

Instituto Español de Fisiología y Bioquímica
Sección de Fisiología Aplicada de Pamplona
(Prof. Dr. J. Jiménez-Vargas)

Micrométodo sencillo para aislar y determinar aminoácidos de líquidos biológicos empleando resinas de intercambio iónico y cromatografía sobre papel

por
José M.² Macarulla

(Recibido para publicar el 5 de febrero de 1959)

Las principales dificultades que presenta el reconocimiento y determinación de microcantidades de aminoácidos en líquidos biológicos estriban en las notables interferencias debidas a electrolitos, azúcares y proteínas. Para un buen desarrollo del cromatograma sobre papel es necesario eliminar las sustancias interferentes o reducirlas al mínimo, y para ello se han aplicado diversas técnicas.

Las sales se separan por electrolisis (de-salting) con membranas de celofán (9), por precipitación con reactivos adecuados (6) y, modernamente, por retención en resinas. Las proteínas, por ultrafiltración (8) o precipitación con diversos disolventes o ácidos orgánicos (2, 10, 12, 13, 16, 21). Los azúcares, por tratamiento de la muestra con acetona clorhídrica (10, 14); por oxidación (20) o por selección de determinados disolventes cromatográficos.

En la actualidad, las resinas de intercambio catiónico o aniónico, aprovechando el carácter de *zwitterion* de los aminoácidos, han permitido aislarlos de las sustancias no iónicas

por una parte, y de los electrolitos fuertes por otra (1, 3, 4, 11, 15, 17).

Las técnicas clásicas suelen presentar tres inconvenientes, que hemos superado en nuestro micrométodo: *a*) requieren macro o semimicrocantidades de líquidos biológicos (de 1 a 20 ml. de muestra); *b*) son de aplicación algo larga y engorrosa o requieren aparatos especiales; y *c*) difícilmente consiguen una separación total de los aminoácidos y las otras sustancias sin pérdidas notables de algunos de ellos o alteración de su forma originaria.

Empleando las resinas con escala micro la preparación de la muestra para cromatografía es breve — el aislamiento de los aminoácidos dura menos de 1 hora —, requiere solamente la cantidad de líquido biológico que se ha de poner en el cromatograma (80-125 μ l. de plasma u orina) y la separación de electrolitos, azúcares y proteínas es fácil y cuantitativa, sin pérdidas ni alteraciones apreciables en los aminoácidos.

Fundamento

En nuestro método hemos escogido la resina Ion-X (Dowex 50 \times 12), de grano muy fino, y fuertemente ácida; siendo, por tanto, buena cambiadora de cationes.

Al pasar a su través una mezcla conteniendo proteínas, péptidos, aminoácidos, azúcares y otras sustancias orgánicas y sales, son capaces de fijarse aquellos compuestos de peso molecular no muy elevado, que pueden disociarse como cationes en medio muy ácido. Por tanto, se fijan los metales de las sales, el amoníaco, los aminoácidos y los péptidos sencillos. Las proteínas, por su peso molecular elevado, no son retenidas por las resinas con número elevado de *cross-linking* (18). Asimismo los aniones de las sales minerales (Cl^- , SO_4^- , CO_3H^- , PO_4H^- , ...) salen en forma de ácidos libres, mientras que los azúcares y otras sustancias orgánicas pasan inalteradas, eliminándose todos estos compuestos al lavar la resina con agua.

El orden de prioridad en la fijación es el de basicidad de la sustancia. En primer lugar los cationes metálicos Ca^{++} , Na^+ , K^+ , seguidos de los aminoácidos básicos (arginina, lisina, ...) del NH_4^+ , y los aminoácidos neutros. Como la resina es fuertemente ácida por ser sulfónica ($\text{pH} < 2$) (18); incluso los ácidos aspártico y glutámico con pI de 3 y 3,2, respectivamente (19), se presentan por completo en forma catiónica fijable.

Para la elución se escoge una base débil capaz de desplazar a los aminoácidos y péptidos y que deje inalterados los cationes inorgánicos. Se ha escogido el NH_3 2 N, fácilmente eliminable por evaporación; quedando un $p\text{H}$ aproximado de 11,8, que permite desplazar a todos los aminoácidos básicos (la lisina y arginina tienen $p\text{I}$ de 9 y 10,7, respectivamente) (19).

