



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO

Escuela Nacional de Estudios Profesionales
"ZARAGOZA"

SEPARACION DE NEUROPEPTIDOS POR CROMATOGRAFIA
DE PARES DE IONES DE ALTA EFICIENCIA.

T E S I S

Que para obtener el Título de
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

p r e s e n t a

SANDRA CONTRERAS MARTINEZ

Asesor: Dra. Luz Elena Vera Avila

México, D. F.

1 9 9 3



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

CONTENIDO

INTRODUCCION	1
I. FUNDAMENTACION DEL TEMA	2
A. ANTECEDENTES	2
B. GENERALIDADES SOBRE LA CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS DE ALTA EFICIENCIA.....	2
1. Principales parámetros cromatográficos	3
a. Tiempo de retención	3
b. Tiempo cero ó tiempo muerto	3
c. Volumen de retención	3
d. Constante de distribución	3
e. Factor de capacidad	4
f. Factor de selectividad	4
g. Eficiencia	5
h. Resolución	5
2. Técnicas de la cromatografía de líquidos de alta eficiencia	6
a. Cromatografía de exclusión por talla	6
b. Cromatografía de intercambio iónico	7
c. Cromatografía en fase reversa químicamente unida (apolar)	8
C. ASPECTOS TEORICOS SOBRE LA CROMATOGRAFIA DE PARES DE IONES	9
1. Mecanismo de pares de iones	10
2. Mecanismo de intercambio iónico dinámico	10
3. Mecanismos mixtos	11
D. SEPARACION DE PEPTIDOS POR CROMATOGRAFIA DE ALTA RESOLUCION MEDIANTE LA FORMACION DE PARES DE IONES	11
E. ASPECTOS FISIOLÓGICOS Y BIOQUÍMICOS DE LA HORMONA LIBERADORA DE LA TIROTROPINA (TRH)	13

1. Distribución de TRH	13
2. Estudios farmacológicos	13
F. TRABAJOS PREVIOS SOBRE LA SEPARACION CROMATOGRAFICA DE TRH	14
G. CARACTERISTICAS DE LOS COMPUESTOS A SEPARAR EN ESTE TRABAJO	15
II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	17
III. OBJETIVOS	18
IV. HIPOTESIS	19
V. METODOLOGIA	20
A. METODO GENERAL	20
1. Equipo	20
2. Material	20
3. Reactivos	20
4. Disoluciones Stock	20
5. Método	21
a. Preparación del equipo	21
b. Lavado de la columna	21
c. Preparación de la fase móvil	21
d. Procedimiento	21
B. DISEÑO EXPERIMENTAL	22
1. Contenido de modificador orgánico en la fase móvil	22
a. Objetivo	23
b. Criterio de aceptación	23
2. Concentración de contraión	23
a. Objetivo	23
b. Criterio de aceptación	23
3. Tipo y concentración de coión	23

a. Objetivo	23
b. Criterio de aceptación	24
4. Efecto del pH en la fase móvil	24
a. Objetivo	24
b. Criterio de aceptación	24
5. Determinación de la longitud de onda de máxima sensibilidad y de la cantidad mínima detectable de TRH:	24
a. Objetivo	24
b. Criterio de aceptación	24
VI. RESULTADOS	25
A. CONTENIDO DE ACETONITRILLO	25
B. CONCENTRACION DEL CONTRAION	25
C. TIPO DE COION	26
D. CONCENTRACION DE COION	26
E. EFECTO DEL pH	27
F. DETERMINACION DE LA LONGITUD DE ONDA DE MAXIMA SENSIBILI- DAD PARA LA DETECCION DE LOS SOLUTOS	27
G. DETERMINACION DE LA CANTIDAD MINIMA DETECTABLE DE TRH ...	28
VII. DISCUSION	29
A. CONTENIDO DE ACETONITRILLO EN LA FASE MOVIL	29
B. CONCENTRACION DE CONTRAION EN LA FASE MOVIL	29
C. CONCENTRACION Y TIPO DE COION	31
D. EFECTO DEL pH DE LA FASE MOVIL	32
VIII. CONCLUSIONES	34
 BIBLIOGRAFIA	 37

INTRODUCCION

La regulación de las funciones que coordina el cerebro se lleva a cabo a través de la comunicación interneuronal, la cual es regulada en parte por mensajeros químicos. Inicialmente se pensó que el número de mensajeros químicos no debería ser muy grande, restringiéndose a moléculas como la acetil colina, las aminas biogénicas y algunos aminoácidos. Sin embargo, recientemente se ha demostrado la presencia de otro tipo de moléculas neuroactivas de naturaleza peptídica, capaces de modificar la actividad neuronal, por lo que se ha propuesto que estos neuropéptidos pudieran actuar como mediadores de la transmisión sináptica.

Ahora bien, los métodos como el radioinmunoensayo (RIA) y los bioensayos generan información valiosa acerca de las velocidades de inactivación de un péptido y los sitios en el organismo donde ocurre este fenómeno. Sin embargo, una información más completa acerca de los mecanismos de inactivación u otras transformaciones más sutiles, requieren la separación e identificación de los péptidos, sus principales metabolitos y los fragmentos en que puede romperse la cadena de aminoácidos que conforman la molécula peptídica. La cromatografía de líquidos de alta resolución resulta ser extremadamente útil para estos fines aunque apenas recientemente se han desarrollado y aplicado métodos para estudiar el catabolismo de péptidos.

Este trabajo consistió en estudiar la retención de los solutos Piroglutamil-histidil-prolinamida, Piroglutamil-histidil-prolina Histidil-prolina-dicetopiperazina, Prolina y Prolinamida sobre una fase estacionaria de octadecilsilice (C18) empleando una fase móvil ácida que contiene acetonitrilo como modificador orgánico y dodecilsulfato de sodio (SDS) como contraión.

Se realizó un estudio secuencial de la influencia de la composición de la fase móvil sobre la retención de éstos solutos. Los parámetros estudiados fueron: fracción volúmica de acetonitrilo, concentración de contraión, tipo de coión, concentración de coión y efecto del pH.

En todas las experiencias ejecutadas se procuró mantener los factores de capacidad de los solutos dentro del rango óptimo ($1 < k' < 10$) para obtener una buena resolución y un tiempo de análisis razonable. Esta condición determinó los intervalos de variación estudiados para cada parámetro.

I. FUNDAMENTACION DEL TEMA

A. ANTECEDENTES

Entre las técnicas utilizadas inicialmente para el análisis de péptidos, polipéptidos y proteínas, que poseen actividad biológica, están los ensayos biológicos realizados "in vivo" o "in vitro" y los radioinmunoanálisis (RIA), los cuales generan poca información sobre las características moleculares del péptido o la proteína, y en casi todos los casos dependen de la disponibilidad de estándares muy bien purificados y caracterizados (10). Por otra parte, las técnicas electroforéticas, como la electroforesis bidimensional o el enfoque isoeléctrico, que permiten la separación con excelente resolución de pequeñas cantidades de muestra, están severamente limitadas en cuanto a la capacidad de muestra aplicada (30).

Esta carencia de técnicas específicas y sensibles para estudios fundamentales de proteínas originó el desarrollo de métodos por cromatografía de líquidos de alta eficiencia (HPLC). Las técnicas de HPLC junto con otros sistemas de cromatografía clásica, han permitido aumentar, de manera importante los conocimientos básicos sobre péptidos y biomoléculas relacionadas (1,15,17,23). En la literatura se encuentran reportadas separaciones de diversos compuestos de origen biológico empleando, principalmente, las siguientes técnicas de la cromatografía líquida:

- Cromatografía de intercambio iónico.
- Cromatografía en fases químicamente unidas (apolares)
- Cromatografía de exclusión por talla
- Cromatografía de pares de iones.

B. GENERALIDADES SOBRE LA CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS DE ALTA EFICIENCIA.

La cromatografía de líquidos de alta eficiencia (comunmente conocida por sus siglas HPLC del nombre en inglés High-Performance Liquid Chromatography) comparte el mismo principio de otros procedimientos cromatográficos, es decir que las separaciones están basadas en las diferencias en el equilibrio de distribución de los solutos entre dos fases no miscibles, una fase estacionaria y una móvil. La característica distintiva de la cromatografía de líquidos moderna con respecto a la cromatografía de líquidos "clásica" es el uso de fases estacionarias de granulometría muy pequeña comunmente 5 o 10 μm , lo que permite disminuir considerablemente la dispersión de las bandas de los solutos durante su migración a lo largo de la columna, aumentando en consecuencia la eficiencia (bandas más estrechas) y facilitando las

separaciones . El paso de la fase móvil a través de las columnas de alta eficiencia es efectuado por bombeo a presión elevada, desde varias decenas hasta centenas de atmósferas dependiendo de la viscosidad del eluente, el diámetro de las partículas de fase estacionaria y la longitud de la columna (15,24,25).

Debido a estas características el equipo requerido en HPLC es más sofisticado y costoso, que el utilizado en cromatografía de líquidos "clásica". Sin embargo, la HPLC presenta ventajas significativas como son:

- Alta reproducibilidad en las separaciones.
- Alta resolución o separación relativa de los solutos.
- Elevada precisión en la cuantificación de los analitos.
- Rapidez de análisis.
- Posibilidad de automatización total en el análisis de rutina.

1. PRINCIPALES PARAMETROS CROMATOGRÁFICOS

a. Tiempo de retención (T_R). Es el tiempo que transcurre entre la aplicación de la muestra y la aparición del centro del pico a la salida de la columna. En el caso de picos Gaussianos, el máximo del pico (ápice) coincide con el centro de gravedad de la distribución de concentración y se utiliza para evaluar T_R . (Figura 1).

b. Tiempo cero o tiempo muerto (T_0). Es el tiempo de elución de un soluto no retenido (que no interacciona con la fase estacionaria) o el tiempo que tarda la fase móvil en atravesar la columna.

c. Volumen de retención (V_R). Dado que el tiempo de elución es una función de la velocidad de la fase móvil un parámetro más importante de la retención es el volumen de retención, V_R . El volumen de retención de una muestra representa el número de mililitros de fase móvil que debe pasar a través de la columna para eluir dicho componente. El volumen de retención es igual a T_R veces la velocidad de flujo de la fase móvil, F (ml/min). En la figura 1 también se muestra el tiempo para la elución de un componente no retenido, T_0 . $T_0 \times F$ es el volumen de elución para un componente no retenido, V_m , el cual es el volumen total de la fase móvil en la columna (volumen muerto).

d. Constante de distribución (K). La ecuación fundamental de la retención para cualquier proceso cromatográfico está dada por:

$$V_R = V_m + KV_s$$

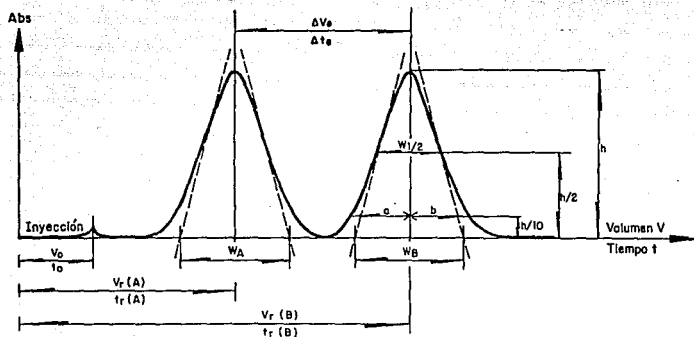


Figura 1. Representación diagramática de una separación por HPLC, mostrando los principales parámetros cromatográficos asociados con la separación. V_0 se conoce como el volumen vacío y es el lugar donde eluye una muestra no retenida. V_A y V_B los volúmenes donde eluyen los componentes A y B respectivamente y son tomadas como el ápice del pico. W es el ancho del pico y se obtiene trazando tangentes a los lados del pico y midiendo el ancho de aquéllas tangentes que intersectan la línea base.

donde K es el coeficiente del equilibrio de distribución (concentración de la muestra en fase estacionaria/concentración de la muestra en la fase móvil), y Vs es el volumen de fase estacionaria (volumen líquido, área de superficie o peso de adsorbente). La constante de distribución es un parámetro característico de cada soluto para un par de fases, móvil y estacionaria dadas.

e. Factor de capacidad (k'). Un parámetro importante de la retención en cromatografía es el factor de capacidad, k', definido como:

$$k' = K \frac{V_s}{V_m} = \frac{\text{Cantidad de soluto en fase estacionaria}}{\text{Cantidad de soluto en la fase móvil}}$$

A diferencia de T_R o V_R el k' es un parámetro independiente de las características geométricas de la columna y de la velocidad de flujo de la fase móvil. El factor de capacidad es también un parámetro característico de cada soluto en un sistema de fases dado. Con respecto a la constante de distribución el factor de capacidad tiene la ventaja de poderse evaluar fácilmente a partir de un cromatograma, por medio de la relación:

$$k' = \frac{V_R - V_M}{V_M} = \frac{T_R - T_0}{T_0}$$

El factor de capacidad es el parámetro más utilizado para expresar la retención de los solutos en los sistemas cromatográficos en columna.

Para aumentar o disminuir la retención de un soluto dado, lo más conveniente es actuar sobre la "fuerza" de la fase móvil. En el caso de fases móviles compuestas por mezclas de disolventes, la fuerza de la fase móvil se cambia modificando las proporciones de estos.

f. Factor de selectividad α .

$$\alpha = \frac{k'_2}{k'_1}$$

Expresa la diferencia en los equilibrios de distribución entre dos solutos, a mayor α mayor separación de los vértices de los picos en el cromatograma. Si $\alpha = 1$ la separación es nula.

