
UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA
Facultad de Ciencias Exactas



Departamento de Química

Tesina – Licenciatura en Química

“Enantioseparación de derivados volátiles de aminoácidos por cromatografía de gases empleando una columna quiral de Lipodex E”

Fiorella Menestrina

La Plata – Argentina

Año 2012

Objetivos

Los objetivos específicos de este trabajo de tesina son:

a- Separar cromatográficamente el mayor número posible de racematos de aminoácidos derivatizados con distintos alquilcloroformiatos mediante una columna quiral para cromatografía de gases conteniendo como selector quiral octakis-(2,6-di-O-pentil-3-O-butiril)- γ -ciclodextrina (Lipodex E).

b – Evaluar y comparar distintos cloroformiatos de alquilo como agentes derivatizantes de aminoácidos para obtener derivados con mayor volatilidad que puedan ser eluidos a las menores temperaturas posibles en tiempos de análisis razonables; y, simultáneamente, incrementar la señal en el detector de ionización de llama, la cuál aumenta proporcionalmente al número de carbonos en las moléculas eluidas.

c.- Optimizar la enantioseparación cromatográfica del mayor número posible de aminoácidos derivatizados por corrida por medio del uso de gradientes de temperatura.

d.- Cuantificar los enantiómeros de aminoácidos derivatizados con el/los reactivos más apropiados en muestras de kéfir.

Índice

Lista de Figuras	5
Lista de Tablas	7
1. Capítulo 1	10
1.1 Definición de quiralidad	11
1.2 Separación de enantiómeros	15
1.2.1 Método indirecto:	15
1.2.2 Método directo:	15
1.3 Fases estacionarias quirales	16
1.3.1 Ciclodextrinas	16
1.4 Enantioseparación de aminoácidos	19
1.4.1 Aminoácidos	19
1.4.2 Importancia de la enantioseparación de aminoácidos	20
1.5 Reacción de derivatización	20
1.6 Referencias	24
2. Capítulo 2	29
2.1 Materiales	30
2.2 Métodos	33
2.2.1 Derivatización	33
2.2.2 Medidas cromatográficas	34
2.2.3 Preparación de patrones	34
2.2.4 Preparación de la muestra	35
2.2.5 Identificación	36
2.2.6 Cuantificación	39
2.3 Cifras de mérito	39
2.3.1 Linealidad del sistema	39
2.3.2 Exactitud	40
2.3.3 Precisión	40
2.3.4 Límite de detección y límite de cuantificación	40
2.4 Referencias	42

3. Capítulo 3.....	43
3.1 Optimización del método	44
3.2 Cifras de mérito	53
3.2.1 Linealidad del sistema	53
3.2.2 Precisión.....	58
3.2.3 Exactitud.....	60
3.2.4 Límite de detección y límite de cuantificación	61
3.2.5 Concentración de aminoácidos en las muestras de kéfir	62
3.3 Referencias	67
4. Capítulo 4.....	68
4.1 Conclusiones	69
5.1 Anexo 1	71
5.1.1 Gráficos de residuos.....	71

Lista de Figuras

Figura 1.1 Enantiómeros de un átomo de carbono asimétrico. Las dos imágenes especulares no son superponibles.	11
Figura 1.2 Los dos enantiómeros de la talidomida [9]	13
Figura 1.3 Modelo de interacción de tres puntos [10].....	14
Figura 1.4 Estructuras de ciclodextrinas naturales que indican la posición de los grupos hidroxilo y las dimensiones de los conos. [10].....	17
Figura 1.5 Estructura general de un aminoácido.....	19
Figura 1.6 Mecanismo de reacción de la derivatización de un aminoácido con un cloroformiato en un medio de reacción con H ₂ O/ROH/Py [48]	22
Figura 2.1 Cromatogramas de los patrones. A) D- y L-Alanina, B) D- y L-Valina, C) D- y L-Leucina, D) D- y L-Prolina, E) D- y L-Isoleucina, F) DL-Glutámico, G) DL-Cisteína, H) DL-Metionina, I) D- y L-Treonina, J) D- y L-Serina, K) D- y L-Asparagina, L) D- y L-Aspártico.	38
Figura 3.1 Gráfico de enantioselectividades para la combinación de etanol/etilcloroformiato y la combinación etanol/isobutilcloroformiato.	51
Figura 3.2 Gráfico de resoluciones para la combinación de etanol/etilcloroformiato y la combinación etanol/isobutilcloroformiato.....	52
Figura 3.3 A) D- y L-Prolina combinación ECF/EtOH. B) D- y L-Prolina combinación isobutilcloroformiato/EtOH.....	52
Figura 3.4 A) D- y L- Valina combinación ECF/EtOH. B) D- y L-Valina combinación isobutilcloroformiato/EtOH.....	53
Figura 3.5 Cromatograma muestra 1 sin sobreagregado: 1) D-Alanina, 2) L-Alanina, 3) L-Valina, 4) D-Prolina, 5) L-Treonina, 6) DL-Glutámico 7) DL-Cisteina.....	64

Figura 3.6 Cromatograma muestra 2 sin sobreagregado: 1) D-Alanina, 2) L-Alanina, 3) D-Valina, 4) L-Valina, 5) D-Prolina, 6) L-Treonina, 7) DL-metionina, 8) DL-Glutámico, 9) DL-Cisteina.....65

Figura 4.1 Gráficos de residuos muestra 1. A) D-Alanina, B) L-Alanina, C) D-Valina, D) L-Valina, E) D-Prolina, F) L-Prolina, G) D-Treonina, H) L-Treonina, I) D-Aspártico, J) L-Aspártico, K) DL-Glutámico, L) DL-Metionina, M) DL-Cisteina.....75

Figura 4.2 Gráficos de residuos muestra 2. A) D-Alanina, B) L-Alanina, C) D-Valina, D) L-Valina, E) D-Prolina, F) L-Prolina, G) D-Treonina, H) L-Treonina, I) D-Aspártico, J) L-Aspártico, K) DL-Glutámico, L) DL-Metionina, M) DL-Cisteina.....79

Lista de Tablas

Tabla 2.1 Estructura y abreviatura de los aminoácidos usados	31
Tabla 2.2 Concentración de los patrones usados	35
Tabla 2.3 Tiempos de retención	36
Tabla 3.1 Valores de retención, selectividad y resolución para los derivados obtenidos con la combinación etilcloroformiato/etanol	44
Tabla 3.2 Valores de retención, selectividad y resolución para los derivados obtenidos con la combinación isobutilcloroformiato/etanol.....	45
Tabla 3.3 Valores de retención, selectividad y resolución para los derivados obtenidos con la combinación metilcloroformiato/etanol.	46
Tabla 3.4 Valores de retención, selectividad y resolución para los derivados obtenidos con la combinación clorometilcloroformiato/etanol.	47
Tabla 3.5 Valores de retención, selectividad y resolución para los derivados obtenidos con la combinación etilcloroformiato/fluoroetanol.	48
Tabla 3.6 Valores de retención, selectividad y resolución para los derivados obtenidos con la combinación etilcloroformiato/perfluorohexanol.	49
Tabla 3.7 Recta de calibrado para la muestra 1	54
Tabla 3.8 Recta de calibrado para la muestra 2.....	54
Tabla 3.9 Valores de F calculados, $s_{y/x}$ y s_y para todos los aminoácidos en la muestra 1.	56
Tabla 3.10 Valores de F calculados, $s_{y/x}$ y s_y para todos los aminoácidos en la muestra 2.	57
Tabla 3.11 Precisión del método de sobreagregado para la muestra 1	58
Tabla 3.12 Precisión del método de sobreagregado para la muestra 2	59

Tabla 3.13 Precisión del método de estándar externo	59
Tabla 3.14 Porcentaje de recuperación para la muestra 1 a dos concentraciones ...	60
Tabla 3.15 Porcentaje de recuperación para la muestra 2 a dos concentraciones ...	61
Tabla 3.16 Límites de detección y cuantificación para la muestra 1	61
Tabla 3.17 Límites de detección y cuantificación para la muestra 2	62
Tabla 3.18 Resultados del análisis para la muestra 1	63
Tabla 3.19 Resultados del análisis para la muestra 2.....	63
Tabla 3.20 Concentración de aminoácidos en la muestra 1.....	66
Tabla 3.21 Concentración de aminoácidos en la muestra 2.....	66

Capítulo 1

Introducción

1.1 Definición de quiralidad

Los isómeros son compuestos que poseen iguales proporciones relativas de los átomos que los conforman pero sus estructuras moleculares son distintas. Los isómeros constitucionales o estructurales tienen la misma fórmula molecular pero la distribución de los enlaces entre sus átomos es diferente, por ello difieren sensiblemente en sus propiedades físicas y químicas y, generalmente, son fáciles de separar utilizando técnicas cromatográficas convencionales. Los estereoisómeros tienen fórmulas moleculares idénticas y sus átomos presentan los mismos enlaces, pero su disposición en el espacio es distinta, es decir, difieren en la orientación espacial de sus átomos. Por lo general tienen similares propiedades físicas y químicas, por lo que su separación en los sistemas convencionales de cromatografía puede ser difícil. Pueden subdividirse en dos categorías generales: en diasterómeros y enantiómeros. Los diasterómeros o isómeros geométricos, presentan una distribución espacial distinta sin ser imágenes especulares. Los enantiómeros o isómeros ópticos son moléculas que se caracterizan por ser imágenes especulares no superponibles entre sí, es decir que son quirales ya que no presentan un plano de simetría. La causa más común de quiralidad en una molécula orgánica es la presencia de un átomo de carbono unido con cuatro grupos distintos como se muestra en la figura 1.1. A estos átomos se les suele denominar centros quirales. [1]

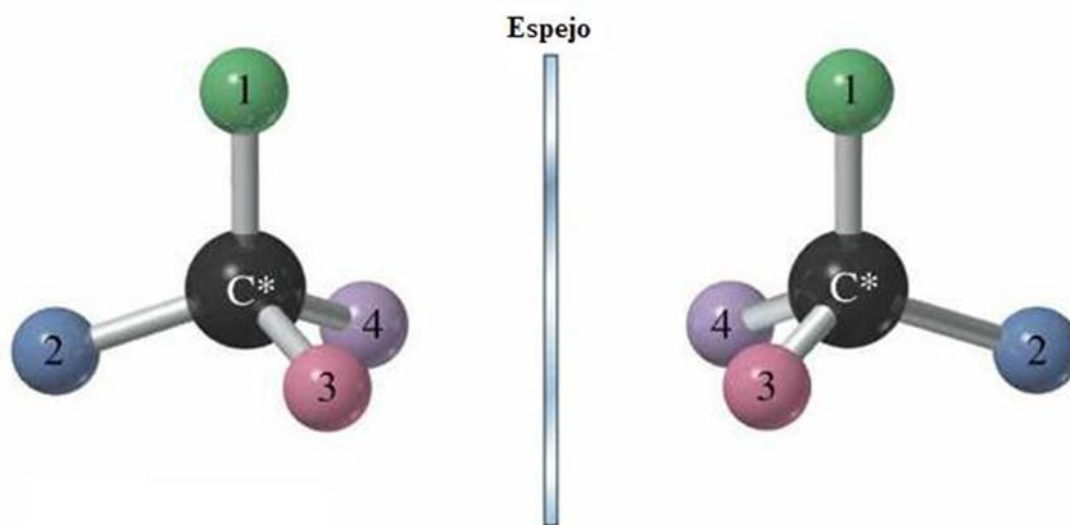


Figura 1.1 Enantiómeros de un átomo de carbono asimétrico. Las dos imágenes especulares no son superponibles.

El estudio de la estereoquímica se inició con los trabajos de Jean Baptiste Biot, científico francés que investigaba en el siglo XIX la naturaleza de la luz polarizada en un plano. Observó que cuando un haz de luz polarizada en un plano atraviesa una solución de ciertas moléculas orgánicas, el plano de la luz polarizada presenta un giro; debido a que no todas las moléculas orgánicas tienen esta propiedad, las denominó ópticamente activas [2]. En 1849, Louis Pasteur comenzó a trabajar con las sales cristalinas del ácido tartárico obtenidas del vino. Observó que al recrystalizar una solución concentrada de tartrato de amonio y sodio, precipitaron dos clases distintas de cristales, que eran imágenes especulares entre sí. Empleando una lupa y pinzas, separó la mezcla cuidadosamente en dos porciones, a una le llamó “cristales derechos” y a la otra “cristales izquierdos”. La muestra original que contenía cristales derechos e izquierdos en proporción 50:50 era ópticamente inactiva y las soluciones de los cristales separados de cada porción eran ópticamente activas y sus rotaciones específicas eran de igual magnitud pero de signo opuesto [3]. Las sales del ácido tartárico que separó Pasteur son enantiómeros, tienen idénticas propiedades físicas y químicas excepto en su comportamiento frente a la luz polarizada o a reactivos quirales. Un enantiómero que gira el plano de la luz polarizada en el sentido de las agujas del reloj, es dextrógiro (+). El otro enantiómero que provoca rotación en el sentido contrario al de las agujas del reloj, es levógiro (-).

El concepto de quiralidad es fundamental en las moléculas biológicas ya que en los organismos vivos se encuentran generalmente presentes sólo uno de los enantiómeros. Por ejemplo, las proteínas están constituidas exclusivamente por la forma L de sus aminoácidos, en tanto que los hidratos de carbono están formados por unidades de azúcares exclusivamente de las formas enantiómeras D [4].

Al ser los sistemas biológicos enantioselectivos una sustancia racémica con propiedades farmacológicas podrá actuar de forma distinta según las interacciones entre el receptor y cada uno de los enantiómeros, pudiendo uno de ellos poseer la propiedad farmacológica y terapéutica y el segundo enantiómero presentar varias alternativas, como ser inactivo, que la propiedad terapéutica se presente en menor intensidad, una acción antagonista, un efecto no deseado o tóxico o, inclusive, una acción farmacológica totalmente diferente [5-7].

Por ejemplo la talidomina se prescribió como fármaco antinausea a mujeres embarazadas y fue suspendido su uso por el alto índice de teratogenicidad. Los estudios demostraron que la R-talidomida poseía el efecto antiémético y que la S-talidomida era la responsable del efecto teratogénico [8]. En este caso un enantiómero posee la actividad deseada y el otro posee una acción tóxica.

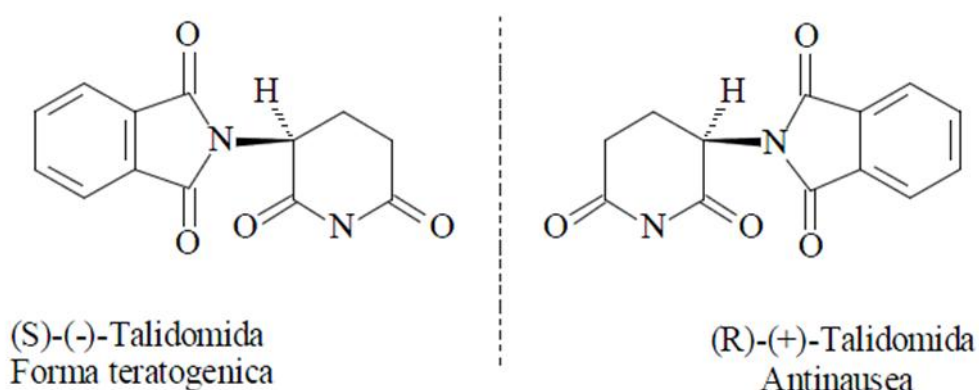


Figura 1.2 Los dos enantiómeros de la talidomida [9]

Como los enantiómeros tienen las mismas propiedades físicas y químicas, su separación requiere un mecanismo que reconozca su orientación óptica. Un método adecuado en cromatografía es la formación de complejos transitorios reversibles de diasterómeros, con un selector quiral adecuado. Para lograr una separación útil los complejos deben diferir en la estabilidad resultante, además las propiedades cinéticas de la formación/disociación del complejo debe ser rápida en la escala de tiempo cromatográfico para minimizar el ensanchamiento de banda y conseguir una resolución adecuada. [10]

Para explicar la formación de complejos diasterómeros entre los enantiómeros y el selector quiral, se utiliza el modelo de interacción de tres puntos, propuesto por Eason y Stedman en 1933 [11]. Los puntos de interacciones ocurren generalmente por

enlaces de hidrógeno, transferencia de carga (π - π), interacciones dipolo-dipolo, interacciones hidrofóbicas o electrostáticas entre los sustituyentes del selector quiral y los enantiómeros.

En la figura 1.3 puede verse como el enantiómero I forma una interacción de tres puntos con el selector quiral representada por las líneas verticales de puntos mientras que el enantiómero II puede formar solo una interacción de dos puntos porque el sustituyente C está en la configuración errónea para interactuar con el grupo complementario del selector quiral. El enantiómero I forma un complejo más estable con el selector quiral que el enantiómero II, y si la diferencia en la estabilidad de los complejos es suficiente, entonces los dos enantiómeros se separan siendo el enantiómero II menos retenido.

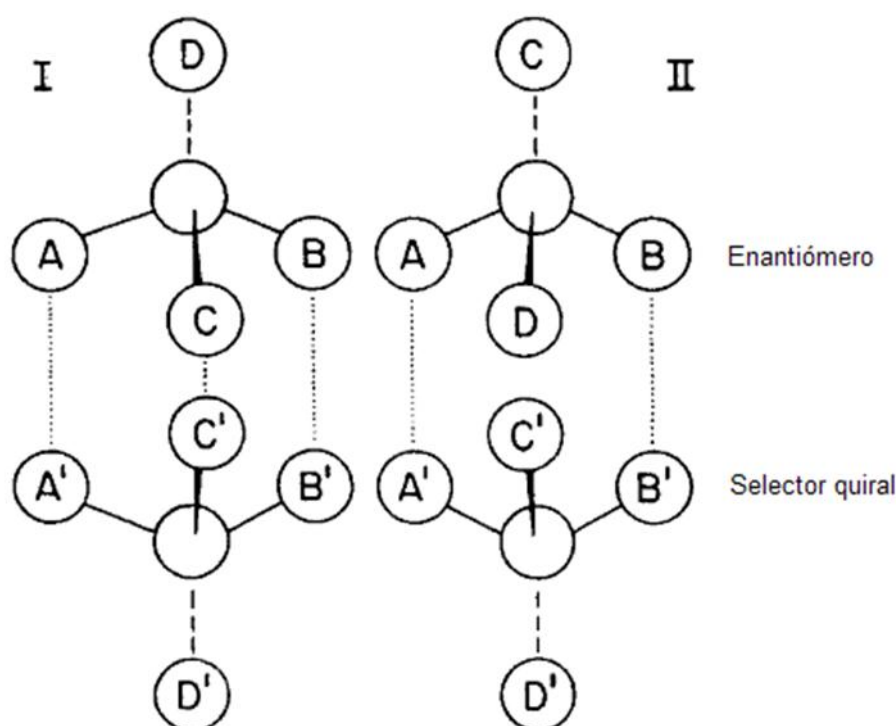


Figura 1.3 Modelo de interacción de tres puntos [10]

1.2 Separación de enantiómeros

Existen dos enfoques generales para la separación de los enantiómeros: el método directo y el indirecto [12-15]. El método directo se basa en la formación de complejos transitorios diastereoméricos con un selector quiral que se encuentra inmovilizado en la fase estacionaria, o agregado a la fase móvil. El método indirecto se basa en la reacción química de la mezcla racémica con un reactivo quiral para obtener un par diastereomérico.

