



GLICOPROTEÍNAS TERAPÉUTICAS

DISEÑO, EXPRESIÓN
EN CÉLULAS DE
MAMÍFERO Y ANÁLISIS
DE SUS GLICANOS

BIOT

GLICO- PROTEÍNAS TERAPÉU- TICAS

Guillermina Forno
Marcos Oggero
(EDITORES)



9

Fundamentos de la cromatografía de alta resolución de intercambio aniónico (HPAEC-PAD)

Determinación estructural de glicoproteínas

ALICIA S. COUTO

9.1. INTRODUCCIÓN

Históricamente, la purificación y el análisis de hidratos de carbono involucró el uso de técnicas como filtración en geles, cromatografía de afinidad (por ejemplo, lectinas) y cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). En esta última técnica se utilizaron columnas de fase reversa con resinas alquílicas o fases amino para la separación de monosacáridos neutros y cromatografía de par iónico para oligosacáridos (Honda, 1984, Hicks, 1988; Huber & Bonn, 1995). Las columnas de celite-carbón que habían sido utilizadas para la separación de hidratos de carbono no pudieron ser aplicadas en HPLC dado su fragilidad a la presión.

Así, existen en el mercado numerosas columnas de HPLC aplicables al análisis de azúcares con diferentes grados de entrecruzamiento, diferentes formas iónicas y tamaños de partículas de las fases estacionarias y también de diferentes largos, aplicables a la separación de monosacáridos y oligosacáridos y que utilizan en general como fase móvil acetonitrilo: agua. Más recientemente, sistemas cromatográficos de interacción hidrofílica usando columnas basadas en empacados de fase unida a sílica con fases móviles de acetonitrilo: agua, también han sido utilizadas para la separación de hidratos de carbono. Sin embargo, este modo de HPLC puede tener desventajas como la inestabilidad y corto tiempo de vida de las fases unidas y la pobre selectividad y eficiencia de las columnas (Corradini *et al.*, 2012).

Debido a que los hidratos de carbono no absorben a longitudes de onda ultravioleta, el método de detección más utilizado es el índice de refracción. Si bien de esta forma se han podido separar oligosacáridos neutros, oligosacáridos que difieren en las ramificaciones y oligosacáridos conteniendo ácido siálico, no se logra la separación de oligosacáridos que difieran en el tipo de unión:

por ejemplo, $\text{Glc}(1\text{-}2)\text{Glc}$, $\text{Glc}(1\text{-}3)\text{Glc}$ y $\text{Glc}(1\text{-}4)\text{Glc}$

Otra metodología muy utilizada es la cromatografía gas-líquido, pero dado que los azúcares no son volátiles, exige una etapa previa de derivatización. (Reinhold, 1972; Laine *et al.*, 1972) También se ha acoplado el uso de cromóforos

o fluoróforos con el fin de aumentar la sensibilidad de detección (Muramoto *et al.*, 1987; Rosenfelder *et al.*, 1985; Takemoto *et al.*, 1985; Lin *et al.*, 1985). En forma más reciente, aparecen en la literatura ejemplos de separaciones de hidratos de carbono que utilizan electroforesis capilar.

Sin embargo, con el fin de mejorar las separaciones y facilitar el análisis de azúcares se desarrolló una técnica de HPLC que utiliza resinas básicas y eluyentes de alto pH (1-4) (Hardy *et al.*, 1988). La separación se basa en la pequeña acidez que presentan los hidratos de carbono (Frahm *et al.*, 1959) y se combina con un detector de pulso amperométrico que no requiere derivatizaciones y que permite la detección de los azúcares en el orden de pico y nanomoles (Rockin *et al.*, 1983). Así, en la Figura 9.1 se observa una separación de monosacáridos y en la Figura 9.2, la separación de oligosacáridos obtenidos por hidrólisis enzimática de fetuina. Nótese que aún dentro de cada grupo de oligosacáridos mono, di, tri y tetrasialilados, se distinguen especies que tienen diferencias solo en los tipos de unión y que se detectan como picos diferentes.

Un equipo de cromatografía de intercambio aniónico con detector de pulso amperométrico (HPAEC-PAD) consta de las siguientes partes: módulo de eluyentes, bomba, inyector, columna de separación, detector electroquímico y la computadora para adquisición de datos (Figura 9.3).

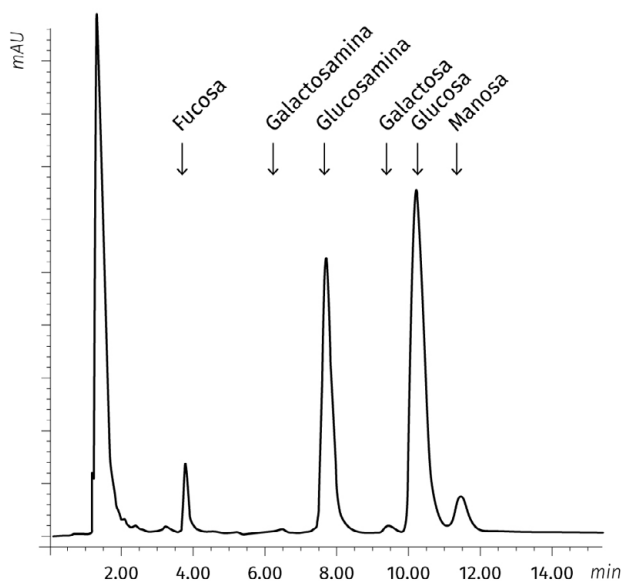


FIGURA 9.1. ANÁLISIS POR HPAEC-PAD DE UNA MEZCLA DE MONOSACÁRIDOS

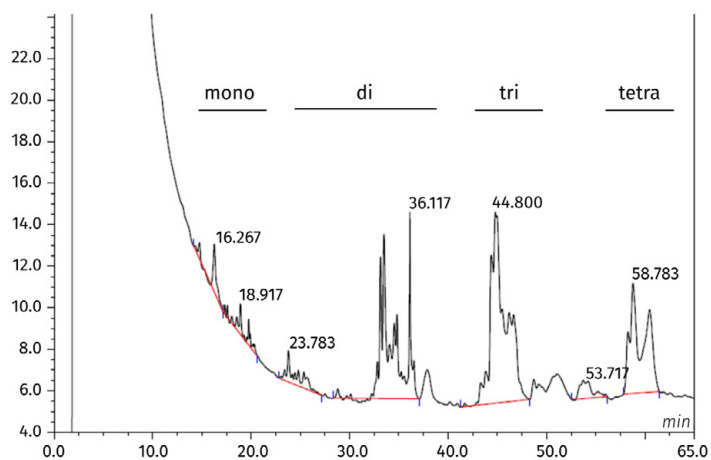


FIGURA 9.2. ANÁLISIS POR HPAEC-PAD DE UNA MEZCLA DE OLIGOSACÁRIDOS SIALILADOS OBTENIDOS POR HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE FETUINA

