

## ESTUDIO SISTEMÁTICO PARA LA DETERMINACIÓN DE AMINOÁCIDOS PLASMÁTICOS

**Jaime Restrepo**  
Universidad del Valle

**Ana Julia Colmenares**  
Universidad del Valle

**Sócrates Herrera**  
Universidad del Valle

Recibido: abril 15, 2011 Aceptado: junio 29, 2011

Pág. 141-151

### Resumen

Se empleó la Cromatografía Líquida de Alta Resolución, en fase reversa, para la separación de 17 feniltiocarbamil-derivados de aminoácidos plasmáticos en 20 minutos. Este método utilizó una columna  $C_{18}$  Waters Pico Tag (300x3,9 mm, 3 $\mu$ m) a una temperatura constante de 38 °C y un gradiente multietapas simple de dos solventes. El solvente A fue una mezcla 0.150 M de acetato de sodio (pH 6.4)- acetonitrilo (96:6 v/v) y el solvente B fue agua-acetonitrilo (40:60, v/v). En la fase inicial, la programación del gradiente, la temperatura de la columna, el flujo y la composición de la fase móvil fueron optimizadas. Al final del estudio, se evaluó la influencia de la liofilización, en lugar de la aplicación de alto vacío, en el tratamiento previo de la muestra y de las soluciones estándar, lo cual condujo a una excelente resolución de los 17 aminoácidos. El método fue validado por exactitud (90% de recuperación), precisión (%RSD < 5%) y linealidad ( $r=0.996$ ). Los límites de detección y cuantificación fueron 0.46 y 1.54  $\mu$ M para la cisteína (Cys) y 1.42 y 4.57  $\mu$ M para la leucina (Leu), respectivamente. Esta técnica resulta eficaz para evaluar el verdadero valor nutricional y composición de aminoácidos en materias primas, productos alimenticios procesados y su biodisponibilidad en humanos.

**Palabras claves:** cromatografía líquida de alta resolución, aminoácidos plasmáticos, feniltiocarbamil derivados, liofilización.

### Abstract

A reversed-phase liquid chromatography (HPLC) method for the separation of 17 phenylthiocarbamyl derivatives of amino acids in human plasma in about 20 min is described. In this method, we used a  $C_{18}$ , Waters Pico Tag column (300x3.9 mm, 3  $\mu$ m) thermostated at 38 °C, and a simple multistep linear gradient of two solvents. Solvent A was 0.150 M sodium acetate (pH 6.40)-acetonitrile (96:6 v/v) and solvent B was water-acetonitrile (40:60, v/v). In the initial phase of development, the composition of the gradient, its timings, column temperature, flow rate, and mobile phase compositions were optimized. At the end of the studio, the influence of the lyophilization instead of High-Vacuum in samples pre-treatment and the standard solutions were studied, and this approach led to an excellent resolution of the 17 aminoacids. The method was validated for accuracy (90% recovery), precision (% RSD < 5%) and linearity ( $r=0.996$ ); detection and quantification limits were 0.46 and 1.54  $\mu$ M in cystein (Cys), 1.42, and 4.57  $\mu$ M in leucine

(Leu), respectively. This technique is effective to evaluate the true nutritional value and composition of amino acids in raw material, food products processed and bioavailability in human being.

**Keywords:** high-performance liquid chromatography, human plasma amino acids, phenylthiocarbamyl derivatives, lyophilization.

## 1 Introducción

Se ha encontrado que el uso de HPLC para la determinación cuantitativa de aminoácidos en fluidos biológicos es más rápido y mejor en los límites de detección que la cromatografía clásica de intercambio iónico [1, 2, 3, 4].

Desde hace algunos años el procedimiento de análisis de aminoácidos basado en la prederivatización con fenil isotiocianato (PITC) ha ido ganando popularidad. Una revisión de la literatura existente indica que en los últimos tiempos se han publicado un poco más de 100 artículos que utilizaban esta técnica [5, 6].

El complejo fenil tiocarbamil (PTC)-aminoácido que se forma durante este proceso puede detectarse con alta sensibilidad a 254 nm. después de haber hecho la separación de los derivados por cromatografía en fase reversa.

