

## Determinación de Aminoácidos por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC)

DELIA R. GUTIERREZ

*Departamento de Desarrollo, Roux Ocefa, S.A.,  
Medina 138, (1407) Buenos Aires, Argentina*

**RESUMEN.** Se detalla el procedimiento utilizado al aplicar el método de Larsen y West<sup>1</sup> a la determinación de aminoácidos en soluciones parenterales de gran volumen. El método consiste en la derivatización de los aminoácidos con O-ftalaldehído y posterior cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) de los productos de reacción. Se utiliza como fase estacionaria una columna de C-18 y como fase móvil un gradiente de acetonitrilo, buffer fosfato de pH 7,2 (a temperatura ambiente), con detector fluorométrico. El análisis se completa en 52 minutos.

**SUMMARY.** "Aminoacids Determination by HPLC". The method of Larsen and West<sup>1</sup> has been applied to the quantitation of aminoacids in large volumen parenteral solutions. It consists in the derivatization of the aminoacids with orthophthalaldehyde (OPA) plus HPLC of the resulting products. A C 18 column was used as stationary phase and a gradient between acetonitrile and phosphate buffer pH 7.2 as mobile phase. The detection was carried out through a fluorometric device. The run time was 52 minutes.

### MATERIAL

#### Equipo

Cromatógrafo líquido Beckman, con sistema de doble bomba y detector de fluorescencia.

Detector de fluorescencia con lámpara de halógeno, rango espectral de 320-800 nm. Fotomultiplicador con rango entre 200-600 nm. Filtro de excitación: 305-395 nm. Filtro de emisión: 470-650 nm.

Integrador SP 4270.

Columna: Ultrasphere ODS (dp = 5 µm; 4,6 mm ID x 25 cm).

Pre-columna: Ultrasphere ODS (dp = 5 µm; 4,6 mm ID x 4,5 cm).

Número de platos teóricos: (para los aminoácidos mencionados, en las condiciones de trabajo descritas a continuación):

	His	Arg	Met	Trp	Lis
N/m	51800	93750	90000	596000	328000

#### Reactivos

**Buffer fosfatos.** Disolver 3,549 g de fosfato disódico anhidro en 400 ml de agua destilada, ajustar el pH a 7,2 con ácido clorhídrico y llevar a 500 ml con agua destilada. Una dilución al 1/4 constituye el buffer de trabajo.

**Buffer borato.** Preparar una solución

**PALABRAS CLAVE:** Cromatografía Líquida de Alta Resolución; Aminoácidos; Soluciones parenterales.

**KEY WORDS:** HPLC; Aminoacids; Parenteral solutions

sobresaturada de ácido bórico (solubilidad: 1 g en 4 ml de agua hirviente), dejar enfriar, filtrar y ajustar el pH a 9,2 con hidróxido de sodio 1 N.

*Solución de o-ftalaldehído/etanotiol.* Disolver 0,050 g de o-ftalaldehído en 4,5 ml de metanol HPLC, adicionar 50  $\mu$ l de etanotiol y 0,5 ml de buffer borato. Este reactivo es de preparación extemporánea.

*Solución estándar de aminoácidos.* Disolver alrededor de 0,050 g de L-Cisteína RS y 0,050 g de L-Tirosina RS, exactamente pesados, en 100 ml de HCl 1 N y transferir 10 ml de dicha solución a un matraz aforado de 1000 ml. En el mismo adicionar, exactamente pesados, alrededor de 0,058 g de L-Fenilalanina RS, 0,065 g de L-Isoleucina RS, 0,090 g de L-Leucina RS, 0,076 g de L-Lisina base RS, 0,031 g de L-Metionina RS, 0,056 g de L-Treonina RS, 0,015 g de L-Triptofano RS, 0,073 g de L-Valina RS, 0,056 g de L-Arginina RS, 0,035 g de L-Histidina RS, 0,060 g de L-Prolina RS, 0,075 g de L-Alanina RS, 0,070 g de ácido L-Aspártico RS, 0,060 g de Glicina RS, 0,120 g de ácido L-Glutámico RS y 0,050 g de L-Serina RS, disueltos en 90 ml de ClH 1 N y llevar a volumen con agua destilada. Almacenar en frasco color caramelo, en heladera, durante 3 meses.

La solución estándar de trabajo consiste en una dilución 1/50 de la anterior.

*Dilución de la muestra.* Medir 1 ml del producto a ensayar y llevar a 100 ml con agua destilada; tomar 2 ml de la dilución anterior y llevar nuevamente a 100 ml con agua destilada.

#### METODO

##### Condiciones de trabajo

*Detector:* Sensibilidad 0,05 RFS; Constante de tiempo: 0,5 seg.

*Integrador:* Velocidad de carta: 0,5 cm/min; atenuación: 32; pico umbral: a evaluar.

