

Análisis de aminoácidos en muestras biológicas impregnadas en papel de filtro por técnicas fluorimétricas.

Aplicación a la detección precoz de errores congénitos del metabolismo

POR

R. Peñafiel, F. Monserrat,
F. Solano y J. A. Lozano

PRESENTACION (Profesor Dr. D. José A. Lozano Teruel)

En el Departamento de Química Orgánica de la Facultad de Ciencias, dirigido por el catedrático de Química Orgánica y Bioquímica profesor Dr. D. Antonio Soler Martínez, siempre existió una preocupación por conectar con la sociedad ofreciéndose en cada momento las colaboraciones que fueran precisas para buscar soluciones adecuadas a los problemas planteados desde fuera de la Universidad. De este modo, todas las personas que en una u otra época hemos desarrollado nuestra actividad en el citado Departamento quedamos sensibilizadas en tales aspectos de servicios a la sociedad.

En el año 1975, a instancia de la entonces Excm. Diputación Provincial de Murcia fui requerido para prestar colaboración en el proyecto de poner en marcha un Centro dedicado a la prevención de la subnormalidad de origen metabólico-genético en recién nacidos. Teniendo en cuenta los antecedentes citados la respuesta tenía que ser afirmativa y entusiasta.

El hoy Instituto de Bioquímica Clínica es sobradamente conocido a nivel nacional e internacional por la labor que viene desarrollando en las provincias de Albacete, Alicante y Murcia, superando anualmente la cifra de 25.000 recién nacidos, sobre los cuales se analizan muestras de orina y sangre que impregnan un papel de filtro especial, realizándose sobre las mismas numerosas determinaciones encaminadas a la búsqueda de posibles deficiencias, pero sobre todo enfocadas a la detección de fenilcetonurias, galactosemias e hipotiroidismo congénitos. Son bastantes los niños



que precozmente descubiertos han sido sometidos en los últimos años a los correspondientes tratamientos, liberándose de la certeza de la subnormalidad correspondiente. Asimismo, en el Instituto de Bioquímica Clínica se efectúa un intenso trabajo en el campo de las cromosopatías y, por consiguiente, en las correspondientes orientaciones y consejos genéticos.

Para facilitar en lo posible la toma y el procesado de las muestras en los recién nacidos, sin necesidad de traslados ni procedimientos complejos y teniendo en cuenta la dificultad de la extracción de muestras de sangre suficiente en muchos neonatos, se planteó intentar realizar el análisis de aminoácidos en las muestras de sangre impregnante de papel de filtro y que se obtiene rutinariamente en tales neonatos mediante una simple punción en el talón, permitiendo el envío de las muestras por correo. En el trabajo adjunto se describe el resultado, positivo, de las investigaciones realizadas al respecto.

INTRODUCCION

Durante los últimos quince años los autoanalizadores de aminoácidos han jugado un gran papel en el campo de la detección de las enfermedades denominadas errores congénitos del metabolismo de aminoácidos, tales como fenilcetonuria, enfermedad del jarabe de arce, etc. Ello implica la estimación rutinaria de los niveles de aminoácidos en muestras biológicas tales como sangre y orina.

La detección de aminoácidos, después del paso de las muestras líquidas por una columna cromatográfica de intercambio iónico (1,2), que se ha venido realizando hasta hace poco con ninhidrina, ha sido sustituida en muchos casos por métodos de detección más sensibles basados en técnicas de fluorescencia que emplean como reactivo fluoescamina (3) y o-ftalaldehído (4,5), con lo que se ha conseguido aumentar la sensibilidad de detección al rango de nanomoles.

A pesar de estos avances, la utilización de muestras líquidas no siempre es posible en determinadas aplicaciones, tales como el «screening» de muestras de recién nacidos para la detección precoz de aminoacidopatías, ya que, por una parte, es frecuentemente difícil obtener sangre suficiente de los neonatos, y, por otra parte, aún más importante, este screening

precisa un método fácil, seguro y rápido para que las muestras lleguen lo más pronto posible al laboratorio, por lo que el método más efectivo es sin duda la recogida de las muestras en papel de filtro y el envío, por correo, de dichas muestras al laboratorio una vez impregnadas y secas.

Por tanto, y haciendo uso de la gran sensibilidad de detección del método fluorimétrico, que alcanza un rango de detección del orden de nanomoles, se ha estudiado la posibilidad de la cuantificación rápida de los aminoácidos contenidos en una muestra biológica impregnada en papel de filtro, tanto para el screening neonatal como para el seguimiento y control del tratamiento de los desórdenes metabólicos relacionados con ciertos aminoácidos.

MATERIALES Y METODOS

1) PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL.

Se utilizó un autoanализador Chromaspek Rank Hilger con un programa optimizado para la separación de aminoácidos de muestras biológicas. La duración del programa fue de 4 horas, empleándose un gradiente de pH obtenido por la combinación programada de un tampón ácido de cítrico-citrato de litio 0,1 M pH = 1,9 y otro básico de borato 0,1 M pH = 11,9. En determinados períodos a lo largo del programa se incluyó la adición de un tampón con metanol para la mejor separación de aminoácidos hidroxilados no aromáticos, y la variación de temperatura de la columna de 40° C a 60° C para una mejor resolución de los aminoácidos ramificados y aromáticos. La detección de los aminoácidos eluidos de la columna de intercambio iónico (resina MK2, Rank Hilger) se llevó a cabo por reacción del aminoácido con o-ftalaldehído (0,8 g/l) en presencia de 2-mercaptoetanol (2 g/l) y en un tampón borato 0,1 M pH = 9, y lectura en el Fluorímetro Chromaspek.

