

00528
81

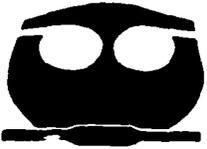


UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

VALIDACION DE UN METODO PARA CUANTIFICAR AMINOACIDOS EN CEREALES Y LEGUMINOSAS POR HPLC

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO DE ALIMENTOS
P R E S E N T A :
CARLOS DE JESUS ROMERO GUZMAN



MEXICO, D. F.



EXAMENES PROFESIONALES FACULTAD DE QUIMICA

2003



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.

JURADO ASIGNADO

Presidente
Vocal
Secretario
1er Suplente
2do Suplente

Prof. ANGELA SOTELO LOPEZ
Prof. FRANCISCA ITURBE CHINAS
Prof. LUCIA CORNEJO BARRERA
Prof. LETICIA GIL VIEYRA
Prof. BERTHA JULIETA SANDOVAL GUILLEN

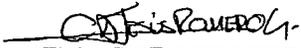
Sitio donde se desarrolló el tema:

Laboratorio 111, departamento de Farmacia, Edificio E, Facultad de Química,
Universidad Nacional Autónoma de México.
Ciudad Universitaria, Circuito Interior, C.P. 04510, México D.F.

Asesor del Tema


M. en C. ~~Angela Sotelo López~~

Sustentante


Carlos de Jesús Romero Guzmán

Agradecimientos

A Iliana González por su valiosa ayuda durante la cuantificación de aminoácidos en el autoanalizador.

A Leticia Gil y Rosa María Argote por su valiosa colaboración y asesoría a lo largo de mi estancia.

Gracias a todas las analistas que participaron con su trabajo: Gabriela López, Helga Castillo, Nancy Flores y Mayra Díaz.

Al maestro Alfredo Salazar por proporcionar parte del material biológico utilizado durante el estudio.

A Waters-México por la ayuda técnica y logística proporcionada a lo largo del trabajo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología-Sistema Nacional de Investigadores por el apoyo económico otorgado en la realización del proyecto.

A todos los profesores que dedicadamente ofrecieron su experiencia para que me permitiera mejorar y anhelar siempre más, tanto en lo académico como en lo personal.

Agradezco a Dios la vida y las bondades que encuentro en ella. Gracias por las armas, los dones y las oportunidades que me permiten luchar por ser quién yo quiero.

*A mi querida UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO, por en ella encontré mucho de lo que da sentido a mi vida...
...cómo no te voy a querer si mi corazón es puma y mi piel dorada...*

Gracias a la Maestra Angela Sotelo por darme la oportunidad de mostrar algo de lo que puedo hacer, por toda la confianza, por todo su cariño y por el ejemplo que significa para mí.

Lety y Rosita, nunca voy a olvidar que, en todo momento estuvieron conmigo brindándome su cariño y amistad sinceros.

Gracias a todos los amigos que encontré, a veces sin buscar, en el laboratorio. Han sido y serán parte de todo: Gaby, la Nor, Ili, Argelia, Helga, Verito, Rosy, Nancy, Sandra, Ponchito, Toño, Semel, Celina, Anita, Vanesa, Millet, Fer, otra Fer, Héctor, Chela y Chlo.

Señora Vicky: gracias por todas las veces que me hizo sentir como en casa, por todo su cariño y amistad. Ha sido un placer.

Maestra Xóchitl, nunca voy a olvidar aquella plática, no puede imaginar cuanto atesoró aquel regaño. Gracias.

Gracias a todas y a todos los que, por lo menos alguna vez, soportaron mi mal genio; les admiro su enorme paciencia conmigo, significa mucho para mí.

Dedicatorias

Carlos y Enriqueta, no encontraría en una vida las palabras que expresaran todo lo que significan para mí; su amor, su confianza en mis decisiones, su paciencia, y todo lo me han dado para ser quién soy. Esto es sólo el inicio de todo lo que ustedes han sembrado, es suyo. Los adoro y estoy orgulloso de ser y venir de ustedes.

Hermanillos: su manera de ser, su compañía y su amistad, me han sido de una enorme ayuda. Gracias Rocío y Juan Manuel, también esto es suyo.

Mi querida Grabeila, tu sabes que todo esto lo pude lograr por que estabas ahí. Tu cariño, tu confianza, tus ganas de hacer las cosas, tu impulso, tu ejemplo y todo lo que tu eres, estará siempre junto conmigo. Te quiero mucho.

A todos los miembros de las familias Romero y Guzmán, en especial a todos los que ya han completado su camino. Gracias por el afecto y el apoyo.

A Nataly, Nelly, Manolo, Gerardo, Geraldine y el pequeño Alex. Venga, que todo en la vida se puede cuando se hace desde el corazón, no se necesita más.

Alicia y Andrés, por estar siempre conmigo. Gracias por la buena estrella.

Alma Velasco, por el apoyo y el cariño. Gracias

Gabriellita, Sandra, Yuyis, la Nor, Fidel, Pelón, Poncho, Gustrapo, Mole, Pollo y Panda. También esto es de ustedes; por ser quienes son, por la locura, por el respeto, por lo que aprendimos, por todo lo que hicimos, por lo que haremos. Pero por lo más importante: me demostraron en cada momento que soy su amigo. Mucho los quiero yo, siempre conmigo estarán.

Por todas las noches de fidelidad, a mi Emma.

**NOSOTROS NACIMOS DE LA NOCHE,
EN ELLA VIVIMOS, MORIREMOS EN ELLA.
PERO LA LUZ SERÁ MAÑANA PARA LOS MÁS,
PARA TODOS AQUELLOS QUE HOY LLORAN LA NOCHE,
PARA QUIENES SE NIEGA EL DÍA,
PARA TODOS LA LUZ, PARA TODOS, TODO.**

Ejército Zapatista de Liberación Nacional

ÍNDICE

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1. ÍNDICE TEMÁTICO

Tema	Página
Índice	
1. ÍNDICE TEMÁTICO	8
2. ÍNDICE DE FIGURAS	10
3. ÍNDICE DE TABLAS	11
Introducción	12
Objetivos	14
Antecedentes	
1. PROTEÍNAS Y AMINOÁCIDOS	17
1.1 Generalidades	17
1.2 Aminoácidos	18
1.3 Calidad de proteína	20
2. PROPIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DE LOS AMINOÁCIDOS	24
2.1 Generalidades	24
2.2 Equilibrios ácido-base de los aminoácidos	24
2.3 Aminoácidos como especies con carga neta	25
2.4 Polaridad de los aminoácidos	26
3. CUANTIFICACIÓN DE AMINOÁCIDOS	28
3.1 Hidrólisis	28
3.2 Análisis por cromatografía de intercambio iónico	31
3.3 Otros medios para identificar y cuantificar aminoácidos	34
4. ANÁLISIS DE AMINOÁCIDOS POR HPLC DE FASE REVERSA	36
4.1 Derivatización	36
4.2 Agentes derivatizantes	37
4.3 6-aminoquinolil-N-hidroxisuccinimidil carbamato	40
5. CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC)	45
5.1 Fundamentos	45
5.2 Parámetros cromatográficos	47
5.3 Elementos básicos de cromatografía	49
5.4 Ensanchamiento de bandas	53
5.5 Cuantificación en cromatografía	54

6. VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS	56
6.1 Definición	56
6.2 Linealidad	56
6.3 Exactitud	58
6.4 Precisión	59
6.5 Repetibilidad / Reproducibilidad	59
6.6 Sensibilidad	60
6.7 Especificidad / Selectividad	60
6.8 Tolerancia / Robustez	60
6.9 Estabilidad	60
Metodología	
1. DIAGRAMA DE FLUJO	62
2. METODOLOGÍA	
2.1 Preparación de las muestra	64
2.2 Determinación de nitrógeno total	65
2.3 Cuantificación de aminoácidos en un autoanizador, previa hidrólisis con HCl 6 N, en reflujo, 4 horas a 145° C	66
2.4 Cuantificación de aminoácidos por HPLC de fase reversa, previa hidrólisis con HCl 6 N en fase de vapor, 4 horas a 145° C	67
2.5 Cuantificación de aminoácidos por HPLC de fase reversa, previa hidrólisis con HCl 6 N en reflujo, 4 horas a 145° C	69
3. VALIDACIÓN	
3.1 Adecuabilidad	70
3.2 Precisión	71
3.3 Linealidad del sistema	71
3.4 Linealidad, Exactitud y repetibilidad del método	72
3.5 Exactitud y Repetibilidad del método (Hidrólisis y cuantificación por HPLC)	74
3.6 Sensibilidad	75
3.7 Especificidad	75
3.8 Tolerancia y robustez	75
3.9 Estabilidad	76
Resultados y discusión	77
Conclusiones	124
Bibliografía	126
Anexos	
ANEXO I. Fórmulas de cálculo	134
ANEXO II. Linealidad	137
ANEXO III. Metodología validada	151

2. ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Página
1. Fórmula estructural de los 20 aminoácidos proteínicos	19
2. Diagrama de Venn que muestra la relación de las propiedades físico-químicas de los aminoácidos	27
3. Reacción de derivatización entre aminas primarias o secundarias y AQC	41
4. Cromatograma de la separación de un hidrolizado de proteína de cacahuete. Detección en fluorescencia	43
5. Cromatograma de la separación de un hidrolizado de proteína de cebada. Detección en UV	44
6. Parámetros cromatográficos	47
7. Sistema de filtración y degasificación de fase móvil	51
8. Línea base	82
9. Cromatograma de la separación de una solución estándar de aminoácidos	85
10. Especificidad del método	100
11. Estabilidad de los derivados de aminoácidos con AQC	103
12. Instalación de la estación de trabajo	162
13. Vial de reacción	163
14. Vial de reacción en la estación de trabajo	163

7. ÍNDICE DE TABLAS

Tabla	Página
1. Nomenclatura trivial, símbolos de 1 y 3 letras y nombre sistemático de los 20 aminoácidos	18
2. Contenido de aminoácidos del patrón establecido por la FAO/OMS	22
3. Algunas propiedades físico-químicas de los aminoácidos	25
4. Dos diferentes escalas de hidrofobicidad, según las características físico-químicas y de estructura de sus cadenas laterales	27
5. Algunas de las principales diferencias entre la cromatografía de líquidos de fase normal y de fase reversa	52
6. Promedio, desviación estándar y coeficiente de variación (n=3) de la respuesta generada por un solo estándar de aminoácidos derivatizados con AQC	81
7. Promedio, desviación estándar y coeficiente de variación (n=3) de los tiempos de retención generados por un solo estándar de aminoácidos derivatizados con AQC	83
8. Precisión del sistema. Reacción de derivatización	87
9. Linealidad del sistema. Curvas de calibración	88
10. Intervalos de confianza para la ordenada al origen de las curvas de calibración	91
11. Linealidad del método. Curvas de recuperación	92
12. Porcentaje de recobro, en tres niveles de adición	95
13. Porcentaje de recobro, promedio de 9 análisis	96
14. Límites de cuantificación y detección de histidina, cistina, metionina y tirosina	99
15. Coeficientes de variación de los análisis realizados por diferentes analistas	104
16. Contenido de aminoácidos en frijol Negro Jamaica	107
17. Contenido de aminoácidos en maíz	108
18. Contenido de aminoácidos en frijol Escumite	109
19. Contenido de aminoácidos en distintas muestras con menos de 20 % de proteína	117
20. Contenido de aminoácidos en distintas muestras del género <i>Phaseolus</i>	118
21. Contenido de aminoácidos en distintas muestras del género <i>Lupinus spp</i>	119
22. Contenido de aminoácidos en distintas muestras de la especie <i>Erythrina americana</i>	120

INTRODUCCIÓN

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

INTRODUCCIÓN

La cuantificación de aminoácidos en alimentos por cromatografía de intercambio iónico ha sido utilizada como método de referencia; no obstante, requiere de mayor manipulación en la preparación de las muestras, tiempos largos de análisis y se ha reportado baja repetibilidad en el análisis de aminoácidos en cereales y leguminosas. En general, las ventajas que proponen los sistemas de análisis por HPLC (mayor resolución, rapidez, facilidad y reproducibilidad en el análisis) han permitido el desarrollo de metodologías alternativas a la tradicional cromatografía de intercambio iónico. La polaridad de los aminoácidos y la ausencia de un cromóforo en la mayoría de ellos, ha obligado al desarrollo de diversas reacciones químicas selectivas que permitan la formación de derivados capaces de ser resueltos en columnas no polares y el uso de sistemas de detección por fluorescencia o luz ultravioleta (UBV). El reactivo 6-aminoquinolil-N-hidroxisuccinimidil carbamato (AQC) permite la formación selectiva de derivados de aminas primarias y secundarias, los cuales pueden ser separados, detectados y cuantificados de modo adecuado en un sistema de cromatografía de líquidos de fase reversa, utilizando un detector de luz UV o un detector de fluorescencia. Generalmente, la principal fuente de error en el análisis es la hidrólisis de los enlaces amida que unen a los aminoácidos entre sí. El método más común considera el uso de HCl 6 N, a reflujo a 110° C durante 20 - 24 horas; el principal inconveniente es la degradación total de triptofano y la pérdida parcial de los aminoácidos azufrados, sobre todo en muestras con porcentajes elevados de hidratos de carbono. Con la finalidad de mejorar la precisión y exactitud en el recobro de cada uno de los aminoácidos después de la reacción de hidrólisis, se han propuesto alternativas distintas, entre ellas: el uso de tiempos más cortos cuando se eleva la temperatura, hidrólisis empleando ácidos orgánicos o hidrólisis con HCl en fase de vapor. En el presente trabajo se estudia la cuantificación de aminoácidos en cereales y leguminosas por HPLC de fase reversa después de hidrolizar el material proteínico con HCl en fase de vapor y derivatizar los aminoácidos liberados con 6 aminoquinolil-N-hidroxisuccinimidil carbamato, como una metodología alternativa al método tradicional de cuantificación.

OBJETIVOS

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1. OBJETIVO GENERAL

- ✓ Validar un método para cuantificar aminoácidos en cereales y leguminosas por HPLC de fase reversa, después de haber hidrolizado el material proteínico con HCl en fase de vapor y derivatizar los aminoácidos liberados con 6-aminoquinolil-N-hidroxisuccinimidil carbamato.

2. OBJETIVOS PARTICULARES

- Establecer las condiciones apropiadas para la derivatización de aminoácidos, utilizando 6-aminoquinolil-N-hidroxisuccinimidil carbamato (AQC).
- Determinar las condiciones óptimas para la separación, identificación y cuantificación de los derivados de los aminoácidos, empleando HPLC de fase reversa.
- Adaptar las condiciones de hidrólisis con HCl en fase de vapor para el análisis de aminoácidos en cereales y leguminosas.
- Proponer una metodología para la cuantificación de aminoácidos en cereales y leguminosas, empleando hidrólisis en fase de vapor, derivatización con AQC y cuantificación por HPLC de fase reversa.
- Evaluar la precisión, linealidad, sensibilidad, tolerancia y robustez del sistema de cuantificación de los derivados de los aminoácidos por HPLC.
- Valorar la linealidad, exactitud, repetibilidad y especificidad del método de extracción, purificación, derivatización y cuantificación de aminoácidos por HPLC.
- Estimar la repetibilidad de la cuantificación de aminoácidos con la metodología propuesta.
- Cuantificar los aminoácidos del material proteínico de dos leguminosas y un cereal, empleando un autoanalizador de aminoácidos para establecer la referencia de la metodología propuesta.

ANTECEDENTES

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1. PROTEÍNAS Y AMINOÁCIDOS

1.1 Generalidades

Todos los tejidos vivos, tanto vegetales como animales, contienen proteínas, éstas difieren de las grasas y los hidratos de carbono por el hecho de que contienen nitrógeno (16 % como promedio). En el análisis proximal, el cálculo del contenido proteínico de un material dado, está fundamentado en la transformación del nitrógeno orgánico de la muestra en amoníaco, el cual después es destilado y cuantificado por titulación; el contenido de proteína (proteína cruda) es 6.25 veces el contenido de nitrógeno.

Todas las proteínas están constituidas por las mismas unidades básicas llamadas aminoácidos, moléculas orgánicas que cuentan con un grupo amino (-NH₂) y un grupo carboxilo (-COOH). Se reporta la existencia de al menos 300 aminoácidos en la naturaleza, de los cuales sólo 20 constituyen las unidades monoméricas de las proteínas (tabla 1).

Los aminoácidos se unen entre sí, en proteínas o péptidos, por formación de enlaces amida entre el grupo amino de un aminoácido y el grupo carboxilo del siguiente, con la consiguiente eliminación de una molécula de agua. Este enlace se conoce como enlace peptídico. Los distintos aminoácidos se van uniendo a partir del extremo amino, en el sentido grupo amino → grupo carboxilo.

La proporción de cada uno de los 20 aminoácidos, la secuencia en que se encuentran enlazados (estructura primaria), la formación de puentes de hidrógeno dentro de una sola cadena de aminoácidos (estructura secundaria), su acomodo tridimensional (estructura terciaria) y la unión de dos o más cadenas de aminoácidos (estructura cuaternaria) son los factores determinantes que intervienen en el arreglo, funciones y propiedades de las proteínas; estructurales (queratina, colágeno, elastina, etc.), reguladoras (hormonas, enzimas, neurotransmisores, etc.), transportadoras (albúmina, hemoglobina, mioglobina, etc.) y de protección (inmunoglobulinas, factores de coagulación, etc.) [1-4].

Tabla 1. Nomenclatura trivial, símbolos de 1 y 3 letras y nombre sistemático de los 20 aminoácidos [5].

Nombre trivial	3 letras	1 letra	Nombre sistemático ^{1,2}
Alanina	Ala	A	Ácido 2-aminopropanoico
Arginina	Arg	R	Ácido 2-amino-5-guanidinopentanoico
Asparagina	Asn	N	Ácido 2-amino-3-carbamilpropanoico
ácido Aspártico	Asp	D	Ácido 2-aminobutanodioico
Cisteína	Cys	C	Ácido 2-amino-3-mercaptopropanoico
Glutamina	Gln	Q	Ácido 2-amino-4-carbamilbutanoico
ácido Glutámico	Glu	E	Ácido 2-aminopentanoico
Glicina	Gly	G	Ácido aminoetanoico
Histidina	His	H	Ácido 2-amino-3-(1H-imidazol-4-il) propanoico
Isoleucina	Ile	I	Ácido 2-amino-3-metilpentanoico
Leucina	Leu	L	Ácido 2-amino-4-metilpentanoico
Lisina	Lys	K	Ácido 2,6-diaminohexanoico
Metionina	Met	M	Ácido 2-amino-4-(metiltilio) butanoico
Fenilalanina	Phe	F	Ácido 2-amino-3-fenilpropanoico
Prolina	Pro	P	Ácido pirrolidin-2-carboxílico
Serina	Ser	S	Ácido 2-amino-3-hidroxiopropanoico
Treonina	Thr	T	Ácido 2-amino-3-hidroxiбутanoico
Triptofano	Trp	W	Ácido 2-amino-3-(1H-indol-3-il) propanoico
Tirosina	Tyr	Y	Ácido 2-amino-3-(4-hidroxifenil) propanoico
Valina	Val	V	Ácido 2-amino-3-metil butanoico

¹ El nombre sistemático está dado para los D, L o DL- aminoácidos

² El nombre sistemático, referido a una situación hipotética: grupos carboxilo no disociados y grupos amino no protonados

1.2 Aminoácidos

Además de constituir proteínas, los aminoácidos, sus derivados y cadenas relativamente cortas de aminoácidos llamadas péptidos, participan en funciones celulares de importancia: como neurotransmisores, hormonas, antibióticos sintetizados por algunos microorganismos, reguladores de procesos biosintéticos y del desarrollo celular, etc.

Los aminoácidos que conforman a las proteínas, cuentan con un grupo amino (-NH₂) y un carboxilo (-COOH), como ambos se encuentran unidos al mismo átomo de carbono (carbono adyacente al carbono del grupo carboxilo) se les llama alfa-aminoácidos.

El carbono al que se encuentran enlazados los grupos funcionales mencionados cuenta con otros dos sustituyentes distintos (figura 1): un átomo de hidrógeno y una cadena (grupo R) ácida, básica, aromática o alifática, en función del aminoácido de que se trate (con excepción de glicina, en donde los dos sustituyentes son átomos de hidrógeno); esto les confiere actividad óptica (rotar el plano de la luz polarizada a la izquierda -levo- o a la derecha -dextro rotatorios-). Aunque se reporta la presencia de aminoácidos levo o dextro rotatorios en algunas proteínas, todos tienen la configuración absoluta del L-gliceraldehído por lo que se les conoce como L-alfa-aminoácidos [1,3,4].

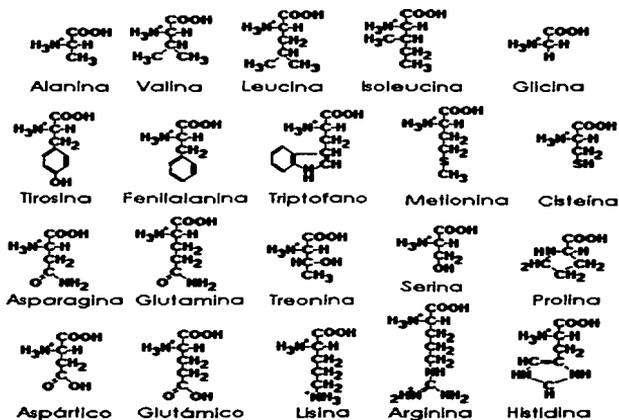


Figura 1. Fórmula estructural de los 20 aminoácidos proteínicos, establecida a pH<2 [3].

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1.3 Calidad de proteína

1.3.1 Proteínas y aminoácidos en la alimentación.

Las proteínas ingeridas en la dieta, al ser degradadas por las enzimas de los jugos digestivos, permiten que los aminoácidos liberados sean absorbidos por el organismo, donde serán distribuidos por el sistema circulatorio en los distintos tejidos para reconstruir el patrón específico correspondiente a corazón, pulmones, piel, músculo, etc. Es por eso que los organismos pueden utilizar proteínas de fuentes muy distintas.

Como se mencionó antes, la forma particular en que los 20 aminoácidos se combinan en las proteínas determina sus características bioquímicas; el valor nutritivo de las proteínas depende del tipo y proporción de aminoácidos que contenga, es más alto cuando hay una gama más completa y mayor proximidad con los requerimientos específicos de una especie dada.

Los aminoácidos no se almacenan en forma comparable a los hidratos de carbono o la grasa, por lo que es necesario que se suministren todos los aminoácidos indispensables juntos en la dieta para lograr la óptima utilización de los 20 aminoácidos en los procesos fisiológicos, de no ser así, su rápido catabolismo provocaría un desbalance en el contenido de nitrógeno del organismo.

La función primaria de las proteínas de la dieta es suministrar los aminoácidos para que el organismo lleve a cabo los procesos de mantenimiento, crecimiento, gestación y lactancia. Si no existe aporte suficiente de aminoácidos, de acuerdo a lo que cada organismo requiere, no se llevan a cabo los procesos mencionados pues no habría material para ello. Además, si los aminoácidos que están presentes no se utilizan, son eliminados por no haber variedad y cantidad suficiente de los 20 aminoácidos [1-2].

1.3.2 Aminoácidos indispensables.

Los aminoácidos indispensables son aquellos que el organismo no sintetiza a la velocidad suficiente o que no sintetiza en lo absoluto (lisina, isoleucina, leucina, valina, metionina, fenilalanina, treonina y triptofano; los infantes requieren, además, de arginina e histidina) para satisfacer las necesidades fisiológicas. Se ha encontrado que en ratas y humanos, los aminoácidos indispensables (con excepción de lisina y treonina) pueden ser sustituidos por sus derivados alfa-hidroxi o alfa-ceto, es decir, que lo que parece ser indispensable es el esqueleto de carbono; en el caso de lisina y treonina, deben ser suministrados ya preformados puesto que la mayoría de los mamíferos superiores han perdido las transaminasas necesarias para la conversión de los hidroxí o ceto derivados en sendos aminoácidos.

Las proteínas que contienen en abundancia aminoácidos indispensables, en general, son consideradas como de alta calidad. Calidad es la utilidad de una proteína alimenticia para el crecimiento y mantenimiento de los tejidos[1-2].

1.3.3 Aminoácidos dispensables.

Los aminoácidos dispensables son aquellos que son sintetizados por el organismo, a partir de un esqueleto de carbono y grupos amino de otros aminoácidos o compuestos simples de nitrógeno, y que por lo tanto no necesitan estar presentes en la dieta (no son necesarios como componente en la dieta pero sí lo son para el organismo, pues también de ellos depende el funcionamiento fisiológico) [1-2].

1.3.4 Evaluación química de la calidad de la proteína.

En términos químicos, la calidad de una proteína se evalúa midiendo el contenido de aminoácidos y comparándolo con una proteína de referencia. El resultado de la comparación, expresado como un porcentaje, permite conocer la abundancia de cada uno de los aminoácidos indispensables en la proteína.

ANTECEDENTES

Generalmente la proteína de huevo es tomada como referencia, aunque la Organización de las Naciones Unidas (ONU), a través del organismo responsable de la alimentación y agricultura (FAO), y la Organización Mundial de la Salud (OMS/WHO), han establecido un patrón con la cantidad de cada aminoácido indispensable, por cada 100 gramos de proteína (16 g de N), necesaria para asegurar que los requerimientos de los seres humanos serán cubiertos (tabla 2) [4].

En años recientes, la OMS y la FAO han recomendado que para lactantes, se utilice como patrón leche humana (tabla 2), en la obtención de la calificación química de los alimentos destinados a este sector de la población [6].

Tabla 2. Contenido de aminoácidos¹ del patrón establecido por la FAO/OMS [7] y de leche humana [6].

Aminoácido	Leche humana ²	Lactantes	Pre-escolares ³	Adultos
Isoleucina	4.0	4.6	2.8	1.3
Leucina	8.5	9.3	6.6	1.9
Lisina	6.7	6.6	5.8	1.6
Azufrados ⁴	2.9	4.2	2.5	1.7
Aromáticos ⁵	6.6	7.2	6.3	1.9
Treonina	4.4	4.3	3.4	1.1
Triptofano	1.7	1.7	1.1	0.9
Valina	4.5	5.5	3.5	0.5
Histidina	2.5	2.6	1.9	—

¹ Expresado en g / 16 g de Nitrógeno

² Comunidad Económica Europea

³ Niños de 2-5 años

⁴ Cisteína + Metionina

⁵ Fenilalanina + Tirosina

— Histidina no se considera indispensable para los adultos

La calificación química de una proteína, es el valor más bajo de la comparación que se lleva a cabo entre el contenido de cada uno de los aminoácidos indispensables de la proteína en cuestión, con el contenido de aminoácidos indispensables de la proteína de referencia o del patrón de FAO/WHO. El aminoácido del que se obtenga la calificación química de la proteína es, también, el aminoácido limitante de la misma. Las proteínas de, presumiblemente, mejor calidad son aquellas con calificaciones químicas cercanas a 100 (la proteína de huevo tiene una calificación química de 100).

ANTECEDENTES

Existen dos formas de calcular la calificación química de una proteína. La primera es la obtención del porcentaje del contenido de un aminoácido dado, respecto al contenido de ese mismo aminoácido en el patrón:

$$CQ = (\text{g aminoácido}/16 \text{ g de N})_{\text{muestra}} / (\text{g aminoácido}/16 \text{ g de N})_{\text{patrón}} \times 100$$

La segunda manera de obtener la calificación química es la comparación del contenido relativo de un aminoácido en una proteína, respecto al contenido relativo del mismo aminoácido en el patrón:

$$CQ = \frac{[(\text{g aminoácido}/16 \text{ g de N}) / (\text{g total de aminoácidos indispensables}/16 \text{ g de N})]_{\text{muestra}} \times 100}{[(\text{g aminoácido}/16 \text{ g de N}) / (\text{g total de aminoácidos indispensables}/16 \text{ g de N})]_{\text{patrón}}}$$

La diferencia principal entre las dos formas de cálculo de la calificación química, es que la primera compara la composición de la proteína contra la composición del patrón, en tanto que la segunda compara la proporción que guarda un aminoácido indispensable en la proteína, respecto a la proporción que guarda el mismo aminoácido en el patrón. Dado que las proteínas de mayor calidad son aquellas con mayor contenido y diversidad de aminoácidos indispensables, esta forma de calcular la calificación química pudiera considerarse como un mejor índice de la calidad de una proteína.

En general, se considera que las proteínas de origen animal son de calidad superior a las de origen vegetal. Las proteínas de los cereales son deficientes en lisina principalmente, en tanto que las proteínas de las leguminosas lo son en los aminoácidos azufrados: cisteína y metionina [4].

Aunque el hecho de conocer la composición de aminoácidos da cierta idea de la calidad de la proteína de un alimento, deben considerarse otros factores, puesto que bajo ciertas circunstancias (presencia de factores antinutricionales y/o preparación del alimento), los aminoácidos no están disponibles para su absorción en el organismo. La evaluación de la calidad de la proteína se complementa con análisis en organismos a los que la proteína será dirigida y de la forma en que será consumida. Los ensayos biológicos empleados para determinar la calidad de una proteína están basados en el porcentaje del nitrógeno ingerido con la dieta que permanece en el cuerpo para síntesis de proteínas estructurales y funcionales o en la ganancia en peso como resultado de la calidad de la proteína ingerida [2,4].

2. PROPIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DE LOS AMINOÁCIDOS

2.1 Generalidades

Los aminoácidos son compuestos químicos cristalinos de puntos de fusión elevados, color blanco, moderadamente solubles en agua (tabla 3) y, en la mayoría de los casos, son insolubles en solventes orgánicos [4].

Los múltiples grupos con carga de los aminoácidos permiten que sean solvatados con facilidad y por lo tanto sean solubles en solventes polares. Los elevados puntos de fusión (>200° C) son indicio de la elevada cantidad de energía que hay que proporcionar para romper las fuerzas iónicas que estabilizan los cristales [3].

2.2 Equilibrios ácido-base de los aminoácidos

El grupo amino de su estructura tiene características básicas ($pK_a = 6.8-7.9$), en tanto que el grupo carboxilo es de carácter ácido ($pK_a = 3.5-4.3$).

Equilibrio ácido – base del grupo carboxilo de los aminoácidos:



Equilibrio ácido – base del grupo amino de los aminoácidos:



Dado que ambos grupos están en la misma molécula, ésta tiene la capacidad de actuar como un ácido o una base, es decir, los aminoácidos son de naturaleza anfotérica.

Algunos aminoácidos también cuentan con grupos capaces de ceder o aceptar un protón en los grupos de la cadena lateral (Arginina, Aspártico, Cisteína, Glutámico, Histidina, Lisina y Tirosina), éstos grupos también influyen en el estado en que se encuentran a un pH dado (Tabla 3) [3-4].

Tabla 3. Algunas propiedades físico-químicas de los aminoácidos [8-9].

Aminoácido	pK _a ^{1,2}	Solubilidad ^{2,3}	pI ³
Alanina	—	16.65	6.11
Arginina	-12	15	10.76
Aspártico	4.5	0.78	2.98
Asparagina	—	3.53	—
Cisteína	9.1-9.5	Alta	3.02
Glutámico	4.6	0.86	3.08
Glutamina	—	2.5	—
Glicina	—	24.99	6.06
Histidina	6.2	4.19	7.64
Isoleucina	—	4.12	6.04
Leucina	—	2.43	6.04
Lisina	10.4	Alta	9.47
Metionina	—	3.38	5.74
Fenilalanina	—	2.96	5.91
Prolina	—	1.62	6.3
Serina	—	5.02	5.68
Treonina	—	Alta	—
Tirosina	9.7	1.11	5.88
Triptófano	—	0.45	5.63
Valina	—	8.85	6.00

¹ pK_a de la cadena lateral; pK_a del grupo amino ~6-8-7.9, pK_a del grupo carboxilo ~3.5-4.3

² Expresado en gramos/100 gramos de agua

³ Valores determinados a 25° C

— no hay datos disponibles

2.3 Aminoácidos como especies con carga neta

Los aminoácidos son electrolitos débiles, por lo que la carga neta está en función del pH del sistema en el que se encuentren.

Los aminoácidos sin carga (con el grupo amino desprotonado y el grupo carboxilo protonado) no pueden existir a ningún pH, pues en un pH suficientemente bajo para protonar el carboxilo de la molécula, el grupo amino también sería protonado.

Cuando las cargas positivas son iguales a las cargas negativas, el aminoácido es neutro y se dice que está en el punto isoeléctrico (pH al cual la carga neta es cero, tabla 3) y se le denomina ión dipolar o zwitterion.

Dichos iones bipolares tienen capacidad para actuar como amortiguadores puesto que son viables para combinarse con ácidos o bases, impidiendo cambios en el pH, ésta capacidad amortiguadora es muy importante en el caso de las células puesto que solo se mantienen en funcionamiento en intervalos de pH muy estrechos.

La capacidad de alterar la carga de los aminoácidos o de sus derivados manipulando el pH facilita la separación física de aminoácidos, péptidos y proteínas.

El punto isoeléctrico es importante puesto que algunas otras propiedades alcanzan valores máximos o mínimos; la conductividad eléctrica, la solubilidad y la viscosidad están todas en su valor mínimo [3-4].

2.4 Polaridad de los aminoácidos

A partir de las características de los grupos funcionales (grupos R) unidos al carbono alfa, los aminoácidos pueden ser clasificados según su polaridad. Aunque existe discrepancia respecto a cuáles son los aminoácidos más o menos hidrofóbicos, en general se acepta que Alanina, Fenilalanina, Isoleucina, Leucina, Metionina, Prolina, Tirosina, Triptofano y Valina, son los aminoácidos con mayor tendencia a asociarse en un ambiente no polar (hidrofóbicos); en tanto que Aspártico, Glutámico, Arginina, Asparagina, Cisteína, Glicina, Glutamina, Histidina, Lisina, Serina y Treonina son los aminoácidos con mayor tendencia a asociarse con agua.

La mayor o menor tendencia de los aminoácidos para formar asociaciones en ambientes acuosos, permitiría, en principio, su manipulación para lograr separar y purificar físicamente, aminoácidos, péptidos, proteínas o sus derivados.

También se menciona que la intensidad de las características hidrofílicas o hidrofóbicas de los aminoácidos está más íntimamente relacionada con las fuerzas intermoleculares que tienen lugar en sistemas mucho más complejos a sistemas de un solo aminoácido en agua, como la presencia de proteínas, otros aminoácidos, compuestos iónicos, compuestos hidrofílicos o hidrofóbicos de naturaleza distinta a los aminoácidos, etc. [3,10-11].

Tabla 4. Dos diferentes escalas de hidrofobicidad, según las características físico-químicas y de estructura de sus cadenas laterales [12-13].

	Según Wolfenden, 1981	Según Kyte, 1982
Más hidrófobo	Glicina Leucina, Isoleucina Valina, Alanina Fenilalanina Cisteína Metionina Treonina, Serina Triptofano, Tirosina Asparagina, Lisina, Glutamina Glutámico, Histidina Aspártico	Isoleucina Valina Leucina Fenilalanina Cisteína Metionina, Alanina Glicina Treonina, Serina Triptofano, Tirosina Prolina Histidina Asparagina, Glutamina Aspártico, Glutámico Lisina
Más hidrófilo	Arginina	Arginina

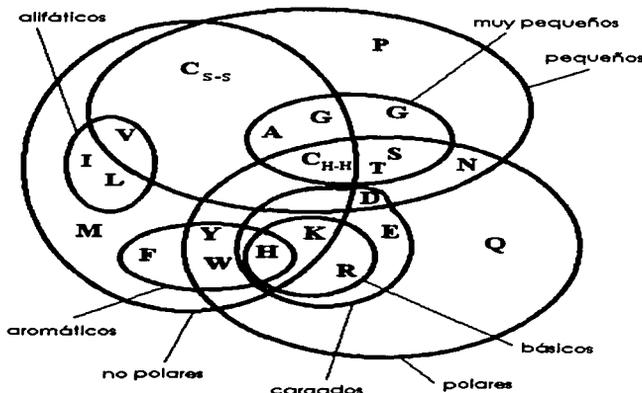


Figura 2. Diagrama de Venn que muestra la relación de las propiedades físico-químicas de los aminoácidos [10].

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

3. CUANTIFICACIÓN DE AMINOÁCIDOS

3.1 Hidrólisis

El análisis cuantitativo de los aminoácidos de proteínas puras o de la fracción proteínica de los alimentos sigue a una etapa de hidrólisis, en la cual son rotos los enlaces peptídicos que unen los aminoácidos entre sí en una proteína o péptido.

La hidrólisis se lleva a cabo cuando el material proteínico se somete a reflujo (110° C) con ácido clorhídrico 6 N durante 24 horas, éstas condiciones, establecidas por Moore y Stein en 1958, deben ser rigurosamente controladas para dar lugar a la ruptura de todos los enlaces amida, produciendo una mezcla de aminoácidos [14-15].

La reacción de hidrólisis en medio ácido destruye por completo el triptofano; además, se reporta que los aminoácidos azufrados son parcial o totalmente degradados cuando en las condiciones de hidrólisis se presentan variaciones a lo reportado por Moore y Stein; el grado de destrucción depende de las características de la matriz en donde se encuentran [16-19].

3.1.1 Hidrólisis en el análisis de triptofano, aminoácidos azufrados y lisina disponible.

En el caso del análisis de triptofano, se ha encontrado que la mejor solución es la hidrólisis alcalina a 145° C con LiOH 4 N, con variaciones en el tiempo en función del contenido de proteína de la muestra [16].

Los aminoácidos azufrados, generalmente son llevados a su forma oxidada más estable (ácido cisteico en el caso de cistina-cisteína y metionin sulfona para metionina) con ácido perbórmico, antes de llevar a cabo el proceso de hidrólisis en muestras alimenticias, aunque se recomienda el mismo tratamiento para evitar su oxidación en péptidos y proteínas durante su análisis, purificación y/o almacenamiento [17-19].

