

# OPTIMIZACIÓN DE UN MÉTODO DE HPLC PARA CUANTIFICACIÓN DE AMINOÁCIDOS EN MUESTRAS PROTEICAS

Marinsaldi, Anabella; Cabanillas, Laura Marina; Rodriguez, Romina; Bernardi, María Eugenia.

Área de Desarrollo de Productos y Procesos, Laboratorio de Hemoderivados (LH), Universidad Nacional de Córdoba (UNC), Córdoba, Argentina.

## INTRODUCCIÓN

La elaboración de concentrados de proteínas requiere del agregado de estabilizantes en su formulación, como por ejemplo, aminoácidos (AA). La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) permite analizar AA en muestras proteicas.

Para la determinación por HPLC, existen procedimientos de derivatización pre-columna y, en este caso el o-ftalaldehído (OPA) fue el de elección.

Un análisis de AA cuantitativo ideal combina velocidad y sensibilidad, tanto de la derivatización como de la técnica analítica. Por ello, la derivatización automatizada en línea utilizando OPA resulta en un procedimiento rápido, preciso, sensible y reproducible.

El objetivo de este trabajo fue optimizar un método de HPLC para cuantificar el contenido de AA y determinar el perfil aminoacídico presente en muestras proteicas utilizando la derivatización pre-columna con OPA.

## DESARROLLO

Se empleó un HPLC Agilent 1260 Infinity, columna Eclipse XDB-C18, optimizando un gradiente para separar los AA: L-Arginina, L-Lisina, L-Alanina, Glicina, L-Histidina y Triptófano.

Se evaluó el impacto de diferentes factores sobre la señal y cromatograma de los AA como: presencia o ausencia de OPA, efecto de la matriz biológica y tratamiento previo de las muestras proteicas.

A fin de realizar las correspondientes curvas de calibración y evaluar la linealidad, se definió un rango de concentraciones para cada AA, teniendo en cuenta las presentes en cada formulación. Las curvas fueron realizadas a partir de una única solución mezcla de los 6 AA. Se cuantificaron los AA en diferentes concentrados de proteínas para evaluar la idoneidad del sistema.

## RESULTADOS:

Se logró la correcta separación de los 6 AA (tiempos de retención). No se observó efecto de la matriz, sin embargo, se realizó un desproteinizado con ácido nítrico previo a la inyección, para proteger el sistema cromatográfico.

La linealidad de las curvas de cada AA utilizando una única solución mezcla fue satisfactoria ( $R^2$  0.989-0.999)

El agregado de OPA es un factor determinante ya que, sin este reactivo, no se observa señal de AA.

Aminoácido	Tiempo de retención (min)	Concentración (mg/ml)	R <sup>2</sup>
L-Histidina	8.11	0.02-0.13	0.989
Glicina	8.50	0.2-1.3	0.999
L-Arginina	9.31	0.1-0.65	0.993
L-Alanina	9.84	0.1-0.65	0.994
Triptófano	13.58	0.1-0.65	0.989
L-Lisina	14.92	0.05-0.325	0.992

Análisis de AA:

Concentrados proteicos	Concentración teórica <sup>1</sup> (mg/ml)	Concentración obtenida (mg/ml)
Factor IX <sup>2</sup>	L-Arginina: 1.5-4.5 L-Lisina: 0.3-2.0	L-Arginina: 4.0 L-Lisina: 1.1
Fibrinógeno <sup>2</sup>	Glicina: 5-20 L-Arginina: 7.5-14	Glicina: 10.6 L-Arginina: 13.4
Complejo Protrombínico	Glicina: 7.5-14.5	Glicina: 11.5

<sup>1</sup> según la formulación <sup>2</sup> producto no comercializado

### CONCLUSIÓN

El método de HPLC optimizado resultó tener la sensibilidad adecuada para medir AA en muestras proteicas. Además, la estrategia de analizar todo los AA a partir de una única solución mezcla lo convierte en un método sencillo de ejecutar. Los resultados obtenidos de los AA, analizados en las muestras proteicas, fueron comparables a los teóricos. Se realizará la validación del método propuesto.