El programa incluye la adición a tiempos preestablecidos de una disolución al 0,008 % de hipoclorito sódico, con el fin de aumentar la sensibilidad de detección de los aminoácidos cistina, prolina e hidroxiprolina, que dan una baja respuesta con el o-ftalaldehído.

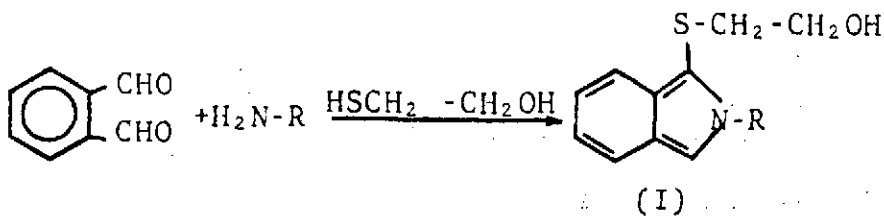
El registro de la señal fluorimétrica e integración de dicha señal se llevó a cabo mediante un integrador Hewlett-Packard, modelo 3390 A.

Como patrón de concentración se empleó una mezcla de los siguientes aminoácidos, a concentración 1,6 mg/l, obtenidos de Sigma Chemical Co. Londres: taurina, aspártico, hidroxiprolina, treonina, serina, glutámico,

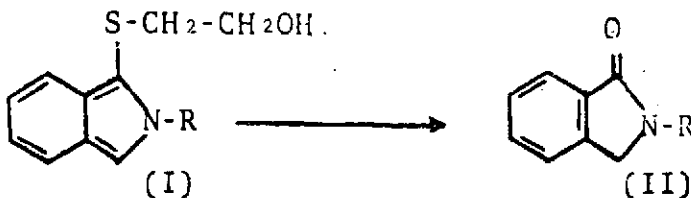
prolina, glicina, alanina, valina, cistina, metionina, isoleucina, leucina, tirosina, fenilalanina, homocistina, β -aminoisobutírico, histidina, ornitina, lisina y arginina. Nor-Leucina se usó como patrón interno. El o-ftalaldehído fue obtenido de Aldrich y otros reactivos fueron de grado analítico y suministrados por diferentes firmas.

2) REACCIÓN DE DETECCIÓN.

El o-ftalaldehído reacciona con los grupos amino de los aminoácidos en presencia de 2-mercaptoetanol y en medio básico para dar un producto fluorescente (I) con un máximo de excitación a 340 nm y una región de emisión entre 400-500 nm:



El producto fluorescente (I), 1-alkil-2-tioalquil-isoindol, sufre en medio acuoso un reajuste azufre-oxígeno dando un producto no fluorescente (II), 2,3-dihidro-1-ona isoindol.



Esta última reacción depende del radical R, es decir, del aminoácido. Glicina e histidina forman los complejos fluorescentes más inestables (6), siendo la descomposición del 40 % y 10 % respectivamente en la primera media hora después de la formación del complejo. Los restantes aminoácidos producen isoindoles de mayor estabilidad, siendo el decaimiento

inferior al 5-7 % durante los primeros 30 minutos. En todos los casos la pérdida de fluorescencia sigue una cinética de primer orden para dar la amida cíclica. En cualquier caso, los tiempos entre la formación del compuesto I y su detección en el programa utilizado, son lo suficientemente cortos para que la pérdida de fluorescencia sea despreciable.

Prolina e hidroxiprolina no reaccionan con el reactivo, mientras cistina produce un bajo rendimiento de fluorescencia, por lo que se introducen algunas modificaciones para convertir estos aminoácidos en compuestos que reaccionen con el o-ftalaldehído y el 2-mercaptoetanol. En concreto, estos aminoácidos son oxidados después de la elución de la columna con hipoclorito sódico, rompiéndose en los dos primeros casos el anillo pirrólico y dando en el tercer caso ácido cisteico, siendo todos los productos capaces de dar fluorescencia con el OPA por lo que pueden ser analizados.

Los flúidos fisiológicos pueden contener también aminoácidos no proteicos que no son α -aminoácidos, como la β -alanina, el γ -aminobutírico o el β -aminoisobutírico. Dichos aminoácidos reaccionan también con este reactivo mientras no lo hacen, o lo hacen muy débilmente, con ninhidrina, por lo cual son también susceptibles de valoración con este método.

3) PREPARACIÓN DE MUESTRAS.

a) Patrón líquido.

Para la determinación de aminoácidos en muestras líquidas, se preparó una disolución mezcla de todos los aminoácidos a una concentración de 1,6 mg/l incluido la Nor-leucina, que se usa como patrón interno, en ClH 0,025 M. Una muestra de 160 μ l se inyecta al autoanalizador, y se somete al programa de 4 horas.

Un cromatograma típico de esta disolución patrón se muestra en la figura 1. Cada aminoácido es identificado por un tiempo de elución, representado en minutos en cada uno de los picos en la figura. El orden de elución es aproximadamente desde los aminoácidos más ácidos, es decir, de pI más bajo, a los más básicos, aunque existen ciertas modificaciones como el caso de la Treonina y Serina por la aplicación al principio del gradiente de pH de un tampón con metanol al 10 % para la separación de éstos.

