

DETERMINACION DE PERFILES DE AMINOACIDOS EN FLUIDO BIOLÓGICOS POR CROMATOGRFIA GASEOSA

M.T. Correa Vidal, A. Rosado Pérez, O. Galup Zayas y D. Fajardo Ledea

Departamento de Espectroscopía Molecular, Centro Nacional de Investigaciones Científicas

Recibido: 5 de Enero de 1990

ABSTRACT. Normal ranges of amino acids in urine and plasma obtained through separation and quantification of their N-trifluoroacetylbutylester derivatives by gas chromatography are reported. Some illustrative examples of the application of this method in investigations of inborn error of metabolism are presented and briefly discussed.

RESUMEN. Se reportan los rangos normales de aminoácidos en orina y plasma obtenidos mediante la separación y cuantificación de sus derivados ésteres butílicos N-trifluoroacetilados por cromatografía gaseosa. Se presentan brevemente algunos ejemplos de la técnica en investigaciones sobre errores congénitos del metabolismo.

INTRODUCCION

En general, el análisis de aminoácidos no puede llevarse a cabo sin el empleo de técnicas cromatográficas. (1) Desde hace más de 3 décadas, muchos investigadores han trabajado arduamente en el desarrollo y perfeccionamiento de técnicas para la determinación cuantitativa de aminoácidos en materiales biológicos. Esos estudios han sido de gran interés en el campo de la bioquímica, la nutrición, las ciencias médicas, la bacteriología y muchos otros. La importancia creciente que presentan los estudios sobre aminoácidos y proteínas en investigaciones bioquímicas ha traído consigo la necesidad y, por tanto, la demanda de desarrollar análisis de aminoácidos rápidos, precisos y sensibles. (2)

Hasta hace muy poco tiempo, se aceptaba generalmente que la mejor vía de análisis de aminoácidos era la cromatografía de intercambio iónico, usando un analizador de aminoácidos. Sin embargo, a pesar del alto grado de desarrollo alcanzado en estos equipos, este método presenta las desventajas inherentes de requerir altos gastos iniciales y costos considerables de las corridas; sus aplicaciones son, además, muy limitadas, prácticamente sólo en el análisis de aminoácidos. (3) Esta es la razón fundamental de que muchos investigadores hayan adoptado como procedimiento alternativo el método de la cromatografía gaseosa (CGL), a pesar de no ser los aminoácidos lo suficientemente volátiles para permitir su análisis directo y deben convertirse en derivados menos polares y más volátiles. (4) Las ventajas de la CGL son, obviamente, el bajo costo y mucha mayor versatilidad del equipo. Además, la CGL ofrece el relativamente sencillo medio de combinar el sistema analítico con la espectrometría de masas, la cual en muchos casos es la única vía de identificación de sustancias desconocidas.

Uno de los principales derivados utilizados en el análisis de aminoácidos por CGL es el N-trifluoroacetilbutiléster (4), a pesar de las dificultades que se confrontan en el análisis de la cistina y los aminoácidos básicos histidina y arginina, debido a problemas de insolubilidad durante la fase de esterificación.

La determinación cuantitativa de aminoácidos en fluidos biológicos, fundamentalmente plasma y orina, constituye uno de los aspectos bioquímicos más importantes en el diagnóstico y estudio de más de 60 aminoacidopatías. (5) La CGL y el sistema combinado CG/EM han jugado un papel fundamental en el conocimiento de estos trastornos metabólicos.

En nuestro laboratorio se ha desarrollado el empleo de esta técnica con fines de diagnóstico. Naturalmente, se hizo necesario establecer previamente los rangos normales de una población de niños aparentemente sanos, que hicieron posible la detección de anomalías en los perfiles de aminoácidos de niños remitidos de diferentes hospitales.

MATERIALES Y METODOS

Se analizaron los aminoácidos en orina y plasma de 20 niños aparentemente sanos seleccionados al azar y las muestras de

pacientes procedentes de diferentes hospitales, en los cuales se sospechaba un error congénito del metabolismo.