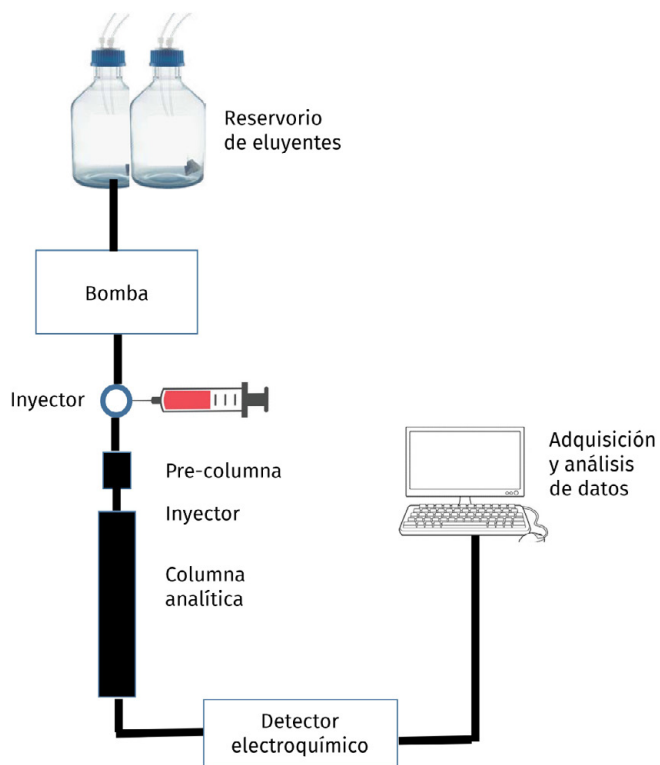


FIGURA 9.3. ESQUEMA DE LAS PARTES CONSTITUYENTES DE UN EQUIPO DE HPAEC-PAD

9.2. FUNDAMENTOS DE LA SEPARACIÓN

Dijimos que la separación se basa en la baja acidez que presentan los hidratos de carbono. Si bien los azúcares no son ácidos, el OH anomérico es el más ácido debido a los efectos inductivos del O del anillo y por estabilización del anión por puente hidrógeno con el OH del C-2. Por lo tanto, en ausencia del OH de C-2 (2-desoxiazúcares) la acidez disminuye (Rendelman, 1973). Si no existe H anomérico (alditoles, glicósidos), la acidez de los H decrece en el orden 2-OH >> 6-OH > 3-OH > 4-OH. (Roberts *et al.*, 1971, Paskach *et al.*, 1991).

A continuación, se listan las constantes de disociación de algunos monosacáridos comunes.

TABLA 9.1. CONSTANTES DE DISOCIACIÓN DE ALGUNOS MONOSACÁRIDOS COMUNES (EN AGUA A 25 °C) (RENDELMAN, 1973)

Azúcar	pKa
Galactosa	12,39
Glucosa	12,28
Xilosa	12,50
Manosa	12,08
Fructosa	12,03
Sorbitol	13,60
α-metil glucósido	13,71

Si recordamos el concepto cromatográfico de Factor de capacidad (retención): $K'_i = t_{r_i} - t_o / t_o$ (donde t_{r_i} = tiempo de retención del compuesto i y t_o = tiempo muerto), en una resina de intercambio aniónico fuerte: a valores decrecientes de pKa los K'_i serán crecientes.

Se puede generalizar que las cetosas dan K'_i similares a las aldosas correspondientes y que los polioles presentan K'_i que aumentan con el número de C (sin embargo, con aldosas hay muchas excepciones).

Si vemos en oligosacáridos, la influencia de la acidez del OH-1 del extremo reductor es menor:

TABLA 9.2. CONSTANTES DE DISOCIACIÓN (EN AGUA A 25 °C) Y FACTORES DE CAPACIDAD DE ALGUNOS OLIGOSACÁRIDOS COMUNES

	Oligosacáridos	pKa	K'
Maltosa	Glc α (1-4) Glc	11,74	6,87
Lactosa	Gal β (1-4) Glc	12,22	2,87
Sacarosa	Glc (1-2) β Fru	12,62	3,30
Rafinosa	Gal α (1-6) Glc α (1-2) β Fru	12,74	5,54

Por el contrario, el tipo de unión glicosídica y la estructura conformacional son factores importantes en la separación. Para series relacionadas de oligosacáridos (por ejemplo, glucosa, maltosa, maltotriosa, maltotetra) si se grafican los $\ln K'$ versus la longitud de cadena dan líneas rectas con pendientes características (Koizumi *et al.*, 1989).

Esto significa que, si partimos de glucosa podremos predecir aproximadamente el tiempo de elución de la maltosa y la maltotriosa (serie de la Glucosa α 1-4). Lo mismo si partimos de xilosa, podremos esperar tiempos de retención mayores para la xilobiosa y la xilotriosa. Si en cambio partimos de sorbitol, que tiene un factor de capacidad menor, toda la serie de maltitol, maltotriitol, etc., se retendrá menos que la maltosa y la maltotriosa. Por lo tanto, ha sido posible resolver isómeros de oligosacáridos neutros con uniones 1-3, 1-4 y 1-6 (Hardy & Townsend, 1988; Lee, 1990) así como oligosacáridos liberados de glicoproteínas (Townsend & Hardy, 1991; Rohrer *et al.*, 2013).

Por otra parte, también oligosacáridos ácidos fueron eficientemente separados en condiciones convencionales mostrando que en HPAEC, las separaciones son rápidas y con gran resolución (Tsuji *et al.*, 1982; Troy *et al.*, 1987). Existen trabajos donde han podido resolver oligosacáridos conteniendo hasta 50 unidades de ácido galacturónico (Hotchkiss & Hicks 1990).

9.3. COLUMNAS

Dado que se trabaja a altos pH, la fase fija de las columnas no puede ser de sílica. Se utiliza un copolímero de estireno-divinilbenceno.

