

CROMATOGRAFIA DE EXCLUSION MOLECULAR DE (BIO)POLIELECTROLITOS

Rosa García, Iolanda Porcar, Agustín Campos y Juan E. Figueroelo

Department de Química Física, Facultad Químiques, Universitat de València
c/ Dr. Moliner, 50. 46100 Burjassot, València. España

SUMMARY

The elution behaviour of several standards ionic polymers, such as poly (L-glutamic acid) (PGA), sodium poly(styrene sulfonate) (PSSNa) and poly(acrylic acid) (PAA) has been analyzed by aqueous size exclusion chromatography (ASEC) as a function of pH and ionic strength (I) of eluent, on both inorganic- and organic-based packings. Quantitative evaluation of secondary effects, such as ionic contributions, is undertaken taking into account electric double-layer effects and the effective radius of polyion. A second order dependence of the elution volume on $I^{1/2}$ is obtained in fair agreement with experimental results. Suggestions on quantitative evaluation of hydrophobic effects are also pointed out.

INTRODUCCION

La cromatografía de exclusión en fase orgánica (SEC) alcanzó un gran auge en la década de los setenta, quedando bien establecidos tanto los fundamentos teóricos como los efectos secundarios que podían afectar al mecanismo de separación estérica. En este contexto, nuestras contribuciones se centraron en dos puntos principalmente: predicción cuantitativa de efectos secundarios y efectos de concentración, algunos de cuyos aspectos han sido comentados en las revisiones (1,2). En la década de los ochenta se desarrollaron y comercializaron nuevos geles hidrófilos de alta resolución, con lo que la ASEC (cromatografía de exclusión en fase acuosa) se extendió a la caracterización de biomacromoléculas: péptidos, proteínas, polinucleótidos y agregados tales como virus, liposomas, etc. Sin embargo, en contraste con la SEC orgánica, se ha constatado ampliamente que la elución de los biopolielectrolitos tanto naturales, como sintéticos, no sigue un mecanismo de exclusión pura, estando siempre presente en cuantía variable efectos secundarios, que según Barth (3), pueden dividirse en dos grupos: los iónicos y los de adsorción. En el primer grupo se contemplan los efectos de intercambio iónico, de inclusión de ión, de exclusión de ión y los electrostáticos intermoleculares, mientras que en el segundo se incluyen los efectos hidrófobos y las interacciones por enlaces de hidrógeno.

Parece plausible atribuir los efectos iónicos a interacciones interfaciales entre la atmósfera iónica del polielectrolito y el campo eléctrico asociado a la superficie del gel, debido a la disociación parcial o total de los grupos hidrófilos que la constituyen. La supresión de esa carga residual minimizaría o anularía los efectos

secundarios, aunque desgraciadamente no se ha comercializado ningún gel con estas prestaciones, a pesar de los esfuerzos realizados. Es por ello, que para la supresión o minimización de los efectos iónicos se empleen frecuentemente eluyentes contenido electrolitos. El uso de estos eluyentes ejerce un doble efecto sobre el volumen de elución del polielectrolito, ya que, por una parte, afecta a su carga efectiva y a su conformación disminuyendo la expansión intramolecular del poliión y, por tanto, su viscosidad intrínseca y su tamaño, y por otro disminuyen la densidad de carga de la superficie del gel y por lo tanto las interacciones con el polielectrolito. En este contexto, se han realizado considerables esfuerzos para cuantificar dichos efectos y merecen destacarse el modelo de Dubin (4-6), que predice efectos de exclusión de ión basados en la reducción del tamaño de poro accesible al ión, la correlación empírica de Mori (7) entre el volumen de repulsión y la fuerza iónica del eluyente, la aproximación semiempírica de Styring y colaboradores (8,9), que proponen una variación lineal entre el volumen de elución y la inversa de la raíz cuadrada de la fuerza iónica, y el tratamiento teórico de Hoagland (10) sobre las interacciones electrostáticas repulsivas de polielectrolitos tipo bastón con superficies cargadas.

En lo que sigue se presenta en forma condensada nuestra aportación al estudio de los efectos secundarios en ASEC. Por una parte, se ha adquirido información experimental precisa sobre el comportamiento de elución de varios polímeros en diversos geles y como influyen en él las condiciones del eluyente (pH, fuerza iónica, etc) y las variables cromatográficas operacionales (caudal, volumen de inyección, etc.). Los geles estudiados con diferentes grupos ionizables han sido Ultrahydrogel(UHG-250).y SpheroGel TSK PW4000 de naturaleza orgánica,y Protein-I 250, de tipo inorgánico. Los poliiones estudiados, también diferentes en su carácter iónico y en flexibilidad de la cadena, han sido poli(estirensulfonato sódico), PSSNa, poli(ácido acrílico), PAA, y poli(ácido L-glutámico), PGA. En segundo lugar, se interpretan cuantitativamente las desviaciones que los polímeros cargados muestran respecto de los neutros en los diferentes eluyentes. Concretamente, sin olvidar las interacciones hidrófobas, se deducen expresiones que evalúan cuantitativamente los efectos iónicos, que se considera se deben a las contribuciones de:

- a) La carga del poliión que sólo se contempla de forma aislada en el modelo de Styring, y
- b) La carga del gel, que se tiene en cuenta en forma también aislada en su modelo por Dubin y col.

