

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE AGRONOMIA
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO



DESARROLLO DE UN METODO POR
CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS DE ALTA
RESOLUCION PARA ANALISIS DE AMINOACIDOS
EN INGREDIENTES UTILIZADOS EN LA
ALIMENTACION ANIMAL

POR
JUANA ARANDA RUIZ

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL
GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS PECUARIAS
CON ESPECIALIDAD EN NUTRICION ANIMAL

DICIEMBRE, 2002

TD
Z5071
FA
2002
.A7

TD
Z5071
FA
2002
.A7



1020148806

314320

TD
Z5071
FA
20 2
.A7



**FONDO
TESIS**

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE AGRONOMIA
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO



DESARROLLO D UN METODO PO
CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS DE ALTA
RESOLUCION PARA ANALISIS DE AMINOACIDOS
EN INGREDIENTES UTILIZADOS EN LA
ALIMENTACION ANIMAL

POR
JUANA ARANDA RUIZ

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL
GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS PECUARIAS
CON ESPECIALIDAD EN NUTRICION ANIMAL

DICIEMBRE, 2002

**DESARROLLO DE UN MÉTODO POR CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA
RESOLUCIÓN PARA ANÁLISIS DE AMINOÁCIDOS EN INGREDIENTES
UTILIZADOS EN LA ALIMENTACIÓN ANIMAL**

Aprobación de Tesis:




Ph. D. Rigoberto González González. Asesor Principal

Dr. Ing. Quím. José Ma. Viader Salvadó. Asesor Externo



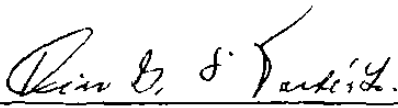
Ph. D. Emilio Olivares Sáenz. Co-Asesor



Ph. D. Erasmo Gutiérrez Ornelas. Co-Asesor



Dr. sc. agr. Hugo Bernal Barragán. Co-Asesor



Ph. D. Ciro G. S. Valdés Lozano
Subdirector de Estudios de posgrado

DEDICATORIA

A mi madre. Efigenia Ruiz de Aranda.

A mi esposo. Javier Jaime Hinojosa Espinosa.

A mis hijos. Javier Alejandro y Jaime Daniel.

A mi hermana. Ma. de los Ángeles Aranda Ruiz.

A todos ellos por el amor y comprensión que siempre me han brindado.

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi agradecimiento a las siguientes personas e instituciones:

Al Ph. D. Rigoberto González González, asesor principal, por su buena disposición para orientarme durante el desarrollo de este trabajo, y por su atinada dirección en la realización de esta tesis.

Al Dr. José Ma. Viader Salvadó, asesor externo, por todo el tiempo que me dedicó, mostrando siempre paciencia y disponibilidad y sobre todo, por el conocimiento que adquirí, mil gracias.

A los Doctores Emilio Olivares Sáenz, Hugo Bernal Barragán y Erasmo Gutiérrez Ornelas, por sus valiosas observaciones y sugerencias durante la revisión del escrito de este trabajo.

A mi amiga Nelly Aurora García Barrera por su compañía, comprensión y apoyo que me ha brindado siempre.

A mis maestros que han compartido sus conocimientos de una manera muy profesional: Rigoberto González G., Emilio Olivares S., Erasmo Gutiérrez O., Hugo Bernal B., Javier Colín N., Sergio Puente T. y Ma. de la Luz González.

Al M.C. Cesáreo Guzmán Flores y al Ph.D. Emilio Olivares Sáenz, ex-director y director de la FAUANL, por el apoyo otorgado para la realización de mis estudios de doctorado.

A la Universidad Autónoma de Nuevo León por el apoyo económico para llevar a cabo mis estudios, investigación y obtención del grado.

A mis amigos y compañeros: Jorge Humberto Guzmán, Nancy Treviño, Gabriela Casas, Rosa Ma. Rodríguez, Javier Castillo, Juan Manuel Huerta, Mariano Molina, Mayela de la H., Hugo Che, Elvia M. Treviño, Korina López, por que de alguna manera contribuyeron en mi formación.

RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO

Juana Aranda Ruiz

*Candidato para obtener el grado de Doctor en Ciencias Pecuarias con especialidad en
Nutrición Animal*

Datos personales:

Nacida en Monterrey N. L., el 23 de Julio de 1962, hija de Francisco Aranda Gutiérrez y Efigenia Ruiz Mata.

Educación:

Egresada de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León como Biólogo, en 1984.

Egresada de la Facultad de Agronomía de la Universidad Autónoma de Nuevo León como Maestro en Ciencias en Producción Animal, en 1997.

Experiencia profesional:

Auxiliar de Investigación y Laboratorista en la Facultad de Agronomía de la Universidad Autónoma de Nuevo León, Marín, N. L. desde 1988. Actualmente también maestro por horas en la misma dependencia.

LISTA DE ABREVIATURAS

AA	Aminoácido
AAs	Aminoácidos
Ala	Alanina
ARC	Agricultural Research Council (Consejo de investigación agrícola)
AOAC	Association of official analytical Chemists (Asociación de químicos analíticos oficiales)
Arg	Arginina
ASB	Albúmina sérica bovina
Asp	Ácido Aspártico
Asn	Asparagina
β_1	Pendiente de la recta
β_0	Ordenada al origen
Cis	Cisteina
Cf	Cociente de frente
C.V.	Coefficiente de variación
Da	Daltons
FAO-WHO	Food and Agriculture Organization-World health Organization (Organización para la agricultura y la alimentación-Organización mundial de la salud)
Fen	Fenilalanina
FR	Fase reversa
g	gramos
Gli	Glicina
Glu	Ácido glutámico
Gln	Glutamina
H	Altura
h	hora (s)
His	Histidina
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IEC	Cromatografía de intercambio iónico
Ile	Isoleucina

L	Litro (s)
Lis	Lisina
Leu	Leucina
M	Mol (s)
Met	Metionina
Mg	Miligramos
µg	Microgramos
min	Minutos
ml	Mililitro
µm	Micromoles
mm	Milimetro
M.S.	Materia seca
N	Normal
NDT	Nutrientes digestibles totales
NEU	Nitrógeno endógeno urinario
NMF	Nitrógeno metabólico fecal
NRC	National Research Council (Consejo de investigación nacional)
p	Probabilidad
P.C.	Proteína cruda
pH	Potencial de hidrógeno
PITC	Fenilisotiocianato
P.M.	Proteína metabolizable
Pmol	Picomoles
Pro	Prolina
r	Coefficientes de correlación
R ²	Coefficiente de determinación
REP	Razón de eficiencia proteica
RPN	Razón proteica neta
Ser	Serina
SPSS	Statistical Package for Social Sciences (Paquete estadístico para ciencias sociales)
t	Tiempo
TEA	Trietilamina

Tir	Tirosina
Tre	Treonina
Trp	Triptófano
UPN	Utilización proteica neta
UV	Ultravioleta
UV-VIS	Ultravioleta-Visible
V	Volumen
Val	Valina
VB	Valor Biológico
VPN	Valor proteico neto
W	Base

CONTENIDO

Capítulo	Página
LISTA DE CUADROS	xii
LISTA DE FIGURAS	xiv
LISTA DE CUADROS DEL APÉNDICE	xv
LISTA DE FIGURAS DEL APÉNDICE	xvi
RESUMEN	xvii
SUMMARY	xix
1. INTRODUCCIÓN	1
2. REVISIÓN DE LITERATURA	3
2.1 Las proteínas en la nutrición animal.....	3
2.2 La proteína en la nutrición de animales no rumiantes.....	4
2.3 La proteína en la nutrición de rumiantes.....	5
2.4 Evaluación de la calidad de la proteína.....	6
2.4.1 Métodos biológicos.....	6
2.4.2 Métodos químicos.....	9
2.5 La cromatografía como una herramienta analítica.....	12
2.6 Aplicación de la cromatografía de HPLC en el análisis de aminoácidos.....	17
2.6.1 Fase móvil.....	17
2.6.2 Fase estacionaria.....	17
2.6.3 Detección.....	18
2.7 Preparación de muestras para análisis cromatográfico.....	19
2.7.1 Hidrólisis de la proteína.....	19
2.7.2 Derivatización de aminoácidos.....	23
2.8 Validación de métodos por cromatografía de líquidos de alta resolución.....	26
2.9 <i>Utilización de la HPLC en el análisis de aminoácidos en alimentos...</i>	28
3. MATERIALES Y MÉTODOS	31
3.1 Separación cromatográfica.....	31
3.1.1 Equipo utilizado.....	31
3.1.2 Elección del reactivo de derivatización, fases estacionaria y móvil.....	32
3.1.3 Preparación de soluciones de estándares de aminoácidos,	

	individuales y mezclas.....	32
3.1.4	Derivatización de aminoácidos.....	34
3.1.5	Determinación del programa de elución adecuado y condiciones óptimas de separación.....	34
3.1.6	Determinación de los tiempos de retención de cada uno de los 17 estándares de aminoácidos en una mezcla y en inyecciones individuales.....	36
3.2	Evaluación cualitativa, cuantitativa y linealidad del método.....	36
3.2.1	Evaluación cualitativa del método: Repetibilidad y Reproducibilidad cualitativa.....	36
3.2.2	Evaluación cuantitativa del método: Repetibilidad y Reproducibilidad cuantitativa.....	37
3.2.3	Evaluación de la linealidad del método (Recta de calibración).....	37
3.3	Evaluación de la metodología de hidrólisis.....	38
3.4	Evaluación de la exactitud del método: Cuantificación de aminoácidos en una proteína de composición conocida: albúmina sérica bovina. (ASB).....	39
3.5	Análisis de ingredientes.....	40
4.	RESULTADOS	41
4.1	Determinación del programa de elución.....	41
4.1.1	Condiciones óptimas de separación.....	41
4.1.2	Determinación de los tiempos de retención de cada uno de los 17 estándares de aminoácidos en una mezcla y en inyecciones individuales.....	45
4.2	Evaluación cualitativa, cuantitativa y linealidad del método.....	47
4.2.1	Evaluación cualitativa del método: Repetibilidad y Reproducibilidad cualitativa.....	47
4.2.2	Evaluación cuantitativa del método: Repetibilidad cuantitativa y reproducibilidad cuantitativa.....	49
4.2.3	Evaluación de la linealidad del método (Recta de calibración).....	51
4.3	Evaluación de la metodología de Hidrólisis.....	52
4.4	Evaluación de la exactitud del método Cuantificación de aminoácidos en albúmina sérica bovina (ASB).....	53
4.5	Análisis de muestras.....	56

4.5.1	Análisis de harinas de soya.....	57
4.5.2	Análisis de harinas de sorgo.....	59
4.5.3	Análisis de mezclas de harinas de soya y sorgo.....	62
5.	DISCUSIÓN	67
6.	CONCLUSIONES	74
7.	LITERATURA CITADA	76
8	APÉNDICE	86

	individuales y mezclas.....	32
3.1.4	Derivatización de aminoácidos.....	34
3.1.5	Determinación del programa de elución adecuado y condiciones óptimas de separación.....	34
3.1.6	Determinación de los tiempos de retención de cada uno de los 17 estándares de aminoácidos en una mezcla y en inyecciones individuales.....	36
3.2	Evaluación cualitativa, cuantitativa y linealidad del método.....	36
3.2.1	Evaluación cualitativa del método: Repetibilidad y Reproducibilidad cualitativa.....	36
3.2.2	Evaluación cuantitativa del método: Repetibilidad y Reproducibilidad cuantitativa.....	37
3.2.3	Evaluación de la linealidad del método (Recta de calibración).....	37
3.3	Evaluación de la metodología de hidrólisis.....	38
3.4	Evaluación de la exactitud del método: Cuantificación de aminoácidos en una proteína de composición conocida: albúmina sérica bovina. (ASB).....	39
3.5	Análisis de ingredientes.....	40
4.	RESULTADOS	41
4.1	Determinación del programa de elución.....	41
4.1.1	Condiciones óptimas de separación.....	41
4.1.2	Determinación de los tiempos de retención de cada uno de los 17 estándares de aminoácidos en una mezcla y en inyecciones individuales.....	45
4.2	Evaluación cualitativa, cuantitativa y linealidad del método.....	47
4.2.1	Evaluación cualitativa del método: Repetibilidad y Reproducibilidad cualitativa.....	47
4.2.2	Evaluación cuantitativa del método: Repetibilidad cuantitativa y reproducibilidad cuantitativa.....	49
4.2.3	Evaluación de la linealidad del método (Recta de calibración).....	51
4.3	Evaluación de la metodología de Hidrólisis.....	52
4.4	Evaluación de la exactitud del método Cuantificación de aminoácidos en albúmina sérica bovina (ASB).....	53
4.5	Análisis de muestras.....	56

4.5.1	Análisis de harinas de soya.....	57
4.5.2	Análisis de harinas de sorgo.....	59
4.5.3	Análisis de mezclas de harinas de soya y sorgo.....	62
5.	DISCUSIÓN	67
6.	CONCLUSIONES	74
7.	LITERATURA CITADA	76
8	APÉNDICE	86

LISTA DE CUADROS

Cuadro	Página
1. Algunos de los métodos disponibles para derivatización pre-columna para el análisis de aminoácidos en hidrolizados de proteína.....	25
2. Cantidad pesada de cada aminoácido para obtener 10 ml de solución 0.1 M.....	33
3. Gradientes utilizados para la separación de aminoácidos mediante HPLC-FR.....	41
4. Gradiente de elución final usado para la separación de aminoácidos mediante HPLC-FR.....	43
5. Repetibilidad en el tiempo de retención de cada aminoácido de una mezcla de 17 estándares (n = 3).....	47
6. Reproducibilidad del tiempo de retención de cada aminoácido de una mezcla de 17 estándares.....	48
7. Repetibilidad de la altura de pico (mv = mili-volts) de cada aminoácido de una mezcla de estándares (17 AA).....	49
8. Reproducibilidad de la altura de pico (mv = mili-volts) de cada aminoácido de una mezcla de estándares (17 AA).....	50
9. Promedio del coeficiente de determinación (R ²) de 7 curvas de calibración de 17 estándares de aminoácidos.....	51
10. Factores de hidrólisis utilizados para compensar las pérdidas ocurridas durante el proceso de hidrólisis de proteínas (n = 5 hidrolizados).....	52
11. Prueba de t de Student del contenido de aminoácidos de albúmina sérica bovina analizada por HPLC-FR y comparada con su valor teórico obtenido por secuencia aminoacídica (n = 3).....	53
12. Contenido de materia seca y proteína cruda de las muestras analizadas.....	56
13. Contenido de aminoácidos en harina de soya (g de AA/100g de M.S.).....	57
14. Contenido de aminoácidos en harina de sorgo (g de AA/100g de M.S.).....	59

15	Contenido de aminoácidos en diferentes proporciones de harinas de soya y sorgo (g de AA/100g de M.S.).....	62
16	Tres formas diferentes de obtener los valores de aminoácidos en las mezclas soya:sorgo.....	63

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1.	Estructura de un α aminoácido.....	3
2.	Cromatograma tipo y algunos parámetros de medición frecuente.....	16
3.	Reacción de derivatización de aminoácidos con diferentes reactivos.....	24
4.	Cromatograma obtenido al realizar un análisis de los reactivos utilizados en la derivatización e hidrólisis (blanco de reactivos).....	44
5.	Cromatograma obtenido al realizar un análisis de una mezcla de 17 estándares aminoácidos.....	46
6.	Cromatograma obtenido al realizar un análisis de aminoácidos de albúmina sérica bovina.....	55
7.	Análisis de regresión entre el contenido de aminoácidos de la albúmina sérica bovina efectuado por HPLC-FR y su composición teórica.....	56
8.	Cromatograma obtenido al realizar un análisis de aminoácidos de una muestra hidrolizada de harina de soya...	58
9.	Cromatograma obtenido al realizar un análisis de aminoácidos de una muestra hidrolizada de harina de sorgo..	61
10.	Cromatograma obtenido al realizar un análisis de aminoácidos en una mezcla soya: sorgo 50:50.....	65
11.	Cromatograma obtenido al realizar un análisis de aminoácidos en una mezcla soya: sorgo 25:75.....	66

LISTA DE CUADROS DEL APÉNDICE

Cuadros		Página
A1.	Programa de elución 1 usado para la separación de aminoácidos mediante CLAR-FR.....	87
A2.	Programa de elución 2 usado para la separación de aminoácidos mediante CLAR-FR.....	88
A3.	Programa de elución 3 usado para la separación de aminoácidos mediante CLAR-FR.....	89
A4.	Programa de elución 4 usado para la separación de aminoácidos mediante CLAR-FR.....	90
A5.	Programa de elución 5 usado para la separación de aminoácidos mediante CLAR-FR.....	91
A6.	Programa de elución 6 usado para la separación de aminoácidos mediante CLAR-FR.....	92
A7.	Programa de elución 7 usado para la separación de aminoácidos mediante CLAR-FR.....	93
A8	Contenido de aminoácidos en soya g/100 g M.S. reportados en diferentes fuentes bibliográficas.....	94
A9	Contenido de aminoácidos en sorgo g/100 g M.S. reportados en diferentes fuentes bibliográficas.....	95

LISTA DE FIGURAS DEL APÉNDICE

Figura		Página
A1.	Separación cromatográfica de 17 estándares de aminoácidos utilizando el gradiente 1 (Fac. de Agronomía).....	87
A2	Separación cromatográfica de 17 estándares de aminoácidos utilizando el gradiente 2 (Fac. de Medicina).....	88
A3	Separación cromatográfica de 17 estándares de aminoácidos utilizando el gradiente 3 (Fac. de Medicina).....	89
A4	Separación cromatográfica de 17 estándares de aminoácidos utilizando el gradiente 4 (Fac. de Medicina).....	90
A5	Separación cromatográfica de 17 estándares de aminoácidos utilizando el gradiente 5 (Fac. de Medicina).....	91
A6	Separación cromatográfica de 17 estándares de aminoácidos utilizando el gradiente 6- flujo 1 ml/min.....	92
A7	Separación cromatográfica de 17 estándares de aminoácidos utilizando el gradiente 7- flujo 2 ml/min. Condición final de separación.....	93

RESUMEN

Juana Aranda Ruiz

Fecha de graduación: Diciembre del 2002

Universidad Autónoma de Nuevo León
Facultad de Agronomía

Título del estudio **DESARROLLO DE UN MÉTODO POR CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN PARA ANÁLISIS DE AMINOÁCIDOS EN INGREDIENTES UTILIZADOS EN LA ALIMENTACIÓN ANIMAL.**

Número de páginas: 95

Candidato para el grado de Doctor en Ciencias Pecuarias con especialidad en Nutrición Animal

Área de Estudio. Ciencias pecuarias. Zootecnia. Nutrición Animal

Propósito y Métodos de Estudio: El conocimiento del contenido de aminoácidos de ingredientes y alimentos del ganado, permite evaluar la calidad de la proteína, dando la posibilidad de adecuar las formulaciones dietéticas de acuerdo a los requerimientos necesarios del ganado en sus diferentes estados fisiológicos, logrando con esto una producción eficiente y bajos costos de formulación para un máximo rendimiento. Los métodos analíticos para cuantificación de aminoácidos han ido evolucionando e incrementando la eficiencia en sensibilidad y tiempo de análisis. La cromatografía de líquidos de alta resolución o High Performance Liquid Chromatography (HPLC), utilizando columnas de fase reversa (FR), ha contribuido grandemente en el análisis de aminoácidos en diferentes áreas de aplicación, entre las que destacan la Nutrición, Farmacología y medio ambiente. El presente estudio se realizó con el objetivo de desarrollar un método de análisis de aminoácidos por medio de Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (HPLC-FR y precolumna de derivatización con fenilisotiocianato), para usarlo en la evaluación de ingredientes utilizados en la alimentación animal. La metodología fue validada mediante la evaluación de la repetibilidad, reproducibilidad y linealidad; la exactitud se determinó al analizar albúmina de suero bovino y comparar los resultados obtenidos con los valores de aminoácidos según su composición molecular. Finalmente, se realizó el análisis de harinas de soya y sorgo; los resultados obtenidos se compararon con los valores reportados en las tablas del NRC (1998).

Contribuciones y conclusiones: Los resultados mostraron una mayor variación en la reproducibilidad del tiempo de retención de los diversos aminoácidos (C.V. < 4%), que en la repetibilidad de este mismo parámetro (C.V. < 1.8%). La evaluación cuantitativa del método presentó una mayor variación en la reproducibilidad (C.V. < 30.0%) que en la repetibilidad (C.V. < 5.6%). Lo anterior indica la necesidad de realizar una curva de calibración por lote de muestras analizadas el mismo día. La respuesta lineal del método presentó coeficientes de determinación (R^2) > 0.95. El triptófano, que se destruye durante la hidrólisis ácida tradicional, presentó señal medible al utilizar el ácido metanosulfónico 4N 0.2% de 3-(2-amino etil)indol como catalizador en la hidrólisis ácida, logrando un 75.5% de recuperación en una mezcla de estándares. La metionina se ha reportado como un aminoácido difícil de cuantificar debido a que se oxigena parcial o totalmente. Sin embargo, en este trabajo presentó buena recuperación (106.4%), corroborando el poder antioxidante del 3-(2-amino etil)indol y la eficiencia del vacío generado en los dispositivos utilizados (tubos Pierce). Los valores de los aminoácidos obtenidos al analizar albúmina sérica bovina, no mostraron diferencias respecto a los valores teóricos ($P > 0.05$), en los aminoácidos: ácido glutámico, glicina, arginina, treonina, alanina, prolina, isoleucina y lisina. Al realizar el ajuste a una recta entre los datos teóricos con los obtenidos por HPLC se obtuvo una R^2 de 0.96, por lo tanto se consideró que la metodología presenta una exactitud apropiada. En las harinas, la cuantificación de los aminoácidos en el caso de sorgo presentó mayor variación al compararlo con los valores reportados por el NRC (1998), mientras que en la soya no se observó diferencias ($P < 0.05$) para la mayoría de los aminoácidos. La lisina en ambas harinas presentó una cuantificación del doble que lo reportado, lo que indica la

posibilidad de una coelución con algún producto de degradación producido durante la hidrólisis, o algún contaminante de estas harinas. La metodología permite determinar la concentración de los aminoácidos esenciales: arginina, histidina, treonina, valina, metionina, isoleucina, leucina y fenilalanina, con alto grado de confianza.

Los análisis de mezclas de harinas de soya y sorgo presentaron un comportamiento lineal entre las variables proporción de soya (X) y contenido de aminoácidos (Y), obteniendo R^2 alrededor de 0.90 en la mayoría de los aminoácidos.

Firma del Asesor Principal.

A handwritten signature in black ink, consisting of several fluid, overlapping strokes, positioned above a horizontal line.

SUMMARY

Juana Aranda Ruiz

Graduation date December, 2002

Universidad Autónoma de Nuevo León
Facultad de Agronomía

Title of the study: **DEVELOP OF A METHOD FOR HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY FOR ANALYSIS OF AMINO ACIDS IN INGREDIENTS USED IN THE ANIMAL FEEDING.**

Pages number: 95

Candidate at Doctor in Animal Science
with specialty in Animal Nutrition

Study Area: Animal Science. Animal Production. Animal Nutrition

Purpose and Methods of Study: Knowledge of amino acid content of ingredients and feeds of livestock is useful to evaluate protein quality, giving the possibility to adapt the dietary formulations according to the requirements of nutrients to cover animal necessities in different physiological states in particular, achieving the goal of efficient production and effective formulation costs for a maximum yield. The analytic methods for quantification of amino acids have evolved and this new technology has increased the efficiency in sensibility and time of analysis. The High Performance Liquid Chromatography (HPLC), using column of reverse phase (RP) has contributed greatly in the analysis of amino acids in different application areas, such as Nutrition, Pharmacology and Environment. The present study was carried out with the objective of develop a technique of amino acid analysis by means of High Performance Liquid Chromatography (HPLC-FR and precolumn derivatization with phenylisothiocyanate), useful to evaluate ingredients used in animal feeding. The methodology was validated by means of the evaluation of the repeatability, reproducibility and linearity; accuracy was determined analyzing bovine serum albumin and comparing the results obtained with the values of amino acids according to its molecular composition. Finally, an analysis of soybean and sorghum meals was carried out, the results were compared with the values reported in the tables of the NRC (1998).

Contributions and conclusions: Results showed a bigger variation in the reproducibility of the retention time of the diverse amino acids (C.V. < 4%) that in the repeatability of the same parameter (C.V. < 1.8%). The quantitative evaluation of the method presented a bigger variation in the reproducibility (C.V. < 30.0%) that in the repeatability (C.V. < 5.6%). These results indicated that it is necessary to carry out a calibration curve for each lot of analyzed samples the same day. The lineal analysis of the method showed a determination coefficient (R^2) greater than 0.95. The tryptophan, which is an amino acid that is destroyed during the traditional acid hidrólisis, presented an appraisable sign when using the methanesulfonic acid 4N 0.2% of 3-(2-aminoethyl)indole, as catalyst in the acid hydrolysis, achieving 75.5% recovery in a mixture of standards. Methionine has been reported as an amino acid that is difficult to quantify because it oxygenates partial or totally. However, in this work it presented good recovery (106.4%), corroborating the antioxidant power of the 3-(2-aminoethyl)indole and the efficiency of the vacuum generated in the used devices (Pierce tubes). The values of the amino acids obtained when analyzing bovine serum albumin did not show differences regarding the theoretical values ($P > 0.05$), in the amino acids: glutamic acid, glycine, arginine, threonine, alanine, proline, isoleucine and lysine. A regression analysis was carried out to adjust with a straight line the theoretical data with those obtained by HPLC. A determination coefficient (R^2) of 0.96 was obtained, therefore, it was concluded that the methodology presents an appropriate accuracy. Quantification of amino acids in sorghum presented bigger variation than the values reported by the NRC (1998), while in soya, there was not observed differences ($P > 0.05$) for most of the amino acids. The lysine in both meals presented a quantification of twice as much that reported, indicating the possibility of a coelution with some degradation product taken place during the hydrolysis, or some pollutant of these meals, or a different lysine content in the analyzed meals.

that in those described in the literature. The methodology allows to determine the concentration of the essential amino acids. arginine, histidine, threonine, valine, methionine, isoleucine, leucine and phenylalanine, with high degree of confidence.

The analyses of mixtures of soybean and sorghum meals presented a lineal behavior among the variables soybean proportion (X) and content of amino acids (Y), obtaining R^2 around 0.90 in most of the amino acids.

Main Adviser Signature: _____

A handwritten signature in black ink, consisting of several stylized, overlapping loops and lines, positioned above a horizontal line that serves as a signature line.

1. INTRODUCCIÓN

Una de las principales preocupaciones en la alimentación animal ha sido satisfacer los requerimientos de proteína de los animales en sus diferentes etapas del desarrollo. Así también, se ha tratado de conseguir un balance adecuado en el perfil de aminoácidos que refleje una buena calidad proteica en la elaboración de dietas. La combinación de ingredientes como estrategia para equilibrar los aminoácidos y la suplementación con aminoácidos, son prácticas comunes en la alimentación de cerdos y aves.

La función más importante de los aminoácidos en todos los organismos vivos es constituir la unidad monomérica para la síntesis de proteína. Además, los aminoácidos sirven como importante fuente de energía (glucogénesis), y algunos son precursores de importantes compuestos biológicos, como por ejemplo la adrenalina y algunas sales biliares entre otros.

Las fuentes proteicas para los animales domesticados han sido las semillas de cereales, leguminosas y oleaginosas, utilizándose tradicionalmente soya, sorgo, y maíz; todos ellos varían en su disponibilidad y precio en el mercado, quedando como alternativa la utilización de subproductos de la industria de alimentos para humanos (obtención de aceites comestibles, jugos, lácteos, tenería, entre otros). Sin embargo, la cantidad de proteína en éstos es menor, y muchas veces pudo haber sido desnaturalizada como resultado del proceso de industrialización (calor). Por esto, se hace necesaria la evaluación del perfil de aminoácidos, que permita seleccionar las mejores fuentes; es decir, aquellos ingredientes que aporten aminoácidos esenciales como Treonina, (Tre) Lisina (Lis), Metionina (Met), Arginina (Arg), Valina (Val), Fenilalanina (Fen), Leucina (Leu), Histidina (His), Isoleucina (Ile), y Triptófano (Trp).

Una técnica moderna en el análisis de aminoácidos es la Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución, o High Performance Liquid Chromatography, (HPLC), que consiste en la elución diferencial de una mezcla de compuestos a través de una columna cromatográfica. La detección generalmente es a través de su absorbancia o fluorescencia ante una determinada longitud de onda, y su presencia es registrada en una forma gráfica denominada cromatograma. Se puede así evaluar cualitativa y

cuantitativamente los componentes de una mezcla, al compararlos frente a estándares de concentración conocida.

