



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**EVALUACIÓN DE AMINOÁCIDOS
PLASMÁTICOS POR HPLC EN PACIENTES
CON ALZHEIMER**

TESIS

**PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

PRESENTA:

ERIC ABURTO ARCINIEGA

MÉXICO, D.F. 2009





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.

DEDICATORIA

A mi padre y a mi madre[†] porque este trabajo es el fruto de su esfuerzo y dedicación.

Les agradezco el apoyo que me han brindado. Porque siempre han estado a mi lado y nunca me han dejado desamparado. A ellos, que me enseñaron a salir adelante y a nunca detenerme.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Rosalinda Guevara Guzmán por brindarme la oportunidad de trabajar bajo su tutela.

A la Dra. Mónica Beatriz Aburto Arciniega por la invitación a trabajar en este protocolo.

Al Dr. Guillermo Mendoza Hernández por su apoyo en la optimización de la metodología así como en los recursos técnicos.

A la M. en C. María Esther Urrutia Aguilar por su ayuda en los análisis estadísticos realizados como parte del Macroproyecto.

A la M. en C. Susana Ivett Martínez Sámano por su incondicional apoyo en la elaboración de esta tesis y durante el desarrollo del protocolo.

Al Dr. Carlos de la Riva por su soporte en los conocimientos sobre la detección de aminoácidos por HPLC.

A la Profra. Silvia de Jesús Mendoza Arellano y Profra. María del Socorro Cecilia Reyna Rodríguez por su participación en la revisión de este trabajo.

A la Dra. Luz Elena Vera Ávila y Dra. Lucía Hernández Garciadiego por su respaldo en el área analítica.

Al apoyo proporcionado por CONACyT (24784-M), DGAPA (IN-216907) y el Macroproyecto SDEI.PTID.05.5.

ABREVIATURAS

Ala	Alanina
Arg	Arginina
Asn	Asparagina
BCAA	Aminoácidos de cadena ramificada
Cit	Citrulina
Cys	Cisteína
Dansyl	5-Dimetilamino-1-naftalensulfonilo
DTA	Demencia tipo Alzheimer
Fmoc	9-Fluorenilmetil cloroformato
GABA	Ácido γ -aminobutírico
Gli	Glicina
Gln	Glutamina
Glu	Glutamato
Grupo R	Cadena lateral de los α -aminoácidos
His	Histidina
HPLC	Cromatografía de líquidos de alta eficiencia (HPLC, por sus siglas en inglés que significan High Performance Liquid Chromatography)
Ile	Isoleucina
LCR	Líquido cefalorraquídeo
LNAA	Aminoácidos largos neutros
Lys	Lisina
Met	Metionina
OPA	o-Ftalaldehído
Orn	Ornitina
Phe	Fenilalanina
Pro	Prolina
Ser	Serina

DKRA	Disolución Krebs Ringer acidificada
Tau	Taurina
Thr	Treonina
Trp	Triptófano
Tyr	Tirosina
Val	Valina

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN.....	10
Planteamiento del Problema	10
Objetivo	11
Hipótesis	11
MARCO TEÓRICO	12
1. Aminoácidos.....	12
1.1. Estructura Química de los Aminoácidos	12
1.2. Clasificación de los Aminoácidos.....	14
1.3. Importancia Biológica de los Aminoácidos.....	16
1.4. Valor Clínico de los Aminoácidos.....	18
2. Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia.....	21
2.1. Fundamento de la Cromatografía.....	21
2.2. Componentes de un Sistema de HPLC.....	22
2.2.1. Fase Móvil.....	22
2.2.1.1. Degasificador.....	22
2.2.1.2. Fuerza de Elución	23
2.2.2. Bomba	24
2.2.3. Inyector.....	24
2.2.4. Columna.....	24
2.2.4.1. Control de la Temperatura de la Columna.....	25
2.2.4.2. Variación en las Dimensiones de la Columna.....	25
2.2.5. Detector	26
2.2.6. Elución Isocrática y por Gradiente.....	26
2.3. Aplicaciones de la Técnica de HPLC.....	28
2.4. Análisis de Aminoácidos por HPLC	29

3. Demencia Tipo Alzheimer	32
3.1. Características de la Demencia Tipo Alzheimer	32
3.2. Aminoácidos y la Demencia Tipo Alzheimer.....	33
DISEÑO EXPERIMENTAL	35
4. Condiciones Experimentales	35
4.1. Reactivos	35
4.2. Disoluciones	38
4.3. Sistema de HPLC.....	38
4.4. Material Adicional	39
5. Metodología	40
5.1. Programa de Inyección.....	40
5.2. Gradiente	41
5.3. Composición de la Fase Móvil B.	42
5.4. Curva de Calibración.....	42
5.5. Tratamiento de las Muestras de Plasma.....	43
5.6. Análisis de Aminoácidos en Sujetos Controles y Pacientes con Demencia Tipo Alzheimer	44
5.7. Análisis Estadístico	45
RESULTADOS	46
6. Resultados	46
6.1. Programa de Inyección.....	46
6.2. Gradiente	47
6.3. Composición de la Fase Móvil B.	55
6.4. Curva de Calibración.....	56
6.5. Análisis de Aminoácidos en Sujetos Controles y Pacientes con Demencia Tipo Alzheimer	59

DISCUSIÓN.....	64
CONCLUSIONES	70
APÉNDICE.....	71
REFERENCIAS	83

INTRODUCCIÓN

Planteamiento del Problema

Cambios en los niveles de aminoácidos han sido objeto de gran discrepancia en la demencia tipo Alzheimer (DTA). En la literatura no se han encontrado diferencias en los niveles de glutamato y aspartato, aunque otros autores reportan que se encuentran aumentados o disminuidos. También, hay reportes sobre la variación en la concentración de glutamina, asparagina y ácido γ -aminobutírico (GABA), al comparar sujetos controles con pacientes con diagnóstico clínico de la DTA. Estas controversias se pueden relacionar a diferencias en las técnicas utilizadas, muestras analizadas (tejido cerebral, líquido cefalorraquídeo o plasma) o en sujetos vivos o post mórtem.

El sistema de cromatografía de líquidos de alta eficiencia (HPLC) utilizado para la detección de aminoácidos en plasma sanguíneo es de la marca Agilent. El método de referencia, "Rapid, Accurate, Sensitive, and Reproducible HPLC Analysis of Amino Acids. Amino Acid Analysis Using Zorbax Eclipse-AAA Columns and the Agilent 1100 HPLC", establece las condiciones de separación y análisis de aminoácidos, vía una derivatización precolumna en proteínas/hidrolizados proteicos. Para la determinación de aminoácidos en plasma sanguíneo, se optimizó el proceso de separación mediante la modificación de la metodología de derivatización e inyección, gradiente y composición de la fase móvil B; implicando la adaptación de este método de referencia para la determinación de GABA y taurina. Estos aminoácidos fueron incluidos en este trabajo dado que el primero ha presentado variaciones en tejido cerebral y plasma en la DTA, además de poseer importancia considerable por su papel de neurotransmisor. También, se ha visto involucrado al aminoácido taurina en esta demencia, mostrando una disminución de los niveles en pacientes con síntomas avanzados, ya que es uno de los aminoácidos más abundantes en el sistema nervioso

central y tiene un papel importante en procesos fisiológicos como osmoregulación, neuroprotección y neuromodulación.

Objetivo

Objetivo General

Evaluar la concentración de aminoácidos en plasma sanguíneo al optimizar la técnica de HPLC en pacientes con diagnóstico clínico de DTA.

Objetivos Particulares

- ✓ Optimizar la metodología de derivatización e inyección por medio de la modificación del programa de inyección del automuestrador.
- ✓ Optimizar la metodología de gradiente de fase móvil como herramienta para mejorar la separación de los aminoácidos.
- ✓ Obtener un intervalo lineal de análisis para la cuantificación de los aminoácidos.
- ✓ Analizar la concentración de aminoácidos en muestras de sujetos controles y pacientes con DTA.

Hipótesis

En vista de los cambios reportados en la literatura sobre los niveles de aminoácidos en la DTA, particularmente en aspartato y glutamato, al poseer la función de neurotransmisores excitadores; en GABA por ser un aminoácido inhibitorio, y en arginina y citrulina, relacionados con la producción de óxido nítrico implicado en el estrés oxidativo, se espera obtener diferencias estadísticamente significativas en los niveles plasmáticos de dichos aminoácidos al comparar estos pacientes con un grupo control, formado por adultos mayores sanos.

MARCO TEÓRICO

1. Aminoácidos

1.1. Estructura Química de los Aminoácidos

Los aminoácidos son moléculas que poseen un grupo amino y un grupo carboxilo. Existen 20 aminoácidos que forman las estructuras monoméricas de las proteínas tanto si provienen de los linajes bacterianos más antiguos como de las formas más complejas de vida.¹ Estas moléculas tienen la característica de que el grupo amino y el grupo carboxilo se encuentran unidos a un mismo carbono y son llamadas α -aminoácidos (Figura 1). En todos ellos el grupo α -amino es un grupo primario, es decir que no tiene sustituyentes. La única excepción ocurre con prolina, cuyo grupo amino es secundario, en donde el nitrógeno forma parte de un anillo de pirrolidina de 5 miembros. Cada uno de los aminoácidos difiere del otro por la cadena lateral (Grupo R) que poseen. Las propiedades fisicoquímicas de cada aminoácido libre depende tanto del grupo carboxilo como del grupo amino y de su cadena lateral, siendo esta última diferente en estructura, tamaño y carga, además de influir en la solubilidad en agua.

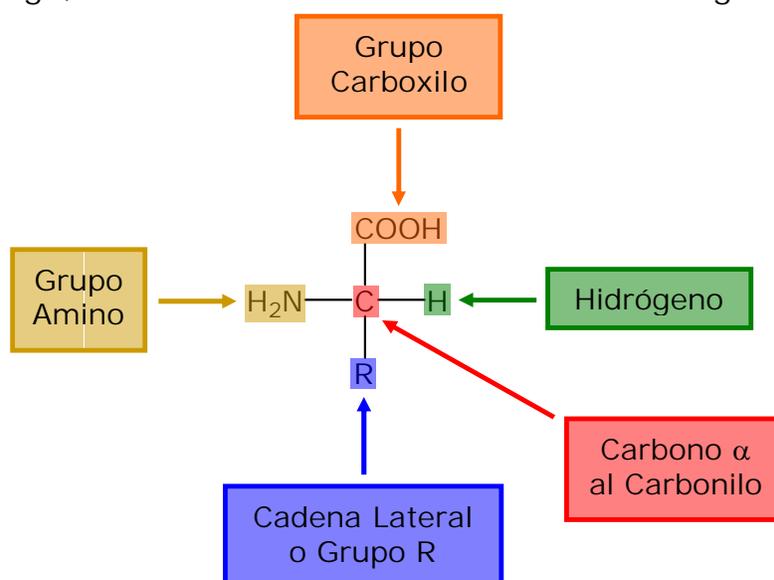


Figura 1. Estructura general de un aminoácido. El grupo -NH_2 está en la posición α al carbonilo.

Además de estos 20 aminoácidos denominados proteicos, existen alrededor de otros 300 que no se consideran proteicos. Son derivados de otros aminoácidos que, al incorporarse a las proteínas como aminoácidos proteicos y, posteriores a la formación de las proteínas, sufren modificaciones químicas.¹

Algunos aminoácidos no proteicos realizan funciones biológicas importantes como mensajeros, precursores, neurotransmisores y otros son formados en el metabolismo fisiológico. Ejemplo de aminoácidos no proteicos son GABA, taurina, citrulina, hidroxiprolina y cistina (Figura 2).

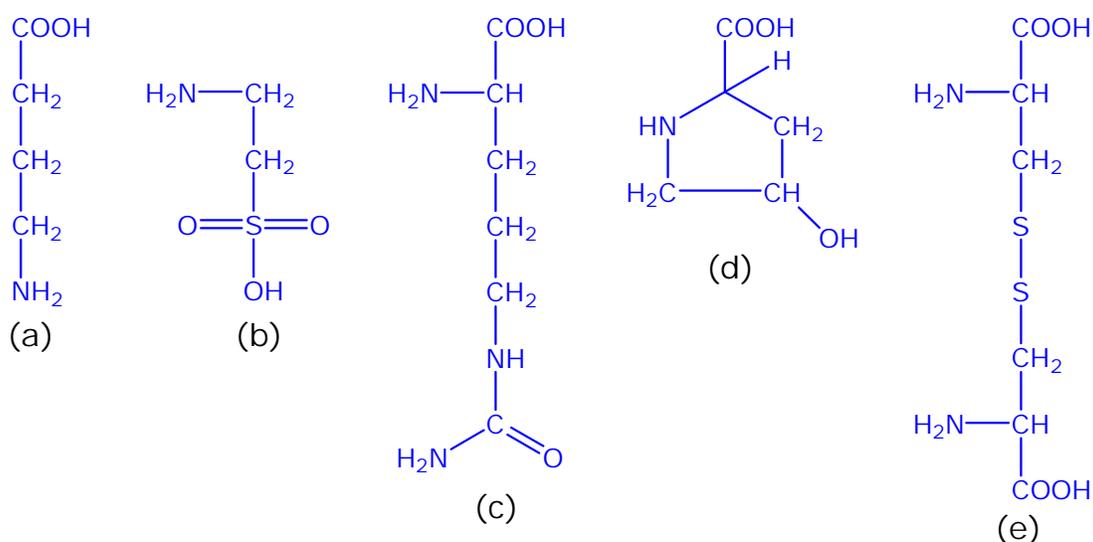


Figura 2. Estructura química de aminoácidos no proteicos: (a) GABA, (b) Taurina, (c) Citrulina, (d) Hidroxiprolina y (e) Cistina.

Los α -aminoácidos, con excepción de glicina, presentan un centro de quiralidad común, que corresponde al carbono α . Por tanto, son posibles dos formas enantioméricas, dando lugar a las formas R o S, según la configuración de los sustituyentes en un centro de quiralidad. Según la rotación del plano de luz polarizada pueden ser dextrorrotatorios (+) o levorrotatorios (-). De acuerdo a la posición del grupo amino en una proyección de Fisher (derecha o izquierda), son agrupados en D ó L. En el caso de los aminoácidos, la configuración R corresponde a la forma D,

y la S, a la L. (exceptuando el caso de la L-cisteína, que presenta configuración R).² Todos los aminoácidos que forman parte de las proteínas corresponden a la forma L. Los D-aminoácidos no se encuentran presentes en las proteínas; sin embargo, aparecen distribuidos en la materia viva; abundan particularmente en la pared celular de bacterias y en antibióticos como la gramicidina S.^{1,3}

1.2. Clasificación de los Aminoácidos

Los aminoácidos se clasifican según la cadena lateral (Figura 3) en:^{1,2,3,4}

- ✓ Aminoácidos con Carga
 - Carga Positiva o Básicos
 - Carga Negativa o Ácidos
- ✓ Aminoácidos Neutros
 - Largos Neutros (LNAA)
 - De Cadena Ramificada o Alifáticos (BCAA)
 - Aromáticos
 - Con Grupo Hidroxilo
 - Con Grupo Amida
 - Con Átomo de Azufre

Desde el punto de vista nutricional, se clasifican en Aminoácidos Esenciales, aquellos que el organismo humano no es capaz de sintetizar y tiene que adquirirlos en la dieta, y Aminoácidos No Esenciales, que son sintetizados por el organismo a partir de precursores accesibles (Tabla 1).^{1,5}

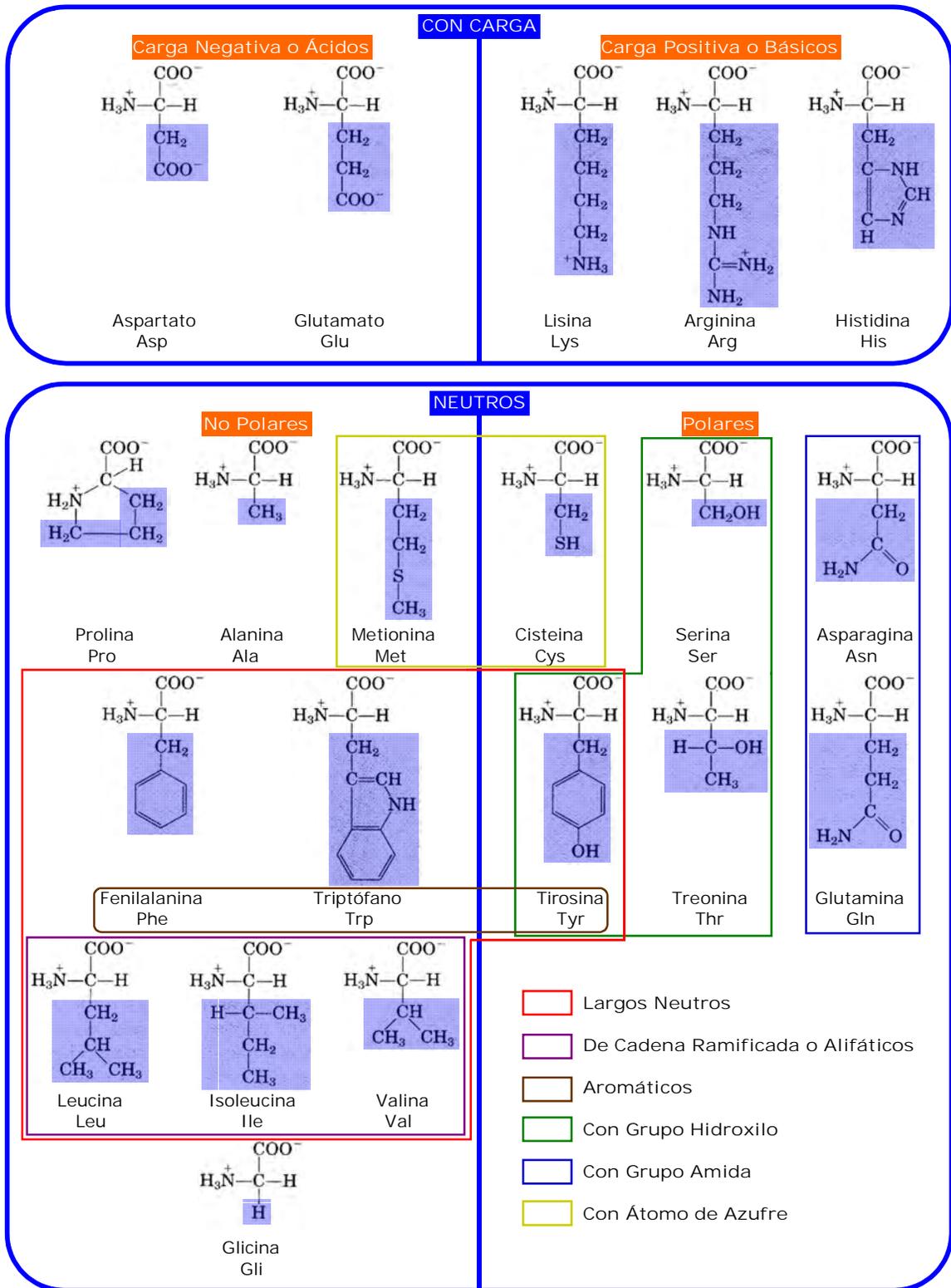


Figura 3. Clasificación de los aminoácidos según la cadena lateral. Los cuadros en colores encierran los tipos de aminoácidos neutros. Nótese que varios de ellos pertenecen a diferentes tipos.^{1,2,3,4}

Tabla 1. Aminoácidos esenciales y no esenciales para el humano.^{1,5}

No Esenciales	Esenciales
Ala	Arg*
Asn	His
Asp	Ile
Cys	Leu
Glu	Lys
Gln	Met
Gli	Phe
Pro	Thr
Ser	Trp
Tyr	Val

* Esencial en niños pero no en adultos.

NOTA: Ver abreviaturas.

1.3. Importancia Biológica de los Aminoácidos

La importancia de los aminoácidos, como bloques biológicos de construcción de proteínas, proviene del hecho de que se pueden asociar en grandes cadenas por medio de un enlace covalente tipo amida, entre el grupo $-NH_2$ de un aminoácido y el $-COOH$ de otro. Proporcionan la clave de la estructura de miles de proteínas que producen las células a partir de los 20 diferentes aminoácidos proteicos. A partir de ellos, los organismos pueden sintetizar enzimas, hormonas, péptidos, anticuerpos, antibióticos y una gama de proteínas y derivados proteicos con actividades biológicas distintas.¹

El esqueleto carbonado de los aminoácidos es transformado en intermediarios metabólicos importantes, los cuales pueden generar ácidos grasos, cuerpos cetónicos y glucosa.⁵ Participan en distintas rutas metabólicas como el ciclo de los ácidos tricarboxílicos (ciclo del ácido cítrico o ciclo de Krebs), ciclo de la urea y reacciones de transaminación, así como en la formación de neurotransmisores como catecolaminas (noradrenalina, adrenalina y dopamina), histamina, serotonina y GABA (Figura 4).

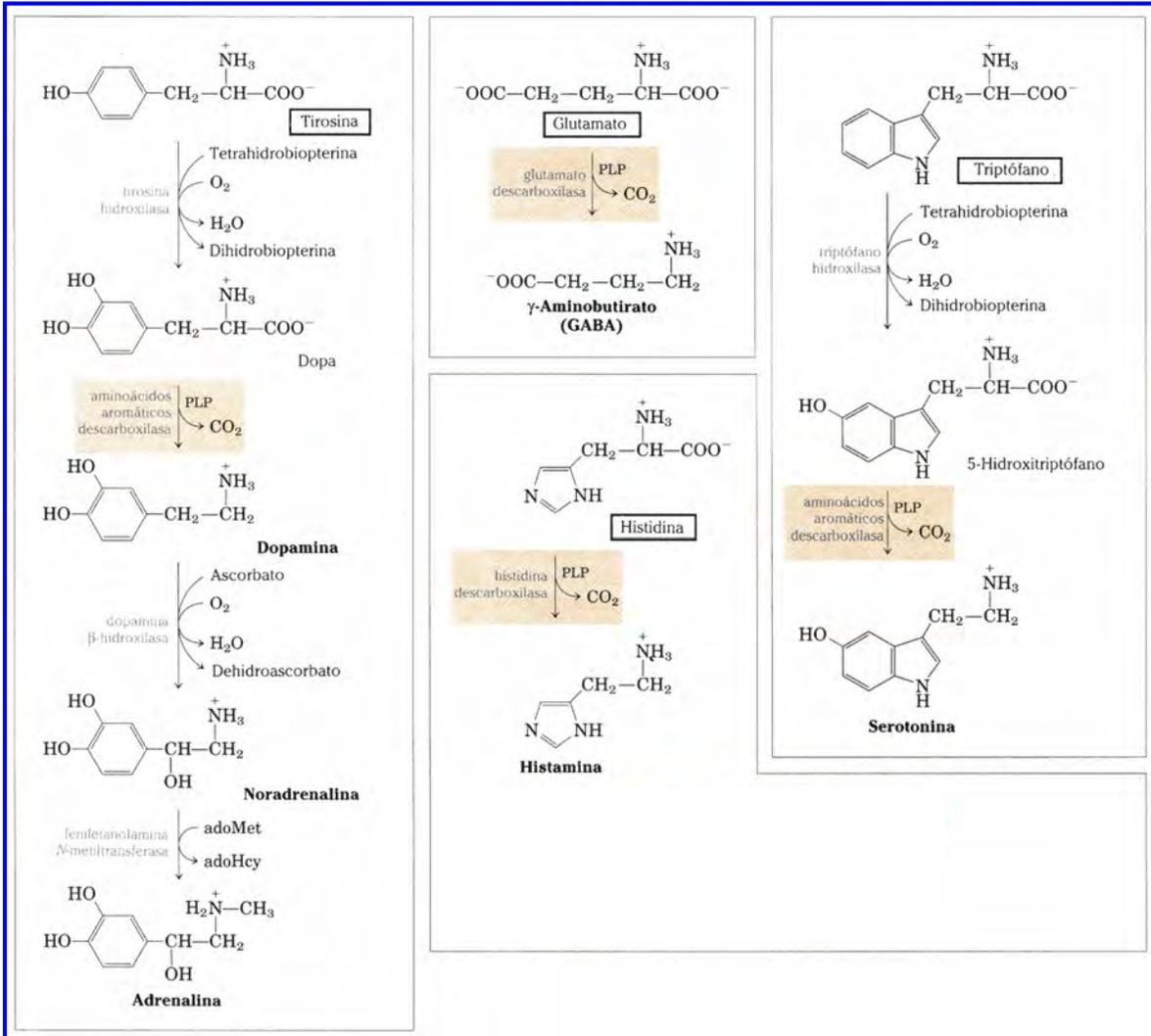


Figura 4. Formación de neurotransmisores a partir de aminoácidos.¹

El aminoácido GABA es un neurotransmisor que se encuentra ampliamente distribuido por todo el sistema nervioso central, produce inhibición presináptica y postsináptica participando en funciones de dicho sistema, como sensitivomotriz, vigilia, memoria y atención o emoción.⁶

La ornitina y citrulina actúan como precursores sucesivos de la arginina en el ciclo de la urea, donde el amoníaco se convierte en urea.¹ Citrulina por su parte, es un producto metabólico de la óxido nítrico

sintasa, una enzima productora de óxido nítrico, sustancia implicada en el estrés oxidativo.⁷

La hidroxiprolina se encuentra en un 10% de la proteína colágena, formando parte del tejido conectivo y óseo, aunque también se puede encontrar en la pared celular vegetal.³

1.4. Valor Clínico de los Aminoácidos

En la Tabla 2 se muestran los valores de referencia de distintos aminoácidos en plasma sanguíneo.⁸ Existen varias patologías asociadas a cambios en los niveles de aminoácidos.^{1,5,9} En la Tabla 3 y Tabla 4 se muestran algunas.