La formación de los PTC derivados obtenidos de esta manera constituyen la etapa inicial de la degradación de Edman [7] y se emplea para la determinación de secuencia de amino ácidos en péptidos y proteínas. Sin embargo, a pesar de que esta técnica fue estudiada desde hace tanto tiempo, su aplicación en la determinación cuantitativa de amino ácidos libres fue hecha por [8] quienes cuantificaron el contenido de amino ácidos libres en carboxipeptidasa y posteriormente los mismos autores estudiaron la metodología para el análisis de amino ácidos en péptidos y proteínas hidrolizados. Sarwar et al. [9], modificaron el método de derivatización precolumna con fenilsotiocianato (PITC) obteniendo cromatogramas de HPLC de 17 amino ácidos, excepto triptofano en forma precisa y rápida (12 min.) en hidrolizados de alimentos y heces. El mismo Sarwar en 1990 [10] diseñó un sistema de análisis rápido para aminoácidos libres de importancia nutricional en suero y órganos animales (hígado, cerebro y corazón).

El propósito de la presente investigación fue modificar el método de Sarwar anteriormente descrito para permitir su aplicación en el análisis de aminoácidos plasmáticos libres más importantes en la nutrición humana. Esta modificación se realizó utilizando la misma columna (Pico-Tag-Waters de 30 cm.) pero variando la temperatura de la columna, cambiando el método estándar de secado por el de liofización, y empleando diferentes condiciones de gradientes. El método de derivatización con fenilisotiocianato y el secado de la muestra en un liofilizador reportado en esta investigación puede ser usado como un método alternativo para la evaluación rápida de calidad proteínica, tanto desde el punto de vista de disponibilidad como de biodisponibilidad, puesto que la metodología existente actualmente según Hernández [11] es lenta y costosa.

## 2 Materiales y métodos

### 2.1 Reactivos y equipos

(a) Reactivos. Los reactivos y solventes empleados en esta investigación fueron grado analítico y cromatográfico respectivamente. El acetonitrilo, metanol, etanol, ácido acético glacial y ácido fosfórico fueron adquiridos en J.T. Baker Chemical Co. El acetato de sodio (anhidro), el fosfato disódico y el acetato de sodio procedían de Mallinckrodt, Inc. La Trietilamina (TEA) de Aldrich Co., en tanto que el fenilisotiocianato (PITC) y el estándar H de 17 aminoácidos se adquirieron en Pierce Co. El estándar de aminoácidos contenía por cada mL: 1.25  $\mu$ moles de cisteína (Cys) y 2,5  $\mu$ moles de arginina (Arg), histidina (His), isoleucina (Ileu), leucina (Leu), lisina (Lys), metionina (Met), fenilalanina (Phe), tirosina (Tyr), treonina (Thr), valina (Val), alanina (Ala), ácido aspártico (Asp), ácido glutámico (Glu), glicina (Gly), prolina (Pro), serina (Ser) y amoníaco, se adicionó también estándar de triptófano (Trp) en concentración de 2,5  $\mu$ moles/mL.

(b) Equipos. En la preparación de buffers y demás soluciones se utilizó agua de alta pureza generada por un sistema Milli-Q de Millipore Corp. La derivatización con fenilisotiocianato se llevó a cabo utilizando tubos de 10x75mm. Las muestras de estándares y de plasma fueron liofilizadas en un liofilizador Labconco. El sistema LC de gradiente consistía de 2 bombas Modelo 510 un automuestreador con loop de inyección de 1 a 250 microlitros, un módulo control de temperaturas (TCM) y un detector de UV Waters 486. Para la determinación de todos los aminoácidos se utilizó una columna C<sub>18</sub>, fase reversa Pico Tag Waters de 300 x 3,9 mm, I.D. 3  $\mu$ m. El sistema analítico y de cálculos se controló utilizando el software Millenium 2010 de Waters.

### 2.2 Preparación de las muestras

Se utilizaron muestras de plasma humano las cuales fueron desproteinizadas adicionando 50 mg de ácido sulfosalicílico (ASS) a 1,0 mL de plasma con posterior mezclado y centrifugación a 3.000 r.p.m. durante 20 min con el propósito de separar los aminoácidos libres de la proteína precipitada. Posteriormente se tomaron 50  $\mu$ L del sobrenadante para someterlos al proceso de resecado y derivatización.

### 2.3 Secado y derivatización

Las muestras de aminoácidos plasmáticos libres y del estándar H de aminoácidos en volumen de 50 microlitros se liofilizaron a sequedad a -40 °C durante 30 min, previa congelación para evitar sublimación completa.

### 2.4 Procedimiento

Se prepararon estándares de aminoácidos a una concentración de 2.5  $\mu$ mol/mL, los cuales fueron sometidos al proceso de derivatización de acuerdo a las siguientes etapas:

Etapa 1- Proceso de resecado: en primer lugar, se preparó la solución de resecado compuesta de EtOH:H<sub>2</sub>O:TEA en una relación 2:2:1 respectivamente. Una vez obtenida la solución de resecado se adicionaron 10  $\mu$ L de la misma a 10  $\mu$ L de la solución estándar, procediendo posteriormente a liofilizar durante 30 minutos hasta tener eliminación del solvente a sequedad completa.

