

## Determinación por cromatografía gaseosa de los monosacáridos neutros de un glicopéptido de la orina humana \*

A. Carrión \*\*

Departamento de Bioquímica  
Facultad de Farmacia  
Santiago de Compostela (España)

(Recibido el 16 de julio de 1976)

A. CARRION. *Gas-Liquid Chromatography Determination of Neutral Monosaccharides From a Human Urine Glycopeptide*. Rev. esp. Fisiol., 34, 235-240. 1978.

Optimum conditions were determined for the satisfactory separation of the carbohydrate residues found in glycoproteins or glycopeptides by using silica gel column chromatography of monosaccharides as their trimethylsilyl ethers. The method is suitable for fractionation of sugar mixtures into neutral sugars and aminosugars.

Chromatography on silica and gas-liquid chromatography were used in succession for the rapid determination of the neutral monosaccharides from a human urine glycopeptide.

En el estudio de la composición glucídica de glicoproteínas y glicopéptidos se ha empleado una serie de técnicas espectrofotométricas y cromatográficas, las cuales, debido a que se realizan separadamente, acumulan independientemente errores experimentales. Por otra parte, la identificación cualitativa de cada monosacárido mediante hidrólisis y cromatografía y las determinaciones espectrofotométricas de metilpentosas, hexosas, hexosaminas y ácidos siálicos exigen numerosas manipulaciones. Además, la pequeña

cantidad de muestra que generalmente se obtiene mediante los procedimientos de aislamiento de glicopéptidos, dificulta las determinaciones colorimétricas cuantitativas de monosacáridos.

Actualmente, las técnicas basadas en la cromatografía de partición gas-líquido resuelven los problemas anteriormente planteados permitiendo el microanálisis de una mezcla compleja de monosacáridos en una sola operación a partir de cantidades del orden de 1 mg de muestra.

Diversas técnicas y distintos derivados volátiles se han utilizado para el análisis cuantitativo de los monosacáridos presentes en las glicoproteínas, glicopéptidos y otros materiales (2, 5-7). En el presente trabajo se adapta a la determinación si-

\* Realizado con una beca de la Fundación Juan March, para estudios en el extranjero.

\*\* Dirección actual: Farmacia Militar. Santiago de Compostela (España).

multánea de las formas anoméricas de los monosacáridos neutros presentes en un glicopéptido aislado a partir de la orina humana normal, una técnica anteriormente descrita para el análisis de mucopolisacáridos (8). La metodología utilizada se basa en la adsorción cromatográfica sobre columna de sílica-gel de los trimetil-silil (TMS) éteres de los monosacáridos, fraccionamiento en grupos mediante elución con disolventes polares y no polares y cromatografía gaseosa de los TMS-monosacáridos neutros.

### Material y métodos

*Reactivos y sustancias patrones.* Como sustancias patrones se usan las siguientes: D-glucosa, D-galactosa, D-manosa, (E. Merck), D-glucosamina (CIH), D-galactosamina (CIH), (Mann Res. Lab.), N-acetil-glucosamina (Sigma). Todos estos monosacáridos fueron mutarrotados en agua a la temperatura ambiente un mínimo de 24 horas antes de su utilización.

Galacitol y heneicosano ( $C_{21}H_{44}$ ) fueron utilizados como patrones internos de referencia.

Hexametildisilazano puro 98 %, trimetilclorosilano purísimo 99 % (Fluka), piridina, acetato de etilo para cromatografía, benceno, tetrahidrofurano, acetona, N-hexano (Merck); estos reactivos fueron previamente redistilados.

*Cromatografía en columna de sílica-gel.* El ácido silícico (Anasil 100-200 mesh; AnalaB Lab.) se lava varias veces con acetona; una vez seco, se activa a 150° C durante 2 horas, se recoge en benceno redistilado y se introduce mediante una pipeta Pasteur en una columna de 80 × 3 mm provista de un ensanchamiento terminal.

La silanización de las muestras hidrolizadas se efectúa en las condiciones descritas anteriormente. Los TMS-éteres se disuelven en 0.1 ml de benceno y se depositan en la columna de sílica-gel con

ayuda de una pipeta Pasteur. Se verifica la elución con 5 ml de benceno y, seguidamente, con 5 ml de acetato de etilo con un 5 % de benceno, recogiendo por separado los líquidos de elución.