Por integración de los picos, el factor de respuesta (f) de cada aminoácido respecto a Nor-leucina, se puede calcular por medio de la expresión:

$$f = \frac{\text{área aminoácido problema}}{\text{área Nor-leucina}}$$

b) *Patrón en papel impregnado.*

Para la determinación de muestra impregnadas en papel de filtro, se preparó una disolución mezcla de todos los aminoácidos, excepto el patrón interno Nor-leucina, a una concentración de 80 mg/l, en ClH 0,025 M. Los papeles de filtro apropiados se impregnaron en esa disolución por inmersión y se dejaron secar. Una vez secos, se cortó un disco de 6,4 mm de diámetro (1/4 de pulgada) con un sacabocados, y se colocó en un tubo Eppendorf de 1 ml de capacidad. Se adicionaron al tubo 200 μ l de una disolución de ácido tricloroacético al 5 % y 200 μ l de otra disolución de Nor-leucina a 3,2 mg/l en ClH 0,025 M. El tubo se tapa y se agita durante un minuto en un agitator Vortex-Mixer para realizar la elución de la muestra del papel de filtro. A continuación los tubos se centrifugaron a 8.000 rpm durante 1 minuto en una centrifuga Eppendorf modelo 5412 y 160 μ l del sobrenadante se aplicaron al autoanalizador. El factor de respuesta de cada aminoácido depende del papel de filtro que se use y del porcentaje de extracción de cada uno. La figura 2 muestra un cromatograma típico de un disco de papel SS-903, que es el usado para la recogida de muestras de sangre en el screening. El cromatograma obtenido con un disco de papel Whatman 1, que es el que se usa para la recogida de muestras de orina, es totalmente análogo al anterior, aunque con un factor de respuesta menor. Las diferencias se deben a la distinta capacidad de absorción que presentan los dos tipos de papel. Por tanto, cada muestra debe compararse con el correspondiente patrón impregnado en el mismo papel en que lo está la muestra.

c) *Preparación de muestras líquidas.*

Para muestras biológicas líquidas (sangre, plasma u orina), se realiza el siguiente protocolo. A un volumen (normalmente 100 μ l) se le adicionan 4 volúmenes de ácido tricloroacético al 5 %. Se agita la mezcla y se centrifuga para sedimentar las proteínas y otros materiales insolubles que se hayan podido formar. A continuación se toma 1 volumen de sobrenadante y se le adiciona 1 volumen de ClH 0,025 M y 2 volúmenes de Nor-leucina de 3,2 mg/l. Se mezcla y se aplica al autoanalizador una muestra de 160 μ l.

Los aminoácidos se identifican por su tiempo de retención y se cuantifican con la siguiente fórmula:

$$(aa) = \frac{f'}{f} \times 20 \times 1,6 \text{ mg/l}$$

siendo f' el factor de respuesta en la mezcla problema y f el factor de respuesta en el patrón líquido. 20 y 1,6 son dos factores relacionados con la dilución de la muestra biológica problema y con la concentración del patrón, respectivamente.

d) *Preparación de muestras impregnadas en papel.*

Se corta un disco de 6,4 mm de diámetro (1/4 de pulgada) y se adicionan 200 μ l de tricloroacético al 5 % y 200 μ l de Nor-leucina de 3,2 mg/l y se procede como en el apartado b. Por último, se aplican al autoanalyzer 160 μ l de muestra.

La determinación de cada aminoácido se realiza por comparación con el patrón disco, mediante la fórmula:

$$(aa) = \frac{f'}{f} \times 80 \text{ mg/l}$$

Siendo f' y f los factores de respuesta de cada aminoácido respecto a Nor-leucina en el disco problema y en el disco patrón, respectivamente.

RESULTADOS Y DISCUSION

El tanto por ciento de extracción de los aminoácidos del papel de filtro fue establecido por comparación entre los factores de respuesta de patrones líquidos y de patrones impregnados en papel SS-903, considerando una impregnación media de 4,7 μ l por disco (7). Se aplicaron al autoanalyzer muestras patrones líquidas y muestras patrones en papel SS-903. Aunque los factores de respuesta pueden variar apreciablemente y dependen de una gran diversidad de factores, la tabla 1 muestra el valor de estos factores para cada aminoácido (primera columna) en el patrón líquido. No obstante, y para controlar esta variabilidad, dichos patrones han de ser introducidos periódicamente en el autoanalyzer durante el análisis rutinario cada 20 muestras aproximadamente y aplicar correcciones cuando sea necesario o realizar la determinación de aminoácidos en las muestras problemas referenciándolas al patrón más cercano en tiempo que se haya aplicado a la columna del autoanalyzer.

El tanto por ciento de extracción para cada aminoácido a partir del papel SS-903 viene representado en la segunda columna. Puede observarse una extracción total en los primeros aminoácidos que eluyen de la columna e incluso en algunos casos apreciablemente mayores del 100 %. La razón de este aumento es desconocida, aunque puede observarse, por un

lado, que el coeficiente de variación entre ensayos para estos aminoácidos es también mayor, y por otra parte existen casos como el del ácido aspártico referenciados en la bibliografía (8) en los cuales su concentración parece ser mayor en muestras impregnadas en papel de filtro que en muestras líquidas.

Para los aminoácidos neutros y básicos que eluyen posteriormente, se observa un porcentaje de extracción entre el 60 y el 80 %. El tratamiento del disco con disolución de un detergente como el Brij 35 al 0,2 % con el fin de mejorar el porcentaje de extracción no produjo aumento apreciable de éste.

Esta elución incompleta de los aminoácidos neutros y básicos del disco de papel puede estar causada por una absorción inespecífica de la matriz celulósica del papel para determinados grupos químicos presentes en las moléculas de los aminoácidos. Por tanto, para saturar estos centros de absorción, se intentó impregnar el papel con la misma disolución patrón de todos los aminoácidos a 80 mg/l, pero conteniendo también 5 g/l de albúmina de suero bovino, proteína que podría saturar dichos centros y bloquear la unión de los aminoácidos provocando su extracción completa. Los resultados de estos experimentos se representan en la columna tercera de la tabla 1.