Etapa 2- Preparación del reactivo derivatizante: dicho reactivo se preparó mezclando EtOH:H<sub>2</sub>O-Q:TEA:PITC en la proporción 7:1:1:1, respectivamente.

Etapa 3- Reacción de derivatización: se adicionaron 20 µL de reactivo derivatizante obtenido en la etapa 2 en cada muestra del estándar procesado en la etapa 1. Posteriormente, se liofilizó durante 30 minutos con el propósito de secar completamente el fenilisotiocianato que no reaccionó. En esta etapa las muestras de estándar quedan perfectamente derivatizadas y listas para el proceso de cromatografía.

El proceso de cromatografía se inicia con la adición de 600 µL de solución diluyente Picotag, la cual se preparó previamente. Después de agitar vigorosamente en vortex, se transfirió a viales de 1 mL y se inyectaron 50 µL de la muestra derivatizada.

## 2.5 Preparación de las fases móviles y eluentes

Eluente A: se preparó disolviendo 19,0 g de acetato de sodio trihidratado en 1.0 l de agua Milli-Q. A esta solución se le adicionaron 0,5 mL de TEA y luego la solución se tituló hasta pH de 6,4 con ácido acético glacial. La solución se filtró empleando una membrana 0,45 µm, de la solución resultante se tomaron 940 mL y se le adicionaron 60 mL de acetonitrilo.

Eluente B: se preparó mezclando 600 mL de acetonitrilo con 400 mL de agua Milli-Q, se filtró a través de una membrana de 0,45 µm y se desgasificó en un baño de ultrasonido durante 20 seg.

Diluyente de la muestra: se pesaron 710 mg de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> y se diluyeron en 1 litro de agua Milli-Q. Se llevó a un pH de 7,4 con H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> al 10% se filtró con membrana de 0,45 µm y de la solución resultante se tomaron 95 mL para mezclarlos con 5 mL de acetonitrilo.

Gradiente: el flujo de gradiente se programó de la manera indicada en la Tabla 1.

**Tabla 1** Programación del flujo de gradiente

| Tiempo (min) | Flujo (ml/min) | %A  | %B  |
|--------------|----------------|-----|-----|
| Inicial      | 1.0            | 100 | 0   |
| 10.0         | 1.0            | 5   | 46  |
| 10.5         | 1.0            | 0   | 100 |
| 11.5         | 1.0            | 0   | 100 |
| 12.0         | 1.0            | 0   | 100 |
| 12.5         | 1.0            | 100 | 0   |
| 20.0         | 1.0            | 100 | 0   |
| 20.5         | 1.0            | 100 | 0   |

## 3 Resultados y discusión

Los estándares de concentración 2,5 µmol/mL, que contienen los 18 aminoácidos, presentan una buena separación como se observa en la Figura 1. Con el propósito de estimar la linealidad del método, se tomaron por separado 1.0 µL, 2.0 µL, 3.0 µL, 4.0 µL y 5.0 µL de la solución estándar de los aminoácidos de concentración 2.5 µmol/mL y se diluyeron a 600 µL con la solución diluyente Pico-Tag, obteniendo concentraciones de 4.2 µmol/L, 8.3 µmol/L, 12.5 µmol/L, 16.7 µmol/L y 20.8 µmol/L respectivamente, para todos los aminoácidos, excepto para la cisteína que se encontraba en una concentración de 1.25 µmol/mL. Cada inyección fue hecha por duplicado.

Utilizando el programa Millenium 2010 se determinaron las curvas de calibración para los 18 aminoácidos. En las Figuras 2, 3 y 4 aparecen las curvas de calibración de 3 de los aminoácidos esenciales más representativos: lisina, metionina y fenilalanina. En la Tabla 2 podemos apreciar los tiempos de retención promedio de los 18 aminoácidos estándar, así como también los respectivos coeficientes de correlación para la curva estándar a 5 concentraciones diferentes. Se observa cómo los coeficientes de correlación presentan valores que van desde 0.9909 para isoleucina hasta 0.9994 para arginina. Teniendo en cuenta que para la cisteína el coeficiente de correlación fue de 0.9835, el más bajo de todos, tal vez por la baja concentración en la que se encuentra en los estándares. Es destacable aquí la excelente respuesta en cuanto se refiere a la linealidad como sistema analítico para caracterizar el método de HPLC empleado.

