www.medigraphic.org.mx

Rev Biomed 1999; 10:17-22.

Determinación de L-canavanina por cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa y por colorimetría.

Artículo Original

Concepción M. Capetillo-Leal, Raúl R. Reyes-Ramírez, Carlos A. Sandoval-Castro.

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Autónoma de Yucatán. Mérida, Yucatán, México.

RESUMEN.

Introducción. Para estudiar la toxicidad y el efecto metabólico de la canavanina en animales o plantas se depende de la disponibilidad de métodos sensibles, específicos y rápidos de análisis.

Materiales y Métodos. Se desarrolló un método para medir la concentración de L-canavanina por cromatografía líquida en fase reversa utilizando DABS-Cl como agente de derivación y se compararon los resultados con aquellos obtenidos por colorimetría por el método de Rosenthal. Cinco muestras de canavalia fueron utilizadas para validar la técnica.

Resultados y discusión. La derivación con DABS-Cl permitió la determinación de éste aminoácido sin interferencia con otros aminoácidos. No se encontraron diferencias entre la concentraciones de L-canavanina en granos de *Canavalia ensiformis* cuando se midió por estos 2 métodos. El análisis colorimétrico puede ser empleado como una herramienta confiable de primer elección. Debido al alto costo que involucra el análisis por HPLC deberá ser empleado cuando exista evidencia de interferencia en el método colorimétrico de compuestos y/o metabolitos presentes en la muestra. ***(Rev Biomed 1999; 10:17-22)***

Palabras clave: L-canavanina, cromatrografía, espectrofotometría

SUMMARY.

Measurement of L-canavanine by reverse phase high performance liquid chromatography and by an spectrofotometric method.

Introduction. In order to study toxicity and metabolic effects of canavanine in animals or plants a quick, sensitivy and specific method is required.

Material and methods. A reverse phase high performance liquid chromatography (HPLC), using DABS-Cl as derivatizing agent, was developed and the results compared with those obtained by

Solicitud de sobretiros: Carlos A. Sandoval-Castro, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Autónoma de Yucatán. Apdo. 4-116 Itzimná, Mérida, Yucatán, 97100 México.

Recibido el 9/Febrero/98. Aceptado para publicación el 25/Mayo/1998.

Este artículo esta disponible en http://www.uady.mx/~biomedic/rb991013.html

colorimetry using the Rosenthal method. Five canavalia samples were used to validate the method. **Results and discusion.** Canavanine determination by HPLC was free from interference with other aminoacids. No significant diferences were found on canavanine concentration in *Canavalia ensiformis* grains as determined by both methods. It was concluded that colorimetric methods may be a first choice option for a rapid screening process. Due to the high cost involved in the HPLC technique, this method should be left for cases when there is interference with metabolites sample is known to exist using the colorimetric technique. ***(Rev Biomed 1999; 10:17-22)***

Key words: L-canavanine, liquid chromatography, colorimetry.

INTRODUCCIÓN.

La canavanina (ácido 2-amino-4-(guanidinooxy) butanoico) es el principal aminoácido libre presente en el grano de canavalia *(Canavalia ensiformis*) y algunas otras leguminosas (1). Es un aminoácido no proteico análogo a la arginina. Sus propiedades tóxicas se deben a esta similaridad estructural, ya que interfiere con el metabolismo de la arginina, inhibe la síntesis de proteínas, bloquea las síntesis de RNA y DNA, afecta el sistema inmune y es un potente antimetabolito que resulta tóxico a diferentes tipos de organismos (2).

A pesar del efecto tóxico de la canavanina contenida en la canavalia, este frijol es una fuente potencial de proteína y energía para los animales (3), por lo que se ha intentado eliminar o reducir la cantidad de este componente por medio de tratamientos tanto físicos como químicos, a niveles que permitan su inclusión en dietas comerciales.

Cualquier intento de estudiar la eficacia de los tratamientos para detoxificación y el efecto metabólico de la canavanina en animales o plantas depende de la disponibilidad de métodos sensibles, específicos y rápidos de análisis, de ahí la importancia de esta determinación.

El método mas común de análisis de la canavanina está basado en la formación de un compuesto cromóforo por reacción con pentacianoaminoferrato y su posterior detección por espectofotometría (1). Este método ha sido criticado por carecer de una especificidad absoluta y un umbral elevado de sensibilidad (4). Como alternativa a los métodos colorimétricos, se ha recurrido a técnicas mas precisas y costosas, como la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) buscando aumentar la confiabilidad en la determinación de la canavanina .

