

ESTUDIO COMPARATIVO DE TRES RESINAS INTERCAMBIADORAS EN SU APLICACION AL ANALISIS DE AZUCARES POR CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA PRESION

M. Marcet y J. Copikova

*Instituto Superior Agroindustrial "Camilo Cienfuegos", Matanzas, Cuba
e Instituto Superior de Tecnología Química, Praga, Checoslovaquia*

Recibido: 25 de febrero de 1987

ABSTRACT. High performance liquid chromatography is an analytical technique that is well established for analysis of sugars. A group of cation exchange resins are studied and standard solutions of mixed sugars are separated by this method. Resolution and retention times are reported. It is also presented the possibility of the technique in analysis of sugar composition in sugar cane juices. This technique is known as an analytical tool and the introduction of the method in sugar industry research laboratories in Cuba will report an important progress.

RESUMEN. La cromatografía líquida de alta presión es una técnica analítica bien establecida para el análisis de azúcares. Se estudió un grupo de resinas intercambiadoras catiónicas y se separaron mezclas de soluciones estándar de azúcares por este método. La resolución y los tiempos de retención se informan en el trabajo. Además, se muestra la posibilidad de la técnica en el análisis de la composición de azúcares en jugos de caña de azúcar. Esta técnica es bien conocida como herramienta analítica y su introducción en los laboratorios de investigación de la industria azucarera resultará un progreso importante para Cuba.

INTRODUCCIÓN

La importancia de los carbohidratos como sustancias orgánicas de especial relevancia en los procesos vitales, por su proporción en muchos casos mayoritaria en fluidos biológicos y multitud de extractos de procedencia biológica diferente y por su importante papel en la composición de los alimentos principales que el hombre y los animales en general, tienen como parte de su dieta alimenticia, es que se han desarrollado un sin número de técnicas que permiten a los investigadores la separación, identificación y cuantificación de ellos.

Las primeras técnicas de cromatografía de papel, en placa delgada y en columnas abiertas, han sido sustituidas en gran medida por métodos instrumenta-

les tales como la cromatografía gas-líquido y la cromatografía líquida de alta presión.

La cromatografía gas-líquido ha sido establecida como importante método de estudio de azúcares a partir del trabajo presentado por Sweeley y col.¹ y desde entonces se han descrito muchas variantes^{2,3,4} y diversas aplicaciones^{5,6,7}. Recientemente, el empleo de la cromatografía líquida de alta presión ha sido prácticamente la que ha reemplazado a la cromatografía gas-líquido, lo que se confirma por el incremento de publicaciones sobre esta materia⁸⁻¹⁵ que se ha observado en esta última década.

Las resinas intercambiadoras catiónicas han sido muy utilizadas en el estudio de azúcares. En este trabajo se pretende la aplicación de ellas, en la investigación de jugos de caña de azúcar. Se han

analizado mezclas patrones de los principales carbohidratos sencillos de este material empleando resinas intercambiadoras catiónicas fuertes en forma cálcica, donde el mecanismo de separación es más por partición que por intercambio iónico.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se seleccionaron resinas intercambiadoras catiónicas a base de divinilbenceno con capacidad elevada de resolución para moléculas pequeñas y con excelente adaptabilidad para su uso discontinuo. A este efecto se estudiaron tres resinas intercambiadoras catiónicas de procedencia checoslovaca (Tabla I).

TABLA I

Características de las resinas intercambiadoras catiónicas estudiadas

Resina	DVB (%)	$\bar{dp}$
OSTION LG KS 0802	8,0	14
OSTION LG FA	9,3	8
OSTION LG KS	4,2	10