Esta disolución amoniacal de aminoácidos, libre de sales y de sustancias orgánicas, basta concentrarla por evaporación y emplearla en cromatografía bidimensional sobre papel para aislar los aminoácidos individualmente.

Material y métodos

Reactivos empleados:

Resina Ion-X;
Acido clorhídrico conc. y 4 N;
Amoníaco 5 N y 2 N;
Peróxido de hidrógeno 30 %;
Aminoácidos puros;
Papel indicador de $p\text{H}$;
Disolventes, reveladores y fijadores de cromatografía.

En una columna de unos 50 mm. de altura y 6,4 de diámetro interno, adaptable a un tubo de centrífuga como se indica en la figura 1-a, se colocan 0,4 g. de la resina no desecada, alcanzando la altura de unos 21-22 mm., sobre un pequeño algodón o tapón de vitrofil que sirve de filtro y soporte. Se lava con agua abundante y con ClH 4 N y NH_4OH 5 N alternativamente, para arrastrar la parte soluble, y se comprueba la eficacia de la operación evaporando los líquidos de lavado a sequedad (la resina está preparada cuando no queda residuo apreciable en ellos).

A continuación se pasan por la columna 10 ml. de ClH 4 N a la velocidad de 30-40 gotas/minuto para dejar la resina en forma ácida.

Se lava con agua hasta neutralidad del líquido saliente y sobre una delgada capa acuosa se deja una pequeña cantidad del líquido biológico en estudio (200 μl . de plasma u orina) y se le hace atravesar la resina a la velocidad de 20 gotas/minuto para facilitar la absorción total de aminoácidos y sales. Se lava la columna con 10 ml. de agua destilada — al

final sale neutro (se comprueba) — que arrastra la mayor parte de proteínas, azúcares y otras sustancias orgánicas. Los líquidos se recogen en un tubo cilindrocónico (fig. 1-a) y se ayuda la operación con una succión suave de la trompa, si procede, succión que permite expulsar los líquidos de salida por simple inversión del aparato. Una vez lavada la resina se conecta al tapón un nuevo tubo de centrífuga de 10 ml. graduado.

Se pasan lentamente — a 20 gotas/minuto — 4 ml. de NH_3 2 N y se recoge todo el líquido saliente. Este contiene la totalidad de los aminoácidos de la muestra. Con 2 ml. de NH_3 los líquidos salen alcalinos, los otros 2 ml. son para garantizar el desplazamiento completo de la arginina.

La resina se lava con agua, con 10 ml. de ClH 4 N y con agua hasta neutralidad, pudiéndose emplear de nuevo numerosas veces.

De los 4 ml. de disolución amoniaca, después de agitada (contiene los aminoácidos de 200 μl . de muestra) se separan 2 ml. en otro tubo idéntico. El primero se evapora en baño maría con un chorro de aire seco, según se indica en la figura 1-b. Con el concentrado o desecado, que contiene los aminoácidos de 100 μl . de líquido biológico, se hace un cromatograma directo para estudiar los péptidos y aminoácidos libres en él. Para ello se añade un poco de agua a las paredes del tubo con la micropipeta que hemos de utilizar para pasar la muestra al papel, se arrastra todo el precipitado y, con unos 30 segundos de centrifugación, se reúne todo el líquido en el fondo. Se pasa el líquido al cromatograma. Se lava el tubo con algo de agua, se repite la centrifugación y se pasa de nuevo al papel.

Con la disolución amoniaca del segundo tubo (contiene los aminoácidos de 100 μl . de líquido) se prepara un hidrolizado de péptidos y amidas. Para ello se evaporan a sequedad como el anterior, el residuo se diluye con agua como aquél y se pasa a un tubo de hidrolisis (4 \times 80 mm.), se lava con agua, se centrifuga 30 segundos, y se pasa también al último tubo, se repite el lavado con ClH puro, que se añade a esta disolución de aminoácidos procurando que el conjunto resulte 5-6 N en ClH. Se cierra el tubo de hidrolisis a la lámpara y se hierve durante 5 horas en baño maría.

