



**AMINOACIDOS POR CROMATOGRAFIA
DE LIQUIDOS DE ALTA RESOLUCION.
ESTUDIO DE PERFILES EN FRUTOS
DE DIFERENTES ESPECIES DE KARWINSKIA**

TESIS

**QUE EN OPCION AL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS
CON ESPECIALIDAD EN QUIMICA ANALITICA BIOMEDICA**

**PRESENTA:
O.C.B. MA. DE LA LUZ SALAZAR CAVAZOS**

MONTERREY, NUEVO LEON, FEBRERO DE 1993

TM

Z6658

FM

1993

S2



1020071220



**AMINOACIDOS POR CROMATOGRAFIA
DE LIQUIDOS DE ALTA RESOLUCION.
ESTUDIO DE PERFILES EN FRUTOS
DE DIFERENTES ESPECIES DE *KARWINSKIA***

TESIS

**PRESENTADA A LA FACULTAD DE MEDICINA
DE LA UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON**

por

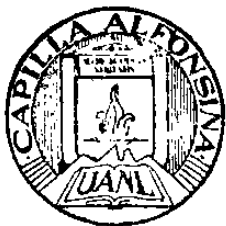
Q.C.B. MA. DE LA LUZ SALAZAR CAVAZOS

**COMO REQUISITO PARCIAL
PARA LA OBTENCION DEL GRADO DE**

**MAESTRO EN CIENCIAS
CON ESPECIALIDAD EN QUIMICA ANALITICA BIOMEDICA**

MONTERREY, NUEVO LEON. FEBRERO DE 1993.

TM
76658
TM
1993
SL



FONDO TESIS

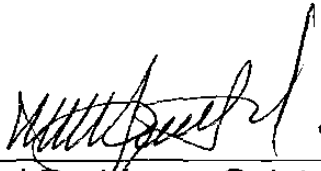
24067

“AMINOACIDOS POR CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS DE ALTA RESOLUCION. ESTUDIO DE PERFILES EN FRUTOS DE DIFERENTES ESPECIES DE KARWINSKIA”

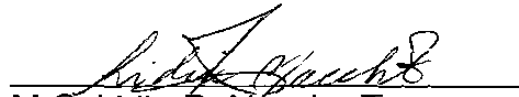
por:

Ma de la Luz Salazar Cavazos

El comité de Tesis:



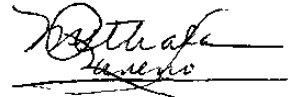
Dr. Manuel Rodríguez Quintanilla



M.C. Lidia R. Naccha Torres



Dra. Noemi Waksman de Torres



Dra. Mirthala Moreno Sepulveda



M.C. Humberto Garza Ulloa

Aprobó:



Dra. Herminia Martínez Rodríguez
Secretario de Ciencias Básicas
Subdirección de Investigación y Estudios de Post-grado
Facultad de Medicina, U.A.N.L.

ASESOR DE TESIS: DRA. NOEMI WAKSMAN DE TORRES

DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA Y TOXICOLOGIA

FACULTAD DE MEDICINA

U.A.N.L.

AGRADECIMIENTOS

Dr. Alfredo Piñeyro López

Por su apoyo para la realización de mi trabajo.

A la Dra. Noemí Waksman

Por su valiosa asesoría.

Al comité evaluador de tesis

Por sus aportaciones.

A mis maestros, compañeros y amigos

Por el apoyo que me brindaron cuando lo necesité.

A mi esposo Héctor y mis hijos
Héctor Javier y Alejandro Arturo

Con amor y gratitud.

A mis padres

Con cariño.

INDICE

	PAGINA
Introducción	1
- Métodos para la determinación de aminoácidos	2
- Detección	5
- Uso de Perfiles de Aminoácidos en la Clasificación Taxonómica de Plantas	9
Objetivos	19
Material y Métodos	20
- Metodología General	20
- Determinación de Derivados de Aminoácidos con Fenilisotiocianato	21
• Equipo y material	21
• Reactivos	22
• Formación de Derivados	22
• Separación	23
• Detección	24
- Determinación de Derivados de Aminoácidos con OPA/2ME	26
• Equipo y Material	26
• Reactivos	26
• Formación de Derivados	27
• Separación	27
• Detección	28
• Análisis	28
- Análisis de los Perfiles de Aminoácidos de Frutos de <i>Karwinskia</i>	31
• Especies en estudio	31
• Tratamiento de la Muestra	31

Resultados	33
• PITC	33
• OPA/2ME	36
• Análisis de Muestras	41
Discusión	58
Conclusiones	65
Bibliografía	66

INDICE DE FIGURAS

		PAGINA
Figura 1	Reacciones de derivación de aminoácidos	6
Figura 2	Localización de la <i>K. affinis humboldtiana</i>	13
Figura 3	Estructura química de la T-510	17
Figura 4	Distribución geográfica de la <i>K. humboldtiana</i>	18
Figura 5	Mezcla de estándares de PTC-aminoácidos	34
Figura 6	Separación de tirosina, triptófano y fenilalanina sin derivar.	35
Figura 7	Estándares de PTC-aminoácidos (concentración superior a 2 nmoles)	37
Figura 8	Mezcla de estándares de OPA-aminoácidos	38
Figura 9	Cromatograma de <i>K. humboldtiana</i> , GarzaGarcía, N.L. Primer estadio de maduración (OPA)	42
Figura 10	Cromatograma de <i>K. humboldtiana</i> , Garza García, N.L. Primer estadio de maduración.(PITC)	43
Figura 11	Cromatograma de <i>K. humboldtiana</i> , Garza García, N.L. Adicionado con treonina. (OPA)	44
Figura 12	Extracto de <i>K. humboldtiana</i> sin derivar.	45
Figura 13	Cromatograma de <i>K. humboldtiana</i> , Garza García, N.L. Segundo estadio de maduración (OPA)	46
Figura 14	Cromatograma de <i>K. humboldtiana</i> , Garza García, N.L. Tercer estadio de maduración (OPA)	47

Figura 15	Cromatograma de <i>K. humboldtiana</i> , Garza García, N.L. Cuarto estadio de maduración (OPA)	49
Figura 16	Cromatograma de <i>K. humboldtiana</i> , Garza García, N.L. Cuarto estadio de maduración (PITC)	50
Figura 17	Cromatograma de fruto maduro de <i>K. humboldtina</i> Garza García, N.L. (OPA)	51
Figura 18	Cromatograma de fruto verde de <i>K. affin humboldtiana</i> (OPA)	52
Figura 19	Cromatograma de fruto verde de <i>K. affin humboldtiana</i> (PITC)	53

INDICE DE TABLAS

		PAGINA
Tabla I	Relación del contenido de T-514 con la letalidad en ratones	14
Tabla II	Contenido de ácidos grasos en <i>Karwinskia</i>	16
Tabla III	Programa de gradiente de elución empleado en la separación de PTC-aminoácidos	25
Tabla IV	Programa de gradiente de elución empleado en la separación de los OPA-aminoácidos	29
Tabla V	Especies sometidas al estudio de aminoácidos	32
Tabla VI	Tiempos de retención y coeficientes de variación de aminoácidos derivados por OPA/2ME.	39
Tabla VII	Factores de Respuesta del detector y coeficientes de variación de OPA-aminoácidos.	40
Tabla VIII	Relación de altura de aminoácidos en frutos de <i>K. humboldtiana</i> de la misma procedencia colectada en diferentes períodos de maduración	54
Tabla IX	Relación de altura de aminoácidos en frutos de <i>K. humboldtiana</i> de otras procedencias.	56
Tabla X	Relación de altura de aminoácidos en otras especies del género <i>Karwinskia</i>	57

INTRODUCCION

La importancia que tiene el estudio de los aminoácidos tanto para el análisis de muestras biológicas como para la elucidación de estructuras proteicas, han conducido al desarrollo de métodos cada vez mas rápidos y precisos para su análisis. La elucidación de la estructura primaria de numerosos péptidos y proteínas no hubiera sido posible sin técnicas adecuadas de identificación de aminoácidos⁽¹⁾.

El primer intento para establecer la secuencia de aminoácidos en proteínas biológicamente activas fue realizado por Sanger y colaboradores en 1953, en su trabajo clásico sobre la molécula de insulina⁽¹⁾. Una técnica de secuenciación ampliamente aceptada, la cual permite el rompimiento del aminoácido NH₂ terminal de una cadena, ha sido la de Edman, en la que el grupo amino terminal reacciona con el fenilisotiocianato a pH alcalino y el producto formado es posteriormente tratado con ácido trifluoroacético el cual causa ciclización y liberación del aminoácido NH₂ terminal como feniltiohidantoína⁽²⁾.

El análisis de la calidad de los alimentos es un problema importante para los tecnólogos del área^(3,4). La importancia del contenido en la dieta de aminoácidos esenciales los cuales no pueden ser sintetizados por el organismo, ha conducido a la evaluación de la calidad de los alimentos protéicos en cuanto a su contenido^(3,5,6).

El conocimiento de muchas rutas metabólicas tanto en microorganismos como en organismos superiores ha requerido también del análisis de aminoácidos y sus intermediarios⁽⁶⁾.

En cuanto a la importancia clínica, se sabe que ciertas enfermedades de tipo metabólico, cursan con alteración de los valores normales de aminoácidos en fluidos biológicos como sangre, orina, líquido amniótico, etc. Tal es el caso de la fenilcetonuria, la alcaptonuria, la enfermedad de la orina de olor a miel de maple, etc.^(7,8). Algunas enfermedades hepáticas y renales cursan también con alteraciones en los valores normales de aminoácidos^(6,9).

METODOS PARA LA DETERMINACION DE AMINOACIDOS

Dentro de los métodos más empleados en la determinación de aminoácidos, tienen un papel muy importante los métodos cromatográficos.

Aunque la cromatografía en papel ha sido de las primeras técnicas utilizadas, y es aún usada, su poder de resolución es escaso; generalmente se utiliza en forma bidimensional, sobre todo cuando las muestras son complejas; además, el tiempo de estudio es prolongado⁽¹⁰⁾.

Para la separación de aminoácidos, el procedimiento de cromatografía de intercambio iónico ha sido desarrollada a tal grado que se ha convertido en una técnica muy efectiva y con un poder de resolución muy alto⁽⁹⁾. Las resinas de intercambio iónico fueron por primera vez utilizadas por Moor y Stein a fines de 1940, ellos emplearon diferentes resinas y eluentes, hasta que en 1958, ellos mismos, junto con Darrel H. Spackman, reportaron un sistema cromatográfico que analizaba los eluidos y los registraba automáticamente en aproximadamente 24 horas. Numerosas modificaciones han sido efectuadas sobre este sistema original los cuales ayudaron a incrementar la sensibilidad y acortar el tiempo de análisis.

En principio los analizadores automáticos de aminoácidos⁽⁹⁾ están basados en las técnicas de intercambio iónico e incluyen la automatización de pasos, como la preparación de la muestra, el control de cambios de buffer, la derivatización post-columna y el registro y cálculo de concentración de los aminoácidos. Con estos avances se han acortado los tiempos de análisis a minutos.

La cromatografía de gases, ha sido utilizada para la determinación de aminoácidos. Tiene la ventaja de ser altamente sensible y de requerir poca muestra para el análisis. Sin embargo, la necesidad de derivatizar la muestra para formar compuestos volátiles, la hace tediosa y consume mas tiempo. Otra de las desventajas de este tipo de cromatografía es que la muestra debe ser desalinizada antes del análisis. Por otro lado si se

combina con la espectroscopía de masas, es una técnica excelente para estudios estructurales e identificación de componentes moleculares.

La cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) ha tenido gran aplicación para el análisis de componentes no volátiles tales como los aminoácidos. Existen muchas publicaciones recientes sobre la aplicación de HPLC en el análisis de aminoácidos^(1-4,11-25). Las 2 técnicas más usuales son:

- 1) Separación a través de una columna de fase inversa en la que la derivación se hace previa a la columna.
- 2) Separación de los aminoácidos a través de una columna de intercambio iónico con derivación post-columna.

Algunas diferencias importantes entre ambos métodos han sido descritas^(2,4) las cuales nos hacen suponer que la utilización de la cromatografía de fase inversa con derivación pre-columna, tiene ventajas sobre la cromatografía de intercambio iónico con derivatización post-columna:

- 1) En el método pre-columna la desproteínización es deseable pero no necesaria como ocurre con el método de derivación post-columna.
- 2) La cantidad de reactivo derivante es mayor en el método post-columna.
- 3) El costo del equipo es mayor en el método post-columna, así como las columnas y eluentes.

4) Los coeficientes de variación para los tiempos de retención así como para áreas y altura de los picos o concentraciones son menores en el caso de los métodos pre-columna por lo que los resultados serán más precisos.

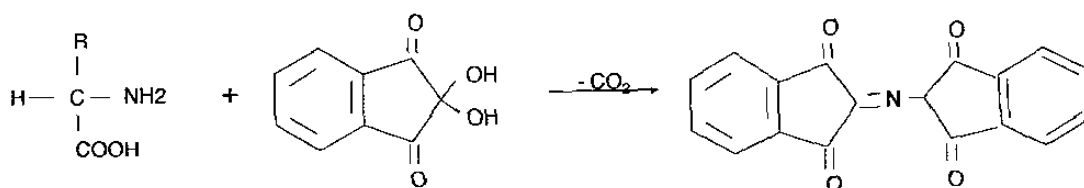
DETECCION

La sensibilidad de los métodos cromatográficos depende en gran parte del sistema de detección empleado en el análisis.