Puede observarse que aunque no se consigue la extracción completa de los aminoácidos, sí aumenta significativamente el porcentaje de extracción, llegando al 90 % en algunos casos. Este aumento no puede atribuirse a posibles aminoácidos libres que presente como impurezas la albúmina de suero bovino, puesto que se comprobó que no existen en cantidades significativas en una muestra líquida de la disolución de albúmina a 5 g/l.

Efecto del tiempo de extracción de la muestra impregnada en papel.

Se realizaron una serie de experimentos en los que el disco de papel fue extraído en las condiciones descritas en métodos, pero se utilizaron distintos tiempos de extracción. Para tiempos de 1, 2, 5, 10 y 30 minutos se obtuvieron los mismos niveles de extracción. Por lo tanto, este factor no resulta crítico en cuanto al desarrollo del método.

Estabilidad de los aminoácidos impregnados en papel.

La estabilidad de los aminoácidos impregnados en papel, cuando las muestras se almacenan durante períodos variables de tiempo, es otro factor que debe ser tenido en cuenta, ya que desde que son tomadas hasta que llegan al laboratorio para su análisis, transcurre un período de tiem-

po variable, en el que las muestras están expuestas a diversas temperaturas.

Por ello se almacenaron muestras a diferentes concentraciones a temperatura ambiente durante una semana. La mayoría de los aminoácidos resultaron estables durante ese tiempo, incluyendo aquellos de mayor interés en el screening para la detección de aminoacidopatías, tales como fenilalanina (para detección de fenilcetonuria), tirosina (para detección de tirosinemia) y los ramificados leucina, isoleucina y valina (para la detección de enfermedad del Jarabe de Arce).

Algunos aminoácidos sí presentaron cambios importantes con el tiempo de almacenamiento, aunque éstos, afortunadamente, no se hayan directamente relacionados con enfermedades metabólicas congénitas importantes. Tal es el caso de los aminoácidos con grupo hidróxido treonina y serina y los aminoácidos básicos, principalmente la histidina, que es el más seriamente afectado. Su concentración puede disminuir hasta un 20 % después de una semana de almacenamiento en este tipo de muestras.

Comparación entre análisis realizados con muestras líquidas y con muestras impregnadas en papel.

La determinación de aminoácidos en muestras biológicas impregnadas en papel de filtro puede realizarse por comparación con el patrón líquido, teniendo en cuenta los porcentajes de extracción previamente determinados. Sin embargo, existe una dependencia de estos porcentajes de extracción con la presencia de proteínas en las muestras, por lo cual la alta concentración de éstas en el plasma o la sangre entera puede introducir serios errores en el cálculo. Otros factores pueden asimismo introducir desviaciones significativas en la estimación, como por ejemplo, el volumen de líquido que impregna un disco de papel y que varía según la naturaleza de la muestra biológica que se impregne y del papel que se utilice, distinto según se trate de sangre u orina.

Por ello, es más conveniente y sencillo determinar la concentración de aminoácidos por comparación de las muestras con patrones previamente impregnados en el mismo tipo de papel. De este modo se evitan todos los factores que pueden contribuir a modificar la extracción, ya que dichos factores afectan igualmente a la muestra biológica cuya concentración se quiere determinar que al patrón.

Para comprobar la exactitud de las determinaciones en estas muestras biológicas impregnadas en papel se realizó un estudio comparativo con los valores que se obtienen de analizar directamente las muestras biológicas líquidas.

Una muestra líquida de orina normal se dividió en dos partes. En una parte, líquida, se determinó la concentración de los aminoácidos por comparación con el patrón líquido. Con la otra parte de la orina se impregnó papel Whatman 1, usado para este tipo de muestras, y después del secado se procesó según el protocolo para muestras impregnadas y se determinó la concentración de aminoácidos respecto al patrón impregnado en el mismo tipo de papel.

Los resultados de esta experiencia se recogen en la tabla 2, donde se expresa la concentración calculada para cada aminoácido en muestra líquida (primera columna) y en muestras impregnadas en papel Whatman 1 utilizando uno (segunda columna) o dos discos (tercera columna). Todos los valores son el resultado de tres determinaciones y puede observarse en la mayoría de los casos una buena correlación.

La concentración de aminoácidos en orina es variable y depende de la diuresis, de tal forma que cuando ésta es alta, la concentración de aquéllos es baja. En tales casos es conveniente realizar el análisis a partir de dos discos de papel, realizando la extracción igual que se describe en métodos para un disco, y empleando como patrón dos discos de éste, procesados de igual forma. Debido a esto se obtuvieron los resultados de la tercera columna en tabla 2 que no indican la introducción de errores apreciables por la presencia de dos discos.

Un estudio análogo al realizado en orina se realizó con una muestra de sangre entera normal y del plasma obtenido a partir de ella. En ambos casos se realizaron determinaciones, bien a partir de una alícuota líquida o bien a partir de una alícuota impregnada en papel SS-903, que es el normalmente utilizado para recoger este tipo de muestras biológicas para el screening.

Los resultados, tanto en plasma como en sangre entera, se expresan en la tabla 3. Puede observarse una mayor variación respecto a la encontrada en orina, particularmente en los aminoácidos con menor tiempo de retención cromatográfica. Sin embargo, de nuevo, los aminoácidos de mayor interés desde el punto de vista de las aminoacidopatías son los sujetos a menor variación, existiendo una buena correlación entre los valores encontrados en muestras líquidas y los encontrados en muestras impregnadas en papel de filtro.

