

UNIVERSITAT DE VALENCIA  
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS  
DEPARTAMENTO DE QUIMICA ANALITICA

ESTUDIO Y APLICACIONES ANALITICAS DE LAS  
REACCIONES DE LA CISTINA, CISTEINA Y  
N-ACETIL-L-CISTEINA CON EL O-FALDEHIDO



MEMORIA que para optar al grado  
de Doctor en Ciencias Químicas,  
presenta la Licenciada

MARIA JOSE MEDINA HERNANDEZ

Valencia, Diciembre de 1988.

UMI Number: U603124

All rights reserved

INFORMATION TO ALL USERS

The quality of this reproduction is dependent upon the quality of the copy submitted.

In the unlikely event that the author did not send a complete manuscript and there are missing pages, these will be noted. Also, if material had to be removed, a note will indicate the deletion.



UMI U603124

Published by ProQuest LLC 2014. Copyright in the Dissertation held by the Author.  
Microform Edition © ProQuest LLC.

All rights reserved. This work is protected against  
unauthorized copying under Title 17, United States Code.



ProQuest LLC  
789 East Eisenhower Parkway  
P.O. Box 1346  
Ann Arbor, MI 48106-1346

Ri. 18681591

310  
R. 4957

A Salva

A mis padres

y hermana



Una Tesis Doctoral es el fruto de un trabajo conjunto y un esfuerzo común, son muchas las personas que han colaborado no sólo en que esta Tesis haya llegado a su fin, sino que también han contribuido a que ésta haya sido una tarea agradable. A todos vosotros quiero daros las gracias.

A la profesora Dña. María Celia García Alvarez-Coque por la dirección, supervisión del trabajo experimental y colaboración en la redacción de esta Memoria y en especial por crear un ambiente cordial de ayuda y confianza.

Al profesor D. Carlos Mongay Fernández por sus orientaciones y acertados consejos para la consecución de este trabajo y por la supervisión de esta Memoria; así como por su afabilidad.

A la profesora Dña. Rosa María Villanueva Camañas por su amistad, su incondicional colaboración y la ilusión puesta en que esta Tesis sea una realidad.

Al profesor D. Guillermo Ramis Ramos por su confianza y apoyo, así como al equipo del Laboratorio 3.

A los miembros del Departamento de Química Analítica y en especial a mis compañeros del Tercer Ciclo por su ánimo y alegre compañía que han hecho más grata la a veces dura tarea de investigar.

Especialmente a mi marido Salvador Sagrado no solo por su ánimo y comprensión sino también por sus consejos prácticos así como por su contribución a esta Tesis.

A mis padres por el estímulo y aliento que siempre me han prestado y a mi hermana, por la eficaz aportación en la parte Bioquímica.

A D. Luis Medina Castro y D. Salvador Sagrado Soler por su colaboración en la confección, montaje y retoque de las figuras y el cariño que han puesto en este Trabajo.

A mi amigo Antonio Sanchez por su colaboración en la utilización del programa de cálculo del método de optimización simplex.

A mis amigos y en especial a Jose y Gemma por su apoyo a lo largo de estos años de trabajo.

Quiero agradecer por último, a la Generalitat Valenciana la concesión de una beca de investigación para la realización de esta Tesis.



UNIVERSITAT DE VALÈNCIA

FACULTAD DE QUIMICAS

Departamento de Química Analítica

Doctor Moliner, 50

Teléfono (96) 363 00 11

BURJASOT (VALENCIA)

D. FRANCISCO BOSCH REIG, Catedrático y Director del Departamento de Química Analítica de la Universidad de Valencia,

CERTIFICA: Que la Licenciada en Ciencias Químicas Dña. MARIA JOSE MEDINA HERNANDEZ ha realizado el trabajo de investigación titulado "Estudio y aplicaciones analíticas de las reacciones de la cistina, cisteína y N-acetil-L-cisteína con el o-ftaldehído", conducente a la obtención del Grado de Doctor en Ciencias Químicas, y que ha sido dirigido por los profesores D.Carlos Mongay Fernandez y Dña María Celia Garcia Alvarez-Coque.

Y para que conste a los efectos oportunos, firmo la presente en Valencia a quince de Diciembre de mil novecientos ochenta y ocho.



UNIVERSITAT DE VALÈNCIA

FACULTAD DE QUIMICAS

Departamento de Química Analítica

Doctor Moliner, 50

Teléfono (96) 363 00 11

BURJASOT (VALENCIA)

CARLOS MONGAY FERNANDEZ, Catedrático , MARIA CELIA GARCIA ALVAREZ-COQUE, Profesora Titular, adscritos al Departamento de Química Analítica de la Universidad de Valencia.

CERTIFICAN: Que la presente Memoria "Estudio y aplicaciones analíticas de las reacciones de la cistina, cisteína y N-acetil-L-cisteína con el o-ftaldehido" constituye la Tesis Doctoral de Dña. MARIA JOSE MEDINA HERNANDEZ.

Asimismo certifican haber dirigido y supervisado tanto los diferentes aspectos del trabajo como la redacción de la presente Memoria.

Y para que así conste, firman la presente en Valencia a quince de Diciembre de mil novecientos ochenta y ocho.

*Carlos Mongay*  
*Fernandez*

*Ma. Celia Garcia*



**INDICE**

Pag.

I.- INTRODUCCION.....	1
I.1.- DERIVATIZACION DE AMINOACIDOS CON O-FTALDEHIDO.....	3
I.1.1.- Aspectos generales .....	3
I.1.2.- Mecanismo de formación de los isoindoles.....	6
I.1.3.- Estabilidad de los isoindoles.....	11
I.1.4.- Mecanismo de degradación.....	15
I.1.5.- Cinética de formación y descomposición.....	25
I.2.- FACTORES ESTRUCTURALES QUE AFECTAN A LA ESTABILIDAD DE LOS ISOINDOLES.....	31
I.2.1.- Efecto de la estructura de la amina sobre la estabilidad.....	31
I.2.2.- Efecto de la estructura del tiol sobre la estabilidad.....	37
I.2.3.- Utilización de sustitutos de o-ftaldehido.....	42
I.3.- DETERMINACION DE LISINA, AMINAS SECUNDARIAS, CISTINA Y CISTEINA CON O-FTALDEHIDO.....	46
I.3.1.- Determinación de lisina y aminos secundarios....	46
I.3.2.- Determinación de cistina y cisteína.....	48
I.4.- DETECCION ESPECTROFOTOMETRICA DE LOS ISOINDOLES.....	58
II.- OBJETIVOS.....	61

	Pag.
III.- PARTE EXPERIMENTAL.....	67
III.1.- REACTIVOS Y APARATOS.....	69
III.2.- ESTUDIOS SOBRE LA FORMACION DE UN PRODUCTO FLUORESCENTES POR REACCION DE LA CISTEINA CON O-FTALDEHIDO.....	72
III.2.1.- INTRODUCCION.....	74
III.2.2.- ESPECTROS DE EXCITACION Y EMISION.....	74
III.2.3.- OPTIMIZACION DE LAS CONDICIONES EXPERIMENTALES.....	77
1.- Efecto de la temperatura sobre la formación del derivado.....	77
2.- Influencia de la acidez del medio.....	80
3.- Influencia de la concentración de o-ftaldehido.....	82
III.2.4.- DETERMINACION DE LA ESTEQUIOMETRIA DEL PRODUCTO DE REACCION DE LA CISTEINA CON O-FTALDEHIDO.....	84
III.2.5.- PARAMETROS ANALITICOS SIGNIFICATIVOS.....	89
1.- Curva de calibrado.....	89
2.- Repetitividad.....	91
III.2.6.- REACCION DE LA CISTINA CON O-FTALDEHIDO.....	92
III.2.7.- REACTIVIDAD DE OTROS AMINOACIDOS CON O-FTALDEHIDO.....	95
1.- Ausencia de tiol.....	95
2.- Presencia de cisteína.....	97
III.3.- DETERMINACION DE CISTINA CON O-FTALDEHIDO.....	102
III.3.1.- INTRODUCCION.....	104
III.3.2.- REACCION DE LA CISTINA CON O-FTALDEHIDO Y MERCAPTOETANOL.....	105

III.3.3.- REACCION DE LA CISTINA CON O-FTALDEHIDO EN AUSENCIA DE MERCAPTOETANOL.....	110
1.- Espectros de absorción.....	110
2.- Optimizacion de las condiciones experimentales.....	114
a) Estabilidad del compuesto formado en medio bórico-borato.....	114
b) Influencia de la concentración de o-ftaldehido.....	116
c) Influencia del pH.....	118
d) Efecto de la adición de ácido.....	120
3.- Parámetros analíticos significativos....	124
a) Curvas de calibrado.....	125
b) Límites de detección y determinación..	130
c) Repetitividad.....	132
4.- Estudio de interferencias.....	133
5.- Análisis de cistina en un preparado farmacéutico.....	140
6.- Estructura del producto de reacción....	142
a) Reacción de la cisteína con o-ftaldehido.....	142
b) Determinación de la estequiometría...	146
c) Carácter ácido-base del producto de reacción.....	148
d) Discusión.....	159
III.4.- UTILIZACION DE N-ACETIL-L-CISTEINA EN LA DETERMINACION DE AMINOACIDOS CON O-FTALDEHIDO...	161
III.4.1.- INTRODUCCION.....	163
III.4.2.- OPTIMIZACION DE LAS CONDICIONES EXPERIMENTALES.....	164
1.- Espectro de absorción y estabilidad de los isoindoles derivados de N-acetil-L-cisteína.....	164
2.- Influencia del pH.....	166
3.- Influencia de la concentración de o-ftaldehido.....	168
4.- Influencia de la concentración de N-acetil-L-cisteína.....	171
III.4.3.- ABSORTIVIDADES MOLARES DE LOS DERIVADOS DE LOS AMINOACIDOS CON O-FTALDEHIDO Y N-ACETIL-L-CISTEINA.....	173

	Pag.
III.4.4.- ESTUDIO CINETICO DE LA FORMACION Y DEGRADACION DE LOS ISOINDOLES.....	177
1.- Introducción.....	177
2.- Método de Guggenheim.....	178
3.- Formación de los isoindoles.....	181
4.- Degradación de los isoindoles.....	190
5.- Factores estructurales que afectan a la estabilidad de los isoindoles.....	192
III.4.5.- INFLUENCIA DE LA CONCENTRACION DE O-FTALDEHIDO Y TIOL SOBRE LA FORMACION Y ESTABILIDAD DE LOS ISOINDOLES.....	198
III.5.- DETERMINACION DE CISTINA CON O-FTALDEHIDO Y N-ACETIL-L-CISTEINA.....	207
III.5.1.- OPTIMIZACION DE LAS CONDICIONES EXPERIMENTALES.....	209
1.- Espectros de absorción.....	209
2.- Influencia del pH.....	213
3.- Influencia de la concentración del reactivo o-ftaldehido-N-acetil-L- cisteína.....	215
III.5.2.- ESTRUCTURA DEL PRODUCTO DE REACCION.....	219
1.- Determinación de la estequiometría.....	219
2.- Acidificación del producto de reacción.....	221
3.- Fluorescencia del producto de reacción.....	225
III.5.3- PARAMETROS ANALITICOS SIGNIFICATIVOS.....	228
1.- Curva de calibrado.....	228
2.- Límites de detección y determinación..	230
3.- Repetitividad.....	231
4.- Discusión.....	232
III.6.- DETERMINACION DE PROTEINAS CON O-FTALDEHIDO Y N-ACETIL-L-CISTEINA.....	233
III.6.1.- INTRODUCCION.....	235
1.- Análisis de péptidos y proteínas intactas.....	235
2.- Análisis de péptidos y proteínas hidrolizadas.....	237

III.6.2.- UTILIZACION DEL REACTIVO O-FTALDEHIDO-N-ACETIL-L-CISTEINA.....	238
1.- Procedimiento de hidrólisis.....	239
2.- Recuperación de algunos aminoácidos sometidos al tratamiento de hidrólisis..	240
3.- Cálculo del peso molecular promedio y factores de corrección.....	242
III.6.3.- APLICACION DEL METODO.....	245
1.- Análisis de mezclas de aminoácidos.....	245
2.- Determinación de N-amínico en suero y orina.....	247
3.- Análisis de proteínas.....	255
a) Sensibilidad y recuperación.....	255
b) Límites de detección y determinación.....	259
c) Reproducibilidad.....	260
4.- Generalización del método.....	261
5.- Análisis de aminoácidos libres en proteínas parcialmente hidrolizadas.....	264
a) Estimación de la absortividad molar del derivado de una proteína intacta.....	265
b) Determinación del contenido en aminoácidos libres en caseína parcialmente hidrolizada.....	268
III.7.- DETERMINACION DE N-ACETIL-L-CISTEINA EN FARMACOS CON O-FTALDEHIDO E ISOLEUCINA.....	273
III.7.1.- IMPORTANCIA FARMACOLOGICA.....	275
III.7.2.- METODOS DE ANALISIS.....	276
1.- Oxidación del grupo tiol.....	277
2.- Formación de mercapturos metálicos.....	280
3.- Reacciones con compuestos cromóforos.....	284
III.7.3.- ENSAYOS PREVIOS.....	286
1.- Elección de la amina.....	286
2.- Absorbancia del blanco.....	291
3.- Estabilidad de las disoluciones.....	293
III.7.4.- OPTIMIZACION DE LAS CONDICIONES EXPERIMENTALES.....	295
1.- Influencia de la concentración de o-ftaldehido.....	295
2.- Influencia de la concentración de isoleucina.....	297

	Pag.
III.7.5.- PARAMETROS ANALITICOS SIGNIFICATIVOS.....	299
1.- Curva de calibrado.....	300
2.- Límites de detección y determinación....	300
3.- Repetitividad.....	303
III.7.6.- ANALISIS DE N-ACETIL-L-CISTEINA EN DIVERSOS FARMACOS.....	304
1.- Descripción y preparación de las disoluciones de los fármacos.....	304
2.- Utilización de métodos comparativos.....	307
a) Método del tetratoato.....	307
b) Determinación colorimétrica de N-acetil-L-cisteína con Fe(III) y 1,10-fenantrolina.....	310
3.- Determinación de N-acetil-L-cisteína con o-ftaldehído e isoleucina.....	313
IV.- CONCLUSIONES.....	317
V.- BIBLIOGRAFIA.....	337

## INDICE DE ABREVIATURAS

ABA	o-acetilbenzaldehido
ACV	$\delta$ -(L- $\alpha$ -aminoadipil)-L-cisteinil-D-valina
DSS	dodecil sulfato sódico
ET	etanotiol
ME	mercaptoetanol
MP	3-mercapto-1-propanol
MPA	ácido 3-mercaptopropiónico
NAC	N-acetil-L-cisteína
NDA	2,3-naftaléndicarboxialdehido
OBB	o-benzoilbenzaldehido
OPA	o-ftaldehido



Aminoácidos proteicos primarios

ALA	Alanina		ILE	Isoleucina	
ARG	Arginina		LEU	Leucina	
ASP	Acido Aspartico (R= OH)	}	LYS	Lisina	
ASN	Asparagina (R= NH2)		MET	Metionina	
GLU	Acido Glutámico (R= OH)	}	PRO	Prolina	
GLN	Glutamina (R= NH2)		SER	Serina	
CYS	Cisteina		TYR	Tirosina	
PHE	Fenilalanina		THR	Treonina	
GLY	Glicina		TRP	Triptofano	
HIS	Histidina		VAL	Valina	

*Aminoácidos no proteicos*

BABA	Acido β-amino-n-butirico	$\text{CH}_3-\underset{\text{NH}_2}{\text{CH}}-\text{CH}_2-\text{CO}_2\text{H}$		Citrulina	$\text{H}_2\text{N}-\text{CONH}-(\text{CH}_2)_3-\underset{\text{CO}_2\text{H}}{\text{CH}}^{\text{NH}_2}$
GABA	Acido γ-amino-n-butirico	$\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CO}_2\text{H}$	NLE	Norleucina	$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_3-\underset{\text{CO}_2\text{H}}{\text{CH}}^{\text{NH}_2}$
BALA	β-Alanina	$\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CO}_2\text{H}$	NVA	Norvalina	$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_2-\underset{\text{CO}_2\text{H}}{\text{CH}}^{\text{NH}_2}$
CYS	Cistina	$\text{H}_2\text{N}-\underset{\text{HO}_2\text{C}}{\text{CH}}-\text{CH}_2-\text{S}-\text{S}-\text{CH}_2-\underset{\text{CO}_2\text{H}}{\text{CH}}^{\text{NH}_2}$	ORN	Ornitina	$\text{H}_2\text{N}-(\text{CH}_2)_3-\underset{\text{CO}_2\text{H}}{\text{CH}}^{\text{NH}_2}$

I . - INTRODUCTION



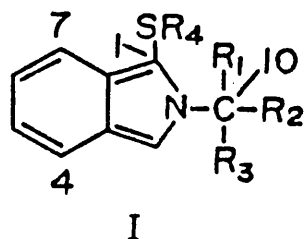
## I.1.- DERIVATIZACION DE AMINOACIDOS CON O-FTALDEHIDO

### I.1.1.- Aspectos generales

Los reactivos derivatizantes más ampliamente utilizados en el análisis de aminoácidos mediante cromatografía líquida (HPLC) son la ninhidrina (1), el o-ftaldehido (OPA) (2-6), fluorescamina (1), cloruro de dansilo (7), cloruro de dabsilo (8) y el 7-fluoro-4-nitro-1,2,3-benzoxadiazol (9). De todos ellos, el más popular es el OPA debido a que presenta una serie de características favorables: origina rápidamente a temperatura ambiente compuestos fluorescentes con los aminoácidos, no presenta fluorescencia intrínseca y no se descompone fácilmente, ni origina productos secundarios fluorescentes. Sin embargo posee alguna limitación, como es la inestabilidad de los productos formados, que se ve acelerada en presencia de un exceso de OPA (2)(10-18).

En 1971, Roth (19) describió por primera vez, la formación casi instantánea de productos fluorescentes por reacción de los aminoácidos con OPA en presencia de mercaptoetanol (ME) a pH 9.5 ( $\lambda_{ex} = 340 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{em} = 455 \text{ nm}$ ,  $\phi = 0.33-0.47$  (10)). Roth consideró la posibilidad de que los distintos aminoácidos dieran lugar al mismo compuesto, como ocurre en la reacción con la ninhidrina. Sin embargo, el hecho de que los rendimientos cuánticos obtenidos difieran de unas aminas a otras sugirió que no se producía el mismo fluoróforo.

Por otro lado, en un principio se pensó que el tiol actuaba simplemente como un agente reductor. Sin embargo, Simons y Johnson (11)(20) demostraron que el tiol forma parte del producto final. Estos autores cristalizaron un derivado, haciendo reaccionar OPA y t-butil-mercaptano con n-propilamina en etanol del 95 %. Mediante cromatografía de capa fina y estudios de RMN, IR y espectrometría de masas del producto fluorescente precipitado, mostraron que se trataba de un isoindol 1-alquiltio-2-alquil-sustituído (I).



Al sustituir el t-butil-mercaptano por ME obtuvieron en disolución acuosa, un derivado fuertemente fluorescente que no pudo ser aislado. Los mismos autores en estudios posteriores similares, demostraron que otros tioles y aminas originan compuestos con la misma estructura (12-13). El estudio de los espectros UV de los derivados (13) confirmó la presencia del anillo isoindol.

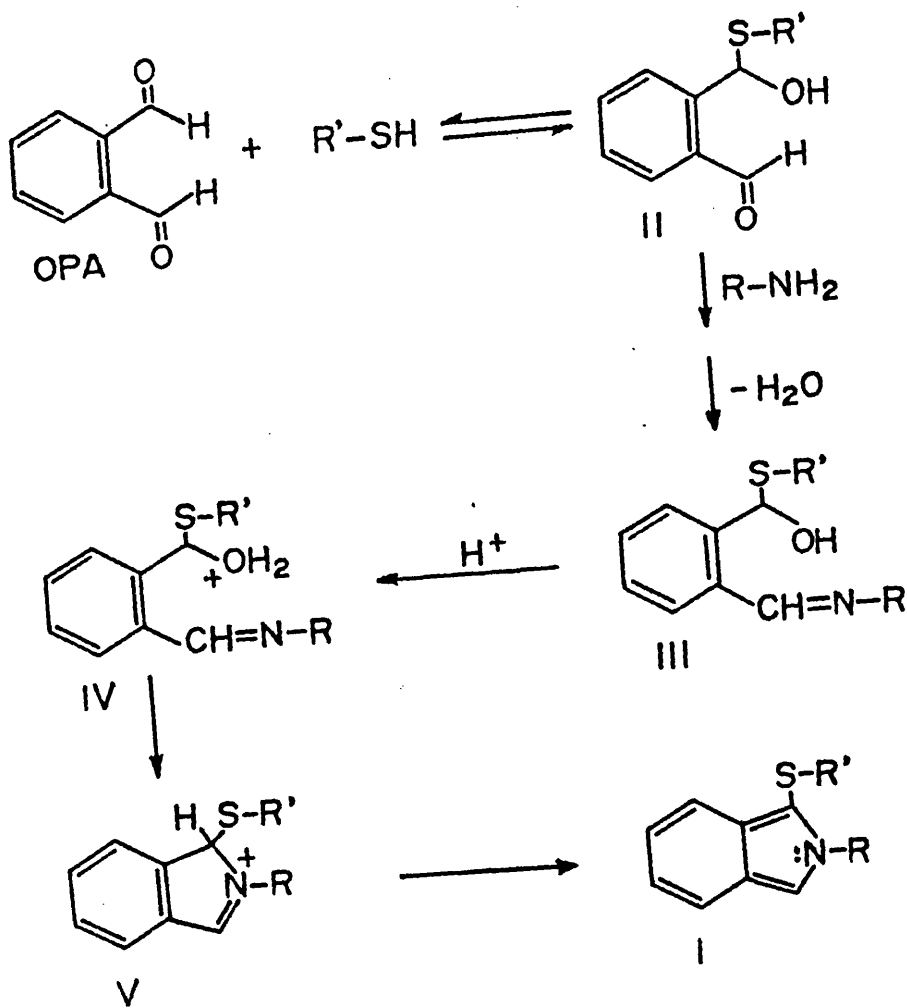
Para poder precipitar y aislar los isoindoles fluorescentes, Simons y Johnson utilizaron largos tiempos de reacción (15 min), tiempos voluminosos y bajas temperaturas de cristalización (0°C). Sin embargo, estas condiciones de formación de los derivados son atípicas (en las condiciones utilizadas en HPLC los isoindoles se forman en cortos períodos de tiempo, generalmente menos de 1 min, a temperatura ambiente o superior) y no puede suponerse a priori que los productos fluorescentes obtenidos en condiciones muy distintas sean los mismos. Por ello Simpson y col. (21) analizaron mediante cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-MS) los extractos en cloruro de metileno de los derivados de diversas aminas primarias, obtenidos por reacción con OPA y ME o etanotiol (ET) a la salida de una columna de HPLC. Debido a la presencia del grupo hidroxilo en los derivados de OPA-ME, fue necesario sililar el concentrado del extracto anhidro, para obtener un producto suficientemente volátil para la separación por GC. El estudio realizado demostró que no es necesario el aislamiento del producto sólido para su análisis estructural y que la estructura fundamental del fluoróforo está presente en todos los derivados.

### I.1.2.- Mecanismo de formación de los isoindoles

Simons y Johnson (13) propusieron un mecanismo de formación del isoindol (I), en el que el OPA reacciona en primer lugar con el ME y a continuación con la amina (Esquema 1). El esquema propuesto supone la protonación de la imina intermedia (III), seguida de una reacción intramolecular parcial del tipo S<sub>w</sub>1 para dar el isoindol protonado (V). Sin embargo, la observación experimental de que el isoindol se obtiene preferentemente en medio alcalino, donde sería poco favorable la formación del hemitioacetal (IV) o isoindol (V), hace a este mecanismo poco probable. Además, las reacciones de sustitución sobre un carbono unido a dos o más heteroátomos normalmente transcurren mediante procesos de eliminación-adición (22) y no a través de una sustitución nucleofílica intramolecular como la sugerida por Simons y Johnson. Finalmente, la imina (IV) no es probable que sea un nucleófilo más fuerte que la amina primaria de la que proviene (23).

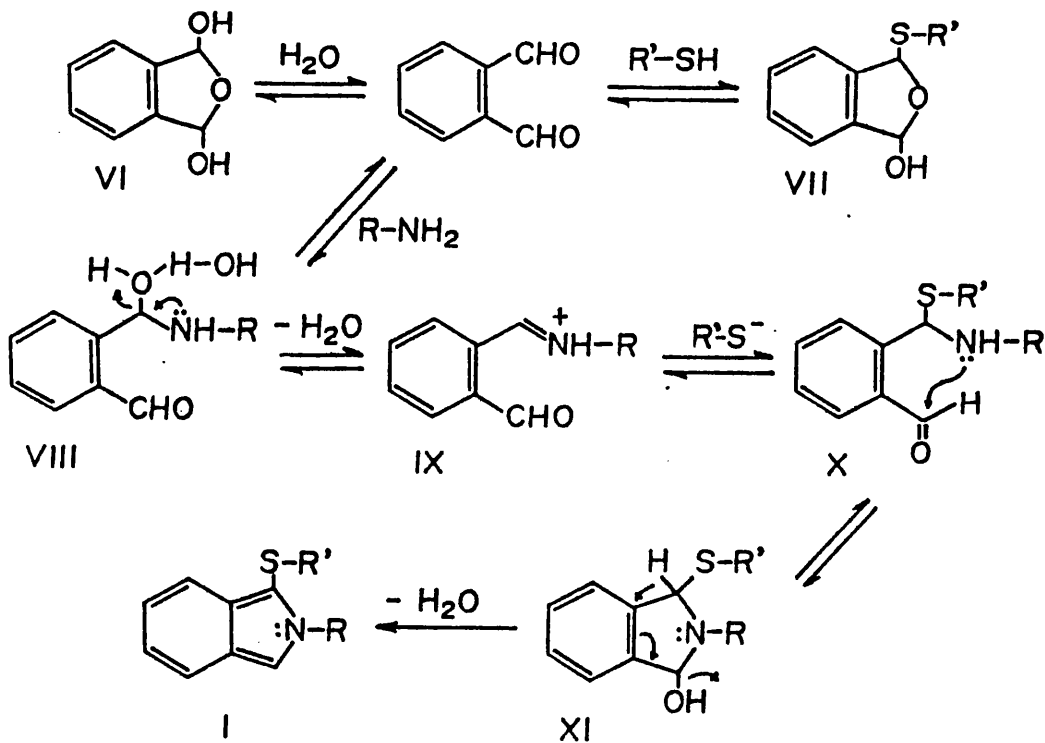
A la vista de estas observaciones, Sternson y col. (24) propusieron otro mecanismo de reacción (Esquema 2), en el que se considera que las disoluciones acuosas de OPA se hallan en equilibrio con una forma cíclica hidratada (VI) (25), y en presencia de un tiol originan una reacción reversible que da lugar a un producto de adición cíclico (VII) (13). Aunque experimentalmente la reacción de derivatización se lleva a cabo mezclando en primer lugar el OPA con el tiol y añadiendo





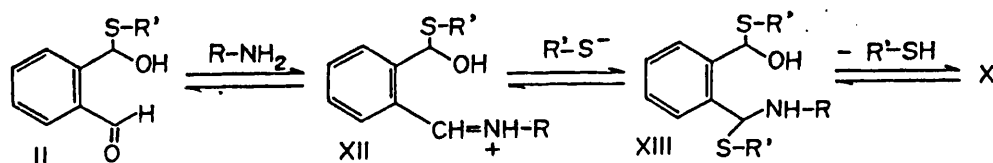
Esquema 1

a continuación la amina, no cabe esperar que los productos de adición VI o VII sean reactivos frente a una amina primaria. Sin embargo, la amina primaria reaccionará rápidamente con la forma libre del OPA para formar una carbinolamina (VIII), la cual se deshidrata para producir una imina protonada, altamente reactiva (IX). Esta última, a su vez, es rápidamente atacada por el anión del tiol, formando un  $\alpha$ -alquilaminobencilsulfuro (X). El ataque nucleofílico intramolecular de la amina secundaria resultante sobre el grupo carbonilo restante cierra el anillo, formando un producto intermedio (XI), que fácilmente se deshidrata para conducir al isoindol fluorescente (I).



Esquema 2

Alternativamente, la formación del  $\alpha$ -alquilaminobencilsulfuro, X, puede tener lugar por reacción del hemitioacetal (II) con la amina primaria, para formar la imina protonada (XII) (Esquema 3), tal como propusieron Simons y Johnson (13); sin embargo este compuesto sería atacado por el anión tiol para formar el hemitioacetal (XIII), que a continuación se descompondría rápidamente en medio básico (26-27) originando X, y la reacción continuaría según el Esquema 2.

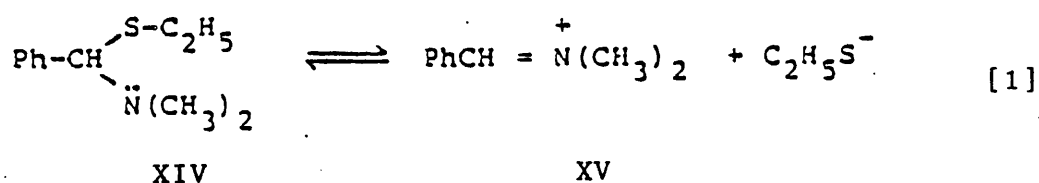


Esquema 3

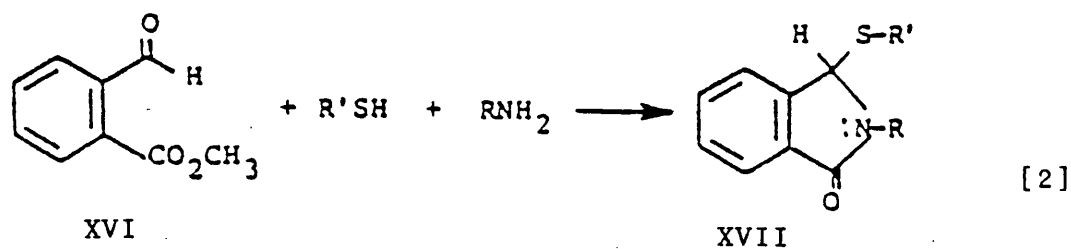
La formación del  $\alpha$ -alquilaminobencilsulfuro (X o XIII) y la consiguiente formación del anillo (X-->XI-->I) representan unos cambios importantes con respecto al esquema dado por Simons y Johnson (13). El mecanismo está de acuerdo con los descritos para reacciones de condensación similares, como es la condensación de cisteína con formaldehído (28), en la cual inicialmente se forma una imina protonada que es atacada por el tiol, originando una tiazolidina. Otra evidencia más de la posibilidad del ataque del anión tiol sobre la imina catiónica (IX) la proporciona el mecanismo de degradación del etil  $\alpha$ -dimetilaminobencilsulfuro (XIV) en

medio acuoso, que origina una imina catiónica (XV) [1] (29).

La reacción inversa supone la adición del tiol a la imina.



Sternson y col. (24) comprobaron además la validez del mecanismo sustituyendo el OPA por metil-(o-formil)-benzoato (XVI), en la condensación con la amina y tiol [2]. La obtención de un 1-alkiltio-2-alkilftalimidina (XVII) indicó la posibilidad de que el intermedio de reacción es una tiocarbinolamina (X) y que la ciclación se inicia por ataque del grupo amino de la tiocarbinolamina sobre el o-carbonilo. Con el OPA, el ataque se produciría sobre un carbono aldehídico, que es de esperar ocurra fácilmente. La etapa final de deshidratación (XI -->I) ha sido también observada en la síntesis de 1-aryl isoindoles a partir de o-aminometil benzofenonas (29).



### I.1.3.- Estabilidad de los isoindoles

La detección de aminoácidos mediante HPLC , tras su reacción con OPA , constituye uno de los métodos más sensibles para su determinación. Las primeras aplicaciones del OPA al análisis de aminoácidos y de otras aminas primarias suponían la derivatización post-columna de los mismos tras su separación por cromatografía de intercambio iónico (30-32). Sin embargo, la utilización de este esquema de análisis requiere la eliminación completa de las impurezas de los reactivos y de la fase móvil, que pueden contribuir de una forma importante a la fluorescencia de fondo (33). Además, se originan pérdidas en la resolución y sensibilidad, debido a la mezcla de la fase móvil con el reactivo (34-35). Por ello, actualmente el interés se ha dirigido hacia la formación pre-columna de los isoindoles (4-5)(33-36), que mejora los límites de detección, simplifica el sistema cromatográfico y reduce el tiempo de análisis.

Desafortunadamente, como hemos indicado, los isoindoles formados con el reactivo OPA-ME no son estables, especialmente los derivados de glicina, alanina, lisina y ornitina (5), por lo que se precisa un cuidadoso control del tiempo de reacción, siendo generalmente necesario automatizar el instrumento para obtener una precisión aceptable. Por otro lado, no es aconsejable guardar las muestras de aminoácidos derivatizadas pues se produce una rápida pérdida de

fluorescencia, por lo que es preferible hacer reaccionar los aminoácidos con OPA inmediatamente antes de proceder a la separación (37).

Cuando los isoindoles se obtienen a partir de concentraciones equimolares de todos los reactantes (amina, OPA y tiol) o cuando existe un exceso de la amina, la velocidad de degradación disminuye enormemente. Por el contrario, la adición de exceso de OPA al isoindol formado, produce su rápida descomposición (38-39).

Cooper y col. (40) realizaron un estudio utilizando HPLC , en el que examinaron la estabilidad de los derivados en dos condiciones distintas: en primer lugar, manteniendo los derivados en la cámara de reacción (en presencia de un exceso de OPA, relación OPA:aminoácido 90:1) durante distintos intervalos de tiempo antes de la inyección en la columna y en segundo lugar, inyectando los derivados inmediatamente en la columna y deteniendo el flujo de disolvente 2 min después, durante distintos intervalos de tiempo. En el primer caso, los derivados dieron no sólo respuestas fluorescentes variables, sino también mostraron distintos grados de estabilidad, siendo especialmente inestables los derivados de OPA-ME de glicina, ornitina y lisina. Esta observación concuerda con otras anteriores (5)(41).

Sin embargo, algunos autores han observado que al utilizar HPLC con derivatización pre-columna (6)(42-43), especialmente cuando los derivados de los aminoácidos son retenidos en la columna por menos de 30 min, se obtienen respuestas fluorescentes comparables para los derivados inestables y los más estables. Efectivamente, Cooper y col. (40) observaron que una vez dentro de la columna, la mayoría de los derivados de OPA-ME son estables, incluyendo los de glicina, ornitina y lisina. Sólo los aminoácidos diácidos, ácido aspártico y glutámico, mostraron una pérdida de fluorescencia significativa. El aumento de estabilidad observado dentro de la columna puede ser debido a la eliminación del exceso del reactivo OPA-ME durante el proceso cromatográfico o a que, al estar inmovilizados los derivados en la columna, se retarde su descomposición.