Los materiales tradicionales utilizados en HPLC son macroporosos y, por lo tanto, la difusión es lenta, la transferencia de masa es escasa, los picos son anchos y como se trabaja a baja presión máxima, los tiempos en general son largos. Para evitar esos inconvenientes se desarrollaron resinas peliculares poliméricas no porosas que garantizan un rápido transporte de masa, una rápida difusión, alta estabilidad entre pH 0-14 y excelente estabilidad mecánica. Las columnas más comunes empleadas para HPAEC específicamente

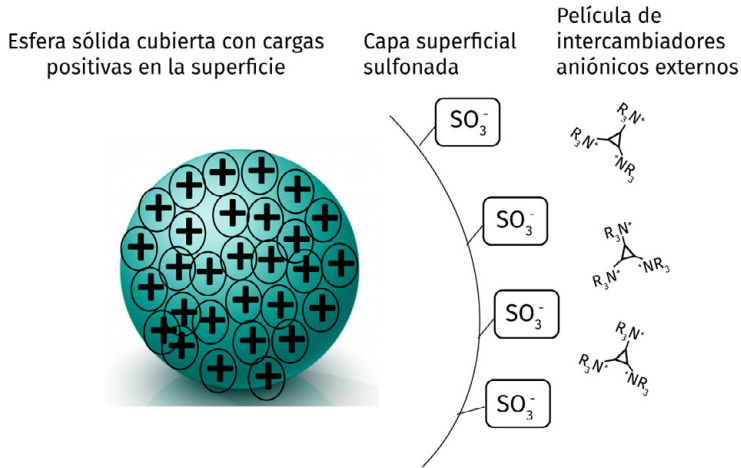


FIGURA 9.4. PARTÍCULA DE LA FASE FIJA CON SUS TRES CAPAS: CORE INERTE, REGIÓN SUPERFICIAL SULFONADA Y MICROBEADS INTERCAMBIADORES

diseñadas para la cromatografía de intercambio aniónico de hidratos de carbono son fabricadas por Dionex (Sunnyvale, CA, USA; ahora Thermo Fisher Scientific Inc., USA).

Las partículas de la fase fija constan de tres capas: un *core* o corazón inerte no poroso; una región superficial sulfonada y capas externas ligadas permanentemente de intercambiadores aniónicos, *microbeads* submicrométricas lo que garantizan un elevado nº de sitios intercambiadores en una superficie pequeña, una alta capacidad de carga y baja difusión (Figura 9.4).

De esta forma se han desarrollado diferentes columnas para separaciones específicas de diferentes hidratos de carbono:

CARBOPAC PA-1 (PA-10, P-20)	monosacáridos neutros y ácidos aminoazúcares
CARBOPAC PA-100 (PA-200)	isómeros estructurales de bajo PM oligosacáridos polisacáridos complejos
OMNIPAC PAX-100	analitos iónicos en general

Existen diferencias en el diámetro de las partículas, el % de divinilbenceno y grado de entrecruzamiento, el diámetro y % de entrecruzamiento de los *microbeads* de látex y la capacidad de carga.

9.4. ELUYENTES

- Como eluyente principal, se utiliza *agua desionizada desgasificada*. Se llama reactivo grado tipo 1 y debe tener una resistividad mayor a 17.8 M Ω /cm. Debe estar libre de impurezas iónicas, orgánicas, microorganismos y agente particulados > 0.2mm. No se recomienda utilizar agua grado HPLC en botella siendo lo más recomendable utilizar agua denominada Milli Q.
- Las separaciones en general se llevan a cabo en *soluciones de NaOH*. La solución madre no se debe preparar a partir de NaOH en pellets debido a que se encuentran muy carbonatados y cambia la fuerza iónica del eluyente. Es aconsejable preparar las soluciones a partir de soluciones comerciales de NaOH 50 % (p/p). Se debe, en todos los casos, evitar la carbonatación y por lo tanto se aconseja minimizar el tiempo de exposición al aire y utilizar botellas frescas en recipientes plásticos. Como el carbonato se acumula en general sobre las paredes y el fondo del recipiente, no es aconsejable volcar desde el recipiente, sino pipetear la cantidad necesaria, sin tocar los bordes.
- *Soluciones de acetato de sodio*. Se usan gradientes crecientes de acetato de sodio o combinados de NaOH y NaAcO. La sal cambia la fuerza iónica del eluyente y la ionización del analito. En algunos casos se utilizan también gradientes reversos (por ej., para separar Gal de Xil) o gradientes ternarios. Las soluciones se preparan a partir de NaAcO anhidro o trihidratado con agua desionizada. Se filtran por membranas de 0.2 mm para evitar particulados y se desgasifican.
- En el caso de las columnas Omnipac PAX-100 que precisan mínimo 1 % solvente orgánico se utilizan solvente grado HPLC. Los solventes más utilizados son metanol, etanol y acetonitrilo. Las mezclas con agua deben hacerse antes de llevarlas al equipo para minimizar la formación de burbujas. Y en los casos de utilizar acetonitrilo e NaOH se aconseja no hacer soluciones del acetonitrilo en la base ya que el solvente orgánico se descompone dando acetato y amoníaco.
- Las soluciones se colocan en los reservorios de plástico, asegurándose que los tubos con filtros en línea lleguen al fondo y queden inmersos en la solución. Se presuriza y desgasifica con helio para prevenir burbujas. Puede también utilizarse argón o nitrógeno. Si el sistema no se encuentra desgasificado convenientemente podemos tener problemas en el funcionamiento de la bomba, en la detección o incluso tener escasa resolución de los analitos por carbonatación del eluyente.
- Los pasos a seguir serían:
 1. preparación del eluyente y colocación en el reservorio;
 2. desgasificación por vacío o sonicación (aprox. 5 min);
 3. colocación del reservorio en el equipo, sin agitar;
 4. cerrar el reservorio, presurizar, pasar Helio a aprox. 7 psi durante 20 min;
 5. llenar el sistema con c/u de los eluyentes por separado (*priming*).

9.5. BOMBAS

Estos equipos presentan una bomba (DX-300; DX-3000) que puede mezclar cuatro eluyentes diferentes, a flujos controlados y composiciones controladas. Existen columnas de 4 mm de diámetro interno (analíticas); de 9 mm de diámetro interno (preparativas) y también columnas denominadas microbore para separaciones más exigentes. Las bombas están preparadas para trabajar con flujos de 0,1 a 10 ml/min, con presión máxima de 5000 psi.

Se puede realizar separaciones isocráticas o con gradiente y la bomba permite utilizar gradientes lineales, cóncavos o convexos.

Se utiliza un programa de a pasos determinado por tiempos que se controla en forma remota con una interfase desde la computadora.

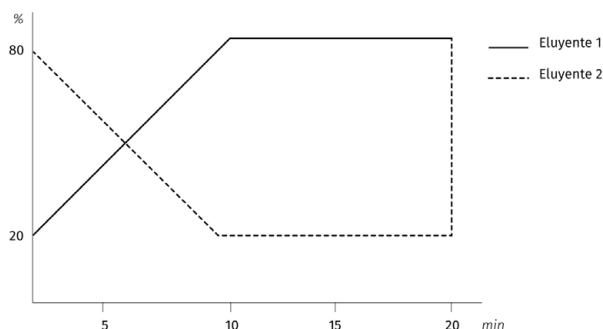


FIGURA 9.5. ESQUEMA DE UN PROGRAMA DE A PASOS

El mantenimiento de la bomba es importante. Se deben lavar los pistones diariamente con agua. Si el equipo no se utiliza por más de tres días se aconseja pasar agua por las 4 válvulas. Se recomienda chequear pérdidas de la bomba y de la tubería, cambiar los filtros de los eluyentes periódicamente y la lubricación regular cada 6 meses de los pistones para que operen suavemente (esto último realizado por personal experto).