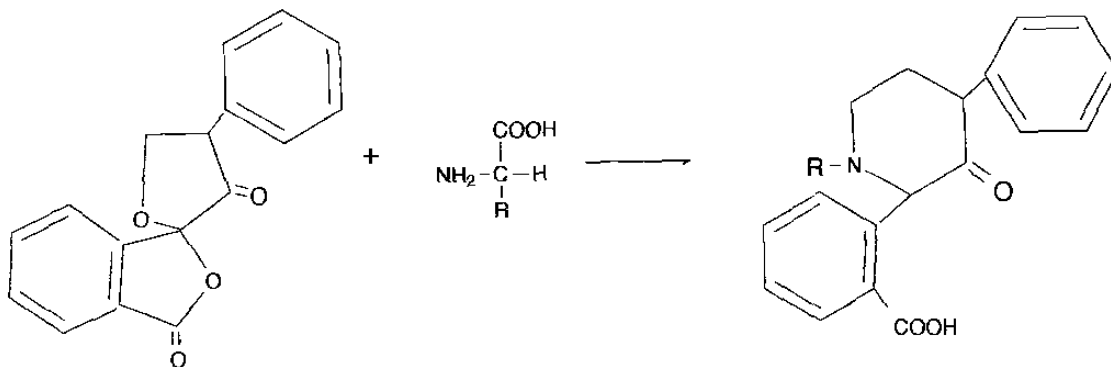
Dentro de los reactivos primeramente utilizados para la detección de aminoácidos figura la ninhidrina. (figura1). Los compuestos formados por la reacción de aminoácidos con la ninhidrina, son complejos color púrpura que absorben a 570 nm. Con iminoácidos como la prolina, esta forma compleja absorbe a 440 nm. Ambas formas absorben a 405 nm. La sensibilidad de los sistemas con ninhidrina depende de varios factores:

- 1) La reacción con los aminoácidos produce ligeras diferencias en la intensidad de los colores y puede variar significativamente con la preparación del reactivo.
- 2) Cuando el reactivo se encuentra oxidado, el color no se desarrolla bien a 570 nm., aunque la absorción a 440 nm. permanece constante.
- 3) En cromatografía de líquidos de alta resolución, la ninhidrina únicamente se puede emplear en sistemas de derivación post-columna⁽⁹⁾.

Reacción con ninhidrina



Reacción con Fluorescamina



Reacción con fenilisotiocianato



Reacción con OPA/2ME

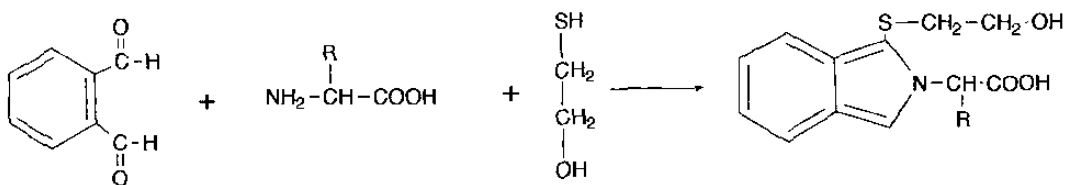


Figura 1.- Reacciones de derivación de aminoácidos con diferentes reactivos

Los reactivos fluorescentes han sido ampliamente utilizados en la detección de aminoácidos. Estos métodos son de lo más sensibles ya que detectan concentraciones de picomoles.

Underfriend en 1972, introdujo un reactivo llamado fluorescamina que reacciona a pH alcalinos con aminas primarias y forma productos fluorescentes que son excitados a 390 nm y emiten a 475 nm (figura 1). El reactivo es inestable en agua y debe ser mantenido en acetona. Los iminoácidos no reaccionan directamente con la fluorescamina, sin embargo, cuando son tratados con la N-cloro succinimida, el anillo es abierto liberando el grupo amino primario el cual es capaz de reaccionar con la fluorescamina. La sensibilidad es semejante a la de la reacción con la ninhidrina, además de que el reactivo es más costoso por lo que no se le ha dado mucho uso⁽⁹⁾.

El cloruro de dansilo (cloruro de 1-dimetilamino naftaleno 5-sulfonoilo) ha sido empleado en la formación de compuestos fluorescentes (figura 1). La eficacia de este método radica en la intensa fluorescencia que producen los derivados, lo que conduce a una gran sensibilidad (nanogramos), así como la alta resistencia a hidrólisis ácidas y alcalinas. Las limitaciones en el uso del cloruro de dansilo son la fuerte interferencia en la separación cromatográfica⁽¹⁹⁾ además de la falta de especificidad⁽⁴⁾ ya que se generan múltiples derivados de los aminoácidos.

Un reactivo que ofrece mayor sensibilidad sobre los anteriores es el ortoftaldehído (OPA) (fig. 1) . A diferencia de la fluorescamina, este producto es estable en solución acuosa. Para desarrollar el producto fluorescente se requiere de la adición de un mercaptano como el 2 mercaptoetanol (2 ME) . La excitación se produce a 340 nm y la emisión se registra a 455 nm.; igual que la fluorescamina, este reactivo también reacciona únicamente con aminas primarias; pero en este caso el anillo de los iminoácidos no puede ser abierto con N-cloro succinimida ya que ésta reacciona con el OPA⁽⁹⁾.

Se ha demostrado que la estabilidad de los derivados producidos con el 2 ME se pierde después de 60 minutos⁽¹⁷⁾. Cuando en la preparación de los derivados se utiliza terbutiltiol en lugar del 2 ME y la detección se efectúa electroquímicamente, la altura de los picos en el cromatograma no disminuye al cabo del tiempo como sucede con el 2 ME. Con este método la sensibilidad es de picomoles, sin embargo, estudios realizados previamente por Allison⁽²⁴⁾ compararon la intensidad de la fluorescencia de los productos formados con ambos reactivos y demostraron que con el terbutiltiol se reduce notablemente, lo cual limita la técnica al uso de detectores electroquímicos.

Yang y Sepúlveda en 1985⁽¹⁹⁾, publicaron una técnica de separación de aminoácidos en la cual utilizan el fenilisotiocianato (P ICT) como reactivo derivatizante formando feniltiocarbamilaminoácidos (PTC-aa) (figura 1),

los cuales fueron separados a través de una columna de fase inversa, empleando gradiente de elución. En este caso la cuantificación la realizaron espectrofotométricamente a 254 nm y detectaron concentraciones menores a picomoles. La ventaja de este método es que elimina las limitaciones del método que emplea el OPA. Otros trabajos han sido publicados en donde emplean el fenilisotiocianato como reactivo de derivación de aminoácidos^(3,11-16,18-20,22).

Si bien la cromatografía de líquidos ha sido ampliamente utilizada para el estudio de aminoácidos, en nuestro medio su uso es limitado y aun no se emplea como técnica de rutina principalmente a nivel clínico.

USO DE PERFILES DE AMINOACIDOS EN LA CLASIFICACION TAXONOMICA DE PLANTAS

Otra de las aplicaciones que se le ha dado al estudio de los aminoácidos es su uso como ayuda en la clasificación taxonómica de plantas⁽²⁶⁾. La mayoría de los aminoácidos encontrados en plantas son derivados de aminoácidos componentes de las proteínas. Ejemplo de algunos aminoácidos que han sido empleados como marcadores taxonómicos es el 5-hidroxitriptofano, el cual se encuentra en concentraciones altas en la semilla de todas las especies del género *Griffonia*. Similarmente las

especies del género *Mucuna*, están caracterizadas por contener altas concentraciones del aminoácido 3,4 dihidroxifenilalanina.

Para la clasificación de las especies de algunos géneros han sido utilizados los perfiles de aminoácidos. Tal es el caso de las especies de los géneros *Lathyrus*, *Vicia* y *Acacia*⁽²⁶⁾. El género *Acacia* ha sido subdividido en cuatro subgéneros en base a los distintos perfiles de aminoácidos encontrados en sus semillas⁽²⁷⁾.

En un estudio realizado en dos especies del género *Cassia*: *C. obtusifolia* y *C. tora*, se encontró que dichas especies poseen varias características fitoquímicas que las distinguen, entre ellas la composición de aminoácidos. En *Cassia tora* se encuentran presentes los aminoácidos: cistina, gamma hidroxí arginina y aspártico; mientras que en *Cassia obtusifolia* no se encuentran, además de que en esta última se encuentra el aminoácido histidina que en *Cassia tora* está ausente⁽²⁸⁾.

En el departamento de Farmacología y Toxicología de la Facultad de Medicina de la UANL se trabaja con productos procedentes de una planta perteneciente al género *Karwinskia*, la *Karwinskia humboldtiana*. Se ha demostrado que la ingestión del fruto produce efectos neurotóxicos⁽²⁹⁾ así como daños en otros órganos, principalmente en hígado y riñón^(30,31).

La planta de la *K. humboldtiana* ha sido descrita como un arbusto liso, de

ramas cilíndricas y largas, rugosas e inermes. Hojas alternas y opuestas, pecioladas, elípticas u oblongas, con nervaduras oscuras muy notables en el envés. El fruto es una drupa de color violeta oscuro cuando está maduro, de 0.5 a 1 cm de diámetro⁽³²⁾.

El género *Karwinskia* incluye 11 especies distintas en México, la cuales presentan propiedades tóxicas y químicas similares a las de la *K. humboldtiana*⁽³³⁾. La mayoría de estas especies poseen diferencias morfológicas bien definidas por lo que ha sido lograda su clasificación taxonómica⁽³⁴⁾. Para su diferenciación morfológica, las plantas fueron divididas en pubescentes y no pubescentes. Las pubescentes fueron *K. rzedowskii* y *K. mollis*, las cuales se diferencian por el tamaño de sus hojas. Dentro de las no pubescentes se incluyen a las especies *subcordata*, *humboldtiana* y *umbellata*. La *K. subcordata* se diferenció de las otras 2 especies por la implantación de sus hojas (con o sin pie).

Del fruto de la *K. humboldtiana* se han aislado 4 compuestos clasificados como antracenas a los que se les llamó de acuerdo con su peso molecular: T514, T544, T496 y T516⁽³¹⁾, los cuales producen efectos tóxicos. Estos compuestos han sido encontrados además en raíz y en hojas⁽³⁶⁾. La presencia de por lo menos uno de estos compuestos antracénicos es una característica del género *Karwinskia*⁽³³⁾.

Existe una planta cuyas características morfológicas son muy semejantes a

las de la *K. humboldtiana* y al momento de haber iniciado el presente trabajo no se sabía si se trataba de la misma especie o era una especie diferente. A la planta se le dió el nombre de *K. affin humboldtiana* y fue colectada por el biólogo Rafael Fernández Nava del Instituto Politécnico Nacional en el estado de Puebla⁽³⁴⁾ (figura 2). En el momento de escribir el presente trabajo se propuso su cambio de denominación por el de *K. macrocarpa*. A diferencia de las plantas de la *K. humboldtiana* que regularmente no alcanzan a medir mas de 2 metros de altura, la *K. affin humboldtiana* se presenta como árbol con alturas de entre 3 y 8 metros. Las hojas de la *K. affin humboldtiana* son morfológicamente idénticas a las de la *K. humboldtiana*, sin embargo presentan coloración verde limón diferente al que presenta la especie *humboldtiana*, además de que las nervaduras que presenta por el envés son mas resaltadas. La *K. affin humboldtiana* presenta frutos muy grandes (1.0-1.2 cm de diámetro) y mesocarpos que sobrepasan el rango descrito para la *K. humboldtiana*⁽³³⁾.

En un estudio previo se correlacionó el contenido de toxinas de cada especie de *Karwinskia* con la letalidad observada en ratones de la cepa CD1⁽³³⁾ (Tabla I). Para el caso de la *K. humboldtiana* colectada en diferentes regiones, la letalidad que se presenta es congruente con el porcentaje de toxina que contienen. Aunque la cantidad de toxina en la *K. affin humboldtiana* es similar al de la *K. humboldtiana* colectada en Linares N.L., el grado de toxicidad muestra ser diferente. Esto podría ser



Figura 2.- Localización de la *Karwinskia affin humboldtiana* en el estado de Puebla, México.

TABLA I. Letalidad observada en ratones cepa CD1 con diferentes especies de *Karwinskia*

ESPECIE	D O S I S					
	1.5g/Kg de peso		2.5g/Kg de peso		5g/Kg de peso	
	letalidad (%)	muerte (días)	letalidad (%)	muerte (días)	letalidad (%)	muerte (días)
<i>K. humboldtiana</i> ¹	100.0	2	100.0	2	100.0	2
<i>K. humboldtiana</i> ²	0.0	30	85.7	2-6	-	-
<i>K. mollis</i>	0.0	30	71.4	2-5	-	-
<i>K. umbellata</i>	14.3	2-6	85.7	2-6	-	-
<i>K. subcordata</i>	-	-	14.3	2-4	57.1	1-4
<i>K. latifolia</i>	-	-	0	30	12.5	21
<i>K. parvijolia</i>	71.4	2-7	100.0	2-6	-	-
<i>K. calderoni</i>	-	-	21.4	4-11	100.0	2-5
<i>K. rzedowskii</i>	-	-	28.5	8-14	100.0	6-7
<i>K. venturensii</i>	-	-	0	30	0	30
<i>K. affinis humboldtiana</i>	-	-	28.5	8-21	100.0	2

1.- Villa de García, Nuevo León, México

2.- Linares, Nuevo León, México.

un primer indicio químico de que se trata de una especie diferente.

El estudio del contenido de ácidos grasos en frutos de varios ejemplares de *Karwinskia humboldtiana* por cromatografía de gases mostró una variación pequeña en la relación de ácidos grasos saturados / no saturados. Esta misma relación calculada para las demás especies da valores que están a más de una desviación estándar de la media calculada. En particular, para la *K. affin humboldtiana* esta diferencia resultó ser altamente significativa⁽³⁸⁾ (Tabla II)

Además, recientemente se aisló un metabolito secundario de la *K. affin humboldtiana*, el cual fue purificado e identificado; siguiendo la costumbre de llamarlos de acuerdo con su PM, se le denominó T510 (figura3)⁽³⁹⁾. Este metabolito está ausente en todos los especímenes de *K. humboldtiana* revisados hasta la fecha, los cuales fueron colectados en diferentes estados (figura 4).

Los antecedentes anteriores permiten suponer que se trata de dos especies diferentes, sin embargo, consideramos importante cualquier información adicional que pudieramos obtener.

En virtud de esto y considerando la importancia del establecimiento de un método analítico adecuado para el análisis de aminoácidos que pudiera ser útil posteriormente en el estudio de materiales biológicos y ante la problemática presentada en la clasificación de la planta llamada hasta el momento *K. affin humboldtiana*, establecimos los objetivos de la presente tesis.

TABLA II

Relación porcentual de ácidos grasos en diferentes especies de *Karwinskia* y comparación de la relación de ácidos grasos insaturados : saturados en las especies *humboldtiana* y *affin humboldtiana*.