Los métodos por HPLC para la determinación de aminoácidos y compuestos aminados se han vuelto de uso rutinario en los laboratorios de nutrición animal y con esto algunos métodos para la determinación de canavanina han sido desarrollados, utilizando derivatización pre-columna con reactivos como Cloruro de Dansilo (4) y OPA (o-ftaldialdehído) (5, 6), realizando la separación de los compuestos en una columna de fase reversa para su posterior detección fluorimétrica. Estas metodologías además de requerir de equipos con detectores específicos para fluorometría, no representan la única opción para el análisis de aminoácidos.

El (Dimetilamino)azobenzenosulfonil-Cloruro (DABS-Cl), es un reactivo de uso común para la determinación de aminoácidos sobre el cual existe extensa bibliografía. La reacción produce compuestos que pueden ser detectados en el espectro visible por un detector estándar UV/VIS (7).

Sin embargo a pesar de ser una método comúnmente empleado para compuestos aminados, no se encuentran en la literatura reportes sobre el uso de derivatización pre-columna utilizando DABS-Cl para la determinación de canavanina. Igualmente no existe comparaciones directas entre determinaciones por HPLC y colorimetría que demuestren la superioridad de cualquiera de éstas técnicas.

El objetivo del presente trabajo fue desarrollar un método para la determinación de canavanina por HPLC utilizando como agente derivatizante al DABS-Cl y comparar los resultados con los obtenidos de manera simultanea por el método calorimétrico descrito por Rosenthal (1).

MATERIALES Y MÉTODOS.

Cinco muestras diferentes de canavalia fueron tomadas para realizar este estudio. Cuatro de ellas provenientes de procesos de ensilaje y una del grano crudo. Todas las muestras se corrieron por cuatriplicado.

Preparación de la muestra.

Extracción. El método de extracción fue realizado de acuerdo al descrito por Oropeza y col. (4).

Se pesó 1 g de muestra molida finamente y se le agregó 10 mL de agua destilada, se agitó durante 10 min al cabo de los cuales se centrifugó por 10 min a 2000 *g*. El sobrenadante fue extraído con un volumen igual de cloroformo y centrifugado por 10 min a 2000 *g*. La extracción con cloroformo fue repetida 2 veces más recuperando la fase acuosa en todos los casos. El extracto obtenido fue utilizado en cada ocasión para la determinación de canavanina por ambos métodos, realizando los análisis de manera simultanea.

Análisis por HPLC.

Instrumentación. El equipo consistió en un cromatógrafo de líquidos Beckman Modelo System Gold con dos bombas para formación de gradiente y detector UV/VIS Modelo 166 con lámpara de halógeno, filtros de segundo orden y software para programación y captura de los datos. Las lecturas se hicieron a 436nm. La columna utilizada fue Ultrasphere ODS 4.6 mm x 25 cm, Beckman.

Reactivos.

a) Acetonitrilo (grado HPLC)
b) Agua (grado HPLC)
c) Acetato de sodio 25 mM pH 6.5 con 4% de Dimetilformamida.
d) Bicarbonato de sodio 500 mM pH 8.1
e) Buffer de fosfatos 50 mM /etanol (1:1) pH 7
f) Dabs-Cl (Sigma St. Louis) 4 nmol/µL
g) L-Norleucina (Sigma St. Louis) 2.5 nmol/µL
h) L-Canavanina base libre (Sigma St. Louis) 2.5 nmol/µL
i) Etanol absoluto

Procedimiento. Una alicuota de 200 µl de cada extracto de canavalia y 500 µL de Norleucina se colocaron en viales de 10 mL perfectamente limpios y secos, se llevó a estufa a 50ºC hasta sequedad y después se les agregó 400 µL de bicarbonato de sodio 500 mM pH 8.1 y 400 µL de DABS-Cl 4 nmol/µL. Se colocó en estufa a 70ºC por 30 min, posteriormente se aforó el volumen a 5 mL con buffer de fosfatos/etanol 1:1 pH 7.0. De esta solución 20 µL fueron inyectados al cromatógrafo. Para la cuantificación de la canavanina se utilizó el método del estándar interno (norleucina), integrando los picos de acuerdo a sus áreas. Las lecturas se hicieron a 436 nm. Las condiciones cromatográficas fueron las descritas en el cuadro 1.