PARTE EXPERIMENTAL

Los detalles experimentales de reactivos, eluyentes, determinación de viscosidades y medidas cromatográficas son los usuales en ASEC y han sido publicados previamente (11-14). Baste indicar que los poliiones fueron muestras comerciales de diversos pesos moleculares, con baja polidispersidad, que como polímeros no cargados se emplearon muestras patrones de POE y dextrano, que los eluyentes de diferentes fuerzas iónicas fueron tampones fosfato para pH = 7,0 y acético-acetato para pHs 4,0 y 5,0 y, por último, que los volúmenes de exclusión de las columnas, V_o , y los volúmenes totales, V_T , se determinaron, respectivamente, con una muestra de Blue Dextran de $M = 2,0 \cdot 10^6 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ y con D_2O .

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La aproximación seguida más frecuentemente para analizar efectos secundarios en ASEC de polielectrolitos es comparar los calibrados del polímero bajo estudio con los de polímeros sin carga obtenidos ambos en igualdad de condiciones experimentales. En este contexto, hay alguna controversia sobre qué magnitud representa el volumen hidrodinámico del polímero, aunque Potscha (15) ha mostrado que cualquier macromolécula eluye según un parámetro universal, el R_η (radio de viscosidad), con independencia de su forma: esfera rígida, madeja expandida, bastón más o menos flexible, ... Dado que R_η está directamente relacionado con $M[\eta]$, será este producto el representativo del tamaño de la macromolécula, sea o no polielectrolito, de acuerdo con el concepto de calibrado universal. En la Figura 1 se recogen a título de ejemplo algunos de los calibrados obtenidos a diferentes fuerzas iónicas. Una discusión cualitativa de los resultados podría resumirse en:

- a) El aumento de la fuerza iónica actúa, por una parte, disminuyendo la expansión intramolecular del polímero (disminuyendo su tamaño) y, por otra, minimizando la repulsión existente entre la superficie del gel y el polielectrolito. En consecuencia, los volúmenes de elución se desplazan hacia mayores valores.
- b) El efecto del pH está relacionado con el grado de ionización de los grupos ionizables de la superficie del gel y de los grupos laterales del polielectrolito. Cuando el pH es inferior al pK_a de dichos grupos, disminuye su grado de ionización y disminuyen, por tanto, las interacciones electrostáticas, que son máximas a pH superiores a los pK_a correspondientes. En general, los calibrados de polielectrolitos se aproximan a los del mecanismo de exclusión estérica pura cuando disminuye el pH de la fase móvil.
- c) En cuanto a la naturaleza de los polímeros se observa que los de tipo vinílico, PSS y PAA, muestran mayores volúmenes de elución que el poliaminoácido, PGA, debido, probablemente, a la mayor flexibilidad de los enlaces C-C-C de la cadena frente al enlace peptídico o a que PSS y PAA poseen una densidad de zonas apolares por unidad de longitud superior a la del PGA, pudiendo interaccionar hidrofóbicamente con el gel y retardándose su elución.
- d) Respecto a los geles, el Protein I-250 exhibe únicamente efectos de exclusión iónica, mientras que los orgánicos TSK PW4000 y UHG-250 muestran además de interacciones iónicas, interacciones hidrofobas, más acentuadas en el primero.

Como corolario de los apuntes anteriores se debe reseñar que las condiciones experimentales óptimas (pH y fuerza iónica) en ASEC de polielectrolitos sintéticos o biológicos dependen del sistema soluto/columna bajo estudio. Cada problema específico requiere una selección adecuada de la columna y una búsqueda rigurosa del eluyente a emplear.