Con las columnas de alta eficiencia de la HPLC se logra separar adecuadamente solutos con factores de selectividad tan bajos como 1.05.

El valor del factor de selectividad, puede modificarse mediante el

cambio de la naturaleza de las fases móvil o estacionaria.

g. Eficiencia. La eficiencia expresa el grado de ensanchamiento que sufren las bandas de los solutos al migrar a través de la columna. Este ensanchamiento es provocado por factores tales como: la difusión ordinaria, la resistencia a la transferencia de masa en las fases móvil y estacionaria y la irregularidad del flujo dentro de la columna debido a la multitud de canales de diferentes dimensiones que se forman entre las partículas del empaque. Los estudios teóricos han mostrado que la eficiencia aumenta si:

- Disminuye el diámetro de partícula del empaque de la columna.
- Se optimiza el flujo de fase móvil
- Se utilizan disolventes menos viscosos.

La eficiencia de una columna se mide por el número de platos teóricos que tiene (N). Aunque éste es un concepto teórico, se le puede explicar considerando a la columna dividida imaginariamente en una serie de porciones en cada una de las cuales el equilibrio de distribución del soluto entre las fases se alcanza. Prácticamente el número de platos teóricos de una columna se evalúa a partir del cromatograma obtenido según:

$$N = 5.54 ((Tr) / \sigma)^2$$

donde σ es la anchura del pico a la mitad de su altura.

El número de platos teóricos de una columna aumenta al aumentar la longitud de ésta. Por ello para comparar la eficiencia entre columnas de diferentes dimensiones se utiliza como parámetro la altura del plato teórico (H) dada por:

$$H = \frac{L}{N}$$

donde L es la longitud de la columna.

h. Resolución (R_s). Este parámetro indica el verdadero grado de separación entre dos picos adyacentes puesto que toma en cuenta tanto la separación entre los vértices de los picos como el ancho de estos. La resolución se define por la relación

$$R_s = \frac{Tr_2 - Tr_1}{2\sigma_1 + 2\sigma_2}$$

donde sigma es la desviación estándar del pico. En el caso de picos simétricos y gaussianos se tiene 4σ = anchura a la base.

Un valor de resolución igual a uno significa que solo un 2% del área de los picos está empalmada y para fines prácticos se

considera una separación adecuada.

La resolución también puede expresarse por la siguiente relación:

$$R_s = \frac{1}{4} \cdot \frac{N}{1+k'} \cdot \frac{\alpha-1}{\alpha}$$

Eficiencia Retención Selectividad

Como se observa la resolución depende de 3 factores que pueden optimizarse para mejorar la separación.

2. TECNICAS DE LA HPLC.

La utilidad de la cromatografía de líquidos para lograr una separación dada depende de la selección adecuada de las fases móvil y estacionaria. Dependiendo de la naturaleza de estas fases, el mecanismo responsable de la retención de los solutos será diferente dando origen a las diferentes técnicas de separación:

- a) Adsorción
- b) Reparto
- c) Exclusión
- d) "Distribución" en fases químicamente unidas (normal y reversa)
- e) Cromatografía iónica
 - Intercambio iónico
 - pares de iones.

A continuación se describen brevemente las técnicas relacionadas con la separación de péptidos y compuestos de origen biológico. En un inciso aparte se describe más detalladamente la cromatografía de pares de iones.

a. Cromatografía de Exclusión por Talla.

La cromatografía de retención o exclusión por talla se conoce también como cromatografía por talla, cromatografía de permeación en gel, cromatografía de filtración en gel, etc. Esta técnica fue introducida en 1959 empleando un lecho formado de partículas esféricas de Dextran entrecruzado con epíclorhidrina (Shephadex). De los desarrollos posteriores han resultado los aerogeles de vidrio o sílica porosos, los xerogeles de dextran o poliácridamida entrecruzados, y los aerogeles-xerogeles de agarosa, poliestireno, o polivinilacetato combinados. Se dispone en el comercio de fases estacionarias de diversos diámetros de partícula y con diferentes intervalos de diámetro de poro (11).

El principio de la separación está basado en las diferencias en la talla molecular de los solutos. Las moléculas muy grandes son

excluidas de los poros del empaque y viajan muy rápidamente a través de la columna. Las moléculas de menor talla permean una fracción del volumen poroso dependiendo de su tamaño y por lo tanto son eluidas de la columna en un volumen de retención mayor. Las moléculas muy pequeñas son las más retenidas puesto que permean todo el volumen poroso.

Las principales aplicaciones de la cromatografía de exclusión son: la separación de mezclas donde los solutos son de talla diferente, y la determinación de pesos moleculares (p. ej. en biopolímeros) (22).

b. Cromatografía de intercambio iónico.

La cromatografía de intercambio iónico es una forma de cromatografía de líquidos de adsorción puesto que implica la interacción de solutos iónicos con sitios fijos iónicos que se encuentran en la superficie de la fase estacionaria.

Las fases estacionarias empleadas en este caso son las resinas intercambiadoras de iones constituidas por un copolímero de poliestireno-divinil benceno con grado de entrecruzamiento variable, cuya superficie ha sido modificada insertándole grupos aniónicos (sulfonato, carboxilato, etc...) ó catiónicos (aminas ionizadas, iones amonio cuaternario, etc...). A estos grupos iónicos fijos se encuentran asociados iones de carga opuesta que pueden ser intercambiados (9,29).

El equilibrio responsable de la retención de los solutos en estos sistemas es el siguiente:



(intercambio de cationes)

en donde:

R-X [·]	es una resina aniónica
P [·]	es el catión intercambiable
S [·]	es un soluto catiónico
m	indica que la especie iónica está en fase móvil

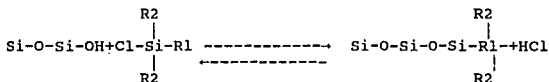
Este equilibrio muestra algunos de los parámetros que intervienen en la retención de los solutos:

- El número de grupos iónicos fijos (capacidad de intercambio de la resina). A mayor capacidad mayor retención.
- La concentración de iones de la misma carga que los solutos, presentes en la fase móvil. A mayor fuerza iónica de la fase móvil, menor retención del soluto.

También intervienen otros parámetros como la temperatura y la composición del eluente (la presencia de un modificador orgánico cambia la solvatación de los iones y por tanto la constante del equilibrio de intercambio). En general se puede decir que entre mayor es la carga y menor el tamaño del soluto solvatado, mayor será la afinidad de éste por la resina y por tanto su retención.

c. Cromatografía en fase reversa químicamente unida (apolar).

Las fases estacionarias utilizadas en esta técnica están constituidas por un soporte de sílice el cual, mediante una reacción química, ha sido modificado para unirle cadenas hidrocarbonadas. La reacción para preparar estas fases es la siguiente:



En el caso de las fases apolares R_1 es generalmente un grupo octilo u octadecilo. R_2 puede ser un grupo Cl o un grupo metilo. Dependiendo de la proporción de los reactivos, del tipo de cloro alquil silano y de las condiciones de la reacción, se pueden obtener fases monoméricas (tipo cepillo) o fases poliméricas (25).

El diámetro de las partículas de sílice para la HPLC es usualmente de 5 a 10 micras.

Las fases móviles están constituidas por mezclas de agua con algún disolvente orgánico, soluble en agua en todas proporciones, como p. ej. Metanol o Acetonitrilo. En ocasiones, se encuentran también disueltos en el eluente sales o buffers (15).

El modelo más apropiado para explicar la retención de los solutos en estos sistemas ha sido el presentado por C.Horváth (19,25) quien adaptó los postulados de la Teoría Solvofóbica, desarrollada por Sinagloqu a la cromatografía sobre fase químicamente unida apolar. Según este modelo, la superficie hidrocarbonada de la molécula del soluto, así como las cadenas hidrocarbonadas de la fase estacionaria, experimentan un efecto de repulsión (hidrofobicidad) hacia el eluente polar, de modo que para disminuir la superficie hidrocarbonada en contacto con la fase móvil se produce una asociación entre el soluto y las cadenas de la fase estacionaria. En otras palabras, la retención no es debida a una atracción entre el soluto y la fase estacionaria sino a la repulsión que ambas partes experimentan hacia el eluente y que las conduce a asociarse.

Con base en lo anterior, resulta que la retención depende principalmente de las siguientes variables:

- Contenido de carbón en la fase estacionaria (concentración y longitud de las cadenas hidrocarbonadas).
- Superficie hidrocarbonada de la molécula del soluto.
- Proporción de agua en la mezcla que constituye la fase móvil.

C. ASPECTOS TEORICOS SOBRE LA CROMATOGRAFIA DE PARES DE IONES.

La cromatografía de pares de iones se empezó a desarrollar hacia mediados de los años 70 buscando plantear un método alternativo al intercambio iónico en resinas para la separación de solutos iónicos o ionizables (19,20).

En su primera fase, la cromatografía de pares de iones estaba estrechamente relacionada con la extracción líquido-líquido de pares de iones, pudiendo adaptarse a aquella los mismos conceptos ya conocidos y desarrollados en ésta. En el sistema cromatográfico, la fase estacionaria estaba constituida por un líquido impregnado sobre un soporte mientras que la fase móvil estaba compuesta por otro líquido inmiscible al primero; es decir que una de las fases era polar, y la otra de baja polaridad. En la fase polar, generalmente agua, se disolvían sales, buffers y un agente formador de pares de iones. Aún cuando se obtuvieron resultados muy satisfactorios en la separación de compuestos iónicos por la técnica descrita, ésta presentaba problemas prácticos debido a la baja estabilidad de las columnas con fase estacionaria impregnada. Es así que, posteriormente, se desarrolló otra forma de cromatografía de pares de iones que utiliza como fase estacionaria a las fases apolares químicamente unidas (21,25).

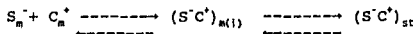
En este segundo sistema, la fase móvil está constituida por mezclas agua-metanol o agua-acetonitrilo en los que se disuelven sales, buffers y particularmente un ión, de carga opuesta a la de los solutos, cuya función es la de actuar como agente formador de pares de iones. Este ión recibe comúnmente el nombre de contraión y puede ser de naturaleza inorgánica (p. ej. iones fosfato o perclorato) o de naturaleza orgánica (iones citrato, alquilsulfonatos, tetraquilamonio, etc...).

La elección del contraión adecuado para una separación dada depende fundamentalmente de las características de los solutos a separar. Cuando estos solutos presentan una alta hidrofobicidad, su retención directa en una fase reversa es muy elevada, por ello en este caso se emplea como contraión un ión inorgánico o un ión orgánico pequeño y muy polar cuya función es formar pares de iones con el soluto en la fase móvil, lo que aumenta la afinidad del soluto hacia el eluyente y disminuye su retención. Mas común es el caso de solutos iónicos poco hidrofóbicos que normalmente no se retienen en una fase reversa. En este caso se requiere utilizar como contraión un ión orgánico voluminoso cuya función es aumentar la retención del soluto (1,7,23,30).

El modo preciso como actúan estos contraiones no ha sido totalmente elucidado, aunque se han propuesto una gran variedad de modelos (8,17,24,25) para explicarlo. Básicamente estos modelos se pueden clasificar dentro de los tipos siguientes:

1. MECANISMO DE PARES DE IONES

En este modelo se supone que la relación de los solutos está basada en el equilibrio:

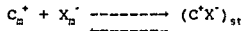


donde S^- es un soluto aniónico y C^+ es un contraión cationico.

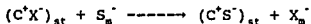
Estas especies forman en la fase móvil (m) o en la interfase (i) un par de iones que por tener una carga neta nula y una superficie hidrocarbonada importante (proporcionada principalmente por el contraión voluminoso), se puede adsorber por efecto hidrofóbico sobre la fase estacionaria apolar.

2. MECANISMO DE INTERCAMBIO IONICO DINAMICO

En este caso se supone que, previamente a la inyección del soluto, el contraión voluminoso presente en la fase móvil se adsorbe por un efecto hidrofóbico sobre la fase estacionaria, asociado a cualquier ión de carga opuesta presente en el medio (iones provenientes de las sales o buffers adicionados):



X_m^- es un anión cualquiera presente en fase móvil. En un segundo paso, la fase estacionaria ya convertida en un intercambiador de iones dinámico puede retener a solutos iónicos según el equilibrio:



3. MECANISMOS MIXTOS.

Debido a que ninguno de los mecanismos anteriores permitía explicar todos los fenómenos observados en estos sistemas, se han propuesto una gran diversidad de mecanismos que representan diversas combinaciones de los dos anteriores.

Cualquiera que sea el mecanismo exacto responsable de la retención de los solutos en estos sistemas, experimentalmente se ha comprobado que ésta depende de los mismos factores que afectan la retención en la cromatografía sobre fase químicamente unida apolar pero además intervienen notablemente los parámetros siguientes:

- Concentración de sales en fase móvil
- tipo de sales disueltas en fase móvil
- pH de la fase móvil
- concentración de contraión en fase móvil
- superficie hidrocarbonada del contraión
- temperatura del sistema.

Aunque la intervención de esta gran cantidad de variables en el proceso de retención de los solutos complica la comprensión cabal de la técnica descrita, desde un punto de vista práctico también le proporciona una gran versatilidad y selectividad lo que permite optimizar separaciones de una gran variedad de solutos iónicos o ionizables.