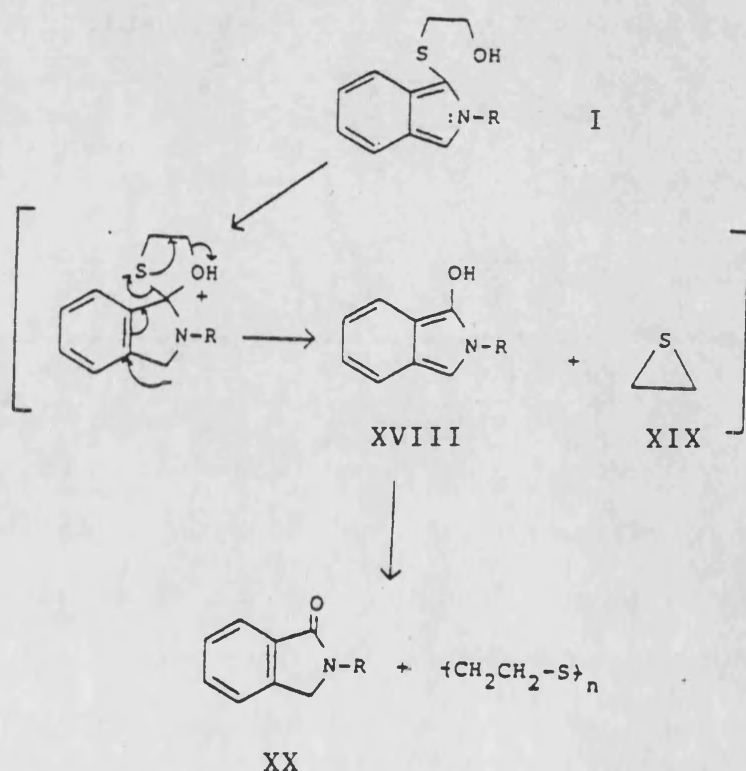
Por otro lado, en presencia de un exceso de OPA, se ha observado una disminución de la velocidad de degradación al aumentar la concentración de diversos tioles (39)(44). Esta observación contradice otras anteriores que indicaban que los excesos de ME no tenían efecto sobre la estabilidad de los derivados. Sin embargo, en uno de estos estudios (45), al variar la concentración de tiol no existía exceso de OPA, de modo que se eliminaba la principal causa desestabilizadora. En el segundo (38), la máxima concentración de tiol examinada fue de  $1.5 \times 10^{-3}$  M y la de OPA,  $1.5 \times 10^{-4}$  M, concentraciones aproximadamente un orden de magnitud por debajo de las utilizadas en (39).

Se puede actuar de diversas formas para obtener una máxima estabilidad de los isoindoles: controlar la concentración de tiol, la concentración de OPA o la estructura del tiol. De ellas, la influencia de la primera sólo es relevante a altas concentraciones. Por otro lado, el uso de una mínima cantidad de OPA parece la vía más adecuada. Según se ha visto anteriormente, deben evitarse grandes excesos de este reactivo, sin embargo, la necesidad de una formación rápida y cuantitativa de los derivados impone unos límites, especialmente en muestras que contienen amins en un amplio rango de concentraciones. Así, finalmente, la alteración de la estructura del tiol parece ser la forma más viable para lograr la estabilización.



I.1.4.- Mecanismo de degradación

Simons y Johnson (11) caracterizaron el producto de degradación de los isoindoles formados con ME como una N-alkilftalimidina (XX), y propusieron dos posibles vías para su formación: la hidrólisis ácida del isoindol (12)(15) (la degradación se ve acelerada a pH ácidos) y el ataque nucleofílico intramolecular del grupo hidroxilo del ME (13) (Esquema 4).

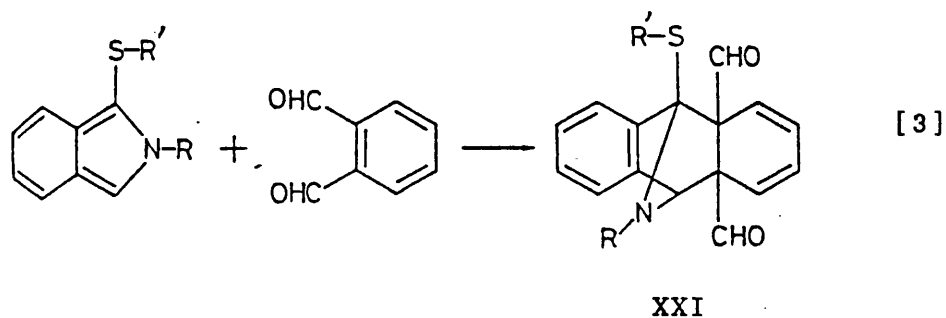


Esquema 4

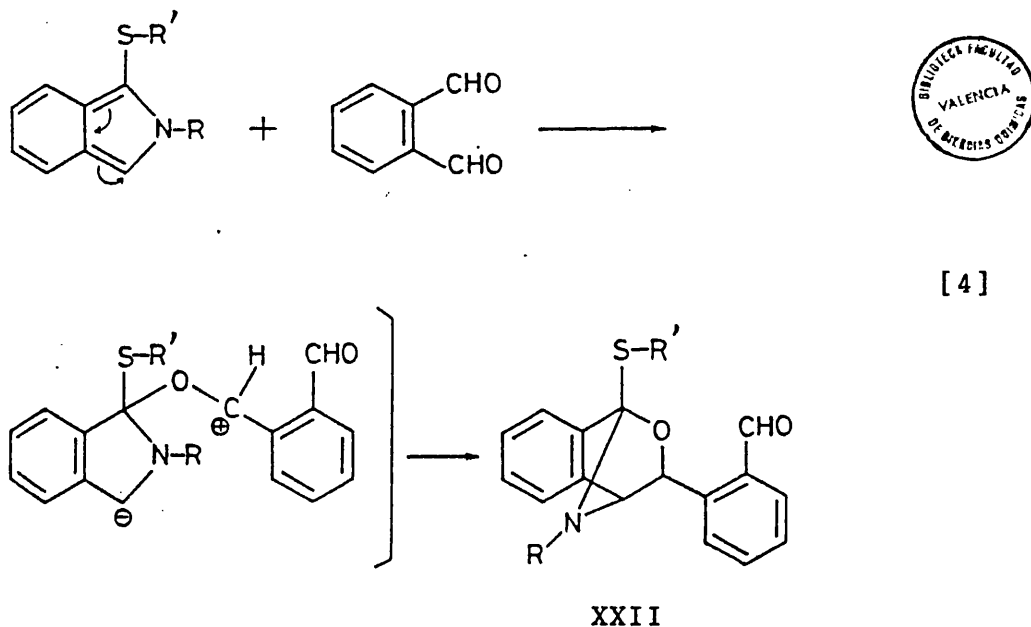
La intervención del grupo hidroxilo en la reacción de descomposición viene apoyada por el hecho de que, la velocidad de degradación de los derivados del ME es menor en medio borato que en medio fosfato, debido probablemente a que el borato compleja al grupo hidroxilo (15). Además, los derivados de ET son más estables que los de ME.

El producto de degradación propuesto por Simons y col. fue también identificado por Stobaugh y col. (38). Sin embargo, según estos últimos autores, el mecanismo propuesto no explica la aceleración de la degradación de los isoindoles derivados de ME a productos no fluorescentes, que se produce al aumentar la concentración de OPA, es decir, no existe ninguna razón obvia por la cual el OPA catalice el ataque nucleofílico intramolecular mostrado en el Esquema 4.

Nakamura y col. (45) propusieron que el efecto desestabilizante del OPA podría explicarse por un ataque directo del OPA al anillo del isoindol, en el que el OPA actuara como dienófilo [3] o como nucleófilo [4], lo que conduciría a productos de degradación distintos del identificado por Simons y Johnson (11). En el primer caso [3] se produciría una reacción de Diels-Alder entre el isoindol fluoróforo (dieno) y el OPA (dienófilo) para formar un derivado no fluorescente (XXI). Este tipo de reacciones de Diels-Alder sobre el anillo pirrol de los isoindoles se producen con dienófilos, como el anhídrido maleico (29)(46) y la N-fenilmaleimida (47-49).



El segundo mecanismo propuesto por Nakamura y col. [4] consiste en un ataque nucleofílico de un grupo aldehído de la molécula de OPA sobre el isoindol, lo que originaría también productos de condensación no fluorescentes (XXII).

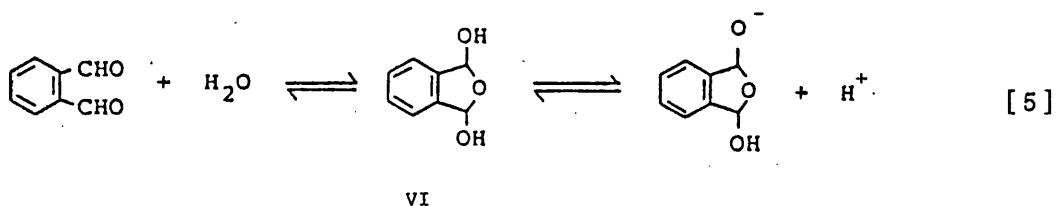


[4]

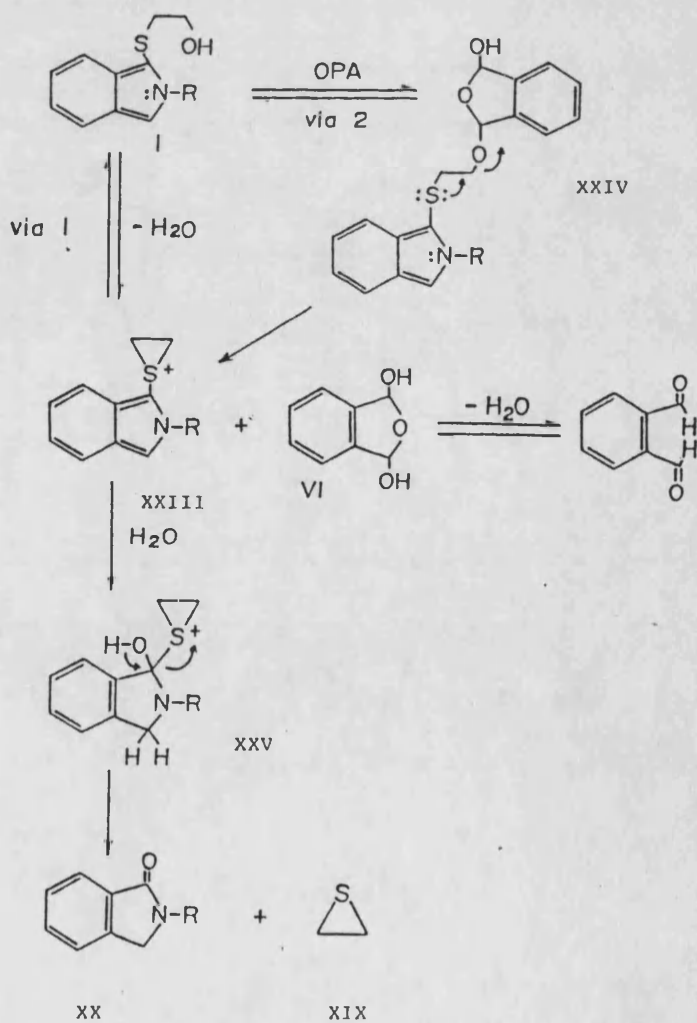
Stobaugh y col. (38) criticaron ambos mecanismos, indicando que el OPA no puede actuar ni como dienófilo ni como nucleófilo. Si actuara como dienófilo respecto al anillo isoindol [3], se formaría un producto en el cual la

aromaticidad del OPA se perdería, lo que es un proceso energéticamente poco favorable. Por otro lado, los grupos aldehído del OPA poseen más bien un carácter electrofílico, por lo que no es probable que efectúen un ataque nucleofílico sobre el anillo isoindol [4].

A diferencia de muchos otros aldehídos aromáticos, tal como se indicó anteriormente (Esquema 2), el OPA se deshidrata en gran extensión para formar una mezcla de 1,3-ftalándioles cíclicos cis y trans (VI), que exhiben un log K de protonación medio de 11.6 (I = 0.1, 25°C) (25) [5]. A 40°C en D<sub>2</sub>O, la constante de hidratación es de 3.99 ± 0.16 (25), así, aproximadamente el 80% del OPA existe en su forma hidratada en disolución acuosa.



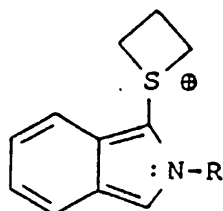
El desplazamiento de este equilibrio y la bien conocida habilidad de los tioéteres para proporcionar asistencia equimérica en las reacciones de desplazamiento (50), junto con observaciones derivadas de diversos estudios cinéticos, llevaron a Stobaugh y col. (38) a proponer un mecanismo de degradación en el que el OPA actúa como catalizador (Esquema 5).



Esquema 5

En ausencia de exceso de OPA (vía 1), el isoindol (I) forma el ion 1-ciclopropilsulfonio isoindol (XXIII). El ataque por el agua y/o hidróxido sobre esta especie puede ocurrir en las posiciones metileno del ion sulfonio para regenerar I o en el C-1 del anillo isoindol para formar XX. En presencia de exceso de OPA (vía 2), el isoindol (I) puede originar rápidamente el hemiacetal (XXIV). La capacidad del grupo ftalandiol para abandonar el anillo (XXIV) es mayor que la del hidroxilo en I, por lo que se facilita la formación del ion sulfonio (XXIII), siendo así mayor la concentración de esta especie en el estado estacionario, y aumentando por lo tanto, la velocidad de degradación del isoindol (I).

La utilización de 3-mercapto-1-propanol (MP), en lugar de ME, aumenta la estabilidad de los derivados, lo que se supone es debido a que la formación de un derivado sulfonio de 4 miembros (XXVI) es menos favorable cinéticamente (38). Estas observaciones descartan el mecanismo propuesto por Nakamura y col. (45), en el cual el OPA ataca directamente el anillo isoindol, ya que si fuera así, sería difícil explicar la gran estabilización conseguida cuando se sustituye el ME por el MP.

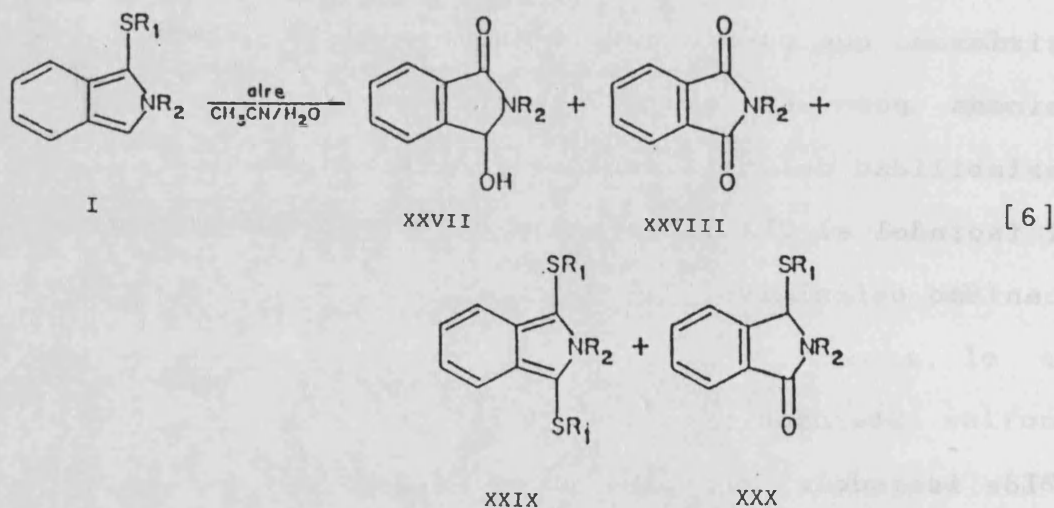


XXVI

Sin embargo, el esquema de degradación de Stobaugh y col. (38), del mismo modo que el de Simons y Johnson (13), sólo es aplicable a los derivados de hidroxitioles (como el ME). Jacobs y col. (39) comprobaron que la capacidad del OPA para acelerar la degradación también se presenta con isoindoles formados con tioles que no contienen grupos hidroxilo, por lo que supusieron que todos los isoindoles deben descomponerse por medio del mismo proceso limitante, en presencia de un exceso de OPA. Estos autores además sugirieron, que puesto que la química de los isoindoles está dominada por las sustituciones electrofílicas (51), la inestabilidad de los mismos se debe a una adición nucleofílica del isoindol al OPA libre. Sin embargo, no propusieron un mecanismo definitivo.

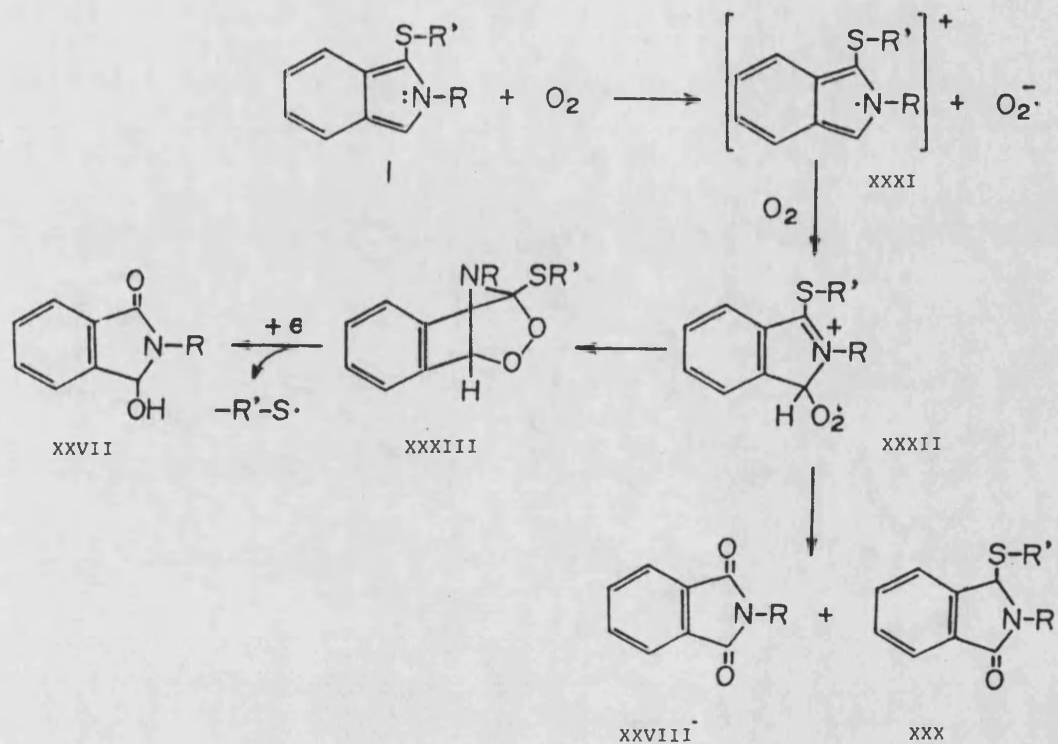
Sternson y col. (24) indicaron que la inestabilidad de los isoindoles proviene principalmente de sus reacciones de condensación y de autooxidación (51). El primer tipo de reacciones sólo puede tener lugar con isoindoles no sustituidos en el nitrógeno. La degradación autooxidativa, por su parte, es acelerada en presencia de aire y ha sido observada en diversos isoindoles (51-56), siendo un caso excepcional el de los isoindoles derivados de ME, en el que el proceso de degradación no es oxidativo y tiene lugar, como ya se ha visto, por un ataque hidrolítico en el C-1 (38).

Stobaugh y col. (57-58) observaron que en general, los 1-(alquiltio)-2-alkuilisoindoles experimentan una degradación autooxidativa, de manera similar a otros isoindoles no sustituidos en el azufre, e identificaron cuatro productos de degradación (XXVII, XXVIII, XXIX y XXX) [6] (57), siendo XXX, una ftalimidina tiosustituída, el componente mayoritario. Además propusieron el mecanismo de degradación mostrado en el Esquema 6.



Según este mecanismo, la transferencia electrónica al oxígeno o a otro radical presente da lugar al radical catiónico XXXI (52), que inicia un proceso en cadena. Este radical reacciona con el O<sub>2</sub> para formar un intermedio, el radical peroxi-isoindoil (XXXII), que puede reaccionar a continuación de diversas formas (54), incluyendo la formación de un endoperóxido (XXXIII).

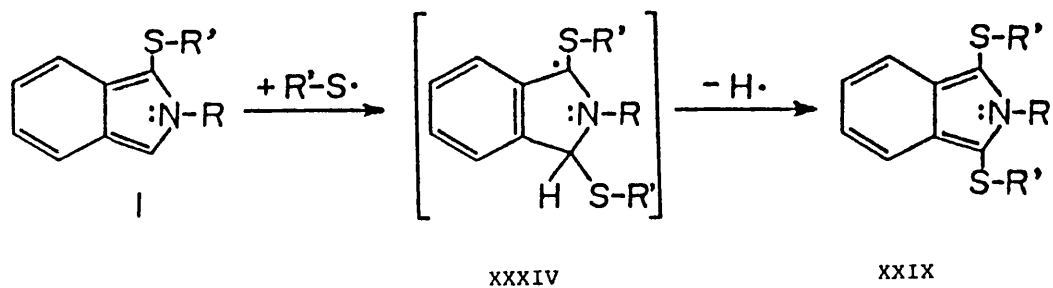




Esquema 6

El producto de degradación no oxidativo (XXIX), (Esquema 7) puede obtenerse a partir de la reacción de los radicales  $-RS\cdot$  (producidos durante el proceso oxidativo descrito en el Esquema 6) con el isoindol no degradado, mediante un proceso de sustitución homolítica a través del intermedio XXXIV. Este tipo de reacción se observa con los pirroles (59-60) y cabe esperar que también tenga lugar con isoindoles, debido a la contribución del intermedio

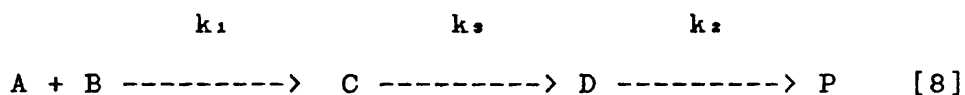
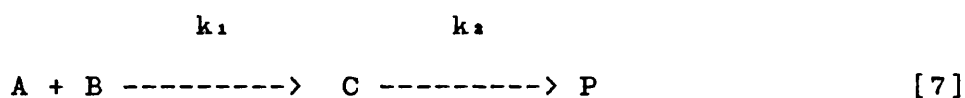
estabilizado por resonancia que se produce durante la reacción. El efecto desestabilizador del OPA puede ser debido a un ataque electrofílico en las posiciones 1 y 3 del anillo isoindol (61).



Esquema 7

I.1.5.- Cinética de formación y descomposición

Svedas y col. (41) realizaron un estudio espectrofotométrico de la cinética de reacción de los aminoácidos con el OPA, en presencia de ME. Estos autores consideraron dos esquemas de reacción basados en los mecanismos propuestos por Simons y col. (13):



donde A es el OPA, B un aminoácido, C y D productos de reacción absorbentes (isoindoles 1-alkil-2-tiosustituído y 1-hidroxi-2-sustituído, respectivamente), P el producto final de descomposición (una N-alkilftalimidina) (XX), no absorbente,  $k_1$  la constante de velocidad de formación del compuesto intermedio, de segundo orden,  $k_2$  la constante velocidad de descomposición, de primer orden, y  $k_3$  la constante de velocidad de primer orden correspondiente a la conversión de C a D.

Asimismo, se propusieron los siguientes sistemas de ecuaciones diferenciales, correspondientes a los esquemas [7] y [8] (41) :

$$\frac{dx}{dt} = k_1(a.-x)(b.-x)$$

$$x = c + p$$

[9]

$$\frac{dp}{dt} = k_2(x-p)$$

$$\frac{dx}{dt} = k_1(a.-x)(b.-x)$$

$$x = c + p + d$$

$$\frac{dc}{dt} = k_1(a.-x)(b.-x) - k_3c$$

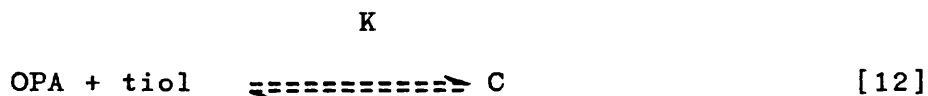
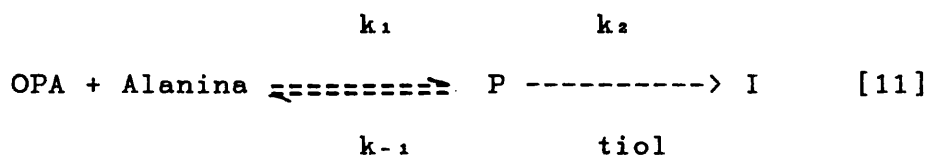
[10]

$$\frac{dp}{dt} = k_2d$$

donde  $x$  es la fracción de OPA o de aminoácido implicada en la reacción,  $a.$  y  $b.$  las concentraciones iniciales de OPA y del aminoácido y  $t$  el tiempo. Las letras minúsculas indican concentraciones instantáneas de cada compuesto.

Los autores encontraron que la curva teórica correspondiente al esquema [8], obtenida por integración del sistema de ecuaciones [10] concordaba mejor con los resultados experimentales. Se observó además que el mejor ajuste se obtenía cuando se consideraba que la diferencia entre las absorptividades molares de C y D era menor del 10%. La similitud entre las absorptividades molares de estos dos compuestos es comprensible, puesto que las sustituciones en la posición 1 del anillo isoindol afectan muy poco a las propiedades espectrales de los compuestos (62).

Posteriormente, Wong y col. (63) realizaron estudios cinéticos sobre la reacción del OPA con la alanina en presencia de ME y ácido 3-mercaptopropiónico (MPA), proponiendo el siguiente esquema cinético, basado en el mecanismo propuesto por Sternson y col. (24):



El reactivo OPA reacciona con la alanina para formar el compuesto intermedio P, que reacciona a continuación con el tiol para producir el isoindol fluorescente (I) [11]. Simultáneamente, el OPA reacciona reversiblemente con el tiol para formar el derivado C [12], cuya constante aparente de disociación es K. Cuando  $[\text{OPA}] < [\text{tiol}]$ , la ecuación de velocidad deducida aplicando la aproximación del estado estacionario a la especie P es:

$$\frac{d[\text{P}]}{dt} = \frac{k_1[\text{OPA}] [\text{tiol}] [\text{Ala}]}{k_{-1}/k_2 + [\text{tiol}]} \frac{K}{K + [\text{tiol}]} \quad [13]$$

Mientras que en las condiciones normalmente utilizadas, en las que la concentración de alanina es mucho menor que la de OPA y tiol se tiene:

$$d[P]/dt = k_{obs}^f [Ala] \quad [14]$$

donde

$$k_{obs}^f = \frac{k_1 [OPA] [tiol]}{k_{-1} / k_2 + [tiol]} \frac{K}{K + [tiol]} \quad [15]$$

Al ajustar a la ecuación [15] los datos experimentales de  $k_{obs}^f$  obtenidos para distintas concentraciones de tiol se obtuvieron las constantes de la Tabla 2:

Tabla 2. - Constantes de formación de los isoindoles derivados de la alanina con el reactivo OPA-tiol (63).

Tiol	$k_1$ ( $\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ )	$k_{-1}/k_2$ (mM)	K (mM)
ME	$113 \pm 4$	$0.053 \pm 0.005$	$4.64 \pm 0.55$
MPA	$121 \pm 13$	$0.100 \pm 0.021$	$1.58 \pm 0.40$

Se observa que los valores de  $k_1$  son similares para ME y MPA, lo que está de acuerdo con el mecanismo propuesto, en el que la primera etapa es independiente del tiol. Por el contrario, la relación  $k_{-1}/k_2$  para MPA es aproximadamente el doble que para ME. Puesto que  $k_{-1}$  corresponde a la descomposición del producto intermedio, P, para producir los reactantes, esta constante debe ser también independiente de la concentración de tiol y por lo tanto,  $k_2(\text{ME})/k_2(\text{MPA}) \sim 2$ , lo que implica que el ME es más efectivo al reaccionar con P. La razón de este comportamiento se puede explicar en base a la mayor basicidad del MPA ( $\log K = 10.2-10.3$ ) (64-65) respecto a la del ME ( $\log K = 9.4-9.5$ ) (65-66), por lo que en las condiciones utilizadas ( $\text{pH} = 9.3$ ), existe una mayor fracción del anión mercapto del ME que del MPA.

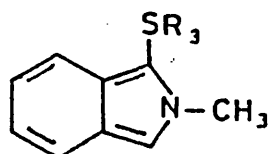
Diversos estudios sobre la cinética de degradación de los isoindoles indican que ésta transcurre mediante al menos dos procesos paralelos; además se observa una relación lineal entre la constante de degradación de primer orden,  $k^{obs}$ , y la concentración de OPA (39) :

$$k^{obs} = k_0 + k_1 [\text{OPA}] \quad [16]$$

donde  $k_0$  es la constante de velocidad para el proceso no catalizado (en ausencia de exceso de OPA) y  $k_1$  corresponde al proceso catalizado por OPA. La constante  $k_0$  es despreciable en presencia de un exceso moderado de OPA.

La actividad del OPA depende en gran medida de la estructura del tiol (38-39). En la Tabla 3 se muestran los valores de  $k_0$  y  $k_1$  correspondientes a derivados de metilamina con diversos tioles (39). Se observa que la constante  $k_0$  es menos variable que la  $k_1$ , lo que parece indicar que el efecto de la estructura sobre la estabilidad, sólo es debido a la inhibición del proceso catalizado por el OPA .

Tabla 3. - Constantes de velocidad de degradación de los derivados de la metilamina con diversos tioles (39).



Isoindol	R <sub>3</sub>	k <sub>0</sub> (min <sup>-1</sup> )	k <sub>1</sub> (M <sup>-1</sup> min <sup>-1</sup> )
a	-CH <sub>3</sub>	0.001	34.0
b	-CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> OH	0.002	17.8
c	-CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	0.002	13.4
d	-CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	0.007	5.6
e	-C(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>	0.003	0.1

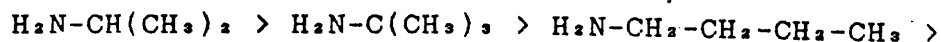
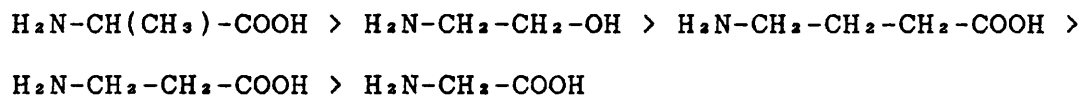
El efecto estabilizador de la presencia de un exceso de tiol es probablemente debido a la formación de uno o más derivados OPA-tiol, que disminuye la concentración de OPA libre. La reacción de adición de agua o tiol a un aldehído con formación del hidrato o hemitioacetal es bien conocida (25) (66-69) y en este caso, el derivado formado, C [12], puede ser el hemitioacetal cíclico (VII, Esquema 2). La estabilización también puede ser debida a la acción antioxidante del tiol (70).



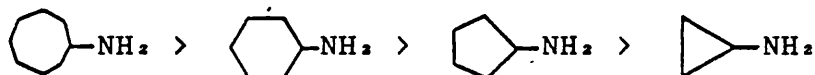
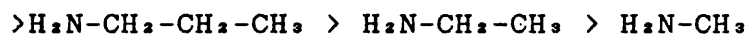
I.2.- FACTORES ESTRUCTURALES QUE AFECTAN A LA ESTABILIDAD DE  
LOS ISOINDOLES

I.2.1.- Efecto de la estructura de la amina sobre la  
estabilidad

Nakamura y col. (45) realizaron un estudio cualitativo sobre el efecto de la estructura de la amina primaria sobre la estabilidad de los isoindoles, formados por reacción con el reactivo OPA-ME. Estos autores observaron, que la velocidad de disminución de la fluorescencia era menor en los derivados de aminas primarias con impedimento estérico alrededor del grupo amino. Así, la sustitución en el carbono  $\alpha$  adyacente al grupo amino parece impedir que los fluoróforos sean atacados por el OPA. Además se observó el gran efecto estabilizador del grupo carboxilo al comparar la estabilidad de los aminoácidos aromáticos L-triptófano, L-dopa y L-tirosina con los correspondientes compuestos descarboxilados. En el Esquema 8 se ordenan en función de su estabilidad diversos aminoácidos y aminas primarias (45) :



XXXV



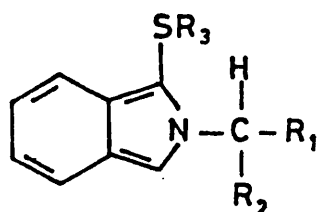
XXXVI

Esquema 8

Más tarde, Stobaugh y col. (38) evaluaron cuantitativamente la estabilidad cinética de diversos isoindoles. El examen de las constantes de velocidad,  $k^{\text{obs}}$ , reveló que se producían ligeros incrementos de la estabilidad al aumentar el tamaño de los N-sustituyentes (Tabla 4, b>a) y al contener estos sustituyentes una sustitución adicional en el C-10 (f>d y e>c). Un aumento adicional de la estabilidad lo produce la presencia de un grupo carboxilo en la amina, aumentando la estabilidad al aproximarse este grupo al C-10 (a-->d). Así, los  $\alpha$ -aminoácidos tienden a formar isoindoles más estables que las otras aminas estudiadas.

Anteriormente, Lindroth y Mopper (5) sugirieron, que el efecto estabilizador del grupo carboxilo de los aminoácidos se debe a un efecto electrodonante en la posición C-10. Sin embargo, los resultados de Stobaugh y col. (38), junto con los de otros autores (36)(71), indican que el aumento en la estabilidad es debido predominantemente a factores estéricos. Además el valor de Hammett,  $\sigma$ , para un grupo carboxilo es casi nulo.

Tabla 4. - Constantes de velocidad de primer orden y tiempos de vida media para la degradación de los isoindoles derivados de OPA-ME y aminas primarias ( $R_2 = -CH_2CH_2OH$ ) (38).