9.6. PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

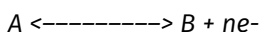
Se recomienda filtrar las muestras por membranas de 0.4 mm para remover partículas, evitar concentraciones salinas muy altas pues son eluyentes fuertes y no inyectar más de 10 nanomoles de un analito en una columna analítica. Las inyecciones son en general de 10 a 50 ml a través del *loop* correspondiente.

9.7. DETECTOR

El uso en tándem del detector de pulso amperométrico con el HPAEC es una ventaja extrema. Esto evita la necesidad de derivatización pre- o poscolumna y es uno de los métodos más sensibles de medición de hidratos de carbono.

El detector es una celda electroquímica que consta de una fuente (potenciómetro) y tres electrodos. Se aplica una secuencia repetitiva de tres potenciales (E_1, E_2, E_3) durante pulsos de tiempo (t_1, t_2, t_3) y se mide la corriente generada por oxidación o reducción del analito sobre la superficie del electrodo de trabajo. Esta corriente es proporcional a la concentración del analito en la solución. Se puede optimizar: la sensibilidad, la reproducibilidad y la selectividad.

La corriente es generada porque las sustancias son oxidadas o reducidas sobre la superficie del electrodo de trabajo. Si hay oxidación, los e^- se transfieren al electrodo de trabajo, se genera una corriente positiva (anódica). Si en cambio se produce una reducción, los electrones se transfieren del electrodo de trabajo a las moléculas electroactivas. Se genera una corriente negativa (catódica). La elección de los potenciales a aplicar se determina por voltametría.



Donde A y B son las especies en equilibrio en la superficie del electrodo

$$\text{Si } E_{\text{app}} = E \quad [B] = [A]$$

$$\text{Si } E_{\text{app}} > E \quad [B] > [A], \text{ el analito se oxida y se genera corriente anódica.}$$

$$\text{Si } E_{\text{app}} < E \quad [B] < [A], \text{ el analito se reduce y se genera corriente catódica.}$$

El proceso sería una voltametría hidrodinámica: el pasaje de una solución conteniendo un analito y un electrolito soporte a través de un electrodo de trabajo por bombeo de la solución. Se aumenta el potencial aplicado y se mide la corriente resultante (Figura 9.6).

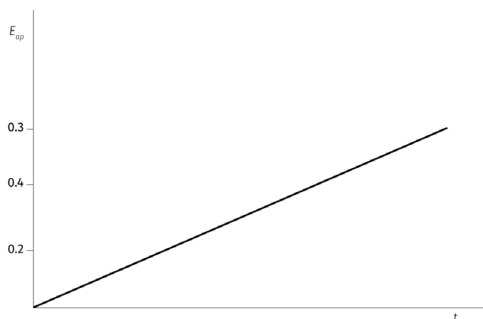


FIGURA 9.6. GRÁFICO DE POTENCIAL APLICADO *VERSUS* TIEMPO

Veamos qué sucede si solo tengo A en solución y el potencial para la oxidación de A es +0,4 V con respecto a un electrodo de referencia.

A 0,2 V la E_{app} es más negativa que E^0 , por lo tanto, se favorece reducción de B a A. Como la solución solo tiene A, no hay reacción. Por lo tanto, la [A] en el electrodo es igual a [A] en el total de la solución y la corriente es cero.

Si el E_{app} es aumentado, la relación de B hacia A aumenta. Por ejemplo:

$$A \text{ 0,4 V } E_{app} = E$$

La [A] = [B] en la superficie del electrodo, pero como la solución circula, la [A] se mantiene. Es decir que a pocos milímetros de la superficie del electrodo, la [A] es constante. La distancia entre el electrodo y el punto en el que la concentración de A es igual a la concentración de A en la solución se denomina zona de difusión. El transporte de A a la superficie del electrodo es vía difusión, o sea existe un gradiente de concentración.

Cuando el potencial es aumentado a 0,6V la concentración de A en la superficie del electrodo es 0. Todas las moléculas que llegan al electrodo se oxidan a B. Por lo tanto, la corriente es limitada por la velocidad de difusión. Se la llama «corriente límite». En ese momento:

$$I = n \times F \times A \times D \times [a]$$

Donde: F, es la constante de Faraday

A, es el área del electrodo

D, es el coeficiente de difusión

[A], es la concentración de A en la solución

Sin embargo, en este caso, estamos en una voltametría cíclica, donde el potencial es aplicado de a pasos:

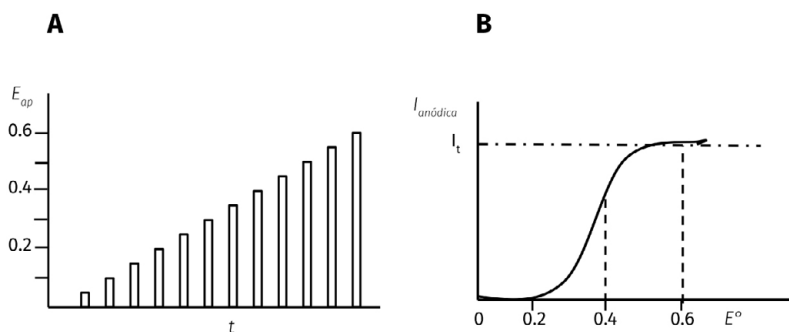


FIGURA 9.7 POTENCIAL APLICADO DE A PASOS EN FUNCIÓN DEL TIEMPO (A). CORRIENTE ANÓDICA EN FUNCIÓN DEL POTENCIAL APLICADO (B)

Es decir, de 0 – 0,2 V no hay reacción
 0 – 0,4 V [A] = [B] sup del electrodo A se oxida
 0 – 0.6 V [A] sup del electrodo = 0

Después del pulso, la corriente medida es alta y decrece a medida que las moléculas difunden como se ve en la Figura 9.7.

La corriente total es la suma de dos corrientes: la corriente de Faraday y la corriente de carga (capacitancia entre la interfase electrodo-solución) Para discriminar entre las dos, se retrasa la medición de la corriente un pequeño tiempo (ej. 20 mseg). Así, se maximiza la relación Faraday/carga.

Luego del retraso se mide la corriente durante un período de tiempo.

La corriente se renueva con el nuevo pulso y existe un circuito que suaviza el salto de un pulso a otro. Se usan tiempos de medición desde 16,7 ms a 200 ms. Los tiempos más largos mejoran relación señal/ruido.

Por lo tanto, el E1 se aplica durante 240 ms y se mide durante 200 ms.

