

Determinación de Aminoácidos en Fluidos Biológicos por Cromatografía Gas-Líquido

R. PINO*, E. COSTA* y J. RODRIGUEZ**

*Escuela de Química y Farmacia, Facultad de Medicina, Universidad de Valparaíso, Casilla 92-V, Valparaíso, Chile

**Escuela de Medicina, Universidad de Valparaíso, Valparaíso, Chile

RESUMEN. El objetivo de este estudio fue desarrollar un método por cromatografía gas-líquido para el análisis de aminoácidos en fluidos biológicos. Las principales etapas del procedimiento experimental fueron aislamiento, derivatización y cuantificación de aminoácidos.

SUMMARY. "Aminoacids Determination in Biological Fluids by GLC". The aim of this study was to develop a gas-liquid chromatographic method for the analysis of aminoacids in biological fluids. This included three main stages: isolation, derivatization and quantitation of aminoacids.

INTRODUCCION

El análisis de aminoácidos puede realizarse por diferentes métodos, tales como químicos, microbiológicos, electroforéticos y cromatográficos, obteniéndose fundamentalmente información cualitativa y semi-cuantitativa. Estos procedimientos son limitados para cuantificar varios aminoácidos simultáneamente. En la actualidad las técnicas de elección son la cromatografía gas-líquido (CGL) y la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), las cuales ofrecen una cuantificación más exacta, adecuada sensibilidad y alta resolución.

La cromatografía gas-líquido presenta numerosas ventajas frente a las técnicas comúnmente empleadas, como son: mayor versatilidad del instrumento, gran exactitud a concentraciones muy bajas y posibilidad de asociarla a la espectrometría de masa para conocer la estructura de metabolitos

no identificados. Una de las mayores desventajas de esta técnica, con respecto a otras, es la necesidad de derivatizar las muestras para transformar los aminoácidos en derivados más volátiles y menos polares, condición necesaria para la separación por cromatografía gaseosa.

En las últimas décadas se han desarrollado varias investigaciones en relación al problema de cromatografía de aminoácidos¹⁻¹³. Los ensayos cuantitativos de aminoácidos han sido desarrollados principalmente convirtiendo a éstos en N-trifluoroacetil-n-butil éster derivados¹⁴⁻¹⁹. Otras investigaciones se han realizado con trimetilsilil derivados²⁰⁻²¹. Actualmente los alquil éster N-heptafluorobutiril derivados se utilizan con mayor frecuencia, ya sea en forma de N-propil^{12, 22-24}, isoamil²²⁻²⁶ o iso-butil ésteres^{1, 27-34}.

PALABRAS CLAVE: Cromatografía gas-líquido; Aminoácidos; Fluidos Biológicos.

KEY WORDS: GLC; Aminoacids; Biological Fluids.

Considerando lo anteriormente expuesto, se podría señalar que la cromatografía es una técnica analítica de gran utilidad para la determinación cuantitativa de aminoácidos en líquidos biológicos (suero, orina, líquido cefalorraquídeo, líquido amniótico).

MATERIALES Y METODOS

Muestras Estándares de Aminoácidos

Solución Estándar de Aminoácidos. Se prepararon soluciones de cada aminoácido en HCl 0,1 N, para obtener una concentración del orden de $10^3 \mu\text{mol/l}$. Se efectuaron mezclas de aminoácidos en HCL 0,01 N, para obtener las concentraciones que se presentan en el cuadro 1.

Aminoácido	Mezcla 1 ($\mu\text{mol/l}$)	Mezcla 2 ($\mu\text{mol/l}$)
Alanina	2.034,0	1.017,0
Glicina	2.061,0	1.030,5
Valina	2.005,0	1.002,5
Treonina	2.102,0	1.051,0
Leucina	2.073,0	1.036,5
Isoleucina	2.064,0	1.032,0
Prolina	2.043,0	1.021,5
Metionina	2.078,0	1.039,0
Ac. Aspártico	2.028,0	1.014,0
Fenilalanina	2.000,0	1.000,0
Ornitina	—	1.437,5
Ac. Glutámico	2.012,0	1.006,0
Lisina	—	1.094,4
Tirosina	2.097,0	1.048,5
Arginina	2.027,0	1.013,5
Histidina	—	1.095,4
Triptófano	—	979,4
Cistina	2.002,0	1.001,0

Cuadro 1. Concentración de aminoácidos en mezclas estándares.

Solución del Estándar Interno. Se prepararon dos soluciones de Norleucina en HCl 0,01 N, cuyas concentraciones fueron $1,014 \mu\text{mol/l}$ y $2,183 \mu\text{mol/l}$.

Muestras Biológicas

Se utilizaron muestras de sangre de una población pediátrica sana de ambos sexos, en un volumen promedio de 3 ml. Inmediatamente formado el coágulo se procedió a su separación, y el suero obtenido se centrifugó a 3.000 rpm durante 10 min. La fracción sérica se removió de las células y se refrigeró hasta ser analizada.