El tratamiento de la muestra con borohidruro de sodio, antes de someterle a hidrólisis ácida, permite hacer determinaciones de lisina disponible (lisina cuyo grupo amino aun está disponible para funciones biológicas) en alimentos cuyo proceso ha favorecido la formación de reacciones de Maillard [20].

Todas estas variantes en los protocolos de hidrólisis, tienen como objetivo realizar análisis de aminoácidos completos en matrices alimenticias, para obtener indicios de la posible calidad de una proteína.

3.1.2 Calidad de la hidrólisis.

El correcto proceso de hidrólisis repercute directamente en la calidad de la cuantificación, puesto que éste puede ser incompleto o podrían degradarse algunos aminoácidos.

Se reporta que aún bajo condiciones controladas y estandarizadas, el rendimiento obtenido de los aminoácidos, en alimento para cerdos y en derivados de soya rara vez es máximo; algunos aminoácidos requieren de más o menos tiempo de hidrólisis para obtener las mayores concentraciones [21].

Se sabe que bajo ciertas circunstancias, algunos aminoácidos son más difíciles de liberar del enlace peptídico cuando se presentan ciertas secuencias, como aquellas que involucran isoleucina y valina, siendo las más difíciles Ile-Ile y Val-Val; también se conoce que en algunos casos, hay una mayor posibilidad de interferencias en el análisis de muestras con porcentajes elevados de hidratos de carbono.

Cuando se requiere de cuantificar aminoácidos durante la secuenciación de péptidos y proteínas, lo más adecuado es que sean realizadas cinéticas de hidrólisis para cada uno de los aminoácidos, con el fin de hacer eficiente y preciso el análisis de aminoácidos del material proteínico de los alimentos; generalmente, estos estudios solo permitirían obtener factores de corrección para mejorar la exactitud en la cuantificación [16,21].

3.1.3 Protocolos alternos de hidrólisis ácida.

Dado que generalmente la etapa de hidrólisis es la mayor fuente de variación en el análisis de aminoácidos, se ha intentado desarrollar métodos alternos al de Moore y Stein para lograr rendimientos mayores con procedimientos que impliquen menores fuentes de error.

Se reporta el uso de distintos tipos de ácidos: ácido p-toluensulfónico, ácido metasulfónico y ácido mercaptoetanosulfónico; con los cuales se producen pérdidas de algunos aminoácidos por lo que la FAO y la OMS desaconsejan su uso.

Otros han propuesto modificaciones al método original de Moore y Stein, como el uso de ampollitas de vidrio selladas a vacío, tubos de vidrio con tapón de rosca, hidrólisis en fase vapor, temperaturas más altas con tiempos más cortos, calentamiento por radiaciones de microondas y distintas combinaciones entre éstos métodos [14,22-23].

Gehrke y colaboradores propusieron un método rápido de hidrólisis de proteínas purificadas, utilizando una temperatura de reflujo de 145° C y 4 horas de hidrólisis se obtuvieron rendimientos máximos para todos los aminoácidos. Al comparar ésta hidrólisis rápida con el método original, Lucas y Sotelo, en 1982, comprobaron que la proteína de matrices distintas con contenidos elevados de material no proteínico (como en los alimentos) puede ser hidrolizado con resultados equivalentes al proceso de Moore y Stein, utilizando el proceso descrito en principio por Gehrke, el cual permite un ahorro considerable de tiempo en el análisis rutinario de aminoácidos de matrices complejas como lo son los alimentos [14].

3.1.4 Hidrólisis con HCl 6 N en fase de vapor.

La hidrólisis con ácido clorhídrico 6 N en fase de vapor es considerada como la más efectiva en el análisis de péptidos y proteínas puros. El uso de fenol (~0.1% p/v) en el ácido clorhídrico que se emplea en la hidrólisis, permite mayor limpieza en el sistema de reacción y, por lo tanto, menor degradación de aminoácidos (como serina, tirosina y treonina) provocada por la presencia de impurezas.

El proceso previo a la hidrólisis requiere de ciclos de evacuación con alto vacío y purga con nitrógeno para eliminar el oxígeno presente y, de este modo, reducir las pérdidas por oxidación (especialmente de tirosina y, presumiblemente, de otros aminoácidos lábiles como cistina y metionina). Puesto que únicamente los vapores y el líquido condensado de HCl entran en contacto con el material proteínico, idealmente, la hidrólisis es más efectiva y el tratamiento, en general, es menos drástico que el reflujo [23-24].

Normalmente el proceso se lleva a cabo a 110° C y dura 20-24 horas, aunque existe la posibilidad de reducir el tiempo de hidrólisis bajo el mismo fundamento con el que se redujo el método original de Moore y Stein; en este caso se tiene el reporte del uso de 150° C durante una hora, aunque se presenta una degradación de alrededor de 10% en serina, treonina y tirosina, respecto a la metodología original de 24 horas [24].

Dada la evidencia de la eficiencia en la reducción del tiempo de hidrólisis que presentaron Lucas y Sotelo, sería posible, con ésta metodología, reducir el tiempo de hidrólisis a 4 horas, con una temperatura de 145° C, tal y como fue reportado por ellos en 1982.

3.2 Análisis por cromatografía de intercambio iónico

3.2.1 Fundamento.

Alrededor de 1960, se crearon los primeros analizadores automáticos de aminoácidos, los cuales permiten cuantificar los aminoácidos procedentes del material proteínico hidrolizado por los métodos mencionados.

Spackman, Stein y Moore utilizaron dos columnas de poliestireno sulfonato para resolver mezclas de aminoácidos; se inyecta una solución ácida con el hidrolizado en las resinas de poliestireno sulfonato, las cuales funcionan como un intercambiador catiónico, quedando retenidos los aminoácidos dada la fuerza de atracción entre las cargas positivas de éstos en un pH bajo y las cargas negativas de los grupos sulfonato.

La fuerza de adsorción variará con la basicidad de los aminoácidos, quedando retenidos con mayor fuerza los aminoácidos más básicos. Lavando la columna con soluciones de distintos valores de pH, los aminoácidos migrarán a distinta velocidad a través de la columna, hasta ser separados.

En general, los hidrolizados de proteínas puras y material proteínico de los alimentos requieren de 3 soluciones amortiguadores con sales de sodio (pH de 3.90, 4.15 y 5.50), en tanto que la separación de aminoácidos provenientes de fluidos biológicos requieren de al menos 5 soluciones amortiguadoras con sales de litio.

El grado de separación entre los aminoácidos depende directamente de las interacciones iónicas e hidrofóbicas que tienen lugar entre los grupos expuestos, grupos con carga, la matriz de la resina de intercambio, las cadenas laterales de los aminoácidos y el flujo de amortiguadores a través de la columna [25].

3.2.2 Orden de elución.

Comúnmente, primero salen los aminoácidos con características ácidas, seguidos de los neutros y finalmente los aminoácidos básicos, los cuales a veces requieren de aumentos en la fuerza iónica para vencer las fuerzas que los mantienen retenidos en la columna.

Por lo general, el orden es el siguiente:

- ✓ aspártico, glutámico, treonina y serina (ácidos e hidroxilados);
- ✓ prolina, cistina, glicina, alanina, valina, metionina, isoleucina, leucina y fenilalanina (alifáticos y aromáticos);
- ✓ lisina, histidina y arginina (básicos).

Si se analizan los datos de las tablas 3 y 4, y se observan las estructuras de la figura 1, se puede explicar el porqué de este comportamiento:

- ✓ Los aminoácidos ácidos son retenidos con muy poca fuerza en la resina debido al relativamente bajo valor de pK_a de sus cadenas laterales (sus grupos carboxilo estarán desprotonados y se repelerán con la carga negativa de la resina);
- ✓ Los valores más altos de pK_a corresponden a los aminoácidos básicos, siendo éstos retenidos con mucho mayor fuerza en la resina, pues al pH con el que es lavada la columna aun permanece protonado el grupo amino de sus cadenas laterales. Con estos aminoácidos el orden de salida es función del pK_a : del más bajo al más alto.

En el caso de alifáticos y aromáticos, el orden de salida es ligeramente influenciado por el punto isoeléctrico, pero tiene más peso el tamaño y polaridad de la cadena:

- ✓ Eluyen primero los aminoácidos de cadena corta;
- ✓ Para tamaños de cadena iguales, son eluidos primero las cadenas más ramificadas;
- ✓ Los grupos hidroxilados también salen primero;
- ✓ Finalmente salen los aromáticos y de éstos, primero el que está hidroxilado.

Bajo condiciones de análisis constantes, cada aminoácido será retenido el mismo tiempo en la columna en cada análisis que se realice [25].

3.2.3 Detección y cuantificación de los aminoácidos eluidos.

Una vez separados los aminoácidos, al salir de la columna, se hacen reaccionar con ninhidrina a temperatura elevada para formar un cromóforo que pueda ser detectado colorimétricamente (derivatización post-columna), pues la mayoría de los aminoácidos no cuentan con uno.

Dos moléculas de ninhidrina reaccionan con una molécula de un aminoácido primario, que se descarboxila y desamina, para formar un compuesto púrpura intenso con un máximo de absorción en 570 nm (todos los aminoácidos, con excepción de prolina, forman el mismo aducto); las aminas secundarias (prolina y su derivado hidroxilado) forman un cromóforo amarillo, con un máximo de absorción en 440 nm.

Aun cuando es una reacción muy sensible, la intensidad del color no siempre es reproducible, ya que la presencia de oxígeno, luz, variaciones en la preparación de la solución y cambios en el pH y la temperatura, provocan variaciones en la intensidad del color.

La intensidad del color es directamente proporcional al contenido del aminoácido en un volumen dado. El color es detectado en un espectrofotómetro o en un colorímetro, la señal que se produce en función del tiempo, es graficada en papel en movimiento, lo cual genera picos.

Bajo las mismas condiciones, cada pico será generado a un tiempo característico a partir del momento en que son introducidos en la columna, lo que permite su identificación; el área bajo cada pico es directamente proporcional a la concentración del aminoácido que dio origen al pico [14-15,25].

3.3 Otros medios para identificar y cuantificar aminoácidos

3.3.1 Cromatografía en papel.

Aun cuando en la actualidad es fácilmente sustituida por metodologías más sofisticadas, la cromatografía en papel encuentra aplicación en el análisis de aminoácidos, principalmente en la identificación. Los solventes más utilizados son mezclas de agua, alcoholes y ácidos o bases. El componente más polar del solvente se une al papel y forma la fase estacionaria, en tanto que los solventes menos polares constituyen la fase móvil. Una variación de mayor interés es la cromatografía bidimensional en papel, en donde la muestra se aplica en un vértice de una hoja cuadrada, se corre la cromatografía con una mezcla de solventes, después se retira la hoja, se seca, se gira 90° y se coloca en una segunda mezcla de solventes para un nuevo corrimiento. Los aminoácidos son revelados con ninhidrina y se identifican por medio del R_f (movilidad relativa al solvente), el cual es constante bajo las mismas condiciones de análisis [3].

3.3.2 Electroforesis.

La electroforesis de alto voltaje es una de las técnicas con mayor utilidad en el área de la bioquímica. Se basa en la separación de los aminoácidos, cuya carga neta depende del pH, en un campo eléctrico de corriente directa. En el análisis de aminoácidos se usan hojas de papel o capas finas de celulosa en polvo como soportes inertes. Las separaciones se llevan a cabo en un campo de 2000 a 5000 V durante 0.5-2 horas y dependen de la carga neta del anfólio así como de su peso molecular. Para revelar e identificar en el electroferograma se utiliza ninhidrina [3].

3.3.3 Cuantificación de tirosina por espectrofotometría de UV.

Existen intentos por cuantificar de un modo más exacto y selectivo los aminoácidos susceptibles de degradación durante la reacción de hidrólisis; en el caso de tirosina, se toma ventaja de la relativamente alta absorbancia en la región UV de estos restos en proteínas de alimentos, lo cual permite evitar el proceso de hidrólisis y, bajo ciertas condiciones del espectrofotómetro de UV (cuarta derivada de los espectros obtenidos por diferenciación electrónica a una velocidad de barrido de 480 nm/min), evitar la interferencia de los otros aminoácidos que generan respuesta en esta zona del espectro [26].

3.3.4 Cuantificación de aminoácidos, como hidantoinas, por HPLC de fase reversa.

Otra adaptación es la formación de hidantoinas de los aminoácidos, haciéndolos reaccionar con cianato de potasio (KCNO). Estos derivados pueden ser separados en cromatografía de líquidos de fase reversa. En la actualidad, esta metodología es útil en la secuenciación de proteínas y péptidos, pues permite la identificación del resto amino terminal de una cadena; esto permitiría especular acerca de su posible traslado al análisis de aminoácidos en alimentos, pues el proceso es muy parecido a la secuenciación con ayuda del reactivo de Edman, PITC, el cual, después fue utilizado con éxito en la cuantificación de aminoácidos en matrices tan complejas como los alimentos [27].

3.3.5 Cromatografía de gases.

La cromatografía de gases es la mayor alternativa para el análisis de aminoácidos después de HPLC; la desventaja principal es la formación de un derivado volátil de los aminoácidos (alquilación), siendo el punto con mayor probabilidad de error, pues la derivatización difiere de aminoácido en aminoácido y es poco reproducible [25].

3.3.6 Cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC).

A pesar de que se ha conseguido adaptar con éxito el fundamento propuesto por Moore y Stein en la cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC, por sus siglas en inglés), por lo general no ha sido muy común su uso.

Uno de los principales inconvenientes es el costo de las columnas de intercambio iónico para HPLC.

La cuantificación por HPLC de fase reversa ha sido una de las más importantes adaptaciones al análisis de aminoácidos del material proteínico en muestras de naturaleza diversa [25].

4. ANÁLISIS DE AMINOÁCIDOS POR HPLC DE FASE REVERSA

La cromatografía de fase reversa utiliza las propiedades de solubilidad de la muestra, de manera muy similar a los mecanismos de extracción por solvente: la partición de una muestra entre un solvente hidrofílico y uno hidrofóbico. El grado de partición depende directamente del grado de solubilidad de la muestra en los distintos solventes.

La única manera de separar aminoácidos empleando columnas de partición, en cromatografía de líquidos de fase reversa, es formando un derivado que reduzca la polaridad de estas especies.

Aun cuando se forman derivados, ciertos grupos ($-\text{COO}^-$ y $-\text{NH}_3^+$, principalmente) pueden conservarse ionizados, lo cual no permitiría que fueran retenidos de modo adecuado en la fase estacionaria, modificándose el grado de partición entre las dos fases. El uso de soluciones de pH amortiguado, permite controlar el grado de ionización y, por lo tanto, manipular eficientemente el grado de partición que rige la separación.

Las fases estacionarias más populares en el análisis de aminoácidos son C_{18} : cadenas de 18 átomos de carbono ligados a la sílice (octadecilsilano), en tanto que la fase móvil tiene mayor diversidad en sus características, pues se emplean solventes orgánicos (tetrahidrofurano, metanol o acetonitrilo) mezclados con soluciones acuosas de pH amortiguado [25,28-29].

4.1 Derivatización

En algunos casos es conveniente transformar los componentes de una muestra en otros compuestos, antes o después de proceder a su separación cromatográfica.

Este tratamiento puede ser necesario para:

- 1) Reducir la polaridad de las especies y de este modo utilizar columnas de reparto y no de intercambio iónico.
- 2) Aumentar la respuesta del detector para todos los componentes de la muestra y
- 3) Aumentar selectivamente la respuesta del detector para determinados componentes de la muestra.

Debido a la polaridad de los grupos carboxilo, amino y los grupos funcionales de algunas de las cadenas laterales de los aminoácidos, y a la ausencia de un cromóforo que permita su detección espectrofotométrica en la mayoría de ellos (solo tirosina, triptofano y fenilalanina cuentan con uno), es estrictamente necesario formar un derivado antes de llevar a cabo la separación en columnas de sílice ligado con grupos alquilo.

La formación de derivados se divide principalmente en post y pre columna, después de haberles separado y previo a su separación en una columna cromatográfica, respectivamente. La primera, como ya se mencionó, se utiliza en la detección de los aminoácidos separados en una columna de intercambio iónico.

Generalmente, los aminoácidos se hacen reaccionar con ninhidrina para su detección colorimétrica (derivatización post columna), o con ortoftalaldehído (OPA) para su detección en la región UV del espectro o por fluorescencia (derivatización pre o post columna).

La formación de derivados pre columna, además de permitir la separación de los aminoácidos en columnas no polares, facilita su detección (en la región UV del espectro o por medio de fluorescencia) y permite hacer selectivo el análisis, reaccionando primordialmente aminoácidos y no otros compuestos que podrían interferir, sobre todo en matrices complejas como los alimentos.

La sensibilidad aumenta en el análisis con la derivatización pre columna, pues el analito no se diluye a la salida del sistema, a diferencia de lo que ocurre en el análisis con derivatización post columna [30].

4.2 Agentes derivatizantes

4.2.1 Ortoftalaldehído (OPA).

El ortoftalaldehído (OPA) fue introducido en 1970 y es uno de los reactivos más comunes en el análisis de aminoácidos por HPLC de fase reversa. Derivatiza aminas primarias y suele emplearse en procesos pre o post columna de manera indistinta.

A diferencia de la ninhidrina, los aminoácidos que reaccionaron con OPA, forman aductos diferentes, lo que permite sean separados en cromatografía de fase reversa.

La reacción ocurre en presencia de un tiol, generalmente 2-mercaptoetanol o etanotiol, lo cual permite la formación de derivados altamente fluorescentes.

Los derivados de los aminoácidos con OPA pueden ser detectados a 330 nm en UV; para aumentar la sensibilidad del análisis, se emplean detectores de fluorescencia a longitudes de onda de emisión mayores a 430 nm.

No existe la necesidad de remover el exceso de reactivo puesto que no interfiere en la separación o en la detección; aun así, se requieren de sistemas de derivatización automatizados para obtener reproducibilidad en la reacción, ya que los derivados de los aminoácidos son relativamente inestables. Otras desventajas son la baja respuesta de cistina y lisina y la falta de reacción con aminas secundarias [30].

4.2.2 Fenilisotiocianato (PITC).

El fenilisotiocianato, PITC, comúnmente conocido como reactivo de Edman, ha sido empleado en la secuenciación rutinaria de péptidos y proteínas.

En 1984, Henrikson, Meredith, Cohen, Tarvin y Bidlingmeyer, demostraron su utilidad como agente derivatizante en el análisis de hidrolizados de aminoácidos por cromatografía de líquidos de fase reversa.

A diferencia de la reacción de los aminoácidos con ninhidrina u OPA, el PITC reacciona con aminas primarias y secundarias, formándose el mismo cromóforo para todos los aminoácidos. Además de ser bastante selectivo, con ésta reacción no se forman derivados disustituidos con tirosina o histidina, únicamente lisina y cistina requieren de dos moléculas de PITC para formar el derivado.

Dada la alta volatilidad del PITC, se requieren de grandes excesos para garantizar la completa derivatización, aún así, sólo una pequeña proporción de los reactivos permanece en el sistema y pueden ser fácilmente separables de los derivados de interés.

La sensibilidad de este método no es tan alta como con la formación de derivados fluorescentes, pero se pueden detectar picomoles de algunos de los derivados.

El desarrollo tecnológico de este sistema de derivatización, permite el uso de presión reducida, nitrógeno y vacío para eliminar el exceso de reactivos y sub productos y evitar, en lo posible, la degradación por oxidación, de los aminoácidos durante la preparación de los derivados.

Una de las principales desventajas es que se requiere de una alta manipulación durante la preparación de los derivados (eliminación del exceso de HCl de la reacción de hidrólisis, evaporación a sequedad, redisolución, secado, derivatización, eliminación de exceso de PITC y redisolución), lo cual ha generado sistemas semi automatizados que disminuyen en gran medida la manipulación.

Algunos autores han encontrado que la reproducibilidad no es muy buena para algunos aminoácidos, en otros, el intervalo de linealidad es muy reducido y que la vida útil de las columnas se ve disminuida por la presencia de PITC que no fue eliminado por completo durante el proceso de derivatización.

Aun así, es uno de los medios más utilizados en el análisis de aminoácidos por cromatografía de líquidos en fase reversa: fórmulas para lactantes; análisis de tejidos, fluidos biológicos o alimentos; determinación de lisina disponible en productos alimenticios; identificación y cuantificación de los productos de ciertas enzimas de importancia en alimentos como las transglutaminasas; etc. [22,30,32].

4.2.3 Otros agentes derivatizantes.

Algunos otros reactivos se han adoptado para utilizarlos como agentes derivatizantes pre columna; el 9-fluorenilmetil cloroformiato fue presentado como agente protector del grupo amino en reacciones de síntesis de péptidos, Moye y Boning demostraron que era posible formar derivados fluorescentes susceptibles de ser separados por cromatografía de líquidos de fase reversa, la desventaja principal está en la eliminación de la interferencia que provoca el reactivo, pues éste es tan fluorescente como los derivados de los aminoácidos bajo las mismas condiciones.

Tanto el cloruro de dansilo como el cloruro de dabsilo han sido bien caracterizados como agentes derivatizantes, pues forman derivados fluorescentes de las aminas primarias y secundarias, las principales desventajas por las que su uso no ha sido muy popular son deficiencias en reacción de derivatización, formación de picos secundarios para el mismo aminoácido, pobre estabilidad de los derivados, alta sensibilidad a la luz y solventes, respuesta distinta en un mismo detector con cantidades equivalentes de un derivado y contaminación por formación de derivados hidroxilados y aminados de los reactivos de derivatización durante la formación de los derivados de los aminoácidos.

Existen muchos otros reactivos que pueden llegar a ser utilizados como agentes derivatizantes, su uso, en la mayoría de los casos, no ha sido completamente desarrollado en la cuantificación de aminoácidos en alimentos.

Algunos de ellos son:

- ✓ ácido 2,4,6 trinitrobenzen sulfónico,
- ✓ 1-fluoro-2,4-dinitrobenzeno,
- ✓ N-succinimidil-p-nitrofenilacetato,
- ✓ 4-nitrofenilisotiocianato,
- ✓ 1-naftilisocianato,
- ✓ fluorescamina, etc.

Los cuales permiten la formación de aminoácidos derivatizados, fluorescentes o con un cromóforo para la región UV del espectro [30].

4.3 AQC: 6-aminoquinolil-N-hidroxisuccinimidil carbamato.

En 1992, Steven Cohen y Dennis Michaud, lograron sintetizar un reactivo derivatizante nuevo, éste reacciona rápidamente con las aminas primarias y secundarias en un solo paso en el proceso de derivatización, lo cual implica, necesariamente, una menor manipulación de la muestra durante su preparación.

El 6-aminoquinolil-N-hidroxisuccinimidil carbamato permite la formación de derivados fluorescentes de los aminoácidos (los derivados también generan respuesta en la región UV del espectro).

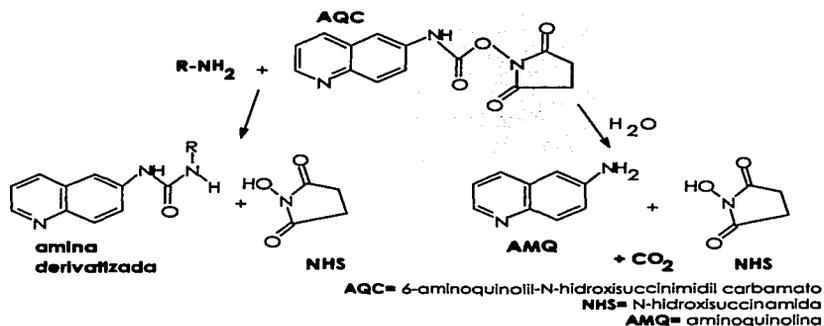


Figura 3. Reacción de derivatización entre aminas primarias o secundarias y AQC [33].

Se requieren excesos de 3 moles a 1 para generar los máximos rendimientos de la reacción; la cual, es poco susceptible a la presencia de sales o detergentes, el máximo rendimiento se alcanza con valores de pH de entre 8.2 y 10.

El exceso de AQC, en presencia de agua se hidroliza rápidamente (aproximadamente 15 s) en AMQ, NHS y CO₂, mientras que la reacción de AQC con aminas primarias o secundarias, da origen a la amina derivatizada correspondiente y NHS como subproducto (figura 3).

Cuando el reactivo de derivatización es insuficiente, la reproducibilidad de los aminoácidos aspártico, glutámico y lisina, es la más afectada. Gráficamente, se producen uno o dos picos, eluidos cerca de glicina e histidina, que podrían corresponder a los dos posibles monoderivados de lisina (aminoácido que reacciona con dos moléculas de AQC, una por grupo amino).

Con un hidrolizado de aminoácidos recién derivatizado, se produce un pico más, éste eluye después de fenilalanina y podría tratarse de un derivado poco estable de tirosina (grupos amino y fenol derivatizados), el cual se degrada, en aproximadamente 4-6 horas, al derivado más estable: tirosina monoderivatizada. La reacción de conversión se acelera calentando a 55° C durante 10 minutos.

Los factores de respuesta (constante de proporcionalidad que relaciona la concentración con la respuesta) obtenidos por fluorescencia son muy distintos entre sí, en parte, por el efecto de bloqueo (quenching) o reducción de la fluorescencia que el agua provoca en los derivados. Los más afectados son los derivados polares, pues al ser eluidos cuando la composición de la fase es mayoritariamente acuosa, generan una respuesta menor que los derivados eluidos cuando la fase acuosa es mayoritariamente orgánica. El caso más preocupante es de cistina, pues, en concentraciones iguales, genera solo el 5 % de la respuesta que genera la fenilalanina (derivado con el mayor factor de respuesta), seguramente por efecto de bloqueo interno de la molécula derivatizada.

En general, los factores de respuesta que se obtienen cuando los derivados son detectados en la región UV son similares entre sí, solo difieren cistina y lisina, pues son derivatizados en dos sitios.

En un detector de fluorescencia (excitación 250 nm, emisión 395 nm), el máximo de emisión de la amina derivatizada no corresponde con el máximo de emisión de AMQ, difieren en alrededor de 60-100 nm. Las condiciones cromatográficas permiten lograr una resolución adecuada entre AMQ y el primer aminoácido derivatizado en ser eluido: ácido Aspártico (figura 4), lo que garantiza que la cuantificación no se verá influenciada por la presencia de este subproducto. Los otros dos subproductos de la derivatización, no registran respuesta en el detector a las condiciones de análisis.

Los aminoácidos derivatizados también pueden ser detectados en la región UV del espectro, a una longitud de onda de 254 nm; en estas condiciones, el sub producto de la reacción, AMQ, genera una respuesta muy intensa, por lo que, para evitar interferencias, debe haber resolución suficiente entre el pico de éste y el del ácido aspártico (figura 5) [33-34].

Aun cuando se trata de un reactivo relativamente nuevo, se han desarrollado un número importante de aplicaciones en el análisis de aminoácidos en muy distintas matrices: péptidos sintéticos, glicoproteínas, alimentos, granos, amino azúcares, aminoácidos libres en plasma, identificación y cuantificación de aminoácidos no proteínicos que son neurotóxicos, etc. [35-40].

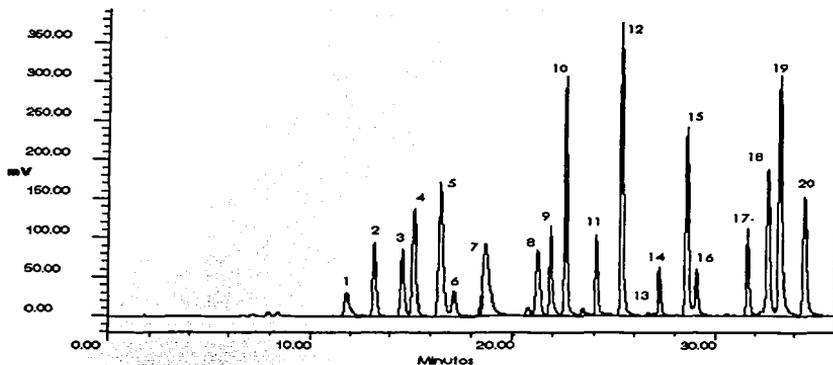


Figura 4. Cromatograma de la separación de un hidrolizado de proteína de cacahuate Derivatización con AQC: 1 AMQ, 2 Asp, 3 Ser, 4 Glu, 5 Gly, 6 His, 7 NH₃, 8 Arg, 9 Thr, 10 Ala, 11 Pro, 12 ácido α aminobutírico (estándar interno), 13 Cys, 14 Tyr, 15 Val, 16 Met, 17 Lys, 18 Ile, 19 Leu, 20 Phe. Columna Nova Pak C₁₈ 3.9 x 150 mm. Detector de fluorescencia excitación 250 nm, emisión 395 nm [41]

Los derivados de AQC, han probado ser más estables que los derivados de PITC, además, el exceso del reactivo no genera impurezas que interfieren en el análisis o en la vida útil de la columna, se requiere de mucho menos tiempo en la preparación de los derivados con AQC y, por lo tanto, de menor manipulación.

Además, también se reporta que la precisión del sistema se ve menos influenciada por la composición de los solventes cuando se forman derivados con AQC, lo cual es una ventaja muy importante [34].

El análisis de aminoácidos puede llevarse a cabo en 35 minutos (contra las casi 4 horas del análisis por cromatografía de intercambio iónico). El método presenta intervalos muy amplios de linealidad para todos los aminoácidos y límites de detección desde 40 fmol para fenilalanina, a 800 fmol para cistina [33].

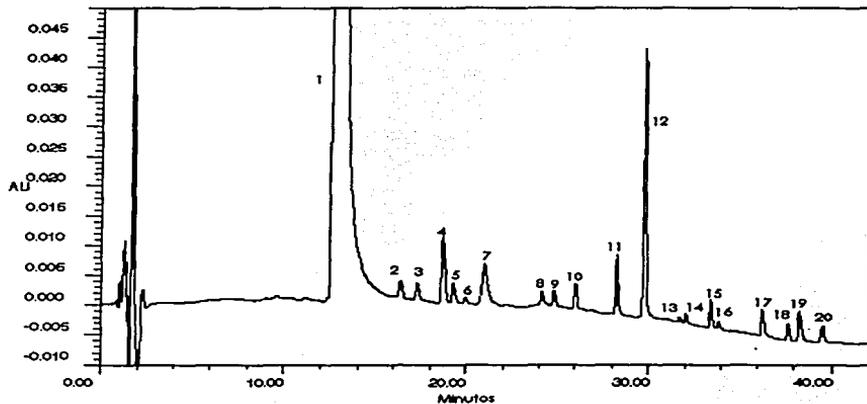


Figura 5. Cromatograma de la separación de un hidrolizado de proteína de cebada derivatización con AQC. 1 AMQ, 2 Asp, 3 Ser, 4 Glu, 5 Gly, 6 His, 7 NH₃, 8 Arg, 9 Thr, 10 Ala, 11 Pro, 12 ácido α aminobutírico (estándar Interno), 13 Cys, 14 Tyr, 15 Val, 16 Met, 17 Lys, 18 Ile, 19 Leu, 20 Phe.

Columna Nova Pak C₁₈ 3.9 x 150 mm. Detector de UV, longitud de onda 254 nm [42]

5. CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC)

5.1 Fundamentos

La IUPAC define la cromatografía como un "método usado principalmente para la separación de los componentes de una muestra, en la cual estos se distribuyen en dos fases, una de las cuales es estacionaria, mientras la otra se mueve. La fase estacionaria puede ser un sólido, un líquido retenido sobre un sólido o un gel y puede estar extendida como una capa o distribuida como una película. La fase móvil puede ser líquida o gaseosa". La separación se efectúa mediante una gran variedad de técnicas y las diferencias moleculares en las que se fundamenta son muy diversas: carga, peso molecular, polaridad del enlace, potencial redox, pKa y estructura de los isómeros o quiralidad [43-44].

En general, la separación de los componentes de una mezcla ocurre por migración diferencial durante su paso a través de una columna empacada con la fase estacionaria, la cual forma distintas interacciones con las moléculas de la mezcla, en función de sus propiedades físico-químicas. La fuerza de las interacciones se debe a los campos eléctricos, inducidos o permanentes, o a fuerzas de Van der Waals.

La separación cromatográfica se considera como el resultado de un número elevado de extracciones individuales, una tras otra, las cuales pueden describirse con constantes de partición (K_D):

$$K_D = \frac{[\text{analito}]_{\text{fase estacionaria}}}{[\text{analito}]_{\text{fase móvil}}}$$

En la cromatografía de fase reversa, los aminoácidos derivatizados se "disuelven" en la columna de sílice enlazado con cadenas de 18 átomos de carbono, provocando su retención; la mayor o menor proporción de acetonitrilo en la fase móvil permite "extraer" los solutos, permitiendo que el sistema semeje un proceso cromatográfico de partición o reparto. Los solutos se reparten en el recubrimiento superficial, el cual semeja una capa sumamente delgada de disolvente orgánico, con lo que el proceso de una extracción simulada líquido-líquido puede ser descrito por una constante de partición, K_D .

La velocidad promedio de migración, de una fase a otra, de una molécula depende del tiempo promedio que se asocia a la fase estacionaria en comparación con el tiempo que se desplaza con la fase móvil.

Cualquier mecanismo que modifique el balance de las interacciones soluto - fase estacionaria (pH, fuerza iónica, polaridad, temperatura) es utilizado con la finalidad de retener selectivamente los componentes de la mezcla en la columna, provocando la migración selectiva de los componentes a la fase móvil, haciendo que sean eluidos por ésta.

En la práctica se requiere de un sistema de detección capaz de monitorear los cambios que ocurren en la salida del sistema, evaluando alguna de las propiedades físico-químicas de los analitos (absorbancia en la región UV o fluorescencia), en el caso del análisis de aminoácidos derivatizados con AQC).

Un cromatograma es la expresión gráfica del desarrollo de la separación, se grafica la respuesta generada en el detector en función del tiempo transcurrido a partir de la introducción de la muestra en el sistema, dando origen a picos que semejan una curva de distribución normal o Gaussiana (figuras 4-6) [28,45-50].

La distribución de todas las concentraciones de un soluto al equilibrio es constante, por lo que todas las concentraciones de la banda cromatográfica saldrán de la columna con la misma velocidad, dando origen a una curva de elución simétrica. Además, la columna actúa como un instrumento de dilución, por lo que la muestra siempre será eluida en un volumen mayor al volumen original, por lo tanto, la dispersión de la banda es inevitable y la elución se aproxima a una curva Gaussiana [28,45].

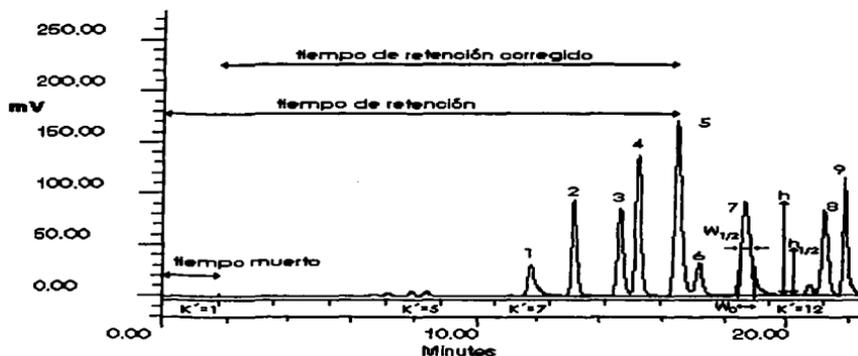


Figura 6. Parámetros cromatográficos

Fragmento de un cromatograma de la separación de un hidrolizado de proteína de cacahuete. Derivatización con AQC. 1 AMQ, 2 Asp, 3 Ser, 4 Glu, 5 Gly, 6 His, 7 NH₂, 8 Arg, 9 Thr, Columna Nova Pak C₁₈ 3,9 x 150 mm. Detector de fluorescencia excitación 250 nm, emisión 395 nm [41]

5.2 Parámetros cromatográficos [28,45-46]

En el campo de la química, el término parámetro se emplea para referirse a una cantidad que toma diferentes valores y caracteriza un proceso. Los parámetros cromatográficos permiten tabular y comunicar los datos con mayor facilidad.

5.2.1 Tiempo y Volumen de retención.

El tiempo o volumen de retención permiten identificar a un componente dado, pues son característicos bajo condiciones de trabajo constantes. El grado de retención de un compuesto particular en una mezcla es expresado, generalmente, en términos de tiempo (t_r) o volumen de retención (V_r).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

El tiempo muerto (t_0) es el tiempo requerido para eluir un soluto que no se retiene en la fase estacionaria, el volumen muerto (v_0) es el volumen mínimo de fase móvil que transporta a un analito dado y corresponde al volumen que ocupa la fase móvil en los resquicios de las partículas de la fase estacionaria en la columna.

El tiempo de retención corregido (t_r') es el tiempo que dura la interacción fase estacionaria-analito, se calcula restando el tiempo muerto del tiempo de retención. El volumen de retención corregido (v_r') es el volumen de la fase móvil necesario para lograr eluir un compuesto retenido en la columna. Se obtiene restando el volumen muerto del volumen de retención (figura 6).

5.2.2 Ancho de pico.

El ancho del pico a la base (W_b), ayuda a calcular la eficiencia del sistema y es la porción de la línea base intersecada por las tangentes al pico. $W_{1/2}$ es el ancho del pico a la mitad de la altura (h); siendo ésta, una medida más reproducible y adecuada para evaluar manualmente la eficiencia del sistema, pues permite describir picos cuya línea base no esté claramente delimitada o no semejen una curva Gaussiana. Un sistema eficiente produce picos delgados (figura 6).

5.2.3 Platos teóricos.

El número de platos teóricos (N) representa el poder de separación de una columna, una columna eficiente tiene un número elevado de platos teóricos, pues cada plato teórico representa un equilibrio teórico de distribución del soluto entre las fases. El valor de N es una medida de la eficiencia.