Con el propósito de evaluar la exactitud y aplicabilidad del método se trató 1.0 mL de la muestra de plasma con 10 mg de ácido sulfosalicílico (ASS) seguido de agitación con vortex y posterior centrifugación a 3000 r.p.m. durante 30 min. Se obtuvieron los aminoácidos libres en el sobrenadante, el cual se separó y filtró a través de una membrana de 0,45  $\mu$ m. Las muestras así tratadas se procesaron en igual forma que los estándares tanto en el proceso de derivatización como en el análisis cromatográfico. El cromatograma obtenido se puede observar en la Figura 5 correspondiente a los aminoácidos libres del plasma; en dicha figura podemos apreciar la excelente resolución para la mayoría de los aminoácidos y la estrecha similitud en cuanto a los tiempos de retención, los cuales aparecen comparados en la Tabla 3. Para la muestra de aminoácidos libres de plasma humano no hay buena resolución para los picos de arginina y treonina debido posiblemente a efectos de columna ya que ésta tenía cierto tiempo de uso. Sin embargo, para propósitos de investigación podemos considerar como de excelente resolución. Estos resultados muestran una mejor resolución de picos de todos los aminoácidos en contraposición a los obtenidos por Lavi et al. [12] quienes reportaron alguna dificultad en la determinación de lisina, histidina, treonina, cisteína en fluidos biológicos por derivatización pre columna con PITC y separación de los aminoácidos derivatizados por cromatografía en fase reversa.

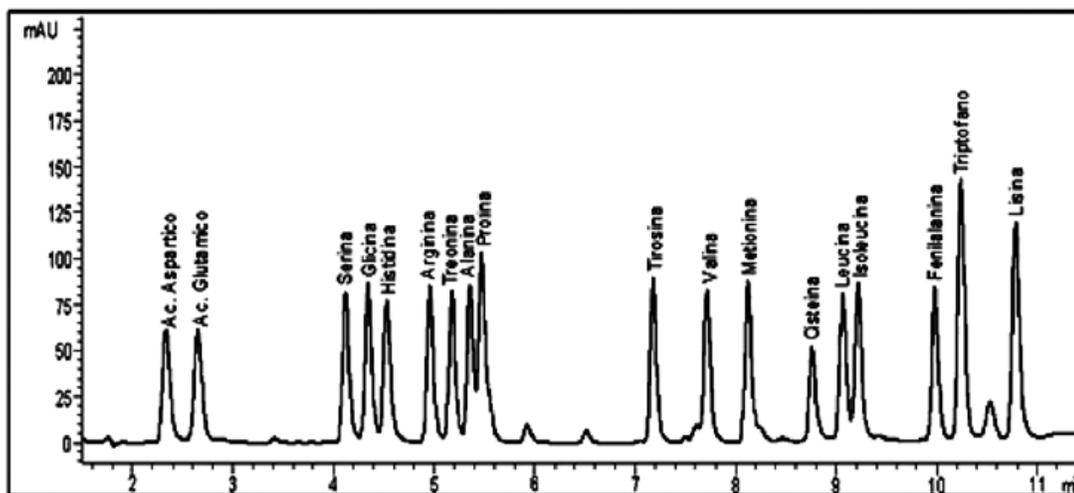


Figura 1 Cromatograma típico de un estándar de aminoácidos libres

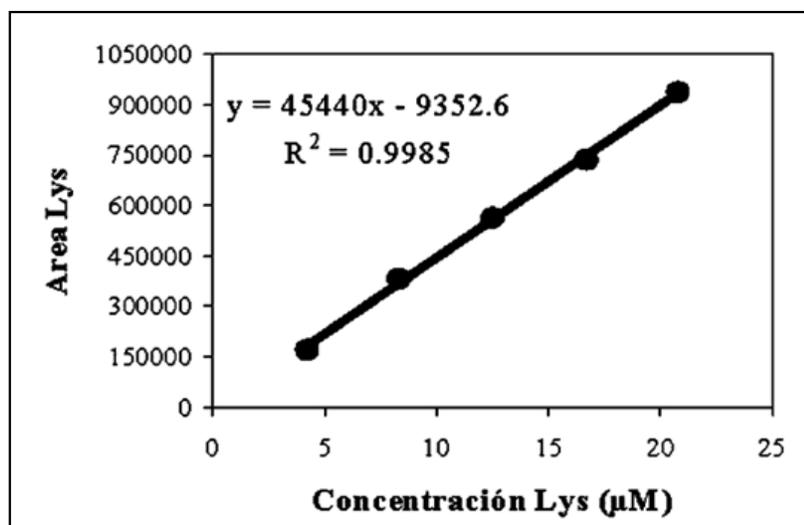


Figura 2 Curva de calibración de lisina (Lys)