ESPECIE	ACIDO GRASO					
	C16	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3	C20
<i>K. humboldtiana</i>	8.5	2.5	38.1	16.9	33.9	0.2
<i>K. umbellata</i>	11.3	3.7	41.0	14.9	26.2	2.6
<i>K. affin humb.</i>	14.2	6.6	30.5	19.5	26.3	2.3
<i>K. subcordata</i>	9.6	4.8	32.2	17.7	32.0	3.2
<i>K. rsedowskii</i>	11.4	3.1	38.0	26.6	19.0	1.9
<i>K. venturensii</i>	17.7	8.2	16.5	45.3	12.3	0.2
<i>K. calderoni</i>	27.9	4.5	15.3	35.7	16.3	0.3
<i>K. latifolia</i>	11.3	3.0	28.6	27.6	28.6	1.2
<i>K. parvifolia</i>	15.9	4.6	37.7	32.0	8.9	0.9

RELACION ACIDOS GRASOS INSATURADOS : SATURADOS

<i>K.humboldtiana</i>	6.4±1.0	n=10
<i>K.affin humboldtiana</i>	3.71±0.7	n= 3

t student = 4.2
p > 0.01

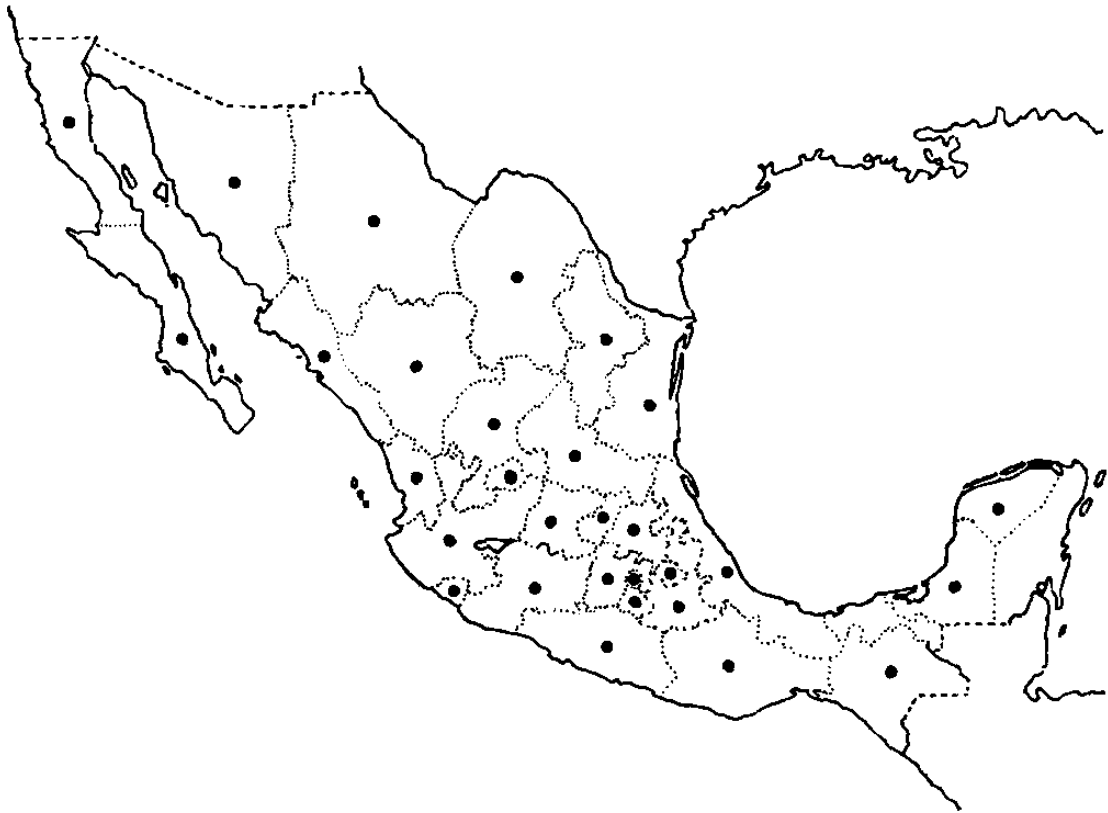


Figura 4.- Distribución Geográfica de la *K. humboldtiana* en la República Mexicana. Se localiza en todo el territorio excepto los estados de Tabasco y Chiapas.

OBJETIVOS

1.- SELECCIONAR UN METODO PARA LA DETERMINACION DE AMINOACIDOS POR CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS DE ALTA RESOLUCION QUE PUEDA SER UTIL PARA EL ESTUDIO DE MATERIALES BIOLÓGICOS.

2.- ESTABLECER UN PERFIL DE AMINOACIDOS EN FRUTO DE DIFERENTES ESPECIES DE *Karwinskia* Y UTILIZARLO, SI ELLO ES POSIBLE, PARA LA CLASIFICACION TAXONOMICA DE LAS MISMAS.

MATERIAL Y METODOS

METODOLOGIA GENERAL

En base a la revisión de los métodos de determinación de aminoácidos, y tomando en cuenta los recursos materiales con los que contamos, se consideró conveniente realizar la determinación de aminoácidos por cromatografía de líquidos de alta resolución en columnas de fase inversa. Así mismo, se realizó el estudio comparativo de 2 técnicas de derivación de aminoácidos pre-columna, las cuales utilizan diferentes sistemas de detección:

a) Fenilisotiocianato

b) Ortoftaldehído/2ME

Para su realización, el trabajo se llevó a cabo en las siguientes etapas:

- 1) Estudio y montaje de los métodos.
- 2) Evaluación y selección del método.
- 3) Estudio de aminoácidos en frutos de las diferentes especies de *Karwinskia*.
- 4) Comparación de los perfiles de aminoácidos presentados por cada una de las especies.

DETERMINACION DE DERIVADOS DE AMINOACIDOS CON FENILISOTIOCIANATO

EQUIPO Y MATERIAL

Cromatógrafo de Líquidos Varian modelo 8500 con espectrofotómetro ultravioleta visible Varian Techtron 635.

Columna de fase inversa de ODS Nova Pak C18 de 0.39 x 30 cm, tamaño de partícula 5 micras (Waters)

Precolumna Universal Micro Pak (Varian) empacada con fase inversa Vydac, tamaño de partícula 25-37 micras.

Registrador Servogor 210.

Equipo para filtrar solventes y portafiltros para filtrar muestra Millipore.

Filtros para agua, solventes y para muestras acuosas Millipore. Diámetro de poro de 0.45 micras.

Liofilizador Vir Tis 12 Modelo 6211-0120

Potenciómetro Beckman modelo 3500 (Ø 61pH meter)

Baño de ultrasonido para la desgasificación de los eluentes. Branson B220 50/60 Hz.

Agitador Vortex Mixer S/P modelo S8223-1.

REACTIVOS

Estándares de aminoácidos (Sigma). Se prepararon estándares individuales de aminoácidos conteniendo 100 micromoles por mililitro en HCl 0.1N de los siguientes aminoácidos: Acido aspártico (asp), ácido glutámico (glu), serina (ser), glicina (gli), treonina (tre), alanina (ala), histidina (his), arginina (arg), valina (val), metionina (met), isoleucina (ile), leucina (leu), fenilalanina (phe), lisina (lis), triptófano (tpf) y asparagina (asn); de dichas soluciones se hicieron mezclas de aminoácidos a diferentes concentraciones.

Fenilisotiocianato, acetonitrilo grado cromatográfico y trietilamina (Sigma)

Metanol y acetato de sodio anhidro y acido acético (Productos Químicos Monterrey)

Para la preparación de los reactivos acuosos se empleó agua desionizada Tanto los solventes como el agua fueron filtrados a través de membranas compatibles de 0.45 μm de porosidad.

FORMACION DE LOS DERIVADOS

Para la identificación de los aminoácidos, se hicieron 5 mezclas de aminoácidos.

- 1) Aspártico-serina- prolina- leucina.
- 2) Glutámico-glicina- tirosina- fenilalanina.
- 3) Histidina- tirosina- lisina- treonina.
- 4) Arginina- Valina- tirosina- lisina.
- 5) Glutámico- alanina- metionina- isoleucina.

En frasco para liofilizador de 5 ml de capacidad, se colocaron 30 μ l de las soluciones de 100 micromoles por mililitro de cada uno de los estándares. Se le adicionó 200 microlitros de metanol, 50 microlitros de trietilamina y 30 microlitros de fenilisotiocianato, se agitaron por 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente fueron liofilizados durante 2 horas para eliminar el exceso de reactivo y se guardaron en desecador para ser reconstituídos al momento del análisis.

Una vez identificados los aminoácidos en las mezclas anteriores se procedió a trabajar con mezclas en donde estuvieran presentes todos los aminoácidos.

SEPARACION

Los liofilizados fueron reconstituídos al momento de hacer el análisis con 200 μ l del eluente A, y filtrados a través de filtro para muestras acuosas de poro de 0.45 μ m. De esta solución se prepararon diluciones de 1:10 hasta

1:80 con el mismo eluente. El volumen de inyección fue de 10 microlitros.

La separación se llevó a cabo en la columna de fase inversa de ODS. Los eluentes empleados para la separación fueron: Eluente A: acetato de sodio 0.03M con 6% de acetonitrilo y 0.05% de trietilamina, pH= 6.4. La mezcla fue filtrada y desgasificada para su uso. Eluente B: mezcla de acetonitrilo: agua 60: 40 (Ambos se filtraron por separado en filtros adecuados y la mezcla se desgasificó para su uso).

El programa de gradiente empleado en la separación se muestra en la tabla III. El flujo se mantuvo a 1 ml por minuto durante la separación y el trabajo se realizó a temperatura ambiente. El tiempo de análisis fue de 53 minutos. Entre cada análisis, la columna se equilibró durante 20 minutos aproximadamente con 100% de eluente A.

DETECCION

La detección se realizó en el espectrofotómetro UV-Vis a una longitud de onda de 254 nm. La escala de absorbancia a la que se trabajó fue de 0 a 0.5 AUFS (unidades de absorbancia correspondientes a escala completa). La velocidad de carta del registrador: 12 cm/ hora y la atenuación: 20 milivolts.

TABLA III

Programa de gradiente de elución empleado para la separación de los aminoácidos derivados por el método del Fenilisotiocianato.

TIEMPO	% de B	DURACION (minutos)
0	0	0
2	2	2
12	8	10
22	28	10
26	68	4
30	100	4
40	0	10

VELOCIDAD DE FLUJO: 1 ml / minuto.

ELUENTE A: acetato de sodio 0.03M con 6% de acetonitrilo y 0.05% de trietilamina, pH= 6.4.

ELUENTE B: acetonitrilo : agua (60 : 40)

COLUMNA: Fase inversa ODS (30 x 0.39 cm; partícula de 5 μ m)

LONGITUD DE ONDA DE DETECCION: 254 nm.

DETERMINACION DE DERIVADOS DE AMINOACIDOS CON OPA/ 2ME

EQUIPO Y MATERIAL

El cromatógrafo de líquidos, la columna, la pre-columna y el resto del equipo empleado, fue el mismo que para la determinación de los derivados con fenilisotiocianato, excepto el detector, el cual fue en este caso un fluorómetro Beckman modelo 157 con filtros de excitación: 305-395 nm y de emisión de: 420-690 nm.

REACTIVOS

Estándares de aminoácidos (Sigma). Se prepararon estándares individuales de aminoácidos conteniendo 100 μ moles por mililitro en HCl 0.1N de los siguientes aminoácidos: aspártico, glutámico, serina, glicina, treonina, alanina, histidina, prolina, arginina, valina, metionina, triptofano, isoleucina, leucina, fenilalanina, lisina y asparagina ; de dichas soluciones se hicieron mezclas de aminoácidos a diferentes concentraciones. El ácido gama amino butírico (GABA) fue empleado como estándar interno.

Ortoftaldehído, 2 mercaptoetanol, tetrahidrofurano (Sigma)

Metanol, fosfato ácido de potasio y borato de sodio decahidratado (Productos Químicos Monterrey)

FORMACION DE LOS DERIVADOS

De las soluciones de estándares de aminoácidos de 100 μ moles por ml se hicieron mezclas en diluciones desde 2 a 0.5 μ moles/ ml, de las cuales se tomó para hacer los derivados.

Preparación del reactivo. 125 mg de OPA fueron disueltos en 5 ml de metanol. De esta solución se tomó un mililitro, se le añadió 1 ml de metanol y 50 μ l de 2 mercaptoetanol y se aforó a 5 ml con una solución saturada de borato de sodio de pH 10.

Reacción. En tubos Eppendorf de 0.5 ml se colocaron 10 μ l de la mezcla de estándares de aminoácidos, se le adicionaron 15 μ l de agua destilada y filtrada y 75 μ l del reactivo OPA/2ME. Se agitaron por 60 segundos y a los 120 segundos fueron inyectados en la columna.

SEPARACION.

Se inyectaron 10 μ l del derivado a la columna de fase inversa de ODS. El sistema de eluentes empleados en la separación fue:

Eluente A) Metanol - solución buffer de fosfato 0.018 M pH 7.2 - tetrahidrofurano (12:85:3).

Eluente B) Los mismos componentes del eluente A en una proporción 55:42:3. Después de preparada, la mezcla B se ajustó a pH 7.6. Ambos eluentes fueron filtrados y desgasificados para su uso.

El programa de gradiente de elución empleado se muestra en la tabla IV.

DETECCION.

La detección se llevó a cabo por fluorescencia. La sensibilidad del detector fue de 0.05 RFU (1 RFU= 10 mV).

ANALISIS.

Empleando como estándar interno el GABA se determinaron los tiempos de retención, tiempos de retención relativos y los factores de respuesta relativos del detector para cada uno de los aminoácidos. El factor de respuesta relativo fue determinado empleando la siguiente ecuación:

$$\text{Factor de respuesta} = \frac{(C_{aa}) \times (h_i)}{(C_i) \times (h_{aa})} ;$$

donde C_{aa} son las concentraciones de aminoácido, C_i la concentración del estándar interno (GABA), h_{aa} y h_i son las alturas de aminoácido y estándar interno respectivamente.