D. SEPARACION DE PEPTIDOS POR CROMATOGRAFIA DE ALTA RESOLUCION MEDIANTE LA FORMACION DE PARES DE IONES.

La gran variedad de péptidos de interés bioquímico cubre una gama muy amplia de polaridades, lo que hace impráctico el uso de un conjunto único de condiciones en la fase móvil para su elución en soportes de cromatografía de alta resolución sobre fases estacionarias apolares (RP-HPLC). Por otra parte, algunas separaciones de péptidos por HPLC en este tipo de fases estacionarias se caracterizan por una mala resolución a causa del ensanchamiento y la asimetría de los picos por equilibrios iónicos complejos que son característicos de los compuestos anfotéricos (12). La adición de casi cualquier sal a la fase móvil mejora el perfil cromatográfico de un péptido en fases estacionarias apolares de sílice modificada, debido al bloqueo de las interacciones entre los solutos y los grupos silanol del soporte. Varias de estas sales adicionadas a la fase móvil, sin embargo, provocan diferencias significativas en la forma de los picos y los tiempos de retención de los solutos de una muestra dada (12,26).

Al adicionar ácido fóstórico (17) en el eluyente se obtienen buenos resultados en el análisis de un número considerable de péptidos, permitiendo además una alta sensibilidad de detección por absorbancia en el rango de 200 a 220 nm. Asimismo, existen reportes

de separaciones de péptidos utilizando fases móviles que contienen sales de fosfatos. La resolución que se obtiene al emplear ácido fosfórico solo ó en combinación con fosfatos en el análisis de péptidos producidos por síntesis química tanto en solución como en fase sólida permite evidenciar la presencia de productos de deleción.

La combinación de un anión polar y pequeño como $H_2PO_4^-$ con los grupos catiónicos de un péptido ($R-NH_3^+$) permite hacer más rápido el análisis de solutos relativamente hidrofóbicos, ya que la consecuente disminución de la hidrofobicidad del par iónico formado provoca la disminución de su retención en la fase estacionaria apolar. En contraste, muchos péptidos relativamente polares no se retienen adecuadamente en columnas de C18 en presencia de fosfatos en la fase móvil, como es el caso del factor regulador de la tirotropina (TRH), y las angiotensinas, así como diversos péptidos hidrofílicos básicos. Recientemente se han estudiado las propiedades cromatográficas de diversos péptidos sobre fases estacionarias alquilo (μ -Bondapack) en presencia de aniones hidrofóbicos formadores de pares de iones para incrementar la retención de péptidos polares. Mediante la adición de un alquil sulfato de sodio apropiado se ha logrado separar un número considerable de péptidos polares (25).

El ácido acético, como aditivo en la fase móvil sobre todo en disoluciones diluidas, da lugar a picos anchos con tiempos de retención considerables y en general no es adecuado para el análisis de péptidos debido a que limita severamente la sensibilidad de detección por absorbancia a bajas longitudes de onda (12,32). El TFA, en cambio, da tan buenos resultados como los que se obtienen con el ácido fosfórico con la única desventaja de que la mayor acidez de las fases móviles con TFA limita la vida de las columnas (23). Sin embargo, muchos péptidos no se retienen lo suficiente para obtener buenas separaciones en columnas apolares con TFA, en la fase móvil, aún en ausencia del modificador orgánico. Otros ácidos perfluoroalcanóicos (14,18) pueden usarse de manera similar a los alquil sulfonatos para la separación de péptidos, obteniéndose picos estrechos y relativamente simétricos.

Son varias las interacciones posibles entre un aditivo iónico en la fase móvil y los componentes de la muestra y/o la fase estacionaria. Las aminas son particularmente efectivas para cancelar la interacción entre los solutos y los grupos silanol de la fase estacionaria. A ello se debe el éxito del fosfato de trietilamonio como aditivo para la separación de péptidos y proteínas. Las alquilaminas de cadena larga probablemente interaccionan con la fase estacionaria apolar formando un recubrimiento dinámico (7). Esta modificación de la fase estacionaria generada por el eluyente provoca interacciones iónicas entre los péptidos y la fase estacionaria. Este efecto que parece ser el mecanismo predominante en el caso de detergentes aniónicos como dodecilsulfato de sodio, posiblemente ocurre también con

detergentes catiónicos como acetato de dodecilamonio. Es posible que los iones tetrametil y tetraetilamonio actúen principalmente formando pares de iones en la fase móvil mientras que el ión tetrabutilamonio prácticamente no forma pares de iones con los solutos por el efecto estérico del catión, sino que actúa recubriendo la superficie de la fase estacionaria, dándole un carácter iónico.

E. ASPECTOS FISIOLÓGICOS Y BIOQUÍMICOS DE LA HORMONA LIBERADORA DE LA TIROTROPINA.

La hormona liberadora de Tirotrópina (conocida por sus siglas TRH del nombre en inglés Thyrotropin-Releasing Hormone) es un tri péptido con ambas terminales bloqueadas, de secuencia pGlu-His-Pro-NH₂, y fue aislado inicialmente de homogenados de hipotálamo de ovino y porcino. Posteriormente, se encontró fuera del hipotálamo, así como de los confines del sistema nervioso central (6). A nivel de la adenohipófisis el TRH estimula la secreción de la tirotrópina, prolactina, y la hormona del crecimiento. Recientemente, se le han atribuido algunas funciones neurológicas a ésta hormona y sus metabolitos, sugiriendo un papel de neurotransmisor ó neuromodulador para la molécula, además de su actividad adenohipofiseal (5,21,31).

1. Distribución del TRH.

A partir del conocimiento de la estructura del TRH fue posible desarrollar anticuerpos específicos que han permitido medir los niveles de TRH presentes tanto en núcleos hipotalámicos como en áreas extrahipotalámicas por medio de la técnica de radioinmunoensayo (RIA). La cuantificación por RIA ha demostrado que la concentración más elevada de TRH se encuentra en el hipotálamo, pero se presentan también concentraciones apreciables en otras áreas del cerebro tales como el cerebro anterior, el tallo cerebral, y el diencefalo posterior. El TRH hipotalámico representa el 31 % del TRH total medido en el cerebro; la médula espinal y el diencefalo posterior poseen concentraciones intermedias y en el cerebelo solo representa el 2% del total en el cerebro (21,31,34).

2. Estudios farmacológicos.

El TRH administrado cisternalmente en dosis muy pequeñas produce taquicardia y eleva la presión sanguínea. Administrado intravenosamente inhibe la secreción de las enzimas gástrica y pancreática. El TRH mejora la recuperación neurológica después del trauma espinal (34). Son necesarios más estudios para establecer qué tanto reflejan estos efectos farmacológicos, los efectos fisiológicos del TRH.

F. TRABAJOS PREVIOS SOBRE LA SEPARACION CROMATOGRAFICA DEL TRH.

Los métodos empleados para analizar el TRH extrahipotalámico comprenden diversas técnicas cromatográficas, sin embargo, debido a los bajos niveles de TRH, no ha sido posible su caracterización química, excepto en el caso de la piel de rana (21). Las técnicas cromatográficas más usadas son la filtración en gel, la cromatografía de intercambio iónico, y la HPLC fase reversa. Esta última ha probado ser la más conveniente debido a su elevado poder de resolución y buena reproducibilidad (2,32,34). La filtración en gel sobre Sephadex o columnas de Bio-Gel no es satisfactoria como herramienta analítica ya que en estos casos, el TRH coeluye con LRH y somatostatina moléculas de talla mayor que el TRH. La cromatografía de intercambio iónico (intercambio catiónico) posee un elevado poder de resolución para la separación de TRH y sus metabolitos. La resina SP-Sephadex C-25 da una resolución igual ó mejor, que la fase reversa para TRH, sin embargo se ha reportado que la reproducibilidad en las separaciones es deficiente (34).

A pesar de que una gran variedad de sistemas cromatográficos de HPLC para el análisis de TRH extrahipotalámico ya se han publicado (21,30,32) ningún estudio se ha realizado para establecer si alguno de ellos es superior a los otros. La razón principal probablemente sea la falta de conocimiento del material contaminante en las muestras de TRH extrahipotalámico.

Una característica común de los sistemas de HPLC para TRH extrahipotalámico es la baja eficiencia mostrada por estos sistemas, comparada con separaciones de otras moléculas de talla similar como los aminoácidos. El sistema de pares de iones de Spindel y Wurtman (30,32) es probablemente el más satisfactorio en este aspecto, obteniéndose un número de platos teóricos de 2500 (columna Bondapak C-18 3.9 X 300 mm) para TRH en extractos de rata. Por comparación, con la misma columna se obtienen comúnmente 10 000 platos teóricos para derivados dansilo de aminoácidos. La razón de la baja eficiencia no se conoce, aunque se supone que puede deberse a interacciones de los grupos básicos (grupos amino) de la molécula del soluto con silanoles residuales en la superficie de la fase estacionaria (sílice modificada con grupos alquilo). Por otra parte, se ha mostrado que no existen diferencias significativas en la eficiencia obtenida con diferentes tipos de empaques de fase reversa utilizados para el análisis de TRH. Estas observaciones indican que puede haber otros factores responsables de la eficiencia de los sistemas de RP-HPLC para este tipo de solutos. Cabe anotar que la columna de intercambio catiónico empleada por Jackson y Kleichlen (34), parece dar una eficiencia similar a la obtenida con las columnas de fase reversa utilizadas por los demás.

La HPLC-RP y la cromatografía de intercambio catiónico han probado ser técnicas adecuadas para la separación de TRH extrahipotalámico. Sin embargo, es posible mejorar la eficiencia de la separación usando por ejemplo los agentes formadores de pares de iones

sugeridos por Spindel y Wurtman (30,32). La desventaja del uso de los ácidos sulfónicos en la fase móvil, en el caso de separaciones con fines micro ó semipreparativos es que no son volátiles, por lo que se requiere el desalado posterior del TRH mediante un paso cromatográfico adicional. Además Spindel y Wurtman han reportado que el ácido sulfónico interfiere con el RIA de TRH. Recientemente se ha encontrado que con un sistema completamente volátil consistente de un gradiente lineal, 0.5% /min de 2-propanol, desde 0.5% de ácido trifluoroacético (TFA) en agua con una velocidad de flujo de 1 ml/min se obtiene una eficiencia comparable a los sistemas de ácido sulfónico. En este sistema el TRH, eluye a los 11 - 13 min (34).

Otro problema que se presenta en el aislamiento de pequeñas cantidades de TRH de tejido extrahipotalámico es el de la detección. El TRH extrahipotalámico siempre ha sido detectado por RIA, pero el trabajo de purificación requiere un método menos específico de detección. Dado que el amino terminal del TRH está bloqueado, una detección altamente sensible por derivatización post-columna con fluorescamina ó o-ftaldialdehído (34) no es posible. La absorbancia a 210 nm es una posibilidad para la detección, pero es problemática, debido a que el material contaminante interfiere severamente cuando se trabaja a una sensibilidad elevada. Una posibilidad podría ser la derivatización pre-columna con cloruro de dansilo del material a ser inyectado a la columna de HPLC, ya que la presencia del imidazol de la histidina en TRH lo hace reactivo al cloruro de dansilo. La molécula nativa puede recuperarse rápidamente del derivado dansilo por tratamiento con ácido. La detección fluorescente de los derivados dansilo de péptidos en efluentes de HPLC es casi insensible a la interferencia por impurezas en los disolventes.

G. CARACTERISTICAS DE LOS COMPUESTOS A SEPARAR EN ESTE TRABAJO.

La hormona liberadora de la tirotrópina o TRH es un péptido relativamente polar de peso molecular bajo constituido por tres aminoácidos (tripéptido), cuyo aminoácido N-terminal es el ácido piroglutámico (fig.2) en el que el nitrógeno del grupo α -amino no es ionizable debido a que forma parte de la estructura cíclica de éste aminoácido. En cuanto a la función α -carboxilo de éste péptido tampoco es ionizable ya que se encuentra en forma de amida en el aminoácido C-terminal prolinamida. Esto quiere decir que el comportamiento ácido-base del TRH está dado por el grupo R del otro aminoácido que integra este neuropéptido, la histidina. Un análisis similar se puede hacer de los metabolitos de TRH tomando en cuenta que en el TRH ácido (TRHOH), el carboxilo terminal se encuentra libre (deamidado) por lo que es ionizable a pH 2. La histidil-prolinamida (His-ProNH₂) difiere de TRH por la pérdida del ácido piroglutámico con la consecuente liberación del grupo α -amino terminal que es ionizable a pH 9, en tanto que la histidil-prolina (His-Pro) guarda una relación con la histidil-prolinamida similar

a la existente entre TRH y TRHOH.

La Hisprodicetopiperazina, que resulta de la unión covalente entre la α -amina terminal (originalmente libre) de la histidilprolinamida y el α -carboxilo terminal (originalmente amidado) constituye una molécula poco polar con un solo grupo ionizable (histidina) a pH 6.

El resto de los metabolitos lo constituyen los aminoácidos libres prolina, prolinamida e histidina. La prolina es un aminoácido cuyo extremo α -amino esta substituído y que posee un grupo R no polar (hidrocarburo alifático). La prolinamida tiene ambos extremos α -amino y α -carboxilo substituídos y la histidina que contiene el grupo imidazolio (grupo R), es débilmente básica.

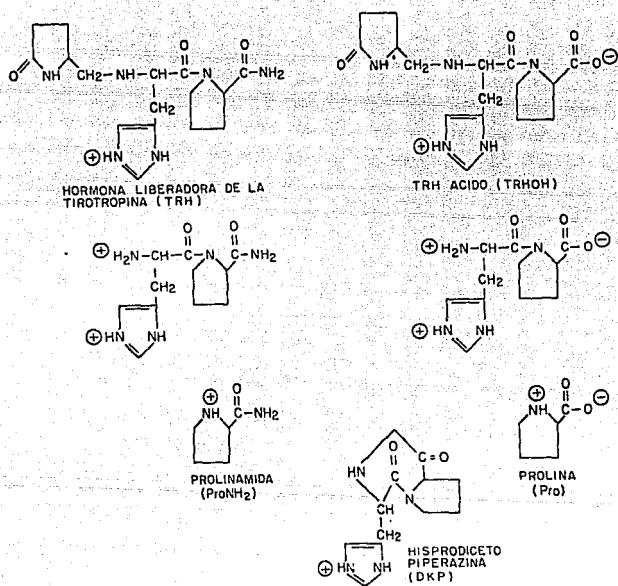


Figura 2.- Estructura química de la Hormona Liberadora de la Tirotrópina (TRH) y sus metabolitos.