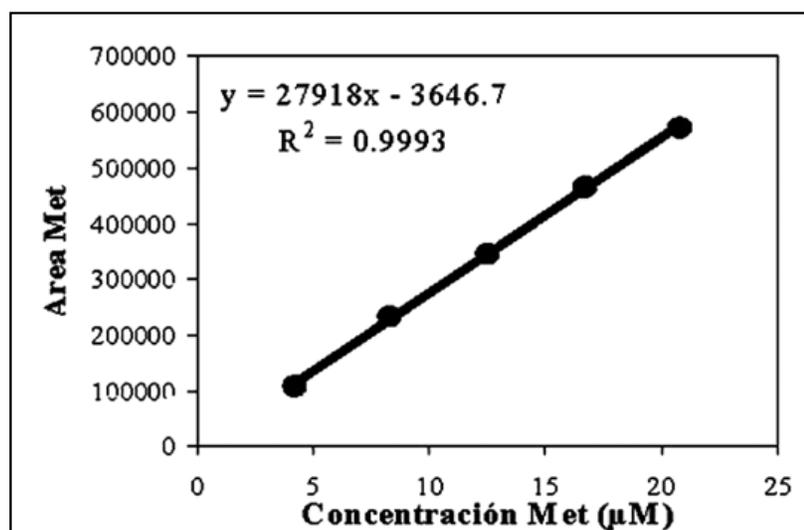


Figura 3 Curva de calibración de metionina (Met)

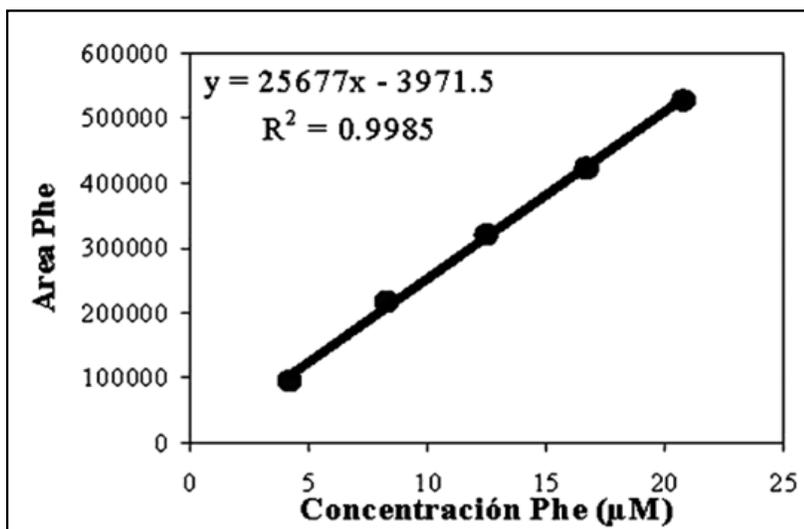
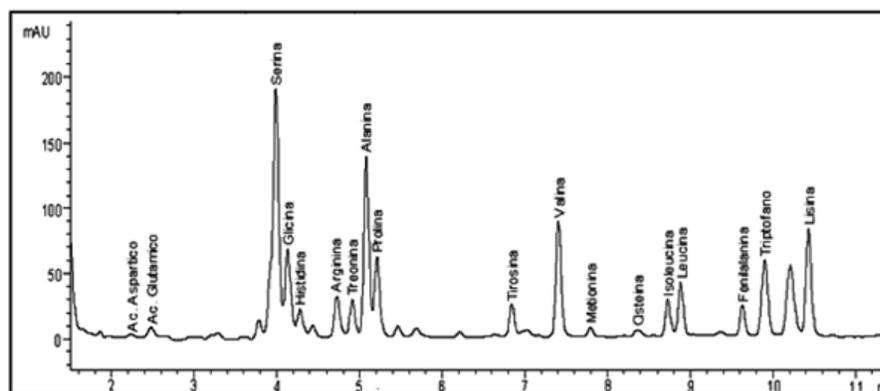


Figura 4 Curva de calibración de fenilalanina (Phe)