Pasado este tiempo, se rompe el tubo; se neutraliza con NH_3 conc. y se pasa su contenido a una columna de resina preparada. Se lava el tubo roto con agua que se añade a la columna y se repite la extracción con la resina para eliminar el exceso de ClH.

La fracción amoniacal se recoge en un tubo de centrífuga como los anteriores, se le agregan 4-5 gotas de H_2O_2 al 30 %, se concentra como antes o poco menos y se pasa a un cromatograma agotándola con un poco de agua.

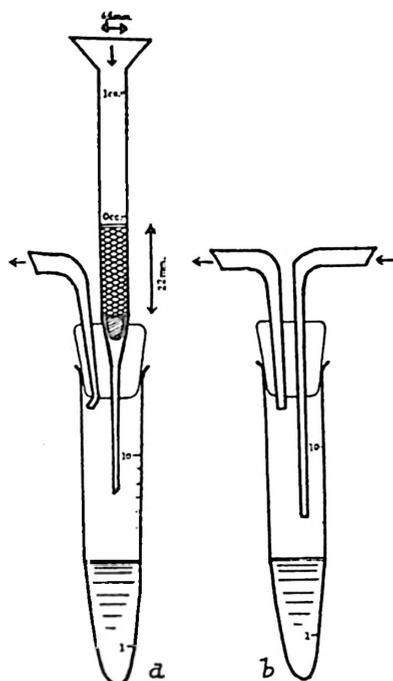


Figura 1. — Dispositivo para el aislamiento de los aminoácidos de líquidos biológicos previo a la cromatografía sobre papel. a) Columna de resina Ion-X adaptada a un tubo de centrífuga al que se puede hacer vacío. Sobre un pequeño algodón, que actúa de filtro y soporte, hay 0,4 g. de la resina que ocupan 20-22 mm. de columna. La capacidad global de ésta es de 2 ml. b) El tubo de centrífuga por simple cambio de tapón se puede someter a un chorro de aire que acelera la evaporación a sequedad en baño maría

Para obtener la disolución amoniacal de aminoácidos, se tarda unos 16-18 minutos, y para evaporar los 2 ml. de la misma otros 15-20. De modo que la muestra está a punto en menos de una hora.

Los cromatogramas, realizados según el método ascendente clásico, con papel Whatman núm. 1, y empleando Butanol-Acético-Agua (4 : 1 : 1) y Fenol 80 % (5, 7, 14), se han reducido a las dimensiones de 23 × 26 cm., que suponen una mayor rapidez y sensibilidad para el método. En efecto, los cromatogramas pequeños aparecen con fondo muy blanco y

limpio (las impurezas llegan siempre al borde) y son reconocibles sobre ellos cantidades del orden de 0,25 μ l. de disolución 0,01 M de un buen número de aminoácidos patrones.

Resultados y conclusiones

La simplicidad de este método es grande, ya que se puede montar con los utensilios corrientes de un laboratorio bioquímico y las resinas y los otros reactivos no son difíciles de adquirir.

Para investigar si la fijación y elución de aminoácidos en la resina es cuantitativa, se han ensayado mezclas de aminoácidos conocidos (incluyendo los dos extremos: ácido aspártico y arginina). El análisis de las tres fracciones recogidas: acuosa previa, amoniacal y otra con exceso de NH_3 , realizado por cromatografía ascendente en tiras, demostró que la totalidad de los aminoácidos aparecen en la segunda fracción, o sea la amoniacal.

De la primera muestra de 100 μ l. obtenemos un cromatograma con 15-20 manchas distintas en plasma o suero y 18-25 en orina, como se aprecia en la figura 2 (a y b). De la segunda muestra sale un cromatograma análogo a la primera, pero de gran eficacia en la interpretación y comprobación de aquél. En efecto, carece de las manchas correspondientes a péptidos, metionina, glutamina, asparragina, triptófano, cisteína-cistina, etcétera..., y aparecen en su lugar respectivo: ácido cisteico, metionina sulfona, etc., y engrosadas las manchas de los ácidos aspártico y glutámico y otros aminoácidos a causa de la hidrólisis de sus amidas o péptidos.

El análisis cualitativo completo de los mismos se hace por comparación de ambos, a la vez, con mapas de aminoácidos puros en cromatogramas bidimensionales con indicación de la posición y color de la mancha de cada uno de ellos (14).