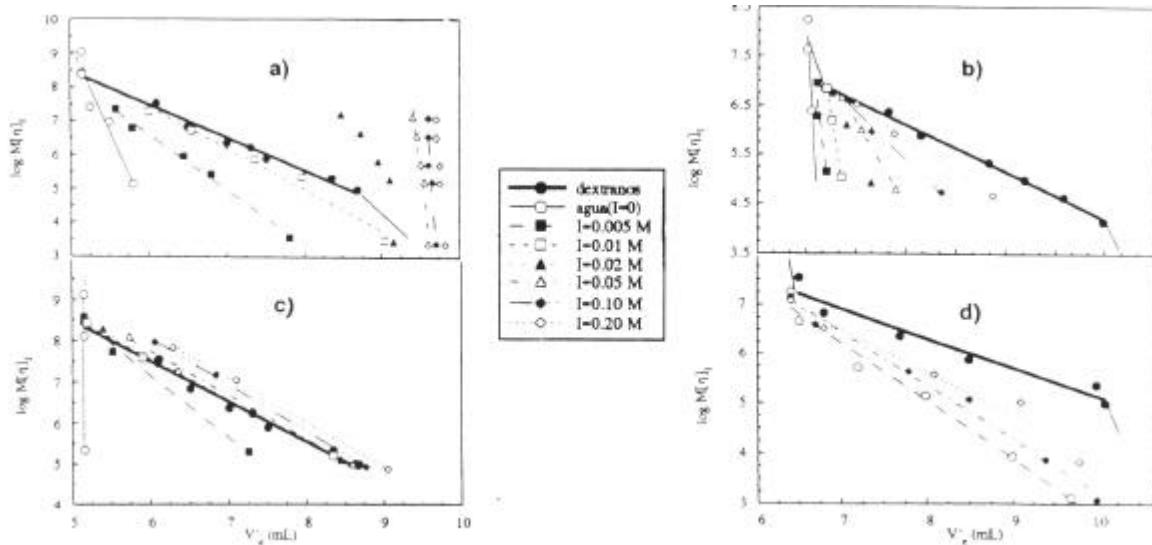


Figura 1. Curvas de calibrado de los sistemas poliIÓN/pH/columna a las fuerzas iónicas arriba enmarcadas:
a) PSS a pH 7 en columna TSK PW; b) PGA a pH 7 en columna HG 250; c) PAA a pH 5 en columna TSK PW;
d) PSS a pH 4 en columna Protein I-250.

A la hora de interpretar cuantitativamente los resultados anteriores, conviene recordar la relación entre los volúmenes de elución de solutos como los polímeros neutros, que se separan únicamente por exclusión, y los de aquellos como los polielectrolitos en que intervienen además efectos secundarios, como se muestra esquemáticamente en la Figura 2, en la que se definen geométricamente los volúmenes intersticiales, V_o , de poros, V_p , y total, V_T .

Los volúmenes de elución de un polímero neutro pueden expresarse, en términos cromatográficos, mediante:

$$V_e = V_o + K_{SEC} V_p \quad (1)$$

y el de un polielectrolito en las formas:

$$V_e = V_o + K_{SEC} K_p V_p \quad (2a)$$

$$V'_e = V_o + K_{SEC} V_p \quad (2b)$$

la primera, general y en analogía con (1) la segunda. K_{SEC} es el coeficiente de exclusión por tamaños y K_p un coeficiente que da cuenta de los procesos de separación secundarios. En nuestro caso, valores de $K_p < 1$ indican efectos iónicos y valores de $K_p > 1$ contribuciones de adsorción.