El análisis de aminoácidos proteicos involucra una metodología compleja compuesta por los siguientes pasos: *hidrólisis de la proteína, derivatización de aminoácidos, separación cromatográfica*, y su cuantificación, haciéndose necesaria la utilización de una mezcla de estándares de referencia.

Considerando la importancia que representa el poder evaluar a la proteína en base al perfil de aminoácidos, se planteó la presente investigación para desarrollar un método por CLAR para análisis de aminoácidos en ingredientes utilizados en la alimentación animal. Se establecieron los siguientes objetivos:

Objetivo general:

Desarrollar un método por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) para el análisis de aminoácidos en ingredientes utilizados en la alimentación animal.

Objetivos específicos:

1. Optimizar la separación cromatográfica de 17 aminoácidos.
2. Evaluar la repetibilidad y reproducibilidad cualitativa del método.
3. Evaluar la repetibilidad y reproducibilidad cuantitativa del método.
4. Evaluar la respuesta lineal del método.
5. Evaluar la metodología de hidrólisis.
6. Determinar la exactitud del método.
7. Probar la metodología obtenida en el análisis de harinas de soya y sorgo.
8. Determinar los cambios cualitativos y cuantitativos de los diferentes aminoácidos en mezclas de harinas de soya y sorgo.

Meta

Estandarización de la técnica HPLC para la determinación de aminoácidos.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Las proteínas en la nutrición animal

Las proteínas son macromoléculas producidas por las células vivas, y tienen funciones estructurales, catalíticas y hormonales, entre otras; su unidad monomérica son los aminoácidos (AAs). Gran parte de las propiedades biológicas de las proteínas está determinada por los tipos de AAs presentes, el orden en el que están dispuestos en la cadena polipeptídica, y por la relación espacial de un aminoácido con otro. Aunque en la naturaleza existen aproximadamente 300 aminoácidos diferentes, sólo 20 de ellos aparecen en las proteínas de todos los seres vivos (Martin, 1984).

Los aminoácidos proteicos son L- α AAs (Figura. 1), L por su configuración espacial y α por que tienen tanto un grupo amino como un carboxilo unido al primer átomo de carbono.

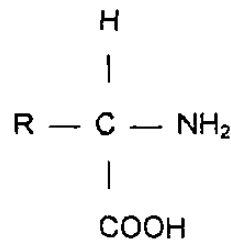


Figura 1. Estructura de un α -aminoácido.

Las fuentes proteicas del alimento para los animales no rumiantes no necesariamente deben aportar los 20 AAs, ya que algunos de ellos pueden ser sintetizados usando esqueletos de carbono (derivados de glucosa y de otros AAs), y grupo amino derivado de otros AAs presentes en exceso. A los AAs sintetizados de esta manera se les denomina no esenciales o dispensables y son: Ácido Aspártico (Asp), Ácido glutámico (Glu), Asparagina (Asn), Glutamina (Gln), Glicina (Gli), Serina (Ser), Alanina (Ala), Tirosina (Tir), Prolina (Pro) y Cisteina (Cis). A los AAs que no pueden ser sintetizados o que no pueden ser sintetizados a una tasa suficiente para permitir óptimo crecimiento o reproducción, son denominados esenciales o indispensables; siendo éstos: Histidina (His), Treonina, (Tre), Arginina (Arg), Metionina (Met), Valina (Val), Leucina (Leu), Isoleucina (Ile), Fenilalanina (Fen), Triptófano (Trp) y Lisina (Lis) (NRC, 1988).

2.2 La proteína en la nutrición de animales no rumiantes

Generalmente el término "proteína" se refiere a la proteína cruda que es definida para una muestra como el contenido de nitrógeno (Kjeldahl) multiplicado por 6.25. Esta definición es basada en el supuesto de que en promedio, el contenido de nitrógeno es 16 g /100 g de proteína. Las proteínas están compuestas de AAs, y éstos son actualmente los nutrientes en los que se basa la evaluación de los alimentos. Por lo tanto, la provisión de AAs en correcta cantidad y proporción, determina la adecuación de un concentrado proteico dietético (NRC, 1988).

En el caso de los animales de estómago sencillo, como los cerdos y las aves, las proteínas que ingieren con el alimento son hidrolizadas por el organismo liberándose AAs que, al absorberse en el intestino delgado pueden emplearse para síntesis de proteína en los tejidos, o si los AAs absorbidos se encuentran en exceso, se emplean como fuente de energía. El valor nutritivo de una proteína completa, una proteína hidrolizada o una mezcla de AAs, es gobernado por su digestibilidad, balance y contenido de AAs esenciales. El concepto de "proteína ideal" (Chung y Baker, 1992) representa el balance en el cual los AAs son requeridos para mantenimiento y deposición de proteína corporal, tomando en cuenta la raza, el sexo y el peso vivo del animal.

Para el uso apropiado de la "proteína ideal" en formulación de dietas para cerdos, debe ser expresada en base a la disponibilidad, más que sobre el total de AAs en la dieta. El método de digestibilidad ilial es más exacto en la estimación de AAs disponibles, porque mide la digestibilidad antes de la degradación microbiana y síntesis de AAs en el intestino grueso. La digestibilidad de proteína y AAs determinados de digesta ileal es importante por tener una alta correlación con la proteína depositada en la canal. Estudios realizados por Yin *et al.* (1991), indicaron que en la formulación de dietas para cerdos en crecimiento, un mejor alimento para relación ganancia - beneficio económico puede ser obtenido en base a digestibilidad ileal de lisina, metionina, isoleucina, leucina y contenido de arginina, que en el total de AAs contenidos.

El concepto de "proteína ideal" ha sido aplicado para reducir excesos de AAs en dietas de cerdos, sin afectar su productividad. Tal es el caso del trabajo realizado por Tuitoek

et al. (1997), que determinaron el efecto de la reducción de excesos de AAs en dietas de cerdos en crecimiento y finalización, evaluando el consumo, tasa de crecimiento, eficiencia alimenticia y marmoleo de la canal, encontrando que la dieta puede ser reducida a un 13% en crecimiento y 12.8% en finalización, mientras que se le añadan AAs cristalinos, bajo el concepto de una proteína ideal.

2.3 La proteína en la nutrición de rumiantes

En rumiantes, como en otros animales, las necesidades de proteína de los tejidos son llenadas a través de AAs absorbidos en el intestino delgado. Estos AAs son proporcionados en parte por proteína microbiana (proteína degradada en el rumen) y en parte por proteína de la dieta que ha escapado de la fermentación en el rumen (proteína sobrepasante). El valor de fuentes dietéticas de nitrógeno no proteico como la urea, dependen enteramente de la degradación a amoníaco en el rumen por bacterias y el subsecuente uso de este amoníaco para síntesis de proteína microbiana. El grado de la síntesis depende de la energía disponible para los microorganismos (Orskov y Miller, 1987).

La proteína dietética es degradada en el rumen por acción microbiana, generando productos nitrogenados en los que se incluyen: péptidos, AAs y amoníaco. Estos productos son usados para la síntesis de proteína microbiana, y hay evidencia de que bacterias creciendo en el rumen incorporan considerables cantidades de AAs preformados, así como amoníaco cuando la dieta contiene proteína (ARC, 1980).

En el caso de los rumiantes, los requerimientos de proteína se expresan como proteína disponible; es decir, la cantidad de proteína cruda de un determinado valor biológico que puede ser absorbida por el tracto digestivo, reuniendo los requerimientos calculados del animal para mantenimiento y producción (ARC, 1980). Los requerimientos del animal están determinados por su estado fisiológico, edad, peso, y en su caso, por la producción de leche o carne.

Al tratar de llenar los requerimientos de proteína, debemos tomar en cuenta las necesidades de los microorganismos del rumen (que generan proteína microbiana) y las necesidades del animal. El sistema utilizado por el ARC (1980) y por el NRC (1988)

cambió de proteína cruda (P.C.) a proteína metabolizable (P.M.) La P.M. provee la proteína microbiana (proteína degradada en el rumen) y la proteína sobrepasante (proteína no degradada en el rumen). Los requerimientos de P.M. son presentados en forma tabular expresados como requerimientos por día. La estimación de los requerimientos de proteína cruda diaria pueden ser obtenidos dividiendo la cantidad de proteína metabolizable por un valor entre 0.64 y 0.80, dependiendo de la degradabilidad de la proteína del alimento. Estos coeficientes se aplican cuando toda la proteína es degradada en el rumen o no degradada, respectivamente; el valor 0.64 se refiere a la digestibilidad (0.8) y valor biológico de la proteína microbiana (0.8), ($0.8 \times 0.8 = 0.64$) y el valor 0.80 se refiere a la eficiencia de utilización (valor biológico) que va de un 60-80% según el alimento. Para estimar la producción de proteína microbiana se toma en cuenta la cantidad de nutrientes digestibles totales (NDT) de la dieta, a partir de los cuales se obtiene un 13% de proteína microbiana por kg de NDT. La proteína microbiana suple hasta el 50% del total de proteína metabolizable, dependiendo de la proteína sobrepasante (NRC, 1996).

2.4 Evaluación de la calidad de la proteína

La composición química de los granos y forrajes es dependiente del clima, tipo de suelo, aplicación de fertilizante, variedad de semilla, almacén del alimento y método de procesado. Por lo tanto, es importante determinar la composición química y digestibilidad de nutrientes en alimentos para identificar la mejor vía para su uso (Fialho *et al.*, 1995).

2.4.1 Métodos biológicos

Los animales de estómago sencillo, como los cerdos y las aves, obtienen los AAs por hidrólisis de las proteínas durante la digestión y su posterior absorción; en los animales rumiantes el proceso es más complicado, ya que debido a la degradación y síntesis de proteína que tiene lugar en el rumen, el material del que finalmente dispone el animal para ser digerido difiere considerablemente del que se encontraba en el alimento en un principio. Por lo tanto, son necesarios enfoques distintos para valorar las fuentes de proteína:

A) Determinación de la calidad de las proteínas para los animales no rumiantes

Diferentes autores hacen mención de los métodos más utilizados en la evaluación de la calidad proteica de los alimentos (Maynard *et al.*, 1979; McDonald *et al.*, 1988 y Pond, *et al.*, 1995). Tales métodos se mencionan a continuación:

Razón de eficiencia proteica (REP). En esta determinación se emplean generalmente ratas en crecimiento y se define como la ganancia de peso por unidad de peso de proteína ingerida. Puede calcularse a partir de la siguiente fórmula:

$$REP = \frac{\text{ganancia de peso (g)}}{\text{proteína consumida (g)}}$$

Con frecuencia los valores de REP se establecen en relación a una proteína estándar (Caseína) con una REP determinada.

Razón de proteica neta (RPN). Se obtiene aplicando una modificación en la que la ganancia de peso de un grupo (experimental) alimentado con proteína (GP) se compara con la de un grupo control alimentado con una dieta exenta de proteína (GSP) y se divide por la proteína consumida.

$$RPN = \frac{\text{ganancia de peso de GP} - \text{pérdida de peso GSP}}{\text{peso de proteína consumida}}$$

Para determinar REP y RPN es necesario de disponer de animales homogéneos y jóvenes, a los que durante el período experimental hay que cuidar, por lo que estos métodos de evaluación de la proteína son caros y requieren gran número de recursos técnicos. Además, están basados sobre medidas de ganancia de peso vivo que puede no guardar relación con la proteína almacenada (Mc Donald *et al.*, 1988).

Existen otras pruebas para una valoración más exacta de las proteínas a partir de los resultados de los experimentos de balance de nitrógeno, donde se mide el nitrógeno ingerido con el alimento y el eliminado en las heces, orina o cualquier otro producto que contenga nitrógeno y que a continuación son citados.

Valor Biológico (VB). Es el porcentaje de nitrógeno absorbido que es retenido por el animal, y constituye la proporción de la proteína del alimento que puede ser utilizada por el animal para sintetizar sustancias orgánicas y tejidos corporales. Se hace una prueba de balance de nitrógeno (medición de nitrógeno en alimento, heces y orina) y se calcula el VB como sigue:

$$VB = \frac{N \text{ ingerido} - (N \text{ fecal} - NMF) - (N \text{ urinario} - NEU) \times 100}{N \text{ ingerido} - (N \text{ fecal} - NMF)}$$

donde: NMF = nitrógeno metabólico fecal

NEU = nitrógeno endógeno urinario.

La utilidad que una proteína tiene para un animal depende de su digestibilidad y de su valor biológico. El producto de estos dos valores representa la proporción del nitrógeno absorbido que se retiene y se llama utilización proteica neta (UPN). El producto de UPN y el porcentaje de proteína bruta es el valor proteico neto (VPN) del alimento y es el valor de la proteína que es utilizable, en realidad, por el animal para el metabolismo.

B) Determinación de la calidad de las proteínas para los rumiantes

La evaluación de la proteína de un alimento para rumiantes es particularmente difícil. El valor de la proteína puede ser determinado por la habilidad del alimento para promover la síntesis de proteína microbiana en el rumen (proteína degradable), por la cantidad de proteína del alimento que escapa de la degradación por los microorganismos y provee proteína y AAs esenciales para su absorción en el intestino delgado (proteína sobrepasante), o por una combinación variable de estos atributos (Orskov y Miller, 1987).

El empleo del valor biológico y la proteína bruta digestible están bien fundamentados, y son todavía de gran utilidad para los estudios del metabolismo proteico. Sin embargo, la información disponible en la actualidad permite obtener un conocimiento más completo de los procesos dinámicos que tienen lugar durante la fermentación ruminal, lográndose elaborar un sistema más adecuado (Orskov, 1988).

Mehrez y Orskov (1977), sugirieron el empleo de la bolsa de nylon (mailla 20 a 40 μm ; dimensión 140 X 90 mm) como método rutinario para determinar la velocidad de degradación de las proteínas de los forrajes y los suplementos proteicos. Esta técnica se basa en la colocación del alimento (3-5 g de materia seca) a evaluar dentro de bolsitas de nylon, las cuales se incuban en el rumen (2, 6, 12, 24, 36 h) con el propósito de medir la desaparición, suponiéndose que esta desaparición es sinónimo de degradación.

La técnica de la bolsa de nylon ha sido ampliamente usada. Mara *et al.* (1997) la utilizaron para determinar el perfil de aminoácidos de 8 ingredientes antes y después de la incubación en el rumen. La proteína degradada en el rumen y metabolizable, así como los requerimientos de aminoácidos indispensables para becerros en engorda, fueron determinados por Zinn y Shen (1998) empleando esta técnica.

2.4.2 Métodos químicos

La determinación de la concentración de proteína es frecuentemente requerida, tanto en trabajos de bioquímica como en el conocimiento del contenido de esta fracción, en ingredientes utilizados en la alimentación. Diversos métodos colorimétricos están disponibles, los cuales tienen características convenientes para un uso particular; cuatro son comúnmente usados en el análisis de proteínas puras y en cuya determinación se emplea la albúmina de suero bovina (ASB), como proteína de referencia. Diversas diluciones de la ASB son hechas para asegurar un rango en el cual se encuentre la proteína desconocida; todas las diluciones son usadas para realizar una curva de calibración y determinar la concentración en la muestra. El color es producido siempre después de agregar el reactivo, y la reacción puede necesitar de un tiempo determinado. Todos los métodos tienen ventajas y desventajas, y la elección del método depende de varios factores; particularmente es importante la cantidad de material disponible (Lowry o Bradford, más sensibles), el tiempo requerido para el ensayo, y si un espectrofotómetro UV está disponible (Alexander y Griffiths, 1993).

Determinación de proteína por la reacción de Biuret

La reacción Biuret ocurre con todos los compuestos que contienen dos o más enlaces peptídicos. Se desarrolla un color azul púrpura, atribuido a la formación de un complejo

entre el Cu^{++} y cuatro átomos de nitrógeno; dos de cada dos cadenas peptídicas adyacentes. El nombre de la reacción es derivado del compuesto orgánico Biuret (CuSO_4 , tartrato de potasio y sodio y NaOH). Rango de detección 0.2 a 2.0 mg, volumen de muestra 1.5 a una longitud de onda de 540 nm.

Determinación de proteína por el método Lowry

El color producido es el resultado de la reacción de proteína con el ión cobre en álcali, como se describió para la reacción Biuret, y la reducción del reactivo fosfomolibdeno-fosfotungsteno (Folin-Ciocalteu) con la tirosina y triptófano presente en la proteína tratada. Rango de detección 20 a 200 μg , volumen de muestra 0.5 ml la detección es a una longitud de onda de 700 nm.

Determinación de proteína por el método Warburg-Christian

La concentración de proteína y ácido nucleico de una solución es estimada haciendo una medición directa de la muestra en la región UV en un espectrofotómetro. La intensidad de absorción de proteína a 280 nm es principalmente debida a residuos de triptófano y tirosina, y la absorción; por lo tanto, varía con la concentración de estos aminoácidos. El método no es específico como los procedimientos calorimétricos descritos anteriormente, pero es no destructivo y la muestra puede recuperarse. Las sustancias más comunes que pueden interferir en el espectro de las proteínas (280 nm espectro de absorción) son los ácidos nucleicos cuya máxima absorción es a 260 nm.

Determinación de proteína por el método Bradford

El color de azul brillante de Coomassie G250 en solución ácida diluida cambia *proporcionalmente conforme el colorante se enlaza a la proteína*. Hay dos mayores ventajas para este método: es un procedimiento rápido y fácil, y que no interfieren sustancias en la determinación. Rango de detección de 0 a 20 μg a una longitud de onda de 595 nm (Plumer, 1971).

Determinación de proteína por el método Kjeldahl

Este método ha sido usado por largo tiempo y generalmente es aplicado a material biológico más que a proteínas puras. El nitrógeno contenido en la muestra es sometido a digestión con H_2SO_4 en ebullición y transformado en sulfato de amonio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ El

residuo se deja enfriar y se diluye con agua. Al agregar NaOH se desprende el NH_4 presente por medio de un proceso de destilación, y se recibe en una solución de ácido bórico. El NH_4 es entonces cuantificado por titulación con una solución estandarizada de ácido, en presencia de un indicador y el nitrógeno en la muestra es calculado. El valor obtenido como contenido de nitrógeno es multiplicado por 6.25 en el supuesto que, en promedio, el contenido de nitrógeno es 16 g de nitrógeno en 100 g de proteína. La estimación del contenido de proteína de un análisis de nitrógeno asume que todo el nitrógeno en la muestra analizada está en forma de proteína. Esto no es estrictamente verdadero para muchos alimentos (Maynard *et al.*, 1979). No obstante, este método es propuesto por el AOAC (1990). El resultado del análisis por este método se reporta como porcentaje de proteína cruda.

Puesto que el valor biológico de una determinada proteína depende sobre todo de los aminoácidos esenciales presentes en ella, es conveniente medir cuantitativamente la presencia de ellos y compararla con los requerimientos en aminoácidos de cada especie animal. Algunas de las formas de expresar los resultados del análisis de aminoácidos para evaluar la calidad de las proteínas son las siguientes:

Índice químico. Según este concepto se considera que la calidad de una proteína viene dada por el aminoácido esencial que tiene en ella menor representación cuando se le compara con la de un estándar (proteína de huevo), ejemplo:

En el trigo el AA más limitante es la lisina la cual representa un 2.7%, si se compara esta cantidad con la reportada en la proteína de huevo (7.2 % de lisina) se obtiene un índice de 37 ($2.7/7.2 \times 100$). Esta metodología tiene la desventaja de que únicamente se toma en cuenta el AA más escaso, aunque haya otros que también puedan ser deficientes (McDonald *et al.*, 1988).

Índice de AAs esenciales (IAAE). En este caso se consideran las cantidades que existen de cada uno de los diez AAs esenciales. Se puede definir como la medida geométrica de los niveles de estos AAs en el huevo y se calcula como:

$$IAAE = \sqrt[n]{\frac{100 a}{a_e} \times \frac{100 b}{b_e} \times \frac{100 c}{c_e} \times \dots \times \frac{100 j}{j_e}}$$

donde a, b, c, ..., j es el porcentaje de los AAs en la proteína del alimento, y $a_e, b_e, c_e, \dots, j_e$ el porcentaje de los mismos aminoácidos esenciales en la proteína de huevo, y n el número de AAs que intervienen en el cálculo. Este método tiene el inconveniente de que proteínas con composiciones muy diferentes pueden tener índices iguales o muy parecidos (McDonald *et al.*, 1988).

2.5 La cromatografía como una herramienta analítica

El término cromatografía engloba una serie de técnicas de separación útiles en el análisis químico para aislar los componentes de mezclas. La cromatografía fue desarrollada por el botánico ruso Mikhail Tswett a quien debe su nombre derivado del griego *Chroma* que significa color y *graphein* que significa describir. Este botánico ruso logró separar una mezcla de pigmentos de plantas en una columna de carbonato de calcio. Por definición la Cromatografía es una técnica en la cual los componentes de una mezcla migran a diferente velocidad en un sistema que entraña un equilibrio entre una fase estática y una en movimiento, conocidas como fase fija o estacionaria y fase móvil, respectivamente (Quattrocchi *et al.*, 1992).

El rápido desarrollo de la cromatografía como herramienta analítica sensitiva no ocurrió hasta 1931 cuando Kuhn, con Lederer y Winterstein con Lederer emplearon la técnica para el análisis de pigmentos de plantas. La cromatografía de columna por estos tiempos tenía aplicaciones limitadas dado que los componentes que se podían separar eran invariablemente lípidos. Pasaron 10 años antes de que Martin y Synge desarrollaran una técnica mediante la cual se pudieran separar compuestos acuosos o hidrofílicos. Esto marcó un nuevo interés en la técnica y en 1944, Consden, Gordon y Martin lograron separar mezclas complejas de aminoácidos en papel y fueron premiados con el Premio Nóbel por sus trabajos.

El desarrollo más reciente en el campo de la cromatografía se deriva de los trabajos de Stahl, quien en 1956 presentó una técnica práctica mediante la cual, una capa delgada de sílica gel, celulosa o de aluminio era diseminada sobre una placa de vidrio. Esta técnica llamada cromatografía de capa delgada (Thin layer chromatography TLC), ha

resultado en un análisis más rápido y más sensible para el examen de mezclas complejas y en muchos casos ha substituido a otros métodos similares más antiguos de cromatografía en papel (Edwards, 1975).

Las metodologías de cromatografía de papel y de capa fina se realizan de la siguiente manera: la muestra debe ser suficientemente concentrada para aplicar una mínima cantidad (5 μ l), el origen de cada muestra se debe marcar en una línea dibujada con lápiz. La mancha deberá ser secada. El revelado del cromatograma es por medio de un solvente depositado en un tanque de reposo, donde se pone en contacto las placas o el papel y se lleva a cabo la separación cromatográfica por un tiempo determinado. Para localizar en el cromatograma sustancias que no son visibles, existen varios reactivos que pueden utilizarse tanto en cromatografía de papel como en capa fina. Finalmente se determina el **cociente de frente**, que se usa para expresar la distancia relativa que se ha desplazado una sustancia. Debido a que es una medida física y es característica de cualquier molécula, debe permanecer constante para cualquier solvente, técnica y temperatura. El término se expresa como sigue:

$$Cf = \frac{\text{La distancia que la sustancia ha viajado desde el origen}}{\text{La distancia que el frente del solvente ha viajado desde el origen}}$$

La cromatografía en papel, en capa fina, en columna y como se verá más adelante la cromatografía de gases; se basan en un proceso cromatográfico denominado fragmentación (Edwards, 1975).

En 1947, en Estados Unidos de Norte América, la comisión de energía atómica dio a conocer información sobre el uso de la cromatografía de intercambio iónico para la separación de productos de fisión nuclear. El proceso cromatográfico de intercambio iónico emplea rellenos en los cuales la partícula está constituida por un polímero o por silicagel, en ambos casos con uniones a grupos intercambiadores de aniones (amonio cuaternario) o intercambiadores catiónicos (ácido sulfónico).

En 1959 Porath y Flodin introdujeron una técnica llamada cromatografía de filtración de gel. Esta nueva herramienta fue utilizada para la separación de sustancias de alto peso molecular, particularmente las proteínas, y ha encontrado muchas aplicaciones en el campo de la bioquímica, la medicina, la fisiología y la biología. Esta modalidad de

cromatografía emplea dos tipos de geles dextranas (Sephadex) y poliacridamida (Biogel P) de diferente porosidad. El proceso de separación se lleva de la siguiente manera, el gel tiene poros cuyo tamaño depende del entrecruzamiento de las partículas del gel, las moléculas que puedan penetrar en esos poros serán retenidas por el gel y mientras que aquellas que sean demasiado grandes serán arrastradas a través de la columna por la fase móvil. La separación por lo tanto resulta dependiente del peso molecular de las sustancias contenidas en la mezcla. Es utilizada en la evaluación del peso molecular de compuestos.

En 1952 James y Martín desarrollan la cromatografía de gases como un método analítico para sustancias exclusivamente volátiles, el método de separación de cromatografía de gases desarrolla el principio de fragmentación de componentes en una mezcla entre dos fases como es usada en otras formas de cromatografía. Un gas inerte es usado como la fase móvil (generalmente Helio) y columnas capilares de sílica modificada como fase estacionaria (Mitruka, 1975).

En los 70's se produjo una revolución en química analítica por la llegada de la Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución CLAR, (High Performance Liquid Chromatography, HPLC), y el desarrollo del proceso de separación de Fase Reversa (FR); la nueva fase estacionaria de gran interés fue constituida a base de adsorbentes sílicas modificadas con Octil- y Octadecilsilanos, proporcionando una fase estacionaria no polar y la utilización de una fase móvil muy polar, constituida generalmente por agua, abundante y económica, mezclada con modificadores orgánicos, entre ellos: metanol, acetonitrilo y tetrahidrofurano, empleo de aditivos, sales o buffers. Este cambio en la polaridad de fases resulta, naturalmente, en un cambio en el orden de elución (Procedimiento de separar con disolventes adecuados de los sólidos adsorbidos. Barcelo, 1976) de los componentes de las muestras en estudio, lo que condujo a darle el nombre; si lo que se había hecho hasta ese momento se consideraba "normal" esta nueva forma de cromatografía en la que se invertía polaridad y orden de elución bien podía denominarse "fase reversa" (Quattrocchi *et al.*, 1992).

Los equipos de HPLC generalmente son modulares, formados por instrumentos individuales que permiten armar el equipo de acuerdo a las necesidades. Los módulos

se integran por: **los reservorios de las fases móviles** que pueden ser un frasco de laboratorio de buena calidad y limpio, o el envase del solvente con tapa para evitar ingreso de partículas. La fase móvil circula por **tuberías** que conectan los reservorios de solventes con la bomba y ésta con el inyector, posteriormente a la columna y de ahí conecta a uno o más detectores en serie. La tubería debe ser inerte y resistente a alta presión.

La fase móvil es impulsada por una **bomba**, cuyo caudal es variable según la escala de trabajo (μl a pocos ml/min). Cuando se bombea una sola fase a una misma concentración se denomina "condición isocrática", y cuando se varía la composición de la fase móvil se denomina "en gradiente". La muestra es introducida por el **inyector**, el cual es un dispositivo que permite introducir la muestra en solución sin interrumpir el caudal del solvente a través del sistema. El inyector está constituido por un cuerpo fijo, un rotor con un sello que gira y un *loop* de muestra. En forma manual se llena el *loop* mediante una jeringa en posición de carga, luego se gira y la fase móvil *arrastra* la muestra hacia la columna. Hay inyectores automáticos, accionados eléctrica o neumáticamente con precisión superior a los manuales.

El detector es la parte del equipo cromatográfico que permite "ver" y ubicar en tiempo y espacio la posición de cada componente de una muestra a la salida de la columna cromatográfica. Los detectores pueden clasificarse en:

Detectores generales, que miden el cambio de alguna propiedad física de la fase móvil que contiene el analito en comparación con la misma fase móvil pura. Un ejemplo es el detector de índice de refracción; es un detector universal y no destructivo, pero muy poco sensible y no puede utilizar gradientes de solventes lo cual limita su campo de acción.

Detectores selectivos que son aquellos sensibles a alguna propiedad específicas del soluto (absorbancia a una longitud de onda dada). Ejemplos de éstos son el detector Ultravioleta/Visible, que es el más empleado en HPLC; posee buena sensibilidad y rango lineal detecta en orden de nanogramos, y permite emplear gradiente de solventes. Otro ejemplo de estos detectores es el detector de fluorescencia, que se *utiliza en sustancias que presentan fluorescencia "natural" o conferida (por*

derivatización). Por su alta sensibilidad y selectividad, es adecuado para el análisis de trazas. El detector electroquímico es 1000 veces más sensible que el detector UV/Vis, y altamente selectivo para compuestos capaces de ser oxidados y reducidos.