Una vez determinado el potencial para que la reacción suceda por voltametría se usa amperometría para detectar. Los azúcares presentan un máximo de respuesta en un rango pequeño de potenciales aplicados. Por lo tanto, el mismo potencial se puede aplicar a todos los azúcares. Si se usa un solo potencial, es lo que se denomina amperometría fija. En un principio existieron detectores de este tipo, pero el electrodo se ensuciaba muy fácilmente. Por eso se aplican 3 potenciales, tal como se muestra en la Figura 9.8 (Koizumi *et al.*, 1989).

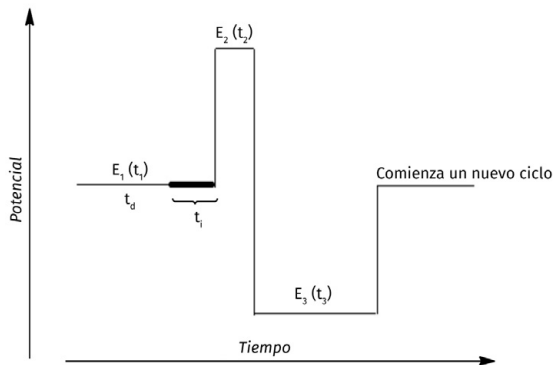


FIGURA 9.8. SECUENCIA REPETITIVA DE POTENCIALES APLICADOS AL ELECTRODO DE TRABAJO

E1 cerca del potencial de oxidación, E2 muy positivo para limpiar el electrodo y E3 muy negativo para reducir el óxido de Au. Las reacciones que sufren los azúcares se indican en la Figura 9.9.

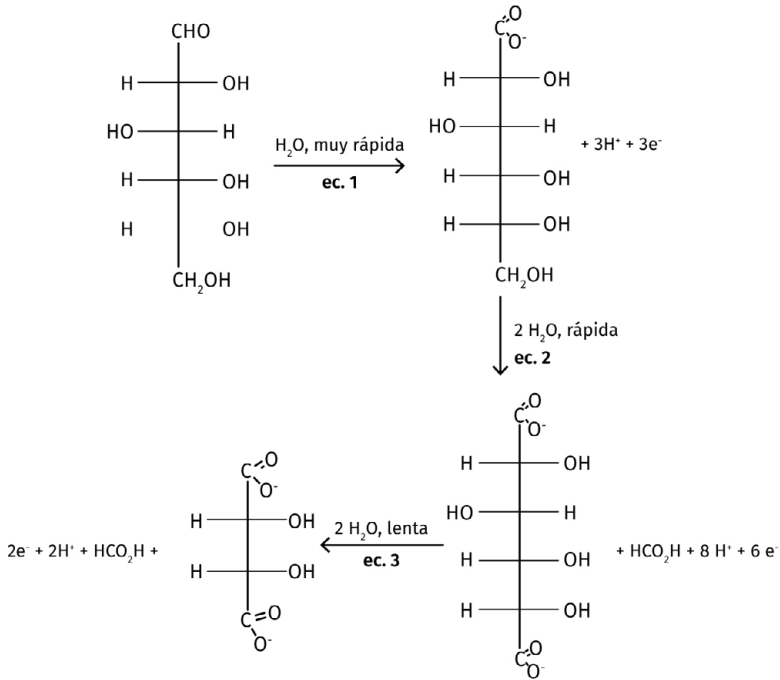
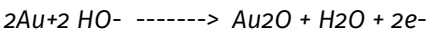


FIGURA 9.9. REACCIONES QUE SUFREN LOS AZÚCARES EN EL ELECTRODO DE TRABAJO

Con el E_1 sucede la ecuaci3n 1 (Figura 9.9), con E_2 , las ecuaciones 2 y 3 (Figura 9.9) y con E_3 la reacci3n de recuperaci3n del electrodo:



Las celdas constan de tres electrodos: un electrodo de trabajo que en general es de oro, pero puede ser tambi3n de plata, platino o carb3n, un electrodo de referencia Ag/AgCl y un *counter* electrodo de acero inoxidable.

Los az3cares oxidados pueden eliminarse del electrodo con un potencial muy negativo que solo dura 10 ms inmediatamente antes de aplicar el potencial de activaci3n positivo y luego negativo.

Existen varios trabajos describiendo la optimizaci3n de los potenciales aplicados y los tiempos de cada uno para diferentes analitos (LaCourse, 1997; Johnson & LaCourse, 1992).

La mejora en la reproducibilidad de la detecci3n de hidratos de carbono a largos tiempos puede alcanzarse aplicando una secuencia de cuatro potenciales al electrodo de trabajo en lugar de tres (Rocklin *et al.*, 1998). En esta secuencia se utiliza un potencial muy negativo para mantener limpio y uno positivo para activar la superficie del electrodo de oro sin causar corrosi3n

del mismo. Esta secuencia de cuatro potenciales maximiza la relación señal/ruido, mostrando límites de detección similares a los que se obtienen con la secuencia de tres potenciales, pero mejorando ampliamente la reproducibilidad a tiempos largos.

Cuidados a tener con la celda del detector:

1. cerrar la celda al final del día;
2. pulir el electrodo periódicamente;
3. lavar los componentes de la celda;
4. chequear pérdidas.

El ruido debe ser mínimo debido a las variaciones de flujo. Se debe evitar la turbulencia por ejemplo, debido a variaciones de temperatura.

Existen otros detectores que amplían la posibilidad de trabajo. Por ejemplo, el denominado ED-40 es detector electroquímico, de conductividad, de amperometría fija, de amperometría pulsada y de voltametría cíclica y, además, monitorea pH para la detección. Se puede adicionar un detector UV-visible variable o uno denominado AD-20, de doble haz programable.

9.8. SUPRESOR (NEUTRALIZADOR)

El uso de membranas supresoras para el desalado se inició en 1989 (Spellman *et al.* 1989). El intercambio de Na^+ por H_3O^+ en la membrana supresora se lleva a cabo en el interior de un par de membranas de intercambio catiónico separadas por la cámara del eluyente.

El método involucra el desalado de las muestras en línea (Basa & Spellman, 1990; Thayer *et al.*, 1998). En este caso se utiliza un supresor aniónico. Provee una alta capacidad de supresión agregando mínimo volumen muerto. Existen supresores para columnas de 4 mm y de 2 mm de diámetro. Consta de un módulo de supresión y una fuente de corriente.

En el interior del módulo supresor se observan 2 compartimentos regenerantes y un compartimiento del eluyente separados por membranas de intercambio iónico. Es decir, hay un canal de flujo regenerante y un canal de flujo de eluyente en lados opuestos de la membrana y estos van a contracorriente

En las cámaras regenerantes están los electrodos. Por lo tanto, se aplica un potencial y el agua de los agentes regenerantes es electrolizada aportando H^+ que pasan por la membrana para la reacción de neutralización. De esta forma, el eluyente se convierte en una forma poco ionizada. A su vez, para mantener el balance de carga los eluyentes catiónicos pasan hacia la zona regenerante.

