



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE
MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

55
Zej

EXTRACCION Y CUANTIFICACION POR
CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS DE
AMINOACIDOS EN MUESTRAS DE SANGRE
TOTAL COLECTADA EN PAPEL FILTRO

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A
ISABEL CRISTINA IBARRA GONZALEZ

MEXICO, D.F.

1995

FALLA DE ORIGEN

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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 esta 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.



EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUIMICA

JURADO ASIGNADO:

Presidente	Prof.: LUZ ELENA VERA ÁVILA
V o c a l	Prof.: JUAN CARLOS LÓPEZ FLORES
Secretario	Prof.: HOMERO HERNÁNDEZ MONTES
1er Suplente	Prof.: JESÚS FERNANDO MONTIEL AGUIRRE
2do Suplente	Prof.: JOSÉ DE JESÚS GARCÍA VALDÉS

El presente trabajo se realizó en la Unidad de Genética de la Nutrición del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección del Q. Juan Carlos López Flores.

ASESOR

SUSTENTANTE

Q. Juan Carlos López Flores.

Isabel Cristina Ibarra González.

La Naturaleza no está en ningún sitio más dispuesta a revelar sus misteriosos secretos, que en aquellos casos en los cuales nos muestra las huellas de su obra fuera de los caminos habituales; y no hay mejor manera de avanzar hacia una práctica más adecuada de la medicina, que abriendo nuestras mentes al descubrimiento de las leyes de la Naturaleza mediante la investigación cuidadosa de los casos de enfermedades en sus formas más raras. Porque lo que se ha visto en casi todas las cosas, es que lo que contienen de útil y aplicable apenas se percibe, a menos que estemos faltos de ellas o que se distorsionen en alguna forma.

WILLIAM HARVEY (1657)

DEDICATORIAS

A mis padres, Gloria y Raúl.

Con profundo agradecimiento por el amor, el apoyo, la paciencia, la educación y la confianza que me han brindado.

A mis hermanos, Martha, Patricia, Gerardo, Javier y Sonia.
Por su ejemplo de superación constante.

☺ A Ely y a Julio por hacer más grande nuestra familia.

**... AL MAESTRO, AL AMIGO, AL HOMBRE
QUE CON SUS ENSEÑANZAS ME SUPO GUIAR EN ESTA IMPORTANTE
ETAPA DE MI VIDA, CONVIRTIÉNDOSE EN PARTE DE ELLA.**

AGRADECIMIENTOS

A la Dr. Luz Elena Vera y al Dr. Homero Hernández por sus comentarios y críticas al presente trabajo.

Al Dr. Antonio Velázquez por su estímulo y apoyo.

A mis compañeros y amigos de la Unidad de Genética de la Nutrición.

A mis compañeros y amigos del Hospital de PEMEX Picacho.

A mis amigos de la Facultad.

A la Facultad de Química, a sus maestros, y a la Universidad.

AGRADECIMIENTOS

👉 De manera muy especial quiero agradecer a quienes han compartido conmigo el significado de la palabra AMISTAD.

Clau, Naty, Mony y Dante.

ÍNDICE

PAGS

1	RESUMEN	9
2	INTRODUCCIÓN	10
3	OBJETIVO	11
4	GENERALIDADES	
4.1	Errores Innatos del Metabolismo	12
4.1.1	Errores Innatos del Metabolismo de Aminoácidos	13
4.1.1.1	Aminoácidos Aromáticos	13
4.1.1.2	Aminoácidos de Cadena Ramificada	15
4.2	Fundamentos Cromatográficos	17
4.2.1	Cromatografía de Líquidos	18
4.2.2	Conceptos Teóricos	22
4.3	Equipo	30
4.4	Análisis de aminoácidos por Cromatografía líquida de alta resolución	37
5	MATERIAL Y MÉTODO	
5.1	Instrumentación	42
5.2	Procedimiento	42
5.2.1	Condiciones Cromatográficas	42
5.2.2	Derivatización y Análisis Cromatográfico	43
5.2.3	Preparación de los Estándares	43
5.2.4	Extracción de los Estándares	44
5.2.4.1	En disolución acuosa	44

	5.2.4.2 En sangre total	44
6	RESULTADOS	45
7	DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES	60
8	BIBLIOGRAFÍA	64
9	ANEXOS	66

RESUMEN

El perfil de aminoácidos libres en fluidos biológicos es de gran importancia para el diagnóstico y seguimiento de patologías tales como los errores innatos del metabolismo, los cuales son más frecuentes en poblaciones pequeñas altamente endogámicas, donde no se cuenta con las facilidades para realizar este tipo de análisis, y donde la obtención y transporte de muestras biológicas presenta graves problemas. Debido a lo anterior, el paciente se ve obligado a realizar viajes constantes a los centros de estudio con el consecuente gasto de tiempo y dinero.

Las muestras de sangre total colectadas en papel filtro son mucho más fáciles de colectar, manejar y transportar que las muestras de plasma o suero; además del hecho relevante de que los amino ácidos en sangre seca en papel filtro muestran una alta estabilidad.

Con el objetivo de contar con una metodología adecuada para la elución de amino ácidos libres presentes en muestras de sangre colectada en papel filtro, para su posterior cuantificación, se realizó una serie de extracciones experimentando con diferentes disolventes y tiempos de extracción en baño de ultrasonido.

El disolvente con el cual se obtuvieron los resultados más satisfactorios para la mayoría de los amino ácidos fue el metanol, con un tiempo de extracción de 30 minutos.

El posterior análisis y cuantificación de los amino ácidos extraídos se realizó por cromatografía líquida de alta resolución, en fase inversa, columna C18, empleando OPA como reactivo derivatizante (precolumna) y detección por fluorescencia.

El análisis para todo el proceso de extracción y cuantificación muestra resultados satisfactorios en cuanto a linealidad y reproducibilidad para la mayoría de los aminoácidos estudiados.

INTRODUCCIÓN.

Los aminoácidos presentes en fluidos biológicos son producto de un sistema de transporte y metabolismo de las proteínas. Los niveles de aminoácidos libres representan el balance entre la utilización de aminoácidos por los tejidos y el catabolismo tanto de las proteínas de la dieta como de las proteínas corporales, así como el producto de biosíntesis de otros intermediarios, dichos niveles presentan poca variación de día a día, entre persona y persona, cuando se trata de individuos sin problemas de nutrición, por lo tanto los cambios del perfil de aminoácidos son indicadores importantes de una gran variedad de condiciones fisiológicas y patológicas.

Los Errores Innatos del Metabolismo (EIM) o enfermedades metabólicas hereditarias son enfermedades monogénicas secundarias a un defecto en una proteína que causa un bloqueo en alguna vía metabólica, con repercusión clínica en el organismo. Los síntomas clínicos pueden ser explicados bien por la acumulación de sustrato, por deficiencia de producto, o por alteraciones en la concentración de metabolitos de vías colaterales a la del bloqueo. Se han identificado muchos errores genéticos que afectan los niveles de aminoácidos en el organismo. En la mayoría de estos errores metabólicos se presentan síntomas clínicos en el periodo neonatal, manifestándose en grados variables desde leve hasta letal.

Hasta ahora no existe terapia definitiva para estas enfermedades. El tratamiento para el manejo de estos pacientes, es esencialmente el control dietético (restricción de sustrato, suplemento de metabolitos deficientes, megadosis de coenzima), que debe cubrir los requerimientos de todos los nutrientes, para lograr un desarrollo adecuado y evitar el catabolismo de compuestos que puedan precipitar nuevamente la sintomatología. Los requerimientos de aminoácidos cambian progresivamente durante el desarrollo, por lo tanto el manejo óptimo requiere una reiterada valoración nutricional (adecuación de la dieta, vigilancia de crecimiento tanto en peso como en talla, determinación de las concentraciones de aminoácidos)

En México los errores innatos del metabolismo muestran su mayor incidencia (85% de los pacientes con aminoacidopatías registrados en el Instituto Nacional de Pediatría) en estados del interior del país, donde no existen centros que puedan realizar el diagnóstico de la enfermedad y el seguimiento al paciente, dicho diagnóstico y seguimiento se realiza en la Unidad de Genética de la Nutrición del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM con sede en el Instituto Nacional de Pediatría, centro de referencia de EIM en México, por lo tanto los pacientes tienen que realizar viajes a este centro para su seguimiento con el consecuente gasto de tiempo y dinero.

El diagnóstico se realiza a través del análisis de aminoácidos en muestras de plasma o suero obtenidas del paciente en el hospital. Para su seguimiento no siempre es necesaria la presencia del paciente y la vigilancia podría realizarse analizando el perfil de aminoácidos en muestras de su plasma, ya que el transporte de la muestra requiere condiciones especiales para evitar su deterioro y en virtud de que las muestras de sangre total colectadas en papel filtro son más fáciles de manejar y transportar y en las cuales se ha demostrado la estabilidad de los aminoácidos libres se decidió desarrollar una metodología de extracción confiable y eficiente que permita eluir los aminoácidos a partir de sangre total colectada en papel filtro, para su análisis posterior por cromatografía.

OBJETIVO

Implementar un método de extracción de los aminoácidos de sangre total colectada en papel filtro para su posterior cuantificación.

GENERALIDADES

ERRORES INNATOS DEL METABOLISMO³⁻⁸

Los errores congénitos del metabolismo se definen como alteraciones bioquímicas de origen genético debidas a errores innatos de la estructura y/o función de las moléculas proteicas. Son trastornos heredados en forma autosómica recesiva en su mayoría. Sir Archibald Garrod fue el primero en establecer el concepto de enfermedades metabólicas congénitas (1902), para describir sus estudios sobre alcaptonuria, albinismo, cistinuria y pentosuria.

Aunque el término " errores congénitos del metabolismo " fue utilizado por Garrod mucho antes de que se supiera que los genes están formados por una secuencia lineal de nucleótidos, los cuales dirigen la síntesis de un polipéptido específico, en la actualidad parece lógico describir los errores congénitos del metabolismo partiendo de los conceptos actuales sobre la interacción gen-proteína.

No fue hasta 1952 que se tuvo la primera demostración de un defecto en una enzima específica en un error innato, cuando Gerty Cori demostró que la enfermedad de Von Gierke es debida a una deficiencia en la actividad de la enzima glucosa-6-fosfatasa.

Los síntomas clínicos pueden ser explicados por el bloqueo total o parcial en una vía metabólica, causado por la ausencia o disminución de la actividad enzimática, teniendo consecuencias variables que son principalmente de dos tipos:

- 1.-Acumulación de sustratos anteriores al bloqueo.
 - La acumulación de dichos productos puede ser por si misma dañina.
 - Apertura de vías alternas, con acumulación de metabolitos tóxicos.
- 2.-Deficiencia de producto.
 - Que puede ser sustrato de reacciones subsecuentes.
 - El control de la vía por el mecanismo de retroalimentación puede ser dañado.

ERRORES INNATOS EN EL METABOLISMO DE AMINOÁCIDOS

Los errores innatos relacionados con la bioquímica de los aminoácidos son muchos en número y muy variados en sus fundamentos bioquímicos, en sus manifestaciones, en la severidad de sus cuadros y en sus tratamientos. Por esta razón, sólo se describirán algunos de estos de manera muy breve.

AMINOÁCIDOS AROMÁTICOS

La degradación de la fenilalanina y la tirosina en el hombre ocurre en una serie de pasos cada uno de los cuales es catalizado por un sistema enzimático.(Figura 1).

La fenilalanina (Fen) es un aminoácido esencial, es decir, que su aporte exógeno es indispensable. Normalmente, la Fen de la dieta que no es utilizada, se degrada por la vía metabólica de la tirosina (Tir). La ausencia o deficiencia de la enzima fenilalanina hidroxilasa (FH) (A) o de su cofactor, la tetrahidrobiopterina, causa acumulación de Fen en los fluidos corporales. Existen diversas formas clínicas y bioquímicas de hiperfenilalaninemia: fenilcetonuria (FCU) clásica, FCU secundaria a deficiencia del cofactor, hiperfenilalaninemia persistente e hiperfenilalaninemia transitoria. Todos se heredan en forma autosómica recesiva.

La FCU clásica está causada por la completa o casi completa deficiencia de la enzima FH. Esta deficiencia causa una acumulación anormal de Fen en sangre, orina, líquido cefalorraquídeo (LCR) y en el resto de los tejidos. El exceso de Fen se transamina a ácido fenilpirúvico o se descarboxila hacia feniletilamina. Éstos y sus metabolitos subsecuentes causan daño cerebral. Los pacientes afectados son asintomáticos al nacimiento, iniciándose el retraso mental gradualmente. El primer síntoma suele ser los vómitos incoercibles. Los pacientes no tratados presentan movimientos incoordinados, crisis convulsivas de difícil control y movimientos rítmicos de las extremidades a lo largo de su desarrollo. Además, es frecuente encontrar dientes espaciados y retraso en el crecimiento, los pacientes suelen

tener el cabello más claro que el resto de sus hermanos no afectados, pero no todos los niños con FCU son rubios y de piel clara.

La Tir se obtiene de las proteínas de la dieta, además de ser sintetizada endógenamente a partir de la Fen. En el organismo, la Tir es utilizada para la síntesis de proteínas, así también, como precursor de dopamina, norepinefrina, epinefrina, melanina y tiroxina. En individuos normales, el exceso de Tir se metaboliza hacia bióxido de carbono y agua. Los errores innatos relacionados con este aminoácido pueden incidir sobre cualquiera de las vías metabólicas en que participa, lo que produce una gran variedad de manifestaciones clínicas.

La tirosinosis es producida por la ausencia de la enzima p-hidroxifenil pirúvico oxidasa (B). Esta patología consiste en una alteración en el metabolismo de la Tir que causa enfermedad hepática severa en la infancia. Se hereda en forma autosómica recesiva.

Existen dos formas de presentación clínica de la enfermedad: la temprana y la tardía, siendo más dramática la de inicio temprano. Los pacientes desarrollan hepatomegalia, ictericia, coagulopatias y otros signos de hepatopatía severa.

Un defecto más de esta vía, es el conocido como alcaptonuria, ocasionado por la ausencia de la enzima homogentísico oxidasa (C), la cual degrada el ácido homogentísico, un intermediario en el metabolismo de la Tir. Esta deficiencia da como resultado una acumulación de ácido homogentísico en los tejidos, el cual es oxidado hacia ácido benzoquinonácetico (ABQA). Los pacientes afectados, excretan grandes cantidades de ácido homogentísico por la orina, lo que la hace de color oscuro. Esta enfermedad se caracteriza por producir osteoartritis y pigmentación del tejido conectivo.

La tirosina es convertida en DOPA Quinona (intermediario en la producción de melanina) por la acción de la enzima tirosinasa (D), la falta de ésta es responsable del albinismo que es uno de los errores innatos más antiguamente reconocidos.

