

PROTOCOLO PARA DETERMINACIÓN DE AMINOÁCIDOS EN ORGANISMOS ACUÁTICOS

PROTOCOL FOR THE DETERMINATION OF AMINOACIDS IN AQUATIC ORGANISM

Leenin Flores¹

Anthony Ruiz

Alberto Oscanoa

RESUMEN

FLORES L, RUIZ A, OSCANO A. 2021. Protocolo para determinación de aminoácidos en organismos acuáticos. *Inf Inst Mar Perú*. 48(1): 25-29.- El análisis de aminoácidos es importante en la acuicultura para su determinación en la dieta de los peces. Se ha elaborado un método HPLC rápido y sensible para la determinación de aminoácidos en muestras de organismos acuáticos por detección con fluorescencia. El método descrito utiliza el método de derivatización pre-columna AQC. Los derivados de aminoácidos-AQC son más estables que otros reactivos comúnmente utilizados. Por esta razón, el objetivo del presente protocolo es determinar el contenido de aminoácidos en organismos acuáticos por cromatografía líquida de alta resolución.

PALABRAS CLAVE: aminoácidos, fluorescencia, cromatografía, AQC, pre-columna

ABSTRACT

FLORES L, RUIZ A, OSCANO A. 2021. Protocol for the determination of amino acids in aquatic organisms. *Inf Inst Mar Peru*. 48(1): 25-29.- In aquaculture, amino acid analysis is important for determining them in the fish's diet. We developed a rapid and sensitive HPLC method for determining amino acids in samples of aquatic organisms via fluorescence detection. The method described uses the AQC precolumn derivatization method. The amino acid-AQC derivatives are more stable than other commonly used reagents. Hence, this protocol aims to determine the amino acid content in aquatic organisms using high-performance liquid chromatography.

KEYWORDS: amino acids, fluorescence, chromatography, AQC, pre-column

1. INTRODUCCIÓN

Los laboratorios del AFIA-IMARPE desarrollan proyectos de investigación orientados al cultivo de peces de importancia para la acuicultura, como el "lenguado" (*Paralichthys adspersus*), la "chita" (*Anisotremus scapularis*) y la "cabrilla" (*Paralabrax humeralis*), elaborando técnicas con alto valor nutricional y comercial.

Entre los estudios más importantes, está la preparación de una dieta adecuada y la combinación de materia prima para nutrición equilibrada.

Considerando que los aminoácidos son biocompuestos base de diversas sustancias, incluso son esenciales en el metabolismo energético de los peces, las fuentes de proteínas deben combinarse satisfaciendo sus necesidades. La relación debe estar en equilibrio con los aminoácidos esenciales (BAKI KAYA OZTURK, KERIM, 2017).

Se han elaborado varios métodos por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) para identificar aminoácidos en alimentos para animales, miel, semillas, productos farmacéuticos y piensos. En general, incluyen la hidrólisis, seguida de una derivatización pre-columna con uno de estos reactivos: orto-ftalldialdehído (OPA), cloroformiato de 9-fluorenilmetilo (FMOC) o isotiocianato de fenilo (PITC) (JAJIC', *et al.*, 2013).

Usar el reactivo de derivatización pre-columna 6 aminoquinolil-N-hidroxisuccinimidil carbamato (AQC) implica una reacción rápida evitando interferencias de matriz, además forma derivados estables con los aminoácidos primarios o secundarios (BAKI, KAYA OZTURK, & KERIM, 2017).

Debido a que este ensayo permite obtener la concentración de aminoácidos en los organismos acuáticos, el objetivo del protocolo es describir un método para su identificación por HPLC.