La **columna** cromatográfica constituye la pieza fundamental del sistema, ya que es el sitio donde se lleva a cabo la separación de los compuestos. Básicamente la columna consta de dos elementos: a) el material de empaque, que considera la naturaleza de su superficie (modificado física o químicamente), el tamaño (3-5 μm) y forma de la partícula, y b) el contenedor del empaque, que considera la longitud (entre 225 mm y 150 mm), el diámetro (4.5 mm, 3 mm) y el material del cual está hecho (acero inoxidable) (Zinder y Kirkland, 1979).

El resultado del ensayo cromatográfico es, por un lado, la obtención de fracciones separadas de los componentes de la muestra, y por el otro, la de un gráfico o cromatograma de cuya interpretación pueden extraerse conclusiones cualitativas y cuantitativas. El **cromatograma** (Figura 2) se obtiene de la señal proveniente del detector por medio de un sistema de toma y procesamiento de datos, entre los que podemos citar: registrador gráfico, integrador y **computadora**, la cual permite mediante un software apropiado el registro gráfico, cálculos, almacén y generación de reportes (Quattrocchi *et al.*, 1992).

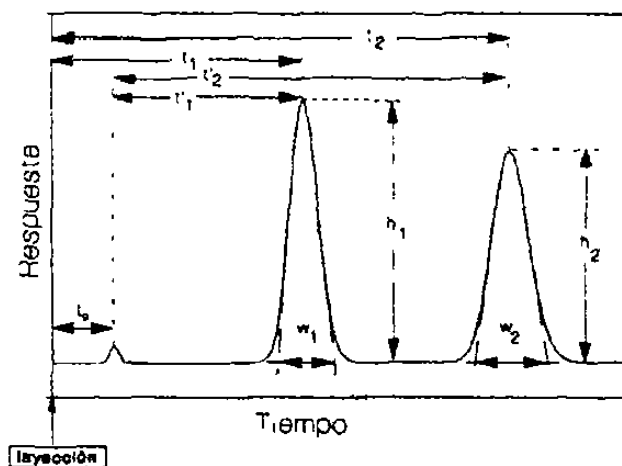


Figura 2. Cromatograma tipo y algunos parámetros de medición frecuente: t = tiempo, H (h) = altura, W = base. (Quattrocchi *et al.*, 1992).

La HPLC-FR ha tenido un gran impacto en el desarrollo de metodologías de análisis de muchos compuestos, entre ellos la determinación de aminoácidos. (Hawk, 1980). La HPLC - es ahora reconocida como una eficaz técnica analítica en investigación biológica. A través de subsecuentes refinamientos de columnas (tamaño de partículas 3-5 μm), bombas de alta presión, válvulas de inyección, y detectores de alta sensibilidad, se redujo el tiempo de análisis de aminoácidos de días a minutos, y la sensibilidad de micromoles a picomoles (Harris, 1988).

2.6 Aplicación de la cromatografía de HPLC en el análisis de aminoácidos

2.6.1 Fase móvil

La fase móvil utilizada para la separación de aminoácidos está basada en el empleo de eluentes acuosos, como lo son las soluciones buffers pudiendo ser de: citrato: citrato de sodio (Beaver *et al.*, 1985), fosfato: fosfato de sodio (Church *et al.*, 1984); acetato: acetato de sodio (Bidlemeier *et al.*, 1987); y por otro lado, buffers combinados con eluentes orgánicos, entre ellos se encuentran el metanol, acetonitrilo y tetrahidrofurano, en algunas ocasiones se adiciona algún compuesto como lo es la trietilamina (Toran *et al.*, 1996)

Investigaciones del tipo de fases móvil y estacionaria, velocidad de flujo (elución), pendiente de elución en gradiente, temperatura y otros factores que influyen en la resolución, selectividad y sensibilidad de separación; han sido investigadas por diferentes autores. (Meek y Rossetti, 1981; Young y Wheat, 1990). Un gradiente de elución de un incremento de concentración de acetonitrilo o metanol como un modificador orgánico en agua, y también la utilización de ácido trifluoroacético como un reactivo de par iónico, pueden ser desarrollados en muchos análisis HPLC de péptidos la composición del solvente, la concentración del buffer y pH son los mayores factores que afectan la cromatografía de fase reversa (Lee y Warthesen, 1996).

2.6.2 Fase estacionaria

La técnica de HPLC incluye dos diferentes formas de realizar el análisis de aminoácidos:

- 1) Separación de los AAs a través de una columna de fase reversa en la que la derivatización se hace previa a la columna (derivatización pre-columna).
- 2) Separación de los AAs a través de una columna de intercambio iónico y posteriormente se derivatizan (derivatización post-columna).

En general, la derivatización pre-columna y separación de los derivados en columnas comúnmente de fase reversa ofrecen mayor eficiencia, facilidad de uso y mayor velocidad de análisis, además de un costo menor de equipo, por lo que ha sido la técnica mayormente empleada (Garza *et al.*, 1986).

2.6.3 Detección

El desarrollo de los procesos cromatográficos ha tenido gran significado en la evolución de los análisis de aminoácidos (Henrikson y Meredith, 1984), cuyos inicios datan a principios de los 40's, con el uso de la cromatografía en papel y en capa fina. Estas técnicas fueron de las primeras utilizadas en el análisis de AAs, y en la actualidad se siguen usando (Vega, 1993; Navarro, 1998). Sin embargo, su poder de resolución es escaso; teniendo que realizar la separación en forma bidimensional, sobre todo cuando las muestras son complejas, y además, el tiempo de análisis es prolongado (Plumer, 1971).

El potencial de la cromatografía y la necesidad de un método de análisis cuantitativo para aminoácidos que condujera a la caracterización de proteínas, propició el uso de las entonces recién desarrolladas resinas de intercambio iónico. Esta aportación fue llevada a cabo por Spackman *et al.* (1958), y en la publicación de su trabajo describieron la separación cromatográfica en columna de intercambio iónico (IEC) de los 20 AAs producto de la hidrólisis de proteína, los cuales eran detectados fotométricamente y registrados en aproximadamente 24 horas.

En este artículo clásico, la ninhidrina fue establecida como el reactivo para derivatización post-columna, reacción que se caracteriza por conferir propiedades cromóforas a los AAs. Por cerca de 30 años, la determinación de aminoácidos pudo ser comúnmente conducida por medio de varios métodos automáticos de

derivatización post-columna con ninhidrina, empleando columna de intercambio iónico. Los AAs con grupo amino primario, reaccionan con la ninhidrina formando un color púrpura azulado que tiene un máximo de absorción a 570 nm. Los AAs con grupo amino secundarios (prolina e hidroxiprolina) forman un color amarillo que es detectado a 440 nm. Ambas formas absorben a 405 nm. La fase móvil consistió de un buffer de citrato de sodio de pH y fuerza iónica variables (Wardlaw y Williams, 1991).

Debido a que el analizador automático con separación en columna de intercambio iónico es limitado principalmente al análisis de AAs, la posibilidad de determinar AAs por cromatografía de gases presentó interés a principios de los 60's, cuyas metodologías involucraron la derivatización pre-columna para que los AAs se convirtieran a derivados volátiles antes de la cromatografía (Mackenzie, 1987). El N-trifluoroacetil n-butil ester, N-acetil-n-propil ester y el N-heptafluoro-butiril ester parecen ser los mejores reactivos para realizar la derivatización. Las ventajas de estos métodos son la alta sensibilidad y la reducida cantidad de muestra para el análisis. Sin embargo, la necesidad de derivatizar la muestra para formar compuestos volátiles, las hace tediosas y tardadas. Otra de las desventajas de este tipo de cromatografía es que la muestra debe ser desalinizada antes del análisis (Fabián *et al.*, 1990).

2.7 Preparación de muestras para análisis cromatográfico

El análisis de AAs involucra una serie de pasos antes de su determinación cualitativa o cuantitativa, entre ellos la hidrólisis de proteína, la posterior derivatización de AAs y, finalmente, la separación cromatográfica. Es en estos aspectos en los que se ha basado la investigación para generar métodos más rápidos y confiables.

2.7.1 Hidrólisis de la proteína

Las proteínas son polímeros formados por un gran número de aminoácidos, enlazados entre sí mediante enlaces peptídicos, que son enlaces entre el grupo carboxilo de un aminoácido y el grupo amino de otro aminoácido. Los enlaces peptídicos son amidas y se pueden hidrolizar con los mismos reactivos empleados en la hidrólisis de amidas simples. El enlace peptídico se puede romper con agua en presencia de un ácido, una base o una enzima proteolítica (Rakoff y Rose, 1988). La rotura produce una amina

(R-NH₂) y un ácido carboxílico (R-COOH). En hidrólisis ácida la amina gana un protón (H⁺) dando un ión amonio (NH₄⁺). En hidrólisis utilizando base, el ácido carboxílico pierde un protón (H⁺), dando un ión carboxilato (R-COO⁻). Las reacciones anteriores (en un ácido o en una base) hace que globalmente la hidrólisis sea irreversible en ambos casos (Carey, 1999).

La completa obtención de AAs libres a partir de la hidrólisis de la proteína, se ha considerado el factor más limitante en la determinación de AAs en alimentos (Gehrke *et al.*, 1985), motivo por el cual se han desarrollado diferentes metodologías que involucran diversos reactivos y dispositivos.

La proteína puede ser hidrolizada a AAs por tratamiento ácido, alcalino o enzimático. Cada método tiene ciertas ventajas y desventajas. El tratamiento ácido destruye el triptófano, la metionina y la cisteína, y parcialmente a la serina y la treonina; la asparagina y la glutamina son interconvertidas a ácido aspártico y a ácido glutámico, respectivamente (Buzzigoli *et al.*, 1990). El tratamiento alcalino produce una parcial o completa destrucción de arginina, cisteína, serina y treonina, y algunas desaminaciones.

En el tratamiento enzimático, cada enzima es específica para un enlace peptídico en particular; una mezcla de enzimas raramente causa una completa hidrólisis. Las enzimas pueden interferir con el análisis de AAs; algunas proteínas son resistentes a enzimas. Church *et al.* (1984), desarrollaron un sistema enzimático con proteinasa K, carboxipeptidasa A y B, aminopeptidasa M, con un comparable pH y temperatura óptima; la hidrólisis de proteína (β -Lactoglobulina e Insulina) fue en 18-24 h, tiempo comparable al de la hidrólisis ácida. El porcentaje de recuperación de aminoácidos fue el 92% de la cantidad esperada. La hidrólisis enzimática ha tenido aplicaciones entre las que destacan su utilización para fines nutricionales y en el tratamiento de algunos trastornos (alergias) y enfermedades estomacales. González *et al.* (1994), emplearon las enzimas Alcalasa 0.6 L y Proteasa 660 L (de origen bacterial), y PEM 2500 S (de origen animal) en la hidrólisis de proteínas del suero de leche (Seralbúmina, β -Lactoglobulina y α -Lactoalbúmina), obteniendo péptidos de menos de 1000 Da., lo que hace desaparecer el efecto alergénico de estas proteínas.

El método más comúnmente usado en la hidrólisis de proteína es el que emplea el HCl 6 N en tubos al vacío a 110 ± 0.5 °C, o bajo reflujo en atmósfera de nitrógeno por 22 - 24 h, (Gehrke *et al.*, 1985). Un tiempo de hidrólisis corto de 4 h, y alta temperatura de 145 °C, fue practicado satisfactoriamente por Gehrke *et al.* (1987), obteniendo resultados similares a los de la hidrólisis a 110 °C por 24 h, excepto para los aminoácidos valina, isoleucina, (de un 8-9% más altos), y treonina y serina (9-13% más bajos). Sin embargo, esta variación puede ser corregida utilizando un factor de hidrólisis para los aminoácidos señalados.

El desarrollo o modificación de métodos para el análisis de triptófano se ha convertido en una importante área de investigación. El triptófano es medido por cromatografía en hidrolizados obtenidos con ácidos orgánicos, bases o ácido clorhídrico solo o con algún aditivo. Fábían *et al.* (1990), realizaron un exhaustivo estudio para optimizar la clásica hidrólisis con ácido clorhídrico 6 N en presencia de 3-(2-amino etil)indol (triptamina) para permitir la determinación conjunta de todos los aminoácidos; una desventaja en la aplicación de este aditivo es que un residuo de la triptamina eluyó junto con la lisina.

Una modificación en el método tradicional de hidrólisis fue llevada a cabo por Kan y Shipe (1981), quienes utilizaron el ácido metanosulfónico 4 N con 0.2% 3-(2 amino etil)indol para hidrólisis de alimentos, y posteriormente separación por HPLC en fase reversa. Los derivados fueron medidos fluorométricamente, encontrando resultados similares a los obtenidos con intercambio iónico, excepto para treonina y glicina que coeluyeron; y cisteína, cistina y prolina que no fueron detectadas.

Fletouris *et al.* (1993) desarrollaron un método rápido para la determinación de triptófano en proteína intacta; la determinación es espectrofotométricamente a 285.5 nm., donde se elimina la interferencia proveniente de tirosina y de otros componentes que absorben en el UV.

Otro aminoácido muy dañado en la hidrólisis ácida es la cisteína, por lo que han sido utilizados métodos de preoxidación para convertirla en ácido cistéico; sin embargo, esta reacción afecta a la metionina convirtiéndola en sulfona y degrada la tirosina. Hoogerheide y Campbell (1991) desarrollaron una metodología usando el ácido dithiodiglicólico como agente protector de la cisteína durante la hidrólisis; sin embargo,

se presentaron dificultades en la aplicación del método, al interferir el pico del reactivo (ditiodiglicólico) con la región de la alanina.

Los procedimientos más comunes usados en la hidrólisis de aminoácidos y que incluyen diferentes dispositivos son: a) operación bajo reflujo y atmósfera de nitrógeno, b) hidrólisis en tubos sellados y al vacío, y c) hidrólisis en tubos con cubierta de rosca y en atmósfera de nitrógeno o al vacío.

Cada procedimiento tiene ventajas y desventajas. La hidrólisis en reflujo, en comparación con otros procedimientos, es restringida por espacio y equipo, admitiendo solamente un limitado número de hidrolizados para ser procesados en cada serie; sin embargo, se recomienda como un método estándar, ya que presenta reproducibilidad en los resultados (Williams, 1986). La hidrólisis en tubos sellados y al vacío es el procedimiento más extensamente usado, este método consume tiempo y requiere de un operador con experiencia para sellar con flama y evacuar el tubo.

El procedimiento basado en tubos con cubierta de rosca y atmósfera de nitrógeno o al vacío es rápido, y por lo tanto, conveniente para análisis rutinarios. Rayner (1985), al comparar estas dos alternativas de los tubos al vacío o con atmósfera de nitrógeno en el análisis de harinas de soya, trigo y caseína, observó que en las harinas la metionina varió, pero en la caseína fue muy estable, esto tal vez debido a que es una proteína pura con ausencia de carbohidratos, grasas y sales minerales. Finalmente, concluyó que el uso de la atmósfera de N₂ no tiene ninguna ventaja; por lo tanto, el uso de tubos de tapón de rosca para hidrólisis es satisfactorio para el análisis rutinario de alimentos.

Waters Associates (Milford Massachussets, USA) desarrollaron un sistema para efectuar la hidrólisis, en el cual 48 muestras pueden ser hidrolizadas a la vez, en un periodo de 24 h a 108 °C, usando HCl 6 N (de alta pureza). Los tubos de hidrólisis con la muestra son depositados dentro de un recipiente hermético (al vacío) con HCl, y sólo vapores están en contacto con la muestra; esto evita la contaminación por AAs presentes en el HCl (Williams, 1986).

El método usado para la hidrólisis de la proteína antes del análisis de AAs es de considerable importancia, porque los aminoácidos específicos son liberados y destruidos

a diferentes tasas, dependiendo de las condiciones de hidrólisis. La tasa de descomposición de los AAs durante la hidrólisis ácida depende de varios factores, incluyendo los siguientes: la naturaleza, la concentración y pureza del ácido empleado, el tiempo y temperatura de hidrólisis, y la presencia de carbohidratos, alcaloides o impurezas de metales (Tuan y Phillips, 1997).

Por otro lado, debe tomarse en cuenta la posibilidad de contaminación, factor limitante en el análisis de AAs en métodos de alta sensibilidad. Knecht y Chang (1986) determinaron la contaminación del material de cristalería de la hidrólisis y de la derivatización (tubos de hidrólisis) durante el análisis de AAs, encontrando que el reactivo de derivatización y la cristalería presentaron contaminación de AAs libres. La mayor contaminación fue después de la hidrólisis ácida. La hidrólisis líquida normal presenta más alto nivel de formación de contaminantes (Asp, Glu, Ser, Gli, Met y Lis) que la gaseosa, probablemente debido a partículas absorbidas en la solución ácida o en la pared del tubo de hidrólisis. Contaminantes eluidos coincidieron en la posición de Met y Lis, a los cuales se les consideró subproductos no aminoácidos.

2.7.2 Derivatización de aminoácidos

Para hacer posible la detección de los aminoácidos, se requiere que presenten características cromóforas o de fluorescencia. Como la mayoría carecen de tales propiedades, se les debe conferir mediante un proceso llamado derivatización, el cual se logra mediante el uso de reactivos específicos.

Las investigaciones realizadas en técnicas de análisis de aminoácidos, se han enfocado principalmente al empleo de diferentes compuestos para obtener derivados cromóforos o fluorescentes de aminoácidos. Se han empleado diferentes reactivos de derivatización pre-columna, entre los que se encuentran: el fenilisotiocianato (PITC) (Toran *et al.*, 1996), el fluorenilmetiloxycarbonilclorhídrico (FMOC-Cl) (Betnér y Földi, 1986), el cloruro de dimetilamino azobenzenosulfonil (DABS-Cl) (Beckmam Instruments. Inc., 1989; Knecht y Chang, 1986), genera compuestos cromóforos. El anterior reactivo produce derivados con una gran sensibilidad, pero a la vez esto ocasiona una fuerte interferencia en la separación cromatográfica, además de la falta

de especificidad, ya que se generan múltiples derivados de los aminoácidos (Knecht y Chang, 1986).

El ortoftaldialdehído (OPA) ofrece buena sensibilidad, y además es estable en solución acuosa. Para desarrollar el derivado fluorescente se requiere de la adición de un mercaptano como el 2-mercaptoetanol (2ME). Se ha demostrado que la estabilidad se pierde después de 60 min (Zielke, 1985), su detección es por medio de un detector de fluorescencia, el cual se programa para producir una longitud de onda de excitación de 340 nm y que registre una longitud de onda de emisión de 455 nm, parámetros en los cuales se registra la señal de los derivados. El OPA reacciona únicamente con aminas primarias (Garza et al., 1986; Cavazos et al., 1996). La reacción de derivatización para los reactivos más utilizados en el análisis de aminoácidos se presentan en la Figura 3.

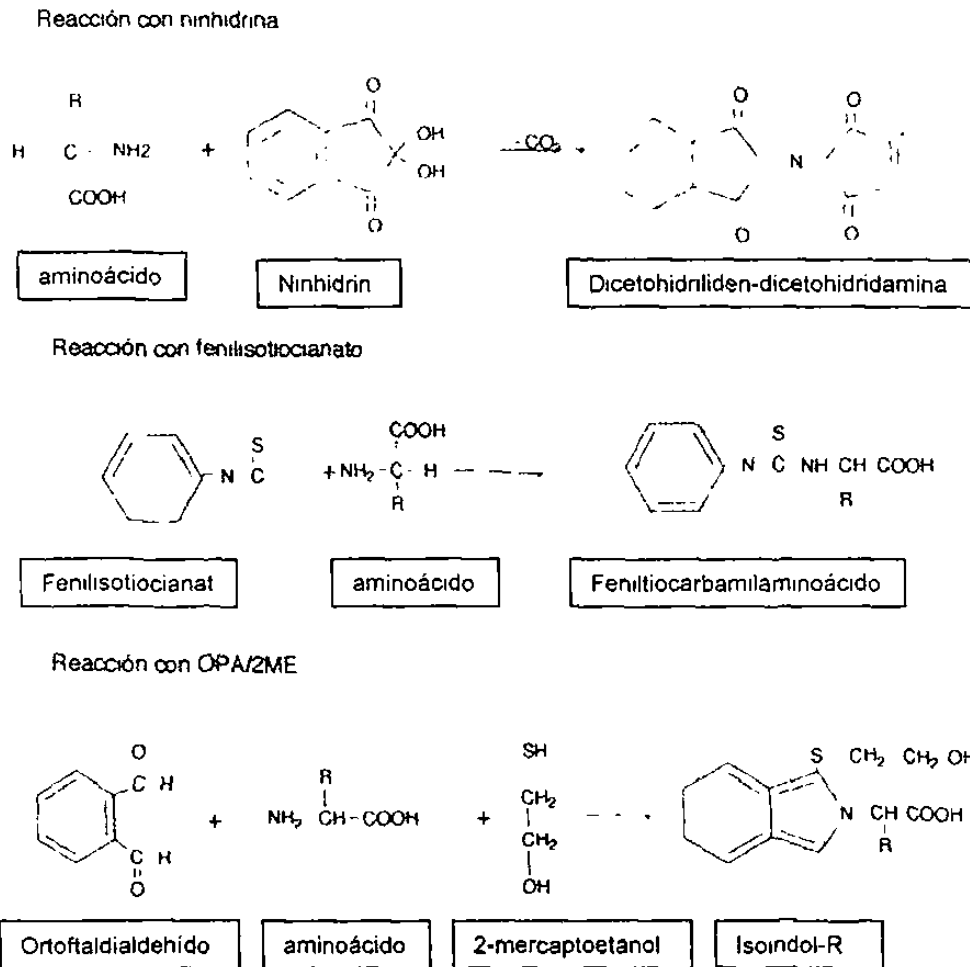


Figura 3. Reacción de derivatización de aminoácidos con diferentes reactivos.

Todos los reactivos de derivatización presentan ventajas e inconvenientes. Algunos de los aspectos que los caracterizan en el análisis de AAs de hidrolizados de proteínas fueron resumidos por la Joint FAO-WHO (1991) y se muestran en el Cuadro 1. Las condiciones que se buscan en un reactivo de derivatización son: que una mezcla de AAs pueda ser cuantitativamente convertida a una mezcla de derivados, que sea fácilmente removido por evaporación, que su metodología no sea excesivamente minuciosa, y que produzca el resultado deseado dentro de un amplio rango de tolerancia del desarrollo de la técnica (Henrikson y Meredith, 1984).

Cuadro 1.-Algunos de los métodos disponibles para derivatización pre-columna para el análisis de aminoácidos en hidrolizados de proteína.

	PITC	OPA	FMOC	FDNB	FDNPAA	Dansyl
Tiempo de derivatización (min)	20	0.5	5	30	50	30
Remoción del reactivo por secado	Si	No	No	Si	Si	No
Extracción del solvente	No	No	Si	No	No	No
Determinación de aminas secundarias	Si	No	Si	Si	Si	Si
Producción cuantitativa	Si	Si	Si	Si	Si	Si
Derivados estables	Si	No	Si	Si	Si	No
Productos de interferencia	No	No	No	Si	Si	Si
Detección	254nm	Fluoresc encia	Fluoresc encia	363nm	340nm	Fluoresc encia
Sensibilidad	pmol	fmol	fmol	pmol	pmol	pmol
Interferencia por contaminantes en eluentes	Si	No	No	No	No	Si

PITC = fenilisotiocianato; OPA = o-ftalaldehído; FMOC = 9- fluorenilmetil cloroformato
FDNPAA = 1-fluoro-2,4-dinitrofenil-5-L-alanina amida; FDNB = 1-fluoruro-2,4-dinitrobenzeno; Dansil = cloruro de -1-dimetilamino-naftaleno 5 sulfonil (Joint FAO-WHO, 1991).

Solamente el PITC y el OPA han sido extensamente usados para derivatización pre-columna en el análisis de hidrolizados de proteína. El PITC es un reactivo que forma derivados que pueden ser medidos en el detector de luz ultravioleta a una longitud de onda de 254 nm, los cuales son cromóforos con aminas primarias y secundarias (PTH-aminoácidos). Usando HPLC-fase reversa se obtienen resultados comparables a los de

cromatografía de intercambio iónico; sin embargo, al reaccionar con hidroxilisina e hidroxiprolina, puede producir interferencia de picos al presentar coelución con lisina y prolina respectivamente (Sarwar y Botting, 1993).

La estabilidad de los PTH-aminoácidos es controlada por la temperatura y pH (5-7.5). En solución a pH óptimo, la pérdida de derivados es de 0-10% en 10 h. Refrigerando a 4°C, se puede limitar la pérdida a 5% en 48 h. El almacenado de derivados secos (liofilizados) a -20°C y bajo presión reducida les da estabilidad por meses, e incluso un año (Krause *et al.*, 1995).

Henrikson y Meredith (1984) fueron los primeros que describieron con detalle la utilización de la derivatización pre-columna de PITC y posteriormente fue desarrollado un método comercial por Waters (Milford, MAUSA), conocido como el método Pico-tag. Subsecuentes cambios realizados por Bidlingmeyer (1987) redujeron el tiempo de análisis de 50 a 23 min. La metodología PITC con varias modificaciones ha sido aplicada a alimentos y fluidos fisiológicos (Beaver *et al.*, 1987; Buzzigoli *et al.*, 1990), alimentos y heces (Sarwar y Botting, 1993), alimentos para humanos y para animales (Hagen *et al.*, 1989).

2.8 Validación de métodos por cromatografía de líquidos de alta resolución

Una vez desarrollado un método de análisis por HPLC, al igual que toda técnica analítica, debe ser confirmando y documentando que los resultados obtenidos son confiables. Quattrocchi *et al.* (1992) hacen mención que en un ensayo de validación debe considerarse los siguientes parámetros:

1. Selectividad.- se refiere a la propiedad del método de producir una señal medible debida sólo a la presencia del analito, libre de interferencia de otros componentes, en la matriz de la muestra.
2. Linealidad.- se refiere a la proporcionalidad entre la concentración de analito y su respuesta; se comprueba mediante un análisis de regresión lineal.
3. Precisión.- está relacionada con dispersión de las medidas alrededor de su valor medio o central, y corresponden al grado de concordancia entre ensayos cuando el método se aplica repetidamente a múltiples alícuotas de una muestra homogénea

La precisión se expresa matemáticamente como la desviación estándar, o más comúnmente, como la desviación estándar relativa o coeficiente de variación.

4. *Exactitud*.- también conocida como error sistemático o tendencia, corresponde a la diferencia entre el valor obtenido (media) y el valor verdadero. La recuperación del analito debe acercarse al 100%.
5. Límite de detección.- corresponde a la mínima cantidad de analito que puede producir un resultado significativo.
6. Robustez.- corresponde a los estudios que indican el grado de confiabilidad del ensayo ante cambios de variables comunes. Estos cambios pueden ser ligeras diferencias operativas de equipo, analista, laboratorio, columna, etc.; es evidente que un método debe ser "robusto" (reproducible), frente a cambios de analistas o instrumentos.

Una de las aplicaciones más relevantes del análisis de aminoácidos ha sido la evaluación de alimentos tanto para animales, como para humanos, investigaciones enfocadas en la obtención de metodologías cuyos resultados sean comparados con los resultados obtenidos por medio de la convencional cromatografía de intercambio iónico (Brian *et al.*, 1987; Beaver *et al.*, 1987; Tuan y Phillips, 1997). La validación de las metodologías ha contribuido a la alternativa de poder utilizar un procedimiento más rápido económico y sensible (Harris, 1988).

Llames y Fontain (1994), realizaron un estudio colaborativo entre 28 laboratorios para observar la desviación estándar relativa existente en la determinación de aminoácidos de ingredientes (maíz, harina de pescado) y alimentos completos para aves (iniciación, finalización); para lo cual, utilizaron cromatografía de intercambio iónico (IEC) y tres métodos alternos de hidrólisis (oxidación con ácido per fórmico hidrólisis-ácida metabisulfito de sodio; oxidación con ácido per fórmico hidrólisis ácida-ácido bromhídrico, e hidrólisis ácida). La mayor variación en cuanto a la repetibilidad para todos los aminoácidos y para los tres procedimientos se presentó en el alimento completo (12.7%). La variación en la reproducibilidad fue mayor que en la repetibilidad; el mayor valor lo presentó el alimento de iniciación (28.2%). Se concluyó que cualquiera de los métodos propuestos puede adaptarse al análisis de aminoácidos.

Beaver *et al.* (1987) validaron una técnica de análisis de aminoácidos utilizando el PITC para el análisis de alimentos para animales. Obtuvieron precisión en el método al analizar muestras de trigo (CV% = 1.9-6.7). La recuperación fue del 100% para la mayoría de los aminoácidos (estándar de aminoácidos). Los valores obtenidos en trigo y muestras de alimento para aves fueron iguales a los obtenidos por cromatografía de intercambio iónico (IEC). Lo anterior muestra la posible aplicación de este método para aplicarse a materiales altos en proteína como son: las harinas de sangre, pescado y soya.