Por otra parte, a pesar de que algunos autores [13] sostienen que el uso de metanol y ASS como agentes desproteinizantes causan considerables pérdidas y reducen el rendimiento de muchos PTC-amino ácidos, al realizar ensayos de porcentaje de recuperación en la Tabla 4 se puede observar que se obtuvieron muy buenos resultados, con porcentajes superiores al 90% para la mayoría de los aminoácidos, excepto la glicina, demostrando de esta manera una buena exactitud de el método de extracción de los aminoácidos libres del plasma humano utilizando como agente desproteinizante el ASS, esto puede deberse también al empleo del sistema de liofilización que por las condiciones de bajas temperaturas (- 40°C) y bajas presiones (10 - 5 mbares) evitan en gran parte la pérdida de PTC-aminoácidos por reacciones colaterales y, simultáneamente, mantienen la estructura molecular intacta lo cual puede no estar sucediendo cuando se utilizan los otros sistemas de secado en la pre-derivatización. En la Figura 6 se muestra una gráfica comparativa de los porcentajes de recuperación para muestra de aminoácidos libres plasmáticos de hombres y mujeres por separado, los cuales fueron obtenidos utilizando la técnica descrita.

**Tabla 2** *Tempos de retención y coeficientes de correlación (R) en estándares de aminoácidos*

| AMINOÁCIDO | T <sub>Ret.</sub> (min.) | R      |
|------------|--------------------------|--------|
| Asp        | 3.633 ± 0.125            | 0.9994 |
| Glu        | 3.967 ± 0.250            | 0.9991 |
| Ser        | 6.888 ± 0.130            | 0.9988 |
| Gly        | 7.250 ± 0.150            | 0.9987 |
| His        | 7.600 ± 0.400            | 0.9993 |
| Arg/Thr    | 10.733 ± 1.240           | 0.9996 |
| Ala        | 11.450 ± 1.410           | 0.9992 |
| Pro        | 11.967 ± 1.315           | 0.9983 |
| Tyr        | 14.833 ± 1.150           | 0.9995 |
| Val        | 15.417 ± 0.240           | 0.9990 |
| Met        | 15.917 ± 0.320           | 0.9996 |
| Cys        | 16.683 ± 1.400           | 0.9917 |
| Ile        | 17.033 ± 0.120           | 0.9994 |
| Leu        | 17.200 ± 6.150           | 0.9982 |
| Phe        | 17.967 ± 0.180           | 0.9992 |
| Trp        | 18.200 ± 0.200           | 0.9983 |
| Lys        | 18.853 ± 0.300           | 0.9992 |



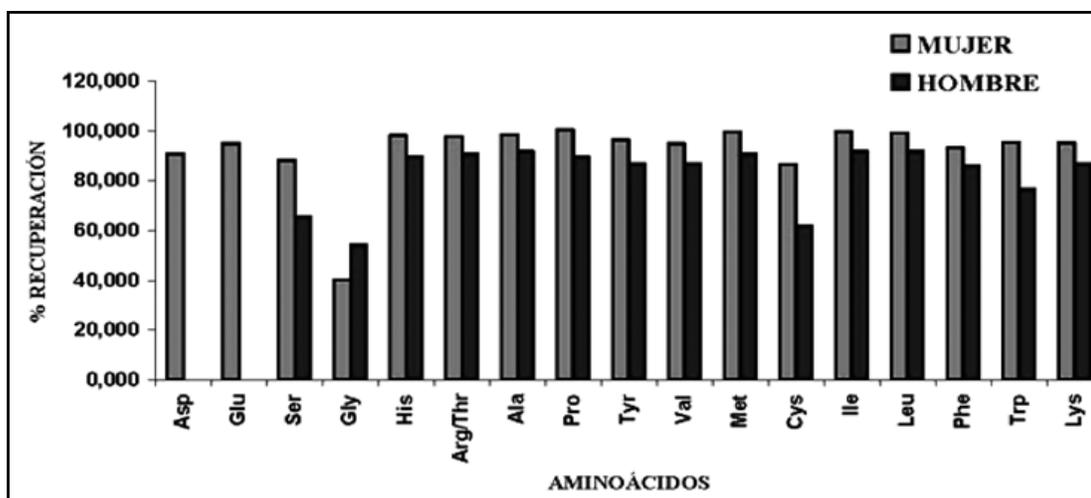
**Figura 5.** *Perfil de aminoácidos plasmáticos libres*