Se recolectaron muestras de orina fresca, las que posteriormente se refrigeraron hasta ser cuantificadas.

Análisis de las Muestras

La preparación de las muestras para el análisis cuantitativo en suero y orina comprendió las siguientes etapas:

- Desproteínización de muestras de suero y orina.
- Preparación de columnas de intercambio iónico (CII) y aislamiento de aminoácidos.
- Derivatización de aminoácidos.
- Cromatografía gaseosa de aminoácidos.

Las muestras biológicas fueron desproteínizadas con ácido sulfosalicílico en una concentración de 50 mg/ml de suero y orina. La solución se agitó y se procedió a centrifugar durante 10 min a 3.000 rpm. Al sobrenadante se le adicionó el estándar interno Norleucina y se procedió a aislar los aminoácidos a través de una resina de intercambio catiónico (Dowex 50 X8-100). El eluato se recibió en microviales de 3 ml, se esterificó el grupo carboxilo con una mezcla isobutanol-HCL 3,2 N y luego se aciló el grupo amino con una mezcla cloruro de metileno-anhidro heptafluorbutírico (HFBA).

Los N (O, S) - HFB isobutil ésteres de aminoácidos se disolvieron en acetato de etilo y mediante una microjeringa (Hamilton 701 N) se inyectaron en un cromatógrafo (Shimadzu GC-8APF), equipado con

doble detector de ionización de llama, doble puerta de inyección, horno con doble columna (columna de vidrio de 3 m x 2,6 mm de diámetro interno rellena con SE-30 sobre Chrom W HP 80/100 mesh), programador de temperatura, registrador e integrador (Chromatopac C-R1B).

Cálculos

El cálculo de la concentración de cada aminoácido perteneciente a una muestra problema se realizó de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$AA = \frac{(\text{Area AA}p / \text{Area SI}p) \times \text{Area SI}st \times \mu\text{mol AA}st}{\text{RMR} \times \text{Area AA}st \times V_i}$$

RMR corresponde a la respuesta molar relativa de determinado aminoácido, definida por:

$$\text{RMR} = \frac{\text{Area AA}st / \mu\text{mol AA}st}{\text{Area SI}st / \mu\text{mol SI}st}$$

AAp: Aminoácido en muestra problema

SIp: Estándar interno en muestra problema

SIst: Estándar interno en mezcla patrón

AAst: Aminoácido en mezcla patrón

Vi: Volumen de muestra antes del intercambio iónico

Análisis Estadístico de los Datos

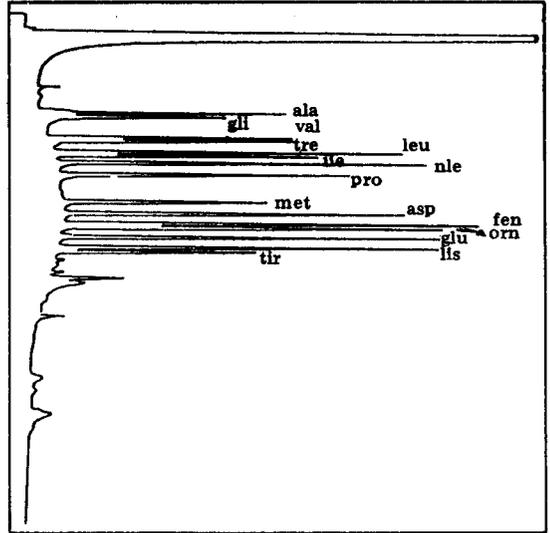
La información fue procesada en un computador IBM-4361, a través del sistema MINITAB-UC³⁵.

Para determinar la existencia de diferencias significativas entre las variables se utilizó el sistema STATPACK³⁶, mediante un microcomputador Olivetti M-19.

RESULTADOS Y DISCUSION

Separación de Mezcla Estándar

El análisis por cromatografía gas-líquido de los N (O, S) - HFB - isobutil ésteres de aminoácidos se desarrolló durante 25 minutos a través de una columna al 3% SE-30,



nle: norleucina (estándar interno)

ala: alanina

met: metionina

gli: glicina

asp: ác. aspártico

val: valina

fen: fenilalanina

tre: treonina

orn: ornitina

leu: leucina

glu: ac. glutámico

ile: isoleucina

lis: lisina

pro: prolina

tir: tirosina

Figura 1. Separación cromatográfica de los N (O, S) -HFB isobutil ésteres de aminoácidos en estudio. Columna rellena 3% SE-30 (mezcla estándar de aminoácidos).

con una temperatura programada entre 100 °C y 240 °C. Los picos lograron una adecuada separación y se caracterizaron por ser simétricos. Las áreas se obtuvieron directamente a través del integrador Chromatopac C-R1B. La figura 1 registra la separación cromatográfica de los 14 aminoácidos en estudio y el estándar interno Norleucina, para una mezcla que cumplió todas las etapas del análisis cuantitativo (CII, derivatización y CGL).