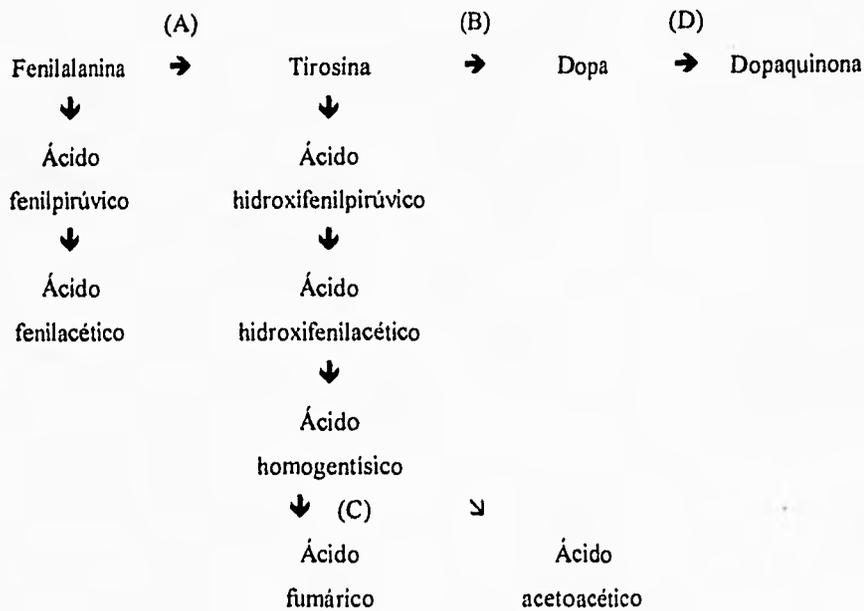
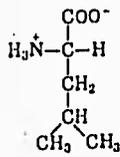


Figura 1 Bloqueos en el metabolismo de los aminoácidos fenólicos

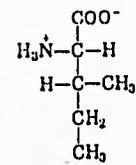
AMINOÁCIDOS DE CADENA RAMIFICADA

Enfermedad de Jarabe de Maple. La valina, leucina e isoleucina, son primero convertidos en su cetoácido correspondiente por transaminación. Sobre dichos cetoácidos actúa la descarboxilasa oxidativa, cuya deficiencia genética, tiene como consecuencia la acumulación de los aminoácidos de cadena ramificada: valina, leucina e isoleucina, de sus cetoácidos respectivos, y sus hidroxiaácidos correspondientes en la sangre eliminándose gran cantidad por orina y dándole a esta un olor muy particular a jarabe de maple (figura 2).

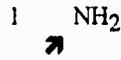
La severidad de la enfermedad depende de la capacidad residual de la enzima. Los pacientes en la forma clásica desarrollan rechazo al alimento, vómitos y letargo hacia la



LEUCINA



ISOLEUCINA

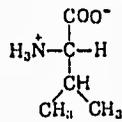


2

CETOÁCIDO
CORRESPONDIENTE



ÁCIDO CON
UN CARBONO
MENOS



VALINA

Figura 2 Esquema parcial de la degradación de los aminoácidos de cadena ramificada. Transaminación a cetoácido (1), seguida de descarboxilación oxidativa (2), sitio de bloqueo de la enfermedad de jarabe de maple.

FUNDAMENTOS CROMATOGRÁFICOS⁹⁻²⁰

La cromatografía es una técnica que abarca un grupo variado e importante de métodos que permiten separar, aislar, identificar y cuantificar componentes presentes en mezclas provenientes de diferentes matrices.

Todos los sistemas cromatográficos constan de una fase móvil que fluye a través de una fase estacionaria. Los componentes de la muestra sufren un equilibrio de distribución entre dichas fases y este equilibrio determina la velocidad con la que los componentes migran a través de el sistema.

La fase estacionaria puede ser un líquido inmovilizado en un soporte inerte o un sólido; mientras que la fase móvil puede ser un gas y por esto, esta técnica se denomina cromatografía de gases, o un líquido y, de aquí, es llamada cromatografía de líquidos.

Las fuerzas físicas y químicas que actúan entre el soluto y las dos fases son responsables de la retención del soluto, la diferencia de magnitud de estas fuerzas determina la resolución y por lo tanto la separación de cada soluto.

Las fuerzas que pueden actuar sobre las moléculas son las siguientes:

- 1.- Fuerzas de dispersión de London o fuerzas de Van der Waals que actúan entre moléculas, causando momentáneamente distorsión de su configuración electrostática.
- 2.- Interacciones dipolo-dipolo que surgen en moléculas temporalmente distorsionadas y resultan en una atracción electrostática entre dichas moléculas.
- 3.- Puentes de hidrógeno
- 4.- Interacciones dieléctricas, como resultado de atracción electrostática entre las moléculas de soluto y un disolvente de mayor constante dieléctrica.
- 5.- Interacciones electrostáticas o fuerzas de Coulomb.

Cualquier variable que afecte dichas fuerzas tiene influencia en el grado de separación obtenido.

CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS

El término cromatografía de líquidos se usa para referirse a aquellos procesos en los que la separación tiene lugar dentro de una columna empacada, utilizando una fase móvil líquida

La cromatografía líquida fue utilizada durante muchos años en su versión clásica. Se trabajaba con una columna de vidrio con diámetros entre 2 y 10 centímetros, empacadas con materiales tales como sílice, alúmina, etc.; y cuyo tamaño de partículas eran de 200 μ aproximadamente. La muestra se introducía en la fase móvil o en un disolvente adecuado y la elución se realizaba pasando la fase móvil a través de la columna por efecto de la gravedad. Posteriormente, se colectaban las fracciones eluidas para su cuantificación. En la actualidad esta técnica se utiliza con fines semipreparativos.

La cromatografía de líquidos permite el análisis de compuestos líquidos y sólidos de muy variada naturaleza: orgánicos e inorgánicos, iónicos o covalentes, no está limitada por la volatilidad de la muestra ni por su estabilidad térmica (como es el caso de la cromatografía de gases) por lo que resulta idónea para la separación de macromoléculas y especies de interés biomédico, productos de naturaleza lábil y una amplia variedad de otros compuestos de alto peso molecular y/o menos estables entre los que se encuentran proteínas, ácidos nucleicos, aminoácidos, polisacáridos, algunos fármacos, vitaminas, etc.

La cromatografía de líquidos tiene otra ventaja comparada con la de gases, existe en ésta una interacción selectiva de las moléculas de la muestra con dos fases cromatográficas, mientras que en cromatografía de gases solo con la fase estacionaria.

La cromatografía de líquidos ha presentado un gran avance tecnológico en columnas, detectores y sistema de bombeo e inyección dando lugar a la llamada cromatografía líquida de alta resolución (HPLC siglas en inglés)

CLASIFICACIÓN

Existen muchas formas para dividir la cromatografía de líquidos de alta resolución. Si esta clasificación está basada en la naturaleza de la fase estacionaria y en el proceso de separación, se tienen cuatro divisiones:

1.- **CROMATOGRAFÍA DE ADSORCIÓN.** (Cromatografía líquido-sólido). La más antigua de las metodologías de la cromatografía de líquidos. La cromatografía en capa fina (CPF) es la versión de lecho abierto de esta técnica y dada su versatilidad, es una de las versiones más empleadas de esta cromatografía. Asimismo, es una excelente alternativa para evaluar la mejor combinación de fase móvil y estacionaria para una muestra dada. La fase estacionaria es un absorbente y la separación está basada en pasos repetidos de adsorción - desorción.

2.- **CROMATOGRAFÍA DE PARTICIÓN.** (Cromatografía líquido-líquido). En esta metodología las moléculas de soluto se reparten entre dos líquidos inmiscibles de acuerdo a sus solubilidades relativas. Un líquido es la fase móvil y el otro es llamado la fase estacionaria, la cual está dispersa en un soporte inerte, finamente dividido. Esta fase es normalmente soportada mecánicamente por adsorción. El desarrollo subsiguiente de esta técnica dio resolución a una gran variedad de muestras conteniendo especies hidrosolubles y/o solubles en aceites, así como compuestos iónicos o no iónicos.

3.- **CROMATOGRAFÍA DE INTERCAMBIO IÓNICO.** Este método separa por medio de empaques que poseen grupos funcionales capaces de tener carga en ciertas condiciones. El mecanismo de retención más común es el intercambio simple de

iones X de la muestra e iones Y de la fase móvil, con los grupos cargados R de la fase estacionaria según los siguientes equilibrios:



Los iones de la muestra que interactúen débilmente con la fase estacionaria (en presencia de iones de la fase móvil) serán débilmente retenidos en la columna y eluirán rápidamente, mientras que aquellos iones que interactúen fuertemente con el intercambiador iónico, serán eluidos en un intervalo de tiempo muy grande.

4.- CROMATOGRAFÍA DE EXCLUSIÓN. Separa moléculas de acuerdo a su tamaño efectivo en disolución, utilizando empaques cuyo tamaño de poro está controlado. Si algunas de las moléculas son demasiado grandes para poder entrar en dicho poro, son totalmente excluidas del empaque y aparecen primero en el cromatograma. Las moléculas que son más pequeñas y pueden permear totalmente la fase estacionaria son las más retenidas en la columna, apareciendo al último en el cromatograma. Solutos de tamaño intermedio, que pueden acercarse al centro del poro, mas no penetrarlo completamente, pasan menos tiempo en la columna y aparecen en la zona intermedia del cromatograma. Dado que las moléculas de disolvente son en general muy pequeñas, son eluidas al último en el tiempo t_0 . Luego entonces, en este tipo de cromatografía, toda la muestra eluye en tiempos menores a t_0 ($k' < 0$), y esta es la diferencia fundamental con las otras cromatografías.

5.- CROMATOGRAFÍA DE PARES DE IONES. Esta cromatografía surge principalmente de las limitaciones de la cromatografía de intercambio iónico y de la dificultad de tratar ciertas muestras por otras técnicas cromatográficas, como compuestos que son muy polares, multi-ionizados y/o fuertemente básicos. Esta técnica puede ser realizada en fase normal o inversa. Por mencionar un ejemplo, en fase inversa con par de iones puede ser ya sea un empaque normalmente silanizado como el utilizado en fases químicamente unidas (C18 o C8), o fases orgánicas no miscibles con agua como 1-pentanol y que están mecánicamente adheridas a un

soporte. La fase móvil consiste de un amortiguador acuoso al cual se le ha añadido un codisolvente orgánico (metanol o acetonitrilo) y un contraión de carga opuesta a la de la muestra. De esta forma, el par iónico formado es soluble en la fase orgánica y se puede realizar la separación.

6- FASES QUÍMICAMENTE UNIDAS. este tipo de cromatografía se desarrolló originalmente para eliminar las desventajas de la cromatografía líquido-líquido, que se basa en líquidos adheridos en forma mecánica, como fase estacionaria. Dado que este tipo de fases son muy estables, esto es, la fase estacionaria no se puede extraer del soporte fácilmente, este tipo de cromatografía, al no requerir presaturación con la fase móvil, es especialmente útil para muestras conteniendo una variedad de compuestos con un gran intervalo de valores para k' , los cuales requieren de gradientes de elución.

Si es dependiendo de la polaridad relativa de las dos fases se definen dos divisiones: Cromatografía de fase normal y Cromatografía de fase inversa.

En la cromatografía de fase normal, la fase estacionaria es más polar que la fase móvil, puede estar formada por sílica o por sílica modificada a la cual se han enlazado cadenas de hidrocarbonadas cortas que contienen grupos amino ($-NH_2$), ciano ($-CN$) o tiol ($-SH$), y la fase móvil es no polar (como hexano).

En la cromatografía de fase inversa, la fase estacionaria es menos polar que la fase móvil, se utilizan empaques de sílica que han sido unidos químicamente con grupos funcionales como el grupo octilo, octadecilo, etc., mientras que la fase móvil es un líquido polar como el agua.

Por ser la técnica empleada en el presente trabajo, los términos siguientes serán referidos a ésta.

CONCEPTOS TEÓRICOS

CROMATOGRAMA

Es el patrón de elución de los componentes de una mezcla, es una gráfica de respuesta del detector en función del tiempo. A cada componente eluido, le corresponde un pico.

Un pico cromatográfico ideal es una curva cuya forma es gaussiana y por lo tanto puede ser descrita por parámetros derivados de la distribución estadística normal, tales como la desviación estándar σ , que sobre una curva gaussiana se define como la semianchura tomada al 60.7% de la altura total.

En la figura 3, se muestran los parámetros de un pico cromatográfico donde: W_i , es el ancho del pico medido en los puntos de inflexión, que están ubicados al 60.7% de la altura total del pico, el ancho en este punto corresponde a 2σ . En ella se muestra como el ancho de un pico en cualquier punto puede expresarse como un múltiplo de la desviación estándar.

Si se trazan tangentes en los puntos de inflexión extendiéndolas hasta la línea base, el ancho del pico (W_b), es la distancia que existe entre ellas y es igual a 4σ .

El ancho del pico medido al 50% de su altura es $W_{0,5}$ y corresponde a 2.354σ .

El área del pico desde el punto que la señal registrada deja la línea base, hasta el punto en donde vuelve a ella, es proporcional a la concentración del soluto.

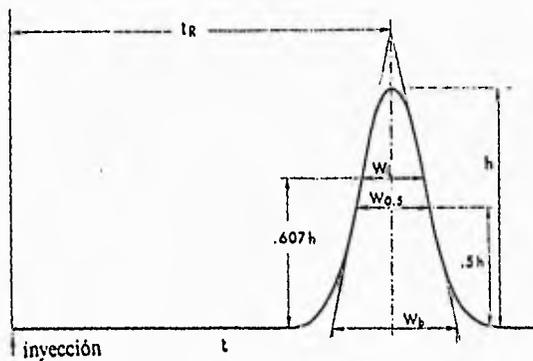


Figura 3 Valores relativos de σ y h

PARÁMETROS CROMATOGRÁFICOS

COEFICIENTE DE DISTRIBUCIÓN (K).

Define la distribución de un compuesto dado entre dos fases.

$$K = \frac{[A]_e}{[A]_m} \quad 1$$

Donde:

$[A]_e$, es la concentración de A en la fase estacionaria.

$[A]_m$, es la concentración de A en la fase móvil.

VOLUMEN DE RETENCIÓN (V_r).

Es el volumen del disolvente necesario para que el soluto salga de una columna cromatográfica en su concentración máxima. Depende de los volúmenes relativos de las dos fases y de los coeficientes de distribución.

$$V_r = V_m + K V_e \quad 2$$

Donde:

V_m es el volumen muerto.