1.2.1 Método indirecto:

Este enfoque es menos utilizado para la separación cromatográfica de enantiómeros. Consiste en el uso de sistemas convencionales de cromatografía después de la reacción de los enantiómeros con un reactivo quiral, formándose diastereoisómeros que difieren en su comportamiento físico y químico. Este método requiere que el enantiómero contenga un grupo funcional adecuado para la reacción. Los métodos indirectos generalmente requieren un mayor esfuerzo para la validación de métodos, debido a las fuentes adicionales de error como la pureza enantiomérica y estabilidad del reactivo quiral, las diferencias en las velocidades de reacción para los dos enantiómeros, las respuestas de diferentes detectores para los diastereómeros entre otros [10].

1.2.2 Método directo:

Se puede realizar utilizando fases estacionarias especiales o utilizando fases estacionarias convencionales con aditivos incluidos en la fase móvil, siendo más común utilizar selectores quirales inmovilizados en las fases estacionarias, esta aproximación es utilizada especialmente para separaciones a escala preparativa. En cromatografía de líquidos puede resultar más simple y flexible utilizar aditivos en la fase móvil, pero al no poder reutilizarse el selector, su costo es una variable a tener en cuenta [10]. En cromatografía gaseosa se utiliza el enfoque directo utilizando fases estacionarias quirales [16-18].

1.3 Fases estacionarias quirales

Las fases estacionarias quirales más utilizadas en cromatografía gaseosa son Chiral-Val (valina unida a polidimetilsiloxano) [19], [20], y las ciclodextrinas modificadas, de las cuales la octakis(3-O-butanoil-2,6-di-O-pentil)- γ -ciclodextrina (Lipodex E), ha sido utilizada exitosamente en la separación de metil ésteres de aminoácidos [21].

1.3.1 Ciclodextrinas

Las ciclodextrinas, también llamadas cicloamilosas, cicloglucanos o dextrinas de Schardinger, son oligosacáridos naturales macrocíclicos que contienen seis (α -), siete (β -), u ocho (γ -) monómeros de D-glucosa en la conformación de silla unidos a través de enlaces $\alpha - (1,4)$ [17], [18], [22-24]. Los anillos de glucosa están dispuestos en la forma de un cono truncado hueco con una cavidad relativamente hidrófoba y una superficie exterior polar donde están situados los grupos hidroxilos. La abertura más grande del cono está rodeada por los grupos hidroxilos secundarios (C-2 y C-3), mientras que los grupos hidroxilos primarios (C-6) están situados en el extremo más pequeño del cono y los grupos CH hacia dentro de la cavidad. En las ciclodextrinas puede distinguirse una parte externa hidrófila y una cavidad hidrófoba. Los grupos hidroxilos primarios (C-6) son libres de girar y parcialmente pueden bloquear la entrada a la cavidad más pequeña. La restringida libertad conformacional y la orientación de los grupos hidroxilo secundario que rodean el extremo opuesto de la cavidad se cree que desempeñan un papel importante en la enantioselectividad de las ciclodextrinas [25], [26].

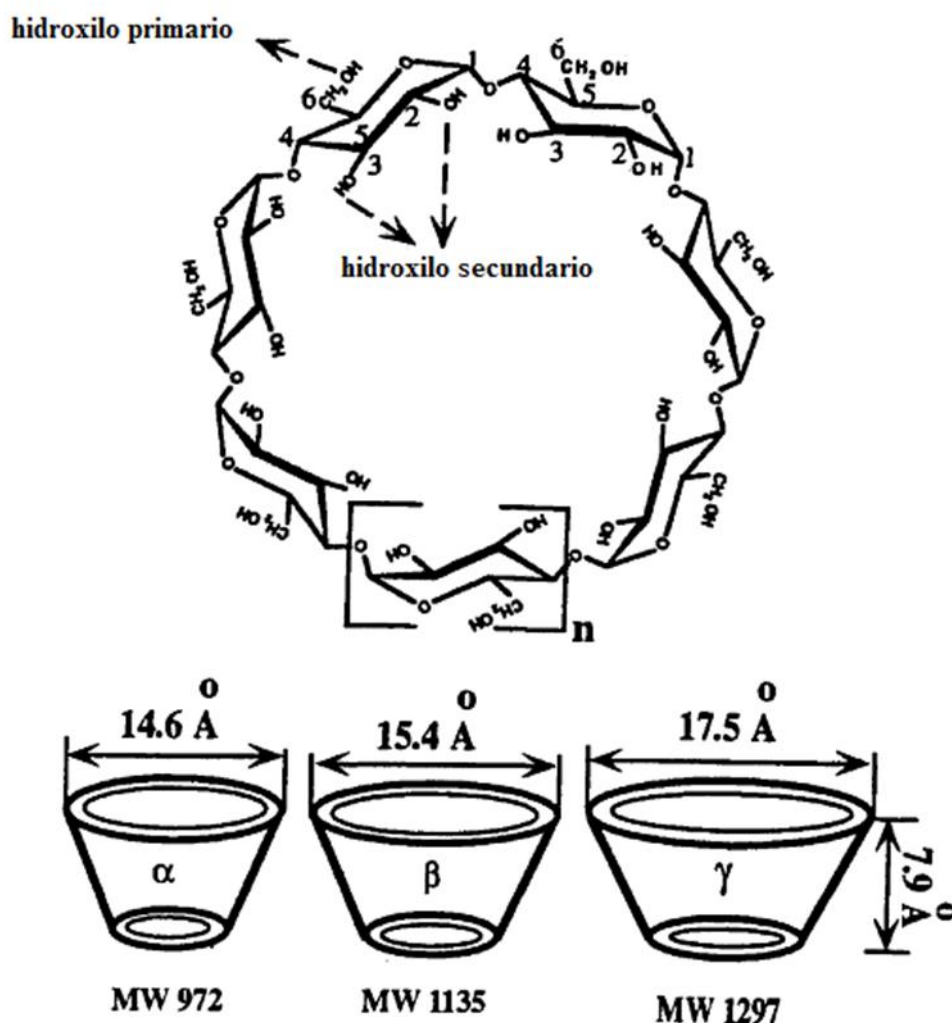


Figura 1.4 Estructuras de ciclodextrinas naturales que indican la posición de los grupos hidroxilo y las dimensiones de los conos. [10]

La derivatización de los grupos hidroxilos del borde exterior con diversos grupos funcionales ofrece un mecanismo simple para modificar las propiedades de las ciclodextrinas naturales, expandir su aplicación para la separación de enantiómeros y optimizar sus propiedades físicas para el uso como fases estacionarias [27].

La β-ciclodextrina permitilada fue empleada por primera vez como fase estacionaria quiral en 1987 [28], y desde entonces se ha convertido en una de las más utilizadas.

A continuación se introdujeron los permetiléteres de α - y γ -Ciclodextrinas, y sustituyentes como etilo, propilo, butilo, pentilo [29], trifluoroacetilo [30], terbutildimetilsililo [31], y derivados similares parcialmente hidroxilados [32].

1.4 Enantioseparación de aminoácidos

1.4.1 Aminoácidos

Los aminoácidos (Figura 1.5) son las unidades químicas constituyentes de las proteínas, y determinan muchas de las propiedades importantes de ellas. Están formados por un grupo amino y un grupo carboxilo unidos al mismo carbono, el carbono α , que está unido a su vez a un átomo de hidrogeno. El cuarto enlace es el que diferencia un aminoácido de otro.

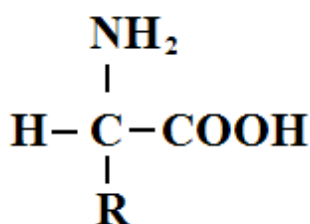


Figura 1.5 Estructura general de un aminoácido

Se conocen cientos de aminoácidos pero solo 20 forman parte de las proteínas. Mientras que las plantas son capaces de sintetizarlos, los animales están limitados a la síntesis de algunos, los no esenciales, que son alanina, prolina, glicina, serina, cisteína, asparagina, glutamina, tirosina, ácido aspártico y ácido glutámico. Los aminoácidos esenciales son aquellos que no pueden ser sintetizados en el organismo, y por lo tanto deben incorporarse en la dieta. Estos son valina, leucina, treonina, lisina, triptófano, histidina, fenilalanina, isoleucina, arginina, metionina.

El grupo funcional unido al carbono α (R), es diferente para cada aminoácido y se los puede clasificar como:

- Grupos R apolares alifáticos: pertenecen a este grupo glicina, alanina, prolina, valina, leucina, isoleucina, metionina.
- Grupos R polares sin carga: pertenecen a este grupo la serina, treonina, cisteína, asparagina y glutamina.

- Grupos R aromáticos: pertenecen a este grupo fenilalanina, tirosina, triptófano.
- Grupos R cargados positivamente: pertenecen a este grupo fenilalanina, arginina e histidina
- Grupos R cargados negativamente: pertenecen a este grupo aspartato y glutamato.

1.4.2 Importancia de la enantioseparación de aminoácidos

A partir de los aminoácidos los diferentes organismos pueden fabricar productos tan diversos como enzimas, hormonas, anticuerpos, neurotransmisores y una gran cantidad de otras sustancias con actividad biológica distinta, es por ello que debido a su importante papel en muchos procesos metabólicos los aminoácidos pueden ser utilizados como marcadores que permiten la detección de algunas enfermedades [33-36]. Por otra parte, en las distintas etapas de preparación de los alimentos procesados puede ocurrir racemización de los mismos, al igual que en los productos alimenticios de origen biotecnológico, como bebidas fermentadas y productos lácteos [37-39], esto conlleva a la aparición de D-aminoácidos cuya importancia biológica en la alimentación debe ser estudiada [40].

El kéfir es una leche fermentada que posee beneficios para la salud que incluyen propiedades restauradoras de la flora bacteriana y la mucosa del estómago, la reducción de los síntomas de intolerancia a la lactosa, estimulación del sistema inmune y reduce el colesterol, además posee propiedades antimutagénicas y antitumorales [41-44]. Por esto se ha convertido en un importante producto lácteo y en consecuencia resulta interesante realizar la caracterización enantiomérica de los aminoácidos presentes en él y su variabilidad durante los procesos de preparación y conservación a los que es sometido.

1.5 Reacción de derivatización

Los enantiómeros de aminoácidos pueden ser determinados mediante cromatografía gaseosa previamente derivatizados para convertirlos en analitos volátiles, lo que los convierte en solutos adecuados para la separación por CG. Al seleccionar los posi-

bles reactivos de derivatización es importante considerar que los derivados deberán tener la mayor presión de vapor posible para eluirlos a temperaturas relativamente bajas por dos razones: se incrementan las enantioresoluciones y además, las fases quirales no soportan excesivas temperaturas [45]. Una buena elección son los reactivos fluorados. La derivatización con reactivos fluorados permite no solo una mayor volatilidad, sino también obtener una mayor señal en la ionización química si se utiliza como detector un espectrómetro de masas [46].

El método de derivatización seleccionado se basa en el tratamiento de los aminoácidos con una mezcla de cloroformiato-alcohol-piridina, para obtener los N(O,S)-alquil alcoxicarbonil ésteres de aminoácidos. Este método fue introducido por Husek y Maccel [47] y luego se realizaron investigaciones para desarrollar métodos cuantitativos y reproducibles de aminoácidos en distintas matrices [48], [49], [46].

Este procedimiento ofrece muchas ventajas experimentales:

- Es una reacción de una etapa; en un solo paso, es posible esterificar el grupo carboxílico y al mismo tiempo proteger los grupos amino y otros susceptibles de sustitución nucleofílica, para producir derivados alcoxi carbonilo.
- Se produce en un medio acuoso: esto significa que el análisis puede realizarse directamente en la matriz acuosa y, por tanto, se puede omitir la etapa de extracción.
- Es prácticamente instantánea: la reacción transcurre suavemente y rápidamente, en casi 60 s, con agitación vigorosa.
- Se produce a temperatura ambiente bajo condiciones suaves: estas condiciones (es decir, las bajas temperaturas de reacción y suaves condiciones ácidas o básicas) evitan fenómenos de racemización y permite una correcta determinación de excesos enantioméricos.
- Los reactivos empleados están comercialmente disponibles, son de bajo costo y fáciles de manejar.

El mecanismo de reacción de un aminoácido con un cloroformiato en un medio de reacción que contiene un alcohol, propuesto por Wang [48], puede ser descrito como se muestra en la figura 1.6:

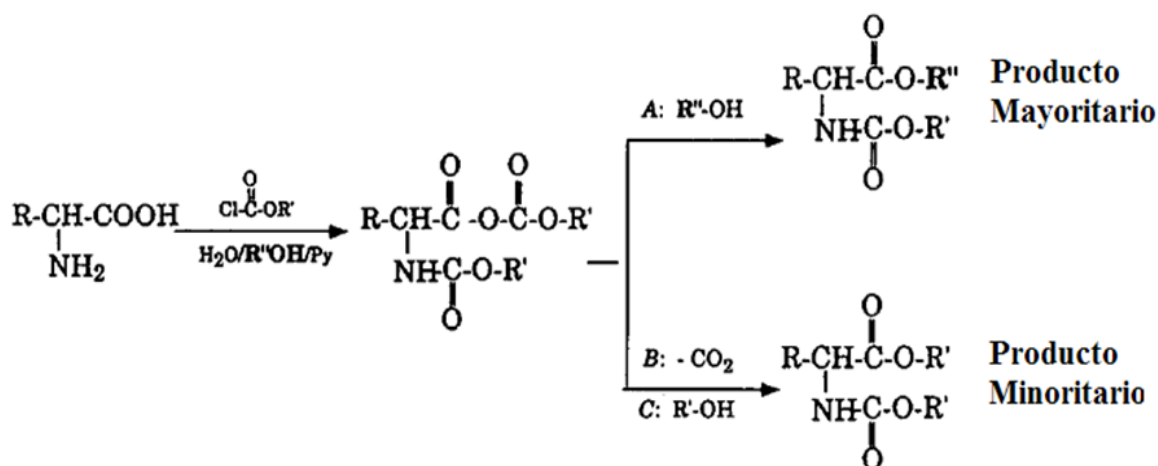


Figura 1.6 Mecanismo de reacción de la derivatización de un aminoácido con un cloroformiato en un medio de reacción con $\text{H}_2\text{O}/\text{ROH}/\text{Py}$ [48]

El tipo de éster formado durante el proceso de derivatización con reactivos cloroformiatos depende directamente del tipo de alcohol presente en el medio de reacción. Cuando se utiliza un alcohol con un grupo alquílico distinto del alquilo del cloroformiato, el grupo alcoxi encontrado en el derivado de éster se corresponde con el alcohol del medio de reacción, y no con el del grupo alquílico del cloroformiato [48].

El resultado del trabajo de Wang es consistente con un mecanismo de intercambio anhídrido mixto del alcohol para la derivatización del grupo carboxilo. El anhídrido mixto reacciona con el alcohol en el medio de reacción y se produce una reacción de intercambio dando el producto mayoritario (como se observa en la vía A de la figura 1.6). Se puede encontrar un producto minoritario en el que el grupo alquilo es el mismo que en el reactivo cloroformiato. Puede ocurrir también una decarboxilación del anhídrido mixto dando lugar al producto minoritario (vía B de la figura 1.6). También es posible, sin embargo, que el anhídrido mixto reaccione con una pequeña

cantidad de alcohol (que tiene el mismo resto R que el del cloroformiato) producido in situ a partir de la hidrólisis del cloroformiato en el medio de reacción (vía C de la figura 1.6).

A pesar de la versatilidad y amplio espectro de sustancias que pueden ser enantioméricamente resueltas en las columnas quirales con Lipodex E, no se ha encontrado descrito en la literatura el uso de esta reacción para la derivatización de aminoácidos y su posterior separación en dichas columnas.