5.2.4 Altura equivalente de un plato teórico.

La altura equivalente de un plato teórico (H) es el segmento de una columna a la que corresponde un plato teórico. Es la medida inversa de la eficiencia; entre menor sea la altura equivalente de un plato teórico, el sistema es más eficiente, ya que, teóricamente, el sistema requiere de menor cantidad de fase estacionaria para obtener un equilibrio de separación, dando la posibilidad de que a lo largo de la columna ocurran muchos equilibrios más.

5.2.5 Factor de capacidad.

El factor de capacidad (K') se define como la razón de la cantidad de soluto en la fase móvil al equilibrio. Es igual a la relación del tiempo que el soluto permanece en la fase estacionaria respecto al tiempo que permanece en la fase móvil.

Se recomiendan valores mayores a 2, para que el tiempo muerto no interfiera con los picos, y menores a 15, pues a mayor retención, se produce un mayor ensanchamiento de los picos debido a la inevitable dilución (figura 6).

5.2.6 Selectividad.

La selectividad (α) mide las diferencias relativas entre la interacción de dos solutos con la fase estacionaria. Un valor mayor de α significa una columna más selectiva e implica una mejor separación entre solutos.

5.2.7 Resolución.

La resolución (R_s) es la medida cuantitativa del grado de separación entre dos solutos. Es una expresión que relaciona el ancho de dos picos eluidos, con la distancia entre sus máximos. A mayor valor de resolución, mayor grado de separación entre picos. La resolución es función de la selectividad (α), eficiencia (N) y retención (K') de un sistema. La resolución se ve afectada por: eficiencia de la columna, tamaño de partícula, velocidad de flujo, presión en la columna, longitud de la columna, interacciones soluto-solvente y solvente-solvente. A medida que aumenta la resolución, el contenido relativo de impurezas disminuye.

5.3 Elementos básicos de cromatografía

Los elementos básicos de un sistema de análisis cromatográfico son: fase móvil, sistema de bombeo, inyector, columna, sistema de detección y sistema de registro y análisis de datos. El resultado del análisis depende de las interacciones que se forman en el sistema instrumento-operario-método [28].

5.3.1 Fase móvil.

La cromatografía de líquidos en fase reversa requiere del uso de mezclas de solventes orgánicos (acetonitrilo al 60 %) y acuosos (buffer acetato de sodio/ácido fosfórico, pH = 5.02) para lograr la elución de los aminoácidos derivatizados retenidos en la columna no polar. El control del pH permite lograr la separación de las moléculas con átomos de hidrógeno ionizables (ácidos aspártico, ácido glutámico, histidina, arginina y los grupos carboxilo del resto de los aminoácidos), pues *mantiene bajo control* el grado de disociación [47].

La proporción de las dos fases cambia en función del tiempo: mayor proporción de agua con pH regulado al inicio, para lograr la elución de los aminoácidos más polares, y *más fuerte* (mayor proporción de modificador orgánico) hacia el final de cada corrida, lo que permite la elución de los derivados menos polares (isoleucina, leucina, norleucina y fenilalanina).

La preparación de la fase móvil garantiza reproducibilidad en los resultados y tiempos de retención. La diferencia en la preparación de una mezcla, produce modificaciones en la selectividad del sistema, reproducibilidad de los tiempos de retención y respuesta del analito en el detector (por ejemplo, el agua *bloquea* la fluorescencia de los aminoácidos derivatizados con AQC, quenching). Aun así, siempre que la preparación de la fase móvil se lleve a cabo del mismo modo y bajo condiciones controladas, se obtendrán resultados reproducibles.

Además de la preparación de las fases móviles, se debe destacar la importancia de la filtración, para la eliminación de partículas que potencialmente podrían dañar las bombas o tapan la columna; y la degasificación, que permite evitar la formación de burbujas en las bombas o en los detectores, la pérdida de respuesta en ciertos detectores por efecto de *bloqueo* y la oxidación de analitos por la presencia de oxígeno.

En general, se usan membranas elaboradas con polímeros insolubles a la fase que se filtra y de tamaño de poro que oscila entre los 0.22 y 0.45 μm en combinación con vacío con el objetivo de filtrar y degasificar las fases en un solo paso (figura 7). El vacío, a diferencia de otros medios de degasificación, provoca una disminución en la solubilidad de los gases al disminuir la presión [47].

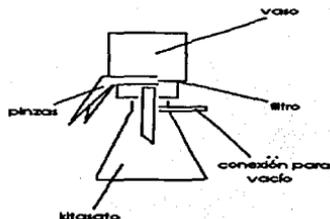


Figura 7. Sistema de filtración y degasificación de fase móvil

5.3.2 Sistema de bombeo.

Las bombas deben ser aptas para proporcionar el flujo adecuado para el método (1 mL/min), entregar con exactitud el flujo establecido (volumen entregado por unidad de tiempo) y mantener en un mínimo grado la inestabilidad de la línea base por diferencias en la entrega de solvente o sincronía de los pistones [47]. El mal funcionamiento de los sistemas de bombeo puede ocasionar baja precisión en la obtención de los tiempos de retención y áreas de cada pico, además de deficiencias en el grado de separación de los derivados de aminoácidos, sobre todo si se considera que se deben separar 20 analitos en un sistema de gradiente: entrega de distintas proporciones de las dos fases en función del tiempo.

5.3.3 Inyector.

Los inyectores son válvulas que orientan la fase móvil hacia la columna, pasando o no, según su posición, por un loop de 20 μ L (comúnmente). Es a través de este último por donde la muestra será introducida (inyectada) al sistema. Si el loop es manual, puede ser llenado total o parcialmente. En el primer caso, se requiere de al menos 5 veces el volumen nominal del loop, lo que permite obtener una precisión de hasta 0.05 %. Si se llena parcialmente, la precisión de la inyección está casi completamente influenciada por la precisión de la jeringa con la que se ha de introducir la muestra. Con ésta técnica se pueden lograr precisiones hasta del 0.3 % [47].

5.3.4 Fase estacionaria.

La cromatografía de fase normal basa su funcionamiento en las interacciones que se forman entre los grupos libres de la sílice y las moléculas, siendo necesario un solvente no polar para eluirlos. La cromatografía de fase reversa emplea una columna no polar para interactuar con los analitos, siendo empleada una fase móvil polar para lograr la elución. La tabla 5 muestra un resumen de las diferencias principales entre los tipos de cromatografía.

Tabla 5. Algunas de las principales diferencias entre la cromatografía de líquidos de fase normal y de fase reversa.

	Fase Normal	Fase Reversa
Polaridad de la columna	Alta a Media	Baja a Media
Polaridad del solvente	Baja a Media	Media a Alta
Orden de elución	de Menor a Mayor Polaridad	de Mayor a Menor Polaridad
Efecto del incremento en la polaridad del solvente	Reducción en t_r	Aumento de t_r

En el análisis de aminoácidos derivatizados con AQC, la cromatografía de fase reversa emplea $-C_{18}H_{37}$ como grupo funcional enlazado a la sílice, se le conoce como octadecil silano (ODS) o simplemente C_{18} .

La principal desventaja de los soportes de sílice está en su susceptibilidad al pH; por debajo de 2, se hidrolizan los grupos funcionales enlazados, en tanto que valores superiores a 8, la sílice se disuelve, perdiéndose la integridad de la columna.

El tipo de sílice del soporte, el diámetro de las partículas que forman el soporte, el tamaño de los poros en las partículas, la concentración del grupo funcional ligado a la sílice y la cantidad de grupos funcionales de la sílice sin enlazar, son los factores que se deben tener en cuenta para alcanzar reproducibilidad entre los análisis realizados entre distintos laboratorios o distintos operadores [28,47-50].

5.3.5 Sistemas de detección.

Los sistemas de detección deben contar con: amplio intervalo de respuesta lineal, evitar el ensanchamiento de banda extracolumnar, generar una respuesta para todos los solutos, ser altamente sensibles, evitar que la señal sea modificada por cambios en la temperatura, poseer una alta relación señal/ruido, evitar la degradación de la muestra y responder con alta velocidad a los cambios instantáneos.

Los detectores de absorbancia son los más usados en HPLC. Su funcionamiento consiste en medir la fracción de luz que atraviesa una solución con la muestra, a una determinada longitud de onda. La respuesta generada, absorbancia, es directamente proporcional a la cantidad de muestra que absorbe la luz incidente

La espectroscopia de fluorescencia es el fundamento de otro tipo de detector, mucho más selectivo y de alta sensibilidad. Se fundamenta en la capacidad de algunas moléculas para absorber energía radiante a una longitud de onda, lo cual excita un electrón. Éste, al volver a su estado basal, emite energía radiante a una longitud de onda mayor, fenómeno conocido como fluorescencia y que es directamente proporcional a la concentración [28,47,51].

El análisis de los derivados de los aminoácidos requiere, idealmente, de un sistema de detección por fluorescencia. El uso de un sistema de luz UV, además de volver menos selectivo y sensible el análisis, propicia deficiencias en la obtención de la línea base, pues se utiliza una sal que genera respuesta en la misma longitud de onda que los derivados [33].

5.4 Ensamblamiento de las bandas

Existen distintos factores que provocan el ensanchamiento de los picos, el cual no es deseable pues con picos más anchos, la resolución es menor, y, por lo tanto, la pureza de cada banda cromatográfica no es adecuada.

Los factores de ensanchamiento intra columna más estudiados son:

- ✓ Difusión de Eddy. Es función de la sinusoidad del "camino", las partículas se moverán más rápido por los caminos más amplios.

- ✓ Difusión longitudinal (difusión molecular). Resulta de la difusión de los solutos en dirección del flujo de la fase móvil.
- ✓ Transferencia de masa en la fase móvil. Se subdivide en dos términos: transferencia de masa a la fase móvil en movimiento y transferencia de masa a la fase móvil estancada. En la transferencia de masa a la fase móvil en movimiento, los solutos se moverán más rápido por el centro de la ruta que si están cerca de la superficie de las partículas. Mientras que en la transferencia de masa a la fase móvil estancada, los solutos tardarán más en salir si se encuentran en la fase móvil estancada pues deben abandonar el volumen estancado para entonces salir con el volumen en movimiento.
- ✓ Transferencia de masa de la fase estacionaria. Aquí, las moléculas que difunden más profundo en la fase estacionaria tardarán más en alcanzar la fase móvil, por lo que serán dejadas atrás por la mayoría de las moléculas.

Existe un valor de velocidad de flujo en el cual la altura equivalente de un plato teórico es mínima, dando como resultado picos delgados. Con flujos bajos, el ensanchamiento se debe principalmente a la difusión longitudinal, en tanto que a velocidades altas, el ensanchamiento es resultado de deficiencias en la transferencia de masa.

Existe otro tipo de ensanchamiento de bandas, se le conoce como ensanchamiento extra columna y generalmente está asociado a problemas con la tubería que permite la circulación de fluido en el sistema y con deficiencias en el sistema de detección [28,45-46].

5.5 Cuantificación en cromatografía

Para cuantificar un componente dado es necesario que la recuperación sea cercana al 100% (que sea eluida y detectada la totalidad del analito que ingresó en la columna), además, los componentes no deben sufrir modificaciones químicas durante el curso de la separación.

La cuantificación precisa se lleva a cabo con facilidad cuando la señal del detector se encuentra en una escala que es exactamente lineal con respecto a la concentración de cada componente. Cuando la señal de respuesta es lineal, la concentración de la especie es proporcional al área bajo la curva de la función respuesta = $f(\text{tiempo})$. El área es la integral de la curva graficada.

En la actualidad, los integradores y computadoras calculan numéricamente el área tras ubicar la línea base; si los picos no se resuelven en su totalidad, la ubicación automática de la línea base puede ser errónea. En el caso de un registrador, la velocidad con la que el papel se desplaza también influye en la precisión del análisis.

Para cuantificar los componentes identificados, se inyectan soluciones de concentración conocida, para después comparar el área del analito en la muestra contra el área del estándar (estándar externo). También es muy común y altamente recomendable, obtener curvas de calibración, es decir, modelos matemáticos que describen el comportamiento de la respuesta (área bajo la curva) que produce un analito dado a distintos niveles de concentración.

El método de cuantificación con ayuda de un estándar interno, permite determinar la concentración del analito en la muestra calculando la relación de las áreas analito a estándar interno. Un estándar interno es un analito que produce una respuesta de características similares y tiene propiedades físico químicas comunes con el analito en cuestión; el estándar interno no debe encontrarse en la muestra y no debe interferir en la respuesta que genera el analito. Este método permite compensar errores en la inyección y, a veces, deficiencias en la preparación de las muestras.

En ambos casos, se pueden obtener factores de respuesta y curvas de calibración. En el presente trabajo se utilizó norleucina (aminoácido sintético) como estándar interno [28].

6. VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS

6.1 Definición

Un método analítico se define como la secuencia de actividades que se deben cumplir para llevar a cabo el análisis de un componente específico (analito) en una muestra. La validación es proporcionar la información necesaria para comprobar que un método cumple con el objetivo para el que fue diseñado, es decir, es la evidencia documentada, de los estudios de laboratorio, de que un método satisface con seguridad los requisitos para su aplicación analítica, permitiendo la obtención de resultados confiables y cercanos al valor real.

La evidencia documentada de la validez de un método se expresa por medio de la evaluación de distintos parámetros: linealidad, exactitud, precisión, repetibilidad, reproducibilidad, límites de detección y cuantificación, especificidad, tolerancia, robustez y estabilidad, en función de las características del análisis. Cada parámetro debe cumplir con ciertos criterios de aceptación para considerar que la metodología es válida.

Los métodos que aparecen en la literatura oficial reconocida (Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos, métodos oficiales de análisis de la AOAC, etc.) se consideran válidos y solo deben cumplirse una etapa de adecuación, verificando que los resultados obtenidos cumplan con los criterios de aceptación [47,52-56].

6.2 Linealidad

La linealidad es la proporcionalidad que existe entre la concentración de un analito y la respuesta (directa u obtenida por medio de transformaciones matemáticas definidas) que genera. Se utiliza el modelo de la ecuación de la línea recta ($Y = mx + b$) para su evaluación. También se evalúa el intervalo dentro del cual se cumple dicha proporcionalidad.

Existe la posibilidad de que la proporcionalidad buscada no sea descrita por un modelo lineal. Pueden utilizarse otros modelos matemáticos que permitan obtener la proporcionalidad entre la respuesta generada y la concentración de un analito dado, siempre que sean cubiertos los requisitos específicos para el modelo encontrado.

La linealidad del sistema es la proporcionalidad del análisis de estándares de referencia en el sistema de cuantificación. Permite obtener curvas de calibración que relacionan la respuesta que genera el analito (Y) en una metodología dada, con la concentración de soluciones estándar del analito (x). Las curvas de calibración se preparan con al menos 5 niveles de concentración del estándar, cada nivel, al menos, por triplicado.

La ecuación que describe la tendencia se obtiene por el método de cuadrados mínimos, donde se obtienen coeficiente de determinación (r^2), pendiente (m) y ordenada al origen (b); además se estima el intervalo de confianza de la pendiente. El coeficiente de determinación debe ser mayor a 0,98 para considerar adecuado el modelo lineal; el intervalo de confianza de la pendiente no debe incluir el cero, pues esto implicaría que no existe proporcionalidad alguna entre la respuesta y la concentración. También se recomienda encontrar el intervalo de confianza para la ordenada al origen, si éste incluye el cero, se considera que es adecuado analizar muestras comparando su respuesta contra la respuesta generada por un estándar en un solo nivel de concentración, es decir, sin necesidad de una curva de calibración para cada análisis.

La linealidad del método es el comportamiento entre la concentración del compuesto de interés, en la muestra, y la respuesta obtenida, descrito mediante la ecuación de la línea recta. En este punto debe abarcar la metodología involucrada en la preparación de la muestra (extracción, purificación, formación de derivados, etc.). Permite asegurar que los resultados que se obtengan serán directamente proporcionales a la concentración del analito en la muestra, dentro de un intervalo dinámico de trabajo y después de haber preparado la muestra de modo conveniente para su análisis. Se utilizan al menos tres niveles de concentración.

Existen dos formas de evaluar la linealidad del método:

- ✓ Cuando se conoce la totalidad de los componentes de la matriz donde se encuentra el analito, se prepara un placebo y se adiciona, en tres niveles de concentración, el analito a cuantificar, el análisis se hace por triplicado.
- ✓ Cuando no se conocen los componentes de la matriz, se utiliza la muestra misma como matriz; sin adicionar y adicionando tres niveles más de concentración, cada uno por triplicado, el analito a cuantificar. En cada nivel, se mantiene constante la cantidad de muestra utilizada, con la finalidad de restar este resultado de las muestras adicionadas.

Cuando no es posible adicionar de manera directa el analito a la muestra, la adición se hace en alguna de las primeras etapas del método, para lograr asegurar que las etapas posteriores no dan lugar a resultados incorrectos.

Los niveles de adición se realizan considerando que los resultados obtenidos estarán dentro del intervalo de linealidad del sistema. Se utiliza como referencia la misma sustancia adicionada. La metodología de la cuantificación debe ser realizada por el mismo analista y bajo las mismas condiciones.

En ambos casos, se reporta la cantidad recuperada (Y) en función de la cantidad adicionada (x). También se utiliza el método de cuadrados mínimos para calcular la pendiente (m), ordenada al origen (b) y coeficiente de determinación (r^2). Se estiman también, los intervalos de confianza para la pendiente y la ordenada al origen, además del coeficiente de variación de la regresión. El coeficiente de determinación debe ser mayor a 0.98 para considerar que el modelo lineal es adecuado; el intervalo de confianza de la pendiente debe incluir el uno, mientras que el intervalo de confianza de la ordenada al origen debe incluir el cero. Si no ocurre así, es posible utilizar los modelos obtenidos para encontrar factores de ajuste que permitan llevar los valores encontrados en el análisis de muestras al valor real [52-54,56].

4.3 Exactitud

Se define como la concordancia entre un valor obtenido, empleando el método, y el valor de referencia. Se expresa como el porcentaje de recobro del análisis de muestras o placebos adicionados (cantidad cuantificada / cantidad adicionada x 100). El intervalo de confianza del promedio de recobro debe incluir el 100% o, el promedio aritmético, de al menos 6 determinaciones, de la recuperación debe estar incluido dentro de un intervalo dado en función del tipo de análisis que se realiza.

Si el método lo permite y se cuenta con justificación para ello, se pueden utilizar factores de corrección cuando no se alcance el 100 % de recobro utilizando el método que se está validando.

Cuando se hace la evaluación de la linealidad del método, puede determinarse simultáneamente la exactitud del método, pues en la evaluación de cada nivel de concentración adicionado, se determina la cantidad de muestra recuperada [52.54.56].

6.4 Precisión

Es el grado de concordancia entre ensayos individuales cuando el método se aplica repetidamente a múltiples alícuotas de una muestra o referencia homogéneos. Se expresa matemáticamente como la desviación estándar relativa (RSD) o coeficiente de variación (%C.V): desviación estándar muestral / media aritmética x 100.

Este punto incluye la precisión y adecuabilidad del sistema y la precisión del método.

La evaluación de adecuabilidad permite encontrar el error en el análisis debido únicamente al equipo. Se examina seis veces una sola muestra, empleando las mismas condiciones en el análisis.

La precisión del sistema se determina a partir del análisis de una solución a un solo nivel de concentración, por sextuplicado.

La precisión del método (o precisión intermedia) se obtiene del análisis por triplicado de una muestra homogénea o sustancia de referencia en dos días diferentes y por dos analistas diferentes [52.54.56].

6.5 Repetibilidad / Reproducibilidad

La repetibilidad es la precisión expresada como la concordancia entre las determinaciones independientes, aplicando el método desarrollado, realizadas bajo las mismas condiciones (muestra, analista, tiempo, aparato, condiciones, etc.).

La reproducibilidad también se refiere a precisión, pero expresada en términos de determinaciones independientes, realizadas en condiciones diferentes (analista, laboratorio, equipo, etc.), analizando una misma muestra. La desviación estándar relativa es la forma de evaluar la reproducibilidad y/o repetibilidad [52.54].

6.6 Sensibilidad

Cuanto mayor es la sensibilidad de un método, será más probable medir cambios más pequeños en la respuesta del sistema de detección. Los parámetros que la definen son: el límite de detección, que es la mínima cantidad del analito que se puede detectar pero no necesariamente cuantificar, y el límite de cuantificación, que es la mínima concentración del analito que se puede determinar con exactitud y precisión razonables.

Tanto el límite de detección, como el de cuantificación, pueden ser estimados a partir de la relación señal / ruido o de los parámetros de la curva de calibración [52,56,57].

6.7 Especificidad / Selectividad

La especificidad es la capacidad de un método analítico para obtener respuesta debida únicamente al analito de interés y no a otros componentes de la muestra, es decir, evaluar inequívocamente al analito en presencia de compuestos endógenos. La selectividad es la posibilidad del método de separar el analito de otros productos. La prueba más simple para la evaluación de especificidad es el análisis de un blanco de la matriz biológica. La evaluación de selectividad, en los métodos cromatográficos, requiere del análisis de pureza de cada uno de los picos, para asegurar que el método es capaz de separar un analito de otros productos [56].

6.8 Tolerancia / Robustez

La tolerancia es la reproducibilidad de los resultados analíticos de una misma muestra bajo diferentes condiciones normales de operación (temperatura, reactivos, diluciones, columna, equipo, etc.). La robustez es la capacidad del método de mantener su desempeño al presentarse variaciones deliberadas en los parámetros normales de operación (gradiente, composición de la fase móvil, sistema de detección, etc) [52,54].

6.9 Estabilidad

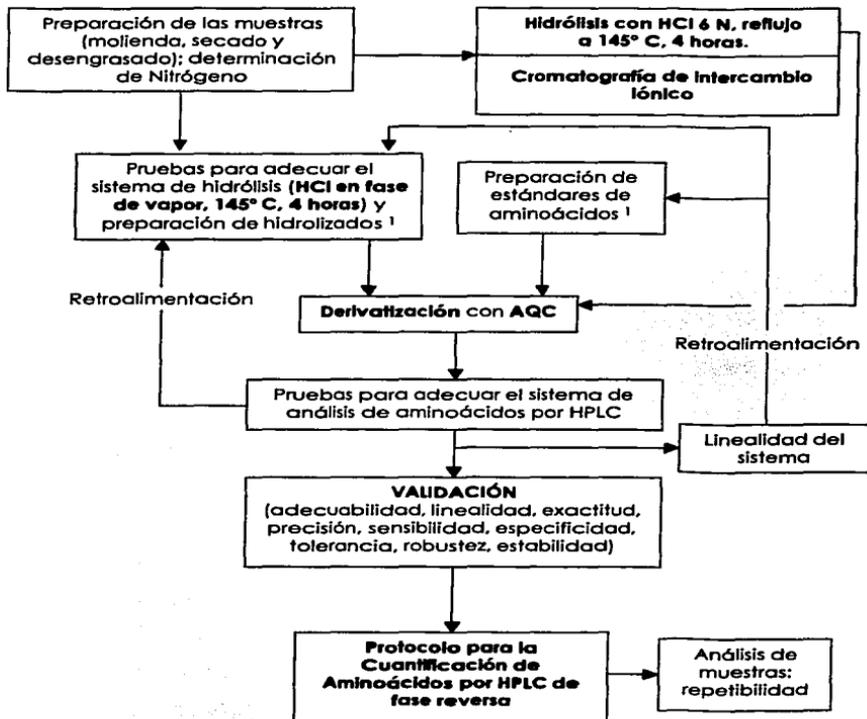
Es la propiedad de una muestra, preparada para su cuantificación, de conservar la integridad físico química y concentración de la sustancia de interés, después de mantenerle bajo condiciones específicas [54].

METODOLOGÍA

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

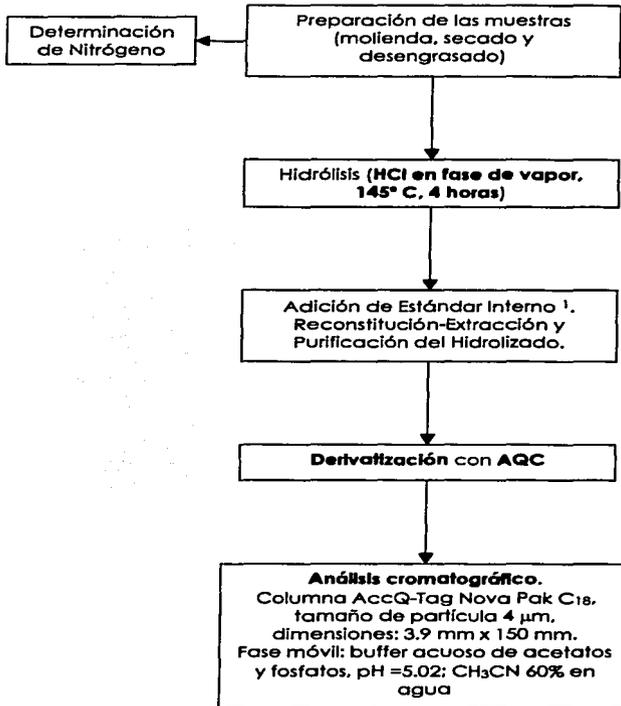
1. DIAGRAMA DE FLUJO

1.1 Validación de un método para cuantificar aminoácidos por HPLC de fase reversa



¹ se utilizó nortecucina 0.1 mM como estándar interno

1.2 Cuantificación de aminoácidos por HPLC de fase reversa



¹ se utilizó norleucina 0.1 mM como estándar interno

2. METODOLOGÍA

2.1 Preparación de las muestras

En la validación de la metodología para cuantificar aminoácidos por HPLC de fase reversa, se emplearon muestras de frijol Negro Jamapa (*Phaseolus vulgaris*), frijol Escumite (*Phaseolus acutifolius*) y maíz (*Zea mays*), las cuales se hidrolizaron con HCl 6 N en reflujo a 145° C por cuatro horas y se analizaron por cromatografía de intercambio iónico. La muestra de frijol Escumite, fue también analizada por HPLC de fase reversa, después de haber sido hidrolizada como ya se mencionó. El objetivo de éstos análisis fue obtener un referente para evaluar los resultados que se obtuvieron con la metodología propuesta.

Una vez obtenido y validado el protocolo de cuantificación de aminoácidos por HPLC, se realizó la cuantificación de aminoácidos en las siguientes muestras:

- ✓ Arroz pulido (*Oriza sativa*);
- ✓ 3 variedades de lupinos (*Lupinus exaltatus*, *Lupinus angustifolius* y *Lupinus aschenbomii*);
- ✓ Semilla, germinado, ejote y semilla del ejote de colorín (*Erythrina americana*), crudos y cocidos;
- ✓ Residuo de vid (*Vitis vinifera*) procedente de la elaboración de vino; y
- ✓ Semillas y germinados de trigo, sorgo, frijol Tepari (*Phaseolus acutifolius*), frijol Escumite (*Phaseolus acutifolius*) y frijol Comba (*Phaseolus lunatus*).

Cada una de las muestras se hizo pasar a través de una malla de 0.5 mm, en un molino Thomas Wiley Laboratory Hill modelo 4 o en un molino Weber-Bros & White modelo 553853.

En el caso de muestras con contenido elevado de humedad (mayor a 10 %), se eliminó el agua, previo a la etapa de molienda, por liofilización (LABCONCO freeze dryer modelo 4.5) o secado a 60-65° C (estufa de corriente forzada LAB-LINE modelo Imperial III). Todas las harinas de las muestras, cuando el contenido de humedad ya era menor a 10 %, fueron secadas (AOAC 14.004, 1984 [58]) en una Estufa de Vacío LAB-LINE modelo 3620, después de haber sido molidas.

Todas las harinas secas, fueron desengrasadas (AOAC 7.063, 1984 [58]) en un aparato de extracción Goldfish de LABCONCO, hasta obtener harinas con menos de 5% de grasa.

En todos los casos se determinó el contenido de nitrógeno total (AOAC 2.055, 1984 [58]).

Los materiales y métodos empleados durante el desarrollo de las siguientes metodologías se encuentran en el anexo III.

2.2 Determinación de Nitrógeno total (proteína cruda). AOAC 2.055, 1984 [58]. Con modificaciones

2.2.1 Fundamento.

El método de Kjeldahl cuantifica el nitrógeno total contenido en una muestra. La conversión a proteína se hace multiplicando por el factor 6.25, pues comúnmente, 100 g de proteína cuentan con 16 g de nitrógeno ($100/16=6.25$).

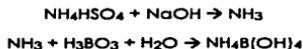
El método se fundamenta en la combustión, en húmedo, de la muestra por calentamiento con ácido sulfúrico concentrado en presencia de catalizadores metálicos para reducir el nitrógeno orgánico a amoníaco, el cual queda en solución al formarse sulfato de amonio.

El medio se alcaliniza y destila por arrastre de vapor, para desprender el amoníaco y después retenerlo en una solución de ácido bórico ($\text{HBO}_2 \cdot \text{H}_2\text{O} = \text{H}_3\text{BO}_3$), donde se forma borato de amonio ($\text{NH}_4\text{B}(\text{OH})_4$), el cual es valorado con HCl.

Reacción de digestión:



Destilación y Recepción en ácido bórico:



En todas las muestras se determinó porcentaje de nitrógeno total con la finalidad de expresar, posteriormente, el contenido de aminoácidos en 16 g de nitrógeno.

2.3 Cuantificación de aminoácidos en un autoanalizador, previa hidrólisis con HCl 6 N, en reflujo, 4 horas a 145° C. [14]

2.3.1 Fundamento.

La determinación cuantitativa de los aminoácidos de una proteína en un alimento, permite realizar una evaluación de la posible calidad de dicha proteína, en términos de cantidad y variedad de los aminoácidos indispensables que contiene. Los equipos automatizados, basados en cromatografía de intercambio iónico, permiten obtener la composición de una proteína, después de haber sido hidrolizada, con exactitud, rapidez y facilidad.

La hidrólisis ácida es el procedimiento generalizado para una gran variedad de proteínas; las cuales se tratan con 2.5 - 5000 veces su peso con HCl 6 N, manteniendo la solución bajo reflujo a 145° C por espacio de 4 horas.

Las resinas específicas (resina de poliestireno sulfonada, carga negativa) acopladas a bombas especiales que mantienen un flujo constante de las soluciones eluyentes, forman interacciones con los aminoácidos cargados positivamente, a manera de un intercambiador catiónico. Una vez separados, se hacen reaccionar con ninhidrina para lograr su detección con ayuda de aparatos de registro electrónico automático.

Con esta metodología se llevó a cabo el análisis de aminoácidos en frijol Escumite, frijol negro Jamapa y maíz, lo que permitió establecer la referencia de la metodología propuesta en este estudio.

2.4 Cuantificación de aminoácidos por HPLC de fase reversa, previa hidrólisis con HCl 6 N en fase de vapor, 4 horas a 145° C [23.33]

2.4.1 Fundamento.

Debido a la polaridad de los aminoácidos y a la ausencia de un cromóforo en la mayoría de ellos, la formación de un derivado antes del análisis por HPLC de fase reversa es necesaria (derivatización pre columna). Los derivados formados con 6-aminoquinolil-N-hidroxisuccinimidil carbamato son estables y permiten incrementar la precisión del análisis rutinario de aminoácidos por derivatización pre columna, dada la, relativamente, menor manipulación de la muestra durante la preparación de los derivados de los aminoácidos liberados después de haber hidrolizado la proteína. El derivado formado también permite mejorar la sensibilidad (análisis por HPLC de fase reversa con detección fluorescente o en UV) y selectividad (reacción selectiva del reactivo con aminas primarias y / o secundarias).

La cuantificación de aminoácidos en alimentos sigue a una etapa de hidrólisis, la cual comúnmente es la principal fuente de error, debido a la manipulación de las muestras.

La hidrólisis ácida en fase de vapor (HCl 6 N, 0.1% de fenol), es otra adaptación que permite incrementar el rendimiento del proceso de hidrólisis, pues las pérdidas por oxidación de aminoácidos se reducen gracias a la combinación de nitrógeno y vacío durante la preparación de las muestras a hidrolizar, el contacto de HCl gaseoso con la muestra y un control eficiente de la temperatura y tiempo de hidrólisis (145° C, 4 horas). Inicialmente diseñado para el análisis de péptidos y proteínas puros, se adaptó para su uso en la hidrólisis de proteínas en cereales y leguminosas.

En la cuantificación de los aminoácidos de las proteínas de cereales y leguminosas, se combinan la derivatización con 6 aminoquinolil-N-hidroxisuccinimidil carbamato, la cuantificación por cromatografía de líquidos de alta resolución de fase reversa (partición de un soluto entre una fase estacionaria no polar y una fase móvil polar), utilizando norleucina como estándar interno, y la hidrólisis del material proteínico con HCl 6 N 0.1% de fenol, en fase de vapor, a 145° C por 4 horas.

2.4.2 Elaboración del protocolo.

Previo a la validación, fue necesario desarrollar y/o ajustar las condiciones en las metodologías de hidrólisis y cuantificación por HPLC para llevar a cabo el análisis de aminoácidos en cereales y leguminosas.

Una vez que se ajustó el análisis cromatográfico, se llevaron a cabo distintas pruebas para adaptar las condiciones de hidrólisis, preparación, purificación y derivatización de las muestras, todo con el objetivo de elaborar el protocolo que sería validado. El protocolo final se encuentra en el anexo III y fue obtenido con los resultados obtenidos al evaluar las siguientes variables.

✓ **Preparación de la muestra: secado**

Se pesaron de 2 a 15 mg de muestra seca y desengrasada.

Se evaluó también la posibilidad de humedecer las muestras con la finalidad de hidratar por completo la muestra y distribuirla en las paredes del tubo para mejorar su exposición a los vapores de HCl.

✓ **Preparación de las muestras: Hidrólisis en fase de vapor**

Se probó hidrolizar de 1 a 6 tubos con muestra por vial de reacción.

✓ **Preparación de las muestras: re-hidratación del hidrolizado**

Se sabe que es necesario el uso de HCl para mejorar el proceso de extracción de los aminoácidos del tubo de hidrólisis. Se evaluaron 2 concentraciones de HCl (10 y 20 mM) durante la re-hidratación de los hidrolizados.

✓ **Preparación de las muestras: re-hidratación y lavado del hidrolizado**

Se supuso que el lavado con acetonitrilo : agua (20:80), permitiría mejorar la extracción de los aminoácidos menos polares. Se realizaron pruebas de lavado utilizando el 25, 50 y 90% del volumen de aforo final. Esto permitiría, en principio, sustituir una dilución previa a la purificación de los hidrolizados con ayuda de un cartucho no polar, según lo reportado por Zendejas [60].

✓ **Preparación de las muestras: dilución de hidrolizado**

Se hicieron evaluaciones utilizando 1 y 5 mL como volumen final de aforo.

✓ Preparación de las muestras: filtración y purificación del hidrolizado

Las muestras necesariamente debieron ser filtradas; se utilizaron filtros de nylon de $0.22 \mu\text{m}$ de tamaño de poro.

Previo a la purificación con cartuchos no polares, se analizó la dilución del hidrolizado con acetonitrilo al 20 % en proporción 1:1, de acuerdo con Zendejas [60].

También se evaluó la purificación omitiendo el paso de dilución y considerando únicamente los lavados con acetonitrilo al 20 %.

Las muestras con volúmenes finales de 1 mL fueron analizadas solo filtradas o filtradas y purificadas con cartuchos no polares.

Para evaluar la extracción y purificación durante la obtención del protocolo, se comparó el área de norleucina lograda después del tratamiento contra el área obtenida con un estándar sin más tratamiento que la derivatización. Esto debido al reporte de las bajas recuperaciones de los aminoácidos no polares cuando se utilizaron cartuchos hidrofóbicos en la purificación [25].

Con el protocolo desarrollado y validado, se procedió al análisis de algunos cereales y leguminosas.

2.5 Cuantificación de aminoácidos por HPLC de fase reversa previa hidrólisis con HCl 6 N, en reflujo, 4 horas a 145°C [14,33].

Se hidrolizó el material proteínico de frijol Escumite con HCl 6 N en reflujo a 145°C durante 4 horas, para posteriormente cuantificar los aminoácidos la proteína por medio de HPLC de fase reversa, derivatizando con AQC.

Después de la hidrólisis, el producto fue filtrado y purificado antes de ser derivatizado con AQC y analizado por HPLC.

El material y método utilizados se encuentran en el anexo III.

3. VALIDACIÓN [52,54-55,57]

En todos los casos, se empleó norleucina como estándar interno. La relación de áreas análito a norleucina, fue registrada como respuesta. Las fórmulas de cálculo utilizadas se encuentran en el anexo I.

3.1 Adecuabilidad

Se registró el promedio, desviación estándar y coeficiente de variación de 6 señales electrónicas producidas manualmente en el detector, con la finalidad de evaluar la precisión en la obtención de las áreas con el registrador empleado. El coeficiente de variación debería ser menor a 1 %.

Una vez establecidas las condiciones del análisis cromatográfico, se procedió a evaluar la adecuabilidad del sistema de análisis.

Idealmente, para cada método analítico se recomienda el uso de distintas soluciones de adecuación, las cuales permiten reportar los parámetros más importantes dentro del desarrollo de un método cromatográfico, con el objetivo de verificar que el sistema de análisis funciona correctamente. En este caso, lo más cercano a una solución de adecuación fue el uso de un estándar de aminoácidos.

Se inyectó por triplicado un estándar de aminoácidos de concentración 0.8 mM de cada aminoácido (cistina 0.4 mM) y norleucina 0.1 mM, reportándose la respuesta del análito, coeficiente de variación, resolución y factores de capacidad para cada análito.

Se emplearon los siguientes criterios de aceptación: el coeficiente de variación deberá ser menor a 3%; el factor de capacidad de cada uno de los analitos, debe ser mayor a 2 y la resolución debe ser mayor a 2.