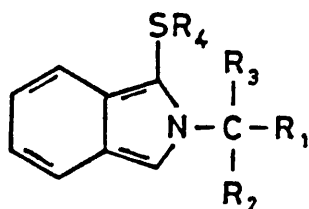


Isoindol	$R_1$	$R_2$	$k^{d.o.b.s.}$ ( $\text{min}^{-1}$ )	$t_{1/2}$ (min)
a	-H	$-CH_2CH_3$	38.0	18.2
b	-H	$-CH_2CH_2CO_2H$	32.9	21.1
c	-H	$-CH_2CO_2H$	27.8	24.9
d	-H	$-CO_2H$	22.5	30.8
e	$-CH_3$	$-CH_2CO_2H$	12.0	57.8
f	$-CH_3$	$-CO_2H$	7.0	98.9

Jacobs y col. (39), al examinar la estabilidad de una serie de derivados variando sistemáticamente la amina, observaron que la introducción de ramificaciones en la cadena lateral de la amina produce un gran efecto estabilizante, y que la magnitud de la estabilización aumenta al aproximarse la ramificación al anillo isoindol. Además, un aumento lineal de la extensión de la cadena, sin ramificación alguna, origina una disminución en un factor de dos en la velocidad de degradación por grupo metileno (Tabla 5, a, b, e, h). Finalmente, el comportamiento de los derivados de los aminoácidos (Tabla 5, j-m) es paralelo al de las alquilaminas, produciéndose una drástica disminución en la velocidad de degradación con la ramificación en la posición  $\alpha$  (j  $\rightarrow$  k  $\rightarrow$  l), y una disminución en un factor de dos por cada carbono adicional (j  $\leftarrow$  m).

Por otro lado, las constantes de velocidad obtenidas con etilaminas-2-sustituídas muestran también que la inhibición de la degradación es producida por efectos estéricos (Tabla 6).

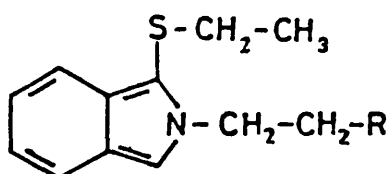
Tabla 5. - Constantes de velocidad de primer orden y tiempos de vida media para la degradación de los isoindoles derivados de OPA-ET y aminas primarias ( $R_4 = -CH_2CH_3$ ) (39).



Isoindol	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	$k^{d.e.s.} \times 10^2$ (min <sup>-1</sup> )	$t_{1/2}$ (min)
a	-H	-H	-H	31.6 ± 0.6	2.2
b	-H	-CH <sub>3</sub>	-H	12.0 ± 0.4	5.8
c	-CH <sub>3</sub>	-CH <sub>3</sub>	-H	0.33 ± 0.03	210
d	-CH <sub>3</sub>	-CH <sub>3</sub>	-CH <sub>3</sub>	*	-
e	-H	-CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	-H	5.69 ± 0.04	12.2
f	-H	-CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	-H	2.3 ± 0.2	30
g	-H	-C(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>	-H	0.33 ± 0.06	210
h	-H	-CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	-H	3.15 ± 0.08	22.0
i	-H	-CH <sub>2</sub> CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	-H	1.7 ± 0.1	41
j	-H	-CO <sub>2</sub> H	-H	5.4 ± 0.02	12.8
k	-CH <sub>3</sub>	-CO <sub>2</sub> H	-H	0.14 ± 0.02	480
l	-CH <sub>3</sub>	-CO <sub>2</sub> H	-CH <sub>3</sub>	*	-
m	-H	-CH <sub>2</sub> CO <sub>2</sub> H	-H	3.41 ± 0.02	20.3

\* No se observan cambios a las tres horas.

Tabla 6. - Constantes de velocidad de primer orden y tiempos de vida media para la degradación de los isoindoles derivados de OPA-ET y etilaminas-2-sustituídas (39).



Isoindol	R	$k_{obs} \times 10^2$ ( $\text{min}^{-1}$ )	$t_{1/2}$ (min)
a	-H	12.0 $\pm$ 0.4	5.8
b	-OH	5.88 $\pm$ 0.08	11.8
c	-CH <sub>3</sub>	5.69 $\pm$ 0.04	12.2
d	=CH <sub>2</sub>	4.40 $\pm$ 0.02	16
e	-CO <sub>2</sub> H	3.41 $\pm$ 0.02	20.3
f	-OCH <sub>3</sub>	3.30 $\pm$ 0.2	21
g	-C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	1.07 $\pm$ 0.05	64.7
h	-C(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>	0.33 $\pm$ 0.06	210

Sin embargo, en ocasiones la obtención de un isoindol más estable viene acompañada de una disminución de la velocidad de formación (t-butilamina, XXXV y  $\alpha$ -metil-L-tirosina) y de una intensidad de fluorescencia menor (t-butilamina y ciclooctilamina, XXXVI) (45). La disminución de la fluorescencia también ha sido observada por Cronin y Hare (14) con el ácido  $\alpha$ -aminoisobutírico, isovalina y t-butilamina, que carecen de hidrógeno en la posición  $\alpha$ .

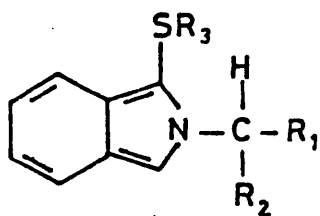
I.2.2.- Efecto de la estructura del tiol sobre la estabilidad

El tiol más utilizado en la derivatización de aminoácidos es el ME. Sin embargo, en múltiples ocasiones se ha sugerido su sustitución por otros tioles, con el fin de aumentar la estabilidad de los isoindoles. Son muchos los tioles que producen isoindoles fluorescentes, aunque en algunos casos la fluorescencia obtenida es menor que con ME (ditiotreitól y ET) y en otros, se forman compuestos no fluorescentes (metilmercaptoacetato y ácido mercaptosuccínico) (10)(15).

Aunque el 2-metil-2-propanotiol produce isoindoles mucho más estables que ME o ET, los derivados formados presentan un rendimiento cuántico de fluorescencia muy bajo, por lo que se recomienda su detección electroquímica (los isoindoles sufren oxidación anódica a un potencial moderado) (72).

Jacobs y col. (39) observaron que los derivados del ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA) son más estables al aumentar la ramificación en la posición  $\alpha$  del tiol (Tabla 7), lo que parece confirmar que el factor determinante de la estabilidad es el volumen del tiol (c $\leftrightarrow$ d). Por otro lado, en la Tabla 7 se observa que el aumento de estabilidad conseguido con ET (b) respecto a ME (e) no es importante.

Tabla 7. - Constantes de velocidad de primer orden y tiempos de vida media para la degradación de los isoindoles derivados del ácido  $\gamma$ -aminobutírico ( $R_1 = H$  ;  $R_2 = -CH_2CH_2CO_2H$ ) (39).



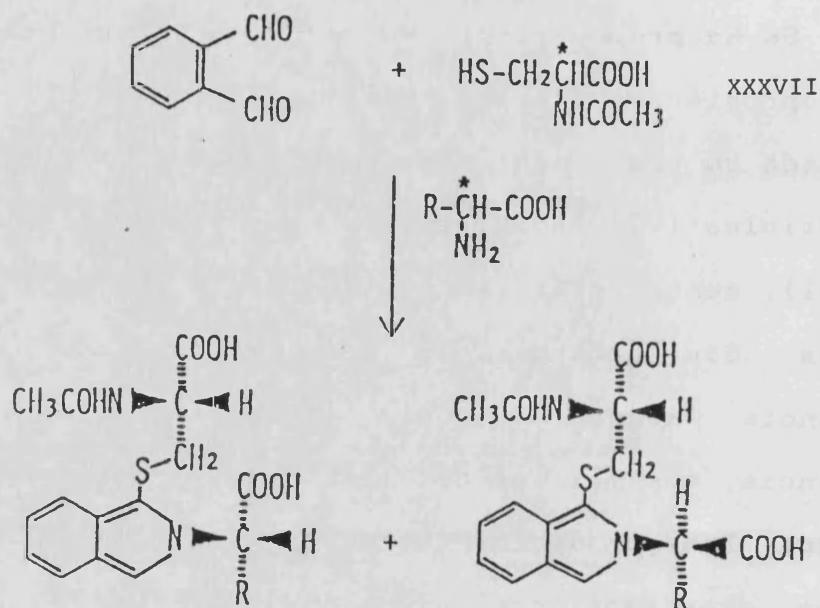
Isoindol	$R_2$	$k^{d.o.b.} \times 10^2$ ( $\text{min}^{-1}$ )	$t_{1/2}$ (min)
a	$-CH_3$	$7.7 \pm 0.2$	9.0
b	$-CH_2CH_3$	$5.96 \pm 0.08$	11.6
c	$-CH(CH_3)_2$	$2.7 \pm 0.6$	25
d	$-C(CH_3)_3$	$0.17 \pm 0.02$	410
e	$-CH_2CH_2OH$	$8.7 \pm 0.2$	8.0

Sin embargo, Simons y Johnson (12) sugirieron el uso de ET como sustituto de ME, debido a que en general los isoindoles derivados de ET son más estables (12)(15)(73). El aumento de estabilidad de dichos derivados ha sido comprobado recientemente por Stobaugh y col. (58) para diversos aminoácidos. Estos autores observaron que el uso de ET ofrece un incremento de más de 5 veces en la estabilidad de los aminoácidos que forman derivados particularmente inestables con ME (GABA,  $\beta$ -alanina, glicina, ácido  $\beta$ -aminobutírico y alanina). Sin embargo, uno de los inconvenientes del ME, su desagradable olor, se ve aumentado con el ET, debido a su mayor volatilidad.



Se ha propuesto el uso de otros tioles como el ácido 3-mercaptopropiónico (74-75) y el tioglicerol (76), pero no se ha extendido su uso. También se ha estudiado la posibilidad de usar ariltioles (77) (bencilmercaptano, tiofenol y trifenilmetanotiol), menos volátiles que ME, en la formación de los isoindoles. Sin embargo, el bencilmercaptano no origina fluorescencia alguna y el tiofenol, aunque produce fluorescencia, sus máximos de excitación y emisión parecen indicar que los productos formados son distintos de los isoindoles obtenidos con alquiltioles. Por último, la formación de derivados con trifenilmetanotiol es muy lenta, incrementándose la intensidad de fluorescencia en un factor de cinco a lo largo de un período de tres horas.

La N-acetil-L-cisteína (NAC) (XXXVII) ha sido empleada en la derivatización pre- y post-columna de aminas primarias y aminoácidos y, por ser un tiol ópticamente activo, permite la separación de compuestos enantiómeros al formar isoindoles diastereoisómeros (Esquema 9) (78-83). Los derivados de la cisteína se encuentran entre los pocos mercaptanos quirales de que se puede disponer en una forma ópticamente pura.

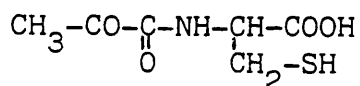


Esquema 9

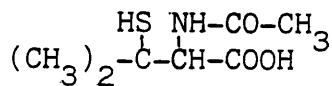
Los espectros de excitación y emisión, así como la intensidad de fluorescencia de los derivados de OPA-NAC es casi idéntica a la de los derivados de OPA-ME, completándose la reacción antes de dos minutos. La fluorescencia de los isoindoles formados es estable al menos durante 10-30 min, incluyendo el derivado de la glicina, que es el más susceptible de autooxidación (41).

Por otra parte, el reactivo NAC origina una intensidad de fluorescencia mayor que el ME en la determinación de iminoácidos previamente oxidados con NaClO, lo que puede ser debido a la alta estabilidad de los isoindoles cisteínicos frente a la oxidación. De este modo, es posible la determinación simultánea de aminoácidos e iminoácidos con sensibilidades del mismo orden (82)(84).

El NAC es un reactivo sólido, comercializado y relativamente económico, presentando un olor apenas apreciable en contraposición a los tioles normalmente usados. Además, el reactivo OPA-NAC y los derivados formados son más estables que los correspondientes al ME y ET. Otros derivados de cisteína que han sido utilizados son la Boc-L-cisteína (N-terbutiloxi-carbonil-L-cisteína) (XXXVIII) (83) y N-acetil-D-penicilamina (XXXIX) (85). La resolución obtenida con NAC es peor que con Boc-L-cisteína, sin embargo, este último presenta la desventaja de no estar comercializado (83).



XXXVIII

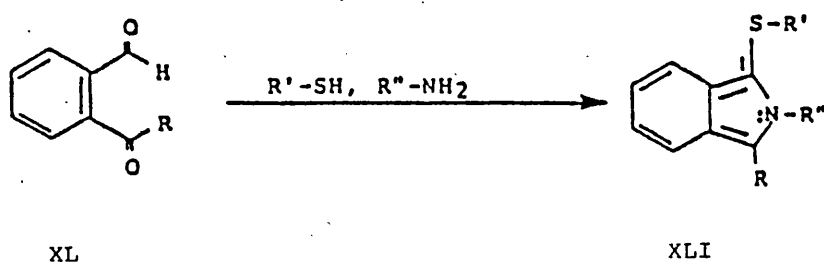


XXXIX

Recientemente se han publicado un par de trabajos en los que los derivados de aminoácidos DL con OPA y NAC se separan mediante cromatografía en fase inversa, utilizando como fase móvil L-prolina y Cu(II). Los isómeros ópticos se separan como complejos mixtos diastereoisómeros de Cu(II)-L-prolina (86-87).

I.2.3.- Utilización de sustitutos de o-ftaldehido

El mínimo requisito estructural para que un reactivo condense con una amina primaria y un tiol es la presencia de la agrupación o-diacilbenceno, en la cual al menos un grupo carbonilo sea aldehídico. Así, los o-cetobenzaldehidos (XL) pueden resultar adecuados. Además, estos compuestos producirían isoindoles 1,2,3-trisustituídos, (XLI) (Esquema 10), que presumiblemente ofrecerían una mayor protección ante la oxidación que la que proporciona el OPA. El o-acetilbenzaldehido (ABA) (XL<sub>a</sub>) y o-benzoilbenzaldehido (OBB) (XL<sub>b</sub>) fueron seleccionados para comprobar la estabilidad de los derivados formados (24).



- |         |                     |
|---------|---------------------|
| a.- ABA | R = CH <sub>3</sub> |
| b.- OBB | R = Ph              |
| c.- OPA | R = H               |

Esquema 10

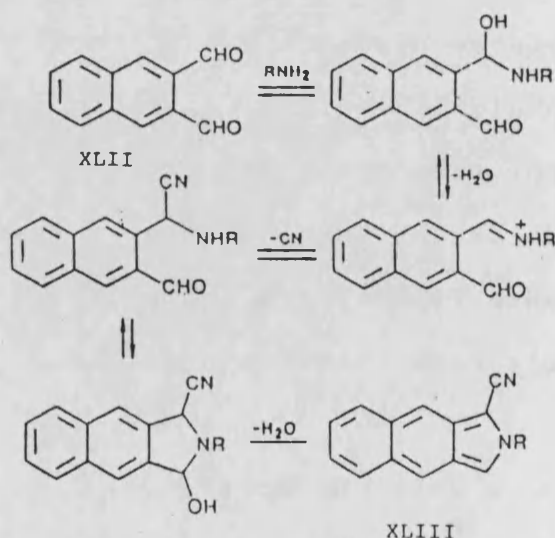
Se realizaron estudios cinéticos utilizando GABA. La formación del isoindol a partir de OBB mostró una cinética de pseudo-primer orden en presencia de un exceso de OBB y ET. Sin embargo, la degradación del isoindol no siguió una cinética de primer orden en estas condiciones. Esta cinética de degradación es característica de la autooxidación de un radical libre, en la que existe un período de inducción, seguido de la aceleración de la descomposición.

El isoindol derivado de OBB es apreciablemente más estable que el derivado de ABA (y éste a su vez es más estable que el de OPA), aparentemente debido a una combinación de efectos estéricos, electrónicos y de resonancia, ejercidos por el sustituyente fenilo en la posición 3. Por otro lado, la velocidad de formación del isoindol a partir de OBB es mucho menor que con OPA o ABA, lo que puede ser debido al impedimento estérico del grupo fenilo, que reduce la posibilidad de ataque nucleofílico intramolecular por la amina secundaria del  $\alpha$ -alquilbencilsulfuro (Esquema 2, X) o a la estabilización por resonancia del reactivo. Así, aunque el isoindol derivado de OBB es considerablemente más estable que el de ABA, la lenta velocidad de formación del primero lo hace menos recomendable como reactivo analítico.

Basándose en el hecho de que la estabilidad de los isoindoles frente a la autooxidación (88) y al ataque electrofílico en las posiciones 1 y 3 (58) se incrementa cuando el isoindol posee sustituyentes fuertemente

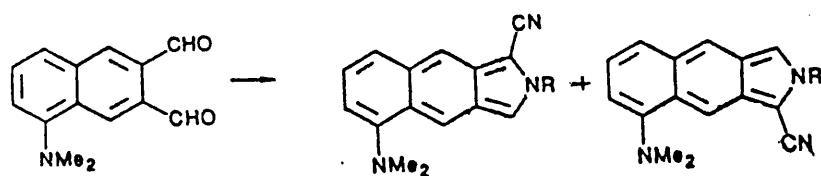
electroatrayentes, se ha propuesto la sustitución del tiol por otros nucleófilos tales como  $N_3^-$ ,  $SCN^-$ ,  $HSO_3^-$  y  $CN^-$ . Sin embargo, al utilizar alanina como amina primaria solo el  $CN^-$  y  $HSO_3^-$  formaron derivados fluorescentes. Se observó un aumento de estabilidad en el derivado de  $CN^-$  con respecto al derivado de ME, sin embargo, el primero presentó una intensidad fluorescente menor (89).

La sustitución de OPA por 2,3-naftaléndicarboxialdehído (NDA) (XLII) en la derivatización de aminoácidos con  $CN^-$  origina derivados 1-cianobenz(f)isoindolol (XLIII), que presentan mayor fluorescencia que los derivados de OPA y ME (89-93). Por el contrario, la utilización de NDA y ME produce derivados inestables y muy poco fluorescentes. El Esquema 11 muestra el posible mecanismo de formación de los derivados de NDA y  $CN^-$ .



Esquema 11

También se ha estudiado el 5-(N,N-dimetilamino)-2,3-naftaléndicarboxaldehido (XLIV), debido a su mayor solubilidad y a la posibilidad de incrementar la fluorescencia de los derivados con  $\text{CN}^-$ . Sin embargo, la reacción origina dos isoindoles isoméricos (91) (Esquema 12).



XLIV

Esquema 12

I.3.- DETERMINACION DE LISINA, AMINAS SECUNDARIAS, CISTINA Y CISTEINA CON O-FTALDEHIDO

I.3.1 - Determinación de lisina y aminos secundarias

En presencia de un exceso del reactivo OPA-ME, la lisina forma un derivado que posee dos grupos isoindol, debido a la existencia en la molécula del aminoácido de dos grupos amino terminales. Chen y col. (10) valoraron lisina con el reactivo OPA-ME. Cuando el grado de sustitución era  $\delta^x < 1$ , se encontró que la intensidad fluorescente era similar a la obtenida con otros aminoácidos, sin embargo cuando  $\delta^x > 1$ , la fluorescencia disminuyó, llegando a ser la décima parte de la de otros aminoácidos en la lisina disustituída.

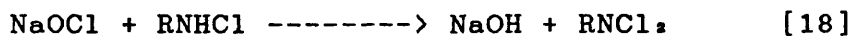
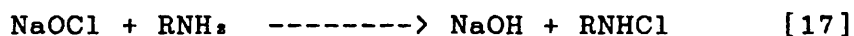
Sin embargo, la fluorescencia de la lisina disustituída aumenta en presencia de un agente tensioactivo aniónico como el dodecil sulfato sódico (DSS) (10)(94), observándose el mismo efecto con un tensioactivo no iónico (95). Así, es probable que la extinción de la fluorescencia sea debida a la interacción de los dos grupos isoindol de la lisina y que el tensioactivo facilite su separación.

Por otro lado, las aminos secundarias tales como la prolina e hidroxiprolina no pueden determinarse directamente con el reactivo OPA-ME, sino que previamente deben oxidarse a aminos primarias. Para ello se han empleado reactivos como la cloramina T y especialmente el hipoclorito sódico (2)(11)(30).

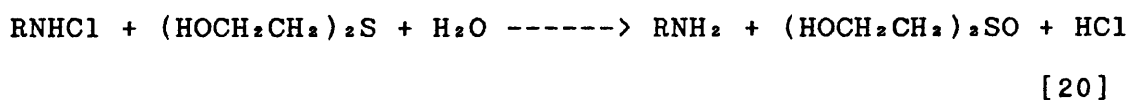
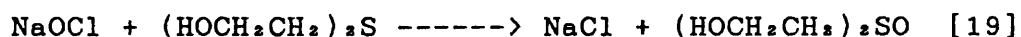


Sin embargo, la mayor desventaja del procedimiento es su baja sensibilidad, aproximadamente diez veces menor que la obtenida con las aminas primarias. Esto puede ser debido a la conversión incompleta a amina primaria o a una reacción incompleta entre la amina primaria formada y el OPA, causada por la interferencia del exceso de oxidante (96).

El exceso de hipoclorito es capaz de clorar a las aminas primarias formando cloraminas [17-18] y de oxidar al OPA y al ME.



Sin embargo, la sensibilidad de la reacción aumenta por adición de 2,2'-tiodietanol, que probablemente reacciona con el exceso de hipoclorito [19] y convierte las monocloraminas en aminas primarias [20] .



I.3.2.- Determinación de cistina y cisteína

El derivado que forman la cistina y cisteína con el reactivo OPA-ME es mucho menos fluorescente que el que forman la mayoría de los aminoácidos (en proporciones equimolares es alrededor de 40 veces menos fluorescente), por lo que este reactivo no es en principio adecuado para la determinación de cistina y cisteína en proteínas, considerando además su bajo contenido en las mismas.

El hecho de que la cisteína, en oposición a otras aminas primarias, dé lugar a un producto débilmente fluorescente, aunque no ha sido completamente explicado, parece ser debido a la presencia del grupo tiol en la molécula de cisteína, el cual compite intramolecularmente con el ME por la posición 1 en el isoindol (I) (97-98). Cuando la cistina reacciona con el reactivo OPA-ME, debido a las condiciones reductoras del medio, se forma el derivado de la cisteína.

Sin embargo, algunos derivados cisteicos, al reaccionar con OPA-ME originan una fluorescencia superior a la producida por la cistina y cisteína (Tabla 8) (2). Así, la S-carboximetilcisteína, el ácido cisteico y la S-3-sulfopropilcisteína dan lugar a una fluorescencia 40-80 veces superior a la que origina la cisteína, por lo que cistina y cisteína pueden determinarse si previamente se transforman en estos derivados cisteicos.

Tabla 8. - Formación de isoindoles fluorescentes con derivados cisteicos (2).

Reactivo derivatizante	Derivados cisteicos	I <sub>F</sub> <sup>a</sup>
-	Cisteína	0.5
-	Cistina <sup>b</sup>	1.0
4-Vinilpiridina	S-β-(4-piridiletil)cisteína	2.5
Ditiotreitol y tetracionato sódico	S-sulfocisteína	2.9
Etilamina	S-2-aminoetilcisteína	19.9
Acido iodoacético	S-carboximetilcisteína	22.9
Acido perbórmico	Acido cisteico	34.8
Tri-n-butilfosfina y 1,3-propanosulfona	S-3-sulfopropilcisteína	43.6

<sup>a</sup> Se comparan concentraciones equimolares

<sup>b</sup> La concentración de cistina es la mitad que la de los otros compuestos, debido a su estructura dimérica.

En los análisis de aminoácidos totales en proteínas, en los que cistina y cisteína se determinan como ácido cisteico, la oxidación con ácido perbórmico se lleva a cabo a 0°C durante dos horas y media, previamente a la hidrólisis ácida con ácido metanosulfónico (42)(97)(99-100). Desafortunadamente, durante el tratamiento con ácido perbórmico, no sólo se destruyen los puentes disulfuro de la cistina, sino que también se origina la destrucción de triptófano, tirosina, valina e histidina (99)(101); aunque esto último se minimiza por adición de agentes reductores o diluyendo la mezcla de reacción con agua, seguida de liofilización (102).

Bermúdez y col. (103) propusieron un método para la determinación fluorimétrica de mezclas de glicina y cisteína con OPA-ME, utilizando un montaje FIA. En el procedimiento propuesto, la cisteína es oxidada a ácido cisteico con  $KIO_3$ , con lo que su fluorescencia aumenta en gran medida, mientras que la glicina no es afectada por el oxidante. Se consigue la resolución de la mezcla de aminoácidos a partir de las señales obtenidas en presencia y en ausencia de oxidante.

Sin embargo, la derivatización de cistina y cisteína con el reactivo OPA-ME tras su oxidación, no presenta en general una buena reproducibilidad, dado el carácter opuesto de las reacciones de formación de ácido cisteico (oxidación) y obtención de los isoindoles (reducción). Además, el análisis total de aminoácidos requiere la obtención de al menos dos hidrolizados, uno en presencia de ácido perbromico y otro en su ausencia (100). Obviamente, es deseable la existencia de unas condiciones experimentales para el análisis de todos los aminoácidos a partir de un solo hidrolizado.

Lee y Drescher (97) propusieron un método en el que, previamente a la adición del reactivo OPA-ME, el grupo tiol de la cisteína es bloqueado por reacción con 1,3-propanosulfona para formar S-3-sulfopropilcisteína. Para determinar cistina, ésta se reduce a cisteína con tri-n-butilfosfina. La 1,3-propanosulfona reacciona

específicamente con la cisteína bajo condiciones suaves, de modo que otros aminoácidos no resultan afectados (la mezcla de reacción se mantiene bajo atmósfera de N<sub>2</sub> a 25°C durante 2 h). La sulfopropilación, seguida de hidrólisis con HCl, condujo a buenos resultados para todos los aminoácidos, excepto triptófano que se destruyó completamente, probablemente debido a la acción del HCl. Por el contrario, la hidrólisis con ácido metanosulfónico originó unos resultados aceptables para el triptófano (recuperación del 80%) y excelentes para los demás aminoácidos. Además, el método es directo: la reducción, alquilación e hidrólisis se realizan en el mismo tubo de hidrólisis. Sin embargo, debido al posible carácter cancerígeno de la 1,3-propanosulfona, se deben tomar precauciones especiales de aislamiento durante el tratamiento.

El bloqueo del grupo tiol con el ácido iodoacético para formar S-carboximetilcisteína, produce un compuesto con una intensidad fluorescente similar a la de los derivados de otros aminoácidos con OPA-ME (98). El procedimiento es rápido y permite la determinación de cisteína en suero y orina, tras la separación de su derivado con OPA-ME mediante HPLC. El uso de reactivos como iodoacetamida y acrilonitrilo para bloquear el grupo tiol también permite la formación de otros derivados con OPA-ME, que son adecuados para la determinación de cistina y cisteína (98).

El bloqueo del grupo amino de la cisteína permite que ésta actúe puramente como tiol. El NAC (XXXVII) ha sido utilizado como estándar interno en la determinación de tioles con OPA y taurina (104). La utilización de NAC en la derivatización de aminoácidos ha sido comentada en el apartado I.2.2 .

Un estudio interesante es el de Usher y col. (81), en el que hacen reaccionar  $\delta$ -(L- $\alpha$ -aminoadipil)-L-cisteinil-D-valina (ACV) con OPA en ausencia de un tiol; el análisis por HPLC mostró un solo pico a los 26 min . Por otro lado, cuando se cromatografió el derivado de OPA-NAC en las mismas condiciones, se obtuvo un pico principal a los 26 min y un segundo pico a los 28 min . Así, el pico a 26 min corresponde a un compuesto fluorescente, en el que el ACV proporciona los grupos amino y tiol, mientras que el pico a los 28 min corresponde a un isoindol, donde el ACV reacciona tan sólo por el grupo amino. Utilizando NAC más diluído, el grupo tiol del ACV compitió más favorablemente con el tiol externo y el pico a los 28 min disminuyó.

La cisteína puede también comportarse como tiol en su reacción con OPA y una amina primaria. Nakamura y col. (104) eligieron arbitrariamente taurina como amina primaria para la reacción fluorogénica, y aplicaron el método a la determinación de cisteína y otros tioles por cromatografía líquida con derivatización post-columna. La presencia de un

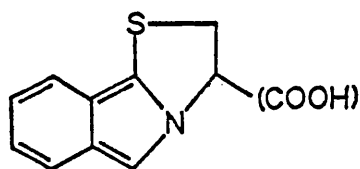
gran exceso de taurina impide que el grupo amino de la cisteína reaccione con el OPA. La mezcla de OPA y taurina da lugar a un color rojo que aumenta con el tiempo y disminuye la capacidad de inducir fluorescencia en los tioles, por lo que el eluato se debe mezclar en primer lugar con la disolución de OPA y luego con la taurina. La reacción se completa a los pocos segundos de añadir la taurina. Más tarde, estos autores desarrollaron otro procedimiento para determinar cisteína, donde la taurina fue sustituida por L-triptófano (45).

Una modificación de este procedimiento permite la determinación simultánea de tioles y disulfuros, tras su separación en una columna de intercambio iónico, reducción de los disulfuros con sulfito a pH 7 y derivatización de los tioles con taurina y OPA a pH 9-10 (105). En la columna, la cisteína se eluye conjuntamente con la cistina, sin embargo es posible la determinación diferencial omitiendo el sulfito en la post-columna. Un inconveniente del procedimiento es que una concentración de sulfito excesiva produce una disminución de la fluorescencia, debido probablemente al consumo de OPA por el bisulfito.

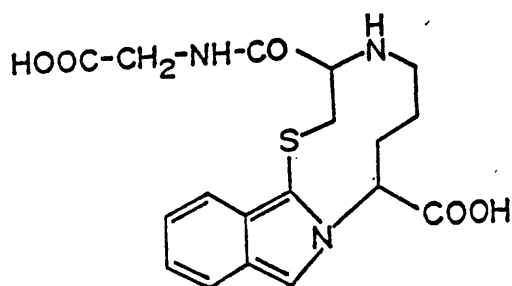
Sin embargo, otros aminoácidos y aminas primarias originan productos débilmente fluorescentes o no fluorescentes, cuando el ME se reemplaza por la cisteína (10)(45). Mopper y Delmas (106) propusieron un método para la determinación de trazas de tioles biológicos por cromatografía

líquida y derivatización pre-columna con OPA, en el que la taurina es sustituida por 2-aminoetanol. A una concentración alta de 2-aminoetanol ( $> 12$  mM) se observó una respuesta fluorescente más bien baja para la cisteína (unas 100 veces menor que con otros tioles), mientras que con una concentración de amina inferior a 1 mM la reactividad de la cisteína con OPA se mejoró drásticamente, pero el derivado eluyó junto con el volumen muerto.

La razón de este comportamiento puede ser la participación del grupo amino de la cisteína en la reacción, a una concentración baja de la amina. La posibilidad de que la cisteína pueda reaccionar a través de sus dos grupos funcionales (amino y tiol) para producir un fluoróforo del tipo de los isoindoles (XLV), tal como ocurre con el glutatión (XLVI), ha sido también sugerida por otros autores.



XLV

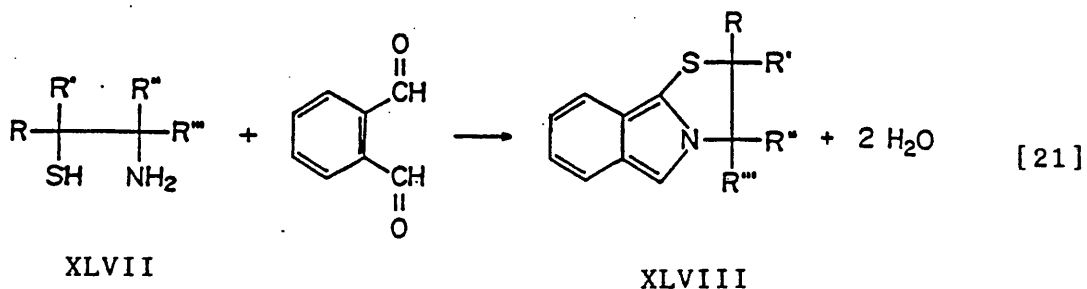


XLVI



Por otro lado, Nakamura y Tamura (104) no observaron fluorescencia al hacer reaccionar la cisteína con OPA a temperatura ambiente, en ausencia de otra amina primaria. Estos autores pensaron que ello era debido a la aparición de reacciones laterales, con formación de productos no fluorescentes, o a la ausencia de fluorescencia del isoindol formado, debido probablemente a la tensión resultante en el anillo de 5 miembros en comparación con el anillo de 10 miembros que origina el glutati6n .

Recientemente Metz y col. (107) encontraron que los  $\beta$ -aminotioles (XLVII) (incluyendo cisteína y  $\beta,\beta$ -dimetilcisteína) forman con OPA derivados fluorescentes en pocos segundos a 50°C (en ausencia de un tiol externo), y propusieron un método para la separación de estos compuestos con OPA por cromatografía líquida y derivatización post-columna. Además, determinaron las estructuras de los derivados fluorescentes formados, analizando sus extractos en cloruro de metileno mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS). Los análisis demostraron que el OPA reacciona selectivamente con los  $\beta$ -aminotioles para producir 2,3-dihidrotiazo(2,3a)isoindoles (XLVIII) [21], similares a los obtenidos con las aminas primarias y OPA en presencia de un tiol externo (I) (11-12)(21).



La cisteína formó un derivado fluorescente (  $\lambda_{\text{ex}} = 356 \text{ nm}$  ,  $\lambda_{\text{em}} = 438 \text{ nm}$  ), sin embargo, reiterados intentos para aislarlo fueron infructuosos, debido aparentemente a su rápida descomposición, como se comprobó por la pérdida de fluorescencia y cambios de color en los tres primeros minutos después de la salida de la columna. No obstante, por similitud con los otros  $\beta$ -aminotioles se propuso la estructura XLV.

También se ha observado que las proteínas en general producen productos fluorescentes con OPA en presencia y ausencia de ME. El rendimiento de la fluorescencia en ausencia de ME puede incrementarse por reducción previa de los puentes disulfuro a grupos tiol libres, y anularse por tratamiento previo de las proteínas con N-etilmaleimida, que bloquea los grupos tiol (108-109).

Resulta interesante señalar la acción interferente de la cisteína en la separación y determinación de 5-hidroxiindoles con OPA en medio HCl 8 M . En esta determinación se hace uso de diversos agentes reductores, entre los que se halla la cisteína, para prevenir la

autooxidación de los 5-hidroxiindoles (110-113). Sin embargo, la cisteína puede reaccionar con OPA para formar un producto fluorescente, por lo que se recomienda evitar su uso (111)(113). En un estudio realizado por Tachiki (111) se muestra cómo la cisteína presenta su máxima fluorescencia al calentarse con OPA en HCl 8 M durante 50 min a 82 °C.