Tabla 2. Valores de referencia de distintos aminoácidos en plasma sanguíneo (mg/dL).⁸

Aminoácido	Intervalo	Aminoácido	Intervalo
Alanina	2.2 - 4.5	Leucina	1.0 - 2.3
Ácido α -aminobutírico	0.1 - 0.2	Lisina	1.2 - 3.5
Arginina	0.5 - 2.5	Metionina	0.1 - 0.6
Asparagina	0.5 - 0.6	Ornitina	0.4 - 1.4
Aspartato	0.0 - 0.3	Fenilalanina	0.6 - 1.5
Citrulina	0.2 - 1.0	Prolina	1.2 - 3.9
Cistina	0.2 - 2.2	Serina	0.8 - 1.8
Glutamato	0.2 - 2.8	Taurina	0.3 - 2.1
Glutamina	6.1 - 10.2	Treonina	0.9 - 2.5
Glicina	0.9 - 4.2	Triptófano	0.5 - 2.5
Histidina	0.5 - 1.7	Tirosina	0.4 - 1.6
Hidroxiprolina	0 - trazas	Valina	1.7 - 3.7
Isoleucina	0.5 - 1.3		

Tabla 3. Patologías asociadas a cambios en los niveles de aminoácidos.^{1,5}

Patología	Cambio en los niveles de aminoácidos	Síntomas	Causa
Síndrome de Hartnup	↑ Ala, Thr, Gln, Ser, Asn, Val, Leu, Ile, Phe, Tyr, Trp, His y Cit	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Fotosensibilidad ✓ Erupciones escamosas de color rojizo que aparecen durante la primera década de vida ✓ Manifestaciones neurológicas: dolor de cabeza, falta de concentración, debilidad de los miembros, ataxia 	Deficiencias en el mecanismo de transporte de determinados aminoácidos como triptófano e histidina a través del intestino delgado y riñones
Fenilcetonuria	↑ Phe y metabolitos (ácidos fenil láctico, fenilpirúvico y fenilacético)	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Vómito ✓ Retraso en el desarrollo ✓ Hipopigmentación ✓ Retraso mental grave 	Defectos en la conversión de fenilalanina a tirosina, debidos a la deficiencia de la enzima fenilalanina hidroxilasa
Alcaptonuria	↑ ácido homogentísico	<ul style="list-style-type: none"> ✓ La orina se oscurece debido a la oxidación del ácido homogentísico. ✓ Pigmentación generalizada ✓ Artritis 	Degradación defectuosa de tirosina debido a la enzima homogentisato-1,2-dioxigenasa
Enfermedad de la orina con olor a jarabe de arce	α -cetoácidos procedentes de aminoácidos con cadenas ramificadas	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Hipoglucemia ✓ Acidosis ✓ Letargo ✓ Falta de apetito ✓ Vómito ✓ Convulsiones ✓ Daño cerebral grave ✓ Muerte 	Defectuosa degradación de aminoácidos con cadenas ramificadas debido al complejo de α -cetoácido ramificado deshidrogenasa

Tabla 4. Condiciones clínicas asociadas con cambios en las concentraciones de aminoácidos en plasma y orina.⁹

Plasma	Orina
Enfermedad cardiovascular	Desórdenes metabólicos hereditarios
Depresión	Inanición / Desnutrición
Ansiedad	Ingestión/Digestión proteica
Insomnio	Alcoholismo
Síndrome de fatiga crónica	Osteoporosis
Esclerosis múltiple	Tumor de Bladder
Artritis reumatoide	Enfermedad de Cushing
Epilepsia	Síndrome de fatiga crónica
Falla cardiaca congestiva	Enfermedad celiaca
Impotencia	Catabolismo muscular
Disfunción eréctil	
Síndrome de dolor	
Sensibilidad química múltiple	
Desórdenes de detoxificación	
Trastornos del espectro autista	
Demencia tipo Alzheimer	
Hipotiroidismo	
Arritmias	
Hipertensión	
Desorden del déficit de atención y	
Trastorno de la hiperactividad del déficit de atención	
Infertilidad	

2. Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia

2.1. Fundamento de la Cromatografía

La cromatografía es una técnica de separación de los constituyentes de una mezcla de compuestos. Se ha convertido en un método analítico de primer orden para identificar y cuantificar los compuestos de una mezcla.¹⁰

La cromatografía de líquidos de alta eficiencia (HPLC, por sus siglas en inglés, que significan High Performance Liquid Chromatography) es una herramienta para el análisis, preparación, separación, purificación, identificación, detección y cuantificación de los componentes de una mezcla de sustancias.¹⁰⁻²² De todos los métodos analíticos e instrumentales, la cromatografía es el que tiene mayor aplicación y, por ello, ocupa una posición dominante.¹⁰ Es una técnica consistente en la separación de los componentes de una mezcla de sustancias en una fase estacionaria haciéndole pasar una fase móvil presurizada. Existe una variedad de métodos cromatográficos. En este trabajo, sólo se hace referencia a la cromatografía de fase químicamente unida.

El principio básico se fundamenta en los equilibrios de distribución de los compuestos presentes entre dos fases no miscibles en la que una, llamada estacionaria, está inmovilizada en una columna o fijada sobre un soporte y la otra, llamada móvil, se desplaza por la fase estacionaria.¹⁰ Participan los procesos físico-químicos de: (1) Reparto, que refiere que el soluto se equilibra entre la fase estacionaria y la fase móvil por diferencia de solubilidad, y (2) Adsorción, relativo a la fijación de una sustancia en la superficie de otra.^{10-13,16,17}

La elución es el proceso en el cual se separan los solutos a través de una fase estacionaria por el movimiento de una fase móvil. La elución a diferentes velocidades de los compuestos conduce a su separación.

2.2. Componentes de un Sistema de HPLC

Los componentes de un sistema de HPLC (Figura 5) son:^{10-13,16,17}

- ✓ Reservorio de fase móvil
- ✓ Degasificador (opcional)
- ✓ Bomba
- ✓ Inyector (manual o automático)
- ✓ Columna (con termostato opcional)
- ✓ Detector
- ✓ Sistema de Datos

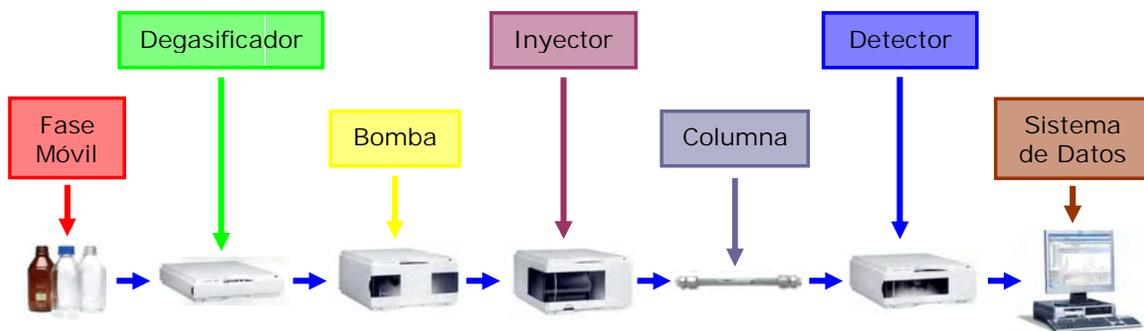


Figura 5. Componentes de un sistema de HPLC.

2.2.1. Fase Móvil

La fase móvil consta de una disolución o mezcla de disolventes que se desplaza por el sistema cromatográfico provocando la separación de los compuestos. Tiene como principales características las siguientes: no debe tener sustancias contaminantes (alta pureza: grado HPLC), disolver a la muestra y no reaccionar con la fase estacionaria, ni degradarla o disolverla.^{10-13,16,17}

2.2.1.1. Degasificador

La degasificación de la fase móvil evita la entrada de aire en el sistema. Lo anterior ocasiona descenso de presión, falta de reproducibilidad, disturbios en la línea base y modificaciones en la composición de la fase móvil.^{10-13,16,17}

Existen varias formas de degasificar, entre ellas:

- ✓ Filtración mediante vacío en línea o microvacío
- ✓ Introducción de gas inerte como argón o helio que reemplaza otros gases disueltos. Su desventaja es que requiere de un flujo constante del gas

2.2.1.2. Fuerza de Elución

La fuerza del disolvente es una clasificación relativa de la habilidad de un disolvente de desplazar un componente dado de una fase estacionaria, relativa a otros disolventes.

Una lista de los disolventes o mezclas de disolventes en orden creciente de fuerza de elución para una particular fase estacionaria es conocida como serie eluotrópica.

La serie eluotrópica refleja la polaridad creciente e hidrofiliidad de los disolventes. Dependiendo del método utilizado para determinar la serie eluotrópica puede haber cambios de lugar de disolventes. Es una guía de la fuerza del disolvente^{14,15} y se puede utilizar en los análisis por HPLC para la mejora o perfeccionamiento de los mismos, ya que en fase reversa al aumentar el porcentaje de disolvente orgánico en la fase móvil, disminuye el tiempo de retención de los compuestos. Esto último también ocurre al aumentar la concentración de sales de la fase móvil. La modificación al pH puede cambiar la elución de los compuestos, dependiendo su grado de ionización debido a que la retención de compuestos ionizables es fuertemente influenciada por el pH.^{16,17}

El aumento en el flujo de la fase móvil provoca una disminución del tiempo de análisis y un aumento en la presión, pero no modifica la separación de los compuestos.

2.2.2. Bomba

La bomba es parte fundamental del sistema de HPLC. Sus características son:^{10-13,16,17}

- ✓ Debe ser químicamente inerte
- ✓ Fabricada con materiales completamente resistentes
- ✓ Soportar altas presiones
- ✓ Proporcionar un flujo de 0.5 - 10 mL/min con reproducibilidad alta (<1.0%) (Ver nota "1" al pie de página) y libre de pulsos
- ✓ De preferencia, proveer un gradiente de fase móvil y un cambio rápido de disolvente

2.2.3. Inyector

Permite la introducción de un volumen de muestra al circuito líquido que se encuentra en alta presión. Trabaja con dos circuitos: a presión alta y atmosférica. Puede realizarse la inyección de la muestra de forma manual o automática; esta última se prefiere ya que disminuye el error humano y aumenta la precisión.^{16,17}

2.2.4. Columna

Consiste en un tubo de pequeño diámetro interno que contiene partículas esféricas de sílica (denominadas base de soporte) en cuya superficie se enlaza químicamente la fase estacionaria. Generalmente se utiliza como fase estacionaria una cadena hidrocarbonada de 18 carbonos.

Cuando la fase estacionaria tiene un carácter no polar, como el caso anterior, se dice que el análisis que se está llevando a cabo es en fase

¹ Aunque existen bombas capaces de proporcionar flujos inferiores a 0.5 mL/min.

reversa. Por el contrario, cuando tiene un carácter polar, por ejemplo los grupos ciano, amino y nitro, se denomina fase normal.^{16-18,22}

2.2.4.1. Control de la Temperatura de la Columna

El control termostatzado de la columna provoca que se obtengan áreas y tiempos de retención más reproducibles. Además, al aumentar la temperatura mejora la desorción de los analitos reduciendo el coleo de los picos y el tiempo de retención; igualmente disminuye la viscosidad y por tanto la presión desciende.^{16-18,22}

2.2.4.2. Variación en las Dimensiones de la Columna

En la Tabla 5 se muestran los efectos sobre la elución de compuestos al modificar las dimensiones de la columna cromatográfica^{16-18,22} (Figura 6).

Tabla 5. Efecto de la disminución del tamaño de partícula, diámetro interno y largo de la columna en los análisis por HPLC.^{10-13,16-18,22}

Parámetro	Al disminuir	Justificación
Tamaño de Partícula	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Mejor separación ✓ ↓ Tiempo de análisis ✓ Provoca que picos anchos se vuelvan esbeltos ✓ ↑ Presión 	Aumenta la superficie de contacto y el número de sitios activos que están en contacto con los analitos
Diámetro Interno	<ul style="list-style-type: none"> ✓ ↑ Tamaño de los picos ✓ ↓ Ancho ✓ ↓ Cantidad de disolvente ✓ ↑ Presión ✓ ↓ Flujo 	Una banda de separación menos diluida es formada por la fase móvil, ya que sólo al variar el diámetro interno, se varía el volumen en la columna
Largo	<ul style="list-style-type: none"> ↓ Proporcionalmente el tiempo de análisis ↓ Proporcionalmente el uso de disolventes ↓ Presión 	Disminuye el tiempo que tardan en recorrer los analitos la columna

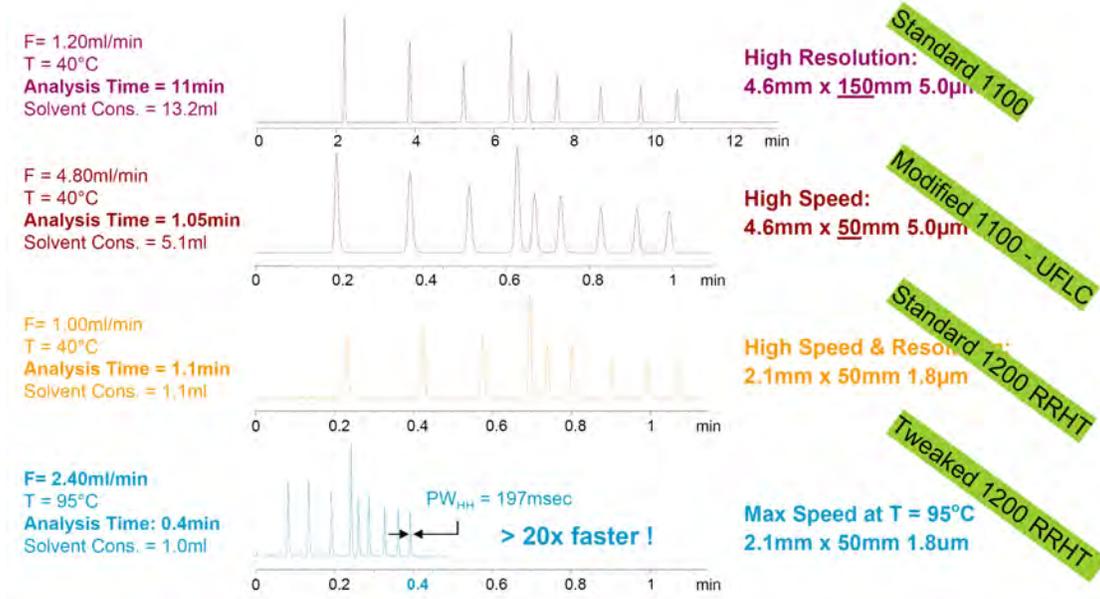


Figura 6. Efecto de la variación del tamaño de partícula, diámetro interno, largo y temperatura de la columna sobre la separación de compuestos.¹⁸

2.2.5. Detector

Consiste en un dispositivo capaz de convertir una propiedad física, no medible directamente, en una señal elaborable y ofrecer información sobre la naturaleza y magnitud de la propiedad física. Se utiliza para revelar la presencia de las sustancias eluidas a la salida de la columna cromatográfica. En la Tabla 6 se muestran algunas características de ciertos detectores para cromatografía de líquidos.^{10-13,16,17}

2.2.6. Elución Isocrática y por Gradiente

Al procedimiento en el que la composición de la fase móvil permanece constante a lo largo del análisis se llama elución isocrática.

En la elución por gradiente se cambia la composición de la fase móvil, ya sea de forma continua o en etapas. Tiene la ventaja de que se obtienen picos bien formados y sin cola. Además, el tiempo de elución disminuye y pueden separarse picos que no se pueden separar con la

elución isocrática.¹⁰⁻¹³ En la Figura 7 se muestra un ejemplo de separación de compuestos con elución isocrática y por gradiente.

Tabla 6. Fundamento, características y sensibilidad de algunos detectores para HPLC.^{10-13,16,17}

Detector	Fundamento	Características	Sensibilidad ¹¹
Ultravioleta-Visible	Espectrofotometría de absorción de luz visible y ultravioleta de un componente a una determinada longitud de onda	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Es el más empleado ✓ No destruye la muestra ✓ Se puede usar con un gradiente 	1 pg
Arreglo de Diodos	Detección ultravioleta a múltiples longitudes de onda	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Permite obtener cromatogramas en 3 dimensiones (absorbencia, tiempo y longitud de onda) 	1 pg
Fluorescencia	Mide la energía emitida por ciertos compuestos excitados por la radiación ultravioleta	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Realiza análisis espectrales ✓ Altamente selectivo 	10 fg
Electroquímico	Mide la corriente de oxidación o reducción en los compuestos que son capaces de reaccionar de esta manera	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Alta especificidad ✓ Muy selectivo 	100 fg

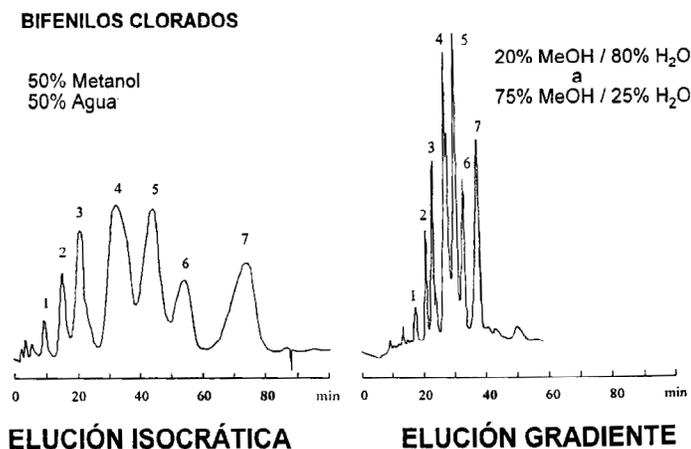


Figura 7. Separación de bifenilos clorados con elución isocrática y por gradiente.¹²

2.3. Aplicaciones de la Técnica de HPLC

Si el componente a analizar es soluble, ya sea en disolventes polares o no polares, se puede analizar por HPLC. Se pueden llevar a cabo análisis en fracciones de segundos (Figura 8), en matrices complejas como líquidos biológicos (Figura 9) y determinando concentraciones muy bajas de los compuestos de interés (Figura 10).^{16,17,22}

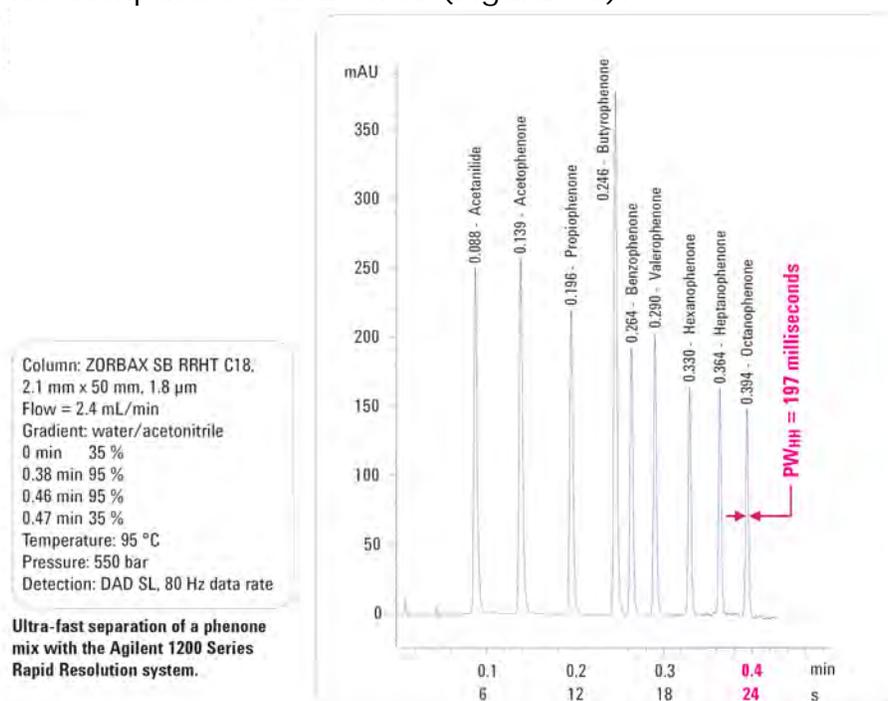
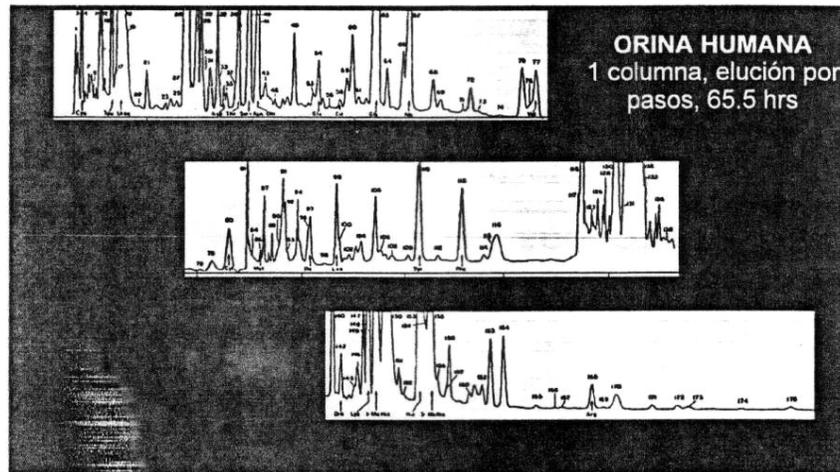


Figura 8. Ultra-rápida separación de una mezcla de fenonas.²²



SEPARATION OF URINE BY ION EXCHANGE CHROMATOGRAPHY

Reprinted by permission of Dr. P.B.Hamilton
(Handbook of Biochemistry, Selected Data for Molecular Biology, B-47, CRC Press, Cleveland, 1968)

Figura 9. Análisis de compuestos en orina humana.¹²

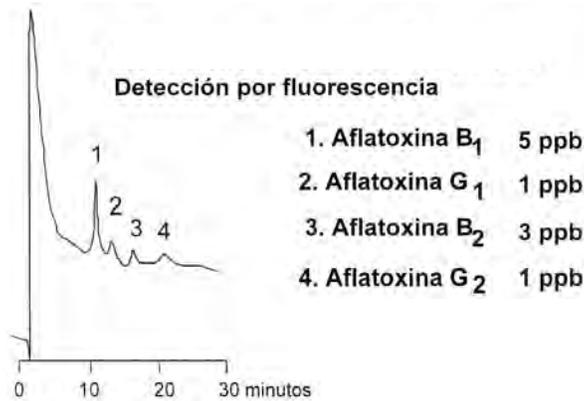


Figura 10. Análisis de aflatoxinas en mantequilla de maní.¹²

2.4. Análisis de Aminoácidos por HPLC

El análisis de aminoácidos es de amplia utilidad en los ámbitos bioquímicos y farmacéuticos, incluso en la investigación clínica. Los métodos utilizados en la determinación de aminoácidos en fluidos biológicos implican una separación por cromatografía de intercambio iónico o de fase químicamente unida (fase reversa).²³

La detección de los aminoácidos, ya sea por absorbencia, fluorescencia o detector electroquímico, requiere una reacción de derivatización. Esto proporciona a los aminoácidos la capacidad de ser detectados, incrementándose la especificidad del método. Los reactivos

utilizados son ninhidrina, o-ftalaldehído (OPA), fenilisotiocianato, cloruro de 5-dimetilamino-1-naftalensulfonilo (dansyl) y 9-fluorenilmetil cloroformato (FMOC).²³

El OPA es el agente más común para el análisis de aminoácidos por HPLC en fase reversa,²⁴ es un efectivo agente derivatizante debido a su facilidad de reaccionar con los grupos amino. La reacción de derivatización de aminoácidos primarios (donde el grupo amino se encuentra unido a uno y sólo un átomo de carbono) con OPA se muestra en la Figura 11.²⁵



Figura 11. Reacción de derivatización de los aminoácidos primarios con OPA.²⁵

Los derivados isoindólicos contienen en la posición 1 del anillo la cadena lateral de los aminoácidos. En presencia de un compuesto tiol y pH alcalino, el OPA reacciona con aminoácidos primarios y forma derivados fluorescentes. El procedimiento de derivatización es bastante simple y la reacción ocurre rápidamente a temperatura ambiente en disolución acuosa. El análisis de aminoácidos vía derivatización no requiere procedimientos de purificación adicionales al tratamiento de las muestras. Los derivados con OPA son menos polares que los aminoácidos originales en sí, lo que permite su separación por fase reversa. Además, el reactivo sin derivatizar no presenta fluorescencia nativa y como consecuencia no produce señales interferentes. Los productos de derivatización presentan un tiempo corto de vida media.