V_e es el volumen de la fase estacionaria.

VOLUMEN MUERTO (V_m).

Representa el espacio intersticial entre las partículas del empaque de la columna y cualquier poro del empaque mismo que puede ser ocupado por la fase móvil.

TIEMPO DE RETENCIÓN (t_r).

Se le denomina al tiempo en el cual eluye, es decir, sale de la columna la concentración máxima una sustancia. Se mide desde el momento en que la muestra se introduce en el sistema hasta que se obtiene el punto máximo de la señal o pico. Es una función que depende del largo de la columna, de la velocidad de la fase móvil, de la afinidad del soluto por las fases estacionaria y móvil y de la temperatura.

El volumen de retención (V_r) y el tiempo de retención (t_r) pueden ser relacionados por la siguiente ecuación:

$$V_r = t_r * f \quad 3$$

Donde f es el flujo de la fase móvil y está dado en ml/min.

TIEMPO MUERTO (t_0).

Es el tiempo necesario para que una molécula de un soluto sin afinidad por la fase estacionaria, atraviese lo largo de la columna.

La altura se mide en el máximo del pico, por lo tanto, corresponde a la mayor concentración de la zona. En este punto de altura máximo se miden los tiempos y volúmenes de retención.(fig. 4)

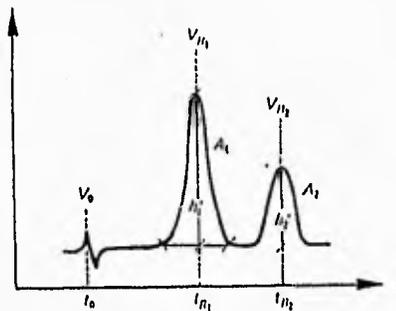


Figura 4 Parámetros cromatográficos.

EFICIENCIA. NÚMERO DE PLATOS TEÓRICOS (N).

La eficiencia de una columna cromatográfica es determinada por el número de platos teóricos bajo condiciones cromatográficas definidas. El número de platos teóricos (N) es evaluado a partir de los datos de un pico cromatográfico (fig. 1), de acuerdo con la siguiente ecuación.

$$N = 16\left(\frac{t_r}{W_b}\right)^2 = 5.54\left(\frac{t_r}{W_{1/2}}\right)^2 \quad 4$$

Donde:

W_b es el ancho en la base del pico.

$W_{1/2}$ es el ancho del pico medido al 50% de su altura.

Puede aumentar el valor de N al incrementar la longitud de la columna, pero esto ocasionaría un incremento en los tiempos de retención, por lo tanto mayor tiempo de análisis

ALTURA EQUIVALENTE A UN PLATO TEÓRICO (H)

Relaciona el número de platos teóricos (N) con la longitud de la columna (L)

$$H = \frac{L}{N} \quad 5$$

La cantidad H mide la eficiencia de una columna dada (operada bajo un juego específico de condiciones) por unidad de longitud de columna. valores pequeños de H significan columnas más eficientes y valores grandes de N. El objetivo de la cromatografía en general es alcanzar valores pequeños de H y grandes de N, con el fin de obtener la máxima eficiencia. En general H es menor para:

- Empaques con tamaño de partícula pequeño, y flujos bajos de fase móvil.
- Fases móviles no viscosas y temperaturas de separación mayores.
- Moléculas pequeñas.

De lo anterior, puede deducirse que una buena separación se obtendrá con columnas largas, empaçadas con partículas de diámetro pequeño, fases móviles no viscosas a flujos bajos con temperaturas de análisis altas. Adicionalmente, se sabe que la separación de compuestos con peso molecular mayor de 1000 es mucho más complicada que con moléculas ligeras.

Uno de los factores que más afectan el valor de H para una columna dada es la velocidad lineal v . El conocer como es esta relación es de vital importancia para entender y controlar una separación una vez que se ha escogido el tipo de cromatografía y la naturaleza de las fases a utilizar. Se puede describir la relación entre estas dos variables por medio de la siguiente ecuación:

$$H = Av^{0.33} + \frac{B}{v} + Cv \quad 6$$

Las constantes A, B y C varían de columna a columna y dependen en cierto grado de la muestra analizada y de la temperatura de separación.

1.- EFECTO MULTICANALES. Término A.

Dado por los múltiples caminos posibles que pueden recorrer las moléculas del soluto, causando ensanchamiento de las bandas o picos. Por lo que para lograr reducir este efecto se utilizan partículas esféricas, de diámetro pequeño y homogéneo, con una alta densidad de empaçado.

2.- EFECTO DE DIFUSIÓN LONGITUDINAL. Término $\frac{B}{v}$

Donde B está en función de el coeficiente de difusión y la viscosidad de la fase móvil, v es la velocidad de la fase móvil.

3.- RESISTENCIA A LA TRANSFERENCIA DE MASA. Término Cv .

Debido a la suma de la resistencia a la transferencia de masa en las fases estacionaria y móvil. Dada por la viscosidad, diámetro de las partículas del empaque y los coeficientes de difusión de los solutos en ambas fases.

FACTOR DE CAPACIDAD (k').

Es la medida del grado de retención. Teóricamente puede ser definido como la relación de la masa del soluto en la fase estacionaria entre la masa del soluto en la fase móvil y se calcula mediante la siguiente ecuación:

$$k' = \frac{(V_r - V_o)}{V_o} \quad 7$$

Si se expresa en función del tiempo utilizando (3), se tiene:

$$k' = \frac{(t_r - t_0)}{t_0} \quad 8$$

Para lograr una adecuada resolución en un corto tiempo de análisis, los valores óptimos de k' deberán estar en un intervalo de $2 \leq k' \leq 5$.

Adecuando la fuerza de la fase móvil ajustamos la retención, con excepción de la cromatografía de exclusión. Una fase móvil fuerte disminuye los valores de k' , en tanto que una fase móvil débil los aumenta.

Al utilizar mezclas de disolventes como fase móvil la fuerza se incrementa al aumentar la proporción del o los disolventes más fuertes. El término de fuerza de la fase móvil es un concepto relativo, ya que depende de la técnica a la que se refiera. En fase normal la fuerza del disolvente se incrementa con la polaridad del disolvente. En fase inversa mientras más baja es la polaridad del disolvente, mayor es la fuerza de elución.

FACTOR DE SELECTIVIDAD (α).

Es una medida de la interacción selectiva de dos compuestos con la fase estacionaria. Describe la posición relativa de dos picos adyacentes y se define como el cociente de sus respectivos valores de k' .

$$\alpha = \frac{k_1}{k_2} \quad 9$$

Puede ser mejorado por el cambio de fase móvil, el cambio de fase estacionaria y control de la temperatura, un valor elevado significa una mayor separación.

RESOLUCIÓN (Rs).

Es una medida cuantitativa del grado de separación entre dos compuestos, se expresa como:

$$R_s = \frac{2(tr_2 - tr_1)}{W_2 + W_1} \quad 10$$

Donde:

W_1 y W_2 son los anchos de la base de cada pico (en unidades de tiempo)

tr_1 y tr_2 son los tiempos de retención de los compuestos 1 y 2.

La Ecuación General de la Resolución muestra los tres factores responsables de la separación: la eficiencia (termino a), la selectividad (termino b) y la retención (termino c).

$$R_s = \left(\frac{\sqrt{N}}{4}\right) \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha}\right) \left(\frac{k'}{1 + k'}\right) \quad 11$$

a b c

Donde:

α es el factor de selectividad.

N es el número de platos teóricos.

k' es el factor de capacidad.

Para obtener una adecuada separación es necesario que $R_s > 1$, y esto se logra ajustando los términos arriba mencionados a valores adecuados.

Para mayor información sobre la deducción de las fórmulas mencionadas ver las referencias 9 y 10.

EQUIPO

Se cuenta actualmente con una amplia gama de equipo en cuanto a costo, complejidad y tipo de instrumental. En general un sistema cromatográfico de líquidos de alta resolución consta de los siguientes componentes:

- 1.-Recipiente de almacenamiento para la fase móvil.
- 2.-Bomba (s), que servirán para impulsar la fase móvil.
- 3.-Controlador de gradiente.
- 4.-Inyector, que es el mecanismo para introducir la muestra.
- 5.-Columna, la cual contiene la fase estacionaria.
- 6.-Detector, obtiene datos que permiten la evaluación cualitativa y cuantitativa de los resultados
- 7.-Registrador: Al emerger un compuesto ya separado en la columna y pasar por el detector, la señal que provoca en éste debe ser registrada por un graficador o un integrador.

FUENTE

**DE FASE — BOMBA — INYECTOR — COLUMNA — DETECTOR — REGISTRADOR
MÓVIL**

Figura 5 Esquema del equipo empleado en cromatografía de líquidos

RECIPIENTE DE ALMACENAMIENTO DE LA FASE MÓVIL

Son recipientes de material inerte, vidrio o plástico que contienen la fase móvil. Existe una tendencia del oxígeno y otros gases a disolverse en las fases móviles, principalmente en las polares, por lo que es necesario desgasificarla antes de su uso. Esto se logra purgándola con un gas inerte o por medio de un baño de ultrasonido ya que si no se elimina el aire,

dentro del instrumento se forman burbujas que afectan el funcionamiento del sistema de bombeo y con ello la eficiencia de la columna.

SISTEMA DE BOMBEO

Su función es proporcionar la fase móvil de manera constante y reproducible durante todo el tiempo del análisis. Puesto que la resistencia al flujo en las columnas utilizadas es muy alta, es necesario que el sistema de bombeo haga fluir la fase móvil a un flujo razonable, ya que de otro modo el análisis sería extremadamente lento.

Las características que debe presentar todo sistema de bombeo son:

- Proporcionar flujo continuo, reproducible y libre de pulsaciones
- Contar con sistema de seguridad para protección del equipo.
- Facilidad de limpieza del sistema.
- Presión máxima de operación.
- Intervalo de flujo obtenido
- Facilidad para cambio de fases móviles.
- Componentes resistentes a disolventes.

INYECTOR

Un factor muy importante para obtener una buena resolución es la adecuada introducción de la muestra en el sistema. La manera ideal de introducir o inyectar una muestra, es en forma de "paquete" pequeño ya que esto ayuda en la obtención de picos simétricos y angostos.

El método más común para introducir la muestra es por medio de válvulas inyectoras de seis pasos cuyo funcionamiento se muestra en la figura 6.

Los inyectores automáticos constan de una válvula de inyección automática, un sistema de llenado de válvula y un control electrónico que sirve para controlar funciones tales como

tiempo de inyección, volumen de inyección, lavado de válvula y jeringa. Los sistemas de inyección automáticos eliminan algunos errores que se presentan en el análisis cuantitativo, ocasionados con las técnicas de inyección manuales además permiten una operación sin atención.

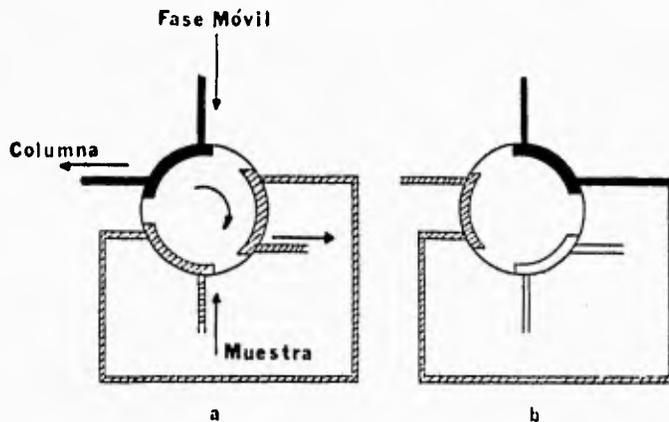


Figura 6 Inyección utilizando una válvula inyectora. a) Tomando la muestra; b) inyectando.

En la posición de carga el flujo de la fase móvil pasa a través de la válvula directamente a la columna, es en este momento cuando se introduce la muestra al "loop" de la válvula, usando una jeringa. Cuando se cambia la válvula con la muestra a la posición de inyectar, la fase móvil ahora viaja por el "loop" y lleva la muestra hacia la entrada de la columna.

DETECTORES

La función del detector es monitorear durante todo el tiempo del análisis la composición de la fase móvil al salir de la columna.

Los detectores se han clasificado dentro de dos grandes grupos:

- 1.-Detectores de tipo universal, que miden el cambio que sufre la fase móvil y la muestra en alguna propiedad física

2.-Detectores de tipo selectivo, sensibles únicamente a una propiedad específica del soluto.

El tipo de detector que se utilice para resolver un determinado problema depende de las propiedades del soluto, la sensibilidad y selectividad requeridas, además de la conveniencia y práctica de uso.

Las características que debe presentar el detector ideal son:

- Alta sensibilidad
- Respuesta a todos los componentes de la mezcla.
- Respuesta rápida.
- Amplio intervalo de linealidad.
- Estabilidad, respuesta no alterada por cambios en la velocidad de flujo o de temperatura.
- Bajo nivel de ruido.
- De fácil operación.

Los detectores más frecuentemente usados en cromatografía de líquidos de alta resolución son los detectores ópticos. Las variaciones en la intensidad de la luz causadas por la absorción UV- visible, fluorescencia o índice de refracción resultantes de la interferencia encontrada al pasar los componentes de la muestra a través de la celda, son monitoreados como cambios de voltaje los cuales son registrados en un integrador.

PROPIEDADES GENERALES DE UN DETECTOR

Sensibilidad: Se refiere a la relación entre la señal generada y la cantidad de muestra que produce dicha señal.

Ruido: Es la variación en la señal del instrumento que no es atribuida a la muestra, se refiere a la inestabilidad de la línea basal y puede ser debida a causas como ruido por conexiones electrónicas.

Linealidad: El intervalo lineal de un detector se puede definir como la relación entre las concentraciones máximas y mínimas respecto a las cuales la respuesta es lineal, es decir si la respuesta eléctrica producida por el detector es directamente proporcional a la masa o concentración de los componentes que pasan por el detector.

COLUMNA

Es aquí donde se efectúa la separación de los componentes de la mezcla. Básicamente es un segmento de tubo de material inerte (acero inoxidable), de diámetro uniforme y capaz de resistir altas presiones, su longitud varía entre 5 y 30cm., con un diámetro interno de 2 a 5mm, empacado con partículas de tamaño entre 3 y 10 μ como fase estacionaria.

FASE ESTACIONARIA

Los empaques para las columnas en cromatografía de líquidos de alta resolución pueden ser un material sólido poroso, con algunas diferencias en composición, estructura y tamaño de partícula en función del tipo de cromatografía. Los materiales usados son generalmente sílice y alúmina; Pueden ser de forma esférica o irregular, pueden utilizarse como fase estacionaria por sí mismos o bien pueden ser soporte de una fase estacionaria químicamente unida.