El análisis cuantitativo sencillo se hace midiendo la cantidad de color de cada mancha (Intensidad \times Superficie) y comparando con una gama de cromatogramas patrones con aminoácidos puros en cantidades variables desde $5 \cdot 10^{-9}$ a $2 \cdot 10^{-7}$ moles cada uno (de 0,5 a 20 μ l. de disolución 0,01 molar).

Los resultados se obtienen por interpolación entre dos patrones consecutivos, deduciéndose el número de μ l. de aminoácidos 0,01 M necesarios para desarrollar idéntico color al que posee el mismo aminoácido en el líquido problema.

Aplicando la expresión:

$$\frac{V'_{\mu} \times 0,01 \text{ M}}{V_{\mu}} \times 10^3 = \text{Número de milimols/l.},$$

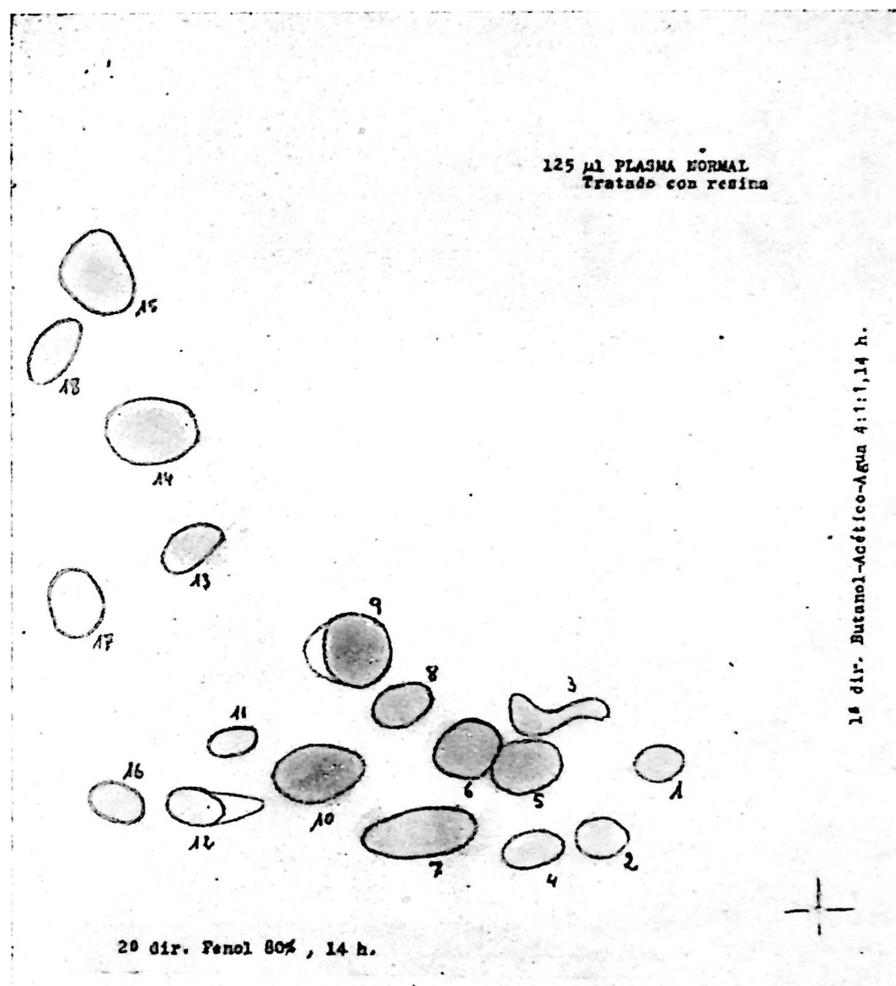


Figura 2 (a). — Véase pie figura 2 (b), página 72

donde V_{μ} es el volumen de muestra y V'_{μ} el de aminoácido 0,01 M capaz de dar la misma mancha que el líquido biológico, obtenemos la concentración de éste en milimols/litro, que multiplicada por su peso molecular se convertirá en mg/litro.

Los resultados de carácter clínico que se obtienen en sueros, plasmas y orinas normales y patológicos serán objeto de otras comunicaciones posteriores.