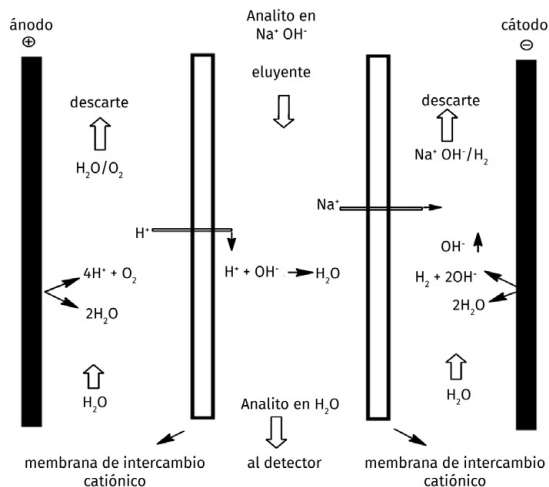


FIGURA 9.10. REACCIONES EN EL MÓDULO DE SUPRESIÓN

9.8.1. Modo de autosupresión reciclada

Utiliza el eluyente de la celda como fuente de agua para la cámara de regeneración. No se utiliza fuente de agua externa. Para ello, el eluyente luego de pasar por la celda de detección es redirigido a la entrada del regenerante. En este caso la fuente de agua contiene el analito diluido, pero al ser mínimas las cantidades del analito, no afectan.

En este caso, la cantidad de agua fluyendo es limitada por el flujo del eluyente. No se debe utilizar cuando hay solventes en el sistema.

9.8.2. Autosupresión con fuente externa de agua

Necesita una fuente constante de agua deionizada de una botella presurizada con un flujo aprox. 5–10 ml/min. Debe colocarse un regulador de presión para el reservorio. En este caso, la cantidad de agua que fluye es independiente del flujo del eluyente y se maneja desde el regulador de presión. Cualquier análisis que se haga con el reciclado puede hacerse en modo externo.

9.8.3. Autosupresión química

Se usa ácido sulfúrico como regenerante en lugar de corriente aplicada y agua desionizada.

El ácido se adiciona desde una botella presurizada.

La capacidad supresora aumenta a medida que aumenta el flujo de agua a través de las cámaras regenerantes. A mayor flujo de agua, mayor capacidad supresora. Se calcula que el flujo externo debe ser aproximadamente 10–15 ml/min para columnas de 4 mm y de 5–7 ml/min para columnas de 2 mm.

La supresión se controla por dos factores: a) la presión aplicada al reservorio de agua; b) la corriente elegida en la unidad.

Luego que la corriente es aplicada, el flujo cae debido a la formación de gases en las cámaras regenerantes. Es importante ajustar la presión para dar el flujo necesario a una dada corriente. En estos casos NO se debe cerrar la salida de gases ya que se forman pequeñas cantidades de H_2 .

Cuando se elige la corriente: a mayor conductividad del eluyente, se necesita aplicar mayor corriente para alcanzar supresión total (depende de la naturaleza del eluyente y de su concentración).

A mayor flujo utilizado en la separación, se requiere mayor corriente. Si la corriente es muy baja, puede no remover totalmente los contraiones de la muestra aun cuando el contraión del eluyente pueda ser removido totalmente. Por otra parte, utilizar una corriente muy alta puede crear una línea de base con mucho ruido.

En general se requiere una corriente menor para columnas de 2 mm que para las de 4 mm.

Cuidados: las membranas deben estar siempre hidratadas Si se deja de usar el supresor por un tiempo, hay que rehidratar antes de comenzar el análisis.

Se sabe que la concentración dinámica regenerante debe ser aprox. 6–8 veces la concentración dinámica del eluyente para una correcta supresión. Así un cálculo aproximado es:

$$7 \times [\text{eluyente mM}] \times (\text{flujo ml/min}) = [\text{regenerante mM}] \times (\text{flujo regenerante ml/min})$$

Ejemplo: si se utiliza un eluyente: 50 mM NaOH con un flujo de 1,5 ml/min se debe usar como regenerante: 50 mM H_2SO_4 a un flujo de 10 ml/min.

9.8.4. Supresor catiónico (no para Hidratos de carbono)

En este caso la solución catiónica del regenerante será hidróxido de tetrabutamonio (TBAOH). Puede utilizarse KOH o $(CH_3)_4NOH$, pero dan peores líneas de base en conductividad. No se aconseja el uso de $Ba(OH)_2$ ya que puede precipitar.

9.9. ALGUNOS EJEMPLOS DE ANÁLISIS

9.9.1. Determinación de fibra dietaria soluble

En la Figura 9.11, panel A, se observa una muestra corrida en una columna Carbo-pack P-200 (4 x 250 mm) con la precolumna correspondiente utilizando un gradiente de NaAcO desde una solución de 50 mM NaOH en ausencia del mismo hasta un solución de 250 mM NaAcO conteniendo 50 mM NaOH en 40 minutos con flujo 0,4 ml/min.

En el Panel A se observa la comparación de la muestra original y la muestra tratada con α -amilasa pancreática/amiloglucosidasa, observándose la desaparición de algunos componentes presumiblemente, oligosacáridos con uniones α -D-(1,4).

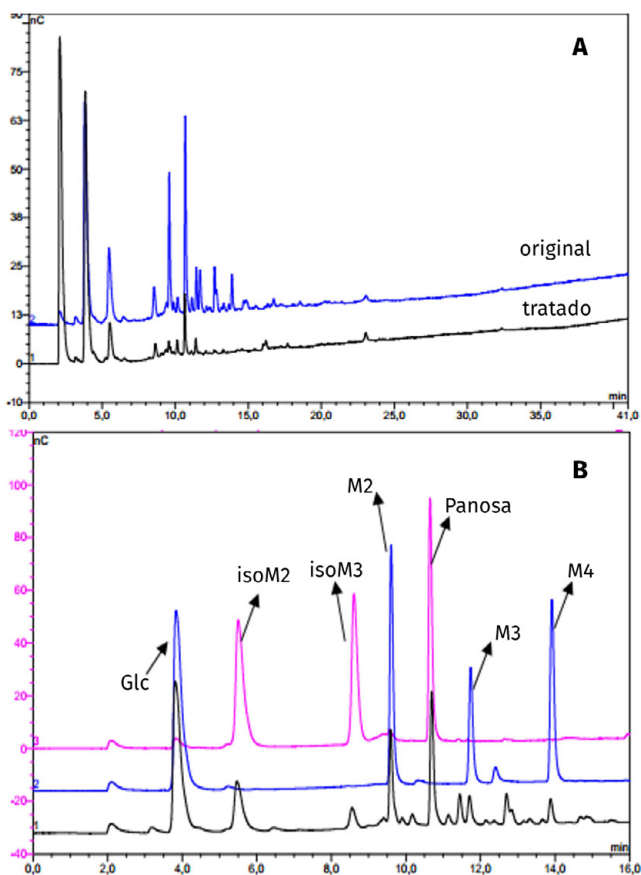


FIGURA 9.11. DETERMINACIÓN DE FIBRA DIETARIA SOLUBLE

En el panel B se observa una magnificación de la zona de 0 a 16 min de la muestra tratada de A en comparación con diferentes testigos comerciales. Se observa el enriquecimiento en oligosacáridos con uniones α -D-(1,6) considerados fibra dietaria soluble.

