

Taratura di colonne gel-cromatografiche per il controllo dei destrani d'uso clinico

ANTONIO ARACO e CLARA FRONTALI
Laboratori di Fisica

Riassunto. — Viene descritto un procedimento per la conversione dei profili di eluizione gel-cromatografici in distribuzione integrale dei pesi molecolari, procedimento adatto al controllo delle preparazioni di destrano per uso clinico.

Il procedimento di calibrazione è basato sull'uso di frazioni di destrano reperibili in commercio, per le quali la distribuzione in pesi molecolari sia nota e possa essere controllata tramite misure assolute di \bar{M}_n ed \bar{M}_w . Per una colonna di date dimensioni, in date condizioni di eluizione, il metodo fornisce un accurato grafico di taratura ($\log. \bar{M}_w$ in funzione di K , coefficiente di ripartizione).

Summary (*Calibration of gel-filtration columns for the examination of dextrans for clinical use*). — A procedure is described which allows to obtain integral distribution in molecular weights for oligodextran preparations of clinical use from the elution profiles obtained by gel-filtration.

The calibration procedure requires the use of commercially available dextran fractions with known distribution in molecular weight (the $M. W.$ distribution of the standards may be checked through absolute determination of \bar{M}_n and \bar{M}_w). For given column dimensions and elution conditions, the outlined procedure yields an accurate plot of $\log \bar{M}_w$ vs k (partition coefficient).

Nelle preparazioni di destrano utilizzate come plasma artificiale nella terapia trasfusionale, ha importanza la determinazione della distribuzione in pesi molecolari, per accertare che non siano presenti molecole con peso molecolare superiore a 200.000 dalton (che causerebbero reazioni immunitarie), né, in percentuale eccessiva, oligosaccaridi con peso molecolare inferiore a 10.000 dalton, di rapidissima eliminazione. È importante cioè che la distribuzione secondo i pesi molecolari sia centrata su un valore del peso molecolare corrispondente, come ordine di grandezza, a quello della sieralbumina umana.

Il metodo più diretto per la determinazione dell'intero spettro di pesi molecolari relativo ad una soluzione di destrano fa ricorso alla gel-filtrazione su « Sephadex » [1-3]. Trattasi di un metodo non assoluto, il quale richiede una preventiva taratura della colonna gel-cromatografica, che consenta di convertire il grafico di eluizione cumulativo in distribuzione integrale secondo i pesi molecolari del campione di destrano analizzato. La taratura deve essere eseguita con molecole di peso molecolare noto e di comportamento idrodinamico simile a quello dei polimeri da controllare. Possono essere utilizzate a questo scopo preparazioni relativamente omogenee di destrano di vario peso molecolare, reperibili in commercio, e caratterizzate oltre che dai valori dei pesi molecolari \bar{M}_n (come media numerica) ed \bar{M}_w (come media pesata), anche dalla distribuzione sperimentale in pesi molecolari. La misura assoluta di \bar{M}_n mediante metodi chimici e/o di \bar{M}_w mediante la tecnica del « Light scattering » può garantire una volta per tutte che i campioni scelti per la taratura abbiano effettivamente la distribuzione indicata dalla casa produttrice [4].

Nel presente lavoro si propone un metodo di analisi di routine per il controllo della distribuzione in pesi molecolari dei destrani (e dei prodotti a base di destrano) di corrente uso in campo clinico, una volta che siano disponibili in laboratorio diversi campioni di riferimento con distribuzione nota e controllata. Il metodo evita il ricorso a calcoli laboriosi sulla distribuzione in pesi molecolari secondo le funzioni interpolatrici proposte da diversi AA. [1, 2, 5].

La Fig. 1 rappresenta un esempio di distribuzione fornita dalla « Pharmacia » per una preparazione di destrano T 70 con peso molecolare medio (come media pesata) $\bar{M}_w = 70.000$. La distribuzione è cumulativa crescente, ovvero

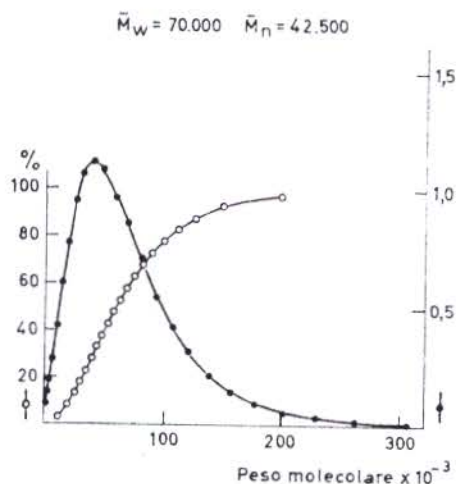


Fig. 1. — Distribuzione integrale crescente (•) e distribuzione differenziale (o) dei pesi molecolari del destrano T 70 fornite dalla « Pharmacia ».

per ogni valore del peso molecolare riporta in ordinata la percentuale in peso di destrano con valori di peso molecolare inferiori o uguali a quello indicato in ascissa.