1.6 Referencias

- [1] McMurry, J. *“Química orgánica”* Thomson , 6ta ed 2004, 277-282
- [2] Biot, J.B., *Phénomènes de polarization successive, observés dans des fluides homogènes* Bull. Soc. Philomatique 1815, 190-192
- [3] Pasteur, L., *Memoires sur la relation qui peut exister entre la forme cristalline et la composition chimique, et sur la cause de la polarization rotatoire.* Comptes Rendues de l'Academie des Sciences 1848, 26, 535-538
- [4] Lehninger, A.L., *“Principios de bioquímica”* Ediciones Omega, 4ta ed., 2006, p. 20
- [5] Gillespie, L.J.; Oates, J.A.; Crout, J. R. ; Sjoerdsma, A., *Clinical and chemical studies with α -methyl-dopa in patients with hypertension.* Circulation 1962, 25, (2), 281-291
- [6] Franz, P.M.; Anliker, S.L.; Callaghan, J.T.; DeSante, K.A.; Dhahir, P. H.; Nelson, R.L.; Rubin, A.; *Disposition in humans of racemic piceadol, an opioid analgesic.* Drug Metab Dispos 1900, 18, (6), 968-973
- [7] Triggle, D.J., *On the other hand: The stereoselectivity of drug action at ion channels.* Chirality 1994, 6, (2), 58-62
- [8] Blaschke, G.; Kraft, H. P.; Markgraf, H., *Chromatographic resolutions of racemates. X. Optical resolution of thalidomide and other glutarimide derivatives.* Chem. Ber. 1980, 113, 2318-2322
- [9] Keunchkarian, S. Tesis doctoral. *Estudio cromatográfico de asociación entre solutos y selectores quirales en fase móvil.* Universidad Nacional de La Plata. 2009
- [10] Poole, C. *“The essence of chromatography”* Elsevier 1er ed 2003, Capítulo 10
- [11] Easson, L. H.; Stedman, E., *Studies on the relationship between chemical constitution and physiological constitution. V Molecular dissimetry and physiological activity.* Biochem. J 1933, 27, 1257-1266
- [12] Lough, W.J. (Ed.), *Chiral Liquid Chromatography*, Blackie, Glasgow, 1989

- [13] Wainer, I.W. (Ed.), *Drug Stereochemistry: Analytical Methods in Pharmacology*, Dekker, New York, NY, 1993
- [14] Subramanian, G. (Ed.), *A Practical Approach to Chiral Separations by Liquid Chromatography*, Wiley-VCH, Weinheim, 1994
- [15] Schreier, P., Bemreuther, A., Huffer, M. *Analysis of Chiral Organic Molecules - Methodology and Applications*, Walter de Gruyter, Berlin, 1995
- [16] Schurig, V. *Practice and theory of enantioselective complexation gas chromatography* J. Chromatogr. A 2002, 956, 315-356
- [17] Wilson, I.D., Adlard, E. R., Cooke, M. Poole, C. F. (Eds.), *Encyclopedia of Separation Science*, Academic Press, London, vol. 5, 2000
- [18] König, W. A. *Gas Chromatographic Enantiomer Separation with Modified Cyclodextrins*, Huthig, Heidelberg, 1992
- [19] Nicholson, G.J., Frank, H., Bayer, E. *Glass capillary gas chromatography of amino acid enantiomers*. Journal of High Resolution Chromatography, 1979. 2(7), 411-415
- [20] Abe, I., Kuramoto, S., Musha, S. *Heliflexchirasil-Val; GC of amino acid enantiomers*. Journal of High Resolution Chromatography, 1983. 6(7), 366-370
- [21] König, W.A., Lutz, S., Hagen, M., Krebber, R., Wenz, G., Baldenius, K., Ehlers, J., Dieck, H.T. *Cyclodextrins as chiral stationary phases in capillary gas chromatography. Part IV: Heptakis(2,3,6-tri-O-pentyl)- β -cyclodextrin*. Journal of High Resolution Chromatography, 1989. 12, 35-39
- [22] Subramanian, G. (Ed.), *A Practical Approach to Chiral Separations by Liquid Chromatography*, Wiley-VCH, Weinheim, 1994
- [23] Valko, K. (Ed.), *Separation Methods in Drug Synthesis and Purification*, Elsevier, Amsterdam, 2000
- [24] Beesley, T. E., Scott, R. R. W. *Chiral Chromatography*, Wiley, Chichester, 1998

- [25] Schuring, V., Nowotny, J. *Gas Chromatographic Separation of Enantiomers on Cyclodextrin Derivatives*, J. Chromatogr. 1990, 939 – 957
- [26] Juvancz, Z., Szejtli, J. *The role of cyclodextrins in chiral selective chromatography*, Trends Anal. Chem. 2002, 21, 379-388
- [27] Snopek, J., Smolková, E., Cserhádi, T., Gahm, K., Stalcup, A., *Cyclodextrins in analytical separation methods*. Pergamon, 1996.3: p. 516-571
- [28] Juvancz, Z., Alexander, G., Szejtli, J. *Permethyated b-cyclodextrin as stationary phase in capillary gas chromatography* J. HRC 1987, 10, 105-107
- [29] Wencz, G., Mischnik, P., Krebber, A., Richters, M., König, W. A. *Preparation and characterization of per-O-pentylated cyclodextrins* J. HRC 1990, 13, 724-728
- [30] Li, W. Jin, H.L., Armstrong, D. W., *2,6-Di-O-pentyl-3-O-Trifluoroacetyl Cyclodextrin Liquid Stationary Phases for Capillary Gas Chromatographic Separation of Enantiomers*, J Chromatogr 1990, 509, 303-324
- [31] Blum, W., Aischolz, R. *Gas chromatographic enantiomer separation on tert-butyl-dimethylsilylated b-cyclodextrin diluted in PS-086. A simple method to prepare enantioselective glass capillary columns*, J. HRC 1990, 13, 515-518
- [32] Armstrong, D. W., Li, W. Y., Pitha, J., *Reversing Enantioselectivity in Capillary Gas Chromatography with Polar and Nonpolar Cyclodextrin Derivative Phases* Anal Chem 1990, 62, 214-217
- [33] Chan, D.L., Rozanski, E. A., Freeman, L. M., *Relationship among Plasma Amino Acids, C-Reactive Protein, Illness Severity, and Outcome in Critically Ill Dogs*. Journal of Veterinary Internal Medicine 2009, 23, 559-563.
- [34] Ranjan, P., Gupta, A., Kumar, S., Gowda, G.A., Ranjan, A., Sonker, A.A., Chandra, A. Ramakant, *Detection of new amino acid markers of liver trauma by proton nuclear magnetic resonance spectroscopy* Liver International, 2006. 26(6): 703-707
- [35] Ohnuma, T., Sakai, Y., Maeshima, H., *Changes in plasma glycine, l-serine, and d-serine levels in patients with schizophrenia as their clinical symptoms improve: Re-*

sults from the Juntendo University Schizophrenia Projects (JUSP). Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry, 2008. 32(8): p. 1905-1912)

[36] Hashimoto, K., Engberg, G., Shimizu, E., Nordin, C., Lindström, L. H., Iyo, M., *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry, 29 (2005) 767–9*

[37] Bruckner, H. Hausch, M. in: *Chirality and Biological Activity*, Alan R. Liss, New York, 1990, p. 129

[48] Bruckner, H., Becker, D., Lüpke, M. *Chirality of amino acids of microorganisms used in Food Biotechnology Chirality 5 (1993) 385*

[39] Lüpke, M., Brückner, H., *Gas chromatographic evaluation of amino acid epimerisation in the course of gelatin manufacturing and processing, Z. Lebensm. Unters.Forsch.A 206 (1998) 323-328*

[40] Friedman, M., *Origin, Microbiology, Nutrition, and Pharmacology of D-Amino Acids. Chemistry & Biodiversity 2010. 7(6): p. 1491-1530*

[41] Chen, T.H., Wang, S.Y., Chen, K.N., Liu, J.R., Chen, M.J. *Microbiological and chemical properties of kefir manufactured by entrapped microorganisms isolated from kefir grains. Journal of dairy science, 2009. 92(7): p. 3002-3013*

[42] Shiomi, M., Sasaki, K., Murofushi, M., Aibara, K. *Antitumor activity in mice of orally administered polysaccharide from Kefir grain. Japanese J. Med. Sci. Biol. 1982, 35, 75-80*

[43] Garrote, G.L., Abraham, A., De Antoni, G. L., *Chemical and microbiological characterisation of kefir grains .Journal of Dairy Research, 2001. 68(04): p. 639-652*

[44] Guzel-Seydim, Z. B., Kok-Tas, T., Greene, A. K., Seydim, A. C. *Review: Functional properties of kefir. Critical Reviews in Food Science and Nutrition 2011, 51:3 261-268*

[45] Schurig, V., *Separation of enantiomers by gas chromatography. J. Chromatogr. A, 2001. 906, 275-299*

- [46] Casal, S., Oliviera, M.B., Ferreira, M. A. *Gas chromatographic quantification of amino acid enantiomers in food matrices by their N(O,S)-ethoxycarbonylheptafluorobutyl ester derivatives*. J. Chromatogr. A, 2000, 866, 221-230
- [47] Husek, P., Macek, K. *Gas chromatography of amino acids* J. Chromatogr. 1975, 113, 139-230.
- [48] Wang, J., Huang, Z.-H., Gage, D. A., Watson, J. T. *Analysis of amino acids by gas chromatography–flame ionization detection and gas chromatography–mass spectrometry: simultaneous derivatization of functional groups by an aqueous-phase chloroformate-mediated reaction* J. Chromatogr. A 1994, 663, 71-78
- [49] Abe, I., Fujimoto, N., Nishiyama, T., Terada, K., Nakahara, T. *Rapid analysis of amino acid enantiomers by chiral-phase capillary gas chromatography* J. Chromatogr. A 1996, 722, 221-227

Capítulo 2

Experimental

2.1 Materiales

- Columna cromatográfica.

Columna comercial de 25 metros de longitud 250 μm de diámetro interno de marca Macherey-Nagel, LIPODEX-E.

- Cromatógrafo gaseoso

El equipo utilizado es un HP 6890+, con control automático de la neumática, N_2 como gas portador y detector de ionización de llama (FID). El sistema de adquisición y análisis de datos está conformado por el software CSW en una PC Pentium con 32 Mb de RAM.

- Reactivos derivatizantes

Para realizar la derivatización de los aminoácidos se utilizaron los siguientes agentes derivatizantes: cloroformiato de etilo, cloroformiato de isobutilo, cloroformiato de metilo, cloroformiato de clorometilo.

- Solventes

En el desarrollo experimental de esta tesina se utilizaron los siguientes solventes: etanol, piridina, agua desionizada obtenida con un sistema de purificación Milli-Q "Millipore", cloroformo, fluoroetanol, perfluoroexanol, tetradecano.

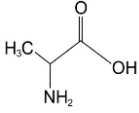
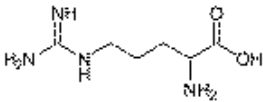
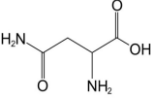
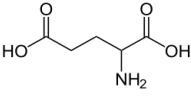
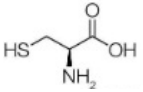
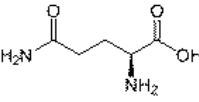
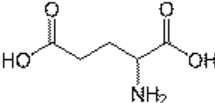
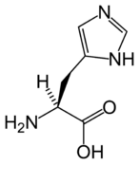
- Estándares de aminoácidos

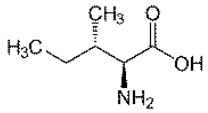
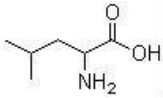
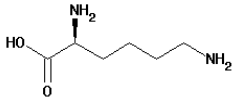
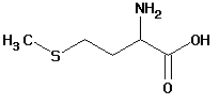
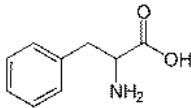
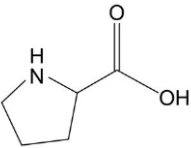
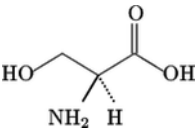
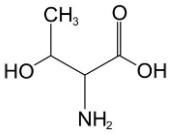
En la tabla 2.1 se detalla la estructura y la abreviatura de los aminoácidos utilizados en este trabajo.

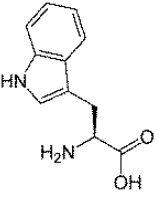
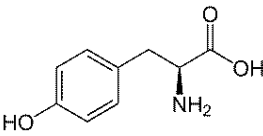
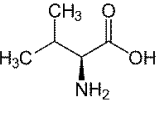
- Muestra de Kefir

Se trabajó con dos tipos de muestras de kéfir, las cuales fueron preparadas y otorgadas por el grupo KEFIR UNLP CIDCA. La muestra 1 consiste en gránulos CIDCA AGK1 crecido en permeado de suero resuspendido al 5% estéril. Se colocan 10 g de gránulo cada 100 ml de leche, se incuba durante 24 hs a 30 °C. Luego se cuele y se recuperan los gránulos. El pH de la muestra 1 fue de 4,25. La muestra 2 se prepara con los mismos gránulos de kéfir CIDCA AGK1 en leche UAT descremada. El modo de preparación fue el mismo que para la muestra 1, y el pH=4,03.

Tabla 2.1 Estructura y abreviatura de los aminoácidos usados

Aminoácido	Estructura	Abreviatura
DL-Alanina		Ala
DL-Arginina		Arg
DL-Asparagina		Asn
DL-Aspártico		Asp
DL-Cisteína		Cys
L-Glutamina		Gln
DL-Glutámico		Glu
DL-Histidina		His

DL-Isoleucina		Ile
DL-Leucina		Leu
DL-Lisina		Lys
DL-Metionina		Met
DL-Fenilalanina		Phe
DL-Prolina		Pro
DL-Serina		Ser
DL-Treonina		Thr

DL-Triptofano		Trp
DL-Tirosina		Tyr
DL-Valina		Val

- Tubos Eppendorf
- Micropipetas Eppendorf de 200 μL y 1000 μL
- Jeringa de inyección Hamilton de 10 μL
- Balanza analítica
- Centrífuga
- Estufa

2.2 Métodos

2.2.1 Derivatización

La reacción de derivatización se basa en el tratamiento de los aminoácidos con cloroformatos de alquilo.

Procedimiento: se pesan alrededor de 100 μg de aminoácidos en un tubo Eppendorf de 1.5 ml y se agregan 100 μl de agua-etanol-piridina (60:32:8), 6 μl del cloroformiato. Se agita durante 5 segundos y se extrae el analito derivatizado con 100 μl de cloroformo que contiene 1% del cloroformiato correspondiente. La capa de cloroformo

se ve limpia y la fase acuosa se vuelve opaca. Se inyecta en la columna capilar una alícuota de la fase orgánica [1].

2.2.2 Medidas cromatográficas

Se utilizó un cromatógrafo de gases HP 6890 con detector FID. El gas portador fue nitrógeno de grado cromatográfico. Se hicieron inyecciones en modo "Split" con una relación 1/20, la temperatura del inyector fue fijada en 200°C y la del detector a 250°C, se operó a flujo constante. Se utilizó metano para estimar el tiempo muerto.

Para realizar la cuantificación de los derivados de aminoácidos en las muestras de kéfir se utilizó un gradiente de temperatura. Inicialmente la temperatura fue de 100°C y se calentó a una velocidad de 2°C/min hasta 115°C, se mantuvo la temperatura constante durante 25 minutos, se realizó un nuevo calentamiento hasta 145°C a 1°C/min, luego se disminuyó la velocidad de calentamiento a 0,5°C/min hasta 155°C, de 155°C a 160°C se calentó a 1°C/min y por último se calentó de 160°C a 185°C a 2°C min.

2.2.3 Preparación de patrones

Se preparó una solución patrón conteniendo 12 aminoácidos. Para ellos se pesó una cantidad conocida de cada uno de los aminoácidos y se llevó a un volumen final de 10 ml con una solución 60:32:8 de H₂O:EtOH:piridina.

Tabla 2.2 Concentración de los patrones usados

Patrones	mg	Patrón (mg/l)
DL-Alanina	9,5	950
DL-Asparagina	11,7	1170
DL-Aspártico	9,1	910
DL-Cisteína	10,1	1010
D-Glutámico	5	500
L-Glutámico	5,4	540
DL-Isoleucina	10,1	1010
D-Leucina	4,8	480
L-Leucina	5,5	550
DL-Metionina	9,7	970
DL-Prolina	9,1	910
DL-Serina	11	1100
DL-Treonina	9,5	950
DL-Valina	12,3	1230
D-Histidina	8,6	860
L-Histidina	4,9	490

2.2.4 Preparación de la muestra

Para remover impurezas que puedan interferir en la separación fue necesaria una limpieza a través de una columna de intercambio iónico. La resina de intercambio catiónico fuerte Dowex 50w-X12 se colocó en un vaso de precipitado, se lavó con NH_4OH 7 N por agitación durante 1 h. Esto se repitió dos veces, luego se lavó con agua desionizada, se agregó un exceso de 3 N HCl y se agitó muy lentamente. Después de 1 h, la resina se lavó con agua desionizada hasta pH neutro. La resina tratada se introdujo en las columnas con cuidado, sin que queden burbujas de aire [2].

A 10 ml de muestra se le agregaron alícuotas (0 – 200 μl) de la solución patrón, 20 μl de tricloroacético y se centrifugó durante 15 minutos a 4200 rpm. El sobrenadante se colocó en la columna de intercambio iónico sin perturbar el lecho de la columna. Las impurezas se lavaron haciendo pasar 10 ml de agua desionizada a través de la columna. Los aminoácidos se eluyeron luego con 10 ml de NH_4OH 7N. Se lavó

la columna con agua desionizada y se regeneró con HCl 3 N. Luego se llevó a sequedad en estufa a 40° C y con burbujeo de N₂.

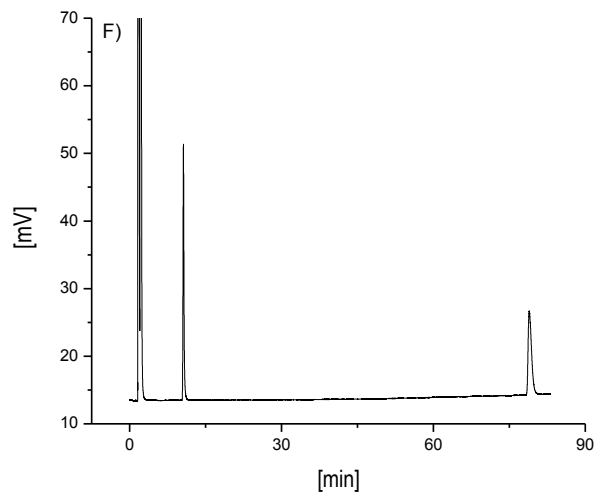
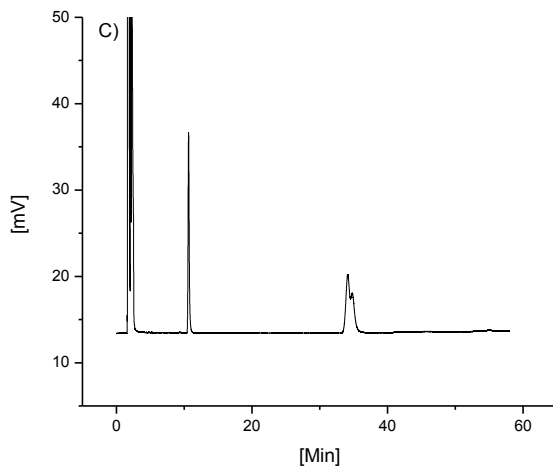
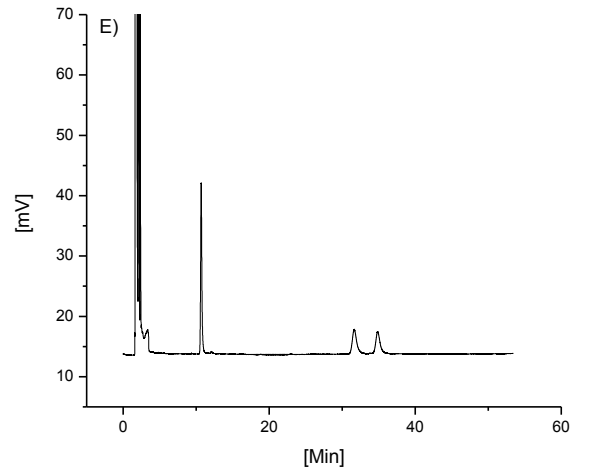
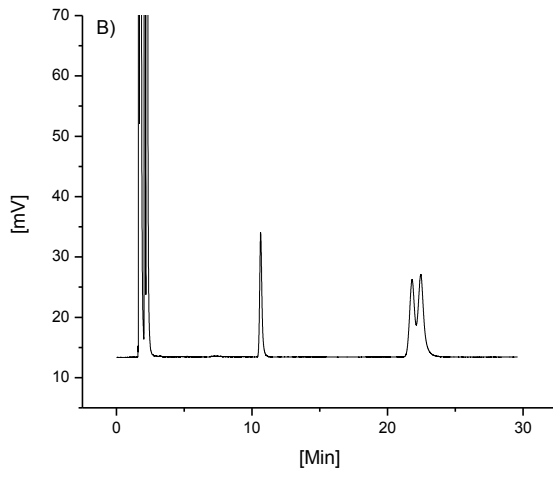
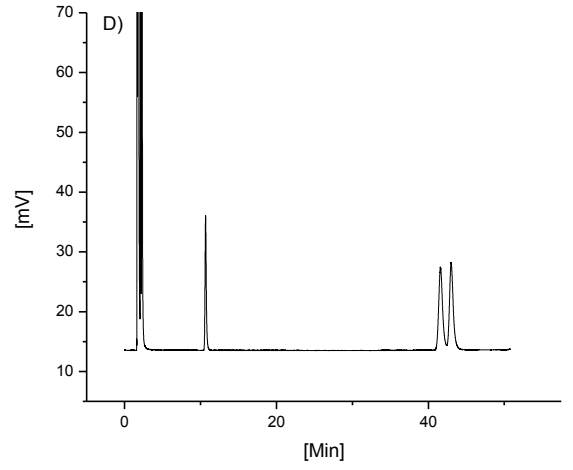
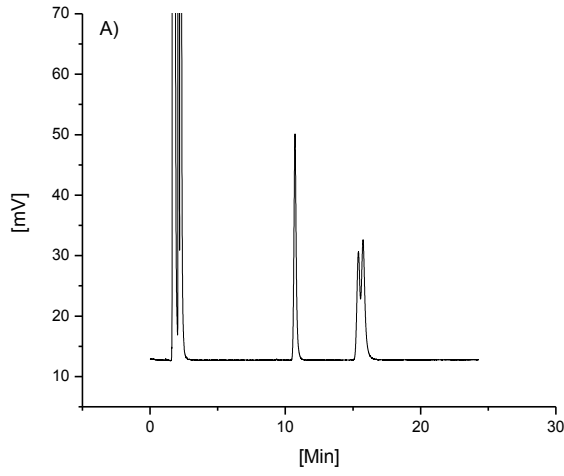
2.2.5 Identificación

La identificación se llevó a cabo utilizando los tiempos de retención (tr) correspondientes a los picos cromatográficos de los patrones.