Cuadro 1
Gradiente utilizado para la separación de L-Canavanina por HPLC.

Tiempo (minutos)	Flujo	%A*	%B†
0	1.5	80	20
23		75	25
24		68	32
33	1.0	68	32
37		60	40
46		40	60
54		25	75
60			

* Acetato de Sodio 25 mM pH 6.5, con 4% de Dimetilformamida, † Acetonitrilo.

Análisis colorimétrico.

Reactivos.

a) Buffer de fosfatos pH 7.0
b) Persulfato de Amonio al 1%
c) Pentacianoaminoferrato (PCAF) al 1%
d) Canavanina 10 ìmol/ml

Procedimiento. Se utilizó 1 mL del extracto y 4 mL de agua destilada, añadiéndole 5 mL de buffer, 1 mL de persulfato y 0.5 mL de pentacianoaminoferrato. La curva de calibración se construyó de acuerdo al cuadro 2. Se dejó reposar por 60 min y se leyó en un espectofotómetro Beckman DU650 con detector UV/VIS a 550 nm.

Análisis de los resultados. Para comparar los resultados obtenidos por medio de ambos métodos se empleó regresión lineal considerando ambas variables (*x* e *y*) como fuente de error utilizando el enfoque de varianza constante sugerido por MacTaggart y Farwell (8).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

El cuadro 3 muestra los resultados promedios obtenidos para las 5 muestras analizadas y las desviaciones estándar correspondientes a cada uno de los métodos utilizados.

Existe cierta controversia para la cuantificación de L-canavanina mediante análisis colorimétrico, dado el argumento de baja especificidad y sensibilidad, sin embargo en este estudio, no se encontraron diferencias significativas entre este tipo de análisis y el de separación cromatográfica utilizando cloruro de dabsilo como reactivo derivatizante y detección UV/Vis.

El análisis de regresión no mostró diferencias significativas ($p<0.05$) entre ambos métodos dado que el intervalo de confianza (95%) para la pendiente incluyó la unidad. Una de las ventajas del análisis de regresión empleado es que genera constantes que son invariantes al cambiar ejes (simétricas sobre la unidad) y permite evitar el sesgo que crea el utilizar regresión lineal clásica donde el error es asociado sobre el eje y. La relación entre las determinaciones por ambos métodos fue descrita por la ecuación:

$$y = 0.0396 + 0.956x$$

(Intervalo de confianza 0.782 - 1.168)

Cuadro 2
Datos para la elaboración de la curva de calibración utilizada para el análisis colorimétrico de canavanina.

STD (mL)	H^2O (mL)	Buffer (mL)	Persulfato (mL)	PCAF (mL)	Conc. (mL)
0	5	5	1	0.5	0
1	4	5	1	0.5	2
2	3	5	1	0.5	4
3	2	5	1	0.5	6
4	1	5	1	0.5	8
5	0	5	1	0.5	10

Cuadro 3
Concentración de canavanina (g Kg^{-1} ± DE) en 5 muestras diferentes de canavalia medido por 2 métodos de laboratorio.

	TIPO DE ANÁLISIS			
	HPLC		COLORIMETRICO	
Muestra	Promedio	DE	Promedio	DE
1	13.0	2.10	13.70	3.50
2	0.90	0.20	1.30	1.20
3	17.20	4.30	17.50	2.70
4	12.00	1.20	11.70	1.60
5	1.59	0.17	1.42	0.09

donde:
y = resultado por HPLC
x = resultado por colorimetría

Ambos métodos presentaron una sensibilidad similar para el rango de valores aquí medido (0.9-17.0 g Kg^{-1}). La crítica sobre la falta de especificidad el método de Rosenthal (1) no es apoyada por los resultados del presente experimento, dado que los resultados obtenidos fueron similares a aquellos derivados de un método altamente especifico (HPLC).

No existían reportes previos acerca de la dabsylacion de L-canavanina y su detección UV/VIS en HPLC. El método aquí descrito esta basado en el mismo principio de determinación de aminoácidos utilizando como reactivo de derivación al cloruro de dabsilo, que tiene absorbancia en la región visible del espectro (436 nM) y produce derivados altamente estables.