DVB divinilbenceno

$\bar{dp}$ diámetro de partícula

Las resinas fueron llevadas de la forma hidrogenónica a la forma cálcica. A 25 mL de resina se adicionaron 250 mL de HCl 1 mol/L con agitación a 60 °C durante 30 min. Posteriormente, se filtró y lavó la resina con suficiente agua destilada para al final adicionarle 200 mL de CaCl_2 1 mol/L, agitándose nuevamente 1 h a 50 °C. Por último, se filtró y lavó hasta reacción negativa a iones Cl^- . Antes de llenar la columna, la resina fue convenientemente desgasificada. Se trabajó con una columna de acero inoxidable de 0,6 cm de diámetro interior y 25 cm de largo. Esta estaba provista de un sistema exterior de cristal que permitía, por circulación de agua, mantener una temperatura constante de 85 °C mediante la utilización de un ultratermostato sensible. Como fase móvil se utilizó agua destilada la cual fue calentada previamente a 92 °C y sometida al vacío hasta alcanzar la temperatura ambiente, logrando así su deaeración.

Se utilizó un cromatógrafo líquido de procedencia checa (Laboratorní Pístroje Praha) que contaba con un secuenciador lineal modelo 4001, un refractómetro diferencial RIDR-101, impresor T2-4620 y contador integrado CI-100.

Los patrones de azúcares de gran pureza fueron obtenidos en un equipo de la firma Merck.

Para la estimación de la resolución se utilizó la ecuación siguiente ¹⁶:

$$R_s = \frac{t_2 - t_1}{(1/2)(t_{w1} + t_{w2})} \quad (1)$$

donde:

R_s resolución

t_1 tiempo de retención de cada azúcar

t_{w1} tiempo de elusión de cada azúcar (Fig. 1).

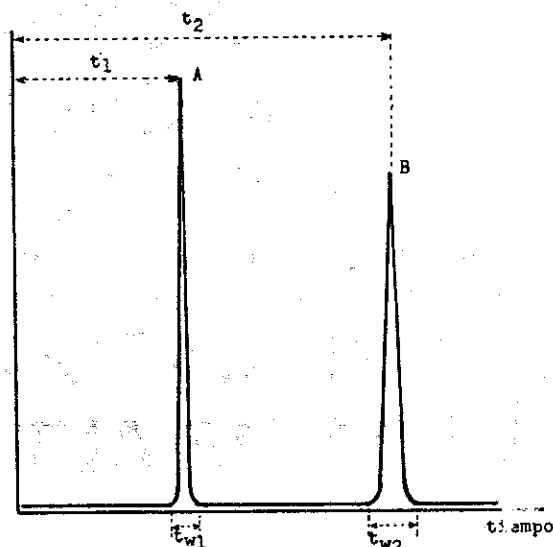


Fig. 1. Cálculo de la resolución (R_{ab}) según ecuación (1)

Una vez preparada y estabilizada la columna, se le inyectaron porciones de 50 mL de soluciones patrones al 1 % de rafinosa, sacarosa, glucosa, xilosa, fructosa y ribosa.

Se estudiaron un total de 10 resinas intercambiadoras catiónicas diferentes en formas distintas, presentando en este trabajo los resultados de las tres que presentaron mayor eficiencia.

En cada columna se realizaron diferentes corridas variando la presión de la bomba y por tanto el flujo, calculándose así, el número de platos y la eficiencia de cada una. (estos valores no se informan en este trabajo).

La velocidad de la carta fue siempre de 0,3 cm/min.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Tabla II se muestran los tiempos de retención de un grupo de azúcares todos a concentración del 1 % los cuales fueron separados mediante la resina OSTION LG KS en forma cálcica. Los resultados presentados corresponden a las medias de 20 determinaciones individuales. Se observa cómo la disminución del flujo en la columna motivado por una caída de presión, incrementa notablemente los tiempos de retención.

En la Tabla III se presentan los resultados obtenidos con una segunda resina. En este caso se utilizó la OSTION LG KS 0802.

Se presentan los resultados de las medias de 20 determinaciones.

Por último, en la Tabla IV se muestran los tiempos de retención obtenidos cuando esta mezcla de azúcares se sometió a la separación por medio de la resina OSTION LG FA.

Las desviaciones estándar y coeficientes de variación individuales no se describen. La mayor desviación obtenida fue de 0,114 y el coeficiente de variación más elevado fue de 0,9 lo que demuestra la alta precisión del método utilizado.