Tabla 2.3 Tiempos de retención

patrones	tr
D-Alanina	15,40
L-Alanina	15,74
D- Asparagina	72,1
L-Asparagina	73,02
D-Aspártico	67,43
L-Aspártico	69,03
DL-Cisteína	97,82
DL-Glutámico	79,56
DL-Isoleucina	31,63
L-Isoleucina	34,85
D-Leucina	34,13
L-Leucina	34,79
DL- metionina	78,33
D-Prolina	41,57
L-Prolina	42,98
D-Serina	70,33
L-Serina	71,77
DL treonina	64,64
L-Treonina	67,83
D-Valina	21,81
L-Valina	22,45

Los cromatogramas correspondientes se muestran en la Figura siguiente:



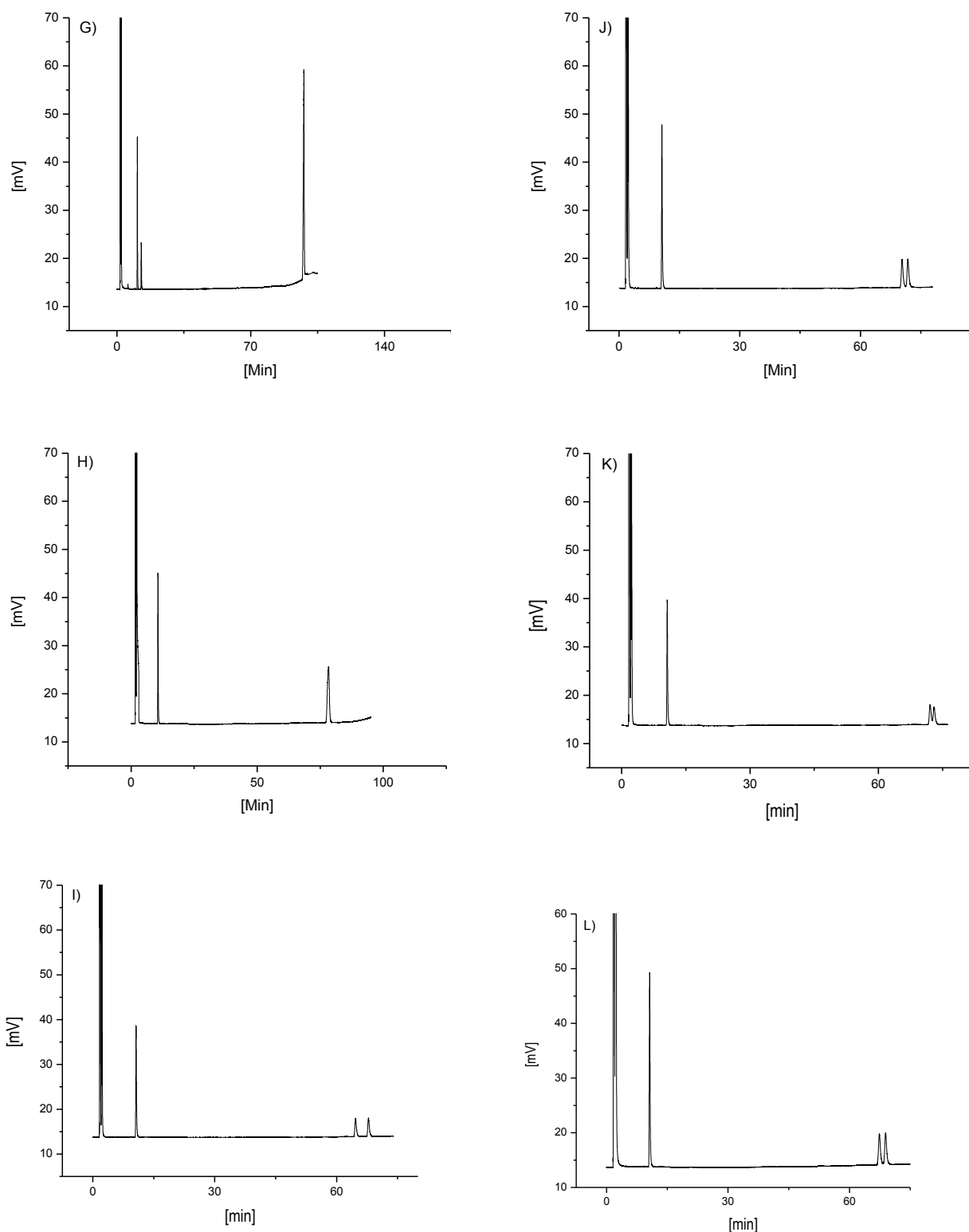


Figura 2.1 Cromatogramas de los patrones. A) D- y L-Alanina, B) D- y L-Valina, C) D- y L-Leucina, D) D- y L-Prolina, E) D- y L-Isoleucina, F) DL-Glutámico, G) DL-Cisteína, H) DL-Metionina, I) D- y L-Treonina, J) D- y L-Serina, K) D- y L-Asparagina, L) D- y L-Aspártico.

2.2.6 Cuantificación

La cuantificación se llevó a cabo utilizando n-tetradecano como estándar interno. Para su preparación se tomaron 10 µl de tetradecano en 10 ml de cloroformo que contiene 1% cloroformiato de etilo. Se construyeron rectas de calibrado tomando los cocientes entre las alturas de los picos de cada compuesto y la del patrón interno frente a la concentración de cada compuesto en la mezcla.

La derivatización se realizó por triplicado de cada uno de los niveles de concentración, se inyectó en el cromatógrafo y se construyeron las rectas de calibrado.

2.3 Cifras de mérito

Las cifras de mérito son valores numéricos basados en una o más características de un sistema o dispositivo que representan una medida de su eficiencia o efectividad [3].

Cifras de mérito:

- Linealidad del sistema
- Exactitud del método
- Precisión del método
- Límite de detección y de cuantificación

2.3.1 Linealidad del sistema

La linealidad de un procedimiento analítico se define como su capacidad dentro de un intervalo para obtener resultados que sean directamente proporcionales, o por medio de una transformación matemática bien definida.

Se recomiendan estudiar al menos 5 niveles de concentración y analizarlas por triplicado, con un total de 15 determinaciones.

Para su evaluación se prepararon 5 concentraciones de cada uno de los 12 aminoácidos seleccionados.

2.3.2 Exactitud

La exactitud es la cercanía del valor analítico al "valor verdadero" de concentración del compuesto de interés en el material bajo examen. En general se requiere que el valor medido no difiera significativamente del aceptado como referencia.

2.3.3 Precisión

La precisión se refiere a la cercanía de una serie de medidas entre sí. Para determinarlo se calcula el error estándar relativo (RSD), el cual no debe ser mayor al 15% para que el método sea considerado preciso, en los niveles inferiores de concentración se acepta hasta un 20%.

$$RSD = \frac{S_i}{\bar{X}_i} \times 100 \quad (2.1)$$

$$\bar{X} = \frac{\sum_{i=1}^n X_i}{n} \quad (2.2)$$

$$S_i = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2}{n-1}} \quad (2.3)$$

2.3.4 Límite de detección y límite de cuantificación

El límite de detección se define como la cantidad o concentración mínima de sustancia que puede ser detectada con fiabilidad por un método analítico determinado (se tiene una cierta confianza de que el analito está presente). Se lo define como:

$$LOD = 3,3S_0 \quad (2.4)$$

$$S_0 = \frac{S_{Y/X}}{A} \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{1}{M} + \frac{\bar{X}^2}{Q_{XX}}} \quad (2.5)$$

$S_{Y/X}$ = desvío estándar de la regresión

A= pendiente

n= número de réplicas

M= número total de muestras de calibrado

\bar{X} = concentración media de calibrado

Q_{XX} = suma de cuadrados de X.

El límite de cuantificación es a la cantidad o concentración del analito a partir de la cual es confiable realizar determinaciones cuantitativas. Se lo define como:

$$LOQ = 10S_0 \quad (2.6)$$

2.4 Referencias

[1] Husek, P. *Rapid derivatization and gas chromatographic determination of amino acids*, J.Chromatogr. A 1991, 552, 289-299

[2] Nair, B. M., Gas-liquid chromatographic analysis of amino acids in food samples, J. Agric. Food Chem. 1977, 25, 614-620

[3] Olivieri, A. C., Goicoechea, H. C. *La Calibracion en Quimica Analitica*,
Universidad Nacional del Litoral, 2007

Capítulo 3

Resultados y discusión

3.1 Optimización del método

En primer lugar se realizaron distintas combinaciones de alcohol/cloroformiato para optimizar la detectabilidad y enantioseparación de los aminoácidos derivatizados en una columna Lipodex E a temperaturas inferiores a los 200°C.

Se combinó el ECF con distintos alcoholes (etanol, perfluoroetanol, 1 H,1H,2H,2H perflurohexanol) y por otro lado se combinó el etanol con diversos cloroformiatos (metilcloroformiato, isobutilcloroformiato y clorometilcloroformiato).

Combinación Etilcloroformiato (ECF)/ Etanol (EtOH):

En la Tabla 3.1 se informan los resultados cromatográficos de esta serie de experimentos.

Tabla 3.1 Valores de retención, selectividad y resolución para los derivados obtenidos con la combinación etilcloroformiato/etanol

Aminoácido	T °C	k1	k2	α	Rs
DL-Alanina	120	5,50	5,63	1,02	0,55
DL-Arginina	No eluye				
DL-Asparagina	150	11,55	12,00	1,04	0,86
DL-Aspártico	150	10,43	10,97	1,05	1,30
DL-Cisteína	160	24,11	-	1,00	-
DL-Glutámico	150	17,73	-	1,00	-
DL-Histidina	190	35,28	-	1,00	-
DL-Isoleucina	150	3,00	3,22	1,07	1,50
DL-Leucina	120	13,99	14,39	1,03	0,63
DL-Lisina	No eluye				
DL-Metionina	150	16,35	-	1,00	-
DL-Fenilalanina	No eluye				
DL-Prolina	130	11,14	11,75	1,05	1,22
DL-Serina	150	10,82	11,42	1,06	1,36
DL-Treonina	150	8,18	9,20	1,12	2,89
DL-Triptofano	No eluye				
DL-Tirosina	No eluye				
DL-Valina	120	8,74	9,04	1,03	0,62

Combinación Cloroformiato de isobutilo (IbuCF)/EtOH:

En la Tabla 3.2 se informan los resultados cromatográficos de esta serie de experimentos.

Tabla 3.2 Valores de retención, selectividad y resolución para los derivados obtenidos con la combinación isobutilcloroformiato/etanol.

aminoácido	T° C	k1	k2	α	Rs
DL-Alanina	120	12,32	12,64	1,03	0,62
DL-Arginina	No eluye				
DL-Asparagina	150	21,76	22,31	1,03	0,61
DL-Aspártico	150	21,46	22,56	1,05	1,25
DL-Cisteina	150	3,61	-	1,00	-
	140	5,55	-	1,00	-
	130	8,74	-	1,00	-
DL-Glutámico	150	18,52	-	1,00	-
DL-Histidina	No eluye				
DL-Isoleucina	150	6,53	7,02	1,07	1,70
DL-Leucina	120	31,00	31,98	1,03	0,66
DL-Lisina	No eluye				
DL-Metionina	150	33,31	-	1,00	-
DL-Fenilalanina	170	21,58	-	1,00	-
DL-Prolina	130	22,61	23,80	1,05	1,32
DL-Serina	150	22,77	23,84	1,05	1,14
DL-Treonina	150	17,14	19,46	1,13	3,18
DL-Triptofano	No eluye				
DL-Tirosina	No eluye				
DL-Valina	120	19,12	19,78	1,03	0,73

Combinación cloroformiato de metilo (MeCF)/EtOH:

En la Tabla 3.3 se informan los resultados cromatográficos de esta serie de experimentos.

Tabla 3.3 Valores de retención, selectividad y resolución para los derivados obtenidos con la combinación metilcloroformiato/etanol.

aminoácido	T°C	K1	K2	α	Rs
DL-Alanina	110	4,44	-	1	-
	100	9,18	-	1	-
	90	22,35	-	1	-
DL-Arginina	No eluye				
DL-Asparagina	150	11,20	-	1,00	-
	140	20,73	-	1,00	-
DL-Aspártico	150	8,27	8,69	1,05	1,24
DL-Cisteína	160	12,16	-	1,00	-
DL-Glutámina	130	7,13	-	1,00	-
DL-Histidina	No eluye				
DL-Isoleucina	150	1,88	2,01	1,07	1,26
DL-Leucina	110	8,72	9,04	1,04	0,81
DL-Lisina	No eluye				
DL-Metionina	150	13,05	-	1,00	-
DL-Fenilalanina	190	10,01	-	-	-
DL-Prolina	130	4,45	-	1,00	-
	120	7,51	-	1,00	-
	100	28,98	-	1,00	-
DL-Serina	150	9,30	9,82	1,06	1,27
DL-Treonina	150	23,14	31,33	1,35	8,06
DL-Triptofano	No eluye				
DL-Tirosina	No eluye				
DL-Valina	110	5,077	5,31	1,04	1,05

Combinación cloroformiato de clorometilo (ClMeCF)/EtOH

En la Tabla 3.4 se informan los resultados cromatográficos de esta serie de experimentos.

Tabla 3.4 Valores de retención, selectividad y resolución para los derivados obtenidos con la combinación clorometilcloroformiato/etanol.

aminoácido	T°C	k1	k2	α	Rs
DL-Alanina	150	4,03	-	1,00	-
	120	19,29	19,88	1,03	0,61
DL-Asparagina	No eluye				
DL-Aspártico	No eluye				
DL-Histidina	No eluye				
DL-Isoleucina	150	0,86	0,98	1,14	1,39
DL-Leucina	130	23,99	-	1,00	-
DL-Lisina	No eluye				
DL-Metionina	150	4,13	4,35	1,05	0,87
DL-Fenilalanina	150	7,73	-	1,00	
DL-Prolina	150	10,90	11,50	1,06	1,16
DL-Triptofano	No eluye				
DL-Tirosina	No eluye				

Combinación Fluoroetanol/ECF:

En la Tabla 3.5 se informan los resultados cromatográficos de esta serie de experimentos.

Tabla 3.5 Valores de retención, selectividad y resolución para los derivados obtenidos con la combinación etilcloroformiato/fluoroetanol.

aminoácido	T°C	k1	k2	α	Rs
DL-Alanina	120	3,19	-	1,00	-
	110	5,61	-	1,00	-
DL-Asparagina	No eluye				
DL-Aspártico	140	5,81	-	1,00	-
	130	10,80	-	1,00	-
	120	19,44	19,81	1,02	0,46
DL-Cisteína	130	64,00		1,00	
DL-Glutámico					
DL-Histidina	No eluye				
DL-Isoleucina	150	1,43	1,55	1,09	1,31
	130	3,74	4,14	1,11	2,25
DL-Leucina	150	1,54		1,00	
	110	12,20		1,00	
	100	22,21		1,00	
DL-Lisina	No eluye				
DL-Metionina	150	9,16	-	1,00	-
DL-Fenilalanina	160	9,71	-	1,00	-
	140	26,06	-	1,00	-
	120	86,91	-	1,00	-
DL-Prolina	110	14,49	15,27	1,05	1,35
DL-Serina	No eluye				
DL-Treonina	150	5,75	-	1,00	-
	130	19,32	20,15	1,04	0,95
DL-Triptofano	No eluye				
DL-Tirosina	No eluye				
DL-Valina	110	6,86	7,11	1,03	0,71

Combinación Perfluorohexanol/ECF:

En la Tabla 3.6 se informan los resultados cromatográficos de esta serie de experimentos.

Tabla 3.6 Valores de retención, selectividad y resolución para los derivados obtenidos con la combinación etilcloroformiato/perfluorohexanol.