Identificación de Picos en Mezclas Estándares

La identificación preliminar de cada pico se realizó derivatizando individualmente cada uno de los aminoácidos. Se determina

Aminoácidos	Casos Válidos	Tiempo de Retención				
		Mínimo	Máximo	Promedio	Desv. Est.	Error Est.
Alanina	22	9,21	9,93	9,60	0,162	0,034
Glicina	23	9,55	10,35	9,94	0,191	0,040
Valina	23	11,52	12,24	11,90	0,174	0,036
Treonina	20	11,75	12,49	12,12	0,180	0,040
Leucina	23	12,91	13,61	13,29	0,174	0,036
Isoleucina	23	13,19	13,88	13,57	0,173	0,036
Prolina	23	15,07	15,79	15,45	0,179	0,037
Metionina	23	17,76	18,44	18,12	0,174	0,036
Ac. aspártico	23	18,85	19,50	19,19	0,169	0,035
Fenilalanina	23	19,84	20,48	20,17	0,170	0,035
Ornitina	15	20,26	20,81	20,53	0,137	0,035
Ac. Glutámico	23	21,17	21,78	21,49	0,165	0,034
Lisina	16	22,15	22,81	22,51	0,164	0,041
Tirosina	19	22,50	23,13	22,81	0,184	0,042

Tabla 1. Tiempos de retención (en min.) de una mezcla estándar de aminoácidos, sobre 3% SE - 30 (23 muestras)

Aminoácido

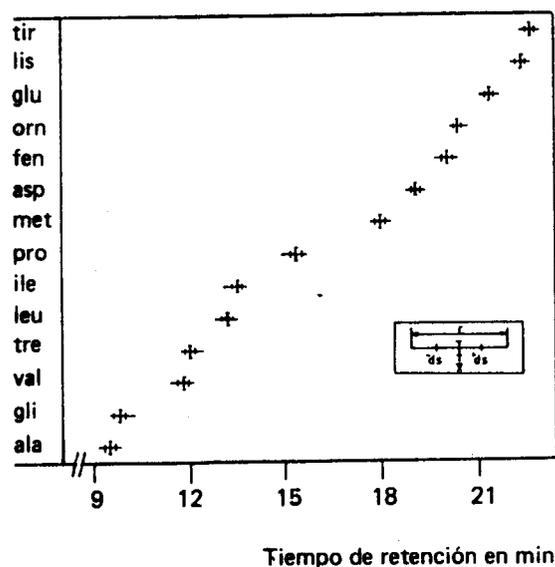


Figura 2. Tiempos de retención (en min) de una mezcla estándar de aminoácidos. Columna rellena al 3% SE-30.

ron sus tiempos de retención, los cuales se emplearon para identificar los picos en diferentes mezclas de aminoácidos. El orden de elución de los aminoácidos concuerda con lo reportado en la literatura^{32, 33} y fue el siguiente: Alanina, Glicina, Valina, Treonina, Leucina, Isoleucina, Prolina, Hidroxiprolina, Metionina, Acido aspártico, 3,4 Dihidroxi-fenilalanina, Fenilalanina, Ornitina, Acido glutámico, Lisina y Tirosina. Los tiempos de retención promedio para los 14 aminoácidos fluctuaron entre 9,60 min (Alanina) y 22,81 min (Tirosina).

La Tabla 1 consigna los tiempos de retención promedio para los N (O, S) - HFB isobutil ésteres de aminoácidos de 23 mezclas que cumplieron todas las etapas de análisis cuantitativo. Las variaciones presentadas en el número de casos considerados para el análisis estadístico se debieron a la ausencia de Ornitina, Lisina, Histidina y Triptofano en las primeras mezclas.

La fig. 2 presenta los tiempos de retención para los 14 aminoácidos identificados, con sus correspondientes promedios, rangos y desviaciones estándares. En general, los derivados de los aminoácidos mostraron un comportamiento homogéneo; las fluctuaciones se atribuyen a las condiciones instrumentales.

Respuesta Molar Relativa

La respuesta molar relativa para cada aminoácido se calculó empleando Norleucina como estándar interno, la cual se resolvió adecuadamente entre los picos de Isoleucina y Prolina.

En la Tabla 2 se entregan las medidas descriptivas para la respuesta molar relativa de los 14 aminoácidos, pertenecientes a 18 mezclas estándares. Estas mezclas fueron sometidas a cromatografía de intercambio

iónico, con el fin de ser tratadas en igual forma que las muestras biológicas. Se observa que el N-HFB isobutil éster de Valina presenta la menor respuesta molar y el N-HFB isobutil éster del Acido glutámico la mayor.

Identificación de Picos en Muestras Biológicas

La identificación preliminar de los picos cromatográficos en suero y orina se realizó por co-inyección de muestras biológicas con determinados derivados de aminoácidos y por comparación con los tiempos de retención correspondientes a mezclas estándares. Estos últimos se utilizaron para identificar cada aminoácido en suero y orina. Las Tablas 1, 3 y 4 presentan los promedios, rangos y desviaciones estándares para los 14 aminoácidos.