Las fases químicamente unidas se desarrollaron en la década de los 70's. La estabilidad de éstas es muy buena se utilizan empaques con grupos polares en cromatografía en fase normal y empaques no polares, en la denominada cromatografía en fase inversa.

Las fases estacionarias se ligan químicamente al soporte mediante una reacción de silanización, en donde los grupos OH de la sílica reaccionan con un cloroalquil-silano para dar una ligadura Si-O-Si-R, estable térmicamente y no hidrolizable (figura 7). También existen fases enlazadas con otros grupos polares, tales como el ciano o amino al final de la cadena de hidrocarburos.

Tamaño y forma de partícula. Para fines analíticos se pueden encontrar materiales de empaque con tamaños de van de 3 a 10 μ ; el valor es nominal pues en realidad se presenta una distribución de tamaños de partícula. Esta distribución tiene un papel importante en parámetros como la presión y la eficiencia, en forma teórica, mientras menor sea el tamaño de partícula y más homogénea sea su distribución, mayor será la eficiencia y la presión del sistema .

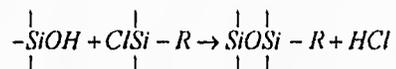


figura 7

FASE MÓVIL

La fase móvil desempeña un papel crítico en cromatografía de líquidos por lo que su adecuada selección es uno de los factores más importantes al establecer los parámetros de una separación.

Las características necesarias en una fase móvil para cromatografía de líquidos son :

- No precipitar la muestra
- Que no afecte la integridad química de la fase estacionaria.
- Tener baja viscosidad tal que permita un bombeo a presión que no sea perjudicial al sistema.
- Ser compatible con el detector utilizado.

La selección de los disolventes a emplear como fase móvil depende de varios factores y propiedades del disolvente que deben considerarse incluyendo la fuerza y la selectividad, así como también algunas otras características físicas como punto de ebullición, viscosidad y otras que pueden influir en la función del detector, la absorción que presenten, el índice de refracción, etc.

Además se deben considerar las reacciones intermoleculares que pueden ocurrir entre las moléculas del soluto y las moléculas de la fase móvil (dispersión, dipolo, puentes de hidrógeno, interacciones dieléctricas). La suma de estas interacciones es referida como la polaridad. La fuerza de un disolvente es directamente relacionada con su polaridad.

Existen aditivos y modificadores orgánicos que nos permiten actuar sobre dichas interacciones. Las disoluciones amortiguadoras son los aditivos más frecuentemente utilizados. Actúan controlando la fuerza iónica y el pH del sistema.

Añadir sales reduce la repulsión electrostática entre las moléculas del soluto, y al mismo tiempo aumenta la tensión superficial de las disoluciones acuosas de manera lineal, así el log de k de un soluto neutro aumenta linealmente con la concentración salina debido al aumento en la tensión superficial. Con los solutos ionizados, el log de k primero disminuye con la concentración salina debido a una baja en el término de interacciones electrostáticas y después se incrementa debido al aumento en la tensión superficial.

El pH es un factor importante para establecer el equilibrio de ionización de los compuestos iónicos. La forma ionizada es menos retenida en fase reversa que la forma neutra.

La fase móvil puede mantenerse constante en cuanto a su composición durante todo el proceso de separación denominándose a este proceso isocrático. Elución en gradiente se lleva a cabo cuando se modifica la composición de la fase móvil durante el análisis, esto se realiza si en una muestra multicomponente los solutos tienen valores de k' muy diferentes en un sistema cromatográfico dado. En este caso se observa que los valores de k' de las primeras bandas son demasiado pequeños, teniéndose una resolución muy pobre, mientras que los valores de k' de las últimas bandas son muy grandes, lo que da lugar a picos muy anchos y bajos.

El gradiente de elución se realiza con la mezcla de dos (o más) disolventes; un disolvente inicial débil A y un disolvente fuerte B, la concentración de B en la fase móvil se va

incrementando a lo largo de la separación, de manera tal que los valores de k' de los componentes durante la separación, caen en un rango óptimo $1 < k' < 5$.

ANÁLISIS DE AMINOÁCIDOS POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN.²¹⁻²⁸

El análisis de aminoácidos ha asumido un papel central en muchos campos de la investigación científica durante las pasadas tres décadas y virtualmente todas las técnicas cromatográficas han sido empleadas para este propósito. Debido a que existe un gran número de posibles aplicaciones del análisis de aminoácidos, es claro que no todas las técnicas cromatográficas disponibles se pueden ajustar a todas las demandas. Cualquier técnica que pueda elegirse, exhibe particulares ventajas y desventajas.

El interés en la determinación de aminoácidos libres en fluidos biológicos es tan viejo como el conocimiento de los mismos aminoácidos, la necesidad de la separación de aminoácidos lleva a Martin y Synge en 1941 ha redescubrir la cromatografía líquida en columna; el método fue pronto mejorado con la introducción de la cromatografía en papel por Consden et al. en 1944. En los 50's los colectores automáticos fueron introducidos en la cromatografía líquida en columna, haciendo más fácil la separación de los compuestos.

Este periodo culmina con la introducción del primer analizador de aminoácidos totalmente automático por Spakman et al. Beckman Instruments introduce el primer analizador de aminoácidos comercial en 1959. La cromatografía en capa fina y la cromatografía de intercambio iónico dominaron el área de análisis de aminoácidos en los 60's y 70's. La introducción y el desarrollo de la cromatografía en fase reversa y la formación de derivados en línea genera la posibilidad de ampliar el intervalo de aplicaciones

La habilidad de la cromatografía líquida de alta resolución de separar rápidamente mezclas de matrices complejas, ofrece una tecnología que puede adaptarse al análisis de aminoácidos. Los fluidos biológicos tales como la orina y la sangre contienen una variedad de aminoácidos, una vez resuelto, el perfil de aminoácidos provee información clínica del estado metabólico del individuo. Errores innatos del metabolismo de aminoácidos, han sido diagnosticados mediante la obtención de estos perfiles. La relación entre la dieta, la enfermedad y la condición metabólica es explorada a nivel de aminoácidos.

La cromatografía es lo suficientemente flexible si el interés es enfocado a un grupo selecto de aminoácidos.

El desarrollo de la cromatografía líquida de alta resolución ha continuado fuertemente desde la aparición del primer analizador de aminoácidos durante la pasada década, además en este periodo se han introducido comercialmente fases estacionarias para cromatografía tanto para fase reversa como para intercambio iónico.

Existen ciertas características que son comunes a todas las técnicas cromatográficas, sin embargo el sistema cromatográfico puede ser elegido para resolver los aminoácidos de interés en una muestra dada.

El sistema de detección también ofrece numerosas alternativas, detección directa por índice de refracción o por absorción ultravioleta, pero por lo general carecen de especificidad y sensibilidad adecuadas, por lo que es necesario hacer reaccionar el grupo amino, común en todos los aminoácidos, con un agente derivatizante para dar un producto que pueda ser detectado con gran especificidad y alta sensibilidad. La estructura química del producto de derivatización determinará el sistema de detección. Puede ser empleado un esquema de formación de derivados fuera de línea, en el cual los aminoácidos libres son separados por cromatografía de intercambio iónico, al salir los componentes de la columna son mezclados con el reactivo para formar los derivados, entonces, los productos de reacción son detectados. Los métodos de cromatografía planar son baratos y ofrecen la posibilidad de manejar un número muy grande de muestras. Otra estrategia es utilizar un esquema de formación de derivados en línea. Los aminoácidos son tratados con el reactivo para formar los derivados antes de realizar la separación cromatográfica. La mezcla de derivados de aminoácidos es entonces separada con inmediata detección.

ANÁLISIS POR INTERCAMBIO IÓNICO.

La metodología de separación de aminoácidos por medio de una resina sintética de intercambio iónico fue descrita primero por Stanford Moore and William Stein. La separación se realizaba en una resina de poliestireno sulfonatada usando un gradiente de elución discontinuo. Los compuestos al eluir eran mezclados con ninhidrina y pasados a través de un tubo de teflón calentado a 95°C. La absorbancia de la solución se monitoreaba a 570 y 440nm. Una separación podía durar 4 días.

El rápido crecimiento en la aplicación de HPLC tiene como resultado el desarrollo de fases estacionarias con partículas de diámetro menores de 10 μ m. Resinas sintéticas que son copolímeros de estireno y divinilbenceno, la propiedad de intercambiador catiónico esta dada a la resina por un proceso de sulfonación.

Una alternativa al gradiente de elución escalonado para el análisis de aminoácidos es el gradiente continuo el cual ofrece las siguientes ventajas:

- Excelente resolución con el uso de un sistema simple de dos disolventes
- Eliminación de picos causados por el uso de gradiente escalonado

Los límites de sensibilidad del análisis de aminoácidos por intercambio iónico con reacción de formación de derivados fuera de línea están generalmente gobernados por la disponibilidad de disolventes de alta pureza.

La mayoría de los analizadores de aminoácidos comercialmente disponibles emplean una resina intercambiadora de iones para la separación de aminoácidos usando ninhidrina como reactivo para la detección, OPA (o-ftalaldehído) y fluram también son utilizados. Este tipo de instrumentos es preferido para el análisis rutinario por razones de facilidad de manejo de muestra y reproducibilidad.

ANÁLISIS EN FASE INVERSA

El incremento en la popularidad de la cromatografía en fase reversa ha generado que muchos investigadores y laboratorios comerciales desarrollen separaciones que puedan ser llevadas a cabo usando un equipo convencional de HPLC.

La separación es llevada a cabo en una fase estacionaria hidrofóbica usando un sistema de elución polar. Los compuestos ionizados tienen interacciones débiles con este tipo de fase estacionaria. Los ácidos y/o las bases pueden ser convertidos en formas más hidrofóbicas por la total supresión de la ionización.

Los aminoácidos son compuestos Zwitterionicos con un pka de la función del ácido menor de 5 y un pka de la función del amino mayor de 8, por lo que no existe un pH en el cual ambos grupos estén sin ionizar.

Se han desarrollado varios procesos de detección para ser empleados en conjunto con cromatografía en fase reversa.

La técnica más empleada en el análisis de aminoácidos por fase inversa es el empleo de la formación de derivados en línea. Un reactivo es unido covalentemente al grupo carboxilo o a el grupo amino para formar el derivado. Este proceso tiene las siguientes ventajas:

- La formación del derivado elimina la característica de Zwitterion del aminoácido dando una especie que actúa más fuertemente con la fase estacionaria.
- Variaciones en el reactivo para formar los derivados pueden ser usadas para incrementar la selectividad o la detectabilidad.

Es importante considerar que un único producto debe ser formado para cada aminoácido. El reactivo más ampliamente recomendado es el orto-ftalaldehído (OPA) para la formación de derivados en línea en el análisis de aminoácidos por fase inversa. El producto de reacción se forma rápidamente a temperatura ambiente, con todos los aminoácidos presenta un solo producto. La reacción que se lleva a cabo se muestra en la figura 8.

Cuando se utiliza detección por fluorescencia la técnica para el análisis de aminoácidos usando formación de derivados en línea puede ser el método más comúnmente empleado, los límites de detección que pueden ser logrados son de 300-400 fmol.

El agente reductor es incorporado en el producto, por lo que la selectividad es influenciada por el tiol seleccionado. En general; los derivados de mercaptoetanol son más polares y por lo tanto se retienen menos en una columna C_{18} que los derivados con etanetiol

Los disolventes con pH neutro, conducen a ionización del grupo carboxilo de los derivados de aminoácidos, por lo que el mecanismo de retención en fase inversa es mixto (ionic-solvophobic).

La temperatura óptima en la columna para la separación de los OPA/aminoácidos está en el intervalo de 28 a 40 °C. En cuanto a la estabilidad, esta decae significativamente después de los 15 minutos de su formación si se utiliza mercaptoetanol. Con etanetiol los derivados son estables por al menos unas pocas horas.

CROMATOGRAFIA EN FASE NORMAL.

La diferente selectividad de aminoácidos en fase normal comparada con la cromatografía en fase reversa permite otras posibilidades para llevar a cabo la separación. Tal es el caso de moléculas muy poco solubles en agua, las cuales al ser muy hidrofílicas no son retenidas en fases reversas como por ejemplo el método descrito por Schuster en 1980, en el que pueden ser resueltos la hidroxilisisonorleucina y la dehidrolisisonorleucina, presentes en hidrolizado de colágena. La desventaja de este sistema es la relativa inestabilidad de la fase amino, su deterioro por formación de bases de Schiff con el grupo carbonilo del soluto.

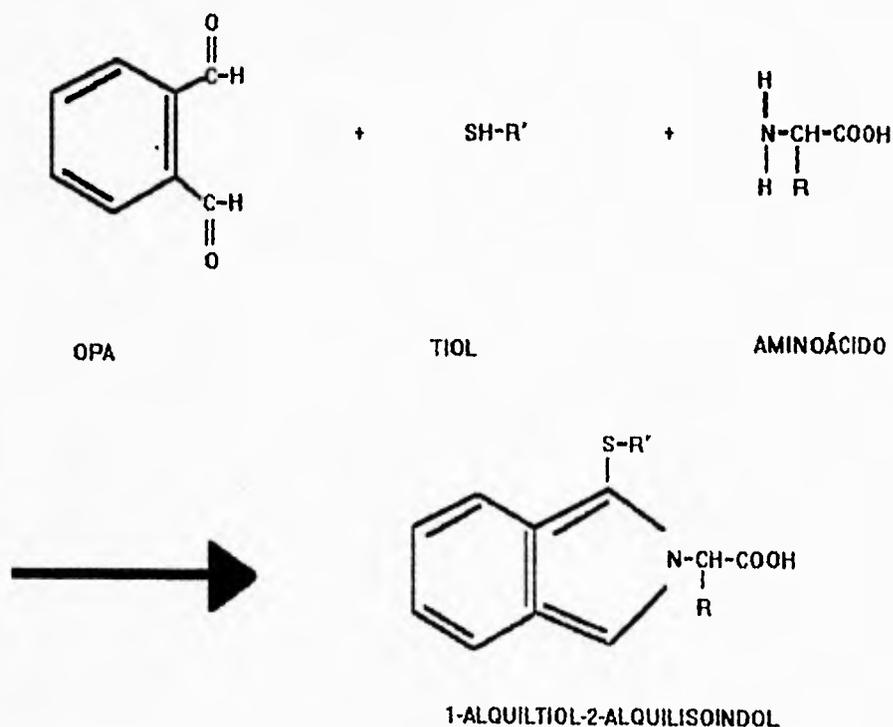


FIGURA 8.

FORMACIÓN DE 1-ALQUILTIOLO-2-ALQUILISOINDOL POR REACCIÓN DE OPA CON AMINAS PRIMARIAS.