¹ IMARPE Esq. Gamarra y Gral. Valle s/n, Callao, Perú. lflores@imarpe.gob.pe

2. MATERIAL Y MÉTODOS

Los materiales que se utilizan en este proceso se listan a continuación:

- HPLC Hitachi LaChrom Elite con detector de fluorescencia y programa EZChrom Elite.
- Bloque de calentamiento ThermoScientific modelo 88870006.
- Balanza semi-micro analítica Sartorius MSU225S-000-DU.
- Vortex VELP *Scientific Wizard*.
- Baño de ultrasonido Branson 2510.
- pH-metro digital.
- Micropipeta de rango variable 1-10 μL , 10-100 μL y 500-5000 μL .
- Tubos de ensayo de 13x100 mm con tapa de PTFE.
- Tubos de ensayo de 16x100 mm con tapa de PTFE.
- Sistema de filtración al vacío.
- Filtro para solventes de HPLC.
- Filtro de jeringa.
- Vial HPLC con fondo cónico.
- Kit de aminoácidos *AccQ•Fluor Waters* o equivalente.
- Acetonitrilo grado HPLC.
- Agua grado HPLC.
- Ácido Clorhídrico concentrado.
- Estándar de 17 aminoácidos código Sigma-Aldrich AAS18 o equivalente de 2,5 $\mu\text{mol/mL}$ (excepto L-Cisteína 1,25 $\mu\text{mol/mL}$), debe contener L-alanina, cloruro de amonio, L-arginina, L-ácido aspártico, L-cisteína, L-ácido glutámico, glicina, L-histidina, L-isoleucina, L-leucina, L-Lisina, L-metionina, L-fenilalanina, L-prolina, L-serina, L-treonina, L-tirosina, L-valina.

PREPARACIÓN DE REACTIVOS

Estándar de aminoácidos extendido (EAA) de 2,5 $\mu\text{mol/mL}$: pese 8,26 mg de L-asparagina (PM= 132,1179 g/mol), 8,20 mg de L-hidroxiprolina (PM= 131,13 g/mol), 9,13 mg de L-glutamina

(PM= 146,14 g/mol) y 12,76 mg de L-triptófano (PM= 204,225 g/mol) en una fiola de 25 mL. Luego añada 10 mL de HCl 0,1 M y disuelva en el baño de ultrasonido. Enrase a 25 mL con agua ultrapura.

Estándar interno (IS) concentración 2,5 $\mu\text{mol/mL}$: pese 6,44 mg de 2-L-Ácido aminobutírico (PM = 103,121 g/mol) en una fiola de 25 mL. Añada 10 mL de HCl 0,1 M y disuelva en el baño de ultrasonido. Enrase a 25 mL con agua ultrapura.

Fase móvil A: disuelva 19 g de acetato de sodio en 1 L de agua ultrapura, ajuste a pH 5,10 \pm 0,01 con ácido fosfórico 40% (requiere alrededor de 6 mL o más). Filtre antes de usar.

HIDRÓLISIS ÁCIDA

- Etiquete todos los tubos con marcador indeleble y coloque cinta adhesiva transparente alrededor de la marca para evitar que se borre durante el tratamiento del termo-baño.
- Pese 20,00 mg de muestra seca en un tubo de ensayo de 13x100 mm con tapa de PTFE. Repita esta operación 2 veces (duplicado) por cada muestra a analizar. Prepare 1 tubo sin muestra (blanco de reactivos).
- Agregue 2 mL (Ve) de una solución de HCl 6M a cada tubo, incluyendo el blanco de reactivos.
- Inyecte cuidadosamente nitrógeno gas para desplazar el aire del tubo durante 1 min, con la ayuda de una pipeta Pasteur unida al balón de nitrógeno gas. Tape el tubo inmediatamente después de la inyección.
- Homogenice los tubos de ensayo en un baño de ultrasonido por 15 minutos.
- Hidrolice las muestras en un termo-baño durante 22 h a 112 °C (Fig. 1). Transcurrido este tiempo, los tubos se retiran y se dejan enfriar hasta alcanzar la temperatura ambiente.
- Homogenice nuevamente los tubos de ensayo en un baño de ultrasonido durante 15 min.
- Centrifugue la muestra a 3000 rpm por 15 min a 20 °C.
- Separe 50 μL (Va) del hidrolizado en un tubo