TABLA II

Tiempos de retención de diferentes azúcares por cromatografía líquida de alta presión en distintas condiciones empleando la resina OSTION LG KS

Azúcares	Tiempo (min)					
Rafinosa	8,6	10,3	13,3	18,3	28,0	55,0
Sacarosa	9,6	11,6	15,0	20,6	31,3	61,6
Glucosa	11,6	14,0	18,0	25,0	37,6	73,3
Xilosa	12,3	15,3	19,3	27,0	40,6	79,0
Fructosa	13,6	16,6	21,3	29,6	44,6	86,6
Ribosa	20,3	24,3	32,3	43,0	65,3	126,0
Flujo (mL/min)	0,3	0,25	0,20	0,15	0,10	0,05
Presión (MPa)	2,0	1,8	1,6	1,4	1,1	0,6
Atenuación	32,0	32,0	32,0	32,0	32,0	32,0

n 20

TABLA III

Tiempos de retención de diferentes azúcares por cromatografía líquida de alta presión en distintas condiciones empleando la resina OSTION LG KS 0802

Azúcares	Tiempo (min)					
Rafinosa	4,3	6,7	8,3	13,3	26,3	61,0
Sacarosa	5,0	8,0	9,0	15,3	20,6	71,0
Glucosa	5,4	8,3	10,3	16,7	33,0	76,7
Xilosa	6,0	9,3	11,0	18,0	36,3	86,7
Fructosa	7,7	1,7	15,3	22,7	45,7	107,0
Ribosa	9,0	4,0	18,3	27,0	53,7	126,0
Flujo (mL/min)	0,6	0,4	0,3	0,2	0,1	0,05
Presión (MPa)	0,4	0,3	0,2	0,18	0,15	0,10
Atenuación	16,0	16,0	16,0	16,0	16,0	16,0

n 20

TABLA IV

Tiempos de retención de diferentes azúcares por cromatografía líquida de alta presión en distintas condiciones empleando resinas OSTION LG FA

Azúcares	Tiempo (min)					
Rafinosa	3,0	4,0	6,0	15,3	28,0	50,0
Sacarosa	3,4	4,3	6,3	16,0	29,7	53,3
Glucosa	3,7	5,0	7,3	18,3	34,0	62,7
Xilosa	4,0	5,3	8,0	19,7	36,3	67,3
Fructosa	4,3	6,0	9,0	21,3	39,3	74,0
Ribosa	6,7	9,0	12,3	30,0	56,7	108,7
Flujo (mL/min)	0,8	0,6	0,4	0,2	0,1	0,05
Presión (MPa)	1,4	1,2	0,8	0,3	0,2	0,1
Atenuación	32,0	32,0	32,0	32,0	32,0	32,0

n 20

En la Tabla V se muestra una comparación de las resoluciones obtenidas para los tres azúcares de mayor interés en los jugos de caña de azúcar, glucosa, fructosa y sacarosa. Los tiempos de retención de sus combinaciones se presentan para cada resina estudiada. Los resultados correspondieron también a las medias de 20 determinaciones.

Aunque las tres resinas estudiadas presentan en general buenos poderes resolutivos para los azúcares estudiados, la OSTION LG KS 0802 en forma cálcica presentó características ligeramente superiores a un flujo de 0,15 mL/min. No obstante, ésta se puede trabajar a flujos aún mayores lográndose separar con eficiencia estas mezclas y acortándose el tiempo de los análisis. A esta misma columna se le aplicó una muestra de jugo de caña de azúcar diluida 15 veces (Fig. 2). Se observan los picos de separación de los distintos azúcares presentes demostrando así, la aplicabilidad del sistema estudiado. El resultado de pruebas de recuperación fue de un 99,1 % para la sacarosa.