Aminoácido	T°C	K1	K2	α	Rs
DL-Alanina	120	3,49	-	1,00	-
DL-Arginina	No eluye				
DL-Asparagina	No eluye				
DL-Aspártico	130	10,35	-	1,00	-
DL-Cisteína	150	1,08	-	1,00	-
	130	2,93	-	1,00	-
	120	10,45	-	1,00	-
DL-Glutámico	130	21,28	21,81	1,03	0,554
DL-Histidina	No eluye				
DL-Isoleucina	150	1,53	1,66	1,08	1,410
DL-Leucina	120	7,02	-	1,00	-
	110	12,06	-	1,00	-
DL-Lisina	No eluye				
DL-Metionina	130	28,88	-	1,00	-
DL-Fenilalanina	150	15,38	-	1,00	-
	190	5,24	-	1,00	-
DL-Prolina	130	5,20	5,34	1,03	0,553
	120	8,96	9,31	1,04	0,936
DL-Serina	150	8,43	-	1,00	-
	140	15,64	-	1,00	-
	130	30,44	-	1,00	-
DL-Treonina	150	5,63	-	1,00	-
	130	18,65	19,46	1,04	1,215
DL-Triptófano	No eluye				
DL-Tirosina	No eluye				
DL-Valina	120	4,19	-	1,00	-
	110	7,14	-	1,00	-
	100	13,12	13,82	1,05	1,336

El par enantiomérico de la prolina pudo ser separado en todas sus formas derivadas, excepto cuando se utilizó la combinación de metilcloroformiato y etanol, a diferencia de lo que ocurre con la columna chirasil-val en la que la prolina no se logra separar en ningún caso [1].

La DL-Arginina no se detecta en ninguno de los casos. Esto puede deberse al bajo rendimiento de derivatización causado por la baja reactividad del grupo guanidino [2], [3].

La respuesta del detector debería ser mayor cuando aumenta el número de átomos de carbono, en este caso se observó que dicha respuesta fue mayor para la combinación etilcloroformiato/etanol. Puede estar ocurriendo que el rendimiento de la reacción sea distinto según la combinación de alcohol/cloroformiato utilizada, y por lo tanto lo que se observa es una suma de los dos factores, es decir, respuesta del detector y rendimiento de reacción.

Las combinaciones de alcohol/cloroformiato con las cuales se obtuvieron mayor cantidad de enantioseparaciones de derivados de aminoácidos fueron con etanol/etilcloroformiato y etanol/isobutilcloroformiato.

En la figura 3.1 puede observarse que la enantioselectividad es similar para ambas combinaciones ya que en algunos casos se obtiene mayor factor de enantioseparación (α) para la combinación etilcloroformiato/etanol como es el caso de los derivados de D- y L-Asparagina, D- y L-Aspártico, D- y L-Prolina y D- y L-Serina, mientras que se obtiene mayor valor de α para la combinación de etanol/isobutilcloroformiato para los derivados de D- y L-Alanina, D- y L-Isoleucina, D- y L-Leucina y D- y L-Treonina.

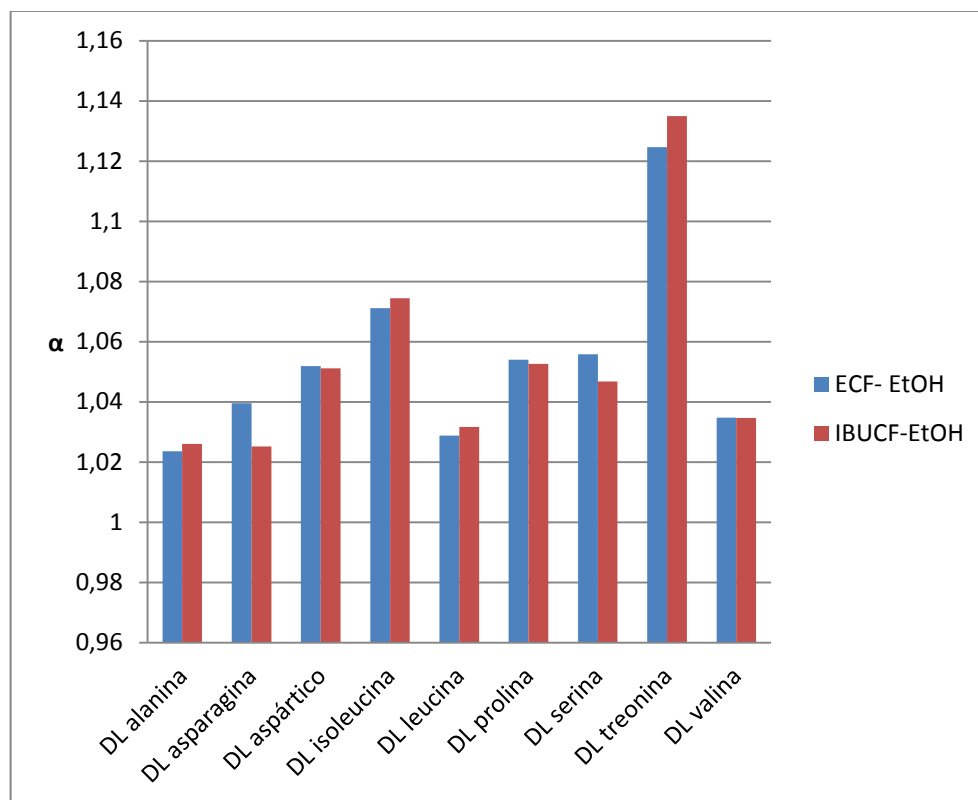


Figura 3.1 Gráfico de enantioselectividades para la combinación de etanol/etilcloroformiato y la combinación etanol/isobutilcloroformiato.

En la figura 3.2 se muestran las resoluciones obtenidas para las combinaciones anteriormente mencionadas. Se obtienen mayores resoluciones para la combinación etanol/isobutilcloroformiato en los casos de los derivados de D- y L-Alanina, D- y L-Isoleucina, D- y L-Treonina, debido a que tienen mayor valor de α . Para D- y L-Prolina y D- y L-Valina también se observa que tienen mayor resolución en el caso de isobutilcloroformiato/etanol, esto se debe a que los picos son más simétricos (ver cromatogramas de Figuras 3.3 y 3.4). Para la combinación de etanol/etilcloroformiato se obtiene mejor resolución para los derivados de D- y L-Asparagina, D- y L-Aspártico, y D- y L-Serina ya que tienen mayor enantioseparación.

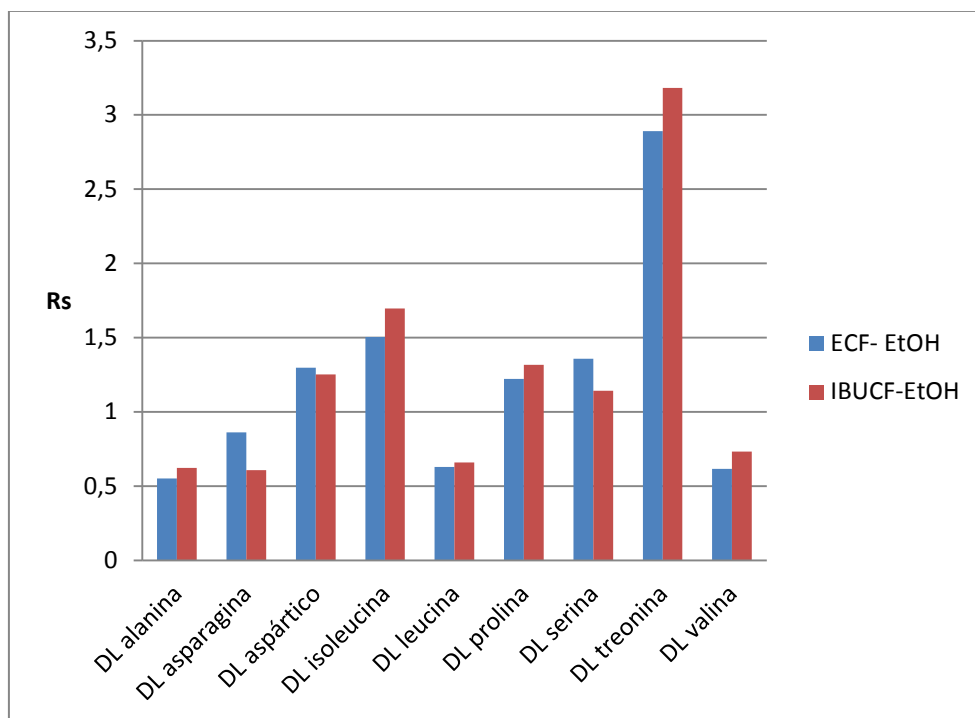


Figura 3.2 Gráfico de resoluciones para la combinación de etanol/etilcloroformiato y la combinación etanol/isobutilcloroformiato.

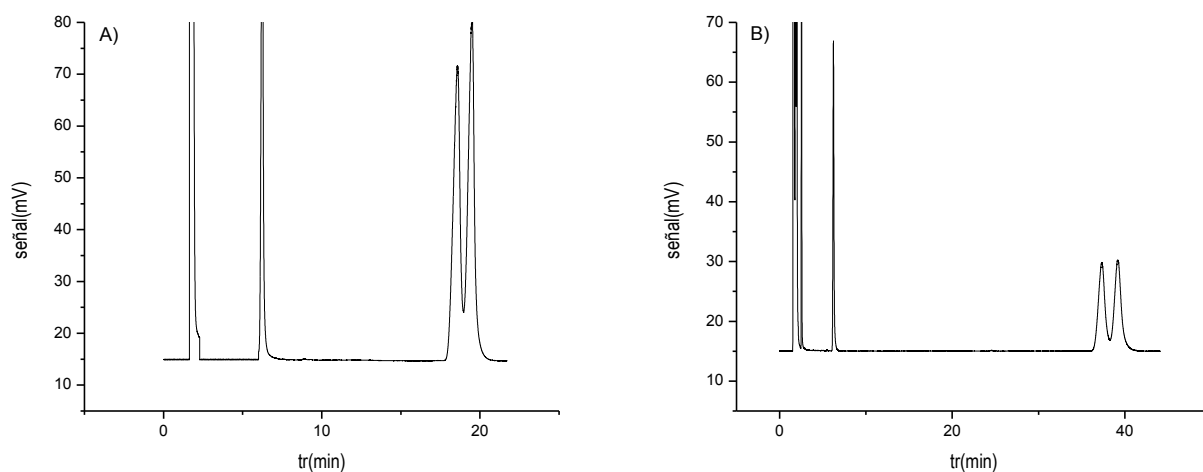


Figura 3.3 A) D- y L-Prolina combinación ECF/EtOH. B) D- y L-Prolina combinación isobutilcloroformiato/EtOH.

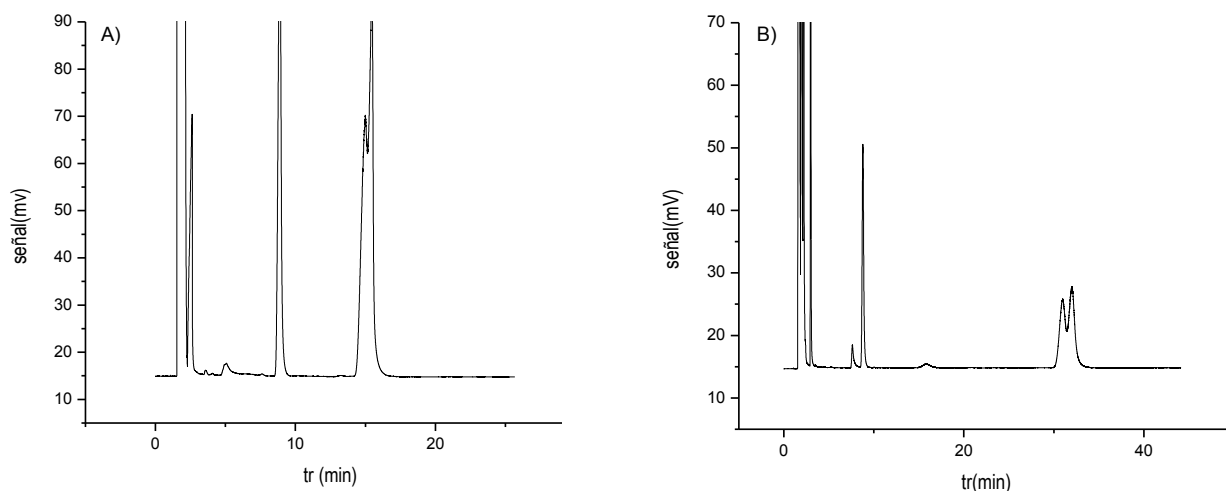


Figura 3.4 A) D- y L- Valina combinación ECF/EtOH. B) D- y L-Valina combinación isobutilcloroformiato/EtOH.

Entre las dos combinaciones de reactivos con las cuales se obtuvieron los mejores resultados no hay muchas diferencias entre sí. Por lo tanto se utilizó la combinación de ECF/EtOH para determinar la composición enantiomérica de aminoácidos en el kéfir ya que los tiempos de retención son menores y de este modo se disminuye el tiempo de análisis. Para ello se determinaron las cifras de mérito: linealidad del sistema, precisión y exactitud, límites de detección y cuantificación.

3.2 Cifras de mérito

3.2.1 Linealidad del sistema

Para el cálculo de linealidad se realizaron mediciones de 5 concentraciones, por triplicado con las muestras de kéfir y con las cuales se calculó la ordenada y la pendiente (tablas 3.7 y 3.8).

Tabla 3.7 Recta de calibrado para la muestra 1

aminoácido	Pendiente	Ordenada
D- Alanina	$(6,9\pm 1,2)10^{-5}$	0,051±0,007
L- Alanina	$(8,6\pm 1,6)10^{-5}$	0,038±0,009
D-Valina	$(3,0\pm 0,3)10^{-5}$	0,001±0,002
L-Valina	$(2,2\pm 5,2)10^{-5}$	0,058±0,004
D-Prolina	$(5,9\pm 1,0)10^{-5}$	0,081±0,006
L-Prolina	$(7,0\pm 0,8)10^{-5}$	0,001±0,004
D-Treonina	$(3,5\pm 0,4)10^{-5}$	0,002±0,002
L-Treonina	$(3,6\pm 0,4)10^{-5}$	0,009±0,002
D-Aspártico	$(2,7\pm 0,4)10^{-5}$	0,002±0,002
L-Aspártico	$(2,5\pm 0,3)10^{-5}$	0,003±0,002
DL-Glutámico	$(1,1\pm 0,2)10^{-5}$	0,009±0,003
DL-Metionina	$(1,0\pm 0,2)10^{-5}$	0,004±0,002
DL-Cisteina	$(3,2\pm 0,9)10^{-5}$	0,023±0,012

Tabla 3.8 Recta de calibrado para la muestra 2

aminoácido	Pendiente	Ordenada
D- Alanina	$(4,3\pm 0,5)10^{-5}$	0,011±0,003
L- Alanina	$(5,1\pm 0,6)10^{-5}$	0,010±0,004
D-Valina	$(1,3\pm 0,1)10^{-5}$	0,010±0,001
L-Valina	$(2,8\pm 0,6)10^{-5}$	0,027±0,005
D-Prolina	$(1,9\pm 0,4)10^{-4}$	0,230±0,022
L-Prolina	$(3,7\pm 0,5)10^{-5}$	0,004±0,003
D-Treonina	$(1,8\pm 0,3)10^{-5}$	0,002±0,002
L-Treonina	$(3,4\pm 0,8)10^{-5}$	0,013±0,004
D-Aspártico	$(2,6\pm 0,5)10^{-5}$	0,0002±0,0029
L-Aspártico	$(1,0\pm 0,4)10^{-5}$	0,003±0,002
DL-Glutámico	$(1,5\pm 0,2)10^{-5}$	0,017±0,003
DL-Metionina	$(3,5\pm 0,7)10^{-5}$	0,066±0,008
DL-Cisteina	$(1,5\pm 0,5)10^{-5}$	0,448±0,056

Para determinar si los datos conservan la linealidad, se hace una relación de varianzas, calculando el parámetro F . El valor experimental de F esta dado por la ecuación (3.1):

$$F_{\text{exp}} = \frac{(S_{y/x})^2}{(S_y)^2} \quad (3.1)$$

Donde

$$(S_{y/x}) = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^m (y_i - \hat{y}_i)^2}{m-2}} \quad (3.2)$$

$$S_y = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^p \sum_{j=1}^r (y_{ij} - \bar{y}_i)^2}{m-p}} \quad (3.3)$$

$S_{y/x}$ = desvío estándar de los residuos de la regresión.

S_y = desvío de las réplicas de las mediciones de calibrado respecto a su promedio.

y_i = respuesta experimental de cada muestra

\hat{y}_i = respuesta estimada en cada punto, esto es, $\hat{y}_i = A x_i + B$.

m = datos disponibles,

p = número de niveles de concentración estudiados en la recta.

r = número de réplicas de cada punto,

y_{ij} = valor de la respuesta correspondiente a cada nivel y réplica.

\bar{y}_i = promedio de las respuestas de las réplicas para cada nivel de concentración.

H_0 : No existe relación lineal simple entre la concentración de aminoácidos y la respuesta del detector.

H_1 : Existe relación lineal simple entre la concentración de aminoácidos y la respuesta del detector.

El valor de F crítico para un nivel de confianza del 95% que se encuentra en tablas de F (de una cola) para $m - 2 = 13$ y $m - p = 10$ grados de libertad es de 2,90.

En las tablas 3.9 y 3.10 se dan los valores de $S_{y/x}$, S_y , y F_{exp} calculados para las muestras 1 y 2.

Tabla 3.9 Valores de F calculados,
 $s_{y/x}$ y s_y para todos los aminoácidos en la muestra 1.

Aminoácido	$S_{y/x}$	S_y	F_{exp}
D-Alanina	$(1,5)10^{-2}$	$(1,4)10^{-2}$	1,23
L-Alanina	$(2,0)10^{-2}$	$(1,9)10^{-2}$	1,17
D-Valina	$(5,0)10^{-3}$	$(4,9)10^{-3}$	1,06
L-Valina	$(8,7)10^{-3}$	$(9,0)10^{-3}$	0,9
D-Prolina	$(1,3)10^{-2}$	$(9,0)10^{-3}$	2,06
L-Prolina	$(9,6)10^{-3}$	$(6,3)10^{-3}$	2,31
D-Treonina	$(5,0)10^{-3}$	$(4,2)10^{-3}$	1,43
L-Treonina	$(5,2)10^{-3}$	$(4,8)10^{-3}$	1,18
D-Aspártico	$(4,6)10^{-3}$	$(4,8)10^{-3}$	0,93
L-Aspártico	$(3,5)10^{-3}$	$(3,3)10^{-3}$	1,15
DL-Glutámico	$(6,4)10^{-3}$	$(5,1)10^{-3}$	1,56
DL-Metionina	$(4,2)10^{-3}$	$(3,2)10^{-3}$	1,72
DL-Cisteina	$(2,6)10^{-2}$	$(2,0)10^{-2}$	1,68

Tabla 3.10 Valores de F calculados, $S_{y/x}$ y S_y para todos los aminoácidos en la muestra 2.