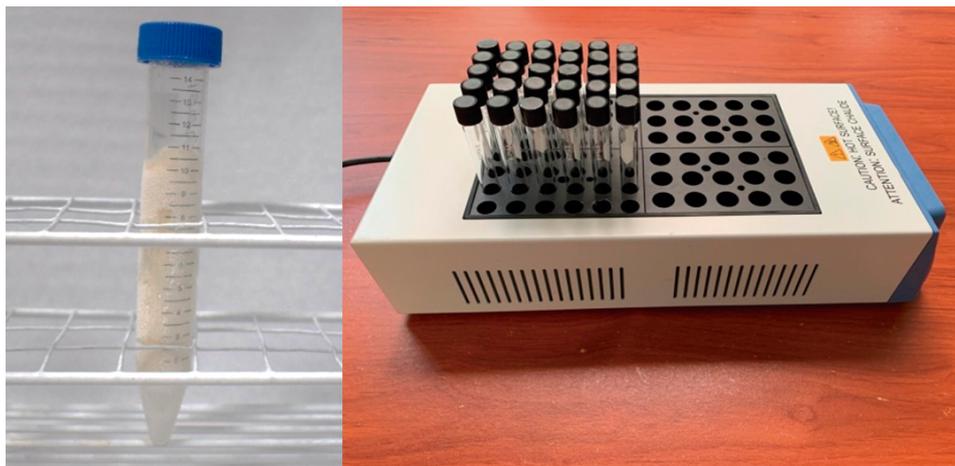


Figura 1.- Muestra y termo-baño de las muestras

de 16x100 mm con tapa de PTFE y adición de 100 μL de IS. Complete a un volumen de 5 mL (Vf) con agua ultrapura (4850 μL).

- Filtre 3 mL de la solución anterior, pase a un tubo limpio y proceda desde la sección "ensayo de aminoácidos" en paralelo con los estándares y el blanco de reactivos.

CURVA DE CALIBRACIÓN

La curva de calibración se prepara a partir de la solución estándar de aminoácidos de acuerdo a la Tabla 1.

Una vez preparado los estándares, se continúa con los procedimientos que se describen en la siguiente sección en paralelo con las muestras y el blanco de reactivos.

ENSAYO DE AMINOÁCIDOS, MÉTODO AQC-WATERS

- Golpee ligeramente el Vial 2A del Kit aminoácidos *AccQ•Fluor Waters* (Fig. 2)

contra la mesa para asegurar que el reactivo se encuentre en la base del vial.

- Enjuague una punta de micropipeta limpia descartando 1 mL del solvente del Vial 2B (Diluyente del reactivo 2A).
- Adicione 1,0 mL de la solución diluyente (Vial 2B) al Vial 2A.
- Tápelo ligeramente y homogenice en el vórtex por 10 segundos.
- Precaliente el bloque de calentamiento a 55 °C.
- Caliente el Vial 2A en la parte superior del bloque, hasta que el polvo se disuelva, no lo coloque dentro del bloque ni lo caliente más de 10 minutos. La concentración del reactivo reconstituido es aproximadamente 10 mM de AQC en acetonitrilo.

Nota. El reactivo reconstituido puede almacenarse en un desecador a temperatura ambiente hasta una semana. El reactivo reacciona con la humedad del ambiente, por ello el contenedor debe estar cerrado herméticamente cuando no esté en uso y no debe refrigerarlo por ningún motivo.

Tabla 1.- Volúmenes de los reactivos para la curva de calibración

Nivel	Volumen del estándar aminoácidos 2,5 $\mu\text{mol/mL}$ (μL)	Volumen del estándar EAA 2,5 $\mu\text{mol/mL}$ (μL)	Volumen del IS 2,5 $\mu\text{mol/mL}$ (μL)	Volumen de agua ultrapura (μL)	Concentración final de aminoácidos, excepto L-cisteína (pmol/ μL)
0	0	0	100	4900	0,0
1	10	10	100	4880	5,0
2	25	25	100	4850	12,5
3	50	50	100	4800	25,0
4	75	75	100	4750	37,5
5	100	100	100	4700	50,0



Figura 2.- Kit aminoácidos AccQ•Fluor Waters

- Dispense 10 µL de los estándares de la curva de calibración, muestra y blanco de reactivos al fondo de un vial HPLC con fondo cónico (Vial M) cada uno.

Nota. Los siguientes pasos se realizan en “serie” no en “paralelo”.

- Dispense 70 µL del AccQ•Fluor Borate Buffer (Vial 1) al vial M, homogenice en vórtex por 10 segundos.
- Dispense 20 µL del reactivo reconstituido (Vial 2A) al vial M y homogenice inmediatamente en el vórtex por 1 min.
- Caliente el vial M en un bloque a 55 °C durante 10 min.
- Coloque el vial M en el automuestreador de un HPLC (Fig. 3).