Por otra parte, existen casos como el de ornitina y ácido aspártico, que dan siempre valores superiores en muestras impregnadas que en muestras líquidas, mientras que la concentración de arginina, al contrario, es siempre menor en muestras impregnadas que en muestras líquidas. La decomposición de arginina impregnada en papel en ornitina y urea podría explicar estos hechos experimentales.

Respecto a los valores encontrados en sangre y su plasma, como es lógico, en general los encontrados en plasma, son mayores que los encontrados en sangre entera. Sin embargo, tras las correcciones calculadas en función del volumen de hematocrito, los valores calculados para sangre en función de los encontrados en plasma son menores que los obtenidos cuando se analiza directamente la sangre entera. Esta variación puede ser debida a los aminoácidos que se encuentran en el interior del eritrocito y que se liberan al medio como consecuencia de la hemólisis que ocurre cuando éstos se tratan en un medio ácido fuerte, como el tricloroacético.

En conclusión, el método ha resultado ser de validez y ha permitido la detección rápida de casos de fenilcetonuria, tirosinemia, Jarabe de Arce, cistinuria, hiperglicinemia, etc., en las muestras analizadas por el Instituto de Bioquímica Clínica procedentes del área geográfica que cubre. En la figura 3 (A, B y C) se muestran cromatogramas de muestras de neonatos con estos tipos de alteraciones, concretamente un caso de fenilcetonuria, otro de tirosinemia y otro de Jarabe de Arce.

RESUMEN

Se ha establecido un método rápido y sencillo para la cuantificación de aminoácidos en muestras biológicas impregnadas en papel de filtro, que son las habituales en el screening neonatal para la detección de aminoacidopatías. Los aminoácidos de mayor interés para este propósito son estables en este tipo de muestras y pueden ser extraídos y determinados de manera precisa. El método resulta de especial interés para laboratorios dedicados a este tipo de análisis, ya que se evitan los tiempos que se pierden en la petición de nuevas muestras líquidas y que son críticos para iniciar satisfactoriamente el tratamiento.

La determinación de ciertos aminoácidos en muestras impregnadas en papel puede sufrir variaciones respecto al análisis directo en muestras líquidas debido a diversos factores, como estabilidad en este tipo de muestras, etc. Sin embargo, mediante el cálculo de factores de corrección, para cada aminoácido en particular, pueden ser también cuantizados con precisión aceptable.

TABLA 1

FACTORES DE RESPUESTA Y PORCENTAJE DE EXTRACCION
DE LOS AMINOACIDOS DE PAPEL SS-903

Aminoácidos	A	B	C
Tau	0,905 ± 0,192	78,9 ± 15,1	82,6 ± 16,3
Asp	0,512 ± 0,096	116,6 ± 23,4	121,6 ± 22,5
HO-Pro... ..	0,123 ± 0,015	124,4 ± 16,8	114,0 ± 15,6
Tre	0,660 ± 0,060	104,3 ± 12,3	96,6 ± 9,9
Ser	0,980 ± 0,143	104,0 ± 16,4	88,5 ± 12,4
Glu	0,516 ± 0,061	107,9 ± 9,6	94,8 ± 10,7
Pro	0,293 ± 0,037	67,4 ± 5,3	64,5 ± 5,2
Gli	1,160 ± 0,124	60,0 ± 10,5	63,0 ± 9,6
Ala	1,130 ± 0,108	57,0 ± 6,6	57,9 ± 5,8
Val	0,890 ± 0,072	81,2 ± 13,6	91,7 ± 12,6
Cis	0,165 ± 0,012	77,3 ± 5,4	82,4 ± 7,2
Met	0,550 ± 0,120	66,5 ± 8,2	81,9 ± 7,8
Ile	1,074 ± 0,062	77,1 ± 4,3	84,2 ± 5,4
Leu	1,062 ± 0,052	78,3 ± 3,9	83,8 ± 4,5
Tir	0,830 ± 0,040	83,8 ± 5,7	92,2 ± 6,1
Fen	0,890 ± 0,036	79,3 ± 5,2	88,8 ± 4,8
Homocis	0,045 ± 0,003	81,2 ± 3,1	80,8 ± 3,8
Baiba	0,760 ± 0,052	76,1 ± 6,0	83,9 ± 7,6
His	1,013 ± 0,108	75,7 ± 9,8	82,5 ± 7,9
Orn	0,600 ± 0,072	75,1 ± 10,2	85,0 ± 10,9
Lis	0,686 ± 0,064	72,5 ± 6,4	81,3 ± 8,2
Arg	0,688 ± 0,089	76,4 ± 6,7	88,0 ± 8,4

A: Factores de respuesta de todos los aminoácidos respecto a Nor-leucina en patrón líquido. Todos se encuentran a concentración de 1,6 mg/l.

B: Porcentaje de extracción de cada aminoácido a partir de muestras en papel SS-903 previamente impregnado en disolución patrón de aminoácidos a 80 mg/l.

C: Porcentaje de extracción de cada aminoácido a partir de muestras en papel SS-903 previamente impregnado en disolución patrón de aminoácidos a 80 mg/l conteniendo albúmina de suero bovino a 5 g/l.