Preparación de la muestra

Una alícuota de 0,4 mL de plasma o 12 mL de orina se pasan por una columna de intercambio iónico Dowex W50 X8 H⁺ de 2 cm de largo y 0,5 cm de d.i.; se pasan 4 mL de agua desionizada y posteriormente se eluyen los aminoácidos con 8 mL de NH₄OH₂N.

En un evaporador rotatorio se lleva a sequedad y se le añaden 3 mL de butanol acidulado, se refluja durante 20 min a 120 °C, al final de los cuales se elimina el exceso de reactivo. Se adiciona 0,2 mL de diclorometano y 300 L de anhídrido trifluoroacético; se refluja durante 5 min a 150 °C.

El análisis por CG/EM fue realizado en un equipo JMS DX-300 de la firma JEOL, acoplado a una computadora JMA 3100. Se trabajó en condiciones de baja resolución con voltaje de ionización de 70 eV y una temperatura en la fuente iónica de 250 °C. Se barrió un rango de masas de 30 a 500 u.m.a./s.

En el análisis cromatográfico se empleó una columna de sílica fundida con fase estacionaria SPB-1 de 30 m de largo. La temperatura del horno se programó de 80 a 280 °C, con un gradiente de 8 °C/min y un período inicial de 2 min.

Las temperaturas en el inyector y separador e introductor fueron de 250 y 220 °C, respectivamente. Se empleó helio como gas portador con un flujo de 1 mL/min, inyectándose L de muestra en condiciones *split-less* durante 1 min.

Para la cuantificación se utilizó hidroxiprolina como estándar interno, en una concentración de 10 mg/mL. Las concentraciones están expresadas en miligramos, o sea, miligramos de aminoácido en 100 mL del fluido biológico.

RESULTADOS Y DISCUSION

Los perfiles de aminoácidos, correspondientes a muestras de orina y plasma de un niño sano, se presentan en las Figura 1A y 2A, respectivamente. Como se puede observar claramente, existe una adecuada resolución cromatográfica para los derivados obtenidos. Debe señalarse, además, que la técnica utilizada presenta muy buena repetibilidad para la mayoría de los aminoácidos y que los espectros de masas de los derivados analizados poseen inmejorables características para una rápida y segura identificación. Sin embargo, la técnica utilizada presenta sus limitaciones respecto a la cistina y los aminoácidos básicos histidina y arginina. Estos aminoácidos no pudieron ser detectados, debido fundamentalmente a problemas de insolubilidad durante la fase de esterificación.

El triptófano presentó también problemas de elución. En primer lugar, es conocido que este aminoácido es muy inestable en medio ácido, por lo que es lógico pensar en la destrucción al menos parcial del mismo durante la acidulación inicial de las muestras. Por otra parte, consideramos que la posible aparición de 4 derivados

durante la fase de acilación del butirato de este aminoácido, resultado observado por Schneider *et al.* (6), es otro problema de la técnica utilizada. Esta última dificultad pudiera ser eliminada de emplearse como agente acilante el anhídrido heptafluorobutírico.