Los disolventes orgánicos se evaporan en corriente de nitrógeno y los TMS-éteres se recogen en 0,1 ml de hexano redistilado y se inyectan en el cromatógrafo de gases.

*Cromatografía en columnas de cambio iónico.* Se emplea el clásico método de BOAS (1) para separar las hexosaminas del resto de los monosacáridos. El líquido efluente de la columna (monosacáridos neutros) se evapora a sequedad en corriente de nitrógeno a 40° C; en el residuo se realiza la trimetil-silanización, según se ha descrito anteriormente.

*Análisis cuantitativo.* Se realiza mediante comparación del área de los TMS-éteres de los monosacáridos con el área del TMS-éter del galacitol. Previamente se calculan los coeficientes de calibración de los trimetilsilil derivados de monosacáridos neutros con respecto al patrón interno galacitol. Para ello se dividen en cinco fracciones los productos de una reacción de silanización efectuada con 500 µg de galactosa, glucosa, manosa y galacitol. Se realiza la determinación mediante cromatografía gaseosa de cada una de las fracciones, calculando la respuesta media del detector para los TMS-derivados y refiriéndola a la obtenida con el TMS-galacitol. Las áreas de los picos correspondientes a cada derivado se calculan por triangulación.

*Hidrólisis del glicopéptido urinario.* La purificación y aislamiento de un glicopéptido a partir de orina humana normal, ha sido descrita anteriormente (4). Se efectúan las hidrólisis para liberación de azúcares neutros con CIH 2N, 4h, 100° C. condiciones óptimas para las glicoproteínas urinarias (3). Se realizan en tubos ce-

rrados con tapón de teflón (Klimax) utilizando una baja concentración de glicopéptido (0,1 %) con el fin de evitar la formación de sustancias húmicas. Los hidrolizados se llevan a sequedad en condiciones de presión reducida ante NaOH.

**Condiciones de la cromatografía gaseosa.** Se utiliza un cromatógrafo Perkin-Elmer 900 equipado con un detector de ionización de llama de hidrógeno. Columnas de vidrio de 2 m de longitud y 3,5 mm de diámetro interno. Columna de Se-30 al 2,2 % sobre Gas-Chrom P; temperatura de la columna 180° C; temperatura del bloque de inyección 30-60° C más alta que la de la columna. Como gas portador se emplea el nitrógeno a un caudal de 10-20 ml/min y 0,5 atm de presión.

**Trimetil-silanización.** Se realiza esencialmente por el método descrito por SWEELEY *et al.* (13) modificado por KARKKÄINEN *et al.* (8). El hidrolizado glicoproteico se mezcla con un patrón interno (50-100 µg de galacitol en solución acuosa) en un tubo de centrifuga cónico. El disolvente se evapora en corriente de nitrógeno. Una vez seca la muestra, se añaden inmediatamente 0,175 ml de piridina, 0,05 ml de hexametildisilazano y 0,025 ml de trimetilclorosilano, por este orden. La mezcla se agita y se deja a la temperatura ambiente durante 30 minutos. Al cabo del cual se evapora a sequedad en corriente de nitrógeno.

Los TMS-derivados formados se extraen utilizando un vibrador ultrasónico con 2-3 ml de n-hexano redistilado. La mezcla se centrifuga y el sobrenadante se lleva a sequedad en corriente de N<sub>2</sub>. Por último, se recoge en 0,1 ml de N-hexano.