La ventaja de su uso con la detección fluorescente es que este reactivo no presenta esta propiedad per se; se puede alcanzar una alta reproducibilidad y sensibilidad (fmoles).²³

Otro tipo de análisis reportado en la literatura es el uso de cromatografía de intercambio iónico con una derivatización postcolumna.²³ De hecho, varias compañías comerciales han establecido diferentes protocolos, basados en intercambio catiónico, fase reversa y detección electroquímica, fluorescente o por ultravioleta.^{26,27,28} Uno de ellos, el de Pickering Laboratories²⁹ reporta el análisis de 45 aminoácidos por intercambio catiónico utilizando gradiente de fase móvil y temperatura con ninhidrina como agente derivatizante. Además del OPA, otros agentes derivatizantes podrían ser utilizados, como el cloruro de dansyl, para la detección de cistina, imposible con el uso de OPA; el fenilisotiocianato para aminoácidos primarios y secundarios o el FMOC para aminoácidos secundarios.²³

Para analizar aminoácidos libres en muestras fisiológicas como plasma, orina y líquido cefalorraquídeo, es necesario eliminar las proteínas presentes. Varios métodos han sido descritos para la deproteinización de muestras; incluyen precipitación con ácidos (ácido sulfosalicílico, ácido perclórico, ácido tricloroacético) o disolventes orgánicos (etanol, metanol, acetonitrilo), ultrafiltración, ultracentrifugación y diálisis.²³ El acetonitrilo ha sido utilizado como agente deproteinizante debido a que no interfiere con la determinación de aspartato y se reporta una completa recuperación de triptófano.³⁰

3. Demencia Tipo Alzheimer

3.1. Características de la Demencia Tipo Alzheimer

La DTA es la causa de uno de los más comunes tipos de demencia. Es un trastorno o desorden cerebral neurodegenerativo que afecta a los adultos mayores. Se caracteriza por la formación de agregados de dos proteínas: placas neuríticas y marañas neurofibrilares, que están involucradas en el proceso de neurodegeneración y muerte neuronal. También existe una reducción de sinapsis y pérdida de células neuronales.³¹ La neurodegeneración en la DTA es una condición patológica de las células, como una forma acelerada del envejecimiento. Las placas neuríticas son generadas por depósitos en el cerebro humano de fibras del péptido β -amiloide, un fragmento derivado del procesamiento proteolítico de la proteína precursora de amiloide. El mayor componente de los fragmentos pareados helicoidales, que forman una red filamentosa compacta, descritas como marañas neurofibrilares, es la proteína Tau. Existe evidencia en estudios de cultivos cerebrales que el estrés oxidativo constituye el principal factor implicado en la modificación de las señalizaciones de rutas metabólicas neuronales. Esto conlleva a anomalías bioquímicas y estructurales y a una neurodegeneración en la DTA. La mayoría de los casos corresponden a la forma esporádica (90-95%).

El síntoma principal es la pérdida de la memoria, como la dificultad para recordar nombres y eventos recientes en las etapas iniciales. Otros síntomas tardíos son alteraciones del juicio, desorientación, confusión, cambios en la conducta y problemas en el habla y al caminar.³²

El diagnóstico de certeza requiere que la manifestación de lesiones particulares en el tejido cerebral. Por ende, el diagnóstico certero es establecido en las autopsias, jamás en la práctica; el 90% de las lesiones cerebrales concuerda con el diagnóstico clínico.³³ No hay

pruebas convincentes de que cualquiera de las diversas formas de tratamiento propuestas para la DTA tengan algún efecto saludable.³⁴

Los criterios diagnósticos para la DTA son:

- ✓ Definir la demencia mediante examen clínico, la Miniexploración del Estado Mental, la Escala de Demencia de Blessed o un examen similar del estado mental
- ✓ Edad del paciente
- ✓ Empeoramiento progresivo de la memoria y otras funciones cognitivas como lenguaje, percepción y capacidades motoras
- ✓ Exclusión de otras enfermedades cerebrales

La prueba de Miniexploración del Estado Mental, llamada también Mini-Mental, por su nombre en inglés Mini-Mental State Examination, fue desarrollada como una prueba de evaluación de función cognitiva. Está dividida en varias secciones: orientación, registro, atención y cálculo, evocación y lenguaje. La administración toma de 5 a 10 minutos y el máximo puntaje es de 30, donde un valor ≥ 24 corresponde a un sujeto normal. Se ha utilizado como una prueba de evaluación de demencia y como parte del estudio de diagnóstico de la DTA, ya que corresponde del 60 al 80% de los casos de demencia.^{32,35}

3.2. Aminoácidos y la Demencia Tipo Alzheimer

La determinación de aminoácidos libres es de interés en tejido cerebral humano, líquido cefalorraquídeo y plasma, sobre todo en sujetos post mórtem, debido a que existen cambios en los niveles de aminoácidos. Existe una gran discrepancia en la literatura sobre las variaciones encontradas en la DTA. Las concentraciones plasmáticas de aminoácidos libres podrían funcionar como un factor de regulación de biosíntesis de neurotransmisores en el cerebro.³⁶

En la Tabla 7 se muestran algunos cambios que se han reportado en la literatura.

Tabla 7. Cambio en las concentraciones de aminoácidos en distintas muestras en pacientes con DTA.

Muestra	Cambio en los Niveles de Aminoácidos	Autor
LCR*	↑ L-Gln ↓ L-Asp	D'Aniello, et al. 2005 ³⁷
LCR	↑ D-Ser ↑ D-Asp ↑ L-Gln ↑ L-His	Fisher, et al. 1998 ³⁸
LCR	↓ Glu ↑ Asp ↑ Lys	Martínez, et al. 1993 ³⁹
LCR	↓ Asp ↓ Glu ↑ Gln	Tohgi, et al. 1992 ⁴⁰
LCR	↑ Glu ↑ Gli	Jiménez, et al. 1998 ⁴¹
Plasma	↑ Asp ↑ Gli ↓ Asn ↓ GABA	
LCR	↓ Gly ↓ Leu ↓ Val	Basun, et al. 1990 ⁴²
Plasma	↓ Tau ↓ Glu	
Plasma	↑ Phe ↑ Arg/(Orn+Lys+His) ↑ 100*[Tau/(Ser*Met)]	Ravaglia, et al. 2004 ³⁶
Plasma	↓ Trp ↓ Met ↑ Tir/Trp+Phe+Val+Leu+Ile ↑ 100*[Tau/(Ser*Met)]	Fekkes, et al. 1998 ⁴³
Suero	↓ D-Ser ↑ L-Ser	Hashimoto, et al. 2004 ⁴⁴
Tejido Cerebral	↓ GABA ↓ Glu ↓ Asp	Seidl, et al. 2001 ⁴⁵

* LCR = Líquido cefalorraquídeo

DISEÑO EXPERIMENTAL

Las condiciones de análisis fueron optimizadas a partir de un método de referencia, el cual establece la determinación de los aminoácidos presentes en proteínas/hidrolizados proteicos, vía una derivatización precolumna.⁴⁶ (Apéndice 1) Para el análisis de aminoácidos en plasma sanguíneo, el proceso de separación fue optimizado mediante la modificación de la metodología de derivatización e inyección, gradiente y composición de la fase móvil B, incluyendo GABA y taurina como analitos.

Los aminoácidos analizados se muestran en la Tabla 8.

Tabla 8. Aminoácidos analizados por el sistema de HPLC en este trabajo.

Aminoácidos			
Aspartato	Histidina	Alanina	Metionina
Glutamato	Glicina	Taurina	Triptófano
Asparagina	Treonina	GABA	Fenilalanina
Serina	Citrulina	Tirosina	Isoleucina
Glutamina	Arginina	Valina	Leucina

Cada aminoácido fue cuantificado utilizando una curva de calibración. Una metodología fue propuesta para el tratamiento de las muestras de plasma sanguíneo. El número de muestras analizadas fueron de 10, para el grupo control, y de 6, para los pacientes con DTA.

4. Condiciones Experimentales

4.1. Reactivos

En la Tabla 9 se muestran los reactivos utilizados.

Tabla 9. Pureza, masa molecular, marca y lote de los reactivos utilizados.

Reactivo	Pureza [%]	Masa Molecular [g/mol]	Marca	Lote
Ácido L-aspártico	>99	133.1	Sigma Aldrich, SigmaUltra (TLC)	042K0056
Ácido L-glutámico	Mínimo 99	147.13	Sigma Aldrich (TLC)	015K0015
L-Asparagina	Mínimo 98	132.12	Sigma Aldrich (TLC)	061K5407
L-Serina	Mínimo 99	105.1	Sigma Aldrich (TLC)	111K0883
L-Glutamina	≥99	146.15	Sigma Aldrich, ReagentPlus™	056K0149
L-Histidina	≥99	155.16	Sigma Aldrich, ReagentPlus™	026K1627
Glicina	Mínimo 99	75.07	Sigma Aldrich (TLC)	122K0035
L-Treonina	≥98	119.12	Sigma Aldrich, Reagent Grade	095K0374
L-Citrulina	Mínimo 98	175.19	Sigma Aldrich (TLC)	073K2511
L-Arginina	≥98	174.2	Sigma Aldrich, Reagent Grade	105K0036
L-Alanina	≥98	89.09	Sigma Aldrich, Reagent Grade	035K0565
Taurina	99	125.15	Sigma Aldrich	01528KO
Ácido γ -aminobutírico	Mínimo 99	103.12	Sigma Aldrich	083K0020
L-Tirosina	≥98	181.19	Sigma Aldrich, Reagent Grade	075K0015
L-Valina	100	117.15	Sigma Aldrich, Cell Culture Tested, non-animal source	026K0373
L-Metionina	≥98	149.21	Sigma Aldrich, Reagent Grade	056K0059
L-Triptófano	≥98	204.23	Sigma Aldrich, Reagent Grade	026K0375
L-Fenilalanina	≥98	165.19	Sigma Aldrich, Reagent Grade	075K0097

Tabla 9. Continuación.

Reactivo	Pureza [%]	Masa Molecular [g/mol]	Marca	Lote
L-Isoleucina	≥98	131.18	Sigma Aldrich, Reagent Grade	026K0716
L-Leucina	≥98	131.18	Sigma Aldrich, Reagent Grade	045K0387
Fosfato dibásico de sodio	Mínimo 99	141.96	Sigma Aldrich, SigmaUltra	086K0066
Cloruro de sodio	≥99.5	58.44	Fluka, BioChemika, Ultra (AT)	1266100
Cloruro de potasio	≥99.5	74.56	Fluka, BioChemika, Ultra (AT)	1195693
Cloruro de calcio dihidratado	≥99.5	147.02	Fluka, BioChemika, Ultra (KT)	1237867
Cloruro de magnesio hexahidratado	≥99.0	203.31	Fluka, BioChemika, Ultra (KT)	1256069
Bicarbonato de sodio	≥99.5	84.01	Fluka, BioChemika, Ultra (T)	1308058
Fosfato monobásico de sodio dihidratado	≥99.0	156.01	Fluka, BioChemika, Ultra (T)	1234415
Metanol	99.98	32.04	J. T. Baker (HPLC)	E37C13
Acetonitrilo	99.99	41.05	J. T. Baker (HPLC)	E32C51

El reactivo OPA (conteniendo o-ftalaldehído y ácido 3-mercaptopropiónico en buffer de borato; lote 1391532) y el buffer de borato (lote 1299234) 0.4 N en agua a pH 10.2 son de la marca Agilent. Se realizaron alícuotas del reactivo OPA colocando 100 µL en insertos de vidrio con soporte de polímero almacenándolas a 4°C. Cada alícuota se utilizó como máximo por 7 días.

El agua desionizada utilizada fue generada al hacer pasar agua bidestilada por un sistema Simplicity® UV de la marca Millipore (No. de inventario: 02235137, Lote: F6PN88357) con un filtro final de 0.05 µm.

4.2. Disoluciones

La disolución Krebs Ringer acidificada (DKRA) fue utilizada como medio para las diluciones de los estándares y como blanco del estudio, ya que es isotónica al plasma sanguíneo.⁴⁷ Fue acidificada para mantener la estabilidad de los aminoácidos. Fue preparada pesando la masa necesaria para un volumen final de 250 mL con una concentración 138 mM de NaCl, 11 mM de KCl, 1.5 de CaCl₂, 1 mM de MgCl₂, 11 mM de NaHCO₃ y 1 mM de NaH₂PO₄. Se disolvieron las sales en agua desionizada, se ajustó el pH a 3.0 con ácido clorhídrico 0.1 M.

La fase móvil A consistió en una disolución 40 mM de fosfato dibásico de sodio a pH 7.8. La fase móvil B se preparó mezclando acetonitrilo:metanol:agua en una proporción 40:45:10.

Todas las disoluciones fueron filtradas con una membrana de 0.22 µm.

4.3. Sistema de HPLC

El sistema de HPLC utilizado es de la marca Agilent, modelo 1100 (Agilent Technologies). Consta de una cabina para disolventes, un degasificador de vacío (Serie G1379A, no. de inventario 2207592), una bomba binaria de doble pistón y alta presión con cámara mezcladora de disolventes y amortiguador (Serie G1312A, no. de inventario 2207593), un inyector automático con muestreador de placa de pocillos (Serie G1367A, no. de inventario 2211132), un módulo de temperatura controlada para el muestreador (Serie G1330B, no. de inventario 2211133), un compartimento termostatzado para columnas (Serie G1316A, no. de inventario 2211134) y un detector de fluorescencia (Serie G1321A, no. de inventario 2211135). La captura y manipulación de los cromatogramas se realizaron con una computadora personal marca HP Compaq dc7600 (No. Inventario 2211136) en el ambiente Windows XP Professional con el programa ChemStation for LC 3D

systems Rev. B.01.03 [204], Agilent Technologies. Se utilizaron dos columnas de fase reversa de la marca Agilent Zorbax Eclipse C18 AAA Solvent Saver Plus con dimensiones de 3.0 mm de diámetro interno, 150 mm de largo y 3.5 μm de tamaño de partícula (Serie USTE001638 y Lote AAA0632002 para ambas). Para la detección, se programó el detector para excitar a una longitud de onda de 340 nm y medir la energía emitida por los compuestos fluorescentes a 450 nm. La temperatura de la columna se estableció en 40°C. El flujo y la aceleración de la bomba fueron de 1.000 mL/min y 100.00 mL/min², respectivamente.

El gradiente y el programa de inyección utilizados en las determinaciones se muestran en el apartado de "Resultados"

4.4. Material Adicional

- ✓ Balanza marca Ohaus, modelo GA200, serie 2580, no. de inventario 874774
- ✓ Parrilla de Agitación/Calentamiento marca Sybron/Thermolyne Nuova II, modelo SP18425, serie 30605202, no. de inventario 405714
- ✓ Potenciómetro marca Beckman modelo Φ 360, serie 4921, no. de inventario 02259653, con un electrodo combinado modelo 511275 (lote S712B) sin compensación automática de temperatura. Las mediciones de pH se realizaron previa calibración con disoluciones buffer de pH 4, 7 y 10
- ✓ Centrifuga marca Eppendorf, modelo 5415C, no. de inventario 1483080
- ✓ Sonicador marca Branson Ultrasonic Cleaner, modelo 2510R-MT no. de inventario 2215356.
- ✓ Sistema de filtración marca Whatman de 1 L de capacidad (no. de inventario 02259635). Se utilizaron filtros de membrana Durapore[®]

GV de 9 cm de diámetro de la marca Millipore de 0.22 μm de tamaño de poro

- ✓ Filtros de jeringa GHP Acrodisc 25 mm 0.45 μm GHP membrane, certificado HPLC
- ✓ Micropipetas marca Biohit Proline de 2-20, 20-200 y 100-1000 μL

NOTA:

Todo el material de vidrio y las espátulas fueron lavados con Extran alcalino MA01, perfectamente enjuagados con agua municipal y con agua del sistema Millipore, y esterilizados.

5. Metodología

5.1. Programa de Inyección

El programa de inyección establecido en el método de referencia fue optimizado respecto a la cantidad de muestra y agua, lavados externos de la aguja y velocidades de toma. Algunos laboratorios de investigación (Laboratorio del Dr. Keith M. Kendrick, Dr. Carlos de la Riva y Dra. Rosalinda Guevara Guzmán) han utilizado 5 μL de muestra para la determinación plasmática de aminoácidos, catecolaminas y acetilcolina. En este trabajo se adecuó el sistema de HPLC para utilizar ese mismo volumen en lugar del que recomienda la compañía Agilent (0.5 μL).

El volumen de inyección total del método de referencia es de 36 μL . No se modificó la cantidad de buffer utilizado ni la del reactivo OPA. Como no fueron analizados aminoácidos secundarios, no fue utilizado el reactivo FMOC. Fue considerado el mismo volumen final de inyección (36 μL) que en el método de referencia por lo que la cantidad de agua se modificó, de 32 μL a 28 μL para completar el volumen.

El lavado externo de la aguja con agua fue modificado de una única vez a tres veces, con el fin de asegurar la limpieza de la aguja de compuestos polares solubles en agua y evitar la contaminación entre

reactivos. En el caso del lavado único con acetonitrilo, el método de referencia lo establece como paso opcional. Se propusieron 2 lavados con acetonitrilo para eliminar posibles contaminantes de carácter no polar provenientes de las muestras de plasma y del reactivo OPA, con el fin de no contaminar el agua del Vial 4 y así evitar la generación de falsos picos.

La velocidad de toma propuesta es de 200 $\mu\text{L}/\text{min}$; se cambió a 50 $\mu\text{L}/\text{min}$ ya que se observó falta de reproducibilidad con la primera, debido a que la aguja tomaba de forma rápida la muestra permitiendo la entrada de aire a la aguja. Esto debido a la ubicación de la aguja en los insertos de plástico conteniendo las muestras.

El tiempo total aproximado que tarda el automuestreador en realizar los movimientos de la aguja es de 3 minutos.

5.2. Gradiente

El gradiente de elución fue modificado respecto al método de referencia al cambiar el porcentaje de fase móvil B y el tiempo de análisis. Para realizar las pruebas de variación del gradiente se prepararon disoluciones de concentración 1 mg/mL de cada aminoácido estudiado (Tabla 8) pesando cuidadosamente 1 mg de cada uno en tubos eppendorf de 2 mL y agregando 1 mL de DKRA. Después, para el análisis individual de los aminoácidos fue realizada una dilución 1/1000, colocando 1 μL de cada disolución 1 mg/mL en un tubo eppendorf de 2 mL agregando 999 μL de DKRA. Para el análisis conjunto se realizó la misma dilución 1/1000 mezclando 1 μL de cada disolución individual de 1 mg/mL y agregando 980 μL de DKRA. Así, la concentración final de cada aminoácido fue de 1000 pg/ μL . Esta disolución fue utilizada para evaluar las pruebas del gradiente y la fase móvil.

Como consecuencia de la modificación del gradiente, aumentó el tiempo de análisis. En el gradiente del método de referencia, fue de 26

minutos y los últimos 2.8 minutos fueron de regeneración del porcentaje inicial. En el gradiente final, el tiempo de análisis fue de 30 minutos con 2.9 minutos de regeneración. Sumando a los 3 minutos que tarda el automuestrador en realizar los movimientos de la aguja, y que además se programó a la bomba para esperar otros 3 minutos después de finalizar el gradiente, el tiempo total de análisis fue de 36 minutos.

5.3. Composición de la Fase Móvil B.

La proporción de acetonitrilo fue modificada del método de referencia. De manera que, de una proporción 45:45:10 de acetonitrilo:metanol:agua, se utilizó 40:45:10 para el análisis de las muestras. Esto se realizó para aumentar la polaridad de la fase y así conseguir un aumento del tiempo de retención de los compuestos.

5.4. Curva de Calibración

El método de estándar externo fue utilizado para la realización de la curva de calibración de los aminoácidos. Fueron preparadas soluciones individuales de concentración 10 mM. Después, todos los aminoácidos fueron mezclados en una misma disolución de concentración aproximada de 200 μM , para cada uno. Posteriormente, se realizaron diluciones hasta llegar a la concentración de 0.0009 μM . Las concentraciones inyectadas al sistema de HPLC fueron desde 0.0009 hasta 200 μM . A continuación se describe el proceso para la preparación de la curva de calibración. (Apéndice 2)

1. Pesar, en un vaso de precipitados de 10 mL, la masa para preparar 10 mL de una disolución 10 mM de cada aminoácido.
2. Disolver con HCl 0.1 M y trasvasar a un matraz aforado de 10 mL, realizando varios lavados del vaso

NOTA: Glutamina se disuelve con agua

3. Sumergir en un baño sónico durante 1-2 minutos
4. Realizar una mezcla y dilución 1/50 con DKRA, colocando 200 μL de cada disolución del paso 2 en un matraz de 10 mL (disolución 200 μM , denominada "disolución madre")
5. Colocar 800 μL de la disolución anterior un tubo eppendorf y añadir 80 μL de DKRA (disolución 181.8 μM)
6. Colocar 600 μL de la disolución anterior un tubo eppendorf y añadir 300 μL de DKRA (disolución 121.2 μM)
7. Realizar diluciones seriadas 1/2, tomando 500 μL y agregando 500 μL de DKRA, hasta llegar a una concentración de 0.0009 μM

La disolución inicial de los estándares en ácido clorhídrico 0.1 M fue tomada de Frank y Powers²⁴, debido a que las disoluciones de aminoácidos son estables a pH bajo, exceptuando para glutamina, que presenta una mayor estabilidad en agua.⁴⁸ Así mismo, Tcherkas y colaboradores reportan la preparación de disoluciones estándares de la curva de calibración a partir de una concentración 200 μM .⁴⁹

5.5. Tratamiento de las Muestras de Plasma.

El tratamiento de las muestras de plasma consistió en la extracción de sangre venosa en un tubo con EDTA como agente anticoagulante, obteniendo así el plasma. Éste fue deproteínizado con la utilización de acetonitrilo. Posteriormente, la muestra fue centrifugada para evitar un bloqueo en la columna, lo que se traduciría en un aumento de la presión del sistema y la posibilidad de interferir en las determinaciones. El tratamiento se realizó de la siguiente manera:

1. Extraer 4 mL de sangre en tubo con K_2EDTA
2. Centrifugar a 3,000 rpm durante 15 minutos

3. Separar el plasma del paquete celular y almacenar a -70°C hasta su análisis
4. Mezclar 200 μL de plasma con 200 μL de acetonitrilo
5. Centrifugar a 14,000 rpm durante 7 minutos
6. Separar el sobrenadante y hacerlo pasar por filtros de jeringa de 0.45 μm
7. Realizar una dilución 1/20 tomando 10 μL y añadiendo 190 μL de DKRA
8. Inyectar esta disolución al sistema de HPLC vía programa de inyección en automuestrador

5.6. Análisis de Aminoácidos en Sujetos Controles y Pacientes con Demencia Tipo Alzheimer

Diez sujetos controles y 6 pacientes con DTA fueron analizados. Las muestras de sangre fueron proporcionadas por la M.C.E. Araceli Jiménez Mendoza y su grupo de trabajo de la Escuela Nacional de Enfermería y Obstetricia de la UNAM, la Dra. Carmen Cruz Revilla y la Dra. Mónica Beatriz Aburto Arciniega, de la Facultad de Medicina, en colaboración con la Dra. Rosalinda Guevara Guzmán como parte del Macroproyecto de la Facultad de Medicina "Nuevas Estrategias Epidemiológicas, Proteómicas y Genómicas en Salud Pública" en la línea de investigación "Enfermedades Neurodegenerativas". Los sujetos en estudio contaban con historia clínica.