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

Como apoyo a una investigación sobre la bioquímica celular de la hormona peptidérgica, se propuso el desarrollo de un método cromatográfico para identificar y cuantificar moléculas neuroactivas de naturaleza polipeptídica. Para este fin, se escogió la cromatografía de alta resolución, utilizando la técnica de pares de iones, por la buena resolución y reproducibilidad que se obtiene en la separación de estas moléculas.

Como solutos modelo se escogieron la hormona liberadora de la tirotrópina (TRH) y algunos de sus metabolitos que, por su naturaleza relativamente polar, requieren de un contraión hidrofóbico para retenerse de manera apreciable en la fase estacionaria.

Con el fin de darle un carácter más general al trabajo realizado, se propuso estudiar la validez del modelo de retención por intercambio iónico dinámico en la cromatografía de pares de iones de péptidos. Esto, además de constituir una contribución al estudio de los mecanismos de retención propios de la cromatografía de pares de iones, ofrece la posibilidad de aplicar una metodología desarrollada mediante el estudio de moléculas simples, a moléculas relativamente complejas (péptidos) que, por otra parte, son de gran relevancia en diversas áreas de la investigación.

En este sentido, los solutos seleccionados como modelo para este estudio, por lo simple de su estructura química y por la variedad de sus funciones ionizables, son en principio ideales para poder hacer el análisis de los resultados en términos de las propiedades moleculares de los solutos.

III. OBJETIVOS

1. Objetivo general

Establecer un método de separación para la hormona liberadora de la Tirotropina y sus metabolitos que apoye las investigaciones sobre la bioquímica de este neuropéptido.

2. Objetivo específico

Realizar un estudio elemental sobre la retención de péptidos en cromatografía de líquidos de alta eficiencia con formación de pares de iones.

IV. HIPOTESIS.

Los compuestos a estudiar presentan, además de similitud en su estructura, la característica de ser poco hidrofóbicos por lo que su retención en una fase estacionaria apolar es muy baja. Sin embargo, ésta característica se puede contrarrestar aplicando los principios de la cromatografía de pares de iones al utilizar como contraión un alquilsulfato o alquilsulfonato de cadena larga, que al presentar una fuerte hidrofobicidad permitirá una retención adecuada de estos compuestos.

Por otro lado, el problema de su separación puede enfocarse a través de cambios en algunos parámetros de composición del eluente. En particular se sabe que los cambios en el pH de la fase móvil, alrededor de los valores cercanos al pK_a de los compuestos provocan variaciones de selectividad muy notorias. Otros parámetros que pueden ajustarse para lograr la mejor separación posible en un tiempo razonable son:

- el tipo y concentración de sales disueltas en la fase móvil y en especial los iones de la misma carga que los solutos (coiones).
- la proporción de modificador orgánico en el eluente
- la concentración del contraión en la fase móvil.

Debido a que los compuestos a estudiar se encuentran en muy bajas concentraciones en los sistemas biológicos, una parte de este desarrollo estará enfocada a la optimización en la detección. Considerando que el espectrofotómetro UV-Visible de longitud de onda variable es uno de los detectores más comunes en HPLC y que la absorbancia para cualquier compuesto, varía notablemente al cambiar la longitud de la luz incidente, nos proponemos variar este parámetro para encontrar las condiciones de máxima sensibilidad.

V. METODOLOGIA

A. METODO GENERAL

1. EQUIPO

Cromatógrafo de líquidos de alta presión	Waters, Asoc.
Módulo de compresión radial RCM100	Waters, Asoc.
Cartuchos de compresión Resolve C18	Waters, Asoc.
Medidor de pH	Beckman
Balanza analítica	Mettler
Balanza semianalítica	Ohaus

2. MATERIAL

Matraces volumétricos	microjeringas
probetas	tubos para microcentrífuga
pipetas graduadas	gradilla
pipetas pasteur	espátula
matraces erlenmeyer	
vasos de precipitados	
pizetas	
barras magnéticas	

3. REACTIVOS

Acetonitrilo grado HPLC	Merck
Agua grado Milli Q	Millipore
Acido fosfórico r.a.	Baker
Carbonato de litio r.a.	Baker
Dodecil sulfato de sodio r.a. (SDS)	BioRad
Fosfato potasio monobásico r.a.	Baker
Fosfato sodio monobásico	Baker
Piroglutamil-Histidil-prolinamida (TRH)	Sigma
Piroglutamil-Histidil-prolina (TRHOH)	Lab.Peninsula
Histidil-prolina-Dicetopiperazina (DKP)	Lab.Peninsula
Prolina (Pro)	Sigma
Prolinamida (ProNH ₂)	Sigma

4. DISOLUCIONES STOCK

Disolución acuosa de SDS al 10%	
Disolución acuosa de Ac. fosfórico al 10%	
Disolución de TRH en ac. acético al 0.01%	1 mg/ml
Disolución de TRH en ac. acético 0.01%	1 mg/ml
Disolución de DKP ácido en acido acético 0.01%	1 mg/ml
Disolución acuosa de Prolina en ácido acético al 0.01%	10 mg/ml
Disolución acuosa de Prolinamida en ácido acético al 0.01%	10 mg/ml

Todas las disoluciones de péptidos y aminoácidos fueron almacenadas a -20°C.

5. METODO

a. Preparación del equipo y parámetro de operación

El cromatógrafo consiste de un controlador de gradiente automático modelo 680 equipado con dos bombas modelos 45 y 590, un inyector modelo U6K, un detector de UV de longitud de onda variable modelo 481 y un registrador Houston Omniscribe. Las separaciones se llevaron a cabo sobre cartuchos de compresión radial Resolve C18. Todos los estudios experimentales se llevaron a cabo a temperatura ambiente. El agua empleada en la preparación de fases móviles fue grado HPLC (obtenida de sistemas Milli-Q). En todos los casos el pH del eluyente se ajustó con una disolución de ácido fosfórico al 10%. Las fases móviles fueron degasificadas por burbujeo de helio antes de usarse. Las muestras se prepararon disolviendo alícuotas de los stocks de péptidos y aminoácidos en la fase móvil. Las cantidades de muestra inyectada (5 microlitros) variaron entre 0.125 y 0.250 g.

La elución se llevo a cabo en el modo isocrático a una velocidad de flujo de 1.3 ml/min y una velocidad de carta de 0.5 cm/min. La detección se hizo a 215 nm.

b. Lavado de la columna

Antes de cada experimento se hizo pasar a través de la columna 30 ml de una solución acuosa de acetonitrilo al 50% v/v (disolución A).

c. Preparación de la fase móvil (disolución B).

Para cada experimento se pasó la cantidad de sal requerida para tener la concentración de coión deseada en 500 ml de eluyente. Aparte, en un matríz aforado de 500 ml se adicionó la cantidad de acetonitrilo requerida en peso (p/v), el volumen de la disolución stock de SDS necesario para alcanzar la concentración de contraión deseada y la sal de coión pesada, anteriormente. Se aforó con agua.

d. Procedimiento.

Una vez lavada la columna con la disolución A, se procedió a equilibrarla con la fase móvil. En efecto, se sabe que el contraión presente en la fase móvil se adsorbe sobre las cadenas hidrocarbonadas de la fase estacionaria debido a su hidrofobicidad. La cantidad de contraión adsorbido y por lo tanto, el volumen de fase móvil requerido para el equilibrio, depende de la composición misma del eluyente y en particular de la fracción volúmica de acetonitrilo, la concentración del propio contraión y el número de átomos de carbono (hidrofobicidad) en su molécula. Para estimar aproximadamente éste volumen se utilizan las siguientes ecuaciones reportadas en la literatura (35):

$$\log[C']_{st} = -0.25 - 0.66[CH_3CN] + 0.06 Nc + 0.72 \log[C']_m + 1.68[CH_3CN](\log[C']_m) - 0.05(Nc)(\log[C']_m)$$

$$\text{vol. eq.} = \frac{\text{gr. empaque} \times [C]_{st}}{[C]_m} + V_m$$

donde:

- [C]_{st} = concentración de contraión en fase estacionaria (mmol/g)
- [C]_m = concentración de contraión en fase móvil (mmol/ml)
- [CH₃CN] = fracción volúmica de acetonitrilo
- N_c = átomos de carbono en la molécula del contraión
- vol. eq. = volumen de fase móvil que debe pasar por la columna para equilibrarla (ml)
- V_m = volumen muerto (ml)

En las columnas utilizadas el peso de fase estacionaria es de 4g. Esta ecuación fue deducida para una columna empacada con fase Lichrosorb RP8, por ello en nuestro caso el volumen obtenido por los cálculos es aproximado. Para asegurar el estado de equilibrio se hizo pasar por la columna un volúmen de fase móvil ligeramente superior y se inyectaron varias veces los solutos para comprobar la reproducibilidad en el tiempo de retención.

En las tablas 1 y 2 se resumen los cálculos del volúmen requerido de fase móvil para equilibrar la fase estacionaria bajo las condiciones de fracción volúmica de acetonitrilo y concentración de SDS utilizadas.

B. DISEÑO EXPERIMENTAL

Una vez determinadas las características de los compuestos a separar y establecidos el tipo de columna (fase estacionaria) y técnica cromatográfica más convenientes, el diseño del método comprende el establecimiento de los parámetros de la fase móvil que permitan la mejor resolución de los componentes.

1. Contenido de modificador orgánico en la fase móvil

Este es uno de los parámetros más importantes de la fase móvil y el estudio de su influencia en la retención de los solutos, permitirá a su vez, junto con el contraión fijar las condiciones de equilibrio del sistema, lo que garantizará el desarrollo experimental en condiciones reproducibles.

La realización de esta primera parte de acuerdo al diseño, se basa en la evaluación del efecto del modificador orgánico sobre la retención. Esto requiere de la elaboración de fases móviles que contienen diferentes porcentajes de modificador orgánico con las

cuales se llevará a cabo la elución de los componentes. Para lo cual es necesario el uso del equipo ya señalado así como de material de vidrio, balanza granataria, balanza analítica y operador.

a. Objetivo

Lograr la separación de los solutos problema variando el contenido de modificador orgánico en la fase móvil y determinar la influencia de éste parámetro sobre su retención.

b. Criterio de aceptación.

Un buen sistema de separación (fase móvil y estacionaria) es aquél que permite resolver todos los componentes de una muestra en un tiempo razonable. La manera de evaluar la contribución de cada componente de la fase móvil a la separación se llevará a cabo a través de los factores de capacidad determinados para cada soluto en cada cambio de variable.

2. Concentración de contraión.

Una vez que se ha determinado el contenido de modificador orgánico en la fase móvil que permita resolver adecuadamente todos los componentes de la muestra, manteniendo las demás variables fijas, se procederá a optimizar la separación, variando éstas dentro de los límites en que ya se ha probado su efecto sobre la retención.

a. Objetivo

Encontrar otra condición experimental que permita definir la concentración de contraión más adecuada en la fase móvil para lograr la separación de los solutos.

b. Criterio de aceptación.

Para evaluar el efecto de esta variable es necesario tomar en cuenta la separación de todos los analitos y el tiempo requerido para conseguirlo.

3. Tipo y concentración de coión.

La sal presente en la fase móvil es otro parámetro importante, ya que su efecto en la retención de los solutos va a depender tanto del tipo de coión, como de su concentración.

a) Objetivo

Determinar otra variable experimental que mejore el patrón de separación obtenido hasta este paso.

b) Criterio de aceptación.

El criterio de aceptación es el mismo que en el caso anterior.

4. Efecto del pH

Por las características estructurales de los solutos (todos son ionizables) el efecto del pH sobre su retención es muy importante. Basándose en esto la variación en el pH de la fase móvil comprende valores cercanos a los pKa de los compuestos.

a. Objetivo

Fijar el valor de pH adecuado para asegurar la interacción de los solutos con el contraión y de esta manera optimizar su separación.

b. Criterio de aceptación.

El criterio de aceptación estará dado por la mejor resolución y el menor tiempo de corrida.

5. Determinación de la longitud de onda de máxima sensibilidad y la cantidad mínima detectable de TRH.

a. Objetivo

Una vez que se ha logrado separar la hormona liberadora de la Tirotrópina (TRH) es necesario encontrar las condiciones de detección adecuadas, que permitan la aplicación del método en la cuantificación de este péptido en sistemas biológicos. Para lograr esto se llevará a cabo la detección de la Hormona Liberadora de la Tirotrópina y sus metabolitos bajo distintas longitudes de onda y una vez elegida la más adecuada se procederá a determinar la mínima cantidad detectable en esas condiciones.

b. Criterio de aceptación

Se seleccionará la longitud de onda que permita detectar la mínima cantidad de soluto posible.

