# Separación de PTH-aminoácidos mediante cromatografía en fase inversa en columnas cortas

L. CASTELLANOS

**Laboratorio de Química de Proteínas, Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, Apartado Postal 6162, La Habana, Cuba**

*Recibido en diciembre de 1988*
*Aprobado en enero de 1989*

## RESUMEN

En el presente trabajo se describe un procedimiento para la separación de 20 PTH-aminoácidos por cromatografía líquida de alta eficiencia en fase inversa, utilizando una columna de tipo C-8, de 50 mm de largo, que permite una gran economía de disolventes y de tiempo. La separación se completa en 14 minutos y utiliza un gradiente de iso-propanol en acetato de amonio 0,025 M a pH 5,3.

## SUMMARY

The present paper describes a procedure for the separation of 20 PTH-aminoacid derivatives by reversed phase HPLC on a C-8 column, 50 mm length, with a consequent economy of time and solvents. Separation takes place in 14 minutes in a gradient of iso-propanol on ammonium acetate 0,025 M, pH 5,3.

## INTRODUCCION

En los útlimos años se han efectuado numerosos esfuerzos encaminados a incrementar la sensibilidad y la rapidez en las técnicas de secuenciación de proteínas. Con el desarrollo de los secuenciadores automáticos una buena parte de las dificultades inherentes a los métodos manuales quedaron superadas, siendo actualmente posible la secuenciación de pocos picomoles con rendimientos repetitivos superiores a 98 % por ciclo. La detección de los derivados obtenidos, feniltiohidantoínas (PTH-) de los aminoácidos, constituye un paso clave en el proceso de secuenciación que tiene que corresponder, en cuanto a rapidez y sensibilidad, a los niveles alcanzados en la degradación automática.

Desde el punto de vista de la cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC), la separación de los 20- PTH aminoácidos constituye un reto técnico por la gran similitud estructural entre estos compuestos y los difíciles requerimientos que impone el trabajo a niveles de alta sensibilidad.

**Copyright © 1989, Sociedad Iberolatinoamericana para Investigaciones sobre Interferón**
**Publicado por el Palacio de las Convenciones, La Habana, Cuba**

Numerosos trabajos se han publicado reportando diferentes procedimientos de separación de los PTH-aminoácidos en columnas de fase inversa mediante HPLC. Las técnicas tradicionales utilizan elución con gradientes y columnas de 4,6 mm por 25 cm, lográndose en general resultados satisfactorios en las separaciones. Recientemente se introdujeron las columnas de tipo *microbore* de 1 mm de diámetro, las cuales han permitido separaciones muy eficientes. (Cunico *et al.*, 1984).

Estas columnas tienen la longitud habitual de 25 cm y utilizan el principio de la elución por gradiente. En este trabajo nos propusimos introducir en el análisis de PTH aminoácidos un nuevo tipo de columnas, recientemente disponible, de 5 cm de longitud, que resultan muy atrayentes por su costo menor con respecto a las columnas tradicionales y que permite el ahorro de disolventes y de tiempo.

## MATERIALES Y METODOS

El equipo de HPLC utilizado está formado por un controlador de gradiente, dos bombas (LKB), un inyector (Rheodyne) provisto de un lazo de 20 µl, un detector de longitud de onda variable y un horno (KNAUER), un registrador de dos canales (LKB) y un procesador de datos (Chromatopack CR3A Shimadzu). La columna de HPLC es una columna Supersphere 60 RP-8 (Merck) de 4 µm de tamaño de partícula y longitud de 5 cm por 4 mm de diámetro interno.

Se prepararon disoluciones de PTH-aminoácidos (Pierce Chem. Co.) en metanol calidad HPLC, a una concentración de 0,25 nM/µl. A partir de estas disoluciones se prepararon tres mezclas de PTH-aminoácidos, en las que cada derivado se encuentra en una concentración de 100 pM, con las siguientes composiciones:

- STD. 1. (Bajos tiempos de retención)
  Asp, Glu, Ser, Thr, Gly, Asn, Gln, His, Ala, Arg.
- STD. 2. (Altos tiempos de retención)
  SCM-Cys, Pro, Trp, Val, Tyr, Met, Phe, Ile, Leu, Lys.
- STD. 3. Mezcla de STD. 1 y STD. 2.

Para la preparación de los disolventes de elución se utilizaron reactivos calidad HPLC (acetato de amonio y acetato de sodio Baker, isopropanol y acetonitrilo Merck y ácido acético Pierce.)

