

## DETECCION DE AMINOACIDURIAS POR CROMATOGRAFIA EN CAPA DELGADA MONODIMENSIONAL

María C. PÉREZ SCHMIT<sup>(1)</sup>; María del C. SARNO<sup>(1)</sup> y Mario R. DELFINO<sup>(1)</sup>

**ABSTRACT:** A simple and quick method that allows to detect in clinic analysis laboratory the presence of pathological concentrations of aminoacids in urine is developed. A step of solid phase extraction that cleans potential interferences in the sample is incorporated. The concentrate is submitted to ulterior monodimensional thin layer chromatography with silica gel as adsorbent and ninhydrin as revealing reactive.  $R_f$  values of the different aminoacid fractions are determined and the obtained chromatographic profiles are compared against reference pool urines. Good performance extraction, acceptable resolution and repetibility reached in TLC lead to aplicate the proposed method to rutine clinical diagnosis.

**RESUMEN:** Se desarrolla un método que permite detectar con rapidez, y en forma sencilla en el laboratorio de análisis clínico, la presencia de aminoácidos en concentraciones patológicas en orina. Se incorpora una etapa de extracción en fase sólida (EFS) que limpia la muestra de potenciales interferentes y se somete al concentrado a una etapa ulterior de Cromatografía en Capa Delgada (CCD) monodimensional. Se utiliza silicagel como adsorbente y ninhidrina como revelador. Se determinan los  $R_f$  de las distintas fracciones de aminoácidos y se compara el perfil obtenido con el de muestras de referencia. La eficiencia de la extracción, la aceptable resolución y la repetibilidad alcanzada en la CCD contribuyen a la utilidad del método propuesto en el diagnóstico clínico de rutina.

**Plabras claves:** aminoácidos, orina, cromatografía, extracción

**Key words:** aminoacids, urine, chromatography, extraction.

### INTRODUCCIÓN

El diagnóstico de las hiperaminoacidurias adquiere relevancia en el tratamiento de niños recién nacidos o prematuros, cuyos trastornos clínicos pasan desapercibidos debido a su escaso desarrollo neurológico. Los errores congénitos del metabolismo de los aminoácidos dan lugar a secuelas graves, entre las que pueden incluirse el retraso mental y la muerte (Davidsohn, 1980).

La medición de nitrógeno total de los  $\alpha$ - aminoácidos tiene poco valor en los estudios metabólicos.

Varias técnicas analíticas se han implementado con el fin de dilucidar las distintas vías metabólicas de los aminoácidos, posibilitando la caracterización de diversas lesiones bioquímicas (Henry, 1980). Estas incluyen: cromatografía en placa delgada bidimensional, cromatografía ga-

seosa acoplada a espectrometría de masas, electroforesis de alto voltaje, electrocromatografía en capa delgada y cromatografía líquida de alta presión en fase reversa previa derivatización (Perham, 1986).

La mayoría de estos métodos no son adaptables a la rutina de un laboratorio clínico, ya sea por el elevado costo de la instrumentación requerida, por la imposibilidad de tratar varias muestras en simultáneo o bien porque requieren habilidad en la interpretación de los resultados.

---

(1) Facultad de Ciencias Exactas y Naturales y Agrimensura, Universidad Nacional del Nordeste (UNNE) - Av. Libertad 5470 (3400) Corrientes. Argentina. E-mail: mdelfino@exa.unne.edu.ar

En varias actualizaciones se han discutido los principios y técnicas de la cromatografía en lechos abiertos, que aún se emplean para la detección de errores congénitos del metabolismo. Una de las más usadas es la cromatografía unidimensional para la detección de fenilalanina y tirosina en suero; el color de las manchas coloreadas con ninhidrina se compara con estándares que han sido corridos simultáneamente (Stahl, 1990). Para la detección de distintos aminoácidos específicos se recurren a otros reveladores; por ejemplo, el reactivo de Erlich (p-dimetilaminobenzaldehído) es usado para identificar hidroxiprolina y citrulina y el reactivo de Pauly (ácido sulfanílico) para detectar histidina (Holme, 1987). La cromatografía bidimensional resulta un enfoque útil para las detecciones en gran escala, aunque conforma un procedimiento engorroso para ser empleado en forma cuantitativa (Pesce, 1990).

Por su parte, la cromatografía de intercambio catiónico conforma una metodología confiable cuando es realizada en analizadores totalmente automatizados (Walton, 1978). Como intercambiadores iónicos se usan resinas de poliestireno sulfonado, denominadas comercialmente Dowex 50 y los procedimientos más comunes para la determinación cuantitativa emplean ninhidrina a la salida de la columna, que permite la colorimetría a 570 ó 440 nm, así como también o-ftaldehído para producir complejos fluorescentes (excitación a 340 nm y emisión a 455 nm). Las ventajas características se resumen en la facilidad de la preparación de la muestra, excelente resolución y buena precisión, aunque no son apropiados para estudios discriminatorios masivos porque insumen 4 a 6 hs por muestra y por el elevado costo y complejidad del autoanalizador.