Se determinaron los coeficientes de variación o desviaciones estándar relativas para los tiempos de retención, áreas y altura de los picos,

$$\text{Coeficiente de Variación} = (s) (100) / X$$

TABLA IV

Programa de gradiente de elución empleado en el método del
Ortoftaldehído/2 mercapto etanol (OPA/2ME).

TIEMPO	% de B	DURACION (minutos)
0	0	0
15	30	9
24	90	16
40	100	10

VELOCIDAD DE FLUJO: 1 ml / minuto

ELUENTE A: metanol : buffer de fosfatos 0.018M : THF* (12:85:3)

ELUENTA B: metanol : buffer de fosfatos 0.018M : THF* (55:42:3)

COLUMNA: fase inversa de ODS (30 x 0.39 cm; partícula de 5 μ m)

DETECCION: Fluorescencia. longitud de onda de excitación: 360 nm;
longitud de onda de emisión: 455 nm.

*THF= tetrahidrofurano

donde s es la desviación estándar y \bar{X} es el promedio de los datos obtenidos.

El número de muestras sometidas al análisis fue entre 5 y 10.

Para determinar la linealidad de la respuesta se utilizaron concentraciones de aminoácidos equivalentes a 200, 150, 75, 37.5, 18.75, 9.35 y 4.68 picomoles de cada aminoácido inyectados.

ANALISIS DE LOS PERFILES DE AMINOACIDOS EN FRUTOS DE *KARWINSKIA*

ESPECIES EN ESTUDIO:

En la tabla V se presentan las especies utilizadas para el estudio, las cuales incluyen plantas de *K. humboldtiana* de diferentes procedencias, algunas de ellas en diferentes etapas de maduración, así como la *K. affin humboldtiana* colectada en dos distintas ocasiones.

TRATAMIENTO DE LA MUESTRA:

Se tomaron 3 gramos de fruto molido y homogenizado y fueron extraídos con 100 ml de etanol al 75% por agitación durante 24 horas⁽⁴⁰⁾. El extracto etanólico obtenido fue filtrado en embudo Buchner. De los filtrados se hicieron los derivados de los aminoácidos para ser analizados tanto por el método de PITC como por el del OPA/ 2ME.

Para la formación de los derivados de las plantas por el método de PITC, se siguió el mismo procedimiento que para los estándares tomando 100 μ l de los extractos. En el caso del método del OPA/2ME también se procedió como con los estándares utilizándose en este caso 10 μ l del extracto para hacer la derivación.

TABLA V

Especies de *Karwinskia* sometidas al estudio de perfiles de aminoácidos.

<u><i>K. humboldtiana</i></u>	Colectada en Villa de García N.L. en diferentes épocas del año (1989)
<u><i>K. humboldtiana</i></u>	Colectada en Linares, N.L. (Sep. 1989)
<u><i>K. humboldtiana</i></u>	Colectada en los Ramones N.L. (Sep. 1989)
<u><i>K. humboldtiana</i></u>	Colectada en Ciénega de Flores N.L. (Sep 1989)
<u><i>K. humboldtina</i></u>	Colectada en el estado de Querétaro. (Sep. 1989)
<u><i>K. affin humboldtiana</i></u>	Colectada en el estado de Puebla. (Nov. 1984 y 1988)
<u><i>K. rzedowskii</i></u>	Colectada en el estado de Jalisco. (Oct. 1984)
<u><i>K. parvifolia</i></u>	Colectada en el estado de Sinaloa. (1990)

RESULTADOS

PITC.

La figura 5 muestra el cromatograma de una mezcla de 14 estándares de aminoácidos derivados por el método del fenilisotiocianato. El orden de elución observado fue de menor a mayor tiempo de retención: Aspártico, glutámico, serina, glicina, treonina, alanina, prolina, arginina, valina, metionina, isoleucina, leucina, fenilalanina, lisina. Bajo las condiciones a las que se corrió este cromatograma, la histidina, presentó un tiempo de retención muy cercano al de la alanina y la mayoría de las veces no se podía resolver. Si bien se observaron variaciones en los tiempos de retención, principalmente cuando se trabajaba con eluentes preparados en distintas ocasiones, el orden de elución en el que aparecieron los aminoácidos fue siempre constante, excepto la histidina que presentó variaciones muy notorias en los tiempos de retención.

La sensibilidad obtenida por este método, bajo nuestras condiciones de trabajo, varió desde aproximadamente 0.2 nanomoles para aminoácidos como la glicina y la fenilalanina, hasta 2 nanomoles para la treonina.

Los aminoácidos tirosina, triptófano y fenilalanina fueron analizados sin derivar, a la misma longitud de onda, por elución isocrática con eluyente A y a un flujo de 1ml/min. (figura 6)

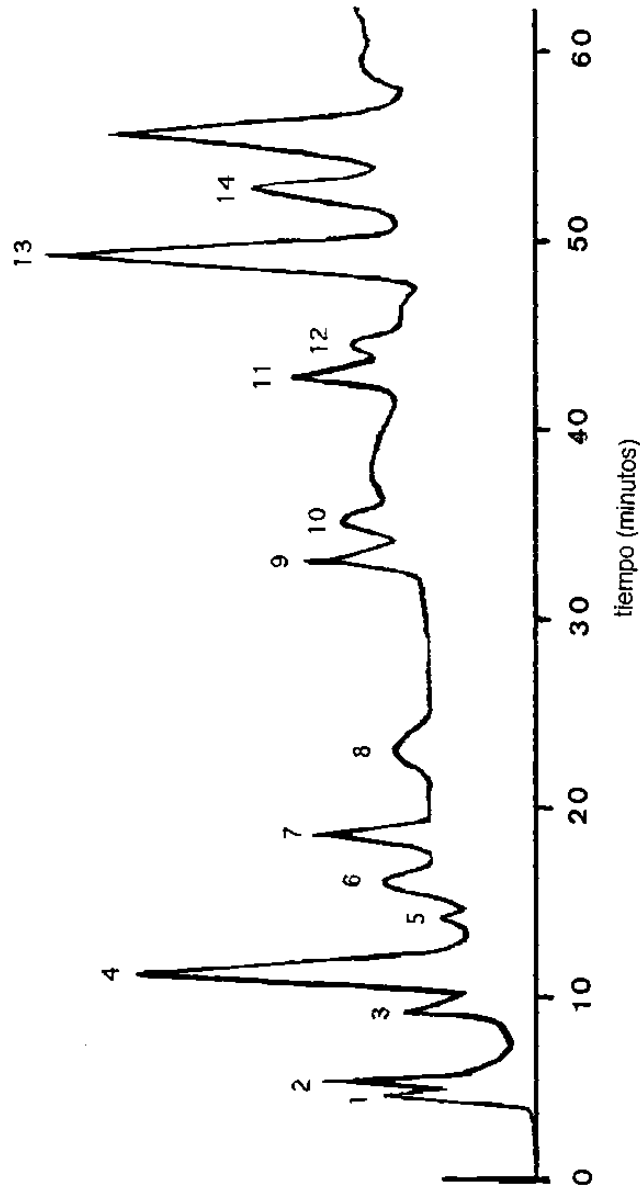


Figura 5.- Mezcla de estándares de aminoácidos derivados con fenilisotiocianato, separados con gradiente de elución a través de columna de fase inversa de ODS. 1) asp, 2) glu, 3) ser, 4) gli, 5) tre, 6) ala, 7) pro, 8) arg, 9) val, 10) met, 11) ile, 12) leu, 13) phe, 14) lys. Las condiciones de la separación se presentan en la Tabla III.

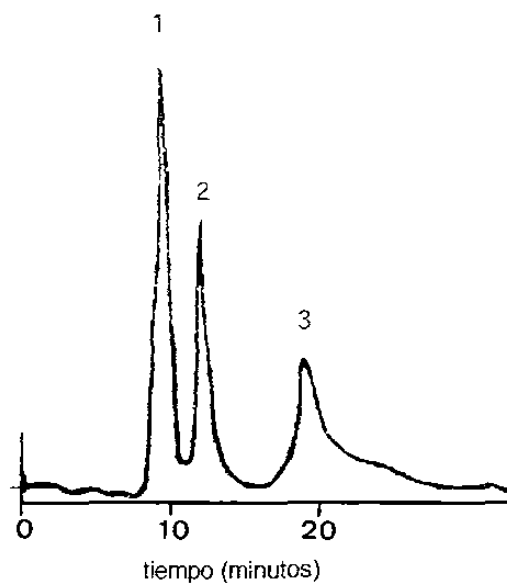


Figura 6.- Separación de aminoácidos aromáticos sin derivar a través de columna de fase inversa de ODS. Elución isocrática. 1) tír, 2) phe, 3) tpf. Eluyente: acetonitrilo : agua (60 : 40). Flujo: 1ml / minuto. Longitud de onda de la detección: 254 nm.

Cuando se trabajó con la mezcla de todos los aminoácidos, se encontró que a concentraciones superiores a los 2 nmoles, se perdía resolución (figura 7).

OPA/2ME.

El cromatograma presentado en la figura 8 muestra la separación de 17 aminoácidos derivados por el método del OPA/2ME. La secuencia de elución en este caso fue: Aspártico, glutámico, asparagina, serina, glicina, treonina, arginina, alanina, ácido gama amino butírico (GABA), tirosina, metionina, valina, triptófano, fenilalanina, isoleucina, leucina y lisina.

Al igual que en el caso del fenilisotiocianato, los tiempos de retención obtenidos presentan variaciones (tabla VI). Los tiempos de retención relativos con respecto al GABA, aminoácido que se empleó como estandar interno, también presentaron variaciones, aunque ligeramente menores. Sin embargo, el orden de elución de los aminoácidos siempre fue constante.

Se calcularon los factores de respuesta relativos del detector para cada uno de los aminoácidos derivados por el método del OPA/2ME, empleando como estándar interno el GABA; en la tabla VII son presentados junto con los coeficientes de variación respectivos. La determinación de los factores de respuesta presentados, se hicieron en base a la altura de los picos, ya que cuando se calcularon en base áreas, los coeficientes de variación obtenidos fueron mayores. Los cálculos de los factores de respuesta se realizaron en mezclas de estándares de distintas concentraciones (150, 75, 35.5 y

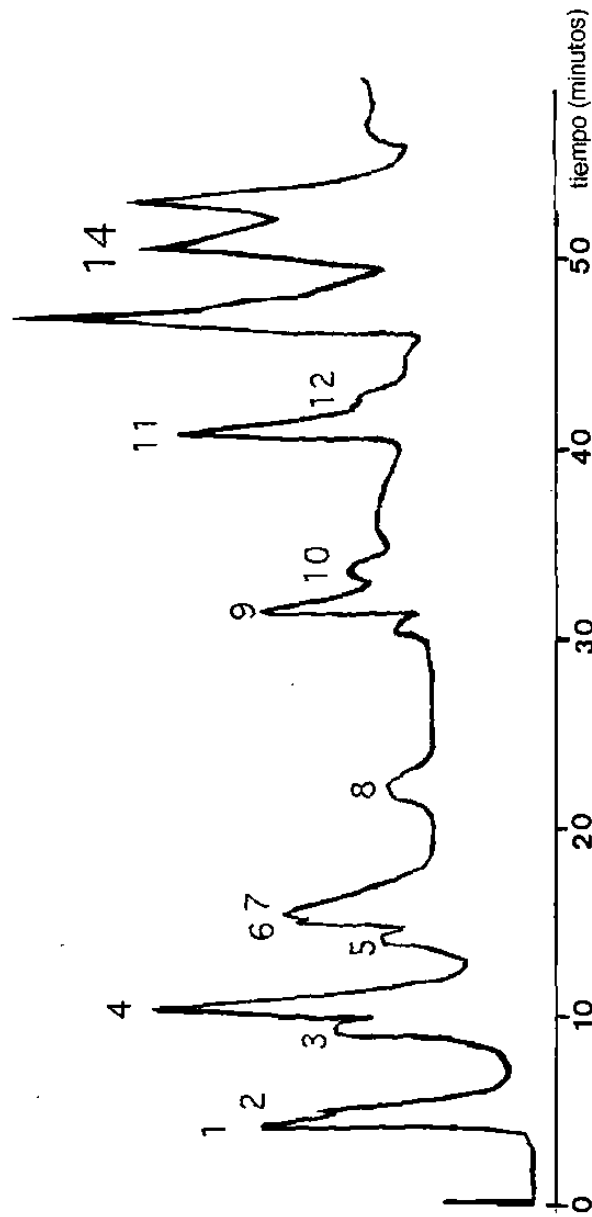


Figura 7.- Mezcla de estándares de aminoácidos derivados con fenilisotiocianato, separados con gradiente de elución a través de columna de fase inversa de ODS.1) asp, 2) glu, 3) ser, 4) gli, 5) tre, 6) ala, 7) pro, 8) arg, 9) val, 10) met, 11) ile, 12) leu, 13) phe, 14) lys. Las cantidades inyectadas fueron superiores a los 8 nanomoles de cada aminoácido. Las condiciones de la separación se presentan en la Tabla III.

