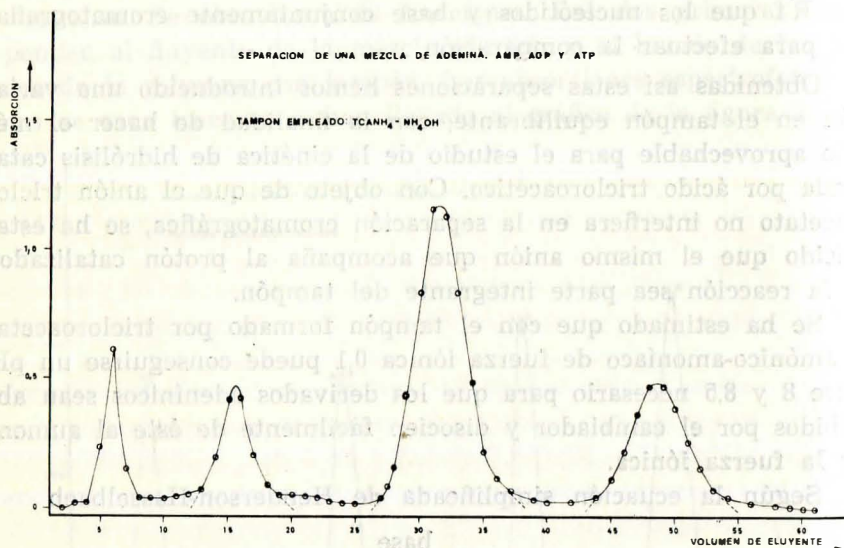


FIG.-3

Se ha intentado realizar separaciones sustituyendo el gradiente continuo por otro discontinuo de fuerza iónica aunque los resultados no han sido satisfactorios.

Una vez conseguidas estas separaciones se puede realizar la hidrólisis ácida de ATP, ADP y AMP catalizada por ácido ClH y TCA sin más que calcular las cantidades de muestra de reacción (que contiene derivados adenínicos más ácido catalizador) que se van a agregar a la disolución de base, para que al mezclarse ambas disoluciones den como resultado los derivados adenínicos disueltos en el tampón equilibrante, anulando así la interferencia que suponía el anión presente en la hidrólisis.

DISCUSION

La resina amberlita CG 400 no nos ha proporcionado resultados satisfactorios debido a su poco especificidad hacia los derivados adenínicos.

La resina Dowex 1 \times 8, proporciona buenos resultados en disoluciones que sólo contienen nucleótidos y adenina en NH_4OH 1 M, pero se presentan ligeros inconvenientes cuando a estas sustancias acompañan aniones tipo TCA-; es posible obviar estos inconvenientes cuando las impurezas son del tipo reseñado, es decir tienen una afinidad por la resina parecida al TCA-. Sin embargo cuando la afinidad es del orden del anión Cl^- los resultados son de dudosa validez.

El DEAE-Sephadex nos ha proporcionado buenas separaciones en tampón de pH 8,3 y 0,1 de fuerza iónica. Si a esta circunstancia se añade la fácil sustitución de los componentes del tampón, en relación a que el anión que acompaña al protón catalizador de la hidrólisis entra a formar parte del tampón y que la elución se efectúa a un pH ligeramente alcalino para el que la hidrólisis es prácticamente nula, se eliminan la totalidad de inconvenientes que presentan los otros intercambiadores iónicos estudiados.

Una desventaja se ha presentado con el uso de DEAE-Sephadex A-25, al no poder sustituir el gradiente continuo por uno discontinuo más fácil de realizar.

La técnica de capa delgada de cambio iónico con DEAE-Celulosa proporciona un buen método para identificación de nucleótidos, aunque la cuantificación por el método propuesto no nos ha resultado efectiva.

RESUMEN

Se ha estudiado la separación de adenina, AMP, ADP y ATP mediante cromatografía en columna de cambio iónico; dirigida hacia el estudio de reacciones hidrolíticas de dichos nucleótidos, catalizadas por ácidos. De los tres intercambiadores iónicos estudiados el DEAE-Sephadex-A-25 nos ha proporcionado los mejores resultados. Según nuestras experiencias tiene la ventaja de poderse emplear un tampón equilibrante cuyo margen de pH sea de 8 a 8,5 y su fuerza iónica 0,1. Manteniendo constantes estos parámetros se puede variar la composición química del tampón, por lo que el mismo ácido que catalice una determinada reacción hidrolítica puede entrar a formar parte del tampón, consiguiéndose de esta forma prescindir del anión que perturbe la mancha de la sepa-

ración. Se completa el estudio con una técnica de cambio iónico en capa delgada mediante DEAE-celulosa que nos ha servido para la identificación de los derivados adenínicos separados.

ABSTRACT

It has been investigated the separation of adenine nucleotides, AMP, ADP and ATP, across the ionic exchange chromatography, directed to the study of hidrolitic reactions of this nucleotides catalized by acids. Of the tree ionic exchangers, the DEAE-Sephadex A-25 enables the best results. This exchanger makes possible the use buffer solutions with pH from 8 to 8,5 and its ionic strength 0,1. The chemical compositions of the buffer solution is easily changeable and the acid catalyst can form the fuffer composition. The study of adeninic nucleotides is made by means of the thin layer chromatography.

BIBLIOGRAFIA

- 1.—COHN W. E. y CARTER C. E.; *J. Am Chem. Soc.*, 72, 4273 (1950).
- 2.—MORENO FRIGOLS J. L.; Tesis Doctoral, Granada, Mayo, (1970).
- 3.—WHATMAN DATA SHEET DS. 13, Ltd., Maidstone, Kent, England.
- 4.—CALDWELL, I. C.; *J. CHROMATOG.*, 44, 331-41 (1969).
- 5.—WIELAND Th. y DETERMANN H.; *Experientia*, 18, 431 (1962).
- 6.—OCKERMAN, P. A.; *Biochim. Biophys. Acta*, 74, 588 (1963).
- 7.—RUSHIZKY G. W., BATOS E. M. y SOLER H. A.; *Biochemistry*, 3, 626, (1964)
- 8.—ROSETT T., SMITH Jr., MATSUI I. y colaboradores; *J. Chromatog.*, 49, 308-12 (1970).
- 9.—KAUFMAN D. G. y GRISHAM J. W.; *J. CHROMATOG.*, 57, 275 (1971).
- 10.—Pharmacia Fine Chemicals; Uppsala, Sweden.
- 11.—RANDERATH K. "Thin Layer Chromatography", Academic Press, New York (1963).
- 12.—JAROSZEWICZ K., DEGUELDRE - GUILLAUME M. J. y LIEBEQC C. J. *Chromatog.*, 24, 279 (1966).
- 13.—STAHL E. "Thin Layer Chromatography", Academic Press, Inc., New York y London R. G.; *Analitic Biochem.*, 10, 108 (1965).
- 14.—"Data for Biochemicals Research" 2.^a ed. Clarendon Press, pag. 169. (1969) Oxford.
- 15.—BOCK R. M. y NAN - SING LING, y MORELL S. A. y LIPTON S. M, *Arch. Biochem. Biophys.*, 62, 253 (1956).
- 16.—Biochemica Catalogue, Mannheim Alemania.
- 17.—RATCLIFF P. W. y FOLLET M. J.; *Nature*, 209, 1129 (1966).