0568205000003

Inf. Técn. Inst. Inv. Pesq.	66	1979

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES PESQUERAS
LAB.º DE VIGO
BIBLIOTECA

Determinación de aminoácidos en productos pesqueros*

Por

J. M. GALLARDO, L. PASTORIZA y M. LÓPEZ-BENITO **

INTRODUCCIÓN

El empleo de la cromatografía en capa fina, constituye una técnica de gran utilidad para la separación y posterior identificación de aminoácidos.

Entre los principales problemas que se plantean, cuando se utiliza este método de análisis, figuran la elección del soporte, y la de los eluyentes más idóneos, para conseguir una buena separación.

JONES y HEATHCOTE (1966) describen una técnica rápida que en seis horas permite separar los aminoácidos por cromatografía en capa fina bidimensional. Ello representa un gran avance, si bien la separación de arginina y lisina no es buena, así como tampoco la del ácido glutámico y el ácido aspártico, presentes como clorhidratos, que dan lugar a dobles manchas debido a las diferentes especies iónicas.

HAWORTH y HEATHCOTE (1969) describen una nueva técnica que mejora la anterior, ya que elimina los defectos que impedían una clara separación de los aminoácidos básicos, realizando la cromatografía en atmósfera saturada de metanol, como componente polar.

La presencia de sales inorgánicas impide la separación de los aminoácidos en fluidos biológicos, siendo preciso utilizar columnas de retardo iónico para la eliminación de dichas sales.

Cuando se trata de lograr una correcta medida cuantitativa de los aminoácidos, previamente separados, es necesaria una buena reproductibilidad de los volúmenes depositados sobre la placa de celulosa, así como también la elección apropiada del método de medida. Los diferentes siste-

* Recibido el 23 de enero de 1979.
** Instituto de Investigaciones Pesqueras. Muelle de Bouzas. Vigo.

mas utilizados para la valoración se basan en los siguientes procedimientos: comparación visual, medida del área de la mancha, espectrofotometría después de la elución, y medidas densitométricas y radiológicas.

Entre los métodos más satisfactorios destacan los densitométricos, ya que tienen numerosas posibilidades de medida (transmisión, reflexión, fluorescencia y fluorescencia *quenching*) lo que permite obtener excelentes resultados.

DALLAS (1968) estudia los factores que influyen en la precisión de estos resultados y, aplicando la densitometría, establece que cuando se realizan las medidas por transmisión por cada 0,01 mm en el cambio de espesor de las placas se produce un cambio en el área de la curva de 0,18 cm^2, mientras que si las medidas son por reflexión, el área de la curva disminuye al aumentar el espesor del adsorbente.

Por último, en las medidas por transmisión, la construcción de las curvas de calibrado puede realizarse siempre y cuando se empleen cantidades pequeñas, de tal forma que exista una relación lineal entre el área de la curva y la cantidad depositada.

OBJETO DE ESTE TRABAJO

El contenido en aminoácidos libres de cualquier producto pesquero es de gran interés. En las especies marinas nos da un índice de los procesos proteolíticos que se desarrollan después de la muerte, mientras que en productos comerciales el contenido de aminoácidos libres, de enorme importancia en la alimentación, sufre deterioros durante los diferentes procesos tecnológicos, tales como la cocción y la esterilización, por lo que se hace imprescindible su medida.

La importancia e interés de contar con métodos analíticos de suficiente sensibilidad se ven incrementados por el hecho de que las Normas de Calidad, para muchos productos pesqueros manufacturados, establecen valores mínimos en contenidos de aminoácidos esenciales, tales como la lisina.

Sobre todo lo anteriormente expuesto, los objetivos del presente trabajo se establecen así:

1. Separación de los aminoácidos en productos pesqueros por cromatografía en capa fina bidimensional, estudiando los eluyentes más idóneos que permitan un buen desarrollo y aislamiento, y fijando, al mismo tiempo, las condiciones cromatográficas apropiadas para obtener una óptima resolución de los citados aminoácidos.
2. Determinación cuantitativa de los aminoácidos, previamente separados, empleando la densitometría por transmisión.
3. Estudio comparativo de los resultados densitométricos y los obtenidos con el autoanalizador de aminoácidos Technicon.