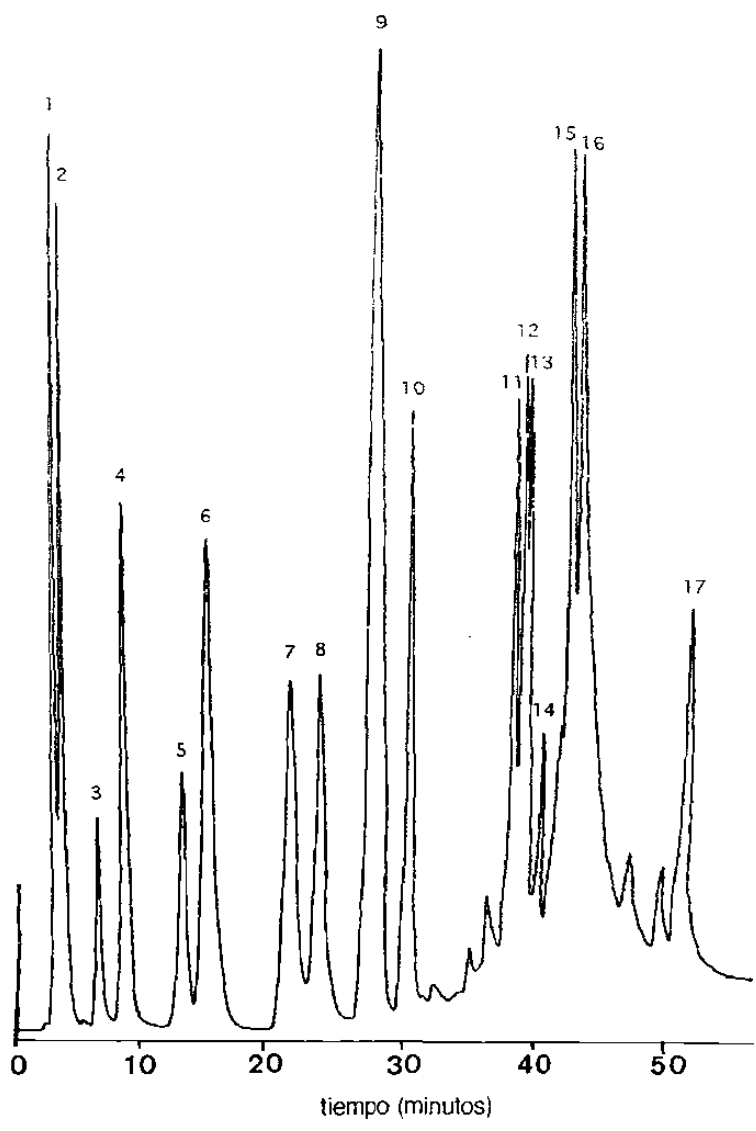


Figura 8.- Mezcla de estándares de aminoácidos derivados por el método del OPA/2ME. 1) asp, 2) glu, 3) asn, 4) ser, 5) gli, 6) tre, 7) arg, 8) ala, 9) GABA, 10) tir, 11) met, 12) val, 13) tpf, 14) phe, 15) ile, 16) leu, 17) lys. Las condiciones de la separación se presentan en tabla IV.

TABLA VI
Cálculo de los coeficientes de variación de los tiempos
de retención de los aminoácidos *

AMINOACIDO	No.de muestras	promedio	DS	CV
Ac. aspártico	5	3.8	0.02	2.63
Ac. glutámico	5	3.9	0.02	3.20
Asparagina	4	6.6	0.05	3.75
Serina	5	7.6	0.18	11.80
Glicina	4	13.2	0.06	2.26
Treonina	4	15.5	0.12	3.87
Alanina	4	24.8	0.14	2.81
Arginina	4	26.7	1.8	24.40
Tirosina	4	32.1	0.18	2.79
Metionina	4	39.5	0.07	0.88
Valina	5	40.8	0.21	2.57
Triptófano	5	42.1	0.15	1.78
Fenilalanina	5	43.7	0.15	1.71
Isoleucina	5	43.9	0.18	2.05
Leucina	5	44.8	0.20	2.23
Lisina	4	52.7	0.13	1.23

* Obtenidos de cromatogramas de mezclas de estándares, analizados en el mismo día y con el mismo eluente. Método del OPA/2ME.

TABLA VII

Factores de respuesta de los aminoácidos y coeficientes de variación*

AMINOACIDO	Factor de respuesta (promedio)	Coefficiente de variación
Alanina	0.725	7.9
Arginina	0.522	16.7
Asparagina	0.165	7.6
Ac. aspártico	1.020	10.6
Glicina	0.315	16.0
Ac. glutámico	0.675	11.3
Isoleucina	0.963	8.6
Leucina	0.759	10.3
Lisina	0.203	11.3
Serina	0.425	13.9
Tirosina	1.100	3.9
Treonina	0.409	17.1
Metionina	0.842	1.5

* obtenidos en base a la altura de los picos utilizando ácido gama amino butírico como estándar interno

16 picomoles). En los estándares de concentraciones de 8 picomoles, se encontraron mayores variaciones en la altura de los picos. Los coeficientes de variación para los factores de respuesta variaron, desde 1.5 para la metionina hasta 16.7 para la arginina.

ANALISIS DE MUESTRAS

El análisis de aminoácidos en los extractos etanólicos de los frutos mostró los siguientes resultados:

En el caso de la *K. humboldtiana*, la figura 9 muestra el cromatograma de un extracto etanólico de fruto verde colectado en el municipio de Garza García, N.L. en el año de 1989 derivado por el método del OPA/2ME. Este fruto correspondía a un primer estadio de maduración. En el cromatograma se observa la presencia de 3 aminoácidos: La asparagina, la arginina, y un tercer aminoácido que en principio se pensó que se trataba de la treonina, pero que cuando se sometió a análisis mediante el método del fenilisotiocianato (figura 10) y se realizó una co-cromatografía con estándar de treonina (figura 11), encontramos que se trataba de un aminoácido diferente, el cual no corresponde a ninguno de los estándares de que disponemos. La parte de los cromatogramas de tiempo posterior a los 35 minutos no se tomó en cuenta, ya que los cromatogramas de los extractos sin derivar presentan una intensa señal a ese tiempo (figura 12).

Los cromatogramas presentados en las figuras 13 y 14 corresponden a

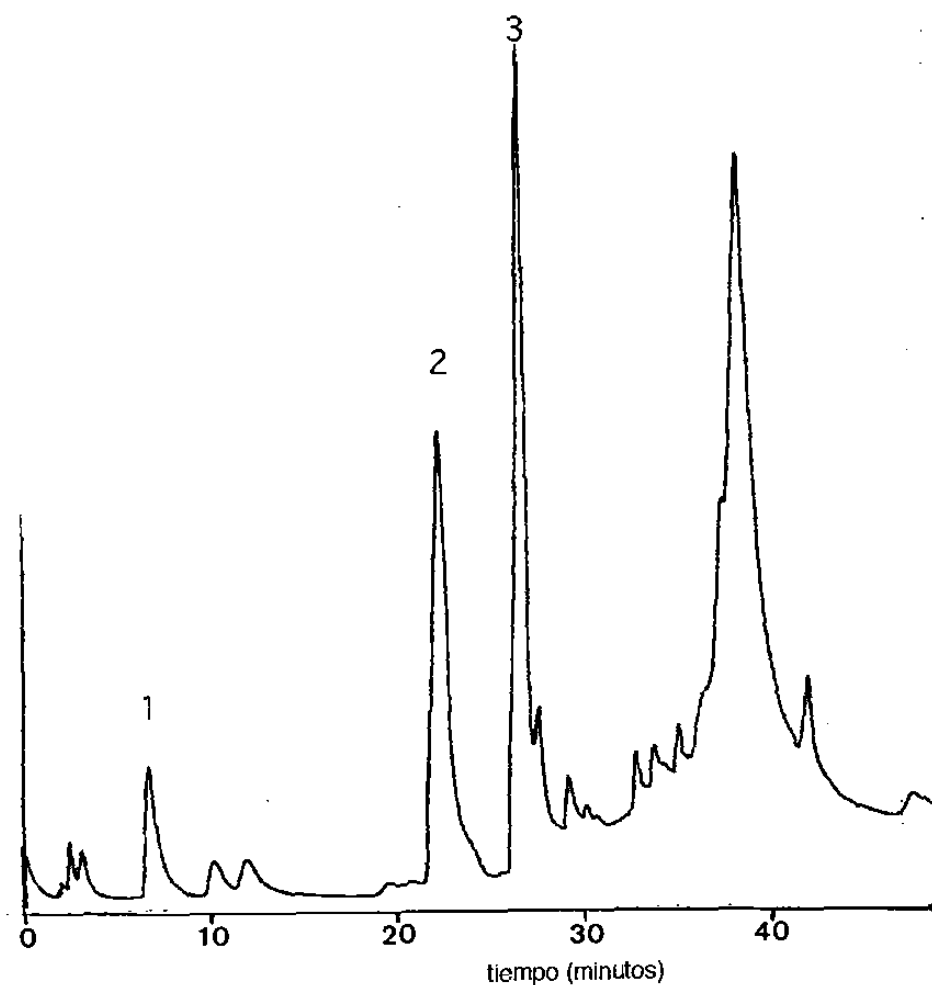


Figura 9.- Extracto etanólico de fruto verde de *K. humboldtiana* colectada en el municipio de Garza García, N.L. Derivado por el método del OPA/2ME. Primer estadio de maduración. 1) asparagina, 2) aminoácido no identificado, 3) arginina. Las condiciones de la separación se presentan en la tabla IV.

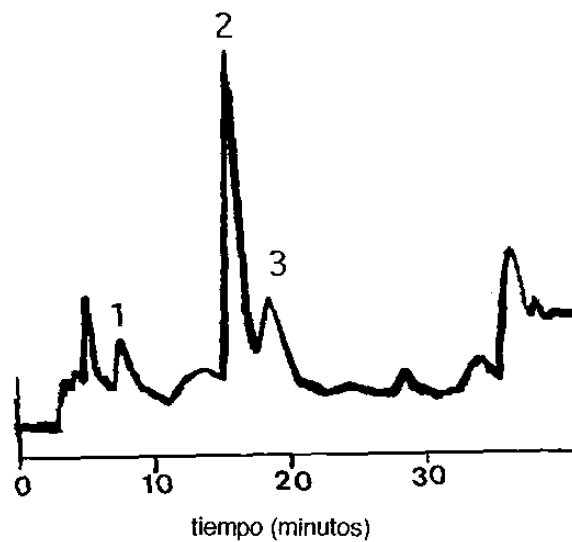


Figura 10.- Extracto etanólico de fruto verde de *K. humboldtiana* colectada en el municipio de Garza García, Nuevo León. Primer estadio de maduración. Derivado por el método del PITC. 1) asparagina, 2) aminoácido no identificado, 3) arginina. Las condiciones de la separación son presentadas en la tabla III.

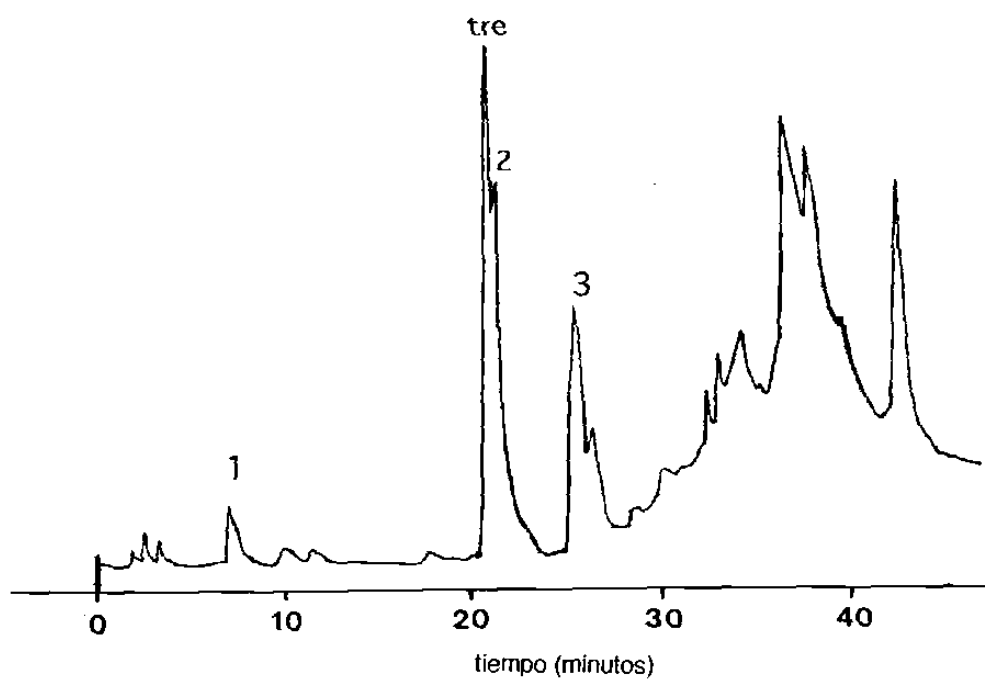


Figura 11.- Extracto etanólico del fruto verde de *K. humboldtiana*, primer estadio de maduración, adicionado con 20 picomoles de treonina y derivados con OPA/2ME. Las condiciones de la separación se presentan en la tabla IV.

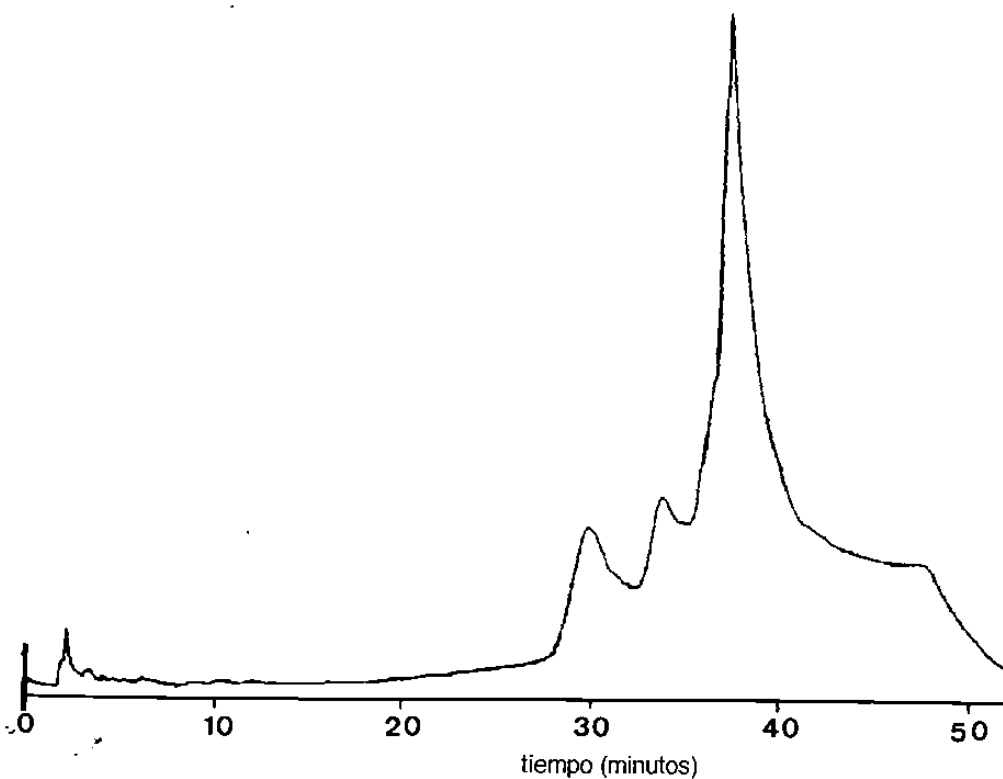


Figura 12.- Extracto etanólico de *K. humboldtiana* sin derivar. Se eluyó bajo las mismas condiciones empleadas en la separación de los extractos derivados por el método del OPA/ 2ME (Tabla IV). Se observa la presencia de compuestos fluorescentes propios de las plantas que eluyen después de los 35 minutos.