TABLA 2
CONCENTRACION DE AMINOACIDOS (mg/l) EN UNA ORINA HUMANA
ADULTA NORMAL

Aminoácidos	A	B	C
Tau	28,3 ± 4,2	30,3 ± 6,5	38,7 ± 5,7
Asp	39,1 ± 5,3	31,5 ± 6,4	32,2 ± 4,6
H ³ O-Pro... ..	39,0 ± 2,9	37,4 ± 3,6	32,6 ± 7,5
Tre	12,1 ± 1,1	14,9 ± 1,4	13,5 ± 1,9
Ser	24,5 ± 2,9	29,2 ± 3,2	34,8 ± 4,2
Glu	61,2 ± 7,5	71,7 ± 6,6	65,1 ± 8,0
Pro	24,6 ± 10,3	22,8 ± 2,9	23,6 ± 3,2
Gli	79,7 ± 10,3	98,7 ± 12,0	98,2 ± 11,2
Ala	28,3 ± 4,5	29,5 ± 3,2	33,0 ± 4,1
Ile	3,7 ± 1,3	5,6 ± 0,6	5,9 ± 0,9
Leu	8,3 ± 2,0	10,5 ± 1,3	13,6 ± 1,6
Tir	9,6 ± 1,8	11,6 ± 2,2	10,6 ± 1,5
Fen	4,5 ± 0,9	6,0 ± 1,4	6,7 ± 1,2
His	33,3 ± 5,9	27,3 ± 4,6	27,0 ± 5,3
Orn	30,6 ± 3,2	25,8 ± 3,9	30,4 ± 4,2
Lis	35,9 ± 2,5	29,4 ± 3,6	32,8 ± 4,1
Arg	7,5 ± 1,1	6,7 ± 0,6	7,6 ± 0,9

A: Calculada a partir de muestras líquidas.

B: Calculada a partir de 1 disco de muestras impregnadas en papel W-1.

C: Calculada a partir de 2 discos de muestras impregnadas en papel W-1.

TABLA 3
CONCENTRACION DE AMINOACIDOS (mg/l) EN PLASMA Y SANGRE ENTERA
HUMANA ADULTA NORMAL

Aminoácidos	A		B	
	Plasma	Sangre	Plasma	Sangre
Asp	—	13,4 ± 2,2	26,4 ± 5,4	26,4 ± 4,6
Tre	16,3 ± 2,1	13,2 ± 1,6	21,8 ± 2,8	14,2 ± 4,5
Ser	10,7 ± 1,4	10,2 ± 1,2	17,6 ± 3,2	19,0 ± 3,6
Glu	15,5 ± 2,1	16,7 ± 2,1	17,3 ± 1,8	22,5 ± 2,4
Pro	29,9 ± 2,8	18,6 ± 2,3	26,7 ± 3,5	19,3 ± 5,1
Gli	14,1 ± 1,6	12,7 ± 1,8	15,7 ± 1,3	15,0 ± 1,2
Ala	28,4 ± 3,2	20,2 ± 1,4	22,5 ± 2,9	24,8 ± 3,5
Val	21,9 ± 2,6	21,1 ± 2,6	16,3 ± 4,8	26,9 ± 7,2
Ile	8,2 ± 1,1	6,5 ± 0,8	7,1 ± 0,9	9,7 ± 1,2
Leu	12,6 ± 1,2	13,4 ± 1,2	10,1 ± 1,1	16,5 ± 2,4
Tir	11,8 ± 0,9	10,0 ± 1,3	9,8 ± 1,9	14,4 ± 3,1
Fen	7,9 ± 0,8	6,8 ± 1,2	6,2 ± 0,7	8,9 ± 1,1
His	20,6 ± 3,4	16,1 ± 4,5	23,5 ± 4,6	12,6 ± 5,2
Orn	12,3 ± 1,8	14,4 ± 2,2	19,6 ± 1,7	15,9 ± 3,6
Lis	30,1 ± 2,8	25,4 ± 3,1	27,0 ± 3,2	34,6 ± 2,9
Arg	14,3 ± 1,9	11,0 ± 2,3	10,7 ± 2,1	7,6 ± 1,9

A: Calculada a partir de muestras líquidas.

B: Calculada a partir de muestras impregnadas en papel SS-903.

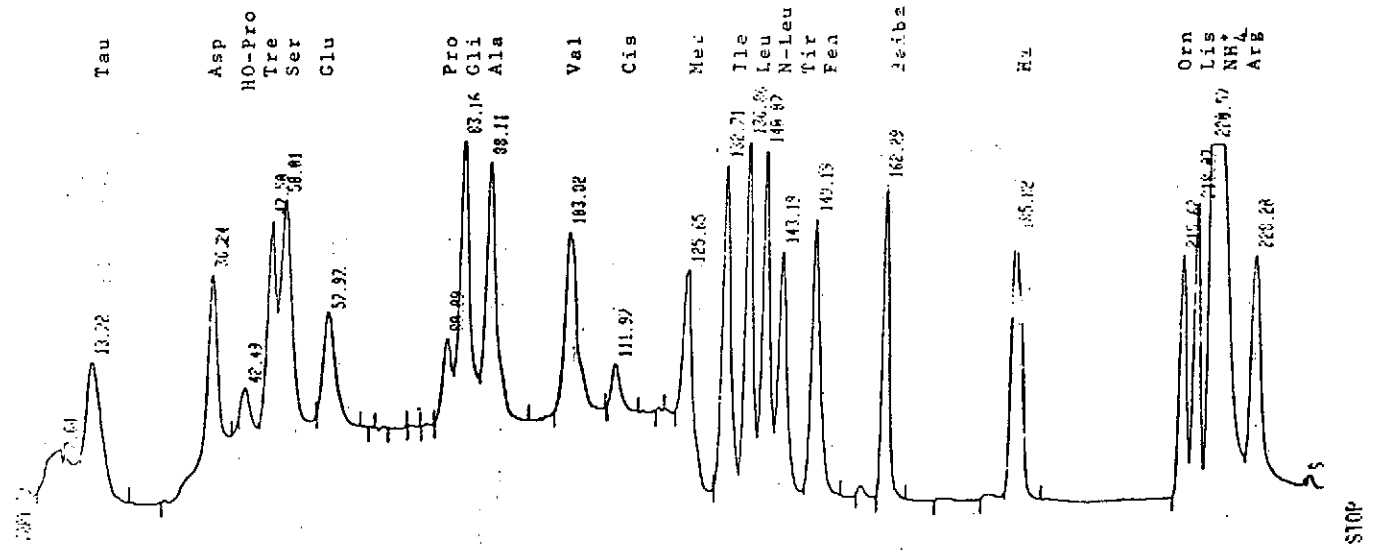


FIGURA 1.—Cromatograma obtenido a partir de una disolución patrón de aminoácidos a concentración de 1,6 mg/l. (Los tiempos de retención se expresan en minutos.)