En los estudios de metabolismo, la concentración de aminoácidos así como de otros metabolitos es de gran importancia. Los análisis a través del plasma son más frecuentes; sin embargo, la medición a través de sangre completa es de gran interés ya que las células rojas de la sangre participan activamente en el intercambio de aminoácidos entre el tejido y la sangre. Por lo tanto, cuando estimamos el papel de un órgano en el metabolismo de aminoácidos con el uso de la técnica de balance neto, tasa de flujo y gradiente de concentración arteriovenosa pueden ser usados para determinar el balance neto verdadero del órgano. Buzzigoli *et al.* (1990) desarrollaron un método para el análisis de sangre, utilizando PITC como reactivo de derivatización y CLAR- Fase Reversa; la deproteinización fue efectuada con ácido perclórico. Los CV más elevados en cuanto a la repetibilidad se presentaron en la histidina (14.6%), metionina (20.5%) y fenilalanina (12.8%); con respecto a la reproducibilidad, la variación fue mayor para la mayoría de los aminoácidos, notándose ese incremento grandemente en la lisina (repetibilidad 2.6 %: reproducibilidad 11.4%).

En el mercado alimenticio, el análisis de aminoácidos no solamente posibilita la investigación y el control de la calidad de los alimentos brindando información de la calidad nutricional de las proteínas, sino que además permite determinar posibles adulteraciones o establecer la autenticidad de los productos naturales (Cavazos *et al.*, 1996)

2.9 Utilización de la HPLC en el análisis de aminoácidos en alimentos

El conocimiento del contenido de aminoácidos de ingredientes y alimentos del ganado es importante para los nutriólogos y los fabricantes de alimentos, para lograr la meta de

producción eficiente y efectivos costos de formulación que conllevan a máximo rendimiento.

Dos ingredientes alimenticios ampliamente usados en la nutrición de monogástricos son el sorgo y la soya. MacDonald *et al.* (1985) desarrollaron una metodología de análisis de los aminoácidos azufrados: metionina y cisteína; y determinaron el contenido de estos aminoácidos en 2 alimentos para humanos y 4 para animales, entre ellos harina de soya. La metodología consistió en una preoxidación con ácido per fórmico antes de la hidrólisis, con 6 N HCl y se utilizó cromatografía de intercambio iónico y el autoanizador de aminoácidos. Los análisis fueron realizados por 7 laboratorios, la cisteína medida como ácido cistéico presentó entre los laboratorios un CV de 7.1 a 10.8% y la metionina medida como metionina sulfona presentó un CV de 1.2 a 12.8%. En el caso particular de la soya, la cantidad de ácido cistéico encontrada fue 0.63 a 0.80 g/100g de MS y para metionina sulfona 0.56 a 0.98 g/100 g MS.

Tuan y Phillips (1997) desarrollaron una metodología para la obtención simultánea de metionina y cisteína durante una hidrólisis ácida (HCl 6 N), añadiendo en esta etapa el 3,3-ácidoditiodipropionico a una temperatura de 145 °C y diferentes tiempos de hidrólisis (50 min, 75 min, 240 min y 540 min). El análisis fue mediante cromatografía de intercambio iónico y HPLC, se utilizaron hidrolizados de una dieta a base de sorgo y se observó que la cantidad de metionina y cisteína aumentó a medida que se incrementó el tiempo de hidrólisis metionina 0.099, 0.175, 0.144, 0.168 g/100 g MS, (tiempos 50 min, 75 min, 240 min y 540 min) y para cisteína 0.220, 0.276, 0.179, 0.236 g/100 g MS (tiempos 50 min, 75 min, 240 min y 540 min) respectivamente.

Los análisis del contenido de aminoácidos en soya y sorgo han sido realizados en diferentes trabajos donde se ha investigado la digestibilidad ileal, la suplementación de un aminoácido determinado, la sustitución de alguna de estas harinas, la digestibilidad de un nutriente en particular y el comportamiento productivo de los animales ante una dieta específica. Un resumen de los valores de aminoácidos reportados en diferentes trabajos donde se ha empleado soya y sorgo, así como el promedio, desviación estándar y coeficiente de variación son presentados en los cuadros 8-A y 9-A del apéndice. En ellos se puede observar que la metodología mayormente usada en su determinación es hidrólisis ácida HCl 6 N, atmósfera de N y determinación por

cromatografía de intercambio iónico, usando el autoanalyzer de aminoácidos. Para la determinación de triptófano se ha realizado hidrólisis con hidróxido de Bario; para metionina, preoxidación con ácido performico.

Otro método reportado es el que emplea el ortoformaldialdehído - 3 ácido mercaptopropiónico, detección fluorescencia (Shimadzu-LC-4 A HPLC), hidrólisis con HCl 6 N, tubos al vacío a 110 °C por 24 h (Yin *et al.*, 1993). En el Cuadro 8-A se presentan los coeficientes de variación para el contenido de aminoácidos en soya, generado de diferentes reportes, y se observa que los mayores C.V. son los obtenidos en tirosina 25.7%, histidina 19.5%, metionina 15.1%, valina 11.4%, y triptófano 10.7%, mientras que el C.V. en el valor de proteína cruda fue de 4.58%. Para el caso del sorgo (Cuadro 9-A), la variación es mayor con respecto a la soya, el C.V. en la proteína cruda fue de 10% y los mayores coeficientes de variación en los aminoácidos fueron obtenidos en valina 31.5%, triptófano 21.7% y metionina 11.1%. Lo anterior muestra la gran variación en los cultivos de sorgo.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

La presente investigación se llevó a cabo en instalaciones de la Facultad de Agronomía de la UANL, localizada en Marín, N. L. Principalmente en el Laboratorio de Biotecnología Microbiana. Parte del trabajo (separación cromatográfica) fue realizada en el Laboratorio de Química Molecular de la Facultad de Medicina UANL.

3.1 Separación cromatográfica

3.1.1 Equipo utilizado

En el presente estudio se utilizó un Cromatógrafo de Líquidos de Alta Resolución, el cual cuenta con un espectrofotómetro UV-VIS (L-4250 Merck-Hitachi Tokio Japón), un sistema de bombas de doble pistón (L-6200 Merck-Hitachi, Tokio Japón), un automuestreador (AS-2000 Merck-Hitachi Tokio Japón) con una capacidad de inyección de 4 a 50 μ l, y una interfase (D-6000 Merck-Hitachi Tokio Japón), la cual permite la conexión con la computadora para que el sistema se maneje mediante el uso de un software (HPLC Manager versión 2 P/N 008-8050-09 Merck-Hitachi Tokio Japón).

Con respecto al tipo de columna, se utilizó una para fase reversa de Octadecilsilanos (Luna Phenomenex, USA) de las siguientes dimensiones: 250 mm de largo con un diámetro de 4 mm y un tamaño de partícula de 4.5 μ m. Para brindar protección a la columna se utilizó una pre-columna de la misma composición y de las siguientes dimensiones: 4.0 mm de diámetro y 20 mm de largo (Hewlett Packard USA). La temperatura durante el análisis fue mantenida a 35°C con un horno calentador de columnas (Eppendorf- CH-30, USA).

3.1.2 Elección del reactivo de derivatización, fases estacionaria y móvil

Considerando que se contaba con un detector de luz ultravioleta y visible, se consultó literatura para definir el reactivo de derivatización que permitiera la detección cromófora de los diferentes AAs. Se eligió el Fenilisotiocianato, ya que es uno de los reactivos de derivatización que producen derivados de aminoácidos cromóforos (Harris, 1988), produce derivados estables (Krause *et al.*, 1995) y una mezcla de aminoácidos puede ser cuantitativamente convertida a una mezcla de derivados (Bidlingmeyer *et al.*, 1987). La forma de llevar a cabo la reacción de derivatización fue siguiendo la metodología propuesta por Bidlingmeyer *et al.* (1987), la cual será detallada ampliamente en la sección referente a derivatización de aminoácidos (3.1.3). La derivatización fue comprobada inyectando una mezcla de AAs sin derivatizar y una mezcla derivatizada, y se observó la señal producida.

La fase estacionaria que se utilizó fue una columna de fase reversa de Octadecilsilanos (Luna Phenomenex, USA). La fase móvil utilizada fue la propuesta por Fürst *et al.* (1989) cuyos eluentes estaban constituidos de la siguiente manera: Eluente A, buffer de fosfatos de sodio 12.5 mM y 0.05% de trietilamina a pH 6.4. Eluente B, se utilizaron 400 ml del buffer de fosfatos de la composición anteriormente descrita más 600 ml de acetonitrilo, se ajustó el pH a 6.4.

La fase móvil fue utilizada en gradiente de elución, hasta lograr la separación de los 17 AAs, como se describirá más adelante.

3.1.3 Preparación de soluciones de estándares de aminoácidos, individuales y mezclas

Se preparó una solución *stock* de cada uno de los estándares de los 17 aminoácidos (Cuadro 2) a una concentración de 0.1 M. Los cálculos se realizaron empleando la fórmula de Molaridad (Segel, 1976).

$$M = \frac{\text{moles}}{V(L)}$$

$$\text{moles} = \frac{g}{PM}$$

$$M = \frac{g/PM}{V(L)}$$

$$\text{entonces } g = (M)(PM)(V)$$

Donde: M es la concentración, PM es el peso molecular de cada aminoácido indicado en la etiqueta de su presentación comercial, y V es el volumen (en este caso = 0.010 L.)

En una balanza analítica (Ohaus USA) se pesó individualmente dentro de un matraz de aforación de 10 ml exactamente la cantidad de AA indicada de acuerdo al Cuadro 2 y posteriormente se agregó HCl 0.1N hasta aforación, excepto en el caso de la tirosina, la cual fue disuelta en NaOH 0.1 N, obteniendo así 17 soluciones de aminoácidos (individuales).

Cuadro 2. Cantidad pesada de cada aminoácido para obtener 10 ml de solución 0.1 M.

Aminoácido	Gramos
DL- Acido Aspártico $C_4H_7NO_4$ SIGMA 99%	0.1331
DL- Acido Glutámico $C_5H_9NO_4$ SIGMA 98% content H_2O 1 mol/mol	0.1471
DL- Serina $C_3H_7NO_3$ SIGMA 98%	0.1051
Glicina $C_2H_5NO_2$ SIGMA 99%	0.7507
DL- Histidina $C_6H_9N_3O_2$ SIGMA 99%	0.1552
Clorhidrato de DL-Arginina $C_6H_{14}N_4O_2 \cdot HCl$ SIGMA 98% con H_2O 1 mol/mol	0.2107
DL-Treonina $C_4H_9NO_3$ SIGMA 98%	0.1191
DL-Alanina $C_3H_7NO_2$ SIGMA 99%	0.8909
DL-Prolina $C_5H_9NO_2$ SIGMA 99% con H_2O 0.25 mol/mol	0.1151
L-Tirosina $HOC_6H_4-4-CH_2CHNH_2COOH$ CARLO ERBA 99%	0.1812
DL-Valina $C_5H_{11}NO_2$ SIGMA 98%	0.1171
DL-Metionina $C_5H_{11}NO_2S$ SIGMA 99%	0.1492
DL-Isoleucina $C_6H_{13}NO_2$ SIGMA 98%	0.1312
L-Leucina $C_6H_{13}NO_2$ SIGMA 99%	0.1312
DL-Fenilalanina $C_9H_{11}NO_2$ 98%	0.1652
L- Triptófano $C_{11}H_{12}N_2O_2$ 98%	0.2042
Clorhidrato de L-Lisina $C_6H_{15}N_4O_2 \cdot HCl$ MERCK 99%	0.1826

A partir de la solución 0.1 M de cada AA se preparó una mezcla tomando 100 μ l de cada uno, depositándose en un matraz de aforación, y completando el volumen de 10 ml con buffer de fosfatos 12.5 mM pH = 6.4; de esta manera se obtuvo una solución con 1 mM de cada AA. La mezcla de aminoácidos conteniendo 1 mM (1 μ mol/ml) de cada uno, fue utilizada para establecer las condiciones óptimas de trabajo.

3.1.4 Derivatización de aminoácidos

El procedimiento para llevar a cabo la derivatización de AAs fue de acuerdo a lo propuesto por Bidlingmeyer *et al.* (1987), Salazar (1993) y Yang (1985). Se llevaron a cabo los siguientes pasos: se tomaron 75 μl de la solución de la mezcla de 17 estándares de AAs de 1 $\mu\text{mol/ml}$, se depositaron en un tubo Eppendorf de 2.5 ml y se llevaron a sequedad utilizando un liofilizador (Labconco, USA). Se adicionó posteriormente 75 μl de una solución constituida por etanol, agua y trietilamina en una proporción 2:2:1 respectivamente. Esta solución proporciona el pH (9) para que se lleve a cabo la reacción de derivatización. Posteriormente, se secó mediante liofilización, y se agregaron 75 μl de una solución constituida por etanol, agua, trietilamina y feniltiocianato en una proporción 7:1:1:1 respectivamente; esta solución permite que los aminoácidos sean convertidos en feniltiocarbamil-derivados (PTH), dándoles propiedad de absorber luz UV pudiendo ser detectados a una longitud de onda de 254 nm. Se agitó durante 10 s en un vórtex a velocidad 6 para lograr una completa homogenización. Se dejó en reposo a temperatura ambiente por 20 min, y después de este tiempo se llevó a completa sequedad mediante liofilización. Los aminoácidos derivatizados fueron almacenados a -20°C hasta su posterior análisis. La derivatización fue evaluada indirectamente en las pruebas de reproducibilidad cuantitativa, (sección 3.2.2) mediante la obtención de C.V.% de la alturas de pico.

3.1.5 Determinación del programa de elución adecuado y condiciones óptimas de separación

Los derivados de la mezcla de aminoácidos (PTH-AAs), se disolvieron en 750 μl de buffer de fosfatos de sodio 12.5 mM con 0.05% de trietilamina, a un pH de 6.4. Para favorecer la disolución se utilizó un baño de ultrasonido (Ultrasonicator, USA) por 10 min a temperatura ambiente. Enseguida se filtró la solución utilizando una unidad de filtrado de muestras (Millipore, USA), y una membrana Durapore (Millipore, USA) de 0.45 μm . La mezcla de aminoácidos derivatizada y resuspendida fue introducida al HPLC utilizando un automuestreador (Hitachi Merck, Tokio Japón), programado para realizar una inyección de 10 μl .

Para la separación de los aminoácidos, se inició con la utilización de un gradiente desarrollado por Salazar (1993), el cual estaba constituido por cambios de la proporción entre el eluyente A y eluyente B (gradiente de elución). Posteriormente se hicieron las modificaciones convenientes hasta permitir la separación cromatográfica y salida de la columna en forma individual de los diferentes AAs. La fase móvil utilizada fue la propuesta por Fürst *et al.* (1989), la cual estaba conformada por el eluyente A buffer de fosfatos de sodio 12.5 mM y 0.05% de trietilamina a pH 6.4.- Se disolvieron 0.24 g de Na_2HPO_4 y 1.30 g de NaH_2PO_4 en un vaso de precipitados, se agregó agua MilliQ, obtenida mediante un sistema de desionización (NANOpure, Barnstead, USA) y 0.5 ml de trietilamina (TEA), se ajustó el pH utilizando HCl 3 N y/o NaOH 3 N y se aforó a un litro con agua MilliQ.

Para el eluyente B se utilizaron 400 ml del buffer de fosfatos de la composición anteriormente descrita, más 600 ml de acetonitrilo, y se ajustó el pH a 6.4 utilizando HCl 3 N y/o NaOH 3 N.

Los eluentes fueron filtrados a través de un filtro Milipore GS 0.22 μm y GV 0.22 μm , para A y B, respectivamente. Se utilizó una unidad de filtración conectada a una bomba de vacío. Los eluentes, antes de utilizarse, fueron desgasificados empleando vacío y agitación magnética durante 10 min en velocidad media (5 de 10). La separación cromatográfica fue iniciada con un gradiente propuesto por Salazar (1993). Después de la inyección de la mezcla de 17 aminoácidos, se observó el cromatograma generado poniéndose especial atención a la forma de los picos cromatográficos y la resolución entre ellos. Se consideró resuelto al pico cuyos extremos inferiores tocaran la línea basal del cromatograma. Posteriormente se realizó la modificación en el programa de elución: cuando los picos no estuvieron resueltos; se introdujeron lapsos donde permanecía una concentración constante de la fase A y B (condición isocrática), en los sitios de elución en gradiente el cambio de la proporción de la fase A y B se disminuyó. Otro cambio efectuado fue el aumento del flujo de las fases, al mismo tiempo que se disminuyeron los tiempos de las etapas de elución en gradiente así sucesivamente, hasta lograr la separación de los 17 aminoácidos. Cabe señalar que parte de esta sección del trabajo fue realizado en el Laboratorio de Química Molecular de la Facultad de Medicina de la UANL, para lo cual se utilizó un sistema de cromatografía de líquidos

de alta resolución Varian Gold, el resto del instrumental y reactivos utilizados fueron los anteriormente señalados.

3.1.6 Determinación de los tiempos de retención de cada uno de los 17 estándares de aminoácidos en una mezcla y en inyecciones individuales

Una vez obtenida la separación de los 17 AAs, se identificó el orden de elución y tiempo de retención, de acuerdo a lo reportado en artículos científicos relacionados con el tema (Fürst *et al.*, 1989). No obstante, se corroboró la identificación de ellos, para lo cual se realizó la inyección de cada aminoácido, constatando el tiempo de retención de cada uno. En el caso de tener duda en alguno de ellos, se realizó una coinyección que consistía en adicionar a una mezcla de los 17 aminoácidos, una cantidad extra del aminoácido que se quería identificar, observando el incremento en altura del aminoácido en particular.

3.2 Evaluación cualitativa, cuantitativa y linealidad del método

3.2.1 Evaluación cualitativa del método: Repetibilidad y Reproducibilidad cualitativa

1. Repetibilidad cualitativa. Esta prueba evalúa fundamentalmente el buen funcionamiento de la bomba y el mezclador del cromatógrafo, bajo condiciones de temperatura constante durante el análisis (Huber, 1994). Se realizó la inyección tres veces el mismo día de una mezcla de 17 estándares de AAs de la misma concentración (1 $\mu\text{mol/ml}$) derivatizados previamente, obteniendo el *coeficiente de variación del tiempo de retención* para cada aminoácido.
2. Reproducibilidad cualitativa. Esta prueba evalúa además de lo anterior, la preparación de fase móvil, deterioro de la columna. Manteniendo condiciones de temperatura constante durante el análisis. Se realizó la inyección en tres días diferentes, de una mezcla de 17 estándares de AAs de la misma concentración (1 $\mu\text{mol/ml}$) derivatizados previamente, obteniendo el *coeficiente de variación del tiempo de retención* para cada aminoácido.

3.2.2 Evaluación cuantitativa del método: Repetibilidad y Reproducibilidad cuantitativa

1. Repetibilidad cuantitativa. Esta prueba evalúa fundamentalmente el detector y el sistema de inyección. Se realizó la inyección tres veces el mismo día de una mezcla de 17 estándares de AAs de la misma concentración ($1 \mu\text{mol/ml}$) derivatizados previamente, obteniendo el coeficiente de variación de la altura de pico para cada aminoácido.
2. Reproducibilidad cuantitativa. Esta prueba evalúa el deterioro del equipo (lámpara, bomba y columna) y preparación de las fases A y B. Se realizó la inyección en tres días diferentes de la mezcla de 17 estándares de AAs de la misma concentración ($1 \mu\text{mol/ml}$) derivatizados previamente, obteniendo el coeficiente de variación de la altura de pico para cada aminoácido (Bidlingmeyer *et al.*, 1984).

3.2.3 Evaluación de la linealidad del método (Recta de calibración).

Para evaluar la linealidad del método, se realizó una serie de diluciones a partir de la concentración de la mezcla de 17 estándares de AA's, siendo éstas de: 1, 0.75, 0.50 y $0.25 \mu\text{mol/ml}$, (Bidlingmeyer *et al.*, 1987; Salazar, 1993). Dichas concentraciones corresponden al volumen antes de la inyección al cromatógrafo, los límites superior e inferior de la dilución fueron seleccionados tomando en cuenta que todos los aminoácidos manifestaran señal (altura de pico), en el cromatograma ($0.25 \mu\text{mol/ml}$), y que a la vez no se presentaran problemas de taponamiento en la columna por exceso de reactivo de derivatización empleado para una mayor cantidad de aminoácidos ($1 \mu\text{mol/ml}$). Posterior a la dilución, se procedió a realizar la derivatización, como se indicó previamente (sección 3.1.4.) Las diferentes diluciones derivatizadas y resuspendidas fueron inyectadas ($10 \mu\text{l}$) al HPLC, se obtuvo para cada AA una señal en base a la altura de pico (Y). Se utilizaron estos datos junto con la concentración (X), para realizar un análisis de regresión obteniendo el coeficiente de determinación (R^2) y los valores de la pendiente (β_1) y ordenada al origen (β_0); los cuales serán utilizados al momento de realizar los análisis cuantitativos posteriores (Silvestre *et al.*, 1994).

3.3 Evaluación de la metodología de hidrólisis

Para determinar la pérdida de aminoácidos por efecto de la hidrólisis, se sometió a "hidrólisis" una mezcla de 17 estándares de AAs, la cual se preparó de la siguiente manera: se tomaron 500 μl de la solución stock de 0.1 M de cada AA individual (sección 3.1.3), se depositaron en un matraz de aforación de 10 ml y se completó el volumen con buffer de fosfatos de sodio 12.5 mM pH 6.4. De esta manera se obtuvo una solución de 5 $\mu\text{mol/ml}$ de cada aminoácido. La metodología de hidrólisis que se siguió fue la descrita por Simpson *et al.* (1976), en la cual se utiliza el ácido metanosulfónico 4 N conteniendo 0.2% de 3-(2-aminoetil)indol como catalizador (Pierce). Este compuesto mantiene la integridad del triptófano a diferencia del ácido clorhídrico que le produce una rápida destrucción por oxidación.

Se tomaron 400 μl de la solución de 5 $\mu\text{mol/ml}$ (cinco repeticiones), se depositaron en un tubo de hidrólisis al vacío (Pierce, USA), se agregaron 500 μl de ácido metanosulfónico (Pierce), se le realizó vacío por 1 minuto mediante una bomba, posteriormente se enroscó el tapón y finalmente se puso en un horno calentador (Pierce) a 153°C por 2 h (Guajardo, 2000). Una vez transcurrido este periodo, se sacaron los tubos del horno se enfriaron y se aforaron a un volumen de 1.5 ml con buffer de fosfatos de sodio 12.5 mM pH 6.4, obteniendo una concentración final de cada aminoácido de 1.33 $\mu\text{mol/ml}$. El hidrolizado se almacenó en un vial Eppendorf a -20°C hasta su análisis cromatográfico. 75 μl del "hidrolizado" fueron derivatizados (de acuerdo a la sección 3.1.4) y resuspendidos en 750 μl . de buffer de fosfatos de sodio 12.5 mM pH 6.4, de aquí se inyectaron 10 μl al HPLC.

Se realizó el análisis cuantitativo mediante el método del estándar externo (Quattrocchi *et al.*, 1992) el cual consiste en la generación de una curva de calibración obtenida a partir de los datos de concentración y altura de pico generados del análisis de una serie de diluciones, siendo estas 1, 0.75, 0.50 y 0.25 $\mu\text{mol/ml}$ de cada uno de los 17 estándares de AAs. Con los datos anteriores se realizó un análisis de regresión para cada AA, obteniendo los coeficientes de determinación (R^2), los valores de β_0 (ordenada al origen) y β_1 (pendiente de la recta). La concentración de cada AA en el "hidrolizado" se determinó utilizando la siguiente fórmula (Draper y Smith, 1981):

$$X = (y - \beta_0) / \beta_1$$

X = concentración

y = altura de pico de cada AA obtenido a partir del cromatograma

β_0 = ordenada al origen

β_1 = pendiente de la recta

Para calcular el factor de hidrólisis, se tomó en cuenta la concentración de los AAs en la mezcla de estándares que se hidrolizó, la cual fue 1.33 $\mu\text{mol/ml}$; este valor se dividió entre la concentración obtenida a partir del análisis cromatográfico del "hidrolizado" y calculada con la fórmula antes descrita (valor de X), de tal manera que se obtuvo un factor de hidrólisis para cada AA.

Dicho factor permitió corregir los valores obtenidos en el análisis de muestras (Tuan y Phillips, 1997).

3.4 Evaluación de la exactitud del método: Cuantificación de aminoácidos en una proteína de composición conocida albúmina sérica bovina (ASB)

Para verificar la exactitud del método desarrollado, se realizó el análisis de una proteína de composición aminoacídica conocida utilizando albúmina sérica bovina (Sigma), la cual ha sido utilizada por Hoogerheide y Cambells (1992), en un estudio similar al presente. Se depositaron 3.5 mg de ASB por triplicado dentro de un tubo de hidrólisis al vacío, y posteriormente se siguieron los mismos pasos descritos en la obtención del factor de hidrólisis. Así también la derivatización fue de acuerdo a lo señalado en la sección 3.1.4 La cuantificación se realizó empleando la fórmula de concentración descrita en la sección 3.3, Y posteriormente se realizó el siguiente cálculo para reportar el contenido de cada aminoácido en porciento.

$$\% \text{ de AA} = 100[(\text{valor de X}) (\text{PM}) (\text{V en L}) / \text{mg de muestra}]$$

Donde:

valor de X = valor obtenido de la ecuación de concentración

PM = peso molecular de cada AA

V = volumen de la dilución en litros

mg = peso de la muestra hidrolizada

Los valores obtenidos se corrigieron utilizando el factor de hidrólisis para cada aminoácido, y fueron comparados con la composición teórica de la ASB (obtenida por secuencia aminoacídica, Banco Genómico). Se realizó una prueba de t de Student ($t_{0.05 (2) gl}$), en la modalidad de un grupo de datos contra un dato (SPSS, 1997), con la finalidad de observar diferencias significativas entre lo esperado y lo obtenido con el método desarrollado. Además, se realizó un análisis de correlación para ver la relación entre los datos obtenidos con respecto a los esperados, se generó una ecuación para ajustar los datos obtenidos con respecto a los esperados mediante una línea de regresión (Hoogerheide y Cambells, 1992).

3.5 Análisis de ingredientes

Se colectó una muestra de los ingredientes soya y sorgo que regularmente son utilizados en la formulación de dietas para cerdos en la FAUANL. Las muestras de soya y de sorgo fueron molidas en un molino Willey y pasadas a través de un tamiz de 2 mm. A partir de harinas de soya y sorgo se realizaron mezclas tomando en cuenta la cantidad de materia seca (determinación gravimétrica 105°C en estufa durante 2 h) de dichos materiales. Se realizaron las combinaciones soya:sorgo 50:50 y 25:75. Posteriormente se determinó la cantidad de proteína de las muestras mediante el método Kjeldahl (AOAC, 1990), y en base a esa cantidad (Cuadro 10), se realizaron los cálculos sometiendo a la hidrólisis 3.5 mg de proteína colocando por triplicado la cantidad señalada. Finalmente se realizó el análisis cuantitativo de aminoácidos de las harinas, usando los procedimientos descritos anteriormente.

Con los resultados obtenidos de los tres hidrolizados de cada muestra, se les calculó la media, desviación estándar y el coeficiente de variación. Los datos obtenidos para los aminoácidos esenciales fueron comparados con los valores (teóricos) reportados en el NRC (1998), ya que la información existente en esta fuente generalmente sirve de referencia al momento de realizar una ración alimenticia para el ganado. Finalmente se realizó una prueba de t de Student con la finalidad de observar diferencias significativas en los datos obtenidos.

4. RESULTADOS

4.1. Determinación del programa de elución

4.1.1 Condiciones óptimas de separación

La separación cromatográfica fue realizada en condiciones de gradiente iniciando con el eluyente polar (A: Buffer) y terminando con el eluyente apolar (Buffer más un compuesto orgánico). En el Cuadro 3 se muestra la serie de cambios en tiempo (min) y proporción del eluyente B de los gradientes utilizados para llegar a las condiciones finales de separación. La resta de cien menos el % del eluyente B es la proporción del eluyente A en todos los gradientes. Se puede observar que el primer cambio que se realizó del gradiente 1 al 2, fue eliminar el paso de 15 a 22 min donde cambiaba el %B de 32% a 28%, esa condición se sustituyó por la introducción de un lapso de elución isocrática de 18 a 25 min manteniendo un 35% del eluyente B, en la Figura 2-A del apéndice se puede observar la poca resolución en los primeros 9 picos.

Cuadro 3. Gradientes utilizados para la separación de aminoácidos mediante HPLC-FR.