MATERIAL Y MÉTODOS

INSTRUMENTACIÓN

Cromatógrafo de líquidos Waters. Constituido por un controlador automático de gradiente (modelo 680), dos bombas (modelo 510), inyector (modelo U6K), e integrador (modelo 740).

La detección se realizó por medio de un detector de fluorescencia (modelo 420), longitud de onda de excitación 338 nm., longitud de onda de emisión 425nm.

PROCEDIMIENTO

CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS

Columna: C-18 Nova-pack (Millipore), de 15 cm x 3.9mm, tamaño de partícula 4 μ m, esférica.

Todas las corridas cromatográficas se realizaron a temperatura ambiente.

Flujo de la fase móvil: 1.5 ml/min.

Gradiente lineal empleado:

tiempo (min.)	disolventes	
	% A	% B
0	83	17
35	45	55
50	16	84

DISOLVENTES

A: Amortiguador de fosfatos 0.02 M. pH = 7, filtrado a través de membrana de 0.45 μ m (Millipore)

B: 45% Amortiguador de fosfatos 0.02 M. pH = 7, 55% Acetonitrilo (Baxter), filtrado a través de membrana de 0.22 μ m. (Millipore).

OPA-Etanetiol.

El reactivo derivatizante contiene: 20 mg de orto-ftaldehido (Sigma) y 10 μ l de etanetiol (Fisher) en un ml de metanol (Baxter).

I. DERIVATIZACIÓN Y ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO.

Una alícuota de 100 μ l de la disolución final de cada muestra se derivatizó agregando 20 μ l de OPA-Etanetiol y 20 μ l de amortiguador de boratos pH = 9.0. Después de dos min. se realizó el análisis de los aminoácidos derivados de OPA por HPLC, inyectando 5 μ l bajo las condiciones anteriormente señaladas.

II. CURVAS DE LOS ESTÁNDARES

Se realizaron tres curvas con los estándares:

- Una en disolución acuosa sin el procedimiento de extracción (curvas de calibración).
- Otra en disolución acuosa impregnados en el papel filtro y realizando el procedimiento de extracción.
- Una más en sangre total impregnada en papel filtro y llevando a cabo el procedimiento de extracción.

III. PREPARACIÓN DE LOS ESTÁNDARES

Para la construcción de las curvas de calibración en disolución acuosa se prepararon varias disoluciones de los siguientes aminoácidos: ASN, GLI, ARG, TAU, ORN, LIS, ALA, ILE, TRE, GLN (Sigma), VAL, MET, LEU, TRP (Merck), SER, GLU (Calbiochem), TIR (Fisher), entre 50 y 750 μ M, concentraciones entre las cuales se encuentran los valores normales y patológicos reportados en la literatura. Como estándar interno se utilizó una disolución de fluorofenilalanina (Sigma), de concentración 20 μ M (contenido en el extracto final previo a la inyección en el sistema cromatográfico, esto es en un mililitro de metanol).

Para la construcción de las curvas en sangre total se agregó a 1 ml de sangre total dializada una alícuota de una disolución acuosa de los estándares anteriormente mencionados con objeto de obtener concentraciones en la sangre de 50 a 750 μ M, similares a las anteriores. Se tomó en cuenta que las alícuotas fueran del menor volumen posible para minimizar los efectos por dilución.

IV. EXTRACCIÓN DE LOS ESTÁNDARES

1.- En disolución acuosa.

Círculos de papel filtro (Specimen collection paper # 903) fueron impregnados con 20 μ l de las disoluciones de estándares en las concentraciones mencionadas, se dejaron secar a temperatura ambiente y posteriormente se extrajeron con 1 ml de metanol en baño de ultrasonido por 10 min.

2.- En sangre total.

La sangre total fue dializada por 48 hrs. contra un gradiente de NaCl 0.15M. El contenido de aminoácidos se monitoreó por la técnica cromatográfica descrita hasta asegurar la limpieza de la sangre.

Una vez adicionados los estándares a la sangre dializada se impregnaron círculos de papel filtro con 20 μ l de dicha sangre (correspondientes a un círculo de 1/4 de pulgada medida estándar de los perforadores convencionales), se dejaron secar a temperatura ambiente para su posterior extracción.

Se estudiaron varios procedimientos de extracción:

- En un ml de metanol (Baxter), por 10 min. en baño de ultrasonido.
- En un ml de metanol al 70% en agua, por 10 min. en baño de ultrasonido.
- En 200 μ l de metanol con ácido clorhídrico al 5%, por 10 min. en baño de ultrasonido, aforando con metanol a un ml.
- En 200 μ l de solución salina isotónica, por 10 min. en baño de ultrasonido, posteriormente aforando a un ml con metanol.
- En un ml de metanol por 20 min. en baño de ultrasonido.
- En un ml de metanol por 30 min. en baño de ultrasonido. Para este inciso se realizó el análisis posterior: a) dentro de la primera semana una vez seca la sangre, b) tres semanas después.

RESULTADOS

El análisis cromatográfico de aminoácidos se realizó siguiendo la metodología ya establecida (25).

El cromatograma obtenido de una muestra de estándares se observa en la figura 9. La identificación de los aminoácidos es la siguiente:

- | | |
|------------------|----------------------|
| 1. Ac. glutámico | 11. Valina |
| 2. Serina | 12. Metionina |
| 3. Glutamina | 13. Isoleucina |
| 4. Asparagina | 14. Leucina |
| 5. Glicina | 15. Triptofano |
| 6. Treonina | 16. Fenilalanina |
| 7. Arginina | 17. Ornitina |
| 8. Alanina | 18. Lisina |
| 9. Alanina | EI. Estándar interno |
| 10. Taurina | |

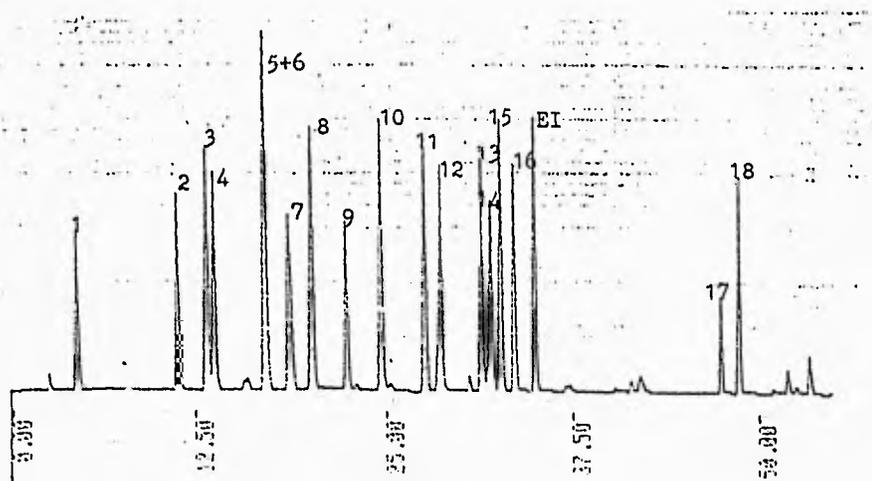


Figura 9 Cromatograma de estándares.

I. Curvas de calibración de los estándares en disolución acuosa sin el procedimiento de extracción.

Se construyeron las curvas de calibración graficando las relaciones de áreas (AA/St) vs las relaciones de concentraciones (AA/St). Las curvas se muestran en la figura 10.

Se realizó con los resultados obtenidos el análisis de regresión lineal, obteniéndose los datos que se encuentran en la tabla 1.

AMINOÁCIDO	b	m	r	n
GLU	0.019	0.783	0.998	8
ASN	0.054	0.730	0.990	10
SER	0.131	0.902	0.997	10
GLN	-0.002	0.632	0.995	8
GLI+TRE	0.130	0.782	0.999	8
ARG	0.048	0.866	0.997	8
ALA	0.076	0.842	0.999	8
TIR	0.034	0.876	0.999	10
TAU	0.005	1.106	0.998	8
VAL	0.054	0.933	0.999	8
MET	-0.014	1.078	0.996	10
ILE+LEU	0.111	0.899	0.998	9
TRP	0.053	1.008	0.999	9
FEN	0.059	0.877	0.999	10
ORN	0.048	0.246	0.994	8
LIS	0.044	0.670	0.993	8

TABLA 1.

Datos de regresión lineal de las curvas de calibración de los estándares en disolución acuosa sin el procedimiento de extracción.

Con los resultados obtenidos para estas curvas, se obtienen para el resto de este trabajo, los factores de respuesta para cada aminoácido.

II. Curvas de extracción de los estándares en disolución acuosa impregnados en el papel filtro.

Ya que la sangre sería colectada en papel filtro, es necesario determinar si los aminoácidos no son retenidos por éste, por lo que se evaluó el porcentaje de recuperación de la extracción de los aminoácidos en solución acuosa impregnados en el papel filtro.

Las concentraciones se calcularon con el factor de respuesta obtenido en el inciso I. arriba descrito, comparando éstas con las concentraciones añadidas.

En la tabla 2 se puede observar el porcentaje de recuperación y las desviaciones estándar relativas de dichas extracciones.

AMINOÁCIDO	% de recuperación	C.V.
GLU	105	8.13
ASN	114	3.32
SER	115	5.40
GLN	99	8.63
GLI+TRE	97	5.15
ARG	94	8.97
ALA	99	6.70
TIR	98	2.68
TAU	83	3.14
VAL	81	4.35
MET	108	6.67
ILE+LEU	103	4.58
TRP	99	3.87
FEN	89	3.44
ORN	93	5.25
LIS	85	4.22

TABLA 2.

Porcentaje de recuperación y desviación estándar relativa (C.V.) de extracción de los aminoácidos en solución acuosa impregnados en el papel filtro.

FIGURA 10. Curvas de calibración de los estándares en solución acuosa sin el procedimiento de extracción.