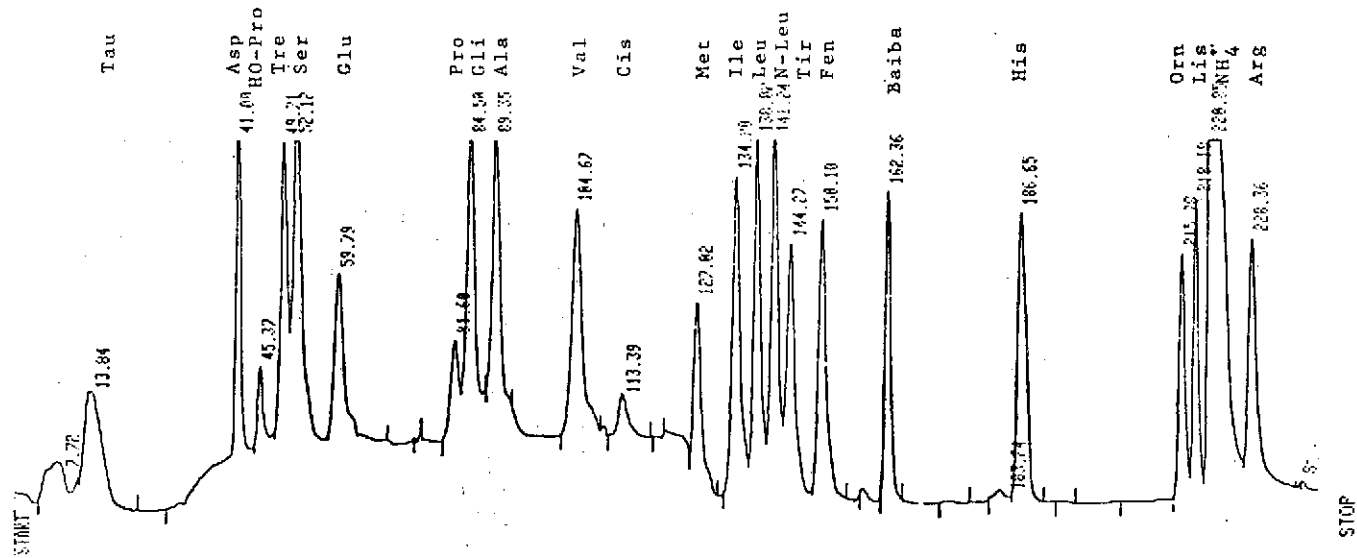


FIGURA 2.—Cromatograma obtenido a partir de un disco de papel SS-903 impregnado con disolución de aminoácidos a concentración de 80 mg/l.

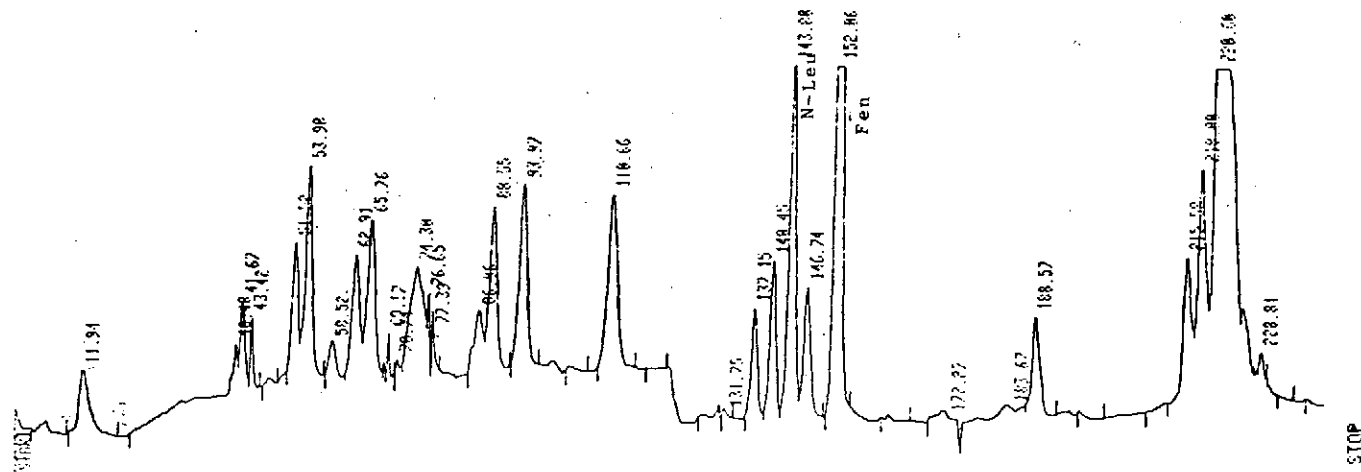


FIGURA 3A.—Cromatograma obtenido con un disco impregnado de sangre en un caso de hiperfenilalaninemia.