##### Fases móviles

A: solución buffer fosfatos diluido de pH 7,2; B: Acetonitrilo HPLC; suministrados de acuerdo al siguiente programa:

Tiempo total (min)	Caudal (ml/min)	% B	Tiempo parcial (min)
0	0,8	—	—
0	"	9	1
1	"	9 a 23	11,5
12,5	"	23	16,5
29	"	23 a 49	21
50	"	49	10
60	0,0	—	—

##### Procedimiento

*Reacción de derivatización.* En un matraz de 5 ml de color caramelo, medir 1 ml de solución estándar de trabajo, 1 ml de buffer borato, 0,5 ml de o-ftalaldehído/etanotiol y llevar a volumen con metanol HPLC. Luego de 1 minuto inyectar 20  $\mu$ l en el cromatógrafo, iniciando en ese momento el gradiente. Una vez terminada la corrida de la solución estándar de aminoácidos se procede de igual manera con la dilución de la muestra.

Antes de cada inyección corroborar que el sistema esté en régimen; para ello se hace necesario correr el gradiente en varias oportunidades, verificando la corrección de la línea de base.

#### RESULTADOS

Aminoácido	Tiempo de retención (min)
Acido L-Aspártico	4,79
Acido L-Glutámico	5,85
L-Histidina	15,92

Aminoácido	Tiempo de retención (min)
L-Serina	17,94
L-Histidina	20,17
L-Treonina + Glicina	22,02
L-Alanina	22,53
L-Arginina	24,49
L-Tirosina	24,82
L-Valina	34,84
L-Metionina	36,01
L-Triptofano	42,47
L-Isoleucina	42,98
L-Leucina	43,43
L-Fenilalanina	43,94
L-Lisina	50,09

Comparar los cromatogramas obtenidos con la solución estándar y la muestra, verificando que el sistema adoptado por la computadora para integrar cada pico haya sido el mismo en ambos casos. De no ser así procesar manualmente (altura, área, etc.) dicho pico.

## CONCLUSIONES

### *Reacción de derivatización*

Dado que este método ha sido diseñado originariamente para el trabajo en forma automática, es necesario el cuidadoso control de una serie de parámetros para lograr reproducibilidad en forma manual: a) el material donde se realiza la reacción deberá ser de vidrio anti-actínico, b) la temperatura de reacción debe ser de 23 °C y c) el tiempo de reacción no sólo deberá ser estrictamente medido para trabajar con el máximo de fluorescencia, sino también para limitar la variación entre análisis.

Además debe tenerse en cuenta que: a) Prolina no da la reacción directamente porque tiene su grupo  $-NH_2$  comprometido en una estructura cíclica (la reacción es de  $-NH_2$  primarios) (para liberar el grupo

amino del ciclo es necesario tratarlo con ClONa o Cloramina T), b) en cuanto a Cisteína, el aducto Cis-OPA tiene una muy pobre fluorescencia, por tanto para que la reacción sea sensible es necesario oxidarlo a ácido Cisteico<sup>2</sup> y c) Histidina, debido a la presencia de ácidos orgánicos que provocan una mayor fuerza iónica en la muestra que en la fase móvil, presenta dos picos<sup>3, 4</sup>.

### *Gradiente*

El pH aparente de la mezcla de solventes llega a 7,6-7,8, lo que va en perjuicio de la columna (hay solubilización parcial de la sílice). La vida útil de la columna es de aproximadamente 100 corridas.

Después de un cierto tiempo se observa un aumento de la presión de trabajo de 1000 psi a 2000 psi. Esto se debe a que los silicatos formados originan centros de cristalización en el filtro de salida. Es necesario limpiar el filtro con NaOH al 30% para eliminarlos.

Los tiempos de equilibrio a 49% de B como así también a 9% de B se deben controlar exactamente, ya que de lo contrario se observa variación en los tiempos de retención de los aductos más polares (Aspártico, Glutámico).

Otro motivo de variación de los tiempos de retención obedece a pequeñas diferencias de concentración de los componentes del buffer de corrida.

Con el tiempo se pierde resolución entre los picos Trp-Ileu y Gli+Treo-Ala. Se puede volver a la situación original por algunas corridas más si se lava la columna con  $CH_3CN$  al 100% durante 30 minutos a un caudal de 0,8 ml/min.

Desde el punto de vista cualitativo permite obtener un cromatograma tipo de las soluciones de aminoácidos comparable con el cromatograma testigo, facilitando un chequeo relativamente rápido de las soluciones en proceso.

Desde el punto de vista cuantitativo permite determinar la concentración de la mayoría de los aminoácidos con un coe-

ficiente de variación del 5%, a excepción de Arg (14%) y Asp (10%).

#### REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Larsen, B.R. y F.G. West (1981) *J. of Chromatogr. Sci.* 19: 259-65
2. Roth, M. (1971) *Anal. Chem.* 43: 880-2
3. Hill, D.W., F.H. Walters, T.D. Wilson y J.D. Stuart (1979) *Anal. Chem.* 51: 1338-41
4. Hodgkin, J.C. (1979) *J. Liquid Chromatogr.* 2: 1047-59