## Resultados

**Separación de monosacáridos en grupos mediante cromatografía sobre columna de sílica-gel.** En la figura 1 se presenta la separación obtenida por cromatografía so-

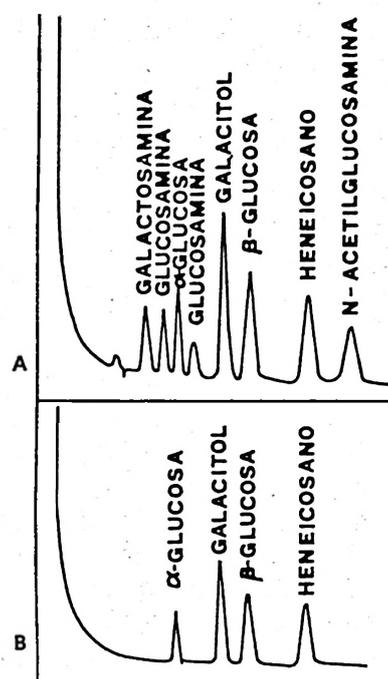


Fig. 1. Separación mediante cromatografía gaseosa de una mezcla de TMS-derivados de monosacáridos patrones antes (A) y después (B) de cromatografía de adsorción sobre columna de ácido silícico.

La elución de los TMS-monosacáridos neutros se realiza con benceno redistilado. Condiciones de la cromatografía gaseosa: columna de SE-30 al 2,2 %; temperatura 180° C, isoterma.

bre columna de sílica-gel al eluir con benceno los TMS-derivados de los monosacáridos neutros y polares. Se observa la completa separación después de un estudio sistemático en el que se consideraron los siguientes factores que influyen en la eficacia de la cromatografía: a) modalidades de purificación del ácido silícico; b) tamaño de los gránulos; c) longitud y diámetro de la columna; d) elección del eluyente adecuado. El rendimiento de la elución con benceno resulta superior al 90 %. Por otra parte, puede comprobarse la persistencia de la razón de cada hexosa con respecto al patrón galacitol y al hidrocarburo saturado heneicosano testigos.

La ineficacia del método para la sepa-

ración cuantitativa de TMS-derivados de hexosaminas está directamente relacionada con el hecho, repetidamente comprobado, de la inestabilidad de los TMS-derivados de las hexosaminas en diferentes líquidos orgánicos utilizados como eluyentes (hexano, benceno, acetato de etilo, tetrahidrofurano); la inestabilidad persiste después de purificación y redestilación de los eluyentes.

*Determinación cuantitativa de los monosacáridos neutros componentes de un glicopéptido urinario.* Una vez realizada la determinación de los coeficientes de calibración respecto al TMS-galacitol de los TMS-derivados de los monosacáridos neutros, generalmente presentes en los glicopéptidos (tabla I), se procede a la determinación cuantitativa de los azúcares neutros presentes en un hidrolizado de un glicopéptido urinario (fig. 2).

Con ambos procedimientos, la cromatografía de adsorción sobre columnas de ácido silícico y la cromatografía de cambio iónico sobre resinas Dowex-50, se logra una perfecta separación en grupos de monosacáridos neutros y polares; sin embargo, el tiempo necesario para conseguir la estricta sequedad que exige la síntesis de los TMS-derivados volátiles de los monosacáridos en condiciones de estabilidad, resulta significativamente menor empleando la técnica de la cromatografía de adsorción en columna de ácido silícico.

En el cromatograma superior (fig. 2) la coincidencia de varios picos de TMS-derivados de hexosas neutras y hexosaminas (liberadas también, en parte, en las condi-

Tabla I. Coeficientes de calibración respecto al TMS-galacitol obtenidos para diferentes TMS-derivados de monosacáridos neutros.

Monosacáridos	Coefficiente de calibración
Galactosa	0,742 ± 0,026
Manosa	0,837 ± 0,045
Glucosa	0,764 ± 0,021