Questo destrano, insieme con altri, pure di nota distribuzione in pesi molecolari, è stato usato per tarare una colonna di Sephadex G-200 di 2,5 cm di diametro e 40 cm di altezza, usando NaCl allo 0,9 % come eluente e un flusso costante di 6 ml/ora, alla temperatura ambiente.

Per ogni destrano sono stati determinati i grafici di eluizione semplice e cumulativo (in Fig. 2 sono riportati, a titolo di esempio, i grafici relativi alla eluizione del destrano sopra nominato), leggendo al polarimetro il valore di $[\alpha]_{589}^{20}$ (angolo di rotazione della luce polarizzata a 20 °C e alla lunghezza d'onda di 589 nm) di ogni frazione raccolta e sommando progressivamente tali valori a partire dalla prima frazione (Tab. 1).

TABELLA 1

Risultati della gel-filtrazione del destrano T 70

Fraz.	K	α	Σ	%	Fraz.	K	α	Σ	%
26	0,000	0,0164	0,0164	4,7	44	0,288	0,0083	0,2895	82,6
27	0,016	0,0130	0,0294	8,4	45	0,304	0,0077	0,2972	84,7
28	0,032	0,0174	0,0468	13,4	46	0,320	0,0072	0,3044	86,9
29	0,048	0,0192	0,0660	18,8	47	0,336	0,0064	0,3108	88,7
30	0,064	0,0210	0,0870	24,8	48	0,352	0,0055	0,3163	90,3
31	0,080	0,0210	0,1090	31,1	49	0,368	0,0045	0,3208	91,5
32	0,096	0,0198	0,1288	36,8	50	0,384	0,0036	0,3244	92,6
33	0,112	0,0192	0,1480	42,2	51	0,400	0,0035	0,3279	93,5
34	0,128	0,0180	0,1660	47,4	52	0,416	0,0034	0,3313	94,5
35	0,144	0,0170	0,1830	52,2	53	0,432	0,0033	0,3346	95,5
36	0,160	0,0160	0,1990	56,8	54	0,448	0,0032	0,3378	96,5
37	0,176	0,0150	0,2140	61,0	55	0,464	0,0030	0,3408	97,2
38	0,192	0,0130	0,2275	65,0	56	0,480	0,0028	0,3436	98,0
39	0,208	0,0125	0,2400	68,4	57	0,496	0,0026	0,3462	98,9
40	0,224	0,0115	0,2515	72,1	58	0,512	0,0024	0,3486	99,5
41	0,240	0,0105	0,2620	74,8	59	0,528	0,0022	0,3508	
42	0,256	0,0100	0,2720	77,6	60	0,544	0,0020	0,3510	
43	0,272	0,0092	0,2812	80,1	TOTALE . . .			0,351	

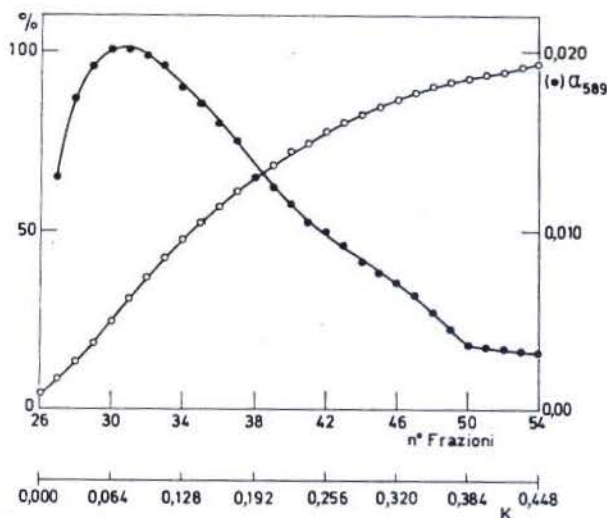


Fig. 2. — Grafici di eluizione sperimentali relativi al destrano T 70 (Tab. 1).