Por último, recientemente se ha propuesto el uso del NDA (XLII) como reactivo alternativo al OPA para la determinación fluorimétrica específica de arginina en medio débilmente alcalino a 20°C ( $\lambda_{ex} = 462$  nm,  $\lambda_{em} = 520$  nm, tiempo de reacción 25 min) (114). La reacción no requiere de la adición de tiol, e incluso su presencia interfiere. Otros aminoácidos no presentan interferencia excepto la cisteína, debido a la presencia del grupo tiol, que debe ser bloqueado por tratamiento con N-etilmaleimida.

#### I.4.- DETECCION ESPECTROFOTOMETRICA DE LOS ISOINDOLES

La gran mayoría de los métodos existentes basados en la reacción del o-ftaldehído con las aminos primarias son fluorimétricos, sin embargo, la fuerte absorción de los derivados de OPA sobre 340 nm , permite también su determinación espectrofotométrica

El mayor uso de la fluorimetría en el análisis de aminoácidos con OPA se debe a que esta técnica es al menos un orden de magnitud más sensible que la espectrofotometría y sin embargo, en la reacción con OPA, esta última puede ser deseable en algunas ocasiones por diversas causas:

1.- Las absortividades molares de los isoindoles de distintos aminoácidos muestran menor variabilidad que los respectivos rendimientos cuánticos fluorescentes.

2.- En algunos casos pueden existir efectos de extinción de la fluorescencia, como ocurre con los péptidos, que presentan una intensidad de fluorescencia menor que la de los aminoácidos (10)(115-116), mientras que sus absortividades molares son similares (117).

3.- El método espectrofotométrico puede ser la única alternativa cuando no se dispone de un fluorímetro.

El método espectrofotométrico presenta un límite de detección para los aminoácidos de  $7 \times 10^{-6}$  M, ligeramente mayor que el obtenido con ninhidrina ( $2 \times 10^{-6}$  M); sin embargo, en comparación con la ninhidrina, el OPA presenta lecturas de absorbancia muy bajas ( $< 0.03$ ), y tanto el reactivo como el cromóforo son estables a temperatura ambiente, no requiriéndose su protección frente al oxígeno atmosférico; tampoco son necesarias unas etapas prolongadas de calentamiento y enfriamiento, como ocurre con la ninhidrina.

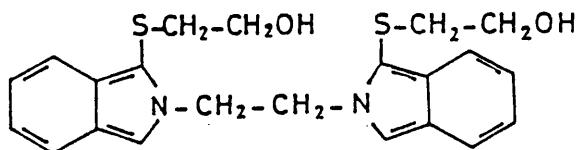
La sustitución en la posición 1 del isoindol no modifica la forma del espectro (29). Además, la naturaleza de la cadena lateral del aminoácido no parece alterar significativamente la absorptividad del derivado de OPA, siendo los valores de las absorptividades molares  $\sim 6000$  (10)(73)(117-118).

La reacción del OPA con las aminas primarias, en presencia de un tiol, es muy adecuada para seguir espectrofotométricamente la hidrólisis enzimática de péptidos. El procedimiento fluorimétrico con OPA no es tan práctico como el método espectrofotométrico, debido a la mayor variabilidad de los rendimientos cuánticos de los isoindoles formados. Se han descrito procedimientos para medir la hidrólisis de N-acil péptidos (73), la proteólisis de las proteínas lácticas (117) y un procedimiento general para medir los grupos amino liberados durante la proteólisis de proteínas (118). Sin embargo, la inestabilidad de los derivados obliga a controlar

estrictamente el tiempo de reacción. Las medidas espectrofotométricas se deben realizar a los 2 min, tiempo en el que se alcanza la máxima absorbancia.

También se ha utilizado la detección espectrofotométrica en HPLC. Así, muestras comerciales de gentamicina se analizaron con derivatización pre-columna, utilizando el reactivo OPA-ácido mercaptoacético (119) y aminoácidos con derivatización post-columna con OPA-ME (120). En el segundo caso, los autores indican que el procedimiento es adecuado para el análisis de aminoácidos en caldos de fermentación, pero la sensibilidad del procedimiento podría incrementarse en 2 ó 3 órdenes de magnitud con un detector fluorimétrico.

Por último, se han descrito métodos espectrofotométricos para la determinación de aminas primarias (bencilamina, feniletilamina, norefredina, ciclohexilamina, 4-aminociclohexanol, furfurilamina, N-butilamina y etanolamina) (121), ésteres de aminoácidos (122) y etilendiamina (123). Para esta última el máximo de absorción se sitúa sobre 430 nm ( $\epsilon = 5000$ ) y la estequiometría de la reacción es etilendiamina:OPA:ME 1:2:2 (XLIX).



XLIX

## II. - OBJETIVOS





La cisteína forma con el o-ftaldehido y mercaptoetanol un derivado mucho menos fluorescente que los isoindoles de otros aminoácidos, lo que imposibilita su determinación directa. Además, en presencia de estos reactivos, la cistina se reduce dando lugar al correspondiente derivado de cisteína.

La razón por la que, a diferencia de otros aminoácidos, la cistina y cisteína dan lugar a un derivado débilmente fluorescente no se conoce con exactitud. Sin embargo, se halla relacionada con la presencia del grupo tiol en la molécula de cisteína, que compite intramolecularmente con el mercaptoetanol. Por otra parte, es posible que el isoindol formado no sea estable y se descomponga rápidamente apenas formado.

Si se bloquea el grupo tiol de la cisteína, se obtienen isoindoles estables, mucho más fluorescentes; sin embargo, el procedimiento se complica excesivamente. Asimismo, se ha especulado sobre la formación de un isoindol por reacción simultánea de los dos grupos funcionales de la cisteína.

Por otra parte, si se bloquea el grupo amino de la cisteína, se obtienen compuestos que pueden utilizarse como tioles, para derivatizar aminas primarias con o-ftaldehído. Un ejemplo de ello es la N-acetil-L-cisteína. También existen evidencias de que la propia cisteína puede actuar exclusivamente como tiol en la derivatización de algunas aminas primarias. Sin embargo, esto se consigue tan sólo cuando la concentración de la amina primaria es elevada, lo que permite competir con el grupo amino de la cisteína.

Debido a la polémica existente, se consideró interesante clarificar algunos aspectos de la reactividad de la cisteína frente al o-ftaldehído, como son la obtención de un isoindol fluorescente en ausencia de otro tiol y su actuación exclusivamente como tiol en mezclas con otros aminoácidos.

El tiol más utilizado en la derivatización de aminoácidos con o-ftaldehído es el mercaptoetanol, sin embargo, su olor desagradable y la inestabilidad de los derivados formados han llevado a la búsqueda de otros tioles alternativos. La N-acetil-L-cisteína se ha propuesto recientemente para la separación de aminoácidos enantiómeros. Este reactivo presenta unas características muy adecuadas: es económico, no presenta olor y lo más importante, los isoindoles formados son muy estables. Sin embargo, su uso no se ha extendido.

No existen estudios cinéticos sobre los isoindoles formados con N-acetil-L-cisteína similares a los realizados con mercaptoetanol. Por ello se consideró interesante realizar un estudio comparativo de la velocidad de formación y degradación de los isoindoles obtenidos con ambos tioles. Estos estudios permiten demostrar la clara superioridad de la N-acetil-L-cisteína, y por lo tanto, pueden conducir al reemplazo definitivo del mercaptoetanol.

Además, la cistina es uno de los aminoácidos más difíciles de determinar en los fluidos biológicos, siendo importante disponer de métodos sencillos para su estimación, ya que algunas enfermedades están relacionadas con alteraciones en su concentración. Se han propuesto numerosos procedimientos para la determinación de cistina, que con frecuencia son complicados, poco selectivos y no conducen a buenos resultados. Por ello, se desarrollaron dos nuevos procedimientos basados en la reactividad de la cistina frente al o-ftaldehído que origina derivados distintos, que pueden ser interesantes para la determinación del aminoácido.

Por otra parte, la determinación de aminoácidos totales tiene un doble interés: Por un lado, algunas alteraciones metabólicas suelen ir acompañadas de un aumento generalizado de los aminoácidos libres en plasma y/o orina, y por otro, el análisis de proteínas sólo conduce a resultados aceptables si se determinan los aminoácidos liberados por hidrólisis de las mismas.

Los isoindoles formados por los distintos aminoácidos con el reactivo o-ftaldehido-N-acetil-L-cisteína son muy estables y presentan espectros de absorción con sensibilidades semejantes. Estos hechos sugirieron la conveniencia de utilizar el reactivo en la determinación de aminoácidos totales y proteínas. Se investigó también sobre la posible mejora de los resultados al utilizar factores de corrección, que tengan en cuenta, por una parte, las distintas absorktividades molares de los isoindoles, y por otra, la recuperación incompleta de algunos aminoácidos.

Por último, la N-acetil-L-cisteína es también utilizada como agente mucolítico, para reducir la viscosidad de las secreciones pulmonares. Sin embargo, los métodos de análisis descritos para su determinación en fármacos sólo parecen haberse aplicado a disoluciones acuosas del compuesto, en ausencia de posibles interferencias. Se investigó por ello sobre el empleo del o-ftaldehido y de una amina primaria en la determinación del tiol en distintos fármacos.

### III. - PARTE EXPERIMENTAL



### III.1.- REACTIVOS Y APARATOS

#### 1.- Reactivos

o-Ftaldehído (OPA) Serva para uso bioquímico. Se prepararon semanalmente disoluciones  $5 \times 10^{-2}$  M en etanol, conservándose en la oscuridad.

Tampon bórico-borato de pH 9.5 preparado a partir de  $H_3BO_3$  0.1 M (6.18 g/l) y NaOH 0.07 M (2.8 g/l).

L-cistina y L-cisteína Merck para uso bioquímico. Se prepararon disoluciones  $1 \times 10^{-2}$  M y  $2.5 \times 10^{-2}$  M , respectivamente, en HCl 0.05 M, guardándose en nevera a 4°C.

2-Mercaptoetanol Merck para síntesis. Se prepararon disoluciones  $7.2 \times 10^{-2}$  M en etanol.

N-Acetil-cisteína Fluka purísima. Las disoluciones se guardaron en nevera a 4°C .

DL- $\alpha$ -Alanina, L-arginina, L-asparagina, L-glutamina,  
L-histidina, L-isoleucina, L-leucina, DL-fenilalanina,  
L-prolina, L-serina, DL-triptófano, L-citrulina, L-norleucina,  
DL-norvalina ,  $\beta$ -alanina, ácido DL- $\beta$ -amino-butírico, ácido  
 $\gamma$ -amino-butírico Scharlau purísimo.

DL-valina Scharlau para uso bioquímico.

L-Acido aspártico y L-ácido glutámico Merck para análisis.

L-Metionina, L-tirosina y L-ornitina hidrocloreuro Merck para uso bioquímico.

Taurina y ácido DL-2-amino-butírico Merck para síntesis.

Glicina Carlo Erba puro.

L-Lisina monohidrocloreuro y L-treonina Fluka purísimo.

Los aminoácidos no solubles en medio neutro se prepararon en HCl 0.05 M.

Caseína hidrolizada, albúmina de suero bovino Fluka Biochemika, para microbiología.

Caseína libre de vitamina Serva para análisis.



2.- Aparatos

Potenciómetro Crison mod. Digilab 501 con electrodo combinado de vidrio.

Baño termostático Selecta Precis-Term mod. 138 .

Espectrofluorímetro Shimadzu de doble haz mod. RF-520 equipado con lámpara de xenon de 150 W y cubetas de cuarzo de 1 cm de paso óptico.

Espectrofotómetro Shimadzu mod. UV-240 provisto de unidad de programas mod. OPI-2 .



III.2.- ESTUDIOS SOBRE LA FORMACION DE UN  
PRODUCTO FLUORESCENTE POR REACCION DE  
LA CISTEINA CON O-FTALDEHIDO



### III.2.1.- INTRODUCCION

Nakamura y Tamura (104) indicaron que a temperatura ambiente y en ausencia de otra amina primaria, la cisteína no reacciona con OPA para formar un producto fluorescente. Posteriormente, Metz y col. (107) observaron que a 50°C se produce la reacción de la cisteína con el OPA para dar un fluoróforo con  $\lambda_{ex} = 356$  nm y  $\lambda_{em} = 438$  nm, que sin embargo se descompone rápidamente.

Inicialmente, quisimos comprobar si eran ciertas las observaciones de ambos autores. Efectivamente, a temperatura ambiente no se observó reacción alguna, mientras que al calentar durante algún tiempo, se formó un producto que presentaba una fluorescencia violeta, por lo que se procedió a optimizar las condiciones de formación de este compuesto.

### III.2.2.- ESPECTROS DE EXCITACION Y EMISION

Se preparó una disolución que contenía OPA en concentración  $2 \times 10^{-4}$  M, tampón bórico-borato de pH 9.5 y cisteína en concentración  $1 \times 10^{-6}$  M. La disolución se calentó a 60°C durante 75 min y, después de enfriar, se registraron los espectros de excitación y emisión frente a un blanco que contenía OPA y tampón en las mismas concentraciones.

En la Figura 1 se muestran los espectros de excitación y emisión del producto formado por reacción de la cisteína con el OPA, observándose un único máximo de excitación a 364 nm y un máximo de emisión a 424 nm .

Es interesante hacer notar que las condiciones experimentales utilizadas son similares a las empleadas por Metz y col. (107) en la formación del derivado OPA-cisteína (e.g. concentración de OPA y temperatura). Aunque estos autores no indicaron con claridad el pH al que verifican la reacción de derivatización post-columna, es posible que sea pH 9-9.5, ya que preparan el reactivo OPA en tampón bórico-borato de pH 10.5 y lo mezclan con el efluente en medio ácido débil.

Es por lo tanto sorprendente que estos autores obtuvieran un producto de reacción fluorescente en pocos segundos, que a continuación se descompuso muy rápidamente. La diferencia entre  $\lambda_{em}$  y  $\lambda_{ex}$  fue  $\Delta\lambda = 82$  nm para el compuesto obtenido por Metz y col., mientras que en este trabajo  $\Delta\lambda = 60$  nm . Los estudios que se muestran a continuación tuvieron como objetivo encontrar las condiciones óptimas para la obtención del derivado de cisteína, así como su posible estructura.

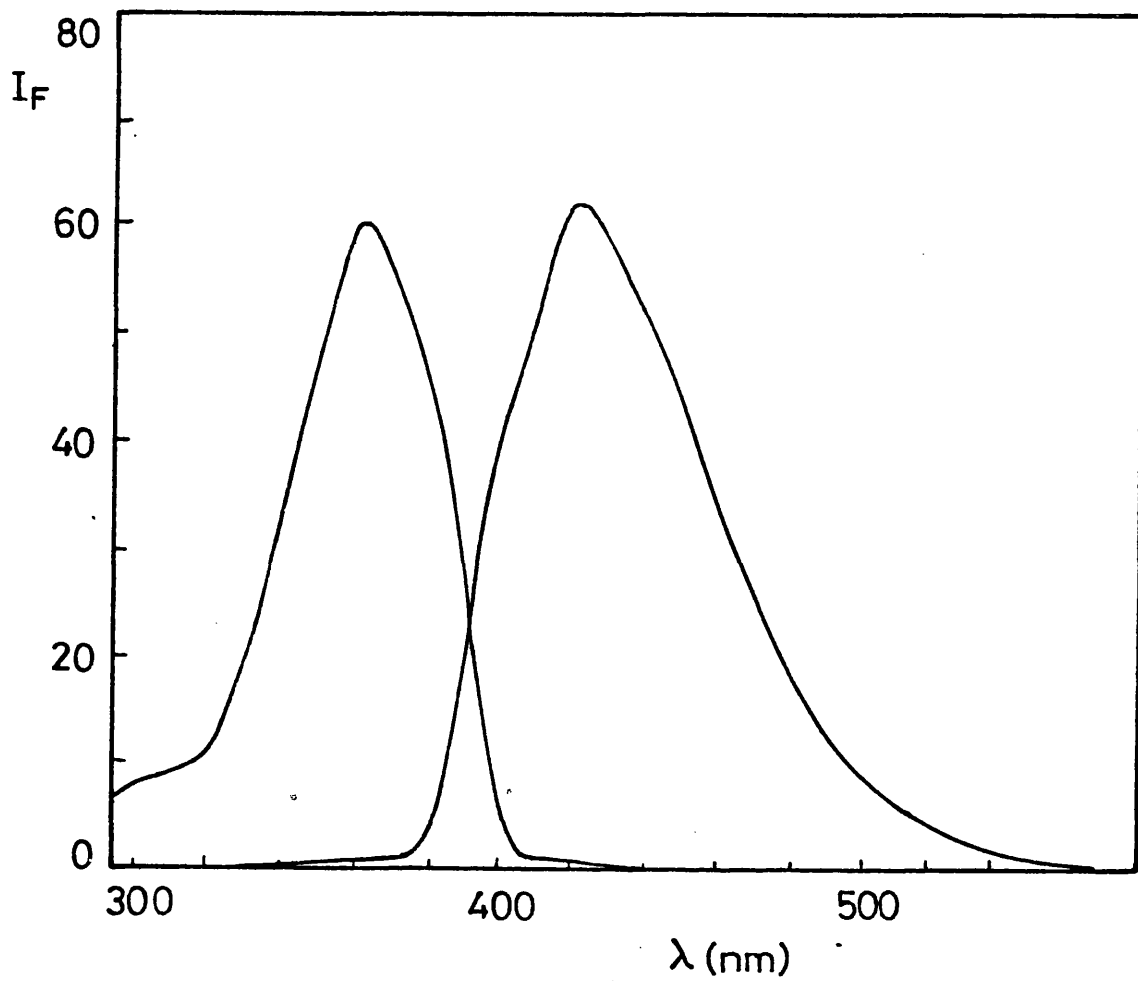


Figura 1. - Espectros de excitación y emisión del producto de reacción de la cisteína con el OPA en medio bórico-borato (pH 9.5), tras calentar 75 min a 60°C.

Cisteína =  $1 \times 10^{-6}$  M ;  $C_{OPA}$  =  $2 \times 10^{-4}$  M

### III.2.3.- OPTIMIZACION DE LAS CONDICIONES EXPERIMENTALES

#### 1.- Efecto de la temperatura sobre la formación del derivado

Dado que la reacción de la cisteína con el OPA presenta una cinética muy lenta, se llevó a cabo un estudio de la variación de la fluorescencia con el tiempo, calentando a distintas temperaturas. Para ello se prepararon disoluciones conteniendo cisteína  $5 \times 10^{-6}$  M , OPA  $2 \times 10^{-3}$  M y tampón bórico-borato de pH 9.5 . El blanco se preparó de la misma forma pero en ausencia de cisteína.

Las disoluciones se calentaron en un baño termostático, sacando alícuotas a diversos tiempos, y tras dejarlas enfriar a  $20^{\circ}\text{C}$  , se leyeron las intensidades de fluorescencia (  $\lambda_{ex} = 364$  nm y  $\lambda_{em} = 424$  nm).

Los resultados se indican en la Figura 2 , donde se observa la notable influencia que presenta la temperatura sobre la velocidad de la reacción. Así, cuando la disolución se calienta a  $50^{\circ}\text{C}$  , la fluorescencia aumenta gradualmente, alcanzándose una respuesta constante a partir de las  $3-3\frac{1}{2}$  h . A menor temperatura, la velocidad de la reacción es muy baja, mientras que a  $60^{\circ}\text{C}$  , a pesar del aumento en la velocidad de formación, el producto se descompone rápidamente.



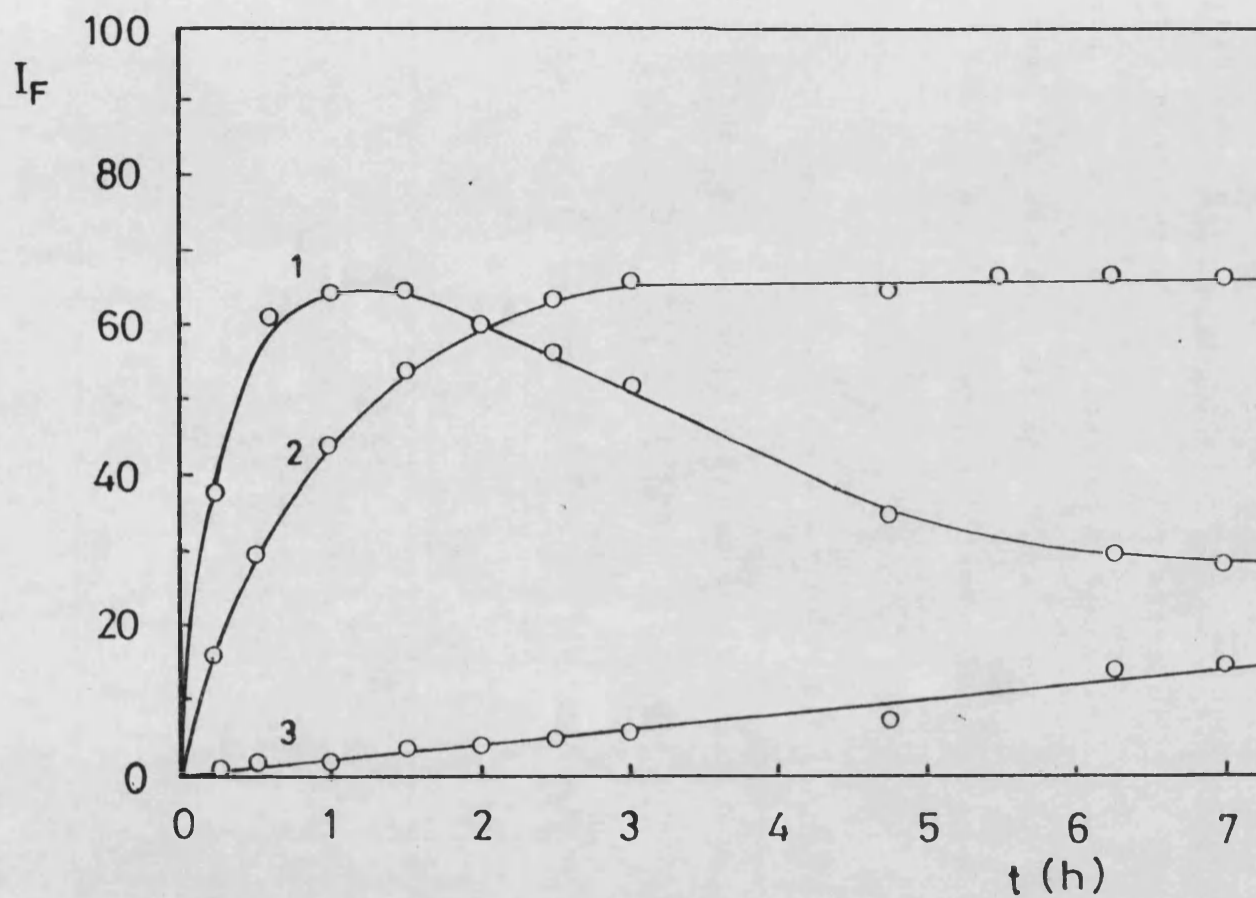


Figura 2. - Efecto de la temperatura sobre la formación del derivado de cisteína-OPA .

C<sub>cisteína</sub> =  $5 \times 10^{-6}$  M ; C<sub>OPA</sub> =  $2 \times 10^{-3}$  M  
 Temperatura: (1) 60° C ; (2) 50° C ; (3) 40° C

Por ello, en las experiencias posteriores se trabajó a 50°C , calentando durante 3 1/2 h . En estas condiciones y tras enfriar la disolución a temperatura ambiente, la intensidad de fluorescencia permaneció estable al menos durante 3 h , como se muestra en la Tabla 9. Sin embargo, durante la etapa de calentamiento, las variaciones de temperatura afectan notablemente a la reproducibilidad , por lo que debe controlarse estrictamente la temperatura del baño, que debe ser lo mas homogénea posible.

Tabla 9. - Estabilidad del compuesto formado a 50°C.

$C_{\text{cisteína}} = 5 \times 10^{-3} \text{ M}$  ;  $C_{\text{OPA}} = 2 \times 10^{-3} \text{ M}$

t (min)	I <sub>F</sub>
10	53.2
20	52.7
30	52.6
50	52.3
65	52.7
105	53.1
120	53.8
150	53.1
180	53.2

## 2.- Influencia de la acidez del medio

La acidez es una de las variables que deben controlarse en las reacciones en que interviene el OPA. Para realizar este estudio se preparó una serie de disoluciones conteniendo cantidades variables de HCl y NaOH , para abarcar un amplio intervalo de pH. La concentración de cisteína fue  $1 \times 10^{-6}$  M y la de OPA  $1.5 \times 10^{-3}$  M.

Los resultados se muestran en la Figura 3. Debido a la gran variación de la fluorescencia con el pH , que muestra un máximo en el intervalo de pH 9.3-10 , es necesario amortiguar la acidez del medio.

Se ensayaron dos sistemas amortiguadores: bórico-borato y bicarbonato-carbonato, obteniéndose las mismas lecturas de fluorescencia en ambos casos. Sin embargo, se eligió el primero, por ser el habitualmente utilizado en las derivatizaciones con OPA.

Se ha estudiado además la influencia de la fuerza iónica, resultando que ésta no afecta a la intensidad de fluorescencia.

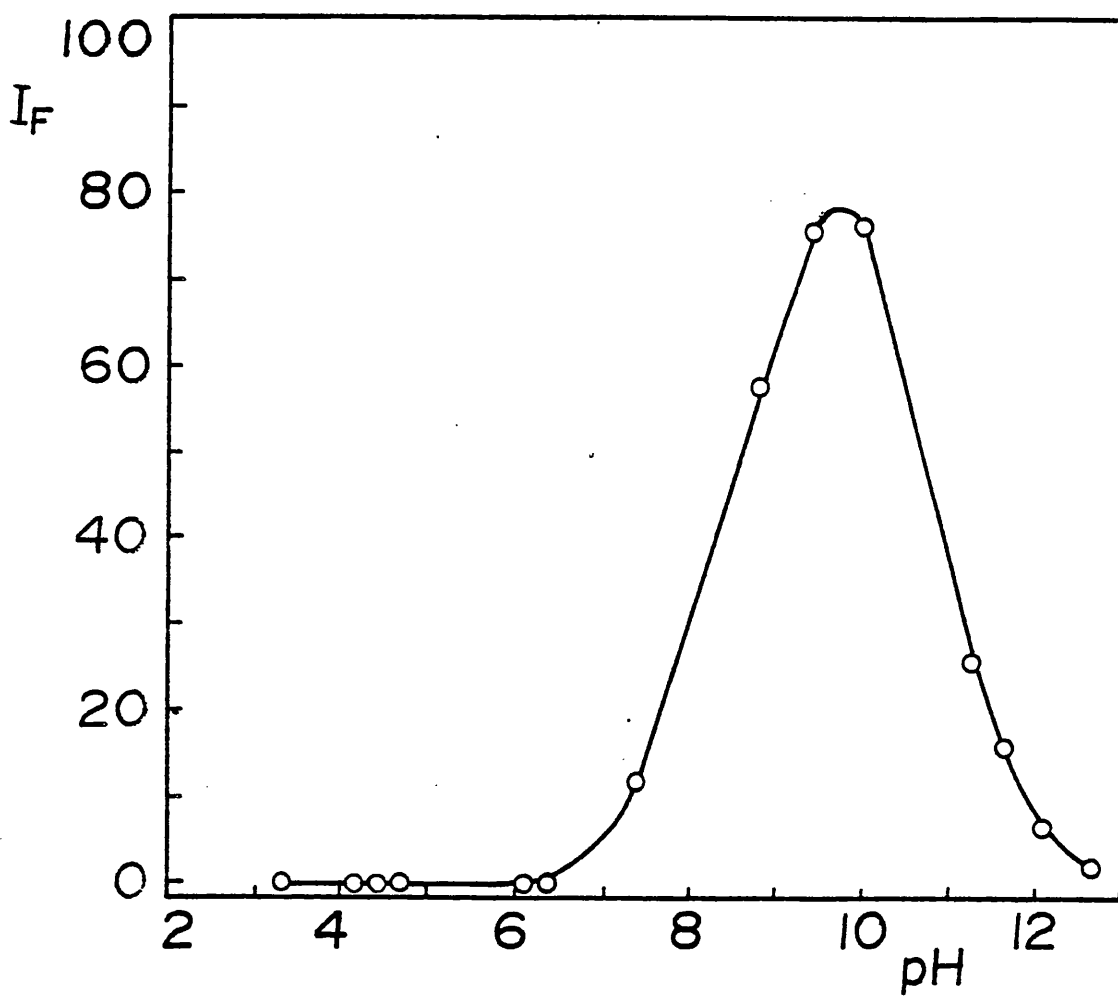


Figura 3. - Influencia del pH sobre la reacción de la cisteína con el OPA.

Cisteína =  $1.0 \times 10^{-3}$  M ; OPA =  $1.5 \times 10^{-3}$  M

### 3.- Influencia de la concentración de o-ftaldehido

Otro factor importante a considerar es la concentración de OPA. Para este estudio se preparó una serie de disoluciones conteniendo cisteína en concentración  $9.9 \times 10^{-7}$  M, tampón borato y cantidades variables de OPA, procediéndose de la forma habitual.

Dado que la disolución del reactivo se prepara en medio etanólico, se mantuvo constante la concentración de alcohol para evitar variaciones en la constante dieléctrica del medio.

Los valores obtenidos se representan en la Figura 4, resultando que a partir de una relación molar OPA/cisteína de 2000 la fluorescencia permanece constante. A pesar de la necesidad de utilizar un gran exceso de reactivo, el gasto del mismo es muy reducido, dado los niveles de cisteína que se determinan.

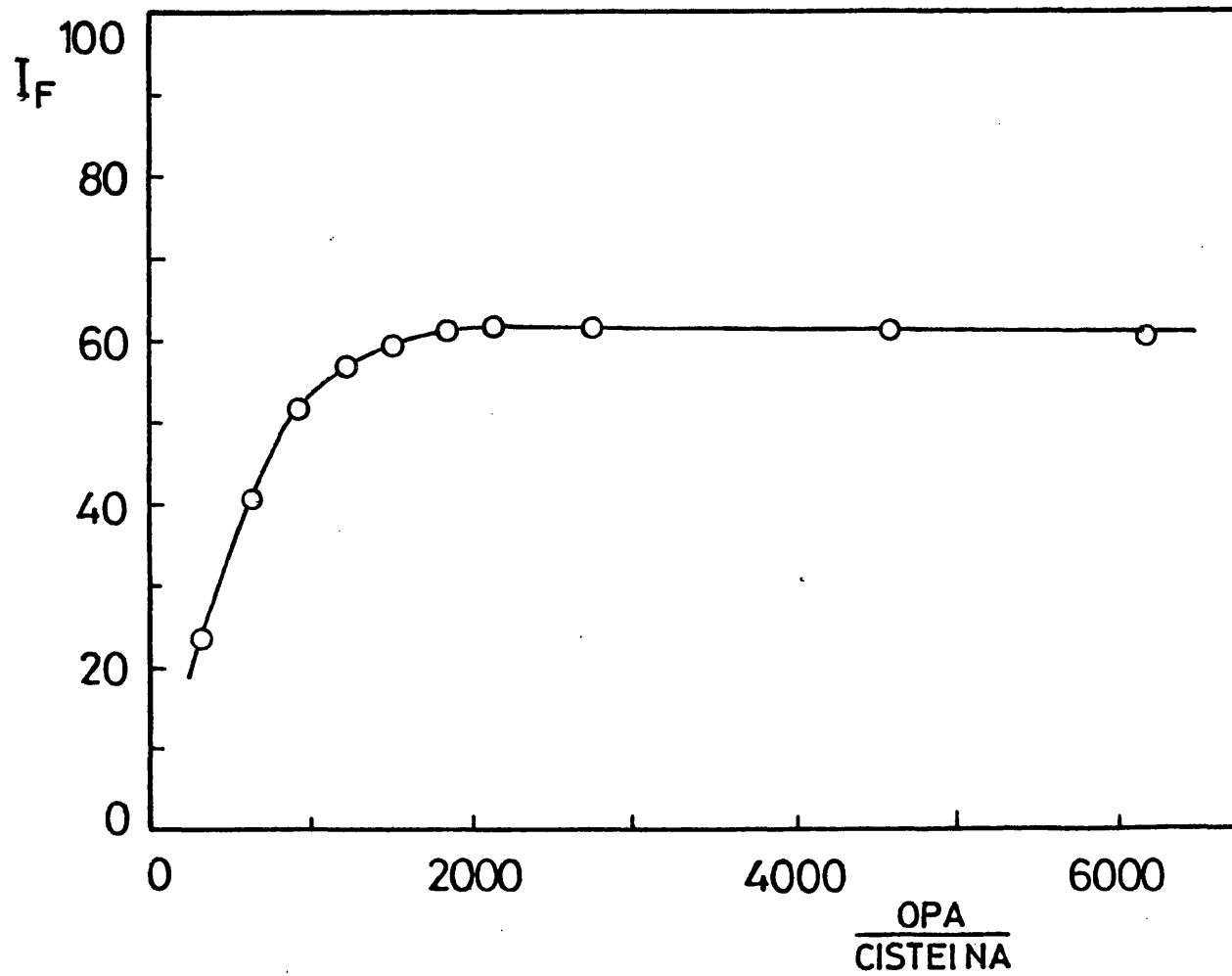


Figura 4. - Influencia de la concentración de o-ftaldehido sobre la reacción. En abscisas se representa la relación molar.

$C_{\text{cisteína}} = 9.9 \times 10^{-7} \text{ M}$

III.2.4.- DETERMINACION DE LA ESTEQUIOMETRIA DEL PRODUCTO DE REACCION DE LA CISTEINA CON O-FALDEHIDO

Para la determinación de la estequiometría del compuesto formado por reacción de la cisteína con el OPA, se utilizó el método de Asmus (124). Este método, llamado "método de la recta" se aplica usualmente a complejos de mediana estabilidad, pero presenta la limitación de ser útil sólo en el caso de que se forme un único producto de reacción. El método fue desarrollado para medidas espectrofotométricas.

Para aplicar el método de Asmus a una reacción del tipo:



se toman volúmenes constantes del compuesto C , v. , en concentración a. y volúmenes variables del reactivo, R , v , en concentración b. , aforando a un volumen constante, V. A partir de las expresiones de la constante de formación del derivado y de los balances de masa para cada uno de los reactivos se llega a la expresión:

$$\beta_n = \frac{A/\epsilon}{[a_0 - A/\epsilon][R]_n} \quad [23]$$

siendo A la absorbancia en el máximo,  $\epsilon$  la absortividad molar del compuesto P, [R] la concentración del reactivo, correspondiendo n a la estequiometría de la reacción.