PARTE EXPERIMENTAL

Determinación de aminoácidos

Preparación de reactivos

— *Disolución de ninhidrina-colidina en etanol.* Concentración de ninhidrina 0,5 %, idem. de colidina 2 %.
— *Disolución de isatina en acetato de cadmio al 0,2 %.*
— *Disolución de acetato de cadmio.* Disolver 0,5 g de acetato de cadmio en 50 c.c. de agua, añadir 20 c.c. de ác. acético y diluir a 500 c.c. con acetona.
— *Disoluciones estándar de aminoácidos.* Se preparan disoluciones acuosas 0,02 M. de cada aminoácido.
— *Caseína.*

Eluyentes

Primera dirección

Para el desarrollo en la primera dirección se empleó 2-propanol-butanona-ClH N (60:15:25). Con este eluyente se logra una buena separación de tirosina y alanina. Se emplea ClH para evitar la aparición de las diferentes especies iónicas del glutámico y del aspártico.

Segunda dirección

El eluyente empleado en la segunda dirección fue butanol terc.-butanona-acetona-metanol-agua-amoníaco (40:20:20:1:14:5).

La adición de acetona mejora la separación de los aminoácidos básicos.

Método operatorio

Preparación de placas cromatográficas

Se mezclan 16 g de celulosa microcristalina Merck con 75 c.c. de agua destilada y 5 c.c. de etanol, se agita durante tres minutos y se lleva a cabo la extensión. Las placas se dejan secar al aire durante 24 horas antes de su uso, una vez secas tienen un espesor de 150 micras, óptimo para la separación de aminoácidos.

Columna de resina de retardo iónico

Para la eliminación de las sales procedentes de los fluidos biológicos, hemos preparado una columna de 12,5 × 1,5 cm de resina de retardo iónico Bio-Rad AG 11A8 de 50-100 mallas. La elución fue de 2 ml/minutos, con agua.

Descripción del método

Con una micropipeta de 1 o 2 microlitros, se aplican los depósitos de las muestras problema en la parte inferior de la placa y a unos 2 cm del borde, secando a continuación con aire caliente.

Una vez hecho el depósito, se introduce la placa en una cubeta que contiene el eluyente de la primera dirección, el cual se deja ascender a temperatura ambiente durante 2,5 horas, hasta que el frente del disolvente alcance unos 13 cm.

A continuación se seca la placa, primeramente con aire frío, y luego con aire caliente a unos 60° C durante 20-25 minutos, a fin de eliminar las trazas de ácido clorhídrico. Se elimina con una espátula la banda amarillenta que acompaña al frente de disolvente y se introduce la placa en la cubeta que contiene el eluyente correspondiente a la segunda dirección, en donde permanece durante 2,5 horas a 18° C de forma que el disolvente ascienda unos 13 cm.

Se retira la placa de la cubeta y se elimina el disolvente en estufa de convección a 70° C durante 25-30 minutos. Para la detección de los aminoácidos se pulveriza la placa con el reactivo policromático ninhidrina-colidina y se deja desarrollar el color en estufa a 75° C durante 15 minutos.

Para la detección de la prolina se pulveriza otra placa con la disolución isatina-acetato de cadmio y se desarrolla el color a 90° C durante 10 minutos.

La identificación de los distintos aminoácidos se efectúa por el R_F correspondiente y también por el color característico que presentan algunos aminoácidos en contacto con el reactivo.

La determinación cuantitativa se realizó con un densitómetro VITATRON TLD 100/Hg, con iluminación de lámpara de cuarzo-iodo de 12 V. y 55 W., para medidas de transmisión.

El equipo de lectura consta de un registrador y un integrador UR 402 con lectura digital de áreas.

Las condiciones del densitómetro fueron las siguientes: Mode: Log (—); Level e/2; Damping = 2; Span = 8.69; Filtro 516; Amplitud de giro = 8 mm; Velocidad eje Y = 3 cm/min.; Velocidad de integración = 60 puls./min. cm.

RESULTADOS EXPERIMENTALES

Se ha realizado un estudio sobre las condiciones cromatográficas y los eluyentes más apropiados para conseguir una adecuada separación de los aminoácidos.

Todas las experiencias se realizaron a temperatura ambiente de 17-18° C.

Como soporte se ensayaron: silicagel G, celulosa MN 300 y celulosa microcristalina Merck, habiendo dado mejores resultados esta última que fue la utilizada en nuestras experiencias.

En cuanto a los sistemas de disolventes se realizaron diversas pruebas que relacionamos a continuación:

A) Eluyente 1.ª dirección: Piridina-Acetona-NH_3-H_2O (45:30:5:20).
Eluyente 2.ª dirección: Isopropanol-Fórmico-Agua (75:12,5:12,5).