Aminoácidos	Casos Válidos	Respuesta Molar Relativa				
		Mínima	Máxima	Promedio	Desv. Est.	Error Est.
Alanina	18	0,345	0,816	0,577	0,152	0,036
Glicina	18	0,434	0,799	0,614	0,110	0,026
Valina	18	0,215	0,890	0,526	0,168	0,040
Treonina	15	0,439	0,916	0,648	0,155	0,040
Leucina	18	0,535	1,103	0,790	0,155	0,036
Isoleucina	18	0,462	1,144	0,720	0,176	0,041
Prolina	18	0,769	1,523	1,013	0,191	0,045
Metionina	18	0,466	1,208	0,792	0,229	0,054
Ac. aspártico	18	0,662	1,652	1,121	0,286	0,067
Fenilalanina	18	0,814	1,665	1,169	0,236	0,056
Ornitina	15	0,614	1,357	0,950	0,242	0,062
Ac. glutámico	18	0,828	1,949	1,333	0,358	0,084
Lisina	15	0,764	1,901	1,128	0,303	0,078
Tirosina	14	0,152	1,216	0,684	0,352	0,094

Tabla 2. Respuesta Molar Relativa de los aminoácidos respecto a la norleucina, sobre 3% SE - 30 (18 muestras)

Aminoácidos	Casos Válidos	Tiempo de Retención				
		Mínimo	Máximo	Promedio	Desv. Est.	Error Est.
Alanina	49	9,21	9,78	9,59	0,142	0,020
Glicina	50	9,49	10,39	9,91	0,156	0,022
Valina	15	11,85	12,11	11,97	0,070	0,018
Treonina	49	11,73	12,34	12,14	0,153	0,022
Leucina	39	12,89	13,51	13,31	0,159	0,025
Isoleucina	28	13,18	13,79	13,58	0,169	0,032
Prolina	46	15,06	15,78	15,52	0,174	0,026
Metionina	4	17,95	18,39	18,12	0,208	0,104
Ac. aspártico	50	18,74	19,56	19,20	0,163	0,023
Fenilalanina	48	19,71	20,38	20,15	0,156	0,023
Ornitina	44	19,94	20,75	20,42	0,171	0,026
Ac. glutámico	50	21,04	21,79	21,49	0,150	0,021
Lisina	49	21,81	22,92	22,43	0,201	0,029
Tirosina	10	22,73	23,10	22,91	0,106	0,034

Tabla 3. Tiempos de retención (en min) de aminoácidos en muestras de orina, sobre 3% SE - 30 (50 muestras)

Aminoácidos	Casos Válidos	Tiempo de Retención				
		Mínimo	Máximo	Promedio	Desv. Est.	Error Est.
Alanina	45	9,41	9,87	9,66	0,107	0,016
Glicina	45	9,79	10,55	10,10	0,160	0,024
Valina	41	11,72	12,11	11,97	0,098	0,015
Treonina	28	11,96	12,39	12,22	0,102	0,019
Leucina	44	13,10	13,50	13,36	0,102	0,015
Isoleucina	43	13,38	13,79	13,63	0,102	0,016
Prolina	44	15,26	15,81	15,55	0,126	0,019
Metionina	11	17,95	18,33	18,16	0,147	0,044
Ac. aspártico	45	19,01	19,54	19,29	0,122	0,018
Fenilalanina	45	19,96	20,58	20,25	0,132	0,020
Ornitina	45	20,21	20,83	20,53	0,131	0,020
Ac. glutámico	45	21,28	21,71	21,54	0,115	0,017
Lisina	45	22,23	22,75	22,52	0,120	0,018
Tirosina	20	22,64	23,03	22,88	0,130	0,029

Tabla 4. Tiempos de retención (en min) de aminoácidos en muestras de suero, sobre 3% SE - 30 (45 muestras)

Para lograr una mayor uniformidad en la identificación de los picos se determinó el Tiempo de Retención Relativo a Norleucina (TRR) para cada aminoácido presente en la mezcla estándar, y éstos se compararon con los correspondientes a suero y orina. Los datos se presentan, según orden de elución, en las Tablas 5 a 7.

La presencia eventual de diferencias significativas entre los tiempos de retención de mezclas estándares y muestras biológicas se determinó a través de la prueba no paramétrica de rangos con signos de Wilcoxon para datos pareados³⁷, la cual indicó que los tiempos de retención de mezclas estándares eran estadísticamente iguales a los de orina ($p_{\text{value}} = 1$), no así a los de suero ($p_{\text{value}} = 0$). Esta diferencia se atribuye a las condiciones instrumentales y a la complejidad de la matriz biológica. De igual forma se aplicó esta prueba a los TRR de cada aminoácido, entre mezclas

estándares y muestras biológicas, indicando que eran estadísticamente iguales a orina ($p_{\text{value}} = 0,454$) y suero ($p_{\text{value}} = 0,190$).