Gra. 1		Gra. 2		Gra. 3		Gra. 4		Gra. 5		Gra. 6	
T (min)	Eluyente B%	T (min)	Eluyente B%	T (min)	Eluyente B%	T (min)	Eluyente B%	T (min)	Eluyente B%	T (min)	Eluyente B%
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	2	5	2	5	2	7	0	30	0	35	10
15	32	18	35	9	10	9	5	44	35	49	42
22	28	25	35	14	10	17	5	51	35	56	42
26	68	33	100	24	35	29	35	59	100	64	100
30	100	38	100	31	35	36	35	64	100	69	100
40	0	48	0	39	100	44	100	69	0	74	0
50	0	50	0	44	100	49	100				
				50	0	54	0				

- **Fase:** Eluyente B: 40% de buffer de fosfato de Na monobásico 12.5 mM + 60% de acetonitrilo + 0.05% de TEA. Flujo: 1 ml/min
- **Columna** para fase reversa de Octadecilsilanos (Phenomenex Luna) de las siguientes dimensiones. 250 mm de largo con un diámetro de 4 mm y un tamaño de partícula de 4.5 μ l **Pre-columna** de la misma composición y de las siguientes dimensiones 4.0 mm de diámetro y 20 mm de largo (Hewlett Packard). **Horno** calentador de columnas (Eppendorf- CH-30); manteniendo una temperatura de 35°C.

El siguiente cambio que se realizó del gradiente 2 al 3 fue introducir lo que se conoce como "escalón" o elución isocrática del minuto 9 al 14; se mantuvo un 10% de B. El cromatograma generado del gradiente 3 se muestra en la Figura 3-A del apéndice, en el cual se observa que no existía cambio en la separación, por lo que se cambió el gradiente 3 al 4 iniciando con 0% del eluyente B manteniendo esa condición por 7 min, para posteriormente a los 9 min tener un 5% del eluyente B y mantener esa condición por 8 min.

En el cromatograma 4-A del apéndice se observa la separación de los primeros 5 picos, pero los siguientes 4 aún se encuentran unidos, por lo que se cambió del gradiente 4 al 5 manteniendo en los primeros 30 minutos condiciones isocráticas con el eluyente A.

En el cromatograma 5-A del apéndice, de los primeros 9 aminoácidos, 7 se observan resueltos en picos separados y 2 están unidos en un mismo pico; los siguientes 3 picos se encuentran separados, le siguen 2 que están unidos pero con puntas separadas (corresponden a isoleucina-leucina); de los siguientes 3 AAs 2 picos se ven separados, pero el tercero se ve unido a un pico pequeño. Viendo que las condiciones isocráticas en el gradiente 5, donde los primeros 35 min se utilizó 100% de eluyente A (0% de eluyente B), no eran suficientes para separar los primeros 9 picos, pero que el gradiente general era favorable para el resto de los picos (8 de 17), se decidió que en el cambio del gradiente 5 al 6 se introdujera una elución en gradiente en los primeros 35 min, cuya pendiente fuera muy ligera de 0 a 10% con eluyente B. Posteriormente, se generó otro incremento de la proporción de B de 10% a 42% en 14 min. Esta proporción se mantuvo por 12 min y favoreció la separación de isoleucina-leucina; posteriormente la proporción de 42% del eluyente B se incrementó a 100% en 8 min, permaneciendo en esta proporción 5 min. En la Figura 6-A del apéndice se observa la separación de los 17 picos.

Como el tiempo de elución se incrementó hasta 80 min, se decidió que se aumentara el flujo del gradiente de 1 a 2 ml/min, y se redujeran a la mitad los tiempos de las diferentes etapas de elución, generando el gradiente 7, el cual constituyó las condiciones finales de separación y se presenta en el Cuadro 4. El tiempo de elución

fue de 35 min, aunque se requirió un tiempo adicional de 20 min para acondicionamiento de la columna empleando eluyente A. En la Figura 7-A del apéndice se observa la separación de 17 picos correspondiente a la mezcla de 17 estándares de AAs.

Los reactivos utilizados en la reacción de derivatización eluyeron al final del cromatograma. En la Figura 4 se observa el cromatograma del blanco de reactivos.

Cuadro 4.- Gradiente de elución final usado para la separación de aminoácidos mediante HPLC-FR.

Tiempo (min)	Eluyente A%	Eluyente B%
0.0	100	0
17.5	90	10
24.5	58	42
28.0	58	42
32.0	0	100
34.5	0	100
37.0	100	0

- Fases: Eluyente A: fosfato de Na monobásico 12.5 mM + 0.05% de TEA pH = 6.4
Eluyente B: 40% de buffer de fosfato de Na monobásico 12.5 mM + 60% de acetonitrilo + 0.05% de TEA.
- Flujo: 2 ml/min.
- Columna para fase reversa de Octadecilsilanos (Phenomenex Luna) de las siguientes dimensiones: 250 mm de largo con un diámetro de 4 mm y un tamaño de partícula de 4.5 µl
- Pre-columna de la misma composición y de las siguientes dimensiones: 40 mm de diámetro y 20 mm de largo (Hewlett Packard)
- Horno calentador de columnas (Eppendorf- CH-30); manteniendo una temperatura de 35°C

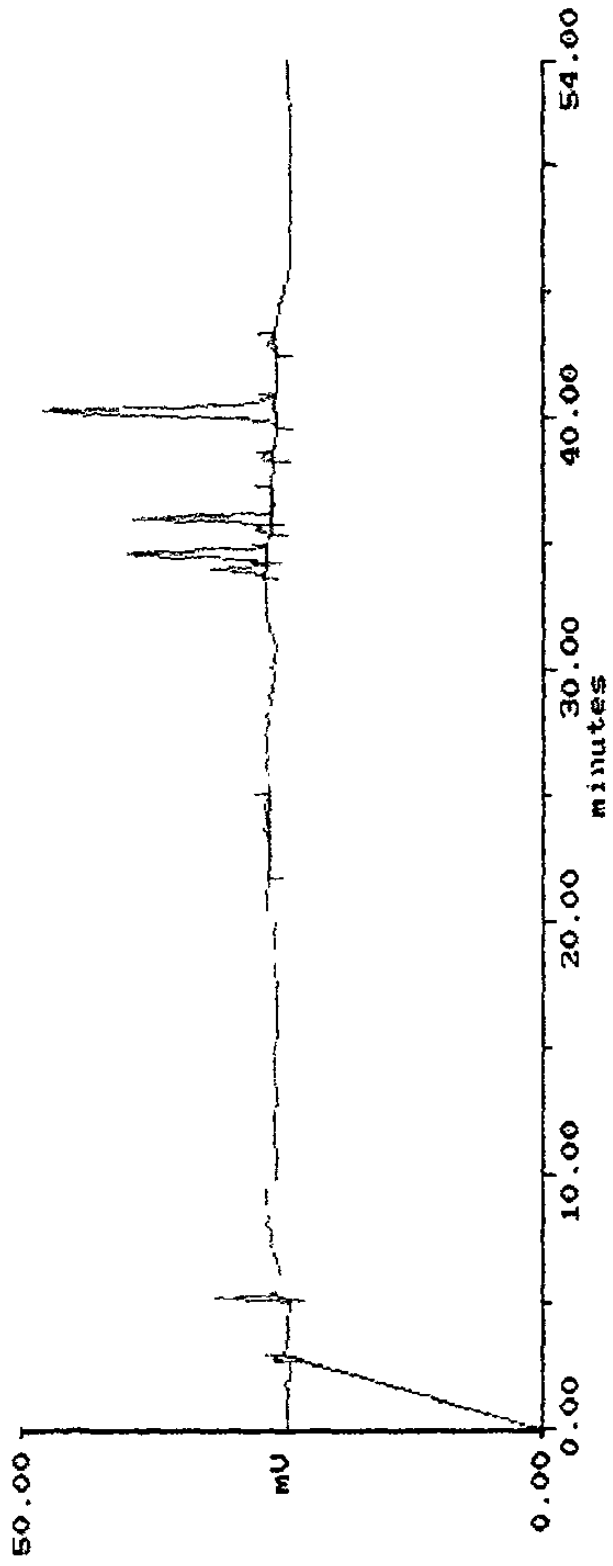


Figura 4. Cromatograma obtenido al realizar un análisis de los reactivos utilizados en la derivatización e hidrólisis (blanco de reactivos).

4.1.2 Determinación de los tiempos de retención de cada uno de los 17 estándares de aminoácidos en una mezcla y en inyecciones individuales

Una vez separados los 17 AAs se confirmó el orden de elución mediante inyecciones individuales de cada uno de ellos y en algunos casos se realizó coinyección para confirmar el tiempo de retención correspondiente. En la Figura 4 se presenta el orden de elución y el tiempo de retención de los 17 estándares de AAs. El orden de elución en la mayoría de los aminoácidos coincidió con lo reportado en la literatura (Fürst *et al.*, 1989), excepto para histidina- treonina que intercambiaron lugar, ya que en la referencia aparecían treonina-histidina y arginina, alanina y prolina que en la referencia aparecían en el orden alanina, prolina y arginina.

La elución de todos los AAs se realizó en 35 min, sin embargo, se adicionaron 20 minutos más de equilibrio para la columna fluyendo por el interior de la columna eluyente A. Los aminoácidos eluyeron en grupos (Figura. 5) aspártico-glutámico, serina-glicina-histidina, arginina, treonina-alanina-prolina, tirosina-valina-metionina, isoleucina-leucina y fenilalanina-trptofano-lisina. El orden estuvo determinado por la polaridad, eluyendo los más polares o hidrofílicos primero y más tarde los apolares o hidrofóbicos. El par isoleucina-leucina, presentan tiempos de retención muy semejantes, difiriendo en tan solo 0.16 min, motivo por el cual las bases de los picos del cromatograma (Figura. 5) se observan unidas.

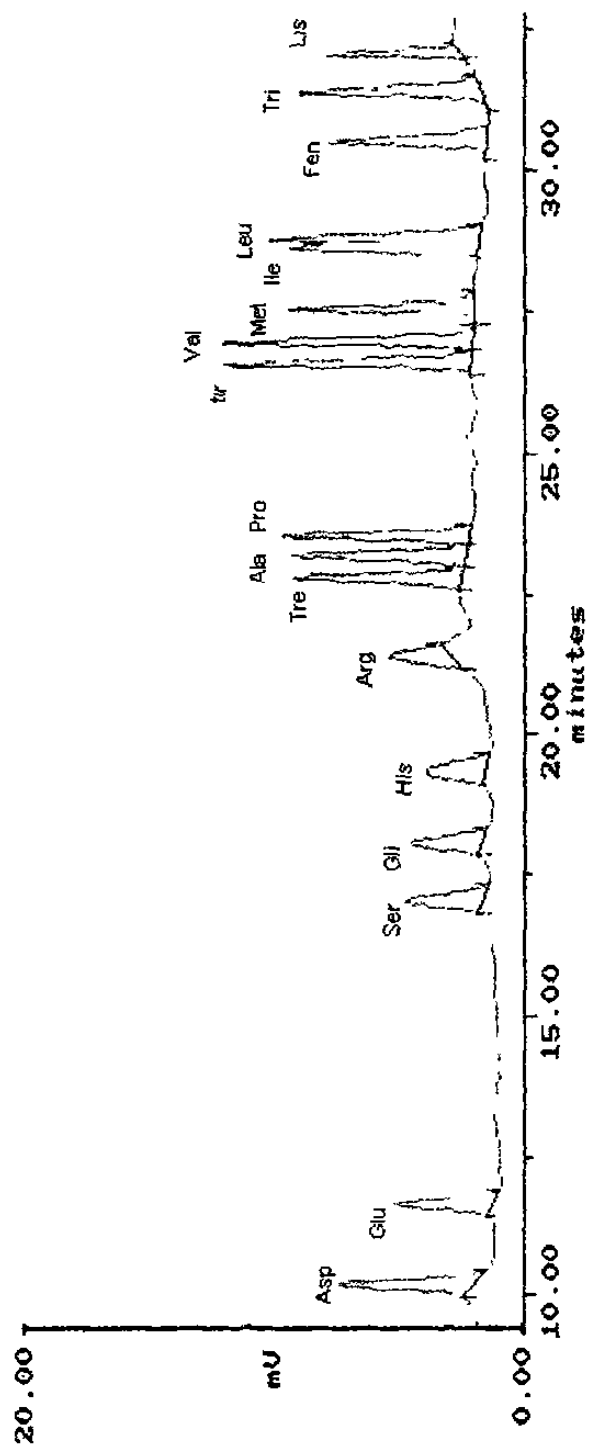


Figura 5. Cromatograma obtenido al realizar un análisis de una mezcla de 17 estándares de aminoácidos.

4.2. Evaluación cualitativa, cuantitativa y linealidad del método

4.2.1. Evaluación cualitativa del método: Repetibilidad y Reproducibilidad cualitativa

1.- Repetibilidad cualitativa.

En el Cuadro 5, se muestra la repetibilidad en tiempos de retención de cada AA. Se obtuvieron C.V. entre 0.03% (lisina) a 1.8 (serina), indicando un buen funcionamiento del equipo cromatográfico. Los mayores C.V. (%) se obtuvieron en los aminoácidos eluidos en los primeros 20 minutos del gradiente, justo donde se presenta un incremento lineal del eluyente B. La repetibilidad obtenida permitió posteriormente identificar cualitativamente los 17 aminoácidos presentes en hidrolizados de muestras en base a su tiempo de retención.

Cuadro 5. Repetibilidad en el tiempo de retención de cada aminoácido de una mezcla de 17 estándares.

AA	PROMEDIO*		
	t_R	S	C.V.
Ác. aspártico	11.2	0.11	1.0
Ác. glutámico	12.6	0.14	1.1
Serina	17.1	0.31	1.8
Glicina	18.1	0.26	1.5
Histidina	19.0	0.23	1.2
Arginina	20.9	0.18	0.9
Treonina	22.8	0.05	0.2
Alanina	23.2	0.04	0.2
Prolina	23.6	0.04	0.2
Tirosina	26.2	0.03	0.1
Valina	26.7	0.03	0.1
Metionina	27.3	0.02	0.1
Isoleucina	28.4	0.02	0.1
Leucina	28.5	0.02	0.1
Fenilalanina	29.9	0.02	0.1
Triptófano	30.6	0.02	0.1
Lisina	31.8	0.01	0.03

AA: aminoácido. *(n = 3), t_R : tiempo de retención, S: desviación estándar, CV: coeficiente de variación.

2.- Reproducibilidad cualitativa

El Cuadro 6, muestra la reproducibilidad de tiempos de retención de cada AA. Los coeficientes de variación para los tiempos de retención en inyecciones de diferentes días, se manifestaron más altos que los obtenidos en inyecciones de un mismo día (Cuadro. 5). El rango de variación fue entre 1.2 (lisina) a 3.9% (arginina).

Cuadro 6. Reproducibilidad del tiempo de retención de cada aminoácido de una mezcla de 17 estándares.

AA	PROMEDIO* t_R	S	C.V.
Ác. aspártico	10.2	0.16	1.6
Ác. glutámico	11.5	0.21	1.8
Serina	16.4	0.33	2.0
Glicina	17.4	0.41	2.3
Histidina	18.5	0.55	3.0
Arginina	20.5	0.81	3.9
Treonina	22.4	0.47	2.1
Alanina	22.8	0.44	1.9
Prolina	23.3	0.33	1.4
Tirosina	26.3	0.38	1.5
Valina	26.7	0.32	1.2
Metionina	27.3	0.35	1.3
Isoleucina	28.4	0.40	1.4
Leucina	28.5	0.41	1.4
Fenilalanina	29.9	0.70	2.3
Triptófano	30.7	0.81	2.7
Lisina	31.7	0.37	1.2

AA: aminoácido, *(n = 3), t_R : tiempo de retención, S: desviación estándar, C.V.: coeficiente de variación.

4.2.2 Evaluación cuantitativa del método: Repetibilidad y reproducibilidad cuantitativa

1.- Repetibilidad cuantitativa.

En el Cuadro 7 se indica la repetibilidad de la altura de pico de cada aminoácido de una mezcla de estándares (17 AA). Los coeficientes de variación, de la altura de pico para tres inyecciones de la mezcla de AAs analizadas el mismo día se manifestaron en un rango de variación entre 0.8% (Fen) y 5.6% (Glu). Los mayores C.V. (%) se presentaron en los AAs eluidos en los primeros 20 minutos del gradiente.

Cuadro 7. Repetibilidad de la altura de pico (mv = milivolts) de cada aminoácido de una mezcla de estándares (17 AA).

AA	Promedio * Altura de pico (mv)	S	C.V.
Ác. aspártico	5076	249	4.9
Ác. glutámico	4234	238	5.6
Serina	3211	108	3.4
Glicina	3036	140	4.6
Histidina	2451	99	4.1
Arginina	2227	27	1.2
Treonina	4877	90	1.8
Alanina	6502	60	0.9
Prolina	7358	186	2.5
Tirosina	9330	137	1.5
Valina	9105	109	1.2
Metionina	8288	239	2.9
Isoleucina	7197	83	1.2
Leucina	7719	152	1.9
Fenilalanina	6136	48	0.8
Triptófano	5672	157	2.7
Lisina	4438	82	1.8

AA: aminoácido, *(n = 3), S. desviación estándar, C V.: coeficiente de variación.

2.- Reproducibilidad cuantitativa.

En el Cuadro 8 se presenta la reproducibilidad de la altura de pico de cada aminoácido de una mezcla de estándares, en la que se puede observar que los coeficientes de variación para altura de pico de inyecciones del estándar realizadas en diferentes días, presentaron valores más altos para todos los AAs, principalmente en senna (28.3%), glicina (29.6%), histidina (23.2%), arginina (25.8%) y lisina (26.1%); comparados con los obtenidos al evaluar la repetibilidad cuantitativa (Cuadro 7).

Cuadro 8. Reproducibilidad de la altura de pico (mv = milivolts) de cada aminoácido de una mezcla de estándares (17 AA).

AA	Promedio * Altura de pico (mv)	S	C.V.
Ác. aspártico	4378	783	17.9
Ác. glutámico	3714	540	14.5
Serina	2550	720	28.3
Glicina	2521	745	29.6
Histidina	2229	518	23.2
Arginina	1761	454	25.8
Treonina	4491	347	7.7
Alanina	5034	356	7.1
Prolina	5918	517	8.8
Tirosina	7753	1118	14.4
Valina	8303	1218	14.7
Metionina	6082	1083	17.8
Isoleucina	6814	827	12.1
Leucina	7881	1339	16.9
Fenilalanina	5480	1086	19.8
Triptófano	6023	476	7.9
Lisina	5194	1354	26.1

AA aminoácido, (n = 3), S. desviación estándar, C V. coeficiente de variación

4.2.3 Evaluación de la linealidad del método (Recta de calibración)

En el Cuadro 9 se presenta el promedio de los coeficientes de determinación, de siete de las curvas de calibración realizadas en este trabajo para cada aminoácido. Al someter a un análisis de regresión los valores registrados, como altura de pico (Y) de cada AA generado de las diferentes concentraciones de la mezcla de estándares (X = 1.00, 0.75, 0.50 y 0.25 μ .l /ml), se observó que los menores coeficientes de determinación (R^2) fueron obtenidos en serina, arginina y lisina; siendo estos de 0.96, mientras que treonina y triptófano presentaron R^2 de 0.97. Para el resto de los AAs el R^2 fue de 0.99 (ácido glutámico, glicina, prolina, tirosina, valina, metionina, isoleucina, leucina y fenilalanina).

Cuadro 9. Promedio del coeficiente de determinación (R^2) de 7 curvas de calibración de 17 estándares de aminoácidos.

AA	R^2
Ác. aspártico	0.98
Ác. glutámico	0.99
Serina	0.96
Glicina	0.99
Histidina	0.98
Arginina	0.96
Treonina	0.97
Alanina	0.98
Prolina	0.99
Tirosina	0.99
Valina	0.99
Metionina	0.99
Isoleucina	0.99
Leucina	0.99
Fenilalanina	0.99
Triptófano	0.97
Lisina	0.96

Determinado por el análisis cromatográfico de una mezcla de estándares de AAs de 1.00, 0.75, 0.50 y 0.25 μ mol /ml.

1306

4.3 Evaluación de la metodología de hidrólisis

En el Cuadro 10 se pueden observar los factores compensatorios de la hidrólisis para cada AA, con los cuales posteriormente se ajustaron los valores obtenidos de los AAs en las muestras de harinas, compensando las pérdidas debido a la hidrólisis (Fabián *et al.*, 1990; Cruz, 1997; Guajardo, 2000). Los valores mayores se obtuvieron en el aspártico y el glutámico con 1.8 y 1.9, respectivamente; lo anterior indica la gran pérdida de estos dos aminoácidos durante la hidrólisis (46.4 y 48.7% respectivamente), la metionina fue el AA menos afectado en la hidrólisis, presentando un factor de 0.94 y una recuperación del 106.4%, corroborando la eficiencia del vacío generado en los dispositivos utilizados (tubos Pierce).

Cuadro 10. Factores de hidrólisis utilizados para compensar las pérdidas ocurridas durante el proceso de hidrólisis de proteínas (n = 5 hidrolizados).

AA	Factor de hidrólisis ¹	S	C.V.	Recuperación (%)
Ác. Aspártico	1.8	0.057	3.1	54.7
Ác. Glutámico	1.9	0.082	4.2	51.3
Serina	1.2	0.039	3.3	85.5
Glicina	1.1	0.080	7.4	92.6
Histidina	1.2	0.054	4.5	82.6
Arginina	1.2	0.137	11.1	80.7
Treonina	1.4	0.239	17.4	72.9
Alanina	1.0	0.100	10.2	102.0
Prolina	1.0	0.074	7.7	103.1
Tirosina	1.1	0.057	5.1	90.1
Valina	1.2	0.053	4.4	81.9
Metionina	1	0.067	7.1	106.4
Isoleucina	1.2	0.031	2.5	81.3
Leucina	1.4	0.084	6.1	72.5
Fenilalanina	1.2	0.055	4.5	81.3
Triptófano	1.4	0.048	3.6	73.5
Lisina	1.3	0.248	19.4	78.1

¹ Determinado como la relación $\mu\text{mol/ml}$ de solución de estándares de AA sometidos a hidrólisis, entre $\mu\text{mol/ml}$ de AA determinados por HPLC después de la hidrólisis por 2 h a 135 °C. S: desviación estándar, C.V.: coeficiente de variación.

El triptófano es un AA que se destruye durante la hidrólisis ácida tradicional (Gehrke *et al.*, 1985); sin embargo, en este trabajo utilizando el ácido metanosulfónico 4 N conteniendo 0.2% de 3-(2-aminoetil)indol (Pierce) presentó un factor de 1.4; lo cual, representa un 75.5% de recuperación. La leucina presentó baja recuperación (72.5%),

representando un factor de hidrólisis de 1.4, la lisina presentó un factor de 1.3 (recuperación del 78.13%); sin embargo, fue el AA que presentó el mayor coeficiente de variación, 19.4%. Otros AAs que presentaron también C.V. altos fueron arginina, treonina, y alanina (11.1, 17.4 y 10.2%, respectivamente), el factor de hidrólisis para estos AAs fue 1.2, 1.4, y 1.0, respectivamente.

4.4. Evaluación de la exactitud del método. Cuantificación de aminoácidos en albúmina sérica bovina (ASB)

Los resultados obtenidos del análisis de tres hidrolizados de ASB se presentan en el Cuadro 11 y su cromatograma de elución en la Figura 6. Los C.V. fueron menores a 11% para 16 de los aminoácidos; treonina, metionina y triptófano fueron los AAs que presentaron mayor coeficiente de variación (10.5, 12.1 y 10.3%, respectivamente).

Cuadro 11. Prueba de t de Student del contenido de aminoácidos de albúmina sérica bovina analizada por HPLC-FR y comparada con su valor teórico obtenido por secuencia aminoacídica (n = 3).

AA	¹ HPLC % AA	² Teórico % AA	C.V.	tc	t _{0.05 (2 gl)}
Ác. aspártico	8.3	10.5	7.1	5.4*	4.3
Ác. glutámico	15.6	14.9	4.2	2.3	4.3
Serina	3.7	4.9	3.7	14.2*	4.3
Glicina	1.6	1.9	5.7	3.1	4.3
Histidina	2.4	3.9	1.6	4.3*	4.3
Arginina	7.5	7.3	3.0	1.8	4.3
Treonina	6.3	6.1	10.5	0.4	4.3
Alanina	5.2	6.1	5.3	0.7	4.3
Prolina	4.3	4.5	7.1	0.7	4.3
Tirosina	4.2	5.6	7.4	6.4*	4.3
Valina	4.9	6.5	6.9	6.9*	4.3
Metionina	0.4	1.1	12.1	20.4*	4.3
Isoleucina	2.7	2.9	6.1	1.5	4.3
Leucina	10.0	12.5	4.4	9.8*	4.3
Fenilalanina	5.7	7.2	5.1	7.2*	4.3
Triptófano	0.4	0.8	10.3	22.2*	4.3
Lisina	12.4	12.8	6.3	0.9	4.3

¹ determinada en este estudio, ²determinada según secuencia aminoacídica (banco de genes) tc: t calculada, t_{0.05 (2 gl)}: t de tablas, C.V.: coeficiente de variación. ⁴Si tc < t_{0.05 (2 gl)}, entonces no existe diferencia significativa, y por lo tanto la exactitud es apropiada, * diferencia significativa (p < 0.05)

Los resultados obtenidos como porcentaje de AA fueron comparados con la proporción de cada AA calculada a partir de la secuencia aminoacídica de dicha proteína (valor teórico).

Se realizó una prueba de t de Student (SPSS, 1997) en la opción de comparación de datos contra un valor teórico. Se observaron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre lo medido y lo esperado para las siguientes AAs: aspártico, serina, tirosina, valina, metionina, leucina, fenilalanina. La metionina y el triptófano fueron los AAs que obtuvieron valores más bajos de lo esperado por lo que presentaron diferencias significativas en la prueba de t de Student ($p < 0.05$). El valor obtenido por metionina fue de 0.42% y su valor teórico 1.09%, en el caso del triptófano el valor obtenido fue 0.4%, mientras que el teórico es 0.89; sin embargo, el valor obtenido en el análisis HPLC es un valor promedio de tres hidrolizados cuyos datos tuvieron un coeficiente de variación para metionina 12% y para triptófano 10.3%.

Los AAs ácido aspártico, serina, histidina, tirosina, valina y fenilalanina, que también presentaron diferencia significativa ($P < 0.05$), manifiestan una diferencia que oscila entre 2.5 y 1.2 unidades porcentuales con respecto al valor teórico; que aunque es una diferencia significativa, al realizar un ajuste a una recta mediante un análisis de regresión lineal entre los valores teóricos y obtenidos por HPLC, se obtuvo un coeficiente de determinación de $R^2 = 0.96$ mostrando la semejanza entre los grupos de datos. En la Figura 7 se muestra la gráfica del ajuste a la recta.

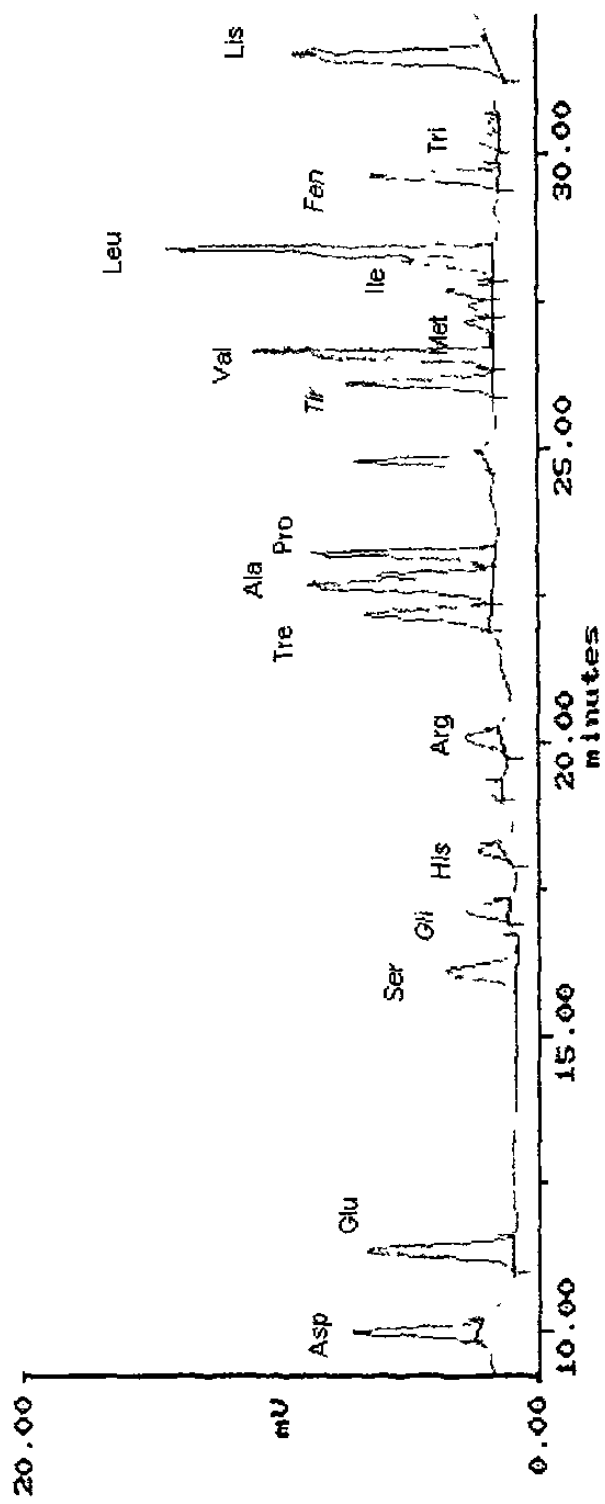


Figura 6. Cromatograma obtenido al realizar un análisis de aminoácidos de albúmina sérica bovina.