También se registró el tiempo de retención de cada uno de los aminoácidos, a partir de las tres inyecciones de un solo estándar de aminoácidos, determinándose promedio, desviación estándar y coeficiente de variación. Se empleó el coeficiente de variación menor a 3 % como criterio de aceptación.

3.2 Precisión del sistema

Se evaluó la precisión del sistema, analizando un sextuplicado de soluciones a un solo nivel de concentración de un estándar de aminoácidos (0.2 mM, cistina 0.1 mM y norleucina 0.1 mM), derivatizadas con AGC. Se midió la respuesta analítica (relación de áreas) y se determinó la media, desviación estándar y coeficiente de variación.

Se utilizó el siguiente criterio de aceptación: coeficiente de variación menor a 5 %

La precisión del método (precisión intermedia) no fue determinada, puesto que los diferentes analistas que participaron, trabajaron con muestras distintas, en niveles distintos de concentración y, en algunos casos, bajo diferentes condiciones de análisis.

3.3 Linealidad del sistema

Se procedió a determinar la linealidad del sistema, sin realizar modificaciones en las condiciones cromatográficas establecidas y evaluadas en las etapas previas.

Se determinó mediante la construcción de una curva de calibración, tipo $Y = mx + b$, con al menos 5 niveles de concentración, cada uno por triplicado (tres soluciones estándar, derivatizadas de manera independiente), de la respuesta de cada uno de los aminoácidos en función de los niveles de concentración manejados.

Puesto que las respuestas son diferentes para cada uno de los aminoácidos, se decidió incluir 7 niveles de concentración, con la finalidad de obtener ecuaciones con al menos 5 niveles de concentración para cada uno de los aminoácidos. Se realizaron soluciones estándar con las siguientes concentraciones: 0.025, 0.05, 0.10, 0.15, 0.20, 0.30 y 0.8 mM de cada aminoácido (0.0125, 0.025, 0.05 y 0.1 mM, en el caso de cistina) con 0.1 mM de norleucina en cada caso. También se prepararon soluciones a la misma concentración de cada aminoácido, pero con norleucina 0.5 mM, pues también se utilizó esta última concentración del estándar interno en el análisis de muestras. Se realizó el análisis bajo las mismas condiciones.

Se obtuvo una curva por aminoácido, del tipo $Y = mX + b$, con el método de los mínimos cuadrados; determinándose el coeficiente de determinación (r^2), ordenada al origen, pendiente e intervalos de confianza de la pendiente y de la ordenada al origen. Se debe reportar, además, el intervalo lineal de la curva.

Los criterios de aceptación empleados fueron: coeficiente de determinación (r^2) mayor a 0.98, el intervalo de confianza de la pendiente ($\alpha = 0.05$) no debe incluir el cero, en tanto que el intervalo para la ordenada al origen debería incluir el valor cero.

3.4 Linealidad, Exactitud y Repetibilidad del método

Aun cuando se conocen, en general, los componentes de las matrices analizadas, es difícil elaborar un placebo.

Dado que se desconoce el comportamiento (cinéticas de degradación o susceptibilidad a las condiciones de reacción) de un hidrolizado de aminoácidos (estándar de referencia) durante la hidrólisis y la variabilidad propia de las muestras, se decidió que era más adecuado utilizar una matriz con alto contenido de hidratos de carbono y adicionarla con aminoácidos inmediatamente después de haberle sometido al proceso de hidrólisis.

El objetivo era determinar si la cuantificación se podría describir con un modelo lineal, evaluando el recobro de la cantidad adicionada (exactitud), después de extraer, purificar, derivatizar y cuantificar en HPLC los aminoácidos libres del enlace peptídico; es decir, determinar si la preparación de la muestra evita que se presenten interferencias asociadas a los productos de degradación de una matriz de elevado contenido de hidratos de carbono sometida a hidrólisis.

Cada nivel de adición se realizó por triplicado para evaluar la repetibilidad del método de análisis.

Se utilizó maltodextrina (Maizena) como fuente de hidratos de carbono. Se pesaron 9 tubos con exactamente 10 mg y se sometieron a hidrólisis en fase de vapor. Después del proceso, se adicionaron, por triplicado, 3 niveles de aminoácidos: 45, 220 y 450 μL del estándar de aminoácidos 2.5 mM, (correspondientes a 0.1125, 0.55 y 1.125 μmoles de cada aminoácido, respectivamente, 0.05625, 0.275 y 0.5625 μmoles en el caso de cistina) por cada 10 mg de maltodextrina, se agitó en vórtex y se llevó a sequedad la muestra con ayuda de vacío, continuándose con el proceso de preparación del hidrolizado (adición de estándar interno, extracción de aminoácidos y purificación) para su posterior derivatización, inyección y cuantificación en el cromatógrafo, todo de acuerdo a las metodologías mencionadas en el anexo III.

Ya que no fue posible preparar un placebo con distintas proporciones de proteína, con las adiciones preparadas se simularon hidrolizados de 40 a 400 μg de nitrógeno. Las 3 adiciones de 45 μL se rehidrataron en 1 mL, las 3 de 220 μL se llevaron a 5 mL y las 3 adiciones de 450 μL se llevaron a 1 mL. Todos los casos fueron purificados con cartucho C18 y filtrados a través de tamaño de poro de 0.2 μm , de acuerdo a lo referido en el anexo III.

Se obtuvo una curva (cantidad recuperada en función de la cantidad adicionada) para cada aminoácido, determinándose el coeficiente de determinación (r^2), ordenada al origen, pendiente e intervalos de confianza para la pendiente y la ordenada al origen. Se reportó además el coeficiente de variación de la regresión.

Los criterios de aceptación empleados fueron: coeficiente de determinación (r^2) mayor a 0.98, el intervalo de confianza de la pendiente ($\alpha = 0.05$) debe incluir el uno y el intervalo de confianza de la ordenada al origen ($\alpha = 0.05$) debe incluir el cero. El coeficiente de variación de la regresión debe ser menor a 3 %, aunque cualquier otro criterio de aceptación deberá estar fundamentado y documentado.

En la evaluación de exactitud y repetibilidad del método de cuantificación de aminoácidos, se determinó la media, desviación estándar y coeficiente de variación del porcentaje de recobro del método:

$$\% \text{ recobro} = (\text{cantidad recuperada} / \text{cantidad adicionada}) \times 100$$

realizando el análisis por cada nivel de adición y considerando las 9 repeticiones totales.

Los criterios de aceptación empleados para esta evaluación fueron: el promedio de recobro debería estar incluido en el intervalo 90-110 %, en tanto que el coeficiente de variación debería ser menor a 5 %, para comprobar que el método de cuantificación de aminoácidos tiene exactitud y repetibilidad adecuados.

3.5 Exactitud y Repetibilidad del método (hidrólisis y cuantificación por HPLC)

La exactitud del método completo (hidrólisis del material proteínico y cuantificación de los aminoácidos liberados por HPLC de fase reversa) se evaluó después de analizar, por triplicado, la composición proteínica de frijol negro Jamapa, frijol Escumite y maíz por cromatografía de intercambio iónico, utilizando el método de hidrólisis propuesto por Lucas y Sotelo en 1982 [14]: hidrólisis con HCl 6 N en reflujo a 145° C por 4 horas (sección 2.3 de METODOLOGÍA).

También se realizó el análisis de frijol Escumite, hidrolizando según el reporte de Lucas y Sotelo, derivatizándole con AQC, para su cuantificación en HPLC de fase reversa, para contar con otra referencia, acerca de la combinación de la hidrólisis tradicional y la cuantificación por HPLC de fase reversa (sección 2.5 de METODOLOGÍA).

La repetibilidad del método se determinó después de cuantificar el contenido de aminoácidos a partir del triplicado de pesadas independientes. Con la colaboración de tres analistas, se analizaron 4 diferentes muestras (un analista evaluó dos muestras, el resto solo una), es decir, la repetibilidad fue evaluada 4 veces. Dado que no analizó la misma muestra, no se determinó la reproducibilidad del método. Se determinó el coeficiente de variación de cada aminoácido, en cada muestra. El protocolo de análisis, tal como fue utilizado por los tres analistas se encuentra en el Anexo III.

3.6 Sensibilidad

A partir de las curvas de calibración, con al menos 5 niveles y por triplicado, se obtuvo la pendiente, el intervalo de confianza de la pendiente (que no debe incluir el cero), el coeficiente de determinación (r^2 mayor a 0,98) y desviación estándar de la regresión. La sensibilidad del sistema se calculó con las siguientes ecuaciones [57]:

$$\text{Limite de detección} = (3.3 \times \text{desv. est. regresión}) / \text{pendiente} \times (1/\sqrt{n})$$

$$\text{Limite de cuantificación} = (10 \times \text{desv. est. regresión}) / \text{pendiente} \times (1/\sqrt{n})$$

Solo se determinaron los límites de cuantificación y detección de los aminoácidos cistina, metionina, tirosina e histidina, pues durante la etapa de adecuabilidad, se encontró que eran los que se encontraban más cerca del límite inferior del intervalo lineal del sistema, cuando se analizaron frijol Escumite y maíz.

3.7 Especificidad

La especificidad se determinó utilizando 10 mg de hidratos de carbono sometidos a hidrólisis, no debiendo producir respuesta analítica a las condiciones de trabajo, analizando aforos de 1 y 5 mL, cada uno por triplicado.

La selectividad no fue evaluada, ya que se requiere del análisis de pureza de cada uno de los picos correspondientes a los aminoácidos presentes en una muestra, con la finalidad de garantizar que el sistema de análisis selecciona y resuelve aminas derivatizadas con AQC entre sí.

3.8 Tolerancia y Robustez

En la evaluación de la robustez del método, se seleccionaron dos factores críticos relacionados al método (pH y composición de fases), y en la evaluación de la tolerancia, se seleccionó un factor crítico ajeno al método (diferentes lotes de reactivo de derivatización).

Se evaluó la tolerancia del método con el análisis de un solo estándar de aminoácidos (0.8 mM, norleucina 0.1 mM), derivatizado por triplicado, cada vez con AQC recién reconstituido, de diferente lote.

No debió haber diferencia ($\alpha = 0.05$) entre las respuestas generadas con cada AQC, utilizando la prueba t de Student para la comparación de promedios con varianza desconocida.

La robustez del sistema, respecto a la composición de la fase móvil B, se evaluó inyectando por triplicado un solo derivado, cuando se preparó fase B en tres días distintos. Se utilizó el análisis de varianza de una vía ($\alpha = 0.05$), donde no debería encontrarse diferencia entre la respuesta generada para cada fase. La robustez en función del pH se evaluó inyectando por triplicado cada vez, un solo derivado cuando se modificó el pH de la fase A en 4.8 y en 5.2. Con ambas modificaciones se debieron resolver todos los picos.

Ambas pruebas fueron evaluadas utilizando el análisis estadístico de una hoja de cálculo de Microsoft Excel versión 9.0.2719.

3.9 Estabilidad

Se evaluó inyectando un mismo derivado, bajo condiciones constantes, a los días 1, 3 y 5. Se determinó la relación porcentual de las respuestas de los días 3 y 5, respecto a la respuesta generada el día 1. El valor absoluto de la diferencia de las relaciones porcentuales (día 1 menos día 3 y día 1 menos día 5) no debió ser mayor a dos unidades porcentuales.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1. ELABORACIÓN DEL PROTOCOLO

Durante la etapa de adecuación del sistema de análisis cromatográfico se realizaron modificaciones al gradiente que inicialmente se tenía reportado [59-60]. Los puntos modificados permitieron: mejorar la resolución entre los pares cistina-tirosina y norleucina-fenilalanina; evitar la interferencia del lavado en la elución de norleucina y fenilalanina, y acelerar la etapa de acondicionamiento de la columna para aumentar la resolución de los primeros 5 picos de la siguiente corrida. También se diseñó un programa que permitiera lavar el sistema al finalizar las sesiones diarias. El programa tal y como fue utilizado se encuentra en el anexo III.

Las fases preparadas como se menciona en el anexo III, fueron almacenadas en refrigeración para conservarlas hasta por un mes cuando fue necesario, filtrándoles y desgasificándoles cuando no fueron utilizadas por más de dos días. Cuando la resolución no fue adecuada, sobre todo en el inicio de cada cromatograma, se ajustó el pH de la fase A (amortiguador acetato de sodio-ácido fosfórico) en 5.02, utilizando ácido fosfórico concentrado o hidróxido de sodio 5 N, según fuese necesario.

La preparación de ambas fases siempre se llevó a cabo de la manera descrita con la finalidad de mantener reproducibilidad en los tiempos de retención y en la respuesta de cada uno de los aminoácidos en el detector, durante todas las etapas del estudio: adecuación del sistema, validación y análisis de muestras.

Dado que es necesario contar con muestras homogéneas y representativas, sobretodo en el análisis de alimentos, se determinó que es adecuado utilizar de 10 a 15 mg de muestra, empleando mayor cantidad de (15 mg) cuando el contenido de proteína es más bajo (menor a 20 %).

El uso de las harinas tal cual, no resultó adecuado. La mejor opción fue adicionar agua (50 μ L), de esta manera se evitó la formación de una especie de pastilla de la muestra carbonizada que fuera sacada del tubo durante la hidrólisis. Además, con la hidratación se mejora la distribución de la muestra en el interior del tubo y, por lo tanto, es más eficiente su exposición a los vapores de HCl.

Bajo las condiciones descritas en el anexo III, se encontró que pueden ser hidrolizados hasta 6 tubos en un solo vial; la presión generada durante la reacción de hidrólisis, no compromete la integridad del equipo.

Existe el reporte de que la extracción de los aminoácidos de hidrolizados de proteínas puras, se hace con HCl 20 mM [24]. Después de intentar hacerlo de ésta manera, se encontró que, dada la complejidad de las muestras sometidas al proceso de hidrólisis, durante el proceso de derivatización era prácticamente imposible amortiguar el medio para que ocurriese la reacción (pH = 8-10). Se decidió que la mejor opción para hacer efectiva la extracción era el uso de HCl 10 mM, lo cual no compromete la eficiencia de la reacción de derivatización de los hidrolizados de las muestras analizadas durante la adecuación.

Para evitar la pérdida de los aminoácidos menos polares en el cartucho de purificación, Zendejas, en 1996 [60], reportó la dilución 1:1 del hidrolizado con acetonitrilo al 20 % antes de proceder a la purificación con el cartucho C₁₈. Además, White y Hart [25] reportaron que la purificación en cartuchos no polares, puede provocar una baja recuperación de aminoácidos poco polares. Se decidió que durante la preparación de la muestra se utilizara CH₃CN al 20 %, con el mismo objetivo propuesto por Zendejas, cambiando la dilución propuesta por lavados directamente en el tubo de hidrólisis. El omitir la dilución permitió que las respuestas generadas por los aminoácidos en más baja concentración estuviesen dentro del intervalo lineal de cada una de las curvas de calibración.

En este punto, se encontró que aproximadamente un volumen del 50 % del aforo final era suficiente, durante la preparación de los hidrolizados, para lograr la recuperación del 100 % de la norleucina utilizada como estándar interno (evaluando el área de este aminoácido sometido al proceso de purificación, respecto al área de un estándar), lo cual implicaría que la recuperación de los aminoácidos tan poco polares como la norleucina (isoleucina, leucina y fenilalanina) debería ser buena. Un exceso de solución de lavado, aseguraría mejores rendimientos, la desventaja es que también podrían ser arrastrados, junto con los aminoácidos no polares, productos de degradación de las matrices hidrolizadas, aumentando el riesgo de *ensuciar* de modo grave la columna.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La elección del volumen de aforo resultó función del contenido de proteína; 1 mL para muestras con menos de 20 % de proteína y 5 mL para muestras con porcentajes mayores. Se encontró que era mejor concentrar el producto de hidrólisis en las muestras con menos de 20 % de proteína. En estos casos se decidió utilizar 1 mL como volumen final. También se decidió mantener la cantidad de norleucina adicionada al hidrolizado (100 μ L de una solución 5 mM); dado que se considera el paso crítico de la preparación de la muestra, el reducir la cantidad de norleucina (pues se redujo el volumen) para mantener la misma concentración que en los estándares de calibración, implicaría, tal vez, mayor error en este punto, por ser necesario adicionar un volumen 5 veces menor.

En todos los casos se utilizaron filtros de nylon de tamaño de poro 0.22 μ m. Se encontró que cuando el volumen de aforo se ha establecido en 1 mL, resulta complicado recuperar la muestra, sin diluirla, después de la purificación con el cartucho. Cuando fue considerado adecuado (soluciones relativamente incoloras), se omitió la purificación y únicamente se llevó a cabo la filtración. El lavado con acetonitrilo ayudaría a precipitar péptidos o proteínas hidrolizados incompletamente, mientras que el uso de filtros evitaría que éstos pasaran a la solución que sería introducida en la columna, pues se conoce que el nylon de los filtros es capaz de formar interacciones con péptidos o proteínas [61].

Con la información anterior se elaboró un protocolo que, después de ser validado, permitiría llevar a cabo el análisis de aminoácidos en cereales y leguminosas, empleando la hidrólisis ácida en fase de vapor y el análisis de los aminoácidos por HPLC de fase reversa con derivatización pre columna. El protocolo, en su versión final, se encuentra en el anexo III.

2. VALIDACIÓN

2.1 Adecuabilidad

La prueba de la precisión con la que el registrador integra las áreas fue satisfactoria. El área promedio de las 6 señales electrónicas producidas con el detector fue 4.9933×10^7 , la desviación estándar 5.2375×10^4 . El coeficiente de variación, 0.1049, resultó menor a la magnitud establecida como criterio de aceptación en esta prueba (1 %), lo cual significa que existe repetibilidad en la forma en la que el registrador ubica la línea base e integra el área bajo la curva de cada pico, a partir de los parámetros utilizados: ancho de pico, velocidad de papel y ruido (PT).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la siguiente tabla se encuentran las respuestas generadas por un solo estándar de aminoácidos (0.8 mM), derivatizados con AQC, después de inyectarse por triplicado.

Tabla 6. Promedio, desviación estándar y coeficiente de variación (n=3) de la respuesta generada por un solo estándar de aminoácidos derivatizados con AQC

Aminoácido ²	¹ Respuesta $\pm \sigma_{n-1}$	%C.V.
Aspártico	10.04 \pm 0.55	5.5
Serina	11.06 \pm 0.18	1.6
Glutámico	9.35 \pm 0.41	4.4
Glicina	10.82 \pm 0.32	3.0
Histidina	10.91 \pm 0.14	1.3
Arginina	10.10 \pm 0.01	0.1
Treonina	11.22 \pm 0.23	2.0
Alanina	9.74 \pm 0.09	0.9
Prolina	11.07 \pm 0.11	1.0
Cistina	8.02 \pm 0.05	0.6
Tirosina	11.48 \pm 0.09	0.8
Valina	10.02 \pm 0.13	1.3
Metionina	9.89 \pm 0.13	1.3
Lisina	13.11 \pm 0.21	1.6
Isoleucina	9.87 \pm 0.07	0.7
Leucina	9.26 \pm 0.12	1.3
Fenilalanina	11.89 \pm 0.22	1.9
Promedio		1.7

¹ Respuesta = Relación de áreas aminoácido a norleucina 0.1 mM

² Concentración 0.8 mM, cistina 0.4 mM

Cabe mencionar que durante la etapa de ajuste del sistema de análisis cromatográfico, se realizó varias veces la prueba de adecuabilidad; la idea era identificar todas aquellas fuentes de variación que impedirían la repetibilidad de las respuestas generadas, para que después de corregir apropiadamente, la variabilidad de los resultados debida únicamente al sistema (cromatógrafo, columna y fase móvil) fuera reducida hasta límites de precisión razonables.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Como se aprecia en la tabla 6, la mayor parte de los aminoácidos superan el criterio de aceptación de esta prueba (% C.V. menor a 3 %). Aspártico, glutámico y glicina son los tres aminoácidos cuyos coeficientes de variación son mayores al parámetro establecido.

La tendencia encontrada podrían explicarse si se considera que la baja precisión estaría asociada a las características propias del sistema de separación. Al no contar con un sistema de mezclado de las fases, al inicio del gradiente, donde existe una mayor proporción de acetato de sodio en la fase móvil (generándose respuesta en el detector), la línea base presenta deriva considerable (figura 8), lo que provocaría una baja precisión en la decisión del registrador para ubicar la línea base y llevar a cabo la integración y obtención del área bajo la curva, lo que repercute finalmente en la relación de áreas que se ha considerado como la respuesta a evaluar.

Esto fundamenta el que se permita la validez de algunos parámetros aun cuando no se cumplieran los criterios, pues el sistema, como única variable, no responde con la precisión requerida en el caso de ácido aspártico, ácido glutámico y glicina.

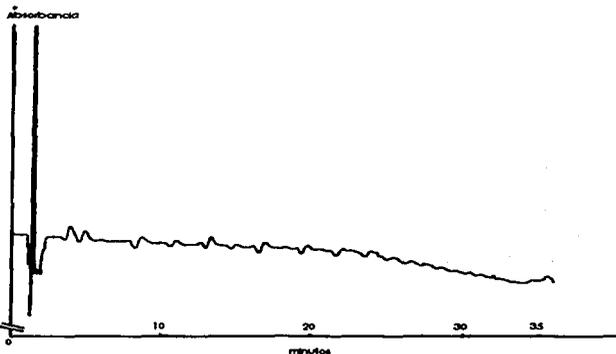


Figura 8. Línea base

Señal producida por la fase móvil durante el desarrollo del gradiente de separación, simulando una inyección. Columna Nova Pak C₁₈ 3.9 x 150 mm. Detector de UV, longitud de onda 254 nm. Atenuación 128.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La siguiente tabla muestra la repetibilidad de los tiempos de retención de cada uno de los aminoácidos, cuando se ha analizado un solo estándar de aminoácidos, inyectado por triplicado.

Tabla 7. Promedio, desviación estándar y coeficiente de variación (n=3) de los tiempos de retención generados por un solo estándar de aminoácidos derivatizados con AQC

Aminoácido ¹	² Tiempo de retención $\pm \sigma_{n-1}$	%C.V.
Aminoquinolina	12.62 \pm 0.07	0.6
Aspártico	15.27 \pm 0.07	0.4
Serina	16.93 \pm 0.06	0.3
Glutámico	17.84 \pm 0.08	0.4
Glicina	19.15 \pm 0.10	0.5
Histidina	19.80 \pm 0.04	0.2
Amoníaco	21.14 \pm 0.09	0.4
Arginina	23.24 \pm 0.11	0.5
Treonina	23.76 \pm 0.06	0.3
Alanina	24.85 \pm 0.11	0.4
Prolina	26.76 \pm 0.10	0.4
Cistina	29.98 \pm 0.15	0.5
Tirosina	30.22 \pm 0.13	0.4
Valina	31.25 \pm 0.16	0.5
Metionina	31.73 \pm 0.18	0.6
Lisina	33.75 \pm 0.21	0.6
Isoleucina	34.51 \pm 0.20	0.6
Leucina	34.97 \pm 0.23	0.6
Norleucina	35.50 \pm 0.25	0.7
Fenilalanina	35.90 \pm 0.27	0.8

¹ Concentración 0.8 mM, cistina 0.4 mM, norleucina 0.1 mM

² Minutos

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Aunque en todos los casos se cumple ampliamente con el criterio de aceptación (% C.V. menor a 3%), hacia el final de la corrida, los tiempos de retención son ligeramente más variables, lo que podría indicar que el modificador orgánico del sistema empieza a perderse por evaporación, provocando variabilidad, sutilmente mayor, en los tiempos de retención entre corridas; dicha variación es poco relevante en términos prácticos puesto que durante toda una corrida de trabajo, la variación en los tiempos de retención difícilmente llegaría a ser mayor a 3% en términos de coeficiente de variación.

Esto lleva a concluir que los aminoácidos derivatizados, de las soluciones empleadas durante la validación y de las muestras analizadas, pueden ser identificados a partir de la comparación con los tiempos de retención obtenidos de los aminoácidos derivatizados de un estándar.

El tiempo muerto fue de 1.21 minutos. El factor de capacidad, K' , (calculado según el anexo 1) fue mayor a 2 en todos los casos. Aunque existe la recomendación de evitar factores de capacidad mayores a 15, para evitar el ensanchamiento de los picos, en este caso solo los picos de aminoquinolina, aspártico, serina y glutámico presentaron factores de capacidad menores a 15, encontrándose valores hasta de 28.37 para noreucina y 28.57 para fenilalanina, últimos aminoácidos en ser eluidos.

El riesgo de que se presentara ensanchamiento en los picos con factores de capacidad mayores a 15, en realidad era muy bajo, ya que en las separaciones que utilizan gradiente, cada cambio en la composición implica nuevas condiciones y, por lo tanto, disminuye la posibilidad de que el fenómeno de transferencia de masa en la fase móvil, responsable del ensanchamiento de las bandas, se presente (sección 5.4 del capítulo ANTECEDENTES).

El gradiente permite que se generen picos más delgados al final del cromatograma (figura 9), cuando los factores de capacidad son más grandes; en tanto que con los factores de capacidad menores, pero cercanos a 15, se presentan picos más anchos, debido a que son eluidos cuando el gradiente prácticamente no ha cambiado durante 15 minutos, facilitando la formación de fenómenos de ensanchamiento intracolumna, a diferencia del final de la separación, donde el gradiente presenta cambios en menos tiempo, generándose condiciones nuevas en menor tiempo.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

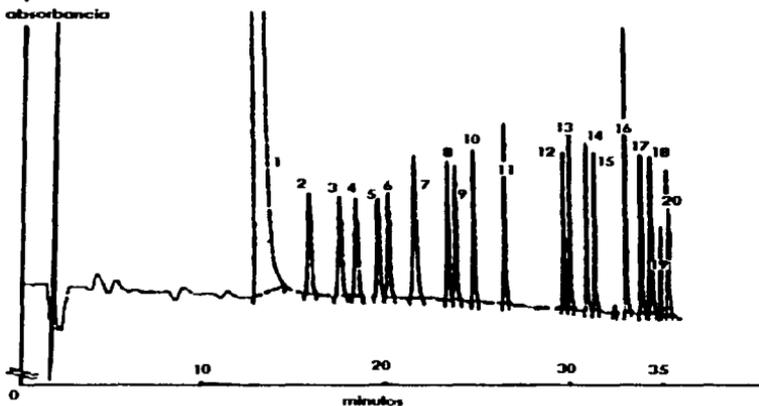


Figura 9. Cromatograma de la separación de una solución estándar de aminoácidos Derivatización con AQC. Concentración de aminoácidos 0.2 mM, cistina y norleucina 0.1 mM 1. AMQ, 2 ASP, 3 SER, 4 GLU, 5 GLY, 6 HIS, 7 NH₃, 8 ARG, 9 THR, 10 ALA, 11 PRO, 12 (CYS)₂, 13 TYR, 14 VAL, 15 MET, 16 LYS, 17 ILE, 18 LEU, 19 N-LEU (estándar interno), 20 PHE. Columna Nova Pak C₁₈ 3.9 x 150 mm. Detector de UV, longitud de onda 254 nm. Atenuación 128. El pico entre 15 y 16 es asociado al metanol que contiene el acetonitrilo usado para disolver el AQC [34]

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Como se aprecia en la figura 9, la mayoría de los pares de picos presenta resolución al nivel de la línea base (resolución mayor a 2). Los pares más comprometidos son glicina-histidina, arginina-treonina, cistina-tirosina y valina-metionina. En estos casos, la resolución fue mayor a 2.0, excepto para el par arginina-treonina, que presentó un valor de 1.5.

Esto significa que en dicho par de picos, aun cuando no se cumple con el criterio de aceptación establecido, únicamente alrededor de 0.1 % de un pico está empalmado con el otro, contaminándolo.

Por tratarse de un aminoácido indispensable (treonina) se consideró modificar el gradiente para aumentar la resolución de este par, el resultado no fue adecuado, ya que se produjeron muy bajas resoluciones (alrededor de 1) en los otros pares, que involucran aminoácidos indispensables (cistina-tirosina y valina-metionina), por lo que se decidió continuar el proceso de validación, cuidando que bajo ninguna circunstancia (cambios pronunciados en la concentración del modificador orgánico o cambios en el gradiente) la resolución entre arginina y treonina fuese menor a 1.5.

También se evaluó la resolución de los pares de picos que involucraron al estándar interno: leucina-norleucina y norleucina-fenilalanina, puesto que el uso del estándar interno se permite siempre y cuando no interfiera en la cuantificación de ninguno de los analitos. Para ambos pares, se presentó una resolución mayor a 2; 2.2 en el primer par y 2.1 en el segundo par, lo que asegura la completa resolución entre el estándar interno y los analitos adyacentes.

2.2 Precisión del sistema

En la tabla 8 se encuentran los resultados obtenidos después de derivatizar e inyectar 6 veces una solución estándar de aminoácidos. Se evalúa la precisión de la reacción de derivatización.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 8. Precisión del sistema. Reacción de derivatización, estándar de aminoácidos 0.2 mM

Aminoácido	Respuesta	%C.V.
Aspártico	2.72 ± 0.04	1.5
Serina	3.10 ± 0.19	6.1
Glutámico	2.86 ± 0.03	1.2
Glicina	2.79 ± 0.01	0.4
Histidina	2.68 ± 0.09	3.5
Arginina	2.48 ± 0.07	2.8
Treonina	2.64 ± 0.02	0.9
Alanina	2.47 ± 0.11	4.5
Prolina	2.61 ± 0.06	2.2
Cistina (0.1 mM)	2.17 ± 0.01	0.6
Tirosina	2.54 ± 0.01	0.4
Valina	2.38 ± 0.03	1.4
Metionina	2.32 ± 0.02	0.8
Lisina	3.89 ± 0.06	1.5
Isoleucina	2.45 ± 0.03	1.4
Leucina	2.35 ± 0.03	1.2
Fenilalanina	2.39 ± 0.02	0.7
	Promedio	1.83

La precisión del sistema, evaluada como la precisión de la reacción de derivatización (toma de alícuota a derivatizar, amortiguación del sistema, derivatización y obtención de la respuesta en el cromatógrafo) es buena; de hecho, en algunos casos los coeficientes de variación son menores a los obtenidos en la prueba de adecuabilidad, esto demuestra que existe precisión en la generación de respuestas cuando se forman derivados a partir de soluciones independientes, donde la principal fuente de error la tendría el equipo y no la reacción de derivatización.

Se obtuvieron coeficientes de variación bajos, cumpliendo con el criterio de aceptación todos los aminoácidos excepto serina. Se debe resaltar que los aminoácidos, cuya *dificultad* en la derivatización pudo haber generado mayor variación, fueron evaluados con repetibilidad adecuada; tirosina (se pudo formar el diderivado), cistina y lisina (que son derivatizados en dos sitios).

2.3 Linealidad del sistema

En la siguiente tabla se muestran los resultados obtenidos durante la elaboración de las curvas de calibración del tipo: respuesta = f(concentración).

Tabla 9. Linealidad del sistema. Curvas de calibración de la respuesta (relación de áreas) en función de la concentración

Aminoácidos dispensables. Norleucina 0.1 mM

Aminoácido	$Y = m X^1 + b$	R ²	Intervalo de confianza ² de la pendiente	Intervalo de linealidad (mM)
Aspártico	11.86 X + 0.24	0.9982	11.60 - 12.13	0.025 - 0.8
Serina	12.99 X + 0.51	0.9951	12.44 - 13.53	0.050 - 0.8
Glutámico	11.70 X + 0.15	0.9964	11.32 - 12.07	0.025 - 0.8
Glicina	14.61 X - 0.02	0.9986	14.35 - 14.88	0.025 - 0.8
Arginina	12.96 X - 0.11	0.9990	12.76 - 13.15	0.025 - 0.8
Alanina	11.77 X + 0.06	0.9994	11.61 - 11.92	0.025 - 0.8
Prolina	13.85 X - 0.13	0.9996	13.70 - 14.00	0.025 - 0.8

Aminoácidos indispensables. Norleucina 0.1 mM

Aminoácido	$Y = m X^1 + b$	R ²	Intervalo de confianza ² de la pendiente	Intervalo de linealidad (mM)
Histidina	13.09 X + 0.02	0.9963	12.67 - 13.13	0.025 - 0.3
Treonina	13.75 X - 0.08	0.9990	13.48 - 14.02	0.025 - 0.3
Cistina ³	21.99 X - 0.03	0.9988	21.54 - 22.44	0.0125 - 0.10
Tirosina ³	13.09 X - 0.06	0.9973	12.69 - 13.50	0.025 - 0.2
Valina	12.73 X - 0.08	0.9993	12.57 - 12.89	0.025 - 0.8
Metionina	11.88 X + 0.06	0.9979	11.55 - 12.21	0.025 - 0.2
Lisina	16.37 X + 0.33	0.9970	15.83 - 16.90	0.050 - 0.8
Isoleucina	12.68 X - 0.09	0.9993	12.52 - 12.84	0.025 - 0.8
Leucina	12.05 X - 0.08	0.9995	11.93 - 12.18	0.025 - 0.8
Fenilalanina	12.45 X - 0.09	0.9985	12.19 - 12.70	0.025 - 0.3

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Aminoácidos dispensables. Norleucina 0.5 mM

Aminoácido	$Y = m X + b$	R^2	Intervalo de confianza ² de la pendiente	Intervalo de linealidad (mM)
Aspártico	$2.37 X + 0.05$	0.9985	2.32 - 2.43	0.025 - 0.8
Serina	$2.60 X + 0.10$	0.9952	2.49 - 2.71	0.050 - 0.8
Glutámico	$2.32 X + 0.04$	0.9967	2.24 - 2.40	0.025 - 0.8
Glicina	$2.91 X + 0.00$	0.9991	2.86 - 2.96	0.025 - 0.8
Arginina	$2.59 X - 0.02$	0.9991	2.54 - 2.64	0.025 - 0.8
Alanina	$2.36 X + 0.01$	0.9995	2.33 - 2.39	0.025 - 0.8
Prolina	$2.76 X - 0.02$	0.9997	2.73 - 2.79	0.025 - 0.8

Aminoácidos indispensables. Norleucina 0.5 mM

Aminoácido	$Y = m X + b$	R^2	Intervalo de confianza ² de la pendiente	Intervalo de linealidad (mM)
Histidina	$2.61 X + 0.00$	0.9972	2.53 - 2.69	0.025 - 0.3
Treonina	$2.75 X - 0.02$	0.9990	2.70 - 2.80	0.025 - 0.3
Cistina ³	$4.39 X - 0.01$	0.9985	4.29 - 4.50	0.0125 - 0.10
Tirosina ³	$2.61 X - 0.01$	0.9972	2.52 - 2.70	0.025 - 0.2
Valina	$2.55 X - 0.02$	0.9995	2.52 - 2.58	0.025 - 0.8
Metionina	$2.37 X - 0.01$	0.9973	2.30 - 2.45	0.025 - 0.2
Lisina	$3.27 X + 0.07$	0.9967	3.16 - 3.38	0.050 - 0.8
Isoleucina	$2.53 X - 0.02$	0.9993	2.49 - 2.58	0.025 - 0.8
Leucina	$2.41 X - 0.02$	0.9995	2.38 - 2.44	0.025 - 0.8
Fenilalanina	$2.49 X - 0.02$	0.9988	2.44 - 2.54	0.025 - 0.3

¹ X = concentración del aminoácido, mM

² $\alpha = 0.05$

³ Cistina y Tirosina se consideran aminoácidos semi indispensables

Las curvas de calibración obtenidas se encuentran en el anexo II.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En todos los casos, se obtuvieron coeficientes de determinación (r^2) mayores a 0.98. En ningún intervalo de confianza de la pendiente se incluyó el cero. Esto significa que en todos los casos, la respuesta (relación de áreas) es directamente proporcional a la concentración y se ajusta a un modelo lineal cuando la concentración de cada uno de los analitos se encuentra dentro de los intervalos que aparecen en la tabla 9, cuando se mantiene constante la concentración de noreuquina: 0.1 mM ó 0.5 mM.

Los modelos matemáticos tienen validez únicamente dentro del intervalo generado, a medida que los valores se acercan a los extremos, crece la incertidumbre en cuanto a la idoneidad del modelo presentado, por eso los modelos no pueden ser utilizados para extrapolar [62].

La pendiente de cada una de las curvas obtenidas, es un índice de la sensibilidad del sistema, es decir, los valores más altos de las pendientes permiten la evaluación de cambios más pequeños en la concentración de un analito en una muestra dada [28].

Las curvas de calibración con mayor sensibilidad son las obtenidas para cistina y lisina (con las dos concentraciones de noreuquina evaluadas), lo cual era esperado, ya que ambos aminoácidos son derivatizados en dos sitios (cistina tiene dos equivalentes de cisteína, cada cual con su grupo amino; lisina se derivatiza en los grupos α y ϵ amino) [33].

El caso de cistina es de especial interés; cuando es utilizado un detector de fluorescencia, la sensibilidad es muy baja y se necesitan concentraciones considerables de este aminoácido para que sea registrada una respuesta [33], en cambio, con el uso de un detector de luz ultravioleta, la sensibilidad es la más alta de los 17 aminoácidos evaluados, lo que tentativamente se traduce en la mayor facilidad para detectar y cuantificar cistina en las muestras con bajo contenido de este aminoácido.

El cálculo del intervalo de confianza de la ordenada al origen ($\alpha = 0.05$) permite predecir si resulta apropiado cuantificar comparando respecto a un estándar de concentración conocida o si es más conveniente el uso de curvas de calibración; siendo mejor utilizar curvas de calibración cuando el cero no está incluido en el intervalo de confianza de la ordenada al origen [53].

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En todos los casos, con excepción de ácido aspártico y prolina (tabla 10), los intervalos de confianza incluyen el cero, lo que hace válida la consideración que permite calcular el contenido de aminoácidos comparando únicamente contra un estándar de concentración conocida, para el resto de los 15 aminoácidos identificados en el método, incluyendo todos los aminoácidos indispensables que se detectan con el método.