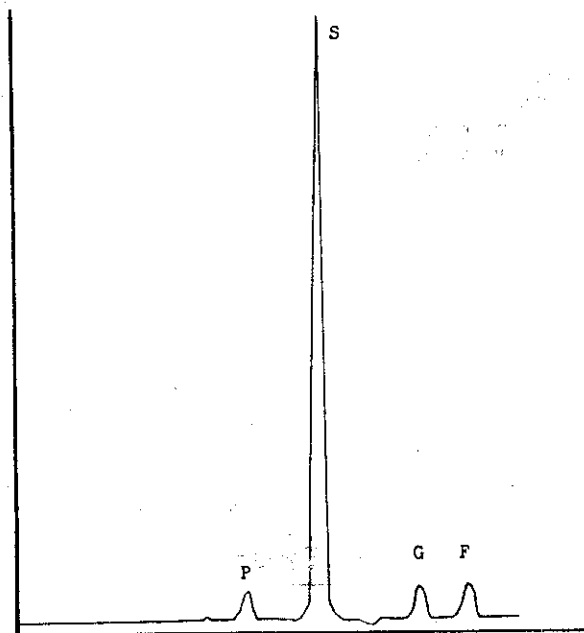


Fig. 2. Cromatograma líquido de alta presión de jugo de caña diluido empleando la resina OSTION LG KS 0802 P polisacáridos, S sacarosa, G glucosa, F fructosa

TABLA V

Resoluciones encontradas por cromatografía líquida de alta presión para sacarosa, glucosa y fructosa empleando tres resinas diferentes

Flujo (mL/min)	t _s	t _{ws}	t _g	t _{wg}	t _f	t _{wf}	R _{wf}	R _{gf}	R _{sf}
OSTION LG KS									
0,30	9,6	1,0	11,6	1,3	13,6	1,3	1,7	1,5	3,0
0,25	11,6	1,0	14,0	1,3	16,6	1,3	2,0	1,9	4,3
0,20	15,0	1,3	18,0	1,7	21,3	1,7	2,0	1,9	4,2
0,15	20,6	1,7	25,0	2,0	29,6	2,0	2,4	2,3	4,9
0,10	31,3	2,7	37,6	3,0	44,6	3,0	2,2	2,3	4,6
0,05	61,6	5,7	73,3	5,7	86,6	6,6	2,1	2,3	4,2
OSTION LG KS 0802									
0,60	5,0	0,6	5,4	0,6	7,7	1,0	0,6	2,8	3,4
0,40	8,0	1,6	8,3	1,6	11,7	1,3	0,2	2,3	2,6
0,30	9,0	1,6	10,3	1,6	15,3	1,6	0,8	3,1	3,9
0,20	15,3	3,0	16,7	3,3	22,7	3,0	0,4	1,9	2,4
0,10	20,6	5,0	33,0	5,6	45,7	5,3	2,1	2,3	4,9
0,05	71,0	10,7	76,7	12,6	107,0	10,0	0,4	2,7	3,5
OSTION LG FA									
0,80	3,0	0,6	3,7	0,6	4,3	1,3	1,2	0,6	1,4
0,60	4,3	0,6	5,0	1,0	6,0	1,3	0,9	0,9	1,8
0,40	6,3	1,3	7,3	1,3	9,0	1,0	0,8	1,4	2,3
0,20	16,0	2,0	18,3	2,0	21,3	2,0	1,2	1,5	2,7
0,10	29,7	4,3	34,0	3,3	39,3	3,0	1,1	1,7	2,6
0,05	53,3	14,0	62,7	11,6	74,0	11,0	0,7	1,0	1,7

Los cálculos fueron realizados ¹⁶ según la expresión (1)

CONCLUSIONES

Se demuestra que las tres resinas estudiadas pueden separar con eficiencia los azúcares presentes en jugos de caña de azúcar.

Esta técnica podría resultar una solución para laboratorios centrales de la industria azucarera y así determinar con precisión el contenido de azúcares reales en jugos de caña o etapas intermedias del proceso de elaboración.

Las resinas utilizadas son regenerables y su explotación para regímenes de trabajo de 8 h diarias puede oscilar entre los 3 y 6 meses sin que exista variación en los resultados.