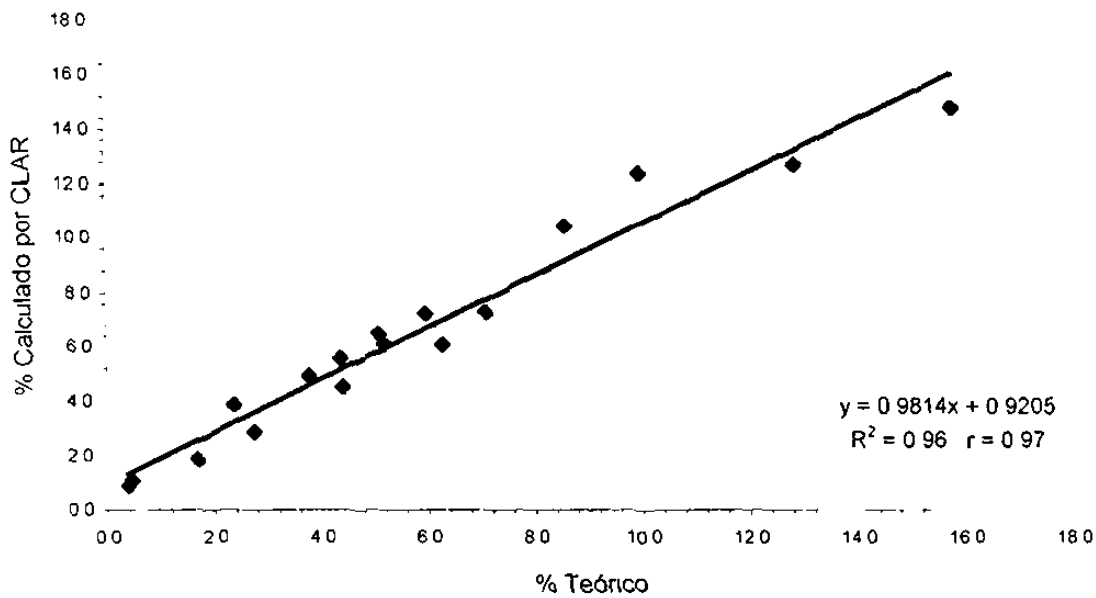


Figura 7. Análisis de regresión entre el contenido de aminoácidos de la albúmina serca bovina efectuado por HPLC-FR y su composición teórica.

4.5 Análisis de muestras

En el Cuadro 12 se muestran los resultados del análisis del contenido de materia seca y proteína cruda para las muestras de soya, sorgo y sus mezclas (soya:sorgo- 50:50 y 25:75).

Cuadro 12. Contenido de materia seca y proteína cruda de las muestras analizadas.

Harinas	Materia seca %	Cenizas %	Materia orgánica %	Proteína cruda %
Soya	95.31	6.82	93.17	52.06
Soya:sorgo 50:50	91.28	4.36	95.64	28.82
Soya:sorgo 25:75	90.71	3.10	96.90	19.10
Sorgo	93.85	2.06	97.93	8.55

4.5.1. Análisis de harina de soya

En el Cuadro 13 se presentan los resultados obtenidos en el análisis de soya, reportados como g AA/100 g de materia seca. Los resultados obtenidos, para aminoácidos esenciales fueron comparados con los reportados por el NRC (1998); los resultados obtenidos para el resto de los aminoácidos fueron comparados con los reportado por Hansen et al. (1993). Se realizó una prueba de t de Student (SPSS, 1997) en la opción de comparación de datos contra un valor teórico. Con respecto a los aminoácidos esenciales no se observaron diferencias significativas ($p > 0.05$) para la mayoría de ellos, excepto para triptófano y lisina. La recuperación del triptófano quedó fuera del límite de detección y cuantificación (1.15 g/100 g M S), como se puede observar en la Figura 8 la ausencia del pico referente a dicho AA.

Cuadro 13. Contenido de aminoácidos en harina de soya (g de AA/100g de M.S.)

	¹ Promedio	S	CV	teórico	tc	t _{0.05 (2) gl}
Ác. aspártico	3.93	0.2316	5.9	³ 5.15	28.23*	4.3
Ác. glutámico	8.31	0.1055	1.3	³ 8.26	0.86	4.3
Serina	2.45	0.0986	4.0	³ 2.26	32.90*	4.3
Glicina	1.80	0.0085	0.5	³ 1.95	1.29	4.3
Histidina	1.35	0.1700	12.6	² 1.28	0.69	4.3
Arginina	3.31	0.4824	14.6	² 3.48	0.63	4.3
Treonina	2.05	0.2830	13.8	² 1.85	1.23	4.3
Alanina	1.79	0.2057	11.5	² 2.39	5.11*	4.3
Prolina	2.32	0.3320	14.3	³ 2.25	6.37*	4.3
Tirosina	1.75	0.2149	12.3	² 1.82	0.64	4.3
Valina	2.05	0.3162	15.5	² 2.27	1.23	4.3
Metionina	0.59	0.1067	18.2	² 0.67	1.36	4.3
Isoleucina	2.37	0.3307	13.9	² 2.16	1.03	4.3
Leucina	3.03	0.4379	14.4	² 3.65	2.51	4.3
Fenilalanina	2.36	0.2737	11.6	² 2.39	0.21	4.3
Triptófano	Menos de 1.15			² 0.65		
Lisina	6.01	0.1617	2.7	² 3.02	31.45*	4.3

¹ n = 3 hidrolizados ²N RC (1998) ³Hansen (1993) Si tc < t_{0.05 (2) gl} entonces no existe diferencia significativa entre el valor teórico y el obtenido, * diferencia significativa ($p < 0.05$)

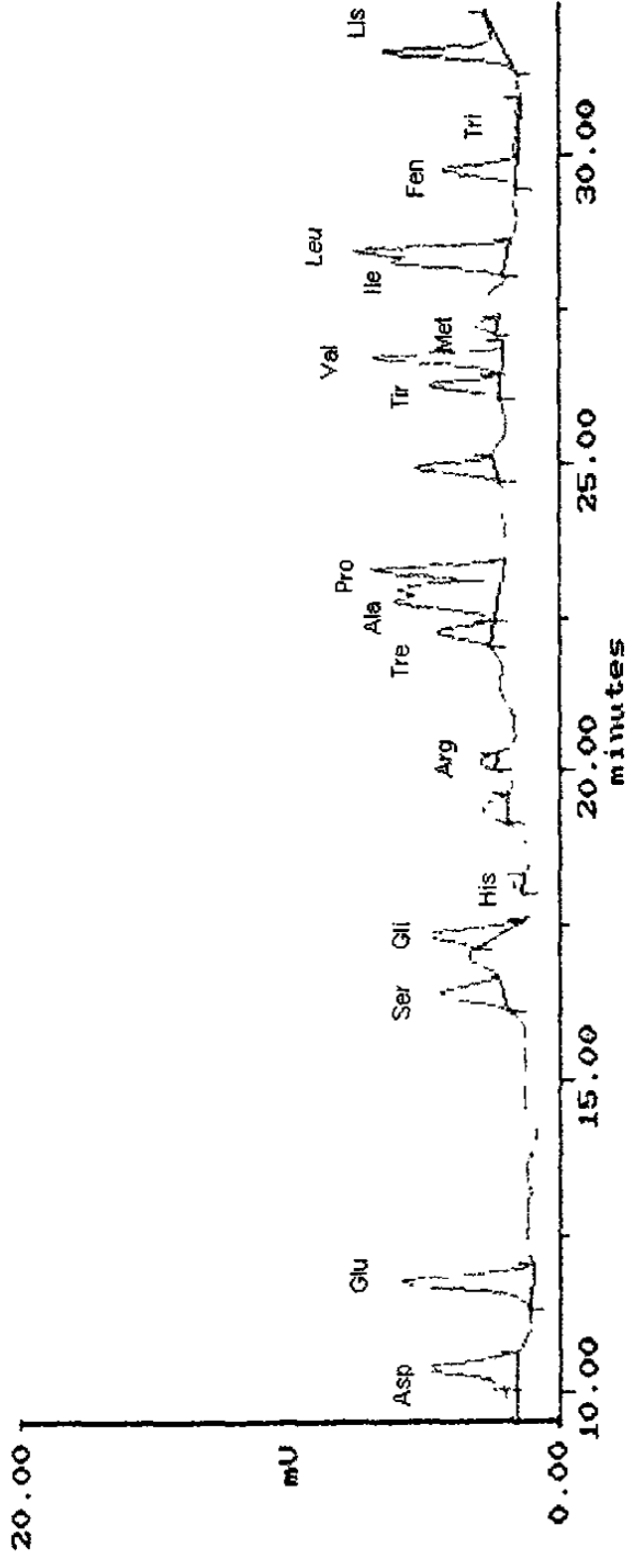


Figura 8. Cromatograma obtenido al realizar un análisis de aminoácidos en una muestra hidrolizada de harina de soya

Por el contrario la lisina aunque presentó valores muy constantes en su determinación (C.V. = 2.7%), obtuvo un valor de cuantificación de 6.01 g/100 g de M.S. siendo el doble del valor descrito en las tablas del NRC (3.02 g/100 g de M.S.). Con respecto al resto de los AAs hubo diferencias significativas entre el valor obtenido y el reportado en la referencia en el aspártico, seinar, alanina y prolina ($p < 0.05$).

4.5.2. Análisis de harina de sorgo

En el Cuadro 14 se presentan los resultados obtenidos en el análisis de sorgo reportados como g AA/100 g de M.S.. Los resultados obtenidos para los aminoácidos esenciales fueron comparados con los reportados por el NRC (1998) el valor de comparación para el resto de los AAs se obtuvo de Hansen *et al.* (1993).

Cuadro 14. Contenido de aminoácidos en harina de sorgo (g de AA/100g de M.S.)

	Promedio	S	C.V.	teórico	¹ tc	t _{0.05} (2 gl)
Ác. aspártico	0.40	0.0026	0.7	³ 0.58	31.17*	4.3
Ác. glutámico	1.41	0.0170	1.2	³ 1.72	53.69*	4.3
Serina	0.44	0.0210	4.7	³ 0.38	10.39*	4.3
Glicina	0.37	0.0088	2.4	³ 0.31	10.39*	4.3
Histidina	0.20	0.0007	0.4	² 0.23	10.0*	4.3
Arginina	0.48	0.0479	9.9	² 0.38	3.64	4.3
Treonina	0.30	0.0066	2.2	² 0.31	4.0	4.3
Alanina	0.50	0.0112	2.2	³ 0.76	45.03*	4.3
Prolina	0.77	0.0250	3.3	³ 0.66	19.05*	4.3
Tirosina	0.32	0.0086	2.7	² 0.35	5*	4.3
Valina	0.45	0.0143	3.1	² 0.46	2	4.3
Metionina	0.17	0.0016	0.9	² 0.17	4	4.3
Isoleucina	0.27	0.0287	10.7	² 0.37	7.34*	4.3
Leucina	0.72	0.0277	3.8	² 1.21	32.07*	4.3
Fenilalanina	0.45	0.0162	3.6	² 0.49	4.91*	4.3
Triptófano	menos de	0.40		² 0.1		
Lisina	0.46	0.0344	7.4	² 0.22	11.52*	4.3

¹Si tc < t_{0.05} (2 gl) entonces no existe diferencia significativa entre el valor teórico y el obtenido, * diferencia significativa ($p < 0.05$), ²NRC (1998) ³Hansen (1993), por cromatografía de intercambio iónico.

Se realizó una prueba de t de Student (SPSS, 1997) en la opción de comparación de datos contra un valor teórico. Los resultados obtenidos muestran que los aminoácidos treonina, valina, y metionina no presentaron diferencia estadísticamente significativa ($P > 0.05$). Se mencionan a continuación los valores del análisis y de referencia de dichos AAs NRC (1998), respectivamente: treonina 0.30-0.31 g/100 g de MS, valina 0.45-0.46 g/100 g y metionina 0.17-0.17% g/100 g de M.S.. Para histidina se obtuvieron valores de análisis y referencia de 0.20 y 0.23 g/100g de M.S., y para tirosina 0.32-0.35 g/100 g de M.S.. En los dos últimos AAs la diferencia entre el valor del análisis y el valor de referencia representa 0.03 unidades porcentuales.

La fenilalanina obtuvo 0.04 unidades porcentuales menos que lo reportado (0.45-0.49 g/100 g de M.S., valor del análisis y valor de referencia, respectivamente). La isoleucina obtuvo 0.10% unidades porcentuales menos que lo reportado (0.27-0.37 g/100 g de M.S.). La leucina obtuvo aproximadamente la mitad que lo reportado (0.72-1.21 g/100g de M.S.). El triptófano quedó fuera del límite inferior de cuantificación y detección (Figura 9), por lo que su resultado se reporta como menor de 0.4. El valor reportado por el NRC (1998), es de 0.1g/100g de M.S. de este AA. La lisina obtuvo un poco más del doble del valor descrito en esa misma fuente (0.46-0.22 g/100g de M.S.).

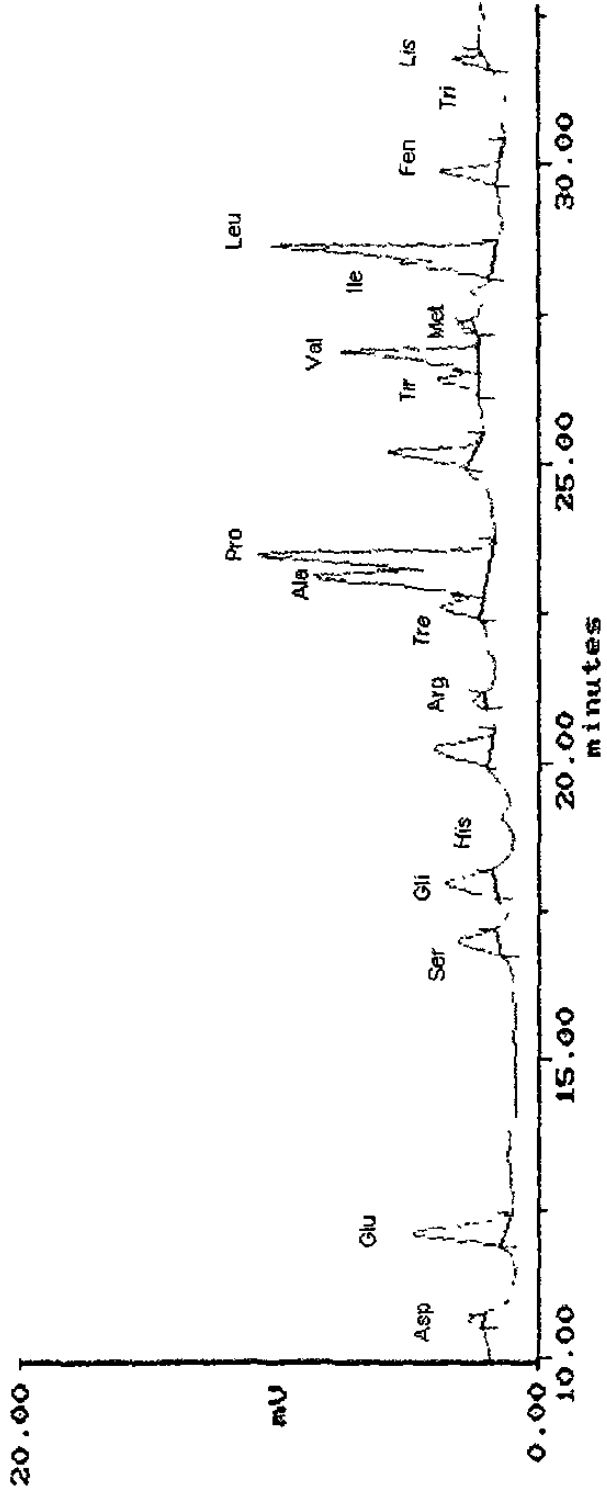


Figura 9. Cromatograma obtenido al realizar un análisis de aminoácidos de una muestra hidrolizada de harina de sorgo.

4.5.3. Análisis de mezclas de harinas de soya y sorgo

Al realizar las mezclas de diferentes proporciones de las harinas, disminuyó la cantidad de proteína cruda a medida que aumentó la cantidad de sorgo (Cuadro 12). En el análisis de aminoácidos no fue posible detectar histidina ni triptófano en las mezclas, ya que quedaron fuera del límite inferior de cuantificación (Cuadro 15) (Figuras 10 y 11).

Cuadro 15. Contenido de aminoácidos en diferentes proporciones de harinas de soya y sorgo (g de AA/100 g de M.S.) y análisis de regresión.

Aminoácidos	soya	50-50	25-75	sorgo	*R ²	β ₀	β ₁
Ác. aspártico	3.93	2.20	1.06	0.40	0.99	-8.53	27.55
Ác. glutámico	8.31	4.30	2.23	1.41	0.98	-11.97	13.72
Serina	2.45	1.73	0.82	0.44	0.96	-19.20	46.29
Glicina	1.80	1.43	0.79	0.37	0.93	-27.03	64.49
Histidina	1.35			0.20			
Arginina	3.31	2.73	1.22	0.48	0.90	-16.12	30.94
Treonina	2.05	1.34	0.68	0.30	0.98	-16.41	55.07
Alanina	1.79	0.99	0.61	0.50	0.97	-26.16	71.89
Prolina	2.32	2.16	1.44	0.77	0.83	-47.59	54.61
Tirosina	1.75	0.86	0.36	0.32	0.95	-7.69	62.54
Valina	2.05	1.12	0.63	0.45	0.98	-18.88	58.94
Metionina	0.59	0.17	0.05	0.17	0.73	6.08	153.74
Isoleucina	2.37	1.03	0.50	0.27	0.97	-2.83	44.68
Leucina	3.03	1.70	0.95	0.72	0.98	-21.08	49.52
Fenilalanina	2.36	1.30	0.61	0.45	0.97	-13.44	48.46
Lisina	6.01	2.38	0.85	0.46	0.96	3.72	16.51

* Coeficientes de determinación entre: X = cantidad de soya en %, Y = % de AA, n = 3 hidrolizados, β₁ = pendiente de la recta, β₀ = ordenada al origen.

La metionina en la mezcla 25:75 (soya:sorgo), presentó un valor menor (0.05 g/100 g de M.S.) con respecto al sorgo (0.17 g/100 g de M.S.). En el resto de los aminoácidos disminuyó proporcionalmente su cantidad a medida que aumentó el contenido de sorgo. Por tal motivo, se decidió realizar un análisis de regresión para observar si el comportamiento entre la variable proporción de soya en la mezcla (X) tenía relación

lineal con el contenido de aminoácidos (Y). Se obtuvo para prolina y metionina un R^2 de 0.83 y 0.73, respectivamente, y para el resto de los aminoácidos un $R^2 > 0.90$ (Cuadro 15).

Como un complemento a lo anterior, en el Cuadro 16 se muestran tres formas diferentes de obtener los valores de aminoácidos en las mezclas soya:sorgo. Se observa que el valor del análisis HPLC de las mezclas directas es muy parecido al valor calculado a partir de la determinación individual de soya (HPLC) y sorgo (HPLC). Al realizar un análisis de correlación para los aminoácidos esenciales entre los dos grupos de datos, se obtuvieron coeficientes de correlación de $r = 0.93$ en la proporción 50:50 y $r = 0.92$ para la proporción 25:75.

Cuadro 16. Tres formas diferentes de obtener los valores de aminoácidos en las mezclas soya:sorgo.

Aminoácidos	50:50			25-75		
	análisis de mezcla ¹	calculado de ingredientes analizados ²	(NRC) ³	análisis de mezcla ¹	calculado de ingredientes analizados ²	(NRC) ³
Ác. Aspártico	2.2	2.17		1.06	1.28	
Ác. Glutámico	4.3	4.86		2.23	3.14	
Serina	1.73	1.45		0.82	0.94	
Glicina	1.43	1.09		0.79	0.73	
Histidina		0.78	0.76		0.49	0.49
Arginina	2.73	1.90	1.93	1.22	1.19	1.16
Treonina	1.34	1.18	1.08	0.68	0.74	0.70
Alanina	0.99	1.15	1.20	0.61	0.82	0.60
Prolina	2.16	1.55	0.00	1.44	1.16	0
Tirosina	0.86	1.04	1.09	0.36	0.68	0.72
Valina	1.12	1.25	1.37	0.63	0.85	0.91
Metionina	0.17	0.38	0.42	0.05	0.28	0.30
Isoleucina	1.03	1.32	1.27	0.50	0.80	0.82
Leucina	1.7	1.88	2.44	0.95	1.30	1.82
Fenilalanina	1.3	1.41	1.44	0.61	0.93	0.97
Lisina	2.38	3.24	1.62	0.85	1.85	0.92
r		0.93	0.76		0.92	0.74

¹análisis de la mezcla HPLC-FR, ²calculado a partir del resultado individuales soya y sorgo HPLC-FR, ³calculado a partir de los valores individuales soya y sorgo reportados por el NRC (1998)

Sin embargo, al comparar el valor del análisis HPLC de las mezclas directas con la forma indirecta a partir de los valores individuales de soya y sorgo reportados por el NRC (1998), se observó que al realizar un análisis de correlación entre estos grupos de datos, los coeficientes de correlación fueron de la siguiente manera: para la mezcla 50:50, $r = 0.76$ y para la mezcla 25:75, $r = 0.74$.

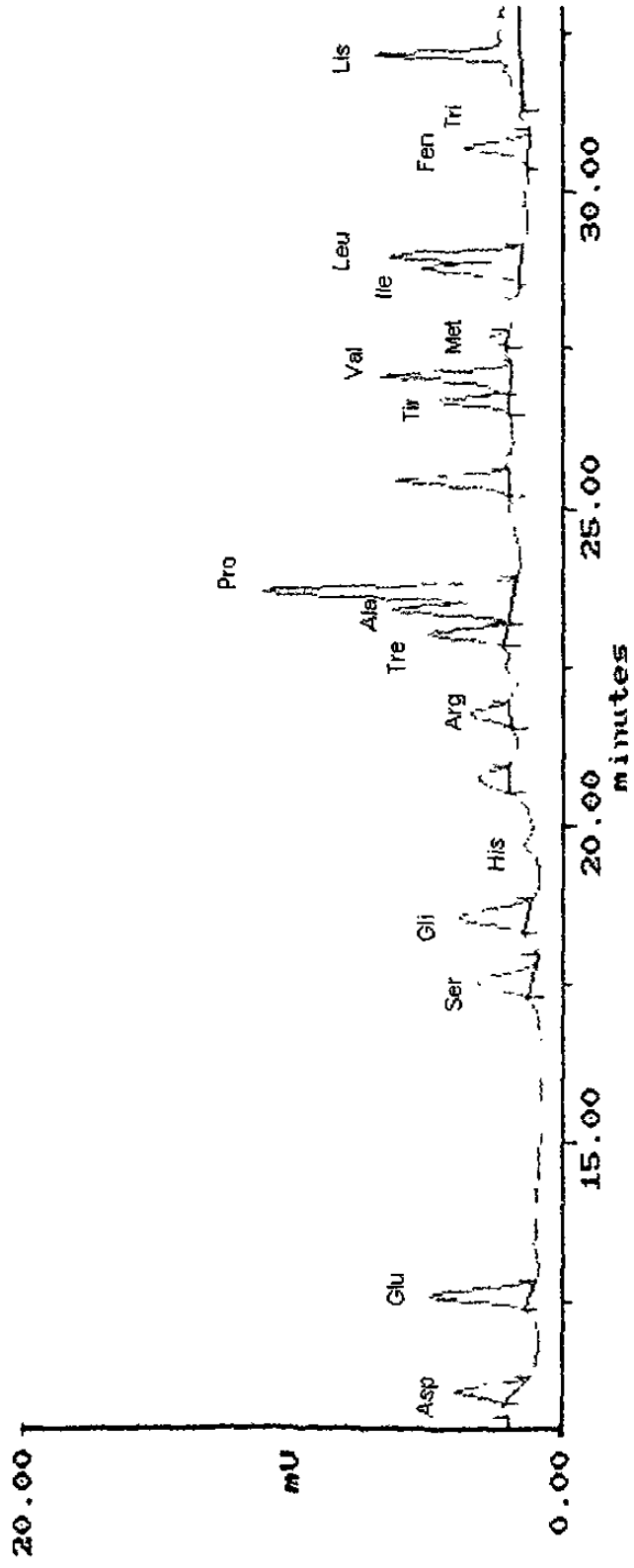


Figura 10. Cromatograma obtenido al realizar un análisis de una mezcla hidrolizada de soya:sorgo 50:50.

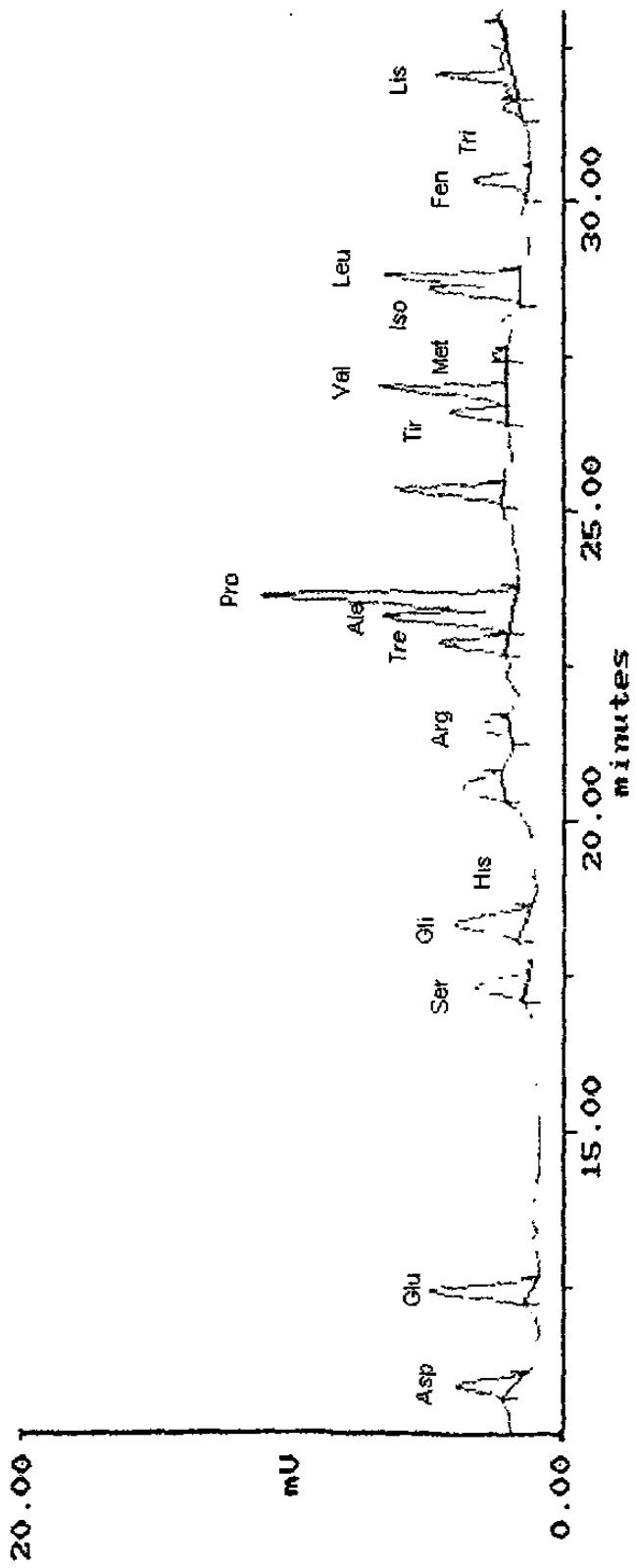


Figura 11. Cromatograma obtenido al realizar un análisis de una mezcla hidrolizada de soya:sorgo 25:75.