VI. RESULTADOS

A. Contenido de acetonitrilo.

El efecto de esta variable se estudió con la siguientes fases móviles:

acetonitrilo	: 23, 24, 25 y 26% (p/v)
contraión	: dodecil sulfato
conc. contraión	: 0.15% conc.
sal disuelta	: LiH_2PO_4 (coión Li^+)
conc. sal	: 15 mM
pH	: 2.15

Los cromatogramas obtenidos para las diferentes concentraciones de acetonitrilo se muestran en la figura 3. El orden de elución de los analitos en este sistema es el siguiente: Prolina < TRH ácido < TRH < Prolinamida < Diketopiperazina y éste se mantiene en todos los experimentos realizados. Como se puede apreciar, con las cuatro concentraciones de acetonitrilo probadas se consigue la resolución de todos los analitos, sin embargo a medida que se incrementa la concentración del modificador orgánico en la fase móvil se observa una disminución en la retención de los solutos y esto se refleja de manera más importante en la separación de TRH y TRH ácido. De tal forma que con una concentración de acetonitrilo de 24 % se consigue la mejor separación entre éstos péptidos. En la gráfica 1 se presenta el efecto que sobre la retención y la selectividad tiene éste parámetro. Como puede observarse los factores de capacidad disminuyen en forma aproximadamente exponencial al aumentar el contenido de acetonitrilo y este comportamiento es común a todos los solutos. Por otra parte, la selectividad (representada por la distancia entre curvas adyacentes) aumenta ligeramente al disminuir la concentración de acetonitrilo.

B. Concentración del contraión.

Las fases móviles empleadas en este caso se muestra a continuación:

acetonitrilo	: 24%
contraión	: dodecil sulfato
conc. Contraión	: 0.05, 0.1, 0.15 y 0.20% (p/v)
sal disuelta	: LiH_2PO_4 (coión Li^+)
Conc. sal	: 15 mM
pH	: 2.15

En la figura 4 se muestran los cromatogramas obtenidos para las diferentes concentraciones de contraión. Nuevamente podemos observar que en todas las concentraciones de contraión usadas se consigue resolver ó separar a todos los analitos. En este caso cuando se incrementa la concentración del contraión en la fase móvil aumenta la separación entre los picos, especialmente al pasar de una concentración de contraión de 0.05 % a 0.1 % el efecto es drástico para TRH y TRH ácido. Concentraciones mayores de

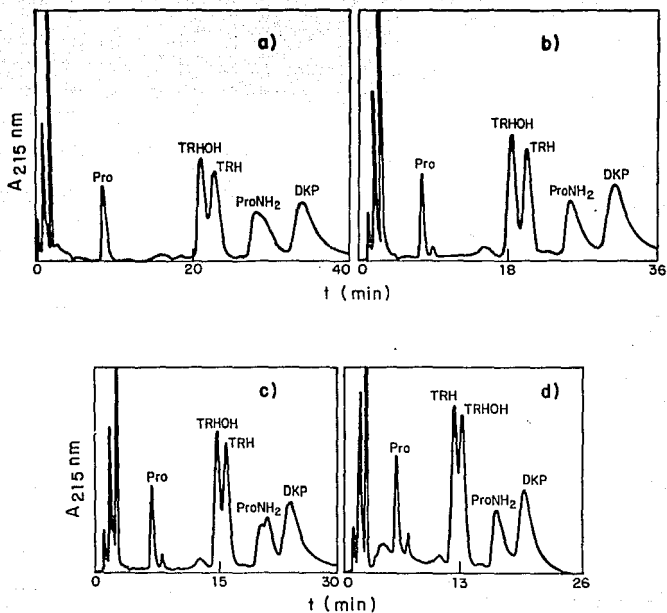
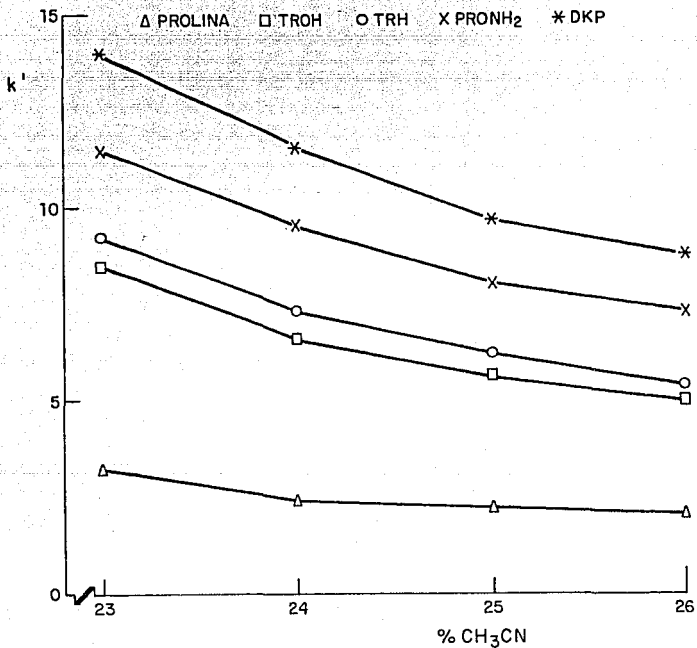


Figura 3. Separación de la Hormona Liberadora de la Tirotrópica (TRH) y sus metabolitos: Pro = Prolina, TRHOH = TRH ácido, ProNH₂ = Prolinamida, DKP = Dicetopiperazina. La elución se llevó a cabo en el modo isocrático a una velocidad de flujo de 1.3 ml/min, sobre una columna Resolve C₁₈. Condiciones de elución: contenido de acetonitrilo en la fase móvil a) 23%, b) 24%, c) 25% y d) 26%.

15mM LiH_2PO_4
pH 2.15
0.15% SDS



Gráfica 1.- Efecto de la concentración del modificador orgánico sobre la retención de la Hormona Liberadora de la Tirotropina (TRH) y sus metabolitos.

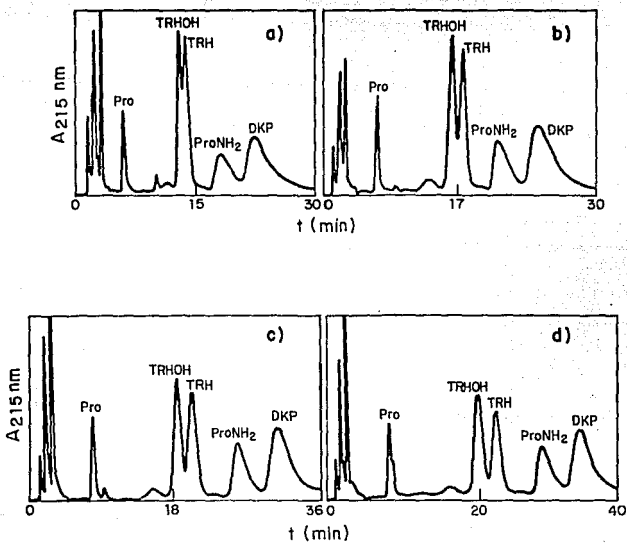


Figura 4. Separación de la Hormona Liberadora de la Tirotrópina (TRH) y sus metabolitos: Pro = Prolina, TRHOH = TRH ácido, Pro NH₂ = Prolinamida y DKP = Dicotopiperazina. La elución se llevó a cabo en el modo isocrático a una velocidad de flujo de 1.3 ml/min, sobre una columna Resolve C₁₈. Condiciones de elución: concentración de contraión (dodecil sulfato) en la fase móvil a) 0.05%, b) 0.1%, c) 0.15% y d) 0.2%.

contraíón ya no mejoran la separaci3n, sin embargo con 0.15 % de SDS se tiene un equilibrio entre resoluci3n y tiempo de an3lisis. Los efectos que sobre la retenci3n y la selectividad tiene este par3metro se muestran en la gr3fica 2. Como puede observarse, los factores de capacidad tienden a aumentar de manera lineal al aumentar la concentraci3n de contraíón hasta llegar a un cierto l3mite, a partir del cual la curva se aplatana (curva de tipo hiperb3lica) para todos los solutos. En cuanto a la selectividad, 3sta aumenta ligeramente al aumentar la concentraci3n de contraíón.

C. Tipo de coíón.

Las fases m3viles empleadas fueron las siguientes:

acetoniitrilo	: 24% (p/v)
contraíón	: dodecil sulfato
conc. contraíón	: 0.15% (p/v)
sal disuelta	: LiH_2PO_4 , KH_2PO_4 y NaH_2PO_4
Conc. sal	: 15 mM
pH	: 2.15

Los cromatogramas obtenidos para los diferentes tipos de coíón se observan en las figuras 5,6 y 7. Pr3cticamente, con los tres coiones estudiados (Na^+ , K^+ y Li^+) se alcanza la separaci3n de todos los analitos, excepto en el caso del K^+ a pH 2.15. La retenci3n de los solutos var3a notablemente al cambiar el coíón en la fase m3vil; la retenci3n sigue el orden: con Li^+ > con Na^+ > con K^+ . Este comportamiento se presenta en los tres valores de pH (2.15, 2.50 y 2.85) y es m3s notable para los solutos m3s retenidos. La observaci3n m3s interesante en estas figuras es el notable efecto que tiene el i3n K^+ sobre la simetr3a y anchura de los picos correspondientes a los solutos m3s retenidos, prolinamida y DKP.

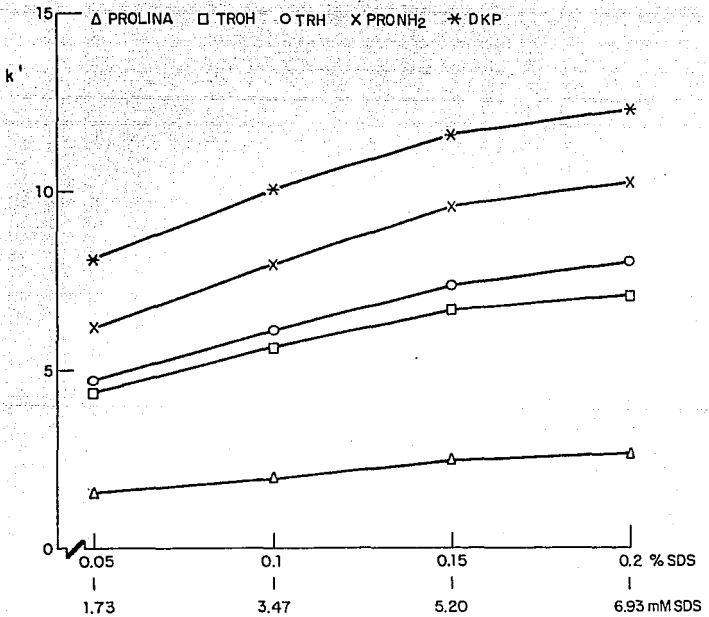
D. Concentraci3n de coíón

En el estudio de esta variable se emplearon las siguientes fases m3viles:

acetoniitrilo	: 24%
contraíón	: dodecil sulfato
conc. Contraíón	: 0.15% (p/v)
sal disuelta	: LiH_2PO_4 (coíón Li^+)
conc. sal	: 5,10 y 15 mM
pH	: 2.15

Los cromatogramas resultantes de las diferentes concentraciones de sal se muestran en la figura 8. Se puede apreciar que la separaci3n entre los picos as3 como los tiempos de retenci3n disminuyen al aumentar la concentraci3n de coíón en la fase m3vil, por lo que la mejor separaci3n entre TRH y TRH 3cido fue posible a una concentraci3n de sal de 5 mM. Sin embargo a este valor corresponde

15mM LiH_2PO_4
pH 2.15
24% CH_3CN



Gráfica 2.- Efecto de la concentración del contraíón en la fase móvil, sobre la retención de la Hormona Liberadora de la Tirotopina y sus metabolitos.

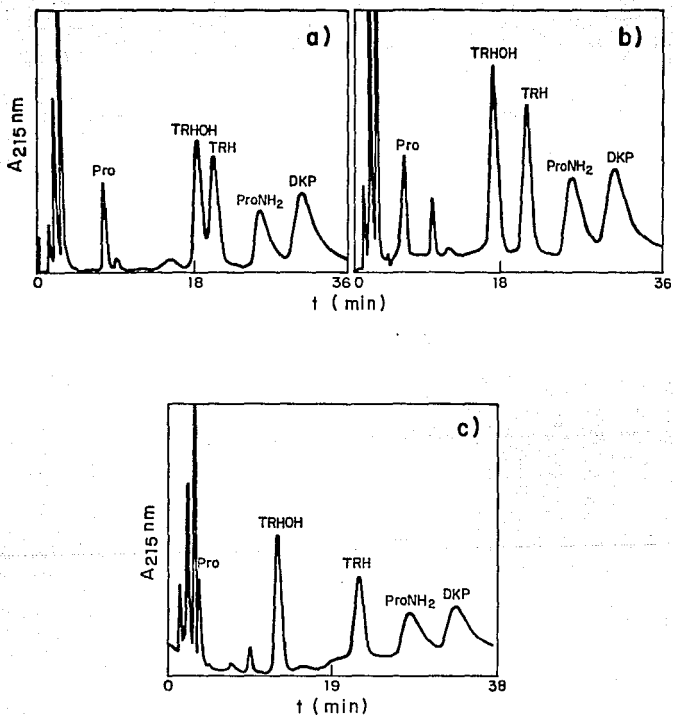


Figura 5. Separación de la Hormona Liberadora de la Tirotrópina (TRH) y sus metabolitos: Pro = Prolina, TRH = TRH ácido, ProNH₂ = Prolinamida y DKP = Dicetopiperazina. La elución se llevó a cabo en el modo isocrático a una velocidad de flujo de 1.3 ml/min, sobre una columna Resolve C₁₈. Condiciones: Coión (Li⁺), pH de la fase móvil a) 2.15, b) 2.5 y c) 2.85.