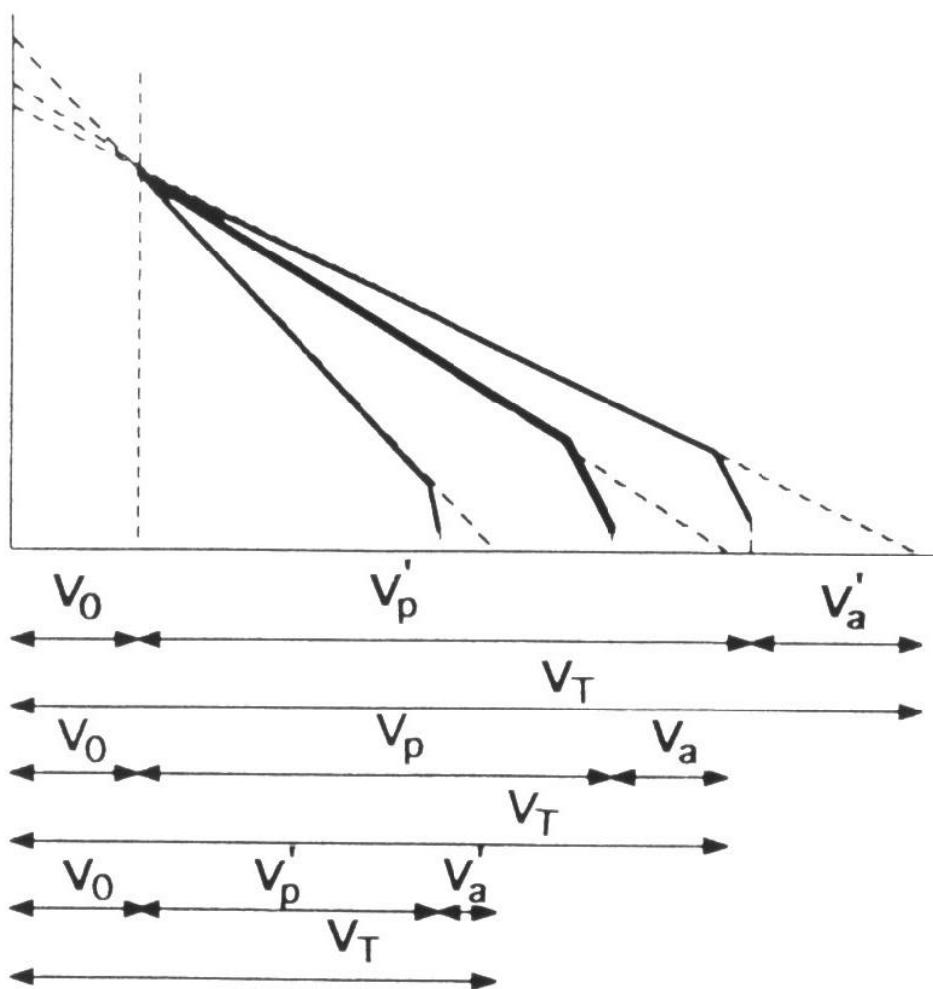


Figura 2. Definiciones geométricas de volúmenes intersticial, de poro y total y calibrados universales para solutos con $K_p < 1$ (efectos iónicos), $K_p = 1$ (sin efectos secundarios y $K_p > 1$ (efectos de adsorción).

En ausencia de procesos secundarios, en SEC de polímeros neutros, la predicción teórica de K_{SEC} se establece a través de los tamaños de poro de la columna y del tamaño del soluto mediante la ecuación de calibrado universal:

$$\log M[\eta] = a - b V_e \quad (3)$$

donde a es la ordenada en el origen de la representación $M[\eta]$ en función de V_e y la pendiente b , o su inversa k_{UC} , se relaciona con las características de la columna, esquematizadas en la Figura 2, mediante:

$$b = \frac{a}{V_o + V_p + V_a} = \frac{1}{k_{UC}} \quad (4)$$

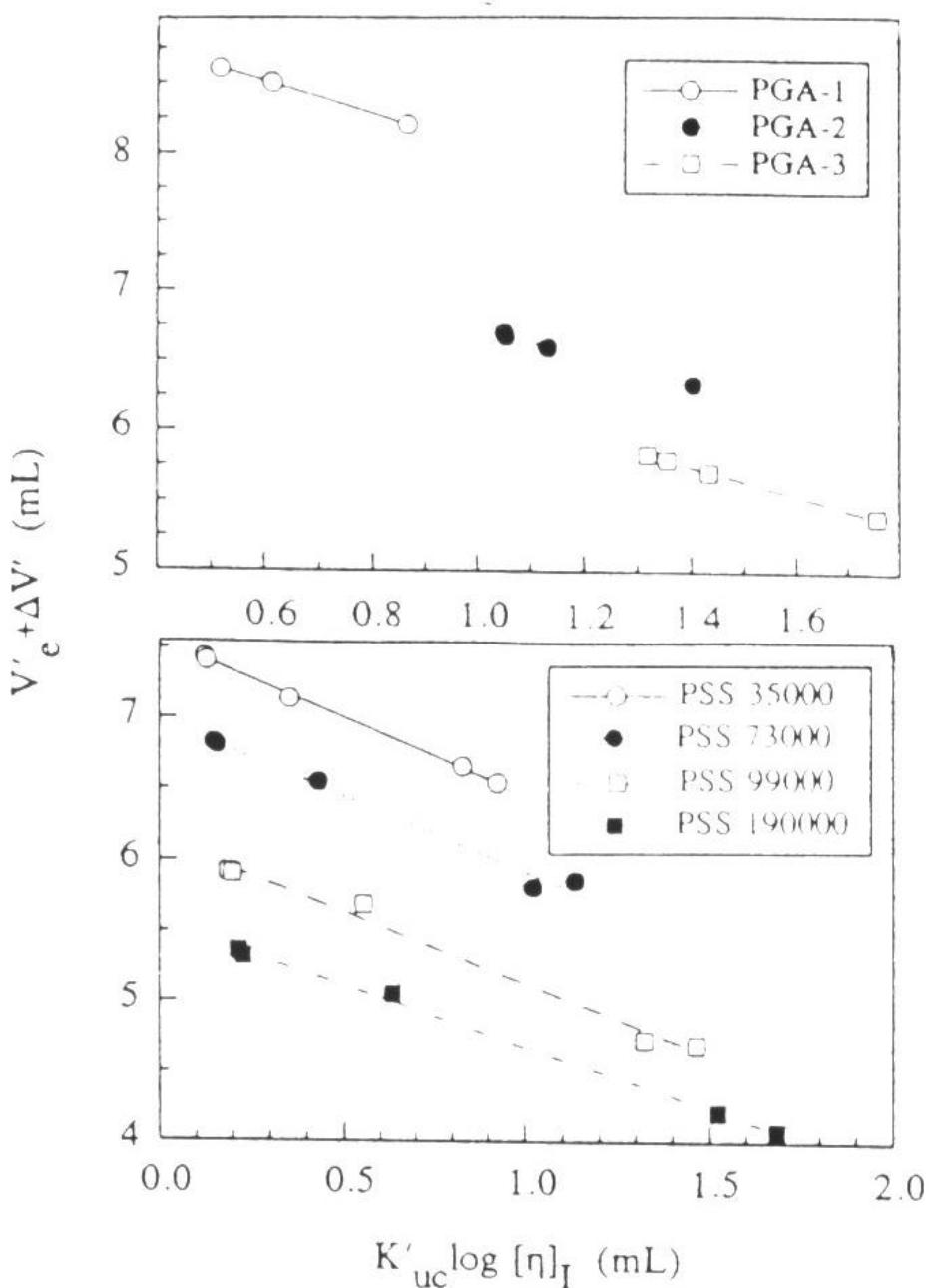


Figure 3. Representación de la ecuación (10) para algunas muestras de los sistemas PGA/pH = 7/TSK PW 4000 y PSSNa/pH = 7/UHG250.