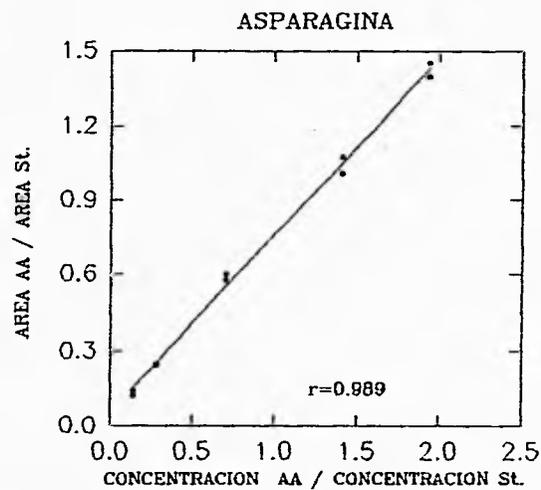


fig 10a

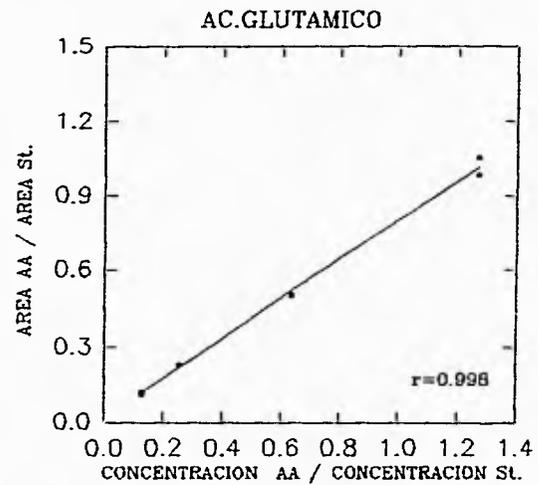


fig 10b

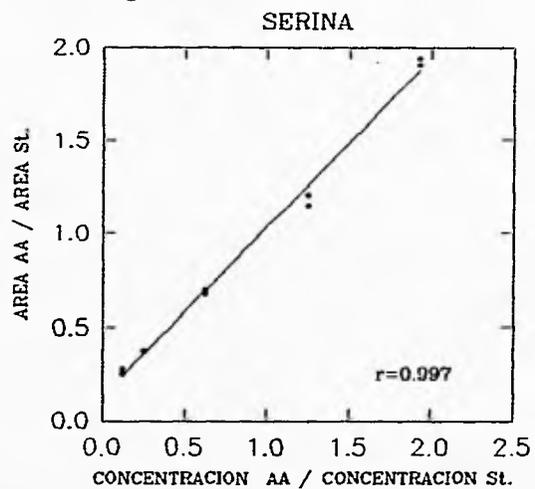


fig 10c

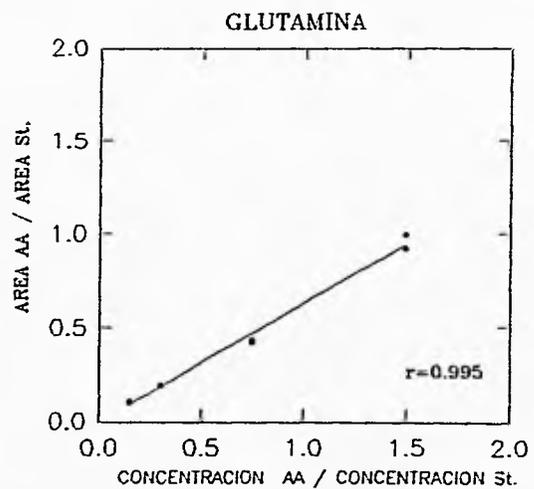


fig 10d

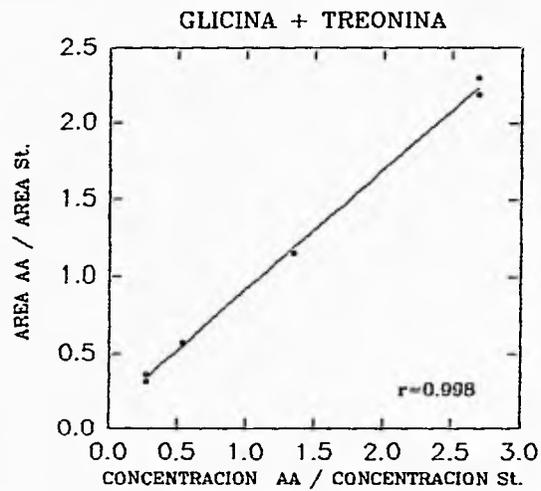


fig 10e

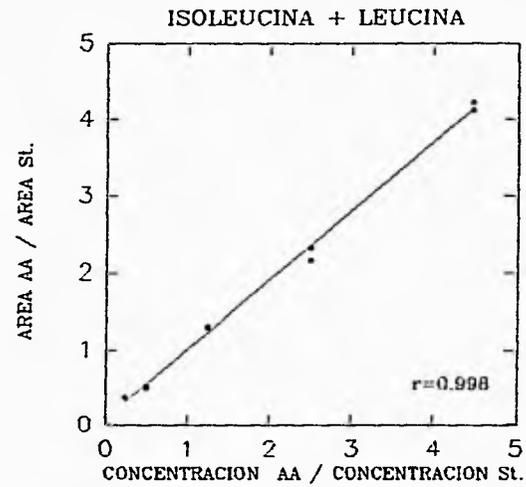


fig 10f

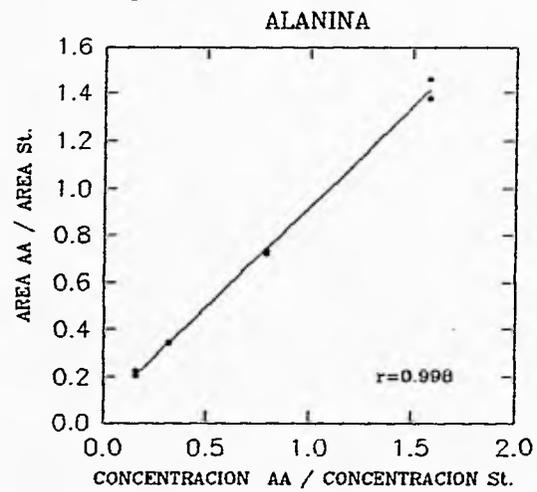


fig 10g

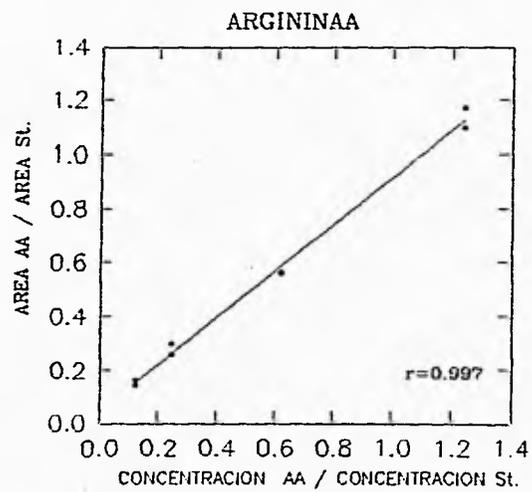


fig 10h

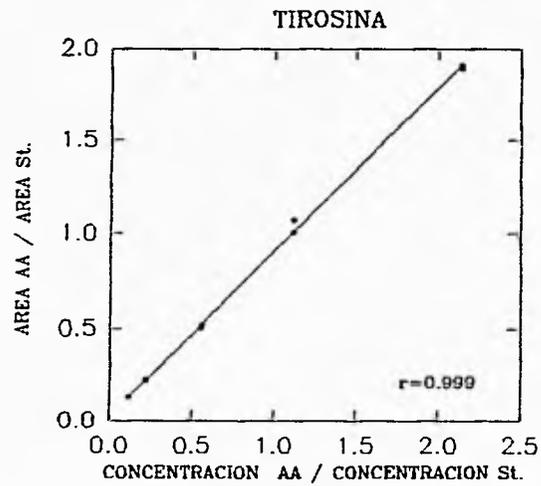


fig 10i

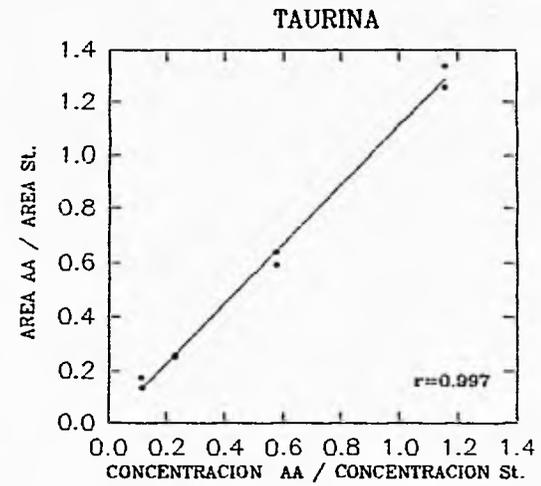


fig 10j

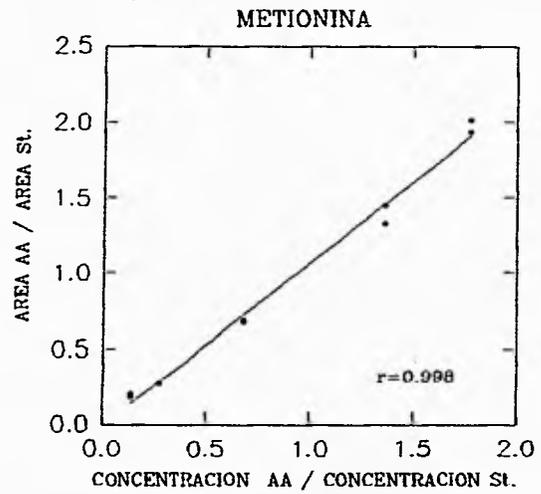


fig 10k

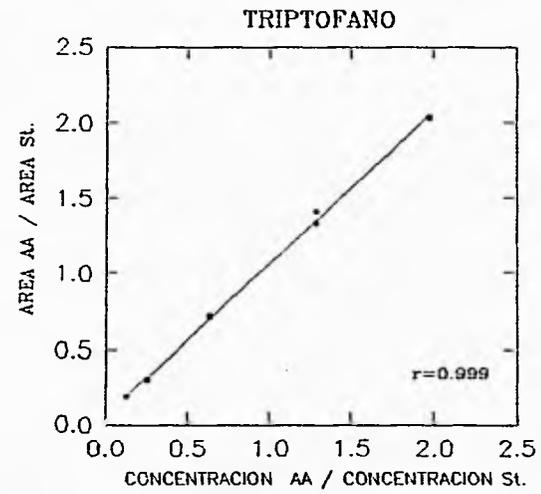
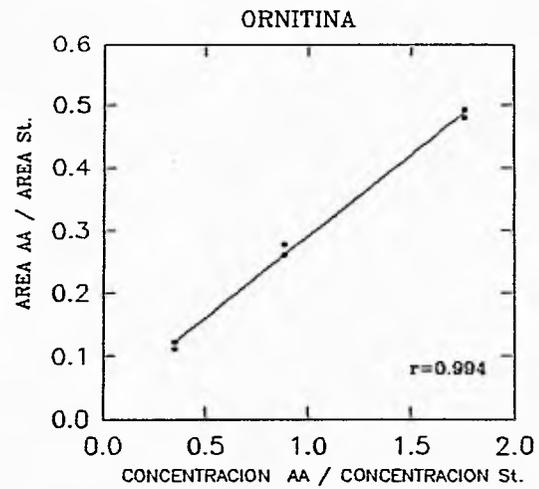
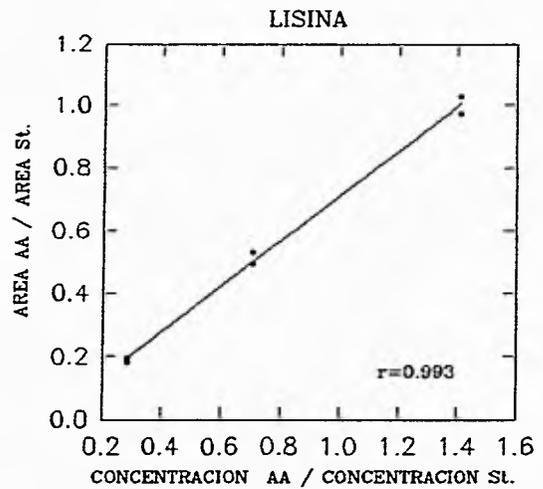
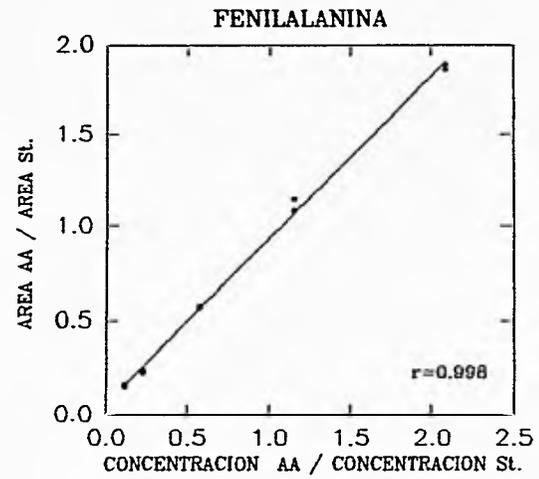
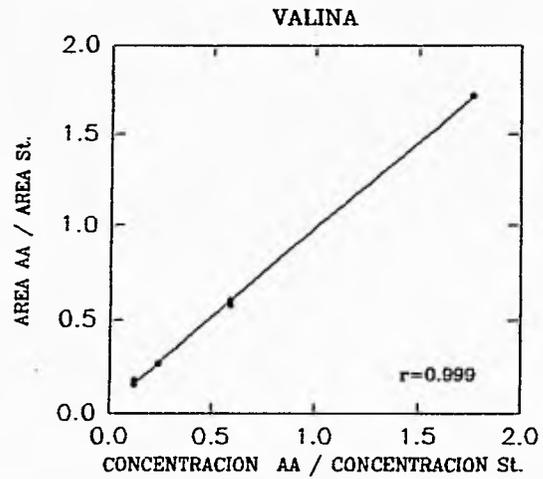


fig 10m



III. Curvas de extracción de los estándares en sangre total impregnada en papel filtro.

Las mejores condiciones de extracción fueron las mencionadas en el número 6 del apartado 2 del inciso IV de la extracción de los estándares en el capítulo de Material y Métodos, la cuál se refiere a la extracción de los estándares con metanol por 30 minutos en baño de ultrasonido.

Los resultados de las otras condiciones de extracción se encuentran en el Anexo I.

Se construyeron las curvas graficando concentración añadida vs concentración recuperada (evaluando ésta a partir del área obtenida y utilizando el factor de respuesta obtenido en el inciso I arriba descrito.). Las gráficas se muestran en la figura 11.

Los porcentajes de recuperación y la reproducibilidad (desviación estándar relativa) de estas extracciones se muestran en la tabla 3.

A partir de los datos obtenidos de estas curvas se realizó el análisis de varianza basado en la distribución "F" (prueba de Snedecor), para probar la linealidad del método. La prueba de hipótesis de linealidad entre concentración añadida y concentración recuperada se encuentra en la tabla 4.

FIGURA 11. Curvas de extracción de los estándares en sangre total impregnada en papel filtro.