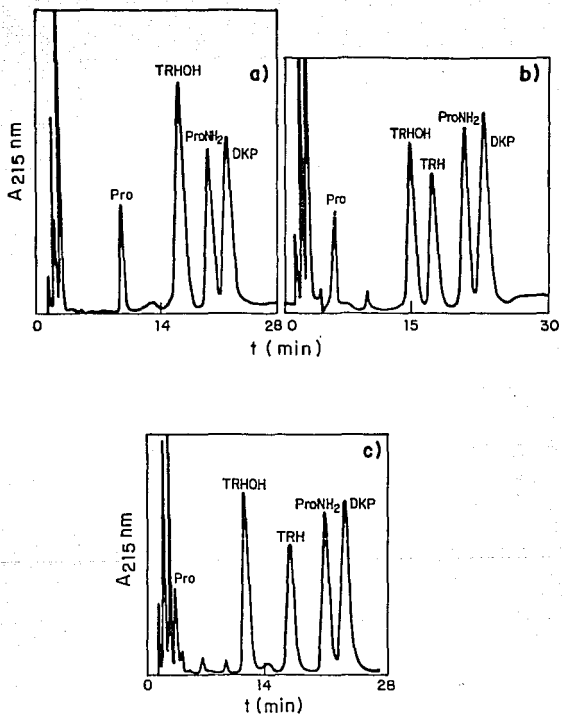


Figura 6. Separación de la Hormona Liberadora de la Tirotrópina (TRH) y sus metabolitos: Pro = Prolina, TRHOH = TRH ácido, ProNH₂ = Prolinamida y DKP = Dicotopiperazina. La elución se llevó a cabo en el modo isocrático a una velocidad de flujo de 1.3 ml/min, sobre una columna Resolve C₁₈. Condiciones: Coión (K⁺), pH de la fase móvil a) 2.15, b) 2.50, c) 2.85.

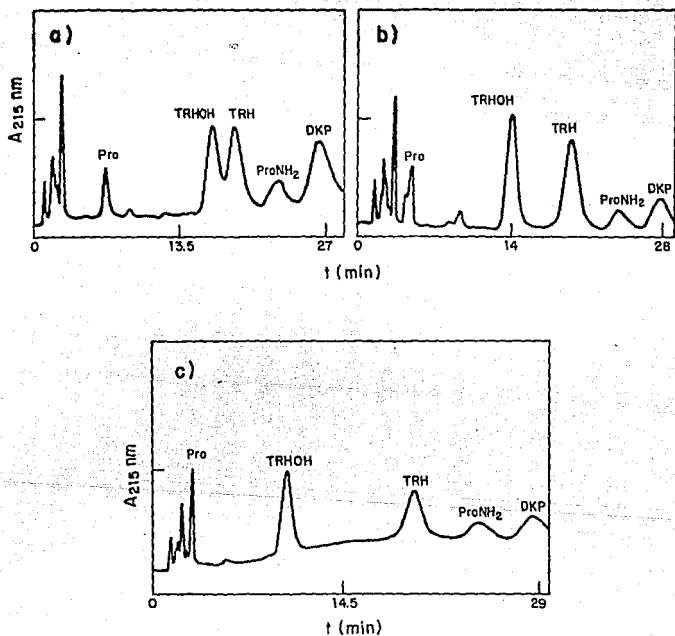


Figura 7. Separación de la Hormona Liberadora de la Tirotrópica (TRH) y sus metabolitos: Pro = Prolina, TRHOH = TRH ácido, ProNH₂ = Prolinamida y DKP = Dicitopiperazina. La elución se llevó a cabo en el modo isocrático a una velocidad de flujo de 1.3 ml/min, sobre una columna Resolve C₁₈. Condiciones: colón (Na⁺), pH de la fase móvil a) 2.15, b) 2.50 y c) 2.85.

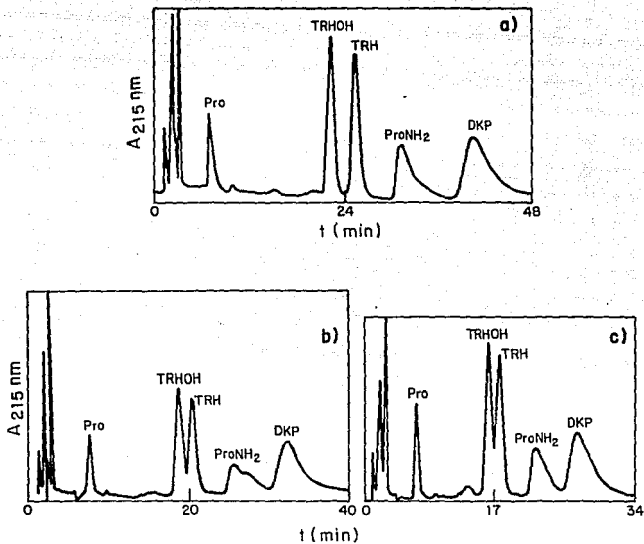


Figura 8. Separación de la Hormona Liberadora de la Tirotrópina (TRH) y sus metabolitos: Pro = Prolina, TRHOH = TRH ácido, ProNH₂ = Prolinamida y DKP = Dicotopiperazina. La elución se llevó a cabo en el modo isocrático a una velocidad de flujo de 1.3 ml/min, sobre una columna Resolve C₁₈. Condiciones: concentración del coión (Li⁺) en la fase móvil: a) 5 mM, b) 10 mM y c) 15 mM.

también un tiempo de elución muy largo y un fuerte efecto sobre la forma de los picos.

En la gráfica 6, se presentan los valores de k' para cada soluto en función de la concentración de sal estudiada. Como puede apreciarse, en general la retención (k') es menor al aumentar la concentración de sal en la fase móvil y lo mismo puede decirse de la selectividad. Solamente la prolina se comporta de manera diferente ya que su retención es poco afectada por variaciones en la concentración de sal.

E. Efecto de pH.

Las fases móviles empleadas fueron las siguientes:

acetonitrilo	: 24%
contraíón	: dodecil sulfato
conc. Contraíón	: 0.15% (p/v)
sal disuelta	: LiH_2PO_4 (coíón Li^+)
conc. sal	: 15 mM
pH	: 2.15, 2.50 y 2.85

Los cromatogramas correspondientes a los valores de pH estudiados se presentan en las figuras 5,6 y 7 en presencia de los coiones Li^+ , K^+ y Na^+ respectivamente. Las gráficas 3, 4 y 5 muestran la variación del factor de capacidad en función del pH. Se observa que el efecto del pH sobre la retención de TRH, prolinamida y DKP es pequeño. Por el contrario, la retención de la prolina y del TRH ácido disminuye drásticamente al aumentar el pH. De hecho, a $\text{pH} = 2.85$ la prolina eluye en un volumen muy cercano al volumen muerto del sistema, cualquiera que sea el contraíón presente en la fase móvil. Asimismo, la separación entre TRH y TRH ácido aumenta, significativamente, al aumentar el pH.

F. Determinación de la longitud de onda de máxima sensibilidad para la detección de los solutos.

Una vez estudiados los efectos de la variación de los componentes de la fase móvil sobre la retención y separación de TRH y sus metabolitos, se procedió a optimizar la detección. La longitud de onda del espectrofotómetro UV se fijó, sucesivamente, a cuatro valores diferentes, inyectando en cada ensayo una mezcla de los cinco analitos. El intervalo de longitudes de onda estudiado (190-220) corresponde a la región de máxima absorbancia del enlace peptídico.

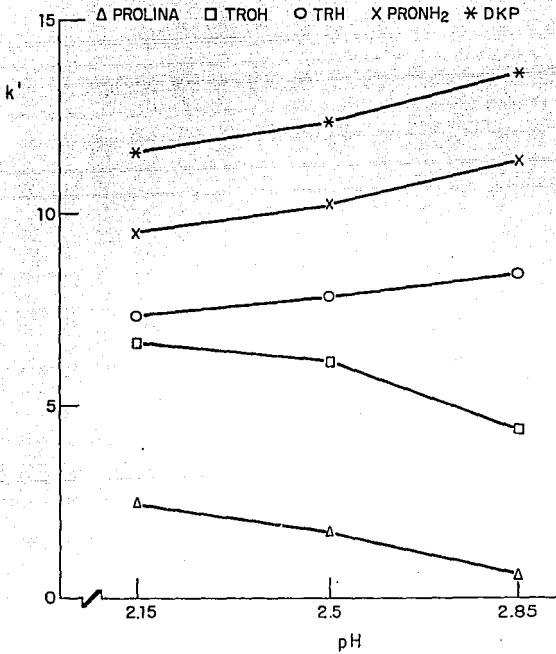
La fase móvil empleada fue la siguiente:

acetonitrilo	: 24%
contraíón	: dodecilsulfato
conc. de contraíón	: 0.15%
sal disuelta	: KH_2PO_4
conc. de sal	: 15 mM
pH	: 2.5

15 mM LiH_2PO_4

0.15% SDS

24% CH_3CN

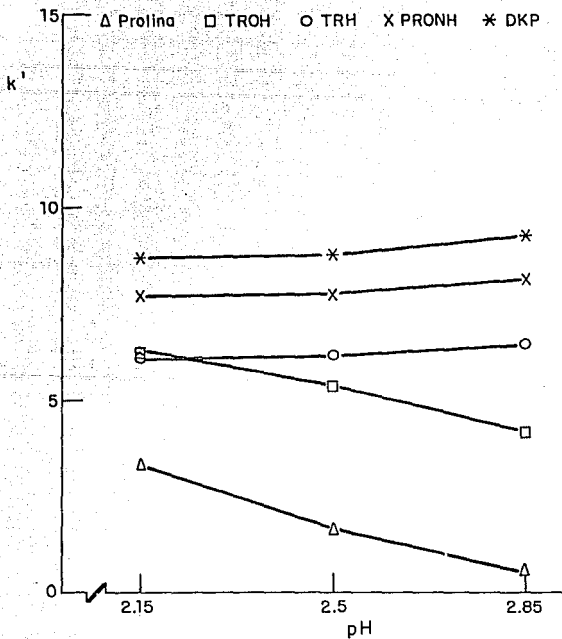


Gráfica 3.- Efecto del pH de la fase móvil, sobre la retención de la Hormona Liberadora de la Tirotrypina y sus metabolitos, con Li^+ como coión.

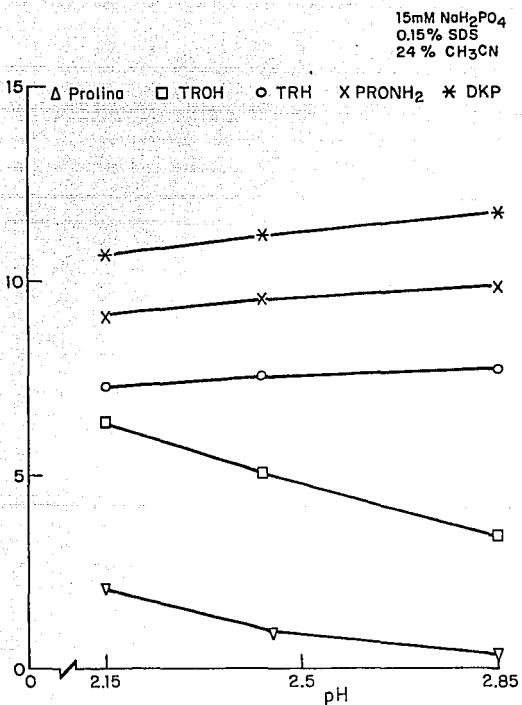
15 mM KH_2PO_4

0.15% SDS

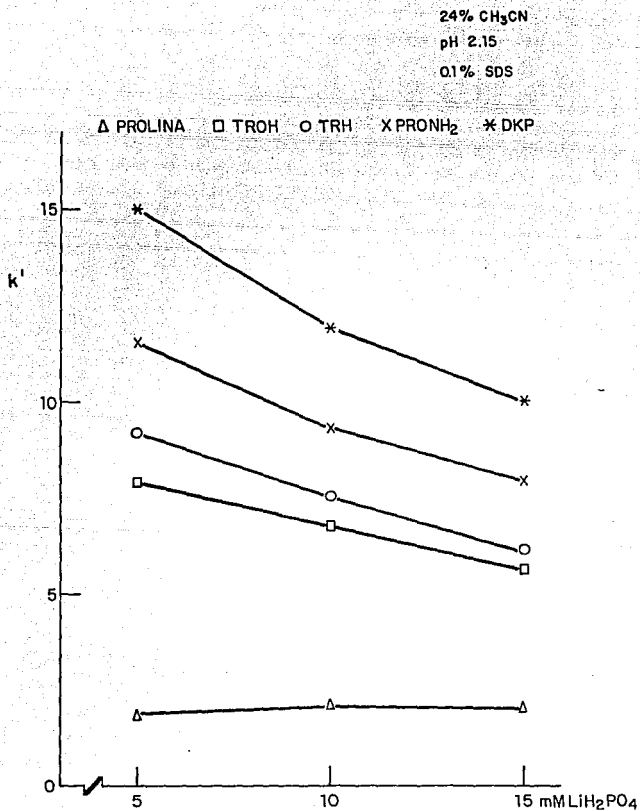
24% CH_3CN



Gráfica 4.- Efecto del pH de la fase móvil, sobre la Hormona Liberadora de la Tirotrópina y sus metabolitos, empleando k' como coión.



Gráfica 5.- Efecto del pH de la fase móvil, sobre la retención de la Hormona Liberadora de la Tirotrópina y sus metabolitos, con Na⁺ como coión.



Gráfica 6.- Efecto de la concentración del Coión, sobre la retención de la Hormona Liberadora de la Tirotrópina y sus metabolitos.

Los cromatogramas obtenidos se muestran en las figuras 9 y 10. Se observa que los compuestos TRH, TRH ácido y DKP muestran una absorbancia máxima alrededor de 210 nm, mientras que la respuesta de prolina y prolinamida aumentan continuamente a medida que la longitud de onda disminuye.