Este sistema ha dado buenos resultados, si bien no logró separar Leucina-Isoleucina ni triptófano-tirosina.

B) Eluyente 1.ª dirección: Propanol-2-Fórmico-H_2O (40:2:10).
Eluyente 2.ª dirección: Metilpropanol-2-Metiletilcetona-NH_3-H_2O (50:30:10:10).

Aunque la separación es aceptable, no se separó la tirosina-alanina, lisina-arginina y leucina-isoleucina.

C) Eluyente 1.ª dirección: 2-propanol-Butanona-ClH 1 N (60:15:25).
Eluyente 2.ª dirección: Butanol terc.-Metiletilcetona-NH_3-H_2O (50:30:10:10).

Con este sistema la separación de lisina-arginina y leucina-isoleucina no fue correcta.

Finalmente se eligió una nueva pareja de eluyentes:

D) Eluyente 1.ª dirección: Propanol 2-Butanona-ClH 1 N (60:15:25).
Eluyente 2.ª dirección: Butanol terc.-butanona-acetona-metanol-agua-NH_3 (0,88) (40:20:20:1:14:5).

Este sistema es el mejor de todos los ensayados y permite una buena separación de los aminoácidos básicos, gracias a la butanona y acetona; también la separación de leucina-isoleucina es buena.

Un aspecto importante es que después de cada uno de los desarrollos es necesario eliminar las trazas de disolventes, el ClH en el desarrollo de la 1.ª dirección y el amoníaco en la 2.ª dirección.

Este sistema es el elegido por nosotros para la separación de los aminoácidos.

En el cuadro 1 se representan los R_F correspondientes a los distintos aminoácidos, separados por la técnica bidimensional, así como también se indica el color característico originado por cada aminoácido con el reactivo ninhidrina-colidina. Con los eluyentes que hemos empleado se obtiene una

CUADRO 1

Valores de R_F correspondientes a los distintos aminoácidos separados por la técnica bidimensional y color originado con el reactivo ninhidrina-colidina

Aminoácidos	*$R_F \times 100$ 1.ª dirección*	*$R_F \times 100$ 2.ª dirección*	*Color*
Histidina	9,0	20,0	Gris/marrón
Lisina	12,0	13,0	Violeta
Arginina	14,0	5,5	Violeta
Ác. Aspártico	35,0	2,7	Verde
Treonina	38,0	56,0	Violeta
Serina	30,0	25,0	Violeta
Ác. Glutámico	43,0	2,7	Violeta
Prolina	45,0	25,0	Amarillo
Glicina	27,0	14,0	Marrón dorado
Alanina	46,0	19,0	Violeta
Valina	64,0	31,0	Violeta
Metionina	63,0	43,0	Violeta
Isoleucina	70,0	53,0	Violeta
Leucina	75,0	59,0	Violeta
Tirosina	57,0	36,0	Gris/azul
Fenilalanina	66,0	61,0	Marrón
Cistina	7,7	2,7	Gris
Triptófano	61,0	52,0	Violeta claro

CUADRO 2

Contenido en aminoácidos de hidrolizado de caseína, g/16 g N

Aminoácidos	*Densitometría presente trabajo*	*Densitometría Heathcote y Haworth*	*Autoanalizador Heathcote y Haworth*
Histidina	3,1	3,1	3,2
Lisina	8,4	7,8	8,1
Arginina	4,0	3,8	3,9
Ác. Aspártico	8,1	7,6	7,3
Treonina	5,2	5,5	6,9
Serina	6,2	6,4	6,3
Ác Glutámico	22,0	22,0	20,8
Prolina	10,3	10,1	10,5
Glicina	2,0	2,4	2,2
Alanina	3,3	3,0	3,3
Valina	6,0	6,5	6,3
Metionina	2,6	2,9	3,1
Isoleucina	5,6	5,6	5,0
Leucina	8,4	8,8	8,2
Tirosina	6,2	6,2	4,9
Fenilalanina	5,1	4,8	5,0
Cistina	0,7	0,4	1,4

CUADRO 3

Contenido en aminoácidos de concentrado de proteína de jurel obtenido por diferentes métodos, expresado en g/16 g N