Determinación de Aminoácidos en Suero y Orina

Con el fin de interpretar adecuadamente los datos cromatográficos en muestras problemas, se determinaron los promedios y rangos para las concentraciones de cada aminoácido ($\mu\text{mol/l}$) en suero y orina, en una población de 95 niños sanos sin signos de alteración metabólica, cuyas edades fluctuaron entre recién nacidos y 6 años (RN-6a).

Análisis de Aminoácidos en Suero de Niños Sanos

Se determinó el valor promedio de la concentración ($\mu\text{mol/l}$), para cada aminoácido en 45 niños sanos. La Tabla 8 presenta los promedios, rangos y desviaciones estándar.

Aminoácidos	Casos Válidos	Respuesta del Tiempo Relativa				Error Est.
		Mínima	Máxima	Promedio	Desv. Est.	
Alanina	22	0,662	0,680	0,672	$3,9 \times 10^{-3}$	$8,4 \times 10^{-3}$
Glicina	23	0,684	0,709	0,696	$6,7 \times 10^{-3}$	$1,4 \times 10^{-3}$
Valina	23	0,829	0,838	0,833	$2,1 \times 10^{-3}$	$4,3 \times 10^{-4}$
Treonina	20	0,845	0,855	0,849	$2,5 \times 10^{-3}$	$5,6 \times 10^{-4}$
Leucina	23	0,929	0,932	0,931	$8,2 \times 10^{-4}$	$1,7 \times 10^{-4}$
Isoleucina	23	0,949	0,951	0,950	$5,6 \times 10^{-4}$	$1,2 \times 10^{-4}$
Prolina	23	1,079	1,084	1,082	$1,1 \times 10^{-3}$	$2,3 \times 10^{-4}$
Metionina	23	1,263	1,278	1,269	$3,7 \times 10^{-3}$	$7,6 \times 10^{-4}$
Ac. aspártico	23	1,336	1,357	1,344	$5,2 \times 10^{-3}$	$1,1 \times 10^{-3}$
Fenilalanina	23	1,403	1,427	1,412	$6,1 \times 10^{-3}$	$1,3 \times 10^{-3}$
Ornitina	15	1,400	1,444	1,430	$9,6 \times 10^{-3}$	$2,5 \times 10^{-3}$
Ac. glutámico	23	1,492	1,523	1,505	$7,6 \times 10^{-3}$	$1,6 \times 10^{-3}$
Lisina	16	1,562	1,594	1,574	$7,9 \times 10^{-3}$	$2,0 \times 10^{-3}$
Tirosina	19	1,578	1,623	1,599	$1,2 \times 10^{-2}$	$2,6 \times 10^{-3}$

Tabla 5. Respuesta del tiempo de los aminoácidos relativo a la Norleucina, en mezclas estándares sobre 3% SE - 30 (23 muestras).

Aminoácidos	Casos Válidos	Respuesta del Tiempo Relativa				Error Est.
		Mínima	Máxima	Promedio	Desv. Est.	
Alanina	49	0,663	0,676	0,671	$3,4 \times 10^{-3}$	$4,9 \times 10^{-4}$
Glicina	50	0,668	0,719	0,693	$6,4 \times 10^{-3}$	$9,0 \times 10^{-4}$
Valina	15	0,832	0,836	0,834	$1,4 \times 10^{-3}$	$3,5 \times 10^{-4}$
Treonina	49	0,843	0,858	0,850	$3,3 \times 10^{-3}$	$4,6 \times 10^{-4}$
Leucina	39	0,928	0,935	0,931	$1,9 \times 10^{-3}$	$3,1 \times 10^{-4}$
Isoleucina	28	0,947	0,954	0,950	$1,4 \times 10^{-3}$	$2,7 \times 10^{-4}$
Prolina	46	1,081	1,094	1,086	$3,0 \times 10^{-3}$	$4,5 \times 10^{-4}$
Metionina	4	1,268	1,279	1,272	$5,0 \times 10^{-3}$	$2,5 \times 10^{-4}$
Ac. aspártico	50	1,339	1,353	1,344	$4,0 \times 10^{-3}$	$5,7 \times 10^{-4}$
Fenilalanina	48	1,404	1,420	1,410	$4,0 \times 10^{-3}$	$5,8 \times 10^{-4}$
Ornitina	44	1,419	1,444	1,429	$5,9 \times 10^{-3}$	$8,9 \times 10^{-4}$
Ac. glutámico	50	1,496	1,521	1,504	$6,4 \times 10^{-3}$	$9,0 \times 10^{-4}$
Lisina	49	1,561	1,594	1,571	$7,6 \times 10^{-3}$	$1,1 \times 10^{-3}$
Tirosina	10	1,588	1,615	1,595	$7,4 \times 10^{-3}$	$2,3 \times 10^{-3}$

Tabla 6. Respuesta del Tiempo de los Aminoácidos Relativo a la Norleucina, en muestras de orina sobre 3% SE - 30 (50 muestras)