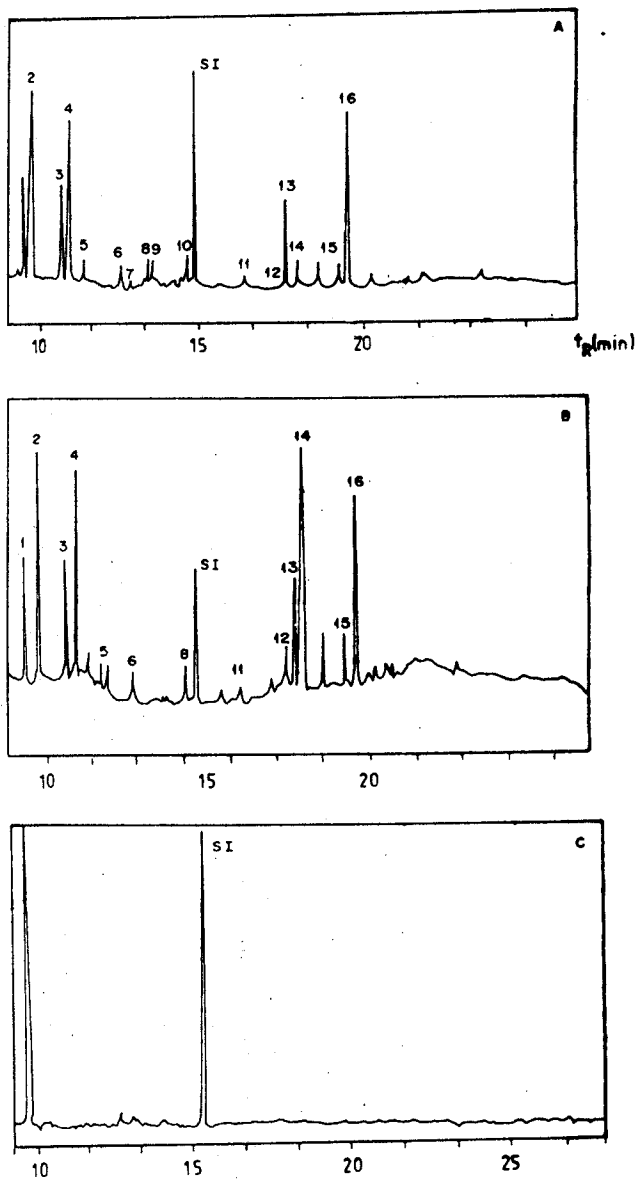


FIGURA 1. Perfiles de aminoácidos urinarios: a) Niño sano; b) Niño fenilcetonúrico (fenilalanina 22,0 mg %); C) Niño con acidemia propiónica (glicina 75 mg %).

No obstante la utilización de rangos de valores normales de aminoácidos en plasma y orina con fines de diagnóstico, los datos reportados por varios autores difieren bastante. Debido a esto, el primer objetivo de este trabajo fue establecer los rangos normales en una población de 20 niños aparentemente sanos con la técnica y derivados utilizados.

Los resultados obtenidos se presentan en las Tablas 1 y 2. Es bueno señalar que, aunque los valores absolutos difieren algo de los reportados por otros autores, existe una buena coincidencia en cuanto a las proporciones de los aminoácidos dentro del perfil cromatográfico. La relativa rapidez y buena repetibilidad de la técnica nos permitieron desarrollar un programa de diagnóstico en el cual se han obtenido muestras de orina de niños remitidos de hospitales pediátricos con sospecha de padecer una aminoacidopatía. Se observaron 3 casos de hiperglicinuria; 2 de ellos como un efecto secundario en neonatos que padecían de acidemia propiónica (la Figura 1C muestra 1 de los casos) y 1 debido a un trastorno metabólico no determinado aún.