Aminoácido	$S_{y/x}$	S_y	F_{exp}
D-Alanina	$(6,2)10^{-3}$	$(6,2)10^{-3}$	1,01
L-Alanina	$(8,0)10^{-3}$	$(8,5)10^{-3}$	0,87
D-Valina	$(2,3)10^{-3}$	$(1,8)10^{-3}$	1,62
L-Valina	$(1,0)10^{-2}$	$(1,1)10^{-2}$	0,91
D-Prolina	$(4,8)10^{-2}$	$(5,4)10^{-2}$	0,82
L-Prolina	$(6,7)10^{-3}$	$(6,4)10^{-3}$	1,08
D-Treonina	$(3,6)10^{-3}$	$(2,5)10^{-3}$	2,08
L-Treonina	$(9,9)10^{-3}$	$(8,8)10^{-3}$	1,28
D-Aspártico	$(6,4)10^{-3}$	$(5,1)10^{-3}$	1,57
L-Aspártico	$(4,9)10^{-3}$	$(4,4)10^{-3}$	1,24
DL-Glutámico	$(6,2)10^{-3}$	$(5,7)10^{-3}$	1,20
DL-Metionina	$(1,8)10^{-2}$	$(1,8)10^{-2}$	0,97
DL-Cisteina	$(1,3)10^{-1}$	$(1,0)10^{-1}$	1,44

Como F_{exp} es menor que $F_{crítico}$ en todos los casos se rechaza H_0 . Con lo cual hay evidencia estadística suficiente para concluir que existe una relación lineal simple entre la concentración de aminoácidos y la respuesta del detector.

Antes de comenzar a utilizar el modelo ajustado, conviene asegurarse de que no se violan las hipótesis sobre las que se soporta: existe una relación lineal entre ambas variables, los residuos están normalmente distribuidos y que la varianza sea constante. Para esto se realiza un gráfico de los residuos. Se llama residuos a las diferencias entre los valores de la variable dependiente (respuesta del detector) observados y los valores que predecimos a partir de nuestra recta de regresión. En este caso se graficaron los residuos contra la variable independiente (la concentración) para cada uno de los aminoácidos y los gráficos pueden verse en el Anexo 1.

En rasgos generales puede observarse que los residuos tienen una distribución normal de media cero y varianza constante.

3.2.2 Precisión

Se evaluó la precisión del método cuando se realizan sobreagregados a las muestras y para estándares en ausencia de muestra. Para ello se tomó una concentración intermedia (la correspondiente a un sobreagregado de 150 μl) y se repitió 3 veces. A partir de las respectivas alturas se calcularon los parámetros estadísticos que se muestran en las tablas 3.11, 3.12 y 3.13, donde \bar{X} es el valor medio de la concentración, S_i es la desviación estándar de las concentraciones y RSD% es el error estándar relativo.

Tabla 3.11 Precisión del método de sobreagregado para la muestra 1

aminoácido	\bar{X}	S_i	RSD%
D-Alanina	980,82	574,28	58,55
L-Alanina	906,19	446,66	49,29
D-Valina	1055,14	215,19	20,39
L-Valina	1080,59	560,48	51,87
D-Prolina	767,76	63,82	8,31
L-Prolina	859,76	184,00	21,40
D-Treonina	1005,21	249,34	24,80
L-Treonina	773,33	151,00	19,53
D-Aspártico	652,91	101,91	15,61
L-Aspártico	818,64	231,16	28,24
DL-Glutámico	2464,59	984,61	39,95
DL-Metionina	1454,32	472,35	32,48
DL-Cisteina	2538,09	906,35	35,71

Tabla 3.12 Precisión del método de sobreagregado para la muestra 2

aminoácido	\bar{X}	S _i	RSD%
D-Alanina	796,33	225,71	28,34
L-Alanina	707,49	252,64	35,71
D-Valina	698,12	82,01	11,75
L-Valina	1162,61	466,36	40,11
D-Prolina	788,96	447,15	56,68
L-Prolina	604,93	206,54	34,14
D-Treonina	514,88	135,55	26,33
L-Treonina	460,24	232,40	50,50
D-Aspártico	409,11	155,20	37,94
L-Aspártico	430,91	156,96	36,43
DL-Glutámico	1494,02	507,46	33,97
DL-Metionina	1660,29	787,61	47,44
DL-Cisteina	2108,51	632,51	30,00

Tabla 3.13 Precisión del método de estándar externo

aminoácido	\bar{X}	S _i	RSD%
D-Alanina	649,66	88,88	13,68
L-Alanina	785,43	23,01	2,93
D-Valina	1166,25	112,45	9,64
L-Valina	777,66	51,75	6,65
D-Prolina	767,76	63,82	8,31
L-Prolina	1466,64	23,55	1,61
D-Treonina	2314,93	23,50	1,02
L-Treonina	2082,33	40,86	1,96
D-Aspártico	2491,52	189,76	7,62
L-Aspártico	2446,84	110,18	4,50
DL-Glutámico	4742,30	67,45	1,42
DL-Metionina	5368,29	39,78	0,74
DL-Cisteina	2532,62	332,23	13,12

Cuando se realizan sobreagregados a las muestras en la mayoría de los casos el error estándar relativo es mayor al 15 % debido a las etapas de preconcentración de la muestra involucran distintos pasos, con lo cual es esperable que el RSD% sea

alto. En la tabla 3.13, se evaluó la precisión con estándares de aminoácidos, y el error estándar relativo está siempre por debajo del 14%.

3.2.3 Exactitud

Para su evaluación se realizó un ensayo de recuperación a dos concentraciones. El porcentaje recuperado (%R) se calcula dividiendo el valor obtenido experimentalmente y el valor teórico.

Tabla 3.14 Porcentaje de recuperación para la muestra 1 a dos concentraciones

aminoácido	ppm	%R	ppm	%R
D-Alanina	475	38,95	712,5	68,06
L-Alanina	475	42,88	712,5	54,31
D-Valina	615	23,51	922,5	26,45
L-Valina	615	18,42	922,5	17,23
D-Prolina	455	29,97	682,5	33,75
L-Prolina	455	31,34	682,5	38,82
D-Treonina	475	27,55	712,5	36,19
L-Treonina	475	19,75	712,5	28,89
D-Aspártico	455	19,41	682,5	20,64
L-Aspártico	455	27,27	682,5	30,73
DL-Glutámico	1040	20,12	1560	28,32
DL-Metionina	970	23,90	1455	26,97
DL-Cisteína	1010	31,59	1515	58,73

Tabla 3.15 Porcentaje de recuperación para la muestra 2 a dos concentraciones

aminoácido	ppm	%R	ppm	%R
D-Alanina	475	24,11	712,5	28,69
L-Alanina	475	25,60	712,5	32,42
D-Valina	615	9,29	922,5	10,66
L-Valina	615	24,32	922,5	22,75
D-Prolina	455	40,73	682,5	61,17
L-Prolina	455	18,24	682,5	20,84
D-Treonina	475	18,10	712,5	21,03
L-Treonina	475	22,02	712,5	28,63
D-Aspártico	455	17,03	682,5	24,86
L-Aspártico	455	16,14	682,5	16,82
DL-Glutámico	1040	38,79	1560	54,61
DL-Metionina	970	57,89	1455	72,48
DL-Cisteina	1010	37,50	1515	55,77

3.2.4 Límite de detección y límite de cuantificación

Se tomaron en cuenta 5 concentraciones por triplicado y se aplicó la ecuación de la recta para el cálculo de las concentraciones.

Tabla 3.16 Límites de detección y cuantificación para la muestra 1

Aminoácido	LOD(ppm)	LOQ (ppm)
D-Alanina	489	1629
L-Alanina	489	1630
L-Valina	54	166
D-Prolina	30	91
L-Treonina	20	60
DL-Glutámico	78	241
DL-Cisteina	112	344

Tabla 3.17 Límites de detección y cuantificación para la muestra 2

Aminoácido	LOD(ppm)	LOQ (ppm)
D-Alanina	18	59
L-Alanina	19	64
D-Valina	23	75
L-Valina	45	149
D-Prolina	32	106
L-Treonina	36	121
DL-Glutámico	53	175
DL-Metionina	63	210
DL-Cisteina	104	348

3.2.5 Concentración de aminoácidos en las muestras de kéfir

Los resultados del análisis para las muestras 1 y 2, luego de ser concentradas en la resina de intercambio, se muestran en las tablas 3.18 y 3.19 respectivamente. Para la muestra 1, la D-Alanina se encuentra por encima del límite de detección con lo cual se puede decir con cierta confianza que se encuentra presente, pero está por debajo del límite de cuantificación, por lo tanto no puede determinarse adecuadamente su concentración. La L-Alanina en cambio, se encuentra por debajo del límite de detección con lo cual no se puede decir con cierta confianza que se encuentra presente. El resto de los aminoácidos se encuentra por encima del límite de cuantificación. Para la muestra 2 pudieron ser cuantificados todos los aminoácidos.

Los cromatogramas obtenidos con las muestras 1 y 2 sin la adición del estándar se muestran en las Figuras 3.5 y 3.6, respectivamente.

Tabla 3.18 Resultados del análisis para la muestra 1

Aminoácido	Ppm
D-Alanina	731
L-Alanina	439
L-Valina	2676
D-Prolina	1372
L-Treonina	242
DL-Glutámico	853
DL-cisteina	728

Tabla 3.19 Resultados del análisis para la muestra 2.

Aminoácido	Ppm
D-Alanina	265
L-Alanina	200
D-Valina	768
L-Valina	959
D-Prolina	1225
L-Treonina	382
DL-Glutámico	1179
DL-Metionina	1872
DL-Cisteina	3019

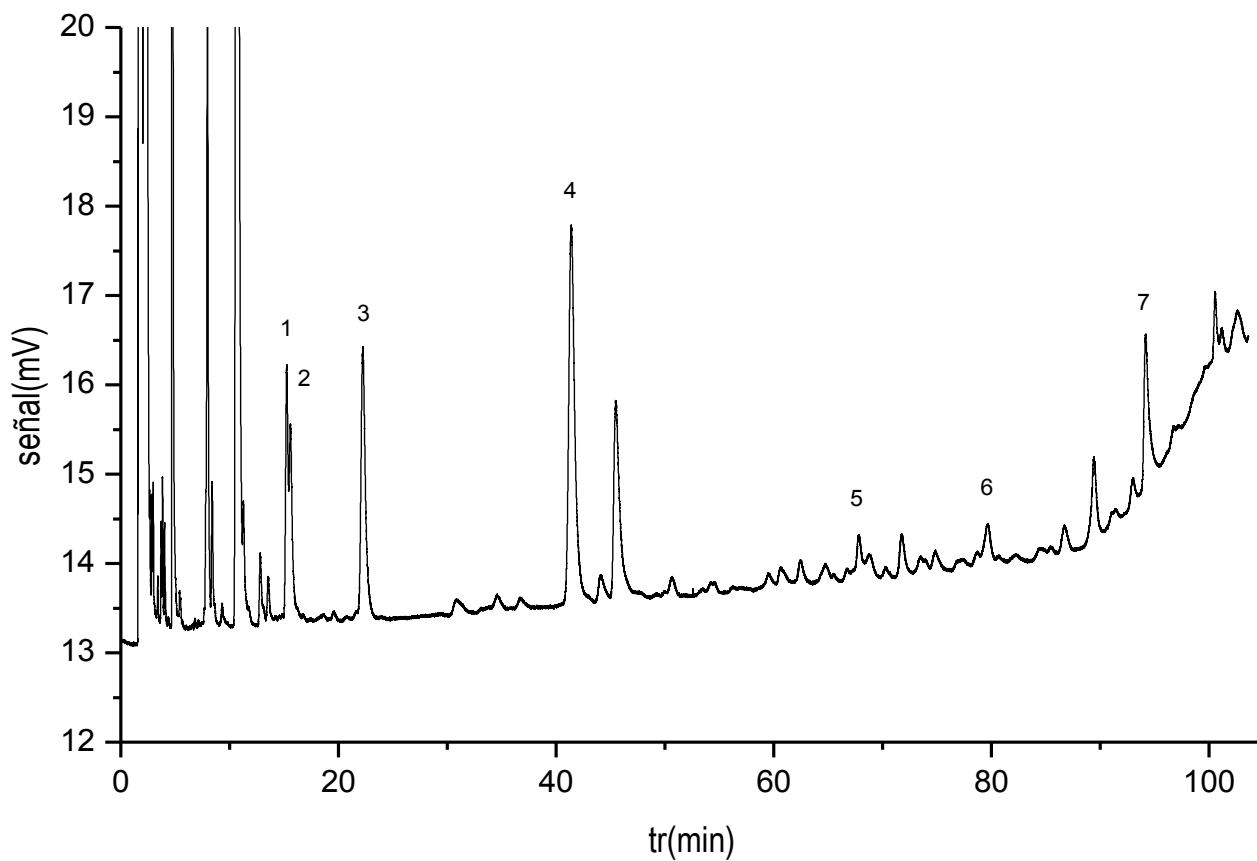


Figura 3.5 Cromatograma muestra 1 sin sobreagregado: 1) D-Alanina, 2) L-Alanina, 3) L-Valina, 4) D-Prolina, 5) L-Treonina, 6) DL-Glutámico 7) DL-Cisteina

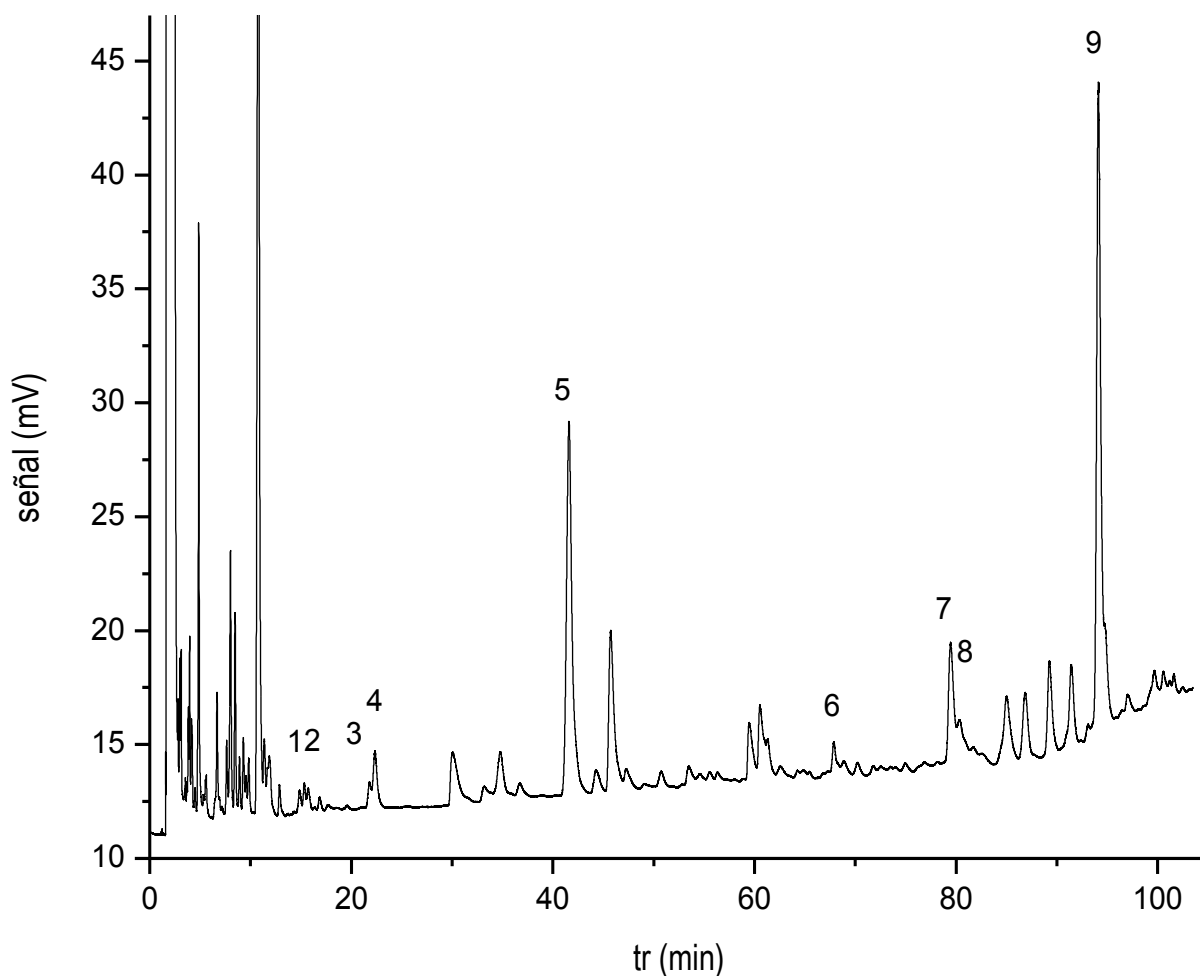


Figura 3.6 Cromatograma muestra 2 sin sobreagregado: 1) D-Alanina, 2) L-Alanina, 3) D-Valina, 4) L-Valina, 5) D-Prolina, 6) L-Treonina, 7) DL-metionina, 8) DL-Glutámico, 9) DL-Cisteina..

Teniendo en cuenta que la muestra fue preparada a partir de 10 ml de kéfir la concentración final de aminoácidos es la que se muestra en las tablas 3.20 y 3.21.

Tabla 3.20 Concentración de aminoácidos en la muestra 1

aminoácido	Ppm
L-Valina	27
D-Prolina	14
L-Treonina	2
DL-Glutámico	9
DL-Cisteina	7

Tabla 3.21 Concentración de aminoácidos en la muestra 2

aminoácido	Ppm
D-Alanina	3
L-Alanina	2
D-Valina	8
L-Valina	10
D-Prolina	12
L-Treonina	4
DL-Glutámico	12
DL-Metionina	19
DL-Cisteina	30

Puede observarse que tanto en la muestra 1 como en la muestra 2 se encuentran presentes aminoácidos esenciales como la valina, treonina y metionina. Además la presencia de D aminoácidos en el kéfir es importante ya que se han realizado estudios en los cuales se demuestra que ante la ausencia completa de la forma L se utilizan los D aminoácidos para cubrir la demanda metabólica. En los lactantes se investigó la utilización de los D aminoácidos, encontrándose que tanto la D-Alanina como la D-Valina fueron utilizados para la síntesis de proteínas. [4]

3.3 Referencias

- [1] Abe, I., Fujimoto, N., Nishiyama, T., Terada, K., Nakahara, T. *Rapid analysis of amino acid enantiomers by chiral-phase capillary gas chromatography* J. Chromatogr. A 1996, 722, 221-227
- [2] Casal, S., Oliviera, M.B., Ferreira, M. A. *Gas chromatographic quantification of amino acid enantiomers in food matrices by their N(O,S)-ethoxycarbonylheptafluorobutyl ester derivatives*. J. Chromatogr. A, 2000, 866, 221-230
- [3] Zampolli, M. G., Basaglia, G., Dondi, F., Sternberg, R., Szopa, C., Pietrogrande, M.C. *Gas chromatography–mass spectrometry analysis of amino acid enantiomers as methyl chloroformate derivatives: Application to space analysis*, J. Chromatogr. A 2007, 1150 162-172
- [4] Friedman, M., *Origin, Microbiology, Nutrition, and Pharmacology of D-Amino Acids*. Chemistry & Biodiversity, 2010. 7(6): p. 1491-1530.