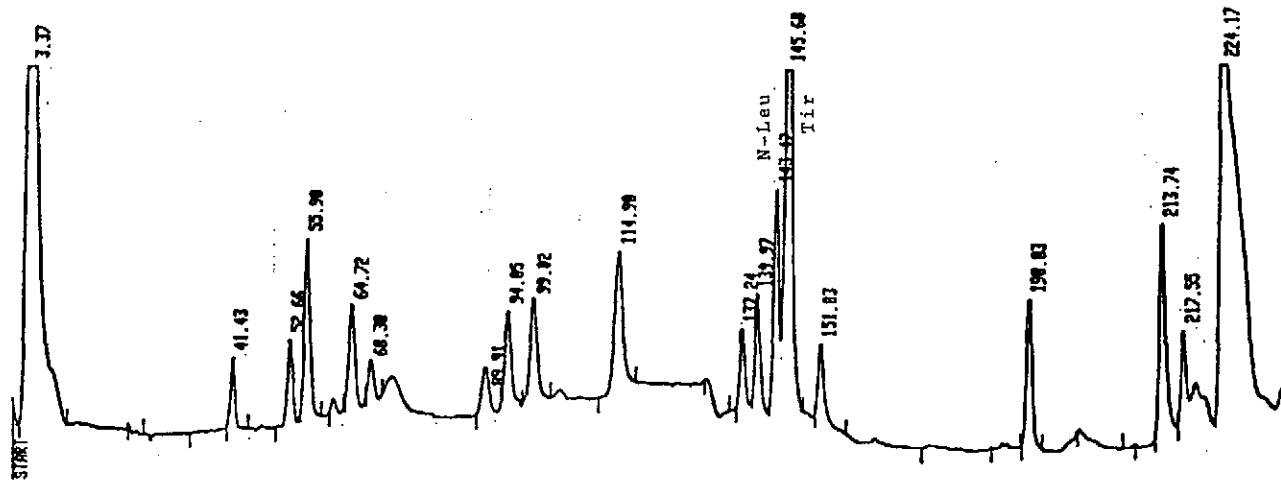


FIGURA 3B.—Cromatograma obtenido con un disco impregnado de sangre en un caso de tirosinemia.

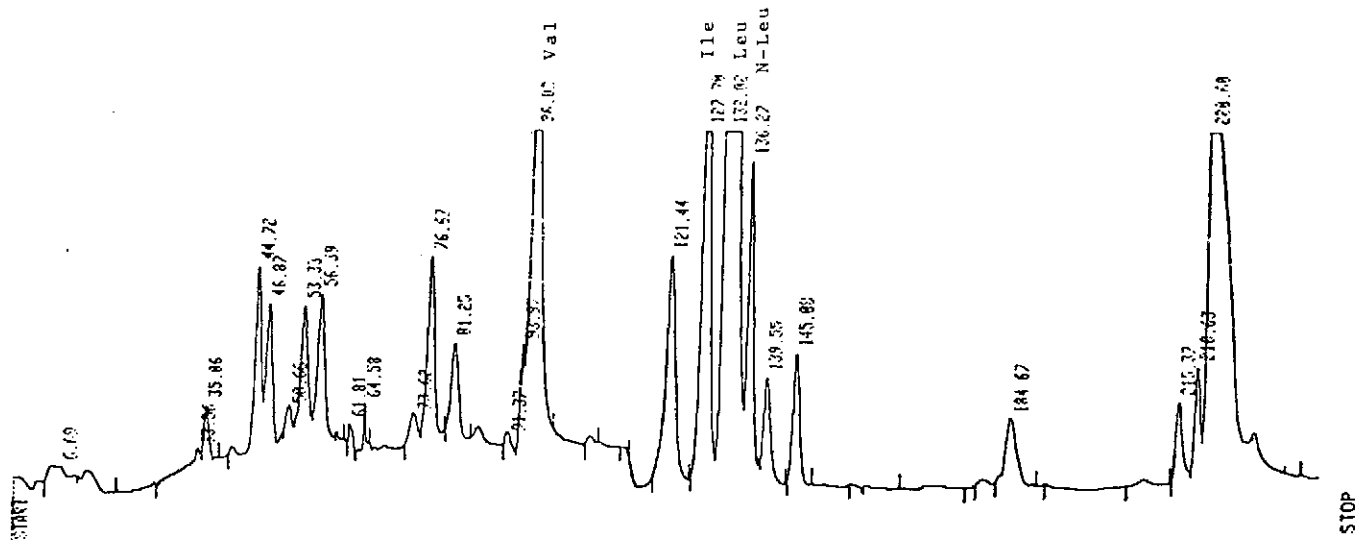


FIGURA 3C.—Cromatograma obtenido con un disco impregnado de sangre en un caso de enfermedad de Jarabe de Arce.

BIBLIOGRAFIA

1. BENSON J. V., Jr.; GORDON, M. J., y PATTERSON, J. A. (1967), *Anal. Biochem.*, 18, 228.
2. SHIH, V. E.; EFRON, M. L., y MECHANIC, G. L. (1967), *Anal. Biochem.*, 20, 299.
3. GEORGIADIS, A., y COFFEY, J. (1973), *Anal. Biochem.*, 56, 121.
4. BENSON, J. R., y HARE, P. E. (1975), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 72, 619.
5. ROTH, M., y HAMPAL, A. (1976), *J. Chromatogr.*, 83, 353.
6. SVEDAS, V. J. K.; GALAEV, I. J.; BORISOV, I. L., y BEREZIN, I. V. (1980), *Anal. Biochem.*, 101, 188.
7. PEÑAFIEL, R.; SOLANO, F., y MONTSERRAT, F. (1983), *Clin. Chim. Acta*, 127, 289.
8. ALLEN, J. C., y GREEN, A. (1980), *Abstract of 2nd. Chromaspek users meeting*, University of Leeds.