En base a lo expuesto, el objetivo de este trabajo es diseñar una técnica que ofrezca una combinación equilibrada de rapidez, sensibilidad y especificidad, necesarias para la detección de aminoácidos en concentraciones patológicas en orina, factible de ser desarrollada en un laboratorio clínico de mediana complejidad. Para ello, se recurre a la combinación de la EFS para limpiar la muestra de potenciales interferentes, a la vez de preconcentrarla, y la CCD monodimensional.

## EXPERIMENTAL

### **Materiales**

*Muestras:* orina 24 h, refrigerada y acidificada con 1 mL de HCl 6 M.

*Cartuchos de extracción en fase sólida (EFS):* Se utilizan columnas de intercambio catiónico fuerte Adsorbex SCX (benceno-sulfonilpropil) 400 mg, marca Merck, catálogo 19486.

*Solventes para EFS*

- (A) HCl 2M
- (B) Agua grado HPLC
- (C) NaOH 2M

*Solventes para CCD*

- (D) n-butanol: acetona, (1:1 v/v)
- (E) Acido acético glacial: agua, (1:2 v/v)

*Placas de Silicagel:* Se emplean cromatofolios Al de Silicagel 60 Merck (20x20 cm), catálogo 440002858.

*Reactivo Revelador:* Se disuelven 7,0 g de ninhidrina en 50 mL de solvente D. Estable durante un máximo de 3 meses refrigerado.

*Estándares de aminoácidos:* Se prepararon soluciones de trabajo de los siguientes aminoácidos marca Sigma: cistina, lisina, histidina, glutamina, arginina, glicina, ácido glutámico, alanina, valina, tirosina, fenilalanina, leucina e isoleucina.

*Conjunto mezcla de orinas:* mezcla de 10 orinas normales acidificadas, para control de comparaciones cuantitativas. Esta mezcla se fracciona y congela. Cada alícuota se descongela y se mezcla previo a su uso.

### **Procedimiento**

*Limpieza/Preconcentración en Fase Sólida*

Para el acondicionamiento de la columna EFS se dejan pasar dos volúmenes de columna de solución A, obteniéndose la forma protonada del relleno, eliminándose el exceso de protones con 5 mL de solución B. Luego, se pasan 25 mL de la orina acidificada, produciéndose la retención de los aminoácidos libres. La etapa de limpieza se realiza con 0,5 mL de B. La elución de los aminoácidos retenidos se efectúa con 1,0 mL de solución C. Una vez obtenidos los aminoácidos concentrados en el eluato, se pasa a la etapa de fraccionamiento por CCD.

#### *Fraccionamiento de los aminoácidos por CCD*

Se cortan las placas Merck en cuadrados de 10 x 10 cm usando un cortapapeles. Se siembra la orina preconcentrada con aplicador de banda mediana (5  $\mu$ L). En la cámara de desarrollo se mezclan 28 mL del solvente (D) con 12 mL del solvente (E) para luego introducir la placa. En el momento que el eluyente alcanza la línea de frente (aprox. 45 min-8 cm) se retira la placa y se procede a su secado en estufa a 60°C durante 10 min.

En un segundo desarrollo, se agregan 3 mL de solución de ninhidrina a la misma mezcla de solventes. Desarrollada la corrida, se retira la placa, se deja evaporar el exceso de solvente, se la coloca en estufa a 60°C durante 10 min y luego a 100°C por el término de 5 min. Se deja enfriar a temperatura ambiente y se examinan las bandas antes de la hora (Pesce, 1990). La intensidad de cada banda es comparada con la correspondiente a la muestra control (pool de orinas) que fue preconcentrada en idénticas condiciones y corrida paralelamente.

#### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la búsqueda de un método que permitiera sembrar una muestra libre de interferencias en la placa, se probaron distintas fases sólidas para la etapa de extracción. Se ensayaron carboximetil-celulosa (Curtius, 1976), kielsel gel G, alúmina, Dowex-2 y Amberlite IRP-69 (Wang, 1989) y columnas de extracción en fase sólida Adsorbex SCX, siendo esta última la que resultó mas conveniente, con una eficiencia de la retención de los aminoácidos del orden del 68-74%. Para determinar los porcentajes de recuperación se usaron los estándares y el conjunto mezcla de orinas,

cuantificando los aminoácidos en el eluato y en la fracción de lavado, utilizándose para ello el método de Goodwin que mide la absorbancia de los dinitrofluoroderivados a  $\lambda = 420$  nm (Henry, 1980).

Por su parte, el control de la temperatura y el tiempo de calentamiento de las placas resultó crítico en la etapa de revelado con ninhidrina. Una temperatura de 60°C por el término de 10 min para la evaporación del solvente y 100°C por 5 min son los recomendados. A menores tiempos y temperaturas, la densidad de las bandas se muestra muy débil, en tanto que si se exceden estos valores el fondo se colorea intensamente, dificultando la visualización de los aminoácidos.

Por comparación con corridas de la misma orina sembradas directamente se ha comprobado que no existe una retención diferenciada de los aminoácidos en la columna EFS. Adicionalmente, la visualización de las bandas mejora notablemente.