Es de destacar que, en los últimos años, se ha popularizado la aplicación de esta técnica para la determinación de hidratos de carbono en alimentos y se han desarrollado variadas aplicaciones para análisis de rutina de alimentos (Corradini *et al.*, 2012).

9.9.2. Comparación del perfil de N-oligosacáridos de un anticuerpo monoclonal y un biosimilar

Muestras de un anticuerpo monoclonal (standard A) y un biosimilar (muestra) se trataron con PNGasa F, la proteína se separó por un Ultrafree McFilter (MW 5000) y la fracción de oligosacáridos liberados se llevaron a seco, se redisolviaron en agua y se analizaron en una columna Carbopack P-200 con precolumna correspondiente. Se utilizó un programa con NaOH 100 mM durante toda la corrida y durante 2 min, luego un gradiente de NaAcO de 0 a 8 mM durante 9 min, a 45 mM durante 11 minutos, a 180 mM durante 14 minutos y a 300 mM durante 9 minutos; flujo 0,25 ml/min.

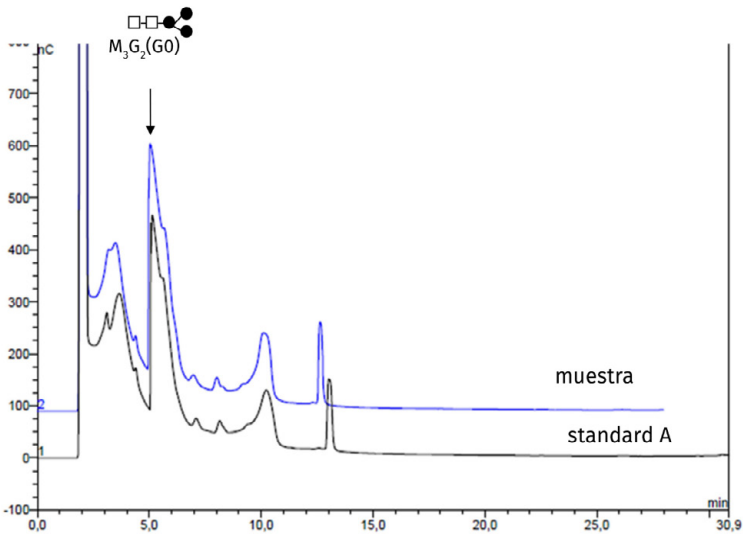


FIGURA 9.12. COMPARACIÓN DEL PERFIL DE N-OLIGOSACÁRIDOS DE UN ANTICUERPO MONOCLONAL Y UN BIOSIMILAR

En la Figura 9.12 se puede observar que no se detectan diferencias entre ambos perfiles y que el componente principal coincide con un testigo comercial de Man_3G_2 (Go).

9.9.3. Otros

La digestión con exoglicosidasas ha sido muy utilizada para el análisis estructural de glicoconjugados. En este tipo de análisis la técnica de HPAEC–PAD es extremadamente útil ya que se puede detectar la aparición del monosacárido producto de la hidrólisis, el oligosacárido más corto producto de la digestión y la desaparición del oligosacárido sustrato en una sola corrida cromatográfica (Weitzhandler *et al.* 2009).

También ha sido muy útil para el análisis de oligosacáridos de polisacáridos derivados de matrices extracelulares (Rothenhöfer *et al.*, 2015).

9.10. CONCLUSIONES

Una de las mayores ventajas de la técnica de HPAEC–PAD es su capacidad de separar oligosacáridos sin necesidad de derivatización. Esto disminuye el tiempo y esfuerzo de la preparación de las muestras mejorando la consistencia del análisis. Usualmente con un detector bien mantenido se consigue una sensibilidad de 10 pmoles. La compatibilidad de la detección electroquímica con gradientes de elución, acoplado a la alta selectividad de las fases estacionarias, permite la separación de mezclas de azúcares simples, oligo- y polisacáridos que pueden ser separados con alta resolución en una sola corrida.

Esta metodología por lo tanto es ideal para el análisis de glicoproteínas producidas por la tecnología recombinante que necesita condiciones de control muy rigurosas. El método es el más utilizado por su velocidad, alta resolución y fácil automatización.

Referencias bibliográficas

- BASA, L. J., & SPELLMAN, M. W.** (1990). Analysis of glycoprotein-derived oligosaccharides by high-pH anion-exchange chromatography. *J. Chromatogr. A*, 499, 205-220. 10.1016/S0021-9673(00)96974-7
- CORRADINI C., CAVAZZA A., & BIGNARDI C.** (2012). High-Performance Anion-Exchange Chromatography Coupled with Pulsed Electrochemical Detection as a Powerful Tool to Evaluate Carbohydrates of Food Interest: Principles and Applications. *International Journal of Carbohydrate Chemistry*, Article ID 487564, 10.1155/2012/487564
- FRAHN, J. L., & MILLS, J. A.** (1959). Paper ionophoresis of carbohydrates. *Aust J. Chem.*, 12, 65-89. 10.1071/CH9590065
- HARDY, M. R. & TOWSEND, R..R.** (1988). Separation of positional isomers of oligosaccharides and glycopeptides by high-performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85, 3289-3293. 10.1073/pnas.85.10.3289
- HARDY, M. R., TOWSEND, R. R., & LEE, Y.C.** (1988). Monosaccharide analysis of glycoconjugates by anion exchange chromatography with pulsed amperometric detection. *Anal. Biochem.*, 170, 54-62. 10.1016/0003-2697(88)90089-9
- HICKS, K. S.** (1988). High Performance Liquid Chromatography of Carbohydrates. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, 46, 17-72. 10.1016/S0065-2318(08)60164-X
- HONDA, S.** (1984). High-performance liquid chromatography of mono- and oligosaccharides. *Anal. Biochem.*, 140, 1-47. 10.1016/0003-2697(84)90130-1
- HOTCHKISS, A. T., & HICKS, K. B.** (1990). Analysis of oligogalacturonic acids with 50 or fewer residues by high-performance anion-exchange chromatography and pulsed amperometric detection. *Anal. Biochem.*, 184, 200-206. 10.1016/0003-2697(90)90669-z
- HUBER, C. G. & BONN, G. K.** (1995). HPLC of carbohydrates with cation and anion-exchange silica and resin-based stationary phases, in *Carbohydrate Analysis, Journal of Chromatography Library*, 58, 147-180, Elsevier, Amsterdam, The Netherlands.
- JOHNSON, D. C. & LACOURSE, W. R.** (1992). Pulsed electrochemical detection at noble metal electrodes in liquid chromatography. *Electroanalysis*, 4, 367-380. 10.1002/elan.1140040404
- KOIZUMI, K., KUBOTA, Y., TANIMOTO, T., & OKADA, Y.** (1989). High-performance anion-exchange chromatography of homogeneous D-glucosyl oligosaccharides and -polysaccharides (polymerization degree greater than or equal to 50) with pulsed amperometric detection. *J. Chromatogr.*, 464, 365-373. 10.1016/S0021-9673(00)94254-7
- LACOURSE, W. R.** (1997). Origins of pulsed potential cleaning. In *Pulsed Electrochemical Detection in High Performance Liquid Chromatography* (pp. 6-8), New York: John Wiley & Sons,.

