

EVALUACION DEL FRACCIONAMIENTO CROMATOGRAFICO UTILIZANDO EL POLARIMETRO LASER LASERPOL 101-M Y COMPROBACION MEDIANTE ESPECTROMETRIA UV-VISIBLE

A. Fernández¹, M. Martínez², C. Hernández¹, J. Iglesias¹, J. Carral³, S. Cañete¹, I. Sánchez⁴ y M.E. Cañizares¹

¹Centro de Biomateriales

²Dpto. de Biología Vegetal, Facultad de Biología, Universidad de La Habana

³Hospital Naval "Luis Díaz Soto", MINSAP

⁴Laboratorio de Bioinorgánica, Facultad de Química, Universidad de La Habana

RESUMEN

En este trabajo se realiza el fraccionamiento cromatográfico, mediante cromatografía líquida en columna por el método de exclusión por tamaños, de la heparina de bajo peso molecular, la cual presenta actividad óptica por ser un glucosaminoglicano. Se efectuaron un total de 12 corridas. Las fracciones se monitorearon mediante medidas del ángulo de desviación de la luz polarizada (α), en grados sacarimétricos, cuyos resultados se comprueban midiendo la absorbancia de los eluatos a 215 nm en un espectrómetro UV-visible 4054 UV/Visible Pharmacia. Biotech y el Espectrofotómetro Pharmacia LKB Ultrospec III con lámpara de deuterio. Se observa una buena correlación dentro de cada método y en comparación con los dos métodos, por lo que se recomienda el uso del equipo para este tipo de determinaciones.

INTRODUCCION

La heparina sódica es una preparación que contiene la sal de sodio de un glicosaminoglicano sulfatado presente en los tejidos de los mamíferos (1). Con el objetivo de evaluar su funcionalidad en la elaboración de un adhesivo con propiedades anticoagulantes se realiza este estudio.

En este trabajo se presentan resultados obtenidos del fraccionamiento del producto realizado mediante el monitoreo de los eluatos de las fracciones teniendo en cuenta las características químicas de la heparina: absorción de la luz en UV y capacidad de desviar el ángulo de la luz polarizada. Para el fraccionamiento de la muestra se empleó el método de cromatografía líquida de elución por tamaño (2-4). Para la evaluación polarimétrica se utilizó un polarímetro Laserpol 101-M como equipo de medición con la finalidad de usarlo durante el resto de la investigación.

MATERIALES Y METODOS

Se preparó una solución acuosa de heparina liofilizada al 1.5 % en agua destilada estéril, de estos se aplicaron 2 mL a una columna previamente empaquetada con Sephadex G 25 de 25 x 2.5 cm, utilizando agua destilada estéril como fase móvil y flujo de 0.5 mL/min. Se recogieron 100 fracciones de 2 mL cada una y se realizaron

12 corridas. Para efectuar el estudio espectrofotométrico se utilizaron dos equipos diferentes, el espectrofotómetro 4054 UV/Visible Pharmacia. Biotech y el Espectrofotómetro Pharmacia LKB Ultrospec III y se leyó cada eluato a 215 nm.

Estos mismos eluatos se leyeron en grados sacarimétricos en un Polarímetro LASERPOL 101-M, se utilizó agua estéril como blanco, y la propiedad de la heparina de ser destrozada. Previo a las corridas se prepararon soluciones de heparina de diferentes concentraciones para conocer el límite de detección del equipo, teniendo en cuenta que el método cromatográfico está asociado a dilución de las muestras.

DISCUSION DE LOS RESULTADOS

Los gráficos I, II, III y IV son una muestra representativa de las diferentes determinaciones que se efectuaron durante la investigación. Los gráficos I y II constituyen una pareja entre el polarímetro Laserpol 101-M y espectroscopía UV, al igual que los III y IV por lo que se puede concluir que existe buena reproducibilidad del método.

En ambas parejas puede verse que a cada fracción obtenida por el método polarimétrico corresponde un máximo del método espectrofotométrico, lo cual indica que es aplicable el método polarimétrico para seguir el fraccionamiento, como se deseaba.

En los gráficos puede apreciarse además bastante coincidencia entre los volúmenes de elución de las fracciones con un máximo de elución, que fueron las tres fracciones que se separaron para posteriores estudios.

CONCLUSIONES

Del trabajo realizado podemos concluir que el método polarimétrico es aplicable para la confección de las curvas de elución de las muestras de heparina u otros compuestos análogos, con propiedades ópticas.