Aminoácidos	Casos Válidos	Respuesta del Tiempo Relativa				Error Est.
		Mínima	Máxima	Promedio	Desv. Est.	
Alanina	4	0,667	0,684	0,674	$3,9 \times 10^{-3}$	$5,8 \times 10^{-4}$
Glicina	45	0,692	0,733	0,704	$8,7 \times 10^{-3}$	$1,3 \times 10^{-4}$
Valina	41	0,831	0,842	0,835	$1,8 \times 10^{-3}$	$2,9 \times 10^{-4}$
Treonina	28	0,848	0,858	0,852	$2,7 \times 10^{-3}$	$5,2 \times 10^{-4}$
Leucina	44	0,929	0,935	0,932	$1,5 \times 10^{-3}$	$2,2 \times 10^{-4}$
Isoleucina	43	0,949	0,954	0,951	$1,0 \times 10^{-3}$	$1,5 \times 10^{-4}$
Prolina	44	1,081	1,099	1,084	$3,5 \times 10^{-3}$	$5,3 \times 10^{-4}$
Metionina	11	1,269	1,277	1,272	$3,0 \times 10^{-3}$	$8,9 \times 10^{-4}$
Ac. aspártico	45	1,339	1,358	1,345	$4,1 \times 10^{-3}$	$6,2 \times 10^{-4}$
Fenilalanina	45	1,407	1,422	1,412	$3,5 \times 10^{-3}$	$5,2 \times 10^{-4}$
Ornitina	45	1,422	1,448	1,432	$5,8 \times 10^{-3}$	$8,6 \times 10^{-4}$
Ac. glutámico	45	1,496	1,514	1,502	$3,3 \times 10^{-3}$	$4,9 \times 10^{-4}$
Lisina	45	1,563	1,582	1,571	$5,1 \times 10^{-3}$	$7,6 \times 10^{-4}$
Tirosina	20	1,592	1,608	1,597	$5,2 \times 10^{-3}$	$1,2 \times 10^{-3}$

Tabla 7. Respuesta del Tiempo de los Aminoácidos Relativo a la Norleucina, en muestras de suero sobre 3% SE - 30 (45 muestras).

Aminoácidos	Casos Válidos	Concentración			Desv. Est.	Error Est.
		Mínima	Máxima	Promedio		
Alanina	44	158	1.237	593,8	247,3	37,3
Glicina	45	198	984	513,8	185,5	27,6
Valina	44	tz	946	422,3	241,7	36,4
Treonina	33	tz	314	127,5	80,8	14,1
Leucina	45	tz	376	192,3	80,8	12,0
Isoleucina	43	19	399	149,7	92,3	14,1
Prolina	44	104	825	405,6	186,6	28,1
Metionina	11	91	517	222,0	119,5	36,0
Ac. aspártico	45	66	1.018	402,3	225,5	33,6
Fenilalanina	45	50	587	232,8	122,7	18,3
Ornitina	44	8	1.808	467,3	413,5	62,3
Ac. glutámico	45	283	1.246	600,0	250,4	37,3
Lisina	45	29	963	474,0	235,4	35,1
Tirosina	25	tz	1.424	539,2	422,5	84,5

tz: Cantidades trazas de Aminoácidos

Tabla 8. Concentraciones en suero ($\mu\text{mol/l}$) según aminoácido, para el total de niños sanos en estudio (45 niños: desde recién nacidos a 6 años)

dares para cada aminoácido. Las concentraciones de Acido glutámico y Acido aspártico incluyen Glutamina y Asparagina, respectivamente. La Figura 3 presenta el cromatograma sérico normal.

Para la determinación de aminoácidos en suero, se consideraron posibles fuentes de error en la interpretación cuantitativa de datos los señalados en el cuadro 2.

Análisis de Aminoácidos en Orina de Niños Sanos

Se determinó la concentración promedio y rango ($\mu\text{mol/l}$), para cada uno de los aminoácidos presentes en orina de 50 niños sanos. La Tabla 9 reúne los datos del análisis estadístico y, al igual que en suero, los valores de Acido glutámico y Acido aspártico incluyen sus respectivas amidas. La Figura 4 registra el cromatograma urinario normal.

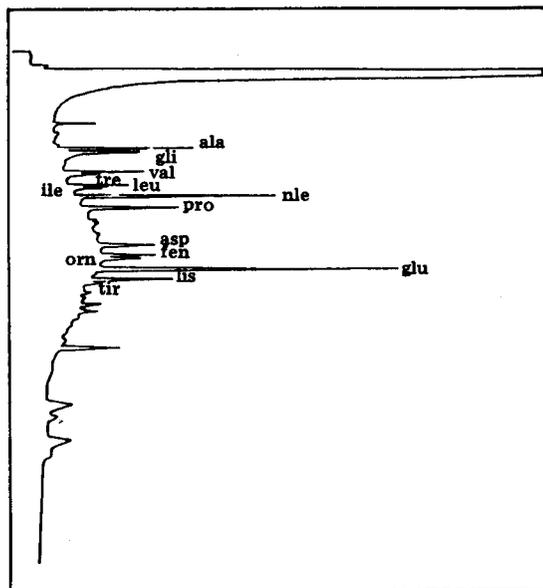


Figura 3. Cromatograma de los N(O,S)-HFB-iso-butil ésteres de aminoácidos en una muestra de suero normal. Columna rellena 3% SE - 30.

