

# Evaluación de diferentes matrices cromatográficas para la determinación del tamaño molecular del polisacárido C de *Neisseria meningitidis* mediante HPLC

Matilde Cuevas, Ileana Martínez, Ismael Martínez, Yaima Merchán, Esther M<sup>a</sup> Fajardo.

Instituto Finlay. Centro de Investigación-Producción de Vacunas y Sueros. Ciudad de La Habana, Cuba.

E-mail: mcuevas@finlay.edu.cu

Las propiedades inmunológicas del polisacárido C de *Neisseria meningitidis* se correlacionan con su tamaño molecular, parámetro físico-químico que se determina mediante cromatografía convencional en filtración en gel, según lo recomendado por la Organización Mundial de la Salud (OMS). Sin embargo, la determinación del coeficiente de distribución (Kd) mediante este método, consume mucho tiempo y requiere relativamente grandes cantidades de muestra del producto. La Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) es más eficiente y podría sustituir el método convencional. Para ello en el presente trabajo se evaluaron diferentes columnas cromatográficas y condiciones de corrida. En todos los casos se determinó el volumen muerto y el volumen total, así como el factor de capacidad, la eficiencia, la asimetría del pico y la repetibilidad. Se empleó como fase móvil NaCl 0,2 mol/L. La columna de Sepharose CL 4B (Pharmacia, Suecia) resultó ser la escogida para la determinación de Kd del polisacárido C mediante HPLC ya que fue la de mayor capacidad para retener la muestra; aunque resultó menos eficiente que la TSK G3000PW (Tosohaas, Japón), mostró igual asimetría del pico, mejor repetibilidad, y menor costo. Se estudiaron diferentes velocidades de flujo, concentraciones y volúmenes de muestra con el fin de determinar las mejores condiciones para el análisis, que resultaron ser las siguientes: Una inyección de 100 µl de muestra (0,1 mg) a 0,3 mL/min de flujo.

**Palabras claves:** Polisacárido C, HPLC, Kd

## Introducción

Las propiedades inmunológicas del polisacárido C de *Neisseria meningitidis* se correlacionan con su tamaño molecular (1), parámetro físico-químico que la Organización Mundial de la Salud (OMS) recomienda se estime mediante la determinación del coeficiente de distribución (Kd) por cromatografía convencional en filtración en gel (2); sin embargo, este método consume mucho tiempo y requiere relativamente grandes cantidades de muestra del producto.

Si se tiene en cuenta que la Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) es más eficiente (3) y podría sustituir el método convencional, el objetivo del presente trabajo fue evaluar diferentes condiciones y columnas cromatográficas para la determinación de Kd mediante HPLC.

## Materiales y Métodos

Fueron evaluadas las siguientes columnas cromatográficas: Superdex - 200, 10 x 300 mm (Pharmacia, Suecia); Fractogel EMD Biosec, 10 x 300

mm (MERCK, Alemania); TSK G3000PW, 7,5 x 600 mm (Tosohaas, Japón) y Sepharose CL 4B, 10 x 300 mm (Pharmacia, Suecia).

Evaluación de parámetros cromatográficos: A las columnas mencionadas anteriormente se les determinó el volumen muerto ( $V_0$ ) y el volumen total ( $V_t$ ) con Azul Dextrana 2000 y Serina Dinitrofenilada respectivamente y también se obtuvieron sus curvas de calibración con patrones de Dextrana (40 000 a 2 000 000). Se evaluó la calidad de cada una de las columnas mediante su eficiencia (N/m), el factor de asimetría (A) y la repetibilidad (C.V). Por otra parte se determinó el factor de capacidad o de retención (K) (4) de cada una de las matrices analizadas, lo que permitió seleccionar la mejor columna para el trabajo propuesto.

Utilizando la columna seleccionada, la velocidad de flujo recomendada para la cromatografía convencional (0,3 mL/min) y una inyección de 100 µl de una muestra de 1 mg/mL, se estudiaron las condiciones de corrida óptimas para el análisis, para ello manteniendo constante todos los demás parámetros, fueron evaluados:

- La velocidad de flujo (0,4 mL/ min)
- La cantidad de muestra inyectada en 100 µL (0,25; 0,1; 0,05 y 0,01 mg)
- El volumen de muestra inyectado (100 y 40 µL de una solución de 1 mg /mL y 20 µL de una solución de 0,5 mg/mL de muestra)

## Resultados y Discusión

En 1990 Bussat B y cols (5), demostraron la posibilidad del uso del HPLC para la determinación del tamaño molecular de polisacáridos bacterianos. Este método en HPLC mostró ser más rápido, eficiente, reproducible y consume menor cantidad de muestra que la cromatografía convencional de filtración en gel. De igual forma Von Hunolstein C. y cols (6) evaluaron dos matrices diferentes para la determinación de la Kd de vacunas conjugadas del polisacárido de *Haemophilus type b* (Hib), mediante un sistema de alta resolución, sugiriendo la sustitución de la tecnología tradicional, usada hasta el momento, por la descrita por ellos.