**Tabla 3** Comparación entre los tiempos de retención de estándares de aminoácidos y los aminoácidos plasmáticos

| AMINOÁCIDO | Estándares Muestra | Plasma Humano  |
|------------|--------------------|----------------|
| Asp        | 3.633 ± 0.125      | 3.533 ± 0.150  |
| Glu        | 3.967 ± 0.250      | 3.783 ± 0.180  |
| Ser        | 6.888 ± 0.130      | 6.350 ± 0.500  |
| Gly        | 7.250 ± 0.150      | 6.667 ± 0.600  |
| His        | 7.600 ± 0.400      | 7.000 ± 0.340  |
| Arg/Thr    | 10.733 ± 1.240     | 9.967 ± 1.420  |
| Ala        | 11.450 ± 1.410     | 10.717 ± 0.410 |
| Pro        | 11.967 ± 1.315     | 11.450 ± 6.507 |
| Tyr        | 14.833 ± 1.150     | 14.633 ± 0.200 |
| Val        | 15.417 ± 0.240     | 15.250 ± 0.340 |
| Met        | 15.917 ± 0.320     | 15.767 ± 0.608 |
| Cys        | 16.683 ± 1.400     | 16.550 ± 0.890 |
| Ile        | 17.033 ± 0.120     | 16.917 ± 0.208 |
| Leu        | 17.200 ± 6.150     | 17.083 ± 0.160 |
| Phe        | 17.967 ± 0.180     | 17.800 ± 0.310 |
| Trp        | 18.200 ± 0.200     | 18.000 ± 0.600 |
| Lys        | 18.853 ± 0.300     | 18.433 ± 0.290 |

**Tabla 4** Porcentajes de recuperación de aminoácidos para la muestra de mujeres

| A.A.    | Concentración determinada en la muestra (a.a. lib.20 µM) | Concentración Std 12.5 µM agregada (std 12µM) | Concentración determinada en la muestra + std (a.a. lib + std 12.5) | % Recuperación |
|---------|--|---|---|----------------|
| Asp     | 0.292  | 13.432  | 12.464  | 90.819         |
| Glu     | 2.094  | 13.487  | 14.802  | 94.998         |
| Ser     | 4.881  | 13.004  | 15.797  | 88.327         |
| Gly     | 12.099   | 13.282  | 10.194  | 40.163         |
| His     | 9.031  | 13.536  | 22.186  | 98.310         |
| Arg/Thr | 5.355  | 13.534  | 18.454  | 97.698         |
| Ala     | 32.079   | 14.245  | 45.590  | 98.415         |
| Pro     | 16.069   | 15.622  | 31.917  | 100.716        |
| Tyr     | 3.252  | 13.223  | 15.890  | 96.449         |
| Val     | 10.469   | 14.554  | 23.756  | 94.935         |
| Met     | 1.565  | 13.565  | 15.062  | 99.549         |
| Cys     | 3.018  | 8.572   | 10.021  | 86.459         |
| Ile     | 3.535  | 12.816  | 16.329  | 99.869         |
| Leu     | 4.931  | 11.891  | 16.706  | 99.310         |
| Phe     | 2.669  | 13.399  | 15.008  | 93.408         |
| Trp     | 2.394  | 16.080  | 17.651  | 95.546         |
| Lys     | 6.216  | 13.567  | 18.848  | 95.273         |



**Figura 6** Comparación del porcentaje de recuperación de aminoácidos libres en muestras de plasma de hombres y mujeres

En conclusión, el método de cromatografía líquida reportado en el presente estudio puede ser usado para la determinación con una muy buena linealidad de los aminoácidos más importantes desde el punto de vista nutricional, especialmente los aminoácidos esenciales (Lys., Val., Phe., Leu., Met., Thr., Trp., e Ile.). Respecto al triptofano, de acuerdo con cromatogramas publicados por Sarwar [14] y Hantharan [15] de aminoácidos plasmáticos utilizando las mismas técnicas de pre-derivatización con PITC y técnicas cromatográficas similares, se puede realizar su caracterización ubicándolo entre fenilalanina y lisina con un tiempo de retención promedio de 18.367 min; esto es importante, debido a que el triptofano es un aminoácido esencial fácilmente degradable como se ha observado en los estudios in vitro de hidrolizados proteicos, por lo cual es necesario diseñar una técnica especial. En nuestro caso, por no haber realizado hidrólisis ácida, los niveles plasmáticos de triptofano pueden ser empleados como índice de su biodisponibilidad. Estudios similares en rumen animal han sido realizados por Or-Rashid [1], y por Frank [16] con OPA y detección de fluorescencia. Un método similar al aquí reportado ha sido de mucha utilidad para la determinación de aminoácidos libres en músculo de salmón [17], y composición de aminoácidos libres en mejillones provenientes de diferentes sitios de España [18].