Los controles, adultos mayores, tuvieron los siguientes parámetros de inclusión: resultado de la Prueba Miniexploración del Estado Mental ≥ 24 , sin depresión, demencia vascular, enfermedad vascular cerebral, diabetes mellitus, hipertensión y traumatismos craneoencefálicos. Los pacientes con DTA tuvieron un resultado de la Miniexploración del Estado Mental ≤ 23 .

Una mezcla de aminoácidos a una concentración 1.8 μM , obtenida a partir de la curva de calibración, fue utilizada para corroborar el tiempo de retención. Las muestras fueron analizadas en diferentes días debido al análisis de aminoácidos en otras patologías como parte del Macroproyecto.

Además de los aminoácidos, se reportan algunos índices que reflejan el comportamiento de los aminoácidos en sistemas biológicos así como el porcentaje de cada aminoácido relativo a la concentración total de ellos, sin incluir alanina y taurina.

5.7. Análisis Estadístico

El análisis estadístico fue llevado a cabo mediante el programa SPSS 13.0 para Windows. La prueba de Kolmogorov-Smirnov fue utilizada para evaluar la normalidad de los resultados al compararlos con una distribución normal (tipo gaussiana), debido a que de este resultado depende la prueba estadística a utilizar (análisis paramétrico, cuando los datos se comportan de forma gaussiana o no paramétrico, en caso contrario). El resultado de la probabilidad de esta prueba mayor o igual a 0.05 implica un comportamiento normal de los datos, permitiendo así la comparación de dos muestras independientes (grupo control y pacientes con DTA) mediante la prueba de t de Student. Para esto, fue necesario realizar la prueba de Levene, que sirve para evaluar la homogeneidad de varianzas. Un resultado menor a 0.05 indicó que la varianza es heterogénea y por consiguiente se tomó el valor correspondiente a esta prueba en el análisis por t.

RESULTADOS

6. Resultados

6.1. Programa de Inyección

El programa de inyección propuesto en este trabajo (Tabla 10) presenta cambios, respecto al método de referencia, en la cantidad de muestra utilizada (5 μL , en lugar de 0.5 μL), cantidad de agua (28 μL , en lugar de 32 μL). Lo anterior fue realizado para detectar, en un mayor volumen, a los aminoácidos presentes en las muestras, conservando el mismo volumen final de inyección propuesto por el método de referencia (36 μL). Como se establece en el apartado "Diseño Experimental, 5.1 Programa de Inyección", pág. 40, los lavados externos de la aguja con agua y acetonitrilo fueron propuestos para eliminar posibles impurezas, provenientes de la muestra y el reactivo OPA, que puedan quedar adheridos en la aguja y, como consecuencia, contaminar otros viales.

Tabla 10. Programa de inyección utilizado para el análisis de las muestras.

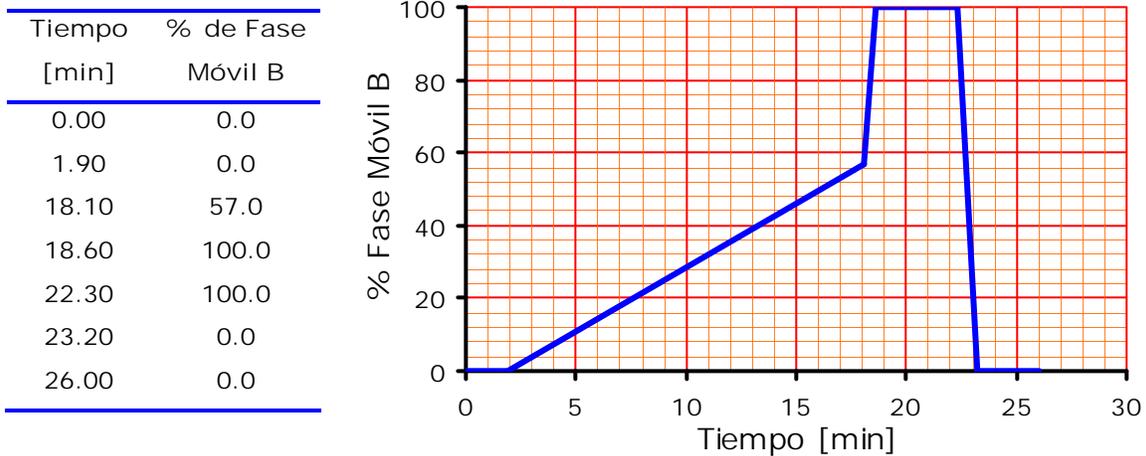
Número	Acción	Cantidad	Ubicación	Contiene
1	Tomar	2.5 μL	Vial 1	Buffer de borato
2	Tomar	5.0 μL	Cualquiera de los platos	Muestra
3	Mezclar (2 veces)	7.5 μL	Loop	---
4	Esperar	0.50 min	---	---
5	Tomar (3 veces)	0.0 μL	Vial 2	Agua, para lavado externo de aguja
6	Tomar	0.5 μL	Vial 3	Reactivo OPA
7	Mezclar (6 veces)	8.0 μL	Loop	---
8	Tomar (2 veces)	0.0 μL	Vial 2	Agua, para lavado externo de aguja
9	Tomar (2 veces)	0.0 μL	Vial 5	Acetonitrilo, para lavado externo de aguja

Tabla 10. Continuación.

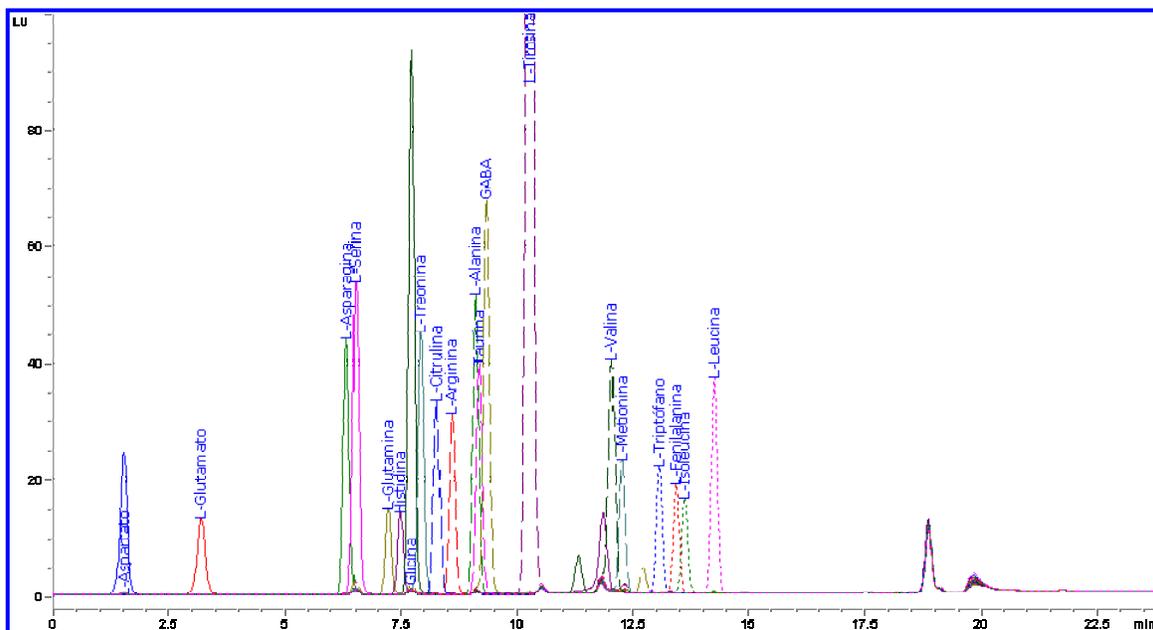
Número	Acción	Cantidad	Ubicación	Contiene
10	Tomar	28.0 μ L	Vial 4	Agua
11	Mezclar (2 veces)	18.0 μ L	Loop	---
12	Injectar	36 μ L	Loop	Mezcla de reacción

6.2. Gradiente

El gradiente del método de referencia (Figura 12) consta de una meseta inicial de 0% de fase móvil B seguida de un incremento lineal, para llegar al 100% se manera súbita, y posterior regeneración de la condición inicial. En fase reversa, dado que la fase móvil A es de carácter polar, y la B, de carácter no polar, el incremento en esta última disminuye la polaridad de la fase móvil promoviendo la elución de los compuestos. La regeneración al 0% tiene como fin realizar un nuevo análisis para comenzar en la meseta inicial. Los compuestos de alta polaridad, que no son afines a la columna, son los que presentan el menor tiempo de retención (aspartato y glutamato, por la carga negativa del grupo carboxilo al pH de la fase móvil A). Los analitos no polares son forzados a salir de la columna a incrementar el % de fase móvil B. Así mismo, la meseta de 100% tiene como fin acarrear a los compuestos no polares presentes en las muestras para que así no haya coelución de muestra a muestra en los análisis.

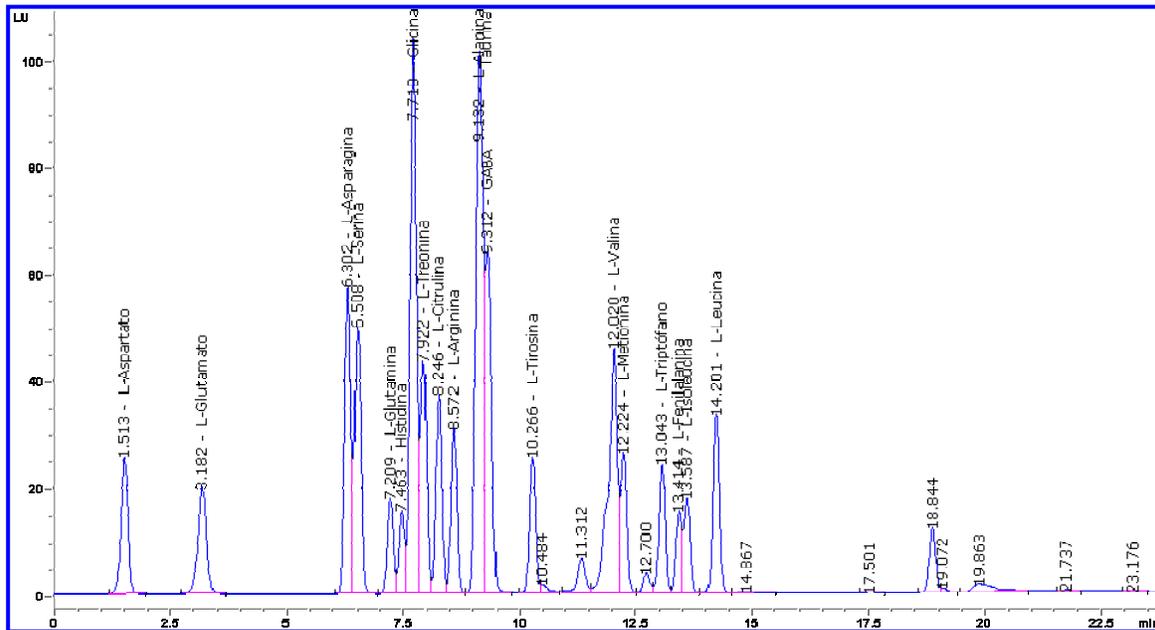
Figura 12. Gradiente establecido por el método de referencia.⁴⁶

En el análisis individual (Figura 13), se observa que los picos de aspartato y glutamato no presentan ninguna coelución. Asparagina y serina se encuentran muy cercanos entre sí; los mismo que glutamina, histidina, glicina, treonina, citrulina y arginina. También alanina, taurina y GABA coeluyen, difiriendo muy poco en el tiempo de retención. Valina y metionina y, fenilalanina e isoleucina, también tienen tiempos de retención muy cercanos.

Figura 13. Análisis individual de los aminoácidos en estudio bajo el método de referencia.⁴⁶

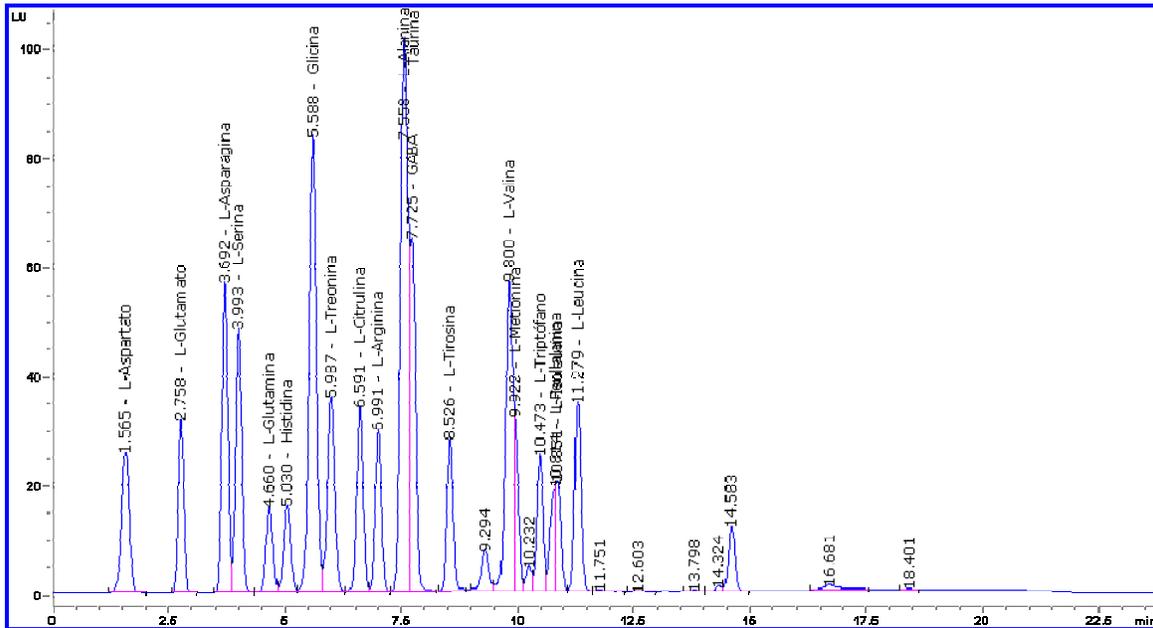
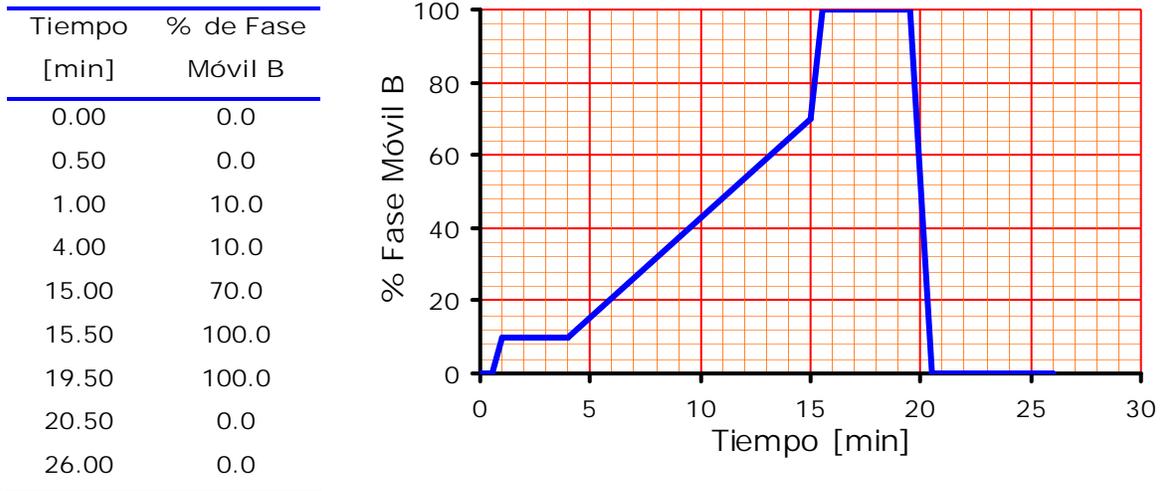
En el análisis conjunto (Figura 14) se confirma el traslape de los picos, resaltando glicina con treonina, alanina y taurina con GABA, valina con metionina y fenilalanina con isoleucina.

Figura 14. Análisis conjunto de los aminoácidos en estudio bajo el método de referencia.⁴⁶



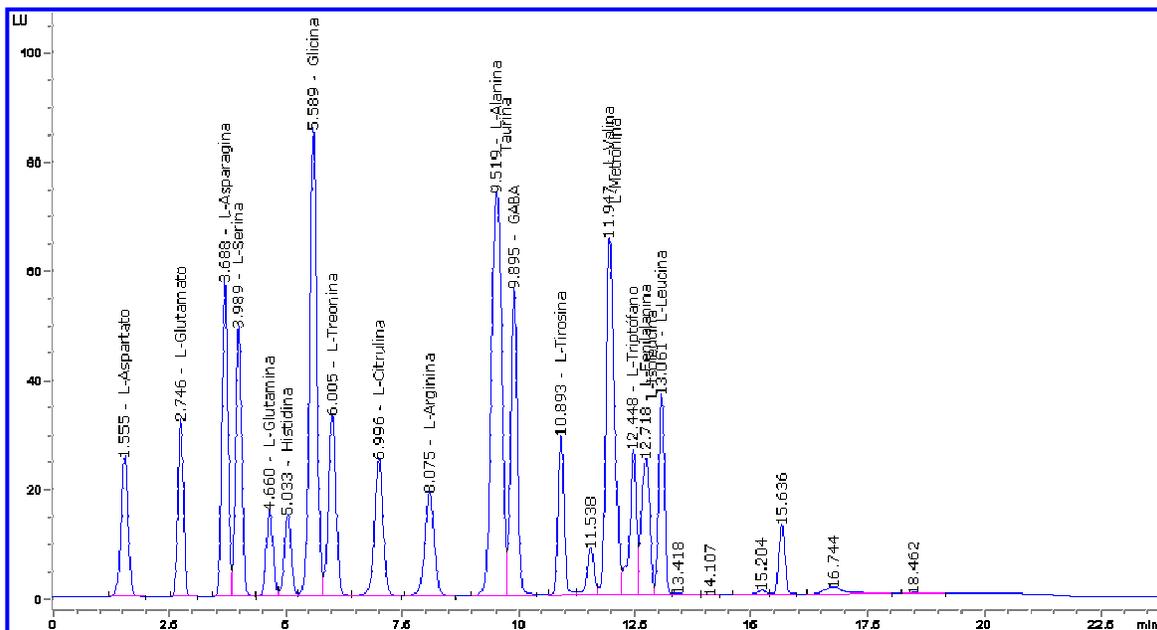
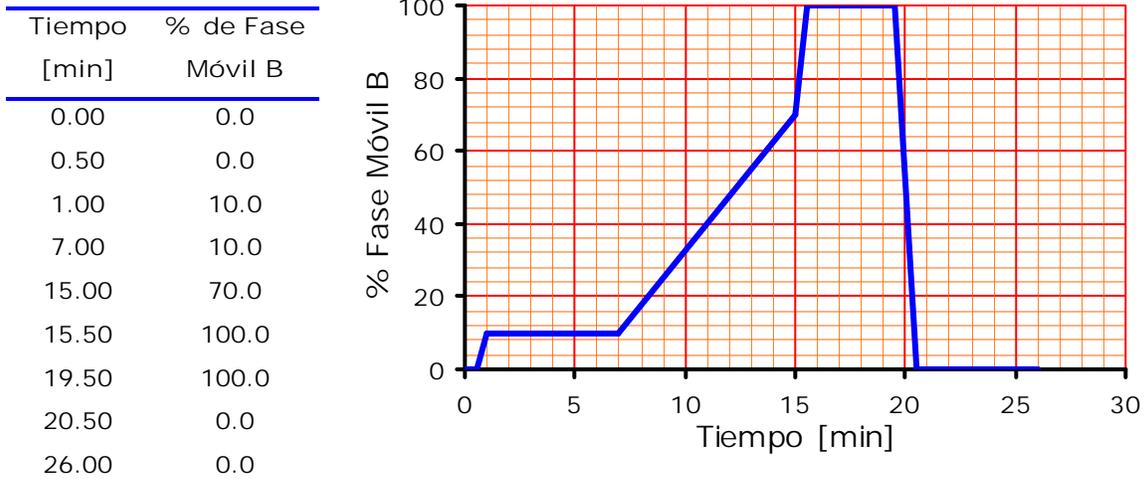
La primera modificación al gradiente (Figura 15) consistió en añadir meseta al 10% al inicio y modificar la pendiente del incremento constante del gradiente. Así, se disminuyó el tiempo de retención de los aminoácidos posteriores a glutamato, observando que se mejoró la separación de asparagina, serina, glutamina, histidina, glicina, treonina, citrulina y arginina. Pero, desde alanina hasta isoleucina, se juntaron más los picos, al grado de no poder diferenciar entre varios de ellos. La elución de aspartato no fue modificada y la de glutamato varió ligeramente, disminuyendo el tiempo de retención.

Figura 15. Primera modificación al gradiente del método de referencia.⁴⁶



En la segunda modificación (Figura 16), la meseta de 10% fue extendida hasta el minuto 7 (tiempo en que detectaba arginina en la primera modificación). Esto con el fin de mejorar la separación de los picos desde asparagina hasta arginina. El incremento constante hasta 70% no fue modificado, por lo que no se obtuvo una buena separación desde alanina hasta isoleucina.