Sustituyendo el valor de b de la ecuación.(4) en la ecuación (3) y despejando la diferencia ($V_e - V_a$) se obtiene la nueva ecuación de calibrado:

$$V_e - V_a = V_o + V_p - k_{uc} \log M[\eta] \quad (5)$$

y análogamente para el calibrado de un polianión en unas condiciones dadas de pH y fuerza iónica I del eluyente, se podrá escribir:

$$V'_e - V_a = V_o + V'_p - k'_{UC} \log M[\eta]_l \quad (6)$$

siendo V_e' el volumen de elución del polielectrolito, $[\eta]$ su viscosidad intrínseca en el eluyente de fuerza iónica I y k'_{UC} la inversa de la pendiente del calibrado $\log M[\eta]$ en función de V_e' , obtenido con muestras de polielectrolito de diversas masas moleculares.

Como se observa en la Figura 1, los volúmenes de elución de polielectrolitos varían con la fuerza iónica del medio. En este contexto, Styring (8,9) ha propuesto una variación lineal de V_e' con $I^{1/2}$, mientras que otros autores (14,16) han propuesto una dependencia de segundo orden, expresada como:

$$V_e' = V_\infty - K_{el} I^{-1/2} \quad (7a)$$

$$V_e' = V_\infty - K_{el} I^{-1/2} + K'' I^{-1} \quad (7b)$$

donde K_{el} es una constante que contiene parámetros eléctricos y geométricos, V_∞ es el volumen de elución del polielectrolito a $I \rightarrow \infty$, en cuyas condiciones el polielectrolito se comportaría como un polímero neutro y en la constante K'' se incluyen las características del sistema cromatográfico. De hecho, para valores de I lo suficientemente elevados ambas ecuaciones coinciden.

La diferencia ($V_e - V_e'$) define la magnitud de los efectos secundarios en ASEC. Su evaluación la hemos realizado eliminando V_o entre las ecuaciones (1) y (2b) y sustituyendo el valor de V_e' dado por la ecuación (7b), lo que permite obtener la siguiente relación entre los volúmenes efectivos de poro que presenta una columna en presencia de un polímero neutro, V_p , y de uno cargado, V'_p , en un eluyente de fuerza iónica I :

$$V'_p - \frac{K''}{K_{SEC}} I^{-1} = V_p - \frac{K_{el}}{K_{SEC}} I^{-1/2} \quad (8)$$

Sumando V_o y restando $k_{UC} \log M[\eta]$ a ambos miembros de la ecuación anterior, expresando K_{SEC} en términos de volúmenes, teniendo en cuenta las relaciones de volúmenes indicadas en la Figura 2 y despreciando la diferencia ($V_a - V'_a$) se obtiene finalmente para la relación entre los volúmenes de elución de un polímero cargado y su correspondiente polímero neutro:

$$V_e + \log \frac{(M[\eta])^{k_{UC}}}{(M[\eta]_\infty)^{k_{UC}}} + (V_p - V'_p) = V_e \quad (9)$$

Como se observa, dos términos contribuyen a los efectos secundarios. El primero es el definido por $\log \left[(M[\eta]_1)^{k_{UC}} / (M[\eta]_\infty)^{k_{UC}} \right]$ y da cuenta de la atmósfera iónica del polielectrolito, la cual define su tamaño y su forma, es decir, su volumen hidrodinámico. De hecho, cuando $I \rightarrow \infty$, $[\eta]_1 \rightarrow [\eta]_\infty$, $k'_{UC} \rightarrow k_{UC}$ y el

término se anula. El segundo término ($V_p - V'_p$) se puede considerar como el volumen de poros impenetrable al polímero debido al potencial electrostático de la superficie de la fase estacionaria y adquiere el valor $V_p - V'_p = V_r = \chi_e$, siendo A el área de la superficie del gel y χ_e la altura de la barrera electrostática creada por el potencial de superficie. Ya que χ_e es proporcional a la longitud de Debye, cuando $I \rightarrow \infty$, $\chi_e \rightarrow 0$, y el término se anula. Así pues, resumiendo, la ecuación (9) contiene dos contribuciones a los efectos iónicos de polímeros cargados a) su carga, sólo considerada en forma aislada en el modelo de Styrling et al. (8,9) y b) la carga del gel, tenida en cuenta de forma aislada también por Dubin y col.(4,5) en su modelo.