5. DISCUSIÓN

La cromatografía de líquidos de alta resolución HPLC ha tenido gran importancia en el análisis cuantitativo de aminoácidos, ya que posibilita eventualmente la determinación simultánea de hasta 30 estándares de aminoácidos (Buzzigoli *et al.*, 1990). Las innovaciones en equipos que permitan resultados iguales o mejores a los obtenidos por cromatografía de intercambio iónico y detección mediante el autoanizador de aminoácidos, procedimiento analítico más ampliamente utilizado en el análisis de AAs (Llames y Fontaine, 1994), han contribuido a la utilización de detectores más sensibles como el de fluorescencia, empleado en el desarrollo de nuevas metodologías como lo son la derivatización pre-columna con ortoftaldialdehído (OPA) (Ishida *et al.*, 1981) o el 9- fluorenilmetil-cloroformato (FMOC-Cl) (Betner y Földi, 1986), con los que se obtienen niveles de detección de 10 pmol/AA/inyección (Fürst *et al.*, 1989). Sistemas completos para realizar la hidrólisis, derivatización, columnas de fase reversa y buffers han sido desarrollados por Waters (Milford, MA, USA), denominándose a todo este conjunto Sistema Pico-tag (Bidleingmeller *et al.*, 1984). El desarrollo de nuevas metodologías han permitido una optimización en el análisis de aminoácidos, tanto en tiempo (menos de una h) así como en nivel de detección (picomoles 10^{-12} moles) (Harris, 1988).

En el presente trabajo se desarrolló una metodología para el análisis de aminoácidos en ingredientes utilizados en la nutrición animal. Se empleó un sistema de cromatografía de líquidos de alta resolución y fase reversa. La derivatización fue pre-columna con el fenilisotiocianato. Este reactivo presentó algunas dificultades en su manejo, ya que tiene una apariencia aceitosa (insoluble en agua, Budavari *et al.*, 1989), lo que hace tardada su evaporación en las muestras; y al momento de efectuar la resuspensión para hacer la inyección en el cromatógrafo, necesariamente hay que utilizar ultrasonido, ya que con agitación normal en Vortex no es suficiente. También es necesario filtrar antes de efectuar la inyección, ya que queda una película en la superficie que tiene que ser retirada para evitar que la columna se tape. Sin embargo, su estabilidad es muy buena, permitiendo la repetición del análisis de una muestra el mismo día, y el almacén (a -20°C) de muestras derivatizadas por más de un mes. Fürst *et al.* (1989) señalan que el exceso de reactivo fenilisotiocianato y productos de degradación generados en el proceso de derivatización de AAs deben ser removidos para proteger la columna, aun así reportó 120 análisis como vida de la columna. Una

reducción de 10 veces (5% - 0.5%) la cantidad de fenilisotiocianato en la solución de derivatización fue probada por Henrikson y Meredith (1984) con igual eficiencia; además, facilitó la evaporación de este compuesto, representando una disminución de la etapa preparatoria para el análisis. La introducción de 10 min de lavado con eluente orgánico (eluente B = 60% de acetonitrilo en 40% de buffer de acetato de sodio) para la elución de residuos de la columna es recomendada por Buzzigoli *et al.* (1990) como una medida de protección contra el deterioro de la misma cuando se utiliza el fenilisotiocianato en el análisis de AAs.

En la separación cromatográfica, los cambios en el gradiente de acuoso a orgánico facilitaron la separación de los AAs, eluyendo aquellos con mayor polaridad y al final los más hidrofóbicos. La separación se realizó en 35 min; sin embargo, fue necesario adicionar 20 min más eluyendo Fase A para equilibrar la columna antes de la siguiente inyección. Se corroboraron los tiempos individuales al inyectar por separado cada aminoácido. De esta manera se determinó el orden de elución, el cual en la mayoría de los aminoácidos coincidió con lo reportado en la literatura (Fürst *et al.*, 1989), excepto para His y Tre que intercambiaron lugar, y Arg, Ala y Pro que en la referencia aparecían en el orden Ala, Pro y Arg. El orden de elución es afectado por la composición del solvente, concentración del buffer y pH del buffer cuando la separación es llevada en cromatografía de fase reversa (Kan y Shipe, 1981). En el presente estudio se realizaron dos cambios con respecto a Fürst *et al.* (1989), siendo los referentes al valor del pH de 6.8 a 6.4 y la composición de los solventes a los cuales se les añadió 0.5% de trietilamina (TEA).

La mayor variación en la evaluación cualitativa del método basada en tiempo de retención, fue obtenida en ensayos de días diferentes (reproducibilidad C.V. = lisina 1.18%- Arginina 3.9%). Esta variación es más alta que la que se obtiene al analizar la muestra el mismo día (repetibilidad C.V. = lisina 0.03%, serina 1.8). Resultados obtenidos por Buzzigoli *et al.* (1992), muestran valores más altos que los obtenidos en este trabajo con respecto a ensayos de días diferentes (reproducibilidad); entre ellos, los de arginina C.V. = 4.4% e histidina C.V. = 6.2%. Los resultados obtenidos se consideran reproducibles para realizar el análisis cualitativo. Lo anterior permite identificar cualitativamente los aminoácidos presentes en una muestra desconocida en base al tiempo de retención.

La evaluación cuantitativa del método en inyecciones del estándar de AAs en diferentes días (reproducibilidad), mostró coeficientes de variación altos (con respecto a la evaluación cualitativa), siendo los mayores entre 12.1% hasta 29.5% encontrándose en este rango la mayoría de los AAs. Lo anterior señala la pérdida de eficiencia de la columna al paso del tiempo (Huber, 1994). La lisina, fue uno de los aminoácido que presentó mayor C.V. (26.1%); lo anterior puede ser debido a que este AA puede generar dos tipos de señales distintas: monoderivada y diderivada, debido al reactivo fenilisotiocianato utilizado en la derivatización, el cual reacciona con el grupo NH_2 , lo que podría ocasionar alturas variables de pico (Bidingmeyer *et al.*, 1987). Buzzigoli *et al.* (1992) obtuvieron C.V. altos para la reproducibilidad cuantitativa en metionina (15.5%), histidina (15.4%), isoleucina (13.6%) y lisina (11.4%). Estos autores en una serie de experimentos encontraron que la desviación estándar relativa para casi todos los AAs disminuyó de 2 a 3%, cuando se realizaron inyecciones por cuadruplicado de la misma muestra después de la derivatización, y señalan que al menos la mitad de la variación del método puede deberse a la etapa de derivatización, y no a la falta de recuperación. Finalmente, recomiendan aumentar el número de repeticiones de la muestra, hacer una selección visual de picos cromatográficos y tratamiento estadístico de las observaciones desviadas. En el presente trabajo, para compensar la falta de reproducibilidad cuantitativa, se decidió que al momento de analizar hidrolizados de muestras se realizara una curva de calibración para el lote analizado el mismo día, y de esta forma reducir el error causado por la variación en las alturas de los picos en días diferentes.

En el transcurso del trabajo se realizaron alrededor de 15 curvas de calibración, obteniendo $R^2 = 0.99$ para 9 de los AAs, para el resto de los AAs las R^2 fueron entre 0.98-0.96 con lo cual fue posible confirmar la respuesta lineal del método en el intervalo de concentraciones practicadas de 1 $\mu\text{mol/ml}$ a 0.25 $\mu\text{mol/ml}$ concentración antes de la inyección y que equivale a 1 nmol a 0.25 nmol concentración en 10 μl de inyección. Lo anterior permitió la utilización de los valores obtenidos de los coeficientes de regresión (β_0 y β_1) para la cuantificación de AAs en las muestras. Bidingmeyer *et al.* (1984) determinó una respuesta lineal en un rango de 20 a 500 pmol al utilizar una técnica de derivatización pre-columna con fenilisotiocianato. Así también Hoogerheide y Campbell (1991), encontraron respuesta lineal al inyectar concentraciones de 5 pmol a 1 nmol al utilizar una técnica de derivatización pre-columna con fenilisotiocianato

La metodología de hidrólisis con ácido metanosulfónico 4 N y 0.2% de 3-(2-amino etil)indol y condiciones de 152 °C por 2 h, permitió la recuperación de triptófano en un 75.5%. Kan y Shipe (1981) describieron que el ácido metanosulfónico es preferible al ácido clorhídrico, ya que protege al triptófano en muestras bajas en carbohidratos. Estos autores reportaron resultados similares del contenido de triptófano en muestras de frijol negro, al comparar los resultados con los obtenidos mediante la técnica tradicional de intercambio iónico e hidrólisis con hidróxido de sodio. Fábían *et al.* (1990), realizaron un exhaustivo estudio para optimizar la hidrólisis con ácido clorhídrico 6 N en presencia de 3-(2-amino etil)indol (triptamina), para permitir la determinación conjunta de 20 aminoácidos, logrando una recuperación de triptófano de 99-100% al aplicar 5-20 mg de triptamina por 60 mg de aminoácidos. Una desventaja en la aplicación de este aditivo es que un residuo de la triptamina eluyó junto con la lisina.

La metionina es un aminoácido que se oxida por la presencia de oxígeno, por lo que para lograr su detección se ha recomendado someter las muestras a un tratamiento de preoxidación con ácido perfórmico (McDonal *et al.*, 1985; Toran *et al.*, 1996), o eliminar el oxígeno presente por medio de vacío o sustitución por nitrógeno (Rayner, 1985). En este trabajo la metionina presentó buena recuperación, corroborando la eficiencia del vacío generado en los tubos Pierce utilizados en la hidrólisis. La lisina fue el AA que presentó el mayor coeficiente de variación, 19.4%, indicando variabilidad en los hidrolizados, ocasionada tal vez por lo anteriormente discutido en la evaluación de la reproducibilidad cuantitativa (Henrikson y Meredith, 1984). Otros AAs que presentaron también C.V. altos fueron arginina, treonina, y alanina (11.1, 17.4 y 10.2%, respectivamente). La literatura señala que los AAs son afectados en diferente grado durante la hidrólisis (Sarwar y Botting, 1993; Gehrke *et al.*, 1985; Rayner, 1985; Beaver *et al.*, 1987). La tasa de descomposición de los aminoácidos durante la hidrólisis ácida depende de varios factores, incluyendo los siguientes: la concentración del ácido empleado, y su pureza, el tiempo y temperatura de hidrólisis y la presencia de carbohidratos, alcaloides o impurezas de metales (Tuan y Phillips, 1997).

En forma general, 13 de los 17 aminoácidos presentaron C.V. menor de 7.7% en la hidrólisis de la mezcla estándar de aminoácidos y tasa de recuperación superior a 78% en 12 de ellos, lo que equivale a factores de corrección (compensatorios) de la hidrólisis de 1.28 a 0.98 en AAs esenciales. Tuan y Phillips (1997), reportaron factores

compensatorios hasta de 1.50 cuando las muestras son sometidas a un tiempo de hidrólisis de 4 h y utilización de ácido clorhídrico 6 N con 3,3'- ácido ditiodipropionico (DTDPA).

El análisis de albúmina sérica bovina mostró que la cuantificación para 8 de los 17 AAs determinados por HPLC-FR no presentaron diferencia estadística significativa ($p > 0.05$) al compararlos con la cantidad de AAs determinada a partir de su secuencia aminoacídica. El triptófano presentó una pobre recuperación, lo cual es problema frecuente cuando la concentración de este AA es menor al 1% en la muestra (Cruz, 1997). Los valores de los AAs obtenidos en el análisis de la ASB por HPLC-FR presentaron relación ($R^2 = 0.95$) con los valores teóricos obtenidos por secuencia aminoacídica por lo que el protocolo de hidrólisis y cuantificación por HPLC-FR fueron empleados en el análisis de muestras de alimentos. Hoogerheide y Campbell (1992) compararon los resultados obtenidos en el análisis de albúmina sérica bovina; al usar el ácido clorhídrico 6 N adicionado con ácido ditiodiglicólico, para la obtención de cisteína en el hidrolizado; contra los valores teóricos obtenidos de la base de datos del Protein Identification Resource mediante el uso del programa computacional GenePro, en la medición de la semejanza en los datos, se observó que al graficar los resultados de lo obtenido contra lo teórico, los datos se ajustaron exactamente a una línea al utilizar mínimos cuadrados.

El análisis de harina de soya no presentó diferencias estadísticamente significativas ($p > 0.05$) para ocho de los 10 aminoácidos esenciales, al compararlos con los reportados por el NRC (1998). La baja concentración de triptófano (0.65 g/100 g M.S.) en la muestra de soya, ocasionó que no se pudiera cuantificar. Por el contrario, la lisina presentó el doble (6.01 g/100 g M.S.) del valor teórico (3.02 g/100 g M.S.), lo anterior indica la posibilidad de una coelución con algún producto de degradación producido durante la hidrólisis, o algún contaminante de esta harina. Investigaciones realizadas por Sarwar y Botting (1993), muestran coelución de lisina y prolina con hidroxilisina e hidroxiprolina respectivamente, ya que el PITC es un reactivo que forma derivados con aminas primarias y secundarias. Resultados obtenidos por Beaver *et al.* (1987) al utilizar fenilisotiocianato (PITC) en el método de derivatización señalan: que algunos valores de los contenidos de AAs de muestras de trigo, fueron más bajos al compararlos con los obtenidos por cromatografía de intercambio iónico (IEC) entre

ellos: el ácido glutámico, 3.12%-PITC y 4.58%-IEC; prolina 1.42%-PITC y 1.52% IEC y lisina 0.36%-PITC y 0.42% IEC.

El análisis de harina de sorgo, los resultados obtenidos mostraron ser diferentes ($P < 0.05$) para la mayoría de los aminoácidos reportados por el NRC (1998). La baja concentración de triptófano (0.1%), no permitió su detección, quedando bajo del límite de cuantificación (0.4%). Con respecto a la lisina, su alta concentración hace suponer una coelución con algún otro compuesto. Aunque en este trabajo sólo se analizó una muestra por triplicado es posible que en diferentes muestras (remesas), se presenten diferencias en el contenido de AAs. Un estudio realizado por Mata (1998) señalan una variación en el contenido de proteína cruda en 28 muestras de sorgo y en 31 muestras de soya, encontrando un mayor coeficiente de variación en sorgo (7.9%) en comparación con la variación obtenida en soya (4.2%). Lo anterior manifestó la variación existente en cultivares de sorgo, debido a diferentes factores entre ellos: la variedad sembrada, el tipo de suelo de donde procede la cosecha y/o manejo general del cultivo (Fialho *et al.*, 1995).

En los Cuadros 8 y 9 A del apéndice, se presenta un resumen de los valores de AAs reportados en diferentes trabajos de investigación; observándose un mayor C.V. (%) en sorgo en forma general y particularmente en los AAs, valina 31.5%, triptófano 21.7% y metionina 11.1%. Lo anterior muestra la gran variación en el contenido de AAs reflejando diferencias al comparar los resultados obtenidos en el presente trabajo con los reportados en el NRC (1998), ya que la muestra analizada procede de la producción nacional, condiciones tal vez muy diferentes a las de los sorgos reportados por el NRC; sin embargo, actualmente los valores tabulados por el NRC sobre el contenido químico de los ingredientes, son tomados como referencia en la elaboración de raciones, debido a la ausencia de este tipo de información generada con ingredientes de origen nacional.

Al analizar las mezclas de diferentes proporciones de las harinas de soya y sorgo, se encontró que la cantidad de proteína cruda y de aminoácidos disminuyó a medida que aumentó la cantidad de sorgo. El análisis de regresión entre la variable concentración de soya (X) tuvo relación lineal con el contenido de aminoácidos (Y), la mayoría de los aminoácidos presentaron R^2 mayor de 0.90.

Lo anterior ofrece la posibilidad de generar ecuaciones de predicción que permitan calcular la cantidad de un aminoácido, en particular en raciones en las que la fuente de proteína sea a partir de soya y sorgo; ingredientes mayoritarios en la alimentación de aves y cerdos (Mata, 1998).

6. CONCLUSIONES

En base a los resultados obtenidos y bajo las condiciones particulares del desarrollo de este trabajo, se concluye lo siguiente:

- Se desarrolló un método para analizar el contenido de aminoácidos en ingredientes utilizados en la alimentación animal, por medio de cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC).
- La metodología desarrollada involucra la utilización de un programa de elución en gradiente, separación cromatográfica en fase reversa, hidrólisis con ácido metanosulfónico 4 N y 0.2% de 3-(2-amino etil)indol bajo condiciones de 152 °C por 2 h y derivatización precolumna utilizando el reactivo fenilisotiocianato.
- La mayor variación en el método tanto para análisis cualitativos como cuantitativos se presenta en los resultados obtenidos entre días diferentes (reproducibilidad), mientras que los resultados generados en un mismo día son muy estables (repetibilidad).
- El método presenta una respuesta lineal entre la concentración (X) y la altura de pico (Y) ($R^2 > 0.95$), permitiendo realizar la cuantificación de aminoácidos mediante una curva de calibración.
- Debido a la baja reproducibilidad cuantitativa, la metodología desarrollada exige la generación de una curva de calibración que incluye a los estándares de aminoácidos, para un lote de muestras analizadas en un mismo día.
- Durante la hidrólisis hay pérdidas de aminoácidos, las cuales fueron compensadas por el factor de hidrólisis de cada uno de los estándares.
- En los ingredientes analizados, la cuantificación de los aminoácidos esenciales en el caso de sorgo presentó mayor variación al compararlo con los valores reportados por el NRC (1998), coincidiendo solamente treonina, valina, y

metionina. Mientras que en la soya no se observaron diferencias significativas ($p > 0.05$) para la mayoría de los aminoácidos excepto para triptófano y lisina.

- Los aminoácidos con mayor problema en la cuantificación fueron el triptófano, el cual quedó por debajo del límite inferior de cuantificación; y la lisina, la cual manifestó valores más altos a los reportados.
- La metodología permite determinar la concentración de los aminoácidos esenciales: arginina, histidina, treonina, valina, metionina, ileucina, leucina y Fenilalanina con alto grado de confianza.

7. LITERATURA CITADA

- Agricultural Research Council. 1980. *The Nutrient Requirements of Ruminant Livestock. Technical Review by an Agricultural Research Council party. Published on Behalf of the ARC, C.A.B. INTERNATIONAL. Wallingford. pp.121-181.*
- Alexander R.R. y J.M. Griffiths. 1993. *Basic Biochemical Methods. 2° Edition. Ed. Wiley-Liss. New York, N.Y. USA. 353 p.*
- Association of Official Analysis Chemists. 1990. *Official Methods of Analysis Edited by Kenneth Helrich. Fifteenth Edition, Published by The AOAC, Arlington, Virginia 22201, USA.*
- Banco Genómico. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
- Barcelo, R.J. 1976. *Diccionario Terminológico de Química. Ed. Alhambra. Madrid España pp. 290.*
- Beaver, R.W., D.M. Wilson, H.M. Jones y K.D. Haydon. 1987. *Amino acid analysis in feeds and feedstuffs using precolumn phenylisothiocyanate derivatization and liquid chromatography – Preliminary study. J. Assoc. Off Anal. Chem. 70:425-428.*
- Beckman Instruments, Inc. 1989. *Aminoacid analysis Kit. Bulletin 5966.*
- Betnér I. y P. Földi 1986. *New automated amino acid analysis by HPLC precolumn derivatization with Fluorenylmethyloxycarbonylchloride. Chromatographia Vol. 22, No. 7-12:381-387.*
- Bidlingmeyer, B. A, S. A. Coher, T. L. Tarvin, y B. Frost 1987. *A new, rapid, high-sensitivity analysis of amino acid in food type samples. J. Assoc. Off Anal. Chem., 70 (2):241-247.*

- Bidlingmeyer, B. A, S. A. Coher, T. L. Tarvin. 1984. Rapid analysis of amino acids using pre-column derivatization. *J. of chromatography*. 336:93-104.
- Brudevold, A.B. y L.L. Southern. 1994. Low-protein, crystalline amino acid supplemented, sorghum-soybean meal diets for the 10- to 20-kilogram pig. *J. Anim. Sci.* 72:638-647.
- Budavari, S., M.J. O'Neil, A. Smith, P.E. Heckelman. 1989. The Merck Index. Eleventh edition. Merck & co., Inc, Rahway, N.J. U.S.A.
- Buzzigoli G., L. Lanzone, D. Ciociaro, S. Frascerra, M. Cerri, A. Scandroglio, R. Coldani y E. Ferrannini. 1990. Characterization of a reversed-phase high performance liquid chromatographic system for the determination of blood amino acids. *J. Chromatogr.* 507:85-93.
- Carey, A.F. 1999. Química Orgánica. Tercera edición . McGraw Hill. Interamericana de españa, S.A.U. Madrid España. 1131 p.
- Cavazos R. N., Naccha Torres, L, Torrez de Navarro, E. y Salazar C., M de la Luz. 1996. Determinación de aminoácidos libres en jugo de naranja por cromatografía de líquidos de alta resolución. *Alimentaria*. Mayo. p. 47-52.
- Cousins, B.W., T.D.Tanksley, Jr., D.A. Knabe, y T. Zebrowska. 1981. Nutrient digestibility and performance of pigs feed sorghums varying in tannin concentration. *J. Anim. Sci.* 53:1524-1537.
- Cruz, R.G. 1997. Cuantificación de aminoácidos de los estadios larvarios del camarón *Penaeus vannamei* y estimación de los requerimientos de aminoácidos esenciales. Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias Biológicas, UANL. San Nicolás de los Garza N.L. México.130 p.
- Chung, T. K., y D. H. Baker. 1992. Ideal amino acid pattern for 10-Kilogram pigs. *J. Anim. Sci.* 70:3102-3111.

- Church F.C., H.E. Swaisgood y G.L. Catignani. 1984. Compositional analysis of proteins following hydrolysis by immobilized proteases. *J Applied Biochem.* 6:205-211.
- Draper, N. R., and H. Smith. 1981. *Applied regression analysis 2º Editón.* John Wiley & Sons, Inc. New York. Chichester, Brisbane.
- Edwards, D. I. 1975. *Cromatografía Principios y Técnicas. El Manual Moderno, S. A. México 1, D. F.* 93 p.
- Fábián V., P.M Szakács., and M.I. Perl 1990. Gas chromatography of tryptophan together with other amino acids in hydrochloric acid hydrolysates. *J Chromatogr.* 520: 193-199.
- Fialho, E. T., H. P. Barbosa y L. F. T. Albino. 1995. Chemical composition, digestible protein and energy value of some alternative feedstuffs for pigs in Brazil. *Anim. Feed Sci. Technol.* 55:239-245.
- Fletouris, J.D., N.A. Botsoglou, G.E. Papageorgiou y A.J. Montis. 1993. Rapid determination of triptophan in intact proteins by derivative spectrophotometry. *J. Assoc. Off Anal. Chem. International Vol. 76, No. 6:*1168-1173.
- Fürst P., L. Pollack, T.A. Graser, H.Godel y P.Stehle. 1989. HPLC analysis of free amino acids in biological material- an appraisal of four pre-column derivatization methods. *J Liquid Chromatogr.* 12(14):2733-2760.
- Garza U. H, R. C. Garza. y A.M.C. Gajá. 1986. Determination of amino acids in wort and beer by reverse-phase high-performance liquid chromatography. *J. Assoc. Off. Anal. Chem. Vol.44 No. 2:*47-57.
- Gehrke, W.CH., L.L. Wall, J.S. Absheer, A.F. Kaiser. 1985. Sample preparation for chromatography of amino acid: acid hydrolysis of proteins *J. Assoc. Off. Anal. Chem. Vol.68 No. 5:*811-821.

- González, T.P., F. Camacho, E. Jurado, M.P. Páez y E.M. Guadix. 1994. Enzymatic hydrolysis of whey proteins. II. Molecular weight range. *Biotechnology and Bioengineering*. Vol. 44:529-532.
- Guajardo, B.C. 2000. Análisis de la composición de aminoácidos de diferentes estadios larvarios del camarón blanco *Litopenaeus vannamei* por medio de cromatografía de líquidos de alta resolución. Tesis de licenciatura. Químico Bacteriólogo Parasitólogo. Fac. de Ciencias Biológicas. UANL, Méx.
- Hagen, S.R., B. Frost, y J. Austin. 1989. Precolumn phenylisothiocyanate derivatization and liquid chromatography of amino acid in food. *J. Assoc. Off Anal. Chem.* Vol. 72:912-916.
- Hansen, J.A., D.A. Knabe, y K.G. Burgoon. 1993. Amino acid supplementation of low protein sorghum-soybean meal diets for 20- to 50-kilograms swine. *J. Anim Sci.* 1:442-451.
- Harris, E.L.V. 1988. Amino acid analysis by precolumn derivatization. In: Walker, J. M. *New protein techniques*. Humana Press. Clifton, New Jersey. USA. pp 33-47.
- Hawk, G. 1980. Biological biomedical application of liquid chromatography. *Chromatographic Science Series* Vol. 10:147-148.
- Henrikson R.L. y S.C. Meredith 1984. Amino acid analysis by reverse-phase high performance liquid chromatography: precolumn derivatization with phenylisothiocyanate. *Analytical Biochemistry*. 136:65-74.
- Herkelman, K.L., G.L. Cromwell, T.S. Stahly, T.W. Pfeiffer y D.A. Knabe. 1992. Apparent digestibility of amino acids in raw and heated conventional and low trypsin -inhibitor soybeans for pigs. *J. Anim. Sci.* 70:818-826.
- Hoogerheide, J.G. y C.M. Campbell. 1992. Determination of cysteine plus half-cysteine in protein and peptide hidrolisates: use of Dithiodiglycolic acid and phenylisothiocyanate derivatization. *Analytical Biochemistry*. 201:146-151

- Huber, L. 1994. Buenas prácticas de laboratorio y buenas prácticas de fabricación actuales. pp. 45.
- Ishida, Y., T. Fujita y K. Asai. 1981. New detection and separation method for amino acids by high-performance liquid chromatography. *J. chromatography* 204:143-148.
- Joint FAO-WHO 1991. Expert consultation, protein quality evaluation food and nutrition. Paper 151. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome.
- Kan, T.A. y W.F. Shipe. 1981. Modification and evaluation of reverse phase high performance liquid chromatographic method for amino acid analysis. *J. Food Sci.* Vol No 47:338-339.
- Knecht, R y J.-Y. Chang. 1986. Liquid chromatographic determination of amino acid after gas-phase hydrolysis and derivatization with (Dimethylamino) azobenzenesulfonyl Chloride. *Anal. Chem.* 58:2375-2379.
- Krause, I., A. Bockhardt, H. Neckermann, T. Henle y H. Klostermeyer. 1995. Simultaneous determination of amino acids and biogenic amines by reversed-phase high-performance liquid chromatography of the dansyl derivatives. *J. Chromatogr. A.* 67-79.
- Lee, K.D. y J.J. Warthesen. 1996. Mobile phase in reverse-phase HPLC for determination of bitter peptides in cheese. *J Food Sci.* 61: 291-294.
- Llames, C.R. y J. Fontaine, 1994. Determination of amino acids in feeds collaborative Study. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 77:1362-1402.
- Mackenzie, S.L. 1987. Gas chromatographic analysis of amino acids as the N-heptafluorobutiril isobutil ester. *J. Assoc. Off Anal. Chem.* 70:151-160.

- Mamputu, M. y R.J. Buhr. 1995. Effect of substituting sesame meal for soybean meal on layer and broiler performance. *Poultry Sci.* 74:672-684.
- Mara, F.P., J.J. Murphy y M. Rath. 1997. The amino acid composition of protein feedstuffs before and after ruminal incubation and after subsequent passage through the intestines of dairy cows. *J. Anim. Sci.* 75:1941-1949.
- Martin D.W, P.A. Mayes y V.W Rodwell. 1984. *Bioquímica de Harper*. Novena ed. El Manual Moderno. México, D. F 660 p.
- Mata, E.M.I. (1998). Variación de la composición nutritiva de los ingredientes de la dieta y su efecto sobre el comportamiento productivo de cerdos en crecimiento. TESIS de Doctorado en Ciencias Pecuarias FA-UANL. Marín, N.L. Diciembre, 1998. 112 p.
- Maynard L.A., J.K. Loosli, H.F. Hintz, R.G. Warner. 1979. *Animal nutrition*. Seventh Ed. Mc Graw-Hill. New York. pp.136-181.
- MacDonald J.L., M.W. Krueger y J.H. Keller. 1985. Oxidation and hydrolysis determination of sulfur amino acids in food and feed ingredients: collaborative study. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* Vol. 68, No 5:826-829.
- McDonald, P.R., A.Edwards y J.F.D.Greenhalgh 1988. *Animal Nutrition*. 4th Ed. Longman Scientific Technical, John Wiley & Sons, Inc., New York. pp. 260-283.
- Meek, J.L. y Z.L. Rossetti, 1981. Factors affecting retention and resolution of peptides in high performance liquid chromatography. *J. Chromatography* 211:15-28.
- Mehrez, A.Z., E.R. Orskov y J. Opstvedt. 1980. Processing factors affecting degradability of fish meal in the rumen. *J Anim. Sci.* 75:1575-1583. *J Anim. Sci.* 50:737-744.