El gradiente utilizado en el método aseguró que todos los aminoácidos contenidos en la muestra fueron eluídos y que no existió traslape de picos entre la L-canavanina y otros aminoácidos libres que pudieran existir en el extracto.

En la figura 1 se muestra el cromatograma obtenido de la inyección de L-canavanina (base libre), que fue utilizada como estándar para la cuantificación de las muestras. En ella puede observarse la presencia de dos picos, uno a los 25.41 y otro a los 55.41 min, ambos pertenecientes a L-canavanina y que pueden explicarse como producto del proceso que siguió la muestra previo a la separación cromatográfica. La presencia de estas dos bandas fue consistente y varió proporcionalmente sobre el rango de concentraciones de canavanina utilizadas en las pruebas de pre-calibración (datos no reportados). La figura 2 muestra el cromatograma resultante de la inyección de una muestra de canavalia. Para hacer la cuantificación se ensayó sobre el uso de una o dos bandas con resultados similares, sin embargo se decidió que se integrarán ambas bandas para obtener los resultados de canavanina presentados.

Aún cuando el método HPLC aquí descrito

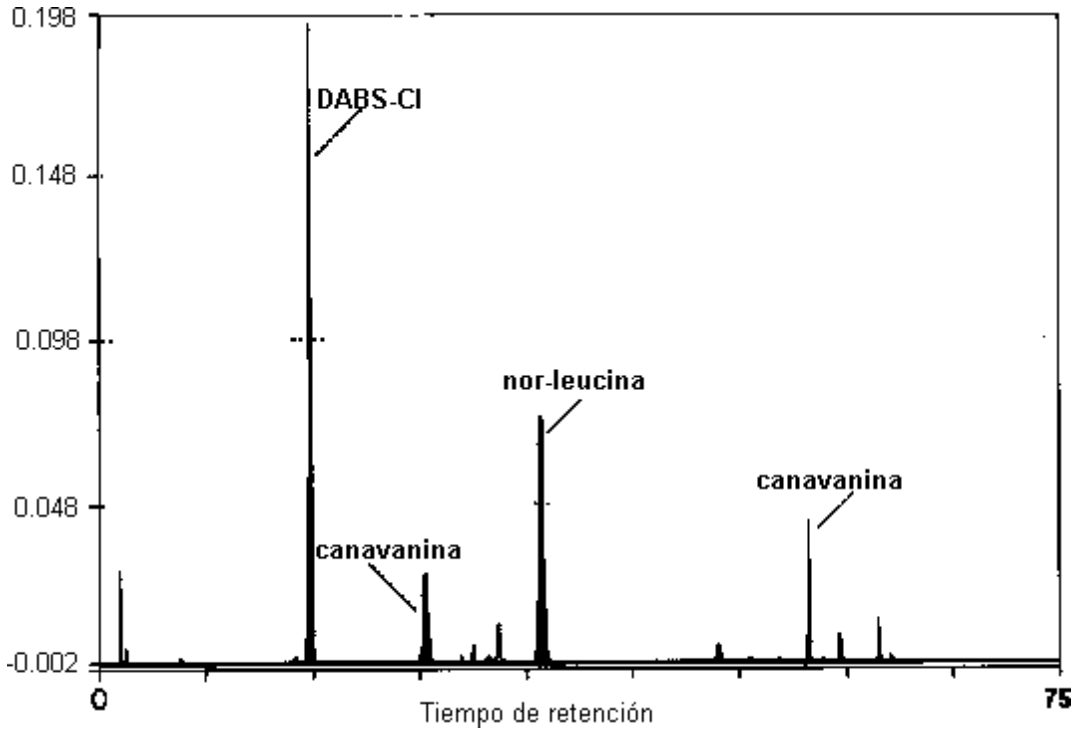

Figura 1.- Cromatograma del estándar de canavanina.