La ecuación (9) puede también utilizarse en la forma:

$$V'_e + \Delta V = V_e - k_{UC} \log M[\eta]_l \quad (10)$$

La representación del primer miembro frente a $k'_{UC} \log M[\eta]_l$ dará rectas de pendiente ≈ 1 , cuyas ordenadas en el origen serán los valores de V_e , es decir los volúmenes de elución de los polímeros neutros que resultarían de la neutralización de los polielectrolitos. En la Figura 3 se muestra la representación de la ecuación anterior para tres muestras de PGA de masas moleculares 13.600, 43.000 y 77.800 g/mol en el sistema PGA/TSK PW4000 y eluyentes de diversas fuerzas iónicas a pH 7,0 y para diversas muestras de PSSNa del sistema PSSNa/pH = 7/UHG250. Como puede observarse en todos los casos las pendientes son cercanas a la unidad confirmándose la validez de la ecuación. De las ordenadas en el origen de dichas representaciones se deduce V_e , el volumen de elución que corresponde al volumen hidrodinámico $M[\eta]_\infty$ de un polímero sin carga de masa M. Como se verá posteriormente, efectivamente, los calibrados teóricos obtenidos de la representación $\log M[\eta]_\infty$ en función de V_e coinciden con los experimentales de polímeros neutros.

Sin embargo, aunque la ecuación (10) tiene una importancia formal indiscutible, carece de ella desde un punto de vista práctico ya que en su utilización son necesarios previamente todos los datos, cuando son algunos de ellos, como k_{UC} y V_T , los que se pretenden predecir. La sustitución de $(V_p - V'_p)$ dado por la ecuación (8) en la ecuación (9) y expresando K_{SEC} en función de las características de las columnas ecuación (1), con las suposiciones aproximadas $k'_{UC} \approx k_{UC}$ y $(V_T - V'_T) \approx (V_p - V'_p)$, permite obtener:

$$V'_e + \Delta V^* = V_e - \frac{K_{el}}{K_{SEC}} I^{-1/2} + \frac{K''}{K_{SEC}} I^{-1} \quad (11)$$

en la que $\Delta V^* = k_{UC} \log (\eta / [\eta]_\infty)$ y que predice una variación de segundo orden de V'_e con respecto a $I^{-1/2}$, en contraposición a la variación lineal propuesta por Styrling:

$$V_e + k_{UC} \log \frac{[\eta]_l}{[\eta]_\infty} = V_e - K_{el} I^{-1/2} \quad (12)$$

En la figura 4 se comparan las ecuaciones (11) y (12) para los sistemas de la Figura 3. Como se observa, los resultados experimentales se ajustan mejor a los polinomios de segundo grado. Finalmente, en la Figura 5 se representan los calibrados universales teóricos obtenidos con los valores de $M[\eta]_e$ y los de V_e' obtenidos de las ordenadas en el origen de las ecuaciones (10) - (12) y se comparan con el calibrado universal de polímeros neutros (dextrano). Como se puede observar en la figura, los volúmenes de elución derivados de la ecuación (10) reproducen exactamente el calibrado de polímeros neutros. Asimismo, se puede comprobar como los calibrados construidos con los V_e' deducidos de la ecuación (11), aquí propuesta, se desvían menos, en general, que los construidos con los deducidos de la ecuación (12).