- Mitruka, B.M. 1975. Gas chromatographic applications in microbiology and medicine. John Wiley & Sons, Inc. New York. USA. pp. 3-26
- National Research Council. 1988. *Nutrient Requirements of Swine*. Ninth Revised Edition. National Academy Press. Washington, D. C.
- National Research Council 1996. Nutrient requirements of beef cattle. Seventh revised Edition. National Academy Press. Washington, D. C.
- National Research Council 1998. Nutrient requirements of swine. Tenth Revised Edition. National Academy Press. Washington, D. C.
- Navarro, M.J.C. 1998. Cromatografía de aminoácidos en extractos de germen de siete semillas. Examen práctico. Biólogo. Facultad de Ciencias. Biológicas. UANL. Octubre de 1998. San Nicolás de los Garza, N.L. 75 p.
- Orskov, E.R. y E.L. Miller. 1987. Protein evaluation in ruminants. World animal science. B. *Disciplinary Approach. Feed Science*. Ed. Orskov, E.R. Elsevier. pp 103-127.
- Orskov, E.R. 1988. Nutrición proteica de los rumiantes. Acribia Zaragoza España. 178 p.
- Owen, K.Q., D.A. Knabe, K.G. Burgoon y E.J. Gregg. 1994. Self-selection of diets and lysin requirements of growing- finishing swine. *J. Anim. Sci.* 72:554-564.
- Plumer, D. T. 1971. An introduction to practical biochemistry. McGraw-Hill London. pp. 54-62
- Pond W.G., D.C. Church y K.R. Pond. 1995. Basic animal nutrition and feeding. Fourth edition. John Wiley & Sons, New York. pp 49-66.
- Quattrocchi, O.A., S.A. Abelaira, R.F. Laba, 1992. Introducción a la HPLC. Aplicación y práctica. Ed. La Argentina. Buenos Aires Argentina 407 p.

- Rakoff, H. y N.C. Rose. 1988. Química orgánica fundamental. Décima primera ed. Limusa, México, D.F. 890 p.
- Rayner, J.C. 1985. Protein hydrolysis of animal feeds for amino acid content. *J. Agric. Food Chem.* 33, 722-725.
- Salazar, C. M. L. 1993. Aminoácidos por cromatografía de líquidos de alta resolución. Estudio de perfiles en frutas de diferentes especies de *Karwinskia*. Tesis de Maestría Fac. Medicina UANL. Monterrey, N.L. México. 70 p.
- Sarwar, G. y H.G. Botting. 1993. Evaluation of liquid chromatographic analysis of nutritionally important amino acids in food and physiological samples, Review. *J. Chromatogr.* 615:1-22.
- Segel, Irwin. 1976. Biochemical calculations. Second ed. John Wiley & Sons. New York. pp. 1-8.
- Silvestre, M.P.C., M. Hamon, y M. Yvon. 1994. Analysis of protein hydrolysates. 2. Characterization of casein hydrolysates by a rapid peptide quantification method. *J. Agric. Food Chem.* 42,2783-2789.
- Simpson J., R. Marjorie y T.Y. Liu. 1976. Complete amino acids análisis of proteins a single hydrolysate. *The J. Biological Chemistry*. Vol 251, No. 7:1936-1940
- Snyder, L. R. y J. J. Kirkland. 1979. Introduction to modern liquid chromatography. A Wiley-Interscience publication. John Wiley & Son, Inc. pp. 173-245.
- Spackman, D.H., W.H. Stein, y S. Moore. 1958. Automatic recording apparatus for use in the chromatography of amino acids. *Anal. Chem.* 30:1190-1206.
- SPSS (Statistical Package for Social Sciences).1997. SPSS Inc., SPSS/PC+ version 8.

- Toran A., R. Barberá, R. Farré, M.J. Lagarda y J.C. López. 1996. HPLC method for cyst(e)ine y methionine in infant formulas J. Food Sci. Vol. 61, No. 6:1132-1135.
- Tuan Y.H. y D.R. Phillips 1997. *Optimized determination of cystine/cysteine and acid-stable amino acids from a single hydrolysate of casein- and sorghum- based diet and digesta samples.* J. Agric. Food Chem 45:3535-3540.
- Tuitoek, J. K., L. G. Young, C. F. M. de Lange, y B. J. Kerr. 1997. The effect of reducing excess dietary amino acid on growing-finishing pig performance: an evaluation of the ideal protein concept. J. Anim. Sci. 75:1575-1583.
- Vega A.A. de los S. 1993. *Caracterización química de la pared celular de actinomicetos con actividad insecticida para dípteros y lepidópteros de importancia agrícola y en salud pública.* Tesis de licenciatura. Químico Bacteriólogo Parasitólogo. Facultad de Ciencias Biológicas. UANL. San Nicolás de los Garza, N. L. 78 p.
- Wardlaw, F.B. y W.P. Williams. 1991. Techniques available for analysis of feed and ingredients. National Feed Ingredient Assn. Nutrition Institute Proceedings, Chicago Ill.
- Williams, A. P. 1986. *General problems associated with the analysis of amino acids by ion-exchange chromatography.* J. Chromatogr. 373:175-190.
- Yang, H-Y, y F.I. Sepulveda. 1985. Separation of phenylthiocarbamyl amino acids by high-performance liquid chromatography on spherisorb octadecylsilane columns. J. chromatogr., 346 413-416.
- Yin, Y. L., R. L. Huang y H. Y. Zhong. 1991. Requirements of ileal digestible amino acid for growing pigs. Chinese Patent, 911764087.
- Yin, Y. L., R. L. Huang, H. Y. Zhong y H.Y. Zhong. 1993. Comparison of ileorectal anastomosis and the conventional method for the measurement of ileal

digestibility of protein sources and mixed diets in growing pigs. *Anim. Feed Sci. Technol.* 42:297-308.

Young, P.M. y T. Wheat. 1990. Optimization of high-performance liquid chromatography peptide separations with alternative mobile and stationary phase. *J. Chromatogr.* 512:273-281.

Zielke, H.R. 1985. Determination of amino acids in the brain by high performance liquid chromatography with isocratic elution and electrochemical detection. *J. of chromatography.* Vol.347:320-324.

Zinn, R.A. y Y. Shen 1998 An evaluation of ruminally degradable intake protein and metabolizable amino acid requirements of feedlot calves *J. Anim. Sci.* 76:1280-1289.

8. APÉNDICE

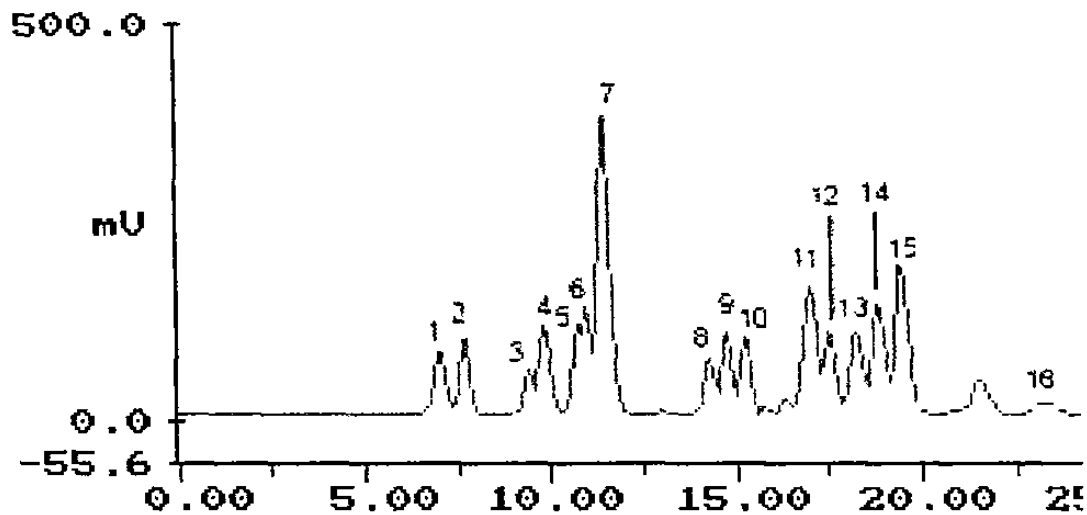


Figura 1-A. Separación cromatográfica de 17 estándares de AAs utilizando el gradiente 1 (Fac. de Agronomía).

Cuadro 1-A. Programa de elución 1 usado para la separación de aminoácidos mediante HPLC-FR.

Tiempo (min)	%A	%B
2	98	2
15	65	32
22	72	28
26	32	68
30	0	100
40	100	0
50	100	0

- Fases: Eluente A: fosfato de Na monobásico 12.5 mM + 0.05% de TEA pH = 6.4
Eluente B: 40% de buffer de fosfato de Na monobásico 12.5 mM + 60% de acetonitrilo + 0.05% de TEA.
- Flujo: 1 ml/min.

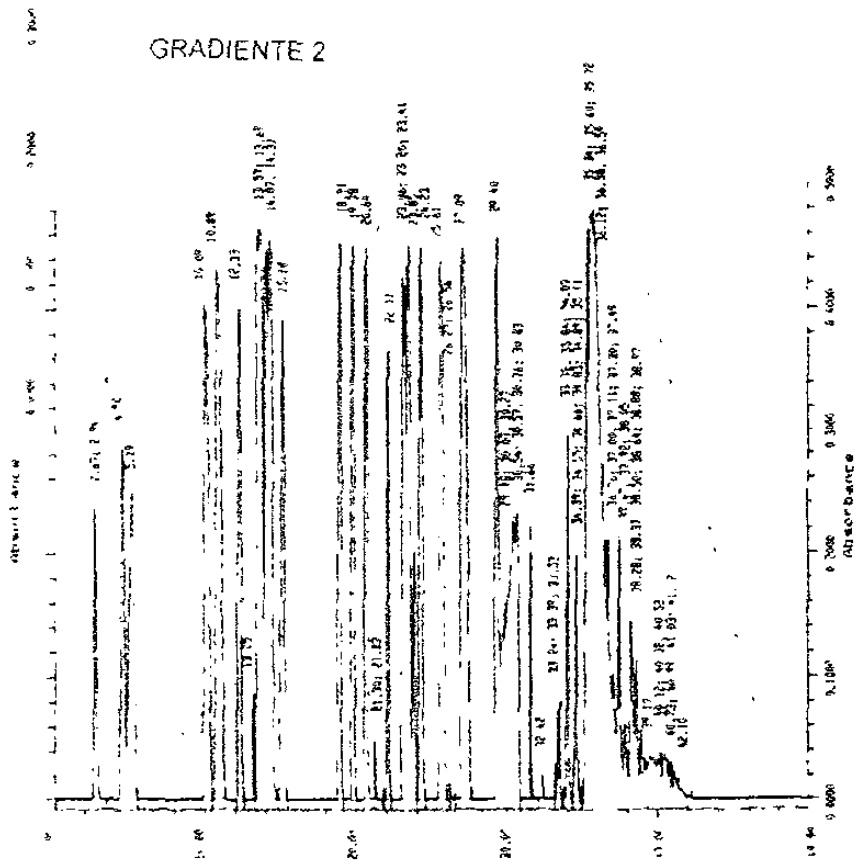


Figura 2-A. Separación cromatográfica de 17 estándares de AAs utilizando el gradiente 2 (Fac. de Medicina).

Cuadro 2-A. Programa de elución 2 usado para la separación de aminoácidos mediante HPLC-FR.

Tiempo (min)	%A	%B
0	100	0
5	82	2
18	65	35
25	65	35
33	0	100
38	0	100
48	100	0
50	100	0

- Fases: Eluente A: fosfato de Na monobásico 12.5 mM + 0.05% de TEA pH = 6.4
Eluente B: 40% de buffer de fosfato de Na monobásico 12.5 mM + 60% de acetonitrilo + 0.05% de TEA.
- Flujo: 1 ml/min.

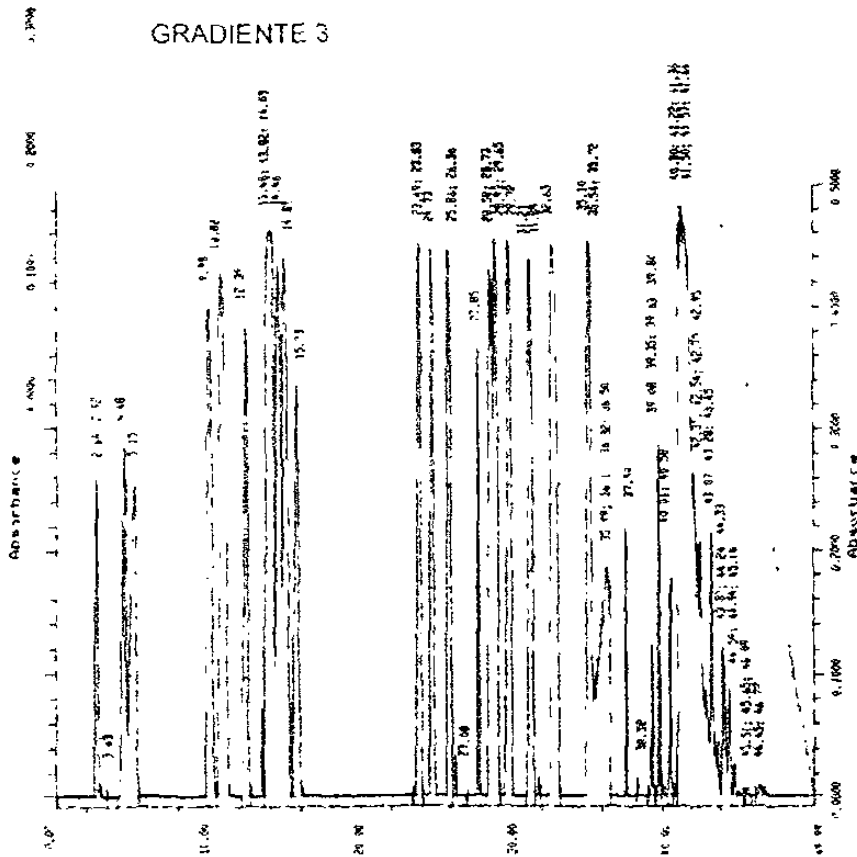


Figura 3-A. Separación cromatográfica de 17 estándares de AAs utilizando el gradiente 3 (Fac. de Medicina).

Cuadro 3-A. Programa de elución 3 usado para la separación de aminoácidos mediante HPLC-FR.

Tiempo (min)	%A	%B
0	100	0
5	82	2
9	90	10
14	90	10
24	65	35
31	65	35
39	0	100
44	0	100
50	100	0

- Fases: Eluyente A: fosfato de Na monobásico 12.5 mM + 0.05% de TEA pH = 6.4.
Eluyente B: 40% de buffer de fosfato de Na monobásico 12.5 mM + 60% de acetonitrilo + 0.05% de TEA.
- Flujo: 1 ml/min.

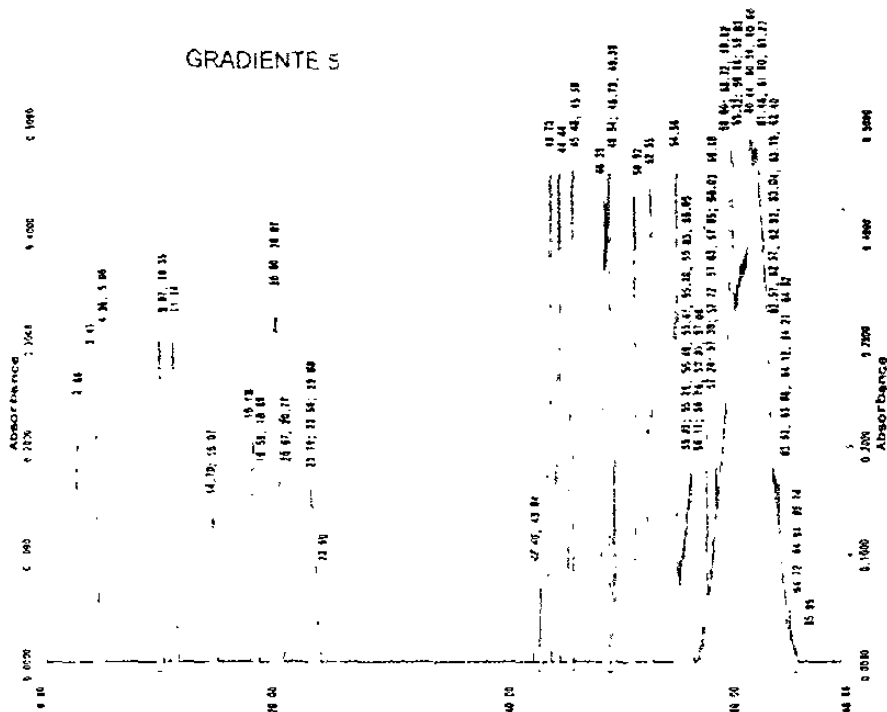


Figura 5-A. Separación cromatográfica de 17 estándares de AAs utilizando el gradiente 5 (Fac. de Medicina).

Cuadro 5-A. Programa de elución 5 usado para la separación de aminoácidos mediante HPLC-FR.

Tiempo (min)	%A	%B
0	100	0
30	100	0
44	65	35
51	65	35
59	0	100
64	0	100
69	100	0

- Fases: Eluente A: fosfato de Na monobásico 12.5 mM + 0.05% de TEA pH = 6.4. Eluente B: 40% de buffer de fosfato de Na monobásico 12.5 mM + 60% de acetonitrilo + 0.05% de TEA.
- Flujo: 1 ml/min.

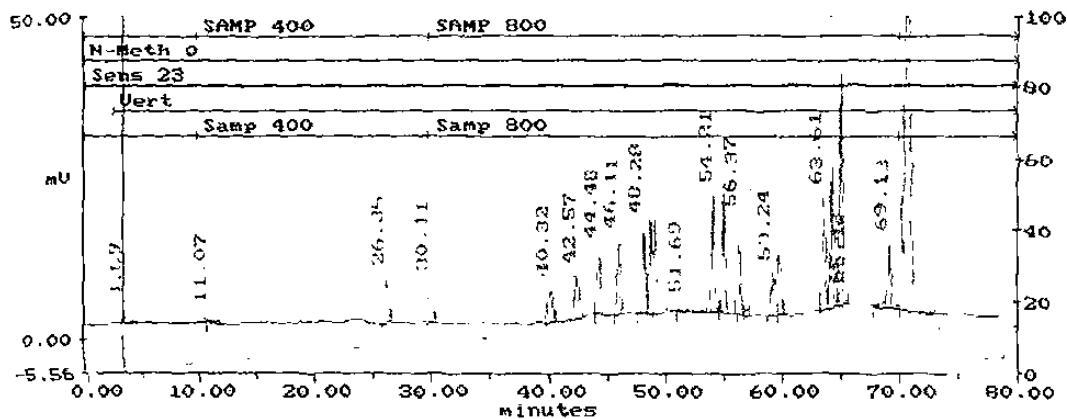


Figura 6-A. Separación cromatográfica de 17 estándares de AAs utilizando el gradiente 6- flujo 1 ml/min.

Cuadro 6-A. Programa de elución 6 usado para la separación de aminoácidos mediante HPLC-FR.

Tiempo (min)	%A	%B
0	100	0
35	90	10
49	58	42
56	58	42
64	0	100
69	0	100
74	100	0

- Fases: Eluyente A: fosfato de Na monobásico 12.5 mM + 0.05% de TEA pH = 6.4. Eluyente B: 40% de buffer de fosfato de Na monobásico 12.5 mM + 60% de acetonitrilo + 0.05% de TEA.
- Flujo: 1 ml/min.

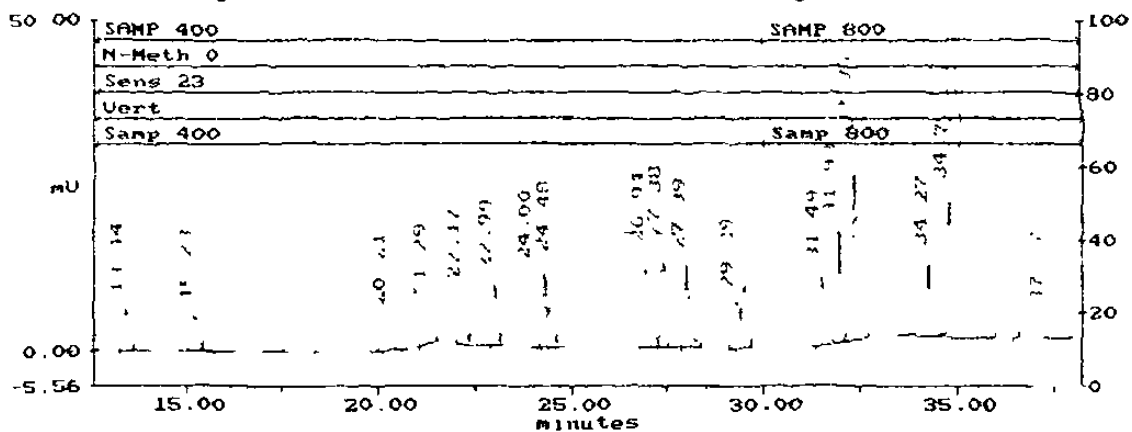


Figura 7-A. Separación cromatográfica de 17 estándares de AAs utilizando el gradiente 7- flujo 2 ml/min. Condición final de separación.

Cuadro 7-A. Programa de elución 7 usado para la separación de aminoácidos mediante HPLC-FR.

Tiempo (min)	%A	%B
0	100	0
17.5	90	10
24.5	58	42
28	58	42
32	0	100
34.5	0	100
37	100	0

- Fases: Eluente A: fosfato de Na monobásico 12.5 mM + 0.05% de TEA pH = 6.4. Eluente B 40% de buffer de fosfato de Na monobásico 12.5 mM + 60% de acetonitrilo + 0.05% de TEA
- Flujo: 2 ml/min

Cuadro 8-A Contenido de aminoácidos en soya g/100 g M.S. reportados en diferentes fuentes bibliográficas.

Autor	PC	Asp	Glu	Ser	Gli	His	Arg	Tre	Ala	Pro	Tir	Val	Met	Ile	Leu	Fen	Tip	Lis	Método de análisis
Yin et al, 1993	47.71	4.45	8.05	2.31	1.74	1.97	2.97	1.64	1.80	5.9	0.83	2.51	0.59	1.97	3.59	2.33		2.21	O-phthaldehído - 3 ácido mercaptopropionico, detección fluorescencia shimadzu-LC-4 A HPLC hidrólisis con 6 N HCl tubos al vacío por 24 h a 110°C/
Hansen, 1993	44.00	5.15	8.26	2.26	1.95	1.14	3.23	1.78	1.97		1.70	2.16	0.59	2.07	3.41	2.25	0.50	2.80	Hidrólisis ácida, e Hidrólisis alcalina Metionina preoxidación con ácido performico
	43.38	5.30	8.55	2.34	2.00	1.18	3.35	1.78	2.00		1.67	2.26	0.66	2.07	3.37	2.27	0.54	2.90	Cromatografía de intercambio iónico usando el autoanalizador de AAs
Herkelman et al, 1992	44.37	5.22	8.27	2.29	2.01	1.16	3.29	1.81	2.00	2.25	1.73	2.20	0.60	2.08	3.46	2.26		2.83	Igual que el anterior
Owen et al 1994	44.4					1.17	3.41	1.83				2.21	0.81	2.09	3.44	2.31		2.90	Hidrólisis ácida HCl 6 N, atmosfera de N
	42.3					1.18	3.26	1.87				2.81	0.58	2.08	3.45	2.25		2.87	Cromatografía de intercambio iónico usando el autoanalizador de AAs
	45.2					1.21	3.41	1.84				2.26	0.58	2.15	3.57	2.33		2.90	
Brudevold et al, 1994	44.67					1.08		1.78				2.29	0.52	1.92		2.10	0.57	2.69	Spitz, 1973 Anal Biochem 56 66
	40.74					1.16		1.77				2.16	0.68	2.03		2.24	0.63	2.75	
	42.53					1.10		1.66				1.98	0.52	1.87		2.19	0.63	2.66	
	43.88					1.10		1.69				1.77	0.52	1.64		2.06	0.52	2.58	
Mamputo y Buht 1995	47.73	5.49	8.36	2.08	2.11	1.30	3.51	1.83	2.16	2.48	1.75	2.43	0.76	2.33	3.74	2.46	0.66	3.07	Cromatografía de intercambio iónico usando el autoanalizador de AAs Hidrólisis ácida HCl 6 N, Met y Cis Preoxidación con Ac Performico Típ Hidrólisis alcalina detección colomenétrica.
PROMEDIO	44.24	5.12	8.30	2.26	1.96	1.23	3.30	1.77	1.99	2.37	1.54	2.26	0.62	2.03	3.50	2.25	0.58	2.76	
S+	2.03	0.40	0.18	0.10	0.14	0.24	0.16	0.07	0.13	0.16	0.40	0.26	0.09	0.17	0.12	0.11	0.06	0.22	
CV%	4.58	7.74	2.18	4.55	6.98	19.5	4.94	4.14	6.44	6.88	25.7	11.4	15.1	8.28	3.47	4.69	10.7	7.89	
n =	12	5	5	5	4	12	8	12	5	3	5	12	12	12	8	12	7	12	

Cuadro 9-A Contenido de aminoácidos en sorgo g/100 g MS reportados en diferentes fuentes bibliográficas.

	PC	asp	glu	Ser	Gli	his	arg	tre	ala	pro	Tir	val	met	lle	leu	fen	tip	lis	Método de análisis
Hansen 1993	8.25	0.58	1.72	0.38	0.31	0.20	0.35	0.29	0.76		0.33	0.44	0.18	0.37	1.10	0.44	0.100	0.21	Hidrólisis ácida Metionina
	8.19	0.60	1.77	0.39	0.32	0.22	0.38	0.29	0.78		0.34	0.45	0.18	0.37	1.13	0.46		0.21	preoxidación con ácido performico
Owen et al., 1994	10.0					0.23	0.40	0.34					0.52	0.41	1.39	0.53		0.22	Cromatografía de intercambio iónico usando el autoanalizador de AAs
	8.0					0.18	0.32	0.26					0.40	0.33	1.07	0.43		0.18	Hidrólisis ácida HCl 6 N atmósfera de N
Brudevold et al, 1994	9.27					0.20		0.33					0.49	0.16		0.47	0.11	0.23	Cromatografía de intercambio iónico usando el autoanalizador de AAs
	8.36					0.21		0.30					0.46	0.17		0.45	0.06	0.22	Spitz, 1973 Anal
	9.12					0.22		0.32					0.42	0.16		0.41	0.13	0.27	Biochem. 56.66
	8.35					0.18		0.26					0.37	0.16		0.37	0.11	0.20	
Cousins et al., 1981	10.80	0.71	2.35	0.46	0.29	0.25	0.42	0.33	0.93	0.61	0.47	0.85	0.21	0.42	1.45	0.57	0.09	0.22	Hidrólisis ácida HCl 6 N,
	9.44	0.63	1.94	0.40	0.27	0.22	0.40	0.29	0.79	0.50	0.42	0.75	0.18	0.38	1.22	0.50	0.08	0.21	atmósfera de N
	10.46	0.72	2.27	0.44	0.29	0.25	0.42	0.33	0.89	0.66	0.48	0.85	0.17	0.42	1.40	0.56	0.10	0.22	Cromatografía de
	9.93	0.64	2.05	0.40	0.28	0.23	0.39	0.30	0.81	0.55	0.43	0.78	0.17	0.38	1.25	0.49	0.07	0.20	intercambio iónico usando el autoanalizador de AAs
PROME. S+ CV% n =	9.16	0.65	2.02	0.41	0.29	0.22	0.39	0.30	0.83	0.58	0.41	0.56	0.17	0.37	1.25	0.47	0.10	0.22	Triptofano hidrólisis hidroxido de Bano
	0.92	0.06	0.26	0.03	0.02	0.02	0.03	0.03	0.07	0.07	0.06	0.18	0.02	0.04	0.15	0.06	0.02	0.02	
	10.09	8.84	12.7	7.59	6.32	10.6	9.00	9.15	8.19	12.0	15.4	31.5	11.1	11.2	11.7	12.6	21.7	9.67	
	12	6	6	6	6	12	12	12	6	4	6	12	12	12	8	12	10	12	