Tabla 10. Intervalos de confianza para la ordenada al origen de las curvas de calibración

Aminoácido	Curvas con nortleucina 0.1 mM	Curvas con nortleucina 0.5 mM
Aspártico	0.01 - 0.38	0.03 - 0.07
Serina	-0.06 - 0.79	-0.01 - 0.24
Glutámico	-0.13 - 0.36	-0.03 - 0.11
Glicina	-0.13 - 0.10	-0.03 - 0.02
Histidina	-0.09 - 0.10	-0.01 - 0.02
Arginina	-0.18 - 0.01	-0.05 - 0.03
Treonina	-0.13 - 0.02	-0.03 - 0.01
Alanina	-0.01 - 0.09	-0.01 - 0.02
Prolina	-0.17 - -0.03	-0.03 - -0.01
Cistina	-0.09 - 0.03	-0.01 - 0.01
Tirosina	-0.13 - 0.06	-0.02 - 0.01
Valina	-0.16 - 0.03	-0.03 - 0.01
Metionina	-0.11 - 0.04	-0.03 - 0.01
Lisina	-0.19 - 0.66	-0.03 - 0.12
Isoleucina	-0.17 - 0.03	-0.04 - 0.01
Leucina	-0.13 - 0.01	-0.03 - 0.01
Fenilalanina	-0.17 - 0.04	-0.03 - 0.01

En negritas, los aminoácidos que no cumplen con el criterio para esta prueba

El utilizar la comparación contra un estándar de concentración conocida, implica que la respuesta es cero cuando la concentración es cero, aun cuando no siempre se dispone de los argumentos necesarios para hacer válida dicha consideración. Por lo general se obtiene un mejor ajuste si se incluye el término correspondiente a la ordenada al origen, aun cuando pareciera que no tiene sentido (por ejemplo, cuando la concentración del analito es cero y en el equipo no se ha registrado señal alguna) [62].

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El que sea completamente válido llevar a cabo la cuantificación empleando la comparación contra un estándar tiene como ventaja principal el consumo de menos recursos durante el análisis rutinario; siempre que sea comprobado, frecuentemente, que el equipo funcione de modo adecuado y de acuerdo con los parámetros del protocolo de validación. Aunque no es lo mejor, se puede utilizar la comparación contra un estándar de aminoácidos para obtener buenas estimaciones para el caso de aspártico y prolina, pues el realizar curvas de calibración para estos dos, sería poco rentable dadas las ventajas mencionadas.

El que dos aminoácidos no presenten el mismo comportamiento que los otros 15, cuando se trabajó a partir de una misma solución estándar con los 17 aminoácidos, no implica que haya falta de ajuste en el sistema cromatográfico, es solo que el comportamiento de la respuesta generada, en función de la concentración, es descrito de mejor manera por un modelo matemático en donde la ordenada al origen no es estadísticamente ($\alpha = 0.05$) cero.

2.4 Linealidad, exactitud y repetibilidad del método; extracción, purificación, derivatización y cuantificación

En la siguiente tabla se muestran los parámetros evaluados para corroborar la linealidad del método. La cantidad recuperada para cada aminoácido se obtuvo con la comparación de las respuestas contra un estándar de aminoácidos de concentración 0.2 mM, de acuerdo con lo obtenido en la linealidad del sistema.

Tabla 11. Linealidad del método. Curvas de recuperación

Aminoácido	$Y = mX + b$	r^2	Intervalos de confianza ²		$\%C.V.R$
			pendiente	ordenada al origen	
			Aminoácidos dispensables		
Aspártico	$0.97 X + 0.02$	0.9987	0.941 - 1.004	- 0.003 - 0.043	2.7
Serina	$1.02 X + 0.00$	0.9989	0.989 - 1.048	- 0.025 - 0.018	2.6
Glutámico	$0.98 X + 0.01$	0.9986	0.951 - 1.018	- 0.013 - 0.035	2.9
Glicina	$1.00 X + 0.00$	0.9986	0.965 - 1.032	- 0.023 - 0.026	3.0
Arginina	$0.99 X + 0.00$	0.9995	0.972 - 1.013	- 0.015 - 0.015	1.8
Alanina	$0.99 X + 0.00$	0.9996	0.976 - 1.013	- 0.008 - 0.019	1.6
Prolina	$1.00 X + 0.00$	0.9993	0.974 - 1.022	- 0.017 - 0.018	2.1

Aminoácidos Indispensables

Aminoácido	$^1 Y = m X + b$	r^2	Intervalos de confianza 2		$^3\%C.V.R$
			pendiente	ordenada al origen	
Histidina	$1.00 X + 0.01$	0.9996	0.972 - 1.008	-0.005 - 0.021	1.6
Treonina	$1.00 X + 0.00$	0.9996	0.983 - 1.017	-0.010 - 0.015	1.5
Cistina ⁴	$0.99 X + 0.00$	0.9996	0.968 - 1.004	-0.003 - 0.010	1.6
Tirosina ⁴	$1.00 X + 0.00$	0.9999	0.992 - 1.005	-0.001 - 0.008	0.6
Valina	$0.99 X + 0.00$	0.9999	0.985 - 1.003	-0.002 - 0.011	0.8
Metionina	$1.00 X + 0.00$	0.9998	0.986 - 1.009	-0.005 - 0.011	1.0
Lisina	$1.00 X + 0.00$	0.9999	0.989 - 1.007	-0.005 - 0.008	0.8
Isoleucina	$1.01 X - 0.01$	0.9998	0.997 - 1.022	-0.016 - 0.002	1.1
Leucina	$1.01 X - 0.01$	0.9998	0.995 - 1.022	-0.015 - 0.004	1.2
Fenilalanina	$1.00 X + 0.01$	0.9998	0.978 - 1.002	-0.003 - 0.015	1.0

¹ Y = cantidad recuperada; X = cantidad adicionada

² $\alpha = 0.05$

³ %C.V.R = coeficiente de variación de la regresión

⁴ Cistina y Tirosina se consideran aminoácidos semi indispensables

Para todos los casos, se cumple con los criterios de aceptación; todos los intervalos de confianza para la pendiente incluyen el uno, todos los intervalos de confianza para la ordenada al origen incluyen el cero, todos los coeficientes de determinación (r^2) son mayores a 0.98 y todos los coeficientes de variación de regresión son menores a 3 %. Las curvas de la cantidad recuperada en función de la cantidad adicionada se encuentran en el anexo III.

Con los tres niveles de adición utilizados en esta prueba (0.1125, 0.55 y 1.125 μ moles por 10 mg de hidratos de carbono sometidos al proceso de hidrólisis), se demostró que el método desarrollado para la extracción, purificación y derivatización de aminoácidos es lineal en el intervalo dinámico estudiado; se registraron respuestas directamente proporcionales a la cantidad adicionada, pudiendo cuantificarse el equivalente de 40 a 400 μ g de nitrógeno por mL (adición de 0.1125 μ moles, llevada a 1 mL y adición de 1.125 μ moles, llevada a 1 mL, respectivamente).

En general, se menciona que las reacciones de derivatización, con cualquier reactivo, no cumplen cabalmente en el análisis de aminoácidos; se mencionan deficiencias en la cuantitatividad de la reacción, falta de reacción con aminas primarias y secundarias, interferencias provocadas por el exceso de reactivo de derivatización o de subproductos, reacciones no selectivas a grupos amino, linealidad en intervalos estrechos y factores e respuesta poco similares entre aminoácidos [30].

En este estudio se demostró que los factores de respuesta son del mismo orden de magnitud para 15 aminoácidos y los más altos (lisina y cistina) son justificables; se encontró linealidad en un intervalo dinámico amplio; las posibles fuentes de interferencia, asociadas al alto porcentaje de hidratos de carbono en cereales y leguminosas, son eliminadas durante la preparación de la muestra; finalmente, la linealidad del sistema permite la cuantificación confiable de, al menos, 15 aminoácidos utilizando la comparación contra un estándar, aunque los resultados obtenidos para aspártico y prolina fueron satisfactorios bajo esta consideración.

Tanto la reacción de derivatización con AQC, como la forma de preparar la muestra, han demostrado la viabilidad de emplear esta metodología en la cuantificación rutinaria de aminoácidos; considerando que aquellos que no fueron degradados o formaron otros subproductos durante la hidrólisis, pueden ser cuantificados correctamente y en un intervalo amplio, aplicando el protocolo desarrollado para la extracción, purificación, derivatización y análisis cromatográfico de aminoácidos en presencia de los subproductos de reacción de hidratos de carbono sometidos al proceso de hidrólisis.

Las tablas 12 y 13 muestran los recobros obtenidos, así como la repetibilidad del método desarrollado para la extracción, purificación y análisis de aminoácidos en presencia de hidratos de carbono hidrolizados. El método fue considerado como exacto si el promedio aritmético se encontraba dentro del intervalo 90 - 110 %. La repetibilidad resultó adecuada cuando los coeficientes de variación resultaron menores a 5 %.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 12. Porcentaje de recobro¹, en tres niveles de adición, después de extraer, purificar, derivatizar con AQC y cuantificar por HPLC de fase reversa

Adición	0.1125 µmoles		0.55 µmoles		1.125 µmoles	
	% recobro ²	%C.V. ³	% recobro ²	%C.V. ³	% recobro ²	%C.V. ³
Aspártico	119.88 ± 2.23	2.2	99.10 ± 2.20	2.2	99.42 ± 2.12	2.1
Serina	102.46 ± 12.8	12.8	99.93 ± 1.93	1.9	101.82 ± 1.84	1.8
Glutámico	97.27 ± 2.11	2.1	104.38 ± 0.44	0.4	98.60 ± 0.30	0.3
Glicina	90.46 ± 1.50	1.5	104.18 ± 0.73	0.7	99.20 ± 0.11	0.1
Histidina	108.89 ± 7.97	8.0	97.62 ± 4.60	4.7	99.90 ± 0.28	0.3
Arginina	94.90 ± 3.63	3.6	100.88 ± 1.79	1.8	98.93 ± 0.97	1.0
Treonina	99.82 ± 8.25	8.2	101.08 ± 1.81	1.8	100.00 ± 0.70	0.7
Alanina	102.19 ± 9.16	9.2	101.38 ± 1.59	1.6	99.79 ± 0.88	0.9
Prolina	92.44 ± 3.90	3.9	102.59 ± 0.54	0.5	99.22 ± 0.11	0.1
Cistina	99.91 ± 1.87	1.9	102.07 ± 0.55	0.5	98.88 ± 0.23	0.2
Tirosina	101.36 ± 3.03	3.0	101.11 ± 0.45	0.4	100.07 ± 0.12	0.1
Valina	101.36 ± 2.83	2.8	100.90 ± 0.49	0.5	99.61 ± 0.46	0.5
Metionina	101.72 ± 5.88	5.9	100.58 ± 1.28	1.3	99.96 ± 0.50	0.5
Lisina	103.88 ± 1.26	1.3	99.15 ± 0.59	0.6	100.15 ± 0.16	0.2
Isoleucina	91.02 ± 1.87	1.9	101.40 ± 0.52	0.5	100.04 ± 0.30	0.3
Leucina	91.82 ± 3.57	3.6	101.37 ± 0.06	0.1	100.08 ± 0.16	0.2
Fenilalanina	101.19 ± 1.43	1.4	101.24 ± 0.20	0.2	99.28 ± 0.57	0.6
Promedio ⁴		4.3	Promedio ⁴	1.2	Promedio ⁴	0.6

¹ % recobro = cantidad recuperada / cantidad adicionada x 100

² promedio de tres determinaciones ± σ_{n-1}

³ % C.V. = coeficiente de variación

⁴ Promedio de coeficientes de variación por nivel de adición

Tabla 13. Porcentaje de recobro¹ después de extraer, purificar, derivatizar con AGC y cuantificar por HPLC de fase reversa (promedio de 9 análisis)

Aminoácido	% recobro ²	%C.V. ³
Aspártico	106.13 ± 10.5	9.9
Serina	101.40 ± 6.65	6.6
Glutámico	100.08 ± 3.45	3.4
Glicina	97.95 ± 6.07	6.2
Histidina	102.14 ± 6.92	6.8
Arginina	98.24 ± 3.36	3.4
Treonina	100.30 ± 4.28	4.3
Alanina	101.12 ± 4.79	4.7
Prolina	98.08 ± 4.89	5.0
Cistina	100.29 ± 1.72	1.7
Tirosina	100.85 ± 1.64	1.6
Valina	100.62 ± 1.66	1.7
Metionina	100.75 ± 3.12	3.1
Lisina	101.06 ± 2.27	2.2
Isoleucina	97.37 ± 4.88	5.0
Leucina	97.76 ± 4.83	4.9
Fenilalanina	100.57 ± 1.24	1.2
Promedio ⁴		4.28

¹ % recobro = cantidad recuperada / cantidad adicionada x 100

² promedio ± σ_{n-1}

³ % C.V. = coeficiente de variación

⁴ Promedio de coeficientes de variación

El coeficiente de variación, considerando 9 repeticiones (tabla 13), es menor a 5 % en todos los casos, excepto con aspártico, serina, glicina e histidina, aunque en todos los casos el promedio aritmético está incluido en el intervalo 90 - 110 % de recobro, de hecho, el intervalo de recuperación se encuentra entre 97 y 103 %, para todos los aminoácidos, con excepción de aspártico.

La repetibilidad, considerando 9 análisis (tabla 13), resultó más baja respecto a lo que se obtuvo en las adiciones de 0.55 y 1.125 μ moles (tabla 12): se puede justificar si se considera que el recobro presentó, comparativamente, mayores deficiencias en el menor nivel de adición; pudo haber ocurrido una mayor degradación del reactivo antes de reaccionar con la totalidad de los aminoácidos por estar en concentración baja. Además, pudo haber influido la variabilidad de ubicar la línea base en el registrador, pues con picos de menor tamaño, el ruido puede provocar variaciones en la integración de las áreas por parte del sistema de registro, lo que se tradujo en sub o sobre estimaciones en algunos aminoácidos.

Esto significa que la metodología de cuantificación por HPLC de fase reversa, derivatización pre columna permite cuantificar aminoácidos de manera exacta, en presencia de los subproductos de la reacción de hidrólisis; presenta deficiencias en la repetibilidad con los primeros aminoácidos en ser eluidos, lo cual seguramente afectará la repetibilidad cuando se analicen muestras.

La relativamente menor exactitud en la cuantificación en el caso de ácido aspártico seguramente encontraría explicación si se considera que lo ideal en su caso era considerar una curva de calibración para su cuantificación y no la comparación contra un estándar.

Si se analiza la recuperación evaluada en tres niveles (tabla 12), con 0.1125 μ moles adicionadas, se obtienen recuperaciones entre 90 y 110 % para todos los aminoácidos, con excepción de aspártico, aunque la repetibilidad es baja para serina, histidina, treonina, alanina y metionina. En los dos niveles restantes, en todos los aminoácidos se obtienen porcentajes de recobro dentro del intervalo 90 - 110 %; de hecho, si se considera un intervalo más estrecho (97 - 103 %) para considerar como exacta a la metodología, en todos los casos se cumpliría con el criterio de aceptación. Para todos los aminoácidos en las adiciones de 0.55 y 1.125 μ moles, la repetibilidad es buena, todos los coeficientes de variación son menores a 5 %. En general, la repetibilidad fue peor en la recuperación de la adición menor (0.1125 μ moles) y mucho mejor cuando la adición fue mayor (1.125 μ moles), considerando que en este último caso, se derivatizó una mayor proporción de aminoácidos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se ha comprobado que el método es capaz de derivatizar los aminoácidos de 10 μL de soluciones de hasta 400 μg de nitrógeno por mL, aunque lo ideal es preparar soluciones que se encuentren en el punto medio de la curva de recuperación, con la finalidad de asegurar que todas las respuestas sean generadas dentro del intervalo de linealidad encontrado para cada aminoácido y disminuir la posibilidad de que se presenten deformaciones en las bandas cromatográficas por la saturación de la columna, además de lograr recuperaciones cercanas a 100 %, con repetibilidad adecuada. De este modo, las muestras con porcentajes elevados de proteína se deben rehidratar en volúmenes mayores y viceversa, de modo que la concentración después de rehidratar sea de alrededor de 0.5 – 1 mg de proteína hidrolizada por mL.

El punto crítico de la preparación de la muestra, es la adición del estándar interno, pues permite compensar los errores involucrados durante el proceso mencionado, de tal modo que es posible cuantificar con exactitud y repetibilidad razonables los aminoácidos de 40 a 400 μg de nitrógeno por mL.

En la exactitud, linealidad y repetibilidad del método de extracción, purificación, derivatización y cuantificación de aminoácidos, la presencia de hidratos de carbono, sometidos al proceso de hidrólisis, no generó interferencias que disminuyeran la calidad del análisis. Lo más adecuado para evaluar el recobro hubiese sido contar con una proteína caracterizada, esto con el objetivo de incluir las posibles interacciones que ocurren en el seno del tubo de hidrólisis, de modo que fueran consideradas en la adecuación de los procesos de extracción, purificación y derivatización.

Todo esto permite confirmar la posibilidad de llevar a cabo el análisis rutinario de aminoácidos del material proteínico de cereales y leguminosas (matrices con porcentajes elevados de hidratos de carbono) por HPLC de fase reversa, derivatizando con AQC, en presencia de los subproductos de reacción asociados a los hidratos de carbono, lo cual permite confirmar lo que establecieron Cohen y de Antonis en 1994, al llevar el sistema de cuantificación más allá del análisis de péptidos y proteínas puros [35-36].

2.5 Sensibilidad

A partir de las curvas de calibración se determinaron los límites de cuantificación (mínimo cuantificable con certeza) y de detección (mínima concentración detectable pero no necesariamente cuantificable). Durante la etapa de desarrollo del protocolo se encontró que la respuesta de estos cuatro aminoácidos fue la más cercana al límite inferior del intervalo de linealidad presentado (tabla 9).

Tabla 14. Límites de cuantificación y detección de cistina, metionina y tirosina

Aminoácido	Límite de Detección (mM)	Límite de cuantificación (mM)
Cistina	0.003	0.008
Metionina	0.005	0.015
Tirosina	0.008	0.025
Histidina	0.005	0.014

Aun cuando se sabe que las determinaciones hechas cerca de los límites del intervalo de linealidad son menos certeras [62], la obtención del límite de cuantificación permite obtener resultados confiables más allá de los límites evaluados. En el caso de tirosina coincide con el punto más bajo de la curva de calibración correspondiente.

El límite de detección permite establecer la presencia de cantidades muy bajas de estos aminoácidos, aun cuando no pueden cuantificarse con confiabilidad, permite establecer la mínima cantidad del aminoácido que produce una respuesta, a las condiciones de trabajo.

2.6 Especificidad

Cuando se sometieron al proceso de extracción, purificación y derivatización 10 mg de hidratos de carbono *hidrolizados*, solo se generó la respuesta correspondiente a aminoquinolina, amoníaco y norleucina (figura 10), lo cual era esperado.

Cuando se realizó un blanco de reactivos (agua, amortiguador y AQC), también se produjo una señal con el mismo tiempo de retención que el amoníaco del estándar. Esto implica que el proceso de derivatización, por sí solo, genera una respuesta que coincide con la que generaría la presencia de amoníaco y que necesariamente tendría que aparecer en esta evaluación.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Esto significa que en el método no se generan respuestas relacionadas a los productos de degradación de los hidratos de carbono después de *hidrolizantes*; solo hay respuesta provocada por la presencia de compuestos con grupos amino (primarios o secundarios) en las muestras, de acuerdo con el protocolo de extracción y purificación elaborado.

También se concluye que no es posible cuantificar amoníaco, pues parece no haber manera de controlar la respuesta que se genera de manera inherente a la derivatización y que coincide con la señal de amoníaco.

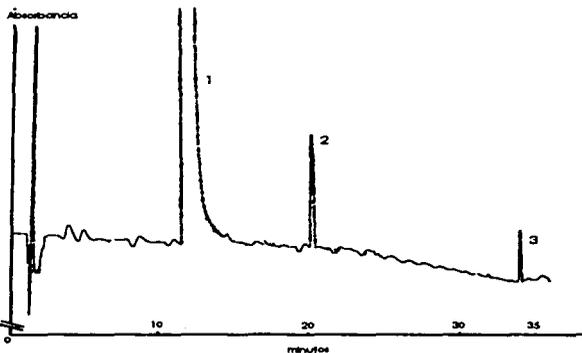


Figura 10. Especificidad del método

Hidrolizado de 10 mg de hidratos de carbono, después de haber extraído, rehidratado en 5 mL, purificado, derivatizado y analizado en HPLC.

1 AMQ, 2 NHs, 3 Norleucina (0.1 mM)

Columna Nova Pak C₁₈ 3.9 x 150 mm. Detector de UV, longitud de onda 254 nm. Atenuación 128

Aun cuando no se determinó la selectividad del método, es importante destacar que bajo las condiciones del gradiente de separación, se podrían resolver otros aminoácidos como homoserina, canavanina, homoarginina, dihidroxifenilalanina, ácido djencólico o ácido α - γ diaminobutírico, según lo reportó Zendejas en 1996 [60].

Reverter reportó la separación y cuantificación de hidroxiprolina, asparagina, taurina, citrulina, ornitina y los otros 17 aminoácidos evaluados en este proyecto, utilizando el mismo tipo de separación, modificando ligeramente el gradiente. Díaz identificó y cuantificó glucosamina y galactosamina. Sun y Chen reportaron la cuantificación de tóxicos en cuyas estructuras se encuentran grupos amino, utilizando condiciones similares [38-40].

Todos estos reportes conducen a destacar la relevancia de evaluar la selectividad del método, pues por tratarse de muestras biológicas, existe la posibilidad de que sean encontrados otros compuestos capaces de generar respuesta en el análisis a las condiciones de trabajo (desde la extracción hasta la formación de derivados) y que no necesariamente sean aminoácidos proteínicos, lo que podría afectar la exactitud del análisis, pues podrían no ser resueltos utilizando el gradiente propuesto.

2.7 Tolerancia y Robustez

No se encontró diferencia significativa ($\alpha = 0.05$) al comparar las respuestas producidas por un solo estándar de aminoácidos (0.8 mM), derivatizado, por triplicado, con AQC de dos distintos lotes. Esto es, el método de derivatización de aminoácidos con AQC, tiene tolerancia al cambio de reactivo de derivatización, por lo que solo se tendría que verificar la eficiencia del sistema y no recurrir a revalidar el método si se cambiase de reactivo de derivatización.

El método no es robusto al pH, es decir, si se modificara de alguna manera el pH del componente de la fase móvil que contiene el amortiguador de ácido fosfórico / acetato de sodio hasta llegar a 4.8, la resolución de las bandas cromatográficas se ve disminuida de modo crítico, principalmente en los primeros aminoácidos en ser eluidos (desde aspártico hasta treonina). El valor máximo de pH en donde se logra la resolución suficiente para todas las bandas es 5.2, aunque las respuestas generadas podrían diferir debido a que las moléculas pueden modificar su comportamiento en un detector de luz UV, debido a que se modifican las características de la solución [51].

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Cuando se preparó la solución con el modificador orgánico de la fase móvil (acetnitrilo:agua, 60:40) en tres días distintos, inyectando el mismo derivado de aminoácidos (0.8 mM), aunque no se modificó la resolución, se encontró diferencia significativa ($\alpha = 0.05$) en la relación de áreas que se evalúa como respuesta en los siguientes aminoácidos: serina, arginina, alanina, tirosina, lisina, leucina y fenilalanina, lo que implica que tampoco es robusto a la composición del modificador orgánico de la fase móvil.

La explicación más lógica es que aun preparando siempre de la misma manera la fase, se genera variación en su composición, en gran parte, por la volatilidad del acetnitrilo. La variación en la concentración de este en la fase móvil, genera distinta respuesta de las moléculas en el detector de luz UV, donde los aminoácidos mencionados son más susceptibles a este fenómeno, de un modo similar a lo que ocurre con las respuestas generadas en un detector de fluorescencia, donde una mayor proporción de agua, genera una variación en el comportamiento de las moléculas cuando se les incide un haz de luz [33,51].

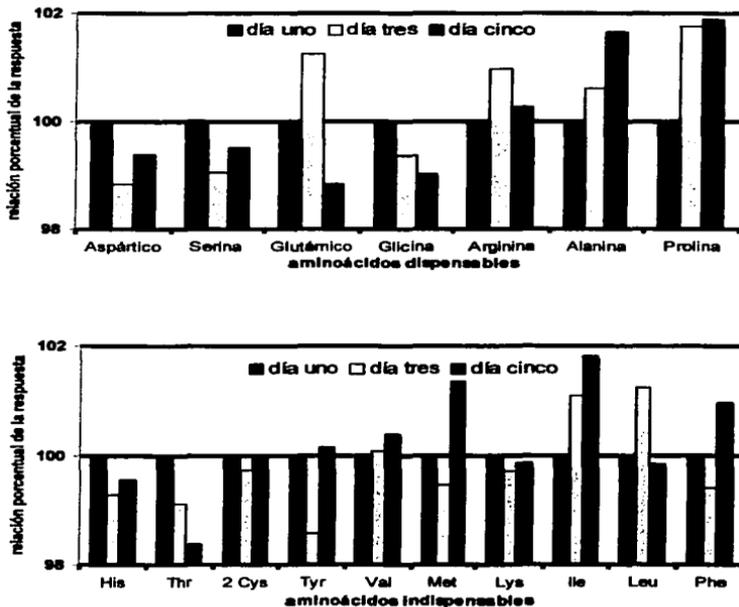
De alguna manera, esto provoca que sea preparada suficiente fase móvil para realizar análisis en intervalos relativamente cortos de tiempo (menos de una semana), para reducir al máximo la posibilidad de variaciones en las respuestas dentro de la misma serie de análisis. Además, por cada corrida se debe analizar un estándar, el cual permitirá evaluar la eficiencia del sistema y obtener la respuesta en función de la concentración para las condiciones de análisis en una sola corrida, disminuyendo la posibilidad de variación.

2.6 Estabilidad

Se derivatizó un estándar y bajo condiciones constantes, se obtuvieron las respuestas en tres días (1, 3 y 5). Se obtuvieron las relaciones porcentuales de los días 3 y 5, considerando como 100 % la respuesta registrada el día uno (figura 11).

Una vez que se formó el derivado de cada uno de los aminoácidos con AQC, la respuesta demostró mantenerse estable durante 5 días, analizando bajo las mismas condiciones cromatográficas. En ningún caso, la diferencia absoluta entre las relaciones porcentuales fue mayor a 2 %, esto significa que durante el transcurso de una semana, los derivados generan respuestas de manera constante (98 – 102 %), respecto a la que generaron el mismo día en que se realizó la reacción (100 %).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN



2 Cys = Cistina

Cistina y Tirosina son considerados aminoácidos semi indispensables

Figura 11. Estabilidad de los derivados de aminoácidos con AQC
Relación porcentual de la respuesta a los 1, 3 y 5 días

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

2.9 Repetibilidad

La repetibilidad del método se evaluó 4 veces; con la participación de tres analistas, se determinó el contenido de aminoácidos en cuatro muestras. Cuando los coeficientes de variación resultaron menores a 10 %, se consideró que el método, aplicado a una misma muestra, presentó repetibilidad suficiente, dadas las condiciones propias de las muestras y la metodología empleada.

Tabla 15. Coeficientes de variación de los análisis realizados por diferentes analistas

Aminoácido	% C.V.			
	Analista 1	Analista 2		Analista 3
		Muestra 1	Muestra 2	
Aspártico	7.1	18.1	4.3	0.4
Serina	5.0	20.2	9.6	2.5
Glutámico	8.7	21.0	1.1	5.5
Glicina	1.5	24.2	5.3	8.5
Histidina	3.4	28.3	5.0	1.9
Arginina	7.0	26.1	6.6	7.7
Treonina	2.3	23.7	8.3	4.8
Alanina	4.6	19.9	4.1	1.5
Prolina	0.7	22.7	7.4	1.6
Cistina	7.1	27.9	6.7	1.0
Tirosina	9.9	20.4	5.6	1.8
Valina	1.7	20.2	7.5	1.4
Metionina	5.7	22.7	4.2	8.9
Lisina	5.8	20.0	3.8	1.6
Isoleucina	1.2	7.4	4.3	2.9
Leucina	2.0	3.2	4.4	6.7
Fenilalanina	6.9	54.9	10.7	9.2
% C.V. promedio	4.7	22.4	5.8	4.0
Total (g/16 gN)	80.07	66.59	66.61	64.22

En negritas, los coeficientes de variación mayores a 10 %

La repetibilidad de otros métodos químicos (% C.V. $\approx 3 - 4$) o cromatográficos (% C.V. $\approx 2 - 3$) [52], es mejor que en el método empleado (% C.V. ≈ 9 , en promedio). En principio, el método de hidrólisis en fase de vapor no fue desarrollado para el análisis rutinario del contenido de aminoácidos en matrices complejas como los alimentos. Originalmente, la derivatización se realiza directamente en el tubo de hidrólisis [23,33]; además, el sistema de derivatización fue propuesto en el análisis de péptidos y proteínas puros, el reporte de su uso en el análisis de aminoácidos en alimentos requiere de metodologías distintas a la propuesta para llevar a cabo la hidrólisis y derivatización de las muestras [36].

La metodología evaluada propone el uso de mayores cantidades de muestra en la etapa de hidrólisis en fase de vapor con el objetivo de obtener mayor representatividad en la muestra y, además, poder llevar a cabo la purificación del hidrolizado con la finalidad de disminuir las posibles interferencias; las modificaciones hechas en la forma de preparar la muestra están encaminadas a facilitar el manejo y disminuir la manipulación de los hidrolizados, con relación a lo que han reportado Cohen y Zendejas [36,60]. Considerando que el método propuesto es una combinación de reacciones químicas y análisis cromatográficos, que están involucradas una etapa de extracción y una de purificación, aunado a la complejidad y heterogeneidad de las matrices analizadas, se justifica el que no se sea tan estricto con el parámetro de repetibilidad; después de todo, se ha adaptado una metodología que no fue diseñada para el análisis rutinario de aminoácidos en alimentos, obteniendo repetibilidades adecuadas.

La hidrólisis con mayores cantidades de muestra implica menor variabilidad, pues la muestra analizada es más representativa, cuando Cohen y De Antonis [36] aplicaron este principio, obtuvieron mejor repetibilidad (% C.V. promedio = 1.3) a la presentada aquí, empleando la derivatización con AQC y el análisis por HPLC de fase reversa en el análisis de granos, sin especificar cuales.

Existen otros reportes en donde se emplea la metodología de hidrólisis con características similares a lo publicado por Cohen y De Antonis [36] y Lucas y Sotelo [14], en donde la repetibilidad, con distintos métodos de cuantificación, es más parecida a lo que se ha obtenido con la metodología propuesta: % C.V. promedio = 5.9 en el análisis de leche en polvo por HPLC de fase reversa, derivatización pre columna con fenilisotiocianato [22] y % C.V. promedio = 9.9 en el análisis de la harina destoxificada de *Erythrina americana* por cromatografía de intercambio iónico [63], además, durante el desarrollo de este trabajo, los coeficientes de variación cuando se analizaron muestras por cromatografía de intercambio iónico (de acuerdo con Lucas y Sotelo, 1982 [14]) fueron mayores a los obtenidos cuando se analizó la misma muestra con la metodología propuesta (tablas 16 – 18).

Lo anteriormente expuesto, justifica el que sea considerado como aceptable, la repetibilidad del análisis por triplicado cuando se han obtenido coeficientes de variación promedio de entre 4 y 6 %.

Un mismo analista (2) obtuvo repeticiones aceptables en el análisis de una de las dos muestras trabajadas por él. Aunque el diseño experimental de ésta prueba no incluyó una intromisión más profunda en las características de las muestras analizadas, se podría inferir que la homogeneidad de la muestra 1 no era adecuada. Sin ningún elemento que sustente con fuerza esta suposición, lo más recomendable para solucionar la problemática que se presentó, tendría que haber sido considerar una mayor cantidad de muestra a hidrolizar por repetición o un número mayor de repeticiones a partir de pesadas independientes.

3. EXACTITUD DEL MÉTODO. COMPARACIÓN CONTRA EL ANÁLISIS TRADICIONAL

Se determinó el contenido de aminoácidos en tres muestras utilizando el método tradicional (hidrólisis con HCl a reflujo; cromatografía de intercambio iónico), el método propuesto (hidrólisis con HCl en fase de vapor; HPLC de fase reversa) y una combinación de ambos.

Tabla 16. Contenido de aminoácidos en frijol Negro Jamapa

Aminoácido	Contenido de aminoácidos ¹	
	Método tradicional ²	Método propuesto ³
Metionina	0.84 ± 0.07 (8.0)	0.13 ± 0.01 (8.9)
Ustina	5.08 ± 1.15 (22.7)	5.49 ± 0.09 (1.6)
Isoleucina	1.71 ± 0.07 (3.9)	4.00 ± 0.11 (2.9)
Leucina	5.71 ± 0.74 (13.0)	6.54 ± 0.44 (6.7)
Histidina	2.10 ± 0.49 (23.2)	2.03 ± 0.04 (1.9)
Fenilalanina	3.60 ± 0.40 (11.0)	3.18 ± 0.29 (9.2)
Valina	3.51 ± 0.20 (5.7)	4.77 ± 0.07 (1.4)
Treonina	3.56 ± 0.29 (8.0)	2.46 ± 0.12 (4.8)
Cistina	0.53 ± 0.11 (20.6)	0.09 ± 0.001 (1.0)
Tirosina	2.48 ± 0.16 (6.3)	0.39 ± 0.01 (1.8)
Aspártico	11.68 ± 3.07 (26.3)	7.58 ± 0.03 (0.4)
Glutámico	10.45 ± 0.97 (9.2)	10.34 ± 0.57 (5.5)
Glicina	8.21 ± 0.40 (4.9) ⁴	2.55 ± 0.22 (8.5)
Alanina		4.09 ± 0.06 (1.5)
Prolina	4.05 ± 0.35 (8.7)	3.08 ± 0.05 (1.6)
Serina	4.94 ± 0.62 (12.7)	2.93 ± 0.07 (2.5)
Arginina	5.04 ± 0.61 (12.1)	4.53 ± 0.35 (7.7)
Total (g / 16 g N)	73.49	64.22
Promedio % C.V.	12.3	4.0

¹ g / 16 g N ± desviación estándar (% coeficiente de variación)

² Hidrólisis con HCl 6 N a reflujo a 145° C. 4 horas. Análisis por cromatografía de intercambio iónico, derivatización post columna con ninhidrina

³ Hidrólisis con HCl 6 N en fase de vapor a 145° C. 4 horas. Análisis por HPLC de fase reversa, derivatización pre columna con AQC

⁴ Suma de alanina y glicina

En negritas, los aminoácidos indispensables. Cistina y Tirosina son considerados semi indispensables

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 17. Contenido de aminoácidos en maíz

Aminoácido	Contenido de aminoácidos ¹	
	Método tradicional ²	Método propuesto ³
Metionina	0.97 ± 0.09 (9.4)	0.10 ± 0.01 (10.0)
Lisina	1.80 ± 0.31 (17.3)	1.60 ± 0.16 (10.1)
Isoleucina	2.33 ± 0.90 (38.8)	2.94 ± 0.03 (1.2)
Leucina	7.65 ± 0.75 (9.8)	8.12 ± 0.28 (3.4)
Histidina	2.42 ± 0.35 (14.3)	3.12 ± 0.17 (5.6)
Fenilalanina	2.73 ± 0.43 (15.6)	1.97 ± 0.07 (3.7)
Valina	3.76 ± 0.31 (8.4)	5.18 ± 0.34 (6.7)
Treonina	3.68 ± 0.53 (14.4)	3.20 ± 0.15 (4.6)
Cistina	1.24 ± 0.05 (3.7)	0.26 ± 0.01 (3.8)
Tirosina	2.85 ± 0.24 (8.4)	0.40 ± 0.04 (10.0)
Aspártico	5.52 ± 1.79 (32.4)	4.50 ± 0.44 (9.8)
Glutámico	6.80 ± 0.81 (11.9)	11.91 ± 0.28 (2.4)
Glicina	13.05 ± 1.63 (12.5) ⁴	3.69 ± 0.35 (9.6)
Alanina		9.17 ± 0.28 (3.0)
Prolina	7.22 ± 0.86 (11.9)	7.64 ± 0.31 (4.1)
Serina	2.81 ± 0.16 (5.7)	2.81 ± 0.05 (1.9)
Arginina	3.61 ± 0.62 (17.1)	2.00 ± 0.16 (8.0)
Total (g / 16 g N)	68.43	66.45
Promedio % C.V.	14.5	5.9

¹ g / 16 g N ± desviación estándar (% coeficiente de variación)

² Hidrólisis con HCl 6 N a reflujo a 145° C, 4 horas. Análisis por cromatografía de intercambio iónico, derivatización post columna con ninhidrina

³ Hidrólisis con HCl 6 N en fase de vapor a 145° C, 4 horas. Análisis por HPLC de fase reversa, derivatización pre columna con AQC

⁴ Suma de alanina y glicina

En negritas, los aminoácidos indispensables. Cistina y Tirosina son considerados semi indispensables

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 18. Contenido de aminoácidos en frijol Escumite

Aminoácido	Contenido de aminoácidos ¹		
	Método tradicional ²	Combinación ³	Método propuesto ⁴
Metionina	0.84 ± 0.10 (11.6)	< 0.005 µmol/mL ⁶	0.21 ± 0.03 (13.4)
Lisina	8.06 ± 1.15 (14.2)	4.43 ± 1.43 (32.3)	5.64 ± 0.11 (1.9)
Isoleucina	1.87 ± 0.32 (16.8)	3.13 ± 0.48 (15.5)	4.77 ± 0.18 (3.8)
Leucina	5.37 ± 0.21 (4.0)	5.65 ± 1.15 (20.4)	7.62 ± 0.13 (1.7)
Histidina	1.86 ± 0.30 (16.2)	< 0.005 µmol/mL ⁶	2.17 ± 0.14 (6.5)
Fenilalanina	4.25 ± 0.37 (8.6)	4.72 ± 0.16 (3.4)	3.98 ± 0.67 (16.8)
Valina	4.05 ± 0.46 (11.4)	3.99 ± 0.74 (18.5)	6.12 ± 0.13 (2.2)
Treonina	3.30 ± 0.17 (5.2)	3.55 ± 0.72 (20.3)	3.44 ± 0.19 (5.5)
Cistina	0.39 ± 0.03 (8.3)	< 0.003 µmol/mL ⁶	0.09 ± 0.01 (11.1)
Tirosina	4.03 ± 0.37 (9.3)	2.86 ± 0.04 (1.5)	0.35 ± 0.04 (10.5)
Aspártico	5.55 ± 1.75 (31.4)	3.65 ± 1.26 (34.5)	8.35 ± 0.36 (4.3)
Glutámico	7.73 ± 4.00 (51.8)	4.54 ± 1.71 (37.8)	11.98 ± 0.19 (1.6)
Glicina	6.85 ± 1.46 (21.3) ⁵	3.65 ± 1.00 (27.5)	3.43 ± 0.12 (3.5)
Alanina	3.93 ± 0.84 (21.4)	3.93 ± 0.84 (21.4)	4.56 ± 0.18 (3.9)
Prolina	4.74 ± 0.46 (9.8)	3.36 ± 0.50 (15.0)	4.08 ± 0.18 (4.3)
Serina	2.93 ± 0.85 (29.0)	8.53 ± 4.65 (54.5)	3.09 ± 0.56 (18.2)
Arginina	5.03 ± 1.11 (22.0)	4.14 ± 0.64 (15.4)	5.63 ± 0.19 (3.4)
Total (g / 16 g N)	67.22	60.13	75.51
Promedio % C.V.	16.94	22.7	6.6

¹ g / 16 g N ± desviación estándar (% coeficiente de variación)

² Hidrólisis con HCl 6 N a reflujo a 145° C, 4 horas. Análisis por cromatografía de intercambio iónico, derivatización post columna con ninhidrina

³ Hidrólisis con HCl 6 N a reflujo a 145° C, 4 horas. Análisis por HPLC de fase reversa, derivatización pre columna con AQC

⁴ Hidrólisis con HCl 6 N en fase de vapor a 145° C, 4 horas. Análisis por HPLC de fase reversa, derivatización pre columna con AQC

⁵ Suma de alanina y glicina

⁶ límite de detección

En negritas, los aminoácidos indispensables. Cistina y Tirosina son considerados semi indispensables

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El análisis por cromatografía por intercambio iónico requiere de mucha manipulación durante la preparación (extracciones, evaporación del exceso de HCl a presión reducida, ajuste de pH, dilución); aun cuando se cuenta con un estándar interno para corregir posibles errores durante la preparación del hidrolizado, los coeficientes de variación obtenidos son altos (columna método tradicional de las tablas 16 a 18).