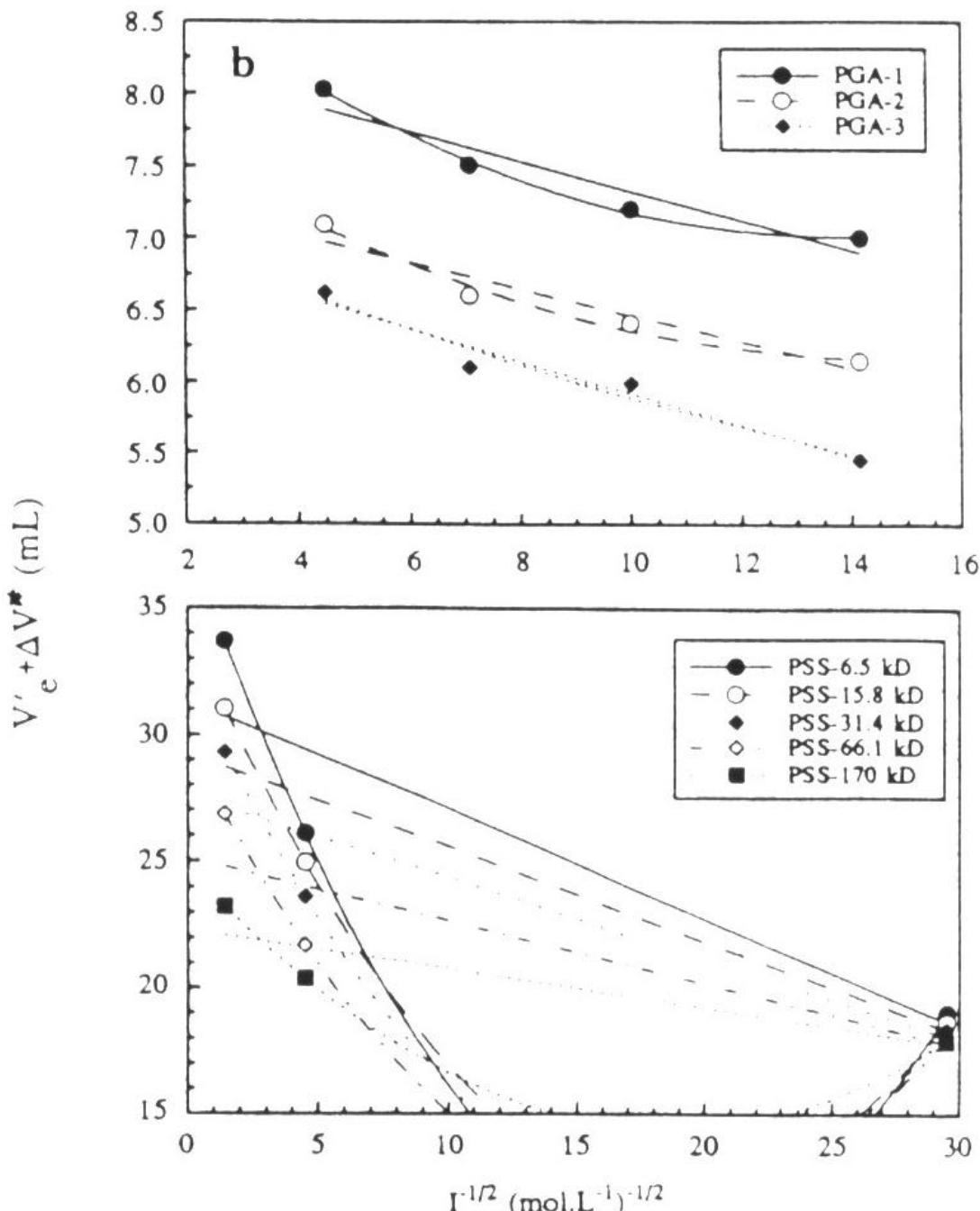


Figura 4. Comparación entre las ecuaciones (11) y (12) para los sistemas de la Figura 3.