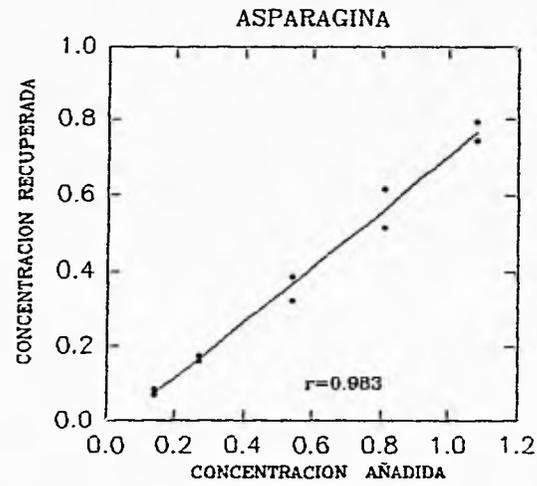


fig 11a

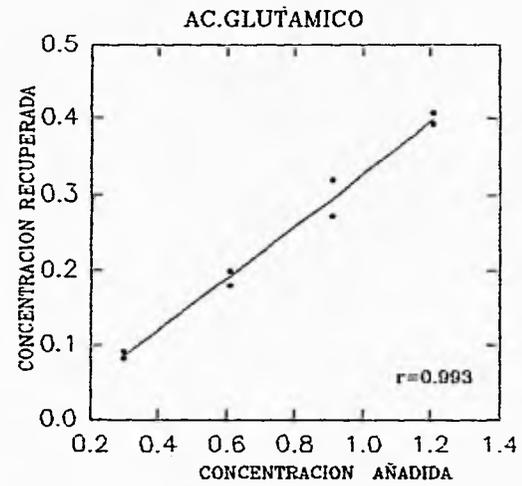


fig 11b

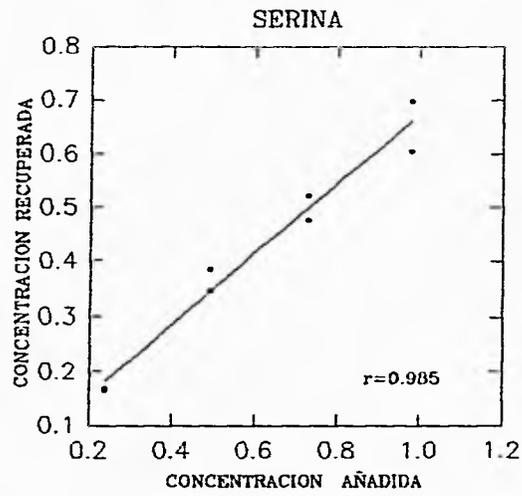


fig 11c

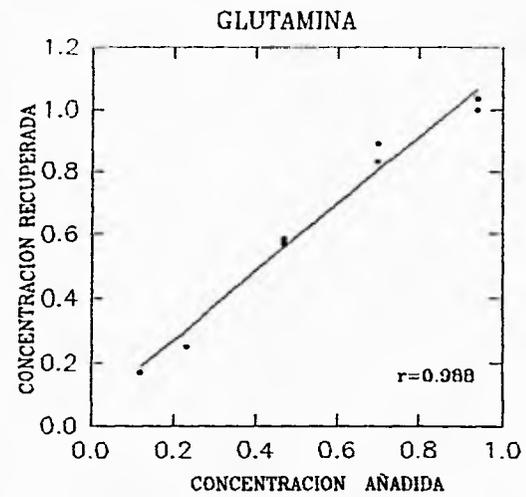


fig 11d

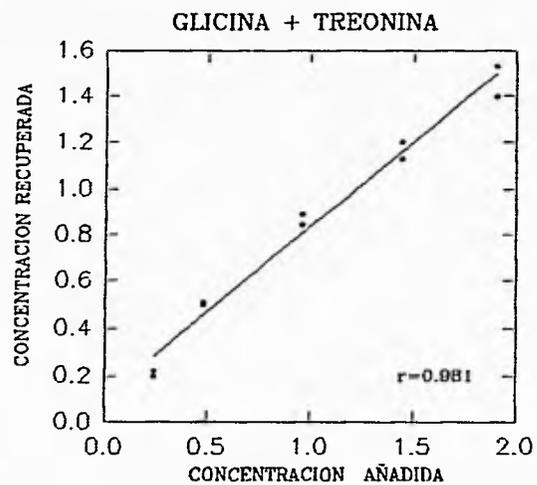


fig 11e

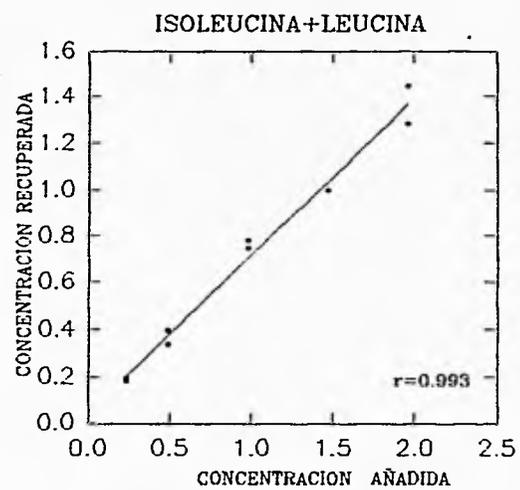


fig 11f

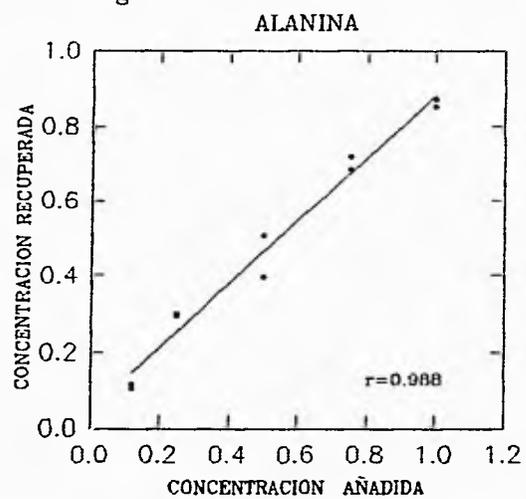


fig 11g

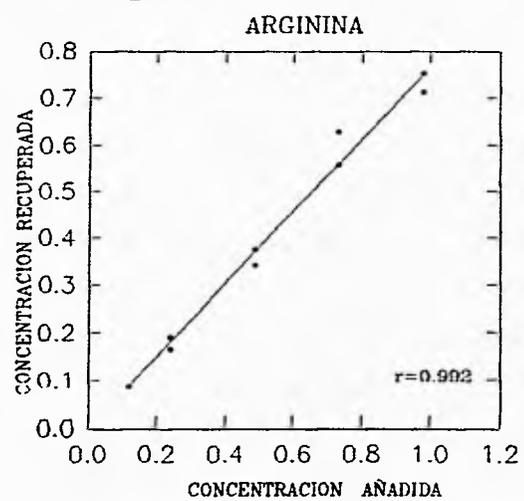


fig 11h

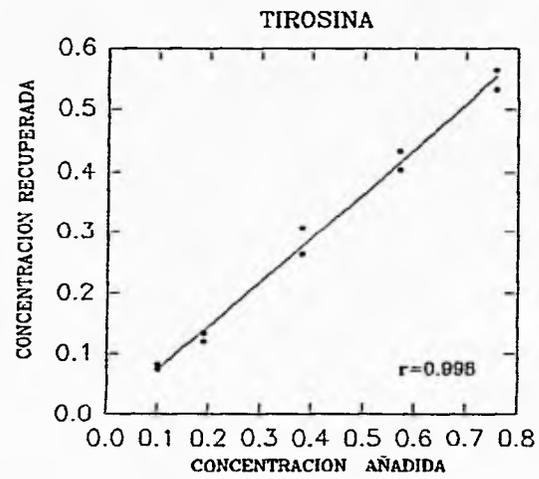


fig 11i

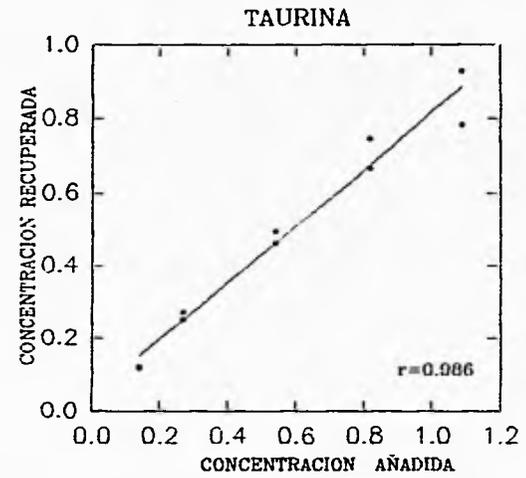


fig 11j

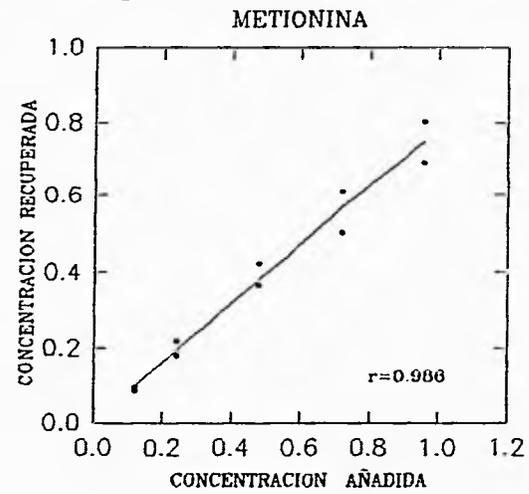


fig 11k

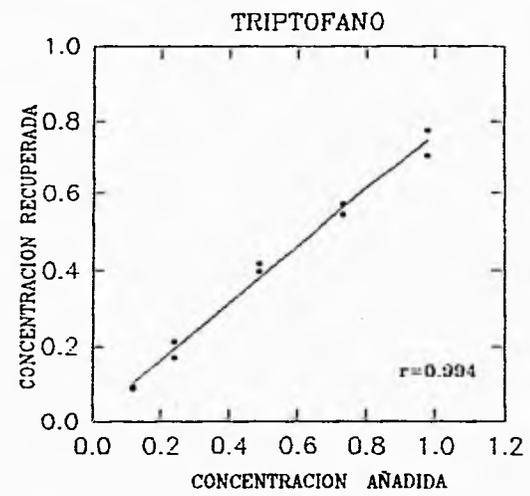


fig 11m

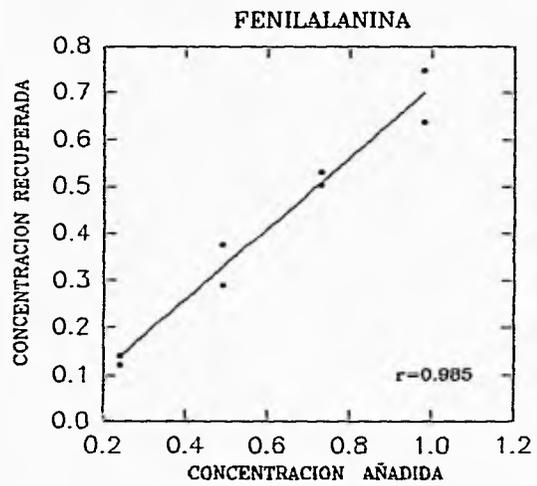


fig 11n

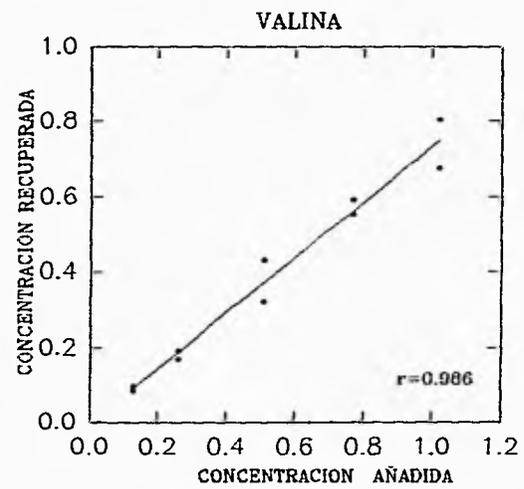


fig 11o

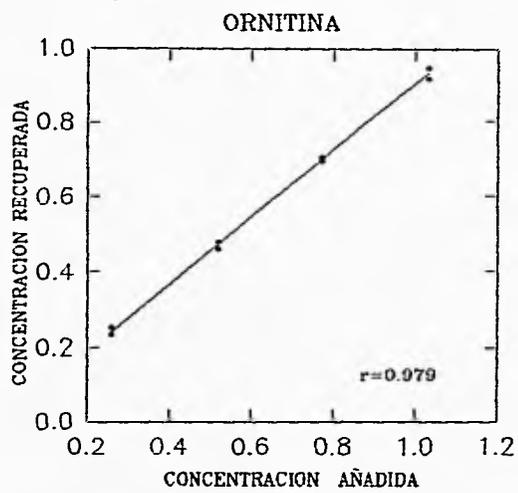


fig 11p

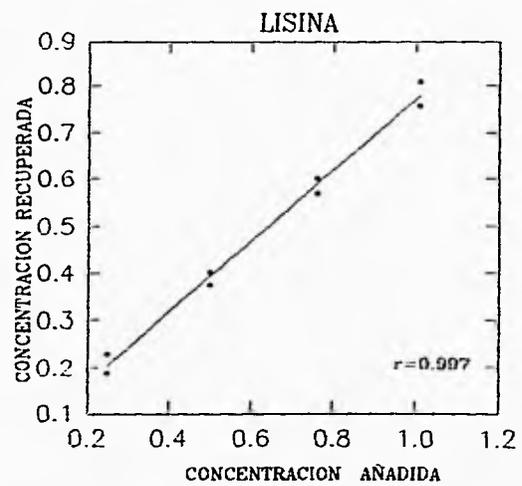


fig 11q

AMINOÁCIDO	RECUPERACIÓN %(1)	CV	N
GLU	31.29	8.11	8
ASN	64.67	12.79	10
SER	69.91	7.07	8
GLN	120.29	10.27	10
GLI+TRE	88.17	12.27	10
ARG	75.41	7.00	10
ALA	95.79	14.62	10
TIR	73.22	7.63	10
TAU	87.54	8.91	10
VAL	71.45	10.32	10
MET	79.24	9.12	10
ILE+LEU	73.68	7.91	10
TRP	77.99	7.49	10
FEN	66.16	13.82	8
ORN	89.35	6.87	8
LIS	78.52	12.91	8

(1) Datos obtenidos de la medición hecha dentro de la primer semana.

TABLA 3.

Porcentaje de recuperación y desviación estándar relativa (C.V.) de extracción de los aminoácidos en sangre total impregnada en papel filtro.

HIPÓTESIS		
Ho: X y Y no están linealmente relacionados		
Ha: X y Y están linealmente relacionados		
AMINOÁCIDO	F_{0.05}[*]	F calculado
GLU	234	440.19
ASN	239	579.25
SER	234	299.16
GLN	239	292.42
GLI+TRE	239	427.31
ARG	239	443.38
ALA	239	346.40
TIR	239	988.04
TAU	239	290.26
VAL	239	286.10
MET	239	299.41
ILE+LEU	239	553.72
TRP	239	770.69
FEN	234	295.55
ORN	234	283.46
LIS	234	325.98

TABLA 4. Ho= hipótesis nula.
 Ha= hipótesis alterna.
 * Valor crítico de F para los grados de libertad correspondientes.

En todos los casos F calculada es mayor que F de tablas, se rechaza la hipótesis nula de no relación lineal entre X y Y y se concluye que la concentración añadida y la recuperada están linealmente relacionadas.

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

Al realizar las mediciones tres semanas después de aplicada la sangre en el papel filtro, se encontraron los resultados que se muestran en la tabla 5.

AMINOÁCIDO	RECUPERACIÓN %	CV	N
GLU	80.52	11.90	8
ASN	56.09	17.79	8
SER	38.56	13.3	8
GLN	60.15	17.54	8
GLI+TRE	42.68	18.39	8
ARG	38.41	16.16	8
ALA	53.72	14.8	8
TIR	61.48	12.09	8
TAU	56.65	9.6	8
VAL	52.28	15.02	8
MET	47.89	10.43	8
ILE+LEU	57.56	15.07	8
TRP	59.62	9.45	8
FEN	55.64	18.46	8
ORN	30.57	11.85	8
LIS	58.60	18.93	8

TABLA 5

Recuperación de estándares después de tres semanas de tomada la muestra.

Por lo que se refiere a el estudio estadístico referente a las curvas de recuperación para cada aminoácido en sangre total, favor de consultar el Anexo II.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES.

A fin de poder comparar las concentraciones de aminoácidos extraídos se realizó una corrección de la concentración. Se calcularon las concentraciones de todos los aminoácidos en todos los experimentos, tomando como base la cantidad de materia presente en el extracto final previo a la inyección en el sistema cromatográfico, esto es en un mililitro de metanol. De esta forma, tanto las inyecciones de disoluciones acuosas sin extraer como las extraídas sería comparables.

En el estudio realizado de los rendimientos de extracción tenemos:

Comparando entre la extracción de los estándares en disolución acuosa y en sangre, el porcentaje de recuperación en el primer caso es cerca del 100 %, con una gran disminución en el segundo. Esto puede ser debido a que los aminoácidos se absorban a compuestos endógenos de la sangre y/o disminución de la solubilidad por la presencia de otros metabolitos.

El porcentaje de recuperación es incrementado si se aumenta el tiempo de extracción en baño de ultrasonido (como se puede ver en la tabla 7, Anexo I). Sin embargo, un tiempo excesivo de análisis no es conveniente para el laboratorio de control clínico, en el cual deben procesarse un número considerable de muestras. La recuperación obtenida a los 30 minutos en la mayoría de los aminoácidos es aceptable para el monitoreo de pacientes con errores innatos del metabolismo, puesto que la mayoría de ellos, aun controlados, presentan niveles de aminoácidos relacionados con su patología de al menos 3 a 4 veces los valores normales.

El coeficiente de variación de algunos aminoácidos es grande. La glutamina es muy inestable, transformándose en glutámico (6), lo cual podría explicar los elevados coeficientes de variación. La pobre reproducibilidad puede ser debida a la variación en la cantidad de sangre por área de papel filtro. Dado que en la aplicación de esta metodología la toma de muestra de sangre dependerá de los padres del paciente o del médico, sería recomendable tomar en cuenta el programa de entrenamiento para toma de muestra de sangre en papel filtro. Esto con objeto de minimizar las fuentes de variación y error.

Las variaciones más altas se encontraron en las regiones de baja concentración, lo cual no es tan grave si se tiene en mente que estas patologías van asociadas con aumentos en concentración y no disminución de la misma.