En el presente trabajo se analizó la posibilidad del uso de la Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) para la determinación de la Kd del polisacárido C. En nuestro estudio, la columna TSK G3000PW fue la de mejor eficiencia (44438 N/m), como se muestra en la Tabla 1, sin embargo el polisacárido C eluyó en el volumen muerto de esta matriz y no se pudo detectar la presencia de agregados, ni la cantidad de muestra eluida que cumplía los requisitos establecidos por la

OMS (2), incluso con diferentes velocidades de flujo y concentraciones de muestra (no se presentan datos). De igual manera, ocurrió con las columnas Superdex – 200 y Fractogel EMD BioSEC, no así con la columna de Sepharose CL 4B que resultó ser la de mayor capacidad (0,515) para retener la muestra (Tabla 2) por lo que presentó mejor resolución (4). Además, aunque esta columna fue menos eficiente, mostró igual asimetría del pico, mejor repetibilidad y menor costo que la TSK G3000PW, lo que sugirió su utilización para la determinación del Kd del polisacárido C mediante HPLC.

Se analizaron los perfiles obtenidos con la columna seleccionada (Sepharose CL 4B) para optimizar los parámetros fundamentales, como velocidad de flujo, cantidad y volumen de muestra inyectada, resultados que se muestran en la Tabla 3 y las Figuras 1, 2 y 3. Se determinó que las condiciones idóneas para el análisis en Sepharose CL 4B (Figura 1- B) fueron las siguientes: Una inyección de 100 µL (1 mg / mL), con flujo de 0,3 mL/min de NaCl 0,2 mol/L como Fase Móvil. La salida del Detector a 206 nm fue de 300 mA, con una sensibilidad de -0.0300 a + 0,45000 UA.

En la Tabla 3 y la Figura 3 se demuestra que en caso de que las condiciones antes señaladas no permitan definir bien el pico de polisacárido, por problemas específicos de alguna muestra, es posible utilizar un volumen de muestra de 40 µl el cual no se toma como definitivo debido a que esto implica un aumento en la sensibilidad del Detector a una longitud de onda tan baja (206 nm) y por tanto mayor inestabilidad de la señal en el punto máximo del pico (Figura 3-B).

**Tabla 1. Parámetros de calidad de las columnas estudiadas**

Columna	Eficiencia (N /m)	Asimetría (A)	Repetibilidad (C.V) (%)
Superdex - 200	38 450	1,25	0,725
Fractogel EMD	4 423	1,26	0,683
TSK G3000PW	44 438	1,26	0,146
Sepharose CL 4B	3 366	1,11	0,023

**Tabla 2. Factor de capacidad (K) de las matrices cromatográficas analizadas**

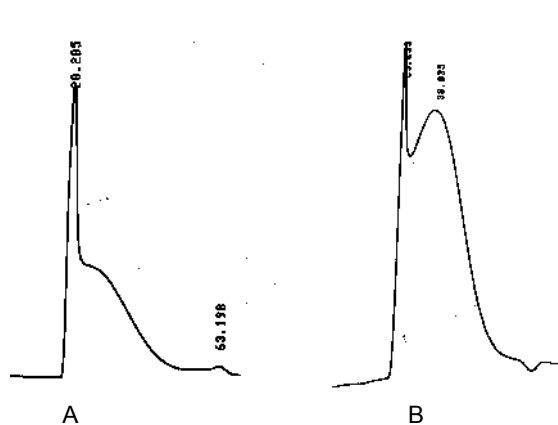
Columna	Capacidad (K)
Superdex - 200	0,068
Fractogel EMD BioSEC	0,111
TSK G3000PW	0
Sepharose CL 4B	0,515

Estos resultados permitieron obtener las condiciones de corrida óptimas para la evaluación del tamaño molecular del polisacárido C mediante HPLC, lo que permite hacer un estudio de correlación de este método con la cromatografía de filtración en gel usada hasta el momento.

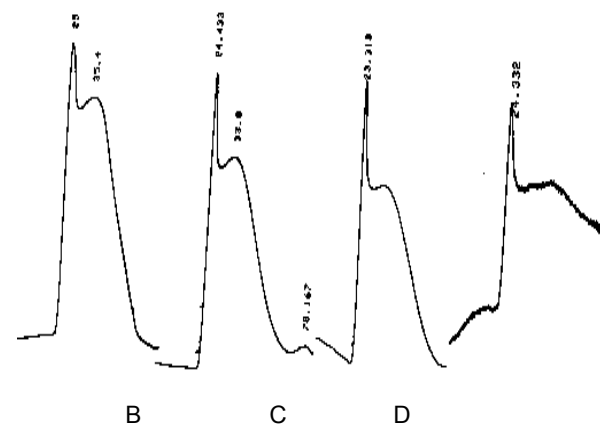
**Tabla 3. Diferentes parámetros analizados para establecer las mejores condiciones de corrida para la determinación de Kd**