- LAINE, R. A. ESSELMAN, W. J. & SWEELEY, C. C.; GINSBURG, V. (Ed.), (1972).** Gas-liquid chromatography of carbohydrates in *Methods in Enzymology* (Vol 28, pp. 159-167), Academic Press New York.
- LEE, Y. C. (1990).** High-performance anion-exchange chromatography for Carbohydrate analysis. *Anal. Biochem.*, 189, 151-162. 10.1016/0003-2697(90)90099-u
- LIN, J. & WU, S. S. (1987).** Synthesis of dabsylhydrazine and its use in the chromatographic determination of monosaccharides by thin-layer and high-performance liquid chromatography. *Anal. Chem.*, 59, 1320-1326. 10.1021/ac00136a014
- MURAMOTO, K., GOTO, R., & KAMIYA, K. (1987).** Analysis of reducing sugars as their chromophoric hydrazones by high-performance liquid chromatography. *Anal. Biochem.*, 162, 435-442. 10.1016/0003-2697(87)90416-7
- PASKACH, T. J., LIEKER, H. P., REILLY, P. J., & THIELECKE, K. (1991).** High performance anion-exchange chromatography of sugars and sugar alcohols on quarternary ammonium resins under alkaline conditions. *Carbohydr. Research*, 215, 1, 1-14. 10.1016/0008-6215(91)84002-V
- REINHOLD, V.; HIRS C. H. & TIMASHEFF, S. N. (Eds) (1972).** Gas-liquid chromatographic analysis of constituent carbohydrates in glycoproteins. *Methods in Enzymology*, 25, pp. 244-249. Academic Press New York. 10.1016/S0076-6879(72)25021-2
- RENDELMAN, J. A. (1973).** Carbohydrates in Solution. *Advances in Chemistry, Ser. (117)*, Washington, D. C. Amer. Chem. Soc., pp. 51-68.
- ROBERTS, E. J., WADE, C. P., & ROWLAND, S. P. (1971).** Effect of base concentration upon the reactivities of the hydroxyl groups in methyl D-glucopyranosides. *Carbohydr. Res.*, 17, 393-399. 10.1016/S0008-6215(00)82547-1
- ROCKLIN, D., CLARKE, A. P. & WEITZHANDLER, M. (1998).** Improved long-term reproducibility for pulsed amperometric detection of carbohydrates via a new quadruple-potential waveform. *Analytical Chemistry*, 70, 8, 1496-1501. 10.1021/ac970906w
- ROCKLIN, R. D., & POHL, C. A. (1983).** Determination of carbohydrates by anion exchange chromatography with pulsed amperometric detection. *J. Liq. Chromatogr.*, 6, 1577- 1590. 10.1080/01483918308064876.
- ROHRER, J. S., BASUMALLICK, L., & HURUM, D. (2013).** High-performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection for carbohydrate analysis of glycoproteins. *Biochemistry (Mosc)*, 78(7), 697-709. 10.1134/S000629791307002X.
- ROSENFELDER, G., MORGELIN, M., CHANG, J. Y. SCHNENBERGER, C. A., BRAUN, D. G. & TOWBIN H. (1985).** Chromogenic labeling of monosaccharides using 4'-N,N-dimethylamino-4-aminoazobenzene. *Anal. Biochem.*, 147, 156-165. 10.1016/0003-2697(85)90022-3

- ROTHENHÖFER, M., GRUNDMANN, M., BERNHARDT, G., MATYSIK, F.-M., & BUS-CHAUER, A.** (2015). High performance anion exchange chromatography with pulsed amperometric detection (HPAEC-PAD) for the sensitive determination of hyaluronan oligosaccharides. *Journal of Chromatography B*, 988, 106–115. 10.1016/j.jchromb.2015.02.027
- SPELLMAN, M. W., BASA, L. J., LEONARD, C. K., CHAKEL, J. A. & O'CONNOR J. V.** (1989). Carbohydrate structures of human tissue plasminogen activator expressed in Chinese hamster ovary cells. *J. Biol. Chem.*, 264, 14100–14111.
- TAKEMOTO, H. HASE, S. & IKENATA T.** (1985). Microquantitative analysis of neutral and amino sugars as fluorescent pyridylamino derivatives by high-performance liquid chromatography. *Anal. Biochem.*, 145, 245–250. 10.1016/0003-2697(85)90357-4
- THAYER, J. R., ROHRER, J. S., AVDALOVIC, N., & GEARING, R. P.** (1998). Improvements to in-line desalting of oligosaccharides separated by High-pH anion exchange chromatography with pulse amperometric detection. *Anal. Biochem.*, 256(2), 207–16. 10.1006/abio.1997.2519
- TOWSEND, R. R. & HARDY, M. R.** (1991). Analysis of glycoprotein oligosaccharides using high-pH anion exchange chromatography. *Glycobiology*, 1, 139–147. 10.1093/glycob/1.2.139
- TROY, F. A., HALLENBECK, P. C., MCCOY, R. D. & VIMR, E. R.** (1987). Detection of polysialosyl-containing glycoproteins in brain using prokaryotic-derived probes. In Ginsburg, V. (Ed.), *Methods in Enzymology* (Vol. 138, pp. 169–185), Academic Press, San Diego, CA. 51, 52. 0.1016/0076-6879(87)38014-0
- TSUJI, T., YAMAMOTO, K., KONAMI, Y., IRIMURA, T., & OSAWA, T.** (1982). Separation of acidic oligosaccharides by liquid chromatography: application to analysis of sugar chains of glycoproteins. *Carbohydr. Res.* 109, 259–269. 10.1016/0008-6215(82)84043-3
- WEITZHANDLER, M., ROHRER, J., THAYER, J.R., & AVDALOVIC, N.** (1998). HPAEC-PAD Analysis of monosaccharides released by exoglycosidase digestion using the CarboPac MA1. *Methods Mol. Biol.* 76, 71–78. 10.1385/0-89603-355-4:71