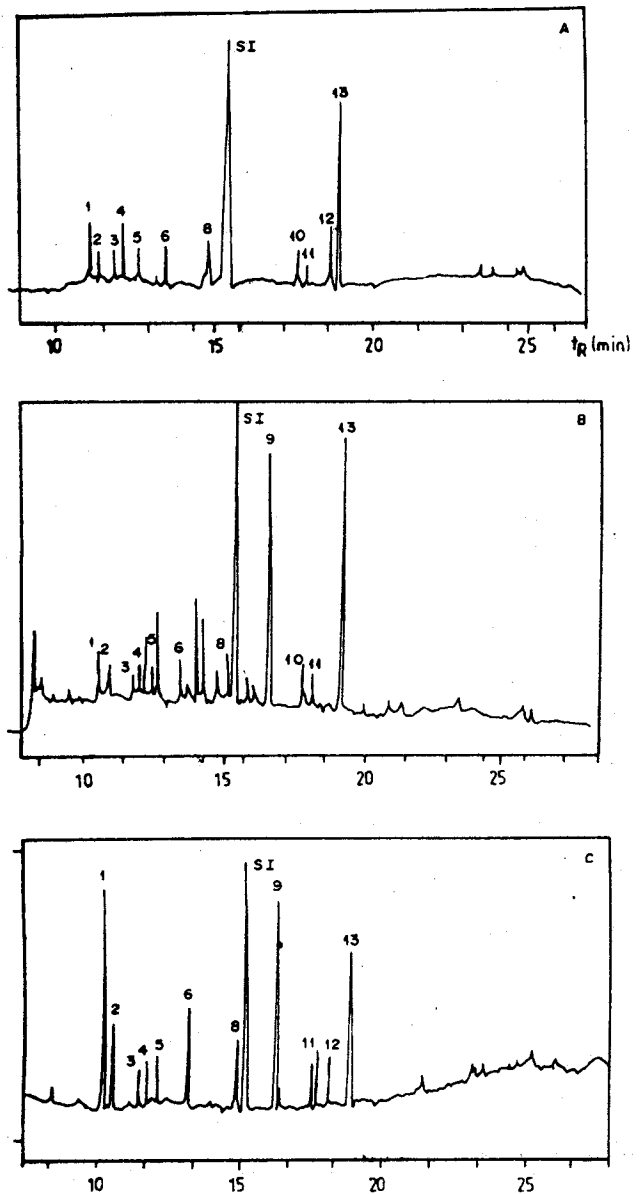


FIGURA 2. Perfiles de aminoácidos plasmáticos: a) Niño sano; b) Niño homocistinúrico (metionina 32,5 mg %); c) Niño con sospecha de padecer un error metabólico congénito.

TABLA 1
Rangos de excreción de aminoácidos en orina encontrados en una población de niños aparentemente sanos

Pico No.	Aminoácido	Intervalo (mg %)	Promedio
1	alanina	4,0-16,5	9,7
2	glicina	9,0-35,0	22,5
3	treonina	4,0-16,6	7,5
4	serina	6,5-18,5	14,1
5	β -alanina	0,0-2,0	1,0
6	valina	0,0-4,0	2,0
7	aminobutírico	0,0-13,0	3,6
8	leucina	0,0-7,5	2,0
9	isoleucina	trazas	---
10	prolina	0,0-2,0	0,8
11	metionina	0,0-1,0	0,2
12	ornitina	0,0-1,5	0,3
13	aspártico	4,0-15,0	11,4
14	fenilalanina	2,0-7,0	4,3
15	lisina+tirosina ¹	2,0-27,0	11,0
16	glutámico ¹	13,5-29,5	27,2

¹ la tirosina etuye conjuntamente con la lisina siendo su concentración muy pequeña

TABLA 2
Rangos de concentración de aminoácidos en plasma
encontrados en una población de 20 niños aparentemente sanos

Pico No.	Aminoácido	Intervalo (mg %)	Promedio
1	alanina	5,0-30,0	10,6
2	glicina	2,5-12,5	5,0
3	treonina	1,7-15,0	7,0
4	serina	5,0-20,0	9,1
5	valina	2,5-22,5	11,1
6	leucina	2,5-15,0	6,5
7	isoleucina	0,3-5,0	1,1
8	prolina	0,5-17,5	8,7
9	metionina	0,0-0,5	0,3
10	aspártico	2,5-15,0	7,1
11	fenilalanina	1,3-7,5	5,0
12	lisina+tirosina	0,7-7,5	6,8
13	glutámico	7,5-72,5	35,5

La Figura 1B muestra el perfil de aminoácidos urinarios de un paciente de 9 meses hospitalizado por presentar síntomas clínicos típicos de una aminoacidopatía. El considerable incremento de fenilalanina en orina permitió diagnosticar este caso como una fenilcetonuria; el diagnóstico fue corroborado posteriormente midiendo el incremento de fenilalanina en plasma no solo por nuestra técnica, sino también mediante el ensayo clásico establecido en el programa de pesquiasaje masivo de la enfermedad.

El análisis en plasma de un niño altamente sospechoso de padecer una homocistinuria clásica permitió demostrar el esperado incremento de la metionina (32,5 mg %) y corroborar el diagnóstico realizado mediante la técnica convencional de nitroprusiato de plata.