Parámetros	Kd	
Velocidad de Flujo	0,4 mL / min	Pico de polisacárido no definido
	0,3 mL/ min	0,244
Cantidad de muestra inyectada en 100 µL	0,25 mg	0,197
	0,1 mg	0,168
	0,05 mg	Pico de polisacárido no definido
	0,01 mg	Pico de polisacárido no definido
Pico de polisacárido no definido	100 µL (Solución de 1 mg / mL)	Pico de polisacárido no definido
	40 µL (Solución de 1 mg / mL)	0,128
	20 µL (Solución de 0,5 mg / mL)	

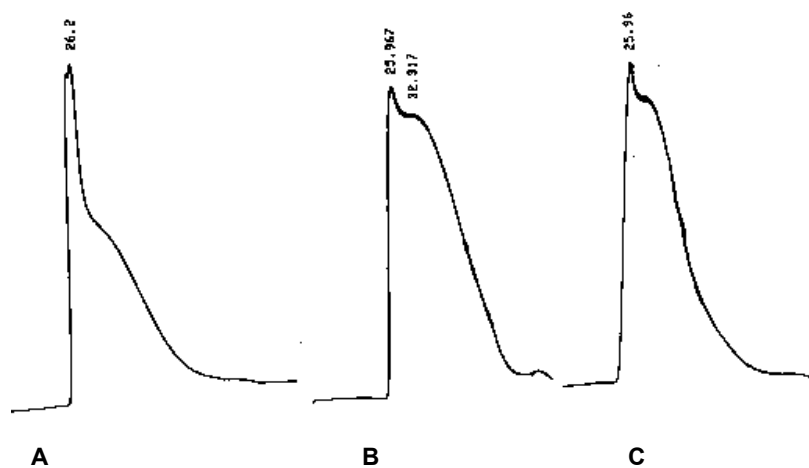
**Figura 1.** Influencia de la velocidad de flujo en el perfil cromatográfico del polisacárido C en Sepharose CI 4B. A - 0,4 mL/min; B-0,3 mL/min



**Figura 2.** Influencia de la cantidad de muestra inyectada en el perfil cromatográfico del polisacárido C en Sepharosa CI 4B: A-0,25 mg; B-0,1 mg; C - 0,05 mg; D-0,01 mg.



**Figura 3.** Influencia del volumen de muestra inyectada en el perfil cromatográfico del polisacárido C en Sepharosa CI 4B. A-100 µL (Solución de 1 mg/mL); B-40 µL (Solución de 1 mg/mL); C-20 µL (Solución de 0,5 mg/mL).



## Referencias

1. Gotschlich EC, Rey M, Triau R, Sparks KJ: Quantitative determination of the human response to immunization with meningococcal vaccines. *J. Clin Invest.* 1972, 51: 89-96.
2. Normas para la vacuna de Polisacáridos Meningocócicos. Series de Informes Técnicos de la Organización Mundial de la Salud (OMS). 1981; (658):190-20.
3. Janson, J.C. and L. Rydén. *Protein Purification: Principles, High Resolution Methods, and Applications.* Second Edition. New York: Wiley-Liss ; 1998.
4. Phenomenex. *Introducción to Peptide and Protein HPLC (Volume I).* USA. Copyright Phenomenex; 1998.
5. Bussat B, Schulz D, Arminjon F, Valentin C and Armand J. Molecular size characterization of bacterial capsular polysaccharide vaccines by High Performance Liquid Chromatographic. *Biologicals.* 1990; 18: 117-121.
6. Von Hunolstein C, Parisi L, Recchia S: A routine high-performance size-exclusion chromatography to determine molecular size distribution of *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccines. *Vaccine.* 1999; 17: 118-125.

## Evaluation of Different Chromatographic Matrixes for Molecular Size Determination of the *Neisseria meningitidis* Polysaccharide C by HPLC

### Abstract

The immunological properties of *N. meningitidis* Polysaccharide C are closely related to its molecular size, a physicochemical parameter determined by conventional Gel filtration chromatography (GFC) as recommended by the World Health Organization (WHO). Nevertheless, the distribution coefficient (Kd) determination by this method is time-consuming and requires a relatively large quantity of sample. The High Performance Liquid Chromatography (HPLC) is more efficient, so it could substitute the conventional method. For that purpose, we evaluated different chromatographic columns and run conditions to determine Kd by (GFC) HPLC. In all cases the void and the total volumes, and also the capacity factor, the column efficiency, the peak asymmetry and the repeatability were determined. The mobile phase was 0,2 mol/L NaCl. The Sepharose CL 4B (Pharmacia, Sweden) resulted the best choice, because it had more capacity to retain the sample; although it was less efficient than the TSK G3000PW (Tosohaas, Japan) column, it showed the same peak asymmetry, the best repeatability and it was cheaper. Different flow rates, sample concentrations and sample volumes were studied to determine the best analysis conditions, which resulted in: an injections of 100 µl of sample (0,1 mg) with a 0,3 mL/min of flow.

**Keywords:** Polysaccharide C, HPLC, Kd