G. Determinación de la cantidad mínima detectable de TRH

Para este ensayo se inyectaron 5 μ l de disoluciones de TRH con las siguientes concentraciones:

disolución 1	:	0.94 ng
disolución 2	:	1.87 ng
disolución 3	:	3.75 ng
disolución 4	:	7.50 ng

Las condiciones experimentales fueron las siguientes:

acetonitrilo	:	24%
contraión	:	dodecil sulfato
conc. contraión	:	0.15% (p/v)
sal disuelta	:	KH ₂ PO ₄
conc. de sal	:	15 mM
pH	:	2.50
longitud de onda de detección	:	2.10 nm
sensibilidad del detector	:	0:01 AUFS

Los cromatogramas correspondientes se muestran en la figura 11. De éstos se concluye que, en las condiciones más adecuadas para la separación de TRH y sus metabolitos y a la longitud de onda de detección de máxima sensibilidad para TRH, la cantidad mínima detectable de este soluto es de, aproximadamente 0.94 ng. Es decir que considerando una inyección de 5 μ l, la concentración mínima detectable de TRH es de 0.188 ppm.

KH_2PO_4 15mM pH 2.5
0.05 AUFS

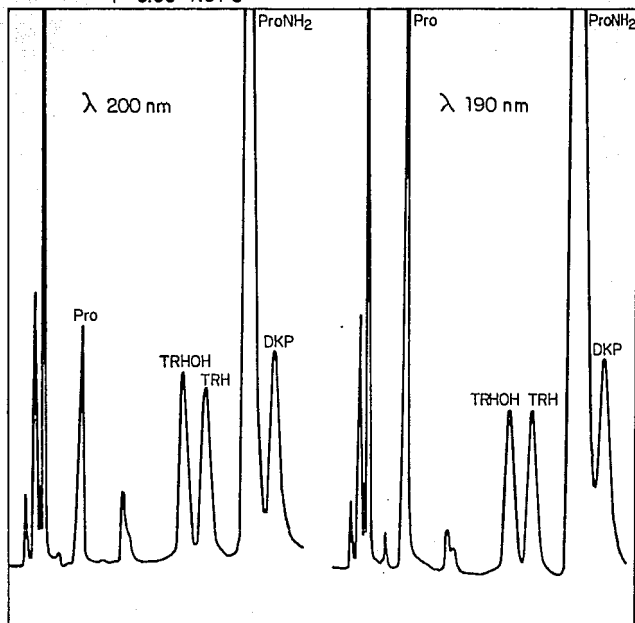


Figura 9. Detección de la Hormona Liberadora de la Tirotrópina (TRH) y sus metabolitos: Pro = Prolina, TRHOH = TRH ácido, ProNH₂ = Prolinamida y DKP = Diketopiperazina, empleando un detector de longitud de onda variable.

KH_2PO_4 15mM pH 2.5
0.05 AUFS

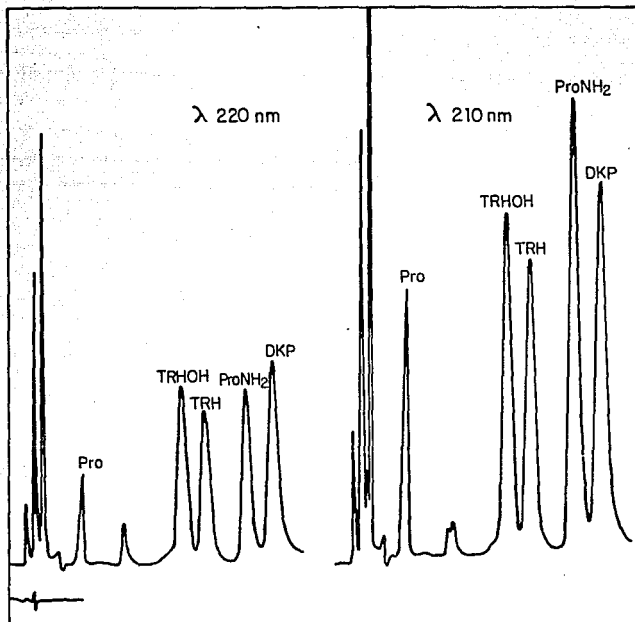


Figura 10. Detección de la Hormona Liberadora de la Tirotrópina (TRH) y sus metabolitos, empleando un detector de longitud de onda variable.

KH_2PO_4 15mM pH 2.50

$\lambda = 210\text{nm}$ 0.01AUFS

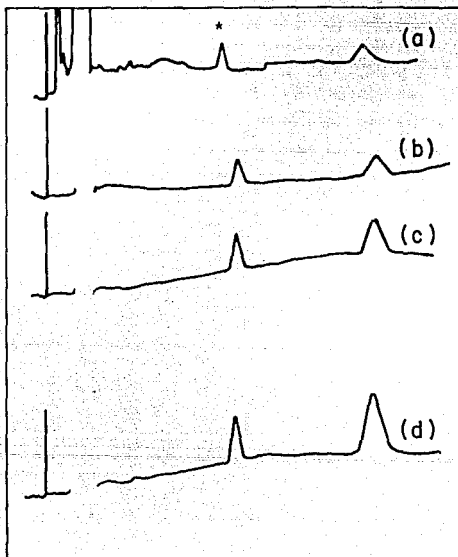


Figura 11. Determinación de la cantidad mínima detectable de la Hormona Liberadora de la Tirotropina (TRH) en las condiciones de máxima sensibilidad. a) 0.94, b) 1.8, c) 3.7 d) 7.5 ng respectivamente.

* Contaminante

VII. DISCUSION

A. Contenido de acetonitrilo en la fase móvil.

El efecto de la concentración del modificador orgánico en el eluente sobre la retención y la selectividad, corresponde al comportamiento típico de los solutos en Cromatografía de Fase Reversa y/o en Cromatografía de Pares de Iones. En este último caso, la disminución de la retención al aumentar el contenido de acetonitrilo ha sido explicada de dos maneras:

1º. El mecanismo de formación de pares de iones en la fase móvil propone, que la influencia del disolvente orgánico se debe a una combinación de dos efectos contrarios: a) el disolvente orgánico provoca una disminución de la constante dieléctrica del medio y favorece la formación del par de iones en el eluente, b) la fijación del par de iones sobre las cadenas hidrocarbonadas del soporte disminuye al aumentar el contenido de disolvente orgánico debido a la disminución de la tensión superficial de la fase móvil, provocada por el incremento en concentración de dicho disolvente orgánico.

2º. Según el mecanismo de intercambio iónico dinámico, el aumento en la concentración de disolvente orgánico provoca una disminución del efecto hidrofóbico sobre el contraión presente en la fase móvil y, por lo tanto, una disminución en la fijación de éste sobre las cadenas hidrocarbonadas de la fase estacionaria (es decir, la capacidad del intercambiador de iones dinámico) también disminuye la retención de los solutos iónicos. A este primer efecto se adiciona el de disminución de efectos hidrofóbicos sobre los solutos, lo que contribuye a hacer más marcada la disminución de la retención. Los resultados obtenidos en estos experimentos no permiten discernir sobre el mecanismo preponderante. Sin embargo, el efecto tan fuerte del acetonitrilo sobre la retención de los solutos indica que este parámetro debe ser controlado muy cuidadosamente para poder obtener resultados reproducibles.

B. Concentración de contraión en la fase móvil

La influencia de la concentración del contraión en el eluente sobre la retención de los solutos puede explicarse también por ambos tipos de mecanismos:

1o. Formación de pares de iones en fase móvil. Al aumentar la concentración de contraión se favorece la formación de pares de iones en fase móvil y, por tanto, su fijación en la fase estacionaria.

2o. Intercambio Iónico Dinámico. Al aumentar la concentración de contraión en el eluente también aumenta la cantidad de éste fijado en fase estacionaria, o sea la capacidad de intercambio de dicha fase y, consecuentemente, la retención de los solutos iónicos. El aumento de la cantidad de contraión fijado en función de su

concentración en fase móvil no es lineal sino que tiende, en forma hiperbólica, hacia un límite a medida que la fase estacionaria se satura en contraíón (Isoterma de Adsorción convexa) (7,35). Como en el caso anterior, los resultados de este conjunto de experimentos no permiten concluir respecto al mecanismo de retención de los solutos.

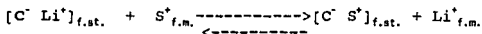
Por otra parte, la figura 4 muestra claramente que la concentración de contraión en fase móvil es un buen parámetro para controlar la retención de los solutos y optimizar su separación. Desde este punto de vista, una mayor separación va generalmente acompañada de un mayor tiempo de análisis y un mayor ensanchamiento y asimetría de los picos. Por el contrario, la tabla 2 muestra que el equilibrio de la columna con la fase móvil es más rápido al aumentar la concentración de contraión en esta última.

C. Concentración y tipo de coión

A diferencia de los dos parámetros anteriormente estudiados, el efecto de la concentración y el tipo de coión en la fase móvil sí dan una clara indicación de los mecanismos de retención preponderantes.

En efecto, la tendencia de los iones inorgánicos hidrofílicos como Na⁺, K⁺ ó Li⁺ a formar pares de iones en una fase móvil predominantemente acuosa es muy débil, debido a las características disociantes y solvatantes del agua. Por lo tanto estos iones no deberían competir con el soluto para asociarse al contraión en la fase móvil. Por otra parte, en Cromatografía en Fase Reversa es bien conocido el llamado "efecto salino" (salting-out) que provoca una mayor retención de los solutos orgánicos al aumentar la concentración de sales en fase móvil debido a un incremento en los efectos hidrofóbicos.

Los resultados observados (gráfica 6) muestran claramente que para cuatro solutos la retención disminuye, en forma aproximadamente inversamente proporcional, al aumentar la concentración de sales en la fase móvil. Este efecto no es propio de la Fase Reversa ni tampoco puede ser explicado por un mecanismo de formación de pares de iones en fase móvil. Por el contrario, un mecanismo de intercambio iónico es totalmente congruente con los efectos observados. Considerando el equilibrio propio del intercambio iónico se tendrá:



donde: C⁻ = contraión aniónico y S^{*} = soluto catiónico

Un incremento en la concentración de iones, con carga del mismo signo que la del soluto, en la fase móvil provoca un desplazamiento del equilibrio a la izquierda y por tanto, una menor retención del soluto.

De la constante del equilibrio se puede deducir:

$$[C^+ S^-]_{f.st.} = \frac{K \text{ eq. } [C^+ Li^+]_{f.st.} [S^-]_{f.m.}}{[Li^+]_{f.m.}}$$

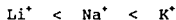
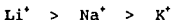
Lo que demuestra una disminución inversamente proporcional del soluto en fase estacionaria al aumentar la concentración de sales (Li^+) en la fase móvil.

En lo que se refiere a la prolina, cuya retención es débil y casi no varía con la concentración de sales (gráfica 6) ó de contraión (gráfica 2) en la fase móvil, se podría concluir que, en las condiciones experimentales de trabajo, este soluto tiene poca tendencia a asociarse al contraión, ya sea en la fase móvil o en la estacionaria.

El efecto que se observa al cambiar el tipo de coión sobre la retención de los solutos también puede ser explicado por un mecanismo de intercambio iónico. Se sabe que en un intercambiador de iones la afinidad de los iones por la fase estacionaria aumenta a medida que disminuye el tamaño del ión solvatado. En el caso estudiado se tiene:

Tamaño del ión solvatado

Afinidad por el intercambiador



Por lo tanto, la retención de los solutos será mayor en presencia de Li^+ y menor en presencia de K^+ . Esto puede comprobarse al comparar las gráficas 3, 4 y 5.

Un fenómeno muy interesante que se observó en estos experimentos al cambiar el tipo de coión (figuras 5, 6 y 7) fue que, además de provocar variaciones en la retención, también se produjeron cambios en la forma, anchura y asimetría de los picos, especialmente los correspondientes a prolinamida y DKP. Desde este punto, los mejores resultados se obtienen en presencia de K^+ , los picos más anchos y asimétricos se obtienen en presencia de Na^+ y, finalmente, con Li^+ se obtienen resultados intermedios. Cabe notar que este efecto, para el cual no se tiene ninguna explicación, no ha sido estudiado ni reportado en la literatura.

D. Efecto del pH de la fase móvil

Para comprender los resultados observados, es necesario conocer las propiedades y estructura de los solutos estudiados. En la figura 2 puede observarse que todos los solutos poseen uno o varios grupos amino básicos que en las condiciones de trabajo ($pH < 3$) están probablemente protonados, lo que les permite interaccionar con un contraión aniónico como el dodecilsulfato. En efecto, el valor del pK_a del grupo α -amino de todos los aminoácidos se sitúa alrededor de 9, por lo que este grupo está totalmente protonado en los tres

valores de pH estudiados (2.15, 2.5 y 2.85). Adicionalmente, el pKa del grupo amino en el anillo de la histidina es de 6, por lo que este grupo también estará totalmente protonado en las condiciones de trabajo. Esto explica el hecho de que las variaciones de pH en el intervalo de 2.15 a 2.85 tengan muy poco efecto sobre la retención de TRH, prolinamida y DKP.

Por otra parte, la prolina y el TRH ácido poseen un grupo carboxilo (pKa aproximado de 2) cuyo grado de ionización (anión) varía fuertemente al cambiar el pH de la fase móvil en el intervalo de 2.15 a 2.85. Así, al aumentar el pH, la prolina adquiere un carácter más marcado de zwitterion y su carga neta tiende a cero lo que disminuye, aún más, su ya débil interacción con el contraión, de tal manera que su retención es prácticamente nula a pH 2.85.