En lo concerniente al análisis de las tres muestras, la resolución del equipo para algunos pares de aminoácidos (glutámico - treonina, treonina - serina, prolina - cistina, valina - metionina) no fue buena en todos los análisis; no hubo la posibilidad de medir el ancho del pico a la mitad de la altura, pues no se logró la separación de ciertos pares de aminoácidos, al menos en el mismo nivel que se alcanzó cuando se llevó a cabo el análisis del estándar de referencia.

Seguramente, la naturaleza química de las muestras y la consecuente dificultad de ajustar el pH en los hidrolizados, provocaron modificaciones de la fuerza iónica en el sistema de análisis, alterándose los equilibrios de disociación de los aminoácidos y, por lo tanto, se modificó el grado de adsorción de cada aminoácido cargado a la columna de intercambio, dando como resultado deficiencias en la separación y pureza de cada banda. Cuando ocurrió así, la estimación de cada aminoácido no resuelto se realizó comparando la relación de altura de dichos picos a norleucina, contra la relación de altura de la banda respectiva a norleucina en el estándar.

Esta suposición podría ser menos válida que la estimación por comparación de áreas, sobretodo si se considera que las modificaciones en la fuerza iónica del sistema de análisis provocan picos más anchos o más delgados que en un estándar, lo que forzosamente implica que la altura de un pico dado no es, en el sentido estricto, directamente proporcional a la concentración.

La baja resolución pudo provocar variabilidad en la estimación, pues no habría manera de conocer con que grado una banda contaminó a la banda adyacente, pues la resolución se modificó entre repeticiones.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Además de la baja resolución, la deriva de la línea base también pudo provocar la alta variabilidad de los resultados que se obtuvieron; en este estudio la decisión de ubicar la línea base fue del analista, pero muchas veces el flujo de solventes no fue constante durante la obtención de un aminograma, provocando diferentes comportamientos de la línea base entre cada repetición y, por lo tanto, el uso de distintos criterios en la decisión. La obtención de las áreas (altura x ancho del pico a la mitad de la altura) pudo también ser fuente de variación, más en el caso de picos muy delgados o bandas con forma irregular (fenilalanina y tirosina).

Aunque sea considerada como metodología de referencia, el análisis de aminoácidos por cromatografía de intercambio iónico fue poco reproducible, y más si se compara con en el análisis de aminoácidos por HPLC de fase reversa (columna *método propuesto* en las tablas 16 a 18), en donde los coeficientes de variación fueron menores utilizando las mismas muestras, aun cuando se utilizó menos material para hidrolizar, lo que supondría menor representatividad.

Es difícil decidir acerca de la exactitud del método propuesto si se considera que el estudio que serviría como referencia fue poco preciso.

Lo ideal sería contar con un péptido o proteína de composición y/o secuencia conocidos para simular muestras de distintos contenidos de proteína y evaluar más certeramente el recobro de cada uno de los aminoácidos con el método propuesto, considerando las posibles interacciones que formarían los hidratos de carbono con los aminoácidos cuando éstos se liberan del enlace peptídico y que tentativamente involucrarían deficiencias en el recobro.

Aun así se evaluaron los resultados obtenidos con la metodología propuesta, tomando como punto de partida los resultados arrojados del análisis de aminoácidos con la metodología puesta a punto por Lucas y Sotelo [14].

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Cuando se compararon los resultados obtenidos por ambos métodos, se encontró que en los tres casos hubo degradación considerable de cistina, metionina y tirosina cuando se realizó la hidrólisis con HCl 6 N en fase de vapor a 145° C, 4 horas. Se degradó aproximadamente el 85 % de metionina en frijol negro Jamapa, el 90 % en maíz y el 75 % en frijol Escumite; cistina fue destruida en un 83 % en frijol negro Jamapa, 80 % en maíz y 75 % en frijol Escumite. Se sabía que la hidrólisis ácida, en presencia de hidratos de carbono, mantenía inestables a los aminoácidos azufrados [64], aunque se tenía reportado mayor estabilidad de metionina cuando se realizó la hidrólisis en fase de vapor del material proteínico purificado [65].

En las tres muestras, el contenido de isoleucina y valina (aminoácidos en donde es más difícil romper el enlace peptídico [25,64,66]) fue mayor con la hidrólisis en fase de vapor, tal vez fue más eficiente la acción de los vapores de HCl que el reflujo. El mismo efecto se presentó con leucina en el frijol Escumite.

En los tres análisis se determinaron cantidades menores de fenilalanina cuando se realizó el análisis con el método propuesto, aunque sólo en maíz fue considerable la deficiencia; la estimación por cromatografía de intercambio iónico pudo ser deficiente, pues no se encontraron reportes de su degradación durante la hidrólisis en fase de vapor directamente sobre las muestras; en cambio, la banda que produce en la cromatografía de intercambio iónico no es de tipo gaussiana y se presenta en la parte final de la elución de los aminoácidos ácidos y neutros, lugar donde la deriva de la línea base es considerable, dificultando la obtención del área de este aminoácido.

Quizá la comparación de los resultados frente al método tradicional muestre que la metodología propuesta difiere en la cuantificación de aspártico, glutámico, alanina, glicina y lisina, pero se debe mencionar que en el análisis por cromatografía de intercambio iónico, estos aminoácidos generaron respuestas muy grandes, dificultando la estimación manual del área de sendos aminoácidos, por lo que pudieron ser estimados con más error, aspártico, glutámico y alanina-glicina en las tres muestras y lisina en las dos muestras del género *Phaseolus*, a diferencia del análisis por HPLC, en donde se obtuvieron respuestas dentro del intervalo de linealidad encontrado, la obtención de áreas no estuvo sujeta a la variabilidad que se presentó en la estimación por intercambio iónico y, además, no se tiene reporte de que sean degradados durante el proceso de hidrólisis, sea cual fuere [25].

Prolina, serina, treonina y tirosina, se degradan gradualmente durante la hidrólisis ácida. La cinética de destrucción de estos aminoácidos no es la misma siempre, depende del tipo de matriz en donde se encuentran los aminoácidos y de las condiciones químicas que prevalecen durante la reacción de hidrólisis [25,36,64,66], es por eso que la comparación es distinta en las tres muestras: respecto a lo cuantificado en la hidrólisis con HCl 6 N a reflujo, con la hidrólisis en fase de vapor hubo menor recuperación de serina en frijol negro Jamapa, se determinó menor cantidad de prolina en los dos géneros de *Phaseolus* y se cuantificó menor cantidad de treonina en frijol negro Jamapa y maíz, aunque en todos el recobro comparativo estuvo por encima de 60 %; no obstante, se debe considerar que la cuantificación por intercambio iónico no fue precisa y que no necesariamente el recobro es mejor cuando se emplea el reflujo durante la hidrólisis.

El que en algunos casos se presenten mejores recobros comparativos cuando se hidroliza con HCl a reflujo, no significa que no se presente degradación de estos aminoácidos, porque seguramente las cinéticas de destrucción difieren entre los dos métodos. Lo mismo ocurriría con los demás aminoácidos, seguramente la hidrólisis de los enlaces amida difiere entre metodologías y aun entre pares de aminoácidos involucrados.

Si la preparación de la muestra durante el análisis por intercambio iónico fue inadecuada y no se incluyó el paso que permite la oxidación a cistina de la cisteína presente, provoca que coeluya con prolina durante el análisis por cromatografía de intercambio iónico, sobre estimando prolina y obviamente subestimando cistina [64].

Teóricamente, el uso de fenol en el ácido clorhídrico empleado en la hidrólisis permite secuestrar los agentes oxidantes que se encuentran como contaminantes en la solución, en ambos métodos [36], una de las ventajas principales de la hidrólisis en fase de vapor es que dichos contaminantes estarían fuera del alcance de los aminoácidos, con lo que de alguna manera se controla el grado en que se degradan los cuatro aminoácidos mencionados [67-68].

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El caso de tirosina es de especial relevancia, la degradación fue del 85 % en el frijol negro Jamapa y en el maíz y de 92 % en el caso de frijol Escumite (85 % si se compara contra el resultado obtenido en la combinación de métodos, tabla 18). Esto significa que en este aminoácido en especial, el fenol no actúa como protector en la hidrólisis en fase de vapor, por lo que seguramente los componentes propios de cada muestra son los responsables del distinto grado de destrucción, a diferencia de la hidrólisis a reflujo, donde la presencia de fenol permite recuperar el 95 %, al menos [64]

Los reportes que se tienen respecto a la comparación de métodos de análisis de aminoácidos involucran, en general, el mismo sistema de hidrólisis y difieren únicamente en el sistema de cuantificación: habitualmente se reportan buenos resultados cuando se comparan los sistemas de derivatización (fenilisotiocianato o AQC) con el análisis por cromatografía de intercambio iónico (derivatizando con ninhidrina para la detección de los aminoácidos) [33-34].

Cuando se realizó la hidrólisis tradicional (HCl 6 N, a reflujo a 145° C, 4 horas) y se realizó el análisis del contenido de aminoácidos de frijol Escumite por HPLC de fase reversa, se encontró muy baja repetibilidad (columna combinación de la tabla 18), seguramente por la excesiva manipulación involucrada durante la preparación de los hidrolizados, pues se requiere de realizar diluciones para llevar la cantidad de proteína hidrolizada al intervalo dinámico que se ha reportado anteriormente en este estudio.

Aun con la baja repetibilidad hallada, se podría inferir que la cuantificación realizada por cromatografía de intercambio iónico, tiene deficiencias, sobre todo en la obtención manual de las áreas de los aminoácidos; ya se ha comprobado que el método de derivatización es exacto y, por lo tanto, la cuantificación debería proveer los mismos resultados pues únicamente ha cambiado la forma de obtener la respuesta de cada aminoácido.

Podría decirse que los aminoácidos lisina, tirosina, aspártico, glutámico, prolina, e isoleucina fueron mal estimados, al menos en el frijol Escumite, todo a causa de la problemática expuesta antes: respuestas muy grandes, deriva de la línea base y falta de resolución. El valor excesivamente alto de serina en la combinación se podría explicar si se considera que la manipulación afectó la calidad del análisis, provocando inestabilidad en la línea base cuando fue eluido este aminoácido, dando lugar a estimaciones con errores grandes.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La imposibilidad de cuantificar histidina, cistina y metionina se explica si se considera que las diluciones efectuadas para mantener el hidrolizado dentro del intervalo dinámico, llevaron la concentración de estos tres por debajo del límite de cuantificación del método, aunque existe la posibilidad de que la hidrólisis efectuada también provoque su degradación (cistina y metionina) [33,68-71], de modo que la cuantificación por cromatografía les sobrestima por las causas ya mencionadas, pues aunque la hidrólisis propuesta permite obtener los rendimientos máximos de la mayoría de los aminoácidos, no implica que éstos no se degraden.

Aunque la combinación podría llegar a ser muy útil en el análisis rutinario de aminoácidos en cereales y leguminosas, se debe estudiar la posibilidad de encontrar una metodología que permita disminuir la manipulación y, principalmente, que garantice la obtención de hidrolizados dentro de un intervalo dinámico tal, que se asegure la correcta derivatización de todos los aminoácidos, ya que la metodología que Cohen y De Antonis propusieron [36] no especifica si con el mismo protocolo se pueden analizar cereales, leguminosas u otros alimentos de manera rutinaria.

La metodología propuesta tiene como ventajas principales menor manipulación durante la hidrólisis de la muestra, la derivatización y cuantificación por HPLC son exactas y, en general, tiene mayor repetibilidad que el análisis por cromatografía de intercambio iónico. La desventaja más importante es que el grado de degradación de cistina, metionina y tirosina cuando se someten las muestras a hidrólisis en fase de vapor, excede el que podría presentar la hidrólisis con HCl a reflujo. Cabe destacar que se ha reportado que los mayores índices de degradación se presentan con muestras con contenidos elevados de hidratos de carbono [68,70-71].

La calidad del análisis rutinario se mejoraría de modo apreciable si se considerase realizar protocolos alternos de hidrólisis, tal y como se realiza en la mayoría de los reportes de análisis de aminoácidos con que se cuenta, pues una vez más se ha comprobado que la principal fuente de deficiencias en la estimación del contenido de aminoácidos es la hidrólisis.

La hidrólisis alcalina, que permite la cuantificación de triptofano, permitiría además, determinar el contenido de tirosina, pues bajo esas condiciones no se presentaría degradación [64,66,68].

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los aminoácidos azufrados en alimentos casi siempre son llevados a su forma oxidada más estable (ácido cisteico en el caso de cist(e)ina, y metionin sulfona para metionina), esto permite lograr recobros mayores respecto a los que se obtienen con la hidrólisis tradicional, sin importar si la cuantificación se realiza por cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de gases o HPLC de fase reversa [68,71].

La calidad del análisis mejoraría si se considerase la opción de oxidar la muestra (con ácido per fórmico) antes de realizar la hidrólisis en fase de vapor, aunque necesariamente se tendría que realizar otro tipo de hidrólisis, pues la oxidación destruye tirosina, fenilalanina y triptofano [19,68-70]

Otra opción que permitiría mejorar la calidad del análisis sería la obtención de factores de corrección para la obtención de los máximos rendimientos, evaluando el efecto del tiempo de hidrólisis en la concentración obtenida para cada aminoácido, donde el intercepto al tiempo cero, representa el contenido original del aminoácido en la muestra.

Aunque idealmente este tipo de experimentos se diseñan para una muestra en particular, podrían proporcionar un buen índice de la calidad de la proteína de cereales y leguminosas, si se lograsen obtener modelos matemáticos que permitieran, con el análisis de solo dos o tres puntos, obtener el contenido real de cistina, metionina y tirosina en la muestra [21,64,66].

El análisis expuesto anteriormente permite establecer que, al menos, la metodología de extracción, purificación, derivatización y cuantificación de los aminoácidos, cuando ya se ha roto el enlace que los mantiene unidos, es válida; cumple adecuadamente con el objetivo para el que fue diseñada. En cambio, el proceso de hidrólisis puede considerarse válido para cuantificar 14 aminoácidos con confiabilidad: aspártico, serina, glutámico, glicina, histidina, arginina, alanina, prolina, valina, lisina, isoleucina leucina y fenilalanina.

4. ANÁLISIS DE MUESTRAS

Cuando se decidió que el protocolo era válido, aunque solo para 14 aminoácidos, se decidió llevar a cabo la cuantificación de aminoácidos en distintas muestras con la finalidad de comprobar su aplicabilidad a matrices distintas a las empleadas durante la validación.

Tabla 19. Contenido de aminoácidos ¹ en distintas muestras con menos de 20 % de proteína

Aminoácido	Residuo de vid	Aroz	Grano de Sorgo	Sorgo germinado	Grano de trigo	Trigo germinado
Metionina	0.56	0.34	0.26	0.21	0.18	0.34
Lisina	5.28	2.04	2.09	2.72	2.08	2.84
Isoleucina	3.92	2.94	4.43	4.54	3.71	4.26
Leucina	6.33	7.13	8.13	10.94	6.29	6.59
Histidina	3.19	2.66	3.75	3.10	3.16	3.31
Fenilalanina	3.34	3.52	3.67	3.87	3.70	4.31
Valina	5.00	6.39	5.59	5.97	4.51	5.36
Treonina	2.92	1.45	1.91	2.12	1.82	2.54
Cistina	0.01	0.27	0.28	0.28	0.21	0.18
Tirosina	0.61	0.36	0.42	0.49	0.21	0.32
Aspártico	8.36	6.21	5.40	4.12	4.08	6.73
Glutámico	15.17	11.87	14.44	12.63	18.00	10.31
Glicina	7.08	3.63	3.62	4.10	4.23	4.50
Alanina	4.54	5.39	8.69	8.12	3.32	4.95
Prolina	5.19	3.85	8.28	6.78	9.51	5.96
Serina	3.31	2.88	3.84	4.05	3.32	2.70
Arginina	5.16	4.97	2.93	2.72	3.25	3.38
Total ¹	80.07	65.90	77.73	76.76	71.58	68.58
Total indispensables ¹	30.6	27.1	30.53	34.24	25.87	30.05
% N x 6.25 ²	11.31	9.38	9.06	9.50	12.44	15.00

¹ g / 16 g N

² porcentaje de nitrógeno en base seca y desengrasada

En **negritas**, los aminoácidos indispensables. Cistina y Tirosina son considerados semi indispensables

%C.V. < 10

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 20. Contenido de aminoácidos ¹ en distintas muestras del género *Phaseolus*

Aminoácido	Frijol comba	Frijol comba germinado	Frijol Tepari	Frijol Tepari germinado	Frijol Escumite	Frijol Escumite germinado
Metionina	0.22	0.21	0.22	0.30	0.21	0.23
Lisina	4.35	4.81	7.45	5.91	5.64	4.78
Isoleucina	4.68	5.47	5.30	5.49	4.77	4.77
Leucina	7.04	8.22	8.43	8.40	7.62	7.00
Histidina	3.95	3.37	3.06	2.70	2.17	1.83
Fenilalanina	5.45	5.88	4.63	5.36	3.98	4.32
Valina	5.57	6.11	6.65	6.65	6.12	5.28
Treonina	3.59	2.72	3.35	3.33	3.44	2.60
Cistina	0.11	0.12	0.13	0.13	0.09	0.10
Tirosina	0.95	0.40	0.72	0.63	0.35	0.50
Aspártico	6.79	9.36	9.46	10.91	8.35	8.08
Glutámico	12.77	14.25	23.71	19.11	11.98	13.03
Glicina	6.65	3.85	6.11	4.62	3.43	3.30
Alanina	5.41	5.16	6.20	5.59	4.56	3.96
Prolina	3.68	4.49	4.25	4.03	4.08	3.26
Serina	9.83	4.57	7.19	5.72	3.09	3.75
Arginina	3.69	3.96	4.51	4.60	5.63	3.52
Total ¹	84.69	82.83	101.4	93.48	75.51	70.31
Total indispensables ¹	35.89	37.18	39.94	38.90	25.87	31.41
% N x 6.25 ²	21.31	24.94	23.44	27.06	24.31	27.50

¹ g / 16 g N

² porcentaje de nitrógeno en base seca y desengrasada

En negritas, los aminoácidos indispensables. Cistina y Tirosina son considerados semi indispensables

%C.V. < 20

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 21. Contenido de aminoácidos ¹ en distintas muestras del género *Lupinus* spp

Aminoácido	<i>Lupinus exaltatus</i>	<i>Lupinus aschenbornii</i>	<i>Lupinus angustifolius</i>
Metionina	0.26	0.20	0.14
Lisina	7.03	5.11	4.41
Isoleucina	3.88	3.50	3.68
Leucina	5.53	4.99	5.37
Histidina	2.44	1.76	2.18
Fenilalanina	1.98	1.16	1.63
Valina	4.46	3.26	3.88
Treonina	2.89	2.57	1.74
Cistina	0.30	0.19	0.15
Tirosina	1.23	0.80	0.54
Aspártico	12.49	8.03	10.57
Glutámico	26.11	27.46	28.20
Glicina	4.00	2.71	5.06
Alanina	4.25	3.05	3.39
Prolina	3.85	2.96	3.49
Serina	4.34	2.61	3.11
Arginina	9.80	7.42	8.55
Total ¹	94.84	77.78	86.09
Total indispensables ¹	30.00	23.54	23.72
% N x 6.25 ²	44.54	45.11	39.25

¹ g / 16 g N

² porcentaje de nitrógeno en base seca y desengrasada

En negritas, los aminoácidos indispensables. Cistina y Tirosina son considerados semi indispensables

%C.V. < 20

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 22. Contenido de aminoácidos ¹ en distintas muestras de la especie *Erythrina americana* (1)

Aminoácido	Semilla cruda	Semilla cocida	Germinado crudo	Germinado Cocido
Metionina	0.85	0.79	1.00	1.00
Lisina	5.73	5.69	5.66	5.47
Isoleucina	3.05	3.20	3.35	3.98
Leucina	5.33	6.04	6.07	7.48
Histidina	1.62	1.75	1.89	1.80
Fenilalanina	0.68	1.94	1.45	3.15
Valina	4.32	3.90	4.43	4.70
Treonina	3.01	2.36	2.79	2.82
Cistina	0.33	0.30	0.55	0.49
Tirosina	0.69	1.29	1.50	2.76
Aspártico	7.39	7.25	10.11	7.99
Glutámico	13.66	10.16	10.18	9.21
Glicina	3.04	1.99	2.17	2.23
Alanina	3.51	3.45	3.70	3.64
Prolina	3.79	3.59	4.31	4.42
Serina	2.53	2.69	2.80	2.86
Arginina	3.61	3.59	4.61	4.60
Total ¹	63.14	59.97	66.59	68.61
Total indispensables ¹	25.61	27.26	28.70	33.65
% N x 6.25 ²	33.01	52.44	47.05	46.65

¹ g / 16 g N

² porcentaje de nitrógeno en base seca y desengrasada

En negritas, los aminoácidos indispensables. Cistina y Tirosina son considerados semi indispensables

%C.V. < 30

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Contenido de aminoácidos ¹ en distintas muestras de la especie *Erythrina americana* (2)

Aminoácido	Ejote crudo	Ejote cocido	Semilla del ejote crudo	Semilla del ejote cocida
Metionina	0.44	0.49	0.38	0.41
Urina	6.74	6.96	7.86	5.11
Isoleucina	3.28	4.00	4.99	4.30
Leucina	5.64	6.98	8.60	7.21
Histidina	2.28	2.61	2.87	2.21
Fenilalanina	0.86	2.73	2.45	2.65
Valina	5.19	5.18	6.34	5.10
Treonina	2.45	1.96	2.93	3.09
Cistina	1.04	< 0.003 mM ³	< 0.003 mM ³	< 0.003 mM ³
Tirosina	1.31	0.63	1.05	0.89
Aspártico	14.82	10.23	11.46	5.98
Glutámico	13.99	12.93	15.25	13.47
Glicina	3.35	3.08	3.55	3.68
Alanina	4.56	4.70	5.48	3.82
Prolina	4.58	4.31	5.16	5.14
Serina	2.99	2.87	3.50	2.93
Arginina	4.04	3.09	5.58	4.80
Total¹	77.93	72.74	87.44	70.77
Total	29.60	31.53	37.46	30.96
Indispensables¹	29.60	31.53	37.46	30.96
% N x 6.25²	25.97	24.76	34.84	38.66

¹ g / 16 g N

² porcentaje de nitrógeno en base seca y desengrasada

³ límite de detección del método

En negritas, los aminoácidos indispensables. Cistina y Tirosina son considerados semi indispensables

%C.V. < 30

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Durante el análisis de las muestras que se ha presentado, participaron 5 distintos analistas, todos utilizando el protocolo descrito en el anexo III, sin realizar modificaciones a lo que se había establecido previamente.

La repetibilidad, expresada como % C.V. en cada tabla, no en todos los casos fue tan baja. Se presentaron mayores deficiencias en la cuantificación de cistina, metionina y tirosina, pues se degradan, por lo que al ser cuantificados en los límites de linealidad del método, el error es mayor. Además, la degradación de éstos podría inclusive diferir entre la misma muestra, pues como ya se dijo, no se conocen las cinéticas de degradación y los factores que podrían tener influencia durante la hidrólisis. Sin considerar los aminoácidos mencionados, los coeficientes de variación, en promedio, fueron menores a 10 %.

Las deficiencias más relevantes fueron en la cuantificación de cistina, metionina y tirosina. Resulta evidente que la destrucción, en distinto grado en cada muestra, de los aminoácidos azufrados no permite evaluar de modo confiable la posible calidad del material proteínico de los materiales analizados, pues en todos los casos éstos serían los limitantes, aun en los cereales, en donde se sabe que no ocurre así. Algo similar ocurriría con los aromáticos, debido a la degradación de tirosina.

Esto implica que es completamente necesario realizar modificaciones al protocolo propuesto o diseñar una metodología alterna, para lograr la correcta estimación de los aminoácidos; es decir, que se evalúe con exactitud la cantidad de cada aminoácido en la muestra y no únicamente estimar la cantidad a partir de una metodología en donde se obtengan máximos recobros, pues el máximo recobro no necesariamente corresponde con la cantidad real, sobre todo cuando no se han considerado extrapolaciones al tiempo cero o utilizado factores de corrección.

En lo que respecta al resto de los aminoácidos, se encontraron contenidos elevados de lisina (más de 4 g por 16 g de nitrógeno) en el residuo de vid y en todas las muestras del género *Phaseolus*, *Lupinus* y *Erythrina*, aunque solo el frijol Tepari, *Lupinus exaltatus*, el ejote crudo y cocido y la semilla del ejote de *Erythrina americana*, presentaron mayor contenido que lo reportado en el patrón de la FAO para preescolares (tabla 2); todos los cereales analizados (arroz, sorgo, sorgo germinado, trigo y trigo germinado) tuvieron menos de 3 g de lisina por 16 g de nitrógeno.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En todas las muestras hay más de 2.8 g de isoleucina por 16 g de nitrógeno (contenido de isoleucina en el patrón para preescolares, FAO/WHO, 1985); sólo arroz, sorgo, germinado de sorgo, todas las especies analizadas del género *Phaseolus*, el germinado cocido, el ejote cocido la semilla del ejote cruda y cocida de *Erythrina americana* tuvieron un contenido de leucina mayor al patrón de la FAO (6.6 g / 16 g N).

Únicamente el germinado de frijol Escumite, *Lupinus aschenbornii* y la semilla y germinado crudos y cocidos de *Erythrina americana*, presentaron menos de 1.9 g de histidina / 16 g N, cantidad establecida en el mismo patrón.

El frijol Comba y el frijol Escumite fueron los únicos casos en que se encontró mayor cantidad de treonina que en el patrón de la FAO para preescolares (tabla 2).

Todas las muestras, excepto *Lupinus aschenbornii*, presentaron contenidos mayores de valina a lo que establece el patrón de FAO.

Finalmente, se debe resaltar que la correcta y completa cuantificación de aminoácidos en los alimentos permite:

- ✓ obtener factores de conversión de nitrógeno a proteína cruda más reales [72];
- ✓ evaluar y caracterizar aislados proteínicos de materiales muy diversos o alimentos que podrían llegar a convertirse en una alternativa de relevancia en los países del tercer mundo [63,73-77];
- ✓ corregir los valores de digestibilidad en pruebas biológicas [78] y
- ✓ cuantificar proteínas altamente purificadas [79].

Es por eso que las modificaciones a la técnica que se ha presentado y que solo fue válida para 14 aminoácidos, permitirían ampliar las capacidades del análisis de aminoácidos más allá de la cuantificación de cereales y leguminosas aquí propuesta.

CONCLUSIONES

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

CONCLUSIONES

- Fueron establecidos los parámetros que permiten la derivatización, con 6-aminoquinilil-N-hidroxisuccinimidil carbamato, y cuantificación de 17 aminoácidos en HPLC de fase reversa. Se demostró su validez en términos de precisión, linealidad, sensibilidad, tolerancia y robustez.
- La metodología de extracción, purificación, derivatización y cuantificación de 17 aminoácidos, demostró ser lineal, exacta, repetible y específico: no se demostraron interferencias asociadas a la presencia de subproductos de la reacción de hidrólisis.
- Se logró adecuar la hidrólisis ácida en fase de vapor al análisis de aminoácidos en cereales y leguminosas.
- Fue obtenida una metodología que permite cuantificar aminoácidos en cereales y leguminosas, después de hidrolizar el material proteínico en fase de vapor y derivatizar los aminoácidos liberados con AQC.
- La metodología propuesta, demostró mayor repetibilidad que el análisis tradicional de aminoácidos por cromatografía de intercambio iónico, previa hidrólisis ácida a reflujo a 145° C durante 4 horas.
- La hidrólisis ácida en fase de vapor a 145° C durante 4 horas, no evita la degradación de cistina, metionina y tirosina.
- Se demostró la validez de la metodología propuesta para únicamente 14 aminoácidos: aspártico, serina, glutámico, glicina, histidina, arginina, treonina, alanina, prolina, valina, lisina, isoleucina, leucina y fenilalanina

BIBLIOGRAFÍA

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

BIBLIOGRAFÍA

1. Fisher, P., Bender, A. **Valor Nutritivo de los Alimentos**. Limusa-Noriega editores, 1ª edición, México, Pág. 69-74, 2000.
2. Lloyd, L.E., McDonald, B.E. **Fundamentos de Nutrición**. Acribia, 1ª edición, España, Pág. 103-112, 1982.
3. Rodwell, V.W. **Aminoácidos**. En **Bioquímica de Harper**, Murray, R., Granner, D., et al. El manual moderno, 13ª edición, México, Pág. 27-37, 1994.
4. Fox, B., Cameron, A. **Ciencia de los Alimentos. Nutrición y Salud**, Limusa-Noriega editores, 5ª edición, México, Pág. 179-199, 1997.
5. I.U.P.A.C. (International Union of Pure and Applied Chemistry). **Nomenclature of Organic Chemistry, Sections A, B, C, D, E, F and H**, Pergamon Press, Inglaterra, 1979.
6. Viadel, B. Alegria, A. **Amino Acid Profile of Milk-Based Infant Formulas**. Int. J. of Food Science and Nutrition. 51: 367-372, 2000.
7. FAO/WHO/UNU, Expert consultation. **Energy and Protein Requirements**, FAO/WHO Nutrition meetings, report series 724; Food and Agriculture Organization / World Health Organization: Suiza, 1985.
8. Budavari, S. (editor). **The Merck Index**. Merck & Co., Inc., 11ª edición, Estados Unidos, 1989.
9. CRC. **CRC Handbook of Chemistry and Physics**. CRC Press, Inc., Estados Unidos, Pág. 7.1, 1992.
10. Cornette, J., Cease, K., Margalit, H., Spouge, J., Berzofsky, J., DeLisi, C. **Hydrophobicity Scales and Computational Techniques for Detecting Amphipathic Structures in Proteins**, J. Mol. Biol. 195: 659-685, 1987.
11. Charton, M., Charton, B. **The Structural Dependence of Amino Acid Hydrophobicity Parameters**, J. Theor. Biol. 99:629-644, 1982.
12. Wolfenden, R., Andersson, L., Cullis, P., Southgate, C. **Affinities of Amino Acid Side Chains for Solvent Water**, Biochemistry 20: 849-855, 1981.
13. Kyle, J., Doolittle, R. **A Simple Method for Displaying the Hydrophobic Character of a Protein**, J. Mol Biol. 157: 105-132, 1982.
14. Lucas, B., Sotelo A. **Amino Acid Determination in Pure Proteins, Foods and Feeds Using Two Different Acid Hydrolysis Methods**, Analytical Biochem. 123: 349-356, 1982.
15. Solomons, G. **Química Orgánica**. Limusa Wiley, 2ª edición, México, Pág. 1311-1314, 2000.

16. Lucas, B., Sotelo, A. **Effect of Different Alkalies, Temperature and Hydrolysis Time on Tryptophan Determination of Pure Proteins and of Food.** Analytical Biochem. 109: 192-197, 1980.
17. Cohen, S. **Analysis of Sulfur-Containing Amino Acids.** Waters Lab Highlights 9/88: LAH 0377-LAH 0379, 1988.
18. Campanella, L., Crescentini, G., Avino, P. **Simultaneous Determination of Cysteine, Cystine and 18 other Amino Acids in Various Matrices by High-Performance Liquid Chromatography.** J. of Chromatography A 833: 137-145, 1999.
19. Alegría, A., Barberá, R., Lagarda, M., López, J. **HPLC Method for Cyst(e)line and Methionine in Infant Formulas.** J. of Food Science. 61(6): 1132-1135, 1996.
20. Sarwar, G., Botling, H., Peace, R., **Complete Amino Acids Analysis in Hydrolysates of Foods and Feeds by Liquid Chromatography of Precolumn Phenylisothiocyanate Derivatives.** J. Assoc. Off. Anal. Chem. 71(6): 1172-1175, 1988.
21. Albin, D.M., Wubben, J.E., Gabert, V.M. **Effect of Hydrolysis Time on the Determination of Amino Acids in Samples of Soybean Products with Ion-Exchange Chromatography or Pre Column Derivatization with Phenylisothiocyanate.** J. Agric. Food Chem. 48: 1684-1691, 2000.
22. Alegría, A., Barberá, R., Lagarda, M., López, J. **Determinación de Aminoácidos en Fórmula para Lactantes por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución en Fase Reversa.** Alimentaria. 295: 103-110, 1998.
23. Bidlingmeyer, B.A., Cohen, S.A., Tarvin, T.L. **Rapid Analysis of Amino Acids using Pre Column Derivatization.** J. Chromogr. 336: 93-104, 1984.
24. Waters. **PICO-TAG Work Station. Operator's Manual.** Waters Co., Estados Unidos, pág. 3.1-3.5, 1988.
25. White, J., Harl, R. **HPLC Analysis of Amino Acids.** En **Food Analysis by HPLC.** Nollet, L. Marcel Dekker, 1ª edición, Estados Unidos, Pág. 75-80, 1992 (1).
26. Botsoglou, N., Fletouris, D., Papageorgiou, G., Mantis, A. **Derivative Spectrophotometric Method for the Analysis of Tyrosine in Unhydrolyzed Protein, Food and Feedstuff Samples.** J. Agric. Food Chem. 41: 1635-1639, 1993.
27. Huang, Z., Ough, C. **Determination of Amino Acid Hydantoin by HPLC with Diode Array Detection.** J. Agric. Food Chem. 39: 2218-2222, 1991.
28. Rubinson, J., Rubinson, A. **Química Analítica Contemporánea.** Pearson Educación, 1ª edición, México, Pág. 4, 330-335, 405-453, 2000.
29. Skoog, D. **Análisis Instrumental.** McGraw-Hill, 4ª edición, España, Pág. 731,752, 1994.