Si la concentración de R es grande frente a la de C, se puede considerar que [R] = b. y reordenando los términos, se llega a la expresión:

$$\frac{1}{v^n} = \frac{a \cdot b \cdot v \cdot \epsilon \beta_n}{v^{n+1}} \times \frac{1}{A} - \left( \frac{b \cdot \epsilon}{v} \right)^n \beta_n \quad [24]$$

Por tanto, la representación de  $1/v^n$  para distintos valores de n frente a  $1/A$  permite conocer la estequiometría del derivado P, así como su constante de formación, ya que cuando n coincide con el coeficiente estequiométrico, la ecuación se ajustará a una recta.

Cuando se realizan medidas de fluorescencia, se puede sustituir en la expresión [24] el valor de la absorbancia por la intensidad de fluorescencia y la absortividad molar por la pendiente de la recta de calibrado. (I<sub>f</sub> vs C<sub>estefna</sub>) .



Para determinar la estequiometría del derivado de cisteína y OPA, se prepararon disoluciones que contenían cisteína en concentración  $9.92 \times 10^{-7}$  M, volúmenes variables de una disolución de OPA  $7.6 \times 10^{-2}$  M y tampón bórico-borato, procediendo del modo habitual.

Los resultados aparecen representados en la Figura 5. Como se observa, el derivado se forma por reacción de un mol de cisteína con un mol de OPA. La ecuación de la recta obtenida fue

$$\frac{1}{v} = -0.5362 + 60566 \frac{1}{I_r} \quad r = 0.9996$$

A partir de la ordenada en el origen se encontró un valor para la constante de formación,  $\log \beta_1 = 3.0$ , lo que explica el gran exceso de OPA, al menos 2000 veces superior a la cisteína, que se requiere para alcanzar una señal constante.

El hecho de que otros aminoácidos que no contienen el grupo tiol no conduzcan a productos fluorescentes con OPA, en ausencia de un tiol externo, indica la implicación del grupo tiol de la cisteína en la reacción. Así, el compuesto descrito por nosotros es muy probable que corresponda al isoindol (XLV), con una estructura similar a la identificada por Metz y col. (107) para la  $\beta, \beta$ -dimetilcisteína (D-penicilamina) (XLVIII).



Las distintas longitudes de onda de los máximos de excitación y emisión que muestra el isoindol de cisteína respecto a los de los derivados de otros aminoácidos, también se observa para otros  $\beta$ -aminotioles (Tabla 10).

**Tabla 10.** - Longitudes de onda de excitación y emisión de los isoindoles de diversos  $\beta$ -aminotioles (107).

Estructura del $\beta$ -aminotiol	Abreviatura	Estructura del isoindol	$\lambda_{ex}$ (max) (nm)	$\lambda_{em}$ (max) (nm)
	BMEA		338	438
	L-CYS		356	438
	D-PEN		331	446
	L-CEE		348	448
	o-ABT		372	440
	CAET		346	446

BMEA:  $\beta$ -mercaptoetilamina; L-CYS: cisteína; D-PEN: D-penicilamina; L-CEE: hidrocloreuro de L-cisteína etil éster; O-ABT: o-aminobencenotiol; CAET: 2-ciclohexilaminoetanotiol.

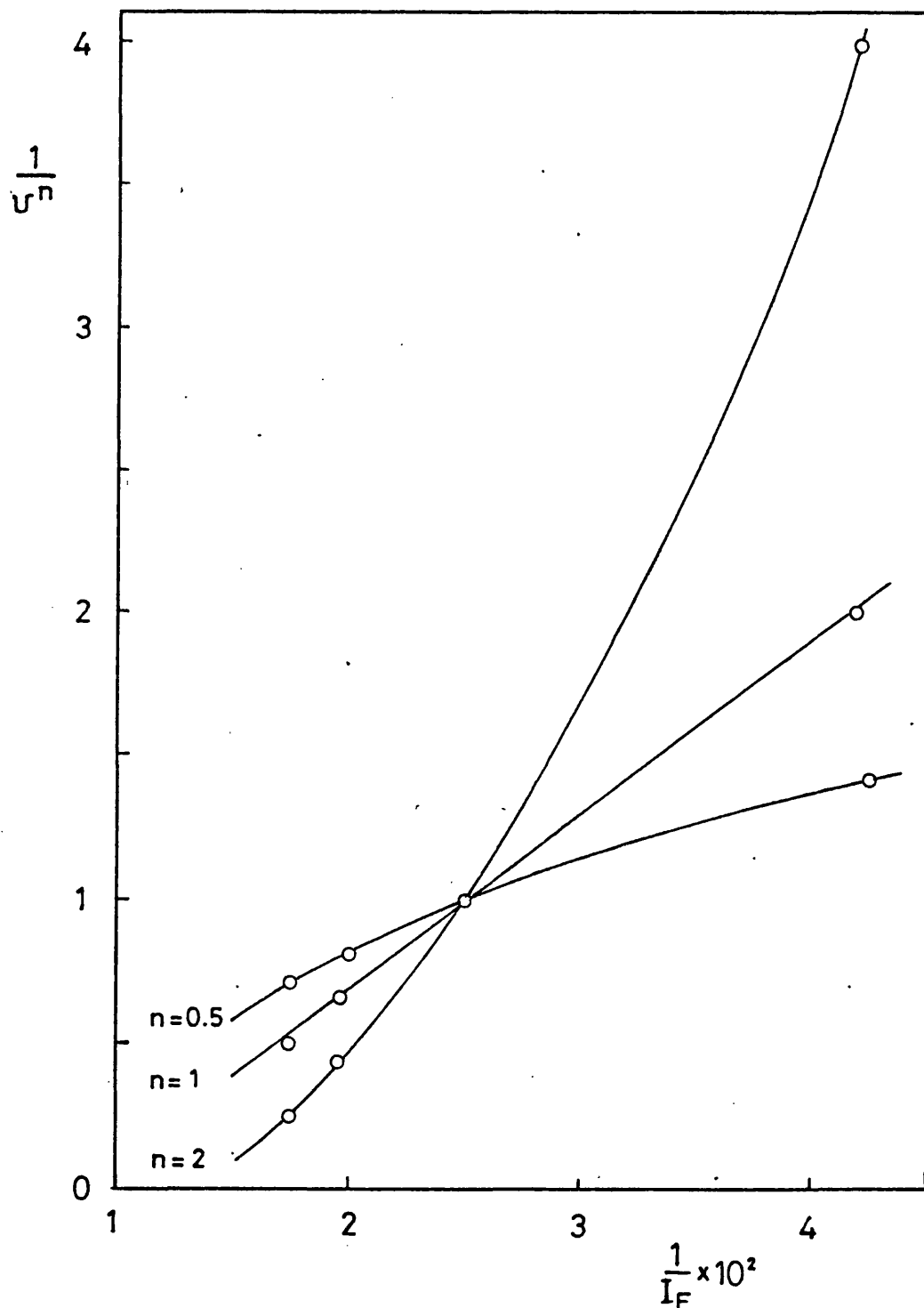


Figura 5. - Determinación de la estequiometría del producto de reacción entre la cisteína y el OPA. Método de Asmus.

$C_{\text{cisteína}} = 9.92 \times 10^{-7} \text{ M}$  ;  $C_{\text{OPA}} = 7.6 \times 10^{-2} \text{ M}$

### III.2.5.- PARAMETROS ANALITICOS SIGNIFICATIVOS

#### 1.- Curva de calibrado

Se obtuvo una curva de calibrado preparando una serie de disoluciones en tampón borato a pH 9.5 , conteniendo OPA en concentración  $4 \times 10^{-3}$  M y cantidades variables de disolución de cisteína  $5.0 \times 10^{-6}$  M , y procediendo según el método indicado.

En la Figura 6 se representa la curva de calibrado obtenida, observándose una perfecta linealidad hasta una concentración de cisteína de  $2.5 \times 10^{-6}$  M (300  $\mu\text{g/ml}$ ), con una sensibilidad de  $2.82 \times 10^7$  . La ecuación de la recta de calibrado es:

$$I_r = -0.076 + 2.82 \times 10^7 \text{ Cisteína} \quad r = 0.999$$

Incrementando la concentración de OPA puede aumentarse el intervalo de linealidad.

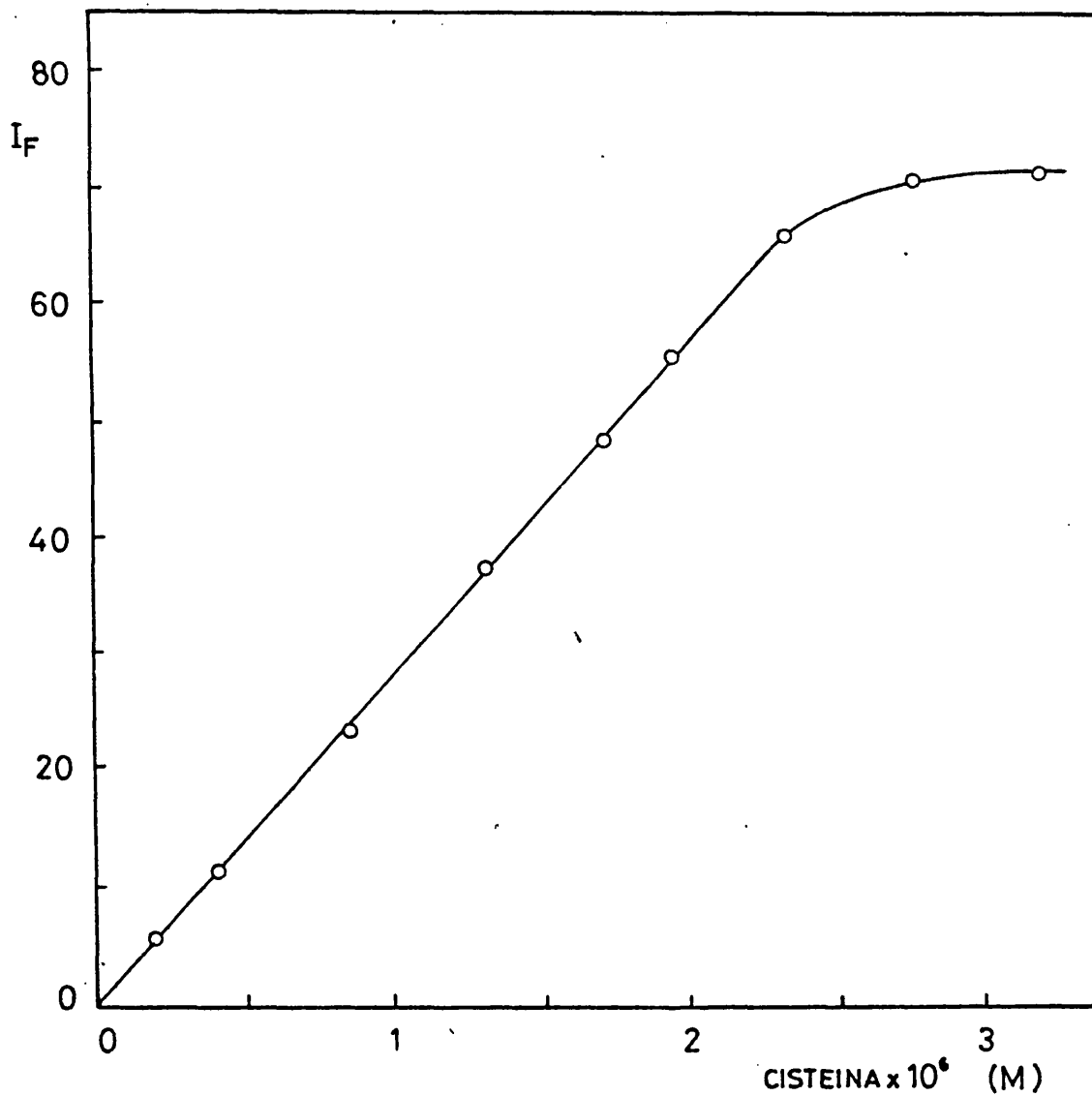


Figura 6. - Gráfica de calibrado.

$COPR = 4 \times 10^{-3} M$  , pH 9.5

## 2.- Repetitividad

Se prepararon 10 disoluciones idénticas que contenían cisteína  $9.92 \times 10^{-7}$  M y OPA  $2.1 \times 10^{-3}$  M. Las disoluciones se calentaron a  $50^{\circ}\text{C}$  durante  $3\frac{1}{2}$  h y se leyó la intensidad de fluorescencia para  $\lambda_{ex} = 364$  nm y  $\lambda_{em} = 424$  nm.

En la Tabla 11 se muestran los resultados obtenidos. El método presenta una buena repetitividad, siendo el coeficiente de variación del 1.9%.

Tabla 11. - Repetitividad.

Cisteína =  $9.92 \times 10^{-7}$  M ; OPA =  $2.1 \times 10^{-3}$  M

Experiencia n°	I <sub>F</sub>
1	27.6
2	26.6
3	26.7
4	27.5
5	27.7
6	26.9
7	27.7
8	27.3
9	26.3
10	26.7
$\bar{x}$	27.12
s	0.52

### III.2.6.- REACCION DE LA CISTINA CON O-FTALDEHIDO

Estudios previos pusieron de manifiesto que cuando la cistina reacciona con el OPA en las condiciones indicadas para la cisteína, se produce un compuesto fluorescente cuyas características espectrales son idénticas a las de la cisteína ( $\lambda_{ex} = 364 \text{ nm}$  y  $\lambda_{em} = 424 \text{ nm}$ ).

Cuando la cistina reacciona con el reactivo OPA-ME se origina el derivado de la cisteína, debido a las condiciones reductoras del medio. En ausencia de ME, es muy probable que la cistina también reaccione con OPA para formar el derivado de cisteína.

La sensibilidad obtenida al reaccionar la cistina con OPA debería ser el doble que para la cisteína, si la reducción fuera completa. Se obtuvieron curvas de calibrado lineales aceptables (Figura 7) y sin embargo, la sensibilidad de un día a otro varió ampliamente, siendo entre 0.25 y 1.6 veces la sensibilidad conseguida con la cisteína (la cual se mantuvo bastante reproducible). Por lo tanto, la reducción de la cistina es probablemente sólo parcial y depende en gran medida de pequeñas diferencias en las condiciones experimentales de un día a otro.

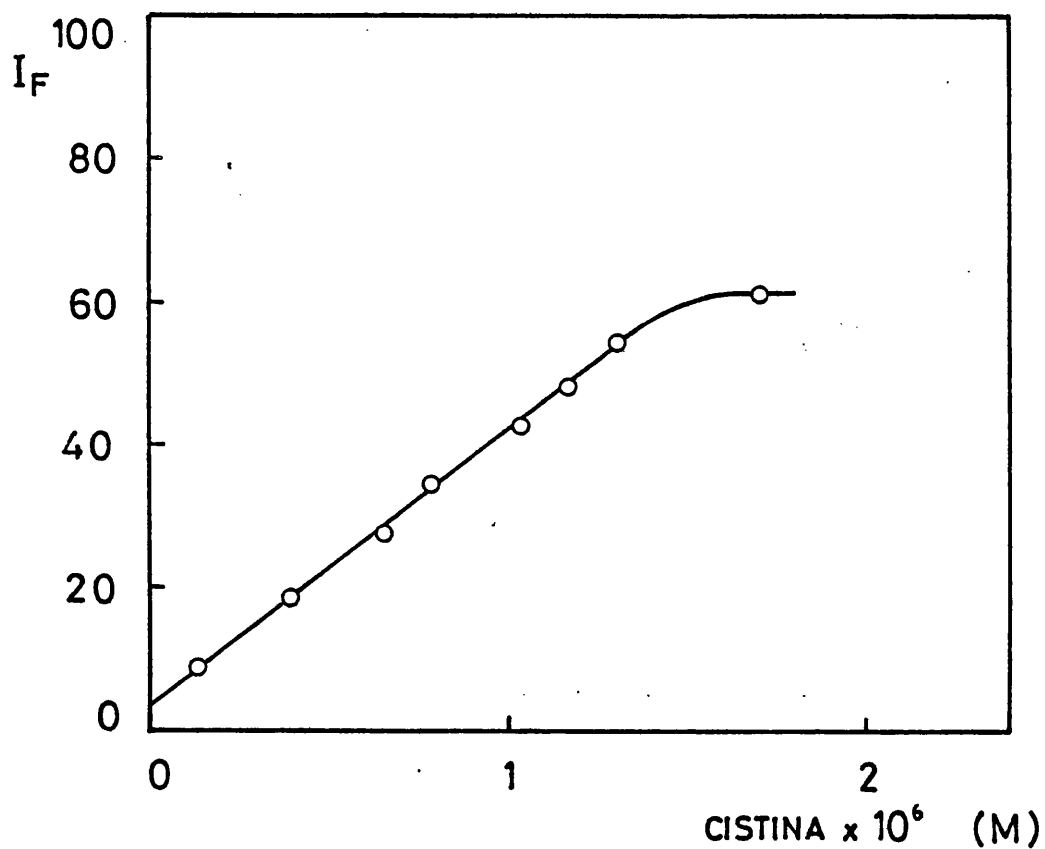


Figura 7. - Gráfica de calibrado para cistina.

C<sub>OPA</sub> = 4x10<sup>-2</sup> M , pH 9.5

Para averiguar si a mayores concentraciones de OPA se llega a obtener una señal reproducible, se estudió la influencia que la concentración de dicho reactivo presenta sobre la reacción con la cistina. Como se observa en la Figura 8, el comportamiento es radicalmente distinto al de la cisteína, produciéndose inicialmente un aumento de la



intensidad de fluorescencia, al incrementarse la concentración de OPA y a continuación un rápido descenso, a partir de una relación OPA/cistina de  $\sim 500$ . Para una relación OPA/cistina de  $\sim 20000$  la fluorescencia disminuyó a la sexta parte, respecto del valor máximo. Este comportamiento parece indicar que en presencia de grandes excesos de OPA, tiene lugar alguna reacción lateral que reduce la fluorescencia.

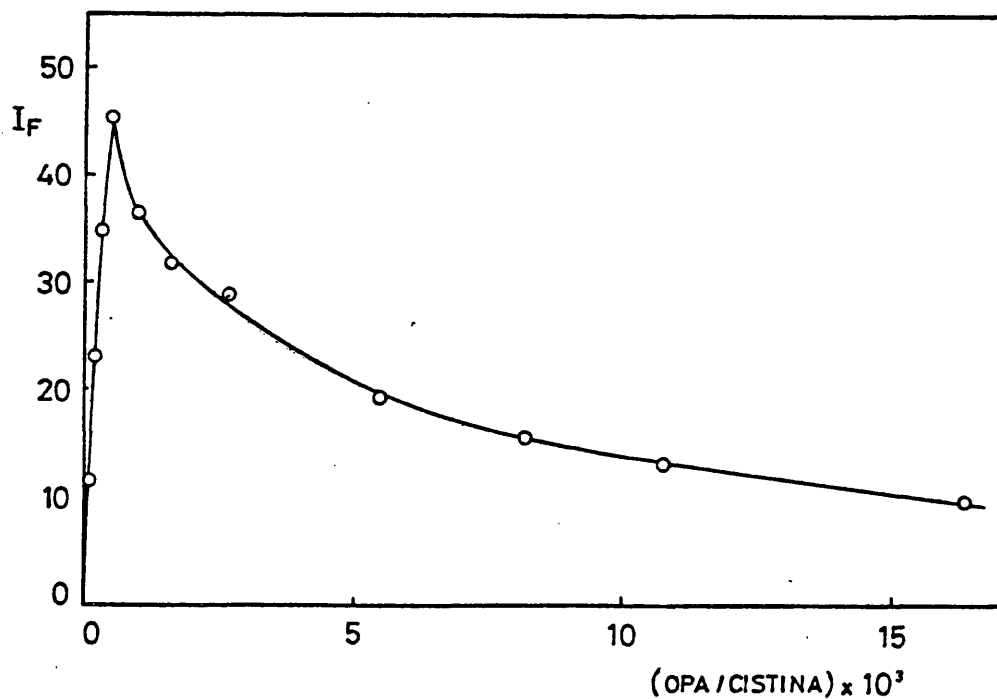


Figura 8. - Influencia de la concentración de OPA sobre la reacción de la cistina con el OPA. En abscisas se representan relaciones molares.

C<sub>cistina</sub> =  $1.0 \times 10^{-6}$  M

### III.2.7.- REACTIVIDAD DE OTROS AMINOACIDOS CON O-FALDEHIDO

#### 1.- Ausencia de tiol

Para estudiar el comportamiento de otros aminoácidos proteicos primarios frente al OPA en ausencia de un tiol, se prepararon disoluciones de los distintos aminoácidos en concentración  $5 \times 10^{-6}$  M .

Disoluciones  $1 \times 10^{-6}$  M de los distintos aminoácidos se calentaron con OPA  $2 \times 10^{-3}$  M en medio bórico-borato (pH 9.5) durante  $3\frac{1}{2}$  h a  $50^{\circ}\text{C}$  , leyéndose la intensidad de fluorescencia para  $\lambda_{ex} = 364$  nm y  $\lambda_{em} = 424$  nm .

En la Tabla 12 se muestran las intensidades de fluorescencia relativas a la cisteína para los distintos aminoácidos estudiados. En ella cabe destacar el comportamiento de la cistina, que es el único aminoácido que presenta una intensidad de fluorescencia apreciable, aunque inferior al de la cisteína. El resto de aminoácidos no parecen reaccionar con el OPA en ausencia de tiol; sin embargo, a temperatura ambiente, en presencia de ME, la mayoría de estos aminoácidos reaccionan instantáneamente para formar isoindoles fluorescentes.

Tabla 12. - Reactividad de otros aminoácidos con OPA en ausencia de tiol.

C<sub>aminoácido</sub> =  $1 \times 10^{-6}$  M ; C<sub>OPA</sub> =  $2 \times 10^{-3}$  M

Aminoácido	I <sub>r</sub>	Aminoácido	I <sub>r</sub>
Cisteína	100.0	Isoleucina	0.1
Cistina	53.8	Serina	0.1
Histidina	1.3	Alanina	0.0
Ac. Aspártico	1.1	Tirosina	0.0
Glutamina	0.8	Treonina	0.0
Triptófano	0.4	Asparagina	0.0
Ac. Glutámico	0.3	Valina	0.0
Glicina	0.2	Leucina	0.0
Fenilalanina	0.2	Lisina	0.0
Prolina	0.2	Metionina	0.0
Arginina	0.2		

## 2.- Presencia de cisteína

Se estudió la influencia que otros aminoácidos presentan sobre la reacción entre la cisteína y el OPA. Para ello se preparó una serie de disoluciones que contenían cisteína  $2 \times 10^{-6}$  M y otros aminoácidos en concentración  $1 \times 10^{-6}$  M, añadiendo sobre la mezcla de cisteína y aminoácidos el reactivo OPA ( $2 \times 10^{-3}$  M) preparado en tampón bórico-borato.

A continuación, se realizó una segunda serie en la que se cambió el orden de adición. En este caso, a la disolución de cisteína se añadió el reactivo OPA y posteriormente la disolución de aminoácido.

En la Tabla 13 se presentan las intensidades de fluorescencia correspondientes a la primera serie, observándose cómo al añadir el reactivo OPA sobre la mezcla de cisteína y otros aminoácidos, se obtiene una menor intensidad de fluorescencia que la producida por la cisteína en su ausencia, existiendo así un efecto inhibitor de la formación del isoindol derivado de la cisteína. La disminución de la fluorescencia parece no depender tanto de la naturaleza del aminoácido como de su concentración, no observándose ningún desplazamiento de los máximos espectrales. Nakamura y col. (45) también observaron una disminución de la fluorescencia al aumentar la concentración de L-tirosina en una mezcla que contenía cisteína y OPA.

Tabla 13. - Intensidades de fluorescencia relativas de disoluciones preparadas por adición de OPA sobre una mezcla de cisteína y otro aminoácido (el valor  $I_r = 100$  se ha asignado a una disolución de cisteína).

$C_{\text{cisteína}} = 2 \times 10^{-6} \text{ M}$  ;  $C_{\text{aminoácido}} = 1 \times 10^{-6} \text{ M}$  ;  
 $C_{\text{OPA}} = 2 \times 10^{-3} \text{ M}$

Aminoácido	$I_r$	Aminoácido	$I_r$
Triptófano	71.3	Alanina	61.0
Tirosina	68.1	Treonina	60.9
Serina	66.9	Histidina	60.9
Ac. Aspártico	66.7	Glutamina	60.7
Fenilalanina	64.7	Isoleucina	55.2
Leucina	64.7	Lisina	55.0
Prolina	64.1	Asparagina	55.0
Metionina	63.6	Ac. Glutámico	54.7
Arginina	63.2	Glicina	49.7

Por otra parte, en la Tabla 14 se observa la influencia del orden de adición, encontrándose que cuando los aminoácidos se añaden después de mezclar la cisteína con el OPA (orden 2) la fluorescencia disminuye en menor medida. Chen y col. (10) observaron que la cisteína bloquea la reacción de

otros aminoácidos con OPA. Así, al mezclar en primer lugar cisteína con OPA y añadir a continuación alanina, no se produjo la reacción de esta última con el reactivo OPA-ME, debido probablemente a que la cisteína desplaza al ME en su reacción con alanina y OPA, originando un producto débilmente fluorescente. La escasa fluorescencia del producto de reacción de la cisteína con OPA-ME puede deberse más que a una falta de reactividad, a su rápida descomposición (10)(115).

Tabla 14. - Intensidades de fluorescencia relativas de mezclas de OPA, cisteína y otros aminoácidos (el valor  $I_r = 100$  se ha asignado a una disolución de cisteína).

$C_{\text{cisteína}} = 2 \times 10^{-6} \text{ M}$  ;  $C_{\text{aminoácido}} = 1 \times 10^{-6} \text{ M}$  ;  
 $C_{\text{OPA}} = 2 \times 10^{-3} \text{ M}$

Aminoácido	$I_r$	
	orden 1 <sup>a</sup>	orden 2 <sup>b</sup>
Tirosina	68	100
Alanina	61	81

<sup>a</sup> El reactivo OPA se añadió sobre la mezcla de cisteína y otro aminoácido.

<sup>b</sup> El aminoácido se añadió sobre la mezcla de cisteína y OPA.

En la Figura 9 se representa la intensidad de fluorescencia de una disolución de cisteína  $2 \times 10^{-6}$  M, en presencia de OPA  $2 \times 10^{-3}$  M y cantidades variables de alanina. Se observa cómo al incrementarse la concentración de alanina se produce una disminución lineal de la fluorescencia.

La pendiente de la recta de calibrado es  $\sim -3 \times 10^7$  M, mientras que las rectas de calibrado correspondientes a la determinación de cisteína muestran pendientes positivas con valores próximos a  $3 \times 10^7$ . Esto parece indicar la presencia de una reacción lateral, donde por cada mol de alanina añadida, deja de formarse un mol de derivado fluorescente de cisteína. Debido al gran exceso de OPA existente en el medio, es muy probable que OPA y cisteína reaccionen conjuntamente con la alanina. Así, es posible que la cisteína se comporte como tiol, de modo similar a como lo hace frente a la taurina en presencia de OPA a temperatura ambiente (104), sin embargo el producto formado no es fluorescente. La disminución de la fluorescencia indica así la descomposición del isoindol de cisteína-OPA y la formación simultánea del isoindol de alanina-OPA-cisteína.

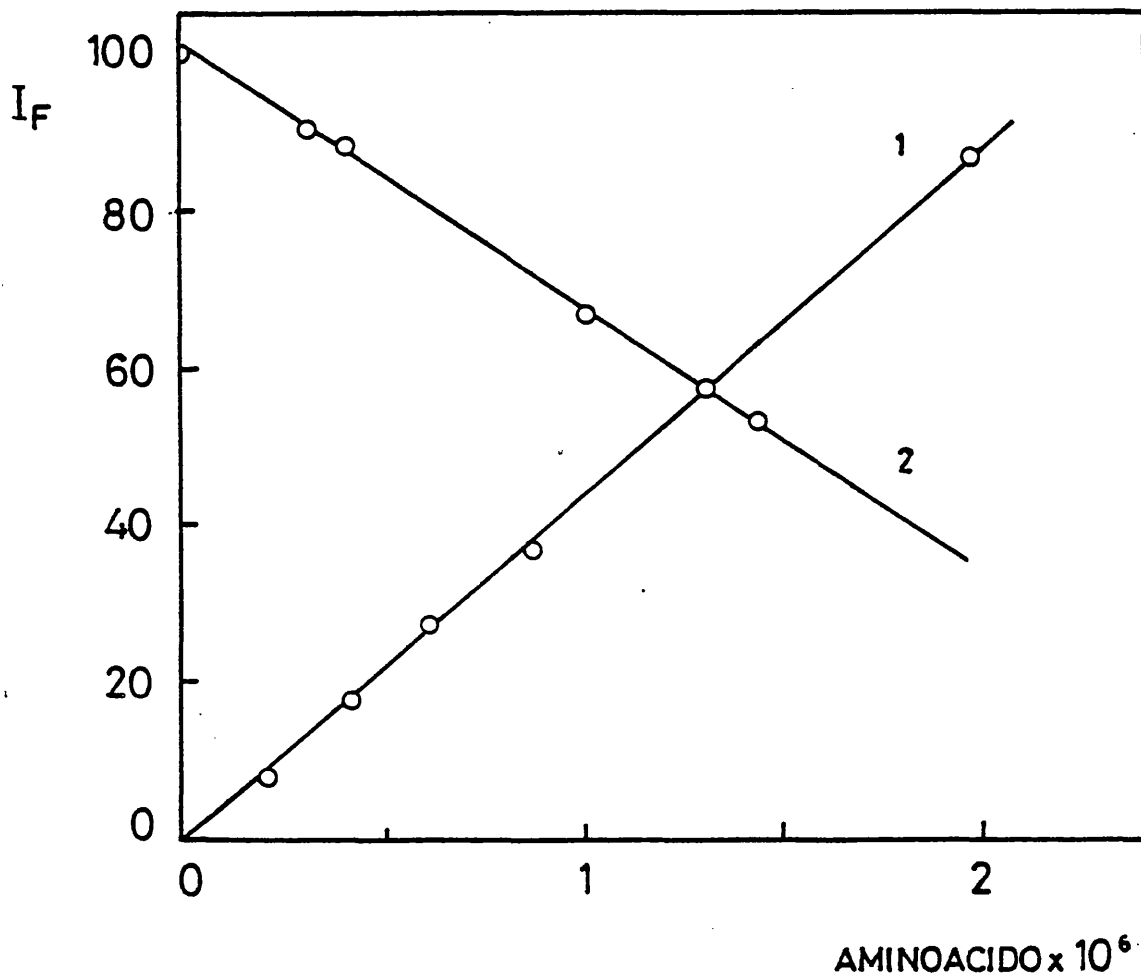


Figura 9. - Gráficas de calibrado: (1) Cisteína; (2) Cisteína  $2 \times 10^{-6}$  M en presencia de cantidades variables de alanina.

$C_{OPA} = 2 \times 10^{-6}$  M



### III.3.- DETERMINACION DE CISTINA CON O-FALDEHIDO



### III.3.1.- INTRODUCCION

La cistina es uno de los aminoácidos más difíciles de determinar en los fluidos biológicos. En determinadas enfermedades se produce una alteración de la concentración de cistina, por lo que resulta interesante desarrollar un método de análisis simple y selectivo, con una sensibilidad adecuada, que permita la determinación de este aminoácido.

La mayoría de los métodos desarrollados para la determinación de cistina implican su reducción previa a cisteína con agentes reductores, como sulfito (125), KCN (126-127), tributilfosfina (128), mercaptoetanol (129), NaBH<sub>4</sub> (130), ditiotreitól (131-133) y ditionito (134). A continuación el grupo tiol se hace reaccionar con un reactivo colorimétrico adecuado.

En otros métodos, previamente al procedimiento espectrofotométrico, la cistina es oxidada a ácido cisteico, generalmente con ácido perbórmico, requiriendo un elevado tiempo de reacción (135-136). La determinación de cistina puede también realizarse sin transformación alguna, midiendo su absorbancia en el UV (137), sin embargo el método no es muy sensible, ni selectivo.

En este capítulo se propone un método espectrofotométrico para la determinación de cistina con OPA.

III.3.2.- REACCION DE LA CISTINA CON O-FALDEHIDO Y  
MERCAPTOETANOL

En la bibliografía se encuentra que el derivado que forma la cistina con OPA en presencia de ME coincide con el obtenido con la cisteína. El compuesto es escasamente fluorescente.

En unas experiencias preliminares, se encontró que la cistina reacciona con el OPA en presencia de ME a pH 9.5 (tampón bórico-borato) para formar un compuesto que presenta un máximo de absorción en el UV. A continuación se muestran los estudios realizados sobre el producto formado.

Con el fin de investigar el tiempo de formación del derivado obtenido por reacción de la cistina y el reactivo OPA-ME, a temperatura ambiente, así como su estabilidad, se preparó una disolución conteniendo cistina  $1.80 \times 10^{-4}$  M, OPA  $1.22 \times 10^{-3}$  M, ME  $1.15 \times 10^{-3}$  M y tampón bórico-borato (pH 9.5). En otra experiencia se observó el cambio producido al añadir HCl. Se leyó la absorbancia frente a blancos preparados en las mismas condiciones pero sin cistina.

Las disoluciones de cistina en presencia del reactivo OPA-ME son ligeramente amarillas y muestran el espectro de la Figura 10.1, en el que se observa una banda con máximo a 330 nm y un hombro sobre 390 nm.