Otro estudio realizado en el plasma de un niño gravemente enfermo que presentaba altas concentraciones plasmáticas de los ácidos láctico y pirúvico, permitió detectar un incremento significativo de alanina. La conjugación de estos datos nos hizo sospechar fuertemente que la enfermedad en cuestión se trataba de una deficiencia del complejo enzimático piruvato deshidrogenasa. Lamentablemente, la muerte repentina del paciente no permitió concluir el estudio.

En el caso de patologías relacionadas con trastornos metabólicos de los aminoácidos cistina (cistinosis), histidina (histidinemia), arginina (deficiencia de la arginilasa) y el triptófano (enfermedad de Hartnup) deberá pensarse en alguna variante de la

técnica utilizada como son: 1) preparación de ésteres metílicos y su posterior transesterificación en butanol/HCl para eliminar problemas de solubilidad, 2) el empleo de anhídrido heptafluorobutírico como agente acilante para eliminar varios posibles derivados del triptófano, 3) el empleo del derivado N²-trifluoroacetil-N¹-carbetoxi-n-butil éster de la histidina, propuesto por Moodie (7) para solucionar el problema de este aminoácido, 4) el empleo del método de Adams (8) para garantizar la elución de la histidina y la arginina.

Otra alternativa interesante es la utilización de los *ter*butil-metilsilil derivados propuestos recientemente por Biermann *et al.* (9) Este método parece ser el preparativamente más sencillo y analíticamente más integral para el análisis por CGL de aminoácidos.

CONCLUSIONES

El método de la cromatografía gaseosa, utilizando los derivados N-trifluoroacetilbutil ésteres, representa una vía alternativa rápida y segura para obtener perfiles satisfactorios de aminoácidos en muestras de orina y plasma. La técnica utilizada presenta, sin embargo, serias dificultades para la detección de cistina, triptófano y los aminoácidos básicos histidina y arginina; el análisis de estos últimos compuestos por CGL requiere de otras formas preparativas de obtención de derivados. Los perfiles cromatográficos de aminoácidos representan, indudablemente, como se demuestra con algunos ejemplos de aplicación, un complemento cualitativo muy valioso de los perfiles de ácidos orgánicos urinarios en el diagnóstico diferencial de aminoacidopatías y acidurias orgánicas.

BIBLIOGRAFIA

1. HUSEK, P. and K.J. MACEK: *Chromatogr.* 113, 139, 1975.
2. ZUWALT, R.W., D. ROACH D. and C.W. GEHRKE: *J. Chromatogr.* 53, 171, 1970.
3. LABADARIOS, D. *et al.*: *J. Chromatogr.* 339, 366, 1985.
4. ———: *J. Chromatogr.* 383, 281, 1986.
5. GALJAARD, H.: *Experientia* 42, 1075, 1986.
6. SCHNEIDER, K. *et al.*: *J. Chromatogr.* 348, 19, 1986.
7. MOODIE, I.M.: *J. Chromatogr.* 99, 495, 1974.
8. ADAMS, R.F.: *J. Chromatogr.* 95, 189, 1974.
9. BIERMANN C.J.: *J. Chromatogr.* 357, 330, 1986.

FOBCOR

LIQUIDO HIDROFOBO

El FOBCOR puede utilizarse después de cualquier proceso de lavado como agente secante y asegura la protección anticorrosiva de la pieza o conjunto por espacio de 30 días.

Cualquier pieza, componente o conjunto metálico, entre etapas del proceso de maquinado puede protegerse de forma segura y sin riesgos para la salud del operario.

Es ideal para la protección a corto plazo de partes interiores de uniones metálicas que deben someterse a operaciones de manipulación y montaje.

Es útil para la eliminación de la humedad en los contactos eléctricos y que es la causante de la existencia de cortocircuitos.

El empleo del FOBCOR como agente secante, sustituye el empleo de grasa a temperatura de 100-120 °C, reduciendo significativamente el gasto de energía eléctrica. Además elimina los riesgos de oxidación del metal por la presencia de los ácidos libres que se forman por el calentamiento de la grasa.

Asegura la protección de la pieza por 30 días.