El mismo efecto se produce con el TRH ácido cuya retención disminuye notablemente al aumentar el pH. Sin embargo, en este caso existen otros grupos amino protonados en la molécula, cuya carga neta se mantiene globalmente positiva, por lo que puede seguir interaccionando con el contraión aniónico y su retención no llega a ser nula.

La separación de dos moléculas tan similares como el TRH y el TRH ácido, que se logra simplemente variando un poco el pH de la fase móvil, es un magnífico ejemplo del efecto tan notable del pH sobre la selectividad cuando se trabaja en valores cercanos a alguno de los pKa de los compuestos a separar.

VII. CONCLUSIONES

En este trabajo se estudio el efecto de diversas variaciones en la composición de la fase móvil sobre la retención y separación de varios compuestos de interés bioquímico, utilizando la técnica de Cromatografía de Pares de Iones. El grupo de compuestos está constituido por la hormona liberadora de la tirotropina TRH), que es una molécula neuroactiva de naturaleza peptídica, y algunos de sus metabolitos: TRH ácido, prolina, prolinamida y dicetopiperazina (DKP).

Los estudios realizados permitieron lograr tres objetivos:

1o. Encontrar las condiciones experimentales más adecuadas para la separación y eventual cuantificación de estos compuestos.

2o. Analizar el efecto de varios parámetros de composición de la fase móvil, sobre el comportamiento cromatográfico de este tipo de solutos (aminoácidos y péptidos pequeños) en una columna de fase reversa en presencia de un ión hidrofóbico en la fase móvil.

Los parámetros estudiados fueron:

- Contenido de acetonitrilo
- Concentración del ión hidrofóbico (agente formador de pares de iones o contraión)
- Concentración de sales
- Tipo de ión con carga del mismo signo que la de los solutos (co-ión).
- pH.

3o. Interpretar los resultados obtenidos y confrontarlos con los mecanismos de retención propuestos en la literatura para la Cromatografía de Pares de Iones.

Con respecto al primer punto se encontro que las condiciones óptimas para la separación y detección de los compuestos son:

Fase móvil

Contenido de acetonitrilo 24% p/v

Concentración de dodecilsulfato de sodio 0.15% p/v (5.2×10^{-3} M)

contraión: dodecilsulfato

Concentración de KH_2PO_4 15×10^{-3} M

coión : K^+

pH : 2.5

Detección

longitud de onda = 210 nm (optimizada con respecto a TRH)

En esas condiciones, la cantidad mínima detectable de TRH es de 0.94 ng. Considerando una inyección de 5 μ l, esto corresponde a una concentración de 0.188 ppm en la disolución muestra.

En lo que se refiere al efecto de los parámetros de composición de la fase móvil sobre el comportamiento de los solutos, este se resume en el siguiente cuadro.

PARAMETRO	VARIACION	EFFECTO SOBRE LA RETENCION	EFFECTO SOBRE LA SELECTIVIDAD*
Contenido de Acetonitrilo		Disminución (exponencial)	Disminución ligera
Conc. de contraíón		Aumenta tendiendo a un límite (hiperbólica)	Aumento ligero
Conc. de sales		Disminución (inverproporcional)	Disminución (aprox. lineal)
Tipo de coíón	$\text{Li}^+/\text{Na}^+/\text{K}^+$	Cambia según el orden: $\text{Li}^+ > \text{Na}^+ > \text{K}^+$	Cambia según el orden: $\text{Na}^+ > \text{Li}^+ > \text{K}^+$
pH	(de 2.5 a 2.85)	Muy poco sobre TRH DKP y prolinamida disminución drástica para prolina y TRH ácido.	Aumenta notablemente

*Considerada con respecto a la separación de TRH y TRH ácido

Es importante hacer notar un efecto del tipo coíón para el cual no se encontraron antecedentes en la literatura; la anchura y simetría de los picos cambia notablemente (en particular para DKP y prolinamida) al cambiar el coíón. La forma de los picos mejora en el siguiente orden: $\text{Na}^+ < \text{Li}^+ < \text{K}^+$.

Finalmente, en lo que se refiere al 3er punto, pudo demostrarse que en la cromatografía de pares de iones de estos solutos, utilizando el contraíón dodecilsulfato, existe indudablemente un mecanismo de intercambio iónico. Este mecanismo, llamado intercambio iónico dinámico, considera que la fase reversa se transforma en un intercambiador iónico debido a la fijación de un contraíón voluminoso sobre las cadenas hidrocarbonadas del soporte. Los coiones y los solutos presentes en la fase móvil compiten para asociarse al contraíón de la fase estacionaria. Sin embargo, los resultados obtenidos no permiten descartar la posibilidad de coexistencia de algún otro mecanismo de retención.

BIBLIOGRAFIA

1. Abrahamson, M. and Groningson, K., High Performance Liquid Chromatography of the tetradecapeptide somatostin, *J. Liq. Chromatogr.* 3 (4), 495-511, 1980.
2. Bauer, K. and Kleinkauf, H., Catabolism of thyroliberin by Rat Adenohypophyseal Tissue Extract, *Eur. J. Biochem.*, 106, 107-117, 1980.
3. Bidlingmeyer, B.A., Cohen, S.A., and Tarvin, T.L., Rapid Analysis of Amino Acids using Pre-column Derivatization, *J. Chromatogr.*, 336, 93-104, 1984.
4. Bishop, C. A., Phosphates as Mobile Phase Modifiers in CRC Handbook of HPLC for the Separation of Amino Acids, Peptides and Proteins II, Hancock, W.S., Ed., 153-159, CRC Press, Inc., Florida, 1984.
5. Brawne, P. and O'Cuim, An Evaluation of the Role of a Pyroglutamyl Peptidase, a Post-Prolyne Cleaving Enzyme and a Post-Proline Dipeptidyl Amino Peptidase, Each Purified from the Soluble Fraction of Guinea-Pig Brain, in the Degradation of Thyroliberin in vitro, *Eur. J. Biochem.*, 137, 75-87, 1983.
6. Coy, D.H., Hypothalamic Releasing Factors in CRC Handbook of HPLC for the Separation of Amino Acids, Peptides, and Proteins II, Hancock, W: S., Ed., 197-203, CRC Press, Inc., Florida 1984.
7. Del Rey, M.E., and Vera-Avila, L.E. Adsorption of tetralkyl Ammonium Ions on Reversed-Phase HPLC Columns. *J. Chromatogr.* 10(13) 2911, 1987.
8. Del Rey, M.E., and Vera-Avila, L.E., A Simple Two-Membered Model for Retention in RP-IPC with Hydrophobic Counterions, *J. Liq. Chromatogr.*, 11(14), 2885-2905, 1988.
9. Dizdaroglu, M., Separation of peptides by High-Performance Ion Exchange Chromatography in Handbook of HPLC for the Separation of Amino Acids, Peptides and Proteins, II. Hancock, W.S., Ed., 23-43 CRC Press, Florida 1984.
10. Echert, H.G. Radioimmunoassay, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 15, 525-533, 1976.
11. Ettre, L.P., Evolution of Liquid Chromatography: A Historical overview in High-Performance Liquid Chromatography. *Advances and perspectives*, I., Horváth, C., Ed., 2-65, Academic Press, N.Y. 1980.
12. Feldman, J.A. and Cohn, M.L. Hypothalamic Releasing Hormones.

Methods of assay by reversed Phase High performance liquid chromatography.

13. Gaastra, W., Enzyme-linked Immunosorbant Assay (ELISA) in Laboratory Techniques, Burdon, R.H., and Knippenberg, P. H., Eds., 46-60, Elsevier 1984.
14. Guyon-Gruaz, A. Raulais, D., and Riaille, P., Luteinizing Hormone Releasing Hormone (LH-RH9 and Analogs, in CRC Handbook of HPLC for the Separation of Amino Acids, Peptides, and Proteins II, Hancock, W.S., Ed. 213-220, CRC Press, Inc., Florida, 1984.
15. Hancock, W.S. Introduction to High Performance Liquid Chromatography in CRC Handbook of HPLC for the Separation of Amino Acids. Peptides and Proteins I. Hancock, W.S., Ed. 3-21, CRC Press, Inc. Florida. 1984.
16. Hancock, W.S., Bishop, C.A., Prestidge, R.L., Harding, D.R.K., Hearn, M.T.W., Reversed-Phase, High-Pressure Liquid Chromatography of Peptides and Proteins with Ion Pairing Reagents, Science 200, 1168-1170, 1978.
17. Hancock, W.S., and Harding, D.R.K., Review of Separation Conditions for Peptides in CRC Handbook of HPLC for the Separation of Aminoacids. Peptides and Proteins II, Hancock, W.S., Ed., 3-20, CRC Press, Inc. Florida 1984.
18. Hancock, W.S. and Harding D.R.K., Review of Separation Conditions in CRC Handbook of HPLC for the Separation of Amino Acids Peptides and Proteins II, Hancock, W.S., Ed., 303-312. CRC Press, Inc., Florida, 1984.
19. Heinrikson, L.R., and Meredith, S.C. Amino Acid Analysis by Reverse-Phase High Performance Liquid Chromatography: Precolumn Derivatization with Phenylisothiocyanate., Anal. Biochem., 136, 65-74, 1984.
20. Jackson, I.M.D., TRH in the Rat Nervous System: Identity with Synthetic TRH on High Performance Liquid Chromatography, Brain Research, 201, 245-248, 1980.
21. Karger, B.L., Le Page, J.N., and Nobuo, T., Secondary Chemical Equilibrio in High Performance Liquid Chromatography in High-Performance Liquid Chromatography. Advances and Perspectives, I, Horváth C., Ed. 113-200, Academic Press, N.Y. 1980.
22. Lazure, C., Dennis, M., Rochemont, J., Seidah, N.G., and Chretien, M., Purification of Radiolabeled and Native Polypeptides by Gel Permeation in High Performance Liquid Chromatography in High-Performance Liquid Chromatography of Proteins and peptides. Hearn M., T. Regnier, F.E. and Wehr,

- F., Eds., 141-149, Academic Press, N.Y. 1983.
23. Mahoney, W.C., and Hermodson, M.A., Separation of Large Denatured Peptides by High Performance Liquid Chromatography, *J. Biol. Chem.* 255, 11199-11203, 1980.
 24. Majors, R.E., Practical Operation of Bonded-phase columns in High Performance Liquid Chromatography in High-Performance Liquid Chromatography. Advances and Perspectives. I. Hotbáth, C. Ed., 76-108, Academic Press, N.Y. 1980.
 25. Melander, W.R. and Horvath, C., Reversed Phase Chromatography in High-Performance Liquid Chromatography. Advances and perspectives. I. Hórvath, C. Ed., 76-108, Academic press., N.Y. 1980.
 26. O'Hare, M.J. and Nice, E.C., Hydrophobic High Performance Liquid Chromatography of Hormonal Polypeptides and Proteins on Alkylsilane Bonded Silica. *J. Chromatogr.*, 171, 209-226, 1979.
 27. Olieman, C., and Voskamp, D., Perfluoroalkanoic Acids as Mobile Phase Modifiers in CRC Handbook of HPLC for the Separation of Amino Acids, Peptides and Proteins I, Hancock, W.S., Ed. 161-166, CRC Press, Inc., Florida 1984.
 28. Regnier, F.E., and Gooding, K.M., High Performance Liquid Chromatography of Proteins. *Anal. Biochem.* 103, 1-25, 1980.
 29. Regnier, F.E., High Performance Ion-Exchange Chromatography of Proteins: The current status, in High-Performance Liquid Chromatography of Proteins and Peptides, Hern, M.T. Regnier, F.E. and Wehr, C.T. eds., 1-7, Academic Press, N.Y. 1983.
 30. Spindel, E., Pettibone, D., Fisher, L., Fernstrom, J. and Wurtman, R., Characterization of Neuropeptides by Reverse-Phase, Ion Pair Liquid Chromatography with Post-Column Detection by Radio-immunoassay. Application to Thyrotropin-Releasing Hormone, Substance P. and Vasopressin., *J. Chromatogr.*, 222, 381-387, 1981.
 31. Spindel, E., and Wurtman, R., TRH Immunoreactivity in Rat Brain Regions, Spinal Cord and Pancreas: Validation by High-Pressure Liquid Chromatography and Thin-Layer Chromatography, *Brain Research*, 201, 279-288, 1980.
 32. Spindel, E., and Wurtman, R., Reversed-Phase, Ion pair Separation of Thyrotropin-Releasing Hormone and some Analogs, *J. Chromatogr.*, 175, 198-201, 1979.
 33. Stewart, J.M. and Young, J.D. Techniques for Purification of peptides in solid phase Peptide Synthesis, J. M. Stewart, Ed.,

96-103 Pierce Chemical Company

34. Vale, W., Grant, G., and Guillemin, R., Chemistry of the Hypothalamic Releasing Factors Studies on Structure-Function Relationships, in *Frontiers in Neuroendocrinology*, Ganong, W.F. and Martini, L., Eds., 375-394, Oxford University Press, 1973.
35. Vera-Avila, L.E., Contribución al Estudio del Mecanismo de Retención en Cromatografía de Pares de Iones, Tesis Doctorado, Paris. Francia, 1979.
36. Vuolteemaho, O., and Leppaluoto, J., Extrahypothalamic Thyrotropin-Releasing Hormone (TRH) in *CRC Handbook of HPLC for the Separation of Amino Acids, Peptides and Proteins II*, Hancock, W.S. Ed. 205-212, CRC Press Inc., Florida 1984.
37. Yang, H.S., Studebaker, J.F., Parravano, C., The Study of Disulfide Bond Pairing in Proteins and Protein Fragments with HPLC.