Se ha reportado que los aminoácidos en sangre seca en papel filtro muestran una alta estabilidad (24). Sin embargo, de acuerdo a los resultados obtenidos (Tabla5), los aminoácidos no son estables después de un periodo de almacenaje relativamente corto (tres semanas). Observando los coeficientes de variación obtenidos en este trabajo y comparándolos con los de la referencia citada, puede verse que aún obteniéndose un coeficiente de variación menor, no se halló la estabilidad reportada. Sin embargo el papel filtro ha sido usado por muchos años como un medio de colección, almacenamiento y transporte de muestras de sangre capilar. Las muestras son fácilmente colectables, manejables y su almacenamiento a temperatura ambiente es aceptable por periodos cortos de tiempo incluyendo el envío a laboratorio por correo, considerando que en nuestro país es más eficiente el sistema de mensajería. Además la cantidad de volumen de muestra para el estudio es mínima.

El tiempo total del análisis incluyendo la extracción y derivatización es de menos de 90 minutos. Dado este tiempo de análisis es que se refuerza la idea de utilizar la extracción en ultrasonicador por un tiempo no mayor de 30 minutos.

Por lo anteriormente mencionado el método puede ser una herramienta útil para el monitoreo de rutina del perfil de aminoácidos de pacientes con errores innatos del metabolismo (fig. 12).

Aminoácidos tales como prolina, hidroxiprolina y cisteína no pueden ser cuantificados por el presente método, ya que el reactivo derivatizante OPA/Etanotiol. reacciona solo con aminos primarios(28). Sin embargo Ishida et al (8), sugieren tratar la muestra con un agente oxidante, antes de la derivatización.

Es importante recordar que esta metodología solo intenta ser una herramienta de monitoreo a larga distancia del estado nutricional del paciente. Si en estos monitoreos el paciente muestra síntomas de recaimiento, deberá ser trasladado a la Unidad de Genética de la Nutrición del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM, donde deberán realizarse las mediciones correspondiente en forma directa a partir del fluido fisiológico correspondiente.

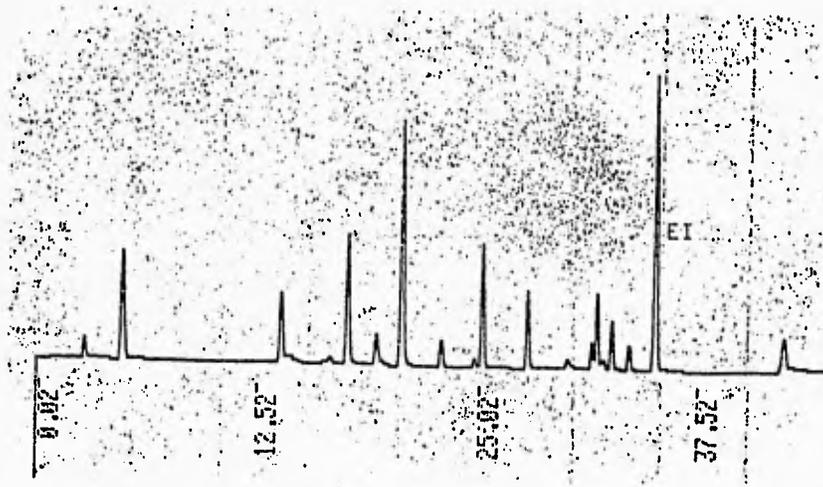


fig. 12a Cromatograma de un paciente normal.

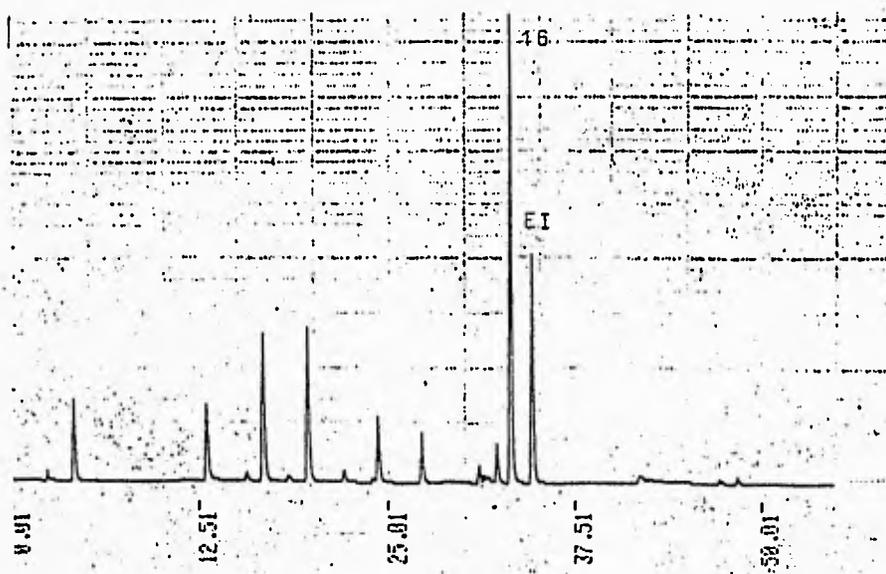


fig. 12b Cromatograma de un paciente con fenilcetonuria.

FALLA DE ORIGEN

RECOMENDACIONES PARA UN TRABAJO FUTURO.

- Los niveles de aminoácidos en sangre total difieren de los de suero o plasma por lo que se requieren nuevos valores de referencia y/o compararse con precaución.
- Podría tratarse de disminuir el coeficiente de variación y aumentar el porcentaje de recuperación incrementándose el tiempo de extracción en el baño de ultrasonido. Sin embargo ello conlleva el aumento del tiempo de análisis ya mencionado
- Sería conveniente corroborar la estabilidad de las muestras tomando en cuenta las condiciones del correo de nuestra comunidad. En las condiciones actuales sólo el sistema de mensajería es eficiente.
- Es recomendable calibrar el papel filtro para tener un mayor control de la cantidad de sangre por área de papel.

BIBLIOGRAFÍA

1. Slocum, R. H.; Cummings, J. G. Techniques in diagnostic human biochemical genetics: A Laboratory Manual. Amino Acid Analysis of physiological Samples; John Wiley and Sons. Inc. 1991. pp 87-126
2. Lundsjö, A., Hageberg, S., Palmér, K., Lindblad, S. Amino acid profiles by HPLC after filter paper sampling: "appropriate technology" for monitoring of nutritional status. Clin. chim. Acta, 191: 201-210 (1990)
3. Yi-yung, H. D. Inborn errors of Metabolism Part 1: Clinical Aspects. Year book Medical Publishers Inc. 2a. edition Chicago USA 1966. pp 132-157.
4. Thompson, J., Thompson, M. Genetics in Medicine. 2a edition W.B. Saunders Company 1973.
5. Scriver C.R.; Beaudet A.L.; Sly W.S.; Valle, D. The Metabolic Basis of Inherited disease, 6a edition Mc.Graw-Hill, 1989.
6. Bremer J; Hans, Duran Marinus; Disturbances of Amino Acid Metabolism: Clinical Chemistry and Diagnosis; Ed Urban and Schwarzenberg; U.S.A. 1981.
7. Garrod A.E. Inborn Errors of Metabolism (Croonian Lectures) Lancet, 2:1-7 (1908).
8. Ishida Y.; et al. New detection and separation method for amino acids by high-performance liquid chromatographic. J. Chromatogr. 204: 143-148 (1981).
9. Karger, B.L.; Snyder, R.L. and Horvath, C. An Introduction to Separation Science. Inc. 1973.
10. Snyder L.R. and Kirkland J.J. Introduction to modern liquid chromatography, 2a. edition . Inc. 1979.
11. Gary T.; Bender. Métodos Instrumentales de análisis en química clínica. Ed. Acribia. España 1987.
12. Fallon, A.; Booth, R. F. G.; Bell, L. D. Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology. vol. 17 Applications of HPLC in biochemistry. Elsevier 1st, edition Netherlands. (1987).pp 185-192.
13. Harol M. McNair. Cromatografía líquida de alta presión. Serie química. Programa regional de desarrollo científico y tecnológico. Depto de asuntos científicos y tecnológicos. Secretaria general de la OEA 1980. pp 15-17
14. García de Marina A.; Del Castillo Benito. Cromatografía Líquida de alta resolución. 1a edición Limusa 1988. pp37-97.
15. Chromatography and separation chemistry. Advances and developments. ACS Symposiums series 297. Santinder Ahuja Editor 1986.

16. Ravindramath, B. Principles and practice of chromatography. Ellis Horwood Limited 1989. Great Britain. pp 79-84
17. Yost, R.W. Practical liquid chromatography. An Introduction. Perkin Elmer, New York 1980.
18. Biological and Biomedical applications of liquid chromatography vol.I y II. 1979.
19. Hamilton, R.J., Jewell, A. Introduction to HPLC. Chapman & Hall London 1978.
20. Horvath HPLC, Advances and perspectives. Academic Press N.Y. Vol I 1980.
21. Pfeifer, R. F., Hill, D. W. High performance liquid chromatography of aminoacids ion-exchange and reverse phase strategies. *Advances in Chromatography* 22: 37-70 (1985).
22. Knox, J. H. Practical aspects of LC Theory. *J. Chromatog. Science* 15: 352-364 (1977).
23. Rajendra, W. High performance liquid chromatography. Determination of aminoacids in biological samples by precolumn derivatization with o-phthalaldehyde. *J. liquid Chromatogr.* 10: 941-955 (1987).
24. Deyl, Z., Hyanek, J., Horakova, M. Profiling of amino acid in body fluids and tissues by means of liquid chromatography. *J. Chromatog.* 379: 177-250 (1986)
25. Hill, D., Burnworth, L., Skea, W., Pfeifer, R. Quantitative HPLC analysis of plasma amino acids as orthophthalaldehyde/ethanethiol derivatives. *J. Liquid. Chromatog.* 5: 2369-2393 (1982).
26. Godel, H., Graser, T., Földi, P., Pfaender, P., Fürst, P. et al.. Measurement of free amino acids in human biological fluids by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatography.* 297: 49-61 (1984).
27. Watanabe, Y., Imai, K. Sensitive detection of amino acids in human serum and dried blood disc of 3mm diameter for diagnosis of inborn errors of metabolism. *J. Chromatog.* 309: 279-286 (1984).
28. Abecassis, J., David-Eteve, Ch., Soun, A. The separation of 24 OPA-AA of natural origin and quantitative analysis of tyrosine by means of HPLC. *J. liquid. Chromatog.* 8: 135-153 (1985).

ANEXO 1

Aquí se muestran los resultados de los procedimientos de extracción de aminoácidos en sangre impregnados en papel filtro, referidos en el apartado 2 del inciso IV de la extracción de los estándares en el capítulo de Material y Métodos

En la tabla (6) se compara la extracción con diferentes disolventes por 10 minutos en baño de ultrasonido.

AMINOÁCIDO	% DE RECUPERACIÓN			SSI
	METANOL	METANOL 70%	METANOL ÁCIDO(HCl) 5%	
GLU	25	33	-	15
ASN	43	-	-	-
SER	45	26	18	-
GLN	38	15	-	30
GLI+TRE	42	20	22	11
ARG	18	16	13	12
ALA	37	41	21	11
TIR	62	110	62	95
TAU	21	19	16	9
VAL	68	63	13	29
MET	55	40	23	-
ILE+LEU	62	69	17	17
TRP	73	14	16	16
FEN	59	37	22	10
ORN	28	43	-	-
LIS	33	28	8	11

SSI Solución salina isotónica

TABLA (6).

Porcentaje de extracción de aminoácidos en sangre impregnados en papel filtro con diferentes disolventes por 10 min. en baño de ultrasonido.

Utilizando metanol como disolvente, ya que con éste se obtuvieron los resultados más satisfactorios para la mayoría de los aminoácidos se midió el porcentaje de extracción a diferentes periodos de tiempo 10, 20 y 30 minutos (TABLA 7).

AMINOÁCIDO	% DE RECUPERACIÓN		
	10 MIN.	20 MIN.	30 MIN.
GLU	25	29	31.29
ASN	43	62	64.67
SER	45	59	69.91
GLN	38	45	120.29
GLI+TRE	42	53	88.17
ARG	18	30	75.41
ALA	37	42	95.79
TIR	62	72	73.22
TAU	21	37	87.54
VAL	68	72	71.45
MET	55	60	79.24
ILE+LEU	62	68	73.68
TRP	73	75	77.99
FEN	59	67	66.16
ORN	28	58	89.35
LIS	33	62	78.52

TABLA 7.

Porcentaje de recuperación de aminoácidos en sangre impregnados en papel filtro a diferentes periodos de tiempo, utilizando metanol como disolvente.

ANEXO 2

Estudio estadístico referente a las curvas de recuperación para cada aminoácido en sangre total.

Las pruebas de hipótesis realizadas sobre la ordenada al origen así como sobre la pendiente y los intervalos de confianza, están basadas en la distribución "t" (prueba de "student"), se muestran en la tabla 8

AMINOÁCIDO	tb	tm	ICb	ICm
GLU	1.38	20.98	-0.05 - 0.01	0.30 - 0.39
ASN	1.60	24.06	-0.08 - 0.01	0.67 - 0.81
SER	0.89	14.11	-0.04 - 0.10	0.53 - 0.76
GLN	2.13	17.10	0.01 - 0.16	0.89 - 1.18
GLI+TRE	2.64	20.67	0.01 - 0.20	0.65 - 0.81
ARG	0.21	21.06	-0.59 - 0.49	0.68 - 0.86
ALA	1.66	18.61	-0.02 - 0.11	0.73 - 0.94
TIR	0.15	31.43	-0.02 - 0.03	0.67 - 0.78
TAU	1.38	17.03	-0.03 - 0.11	0.67 - 0.88
VAL	0.25	16.91	-0.07 - 0.06	0.63 - 0.84
MET	0.32	17.30	-0.05 - 0.07	0.67 - 0.88
ILE+LEU	1.24	23.53	0.04 - 0.12	0.61 - 0.74
TRP	0.78	27.76	-0.02 - 0.05	0.69 - 0.81
FEN	1.19	13.98	-0.13 - 0.05	0.63 - 0.89
ORN	1.410	22.775	0.021 - 0.07	0.220 - 0.27
LIS	1.789	21.674	-0.016 - 0.10	0.595 - 0.75

TABLA 8. tb=t calculada de la ordenada al origen
tm=t calculada de la pendiente
ICb=Intervalo de confianza de la ordenada al origen (95%)
ICm=Intervalo de confianza de la pendiente (95%)

Las pruebas de hipótesis realizadas sobre la ordenada al origen demuestran que el valor de regresión obtenido puede considerarse estadísticamente igual a cero, excepto para glicina + treonina, lo que indica la presencia de error sistemático para estos aminoácidos.