Procedimiento	Efecto sobre el Aminoácido	
	Disminuye la concentración	Aumenta la concentración
Venipuncturas repetidas sobre suero	Ac. glutámico	—
Coagulación del suero a temperatura ambiente	Glutamina, Aspargina	Ac. aspártico, Ac. glutámico
Retraso en la desproteínización de la muestra	Cistina Mezclas de disulfuros	—
Contaminación con plaquetas y hematíes	—	Ac. aspártico, Ac. glutámico
Glóbulos blancos y hemólisis	Arginina, Cistina	Ornitina

Cuadro 2. Factores que afectan el contenido de Aminoácidos en plasma y suero ³⁸

Aminoácidos	Casos Válidos	Concentración			Desv. Est.	Error Est.
		Mínima	Máxima	Promedio		
Alanina	49	tz	934	282,0	204,1	29,2
Glicina	49	275	4.089	1.172,0	1.020,0	145,7
Valina	18	tz	186	68,7	55,2	13,0
Treonina	42	22	686	247,5	182,1	28,1
Leucina	45	tz	211	67,3	56,6	8,4
Isoleucina	35	tz	159	50,2	39,5	6,7
Prolina	49	tz	345	97,8	70,4	10,0
Metionina	4	38	190	110,5	68,1	34,0
Ac. aspártico	49	20	551	212,5	134,1	19,2
Fenilalanina	49	tz	220	85,9	61,9	8,8
Ornitina	48	tz	396	107,0	91,5	13,2
Ac. glutámico	50	21	888	261,7	178,3	15,2
Lisina	49	tz	826	235,8	183,6	26,2
Tirosina	12	tz	418	123,8	145,6	42,0

tz: Cantidades trazas de Aminoácidos

Tabla 9. Concentraciones en orina ($\mu\text{mol/l}$) según Aminoácido, para el total de niños sanos en estudio (50 niños: desde recién nacidos a 6 años)

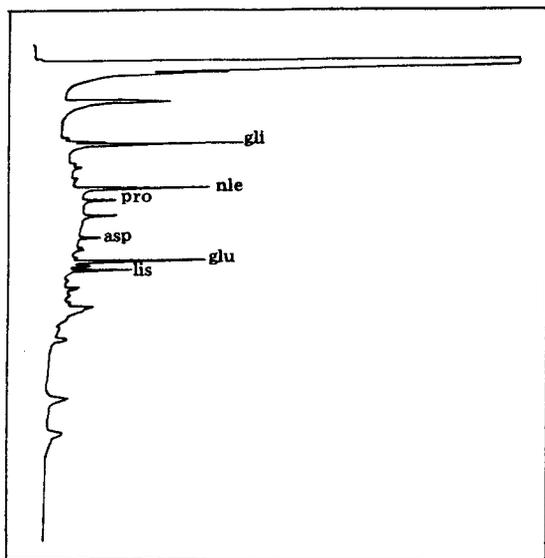


Figura 4. Cromatograma de los N (O, S)-HFB-Iso-butil ésteres de Aminoácidos en una muestra de orina normal. Columna rellena 3% SE - 30.

En la interpretación de cromatogramas urinarios se tuvieron presentes los siguientes factores:

- Presencia de enzimas liberadas desde tejido renal dañado, ya que por hidrólisis de péptidos y proteínas se pueden incrementar los aminoácidos libres ³⁸.
- Contaminación con bacterias. Se ha demostrado que la presencia de microorganismos que contienen hipuricasa desdoblan el ácido hipúrico en ácido benzoico y glicina, elevando el nivel de esta última por encima de los valores normales en orina ³⁹.
- Procesos metabólicos no relacionados con alguna aminoacidopatía primaria, tales como estado nutricional, variaciones circadianas e infección. Existen gran-

des diferencias en los patrones cromatográficos en orina de sujetos sanos, principalmente por los hábitos alimenticios ³⁸.

Por otra parte, existen variaciones naturales en las concentraciones de los aminoácidos en orina según los grupos ⁴⁰.