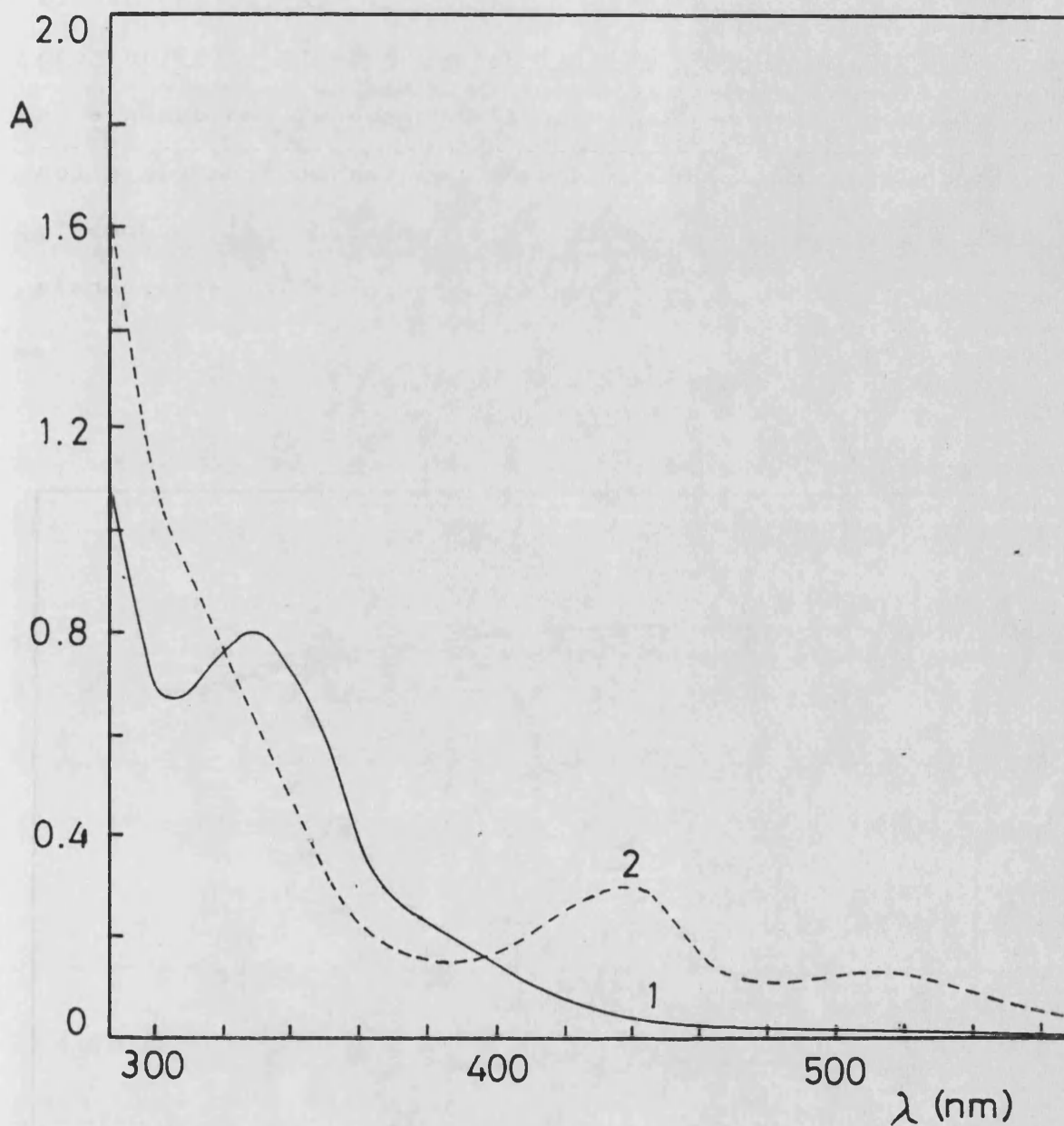


Figura 10. - Espectro de absorción del producto de reacción de la cistina con el reactivo OPA-ME en: (1) Medio bórico-borato a pH 9.5 ; (2) Medio HCl a pH < 1.

$C_{\text{cistina}} = 1.80 \times 10^{-4} \text{ M}$  ;  $C_{\text{OPA}} = 1.22 \times 10^{-3} \text{ M}$  ;  $C_{\text{ME}} = 1.15 \times 10^{-3} \text{ M}$

En la Figura 11 se muestra la variación de la absorbancia con el tiempo para el derivado de la cistina con OPA-ME. Como se observa, la reacción procede rápidamente a temperatura ambiente, alcanzándose la máxima absorbancia a los 4.5 min de efectuada la mezcla. Sin embargo, el compuesto formado no es muy estable y un minuto después, la absorbancia empieza a disminuir.

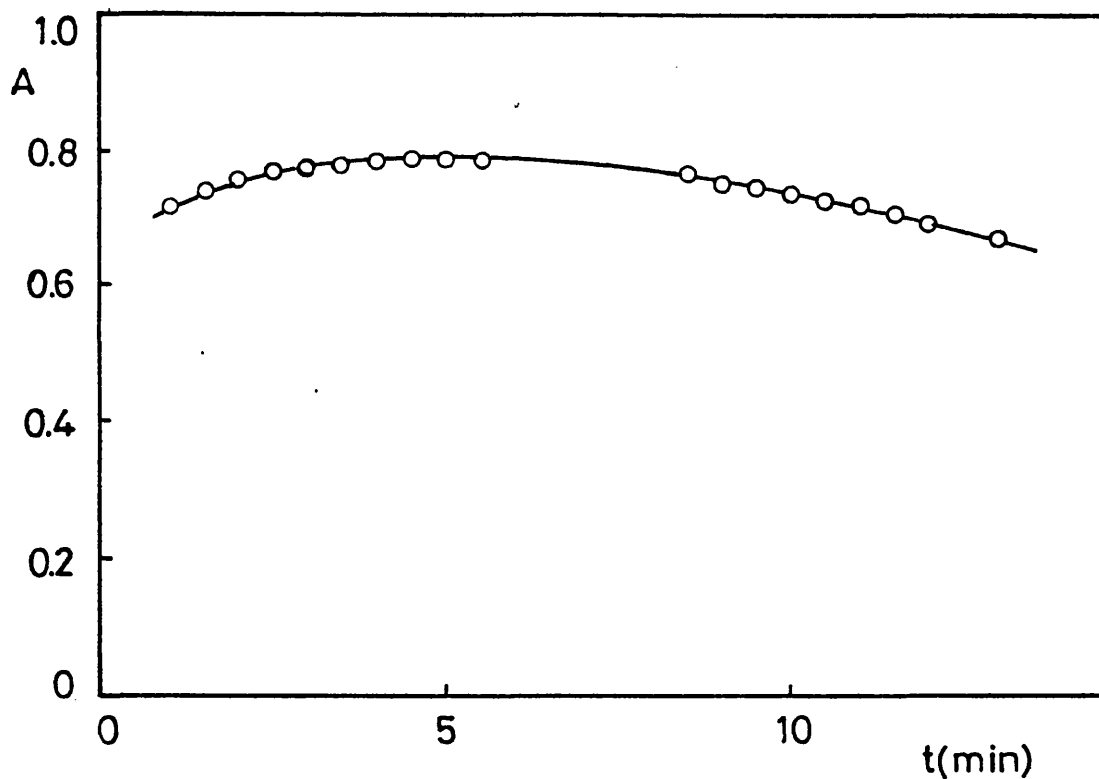


Figura 11. - Variación de la absorbancia a 330 nm con el tiempo del derivado cistina-OPA-ME a pH 9.5 .

$C_{\text{cistina}} = 1.80 \times 10^{-4} \text{ M}$  ;  $C_{\text{OPA}} = 1.22 \times 10^{-3} \text{ M}$  ;  $C_{\text{ME}} = 1.15 \times 10^{-3} \text{ M}$

Al añadir HCl al derivado formado a pH 9.5 hasta pH < 1 , el espectro de la disolución se modificó (Figura 10.2), produciéndose la desaparición del máximo a 330 nm , que presentaba el compuesto en medio bórico-borato y la formación de unas nuevas bandas a 440 nm y 510 nm , con un cambio del color de la disolución a rosa. Las disoluciones acidificadas mantienen su absorbancia constante al menos durante 20 min .

La Figura 12.1 muestra una gráfica de calibrado correspondiente a una serie de disoluciones de cistina que contienen OPA y ME en medio bórico-borato, preparadas según el procedimiento descrito anteriormente. La absorbancia se leyó a 330 nm a los 5 min de efectuada la mezcla. La ecuación de la recta de calibrado obtenida es:

$$A = -0.015 + 4.37 \times 10^3 C_{\text{cistina}} \quad r = 0.998$$

Al acidificar se observó también una dependencia lineal de la absorbancia a 510 nm , al incrementarse la concentración de cistina (Figura 12.2), mientras que la intensidad de la banda a 440 nm permanecía constante. La ecuación de la recta de calibrado obtenida a 510 nm es la siguiente:

$$A = -0.023 + 1.36 \times 10^3 C_{\text{cistina}} \quad r = 0.999$$

Sin embargo, puesto que es necesario un estricto control del tiempo de reacción, la reacción de la cistina con el reactivo OPA-ME no es adecuada para el desarrollo de un procedimiento analítico para determinar cistina.

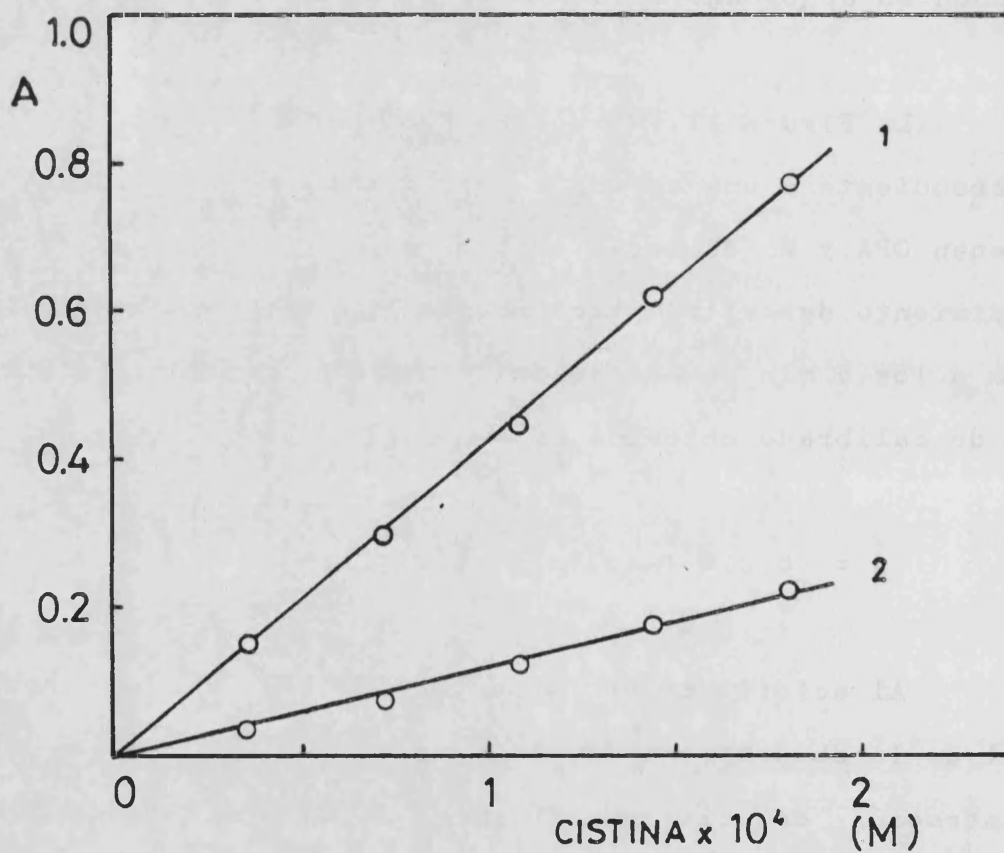


Figura 12. - Curvas de calibrado en: (1) Medio bórico-borato a pH 9.5 ( $\lambda = 330$  nm) ; (2) Medio HCl a pH < 1 ( $\lambda = 510$  nm ).

$C_{OPA} = 1.22 \times 10^{-3}$  M ;  $C_{ME} = 1.15 \times 10^{-3}$  M



III.3.3.- REACCION DE LA CISTINA CON O-FALDEHIDO EN AUSENCIA DE MERCAPTOETANOL

En el apartado anterior encontramos que para concentraciones inferiores a  $1-2 \times 10^{-6}$  M , la cistina reacciona con OPA sin necesidad de la adición de un tiol, dando lugar a un derivado de cisteína-OPA , previsiblemente un isoindol. Sin embargo, para concentraciones superiores el producto de reacción es un derivado distinto al obtenido a partir de cisteína. A continuación se muestran una serie de estudios sobre el compuesto obtenido.

1.- Espectros de absorción

Se preparó una disolución en medio tamponado bórico-borato a pH 9.5 , con concentraciones de cistina y OPA  $2 \times 10^{-4}$  M y  $4 \times 10^{-3}$  M, respectivamente. La disolución se calentó a 60°C durante 30 min y una vez enfriada a temperatura ambiente, se registró el espectro de absorción y se leyó la absorbancia frente a un blanco preparado en ausencia de cistina.

Igualmente, se obtuvo el espectro del producto formado tras acidificar la disolución anterior con HCl hasta pH < 1 , así como los espectros correspondientes a los blancos en medio bórico-borato y en medio ácido, conteniendo OPA

$4 \times 10^{-3}$  M (2 ml de disolución etanólica de OPA  $5 \times 10^{-3}$  M a 25 ml). En este último caso se midió la absorbancia frente a una disolución que contenía 2 ml de etanol y tampón bórico-borato en 25 ml de agua.

En la Figura 13 aparecen los espectros del OPA tanto en medio bórico-borato (espectro 1), como en medio ácido (espectro 2). En ambos casos los espectros muestran bandas en el UV sobre 260 y 300 nm .

En la Figura 14 se muestran los espectros de absorción del producto de reacción de la cistina con OPA. Como se observa en dicha figura, el compuesto formado en medio bórico-borato (espectro 1) presenta una banda de absorción sobre 335 nm . La pequeña, pero no despreciable, absorbancia que presenta el OPA a esta longitud de onda indica la necesidad de utilizar blancos que contengan este reactivo.

Por otra parte, al acidificar con HCl las disoluciones obtenidas a pH 9.5 , se observó la intensificación de su color amarillo, debido a la aparición de una nueva banda a 440 nm (Figura 14.2). La acidificación originó al mismo tiempo la disminución de la absorbancia a 335 nm . En este caso las medidas de absorbancia se pueden realizar frente a blanco agua, debido a la nula absorbancia del OPA a 440 nm .

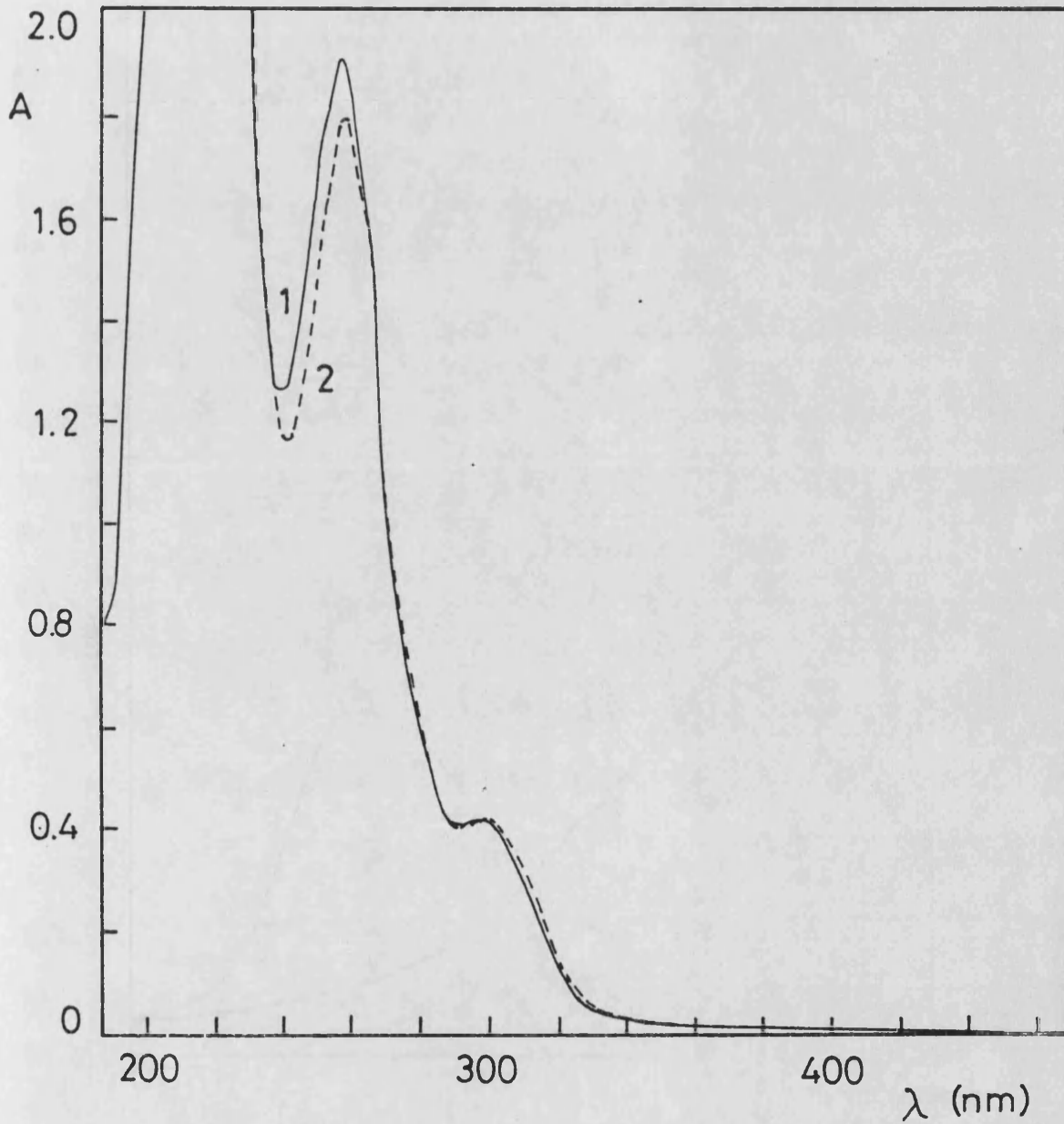
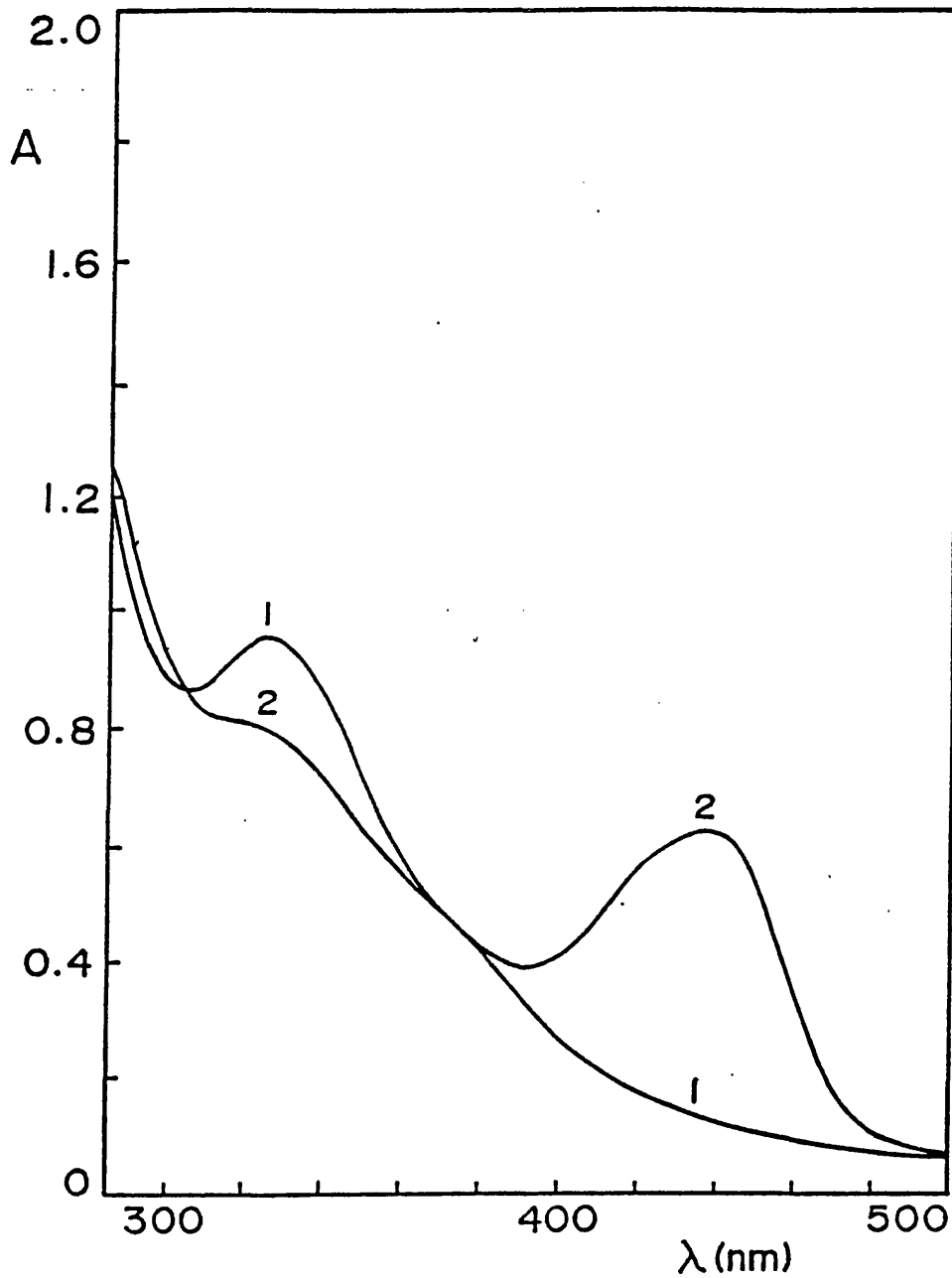


Figura 13. - Espectros de absorción del OPA en : (1) Medio bórico-borato a pH 9.5 ; (2) Medio HCl a pH < 1 .

$C_{OPA} = 4 \times 10^{-3} \text{ M}$



**Figura 14.** - Espectros de absorción del producto de reacción de la cistina con el OPA en ausencia de ME en: (1) Medio bórico-borato a pH 9.5 ; (2) Medio HCl a pH < 1 .

$C_{\text{cistina}} = 2 \times 10^{-4} \text{ M}$  ;  $C_{\text{OPA}} = 4 \times 10^{-3} \text{ M}$

## 2.- Optimización de las condiciones experimentales

### a) Estabilidad del compuesto formado en medio bórico-borato

Con el fin de investigar el tiempo y la temperatura óptima de formación del compuesto obtenido, al reaccionar la cistina y el OPA en medio bórico-borato a pH 9.5 , se estudió la variación de la absorbancia con el tiempo a distintas temperaturas. Para ello se prepararon diversas disoluciones conteniendo una concentración de cistina  $2.92 \times 10^{-4}$  M y OPA  $4 \times 10^{-3}$  M , y se calentó a distintas temperaturas. Tras enfriar se leyó la absorbancia a 335 nm a tiempos variables.

Los resultados aparecen representados en la Figura 15 , donde se observa cómo al aumentar la temperatura se produce un aumento de la velocidad de la reacción. A una temperatura de 60 °C la absorbancia permanece constante a partir de los 30 min ; con temperaturas inferiores se requiere un mayor tiempo de calentamiento para alcanzar la estabilización de la señal, mientras que temperaturas superiores (70 °C) no afectan prácticamente ni a la velocidad de la reacción, ni a la estabilidad de las disoluciones.

Las disoluciones obtenidas por calentamiento a 60°C durante 30 min , y enfriadas a temperatura ambiente, mantienen prácticamente inalterado el valor de la absorbancia durante largo tiempo, observándose a las 24 h un descenso de tan sólo un 5 % .

A la vista de los resultados, se elige como condiciones óptimas de trabajo el calentamiento a 60-70°C al menos durante 30 min .

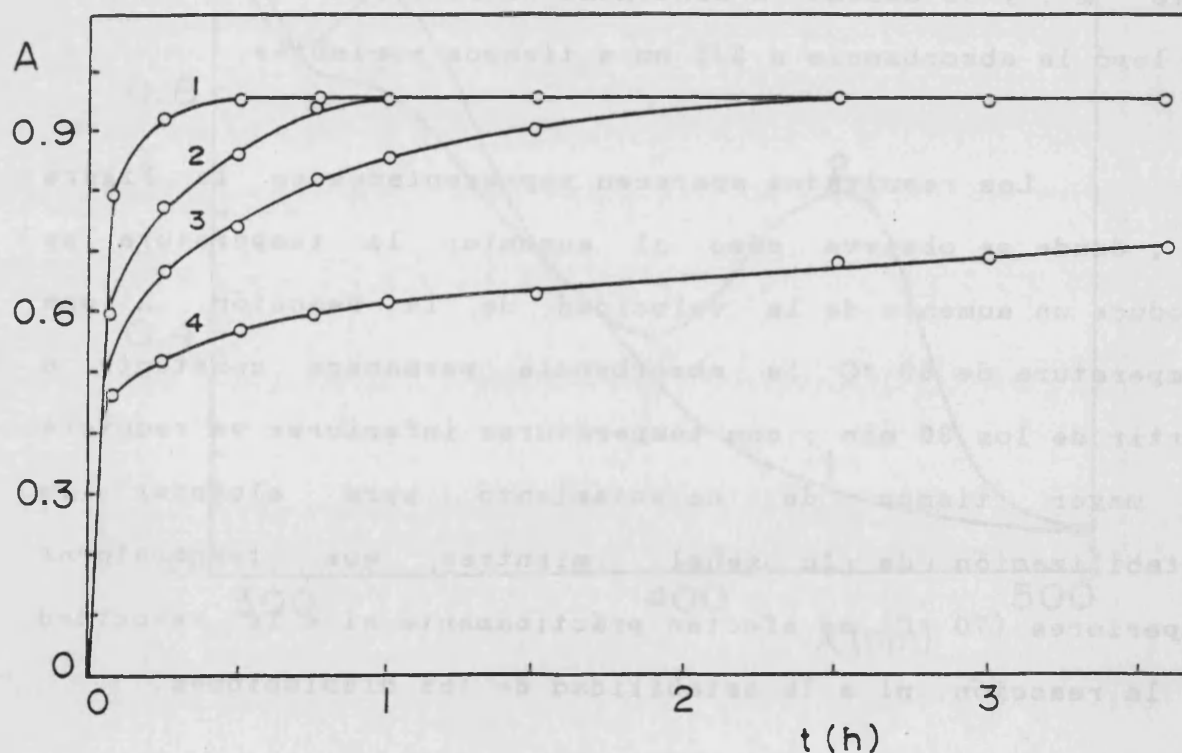


Figura 15. - Efecto de la temperatura sobre la reacción de la cistina con el OPA en medio bórico-borato.

$C_{\text{cistina}} = 2.92 \times 10^{-4} \text{ M}$  ;  $C_{\text{OPA}} = 4 \times 10^{-9} \text{ M}$

Temperatura: (1) 60°C ; (2) 50°C ; (3) 40°C ; (4) 20°C

b) Influencia de la concentración de o-ftaldehido

Se estudió la influencia de la concentración de OPA para dos niveles de concentración de cistina:  $5.7 \times 10^{-5}$  M y  $2.85 \times 10^{-4}$  M . Para ello se prepararon dos series de disoluciones que contenían cantidades constantes de cistina y de tampón bórico-borato y cantidades variables de OPA. Las disoluciones se mantuvieron en un baño termostatado a una temperatura de 60 °C durante 30 min y se leyó la absorbancia a temperatura ambiente a 335 nm .

Los resultados se representan en la Figura 16 . En ella se observa que es necesaria una concentración de OPA al menos 25 veces superior a la de cistina para que obtener una la lectura de absorbancia constante.

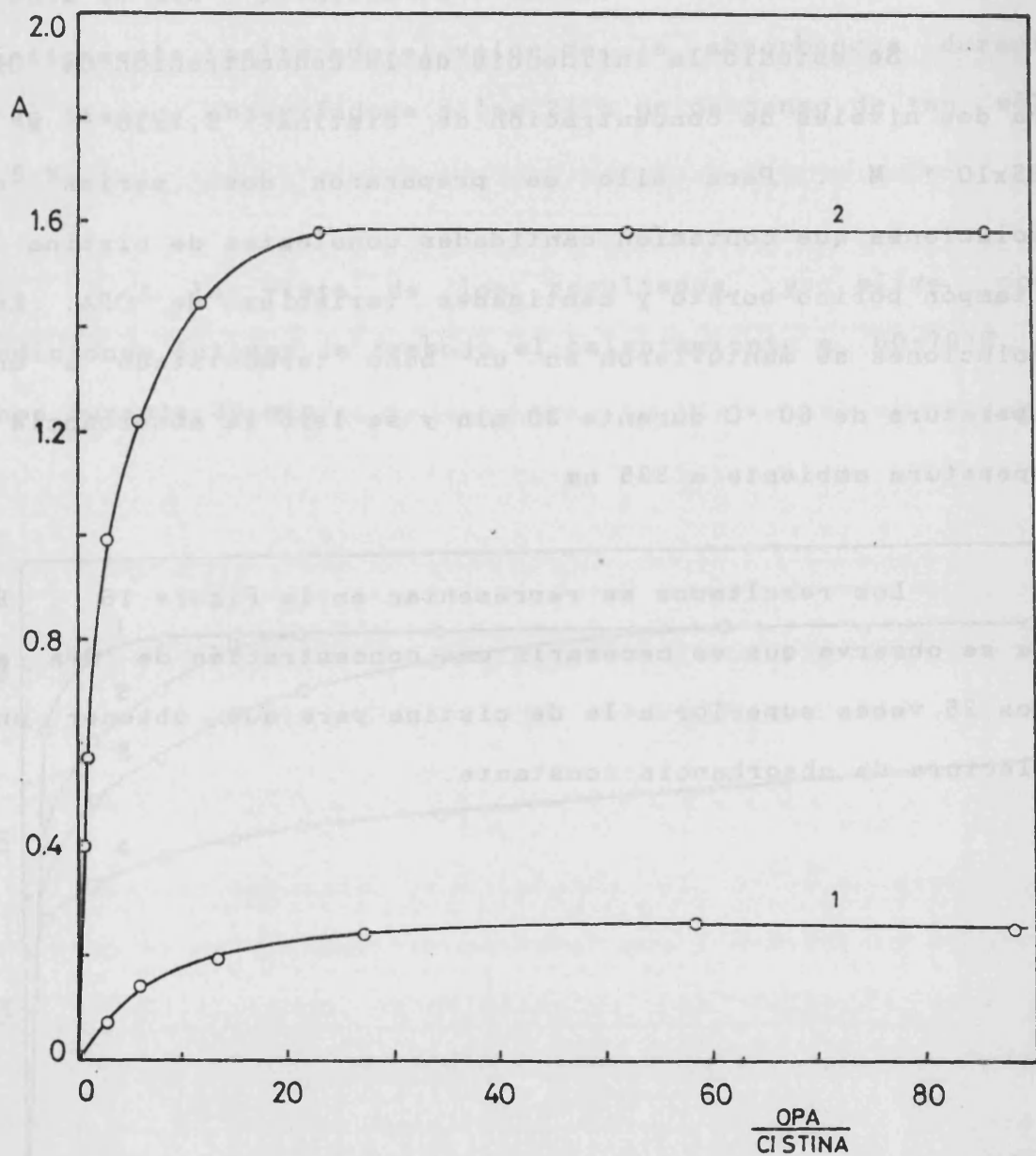


Figura 16. - Influencia de la concentración de OPA a pH 9.5 .  
En abscisas se representan relaciones molares.

Cistina: (1)  $5.7 \times 10^{-5} \text{ M}$  ; (2)  $2.85 \times 10^{-4} \text{ M}$



c) Influencia del pH

Se preparó una serie de disoluciones conteniendo concentraciones de cistina  $2.92 \times 10^{-4}$  M y OPA  $7.9 \times 10^{-4}$  M , a diferentes valores de pH , ajustados con HCl y tampones citrato, fosfato y borato de fuerza iónica 0.1 M . Se calentaron a 60 °C durante 30 min , leyéndose la absorbancia a 335 nm una vez enfriadas las disoluciones a temperatura ambiente.

Los resultados se representan en la Figura 17. La reacción de la cistina con OPA depende acusadamente del pH del medio. Se observa la máxima absorbancia en el intervalo de pH 9.2-9.7 . Una disminución del pH da lugar a un descenso de la señal analítica, que llega a anularse a pH < 3 . De igual modo, pH superiores conducen a absorbancias menores. En lo sucesivo se lleva a cabo la reacción entre la cistina y el OPA a pH 9.5-9.6 amortiguado con tampón bórico-borato.

La disminución de la efectividad de la reacción entre el OPA y los aminoácidos a pH < 9.2 está asociada probablemente con la protonación del grupo amino del aminoácido, cuyo log K es  $\sim 9.5$  . Sin embargo, resulta difícil explicar por qué disminuye la absorbancia a pH > 10 , que correspondería a la protonación de otro grupo ionogénico con log K > 11.0 (41).

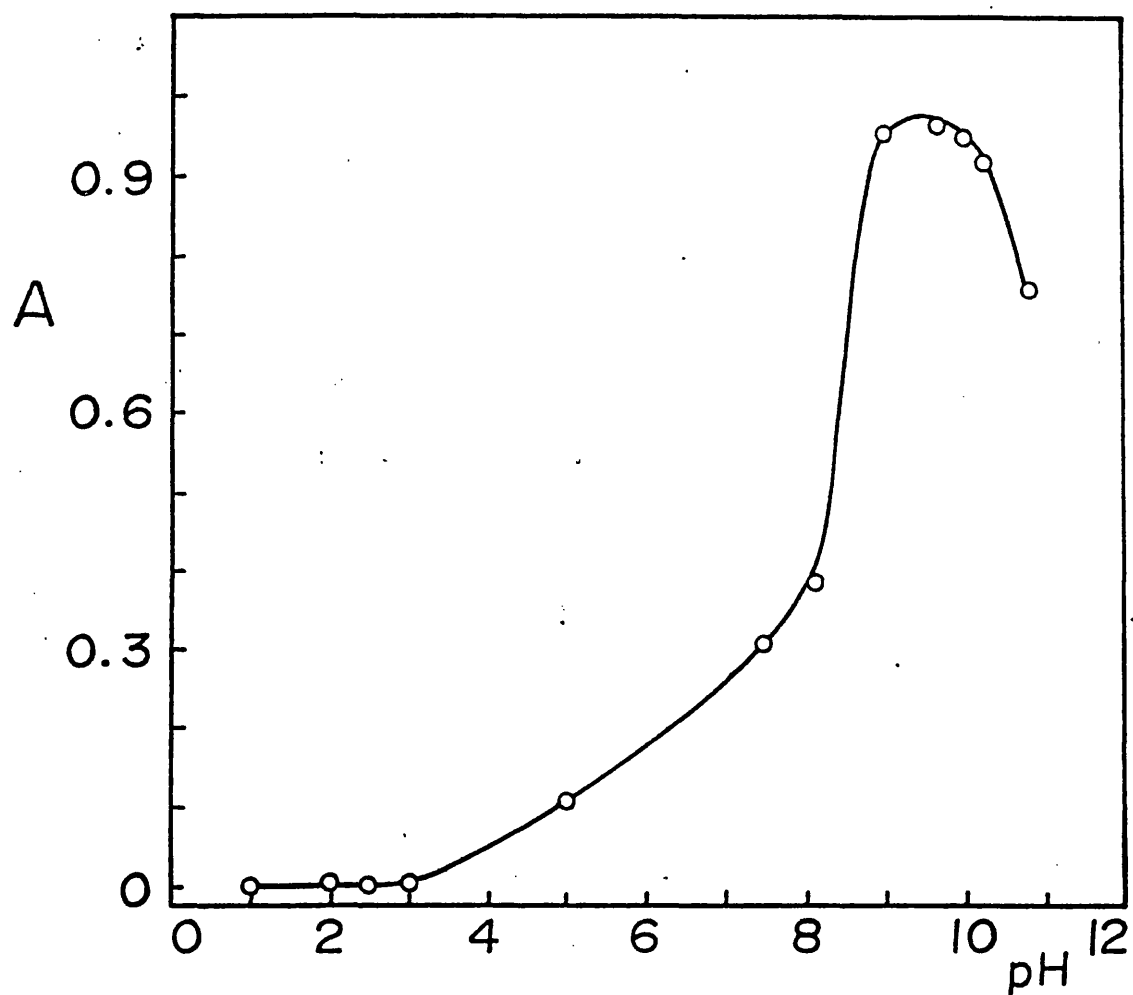


Figura 17. - Influencia del pH sobre la reacción de la cistina con el OPA.