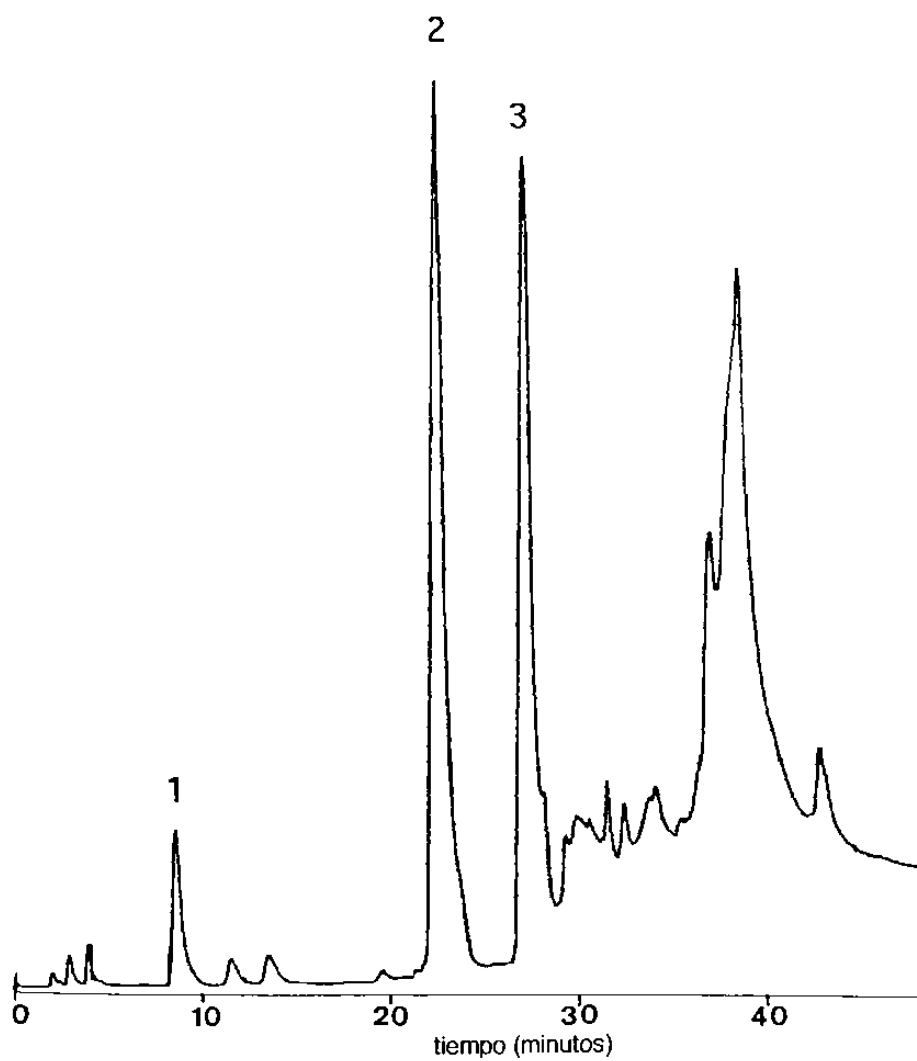


Figura 13.- Extracto etanólico de fruto verde de *K. humboldtiana* procedente de Garza García, N.L. Segundo estadio de maduración. Derivado por el método del OPA/2ME. 1) asparagina, 2) aminoácido no identificado 3) arginina. Las condiciones de separación se presentan en la tabla IV.

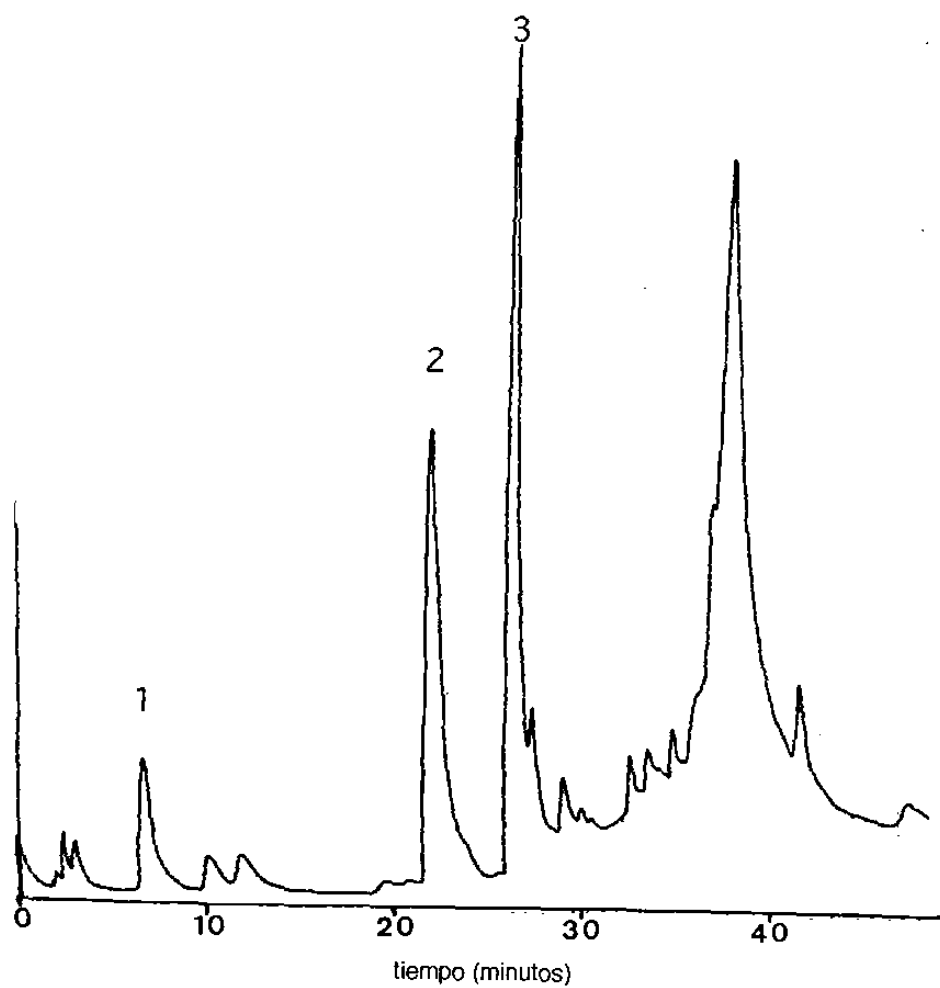


Figura 14.- Extracto etanólico de fruto verde de *K. humboldtiana* procedente de Garza García, N.L. Tercer estadio de maduración. Derivado por el método del OPA/2ME. 1) asparagina, 2) aminoácido no identificado y 3) arginina. Condiciones de separación en la tabla IV.

extractos de plantas colectados en 2 estadios posteriores de maduración del fruto verde en los cuales se encuentran presentes los mismos aminoácidos. En los tres estadios la proporción del pico correspondiente a la asparagina es inferior a la de los otros 2 aminoácidos.

El análisis de los extractos de fruto verde correspondiente a un cuarto estadio de maduración presentó un cambio notorio en la relación de estos 3 aminoácidos (figura 15). En este caso la altura del pico correspondiente a la asparagina aumenta notoriamente con respecto a los otros 2 aminoácidos. Este mismo cambio se observó en el extracto de fruto sometido a derivación con el fenilisotiocianato (figura 16).

El fruto maduro presentó un cromatograma muy similar al del cuarto estadio de maduración del fruto verde (figura 17).

El análisis por ambos métodos de la *K. affinis humboldtiana* presentó un predominio en la altura del pico correspondiente a la asparagina, como se observa en las figuras 18 y 19.

El cálculo de la relación de alturas de los picos correspondientes a los 3 aminoácidos es presentada en la tabla VIII. Pudimos apreciar que en los 3 primeros estadios se mantiene una menor relación de la asparagina con respecto a los otros aminoácidos. En el cuarto estadio y en el fruto maduro se invierte totalmente la relación.

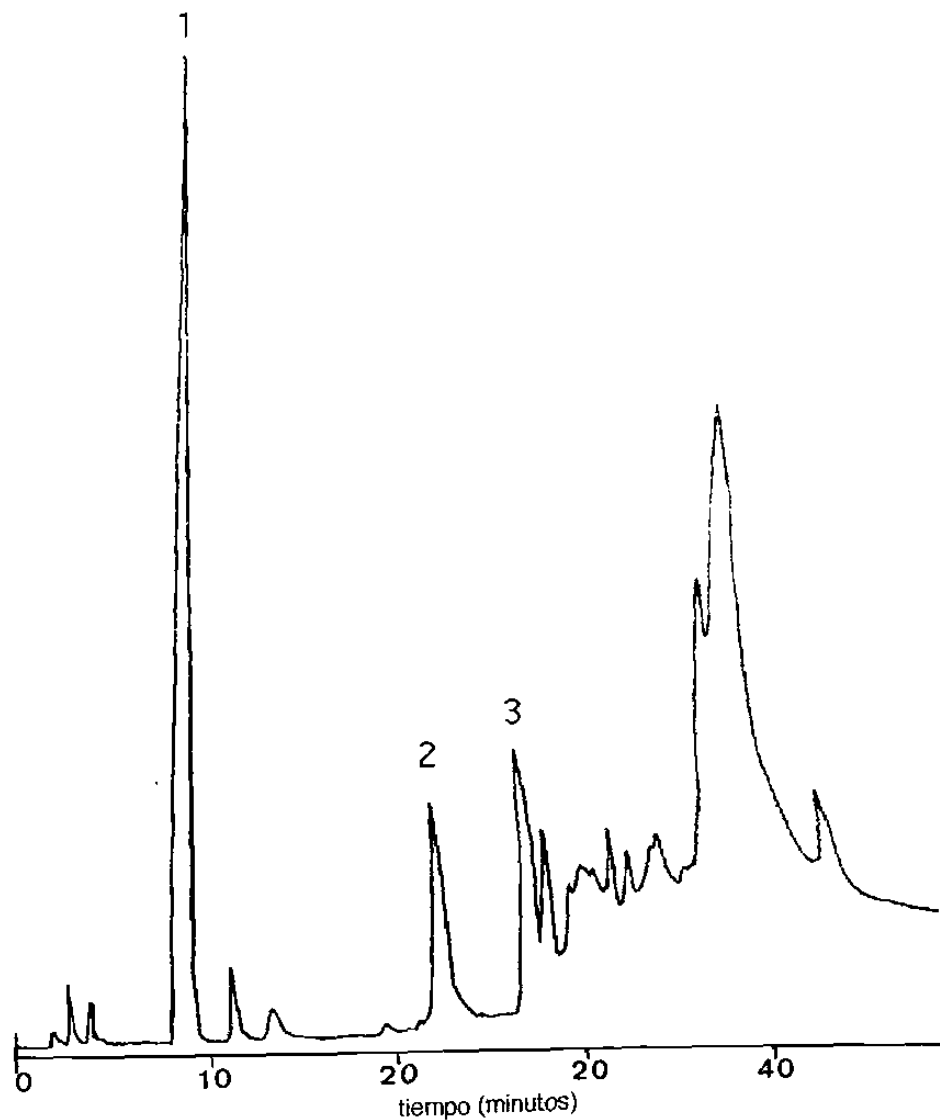


Figura 15.- Extracto etanólico de fruto verde de *K. humboldtiana* procedente de Garza García, N.L. Cuarto estadio de maduración. Derivado por el método del OPA/2ME. 1) asparagina, 2) aminoácido no identificado, 3) arginina. Condiciones se presentan en tabla IV.

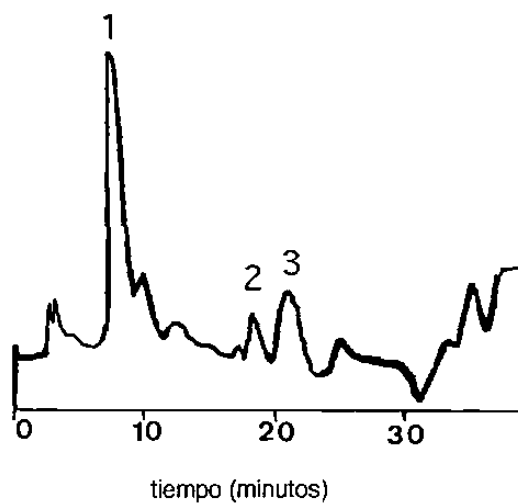


Figura 16.- Extracto etanólico de fruto verde de *K. humboldtiana* procedente de Garza García, N.L. Cuarto estadio de maduración. Derivado por el método PITC. 1) asparagina, 2) aminoácido no identificado, 3) arginina. Las condiciones de la separación se presentan en la tabla III.