### Referencias bibliográficas

- [1] Or-Rashid, Mamun M., Onodera, Ryoji; Wadud Shaila and Mohammed Nazimuddin (2000). Convenient method of threonine, methionine and their related amino compounds by high-performance liquid chromatography and its application to rumen fluid. *Journal of Chromatography B*. 741 (2): 279-287
- [2] Fekkes, Durk; Voskuilen- Kooyman Ans; Jankie, Robin and Huijmans (2000). Precise analysis of primary amino acids in urine by an automated high-performance liquid chromatography method: comparison with ion-exchange chromatography. *Journal of Chromatography B*. 744 (1): 183-188

- [3] Schwarz, Elisabeth L.; Roberts, WWilliam L. and Pasquali, Marzia (2005). Analysis of plasma amino acids by HPLC with photodiode array and fluorescence detection. *Clinica Chimica Acta*, 354 83-90
- [4] Christo dos Santos, Sandra; Martimbianco de Figueiredo, Carmen; Oliveira de Andrade, Sonia María and Batista Palhares, Durval. (2007). Plasma amino acids in preterm infants fed different human milk diets from a human milk bank. *e-SPEN, The European e-Journal of Clinical Nutrition and Metabolism* 2: 51-56
- [5] Deyl, Z., Hyánek, J., and Horáková, M. (1986). Profiling of amino acids in body fluids and tissues by means of liquid chromatography. *J. Chromatography*. 379:177-250.
- [6] Sarwar G.; Botting H.G. (1993) Evaluation of liquid chromatographic analysis of nutritionally important amino acids in food and physiological samples. *J. Chromatogr.* 615(1): 1-22
- [7] Edman, P., (1950). *Acta Chemica Scandinavica*, 4: 283-293
- [8] Tarr, G. E., Koop, D. R., Morgan E. T. and Coon, M. J., (1982). Purification and characterization of a unique isozyme of cytochrome P-450 from liver microsomes of ethanol-treated rabbits. *The Journal of Biological Chemistry* 257(14): 8472-8480.
- [9] Sarwar, G., Botting, H. G. and Peace, R. W. (1988) Complete amino acid analysis in hydrolysates of foods and feces by liquid chromatography of precolumn phenylisothiocyanate derivatives. *Journal – Association of Official Chemists*. 71(6): 1172-1175
- [10] Sarwar, G., Botting, H. G. (1990) Rapid analysis of nutritionally important free amino acids in serum and organs (liver, brain, and heart) by liquid chromatography of precolumn phenylisothiocyanate derivatives. *Journal – Association of Official Chemists.*; 73 May-Jun (3):470-475.
- [11] Hernández, T., Hernández A. and Martínez C., (1996). Proteins quality: concepts and evaluation. *Alimentaria*. 274:27-37.
- [12] Lavy, L. E. and Holcenberg, J. S., Cole D.E. and Jolivet J. (1986). Sensitive analysis of asparagine and glutamine in physiological fluids and cells by precolumn derivatization with phenylisothiocyanate and reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Journal Of Chromatography*. 377: 155-163.
- [13] Early, R.J. and Ball, R.O., (1987). Amino acid analysis of physiological fluids and some applications in biological research. *Journal of Analytical Purifications* 2, pp. 47–51.

- [14] Sarwar, G. and Botting, H. G. (1990) Rapid analysis of nutritionally important free amino acids in serum and organs (liver, brain, and heart) by liquid chromatography of precolumn phenylisothiocyanate derivatives. *Journal – Association of Official Chemists*. 73(3): 470-475.
- [15] Hariharan M, Sundar N, Vannoord T (1993) Systematic approach to the development of plasma amino acid analysis by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection with precolum derivatization using phenylisothiocyanate. *Journal of Chromatography*. 621(1):15-22.
- [16] Frank, Michael P. and Powers. Robert. W. (2007) Simple and rapid quantitative high-performance liquid chromatographic analysis of plasma amino acids. *Journal of Chromatography B* 852 (1):646-649
- [17] Bugueño, G., Escriche, I., Serra, J.A. y Restrepo, J., (1999). Determinación de aminoácidos libres en músculo de salmón (*Salmo salar*) fresco por cromatografía líquida de alta resolución. Derivatización con PITC. *Alimentaria*. 299: 77-80
- [18] Fuentes, A., Fernández-Segovia, I., Escriche, I., Serra, J.A. (2009). Comparison of physico-chemical parameters and composition of mussels (*Mytilus galloprovincialis* Lmk.) from different Spanish origins *Food Chemistry*. 112(2): 295-302

#### **Dirección de los autores**

Jaime Restrepo

Departamento de Química, Universidad del Valle, Cali - Colombia  
jarestre@univalle.edu.co

Ana Julia Colmenares

Departamento de Química, Universidad del Valle, Cali - Colombia  
Ana.colmenares@correounivalle.edu.co

Sócrates Herrera

Instituto de Inmunología, Universidad del Valle, Cali - Colombia  
sherrera@inmuno.org