Los tampones utilizados fueron:

- Acetato de amonio: 0,025 M; 0,05 M
- Acetato de sodio: 0,025 M; 0,05 M

Para la selección del pH óptimo se ajustaron los tampones anteriores al valor de pH seleccionado, mediante adición de ácido acético. Se estudió la separación a los siguientes pH: 4,0; 4,5; 5,0; 5,3; 5,6; 6,0.

## RESULTADOS Y DISCUSION

Para lograr una efectiva separación de los 20 PTH-aminoácidos, se procedió a optimizar independientemente las condiciones de separación para los PTH- de bajo y de alto tiempo de retención (STD.1 y STD.2 respectivamente), ajustándose primero las condiciones hasta lograr la separación completa de los componentes de STD.1.

La fase móvil utilizada en la separación de los PTH- aminoácidos se ajustó empíricamente para lograr las mejores condiciones de selectividad. Para ello partimos de la amplia experiencia existente en trabajos precedentes respecto a las condiciones de separación en las columnas tradicionales C-8 y C-18 largas (4,6 x 250 mm). Los ensayos con diferentes pH y fuerzas iónicas del tampón A, demostraron la gran sensibilidad de los aminoácidos dicarboxílicos y dibásicos (Glu, Asp, Arg, His y Lys) a los cambios en estos parámetros. Resultados similares han sido reportados previamente (Meuth y Fox, 1986).

## Concentración del tampón y pH

En general, una concentración salina de 0,025 M resultó suficiente para lograr una buena resolución. La selección de esta concentración tuvo en cuenta, además, la compatibilidad con un gradiente que incluye una alta proporción del modificador orgánico, con el fin de evitar el depósito salino en la columna.

Las separaciones fueron estudiadas en un rango de pH entre 4,0 y 6,0 para dos valores de la fuerza iónica (0,025 y 0,050 M), y para dos sales (acetato de amonio y acetato de sodio). Los incrementos en el pH originan reducciones apreciables de los tiempos de retención de los aminoácidos ácidos y aumento de los tiempos de retención de los aminoácidos His y Arg; los valores de Lys variaron relativamente poco con el pH, pero resultaron muy sensibles a la forma del gradiente (% del modificador orgánico). Se encontraron los mejores resultados para las separaciones de los pares Asp/Glu; His/Arg; Thr/Gly para pH de 5,3 a 5,6. A causa de la sensibilidad de estas separaciones ante los ligeros cambios de pH, es conveniente rectificar diariamente el pH del tampón salino.

## Naturaleza del tampón

Se encontró poca diferencia entre las separaciones utilizando acetato de amonio y acetato de sodio. El acetato de amonio resultó superior en la resolución de algunos pares de derivados de bajos tiempos de retención (Ser/Thr, Gly/Gln). Para los PTH- de altos tiempos de retención, no existió diferencia apreciable, lográndose en general una buena separación .

El isopropanol resultó ser un disolvente adecuado para la separación de los 20 PTH-aminoácidos, pudiendo ser un sustituto para el acetonitrilo, que es el modificador orgánico más popular en este tipo de separaciones, pero que es mucho más costoso.

Los PTH-aminoácidos de la mezcla de bajos tiempos de retención (hidrofílicos, Std. #1) resultaron ser los más sensibles a las formas de los gradientes, y especialmente a la pendiente en el intervalo desde el inicio de la separación hasta los ocho minutos. Los PTH-aminoácidos hidrofóbicos (Std. #2) resultaron en general mucho mejor resueltos con gradientes abruptos, lográndose relaciones altura/ancho de pico satisfactorias para la resolución de pares muy cercanos, mientras que los gradientes de pendiente suave, en general, causaron un notable ensanchamiento de los "picos". Este problema se presenta notablemente en las separaciones isocráticas (Tsunasawa, *et al.*).

La temperatura de 48°C resulta conveniente para reducir la viscosidad del modificador orgánico, si bien por el hecho de utilizar una columna corta, las presiones de trabajo son siempre bajas, incluso con disolventes de alta viscosidad.