Conclusiones

- Los derivados de Cisteína, Cistina, Arginina, Histidina y Triptofano presentaron baja reproducibilidad, lo cual se atribuye al tratamiento de las muestras antes del análisis cromatográfico.
- La columna cromatográfica empleada presentó una adecuada resolución de los derivados de aminoácidos durante 4 meses.
- La mayoría de los derivados de aminoácidos en estudio fueron estables a temperatura ambiente durante dos semanas, a excepción de Metionina y Tirosina, que disminuyeron significativamente sus respuestas molares.
- El tiempo de retención relativo a Norleucina para cada uno de los aminoácidos demostró ser de mayor utilidad en la identificación de picos en muestras biológicas.
- Para la interpretación de cromatogramas en muestras biológicas es importante tener presente factores como contaminación, hemólisis, tratamiento farmacológico, variaciones circadianas, estado nutricional, infección y otras patologías.
- La técnica analítica descrita sería una alternativa eficiente para detectar aminoacidopatías u otro error congénito del metabolismo.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Desgres, J., D. Boisson y P. Padie (1979) *J. Chromatogr.* 162: 133-52
- Gehrke, Ch., K. Kuo y R. Zumwalt (1971) *J. Chromatogr.* 57: 209-17
- Moss, C.W., M.A. Lambert y F. Díaz (1971) *J. Chromatogr.* 60: 134-6
- Casagrande, D. (1970) *J. Chromatogr.* 49: 537-40

5. Zumwalt, R., K. Kuo y Ch. Gehrke (1971) *J. Chromatogr.* 55: 267-80
6. Roach, D., y H. Ghrke (1969) *J. Chromatogr.* 43: 303-10
7. Husek, P. y K. Macek (1975) *J. Chromatogr.* 133: 139-230
8. Labadarios, D., I.M. Moadie y G.S. Shephard (1984) *J. Chromatogr.* 310: 223-31
9. Makita, M., S. Yamamoto y S. Kiyama (1982) *J. Chromatogr.* 237: 279-84
10. Gehrke, Ch. y H. Takeda (1973) *J. Chromatogr.* 76: 63-75
11. Cliffe, A.L., N.J. Berridge y D.R. Westgarth (1973) *J. Chromatogr.* 78: 333-41
12. Jonsson, J., J. Eyem y J. Sjoquist (1973) *Anal. Biochem.* 51: 204-19
13. Bengtsson, G. y G. Odham (1979) *Anal. Biochem.* 92: 426-43
14. Roach, D. y Ch. Gehrke (1969) *J. Chromatogr.* 44: 269-78
15. Gehrke, Ch. y F. Shahrokhi (1966) *J. Chromatogr.* 15: 97-108
16. Lamkin, W. y Ch. Gehrke (1965) *Anal. Chem.* 37: 383-9
17. Cancalon, P. y J. Klingman (1974) *J. Chromatogr. Sci.* 12: 349-55
18. Zonzely, C., G. Marco y E. Emery (1962) *Anal. Chem.* 34: 1414-7
19. Gamerith, G. (1983) *J. Chromatogr.* 256: 267-81
20. Gerhke, Ch., H. Nakamoto y R. Zumwalt (1969) *J. Chromatogr.* 45: 24-51
21. Gerhke, Ch. y K. Leimer (1971) *J. Chromatogr.* 57: 219-38
22. Kirkman, M. (1974) *J. Chromatogr.* 97: 175-91
23. Moss, C.W. y A.M. Lambert (1974) *Anal. Biochem.* 59: 259-62
24. March, J.F. (1975) *Anal. Biochem.* 69: 420-42
25. Zanetta, H.P. y G. Vicedon (1973) *J. Chromatogr.* 76: 91-9
26. Felker, P. y R. Banduski (1975) *Anal. Biochem.* 67: 245-62
27. Siezen, R.J. y T.H. Mague (1977) *J. Chromatogr.* 130: 151-60
28. Mackenzie, S.L. y L.R. Hodge (1977) *J. Chromatogr.* 132: 485-93
29. Mackenzie, S.L. y D. Tenaschuk (1975) *J. Chromatogr.* 104: 176-7
30. Mackenzie, S.L. y D. Tenaschuk (1974) *J. Chromatogr.* 97: 19-24
31. Felker, P. (1978) *J. Chromatogr.* 153: 259-62
32. Mackenzie, S.L. y D. Tenaschuk (1979) *J. Chromatogr.* 173: 53-63
33. Mackenzie, S.L. y D. Tenaschuk (1979) *J. Chromatogr.* 171: 195-208
34. Modie, I.M. (1981) *J. Chromatogr.* 208: 60-6
35. Rodríguez, G. (1986) "Computación estadística interactiva: El sistema MINITAB-UC" Depto. Estadística, Facultad de Matemáticas, Pontificia Universidad Católica de Chile
36. NWA STATPACK (1984) en "Multifunción statistics library" Northwest Analytical, Inc. Portland, Oregon
37. Hollander, M. y D. Wolfe (1973) "Nonparametric statistical methods", John Wiley & Sons, New York
38. Scriver, C.R. y L.E. Rosenberg (1979) "Metabolismo de los aminoácidos y sus trastornos" Ed. Científico-Médica, Barcelona
39. Halpern, B., N.E. Pereira, M.D. Solomon y E. Steed (1971) *Anal. Biochem.* 39: 156-61
40. Rodríguez, J., R. Pino y E. Costa (1987) *Rev. Chil. Pediatr.* 58: 436-41