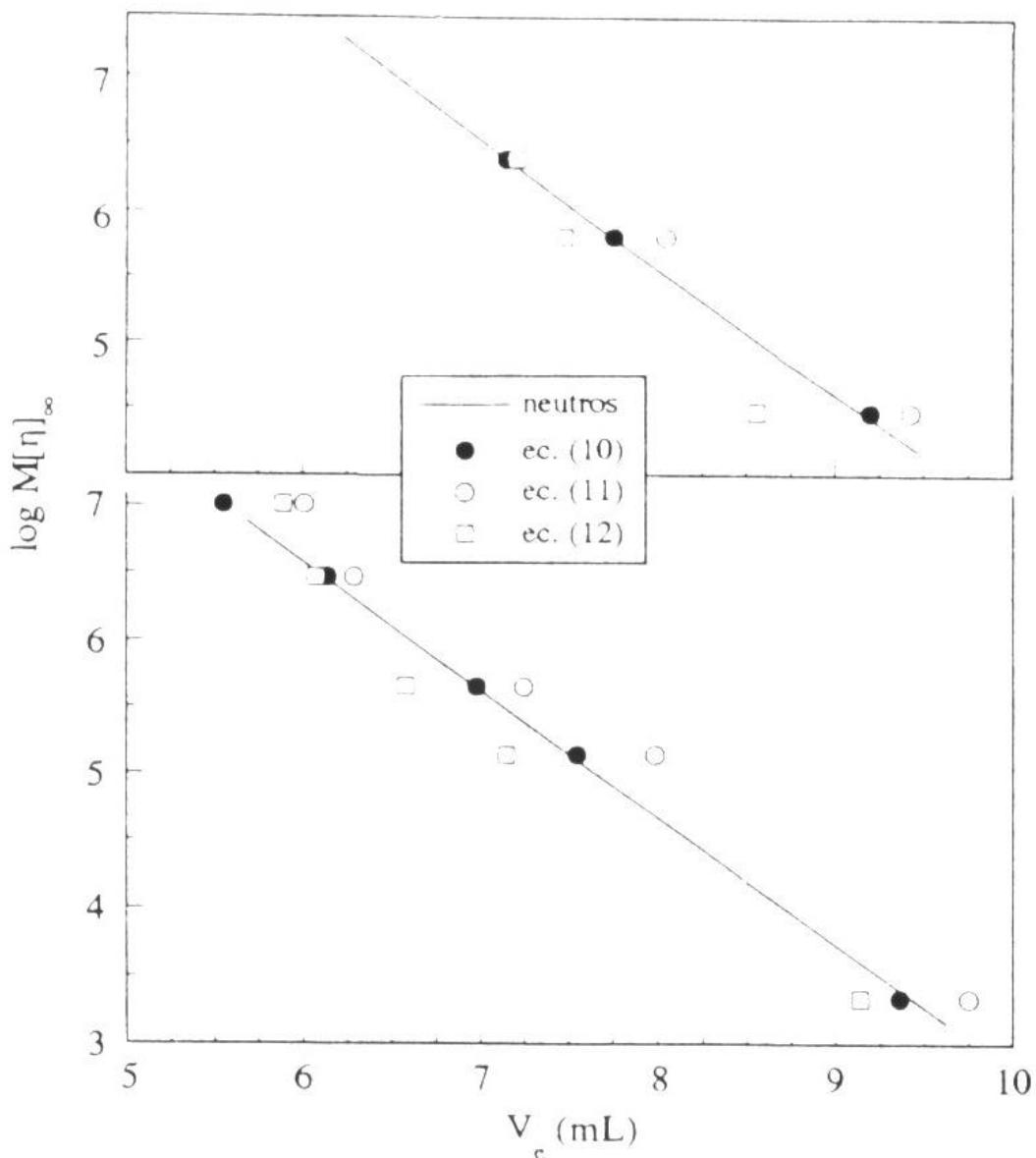


Figura 5. Comparación entre los calibrados universales de polímeros neutros y los deducidos de las ecuaciones (10), (11) y (12) para los sistemas de la Figura 3.

La ecuación propuesta evalúa pues la contribución de los efectos iónicos, pero no da cuenta de otros efectos secundarios, como los de adsorción, también presentes en algunos de nuestros sistemas como se observa en la Figura 1, en que en algunos de ellos los volúmenes de elución de los poliiones a moderadas fuerzas iónicas se desplazan a valores superiores a los de los correspondientes polímeros neutros. En este contexto, eliminadas o minimizadas las interacciones iónicas, para un mismo volumen hidrodinámico, se puede evaluar experimentalmente el valor de K_p a través de:

$$K_p = \frac{V_e - V_o}{V_e - V_o} \quad (13)$$

y se están realizando estudios para su evaluación cuantitativa por medio de su relación con los parámetros de interacción disolvente-polímero, g^o_{12} , y disolvente-gel g^o_{13} , propuesta por Horta et al (17):

$$\ln K_p = -m_2 \phi_3 (1 - g^o_{12} - g^o_{13}) \quad (14)$$

en la que m_2 es la relación entre los volúmenes molares de polímero y disolvente. Como V_2 es proporcional a M , $\ln K_p$ debe seguir una variación lineal con M , como se ha observado experimentalmente.

BIBLIOGRAFIA

- (1) H.G. Barth, W.E. Barber, C.H. Lochmüller, R.E. Majors y F.E. Regnier, *Anal. Chem.*, **58**, 211R (1986).
- (2) H.G. Barth, W.E. Barber, C.H. Lochmüller, R.E. Majors y F.E. Regnier, *Anal. Chem.*, **60**, 387R (1988).
- (3) H.G. Barth, *J. Chromatogr. Sci.*, **18**, 409 (1980)
- (4) P.L. Dubin y M.M. Tecklenburg, *Anal. Chem.*, **57**, 275 (1985).
- (5) P.L. Dubin, C.M. Speck y J.I. Kapland, *Anal. Chem.*, **60**, 895 (1988).
- (6) P.L. Dubin, R.M. Larter, C.J. Wu y J.I. Kaplan, *J. Phys. Chem.*, **94**, 7243 (1990).
- (7) S. Mori, *Anal. Chem.*, **61**, 530 (1989).
- (8) M.G. Styring, C.J. Davison, C. Price y C. Booth, *J. Chem. Soc., Faraday Trans. I*, **80**, 3051 (1984).
- (9) M.G. Styring, H.H. Teo, C. Price y C. Booth, *Eur. Polym. J.*, **24**, 333 (1988).
- (10) D.A. Hoagland, *Macromolecules*, **23**, 2781 (1990).
- (11) M.J. Parets, R. García, V. Soria y A. Campos, *Eur. Polym. J.*, **26**, 767 (1990).
- (12) V. Soria, A. Campos, R. García, M.J. Parets, L. Braco y C. Abad, *J. Liquid Chromatog.*, **13**, 1785 (1990).
- (13) E. Pérez-Payá, L. Braco, C. Abad, V. Soria y A. Campos, *J. Chromatog.*, **548**, 93 (1991).
- (14) R. García, I. Porcar, A. Campos, V. Soria y J.E. Figueruelo, *J. Chromatog. A*, **655**, 3 (1993).
- (15) M. Potschka, *Macromolecules*, **24**, 5023 (1991).
- (16) R. García, I. Porcar, A. Campos, V. Soria y J.E. Figueruelo, *J. Chromatog. A*, **662**, 61 (1994).
- (17) J.M. Barrales-Rienda, P.A. Galera Gómez, A. Horta y E. Saiz, *Macromolecules*, **18**, 2572 (1985).