CONDICIONES DEL HPLC

- Columna Hypersil GOLD C18 de 4,6 mm x 150 mm, 5µm con guardacolumna.

- Temperatura del horno de la columna de 37 °C.
- Volumen de inyección 5 µL.
- Fases móviles: A = Fase móvil A y B = Acetonitrilo grado HPLC.
- Rampa de la fase móvil (Tabla N° 2).

Volumen gastado aproximado de fase móvil por muestra: 34,9 mL A y 3,1 mL B.

Longitud de onda de excitación (Ex) igual a 250 nm y longitud de onda de emisión (Em) igual a 395 nm.

Tabla 2.- Rampa de fase móvil

Tiempo (min)	Flujo (mL/min)	%A	%B
0	1,0	100	0
2	1,0	100	0
24	1,0	83,5	16,5
30	1,0	75,0	25
30,1	1,0	100	0
38	1,0	100	0



Figura 3.- HPLC Hitachi LaChrom Elite

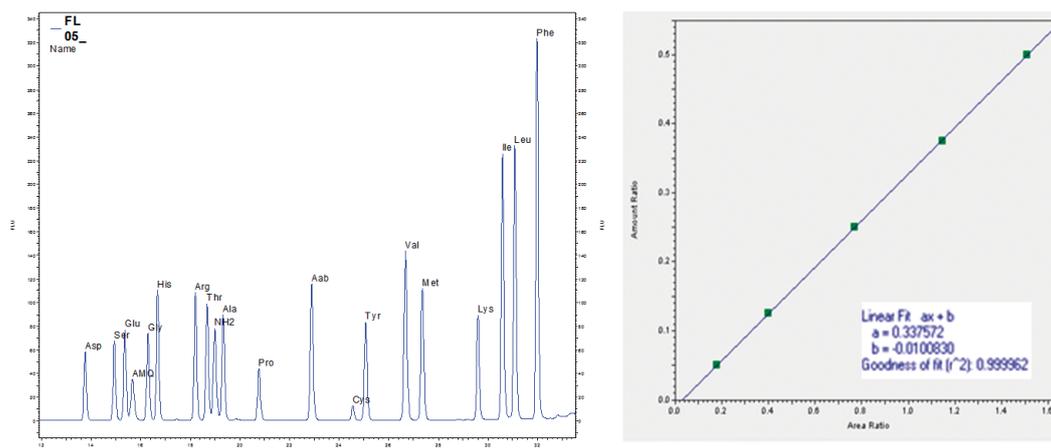


Figura 4.- Cromatograma típico del estándar de aminoácidos Sigma-Aldrich AAS18 y la curva de calibración

El cromatograma típico y la curva de calibración se muestran en la figura 4.

PROCESAMIENTO DE DATOS

La concentración de aminoácidos en mg/g, se calcula mediante la fórmula:

$$\text{mg AA}_i \text{Tg muestra} = \frac{C_{mi} * V_e * V_f * PM_i}{P_s * V_a * 1000000}$$

Dónde:

AA_i = aminoácido i

C_{mi} = Concentración del aminoácido i de la curva de calibración (pmol/μL)

PM_i = Peso molecular del aminoácido i

V_e = Volumen de extracción (mL)

V_a = Volumen de alícuota (mL)

V_f = Volumen final de dilución de la alícuota (mL)

P_s = Peso de la microalga liofilizada (g)

CONTROL DE CALIDAD

El duplicado de la muestra deberá tener una desviación estándar relativa porcentual (RSD%) menor a 4%, en caso contrario se repite la prueba.

REFERENCIAS

- BAKI B, KAYA OZTURK D, KERIM M. 2017. Determination of Essential Amino Acid Changes Related to the Growth of sea bass (*Dicentrarchus labrax*). Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences. 1425-1429. doi:10.4194/1303-2712-v17_6_36
- JAJIĆ I, KRSTOVIĆ S, GLAMOCIĆ D, JAKSIĆ S, ABRAMOVIĆ B. 2013. Validation of an HPLC method for the determination of amino acids in feed. Journal of the Serbian Chemical Society. 839-850. doi:10.2298/JSC120712144J