Figura 16. Segunda modificación al gradiente del método de referencia.⁴⁶

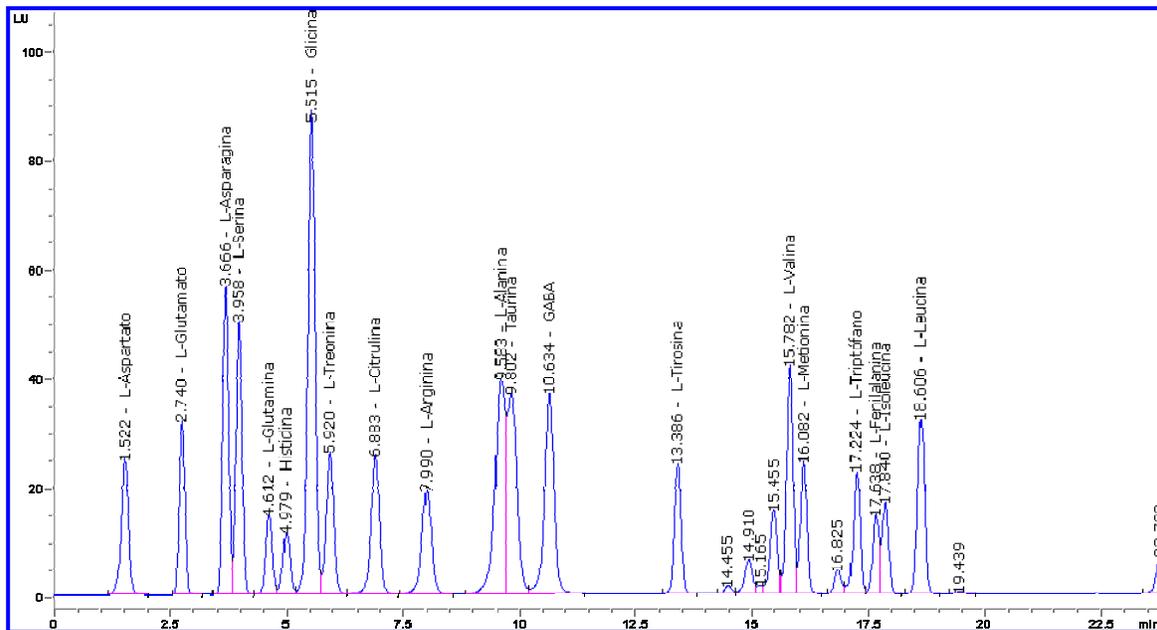
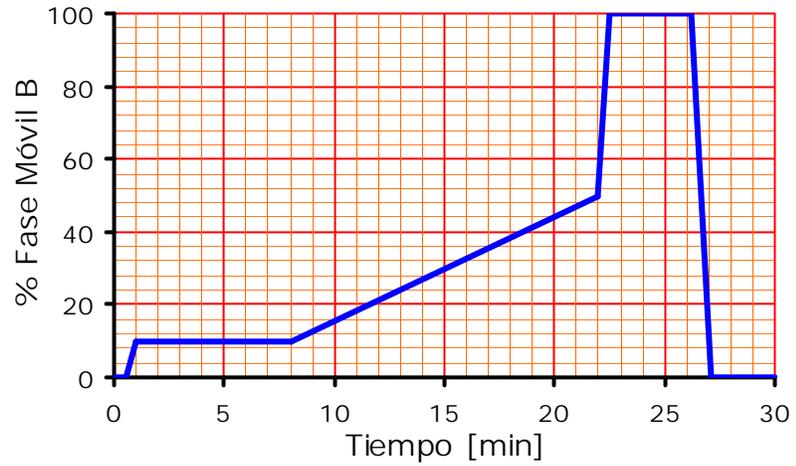


En la tercera modificación (Figura 17), la meseta del 10% fue ampliada del minuto 7 al 8, para mejorar la separación de alanina, taurina y GABA. Como la meseta que existe entre el 0 y 10% es igual a la segunda modificación (Figura 16), no hubo diferencia en la separación desde aspartato hasta arginina. En esta variación del gradiente, el incremento al 70% fue modificado en tiempo y porcentaje. Lo anterior aumentó los tiempos de retención de los analitos desde alanina,

mejorando su separación; aunque fenilalanina e isoleucina permanecen juntos. Se obtuvo una mejoría en la separación de GABA respecto a alanina y taurina.

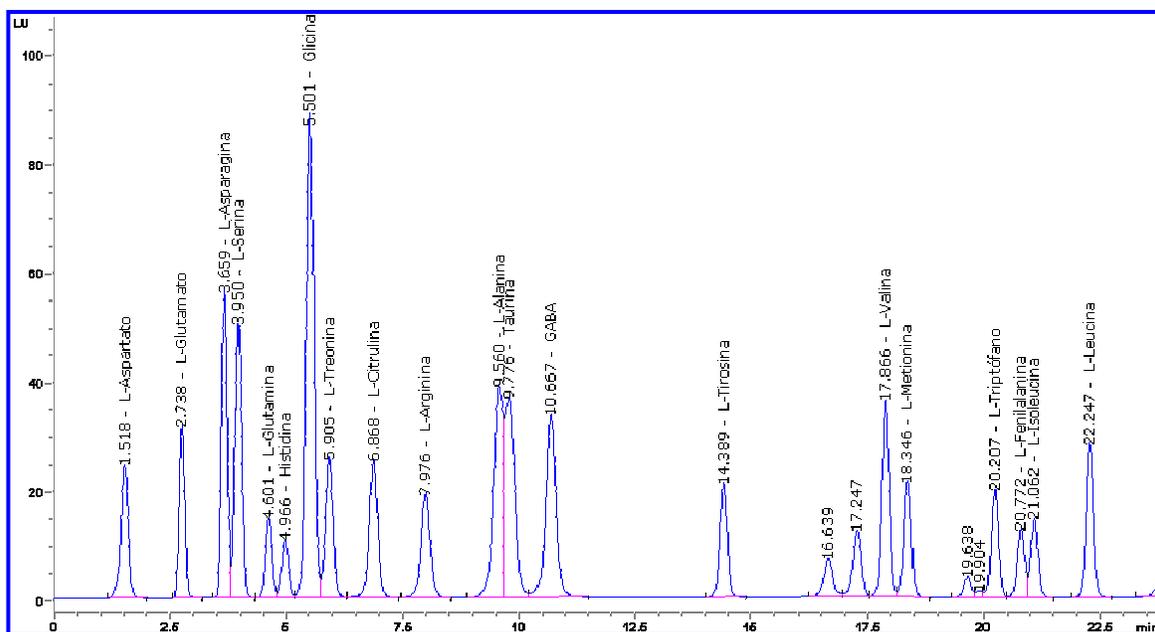
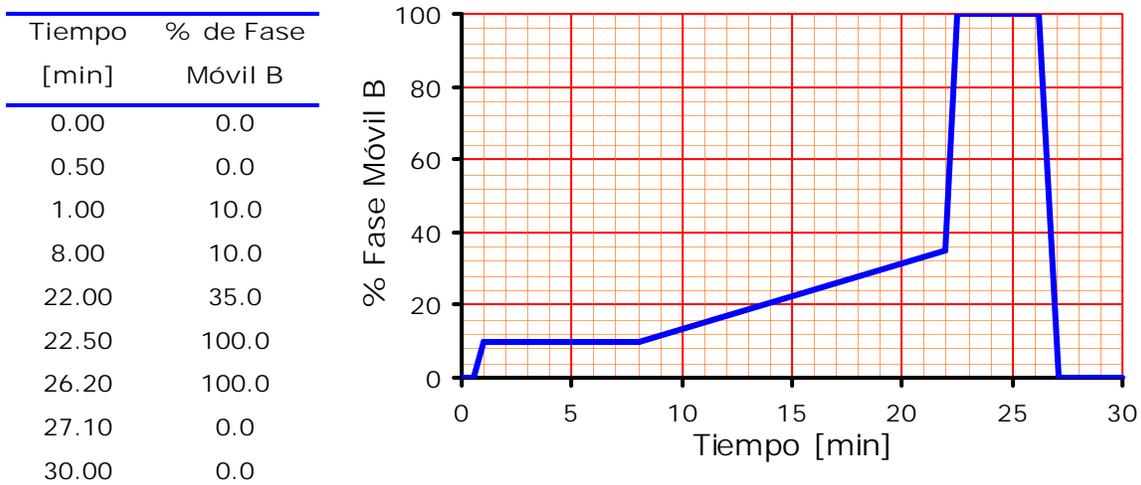
Figura 17. Tercera modificación al gradiente del método de referencia.⁴⁶

Tiempo [min]	% de Fase Móvil B
0.00	0.0
0.50	0.0
1.00	10.0
8.00	10.0
22.00	50.0
22.50	100.0
26.20	100.0
27.10	0.0
30.00	0.0



El gradiente utilizado para el análisis de plasma sanguíneo (Figura 18) proporcionó una gran mejoría en la separación de todos los analitos, exceptuando para alanina y taurina, en comparación al gradiente del método de referencia (Figura 12 y Figura 14) La modificación del incremento constante de 50% a 35% mostró una mejoría en la separación de los últimos 5 aminoácidos. Con este gradiente no se pudo separar alanina y taurina.

Figura 18. Gradiente utilizado para la determinación de aminoácidos en plasma sanguíneo.



La separación de los picos fue medida cuantitativamente con el parámetro cromatográfico resolución, el cual fue determinado para el gradiente del método de referencia y para el gradiente utilizado (Tabla 11). Los cambios en la resolución de GABA y metionina fueron los más sobresalientes. La mayoría de los aminoácidos presentaron un aumento en la resolución.

Tabla 11. Resolución de cada par de aminoácidos consecutivos para el gradiente establecido por el método de referencia y el gradiente utilizado en las muestras sanguíneas.

Aminoácido	Método de Referencia			Gradiente utilizado		
	Tiempo de retención [min]	Wh* [min]	Resolución**	Tiempo de retención [min]	Wh* [min]	Resolución**
L-Aspartato	1.513	0.1584	---	1.518	0.1632	---
L-Glutamato	3.182	0.1944	5.58	2.738	0.1358	4.81
L-Asparagina	6.302	0.1573	10.47	3.659	0.1428	3.90
L-Serina	6.508	0.1453	0.80	3.950	0.1483	1.18
L-Glutamina	7.209	0.1451	2.85	4.601	0.1545	2.54
L-Histidina	7.463	0.1275	1.10	4.966	0.1596	1.37
Glicina	7.710	0.1507	1.05	5.501	0.1664	1.94
L-Treonina	7.922	0.1058	0.98	5.905	0.1728	1.41
L-Citrulina	8.246	0.1459	1.52	6.868	0.1901	3.13
L-Arginina	8.572	0.1464	1.32	7.976	0.2074	3.29
L-Alanina	9.132	0.2246	1.78	9.560	0.2400	4.18
Taurina	9.132	---	---	9.776	0.2055	0.57
GABA	9.312	0.1087	0.64	10.667	0.2232	2.45
L-Tirosina	10.266	0.1479	4.39	14.389	0.1699	11.17
L-Valina	12.020	0.1796	6.32	17.866	0.1712	12.03
L-Metionina	12.224	0.1181	0.81	18.346	0.1687	1.67
L-Triptófano	13.043	0.1488	3.62	20.207	0.1670	6.54
L-Fenilalanina	13.414	0.1270	1.59	20.772	0.1741	1.95
L-Isoleucina	13.587	0.1706	0.69	21.062	0.1728	0.99
L-Leucina	14.201	0.1476	2.28	22.247	0.1670	4.12

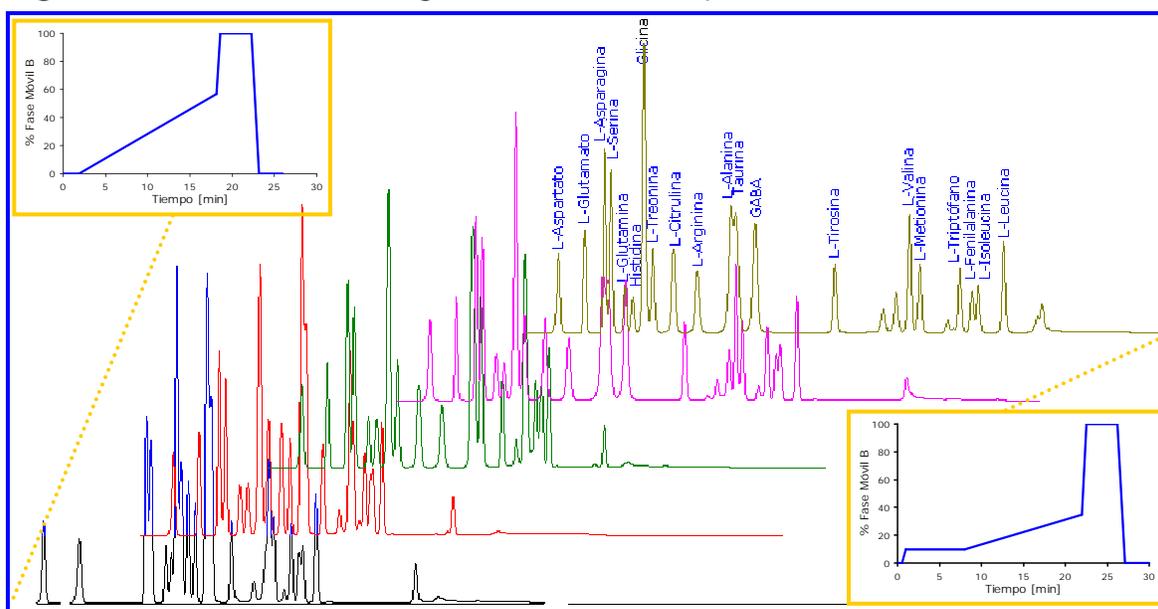
Sólo se resaltan los aminoácidos en que la resolución cambió de un valor menor de 1.0 a mayor de 1.5.

* Wh = Ancho del pico a la mitad de la altura.

** Resolución calculada respecto al pico anterior. Ver Apéndice 3.

La Figura 19 muestra un resumen de la evolución del gradiente en la separación de los aminoácidos, mostrando el gradiente establecido por el método de referencia y el gradiente utilizado en este trabajo. En esta imagen se facilita observar la mejora en la separación que se obtuvo en todos los aminoácidos, excepto en alanina y taurina, que coeluyen y que las condiciones experimentales utilizadas (como fase móvil, columna y gradiente) no permitieron separarlos.

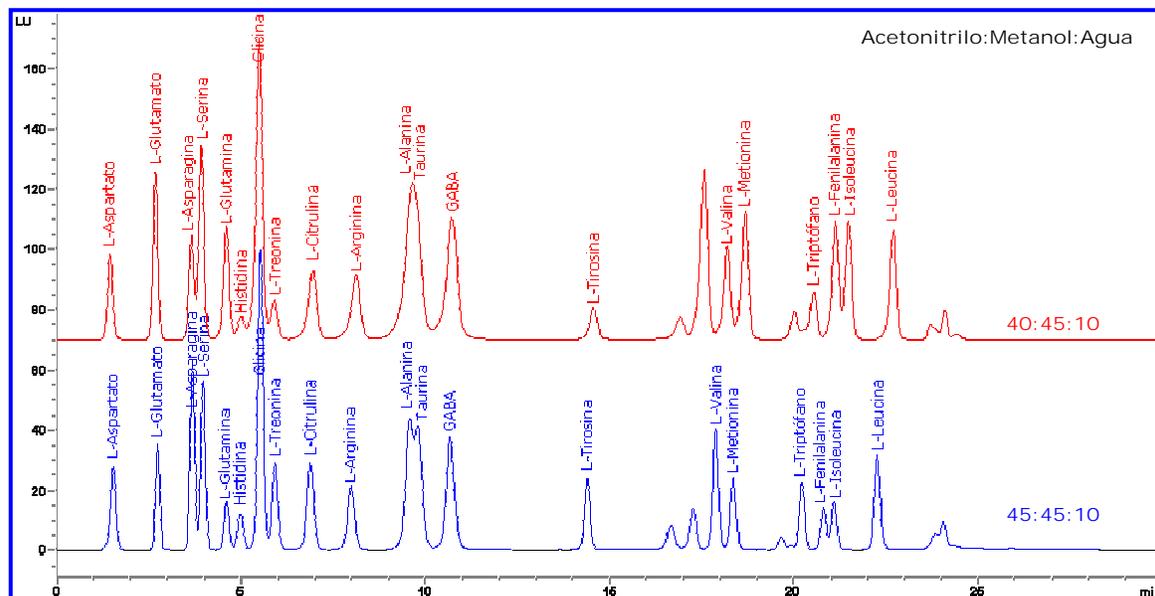
Figura 19. Evolución del gradiente en la separación de los analitos.



6.3. Composición de la Fase Móvil B.

Al modificar la composición de la fase móvil B, de 45:45:10 a 40:45:10 de acetonitrilo:metanol:agua, fue conseguida una pequeña modificación en los tiempos de retención de los analitos, prevaleciendo desde tirosina hasta leucina. De hecho, se consiguió que la línea base llegara casi a la base del cromatograma en la mayoría de los aminoácidos (Figura 20).

Figura 20. Modificación a la composición de la fase móvil B.



6.4. Curva de Calibración.

En la Tabla 12 se indica la masa pesada de cada aminoácido para la curva de calibración, así como la concentración real de la disolución madre (aprox. 200 μM). La pureza fue tomada en cuenta para llevar a cabo los cálculos.

Tabla 12. Masa pesada de cada aminoácido para la curva de calibración y concentración real de la disolución madre.

Aminoácido	Pureza [%]	Masa Molecular [g/mol]	Masa Pesada* [g]	Concentración Real de la Disolución Madre [μM]
Aspartato	99	133.1	0.0133	198
Glutamato	99	147.13	0.0147	198
L-Asparagina	98	132.12	0.0133	197
L-Serina	99	105.1	0.0105	198
L-Glutamina	99	146.15	0.0146	198
L-Histidina	99	155.16	0.0155	198
Glicina	99	75.07	0.0076	200
L-Treonina	98	119.12	0.0119	196
L-Citrulina	98	175.19	0.0176	197
L-Arginina	98	174.2	0.0174	196
L-Alanina	98	89.09	0.0089	196
Taurina	99	125.15	0.0127	201
GABA	99	103.12	0.0103	198
L-Tirosina	98	181.19	0.0181	196
L-Valina	100	117.15	0.0119	203
L-Metionina	98	149.21	0.0148	194
L-Triptófano	98	204.23	0.0203	195
L-Fenilalanina	98	165.19	0.0165	196
L-Isoleucina	98	131.18	0.0131	196
L-Leucina	98	131.18	0.0132	197

* No incluye corrección por porcentaje de pureza

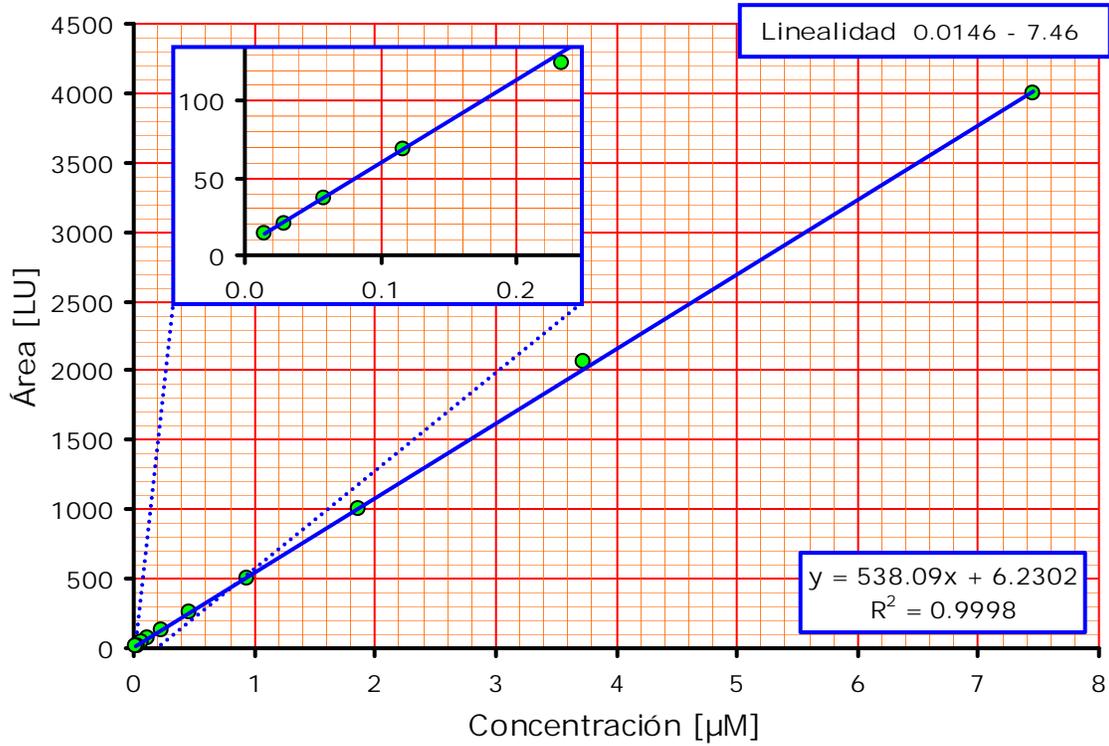
Para cada aminoácido fue obtenido un intervalo de linealidad diferente y un buen coeficiente de correlación (0.999) (Tabla 13).

Tabla 13. Intervalo de linealidad obtenido de la curva de calibración para cada aminoácido.

Aminoácido	Intervalo de Linealidad [μM]	R
Aspartato	0.0146 - 15.0	0.999
Glutamato	0.234 - 30.0	0.999
L-Asparagina	0.117 - 7.47	0.999
L-Serina	0.0293 - 15.0	0.999
L-Glutamina	0.468 - 30.0	0.999
L-Histidina	0.117 - 7.49	0.999
Glicina	0.949 - 15.2	0.999
L-Treonina	0.232 - 14.8	0.999
L-Citrulina	0.0146 - 7.46	0.999
L-Arginina	0.116 - 7.42	0.999
L-Alanina	---	---
Taurina	---	---
GABA	0.000914 - 0.234	0.999
L-Tirosina	0.0579 - 7.42	0.999
L-Valina	0.240 - 15.4	0.999
L-Metionina	0.115 - 7.36	0.999
L-Triptófano	0.115 - 7.38	0.999
L-Fenilalanina	0.0145 - 7.42	0.999
L-Isoleucina	0.0145 - 7.41	0.999
L-Leucina	0.233 - 7.47	0.999

En la Figura 21 se observa un ejemplo del gráfico obtenido de la curva de calibración de citrulina.

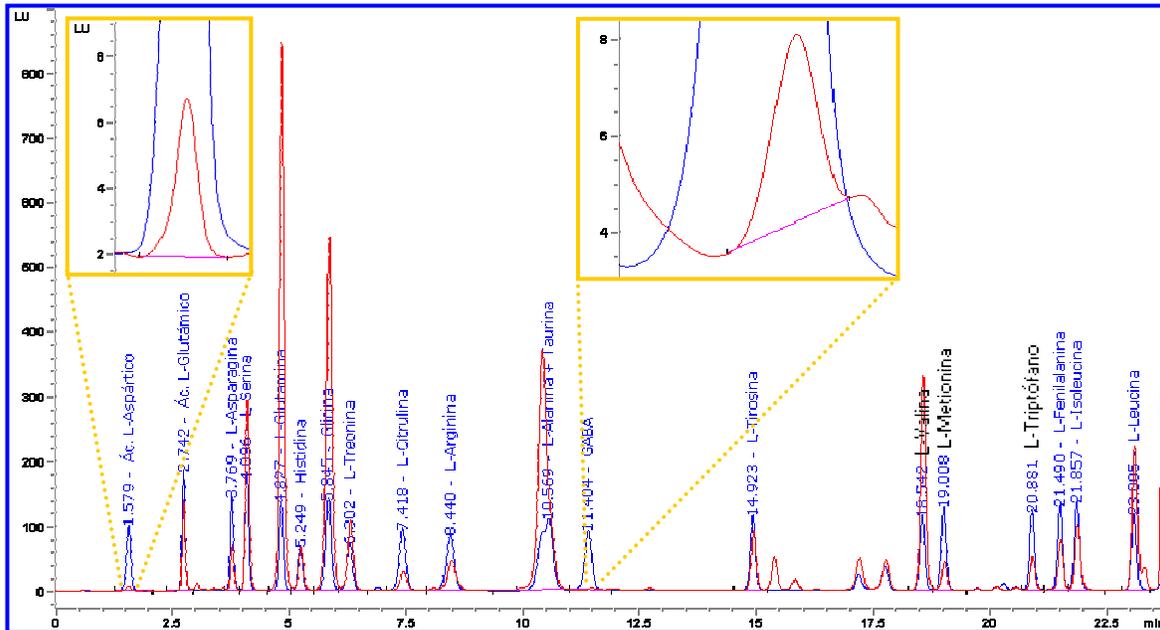
Figura 21. Curva de calibración de citrulina.



6.5. Análisis de Aminoácidos en Sujetos Controles y Pacientes con Demencia Tipo Alzheimer

En la Figura 22 se muestra un cromatograma de un paciente con diagnóstico clínico de DTA traslapado con un estándar de concentración 1.8 μM . Se observa que aspartato y GABA son los aminoácidos que se encuentran en menor concentración. Por otro lado, los aminoácidos glutamina, glicina y valina están en mayor cantidad.

Figura 22. Cromatograma de un paciente con diagnóstico clínico de DTA (color rojo) traslapado con un estándar de concentración 1.8 μ M de cada aminoácido (color azul).



Los resultados de los niveles de aminoácidos se muestran en la Tabla 14. Existe diferencia estadísticamente significativa al comparar los resultados de la prueba de Miniexploración del Estado Mental indicando la presencia de demencia en los pacientes con DTA.

Los niveles de histidina son significativamente elevados y, el índice GABA/glutamato, asparagina% y glutamina%, disminuidos.

Al realizar las pruebas de Kolmogorov-Smirnov y Levene se obtuvo que todos los parámetros determinados tuvieron un comportamiento normal y, la mayoría, varianzas homogéneas, por lo que se utilizó la prueba de t de Student para muestras independientes para el análisis estadístico.

Tabla 14. Parámetros determinados en los sujetos controles y en pacientes con DTA.