La optimización combinada de los diferentes factores que intervienen en esta técnica nos llevó a seleccionar las siguientes condiciones, que permiten la separación de 20 PTH-aminácidos en menos de 14 minutos:

Disolvente A: Acetato de amonio 0,025 M pH 5,30.
Disolvente B: Isopropanol.
Flujo: 0,8 ml/min.
Programa de gradiente:

| Tiempo: (min) | %B: |
|---|---|
| 0 | 0 |
| 5 | 8 |
| 15 | 30 |

Temperatura: 48°C

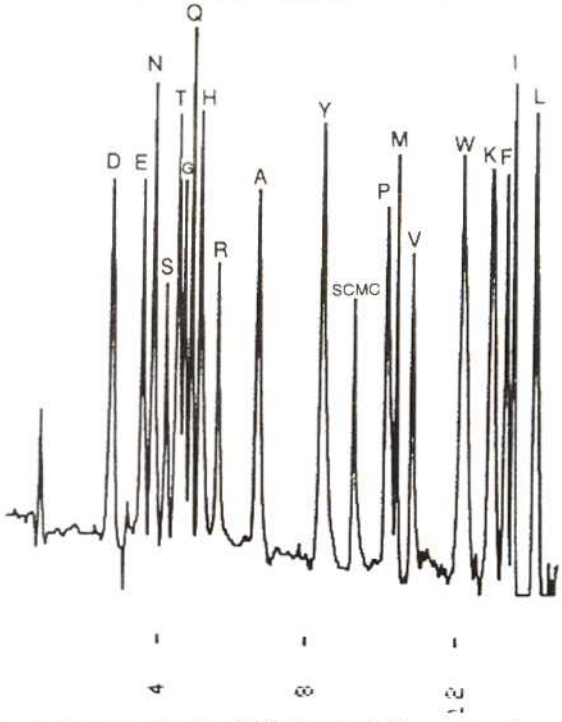


FIG. 1. Cromatograma de la separación de 20 PTH-aminoácidos en la columna Supersphere C-8, *Merck*, de 4 x 50 mm (véanse las condiciones en la tabla 1).

En la tabla 1 se muestran los tiempos de retención obtenidos para los 20 PTH-aminoácidos.

**Tabla 1**

**TIEMPOS DE RETENCION DE LOS PTH-AMINOACIDOS EN LAS CONDICIONES SELECCIONADAS**

| | | | |
|---|---|---|---|
| Asp: | 2,75 | Tyr: | 8,49 |
| Glu: | 3,68 | ScmCys: | 9,25 |
| Asn: | 3,93 | Pro: | 10,11 |
| Ser: | 4,22 | Met: | 10,36 |
| Thr: | 4,58 | Val: | 10,92 |
| Gly: | 4,71 | Trp: | 12,24 |
| Gln: | 4,97 | Lys: | 12,94 |
| His: | 5,18 | Phe: | 13,23 |
| Arg: | 5,66 | Ile: | 13,46 |
| Ala: | 6,73 | Leu: | 13,69 |

Condiciones: Columna Supersphere Merck 60, RP-8, 50 x 4 mm.
**Flujo:** 0,8 ml/min, temp: 48°C,
**Buffer A:** $NH_4Ac$ 0,025 M.
**Buffer B:** Isopropanol.
**Gradiente:** T:0, %B:0; T: 5, %B:8; T:15, %B 30.

La reproducibilidad del procedimiento permite trabajar con tablas de calibración y efectuar la identificación mediante un procesador de datos. La columna Supersphere C-8 corta ha sido utilizada en nuestro laboratorio con este procedimiento en la secuenciación manual de péptidos del factor de crecimiento epidérmico humano recombinante (Rec-(h)-EGF) con una adecuada reproducibilidad en los resultados obtenidos ciclo tras ciclo, y con una apreciable economía de disolventes y de tiempo.

La separación reportada en este trabajo demuestra que el desarrollo alcanzado en la tecnología de producción de fases estacionarias hace posible la separación de mezclas tan complejas en columnas de 5 cm de longitud. La detección de los PTH-aminoácidos en el rango de los picomoles es posible con un tiempo de análisis por ciclo relativamente corto. El procedimiento puede ser automatizado e incluido en los sistemas de secuenciación automática con detección simultánea *(on line)*.

## AGRADECIMIENTOS

Agradecemos al Dr. Luis Lautenschläger (E. Merck), el suministro de muestras de columnas cortas de fase inversa.

## REFERENCIAS

CUNICO, R.; L. CORREIA y C. WERH (1984). *High-sensitivity phenylthiohydantoin aminoacid analysis using conventional and microbore chromatography*. J. of Chromatography **336**: 105-113.

MEUTH, J. y L. FOX (1986). *Separation of aminoacid phenylthiohydantoin derivatives by high pressure liquid chromatography*. Anal. Biochem. **154**: 478-484.

TSUNASAWA, S.; J. KONDO y F. SAKIYAMA (1985). *Isocratic separation of PTH-aminoacids at picomole level by RP-HPLC in the presence of SDS*. J. Biochem., **97**: 701-704.