30. White, J., Hart, R. **Derivatization Methods for Liquid Chromatographic Separation of Amino Acids.** En **Food Analysis by HPLC**, Nollet, L. Marcel Dekker, 1ª edic., Estados Unidos, Pág. 53-73, 1992 (2).
31. White, J., Hart, R., Fry, J. **An Evaluation of the Waters Pico Tag System for the Aminoacid Analysis of Food Materials.** J. of Clinical Lab. Automation. 8(4): 170-177, 1986.
32. Sato, K., Tsukamasa, Y., Chiharu, I., Ohtsuki, K., Yutaka, S., Kawabata, M. **Improved Method for Identification and Determination of ϵ -(γ -Glutamyl) Lysine Cross-Link in Protein Using Proteolytic Digestion and Derivatization with Phenyl Isothiocyanate Followed by High-Performance Liquid Chromatography Separation.** J. Agric. Food Chem. 40: 806-810, 1992.
33. Cohen, S., Michaud, D. **Synthesis of a Fluorescent Derivatizing Reagent, 6-Aminoquinolyl-N-Hydroxysuccinimidyl Carbamate, and its Application for the Analysis of Hydrolyzate Amino Acids Via High-Performance Liquid Chromatography.** Analytical Biochem. 211: 279-287, 1993.
34. Strydom, D., Cohen, S. **Comparison of Amino Acid Analyses by Phenylisothiocyanate and 6-Aminoquinolyl-N-Hydroxysuccinimidyl Carbamate Precolumn Derivatization.** Analytical Biochem. 222: 19-28, 1994.
35. De Antonis, K., Phyllis, R., Cohen, S. **High-Performance Liquid Chromatographic Analysis of Synthetic Peptides Using Derivatization with 6-Aminoquinolyl-N-Hydroxysuccinimidyl Carbamate.** Analytical Biochem. 223: 191-197, 1994.
36. Cohen, S., De Antonis, K. **Applications of Amino Acid Derivatization with 6-Aminoquinolyl-N-Hydroxysuccinimidyl Carbamate. Analysis of Feed Grains, Intravenous Solutions and Glycoproteins.** J. of Chromatography A 661: 25-34, 1994.
37. Diaz, J., Liberia, J. Comellas, L., Broto-Puig, F. **Amino Acid and Amino Sugar Determination by Derivatization with 6-Aminoquinolyl-N-Hydroxysuccinimidyl Carbamate Followed by High-Performance Liquid Chromatography and Fluorescence Detection.** J. of Chromatography A 719: 171-179, 1996.
38. Reverter, M., Torbjorn, L., Lindberg, J. **Determination of Free Amino Acids in Pig Plasma by Pre Column Derivatization with 6-Aminoquinolyl-N-Hydroxysuccinimidyl Carbamate And High-Performance Liquid Chromatography.** J. of Chromatography B 696: 1-8, 1997.
39. Sun, T., Wong, W. **Determination of Domoic Acid In Phytoplankton by High-Performance Liquid Chromatography of the 6-Aminoquinolyl-N-Hydroxysuccinimidyl Carbamate Derivative.** J. Agric. Food Chem. 47: 4678-4681, 1999.

40. Chen, X., Wang, F., Chen, Q., Chen-Qin, X., Li, Z. **Analysis of Neurotoxin 3-N-Oxalyl-L-2,3-Diaminopropionic Acid in *Lathyrus Sativus* by High-Performance Liquid Chromatography with 6-Aminoquinolyl-N-Hydroxysuccinimidyl Carbamate (AQC) Derivatization.** J. Agric. Food Chem. 48: 3383-3386, 2000.
41. http://www.waters.com/watersdivision/waters_website/applications/acqtag/peanuts.asp
Consultado el 15 de Septiembre de 2002, 19:47.
42. http://www.waters.com/watersdivision/waters_website/applications/acqtag/barley.asp
Consultado el 15 de Septiembre de 2002, 19:47.
43. I.U.P.A.C. (International Union of Pure and Applied Chemistry). **Recommendations on Nomenclature for Chromatography.** Pure Appl. Chem, 37: 447, 1974.
44. Heftmann, E. **Chromatography.** Elsevier, 5ª edición, Holanda, Pág. A171-A175, 1992.
45. Krstulovic, A. **Reverse Phase High Performance Liquid Chromatography. Theory, Practice and Biomedical Applications.** John Wiley and sons, 1ª edición, Estados Unidos, Pág., 4-31, 1982.
46. Departamento de Química Analítica. **Química Analítica Instrumental II, Manual De Laboratorio.**, PAPIME. Facultad de Química, UNAM, México, Pág. 41-42, 1999.
47. Quattrocchi, O., Abelaira, S., Laba, R. **Introducción a la HPLC. Aplicación y Práctica.** Merck-Argentina, 1ª edición, Argentina, Pág. 10-37, 65-88, 301-328, 1992.
48. Neue, U. **HPLC Columns: Theory, Technology and Practice.** Wiley, 1ª edición, Estados Unidos, Pág. 41-65, 106-122, 296-310, 1997.
49. Dolan, J. **Editorial. Guide to LC Method Development. Starting Out Right.** LCGC 18(1) 1-5, 2000.
50. Neue, U. **HPLC Troubleshooting Guide.** Waters corp., 1ª edición, Estados Unidos, Pág. 4, 15-18, 21-23, 36-37, 39, 42, 43, 48, 52, 64, 66 y 69, 2001.
51. Scott, R. **Liquid Chromatography Detectors.** Elsevier Scientific Publishing Company, 1ª edición, Holanda, Pág. 1-4, 9-20, 1977.
52. García, A., Soberón, E., Cortés, M., Rodríguez, R., Herrera, J., Alcántara, A., Chárvel, A., Mota, R., Garzón, A. **Guía de Validación de Métodos Analíticos.** Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos México, A.C., 2ª edición, México, Pág. 4, 8-11, 19-38, 44, 51, 55-86, 2002.
53. Alcántara, A., Cortés, M., Soberón, E., Herrera, J., García, A. **Validación de Métodos Analíticos en Memorias del II Simposio Nacional de Validación.** Colegio Nacional de Químicos-Farmacéuticos-Biólogos México, A.C., México, 2002.
54. Mendoza, J. **Validación de una Metodología para la Determinación de Ácido Fítico en Alimentos.** Tesis Licenciatura, UNFM, México, Pág. 40-43, 54-56, 2001.

55. Díaz de Armas, M., Hernández, I., Martínez, M., Licea, V., Gómez, L., Louro, G., Morera, Y., González, E. **Validación de Técnicas Analíticas Utilizadas en el Control de la Calidad.** Rev. Cubana Farm. 32 (2): 106-112, 1998.
56. Delgado, M. **Desarrollo de un Método Analítico para Medir el Contenido de Alcaloides en Lupinos por Cromatografía de Gases.** Tesis Licenciatura, UNAM, México, Pág. 33-37, 1998.
57. Díaz, I., Fariñas, O. **Validación del Método Analítico para la Determinación de 3 Vitaminas Hidrosolubles en un Suplemento Vitamínico.** Rev. Cubana Farm. 34(2): 93-99, 2000.
58. Williams, S. **Official Methods of Analysis of the Association of Analytical Chemists.** 14^o edición, AOAC, Estados Unidos, Pág. 16.60,249, 1984.
59. Waters. **Waters AccQ-Tag Chemistry Package. Instruction Manual.** Waters Co., Estados Unidos, pág. 5.7-5.8, 1994.
60. Zendejas, M. **Determinación de Proteína Verdadera y Cuantificación de Aminoácidos Proteínicos, Libres y Raros por HPLC en Cuatro Estados de Maduración en el Fruto *Erythrina americana*.** Tesis Licenciatura, UNAM, México, Pág. 82, 1996.
61. Waters, GelmanSciences. **Acrodisc. HPLC Syringe Filters.** Waters Co., Estados Unidos, 1995.
62. Montgomery, D. **Diseño y Análisis de Experimentos.** Grupo Editorial Iberoamérica, 1^o Edición, México, Pág. 429-4441, 1991.
63. Sotelo, A., Soto, M., Lucas, B., Giral, F. **Comparative Studies of the Alkaloidal Composition of Two Mexican *Erythrina* Species and Nutritive Value of the Detoxified Seeds.** J. Agric. Food Chem. 41: 2340 - 2343, 1993.
64. Gehrke, C., Wall, L., Absheer, J., Kaiser, F., Zumwalt, R. **Sample Preparation for Chromatography of Amino Acids: Acid Hydrolysis of Proteins.** J. Assoc. Off. Anal. Chem. 68(5): 811-821, 1985.
65. Knecht, R., Chang, J. **Liquid Chromatographic Determination of Amino Acids after Gas-Phase Hydrolysis and Derivatization with (Dimethylamino)azobenzene sulfonyl Chloride.** Anal. Chem. 58: 2375-2379, 1986.
66. Zumwalt, R., Absheer, J., Kaiser, F., Gehrke, C. **Acid Hydrolysis of Proteins for Chromatographic Analysis of Amino Acids.** J. Assoc. Off. Anal. Chem. 70(1): 147-151, 1987.
67. Strydom, D., Fett, J., Lobb, R., Alderman, E., Bethune, J., Riordan, J., Vallee, B. **Amino Acid Sequence of Human Tumor Derived Angiogenin.** Biochemistry 24: 5486-5494, 1985.
68. Elkin, R., Griffith, J. **Hydrolysate Preparation for Analysis of Amino Acids in Sorghum Grains: Effect of Oxidative Pretreatment.** J. Assoc. Off. Anal. Chem. 68(6): 1117-1121, 1987.

BIBLIOGRAFÍA

69. Gehrke, C., Rexroad, R., Schisla, R., Absheer, J., Zumwalt, R. **Quantitative Analysis of Cystine, Methionine, Lysine, and Nine other Amino Acids by a Single Oxidation-4 Hour Hydrolysis Method.** J. Assoc. Off. Anal. Chem. 70(1): 171-1174, 1987 (1).
70. McDonald, J., Krueger, M., Seller, J. **Oxidation and Hydrolysis Determination of Sulfur Amino Acids in Food and Feed Ingredients: Collaborative Study.** J. Assoc. Off. Anal. Chem. 68(5): 826-829, 1985.
71. Gehrke, C., Kuo, K., Kaiser, F., Zumwalt, R. **Analysis of Amino Acids by Gas Chromatography as the *N*-trifluoroacetyl *n*-butyl Esters.** J. Assoc. Off. Anal. Chem. 68(6): 160-170, 1987 (2).
72. Sosulski, F., Imafidon, G. **Amino Acid Composition and Nitrogen-to-Protein Conversion Factors for Animal and Plant Foods.** J. Agric. Food Chem. 38: 1351-1356, 1990.
73. Dewanji, A. **Amino Acid Composition of Leaf Proteins Extracted from Some Aquatic Weeds.** J. Agric. Food Chem. 41: 1232-1236, 1993.
74. Olaofe, O. **Amino Acid and Mineral Compositions and Functional Properties of Some Oilseeds.** J. Agric. Food Chem. 42: 878-881, 1994.
75. Chi-Wah, C., Dixon, P. **Amino Acid Composition and Subunit Constitution of Protein Fractions from Cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp) Seeds.** J. Agric. Food Chem. 42: 1857-1860, 1994.
76. Zarkadas, C., Voldeng, H., Yu, Z., Choi, V. **Assessment of the Protein Quality of Nine Northern Adapted Yellow and Brown Soybean Cultivars by Amino Acid Analysis.** J. Agric. Food Chem. 47: 5009-5018, 1999.
77. Ruiz, M., Safelo, A. **Chemical Composition, Nutritive Value, and Toxicology Evaluation of Mexican Wild Lupins.** J. Agric. Food Chem. 49: 5336-5339, 2001.
78. Sarwar, G., McDonough, F. **Evaluation of Protein Digestibility-Corrected Amino Acid Score Method for Assessing Protein Quality of Foods.** J. Assoc. Off. Anal. Chem. 73(3): 347-356, 1990.
79. Sittampalam, G., Ellis, R., Miner, D., Rickard, E., Clodfelter, D. **Evaluation of Amino Acid Analysis as Reference Method to Quantitate Highly Purified Proteins.** J. Assoc. Off. Anal. Chem. 71(4): 833-837, 1988.

ANEXOS

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

ANEXO I. FÓRMULAS DE CÁLCULO

ANEXO I. Fórmulas de cálculo

1. PRECISIÓN, REPETIBILIDAD, ADECUABILIDAD

Promedio aritmético (\bar{Y})

$$\bar{Y} = \Sigma y / n$$

Desviación estándar (σ_{n-1})

$$\sigma_{n-1} = \sqrt{\left(\frac{[(n \cdot \Sigma y^2) - (\Sigma y)^2]}{n \cdot (n-1)} \right)}$$

Coefficiente de variación (% C.V.)

$$\% \text{ C.V.} = \sigma_{n-1} / \bar{Y} \cdot 100$$

donde:

$$\Sigma y = y_1 + y_2 + \dots + y_n$$

$$\Sigma y^2 = y_1^2 + y_2^2 + \dots + y_n^2$$

y = respuesta (relación de áreas aminoácido a nortefucina)

n = número de repeticiones

2. LINEALIDAD

Pendiente (m)

$$m = \frac{(Z \cdot \Sigma xy) - (\Sigma x \cdot \Sigma y)}{Z \cdot \Sigma x^2 - (\Sigma x)^2}$$

Ordenada al origen (b)

$$b = \frac{\Sigma y - m \cdot \Sigma x}{Z}$$

Coeficiente de determinación (r^2)

$$r^2 = \frac{(Z \cdot \Sigma xy - \Sigma x \cdot \Sigma y)^2}{(Z \cdot \Sigma x^2 - (\Sigma x)^2) \cdot (Z \cdot \Sigma y^2 - (\Sigma y)^2)}$$

Intervalo de confianza para la pendiente

$$m \pm t_{0,975, n-2} \cdot \sigma_m$$

$$\sigma_m = \sigma_{y/x} \cdot \sqrt{\left(\frac{1}{\Sigma x^2 - ((\Sigma x)^2 / Z)} \right)}$$

$$\sigma_{y/x} = \sqrt{\left(\frac{\Sigma y^2 - (m \cdot \Sigma xy) - (b \cdot \Sigma y)}{Z - 2} \right)}$$

Intervalo de confianza para la ordenada al origen

$$b \pm t_{0,975, n-2} \cdot \sigma_b$$

$$\sigma_b = \sigma_{y/x} \cdot \sqrt{\left(\frac{1}{Z} + \frac{(x)^2}{\Sigma x^2 - ((\Sigma x)^2 / Z)} \right)}$$

$$x = \Sigma x / Z$$

Coeficiente de variación de regresión ($CV_{x/y}$)

$$CV_{x/y} = \sigma_{y/x} / \hat{y} \cdot 100$$

donde:

$$\Sigma x = x_1 + x_2 + x_3 + \dots + x_n$$

$$\Sigma y = y_1 + y_2 + y_3 + \dots + y_n$$

$$\Sigma x^2 = x_1^2 + x_2^2 + x_3^2 + \dots + x_n^2$$

$$\Sigma y^2 = y_1^2 + y_2^2 + y_3^2 + \dots + y_n^2$$

$$\Sigma xy = x_1 y_1 + x_2 y_2 + x_3 y_3 + \dots + x_n y_n$$

X	f(x)
x_1	y_1
x_2	y_2
x_3	y_3
\vdots	\vdots
x_n	y_n

Z = número total de datos (x y f(x)); $Z \cdot n$

X = nivel de concentración o adición;

Y = respuesta (relación de áreas aminoácido a nortecina)

ANEXO I. FÓRMULAS DE CÁLCULO

3. PARÁMETROS CROMATOGRÁFICOS [28,45-46]

Platos teóricos (N)

$$N = 16(t_r/W_b)^2 = 5.545(t_r/W_{1/2})^2$$

donde N es el número de platos teóricos, t_r es el tiempo de retención de un pico dado, W_b es el ancho del pico a la base (en unidades de tiempo) y $W_{1/2}$ es el ancho del pico a la mitad de su altura (en unidades de tiempo).

Altura equivalente de un plato teórico (H)

$$H = L/N$$

donde L es la longitud de la columna (en mm) y N el número de platos teóricos.

Factor de capacidad (K')

$$K' = t_r'/t_0$$

donde K' es el factor de capacidad, t_r' es el tiempo de retención corregido y t_0 es el tiempo muerto.

Selectividad (α)

$$\alpha = t_r^2/t_r^1$$

donde t_r^2 es el tiempo de retención del soluto dos y t_r^1 es el tiempo de retención del soluto uno.

Resolución (Rs)

$$R_s = 2(t_r^2 - t_r^1) / (W_b^2 + W_b^1)$$

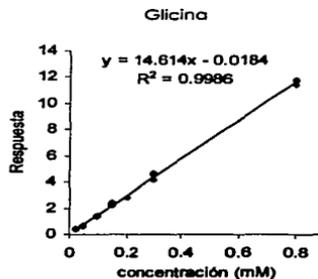
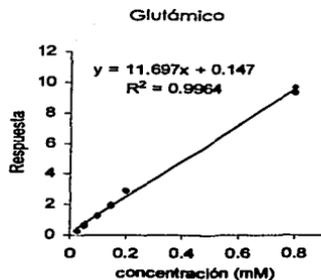
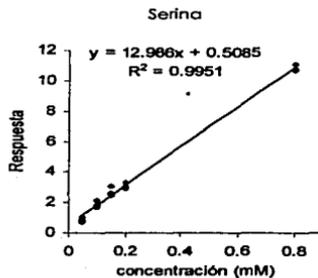
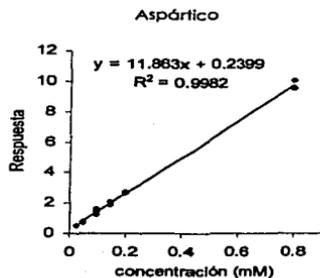
donde los tiempos de retención de cada pico (t_r^2 y t_r^1) y los anchos a la base, de cada pico (W_b^2 y W_b^1) se expresan en unidades de tiempo.

La resolución es función de la selectividad (α), eficiencia (N) y retención (K') de un sistema, lo cual permite optimizar el grado de separación.

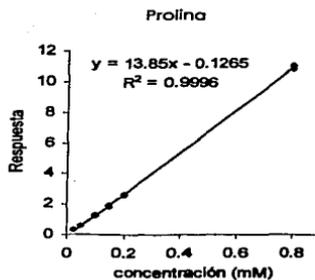
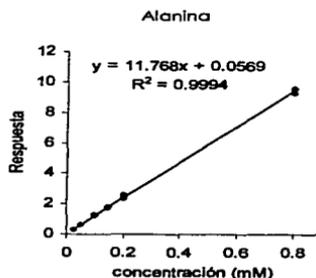
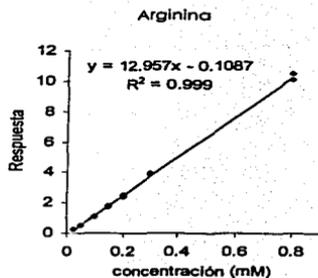
$$R_s = 1/4 [(\alpha - 1)/\alpha] [N^{1/2}] [K' / (1 + K')]$$

ANEXO II

Linealidad del sistema. Norleucina 0.1 mm

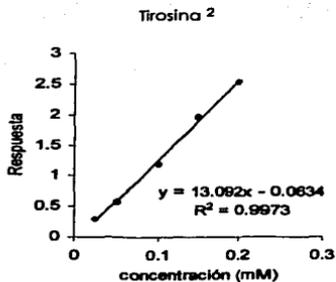
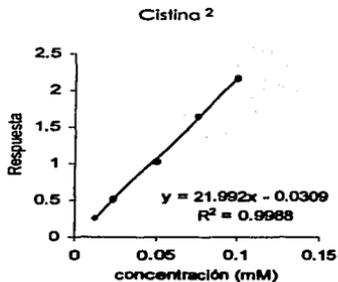
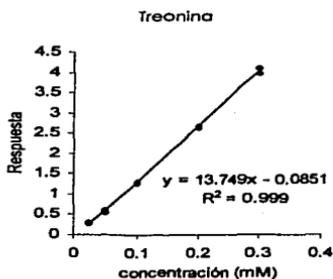
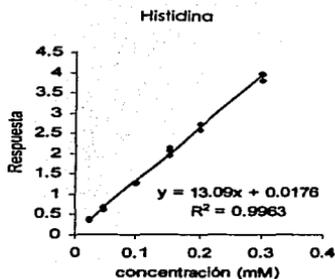
Curvas de calibración Respuesta¹ en función de la concentración. Aminoácidos dispensables

ANEXO II. LINEALIDAD

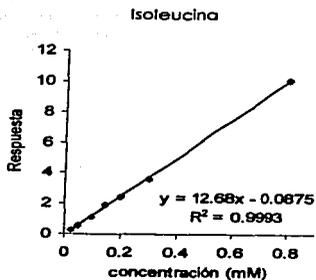
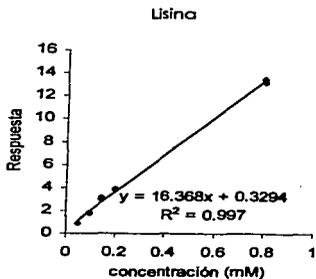
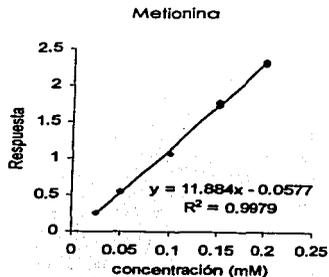
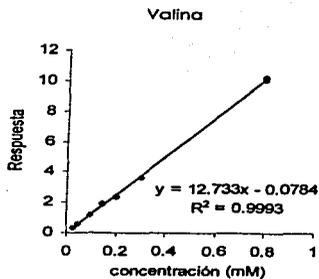


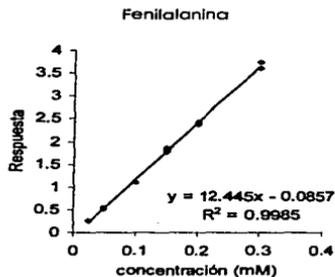
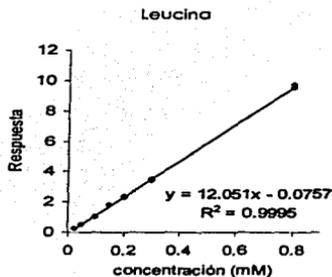
Resposta = Relación de áreas aminoácido a norteficina

Curvas de calibración Respuesta ¹ en función de la concentración, Aminoácidos indispensables



ANEXO II. LINEALIDAD

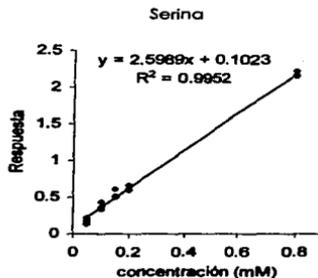
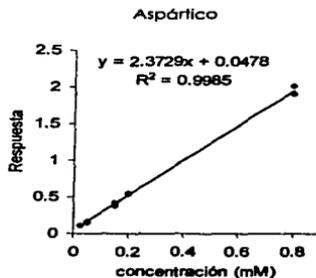




¹ Respuesta = Relación de áreas aminoácido a norleucina
² Cistina y Tirosina se consideran aminoácidos semi indispensables

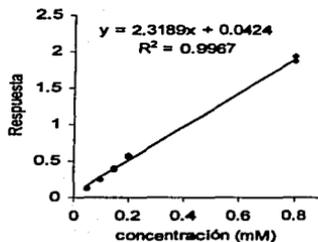
Linealidad del sistema. Norleucina 0.5 mm

Curvas de calibración Respuesta ¹ en función de la concentración. Aminoácidos dispensables

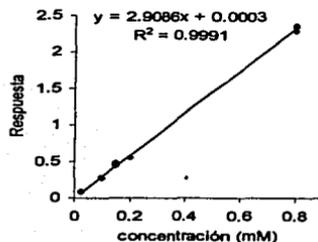


ANEXO II. LINEALIDAD

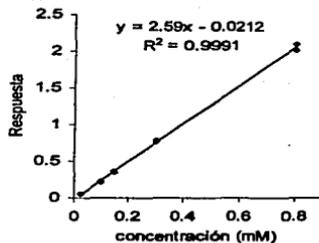
Glutámico



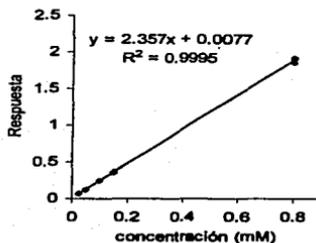
Glicina

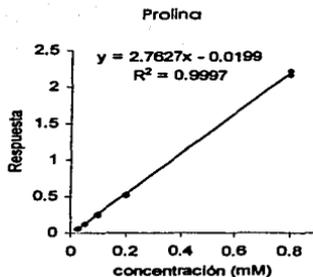


Arginina



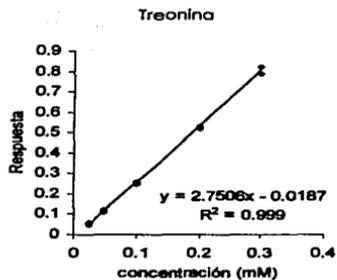
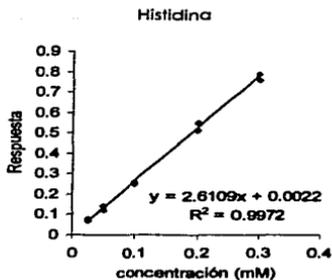
Alanina





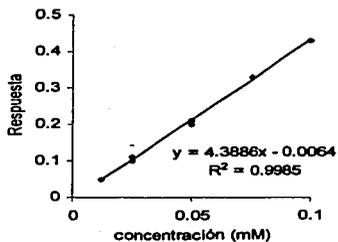
¹ Resposta = Relación de áreas aminoácido a nortleucina

Curvas de calibración Resposta ¹ en función de la concentración. Aminoácidos indispensables

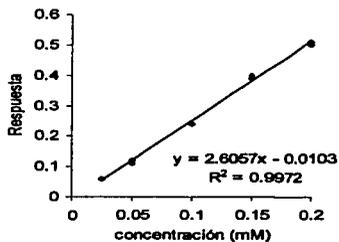


ANEXO II. LINEALIDAD

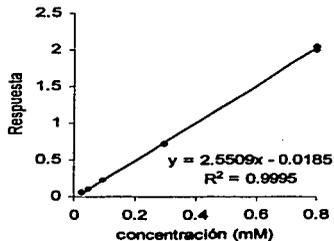
Cistina ²



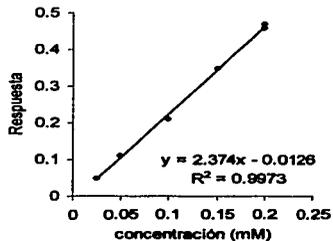
Tirosina ²



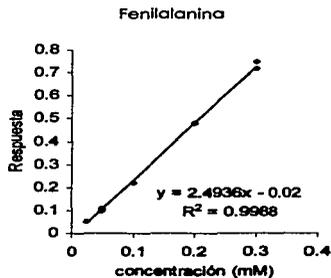
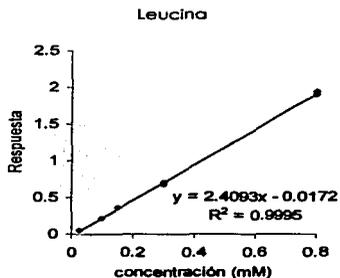
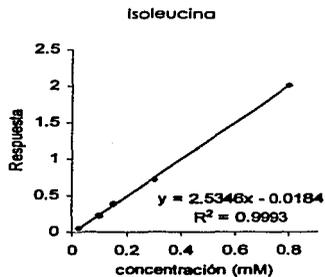
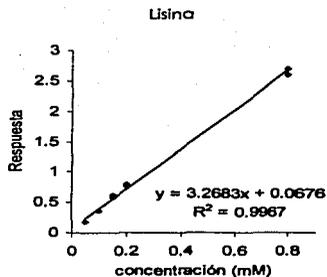
Valina



Metionina



ANEXO II. LINEALIDAD

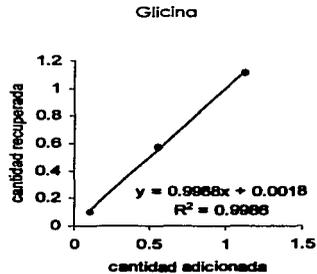
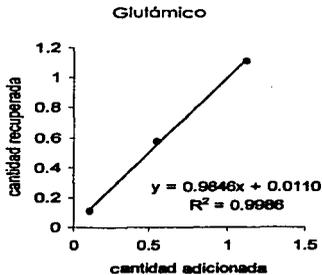
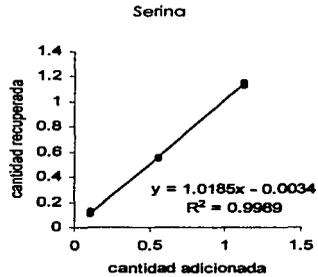
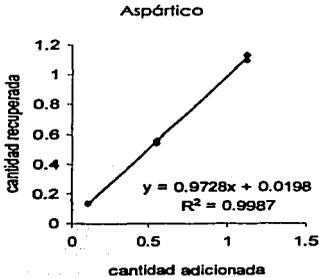


¹ Resposta = Relación de áreas aminoácido a nortleucina

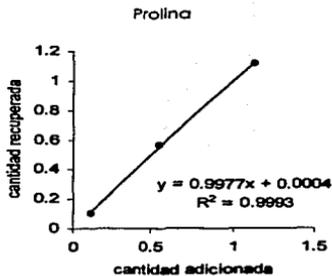
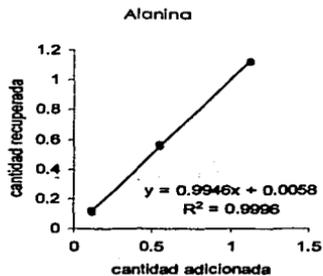
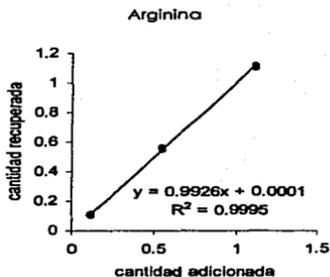
² Cistina y Tirosina se consideran aminoácidos semi indispensables

Linealidad del método

Curvas de recuperación. Cantidad recuperada en función de la cantidad adicionada ¹.
Aminoácidos dispensables



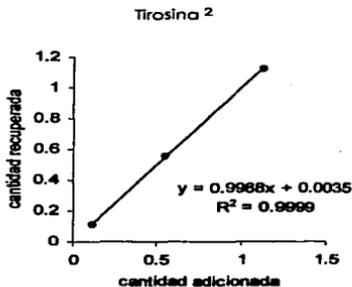
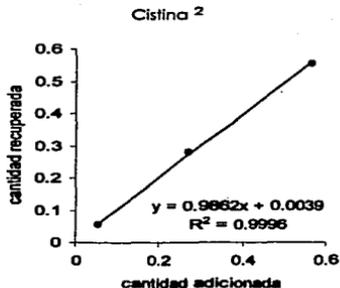
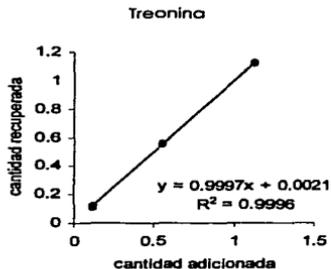
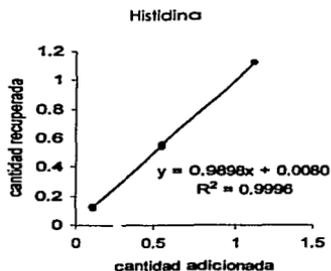
ANEXO II. LINEALIDAD



¹ Cantidad Adicionada y Cantidad recuperada en μ moles

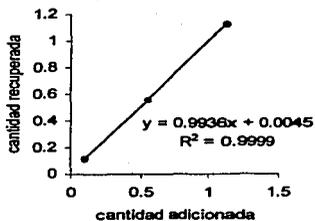
ANEXO II. LINEALIDAD

Curvas de recuperación. Cantidad recuperada en función de la cantidad adicionada ¹.
Aminoácidos Indispensables

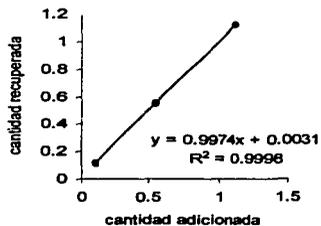


ANEXO II. LINEALIDAD

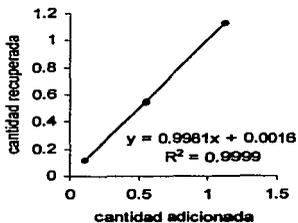
Valina



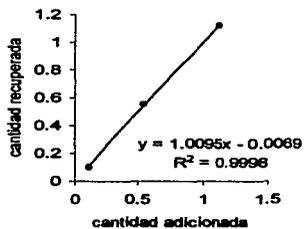
Melionina



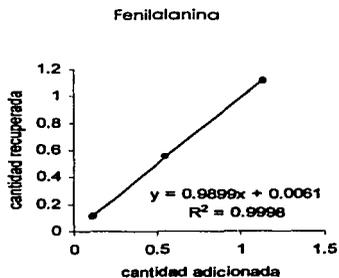
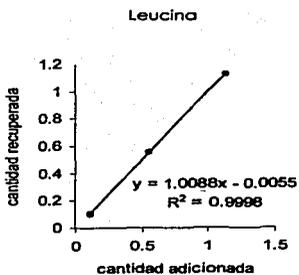
Lisina



Isoleucina



ANEXO II. LINEALIDAD



- 1 Cantidad Adicionada y Cantidad recuperada en μ moles
2 Cistina y Tirosina se consideran aminoácidos semi indispensables

ANEXO III. MATERIALES Y MÉTODOS

1. Determinación de Nitrógeno total (proteína cruda). AOAC 2.055, 1984 [58]. Con modificaciones

Materiales y reactivos.

- Digestor TECATOR modelo ab-20/40
- Destilador Kjeldahl auto 1030 analyzer, TECATOR
- Tubos de digestión de 75 mL, TECATOR
- Papel china
- Mezcla digestiva [3 g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 50 mL de H_3PO_4 y 430 mL de H_2SO_4 concentrado]
- Peróxido de hidrógeno al 30 %
- Sulfato de potasio (R.A.)
- Hidróxido de sodio 60% (p/v)
- Solución de ácido bórico con indicadores (ácido bórico 1%, rojo de metilo 0.0007% y 0.001% de verde de bromocresol)
- HCl 0.01 N, valorado

Procedimiento.

Para cada muestra se pesaron, en papel china, de 70 a 100 mg de harina y 0.5 g de K_2SO_4 , se depositaron dentro de un tubo de digestión. Se añadieron 3 mL de mezcla digestiva y se colocaron en el digestor a 340° C.

Después de 15 minutos, se sacaron y dejaron a temperatura ambiente 5-10 minutos. Se le adicionó 1.5 mL de H_2O_2 al 30% a cada tubo y se colocaron de nueva cuenta en el digestor a 370° C hasta que se logró transparencia en la mezcla. Se realizó la destilación de cada tubo, recibiendo el amoníaco en ácido bórico con indicadores y valorando con HCl 0.01 N titulado. El objetivo de modificar la mezcla digestiva y utilizar peróxido de hidrógeno fue lograr la completa oxidación de la materia orgánica y reducir la pérdida de nitrógeno por formación de aminos o nitrógeno libre, favoreciendo la formación de sulfato de amonio. Se utilizó como blanco dextrosa (100 mg). El porcentaje de proteína se obtuvo multiplicando % de nitrógeno por 6.25.

Cálculos

$$\% \text{ Proteína} = [6.25 \times (M-Y) \times N \times 0.014 \times 100] / m$$

donde:

- ✓ M es el volumen (mL) gastado en la valoración de la muestra
- ✓ Y es el volumen gastado en la valoración del blanco
- ✓ N es la normalidad de HCl
- ✓ 0.014 son los miliequivalentes de nitrógeno (g N por mEq)
- ✓ m es el peso de la muestra (g)

ANEXO III. MATERIALES Y MÉTODOS

2. Cuantificación de aminoácidos en un autoanalizador, previa hidrólisis con HCl 6 N, a reflujo, 4 horas a 145° C. [14]

Materiales / Reactivos.

- Autoanalizador de aminoácidos TECHNICON modelo NC 2P
- Columna de vidrio empacada con resina de poliestireno sulfonata (Resina de Intercambio Catiónico forma Sódica Aminex A9 de tamaño de partícula 11.5 µm, de BIO-RAD) de 470 x 4 mm, altura de la columna 420 ± 5 mm,
- Digestor TECATOR modelo ab-20/40
- Potenciómetro CORNING modelo 10
- Rotavapor BUCHI modelo R
- Acrodisco de nylon GELMAN, 0.2 µm de tamaño de poro y 13 mm de diámetro
- Micro jeringa HAMILTON modelo 1001-LTN
- Tubos de cultivo de pared gruesa con tapón de rosca y cubierta de teflón, PIREX
- HCl 6 N con 0.1 % de fenol
- Nitrógeno de alta pureza (99.997 %), INFRA
- Metil-celulosa al 50% en agua desionizada
- Amortiguador de ácido acético / acetato de sodio 4 N, pH 5.51 ± 0.02, filtrar con papel WHATMAN 542
- Sulfato de hidracina (1.049 g de sulfato de hidracina, 0.4 mL de H₂SO₄ concentrado, 30 mL de solución Brij-35 al 20 %, y agua desionizada suficiente para obtener un volumen total de 4 L; se añaden 0.8 mL de ácido caprílico para evitar la formación de espuma después de filtrar con papel WHATMAN 542)
- Ninhidrina (40 g de ninhidrina en 2 L de metil-celulosa, adicionar 1 L de amortiguador de acetatos 4 N pH 5.51, llevar a volumen de 4 L con agua desionizada, filtrar con papel WHATMAN 542)
- Solución lavadora (Agua:Etanol 3:1, v/v, con 0.01 % de hidroquinona como antioxidante)
- Solución de dilución (50 mL de HCl 0.2 M - 33.3 mL de NaCl 0.2 M, con hidroquinona 0.01 % en un volumen final de 200 mL, pH = 1.5 ± 0.05)
- Amortiguador para regeneración de la columna, pH = 4 ± 0.02 (4.1 g de acetato de sodio anhídrido, 20 mL de ácido acético glacial, 78 mL de etanol absoluto, 0.11 g de hidroquinona, 8 mL de solución Brij-35 al 20%, 0.1 g de la sal disódica del ácido etilendiamintetracético, agua desionizada suficiente para llevar a un volumen final de 1 L, filtrar en papel WHATMAN 542 y añadir 0.2 mL de ácido caprílico para evitar la formación de espuma)
- Amortiguador para elución de aminoácidos ácidos y neutros, pH = 4.1 ± 0.02 (4.5 g de acetato de sodio anhídrido, 15 mL de ácido acético glacial, 1.2 mL de acetato de zinc dihidratado 0.5 M, 80 mL de etanol absoluto, 0.11 g de hidroquinona, 8 mL de solución Brij-35 al 20 % y agua desionizada suficiente para llevar a un volumen final de 1 L, filtrar en papel WHATMAN 542 y añadir 0.2 mL de ácido caprílico para evitar la formación de espuma)
- Amortiguador para la elución de los aminoácidos básicos, pH = 5.4 ± 0.02 (87 g de acetato de sodio anhídrido, 20 mL de ácido acético glacial, 11 mL de alcohol benzílico, 2 mL de acetato de zinc dihidratado 0.5 M, 8 mL de solución Brij-35 al 20 % y agua desionizada suficiente para llevar a un volumen final de 1 L, filtrar en papel WHATMAN 542 y añadir 0.2 mL de ácido caprílico para evitar la formación de espuma)
- Amortiguador para el lavado de la resina (1 g de la sal disódica del ácido etilendiamintetracético, 8 g de hidróxido de sodio y agua desionizada suficiente para llevar a un volumen final de 1 L, filtrar en papel WHATMAN 542)
- Norleucina 5 mM
- Estándar de aminoácidos 2.5 mM de SIGMA AA-S-18 (cistina 1.25 mM)

Procedimiento.