Parámetro	Adultos Mayores					DTA*					p de Levene	p de t de Student
	N	Promedio	D.E. ^a	E.E. ^b	p de Kolmogorov-Smirnov	N	Promedio	D.E. ^a	E.E. ^b	p de Kolmogorov-Smirnov		
Edad	10	73.000	10.781	3.409	0.443	6	77.500	9.628	3.931	0.906	0.487	0.415
Miniexploración ^c	10	27.900	1.729	0.547	0.702	6	15.330	2.066	0.843	0.964	0.391	0.000
Aspartato	10	3.243	0.922	0.292	0.834	6	5.001	3.178	1.297	0.504	0.030	0.238
Glutamato	10	47.615	13.704	4.334	0.717	6	124.826	172.694	70.502	0.372	0.012	0.324
Asparagina	10	38.700	9.541	3.017	0.979	6	34.497	6.037	2.465	0.810	0.449	0.352
Serina	10	88.803	20.395	6.450	0.838	6	99.828	14.291	5.834	0.503	0.511	0.267
Glutamina	10	608.889	176.294	55.749	0.217	6	523.322	169.812	69.326	0.889	0.934	0.357
Histidina	10	67.968	11.425	3.613	0.836	6	87.507	23.636	9.650	0.986	0.060	0.041
Glicina	10	251.579	68.928	21.797	0.996	6	276.330	115.164	47.015	0.908	0.133	0.596
Treonina	10	88.959	21.192	6.701	1.000	6	124.242	49.456	20.190	0.995	0.051	0.065
Citrulina	10	27.885	11.428	3.614	0.910	6	30.967	7.108	2.902	0.774	0.476	0.564
Arginina	10	45.954	14.500	4.585	0.797	6	41.040	16.052	6.553	0.978	0.513	0.538
GABA	10	2.395	1.005	0.318	0.623	3	1.394	1.015	0.586	0.955	0.951	0.159
Tirosina	10	56.620	11.146	3.525	0.465	6	63.538	16.965	6.926	0.961	0.285	0.338
Valina	10	184.747	38.772	12.261	0.707	6	196.927	53.138	21.694	0.999	0.380	0.604
Metionina	10	23.359	4.581	1.449	0.929	6	27.525	5.398	2.204	0.925	0.699	0.121
Triptófano	10	40.012	13.783	4.359	0.468	6	49.399	19.452	7.941	0.997	0.392	0.276
Fenilalanina	10	52.792	11.339	3.586	0.999	6	57.738	12.517	5.110	0.713	0.863	0.430
Isoleucina	10	48.104	9.729	3.077	0.971	6	57.155	19.178	7.829	0.984	0.194	0.227
Leucina	10	120.051	23.828	7.535	0.979	6	130.614	40.691	16.612	0.997	0.158	0.519
Cit / Arg	10	0.610	0.230	0.073	0.897	6	0.802	0.158	0.065	0.970	0.393	0.095
GABA / Glu	10	0.052	0.019	0.006	0.930	3	0.017	0.025	0.014	0.790	0.621	0.025
Ser / Gli	10	0.370	0.103	0.033	0.968	6	0.400	0.120	0.049	0.943	0.413	0.597
Asn / Asp	10	12.740	4.581	1.449	0.806	6	8.979	4.231	1.727	0.938	0.992	0.125
Gln / Glu	10	14.574	8.894	2.813	0.376	6	10.449	6.449	2.633	0.705	0.612	0.341
Tyr / Phe	10	1.084	0.151	0.048	0.999	6	1.094	0.110	0.045	0.735	0.509	0.895
Trp / LNAA ^d	10	0.085	0.022	0.007	0.984	6	0.096	0.022	0.009	0.815	0.974	0.366
Tyr / LNAA	10	0.127	0.014	0.005	0.983	6	0.130	0.012	0.005	0.970	0.486	0.656
Phe / LNAA	10	0.118	0.021	0.007	0.610	6	0.119	0.013	0.005	0.695	0.726	0.970
Trp / LNAA + Tyr / LNAA	10	0.212	0.027	0.009	0.990	6	0.226	0.014	0.006	0.987	0.120	0.272
Esenciales ^e	10	625.992	108.105	34.186	0.963	6	731.106	189.365	77.308	0.829	0.198	0.175

Ver "NOTAS" en página 63

Tabla 14. Continuación.

Parámetro	Adultos Mayores					DTA*					p de Levene	p de t de Student
	N	Promedio	D.E. ^a	E.E. ^b	p de Kolmogorov-Smirnov	N	Promedio	D.E. ^a	E.E. ^b	p de Kolmogorov-Smirnov		
No Esenciales ^f	10	1169.289	221.303	69.982	0.874	6	1199.349	208.544	85.138	0.920	0.994	0.792
Totales ^g	10	1797.676	291.101	92.054	0.670	3	1973.924	392.437	226.573	0.999	0.565	0.409
LNAAs	10	502.326	92.280	29.182	0.733	6	555.370	156.726	63.983	0.985	0.219	0.404
BCAAs ^h	10	352.902	65.005	20.556	0.790	6	384.695	111.547	45.539	0.998	0.179	0.479
Básicos ⁱ	10	113.922	22.621	7.153	0.923	6	128.547	18.729	7.646	0.953	0.722	0.205
Ácidos ^j	10	50.858	14.364	4.542	0.822	6	129.828	175.819	71.778	0.380	0.012	0.322
Aromáticos ^k	10	149.424	32.737	10.352	0.868	6	170.675	45.620	18.624	0.892	0.667	0.295
BCAA / Aromáticos	10	2.409	0.384	0.122	0.578	6	2.246	0.114	0.047	0.997	0.104	0.335
Asp %	10	0.181	0.045	0.014	0.780	3	0.371	0.309	0.178	0.969	0.000	0.398
Glu %	10	2.697	0.779	0.246	0.570	3	12.559	15.454	8.922	0.863	0.000	0.384
Asn %	10	2.144	0.287	0.091	0.792	3	1.652	0.150	0.087	0.987	0.354	0.017
Ser %	10	4.963	0.963	0.304	0.824	3	5.490	0.636	0.367	0.995	0.515	0.398
Gln %	10	33.664	6.096	1.928	0.610	3	23.140	8.080	4.665	0.979	0.542	0.032
His %	10	3.800	0.364	0.115	0.967	3	3.862	1.246	0.719	0.783	0.003	0.940
Gli %	10	14.006	3.190	1.009	0.936	3	13.882	5.085	2.936	0.998	0.402	0.959
Thr %	10	4.944	0.832	0.263	0.995	3	4.769	1.298	0.750	0.999	0.454	0.781
Cit %	10	1.529	0.516	0.163	0.974	3	1.637	0.675	0.390	1.000	0.749	0.769
Arg %	10	2.552	0.628	0.199	0.726	3	2.480	1.289	0.744	1.000	0.204	0.893
GABA %	10	0.135	0.055	0.017	0.762	3	0.072	0.052	0.030	0.909	0.945	0.108
Tir %	10	3.143	0.352	0.111	0.656	3	3.266	0.987	0.570	0.988	0.028	0.851
Val %	10	10.350	1.713	0.542	0.551	3	10.104	2.882	1.664	1.000	0.368	0.853
Met %	10	1.292	0.069	0.022	0.563	3	1.313	0.273	0.158	0.814	0.002	0.908
Trp %	10	2.229	0.691	0.219	0.860	3	2.632	1.074	0.620	0.869	0.293	0.446
Phe %	10	2.931	0.384	0.122	0.939	3	2.846	0.737	0.425	0.886	0.079	0.788
Ile %	10	2.691	0.412	0.130	0.952	3	2.960	1.271	0.734	0.944	0.010	0.751
Leu %	10	6.747	1.199	0.379	0.735	3	6.964	2.292	1.323	1.000	0.302	0.826

Ver "NOTAS" en página 63

NOTAS.

- * DTA = Demencia tipo Alzheimer
- ^a D.E. = Desviación estándar
- ^b E.E. = Error estándar
- ^c Miniexploración = Resultado de la prueba de Miniexploración del Estado Mental
- ^d LNAA = Aminoácidos largos neutros
- ^e Suma de los aminoácidos histidina, treonina, valina, metionina, triptófano, fenilalanina, isoleucina y leucina
- ^f Suma de los aminoácidos aspartato, glutamato, asparagina, serina, glutamina, glicina, citrulina, arginina y tirosina
- ^g Suma de esenciales y no esenciales más GABA
- ^h BCAA = Aminoácidos de cadena ramificada
- ⁱ Básicos = Suma de arginina e histidina
- ^j Ácidos = Suma de aspartato y glutamato
- ^k Aromáticos = Suma de tirosina, triptófano y fenilalanina

DISCUSIÓN

En este trabajo se determinó la concentración de aminoácidos libres en plasma sanguíneo por HPLC en sujetos sanos, que formaron el grupo control, y pacientes con diagnóstico clínico de DTA. Fueron realizadas modificaciones al programa de inyección, gradiente y fase móvil en el método de referencia de la compañía Agilent, el cual está enfocado a determinar aminoácidos presentes en proteínas/hidrolizados proteicos. Este trabajo forma parte del Macroproyecto de la Facultad de Medicina "Nuevas Estrategias Epidemiológicas, Proteómicas y Genómicas en Salud Pública", en la línea de investigación "Enfermedades Neurodegenerativas", a cargo de la Dra. Rosalinda Guevara Guzmán. En este trabajo fueron incluidos GABA y taurina como parte de los aminoácidos en estudio dado que el primero ha presentado variaciones en tejido cerebral y plasma en la DTA^{41,45, 50}, además de poseer importancia considerable por su papel de neurotransmisor. También, se ha visto implicado al aminoácido taurina en esta demencia, mostrando una disminución de los niveles en pacientes con síntomas avanzados de la DTA⁵¹, ya que es uno de los aminoácidos más abundantes en el sistema nervioso central y tiene un papel importante en procesos fisiológicos como osmoregulación, neuroprotección y neuromodulación.⁵² Con la técnica utilizada no se pudo separar alanina y taurina. Las posibles soluciones serían optimizar otros parámetros cromatográficos, como la cantidad de sales y el pH de la fase móvil acuosa, nuevas modificaciones a la fase móvil orgánica y temperatura de la columna o, en su defecto, la utilización de columnas diferentes, como de intercambio iónico con una derivatización postcolumna, en la que los aminoácidos son separados en primera instancia. A su vez, sólo se pudo determinar la concentración de GABA en 3 de las 6 muestras de los pacientes con DTA, para lo cual se propone realizar un gradiente de la

amplificación del detector con un aumento de la misma en el tiempo en que sale el pico de GABA.

Respecto al manejo de un sistema de HPLC automatizado, el uso de un automuestrador para realizar la reacción de derivatización e inyección de las muestras permite disminuir errores significativos en la cuantificación de los analitos, lo que favoreció en este trabajo el uso del mismo. En la utilización de un procedimiento automático elimina los errores humanos que podrían ocurrir en una derivatización manual; aumenta la precisión del tiempo de reacción y el volumen de inyección.

Referente a la optimización de la metodología, las modificaciones al programa de inyección (Tabla 10, pág. 46) permitieron asegurar la limpieza de la aguja de inyección al aumentar los lavados de la misma. Los lavados propuestos con acetonitrilo y agua previenen de la contaminación entre muestras y la generación de falsos picos y por ende de erróneas cuantificaciones. La disminución de la velocidad de toma (de 200 a 50 $\mu\text{L}/\text{min}$) permitió aumentar la reproducibilidad entre los estándares analizados.

El análisis individual de los aminoácidos (Figura 13, pág. 48) permitió identificar cada una de las señales generadas por los aminoácidos, que fue de vital importancia para reconocer los traslapes presentados en el análisis conjunto (Figura 14, pág. 49).

La optimización al gradiente del método de referencia mejoró la separación de varios aminoácidos, entre ellos GABA (Figura 15 a Figura 19, págs. 50 a 55). El cambio en las resoluciones de mayor consideración corresponde a GABA y metionina (Tabla 11, pág. 54). Para ellos, con esta metodología, se pudo incrementar a un valor mayor

a 1.5, donde el traslape de los picos es del orden del 0.3%.¹¹ La resolución para todos los picos, excepto para alanina y taurina, en el gradiente utilizado, es mayor a 1.0, en donde el traslape de las áreas es cercano al 4%.¹¹ En vista de que alanina y taurina tienen corto grado de separación (resolución de 0.57), no fueron cuantificados en este trabajo.

En este trabajo, la modificación de la composición de la fase móvil B (Figura 20, pág. 56) sólo permitió aumentar de forma ligera el tiempo de retención de los aminoácidos pero no mejoró la separación de los mismos. Las posibles soluciones a esto sería modificar el porcentaje de disolvente orgánico en la fase móvil B o cambiar la composición de sales en la fase móvil A, para así mejorar la separación de los analitos con el gradiente utilizado.

Con la optimización de la metodología, se pudieron cuantificar 18 aminoácidos en plasma sanguíneo, incluyendo a GABA (Figura 22, pág. 60). A pesar de que varios autores han reportado la cuantificación de aminoácidos en fluidos biológicos,^{24,53,54} existen diferencias relacionadas a la metodología empleada, como en el uso de otras fases móviles, columnas y reactivos derivatizantes. Así, algunos investigadores han publicado en la literatura el análisis de aminoácidos con el mismo sistema cromatográfico y misma columna que se utilizó en este trabajo. Por ejemplo, Bartolomeo y Maisano⁵⁵ no determinaron GABA y taurina, por lo que no reportan problemas de coelución; Schwarz y colabs.⁵⁶ publicaron la necesidad de analizar por duplicado muestras de plasma con distinta fase móvil ya que no lograron separar todos los aminoácidos en su estudio. Cabe mencionar que ellos tampoco determinaron GABA.

Con el uso de acetonitrilo como agente precipitante, no se observó alguna interferencia de este disolvente en la determinación de los aminoácidos. Relativo a los diferentes métodos de deproteinización de muestras fisiológicas, Davey y Ersseer⁵⁷ publicaron que la precipitación de proteínas con acetonitrilo fue la forma más adecuada para el tratamiento de las muestras de plasma y líquido amniótico. Sin embargo, existen ventajas y desventajas del uso de disolventes orgánicos y ácidos: con el uso de ácido tricloroacético y ácido sulfosalicílico se han reportado una baja recuperación de triptófano, este último puede interferir en la elución de aspartato y glutamato y con el uso de acetonitrilo se ha reportado una disminuida detección de ciertos aminoácidos como glicina y arginina.²³

Los niveles de aminoácidos plasmáticos encontrados en el grupo control (Tabla 14, págs. 61-62) son semejantes a los reportados en la literatura.^{41,42,58,59} Existe una gran controversia sobre las diferencias encontradas de aminoácidos libres en pacientes con DTA. Esto puede deberse por diferencias en las técnicas utilizadas (intercambio iónico o fase reversa) muestras analizadas (tejido cerebral, líquido cefalorraquídeo o plasma) o en sujetos vivos o post mórtem. Se ha publicado que no se han encontrado diferencias en los niveles de glutamato y aspartato, aunque otros autores reportan que se encuentran aumentados o disminuidos;^{37,41} lo mismo ocurre con histamina.⁶⁰ La degradación de histidina conlleva a la formación de glutamato. Por otro lado, su descarboxilación forma histamina, que posee propiedades vasodilatadores y está relacionada con procesos alérgicos, además de ser un neurotransmisor.¹ Glutamato y aspartato además de GABA y glicina tienen un especial interés por ser neurotransmisores excitadores e inhibidores, respectivamente. Glutamato y aspartato por un lado, pueden aumentar la función

cognitiva y mejorar la memoria, pero una estimulación excesiva está relacionada con daño cerebral por excitotoxicidad.⁶¹ También se ha visto una disminución de las funciones noradrenérgica, GABA-érgica y serotoninérgica además de una pérdida de neuronas monoaminérgicas y de las colinérgicas en el encéfalo en esta demencia.³⁴ Esto explicaría que el índice GABA/glutamato se encontrara disminuido, como una medida indirecta de la elevada variación de los niveles de glutamato y la reducción de los niveles de GABA. Sin embargo, las determinaciones de GABA y glutamato, de forma individual, no presentaron diferencias significativas. Cabe mencionar que algunos autores no han encontrado cambios en los niveles de GABA.^{37,45} Desafortunadamente en sólo 3 individuos, de una población total de 6, con diagnóstico clínico de DTA, se cuantificó GABA, por lo que no se puede concluir sobre una posible variación de este aminoácido, al comparar los niveles con el grupo control.

El aumento encontrado en los valores de histidina en los sujetos con DTA no concuerda con lo reportado en la literatura, donde se ha visto disminuida su concentración y por ende la de glutamato y la de histamina.⁶⁰ Porcentualmente, los valores de asparagina y glutamina presentaron diferencia significativa, pero su interpretación requiere de mucho cuidado, por la cantidad de sujetos con DTA estudiados y su significado. Estos aminoácidos provienen del metabolismo de glutamato, por lo que la disminución de asparagina implicaría un aumento de los niveles de aspartato y disminución de los valores de glutamato. La reducción de los niveles de glutamina resultaría de un aumento de los valores de glutamato.

No se encontraron diferencias significativas en los valores de triptófano ni en los índices Trp/LNNA y Tyr/LNNA, lo cual no concuerda con lo reportado en la literatura. Los niveles de triptófano en el plasma de pacientes con DTA pueden resultar de una disminuida síntesis de serotonina. Los índices Trp/LNNA y Tyr/LNNA reflejan la cantidad de triptófano y tirosina disponible para la síntesis de serotonina y catecolaminas, debido a que los LNAA compiten por el transporte a través de la barrera hematoencefálica.⁴³

Arginina y citrulina están relacionados con el estrés oxidativo en la DTA, ya que al metabolizarse arginina, mediante la enzima óxido nítrico sintasa, hay un aumento en los niveles de citrulina y de óxido nítrico³⁶ Sin embargo, en este trabajo no se encontró diferencia de estos aminoácidos en sujetos con DTA.

Los niveles de aspartato, glutamato, GABA, arginina y citrulina no presentaron diferencias estadísticamente significativas, probablemente debido a la cantidad de sujetos analizados. Desafortunadamente el número de individuos en el estudio (10 sujetos controles y 6 pacientes con DTA) fue bajo, por lo que se recomienda aumentar el número de individuos para fortalecer el análisis estadístico.

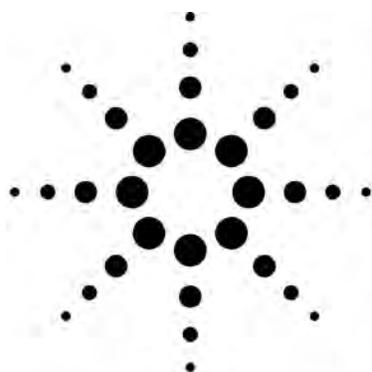
CONCLUSIONES

Se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$) en los niveles de histidina y el índice GABA/glutamato en pacientes con DTA, comparados con sujetos controles, al analizar las concentraciones de aminoácidos en plasma sanguíneo por HPLC. La falta de significancia ($p \geq 0.05$) en los niveles de glutamato, GABA, aspartato, citrulina y arginina puede explicarse por el reducido número de muestras analizadas, por lo que se intentará continuar el estudio para obtener resultados más concluyentes.

La optimización de la metodología del programa de inyección, gradiente y fase móvil permitió la detección y cuantificación de 18 aminoácidos plasmáticos, entre ellos GABA. No fue posible, con el método utilizado en este trabajo, separar los aminoácidos alanina y taurina por lo que se propone realizar nuevas modificaciones al método de referencia o incluso cambiar de técnica a intercambio iónico ya que también en esta última se ha reportado la determinación de aminoácidos en fluidos biológicos.

APÉNDICE

Apéndice 1. Método de referencia para la determinación de aminoácidos.



Rapid, Accurate, Sensitive, and Reproducible HPLC Analysis of Amino Acids

Amino Acid Analysis Using Zorbax Eclipse-AAA Columns and the Agilent 1100 HPLC

John W. Henderson, Robert D. Ricker, Brian A. Bidlingmeyer, and Cliff Woodward

An ideal, quantitative amino acid analysis combines speed and sensitivity with reliability of both the derivatization reaction and the analytical technique. These goals are achieved with automated, online derivatization using *o*-phthalaldehyde (OPA) for primary amino acids and 9-fluorenylmethyl chloroformate (FMOC) for secondary amino acids; the automated derivatization is then integrated with rugged HPLC analysis. The complete procedure is rapid, accurate, sensitive, and reproducible using the Agilent 1100 HPLC.

Combining OPA and FMOC chemistries enables fast pre-column derivatization of amino acids (AA) for chromatographic analysis. The reaction mixture is buffered at a pH of 10.2, which allows direct derivatization of acid hydrolyzed protein/peptide samples. The primary AA's are reacted first with OPA using 3-mercaptopropionic acid (3-MPA). The secondary AA's do not react with the OPA; but are then derivatized using FMOC. The incorporation of 3-MPA into the indoles decreases their hydrophobicity, and as a result, the OPA-derivatives elute chromatographically before the FMOC derivatives. Excess FMOC and its degradation products elute after the last of the secondary AA's and do not interfere with the analysis. The derivatization process is fast

and is easily automated using the Agilent 1313A autosampler. Because of the advantageous reaction speeds, both derivatizations are complete at room temperature. The automated procedure provides a high degree of reproducibility. Total analysis from injection to injection can be achieved in as little as 14 min (10-min analysis time) on the 75-mm column. On the 150-cm column total run time is 26 min (16-min analysis time). Both analyses provide high sample throughput.

SEPARATION OPTIONS

The Zorbax Eclipse-AAA column contains batch-qualified reversed-phase material. When used according to the protocol described in this *Technical Note*, the column enables the user to separate the

amino acids commonly found in protein/peptide hydrolysates.

The A and B mobile-phase components are easy to prepare, and the gradient consists of linear segments (refer to *Experimental Conditions, Mobile Phase* section, for details). This combination contributes to a rugged protocol that can be accomplished on the Agilent 1100 HPLC using either binary or quaternary solvent-delivery systems.

The chromatogram in Figure 1 illustrates typical routine sensitivity in high-throughput applications that can be obtained on the Agilent 1100 HPLC binary system using the 1100 Diode Array Detector (DAD). A single run can be completed in 14 minutes (including re-equilibration) with adequate resolution. Separation conditions are listed in

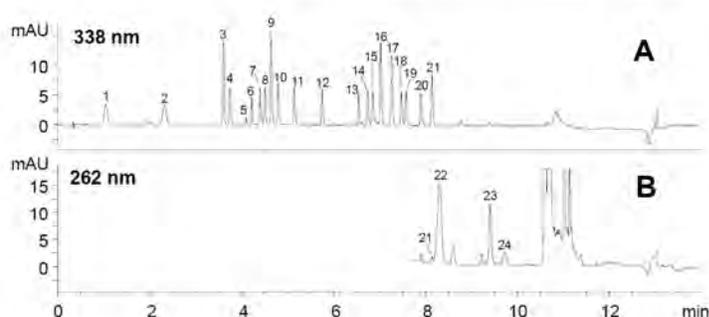


Figure 1: Routine Analysis, High-Throughput Separation of 24 Amino Acids Using the Eclipse-AAA Protocol. The column dimensions are 4.6 x 75 mm, 3.5 μ m. See Table 1 for peak identification. Detection: A, 338 nm (OPA amino acids), B, 262 nm (FMOC-amino acids).

the *Experimental Conditions* section. The primary amino acids (OPA-derivatized) shown in Figure 1A, are monitored at 338 nm while the secondary amino acids (FMOC-derivatized) shown in Figure 1B, are monitored at 262 nm. The amount injected was 125 pmoles of each amino acid, in 0.5 μ L.