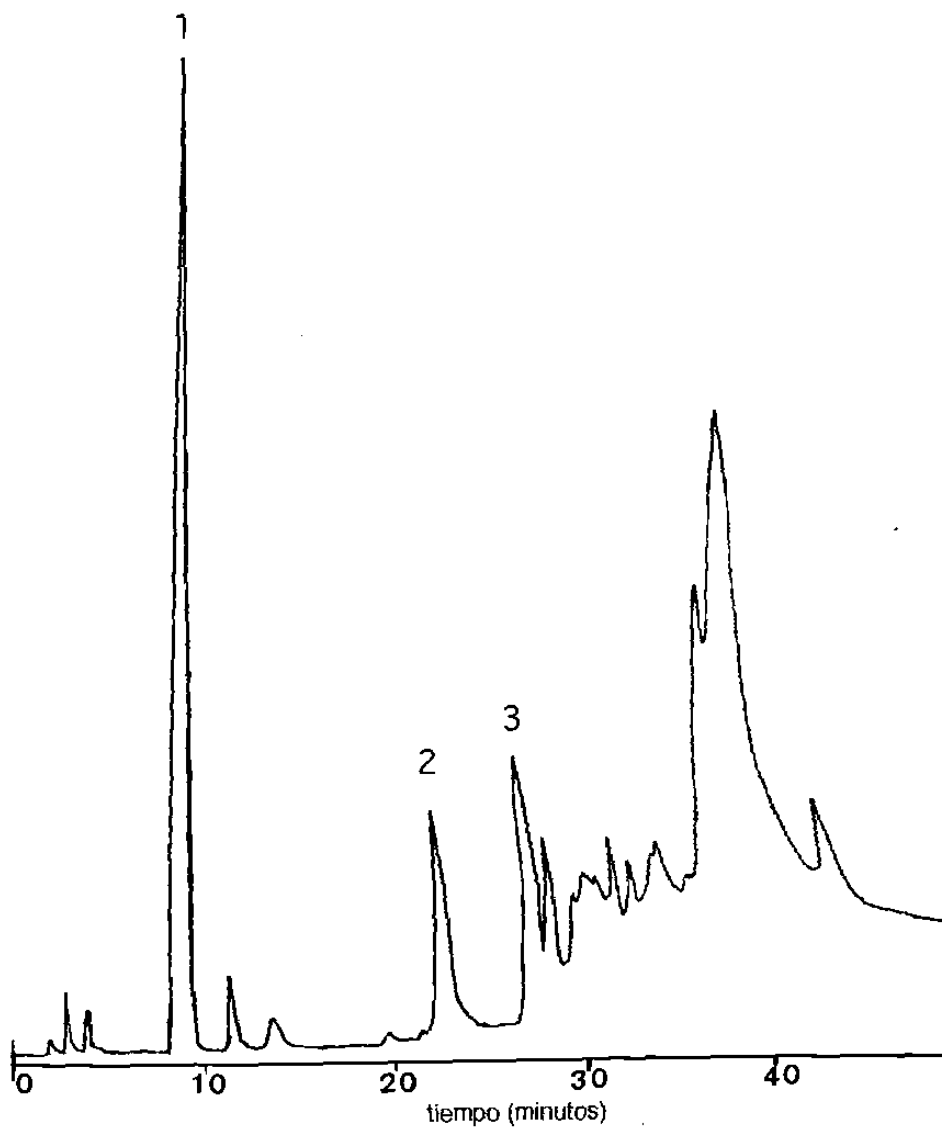


Figura 17.- Extracto etanólico de fruto maduro de *K. humboldtiana* procedente de Garza García, N.L. Derivado por el método OPA/2ME. 1) Asparagina, 2) aminoácido no identificado 3) Arginina. En la Tabla IV se presentan las condiciones de la separación.

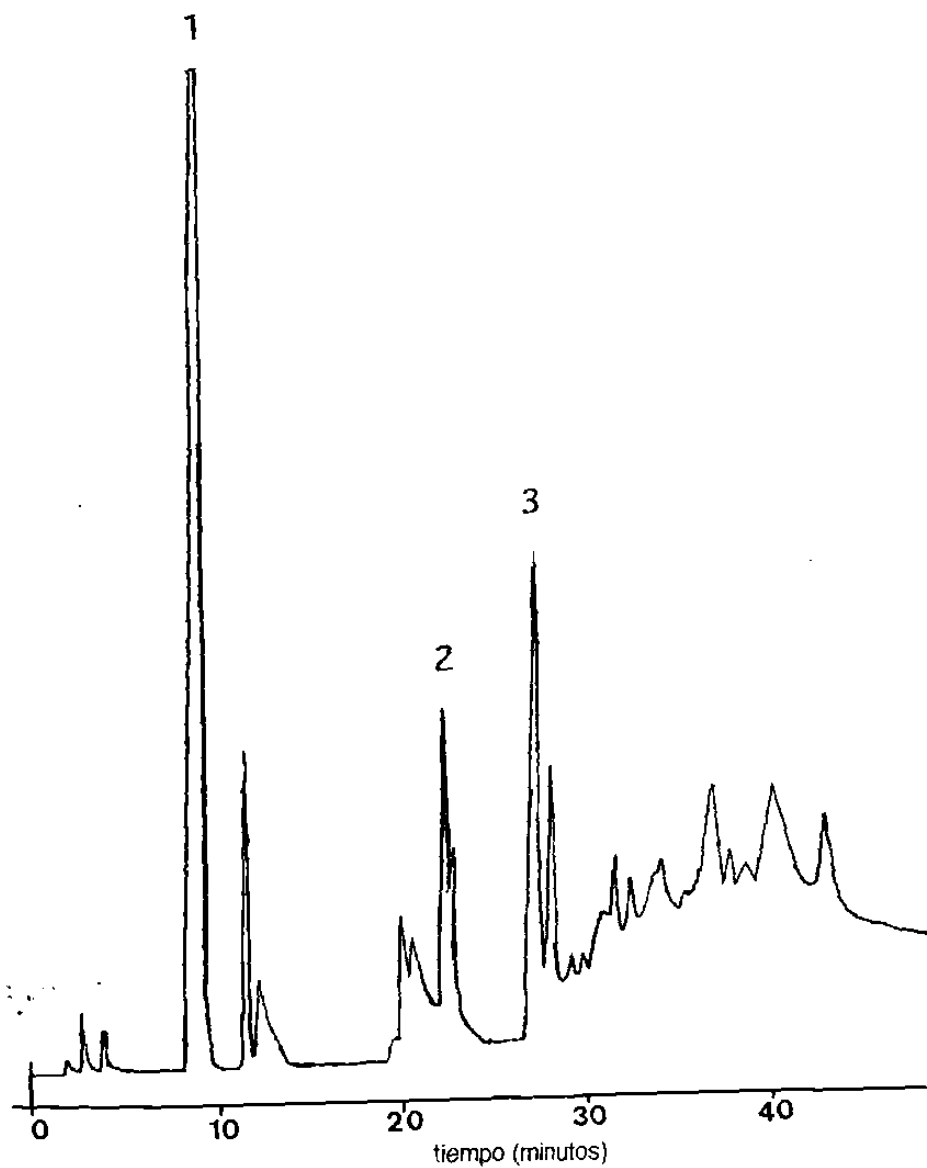


Figura 18.- Extracto etanólico de fruto verde de *K. affin humbolditiana*. Derivado por el método del OPA/2ME. 1) asparagina, 2) aminoácido no identificado, 3) arginina. Las condiciones de la separación se encuentran en la tabla IV.

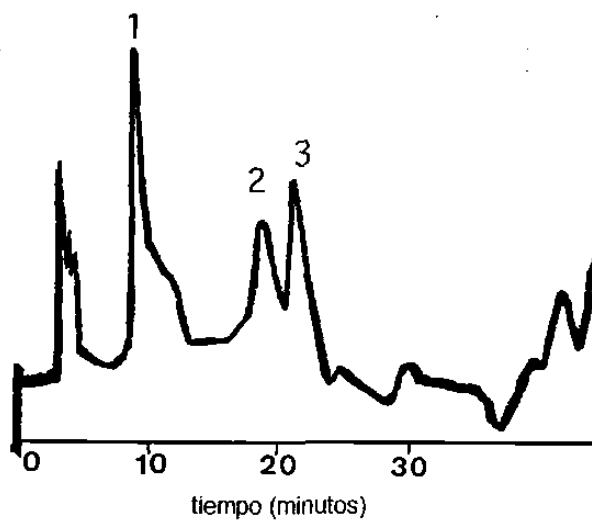


Figura 19.- Extracto etanólico de fruto verde de *K. affin humboldtiana* derivado por el método de PITC. 1) asparagina, 2) aminoácido no identificado 3) arginina. En la tabla III se encuentran las condiciones empleadas en la separación.

TABLA VIII

Relación de altura de aminoácidos presentes en *K. humboldtiana*
de diferentes estadios de maduración.

Estadio de maduración	AMINOACIDOS		
	A	B	C
PRIMERO	1	5.80	6.70
SEGUNDO	1	6.70	5.30
TERCERO	1	3.50	6.50
CUARTO	1	0.26	0.22
F. MADURO	1	0.28	0.30

A = ASPARAGINA

B = AMINOACIDO NO IDENTIFICADO

C = ARGININA

En cuanto a plantas estudiadas de *K. humboldtiana* de otras procedencias, en la tabla IX se muestran las relaciones de altura de los 3 aminoácidos. En todos los casos se encontró una mayor proporción de la altura correspondiente al aminoácido asparagina.

La tabla X presenta la relación de altura de los picos de los tres aminoácidos en otras tres especies diferentes del género *Karwinskia*: *K. affin humboldtiana*, *K. rzdowskii* y *K. parvifolia*, encontrándose en ellas un predominio del aminoácido asparagina. Para el caso de la *K. affin humboldtiana* la relación de aminoácidos es muy semejante al cuarto estadio de maduración del fruto verde y al fruto maduro de la *K. humboldtiana* colectada en el municipio de Garza García, N.L.

TABLA IX

Relación de altura de aminoácidos en *K. humboldtiana*
de diferentes procedencias.

Procedencia	AMINOACIDOS		
	A	B	C
LOS RAMONES, N.L.	1	0.40	0.65
CIENEGA DE FLORES, N.L.	1	-	0.60
LINARES, N.L. (árbol)	1	0.05	0.44
LINARES, N.L. (arbusto) FSM*	1	0.09	0.75
QUERETARO	1	0.36	0.71

A = ASPARAGINA

B = AMINOACIDO NO IDENTIFICADO

C = ARGININA

* Fruto semi-maduro

TABLA X

Relación de alturas de aminoácidos en otras especies
del género *Karwinskia*

ESPECIE	A	B	C
<i>K. affin humboldtiana</i>	1	0.275	0.425
<i>K. rzedowskii</i>	1	0.210	0.586
<i>K. parvifolia</i>	1	0.022	0.355

A = ASPARAGINA

B = AMINOACIDO NO IDENTIFICADO

C = ARGININA

DISCUSION

En el presente trabajo se comparan dos métodos de determinación de aminoácidos por cromatografía de líquidos de alta resolución. Ambos se basan en la separación en columna de fase inversa. Los reactivos de derivación y sistemas de detección utilizados son distintos.

La reacción de derivación con el PITC es rápida, se lleva a cabo a temperatura ambiente y los PTC-aminoácidos formados son estables indefinidamente a temperatura ambiente cuando son mantenidos en condiciones anhidras⁽¹²⁾. Nuestra experiencia confirmó que no se presentan variaciones en los cromatogramas aún dos semanas después de la formación del derivado. La eliminación de los reactivos de derivación es importante, ya que su presencia puede producir aberraciones notorias principalmente en la primera parte del cromatograma⁽⁴¹⁾. Si bien, para eliminarlos no es imprescindible llevar a sequedad la muestra⁽⁴¹⁾, sobre todo cuando se va a realizar la separación inmediata, en nuestra experiencia lo consideramos útil ya que de esta manera el derivado formado es más estable y las muestras así procesadas pueden ser analizadas posteriormente. Una limitante que se reporta cuando el compuesto derivado es llevado a sequedad, es la dificultad que se presenta para su solubilidad⁽⁴¹⁾. En el caso del presente trabajo el uso del eluyente A permitió obtener buenos resultados de solubilidad.

La derivación con el reactivo OPA/2ME, presenta las ventajas de poder llevarse a cabo fácilmente a temperatura ambiente, en un medio acuoso, es cuantitativamente reproducible y los productos generados son altamente fluorescentes, por lo que se obtiene una gran sensibilidad. La reproducibilidad y la sensibilidad pueden ser afectados cuando los tiempos de desarrollo de la técnica no son estrictamente controlados, ya que no todos los aminoácidos pierden su actividad fluorescente en el mismo tiempo. Esta limitación puede ser eliminada con el uso de equipo automatizado para la derivación pre-columna⁽²⁹⁾, sin embargo esto implica costo adicional.

La estabilidad del reactivo OPA/2ME, puede ser mantenida indefinidamente a temperatura ambiente, restableciéndole reactividad con la adición frecuente del 2ME; sin embargo, existen reportes que indican la formación de turbidez y disminución de su actividad, así como la formación de un producto de degradación del reactivo⁽⁴⁾. Nosotros pudimos observar la aparición de dicho producto que presenta un tiempo de retención cercano al de la arginina y en ocasiones aumentaba de manera artificial la altura de la señal correspondiente a este aminoácido en las muestras

Si bien la sensibilidad reportada para ambos métodos es a nivel de picomoles^(12,41), en nuestro caso, la sensibilidad del detector UV empleado para la determinación de los derivados con PITC, solamente nos permitió detectar concentraciones de nanomoles. Esto disminuyó notablemente el

poder de resolución, debido probablemente a una sobrecarga de la columna⁽⁴²⁾. Por dicha razón no fue posible determinar factores de respuesta de aminoácidos a través de este método.

Aunque los límites de detección de los OPA aminoácidos son inferiores a los 8 picomoles, nosotros encontramos que los coeficientes de variación de los factores de respuesta son más elevados a estas concentraciones.

Por otro lado el método del fenilisotiocianato presenta la ventaja de poder detectar iminoácidos como la prolina, lo cual no es posible empleando el método del OPA/2ME a menos que ésta sea oxidada previamente⁽¹²⁾

Los factores de respuesta del detector a los aminoácidos derivados, se realizaron en base a altura de los picos, ya que los calculados en base a áreas presentan coeficientes de variación mayores. Estas observaciones coinciden con lo reportado por otros autores^(4,43).

Muchos de los análisis cromatográficos están basados en el supuesto de que los tiempos de retención para un compuesto dado permanecen constantes cuando las condiciones de la separación no cambian. Sin embargo, pueden ocurrir cambios muy notorios en los tiempos de retención debido a varios factores. Entre las causas que provocan estos cambios están las variaciones en la temperatura, la velocidad de flujo y las variaciones en la composición de la fase móvil. Cuando ocurren fluctuaciones en los flujos tanto los

tiempos de retención absolutos como los relativos no son constantes y varían de corrida a corrida. Los cambios en la composición de la fase móvil pueden provenir de varias causas: errores en la preparación manual de la fase móvil, errores provenientes de mal funcionamiento del mezclador, evaporación selectiva de un solvente, toma de dióxido de carbono del aire con cambio consiguiente del pH. En fase inversa, cambios de 0.01 unidades de pH, pueden producir cambios de hasta un 1% en el tiempo de retención. Cambios de 1% del solvente orgánico en la fase móvil pueden producir hasta 10% de cambio en los tiempos de retención⁽⁴³⁾.