Aminoácidos	*Método ácido*		*Método del alcohol isopropílico*		*Método Halifax*	
	Densitometría	*Autoanalizador*	*Densitometría*	*Autoanalizador*	*Densitometría*	*Autoanalizador*
Histidina	2,6	2,6	2,1	1,9	1,6	1,7
Lisina	7,2	7,6	8,4	8,8	9,4	9,9
Arginina	6,0	6,2	6,4	5,9	6,1	5,3
Ác Aspártico	9,2	9,1	10,0	8,8	9,0	8,9
Treonina	4,1	2,1	4,7	3,9	3,8	4,4
Serina	3,1	3,3	3,7	3,2	4,5	3,6
Ác. Glutámico	9,9	10,3	13,4	13,9	14,6	15,4
Prolina	3,0	3,1	3,2	3,2	2,9	2,9
Glicina	3,8	3,7	4,9	4,8	4,4	4,3
Alanina	3,8	3,8	5,4	4,9	5,1	5,3
Valina	3,9	5,0	5,4	5,5	5,7	5,7
Metionina	1,9	2,1	2,2	2,5	2,1	2,7
Isoleucina	4,6	4,1	4,4	4,6	4,3	4,8
Leucina	8,4	7,0	7,4	8,8	9,1	9,2
Tirosina	3,7	2,8	2,8	2,7	2,7	2,7
Fenilalanina	4,2	4,1	5,4	3,9	4,9	4,4

alta reproductibilidad de los citados R_F y una correcta identificación de los distintos aminoácidos.

Asimismo hemos utilizado la cromatografía en capa fina con hidrolizados de caseína, obteniendo unos resultados concordantes con los observados por HEATHCOTE y HAWORTH (1969) (cuadro 2).

En el cuadro 3 se resumen los resultados obtenidos con hidrolizados de

CUADRO 4

Contenido en aminoácidos libres de solubles de pescado, expresado en g/16 g N, empleando la densitometría previa eliminación de la sal

Aminoácidos	*g/16 g N*	*Aminoácidos*	*g/16 g N*
Arginina	1,3	Tirosina	trazas
Lisina	1,7	Valina	3,3
Histidina	trazas	Metionina	0,5
Glicina	1,1	Isoleucina	0,8
Ác Aspártico	1,8	Leucina	2,2
Ác. Glutámico	0,6	Fenilalanina	0,9
Alanina	0,9	Treonina	0,7
Serina	1,7		

proteína de jurel, empleando la técnica densitométrica y la de análisis automático con el analizador de aminoácidos TECHNICON, comprobándose que las diferencias de los valores obtenidos por ambos métodos son mínimas.

Finalmente, en el cuadro 4 se expresan las experiencias realizadas con muestras de solubles de pescado de alto contenido en sal, que fue eliminada antes de proceder al empleo de la técnica densitométrica.

Cuando se emplea esta técnica es preciso tener en cuenta la necesidad de extremar las precauciones de trabajo para obtener buenos resultados.

SUMMARY

DETERMINATION OF AMINO ACIDS IN FISHERY PRODUCTS. — In the present paper we describe a study about the amino acid separation in fishery products by two-dimensional thin-layer chromatography, determining the solvents and the chromatographic conditions. So it is carried out a quantitative determination of amino acids by transmission densitometry comparing the results obtained in this way with the results obtained with the Technicon automatic amino acid analyser.

The best results have been reached using «Merck» cellulose microcrystalline as adsorbent and the following solvent systems:

First dimension solvent: 2-propanol-butanone-I N hydrochloric acid (60:15:25)
Second dimension solvent: 2-methylpropanol-2-butanone-propanone-methanol-water-(0.88) ammonia (40:20:20:1:1415)

Finally, and with mackerel protein hycrolysates, we could show there are no appreciable differences between the results obtained from densitometric valuation and those obtained from the Technicon automatic amino acid analyser.

BIBLIOGRAFÍA

DALLAS, M. S. J. — 1968. Precision in the direct densitometry of coloured compounds on thin layer chromatograms. *J. Chromatog.*, 33. 337-346.

HAWORTH, C. and J. G. HEATHCOTE. — 1969. An improved technique for the analysis of amino acids and related compounds on thin layers cellulose. I. Qualitative separation. *Ibidem*, 41: 380-385.

HEATHCOTE, J. G. and C. HAWORTH. — 1969. An improved technique for the analysis of amino acids and related compounds on thin layers of cellulose. II. The quantitative determination of amino acids in protein hydrolysates. *Ibidem*, 43: 84-92.

JONES, K. and J. G. HEATHCOTE. — 1966. The rapid resolutnon of naturally ocurring amino acids by thin layer chromatography. *Ibidem*, 24: 106-111.