Table 1. Amino Acid Elution Order Using Eclipse-AAA Protocol

Peak No.	Amino Acid	3-Letter Code
1	Aspartate	ASP
2	Glutamate	GLU
3	Asparagine	ASN
4	Serine	SER
5	Glutamine	GLN
6	Histidine	HIS
7	Glycine	GLY
8	Threonine	THR
9	Citrulline	CIT
10	Arginine	ARG
11	Alanine	ALA
12	Tyrosine	TYR
13	Cystine	CY2
14	Valine	VAL
15	Methionine	MET
16	Norvaline	NVA
17	Tryptophan	TRP
18	Phenylalanine	PHE
19	Isoleucine	ILE
20	Leucine	LEU
21	Lysine	LYS
22	Hydroxyproline	HYP
23	Sarcosine	SAR
24	Proline	PRO

When more resolution is desired than is available from the high-throughput separation on a 75-mm column (Fig. 1), a 150-mm column length should be used. Figure 2 shows a typical routine sensitivity, high-resolution separation obtained from two different Zorbax Eclipse-AAA 150-mm length columns – one with 3.5 μ m particles and the other with 5 μ m particles. The chromatograms show the 338 nm UV signal that detects the OPA-derivatized primary amino acids. These separations are quite similar in appearance, but the chromatogram for the 3.5- μ m column demon-

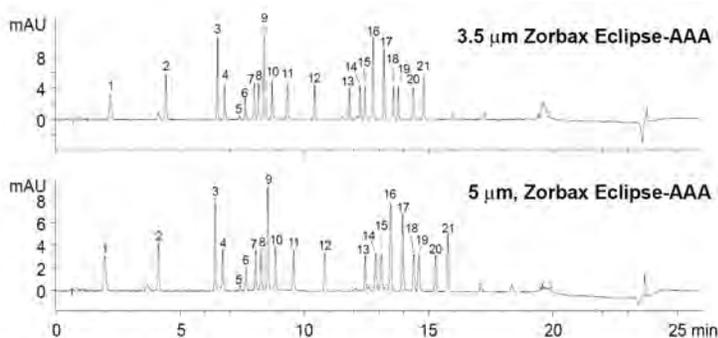


Figure 2: High-Resolution Analysis of 21 Amino Acids: on the 5 μ m and 3.5 μ m Zorbax Eclipse-AAA Column. Column dimensions are 4.6 x 150 mm. See Table 1 for peak identification. Detection: 338 nm (OPA amino acids).

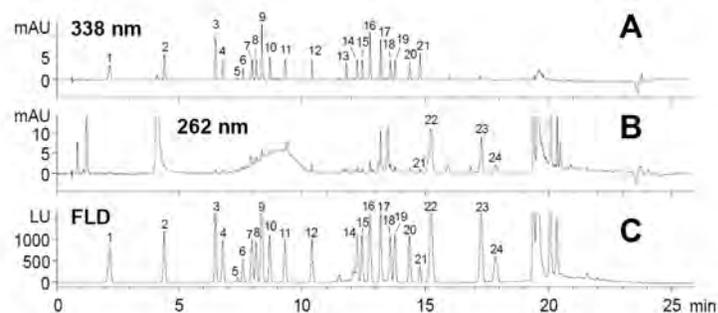


Figure 3: High Sensitivity, High-Resolution Analysis of Amino Acids Using Different Detection Modes and the Zorbax Eclipse-AAA Protocol. The column dimensions are 4.6 x 150 mm, 3.5 μ m. See Table 1 for peak identification. Detection: A. UV 338 nm (OPA amino acids), B. UV 262 nm (FMOC-amino acids), C. fluorescence (see *Experimental Conditions*).

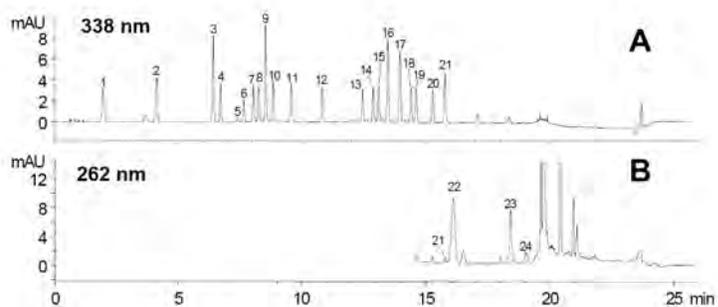


Figure 4: Routine Analysis, High Resolution of 24 Amino Acids Using the Eclipse-AAA Protocol. The column dimensions are 4.6 x 150 mm, 5 μ m. See Table 1 for peak identification. Detection: A. UV 338 nm (OPA amino acids), B. UV 262 nm (FMOC-amino acids).

strates higher resolution resulting from higher efficiency. Back pressure on the column containing the smaller, 3.5 μm , particles is 240-300 bar (3530-4410 psi), while the back pressure of the column having 5 μm particles is 160-210 bar (2350-3090 psi). Thus, if only primary amino acids are of interest and the 15-cm column length is used, the larger 5- μm packing is a better choice because of less system backpressure.

The value of the 15-cm column containing 3.5- μm particles, over its 5- μm counterpart, is clearly illustrated by comparing Figures 3 and 4. Figure 3A shows separation of the primary amino acids, monitored at 338 nm; Figure 3B shows the separation monitored at 262 nm; and Figure 3C shows the analysis using fluorescence detection. Note the resolution between peaks #21 (lysine) and #22 (hydroxyproline) in Figures 3 and 4. The increase in resolution between these peaks, when using the longer column with smaller particles (150mm, 3.5 μm), provides a longer time-window that facilitates wavelength switching of the DAD or FLD between peaks #21 and #22.

When monitoring at 262 nm (Fig. 3B), a small baseline “hump” elutes between 7 and 10 minutes due to derivatization byproducts. Since only the primary AA's are monitored (338 nm) during this time, the “hump” has no impact on their detection or resolution. It is best to monitor at two wavelengths for detection of secondary amino acids such as hydroxyproline. If this is not desirable, wavelength switching can be used.

The specific time to switch fluorescence (or UV) wavelengths may differ due to minor variations in temperature, mobile phase, etc. In Figure 3C the FLD signal monitored at 450 nm (Ex = 340 nm), is programmed to change to 305 nm

(Ex = 266 nm) after peak #21 (lysine) elutes but before peak #22 (hydroxyproline) elutes. In this case, the switch was programmed to occur at exactly 15 minutes. For specific details, see the *Experimental Conditions* Section, *Detection Settings*. After Peak #24 (proline) elutes, the gradient increases to 100% channel B to elute reaction byproducts from the column. After the step gradient up to 100% B for 3.7 minutes, a programmed return to the starting conditions equilibrates the column for the next injection. Also note in the fluorescence chromatogram, that Peak #13 (cystine) does not fluoresce under these conditions and is not detected.

Lysine-Hydroxyproline Separation and Wavelength Switching

Analysis of lysine and hydroxyproline has a major impact on the choice of detection parameters and column configuration, as well as the resulting runtime. Amino acids eluting prior to hydroxyproline (up to and including lysine) are derivatized with OPA and are detected at 338 nm. Hydroxyproline elutes immediately after lysine and is the first FMOc-derivatized amino acid to elute; detection must be at 262nm. The simplest solution is continuous collection of 338 nm and 262 nm data in two separate signals using the Agilent 1100 DAD

or MWD (multiwavelength detector).

If the DAD and MWD are not available, the wavelength collected in a single channel can be switched under carefully chosen conditions, for detection of both OPA and FMOc-derivatized amino acids. Collection of data in a single channel may be necessary, for instance, when using the Agilent 1100 VWD (variable wavelength detector). Increased resolution between lysine and hydroxyproline is possible when using more-complex gradient-profiles. Check on the web for additional information at www.agilent.com/chem in the “Technical Support” / “User Contributed Software”.

When hydroxyproline is not of interest in the sample (e.g., in analysis of protein hydrolysates), it is possible to use any of the column configurations and switch wavelength at a time between lysine elution and elution of the first FMOc-amino acid (sarcosine or proline). In this scenario, the 4.6 x 75 mm column size is adequate and has the advantage of half the analysis time.

COMPARISON WITH AMINOQUANT METHOD ON THE HP1090 HPLC

Figure 5A shows a chromatogram

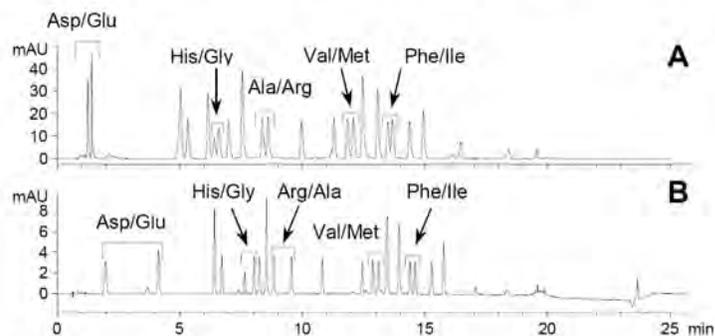


Figure 5: Comparison of Amino-Acid Analyses. A) AminoQuant Method on the HP 1090 HPLC with a Hypersil AA Column. B) Zorbax Eclipse-AAA Column (4.6 x 150 mm, 5 μm) on the Agilent 1100 HPLC.

from the original AminoQuant method (Application Notes, HP Pub. No. 5954-6257) on the HP1090 HPLC using the specified mobile phase, column and flow rate. There are five critical pairs (asp/glu, his/gly, ala/arg, val/met and phe/ile) in this separation. The asp/glu pair elutes very closely to the void volume.

Figure 5B shows a chromatogram obtained using the Zorbax Eclipse-AAA column. The resolution of all of the critical pairs is improved, especially the first pair, asp/glu, which now has increased retention and is moved significantly away from the column's void volume. Note also, that arginine elutes before alanine when using the Eclipse-AAA column, compared to the original AminoQuant method on the same HP 1090 instrument.

REPRODUCIBILITY

Table 2 shows the results from replicate injections (n=6) of the amino acid reaction mixture separated using a Zorbax Eclipse-AAA column (4.6 x 150 mm, 3.5 μ m). Each run represents an individual derivatization and its chromatographic separation. Retention time reproducibility is quite good with an average % relative standard deviation (%rsd) of 0.18%. The reproducibility of the derivatization, as represented by the peak area has an average %rsd of 2.0. These data are comparable to those published for the original AminoQuant method on the HP 1090 instrument (0.23 % and 2.3 % respectively (*LC/GC International*, Volume 5, Number 2, Feb 1992, pp. 44-49).

LINEARITY AND SENSITIVITY

Linearity for the Eclipse-AAA protocol is demonstrated for the range of 4.5 pmoles to 450 pmoles, using amino acid standards (0.5 μ l sample). Figure 6 shows calibration curves for several amino acids

using DAD or FLD detection. The correlation coefficient for all 24 amino acids is between 0.99900 and 1.00000 using either the DAD or FLD detector for calibration.

Detection of derivatized amino acids at two low levels, 5 pmoles and 50 pmoles, is shown in Figures 7 and 8 for the DAD and FLD, respectively. Using the DAD (Fig. 7), each amino acid in the standard mix can be resolved at a level of approximately 10 pmoles. The FLD (Fig. 8) shows higher sensitivity than the DAD.

Amino Acid	Retention % rsd	Peak Area % rsd
ASP	0.58	0.8
GLU	0.33	3.0
ASN	0.16	2.2
SER	0.12	2.8
GLN	0.12	2.4
HIS	0.11	2.7
GLY	0.15	2.5
THR	0.12	1.1
CIT	0.10	3.5
ARG	0.36	2.3
ALA	0.11	0.9
TYR	0.12	0.7
CY2	0.17	0.6
VAL	0.16	0.5
MET	0.17	1.1
NVA	0.15	0.7
TRP	0.18	0.8
PHE	0.14	0.8
ILE	0.14	1.1
LEU	0.18	1.0
LYS	0.19	3.2
HYP	0.13	4.2
SAR	0.14	6.8
PRO	0.12	2.7
Mean	0.18	2.0

Table 2: Reproducibility of the Zorbax Eclipse-AAA Protocol for the Analysis of Amino Acids. An Agilent 1100 System with quaternary pump was used. Values represent six replicate analyses.

CONCLUSION

Using OPA and FMOC chemistries, amino acid analysis of protein and peptide hydrolysates can be performed in ten minutes using the Zorbax Eclipse-AAA column and

the Agilent 1100 HPLC. This separation approach offers improved retention of five critical pairs compared to the original AminoQuant method on the HP1090 HPLC system. The reproducibility of the analysis of amino acids on the Eclipse-AAA column is comparable to that of the original AminoQuant method, and the mobile phase is more straightforward to prepare with only a pH adjustment of the buffer (solvent A) needed.

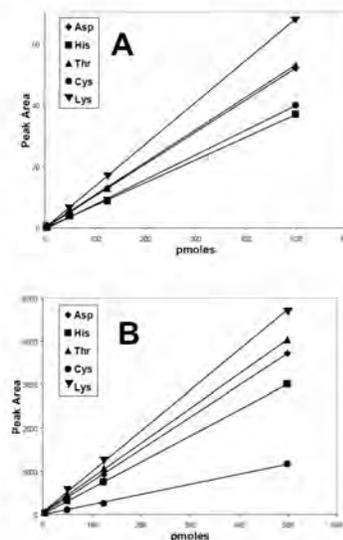


Figure 6: Calibration curves for analysis of amino acid derivatives by UV (A) or FLD (B) detection. Linearity is demonstrated for the concentration range of 4.5 to 450 pmoles in 0.5 μ l of sample.

The choice of column depends upon the analysis speed and resolution desired:

ZORBAX Eclipse-AAA
4.6 x 75 mm (3.5 μ m) for routine sensitivity, high-throughput work using the DAD.

ZORBAX Eclipse-AAA
4.6 x 150 mm (5 μ m), for routine sensitivity, high-resolution work at lower back pressures, using the DAD

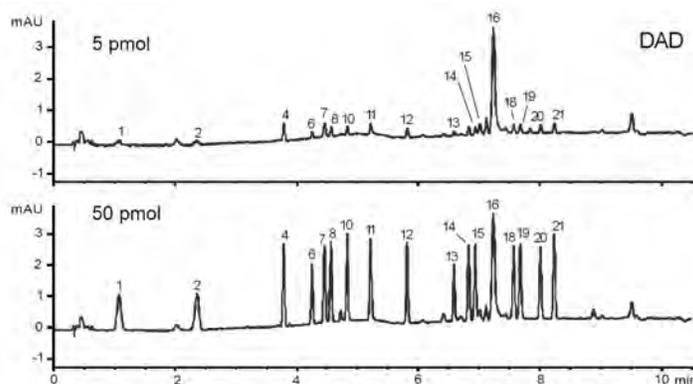


Figure 7: UV-Detector Response 338 nm (OPA-derivatives) Using Different Concentrations of Amino Acids.

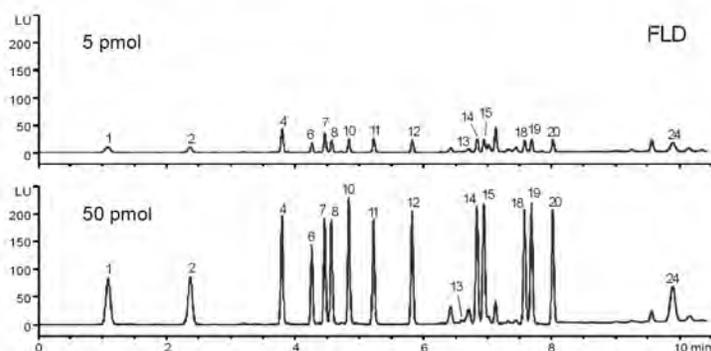


Figure 8: Fluorescence-Detector Response Using Different Concentrations Amino Acids. Gain for the Photomultiplier Tube (PMT) = 10.

ZORBAX Eclipse-AAA
4.6 x 150 mm (3.5 μ m), for high sensitivity, high-resolution work using the FLD.

ZORBAX Eclipse-AAA
3.0 x 150 mm, (3.5 μ m), available in Fall of 2000, is for high sensitivity, high-resolution work with less solvent and sample consumption.

Using the Agilent 1313A auto-sampler to automate the pre-column derivatization procedure results in a speedy and reproducible reaction with minimal operator intervention. This protocol can be used for routine analysis of both primary and secondary amino acids using the DAD and collecting two wavelengths, or with programmed wavelength switching.

For high-sensitivity work, the fluorescence detector is required.

EXPERIMENTAL CONDITIONS

Chromatograms shown in Figures 1 – 8 were obtained using the following experimental conditions:

Instrument

The recommended chromatographic system is the Agilent 1100 HPLC: G1312A Binary pump with G1315A Diode Array Detector (DAD), 6-mm or 10-mm flow cell, and/or G1315A Fluorescence Detector (FLD). While the results shown here were obtained the binary pump, this procedure has also been used with the Agilent 1100 quaternary pump (G1311A).

HPLC Columns

ZORBAX Eclipse-AAA
4.6 x 75 mm, 3.5 μ m
PN 966400-902

ZORBAX Eclipse-AAA
4.6 x 150 mm, 3.5 μ m
PN 963400-902

ZORBAX Eclipse-AAA
4.6 x 150 mm, 5 μ m
PN 993400-902
Optional guard column*
ZORBAX Eclipse-AAA
4.6 x 12.5 mm, 5 μ m, 4/PK
PN 820950-931

ZORBAX Eclipse-AAA
3.0 x 150 mm, 3.5 μ m
Available in Fall of 2000.

* The optional guard column should be installed directly preceding the analytical column, using a low dead-volume connector.

Mobile Phase

A: 40 mM Na_2HPO_4 pH 7.8 [5.5 g NaH_2PO_4 monohydrate + 1 liter water; adjust to pH 7.8 with NaOH solution (10 N)]
B: ACN: MeOH: water (45:45:10, v/v/v)

It is convenient to make Mobile Phase A as a 10X stock solution with no pH adjustment. The solution can be kept for several weeks and can be diluted and titrated to pH 7.8, as needed. All mobile-phase solvents should be HPLC grade.

Pump Settings

Flow: 2 mL/min
Stoptime: 14 min (75-mm column) or 26 min (150-mm column)
Post time: off

Auxiliary Pump Settings:

Max. flow ramp: 100 mL/min²
Compressibility A: 50×10^{-6}
Minimal Stroke A: 20 μ L
Compressibility B: 115×10^{-6}
Minimal Stroke B: Auto

Gradients:

For 75 mm column length

Time (min)	% B
0	0
1	0
9.8	57
10	100
12	100
12.5	0
14	0

For 150 mm column length

Time (min)	% B
0	0
1.9	0
18.1	57
18.6	100
22.3	100
23.2	0
26	0

Note: To extend column life, flush column with 10 column volumes of 100% B when column will not be used for periods of overnight or longer.

Detector Settings

DAD:

Required Lamps:

UV lamp: yes

Vis. lamp: no

UV: 338 nm, 10 nm bandwidth (bw), reference: 390 nm, 20 nm bw (for OPA-amino acids)

262 nm, 16 nm bw, reference: 324 nm, 8 nm bw (for FMOC-amino acids)

Peakwidth: >0.03 min (0.5 s)

Slit: 4 nm

FLD:

For 75 mm column

Time (min)	Ex/Em (nm)	PMT Gain
0	340/450	10
8.5*	266/305	9

For 150 mm column

Time (min)	Ex/Em (nm)	PMT Gain
0	340/450	10
15*	266/305	9

*The specific time to switch fluo-

rescence wavelengths may differ due to variations in temperature, mobile phase, etc.

Peakwidth: >0.5 min

Autosampler:

See vial positioning (Fig. 9)

Injector program:

Draw 2.5 µL from vial 1 (borate buffer)
 Draw 0.5 µL from sample (e.g., choose vial position #11 for amino acid sample)
 Mix 3 µL "in air", max speed, 2x
 Wait 0.5 min
 Draw 0 µL from vial 2 (needle wash using water in uncapped vial)
 Draw 0.5 µL from vial 3 (OPA)
 Mix 3.5 µL "in air", max speed, 6x
 Draw 0 µL from vial 2 (needle wash using water in uncapped vial)
 Draw 0.5 µL from vial 4 (FMOC)
 Mix 4 µL "in air", max speed, 6x [Optional needle rinse for high sensitivity use: Draw 0.0 µL from vial 6 (ACN, acetonitrile)]
 Draw 32 µL from vial 5 (water)
 Mix 18 µL "in air", max speed, 2x
 Inject

Auxiliary:

Drawspeed: 200 µL/min
 Ejectspeed: 600 µL/min
 Draw position: 0.0 mm

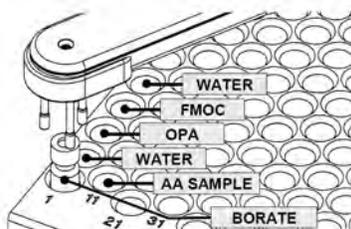


Figure 9: Position of reagent vials in the Agilent 1313A autosampler. This positioning of vials is designed for the listed injector program.

Vials:

Conical vial inserts with polymer feet (Fig. 10A) are required to hold the OPA and FMOC reagents



Figure 10: Insert, Vial, and Cap. Photo of conical insert A (Agilent PN 5181-1270), amber wide-opening vial B (Agilent PN 5182-0716), and screw cap C (Agilent PN 5182-0721), for amino acid analysis using the Agilent 1100 autosampler.

because of the limited volumes involved. The inserts are compatible with wide-opening screw-top (Fig. 10B-C) or crimp-top vials. For this procedure snap-cap vials should not be used because an airtight seal is needed for both FMOC, because it is highly volatile, and OPA, because it slowly degrades in the presence of oxygen. Be careful not to use vials or caps designed for other instruments, as these may damage the Agilent G1313A autosampler.

Column Compartment:

Temperature: 40°C (left and right side)
 Enable analysis: When temperature is within setpoint +/- 0.8°C

Derivatization Reagents

Borate Buffer:

Agilent PN 5061-3339
 Solution is 0.4 N in water, pH 10.2. Keep refrigerated (4°C). Dispense as necessary.

FMOC Reagent:

Agilent PN 5061-3337
 Pipette 100-µL aliquots of the 1-mL FMOC reagent into conical inserts, cap immediately and refrigerate (4°C); solution is useable for 7 - 10 days, maximum, after dispensing.

OPA Reagent:

Agilent PN 5061-3335

Pipette 100- μ L aliquots of the 1-mL OPA reagent into conical inserts, cap immediately and refrigerate (4°C); solution is useable for 7 - 10 days, maximum, after dispensing.

Water: Deionized, HPLC grade

See *Ordering Information* for descriptions and part numbers.

SAMPLE PREPARATION

Note: Each reagent vial should be replaced every day. Each 1 mL ampoule of reagent contains sufficient solution to last about ten days (1000 μ L/100 μ L = 10 days).

Amino Acid Mix for Chromatographic Comparisons

For chromatographic analyses, 17 amino acids from the 250 pmol/ μ L standard mix (PN: 5061-3331), plus citrulline and the 6 supplemental amino acids, were combined at a concentration of approximately 250 pmol/ μ L. The mixture was prepared by combining the two stock solutions described below. Add 1 μ L of the supplemental amino acid stock solution to a fresh aliquot of the 250-pmole standard (100 μ L) in the conical vial insert. Mix using a vortex mixer to complete the 24-component standard ready for injection (250 pmol/L).

250 pmole standard:

Divide 1 mL ampoule of 250pmol/ μ L amino acids (PN 5061-3331) into 100 μ L portions in conical vial inserts, cap and refrigerate aliquots at 4°C.

Supplemental amino acid stock solution:

Weigh about 0.25 mmoles of each auxiliary amino acid (gln, asn, trp, nva, hyp, sar) from kit (PN 5062-2478) into a 20-mL vial. Add 5 mL deionized water and sonicate in a

hot water bath until dissolved.

Add another 5 mL water to complete dilution. Store in refrigerator (4°C). Citrulline (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO) was added in this mix at the same concentration.

For storage, do **not** combine supplemental amino acids with amino acid standards. Some of these supplemental amino acids degrade in HCl (especially glutamine, and to a lesser extent, asparagine).

Amino Acid Mix for Calibration Curves

For the construction of calibration curves, 17 amino acids, plus the 4 extended amino acids, are combined at various concentrations with fixed amounts of internal standards. The internal standards (ISTD) (norvaline and sarcosine) are part of the supplemental amino acid kit (PN: 5062-2478). The remaining amino acids in this kit (gln, asn, trp, hyp) form the extended amino acids (EAA). To make the appropriate solutions, refer to Tables 3 and 4 for low and high sensitivity standards, respectively.

Amino acid standards (10 pmol/ μ L to 1nmol/ μ L):

Divide each 1 mL ampoule of standards PN 5061-3330 through 5061-3334) into 100 μ L portions in conical vial inserts, cap and refrigerate aliquots at 4°C. Calibration curves may be made using from 2 to 5 standards, depending on experimental need.