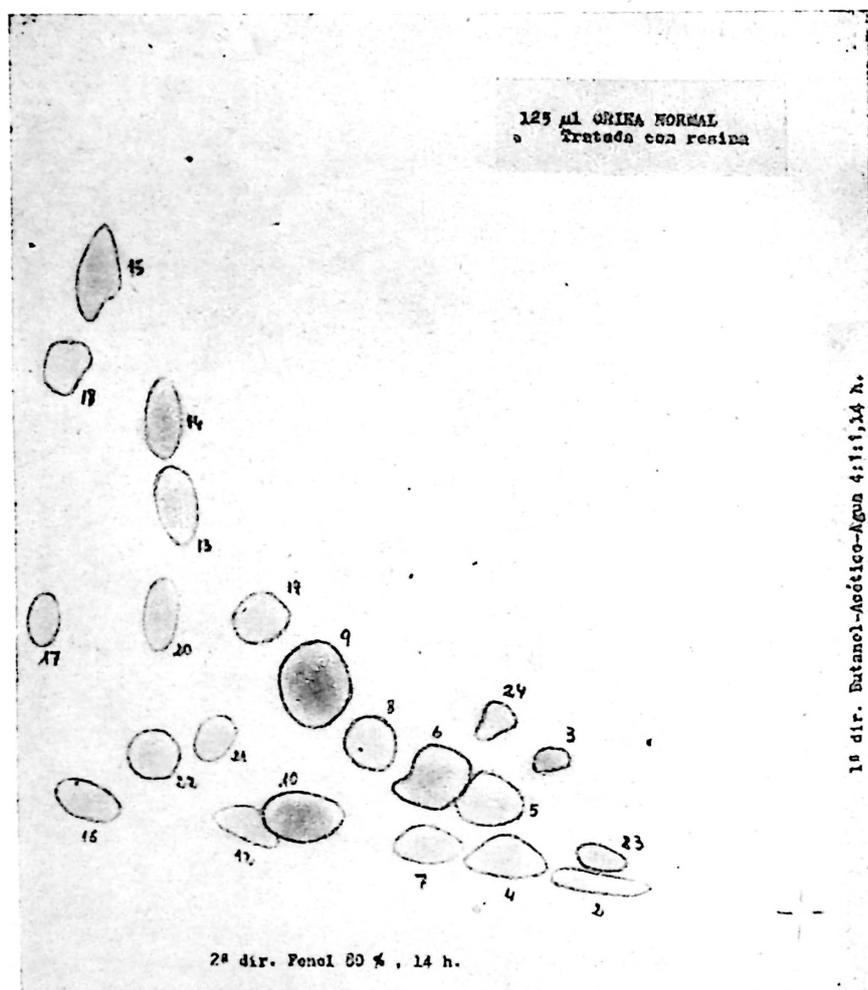


Figura 2 (b).—Cromatogramas de plasma (a) y orina (b) normales tratados previamente con resina. Aparecen respectivamente 18 y 22 manchas bien definidas, predominando en ambos la alanina y glutamina. Orden de las manchas: 1-ácido aspártico, 2-cisteína, 3-ácido glutámico, 4-ornitina, 5-serina, 6-glicocola, 7-lisina, 8-treonina, 9-alanina, 10-glutamina, 11-hidroxiprolina, 12-arginina, 13-triptófano, 14-valina, metionina, 15-leucinas, 16-histidina, 17-prolina, 18-fenilalanina, 19-tirosina, 20-ácido β -aminoisobutírico, 21-citrulina, 22-metionina sulfona, 23 y 24-substancias constantes de la orina

Resumen

Se ha puesto en marcha un micrométodo sencillo y rápido para aislar los aminoácidos de líquidos biológicos, como tratamiento previo a su estu-

dio cromatográfico sobre papel. Utilizando sólo la cantidad de 0,4 g. de resina Ion-X (de intercambio catiónico) se reduce considerablemente el tiempo de fijación de la muestra y elución con amoníaco, sin pérdidas apreciables de aminoácidos ni interferencias sensibles de otras sustancias.