Capítulo 4

Conclusiones

4.1 Conclusiones

En esta tesina se probaron distintos cloroformatos de alquilo, alcoholes y temperaturas con el fin obtener las condiciones que den el número máximo de aminoácidos derivatizados que puedan ser enantioméricamente separados por cromatografía de gases empelando una columna quirral de Lipodex E.

- El par enantiomérico de prolina pudo ser separado en todas sus formas derivadas, excepto cuando se utilizó la combinación de metilcloroformiato y etanol, a diferencia de lo que ocurre con la columna chirasil-val que no separa en ningún caso el par enantiomérico de prolina.
- La DL-Arginina no se detecta en ninguno de los casos. Esto puede deberse al bajo rendimiento de derivatización causado por la baja reactividad del grupo guanidino.

Las combinaciones de alcohol/cloroformiato de alquilo con las cuales se obtuvieron mayor número de picos por corrida fueron etanol/etilcloroformiato y etanol/isobutilcloroformiato. Ambas combinaciones presentaron una enantioselectividad y resolución similar para el mismo número de aminoácidos enantioresueltos. Se utilizó la combinación de ECF/EtOH para determinar la composición enantiomérica de aminoácidos en el kéfir debido a que los tiempos de retención son menores y de este modo se disminuye el tiempo de análisis.

Con respecto a las cifras de mérito se obtuvieron los siguientes resultados:

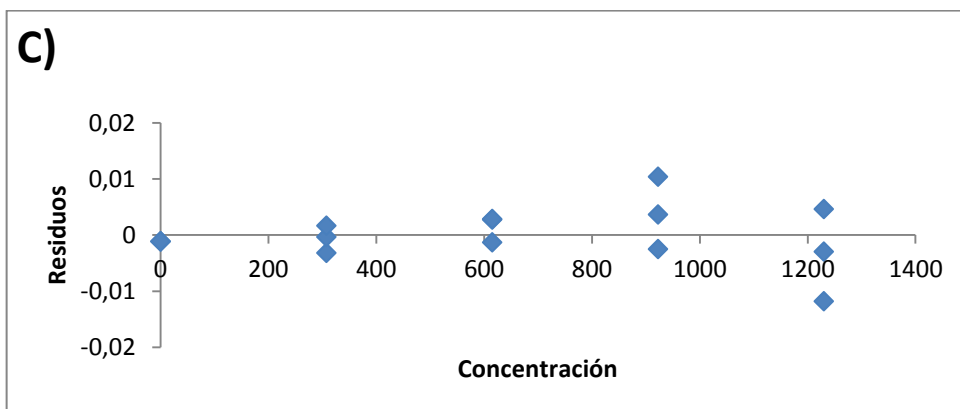
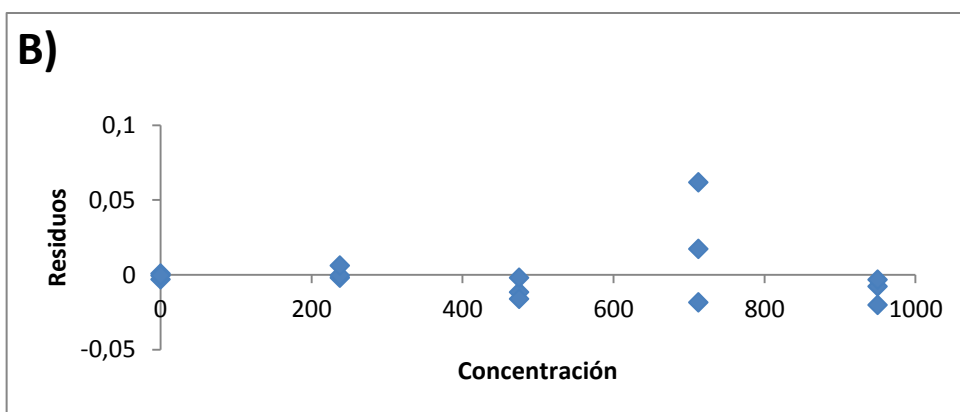
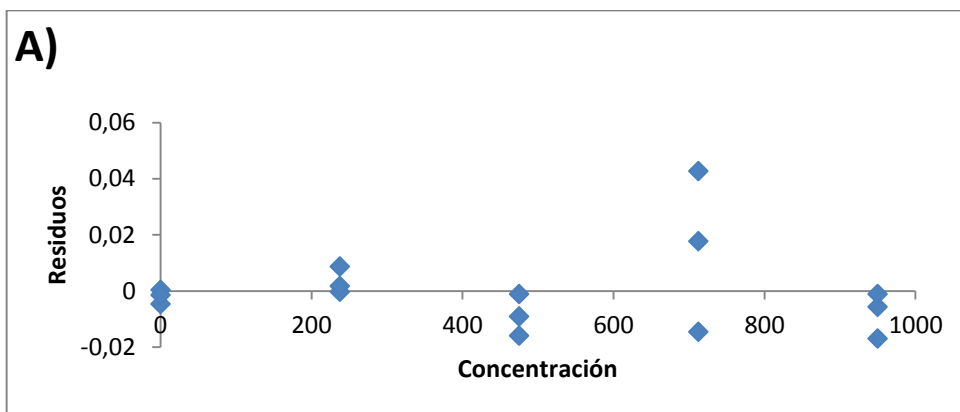
- La tabla de análisis de varianza utilizando un nivel de significación del 5%, demostró hay evidencia estadística suficiente para concluir que existe una relación lineal simple entre la concentración de aminoácidos y la respuesta del detector.
- Cuando se realizan sobreagregados a las muestras en la mayoría de los casos el error estándar relativo es mayor al 15 % debido a las etapas de pre-concentración de la muestra involucran distintos pasos, con lo cual es espe-

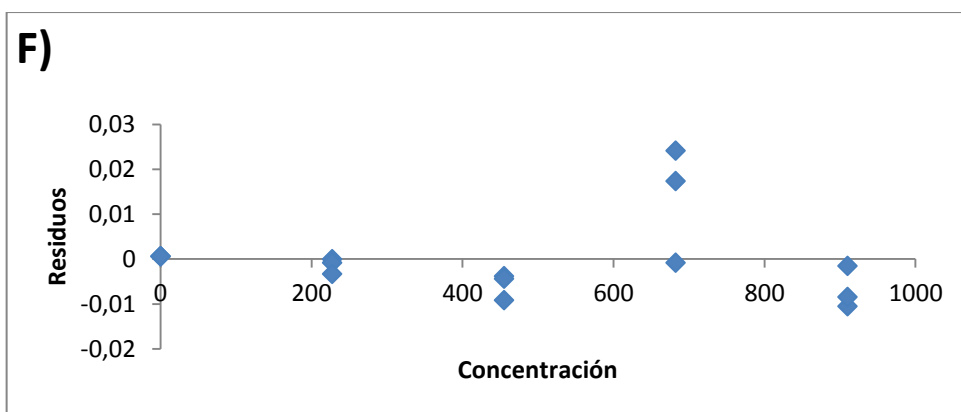
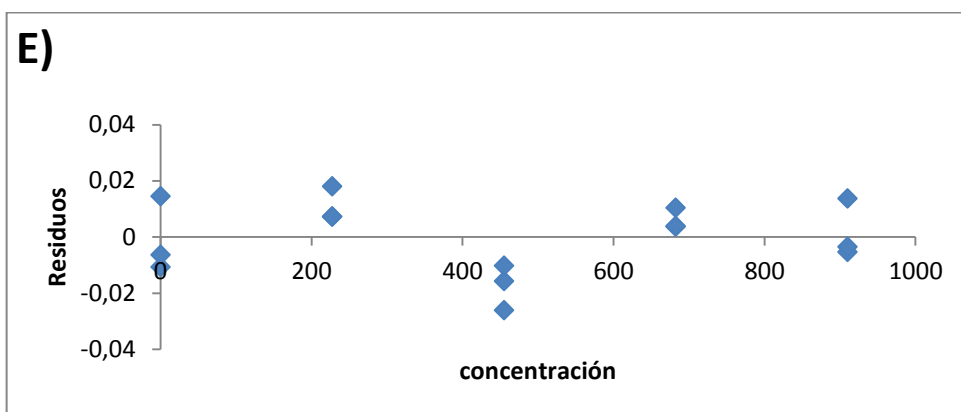
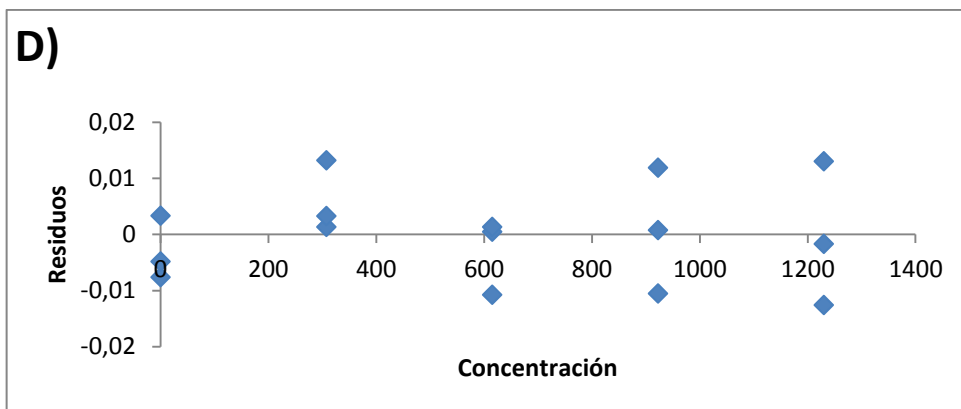
rable que el RSD% sea alto. Cuando se evaluó la precisión con estándares de aminoácidos, y el error estándar relativo está siempre por debajo del 14%.

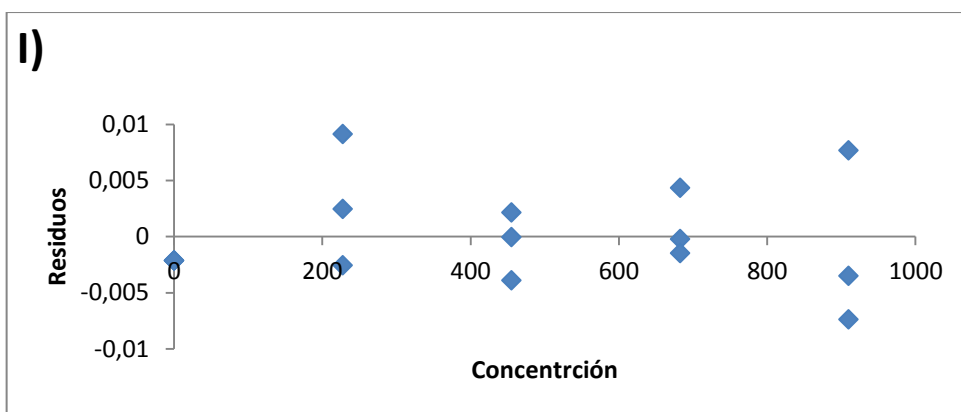
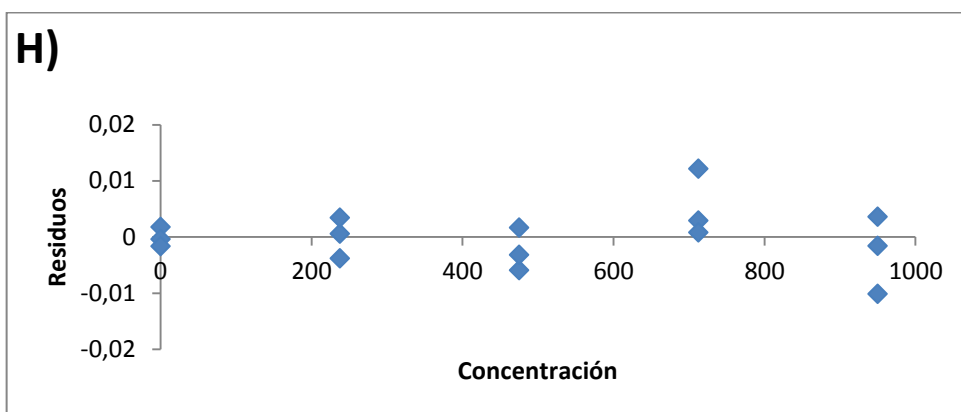
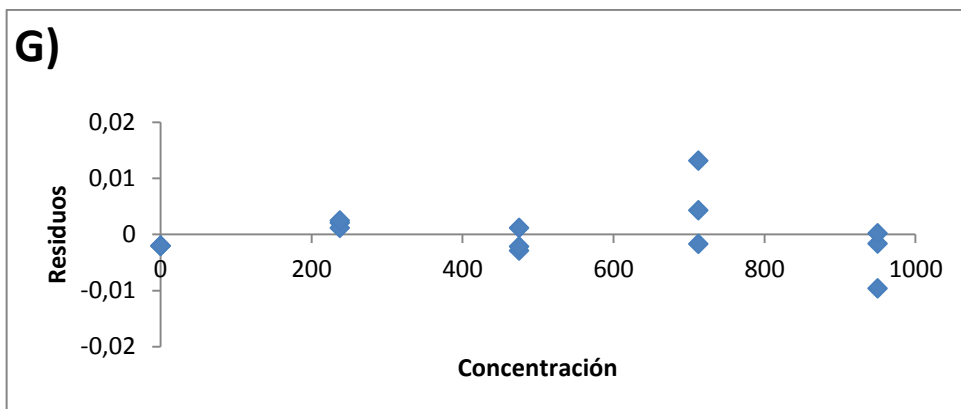
- Los límites de detección se encontraron entre 19,54 ppm (L-Treonina) y 488,92 ppm (L-Alanina) para la muestra 1 y 17,84 ppm (D-Alanina) y 104,39 ppm (DL-Cisteína) para la muestra 2, y los límites de cuantificación entre 19,93 ppm (L-Treonina) y 1629,73 ppm (L-Alanina) para la muestra 1 y 59,48 ppm (D-Alanina) y 347,98 ppm (DL-Cisteína).
- En la muestra 1 la D-Alanina no pudo ser cuantificada y la L-Alanina no pudo ser detectada. En la muestra 2 pudieron ser cuantificados todos los aminoácidos.

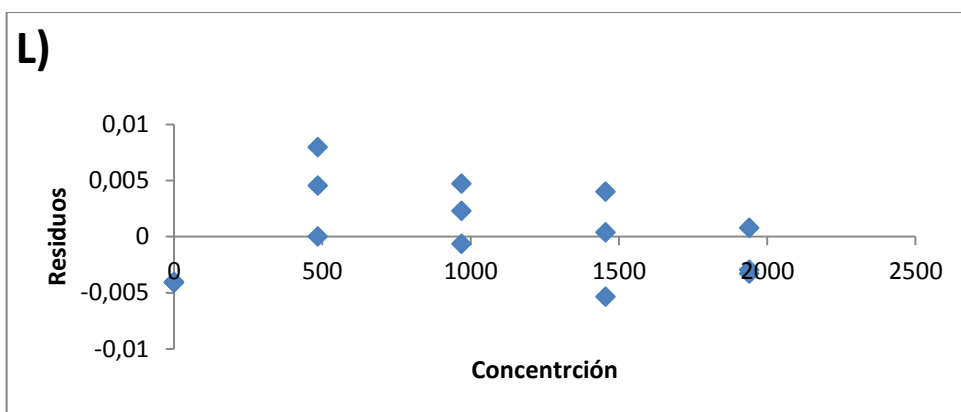
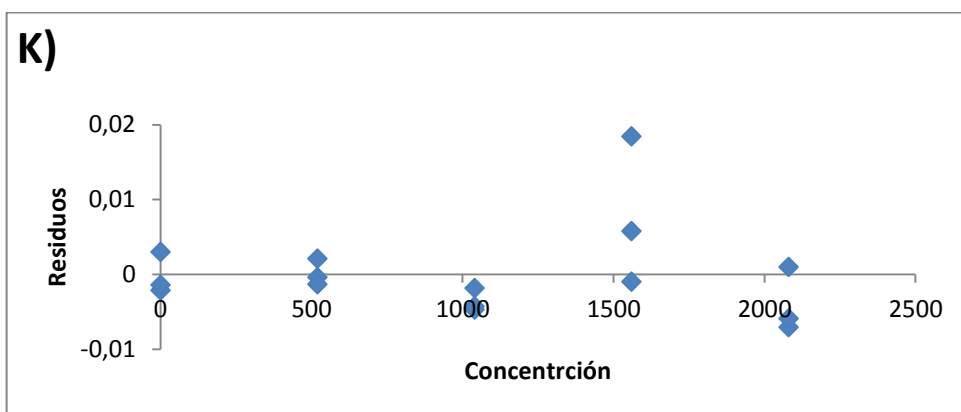
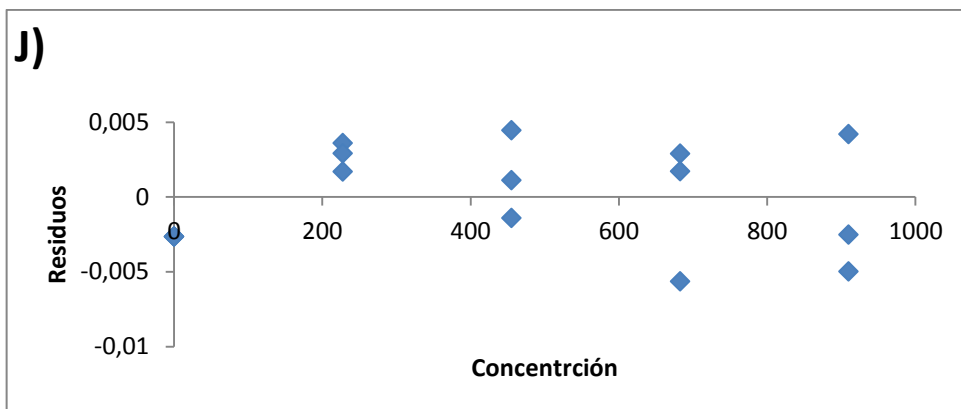
5.1 Anexo 1