Hidrólisis

Se pesó en un tubo de vidrio con tapón de rosca y cubierta de teflón la cantidad de muestra de cada harina seca y desengrasada (frijol negro Jamapa, frijol Escumite y maíz) de acuerdo al contenido de proteína ($\% \text{ muestra} = 0.05 \times 100 / \% \text{ proteína}$). A continuación se adicionó el volumen de HCl 6 N + 0.1% de fenol necesario para la hidrólisis de las proteínas, basándose también en el contenido de proteína ($\text{mL HCl } 6 \text{ N } 0.1\% \text{ de fenol} = 4 \times 100 / \% \text{ proteína}$), con excepción del maíz, en el cual se emplearon 25 mL. Cada tubo con muestra a hidrolizar se mantuvo a 145° C durante cuatro horas dentro del digestor.

Transcurrido el tiempo de hidrólisis se dejó enfriar hasta alcanzar temperatura ambiente. Se trasvasaron sendos contenidos cuantitativamente a matraces bola de 100 mL, lavando cada tubo con solución lavadora. Se adicionaron después, 5 mL de norleucina 5 mM, aunque lo más recomendable sería añadir la solución de norleucina antes de trasvasar. Cada hidrolizado se llevó a sequedad en un rotavapor (70-80° C), con la finalidad de eliminar el exceso de HCl. A cada tubo se añadió solución lavadora (alrededor de 10 mL) para re suspender los sólidos y filtrar el hidrolizado con ayuda de vacío a través de papel WHATMAN 542, también se añadieron aproximadamente 5 mL más de solución lavadora para lavar los matraces que contenían los hidrolizados. Se ajustó el pH a 6.8 ± 0.2 con NaOH 5 N y se aforó cada hidrolizado en 25 mL con agua destilada. Se burbujó nitrógeno y se mantuvieron en congelación hasta su inyección.

Análisis cromatográfico

Cada hidrolizado a inyectar en el autoanalizador se diluyó 1:1 con solución de dilución (volumen total de 2 mL); después se filtró a través de un acrodisco, descartando las primeras cinco gotas de cada filtrado. Del filtrado, se inyectaron 0.1 mL en el autoanalizador.

Las condiciones cromatográficas empleadas fueron las siguientes: temperatura de la columna 60° C, velocidad de flujo de los amortiguadores 0.6 mL / minuto, velocidad de flujo de ninhidrina 0.8 mL / minuto, velocidad de flujo de sulfato de hidracina 0.6 mL / minuto, velocidad de flujo de nitrógeno 0.32 mL / minuto, velocidad de flujo sobre el colorímetro 0.6 mL / minuto, temperatura del baño de reacción 89° C, sensibilidad del registrador 2.5 U, atenuación 2.5 y velocidad de la carta 3 mm / minuto.

ANEXO III. MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizó un programa de elución de 10 pasos con la siguiente caracterización:

Paso	Duración (minutos)	Caracterización
1	2	Amortiguador 1. Metil-celósolve; inyección
2	2	Amortiguador 2. Metil-celósolve
3	60	Amortiguador 2. Ninhidrina; registrador
4	70	Amortiguador 3. Ninhidrina; registrador
5	20	NaOH 0.2 N, Ninhidrina; registrador
6	2	NaOH 0.2 N, Metil-celósolve; registrador
7	6	Amortiguador 1. Metil-celósolve; registrador
8	10	Amortiguador 1. Metil-celósolve; apaga registrador
9	16	NaOH 0.2 N, Metil-celósolve; apaga registrador
10	46	Amortiguador 1. Metil-celósolve; apaga registrador

En todos los pasos hay flujo de sulfato de hidracina. Bajo estas condiciones, cada análisis fue realizado en aproximadamente 3 horas con 40 minutos.

Para poder cuantificar los aminoácidos de cada uno de los hidrolizados de cada harina seca y desengrasada, fueron inyectados 0.1 mL de una mezcla de aminoácidos: metionina, lisina, isoleucina, leucina, histidina, fenilalanina, valina, treonina, tirosina, ácido aspártico, ácido glutámico, alanina, glicina, prolina, serina y arginina 0.25 mM cada uno, norleucina 0.5 mM y cistina 0.125 mM. Esto permitió obtener factores que relacionan el área o altura de cada pico con la concentración. De antemano se sabía del alto contenido de ácido aspártico, ácido glutámico, alanina, glicina y lisina en las muestras, de tal modo que la atenuación para éstos se llevó a 0.5 cuando fue necesario. Se preparó otro estándar con exceso de estos aminoácidos, con la finalidad de obtener factores de respuesta para los picos atenuados de los aminoácidos en exceso. La composición de dicho estándar fue: metionina, isoleucina, leucina, histidina, fenilalanina, valina, treonina, tirosina, prolina, serina y arginina 0.25 mM, ácido aspártico, ácido glutámico, lisina y norleucina 0.5 mM, alanina y glicina 0.375 mM y cistina 0.125 mM, inyectándose 0.1 mL también.

Cálculos

Con cada harina seca y desengrasada se obtuvieron tres aminogramas, además de los aminogramas de los estándares de aminoácidos, atenuados y sin atenuar. En cada uno se obtuvo el área de cada pico multiplicando el ancho del pico a la mitad de la altura (debido a la irregularidad de la línea base) por la altura total del pico.

ANEXO III. MATERIALES Y MÉTODOS

De las áreas obtenidas de la separación del estándar de aminoácidos, se obtienen los equivalentes de norleucina (EN):

$$EN = \text{Área norleucina estándar} / \text{Área aminoácido estándar.}$$

Cada aminoácido en cada estándar fue cuantificado de acuerdo con la siguiente ecuación

$$\text{g aa muestra} / 16 \text{ g de N} = (A_{aa} \cdot EN \cdot \mu\text{molestándar} \cdot P_{Maa} \cdot A_{faro}) / (AN_m \cdot \text{alícuota} \cdot N_m) \cdot 16$$

donde:

- ✓ A_{aa} es el área del aminoácido en la muestra
- ✓ EN es el equivalente de norleucina para ese aminoácido
- ✓ $\mu\text{molestándar}$ son las micromoles del aminoácido en el estándar
- ✓ P_{Maa} es el peso molecular del aminoácido
- ✓ A_{faro} es el volumen final del hidrolizado preparado
- ✓ AN_m es el área de norleucina en la muestra, alícuota es el volumen inyectado al autoanalizador
- ✓ N_m son los gramos de nitrógeno en la muestra

ANEXO III. MATERIALES Y MÉTODOS

3. Cuantificación de aminoácidos por HPLC de fase reversa, previa hidrólisis con HCl 6 N en fase de vapor, 4 horas a 145° C. [23,33]

Materiales y reactivos.

Hidrólisis

- Estación de trabajo Pico Tag, WATERS
- Viales de reacción de la estación de trabajo Pico Tag
- Bomba de alto vacío RVB, EDWARDS
- Refrigerante tipo dedo frío
- Tubos de ensayo de 4 x 50 mm, CORNING
- Cortador de vidrio o marcador de tinta permanente Esterbrook de BEROL
- Micro pipeta (y puntas) con capacidad 200-1000 µL, FINNPIPETE
- Vórtex Súper mixer modelo 1290, LAB-LINE INSTRUMENTS
- Agua destilada y desionizada^a
- Hielo seco
- Metanol (Q.P.)
- Nitrógeno de alta pureza (99.997%), INFRA
- HCl 6 N, 0.1% de fenol^b

Preparación de la muestra

- Micro pipeta (y puntas) con capacidad 50-200 µL, FINNPIPETE
- Pipeta Pasteur
- Vórtex súper mixer modelo 1290, LAB-LINE INSTRUMENTS
- Matraz aforado de 5 mL, matraz aforado de 1 mL^c
- Jeringas de 10 mL
- Acrodisco de nylon, 0.2 µm de tamaño de poro y 13 mm de diámetro, GELMAN
- Tubos de ensayo de 10 x 70 mm, PYREX
- Cartucho Sep Pak C18 Classic, WATERS
- Norleucina 5 mM-HCl 10 mM^c
- Acetonitrilo:Agua 20:80^d
- Acetonitrilo grado HPLC, JT-BAKER
- Agua destilada y desionizada^a

^a para cuantificar aminoácidos en muestras con menos de 20% de material proteínico

Derivatización

- Tubos de ensayo de 4 x 50 mm, CORNING
- Parrilla de calentamiento, Stirrer/Hot Plate CORNING, con baño de agua a 55° C
- Micro pipeta (y puntas) con capacidad 5-50 µL, FINNPIPETE
- Micro pipeta (y puntas) con capacidad 50-200 µL, FINNPIPETE
- Micro pipeta (y puntas) con capacidad 100-1000 µL, FINNPIPETE
- Vórtex Súper mixer modelo 1290, LAB-LINE INSTRUMENTS
- Parafilm
- Estándar de aminoácidos H 2.5 mM, Cistina: 1.25 mM, PIERCE

^a Utilizar agua purificada de 18 Mohm de resistividad o agua destilada y desionizada pasada por un filtro de 0.22 µm.

^b Se puede utilizar HCl 6 N de punto de ebullición constante, agregando un cristal del fenol durante la preparación de la muestra a hidrolizar

^c Disolución de norleucina (c.b.p. 5 mM) en HCl 0.1 M suficiente para obtener 10 mM al final

^d 200 mL de acetonitrilo grado HPLC, más 800 mL de agua purificada (según a)

- Acetonitrilo (AccQ Fluor reagent diluent, vial 2B), 6-aminoquinolil-N-hidroxisuccinimidil carbamato (AccQ Fluor reagent, vial 2A) y Buffer de boratos (AccQ Fluor Borate Buffer, reactivo 1), WATERS[®]

Análisis cromatográfico

- Sistema de entrega de disolventes (2), modelo 510, de WATERS
- Inyector Rheodyne con loop de 20 μ L
- Jeringa para HPLC 25 μ L, HAMILTON
- Detector UV-Vis WATERS 486, WATERS
- Horno y unidad de control de temperatura modelo III, WATERS
- Controlador automático de gradiente modelo 680, WATERS
- Adquisición e integración de datos Chromjet modelo 54076, WATERS
- Sistema de filtración a vacío y filtros de 0.45 (tipo HA) y 0.22 (tipo GV) μ m de tamaño de poro, MILLIPORE
- Filtro de tamaño de poro 0.22 μ m, MILLIPORE
- Filtro pre columna en línea, WATERS
- Columna AccQ-Tag Nova Pak C₁₈, tamaño de partícula 4 μ m, de 3.9 mm x 150 mm, de WATERS
- AccQ Tag concentrado A (buffer acuoso de acetatos y fosfatos) de WATERS
- Acetonitrilo (grado HPLC), JT BAKER
- Agua destilada y desionizada[®]

Procedimiento.

Hidrólisis con HCl 6 N en fase de vapor, por 4 horas a 145° C

Preparación de la estación de trabajo

Se preparó la estación de trabajo de acuerdo al diagrama (figura 12). Se depositó hielo seco en el recipiente del refrigerante tipo dedo frío y metanol suficiente para cubrir el hielo seco que fue depositado. Una vez que se verificó que los controles de vacío y de Nitrógeno se encontraran cerrados, se encendió la bomba de vacío y después de cinco minutos la lectura del manómetro de la estación de trabajo era de 50-70 militorr. La presión de salida del nitrógeno no excedía 0.3 kg/cm².

Secado

Se pesaron 10 mg de muestra SECA Y DESENGRASADA (15 mg en el caso de muestras con menos de 20% de proteína) en el interior de un tubo de 4 x 50 mm, previamente marcado con el cortador de vidrio o con el marcador de tinta permanente.

Se agregó una gota de agua (aproximadamente 50 μ L) y se agitó durante algunos segundos en el vórtex, con la finalidad de hidratar por completo la muestra y distribuirla en las paredes del tubo para mejorar su exposición a los vapores de HCl.

Se depositó en el vial de reacción seco. A éste, se le colocó la tapa y se desizó el botón rojo a la posición *abierto* (figura 13).

[®] AccQ Fluor Reagent Kit de WATERS

ANEXO III. MATERIALES Y MÉTODOS

El vial se colocó en la estación de trabajo, se abrió la válvula de Nitrógeno durante 10-15 segundos, después se abrió lentamente la válvula de vacío hasta alcanzar una presión de 1-2 Torr. Abriendo y cerrando la válvula de nitrógeno, se controló la espuma y ebullición de la mezcla con la muestra, para evitar pérdidas por proyección del material al exterior del tubo. Una vez desaparecida la espuma, se cerró la válvula de nitrógeno y se mantuvo abierta la del vacío hasta secar las muestras (presión de 50-70 miliTorr). Se cerró la válvula de vacío y se retiró el vial de la estación de trabajo (figura 14).

Purga con nitrógeno

Se agregaron 200 μ L de HCl 6 N con 0.1 % de fenol en el fondo del vial de reacción, cuidando no introducir ácido al interior de los tubos con muestra. Para purgar el vial de hidrólisis, se cerró e introdujo nuevamente en la estación de trabajo (figura 14), se abrió lentamente el vacío hasta alcanzar 1-2 Torr de presión y se mantuvo abierto hasta que empezó la ebullición del ácido clorhídrico [cuando no ocurrió en 30 segundos, se continuó con la purga]; se cerró el vacío y se purgó el vial con nitrógeno durante 5 segundos; se cerró el nitrógeno y se repitió éste ciclo dos veces más.

Al finalizar el tercer ciclo, se abrió el vacío del mismo modo y se mantuvo hasta que alcance una presión ligeramente menor a 1 Torr. Se cerró el vial deslizando el botón verde a la posición cerrado, se cerró el vacío y se sacó el vial de reacción de la estación de trabajo (figuras 2 y 3).

Hidrólisis en fase de vapor

Una vez finalizada la preparación, se introdujo el vial al horno de la estación de trabajo, previamente calentado a 145° C, durante 4 horas.

Preparación de hidrolizados

Eliminación del exceso de HCl

Transcurrido el tiempo, se sacó el vial del horno, se dejó enfriar a temperatura ambiente y dentro de una campana de extracción, se deslizó el botón rojo a la posición abierto para dejar escapar el ácido y los vapores que se generaron durante el proceso.

Después se abrió el vial de reacción y se sacaron los tubos con los hidrolizados, se enjuagó el exterior de cada uno con agua y se depositaron en un vial de reacción seco.

Después, se procedió a eliminar el exceso de ácido del interior de cada uno de los tubos con ayuda de vacío; se tapó el vial asegurando que se encontrara en la posición abierto, se introdujo en la estación de trabajo y se abrió el vacío hasta alcanzar 1-2 Torr, se mantuvo abierto hasta que la lectura del manómetro de la estación de trabajo fue de 50-70 miliTorr. Se cerró el vial y el vacío, conservándose los hidrolizados en una atmósfera inerte hasta su posterior preparación.

Preparación de las muestras: re-hidratación del hidrolizado

A cada uno de los tubos con hidrolizado se agregaron 100 μ L de norleucina 5 mM - HCl 10 mM, el primero como estándar interno y el ácido clorhídrico para rehidratar y extraer los aminoácidos del tubo de hidrólisis. Se agitó un minuto en vórtex y se dejó reposar un minuto para después agregar de 100 a 200 μ L de acetonitrilo 20%, agitando un minuto más en vórtex, para después transferir cuantitativamente a un matraz volumétrico de 1 ó 5 mL con ayuda de una pipeta Pasteur, se lavó con acetonitrilo al 20% (en total, 400 μ L en el caso de volumen de aforo 1 mL y hasta 2.5 mL en el caso de volumen de aforo 5 mL; en adiciones de 100 en 100 μ L) y agitó cuanto fue necesario, hasta que la solución de lavado era incolora, se transfirió cuantitativamente el contenido de cada paso de lavado al matraz volumétrico de 5 o 1 mL, según el caso. El lavado con acetonitrilo permitió mejorar la extracción de los aminoácidos menos polares. La elección del volumen de aforo es función del contenido de proteína; 1 mL para muestras con menos de 20 % de proteína y 5 μ L para muestras con porcentajes mayores.

ANEXO III. MATERIALES Y MÉTODOS

Se llevó al aforo con agua purificada (concentración final de norleucina: 0.1 mM y 0.5 mM para volumen de aforo de 1 mL).

Preparación de las muestras: purificación y filtración

Se procedió a purificar la muestra con la ayuda de un cartucho Sep Pak C₁₈, el cual fue previamente activado de la siguiente manera:

Con ayuda de una jeringa, se hicieron pasar lentamente (1-2 mL/minuta) 6 mL de acetnitrilo grado HPLC por el cartucho (conectado a la jeringa por la parte más larga), inmediatamente después, se hicieron pasar 6 mL de agua purificada.

Una vez activado el cartucho y sin que se secase, se hicieron pasar los 5 mL de la muestra, desechándose los primeros 2 mL (para eliminar la mezcla de hidrolizado con el agua remanente de la activación) y recuperando en un tubo de ensaye el resto de la muestra que contenía los aminoácidos.

Se filtró la muestra, ya purificada, a través de un acrodisco de nylon de 0.2 µm de tamaño de poro, conectado en la punta de otra jeringa, desechándose las primeras 3-5 gotas y recuperando el resto, del cual fue tomada la alícuota para derivatizar los aminoácidos. Las muestras con menos de 20 % de proteína, sólo fueron filtradas a través del acrodisco.

Análisis cromatográfico.

Una vez que se ha purificado y filtrado el hidrolizado, se procedió a derivatizar 10 µL, de la forma en que se describe a continuación. Cuando el hidrolizado ya había sido derivatizado, se inyectaron en el cromatógrafo, de 5 a 20 µL (para muestras con porcentajes de proteína altos o bajos, respectivamente), con la finalidad de generar respuestas dentro del intervalo lineal, para todos los aminoácidos.

Derivatización

Reconstitución de AQC

Se calentó la pastilla con baño de agua a 55 °C. Una vez que la totalidad del reactivo de derivatización AQC (vial 2A) se encuentra en la parte inferior del vial, se enjuagó la punta de una micro pipeta de 1000 µL, cargándola con 1000 µL del reactivo de dilución de AQC (vial 2B) y desechándolos, para después transferir 1000 µL del mismo reactivo (vial 2B) para reconstituir el reactivo de derivatización (vial 2A). Se cerró el vial herméticamente y agitó (con Vórtex) por 10 s. Se calentó (no más de 10 minutos) el vial 2A en la pastilla hasta la disolución del reactivo de derivatización AQC. El reactivo se almacenó en refrigeración cuando no fue utilizado, cuidando de exponerle lo menos posible a la humedad del ambiente para evitar su degradación.

Preparación de un estándar de aminoácidos

Se mezclaron 80 µL de la solución stock de aminoácidos (2.5 mM) con 20 µL de norleucina 5 mM - HCl 10 mM y 900 µL de agua purificada para obtener un estándar de 16 aminoácidos (Asp, Ser, Glu, Gly, Hys, Arg, Thr, Ala, Pro, Tyr, Val, Met, Lys, Ile, Leu y Phe) de concentración 0.2 mM (cistina, 0.1 mM) con 0.1 mM de norleucina como estándar interno.

Para el análisis de muestras con bajo contenido de proteína, se utilizó un estándar de aminoácidos con la misma concentración de todos, excepto norleucina; 0.5 mM; se agregaron 80 µL de estándar de aminoácidos 2.5 mM, se adicionaron 100 µL de la solución de norleucina 5 mM-HCl 10 mM y finalmente se llevó a 1 mL con 800 µL de agua purificada.

ANEXO III. MATERIALES Y MÉTODOS

Derivatización de aminoácidos

En un tubo de ensayo de 4x50 mm, se depositaron 10 µL del estándar de aminoácidos, evitando que la punta de la pipeta tocara las paredes del tubo; se agregaron 70 µL del buffer de boratos (reactivo 1), agitando el tubo en un vórtex por 10 segundos y finalmente se agregaron 20 µL del reactivo de derivatización ya reconstituido, vial 2A, se agitó en el vórtex durante un minuto (tiempo durante el cual se lleva a cabo la reacción y se hidroliza el exceso de AQC, figura 14), se cubrió con parafilm la boca del tubo y se introdujo en el baño de agua a 55° C durante 10 minutos para completar la formación del monoderivado de tirosina.

Análisis cromatográfico

Preparación de fase móvil

✓ Buffer acetatos-ácido fosfórico (fase A), pH = 5.02 ± 0.02.

Se diluyeron 100 mL de concentrado A (AccQ Tag concentrado A) hasta 1000 mL con agua purificada, utilizando un matraz volumétrico de 1000 mL. Se hizo pasar la totalidad de la fase a través de un sistema de filtración a vacío (figura 7) con un filtro de tamaño de poro 0,45 µm tipo HA. Se mantuvo el vacío durante 5 minutos, después de que había pasado la totalidad de la fase A por el sistema de filtración, para desgasificarla. La fase así preparada pudo almacenarse en refrigeración para conservarla hasta por un mes, filtrándole y desgasificándole cuando no fue utilizada por más de dos días. El pH debió ser de 5.02, utilizando ácido fosfórico concentrado o hidróxido de sodio 5N, cuando fue necesario.

✓ Acetonitrilo: agua 60:40 (fase B).

En una probeta de 1000 mL, se vertieron 600 mL de acetonitrilo grado HPLC, añadiéndose 450 mL de agua purificada, después de que hubo salido el aire se ajustó a 1000 mL con agua purificada. Se filtró y desgasificó la fase B de la misma manera en que se hace para la fase A, utilizando un filtro de 0,22 µm tipo GV. Se almacenó en refrigeración para conservar su composición durante una semana, volviendo a filtrar y desgasificar cada dos días.

Acondicionamiento del equipo

Se encendió el equipo (bombas, controlador y registrador, en ese orden), después de asegurar que había fase móvil suficiente (A y B) para cada una de las 2 bombas, sin aire en las tuberías que suministran la fase en cada bomba y que la columna se encontraba conectada en la dirección adecuada. El acondicionamiento del equipo se programó en el registrador como sigue:

Acondicionamiento del equipo			
Tiempo (minutos)	% fase A	% fase B	Flujo (mL/minuto)
Inicio	0	100	0
5	0	100	1
40	0	100	1
45	100	0	1
60	100	0	1

Curva ó (gradiente lineal)

Se encendió el controlador de temperatura y se ajustó a 37° C, una vez que hubo flujo dentro de la columna. Se encendió el detector UV-Vis e inmediatamente después de finalizar la comprobación rutinaria del detector, se ajustó a 254 nm de longitud de onda, filtro 0.5 y sensibilidad 0.2; para después ajustar a cero la lectura, antes de que en la celda empezara a fluir amortiguador (fase A) pues de lo contrario, en el desarrollo del gradiente la línea base caería por debajo de cero al irse enriqueciendo con acetonitrilo al 60 %, de modo que el registrador no podría establecer la línea base para la integración de cada uno de los picos.

ANEXO III. MATERIALES Y MÉTODOS

Antes de iniciar el desarrollo del gradiente, el registrador fue encendido y ajustado con las siguientes condiciones: velocidad del papel, *chart speed*, 0.5 cm / minuto; ancho de pico, *PW*, 3; atenuación, *atten*, 128 y *ruido* (mínima magnitud de las señales que serán reconocidas como un pico) *PT*, 1000.

Gradiente de separación y cuantificación de aminoácidos

Cuando transcurrió el tiempo de acondicionamiento, sin interrumpir el flujo, se inició el gradiente (previamente grabado en el controlador de flujo) con el cual se efectuó la separación de los derivados de los aminoácidos.

Tiempo	% A	% B	Flujo
Inicio	100	0	1
0.5	98	2	1
1.5	93	7	1
19	90	10	1
32	67	33	1
35	67	33	1
36	0	100	1
41	0	100	1
42	100	0	1
43	100	0	1.2
64	100	0	1.2
65	100	0	1
66	0	100	1
100	0	100	1

El orden de elución de los aminoácidos es el siguiente:

- | | |
|-------------------------|------------------|
| 1. Aminoquinolina (AMQ) | 11. Prolina |
| 2. Aspártico | 12. Cistina |
| 3. Serina | 13. Tirosina |
| 4. Glutámico | 14. Valina |
| 5. Glicina | 15. Metionina |
| 6. Histidina | 16. Lisina |
| 7. Amoniaco | 17. Isoleucina |
| 8. Arginina | 18. Leucina |
| 9. Treonina | 19. norleucina |
| 10. Alanina | 20. Fenilalanina |

El tiempo de corrida fue de 55 minutos; a partir del minuto 36, el gradiente ya no tiene influencia en la separación de los derivados de los aminoácidos, por lo que transcurrido este tiempo, se detuvo el registrador para obtener áreas y tiempos de retención de los derivados. A partir del minuto 66, el gradiente se diseñó para lavar la columna al finalizar las inyecciones de cada sesión. El controlador de temperatura se apagó aproximadamente 10 minutos antes de que dejara de circular fase móvil en el interior de la columna.

Se inyectaron 5 μ l de soluciones estándar de aminoácidos derivatizados, durante las etapas de adecuación y validación, y 5–20 μ l de hidrolizados de aminoácidos derivatizados en el análisis de muestras.

ANEXO III. MATERIALES Y MÉTODOS

Cálculos

utilizando curva de calibración

$$\mu\text{g aminoácido} / 16\text{ g N} = 1.6 \times A [(respuesta - b)/m] \times P.M. / (\text{mg} \times \% \text{ N})$$

donde:

- ✓ A es el aforo (en mL) después de la extracción de los aminoácidos
- ✓ respuesta es la relación de áreas aminoácido a norleucina en la muestra
- ✓ P.M. es el peso molecular del aminoácido
- ✓ mg es el peso de la muestra en miligramos
- ✓ %N es el porcentaje de nitrógeno en la muestra
- ✓ b es la ordenada al origen y m es la pendiente de la curva de calibración de cada aminoácido

La concentración de norleucina en la muestra debe ser la misma que en los estándares de la curva de calibración: 0.1 o 0.5 mM

comparando contra un estándar

$$\mu\text{g}/16\text{ g N} = \frac{1.6 \times A \times \text{respuesta}_{\text{muestra}} \times (1/\text{respuesta}_{\text{estándar}}) \times C_{\text{aa estándar}} \times P.M. \times C_{\text{norleucina muestra}}}{(\text{mg} \times \% \text{ N}) \times C_{\text{norleucina estándar}}}$$

donde:

- ✓ respuesta_{muestra} es la relación de áreas aminoácido a norleucina en la muestra
- ✓ respuesta_{estándar} es la relación de áreas aminoácido a norleucina en el estándar
- ✓ C_{aa estándar} es la concentración del aminoácido en el estándar
- ✓ C_{norleucina muestra} es la concentración de norleucina en la muestra (0.1 ó 0.5 mM)
- ✓ C_{norleucina estándar} es la concentración de norleucina en el estándar (0.1 ó 0.5 mM)
- ✓ P.M. es el peso molecular del aminoácido
- ✓ mg es el peso de la muestra en mg
- ✓ % N es el porcentaje de nitrógeno en la muestra
- ✓ A es el volumen de aforo

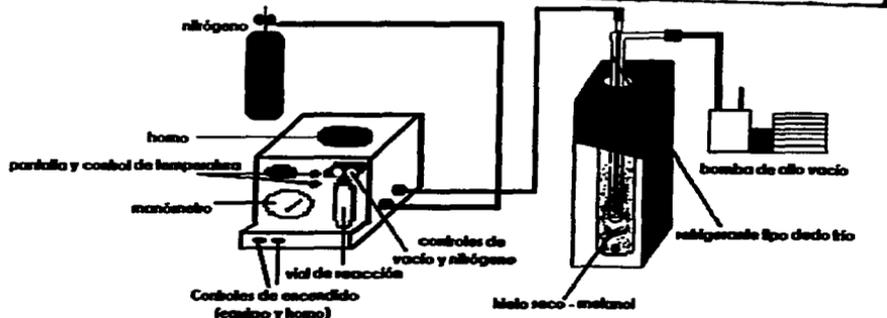


Figura 12. Instalación de la estación de trabajo

ANEXO III. MATERIALES Y MÉTODOS

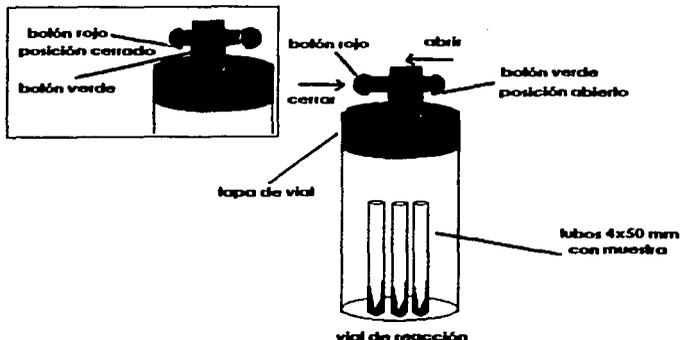


Figura 13. Vial de reacción

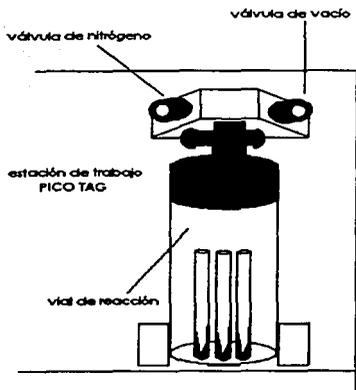


Figura 14. Vial de reacción en la estación de trabajo

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

ANEXO III. MATERIALES Y MÉTODOS

4. Cuantificación de aminoácidos por HPLC de fase reversa previa hidrólisis con HCl 6 N, a reflujo, 4 horas a 145° C. [14,33,60]

Materiales / Reactivos.

Hidrólisis y Preparación de la muestra

- Digestor TECATOR modelo ab-20/40
- Potenciómetro CORNING modelo 10
- Rotavapor BUCHI modelo R
- Tubos de cultivo de pared gruesa con tapón de rosca y cubierta de teflón PIREX No. 9826
- HCl 6 N con 0.1 % de fenol
- norleucina 5 mM
- Solución lavadora (Agua:Etanol 3:1, v/v, con 0.01 % de hidroquinona como antioxidante)
- Vórtex súper mixer modelo 1290, LAB-LINE INSTRUMENTS
- Matraz aforado de 50 mL
- Matraz aforado de 10 mL
- Jeringas de 10 mL
- Acrodisco de nylon GELMAN, 0.2 µm de tamaño de poro y 13 mm de diámetro
- Cartucho Sep Pak C18 Classic, WATERS
- Acetonitrilo:Agua 20:80

Derivatización

- Tubos de ensayo de 4 x 50 mm, CORNING
- Pamilla de calentamiento, Stirrer/Hot Plate CORNING, con baño de agua a 55° C
- Micro pipeta (y puntas) con capacidad 5-50 µL, FINNPIPETE
- Micro pipeta (y puntas) con capacidad 50-200 µL, FINNPIPETE
- Vórtex Súper mixer modelo 1290, LAB-LINE INSTRUMENTS
- Parafilm
- Estándar de aminoácidos: H 2.5 mM, excepto Cistina: 1.25 mM, PIERCE
- Acetonitrilo (AccQ Fluor reagent diluent, vial 2B), 6-aminoquinolil-N-hidroxisuccinimidil carbamato (AccQ Fluor reagent, vial 2A) y Buffer de boratos (AccQ Fluor Borate Buffer, reactivo 1), WATERS

Análisis cromatográfico

- Sistema de entrega de disolventes (2), modelo 510, de WATERS
- Inyector Rheodyne con loop de 20 µL
- Jeringa para HPLC 25 µL, HAMILTON
- Detector UV-Vis WATERS 486, WATERS
- Horno y unidad de control de temperatura modelo III, WATERS
- Controlador automático de gradiente modelo 680, WATERS
- Adquisición e integración de datos Chromjet modelo 54076, WATERS
- Sistema de filtración a vacío y filtros de 0.45 (tipo HA) y 0.22 (tipo GV) µm de tamaño de poro, MILLIPORE
- Filtro de tamaño de poro 0.22 µm, MILLIPORE
- Filtro pre columna en línea, WATERS
- Columna AccQ-Tag Nova Pak C18, tamaño de partícula 4 µm, de 3.9 mm x 150 mm, de WATERS
- AccQ Tag concentrado A (buffer acuoso de acetatos y fosfatos) de WATERS
- Acetonitrilo (grado HPLC), JT BAKER
- Agua destilada y desionizada

ANEXO III. MATERIALES Y MÉTODOS

Procedimiento

Se hidrolizó el material proteico de frijol Escumite con HCl 6 N a reflujo a 145° C durante 4 horas, para posteriormente cuantificar los aminoácidos de la proteína por medio de HPLC de fase reversa, derivatizando con AQC.

Se pesó, por triplicado, en un tubo de vidrio con tapón de rosca y cubierta de teflón la cantidad de harina seca y desengrasada de frijol Escumite, de acuerdo al contenido de proteína ($\text{g muestra} = 0.05 \times 100 / \% \text{ proteína}$). A continuación se adicionó el volumen de HCl 6 N + 0.1% de fenol necesario para la hidrólisis de las proteínas, basándose también en el contenido de proteína ($\text{mL HCl 6 N 0.1\% de fenol} = 4 \times 100 / \% \text{ proteína}$). Cada tubo con muestra a hidrolizar se mantuvo a 145° C durante cuatro horas, dentro del digestor.

Transcurrido el tiempo de hidrólisis se dejó enfriar hasta alcanzar temperatura ambiente. Se adicionaron 2.5 mL de norleucina 5 mM y se trasvasaron sendos contenidos cuantitativamente a matraces bola de 100 mL, lavando cada tubo con solución lavadora. Cada hidrolizado se llevó a sequedad en un rotavapor (70-80° C), con la finalidad de eliminar el exceso de HCl. A cada tubo se añadió solución lavadora (alrededor de 10 mL) para re suspender los sólidos y filtrar el hidrolizado con ayuda de vacío a través de papel WHATMAN 542, también se añadieron aproximadamente 5 mL más de solución lavadora para lavar los matraces que contenían los hidrolizados. Se ajustó el pH en 6.8 ± 0.2 con NaOH 5 N y se aforó cada hidrolizado a 50 mL con agua destilada y desionizada. Después, se diluyó 1 mL de este hidrolizado a 10 mL con agua destilada y desionizada. Para llevar a cabo la purificación, se tomaron 2 mL de hidrolizado ya diluido y se añadieron 2 mL de acetonitrilo al 20 %.

Se procedió a purificar la muestra con la ayuda de un cartucho Sep Pak C₁₈, previamente activado como en la sección 3. Sin que el cartucho se secase, se hizo pasar la muestra, desechándose los primeros 2 mL (para eliminar la mezcla de hidrolizado con el agua remanente de la activación) y recuperando en un tubo de ensaye el resto de la muestra que contiene los aminoácidos.

Se filtró la muestra, ya purificada, a través de un acrodisco de nylon de 0.2 μm de tamaño de poro, conectado en la punta de otra jeringa, desechándose las primeras 3-5 gotas y recuperando el resto, del cual fue tomada la alícuota para derivatizar los aminoácidos.

Una vez purificado y filtrado el hidrolizado, se procedió a derivatizar 10 μL , de la forma ya descrita (sección 3 de este anexo). Cuando el hidrolizado ya había sido derivatizado, se inyectaron en el cromatógrafo, con las condiciones que se han explicado (sección 3), 5 μL .

ANEXO III. MATERIALES Y MÉTODOS

Para realizar la cuantificación, se compararon las relaciones de áreas obtenidas en las muestras contra las obtenidas con un estándar de aminoácidos, para lo cual también se preparó y derivatizó un estándar de aminoácidos.

Cálculos

De las áreas obtenidas de la separación del estándar de aminoácidos, se obtienen los equivalentes de norleucina (EN):

$$EN = \text{Área norleucina estándar} / \text{Área aminoácido estándar}$$

Cada aminoácido en cada estándar fue cuantificado de acuerdo con la siguiente ecuación

$$\text{g aa muestra} / 16 \text{ g de N} = (A_{aa} * EN * \mu\text{molestándar} * P_{Maa} * A_{\text{foro}} * F_1 * F_2) / (AN_m * a * N_m) * 16$$

donde:

- ✓ A_{aa} es el área del aminoácido en la muestra
- ✓ EN es el equivalente de norleucina para ese aminoácido
- ✓ $\mu\text{molestándar}$ son las micromoles del aminoácido que dieron origen a esa respuesta en el aminograma del estándar
- ✓ P_{Maa} es el peso molecular del aminoácido
- ✓ A_{foro} es el volumen final del hidrolizado preparado
- ✓ F_1 y F_2 son los factores de las dos diluciones realizadas
- ✓ AN_m es el área de norleucina en la muestra, a es el volumen inyectado al cromatógrafo
- ✓ N_m son los gramos de nitrógeno en la muestra hidrolizada