C<sub>cistina</sub> =  $2.92 \times 10^{-4}$  M ; C<sub>OPA</sub> =  $7.9 \times 10^{-4}$  M

d) Efecto de la adición de ácido

En la Figura 14 se puso de manifiesto la aparición de una banda a 440 nm en el espectro obtenido en medio HCl. Este máximo puede tener interés analítico debido a la ausencia de esta banda en otros aminoácidos.

En este apartado se realiza un estudio de la influencia de la acidez sobre el producto que forma la cistina con el OPA a pH 9.5 . Para ello se parte del compuesto obtenido en medio tamponado bórico-borato tras calentar a 60 °C durante 30 min . Una vez enfriada la disolución a temperatura ambiente se acidifica con HCl . La concentración de cistina es  $9.07 \times 10^{-5}$  M y la de OPA  $4 \times 10^{-3}$  M .

En las Figuras 18 y 19 se muestran los espectros obtenidos a distintos valores de pH , observándose una disminución gradual de la banda a 335 nm y un incremento de la banda a 440 nm a medida que disminuye el pH . Asimismo, se observan dos puntos isobésticos hacia pH 6 ( $\lambda = 355$  nm) y 3 ( $\lambda = 400$  nm), que corresponderían a distintas protonaciones del compuesto formado a pH 9.5 (ver apartado III.3.6.c). La intensidad de la banda a 440 nm obtenida a pH <1 es un 20% menor que la banda a 335 nm en medio bórico-borato.

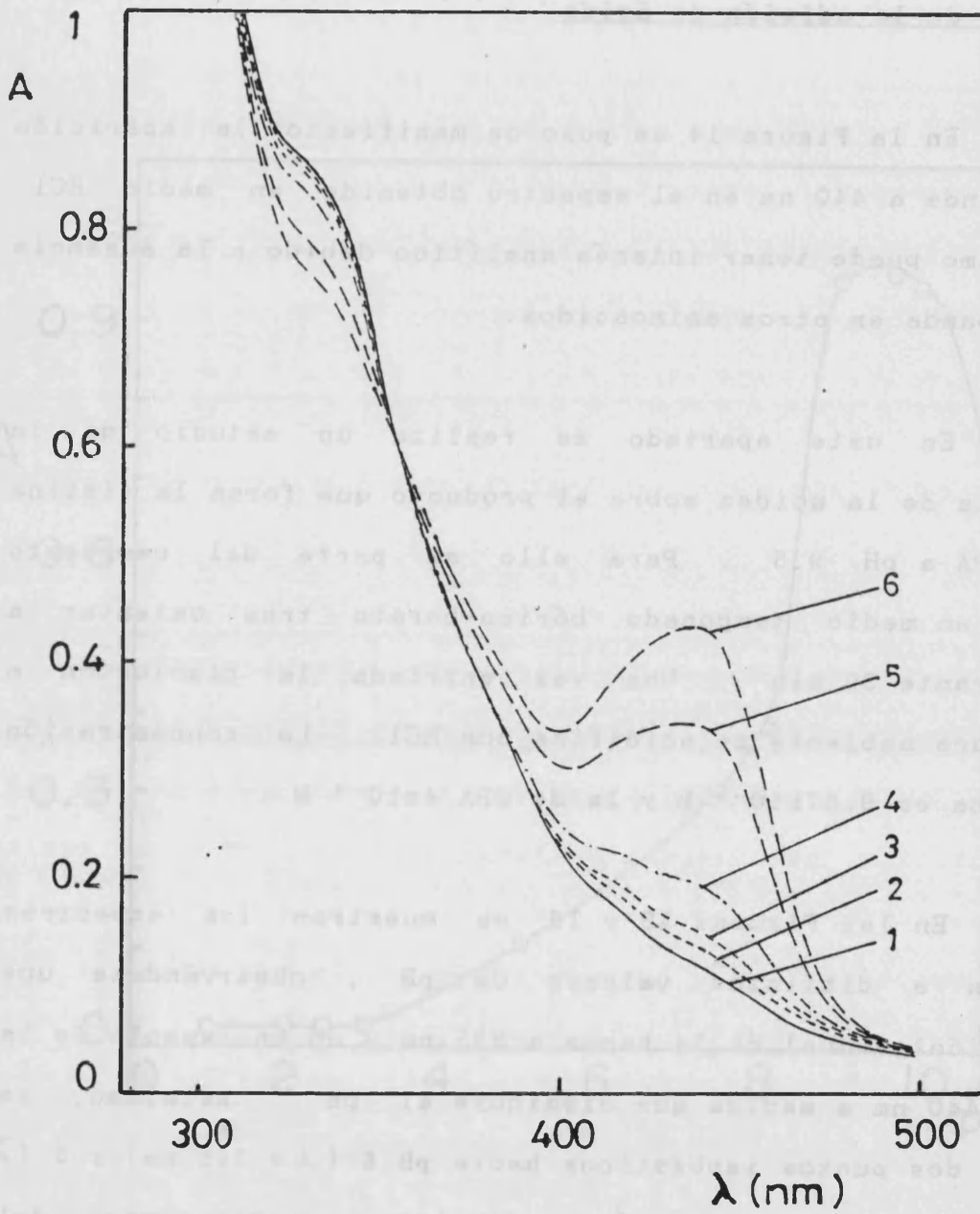


Figura 18. - Efecto de la adición de ácido sobre el producto formado por reacción de cistina y OPA a pH 9.5 .

$C_{\text{cistina}} = 9.07 \times 10^{-5} \text{ M}$  ;  $C_{\text{OPA}} = 4 \times 10^{-3} \text{ M}$

pH: (1) 7.25 ; (2) 6.49 ; (3) 6.12 ; (4) 5.58 ; (5) 4.70 ;  
(6) 4.04

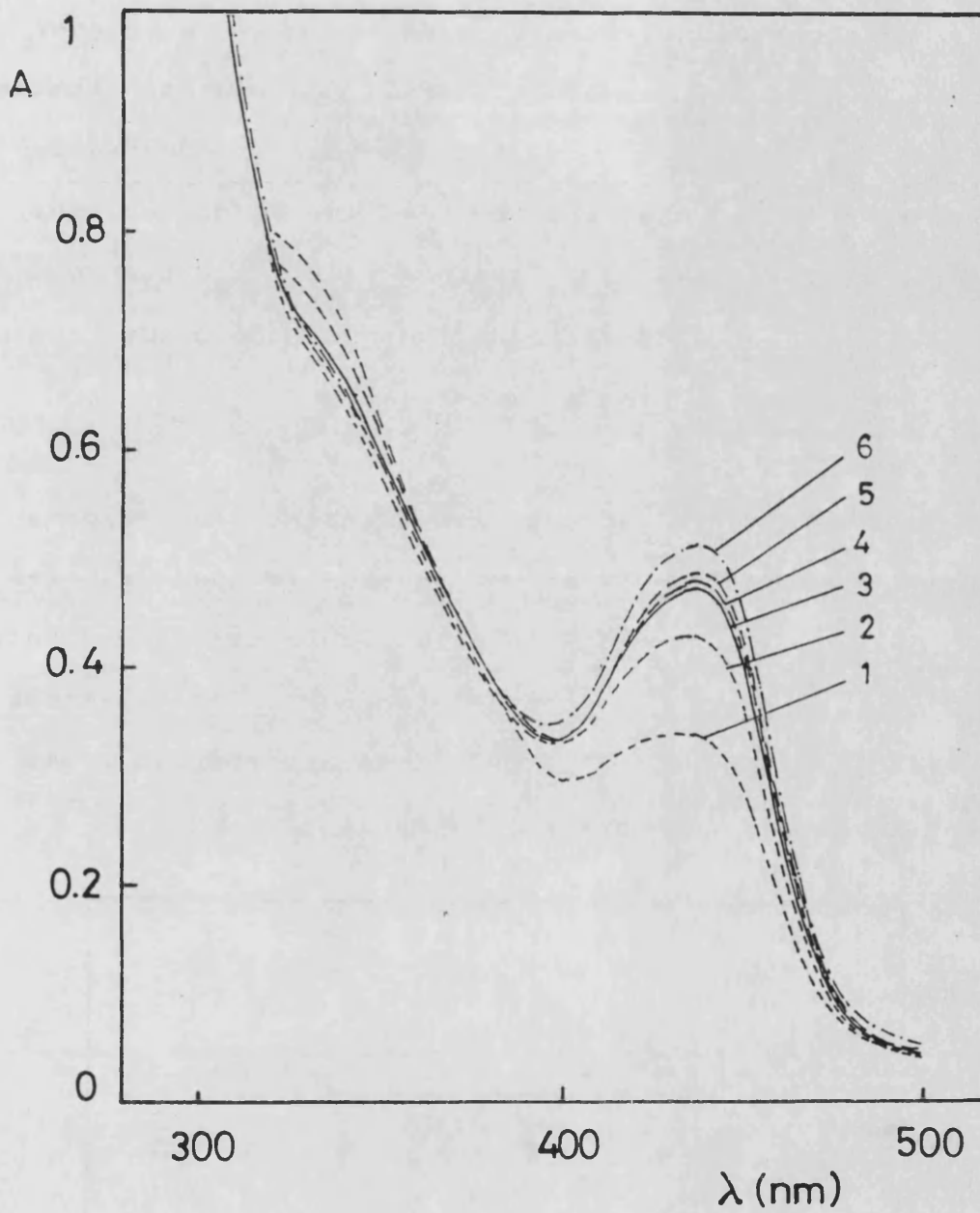


Figura 19. - Efecto de la adición de ácido sobre el producto formado por reacción de cistina y OPA a pH 9.5 .

$C_{\text{cistina}} = 9.07 \times 10^{-5} \text{ M}$  ;  $C_{\text{OPA}} = 4 \times 10^{-3} \text{ M}$

pH : (1) 4.70 ; (2) 4.04 ; (3) 3.29 ; (4) 3.05 ; (5) 2.62 ; (6) 1.65

Al aumentar nuevamente el pH se vuelve a obtener el espectro del compuesto formado a pH 9.5 . Este comportamiento es distinto al observado con los isoindoles derivados de OPA-ME , en los que la adición de un ácido origina la destrucción irreversible del isoindol. Es posible que el compuesto formado al acidificar un isoindol coincida con el producto OPA-amina obtenido en ausencia de ME (19).

En la Figura 20 se representan los valores de absorbancia a 440 nm frente al pH. Se observa que a valores de pH inferiores a 1 la absorbancia permanece constante, mientras que al aumentar el pH la señal disminuye, no llegando a extinguirse en medio neutro. A pH < 1 la absorbancia a 440 nm permanece inalterada durante varias horas.

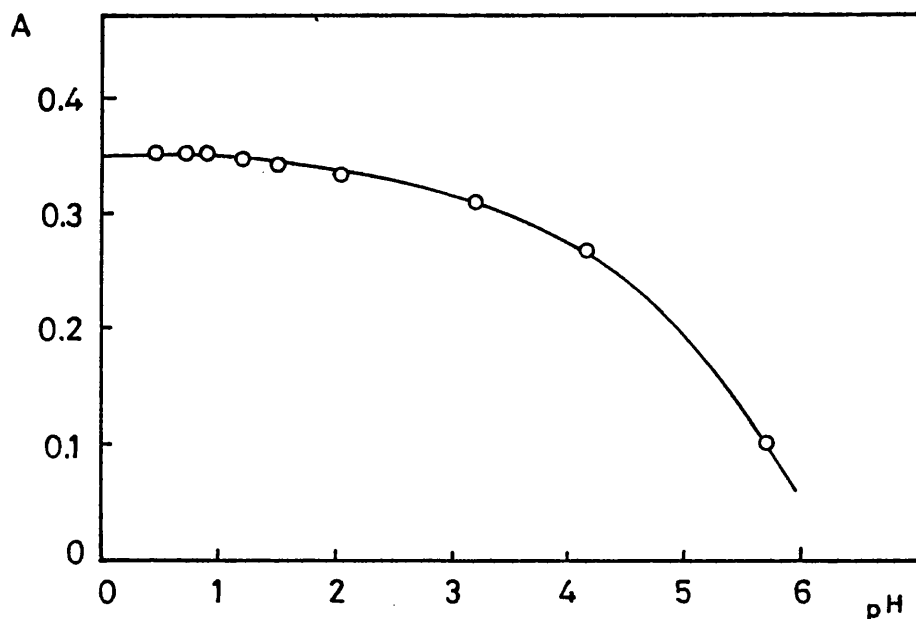


Figura 20. - Aumento de la absorbancia a 440 nm al disminuir el pH.

$C_{\text{isoindol}} = 9.07 \times 10^{-5} \text{ M}$  ;  $C_{\text{OPA}} = 4 \times 10^{-3} \text{ M}$

### 3.- Parámetros analíticos significativos

En este apartado se muestra el intervalo de linealidad, límites de detección y repetitividad correspondientes a la determinación de cistina con OPA en medio bórico-borato y después de la adición de HCl hasta pH<1.

#### a) Curvas de calibrado

##### Medio bórico-borato

Se preparó una serie de disoluciones con tampón bórico-borato de pH 9.5 , OPA  $8.75 \times 10^{-3}$  M y cantidades variables de cistina, procediendo del modo habitual. Se leyó la absorbancia de las disoluciones a 335 nm .

En la Figura 21 se muestra cómo evoluciona la banda a 335 nm con la concentración de cistina, observándose un ligero desplazamiento hipsocrómico para concentraciones de cistina mayores de  $1.3 \times 10^{-4}$  M .

Al representar la absorbancia a 335 nm frente a la concentración de cistina (Figura 22) se observa una ligera curvatura, que se acentúa para concentraciones de cistina superiores a  $1.5 \times 10^{-4}$  M (36 µg/ml) . El ajuste de los datos hasta esa concentración conduce a una recta de ecuación :

$$A = -0.016 + 4.54 \times 10^3 \text{ Cistina}$$

$$r = 0.999$$

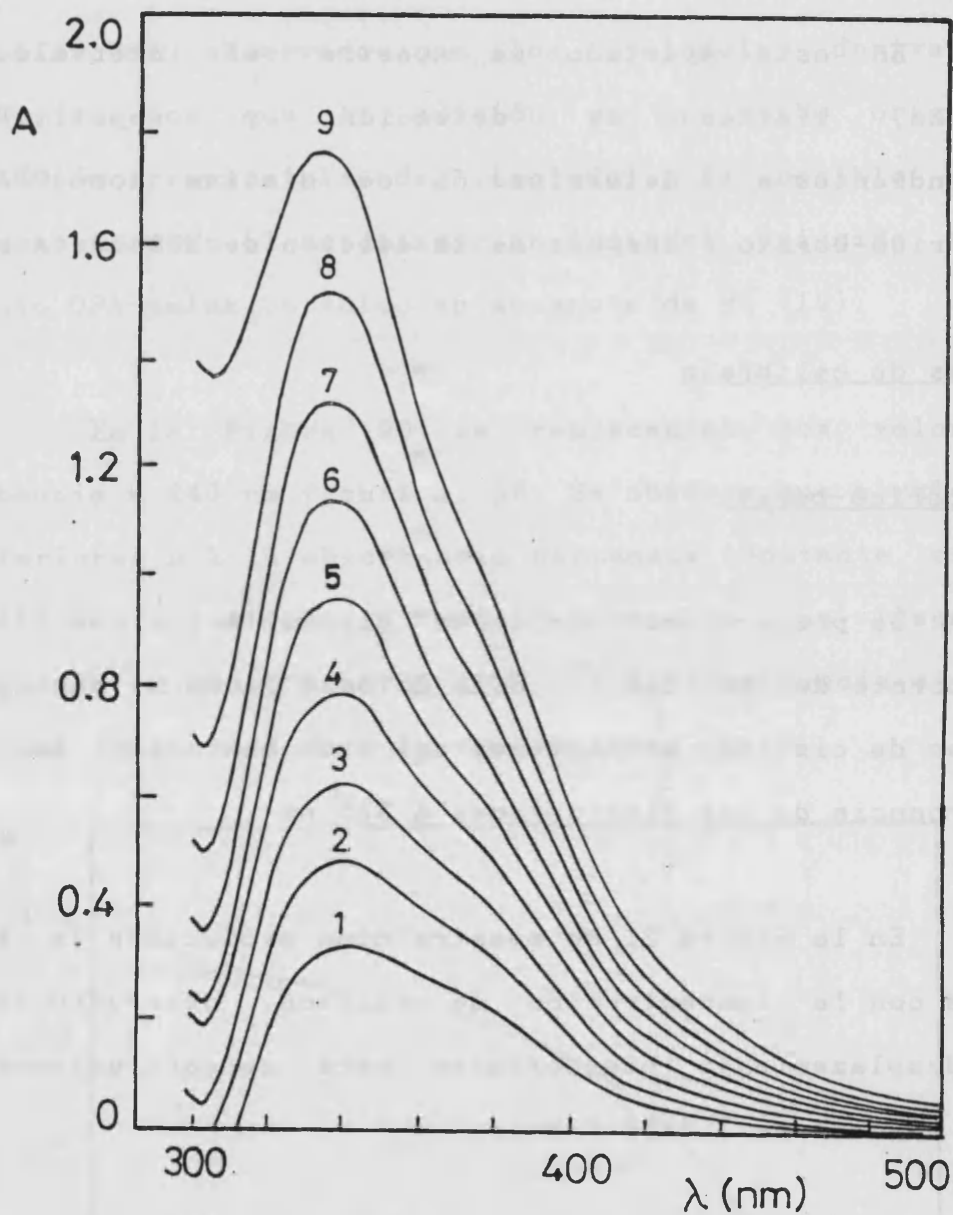


Figura 21. - Efecto de la concentración de cistina sobre el espectro de absorción del derivado de OPA en medio bórico-borato .

$C_{OPA} = 8.75 \times 10^{-3} \text{ M}$

$C_{cistina} \text{ (M)}$  : (1)  $3.6 \times 10^{-5}$  ; (2)  $5.4 \times 10^{-5}$  ; (3)  $7.3 \times 10^{-5}$  ;  
(4)  $9.1 \times 10^{-5}$  ; (5)  $1.09 \times 10^{-4}$  ; (6)  $1.27 \times 10^{-4}$  ; (7)  $1.45 \times 10^{-4}$  ;  
(8)  $1.63 \times 10^{-4}$  ; (9)  $1.81 \times 10^{-4}$



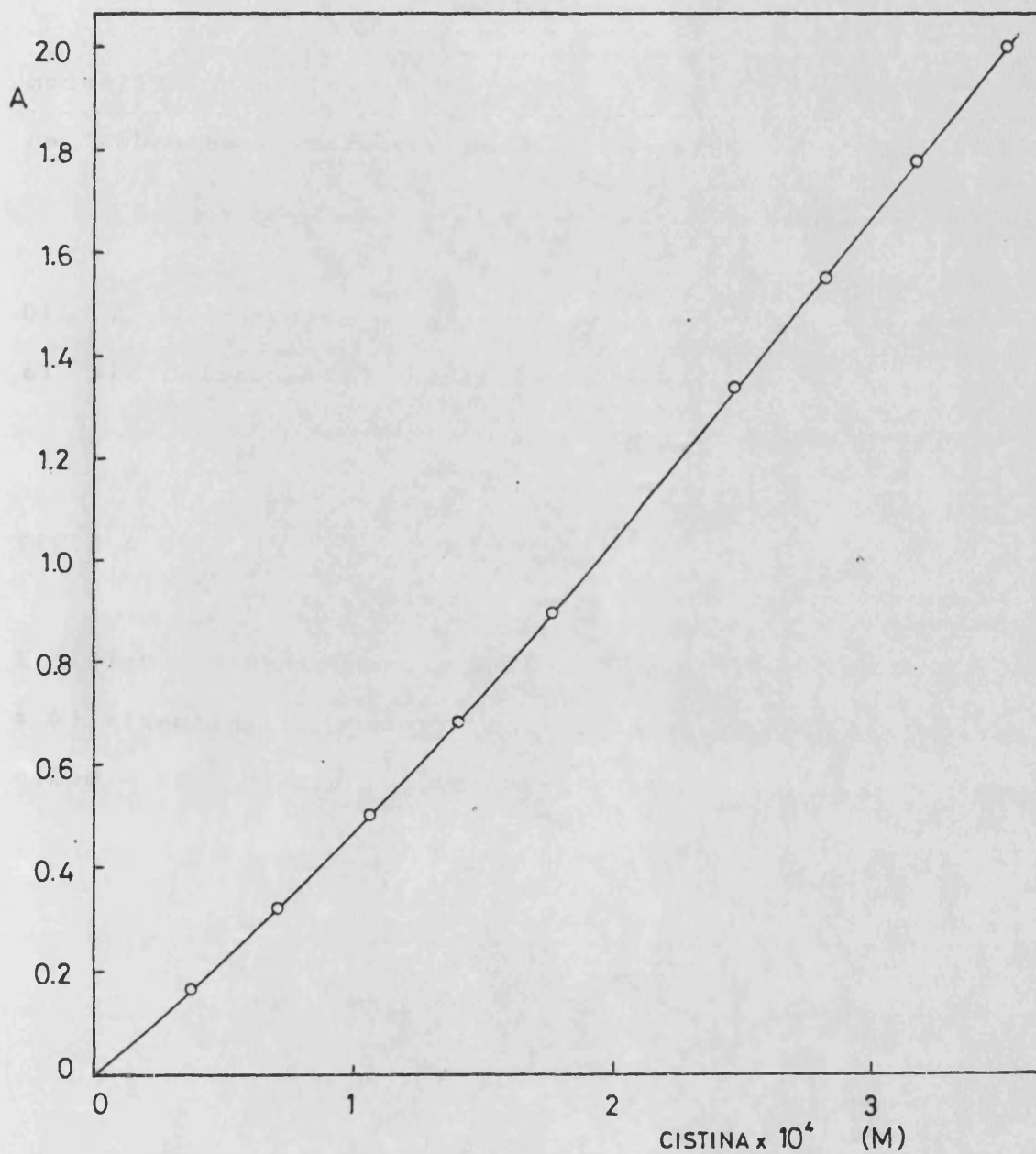


Figura 22. - Gráfica de calibrado en medio bórico-borato.

COPA =  $8.75 \times 10^{-3}$  M

Medio ácido

Las disoluciones anteriores (pH 9.5) se acidificaron con HCl hasta  $\text{pH} < 1$ , obteniéndose los espectros mostrados en la Figura 23.

En la Figura 24.2 se representa la absorbancia a 440 nm frente a la concentración de cistina. La ecuación de la recta de calibrado es:

$$A = -1.1 \times 10^{-4} + 3.83 \times 10^3 C_{\text{cistina}} \quad r = 0.999$$

La linealidad en este caso se amplía al menos hasta  $1.9 \times 10^{-4}$  M (45  $\mu\text{g/ml}$ ), si bien la sensibilidad disminuye ligeramente ( $\epsilon = 3.83 \times 10^3$  frente a un  $\epsilon = 4.54 \times 10^3$  obtenido en medio bórico-borato)(Figura 24).

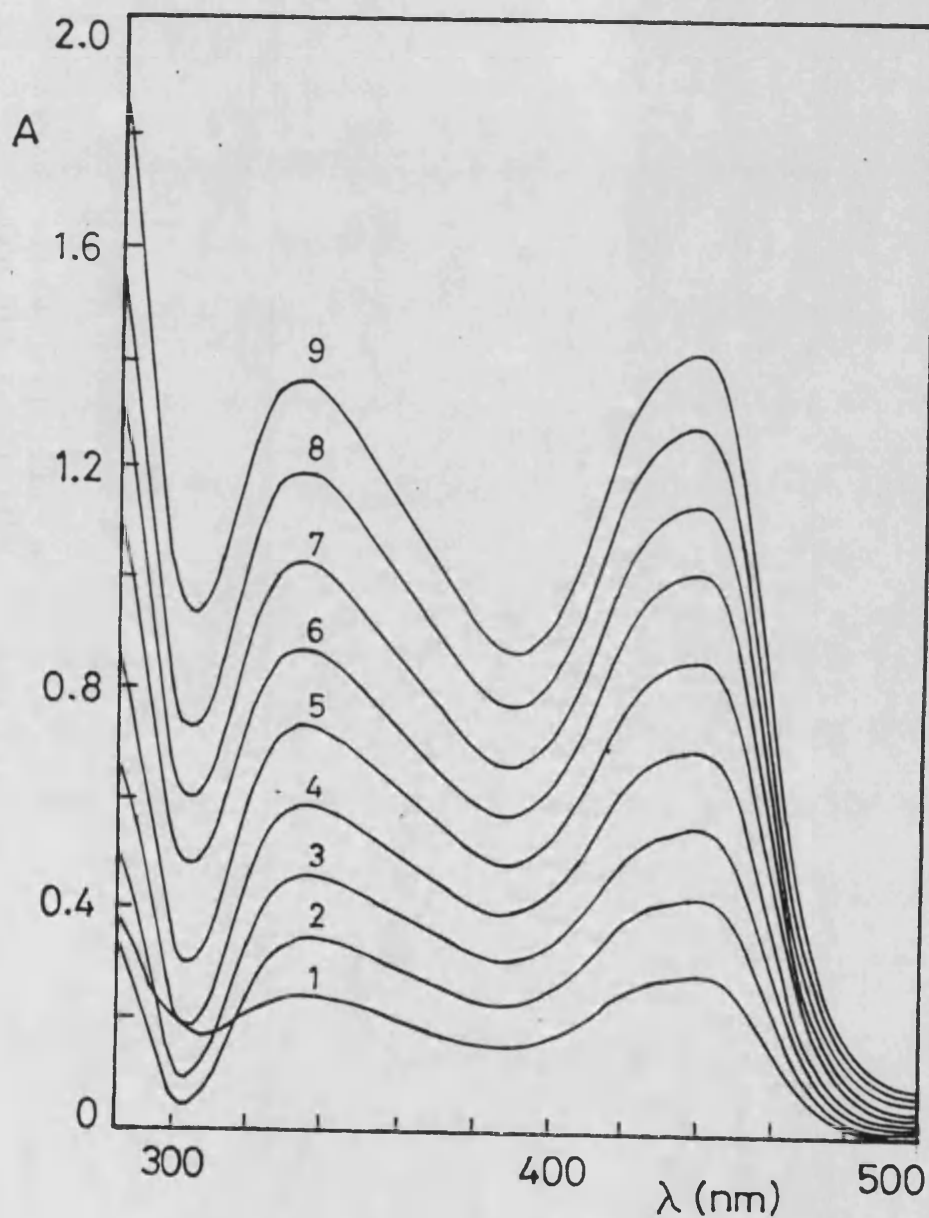


Figura 23. - Efecto de la concentración de cistina sobre el espectro de absorción del derivado con OPA a  $\text{pH} < 1$ .

$C_{\text{OPA}} = 4 \times 10^{-3} \text{ M}$

$C_{\text{cistina}} \text{ (M)}$  : (1)  $3.6 \times 10^{-5}$  ; (2)  $5.4 \times 10^{-5}$  ; (3)  $7.3 \times 10^{-5}$  ;  
(4)  $9.1 \times 10^{-5}$  ; (5)  $1.09 \times 10^{-4}$  ; (6)  $1.27 \times 10^{-4}$  ; (7)  $1.45 \times 10^{-4}$  ;  
(8)  $1.63 \times 10^{-4}$  ; (9)  $1.81 \times 10^{-4}$

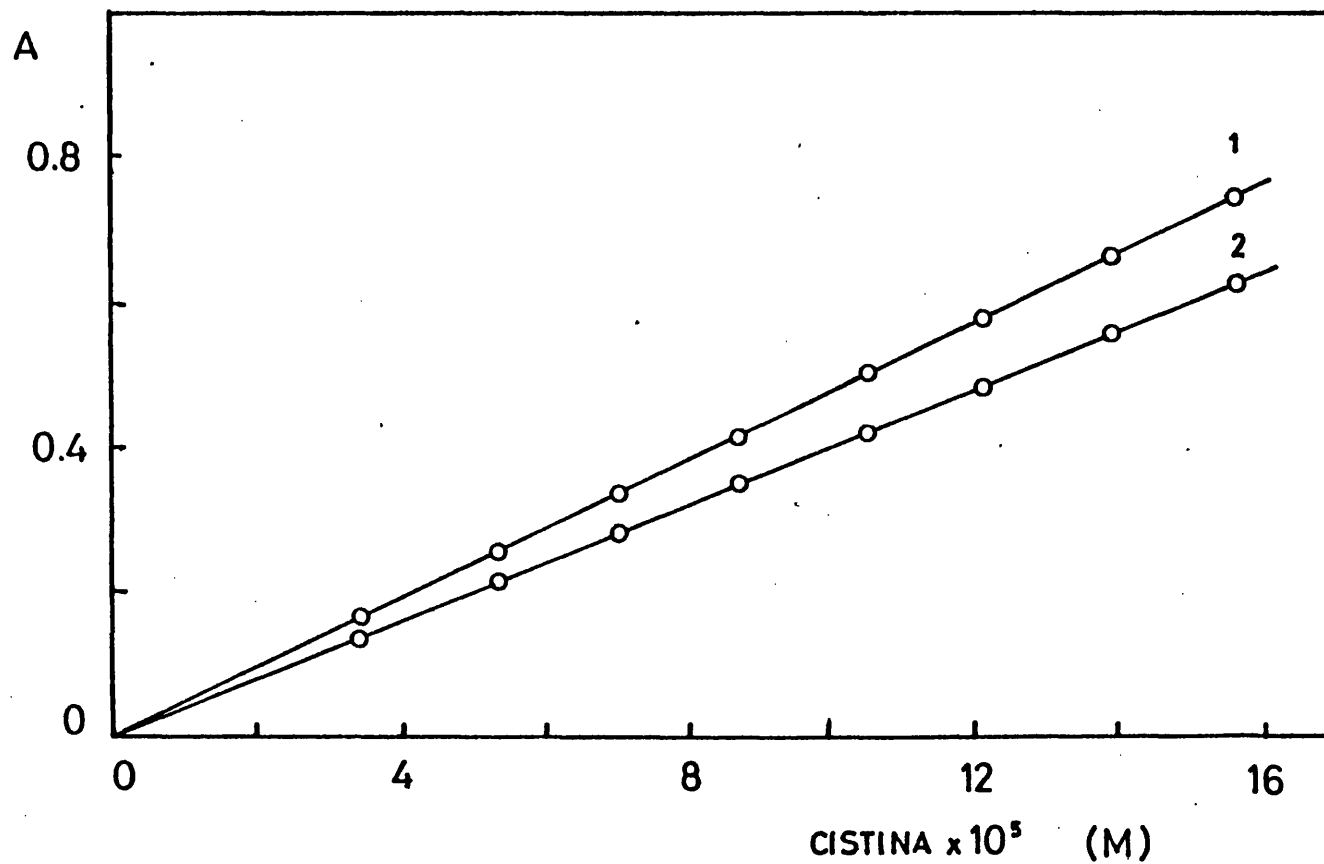


Figura 24. - Gráficas de calibrado en: (1) Medio bórico-borato ( $\lambda = 335$  nm); (2) pH < 1 (HCl) ( $\lambda = 440$  nm).

$C_{OPA} = 4 \times 10^{-3}$  M

b) Límites de detección y determinación

En este apartado se halla la concentración mínima de cistina que puede detectarse y determinarse mediante los procedimientos propuestos. Para ello se prepararon dos series de 10 disoluciones conteniendo OPA en concentración  $2 \times 10^{-3}$  M (1 ml de disolución etanólica  $5 \times 10^{-2}$  M a 25 ml). La primera serie se preparó en tampón bórico-borato de pH 9.5 y la segunda añadiendo primeramente tampón bórico-borato y a continuación HCl concentrado hasta  $\text{pH} < 1$ . Se midió la absorbancia a 335 y 440 nm, respectivamente, frente a un blanco que contenía tampón y 1 ml de etanol.

Los resultados se muestran en la Tabla 15. El límite de detección se ha calculado según el criterio 3s, mientras que el límite de determinación se halló para 10s.

Los valores encontrados para los límites de detección fueron:  $8.39 \times 10^{-7}$  M (0.20  $\mu\text{g/ml}$ ) a 335 nm y de  $5.54 \times 10^{-7}$  M (0.13  $\mu\text{g/ml}$ ) a 440 nm, y para los límites de determinación:  $2.74 \times 10^{-6}$  M (0.67  $\mu\text{g/ml}$ ) y  $1.85 \times 10^{-6}$  M (0.44  $\mu\text{g/ml}$ ), respectivamente.

Tabla 15. - Cálculo del límite de detección.  
Absorbancia de disoluciones de OPA.

Experiencia nº	A	
	pH = 9.5	pH <1
1	0.028	0.005
2	0.025	0.005
3	0.024	0.006
4	0.024	0.005
5	0.024	0.005
6	0.024	0.006
7	0.024	0.007
8	0.024	0.005
9	0.024	0.005
10	0.025	0.006
s	0.0013	$7.0 \times 10^{-4}$

c). Repetitividad

Para este estudio se prepararon independientemente 10 disoluciones idénticas de cistina y OPA en medio bórico-borato, y a pH < 1 . La concentración de cistina fue  $1.3 \times 10^{-4}$  M y la de OPA  $4 \times 10^{-3}$  M .

En la Tabla 16 se muestran los resultados obtenidos tanto en medio bórico-borato ( $\lambda = 335$  nm) como en medio HCl ( $\lambda = 440$  nm). El método presenta una buena repetitividad, siendo los coeficientes de variación del 0.5% y 1.0% , respectivamente.

Tabla 16. - Repetitividad en medio bórico-borato y en medio HCl.