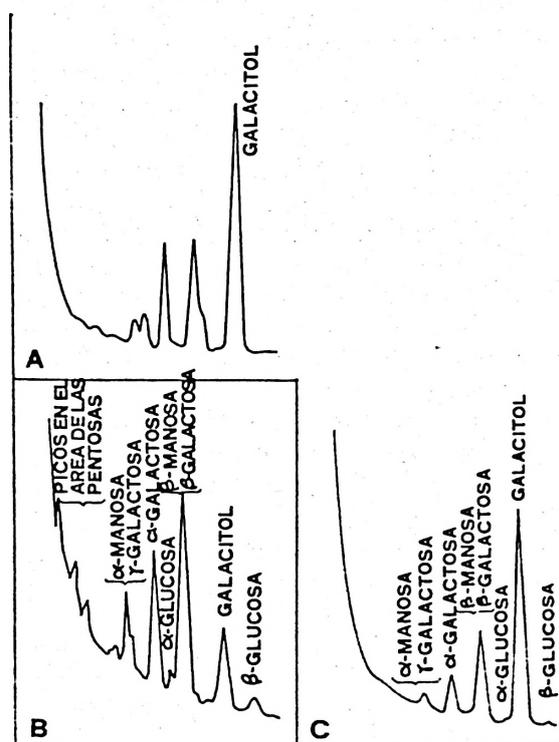


Fig. 2. Separación mediante cromatografía gaseosa de los TMS-derivados de los monosacáridos liberados por hidrólisis de un glicopéptido de la orina humana.

A) Cromatograma correspondiente a un hidrolizado del glicopéptido en condiciones de liberación de azúcares neutros. B) Cromatograma obtenido separando los monosacáridos del hidrolizado mediante columna de Dowex-50. C) Cromatograma obtenido después de cromatografía sobre columna de ácido silícico y elución con benceno. Condiciones de la cromatografía gaseosa: columna de SE-30 al 2,2%; temperatura 180° C, isoterma.

ciones empleadas en la hidrólisis) imposibilita el cálculo de las superficies correspondientes a los picos de cada TMS-derivado. En el segundo y tercer cromatograma los picos de los TMS-derivados de la  $\beta$ -manosa y de la  $\beta$ -galactosa se superponen, por lo que el área del pico del TMS-éter de la  $\beta$ -manosa se calculó a partir del área del TMS-éter de la  $\alpha$ -manosa (71,1 % del área total). El área del pico del TMS-éter de la  $\beta$ -galactosa se calculó

Tabla II. Determinación por cromatografía gaseosa de monosacáridos neutros en un glicopéptido de orina humana.

Monosacáridos	% peso seco
Galactosa	9,2
Manosa	5,7
Glucosa	1,3

restando el área calculada del TMS-éter de la  $\beta$ -manosa del área del pico correspondiente a la superposición de ambos derivados (tabla II). El contenido porcentual de hexosas del glicopéptido determinado por cromatografía gaseosa coincide sensiblemente con el hallado previamente mediante la reacción del orcinol- $\text{SO}_4\text{H}_2$  (4). No se ha calculado el contenido en fucosa del glicopéptido urinario debido a que las condiciones escogidas para la cromatografía gaseosa fueron las óptimas para la separación de los TMS de las hexosas, por lo que la zona de las pentosas queda delimitada en la correspondiente al n-hexano utilizado como disolvente para la inyección de las muestras en el cromatógrafo.

### Discusión

La cromatografía gaseosa proporciona un rápido y eficaz método para separar compuestos de estructura similar. Posiblemente, la única desventaja de la aplicación de las técnicas de cromatografía gaseosa al estudio de mezclas complejas de glúcidos, consiste en el gran número de picos que se originan, algunos de los cuales se superponen en el cromatograma. La adecuada elección de la fase estacionaria o el empleo de un determinado derivado volátil evitan, en su mayor parte, las coincidencias de picos correspondientes a sustancias distintas.

BOLTON *et al.* (2) fueron los primeros que aplicaron la cromatografía gaseosa al estudio de la composición glucídica de glicoproteínas y glicopéptidos. CLAMP

*et al.* (5) emplean la metanólisis en lugar de la hidrólisis ácida para la liberación de los monosacáridos de glicoproteínas y glicopéptidos, razonando que con el segundo procedimiento no es posible lograr una separación de los picos de galactosa y manosa al utilizar los TMS-derivados volátiles, inconveniente fácilmente evitable mediante el cálculo utilizado en la presente investigación. Para evitar la formación de numerosos picos, algunos autores (6, 9, 11, 12), emplean los alditol-acetatos de los monosacáridos. NIEDERMEIER (10) asocia la hidrólisis ácida mediante resinas con la formación de alditol-acetatos para determinar los monosacáridos en glicoproteínas a partir de cantidades de muestra de 1 mg conteniendo 6 % de carbohidratos. La rapidez y facilidad de formación de los TMS-éteres de los carbohidratos, permitieron que SWEELEY *et al.* (13) utilizaran estos derivados para la determinación mediante cromatografía gaseosa de monosacáridos en numerosos materiales biológicos. La ventaja de los TMS-monosacáridos respecto a otros derivados se basa en su formación cuantitativa a temperatura ambiente. Sin embargo, estos compuestos resultan hidrolizados lentamente por exposición a la humedad del ambiente, por lo que resulta necesario efectuar la TMS-silanización en estrictas condiciones de sequedad.