Extended amino acid (EAA) stock solution:

This solution is made using four of the six amino acids in the supplemental amino acid kit (PN: 5062-2478). For use with low-sensitivity standards (Table 3), make a 25-mL

solution containing 18 nmol/ μ L of glutamine, asparagine, tryptophan, and 4-hydroxy-proline in deionized water. Sonicate the solution until dissolved. Store the solution refrigerated at 4°C. For use with high-sensitivity standards (Table 4), make a 1.8 nmol/ μ L solution by diluting 5 mL of the 18 nmol/ μ L standard with 45 mL deionized H₂O.

Internal standards (ISTD) stock solution:

These solutions are made using two of the six amino acids in the supplemental amino acid kit (PN: 5062-2478). For use with low-sensitivity standards (Table 3), make a 25-mL solution containing 10 nmol/ μ L of norvaline and sarcosine in deionized water. Sonicate the solution until dissolved. Store in refrigerator (4°C). For use with high-sensitivity standards (Table 4), make a 1 nmol/ μ L solution by diluting 5 mL of the 10 nmol/ μ L standard with 45 mL deionized H₂O. Store in refrigerator (4°C).

ADDITIONAL SUPPORT

User-contributed Chemstation Method files for each column type, written documentation, as well as an amino acid report and macro, are available by download via the Agilent web site at www.agilent.com/chem, under "Technical Support" / "User Contributed Software".

Table 3: Preparation of Low-Sensitivity Amino Acid Standard Solutions. Prepare the three low-sensitivity standards by mixing together stock solutions in the volumes shown.

	Concentration of Final AA Solutions (pmol/ μ L)		
	900	225	90
Take 5 mL 18 nmol EAA	5mL	5mL	5mL
Dilute with 0.1NHCl	–	15mL	45mL
Diluted EAA mix	5mL	20mL	50mL
Take 5 mL diluted EAA mix	5mL	5mL	5mL
Add 10 nmol ISTD solution	5mL	5mL	5mL
EAA-ISTD mix	10mL	10mL	10mL
Take 100 μ L EAA-ISTD mix	100 μ L	100 μ L	100 μ L
Add 1000 pmol AA standard	900 μ L	–	–
Add 250 pmol AA standard	–	900 μ L	–
Add 100 pmol AA standard	–	–	900 μ L
Final AA Solution with EAA and 500 pmol/μL ISTD	1 mL	1 mL	1 mL

Table 4: Preparation of High-Sensitivity Amino Acid Standard Solutions. Prepare the three high-sensitivity standards by mixing together stock solutions in the volumes shown.

	Concentration of Final AA Solutions (pmol/ μ L)		
	90	22.5	9
Take 5 mL 1.8 nmol EAA	5mL	5mL	5mL
Dilute with 0.1NHCl	–	15mL	45mL
Diluted EAA mix	5mL	20mL	50mL
Take 5 mL diluted EAA mix	5mL	5mL	5mL
Add 1 nmol ISTD solution	5mL	5mL	5mL
EAA-ISTD mix	10mL	10 mL	10 mL
Take 100 μ L EAA-ISTD mix	100 μ L	100 μ L	100 μ L
Add 100 pmol AA standard	900 μ L	–	–
Add 25 pmol AA standard	–	900 μ L	–
Add 10 pmol AA standard	–	–	900 μ L
Final AA Solution with EAA and 50 pmol/μL ISTD	1mL	1mL	1mL

ORDERING INFORMATION

Eclipse-AAA HPLC Columns

Description	Size (mm)	Particle Size (µm)	Agilent Part No.
Analytical routine sensitivity, high-resolution	4.6 x 150	5µm	993400-902
Analytical high sensitivity, high resolution work using the FLD	4.6 x 150	3.5µm	963400-902
Analytical, routine sensitivity, high-throughput	4.6 x 75	3.5µm	966400-902
Analytical high sensitivity, high resolution work—DAD or FLD	3.0 x 150	3.5µm	961400-302
Guard (4/pk)	4.6 x 12.5	5µm	820950-931
Guard Hardware Kit	—	—	820777-901

Derivatization Reagents

Description	Agilent Part No.
Borate Buffer: 0.4 M in water, pH 10.2, 100mL	5061-3339
FMOc Reagent, 2.5 mg/mL in ACN, 10 x 1 mL ampoules	5061-3337
OPA Reagent, 10mg/mL in 0.4M borate buffer and 3-mercaptoproprionic acid, 6 x 1mL ampoules	5061-3335
DTDPA Reagent for analysis of cysteine, 5g	5062-2479

Vials

Description	Agilent Part No.
100 µL Conical insert with polymer feet, 100/pk Amber, wide-opening, write-on, screw-top vial, 2mL, 100/pk	5181-1270
Green Screw Cap, PTFE/silicone septum, 100/pk	5182-0716
	5182-0721

Standards

Description	Agilent Part No.
Amino Acid Standard in 0.1 M HCl, 10 x 1mL ampoules	
1 nmol /ml	5061-3330
250 pmol /ml	5061-3331
100 pmol /ml	5061-3332
25 pmol /ml	5061-3333
10 pmol /ml	5061-3334
Supplemental Amino Acids:	
Nva, Sar, Asn, Gln, Trp, Hyp, 1g each	5062-2478

Additional Support

Description
User-contributed Chemstation method files, custom amino-acid report and macro, and any additional documentation are available through the web at www.agilent.com/chem under "Technical Support" / "User Contributed Software".

Copyright 2000 Agilent Technologies All Rights Reserved. Reproduction, adaptation or translation without prior written permission is prohibited, except as allowed under the copyright laws.

Apéndice 2. Ejemplo de cálculo de las disoluciones de la curva de calibración.

Para asparagina:

Masa pesada = 0.0133 g

$$M = \frac{m}{MM V} = \frac{0.0133 \text{ g}}{\left(132.12 \frac{\text{g}}{\text{mol}}\right) 0.01 \text{ L}} = 0.0101 \frac{\text{mol}}{\text{L}} \times \frac{98\%}{100\%} = 0.00987 \frac{\text{mol}}{\text{L}}$$

$$0.00987 \frac{\text{mol}}{\text{L}} \times \frac{10^3 \text{ mmol}}{1 \text{ mol}} = 9.87 \frac{\text{mmol}}{\text{L}} = 9.87 \text{ mM}$$

$$9.87 \frac{\text{mmol}}{\text{L}} \times \frac{200 \mu\text{L}}{10\,000 \mu\text{L}} = 0.197 \frac{\text{mmol}}{\text{L}} \times \frac{10^3 \mu\text{mol}}{1 \text{ mmol}} = 197 \frac{\mu\text{mol}}{\text{L}} = 197 \mu\text{M}$$

$$197 \mu\text{M} \times \frac{800 \mu\text{L}}{880 \mu\text{L}} = 179 \mu\text{M} \times \frac{600 \mu\text{L}}{900 \mu\text{L}} = 120 \mu\text{M}$$

$$120 \mu\text{M} \times \frac{500 \mu\text{L}}{1000 \mu\text{L}} = 59.8 \mu\text{M} \times \frac{500 \mu\text{L}}{1000 \mu\text{L}} \dots = 0.000912 \mu\text{M}$$

Apéndice 3. Parámetros cromatográficos: Resolución.^{10,11}

Para definir numéricamente el grado o capacidad de separación existente entre dos analitos se emplea la resolución. Se calcula de la siguiente manera:

$$\text{Resolución} = \frac{\Delta Z}{W_{\text{Bpr}}} = \frac{1.18\Delta Z}{W_{\text{hA}} + W_{\text{hB}}}$$

Donde:

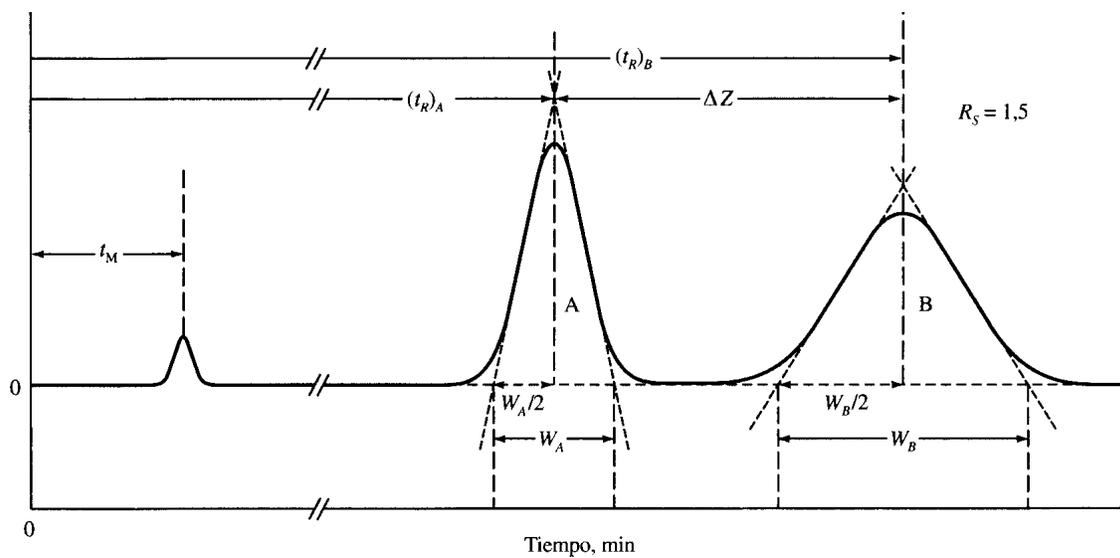
ΔZ = Diferencia de los tiempos de retención de los picos

W_{Bpr} = Promedio de la anchura del pico en la base

W_{hA} = Anchura del pico del analito A a la mitad de la altura

W_{hB} = Anchura del pico del analito B a la mitad de la altura

En la siguiente figura se observa dos compuestos (A y B) separados por una resolución de 1.5.



REFERENCIAS

- 1 Lehninger, A. L., Nelson, D. L., Cox, M. M. Principios de Bioquímica. 2ª ed. Omega, S.A. España, 1993. 1013 págs.
- 2 McMurry, J. Química Orgánica. 5ª ed. Internacional Thomson. México, 2000. 1284 págs.
- 3 Peña Díaz, A., Arroyo Begovich, A., Gómez Puyou, A., Tapia Ibargüengoyitia, R., Gómez Eichelman, C. Bioquímica. 2ª ed. Limusa. México, 1988. 427 págs.
<http://books.google.es/books?id=EFUP472dyEMC>
- 4 Salgado, J. Estructura, propiedades y funciones de los aminoácidos y las proteínas. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Odontología, Universidad de Valencia. España, 2008.
<http://www.uv.es/~salgado/odonto/Tema2.pdf>
- 5 Teijón Rivera, J. M., Garrido Pertierra, A., Blanco Gaitán, D., Villaverde Gutiérrez, C., Mendoza Oltras, C., Ramírez Rodrigo, F. Fundamentos de bioquímica metabólica. 2ª ed. Tebar. España, 2006. 422 págs.
http://books.google.es/books?id=lw_z2TPXvZgC&printsec=frontcover&source=gbs_summary_r&cad=0
- 6 Flórez, J., Armijo, J. A., Mediavilla, A. Farmacología humana. 3ª ed. Masson, S.A. España, 1997. 1291 págs.
- 7 Baynes, J. W., Dominiczak, M. H. Bioquímica médica. 2ª ed. Elsevier. España, 2007. 703 págs.
<http://books.google.es/books?id=OCWP08sZok4C&printsec=frontcover&dq=bioquimica#PPA10,M1>
- 8 Ángel, G., Ángel, M. Interpretación clínica del laboratorio. 5ª ed. Editorial Médica Panamericana. Colombia, 1996. 654 págs.

- 9 Bongiovanni, B., Feinerman, J. Amino acid profiling, clinical guidelines for determination of preferred specimen choice. *Townsend Letter for Doctors and Patients: the Examiner of Medical Alternatives*. 245. 2003. 38-42.
- 10 Rouessac, F., Rouessac, A. Análisis químico, métodos y técnicas instrumentales modernas. 1ra trad. de la 5ª ed. en francés. McGraw-Hill Interamericana. España, 2003. 419 págs.
- 11 Skoog, D. A., Holler, F. J., Nieman, T. A. Principios de análisis instrumental. 5ª ed. McGraw Hill. España, 2001. 918 págs.
- 12 McNair, H., Gómez, H. Cromatografía de gases acoplada con espectrometría de masas y HPLC (BENCHTOP GC/MS Y HPLC). XI Congreso Latinoamericano de Cromatografía y Ciencias Afines, 26-30 de junio, 2006. Mérida, Yucatán, México.
- 13 Harris, D. C. Análisis químico cuantitativo. 2ª ed. (correspondiente a la 5ª ed. original norteamericana) Reverté, S.A. España, 2001. 841 págs.
- 14 Heftmann, E. Chromatography, fundamentals and applications of chromatography and related differential migration methods, Part A fundamentals and techniques. 5ª ed. Journal of Chromatography Library. Países Bajos, 1992. 517 págs.
- 15 Bidlingmeyer, B. A. Practical HPLC methodology and applications. John Wiley & Sons, Inc. EUA. 1992.
- 16 De la Riva, C. Curso de cromatografía. Universidad Nacional Autónoma de México. México, 1999.
- 17 De la Riva, C. Curso de introducción a la cromatografía. Universidad Nacional Autónoma de México, Sociedad Mexicana de Ciencias Fisiológicas, A.C. IN 15193N, México.

- 18 Bedolla Améndola, I. C. Seminario: Temas Selectos de Columnas LC. ¿Qué tan rápido puede ser mi análisis? Columnas ZORBAX™ Rapid Resolution HT. Agilent Technologies México, 30 de Abril, 2008, Ciudad de México, México.
- 19 Williams, F. Cromatografía de líquidos de alta eficiencia (HPLC). Departamento de Química Inorgánica, Analítica y Química Física, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. Argentina.
http://www.qi.fcen.uba.ar/materias/ai/clase4_2007.pdf
- 20 Bussi, J. Cromatografía de líquidos de alta eficacia (HPLC). Laboratorio de Análisis, Instituto de Ingeniería Química, Facultad de Ingeniería, Universidad de la República. Uruguay, 2007.
<http://www.fing.edu.uy/iq/analisis/cursos/ainst/hplc.pdf>
- 21 Gomis Yagües, V. Tema 4. Cromatografía de líquidos de alta resolución. Departamento de Ingeniería Química, Universidad de Alicante. España, 2008.
<http://rua.ua.es/dspace/bitstream/10045/8248/3/T4cromatliquid.doc>
- 22 Agilent Technologies. Agilent 1200 Series LC Systems and Modules. Agilent Technologies. Alemania, 2006 PN 5989-5200EN. 24 págs.
- 23 Fekkes, D. State-of-the-art of high-performance liquid chromatographic analysis of amino acids in physiological samples. Review. Journal of Chromatography B: Biomedical Applications. 682. 1996. 3-22.
- 24 Frank, M. P., Powers, R. W. Simple and rapid quantitative high-performance liquid chromatographic analysis of plasma amino acids. Journal of Chromatography B. 852. 2007. 646-649.

- 25 Woodward, C., Henderson Jr, J. W. High-Speed Amino Acid Analysis (AAA) on 1.8 μ m Reversed-Phase (RP) Columns. Application. Pharmaceuticals and Food. Agilent Technologies Inc. EUA, 2007. PN 5989-6297EN, 1-14.
- 26 Mayer, A. G., Lai, F. Varian Application Note Number 2. AminoTag precolumn amino acid analysis. LC, Varian Chromatography Systems. LC2:0292.
- 27 ESA Application Note Coulochem III. Amino acids - OPA/BME derivatization. ESA, Inc. 70-0160P IA-5
- 28 Jasco HPLC Application Note 02-04. Detection of amino acids using HPLC with CD detection. Jasco, Inc. 02-04.
- 29 Pickering, M. V. Pickering Laboratories The Application Notebook - February 2006 Advertising Supplement. Amino Acid Analysis with Temperature and Eluent Gradients: The Importance of Temperature Profiles with Complex Retention Mechanisms. Pickering Laboratories, Inc. 22-23.
- 30 Uhe, A. M., Collier, G. R., McLennan, E. A., Tucker, D. J., O'Dea, K. Quantitation of tryptophan and other plasma amino acids by automated pre-column o-phthaldialdehyde derivatization high-performance liquid chromatography: improved sample preparation. Journal of Chromatography. 564. 1991. 81-91.
- 31 Maccioni, R. B., Muñoz, J. P., Barbeito, L. The molecular bases of Alzheimer's disease and other neurodegenerative disorders. Archives of Medical Research. 32. 2001. 367-381.
- 32 Mebane Sims, I. 2009 Alzheimer's disease. Facts and figures. Alzheimer & Dementia, The Journal of the Alzheimer's Association. 5. 3. 2009. 234-270.

- http://www.alz.org/national/documents/report_alzfactsfigures2009.pdf
- 33 Campion, D., Benitez, M. G., Hannequin, D. La enfermedad de Alzheimer. Siglo XXI. México, 2003. 136 págs.
http://books.google.es/books?id=ZQWyIGGChNcC&printsec=frontcover&source=gbs_summary_r&cad=0
- 34 Victor, M., Adams, R. D., Sandoval, A., Pérez, G., Péres, J., Ropper, A. Adams y Victor. Principios de neurología. 7ª ed. McGraw Hill, México, 2002.
- 35 Ardila, A., Rosselli, M., Puente, A. E. Neuropsychological Evaluation of the Spanish Speaker. Springer. EUA, 1994. 201 págs.
http://books.google.es/books?id=F_tBKkvsHtcC&pg=PA7&dq=minimiental#PPA7,M1
- 36 Ravaglia, G., Forti, P., Maioli, F., Bianchi, G., Martelli, M., Talerico, T., Servadei, L., Zoli, M., Mariani, E. Plasma amino acid concentrations in patients with amnesic mild cognitive impairment or Alzheimer disease. The American Journal of Clinical Nutrition. 80. 2004. 483-488.
- 37 D'Aniello, A., Fisher, G., Migliaccio, N., Cammisa, G., D'Aniello, E., Spinelli, P. Amino acids and transaminases activity in ventricular CSF and in brain of normal and Alzheimer patients. Neuroscience Letters. 388. 2005. 49-53.
- 38 Fisher, G., Lorenzo, N., Abe, H., Fujita, E., Frey, W. H., Emory, C., Di Fiore, M. M., D'Aniello, A. Free D- and L-amino acids in ventricular cerebrospinal fluid from Alzheimer and normal subjects. Amino Acids. 15. 1998. 263-269.
- 39 Martínez, M., Frank, A., Diez-Tejedor, E., Hernanz, A. Amino acid concentrations in cerebrospinal fluid and serum in Alzheimer's

- disease and vascular dementia. *Journal of Neural Transmission*. 6. 1993. 1-9.
- 40 Tohgi, H., Abe, T., Takahashi, S., Kimura, M. A selective reduction of excitatory amino acids in cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer type dementia compared with vascular dementia of the Binswanger type. *Neuroscience Letters*. 141. 1992. 5-8
- 41 Jiménez, F. J., Molina, J. A., Gómez, P., Vargas, C., Bustos, F. de, Benito, J., Tallón, A., Ortí, M., Gasalla, T., Arenas, J. Neurotransmitter amino acids in cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer's disease. *Journal of Neural Transmission*. 105. 1998. 269-277.
- 42 Basun, H., Forssell, L. G., Almkvist, O., Cowburn, R. F., Eklöf, R., Winblad, B., Wetterberg, L. Amino acid concentrations in cerebrospinal fluid and plasma in Alzheimer's disease and healthy control subjects. *Journal of Neural Transmission*. 2. 1990. 295-304.
- 43 Fekkes, D., van der Cammen, T. J. M., van Loon, C. P. M., Verschoor, C., van Harskamp, F., de Koning, I., Schudel, W. J., Pepplinkhuizen, L. Abnormal amino acid metabolism in patients with early stage Alzheimer dementia. *Journal of Neural Transmission*. 105. 1998. 287-294.
- 44 Hashimoto, K., Fukushima, T., Shimizu, E., Okada, S., Komatsu, N., Okamura, N., Koike, K., Koizumi, H., Kumakiri, C., Imai, K., Iyo, M. Possible role of d-serine in the pathophysiology of Alzheimer 's disease. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*. 28. 2004. 385-388.
- 45 Seidl, R., Cairns, N., Singewald, N., Kachler, S. T., Lubec, G. Differences between GABA levels in Alzheimer's disease and Down

- syndrome with Alzheimer-like neuropathology. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*. 363. 2001. 139-145.
- 46 Henderson, J. W., Ricker, R. D., Bidlingmeyer, B. A., Woodward, C. Rapid, Accurate, Sensitive, and Reproducible HPLC Analysis of Amino Acids. *Amino Acid Analysis Using Zorbax Eclipse-AAA Columns and the Agilent 1100 HPLC*. Agilent Technologies. EUA, 2000. PN 5980-1193E. 10 págs.
- 47 Pera Jiménez, C. Cirugía. 2^a ed. Elsevier. España, 1996. 471 págs.
http://books.google.es/books?id=7MG0X4OeEykc&printsec=frontcover&source=gbs_summary_r&cad=0
- 48 Grossie, Jr., V. B., Yick, J., Alpeter, M., Welbourne, T. C., Ota, D. M. Glutamine Stability in Biological Tissues Evaluated by Fluorometric Analysis. *Clinical Chemistry*. 39. 6. 1993. 1059-1063.
- 49 Tcherkas, Y. V., Kartsova, L. A., Krasnova, I. N. Analysis of amino acids in human serum by isocratic reversed-phase high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *Journal of Chromatography A*. 913. 2001. 303-308.
- 50 Sasaki, H., Muramoto, O., Kanazawa, I., Arai, H., Kosaka, K., Ilzuka, B. Regional distribution of amino acid transmitters in postmortem brains of presenil and senil dementia of Alzheimer type. *Annals of Neurology*. 19. 3. 1986. 263-269.
- 51 Csernansky, J. G., Bardgett, M. E. Sheline, Y. I. Morris, J. C., Olney, W. CSF excitatory amino acids and severity of illness in Alzheimer's disease. *Neurology*. 46. 1996. 1715-1720.
- 52 Olive, M. F. Interactions between taurine and ethanol in the central nervous system. *Amino Acids*. 23. 4. 2002. 345-357.
- 53 Kang, X., Xiao, J., Huang, X., Gu, Z. Optimization of dansyl derivatization and chromatographic conditions in the determination

- of neuroactive amino acids of biological samples. *Clinica Chimica Acta*. 366. 2006. 352-356.
- 54 Cynober, L. A. Plasma amino acid levels with a note on membrane transport: characteristics, regulation, and metabolic significance. *Nutrition*. 18. 2002. 761-766.
- 55 Bartolomeo, M. P., Maisano, F. Validation of a reversed-phase HPLC method for quantitative amino acid analysis. *Journal of Biomolecular Techniques*. 17. 2006. 131-137.
- 56 Schwarz, E. L., Roberts, W. L., Pasquali, M. Analysis of plasma amino acids by HPLC with photodiode array and fluorescence detection. *Clinica Chimica Acta*. 354. 2005. 83-90.
- 57 Davey, J. F., Ersser, R. S. Amino acid analysis of physiological fluids by high-performance liquid chromatography with phenylisothiocyanate derivatization and comparison with ion-exchange chromatography. *Journal of Chromatography*. 528. 1990. 9-23.
- 58 Rudman, D., Mattson, D. E., Feller, A. G., Cotter, R., Johnson, R. C. Fasting plasma amino acids in elderly men. *American Journal of Clinical Nutrition*. 49. 1989. 559-566.
- 59 Caballero, B., Gleason, R. E., Wurtman, R. J. Plasma amino acid concentrations in healthy elderly men and women. *American Journal of Clinical Nutrition*. 53. 1991. 1249-1252.
- 60 Leurs, R., Timmerman, H. *The Histamine H3 receptor*. Elsevier. EUA, 1998. 291 págs.
<http://books.google.es/books?id=HJuzEwpF2-EC&pg=PA245&dq=histamine+alzheimer&lr=>
- 61 Salzman, C. *Clinical geriatric psychopharmacology*. 4a ed. Lippincott Williams & Wilkins. EUA, 2004. 696 págs.

<http://books.google.es/books?id=RXvpjJ1Un2gC&pg=PA603&dq=amino+acids+alzheimer>