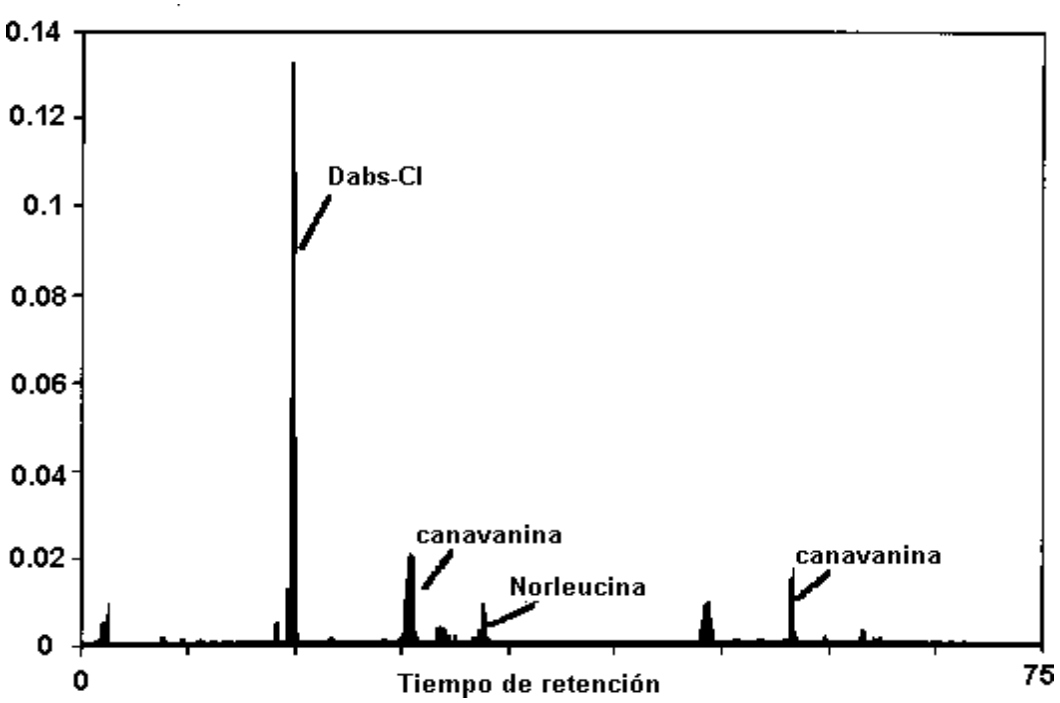

Figura 2.- Cromatograma de una muestra de canavalia.

resultó en una buena separación de la canavanina, este análisis al ser comparado con el método colorimétrico resulta más laborioso, implica mayores tiempos de análisis y costo de reactivos y equipo empleados. Si consideramos que, de acuerdo a los resultados obtenidos no existen diferencias significativas entre ambos métodos, el análisis colorimétrico de canavanina brinda una buena alternativa rápida para la cuantificación de L-canavanina en etapas iniciales de valoración de procesos físicos, químicos y fisiológicos que involucren este aminoácido. El análisis por HPLC deberá ser utilizado cuando exista evidencia probada sobre problemas de específidad por interferencia de algún compuesto y/o metabolito.

REFERENCIAS.

1.- Rosenthal GA. Preparation and colorimetric analysis of L-canavanina. Anal Biochem 1977; 77:147-51.

2.- Van Balgooy JNA. Separation of canavanine by high performance liquid chromatography. Experientia 1987; 43:1034-37.

3.- D'Mello JPF, Acamovic T, Walker AG. Nutritive value of jack beans (Canavalia ensiformis (L.) DC) for young chicks. Trop. Agric. (Trinidad) 1985; 62:145-50.

4.- Oropeza C, Alpizar L, Loyola-Vargas VM, Quiroz J, Scorer K. Determination of L-canavanine and L-canaline in plant tissues by high performance liquid chromatography. J Chromatography. 1988; 456:405-409.

5.- Weissberger LT, Armstrong MK. Canavanine analysis of Alfalfa extracts by high performance liquid chromatography using pre-column derivatization. J Chromatographic Sci. 1984; 22:438-440.

6.- Acamovic T; D'Mello F. HPLC analysis of Canavanine and Canaline in Canavalia Ensiformins, and in Excreta and Serum Chicks. J Sci Food Agric 1990; 50:63-70.

7.- Knecht R, Chang J. Liquid chromatographic determination of amino acids after gas-phase hydrolysisi and derivatization with (Dimethylamino)azobenensulfonyl Chloride. Anal Chem 1986; 58:2375-9.

8.- MacTaggart DC. Farwell SO. Analytical use of linear regression. Part II: Statical Error in Both Variables. J AOAC Int 1992; 75:608-14.