La cromatografía de cambio iónico se ha empleado frecuentemente para separar grupos de monosacáridos (1), pero si se pretende acoplar a las técnicas de cromatografía gaseosa, resulta un procedimiento lento, debido a la utilización de volúmenes relativamente importantes de disolventes acuosos, los cuales, necesariamente, deberán ser evaporados para que pueda lograrse la síntesis de los TMS-derivados volátiles. El método de fraccionamiento usado en la presente investigación, con el cual se separan por elución con disolvente orgánico neutro los derivados volátiles de los monosacáridos previamente adsorbidos en una pequeña columna de ácido

silícico, resulta, por lo tanto, especialmente apto para la posterior separación y determinación de los monosacáridos neutros componentes de pequeñas cantidades de glicoproteínas y glicopéptidos.

Los TMS-éteres de los monosacáridos sintetizados a partir del residuo seco del hidrolizado glicopeptídico permanecen estables durante la separación en columnas de ácido silícico debido a las rigurosas condiciones de eliminación de humedad empleadas. La apolaridad de estos compuestos permite asimismo un rápido desarrollo de los cromatogramas gaseosos y una separación clara de los diferentes monosacáridos.

#### Agradecimientos

A J. Karkkainen, por su constante ayuda y crítica en la realización del presente trabajo, y a J. Huttunen, por su acogida en el Laboratorio de Química Médica de la Facultad de Medicina de Helsinki.

#### Resumen

Se establecen las condiciones óptimas para la separación de los carbohidratos generalmente presentes en glicoproteínas y glicopéptidos, mediante cromatografía en columnas de ácido silícico, de los trimetil-silil-éteres de los monosacáridos.

El método utilizado permite el fraccionamiento en grupos de monosacáridos neutros y

hexosaminas. La cromatografía de adsorción sobre ácido silícico y la posterior cromatografía gaseosa de los trimetil-silil-derivados permiten la rápida determinación de los monosacáridos neutros componentes de un glicopéptido de la orina humana.

#### Bibliografía

1. BOAS, N. F.: *J. Biol. Chem.*, **204**, 553-563, 1953.
2. BOLTON, C. H., CLAMP, J. R. y HOUGH, L.: *Biochem. J.*, **96**, 5C-6C, 1965.
3. BOURRILLON, R.: *Bull. Soc. Chim.*, **1**, 268-271, 1965.
4. CARRIÓN, A., CABEZAS, J. A. y BOURRILLON, R.: *Clin. Chim. Acta*, **25**, 351-356, 1969.
5. CLAMP, J. R., DAWSON, G. y HOUGH, L.: *Biochim Biophys. Acta*, **148**, 342-349, 1967.
6. CROWELL, E. P. y BURNETT, B. B.: *Anal. Chem.*, **39**, 121-124, 1967.
7. KAMERLIN, J. P., GERWIG, J. G., VLIAGENTHART, F. G. y CLAMP, J. R.: *Biochem. J.*, **151**, 491-495, 1975.
8. KARKKÄINEN, J. E., HAAHTI, E. O. y LEHTONEN, A. A.: *Anal. Chem.*, **38**, 1316-1319, 1966.
9. LEHNHARDT, W. F. y WINZLER, R.: *J. Chromatog.*, **34**, 471-479, 1968.
10. NIEDERMEIER, W.: *Anal. Biochem.*, **40**, 465-475, 1971.
11. OADES, J. M.: *J. Chromatog.*, **28**, 246-252, 1967.
12. SHAW, D. H. y MOSS, G. W.: *J. Chromatog.*, **41**, 350-357, 1969.
13. SWEELEY, C. C., BENTLEY, R., MAKITA, M. y WELLS, W. W.: *J. Amer. Chem. Soc.*, **85**, 2497-2507, 1963.