Se utilizó agua destilada como fase móvil lo que simplifica aún más el método y elimina el empleo de reactivos costosos.

Variando el tipo de resina se pueden estudiar otros azúcares complejos como son los polisacáridos, que son de gran interés industrial.

Con un costo inicial de equipos la industria azucarera podría disponer de un rápido y eficiente sistema para el análisis rutinario del contenido de azúcares en las distintas fases del proceso industrial.

BIBLIOGRAFIA

1. Sweeley C. C., Bentley R., Makita M. and Welles W. W. *J. Am. Chem. Soc.*, 85, 2 497, 1963.
2. Chaplin M. F. *Anal. Biochem.*, 123, 336, 1982.
3. Mawhinney T. P., Feather M. S., Barbero G. J. and Martínez J. R. *Anal. Biochem.*, 101, 112, 1980.

4. Oshima R., Yoshikawa A. and Kumanotani J. *J. Chromatogr.* 213, 142, 1981.
5. Green C., Doctor V. M., Holzer G. and Oro J. *J. Chromatogr.* 207, 268, 1981.
6. Oshima R., Kumanotani J. and Watanabe C. *J. Chromatogr.* 250, 90, 1982.
7. Blakeney A. B., Harris P. J., Henry R. J. and Stone B. A. *Carbohydr. Res.* 113, 291, 1983.
8. Ladisch M. R. and Tsao G. T. *J. Chromatogr.* 166, 85, 1978.
9. Tang P. W. and Williams J. M. *Carbohydr. Res.* 136, 259, 1985.
10. Binder H. *J. Chromatogr.* 189, 414, 1980.
11. Andersson L. *J. Chromatogr.* 325, 37, 1985.
12. Watanabe N. and Inoue M. *Anal. Chem.* 55, 1 016, 1983.
13. Makkee M., Kieboom A. and Bekkum H. *Int Sugar Journal* 87, 1 035, 1985.
14. Bonn G. *Chromatographia* 8, 445, 1984.
15. Betschart H. F. and Prenosil J. E. *J. Chromatogr.* 299, 498, 1984.
16. Pharmacia Laboratory Separation Division, Gel filtration, Theory and Practice. S-751 82, Uppsala, Sweden, 1984.

ESTIMULADOR ELECTROMAGNETICO PULSANTE

El estimulador de campo electromagnético pulsante consta de la fuente, la cual se alimenta por conexión al sistema energético en sus variables de 110/220 V CA. Ella induce el campo magnético entre dos bobinas que constan de 200 vueltas de alambre de 0,25 mm; su tamaño es variable según la región; su forma es cóncava para permitir adaptarse a superficies enyesadas o a la piel; siempre deben colocarse paralelas y perpendiculares al foco lesional; el sistema de cierre Velcro evita su desplazamiento.

El campo magnético es un tratamiento no invasivo, indoloro, sin efectos dañinos sobre el paciente; tiene la capacidad de inducir en el tejido óseo y vecinos una señal eléctrica de gran eficacia biológica modificando el comportamiento celular y provocando una intensa osteogénesis. El tratamiento se realiza a diario durante 10 horas continuas por 12-14 semanas.

En nuestro aparato el campo creado es bajo 2 Gs, al igual que la frecuencia 15 Hz.

El campo magnético pulsante se utiliza por sí mismo, junto a aparatos enyesados, osteosíntesis interna y externa, siempre con comitar su uso con la

pacientes portadores de marcapasos ni en estado de gestación.

DATOS TECNICOS

Voltaje de alimentación: 110/220 V CA

Frecuencia: 50/60 Hz

Señal de salida:

Pulsos de 0-30 V

0,1-0,5 ms de duración y trenes de 15 Hz

Tiempos de estimulación:

1,2,4,8 y 10 horas (o continuo)

Dimensiones: (175 x 215 x 120)mm

Masa: 1,3 kg

Magnitud-2 Gs

Ancho del pulso-200 ms

PRODUCIDO POR:

PRODUCED BY:



EXPORTADO POR:

medica