Se determinaron los  $R_f$  de los principales aminoácidos, cuyos niveles de excreción urinaria ponen de manifiesto distintas deficiencias orgánicas. En todos los casos se incluyen las desviaciones estándares. La Fig. 1 presenta una descripción esquemática de la separación de aminoácidos.

La intensidad del color rosado de una banda de una muestra particular se considera significativamente exhalada cuando es por lo menos el doble de la densidad colorimétrica de la correspondiente al pool de orina. Asimismo, es recomendable proceder a un análisis cuantitativo de los aminoácidos urinarios en un analizador de intercambio iónico automatizado para confirmar una aminoacidopatía particular.

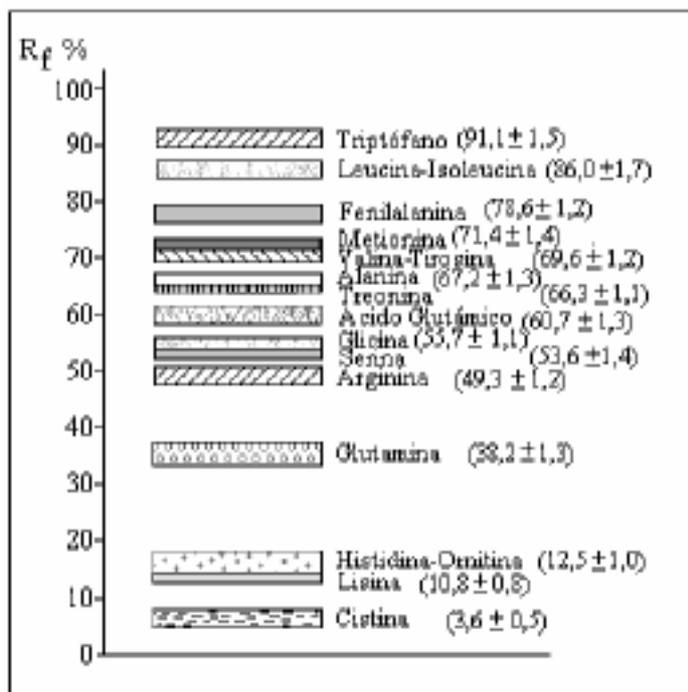


Fig. 1: Descripción esquemática de la separación de ácidos

El acoplamiento EFS-CCD, introducido en este trabajo, permite sembrar un menor volumen de muestra con implicancias positivas en la resolución de las bandas y la remoción de aquellas sustancias ninhidrina-positivas excretadas, muchas de ellas originadas en drogas (ejemplos: acetaminofeno, amoxicilina) o hábitos dietéticos (aminas fenólicas e indólicas a partir del consumo de ciertos alimentos vegetales), que dificultan la evaluación final (White, 1968).

#### CONCLUSIONES

- La etapa de preconcentración por EFS posibilita, además de la limpieza de la muestra, una mayor resolución en un desarrollo monodimensional y una visualización comparativamente mejorada de las bandas.
- El tratamiento de las muestras por EFS permite la remoción de varias otras sustancias ninhidrina-positivas excretadas que complican la interpretación de los resultados.

- La técnica permite configurar un perfil cromatográfico tipo para individuos normales y es indicada para estudios discriminatorios de distintos casos de aminoacidopatías.
- Las ventajas de esta técnica sobre la CCD bidimensional se basan en la simplicidad de sus etapas operativas, corto tiempo de análisis para su desarrollo monodimensional y mayor confiabilidad en la interpretación de los resultados.

#### BIBLIOGRAFÍA

- CURTIS, H.C. and M. ROTH, 1976. *Clinical biochemistry, principles and methods*. Vol. II. Walter de Gruyter, Berlin, West Germany.
- DAVIDSOHN, I. y B. HENRY, 1980. *Diagnostico Clínico por el Laboratorio*. Salvat Editores S. A. Barcelona- Buenos Aires.
- HENRY, R.J.; D.C. CANNON y J.W. WINKELMAN, 1980. *Química Clínica. Principios y Técnicas*. Editorial Jims. Barcelona.
- HOLME, D.J. y H. Peck, 1987. *Bioquímica Analítica*. Editorial Acribia S. A. Zaragoza. Espana.
- PERHAM, N. (ed.), 1986. *Instrumentation in amino acid sequence analysis*. Academic. Press, New York, USA.
- PESCE, A.J. y L.A. KAPLAN, 1990. *Quimica Clinica*. Ed .Med. Panamericana, 418-422.
- STAHL, 1990. *Thin Layer Chromatography*. Springer-Verlang, New York.
- WALTON, H.F., 1978. *Principios y métodos de análisis químico*. Ed. Reverté Mexicana, S.A.
- WANG, T. R., 1989. *Application of a Thin Layer Chromatography microtechnique for the screening of AA in 3165 Chinese newborns*. Taiwan Ihsueh Hui Tsa Chih.

Recibido/Received/: 23-Set-03  
Aceptado/Accepted/: 20-Oct-03