Cuando se cambia la composición de la fase móvil o la temperatura, se requiere un cierto tiempo para que la columna sea reequilibrada. Si el tiempo utilizado para establecer el equilibrio no es suficiente, los tiempos de retención varían notoriamente.

Efectos como desactivación o saturación de la columna así como las interacciones de la muestra con la fase estacionaria pueden conducir también a cambios notorios en los tiempos de retención.

La mayoría de las técnicas empleadas en la separación de los PTC-aminoácidos, se llevan a cabo en columnas mantenidas a temperatura constante (37 °C o mayores)^(12,19,41), lo cual permite eluciones más rápidas y mayor reproducibilidad en los tiempos de retención. Si bien el control de la temperatura hubiera sido ideal, las condiciones de nuestro equipo no nos

permitieron realizarlo. En este caso se efectuaron co-cromatografías con estándares conocidos, con lo que logramos una aproximación a la identificación de los compuestos.

Para la determinación de los tiempos de retención relativos se empleó el ácido gama amino butírico, ya que no se encuentra presente en las plantas analizadas. Los coeficientes de variación que obtuvimos para los tiempos de retención relativos son muy semejantes a los que se obtienen con tiempos de retención absolutos. Cuando se realiza separación con gradiente de elución, es recomendado emplear varios estándares internos para obtener coeficientes de variación menores⁽⁴⁾.

La selección de la composición de los eluentes fue basada en el trabajo publicado por Garza Ulloa ⁽⁴⁾ con algunas modificaciones.

El aire disuelto en la fase móvil puede interferir en la separación cromatográfica causando burbujas en el sistema, o disminuyendo la respuesta del detector ya sea por desplazamiento de la línea base o por problemas de apagamiento en el caso de la fluorescencia⁽⁴³⁾. Las burbujas se forman cuando las mezclas de la fase móvil presentan sobresaturación de aire; esto sucede cuando la solubilidad del aire en la mezcla es significativamente menor en los solventes puros. Este tipo de problemas se presenta frecuentemente en la fase inversa, donde uno de los solventes es agua.

Para la conservación de la composición del eluente, ha sido recomendado la filtración de los solventes por separado antes de su mezcla. En este trabajo tanto el eluente A como el B fueron preparados y posteriormente filtrados al vacío, ya que la sonicación no fue suficiente para desgasificar. El uso de vacío es, después del burbujeo con helio el método más recomendado para la desgasificación de solventes. Si la fase móvil es filtrada al vacío, la desgasificación se lleva a cabo consecuentemente y es aún más efectiva si ésta se lleva a cabo directamente sobre el reservorio de la fase⁽⁴³⁾.

En cuanto a la separación de los aminoácidos, la secuencia metionina, valina, triptófano, no se logró resolver completamente por el método del OPA, mientras que el par glutámico-aspártico presentó mejor resolución por este método que por el del PITC. El par leucina-isoleucina, que por cromatografía en capa fina no es posible resolver, presentó buena resolución por ambos métodos.

La extracción de los aminoácidos de las plantas en estudio se realizó siguiendo el procedimiento de Dunnel y Fowden, el cual ha sido empleado para la extracción de aminoácidos no proteicos de semillas de distintos géneros, entre ellas leguminosas ⁽⁴⁰⁾.

El análisis de los aminoácidos presentes en los extractos de las plantas se realizó tanto por el método del PITC como por el del OPA/2ME con el objetivo de comparar resultados, los cuales coincidieron en ambos casos.

Los perfiles obtenidos de los cromatogramas de las muestras analizadas son cualitativamente semejantes, sin embargo presentan diferencias cuantitativas importantes. La presencia de los tres aminoácidos (asparagina, arginina, y el aminoácido no identificado) es común a todas las muestras analizadas, excepto en el caso de la planta colectada en el municipio de Ciénega de Flores, en la cual no se detectó la presencia del aminoácido no identificado.

La relación de la concentración de estos aminoácidos varió notoriamente tanto con el período de maduración en el que se encontraba así como con el lugar de procedencia de la planta, esta última debido probablemente a variaciones en la composición del suelo⁽⁴⁵⁾

Ya que el perfil de aminoácidos que presenta el fruto de la *K. affin humboldtiana* es muy similar al que presentan algunos de los frutos de *K. humboldtiana*, además de las grandes variaciones que existen en la relación cuantitativa de los aminoácidos, no nos fue posible utilizar el patrón de aminoácidos como criterio de ayuda en la diferenciación de especies.

CONCLUSIONES

- 1) De los métodos analizados, el del Ortoftaldehído, /2 Mercaptoetano presenta ventajas como mayor sensibilidad y mejor resolución; si bien en ocasiones pueden ser complementarios.
- 2) En nuestro caso, no es posible emplear los perfiles de aminoácidos como ayuda para la clasificación taxonómica de las diferentes especies de *Karwinskia*, ya que las especies estudiadas contienen los mismos aminoácidos; además se presenta una gran variación en la proporción de estos dentro de la misma especie.

BIBLIOGRAFIA

1. Biological Biomedical Applications of Liquid Chromatography. Vol 10 *Chromatografic Science series*. Ed. Hawk Gerald. 147 y 148, 1980.
2. Horvath Csaba. *High Performance Liquid Chromatography. Advances and Perspectives*. Vol 2 Academic Press Inc., 77, 1980.
3. Sarwar G., Botting H.G., and Peace Robert W. Vitamins and Other Nutrients Complete Amino Acid Analysis in Hidrolysates of Foods and Feces by Liquid Chromatography of Precolumn Phenylisothiocyanate Derivatives. *J. Assoc off Anal. Chem.*. Vol.71 no.6, 1172-1175, 1988.
4. Garza Ulloa, Garza Cantú R. and Canales Gajá A.M. Determination of Amino Acids in Wort and Beer by Reverse-Phase High-Performance Liquid Chromatography. *ASBC Journal*. Vol. 44 No. 2, 1986.
5. Srinivasan. The origins of modern *Biochemistry*. *Academy of Science Annals*. Vol 325 237-247, May 31 1979
6. Thomas R.R. *Selected Screening Test for Genetic Metabolic Diseases*. Year Book Medical Publishers. Cap. 3 y 4 1977.
7. Youdim M B H Editor *Aromatic Aminoacid Hidroxilases and Mental Disease*. John Willey and Sons. 1979.
8. Meister Alton. *Biochemistry of the amino Acids*. Academic Press Inc. Cap.4 1957.
9. Blackburn S. *Amino Acid Determination Methods and Techniques*. 2a. ed. 1978.
10. Bohinski. *Bioquímica*. Fondo Educativo Interamericano S.A. Cap. 2. 1978.

11. Davey J.F. and Ersser R. S. Aminoacid analysis of fisiological fluids by high-performance liquid chromatography with phenylisothiocyanate derivatization and comparison with ion-exchange chromatography. *Journal of Chromatography*. Vol 528, 9-23,1990.
12. Heinrikson R. L. and Meredith Stephen C. Aminoacid analysis by Reverse- Phase High Performance Liquid Chromatography: Precolumn Derivatization with Phenylisothiocyanate. *Analytical Biochemistry* Vol. 136, 65-74, 1984.
13. Simmons J. and Schlesinger D. H. High-Performance Liquid Chromatography of Side-Chain-Protected Aminoacid Phenylthiohydantoin. *Analytical Biochemistry* Vol.104, 254-258, 1980.
- 14.- Tarr G.E. Rapid Separation of aminoacid Phenylthiohydantoin by Isocratic High Performance Liquid Chromatography. *Analytical Biochemistry* Vol. 111, 27- 32, 1981.
15. Henderson L.E., Copeland T.D. , Oroszlan S. Separation of Aminoacid Phenylthiohydantoin by High Performance Liquid Chromatography on Phenylalkyl Support. *Analytical Biochemistry* Vol. 102, 1-7, 1980.
16. Dimari S.J. Robinson J.P. and Hash J.H. Use of a Ternary Gradient for The Separation of Phenyl Thiohydantoin-Amino Acids, including the Methyl Esters of aspartic and glutamic acids, by High Performance Liquid Chromatography. *Journal of Chromatography*. Vol. 213, 91-97, 1981.
17. Zielke H. R. Determination of amino acids in the brain by high-performance liquid chromatography with isocratic elution and electrochemical detection. *Journal of Chromatography*. Vol. 347, 320-324, 1985.
18. Johnson N.D., Hunkappiller M.W. and Hood L.E. Analysis of Phenylthiohydantoin Amino Acids by High- Performance Liquid Chromatography on DuPond Zorbax Cyanopropylsilane Columns. *Analytical Biochemistry*. Vol. 100, 335-338, 1979.

19. Yang C. Y. and Sepúlveda F. Separation of Phenylthiocarbamyl Amino Acids by High-Performance Liquid Chromatography on Spherisorb Octadecylsilane Columns. *Journal of Chromatography*. Vol. 346, 413–416, 1985.
20. Heinrikson R. L. and Meredith S. C. Amino Acid Analysis by Reverse Phase High-Performance Liquid Chromatography: Precolumn Derivatization with Phenylisothiocyanate. *Analytical Biochemistry*. Vol 136, 65-74, 1984.
21. Wernicke R. Separation of Underivatized Amino Acid Enantiomers by Means of a Chiral Solvents-Generated Phase. *Journal of Chromatographic Science*. Vol 23, 39-46, January, 1985.
22. Kamisaki Y., Takao Y. and Itoh T. Determination of Gama Amino-butyric acid in Human Cerebrospinal Fluid by Isocratic High-Performance Liquid Chromatography. *Journal of Chromatography*. Vol. 529, 417- 423, 1990.
23. Rosenlud B.L. Time- Saving Method for the Reverse-Phase High-Performance Liquid Chromatography of Phenylthiocarbamylamino Acid Derivatives of Free Amino Acids in Plasma. *Journal of Chromatography*. Vol. 529, 258-262, 1990.
24. Allison L.A. O-Phtalaldehyd Derivatives of Amines of High-Speed Liquid Chromatography/ Electrochemistry *Anal Chem.*. Vol. 56, 1089, 1984
25. Horvath Csaba *High Performance Liquid Chromatography. Advances and perspectives*. Vol. 2, 289, 1980.
26. Bell E A. Non-Protein Amino Acids in Plants: their Chemistry and Possible Biological Significance. *Rev. Latinoamer. Quim*. Vol. 11, 16–23, 1980.
27. Evans C. S., Queshi M Y. and Bell E. Free Amino Acids in the Seeds of Acacia Species. *Phytochemistry*. Vol 16, 565-570, 1977.

28. Upadhtata L., Singh S.K. Phytochemical Evaluation of *Cassia obtusifolia* and *Cassia Tora*. *Proc. Indian Acad Sci, Plant Sci.* Vol 96, No.4, 321-326, 1986.
29. Padron Puyou, F, “Estudio Clínico Experimental de la parálisis por *K. humboldtiana* (Tullidora) en niños. *Gaceta Med. México*, Vol. 81, 299, 1951.
30. Bermúdez M.V., González Spencer D, Guerrero M. Waksman N. and Piñeyro A. “Experimental Intoxication with fruit and purified toxins of Buckthorn (*K. humboldtiana*)” *Toxicon*. Vol. 24; 1091, 1986.
31. Bermúdez, M.V., Toxicidad aguda de *Karwinskia humboldtiana* en diferentes especies de animales. Disertación Doctoral U.A.N.L., Monterrey, N.L. 1989.
32. Clavijero, F.X. *Historia de la Antigua o Baja California*, México, D.F.. Editorial Porrúa S.A., 3era Ed, 31-32, 1982.
33. Waksman N., Martínez L. and Fernández Nava R. Chemical and Toxicological screening in genus *Karwinskia*. *Rev. Latinoam. Quim.* Vol. 20, 27, 1989.
34. Fernández Nava, R. El género *Karwinskia* Zucc. (Rhamnaceae) en México. Tesis. Esc. Nac. de Ciencias Biológicas. México, D.F. 1988.
35. Dreyer, D., Arai, I., Bachman, C., Anderson, W., Smith, R. and Daves, D. Jr. Toxins Causing Noninflammatory Paralytic Neuropathy. Isolation and Structure Elucidation. *J.Am. Chem. Soc.* Vol 97, 4986, 1985.
36. Dominguez X.A., Temblador, S. y Cedillo, M.E. Estudio químico de la raíz de la Tullidora (*K. humboldtiana*, Zucc). *Rev. Latinoamer. Quim.* Vol. 7, 46, (1976).
38. Castillo J. M. y Waksman N. Estudio Comparativo de los Aceites Aislados de las Distintas Especies de *Karwinskia*. XIII Simposium Internacional de Productos Naturales, Monterrey, México. Abril, 1986.

39. Rivas V., Torres M. R. and Waksman N. Dimeric anthracenones from *Karwinskia* species, *Planta Medica*. Vol. 56, 562, 1990.
40. Harborne J.B. "*Phytochemical Methods*" (Science paperbacks). Chapman and Hall, 1980.
41. Thoma R. S. and Crimmins Dan L. Automated Phenylthiocarbamil amino acids analysis of carbopeptidase/ aminopeptidase digest and acid hidrolysated. *Journal of Chromatography*. Vol. 537, 153-165, 1991.
42. Yost R.W., Etre L.S., Conlon R.D. *Introducción a la Cromatografía Líquida Práctica*. Perkin Elmer, 56, 1980
43. Dolan J.W. and Snyder L.R. *Troubleshooting L C Systems*. Humana Press Clifton, New Jersey, 1989.
44. Katz E. *Quantitative Analysis using Chromatographics Techniques*. John Wiley and Sons, Capítulo 3, 1987.
45. Vasconcelos A.M. Chaves das Neves H.J. Characterization of Elementary Wines of *Vitis vinifera* Varieties by Patterns Recognition of Free Amino Acid Profiles. *J.Agric Food Chem*. Vol. 37, 931-937, 1989.