Con una pequeña muestra de 200 μ l de plasma, suero u orina se realizan dos cromatogramas paralelos. El primero con los aminoácidos libres y péptidos sencillos existentes en 100 μ l del líquido biológico tratado con la resina, y el segundo con el mismo contenido, previa hidrólisis de los péptidos y amidas y oxidación de los aminoácidos azufrados.

Salen de 15 a 25 aminoácidos por cromatograma, en general, fácilmente identificables y determinables con la ayuda de mapas de manchas y cromatogramas patrón a distintas diluciones.

Summary

A simple micromethod for the isolation and determination of amino-acids in biologic fluids using ionic exchange resins and paper chromatography

A fast micromethod for isolating amino-acids in biologic fluids has been started, as a previous treatment to its paper chromatography study.

In a small column with 2 ml. capacity, 0.4 gr. of resin Ion-X (Dower 50 \times 12) are placed, reaching a height of 22 mm. over a cotton-wool plug.

After the previous alternating treatment with an acid and an alkali, it is left in acid form and is washed with water until the fluids comes out neutral. Then 200 μ l of biologic fluid are added, they are passed at a rate of 20 drops/minute and are washed with 10 ml. of water. They are eluted with 4 ml. of ammonia 2 N and are divided into two parts. The first is evaporated and diluted in order to do a bidimensional chromatogram. The second is evaporated, hydrolized with HCl 5-6 N during 5 hours, treated again with resin, oxidized with H₂O₂ and concentrated for another chromatogram.

Comparing both results the sulfur-containing amino-acids, the amides and the peptides are identified and an idea of their composition is obtained. With the help of an adequate map and standard chromatogram at different dilutions, all of the amino-acids in the problem fluid are identified and their concentrations valued.

Bibliografía

- (1) BERGERET, B., y CHATAGNER, F. : *Biochim. et Biophys. Acta* **14**, 543, 1954.
- (2) BHATTACHARYA, S. K., ROBSON, J. S., y STEWARD, C. P. : *Biochem. J.*, **60**, 696, 1955.
- (3) BLAZSEK, V. : *Orsovi Szemle*, **52**, 19.667, 1958.
- (4) BUCHANAN, A. L. : *Anal. Chem.*, **29**, 1877, 1957.
- (5) CRAMER, F. : *Paper Chromatography*, 1954.
- (6) CRAMER, F. : *Papierchromatographie*, 1952.
- (7) DENT, C. E. : *Biochem. J.* **43**, 169, 1948.
- (8) DENT, C. E., y SCHILLING, J. A. : *Biochem. J.*, **44**, 318, 1949.
- (9) GORDON, A. H. : *Agew. Chem.* **61**, 367, 1949.
- (10) GORDON, A. H., y NARDI, G. L. : *J. of Lab. and Clin. Med.* **43**, 827, 1954.
- (11) HAUGAARD, N., y HAUGAARD, E. S. : *Comptes rendus des travaux du Lab. Calberg S. Chim.*, **29**, 347, 1955.
- (12) HASSAL, C. H., y REYLE, K. : *Biochem. J.* **60**, 334, 1955.
- (13) HENRIQUES, O. B., HENRIQUES, S. B., y NEUBERGER, A. : *Biochem. J.*, **60**, 409, 1955.
- (14) MACARULLA, J. y ALVAREZ DE LA VEGA, F. : *Rev. de Med. E. G. Navarra*, **1**, 205, 1957.
- (15) MUELLER, G. C., BOWMAN, G. y HERRANEN, A. : *Anal. Chem.*, **27**, 1.357, 1955.
- (16) PARTRIDGE, S. M. : *Biochem. J.*, **42**, 238, 1948.
- (17) PIEZ, K. A., TOOPER, E. B., y FOSDICK, L. S. : *J. of Biol. Chem.*, **194**, 669, 1952.
- (18) SAMUELSON, O. : *Ion Exchangers in Analytical Chemistry*, 1952.
- (19) SAYUN, M. : *Outline of the Amino acids and Proteins*, 1944.
- (20) VALAIZE, H., y DUPONT, G. : *Industries Agric. et Alim.*, **68**, 245, 1951.
- (21) WALKER, B. S., TELLES, N. C., y PASTORE E. J. : *Arch. Neurology and Psychiatry*, **73**, 149, 1950.