Gráfico I

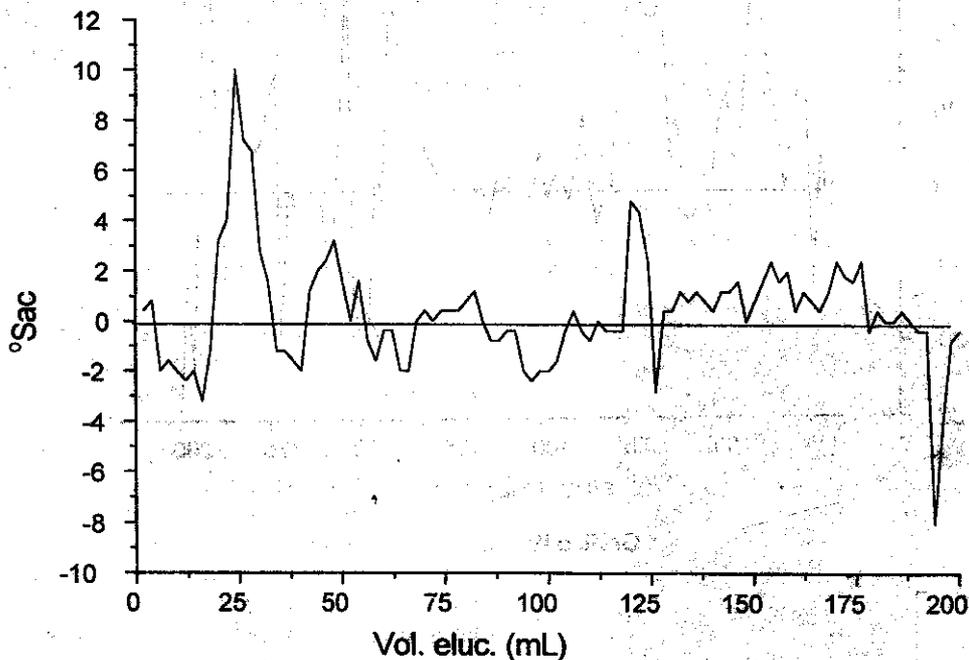


Gráfico II

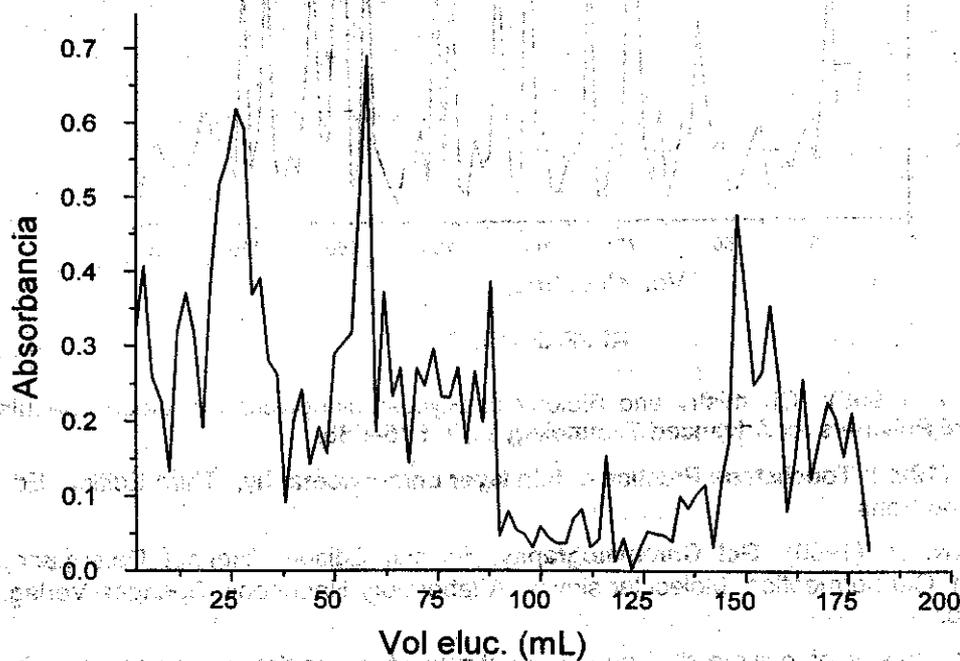


Gráfico III

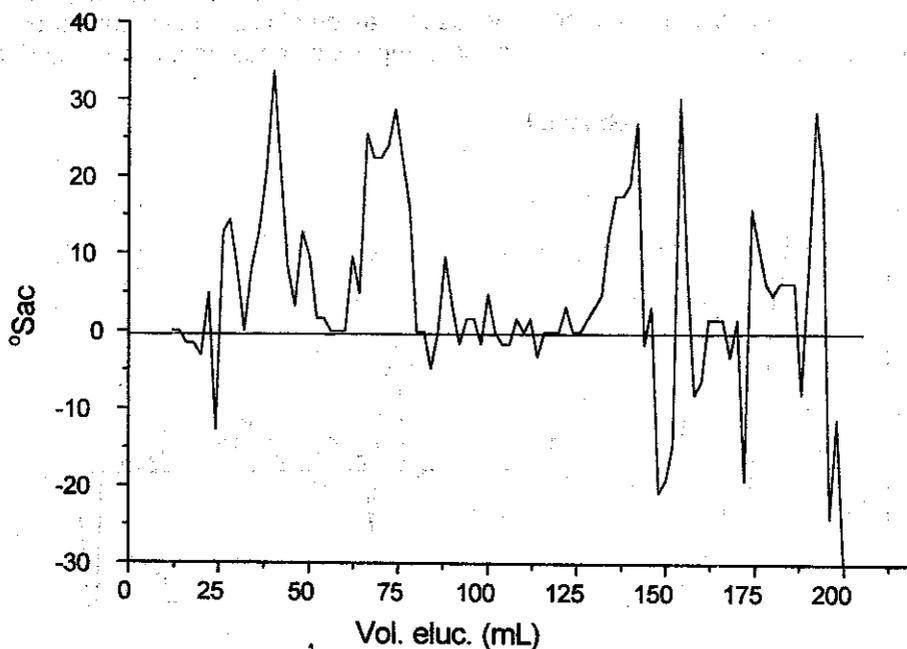
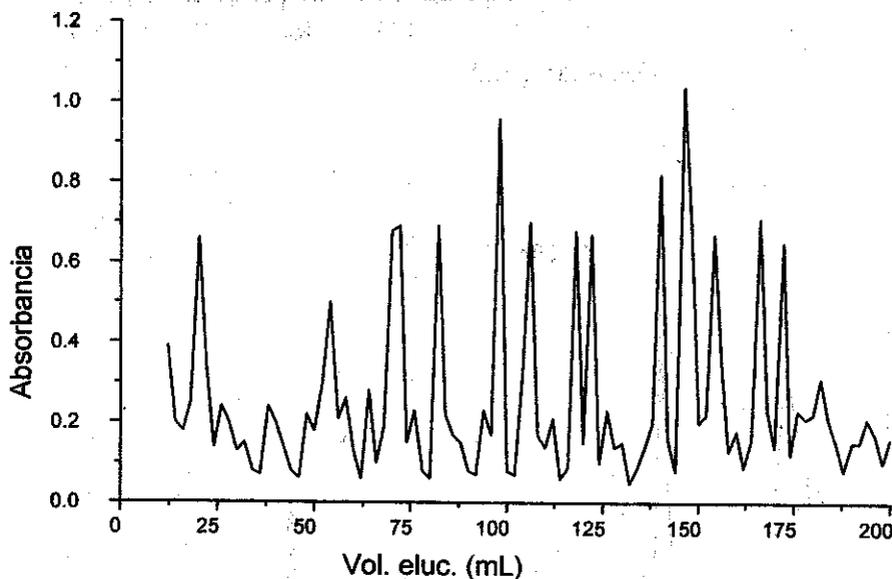


Gráfico IV



REFERENCIAS

1. BARBUCCI, A. (1996): "Chemistry and Biology of Glycosaminoglycans in blood coagulation", **Magnani Polymers for Advanced Technologies**, 7, 675-685.
2. JOSEPH, C. (1992): **Touchstone Practice of thin layer chromatography**, Third Edition. Ed. John Wiley and Sons.
3. DETERMANN, H. (1969): **Gel Chromatography**, Second Edition. (Helmut Determann). Gel filtration. Gel permeation. Molecular sieves. A laboratory Handbook. Springer-Verlag. New York Inc.
4. "Analytical chemistry of polymers". Parte II, **Analysys of molecular structures and chemical groups**, Editted Gordon McKline, Interscience publishers, (1962).