5.1.1 Gráficos de residuos









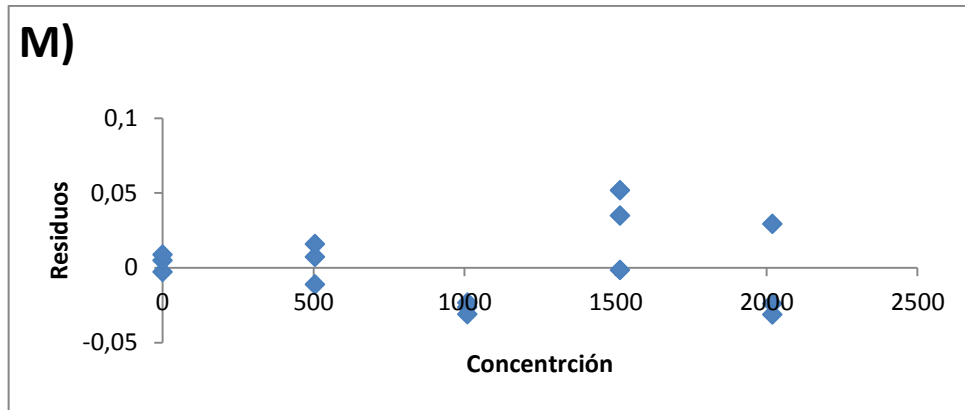
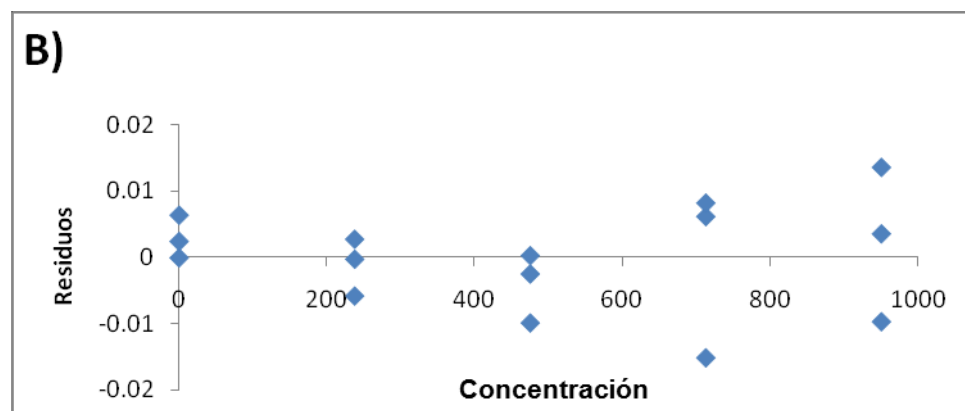
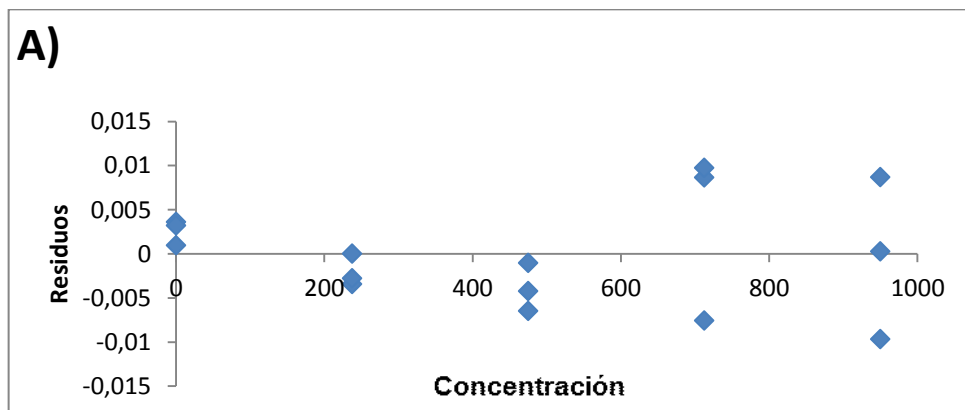
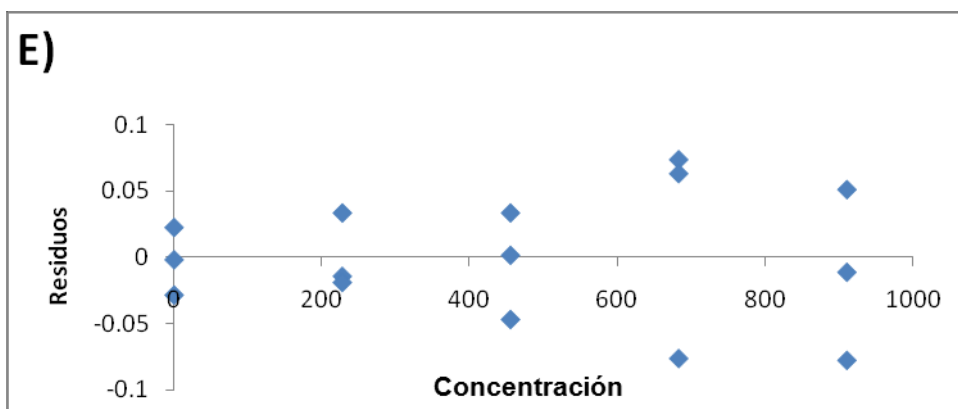
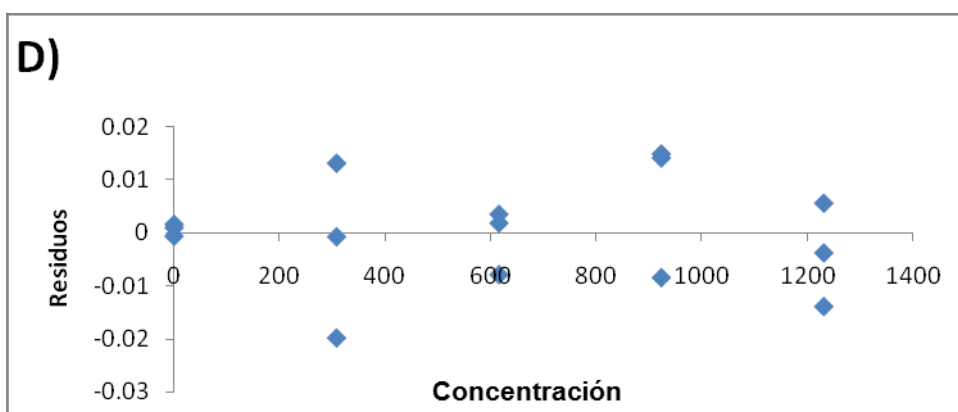
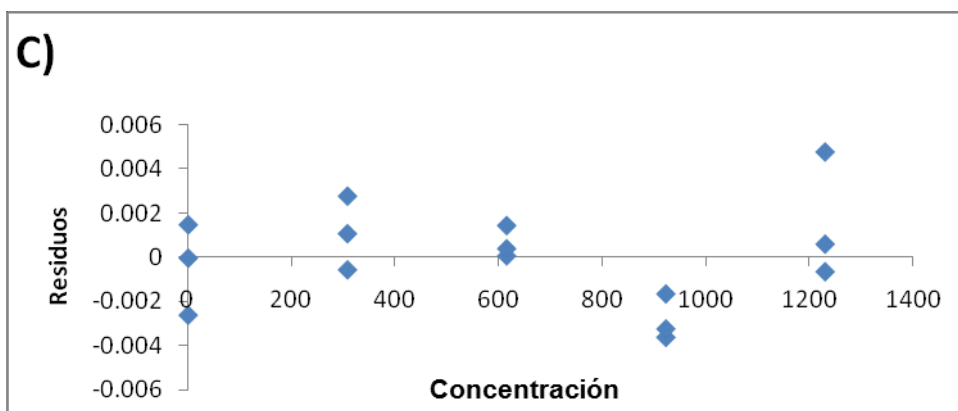
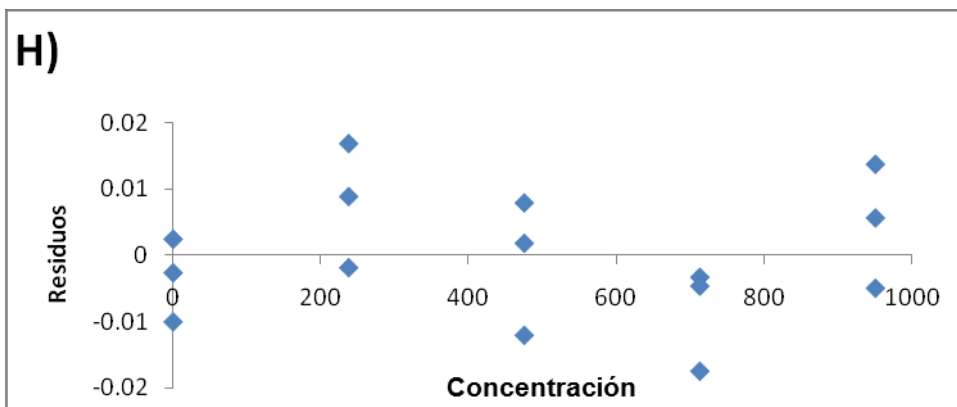
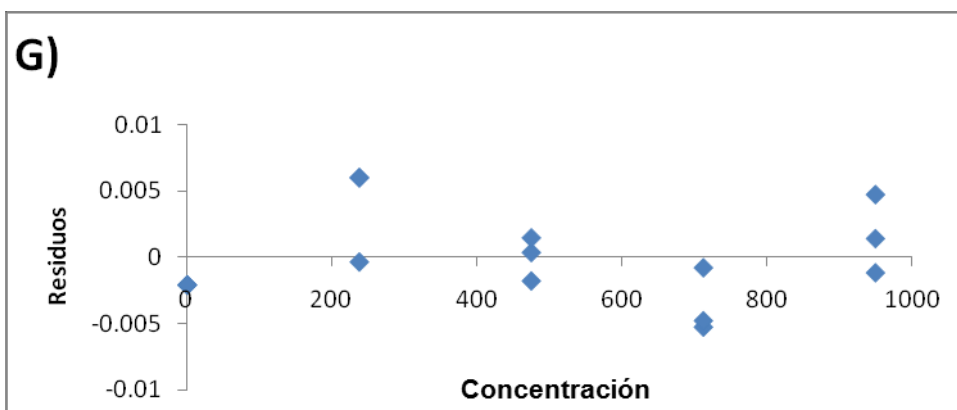
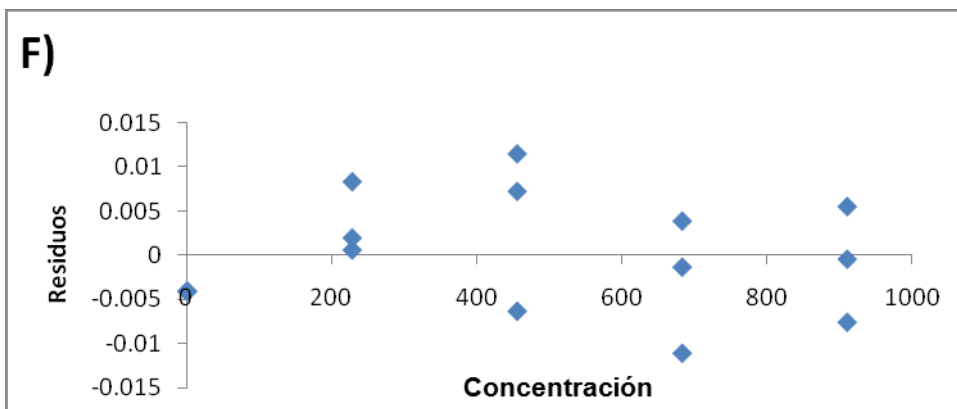
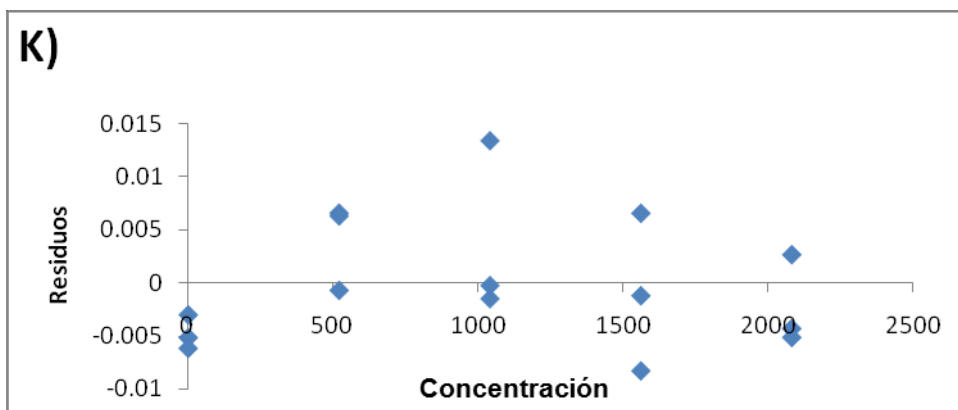
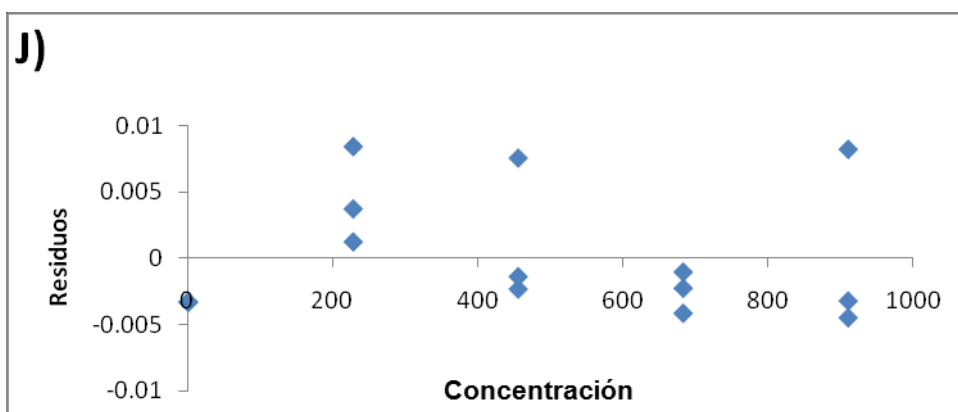
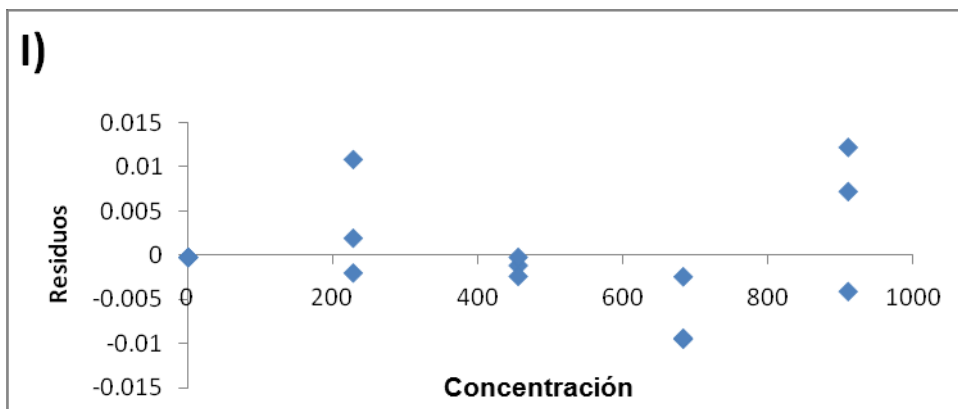


Figura 4.1 Gráficos de residuos muestra 1. A) D-Alanina, B) L-Alanina, C) D-Valina, D) L-Valina, E) D-Prolina, F) L-Prolina, G) D-Treonina, H) L-Treonina, I) D-Aspártico, J) L-Aspártico, K) DL-Glutámico, L) DL-Metionina, M) DL-Cisteína.









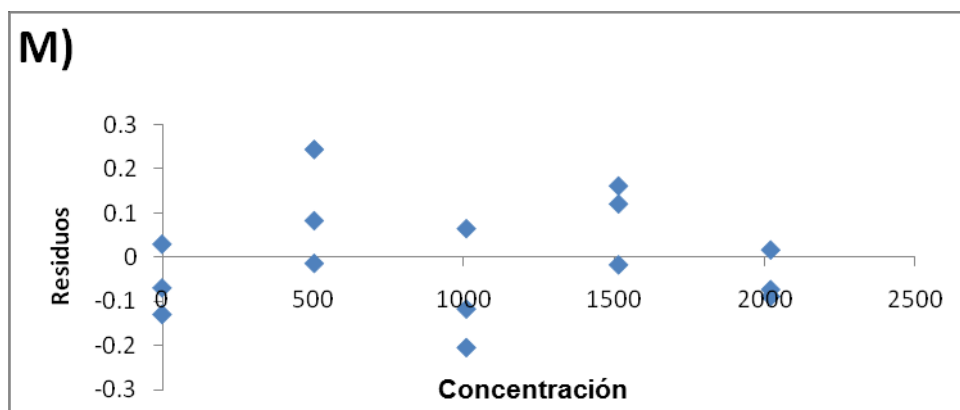
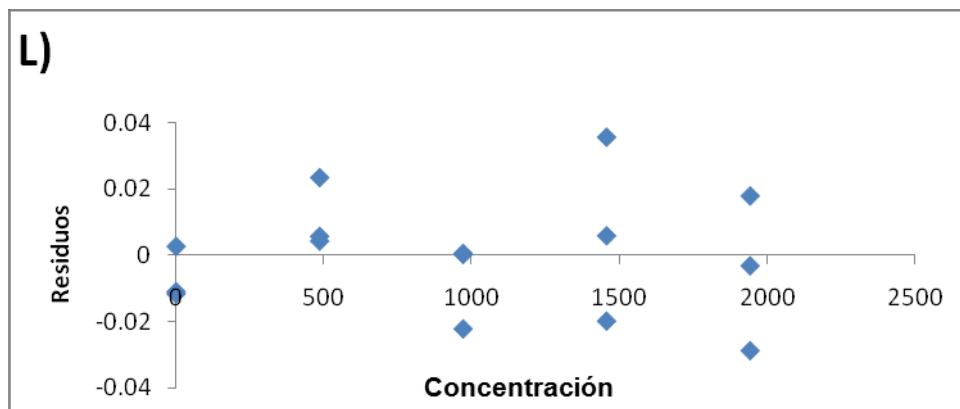


Figura 4.2 Gráficos de residuos muestra 2. A) D-Alanina, B) L-Alanina, C) D-Valina, D) L-Valina, E) D-Prolina, F) L-Prolina, G) D-Treonina, H) L-Treonina, I) D-Aspártico, J) L-Aspártico, K) DL-Glutámico, L) DL-Metionina, M) DL-Cisteina.