In ogni esperimento venivano raccolte frazioni uguali di 2,2 ml di volume e per ciascuna veniva calcolato il valore del coefficiente di ripartizione K_1 definito dalla relazione:

$$K_1 = \frac{V_1 - V_0}{V - V_0}, \text{ dove } V_1 \text{ è il volume di eluizione (pari al volume di}$$

effluente raccolto fino all'*i*-sima frazione), V è il volume totale del letto di gel e V_0 il volume della colonna (che non è altro che il volume cor-

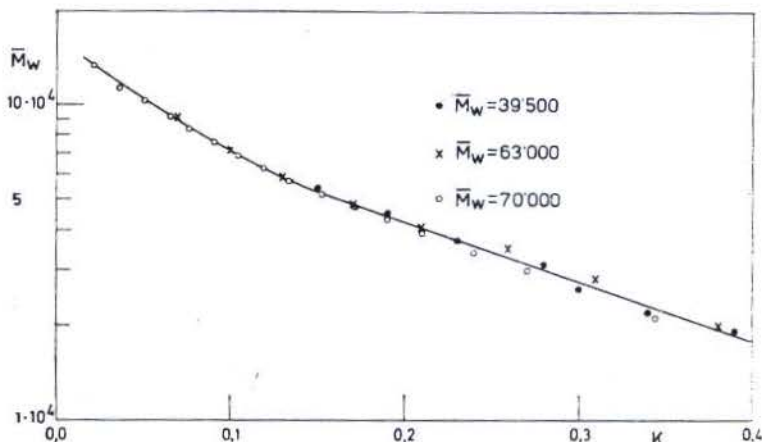


Fig. 3. — Grafico di taratura del sistema gel-cromatografico adottato (Tab. 2).

TABELLA 2

**Coppie di valori \bar{M}_w , K ricavati
per il destrano T 70**

% di destrano con \bar{M}_w superiore a	\bar{M}_w (limite inferiore)	K ricavato dal grafico di eluizione cumulativo
10.	132.000	0,0224
15.	114.000	0,0368
20.	102.000	0,0512
25.	92.000	0,0656
30.	84.000	0,0768
35.	76.000	0,0912
40.	69.000	0,1040
45.	63.000	0,1200
50.	57.000	0,1344
55.	52.000	0,1520
60.	47.000	0,1712
65.	43.000	0,1904
70.	39.000	0,2112
75.	34.000	0,2400
80.	30.000	0,2672
85.	26.000	0,3040
90.	21.000	0,3440

rispondente al massimo del picco di eluizione di una specie con dimensioni molecolari tali da essere completamente esclusa dalla diffusione nelle particelle di gel ed essere eluita immediatamente attraverso gli spazi interstiziali, come ad esempio il « Dextran Blue » con $\bar{M}_w = 2 \cdot 10^6$ dalton).

Occorre a questo punto ricordare che nella gel-filtrazione le molecole di un soluto polidisperso vengono eluite dalla colonna secondo l'ordine decrescente dei rispettivi pesi molecolari. Il grafico di taratura della colonna in precedenza descritta è stato pertanto ricavato confrontando le distribuzioni integrali decrescenti (Tab. 2), ricavate da quelle crescenti (Fig. 1) fornite dalla casa produttrice, con i grafici di eluizione cumulativi (Fig. 2) dei vari destrani di riferimento.

Seguendo questa procedura è stato possibile ricavare diverse coppie di valori \bar{M}_w, K (Tab. 2) per ogni destrano noto, ed è stato quindi costruito il grafico di taratura della Fig. 3 dove si può osservare che i dati relativi a diversi campioni di riferimento (con differenti valori di \bar{M}_w e di \bar{M}_n) sono in buon accordo tra loro.

Una volta ottenuto il grafico di taratura per un dato sistema gel-cromatografico, il profilo di eluizione cumulativo di una qualsiasi preparazione di destrano incognita è immediatamente convertibile in distribuzione integrale secondo i pesi molecolari [6].

Ricevuto il 20 dicembre 1975.

Accettato il 24 gennaio 1976.

BIBLIOGRAFIA

1. ARACO, A. & M. BELLI, 1974. Aspetti teorici e sperimentali della gel-filtrazione. *Rapp. Ist. Super. Sanità, Lab. Fisica, ISS R74/14*.
2. ARACO, A., 1974. Un metodo per l'analisi di routine della distribuzione in pesi molecolari dei destrani d'uso clinico. *Rapp. Ist. Super. Sanità, Lab. Fisica, ISS T74/14*.
3. ARTURSON, G. & K. GRANATH, 1972. Dextrans as test molecules in studies of the functional ultrastructure of biological membranes. Molecular weight distribution analysis by gel chromatography. *Clin. Chim. Acta*, **37**: 309-322.
4. FRONTALI, C., A. ARACO, & S. NOTARGIACOMO, 1972. Analisi della distribuzione in pesi molecolari di preparazione di destrano per uso clinico. *Rapp. Ist. Super. Sanità, Lab. Fisica, ISS 72/15*.
5. GRANATH, K., & B. E. KVIST, 1967. Molecular weight distribution analysis by gel filtration on sephadex. *J. Chromatog.* **28**: 69-81.
6. WILLIAMS, J. W. & W. M. SAUNDERS, 1954. Size distribution analysis in plasma extender systems. II. Dextran. *J. Phys. Chem.* **58**: 854-859.