Cistina =  $1.3 \times 10^{-4}$  M ; C<sub>OPA</sub> =  $4 \times 10^{-3}$  M

Experiencia n°	A	
	pH = 9.5	pH < 1
1	0.613	0.479
2	0.617	0.484
3	0.610	0.477
4	0.614	0.472
5	0.609	0.471
6	0.617	0.481
7	0.609	0.480
8	0.616	0.472
9	0.610	0.482
10	0.611	0.471
$\bar{x}$	0.613	0.477
CV(%)	0.5	1.0

#### 4.- Estudio de interferencias

Se estudió el efecto de la presencia de distintos aminoácidos proteicos primarios, junto con ornitina, norleucina, citrulina y norvalina, sobre la determinación de cistina. Para ello se preparó una serie de disoluciones que contenían cistina  $1.3 \times 10^{-4}$  M junto con otros aminoácidos, OPA  $2 \times 10^{-3}$  M y tampón bórico-borato (pH 9.5). Las disoluciones se calentaron durante 30 min a 60 °C y se midió la absorbancia a 335 nm a temperatura ambiente; posteriormente se acidificó con HCl hasta pH <1 y se leyó la absorbancia a 440 nm .

Otros aminoácidos reaccionan con el OPA a pH 9.5 , dando lugar a bandas de absorción a 335 nm (Figura 25). A pesar de que las absortividades molares son en general menores que la de la cistina ( e.g. serina,  $\epsilon = 137$  ; isoleucina,  $\epsilon = 227$  ; ácido glutámico,  $\epsilon = 444$  ; tirosina,  $\epsilon = 597$  ; fenilalanina,  $\epsilon = 839$  ), éstas son lo suficientemente elevadas para producir errores importantes. Además, la absortividad molar de algunos aminoácidos es similar a la de la cistina. Así, en la determinación de cistina en presencia de una concentración de alanina 1.5 veces mayor, el error fue del 250% ; asimismo, con una relación molar glicina/cistina de 3, el error fue del 108 % y con una relación molar triptófano/cistina de 2, el error fue del 120% .



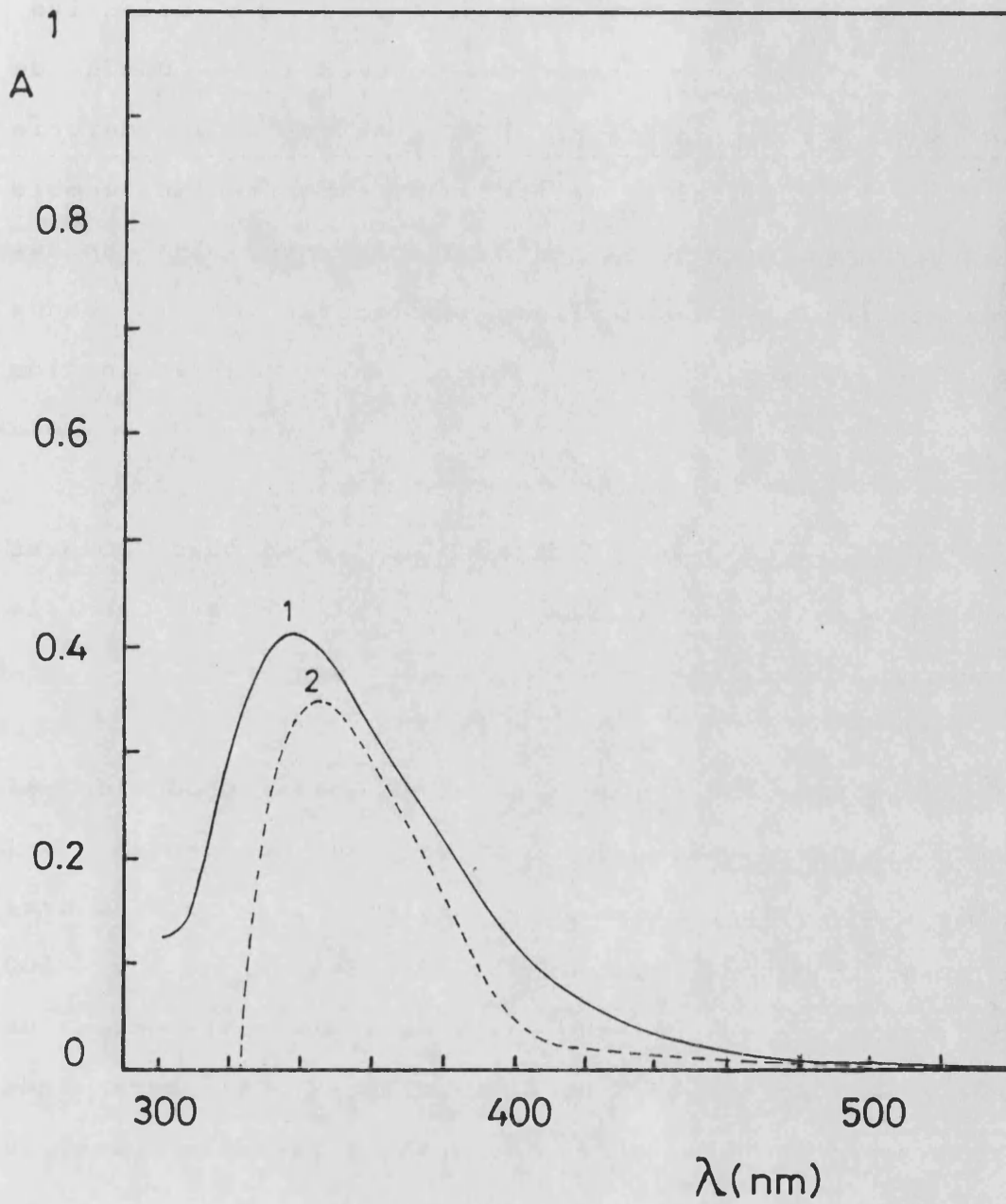


Figura 25. - Espectros de absorción de disoluciones de glicina y OPA en: (1) Medio bórico-borato; (2) Medio ácido.

$C_{OPA} = 2 \times 10^{-3} \text{ M}$  ,  $C_{glicina} = 2.4 \times 10^{-4} \text{ M}$

El procedimiento en medio ácido es más selectivo, puesto que el único aminoácido que presenta la banda de absorción a 440 nm es la cistina. Los espectros de la mayoría de los aminoácidos proteicos primarios no experimentan cambio alguno al disminuir el pH del medio. No obstante, las anchas bandas de absorción a 335 nm llegan a solaparse con la banda de la cistina a 440 nm, interfiriendo en la determinación (Figura 25).

En la Tabla 17 se indican las relaciones molares interferencia/cistina para las cuales el error en la determinación de cistina a 440 nm es menor del 6 % .

Debido al aumento de la línea base producido al acidificar la disolución de cistina en presencia del aminoácido interferente (la absorbancia no llega a anularse incluso a longitudes de onda muy alejadas del máximo e.g. 600 nm), los errores se calcularon comparando la diferencia de absorbancia a 440 y 600 nm (ver Figura 26) para cada aminoácido, frente al valor de esta diferencia para la cistina.

Tabla 17. - Efecto de otros aminoácidos en la determinación de cistina a pH<1\*.

Aminoácido	Relación molar <sup>b</sup>	Aminoácido	Relación molar <sup>b</sup>
Cisteína	0.2	Leucina	4.0
Ornitina	0.3	Valina	4.7
Norleucina	0.6	Tirosina	5.8
Histidina	1.0	Glicina	6.0
Triptófano	1.2	Ac. Aspártico	7.0
Lisina	1.5	Treonina	7.5
Arginina	2.0	Metionina	8.0
Fenilalanina	2.0	Prolina	12.0
Alanina	2.3	Isoleucina	12.5
Citrulina	2.7	Ac. Glutámico	12.5
Glutamina	3.0	Serina	25.0
Norvalina	3.5	Taurina	30.0
Asparagina	3.5		

\* Cistina =  $1.3 \times 10^{-4}$  M .

<sup>b</sup> Relación molar aminoácido/cistina que produce un error relativo < 6% .

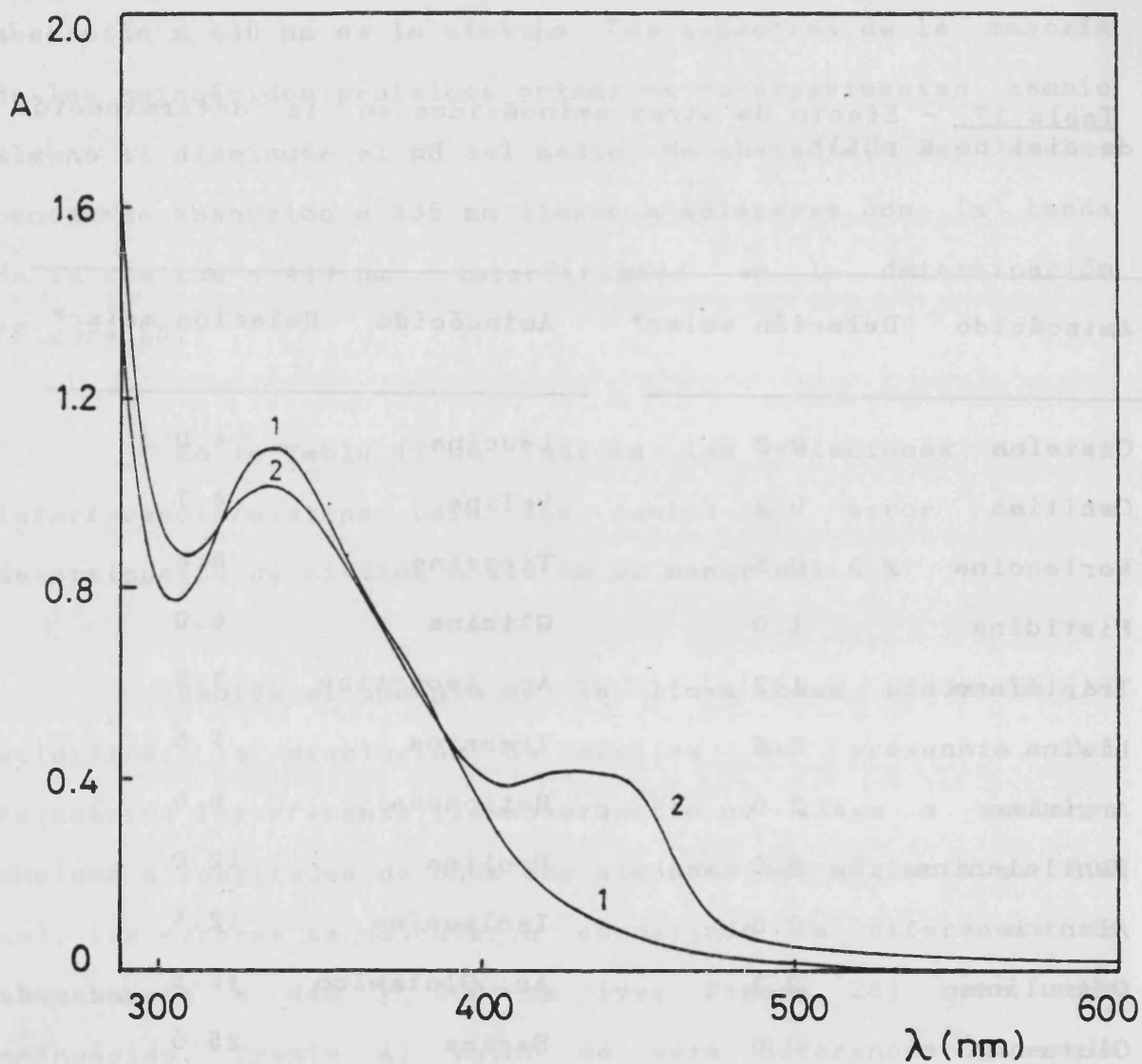


Figura 26. - Espectros de absorción de disoluciones de cistina y OPA en presencia de fenilalanina:  
(1) Medio bórico-borato ; (2) Medio ácido.

Cistina =  $1.3 \times 10^{-4}$  M ;  $C_{OPA}$  =  $2 \times 10^{-3}$  M

Algunos aminoácidos como la alanina, ornitina, lisina e histidina dan lugar a coloraciones (rosa a violeta), presentando una banda de absorción con  $\lambda_{max} > 440$  nm, que interfiere gravemente en la determinación de cistina. Además, la coloración violeta que presenta la ornitina en medio bórico-borato, se vuelve naranja a los pocos minutos, y roja al acidificar.

Existen referencias sobre la formación de productos coloreados con OPA en medio fuertemente ácido u orgánico, con algunos aminoácidos como glicina, triptófano y arginina (138-142), así como taurina y tiramina (143).

Algunos aminoácidos precipitan por la adición de HCl por encima de una cierta concentración: cisteína, norvalina, histidina, citrulina, glutamina, glicina, tirosina, isoleucina y metionina. Para la mayoría de estos aminoácidos, el límite de interferencia viene fijado por la aparición de los precipitados, que probablemente absorban el producto de reacción del OPA con la cistina. Sin embargo, aunque el empleo de surfactantes como el SDS (dodecilsulfato sódico) o Triton X-100 evitó la precipitación, la interferencia siguió existiendo.

Una de las interferencias más graves es la de la cisteína, debido a que al acidificar se produce instantáneamente un precipitado, que presenta distintas coloraciones, dependiendo de la concentración de cisteína. La precipitación se evitó utilizando surfactantes, sin embargo, aunque éstos no afectaron a la determinación de cistina, la presencia de cisteína siguió proporcionando valores de absorbancia inferiores a los hallados en su ausencia, para concentraciones superiores a  $2.6 \times 10^{-5}$  M .

El método propuesto no es probablemente lo suficientemente selectivo para permitir la determinación directa de cistina en fluídos biológicos, pero puede ser útil tras una separación cromatográfica.

5.- Análisis de cistina en un preparado farmacéutico

Se aplicó el método propuesto de determinación de cistina a un preparado del laboratorio La Química Médica S. A. (Barcelona), en forma de comprimidos, con un valor nominal por comprimido de 250 mg de cistina, en presencia de excipiente. Este medicamento está indicado para afecciones en las que exista un déficit de azufre como alopecias difusas, peladas, acné, eczemas seborreicos, enfermedades de las uñas, psoriasis, etc.

Para determinar el contenido en cistina se disolvió un comprimido ( ~ 350 mg ) en HCl 1 M , se filtró para separar el excipiente y se aforó a 500 ml ; a continuación se diluyó 25 veces. En aforados de 25 ml se introdujeron 2 ml de muestra, tampón bórico-borato y OPA en concentración  $6 \times 10^{-3}$  M.

La determinación se hizo aplicando el método de adición estándar, añadiendo sobre la muestra cantidades crecientes de una disolución de cistina  $8.79 \times 10^{-4}$  M y siguiendo el procedimiento habitual. Las medidas se realizaron en medio bórico-borato midiendo la absorbancia a 335 nm .

En la Figura 27 se muestra la aplicación del método de adición estándar a la determinación de cistina. El valor obtenido fue 250.4 mg frente a los 250 mg declarados por el fabricante.

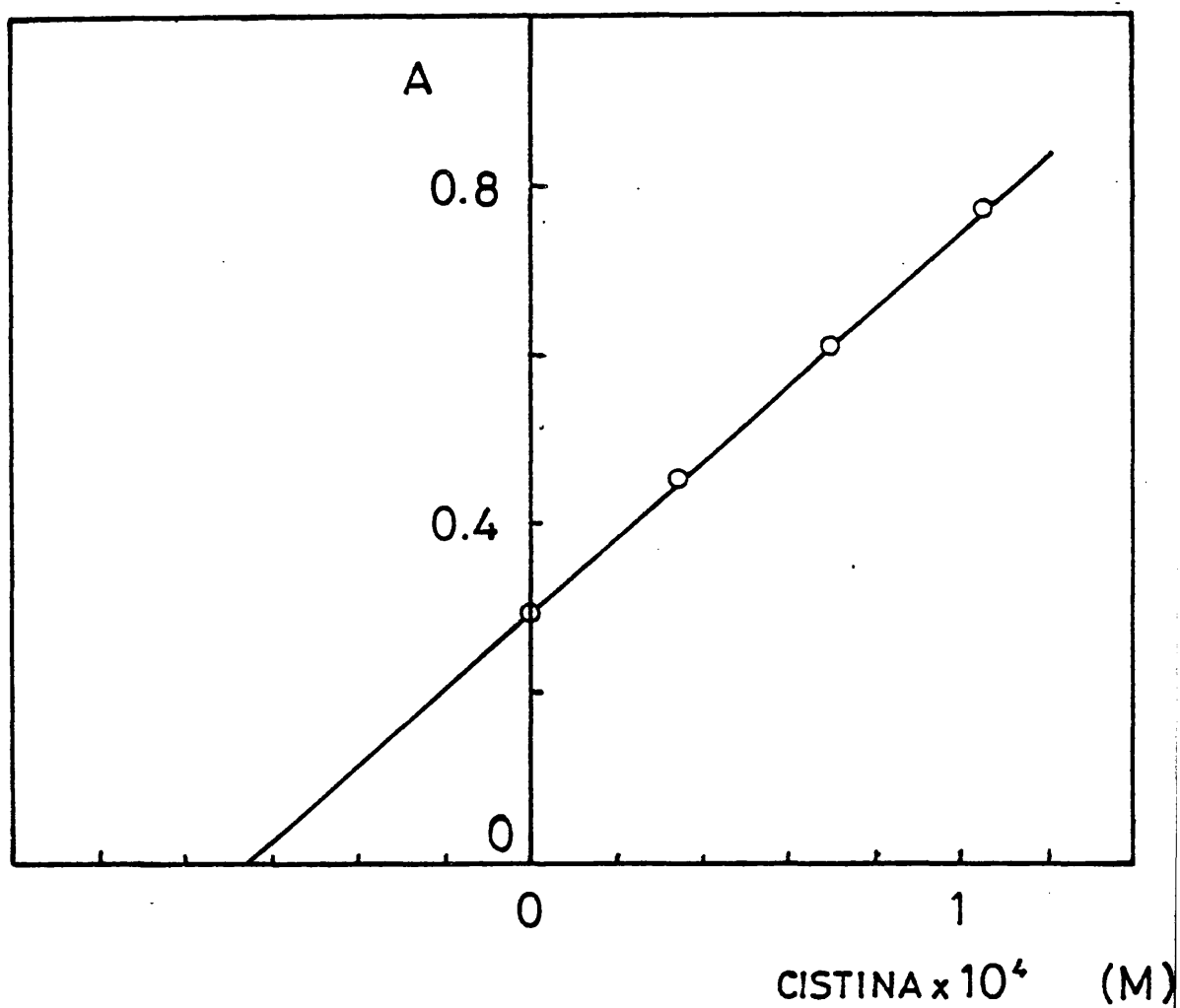


Figura 27. - Método de adición estándar. Determinación del contenido en cistina de un comprimido.

$C_{OPR} = 6 \times 10^{-3} M$



## 6.- Estructura del producto de reacción

### a) Reacción de la cisteína con o-ftaldehido

En la bibliografía se indica que cuando la cistina reacciona con OPA en presencia de ME , se produce su reducción a cisteína, siendo el producto de reacción un derivado de cisteína-OPA. En ausencia de mercaptoetanol, para concentraciones de cistina menores de  $1-2 \times 10^{-6}$  M , también se forma un derivado de cisteína. Sin embargo, cuando su concentración es un orden de magnitud mayor, cistina y cisteína muestran un comportamiento muy distinto. En este apartado se estudia la reactividad de la cisteína con el OPA en las condiciones de determinación de la cistina.

En primer lugar, se obtuvo el espectro del producto de reacción de la cisteína con el OPA (en relación 1:1), que presenta una coloración verde. En la Figura 28 se muestran los espectros de absorción de los derivados de cistina y cisteína en medio bórico-borato, que son claramente distintos, por lo que puede afirmarse que corresponden a distintos productos de reacción.

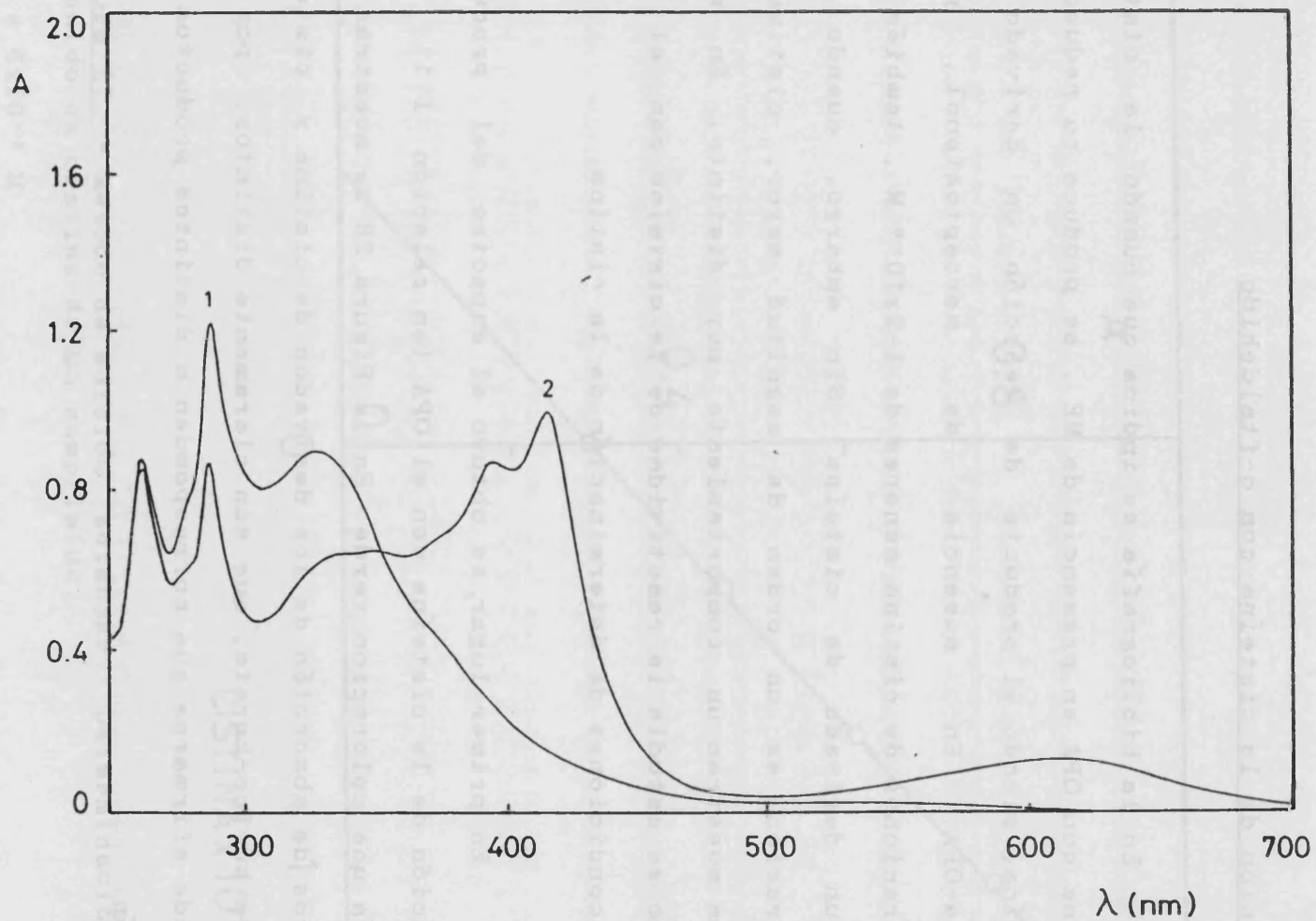


Figura 28. - Espectros de absorción de los productos de reacción de la cistina (1) y cisteína (2) con OPA (relación 1:1) a pH 9.5 .

Se observó, por otra parte, que al acidificar la disolución de cisteína y OPA, se produce la precipitación del producto de reacción, que presenta distintas coloraciones (verde, violeta y marrón), dependiendo de la relación OPA/cisteína.

Con el fin de investigar si es posible la formación de un derivado cisteína-OPA estable, se realizó un estudio de la influencia de la concentración de OPA. Sin embargo, como se observa en la Figura 29, al reaccionar la cisteína con el OPA en medio bórico-bórato, tras calentar 30 min a 60°C, el espectro se modifica al aumentar la concentración de OPA (hasta al menos una relación molar OPA/cisteína de 50), existiendo un cambio muy notable en la forma del espectro para concentraciones bajas de OPA.

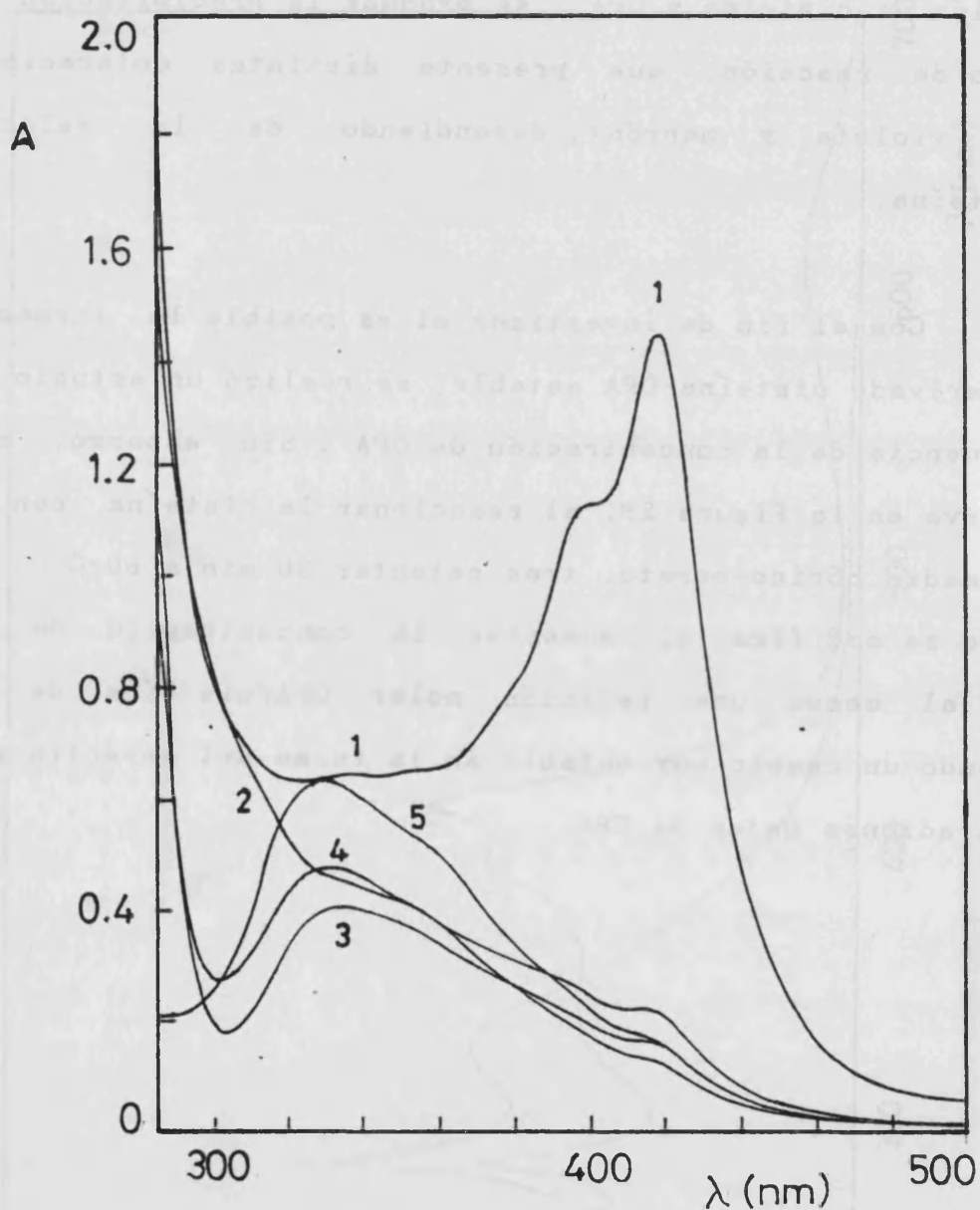


Figura 29. - Influencia de la concentración de OPA sobre el producto de reacción de la cisteína.

$C_{\text{cisteína}} = 5 \times 10^{-4} \text{ M}$

$C_{\text{OPA}} \text{ (M)} : (1) 5 \times 10^{-4} \text{ (1:1)} ; (2) 2.5 \times 10^{-3} \text{ (1:5)} ; (3) 5 \times 10^{-3} \text{ (1:10)} ; (4) 1.25 \times 10^{-2} \text{ (1:25)} ; (5) 2.5 \times 10^{-2} \text{ (1:50)}$

b) Determinación de la estequiometría

Para la determinación de la estequiometría del producto de reacción de la cistina con el OPA se aplicó el método de Asmus, según el procedimiento indicado en el apartado III.2.4 .

Para ello se preparó una serie de disoluciones que contenían tampón bórico-borato, cistina  $5.7 \times 10^{-5}$  M y volúmenes variables de una disolución de OPA  $3.8 \times 10^{-3}$  M , llevándolos a un volumen final de 25 ml . Se calentaron las disoluciones a  $60^{\circ}\text{C}$  durante 30 min, leyéndose la absorbancia a 335 nm .

En la Figura 30 se representa la aplicación del método de Asmus, observándose cómo el compuesto coloreado se forma por reacción de un mol de cistina con dos moles de OPA. La ecuación de la recta obtenida fue:

$$1/v^2 = -1.355 + 0.32 (1/A) \qquad r = 0.998$$

Conocida la estequiometría del derivado, es posible conocer un valor aproximado de su constante de formación acumulada, a partir de la ordenada en el origen. El valor obtenido fue :

$$\log \beta_2 = 7.7$$

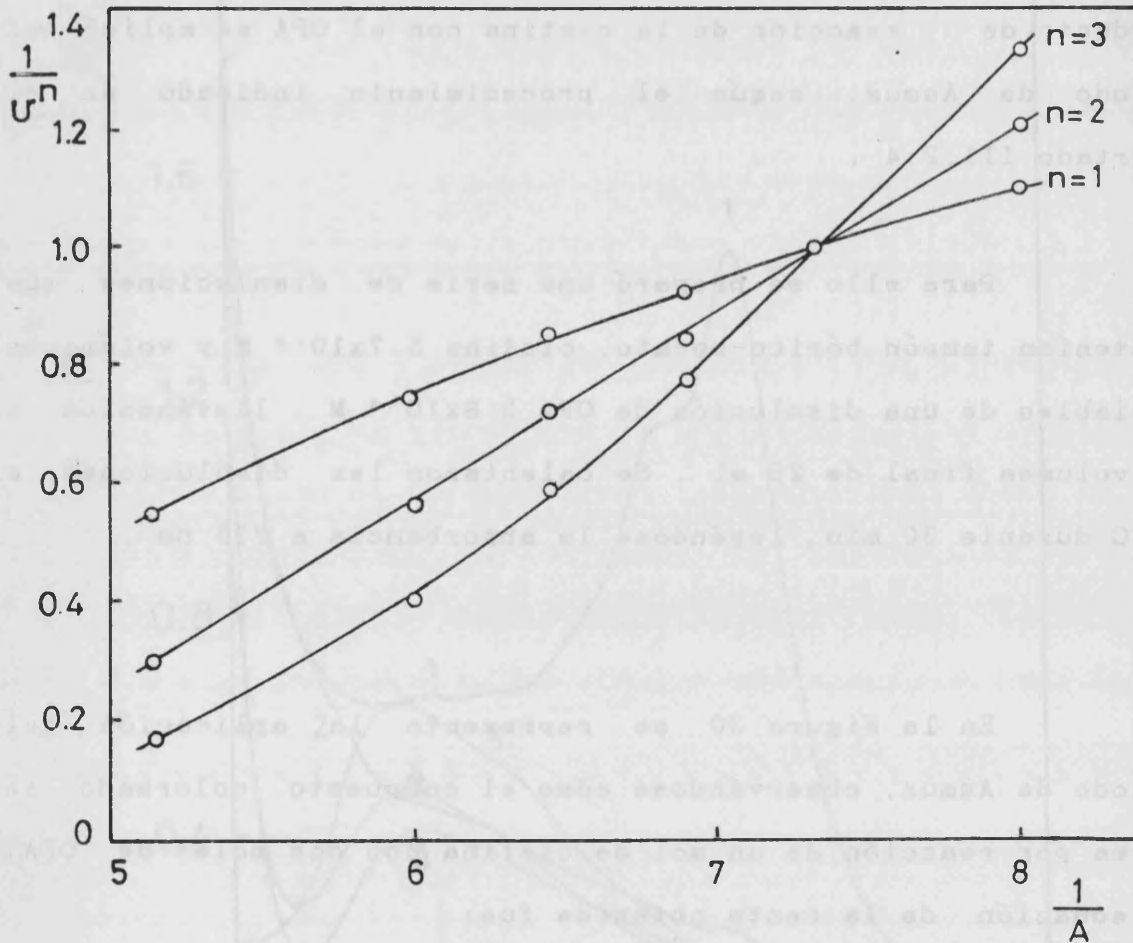


Figura 30. - Determinación de la estequiometría de la reacción de la cistina con OPA . Método de Asmus.

$C_{\text{cistina}} = 5.7 \times 10^{-5} \text{ M}$  ;  $C_{\text{OPA}} = 3.8 \times 10^{-3} \text{ M}$

c) Carácter ácido-base del producto de reacción

En el apartado III.3.3.1 se puso de manifiesto la aparición de una banda a 440 nm al acidificar el producto de reacción de la cistina con el OPA, formado a pH 9.5 . Asimismo, en el apartado III.3.3.2.c se encontró que a  $\text{pH} < 1$  se obtienen valores de absorbancia constantes a 440 nm . La aparición de dos puntos isobéuticos indicaron además la existencia de dos grupos ácido-base, que se protonan en medio ácido débil.

En este apartado se hallan las constantes de protonación del producto de reacción de la cistina con el OPA a  $I = 0.1 \text{ M}$  y  $20^\circ \text{ C}$  . Para ello, se preparó una disolución que contenía cistina  $3.6 \times 10^{-4} \text{ M}$  , OPA  $2.5 \times 10^{-2} \text{ M}$  , NaOH  $0.09 \text{ M}$  y una disolución tampón universal de Britton-Robinson (compuesto de acetato, fosfato y borato en concentraciones iguales), cuya preparación se detalla a continuación. La mezcla, de pH 9.5 , se calentó 30 min a  $60^\circ \text{ C}$  y se tomaron alícuotas, a las que se añadió distintos volúmenes del mismo tampón universal y de HCl, leyéndose la absorbancia a 440 nm.

Las disoluciones tampón se prepararon utilizando un diagrama  $\log C$  frente a  $C_{\text{H}^+}/C$  (donde  $C$  representa la concentración analítica del tampón universal y  $C_{\text{H}^+}$  la concentración analítica de los iones  $\text{H}^+$ ), que Ramis Ramos y col. (144) trazaron para el tampón universal de Britton-Robinson (acetato-fosfato-borato) en concentraciones iguales y a diversas fuerzas iónicas (Figura 31).

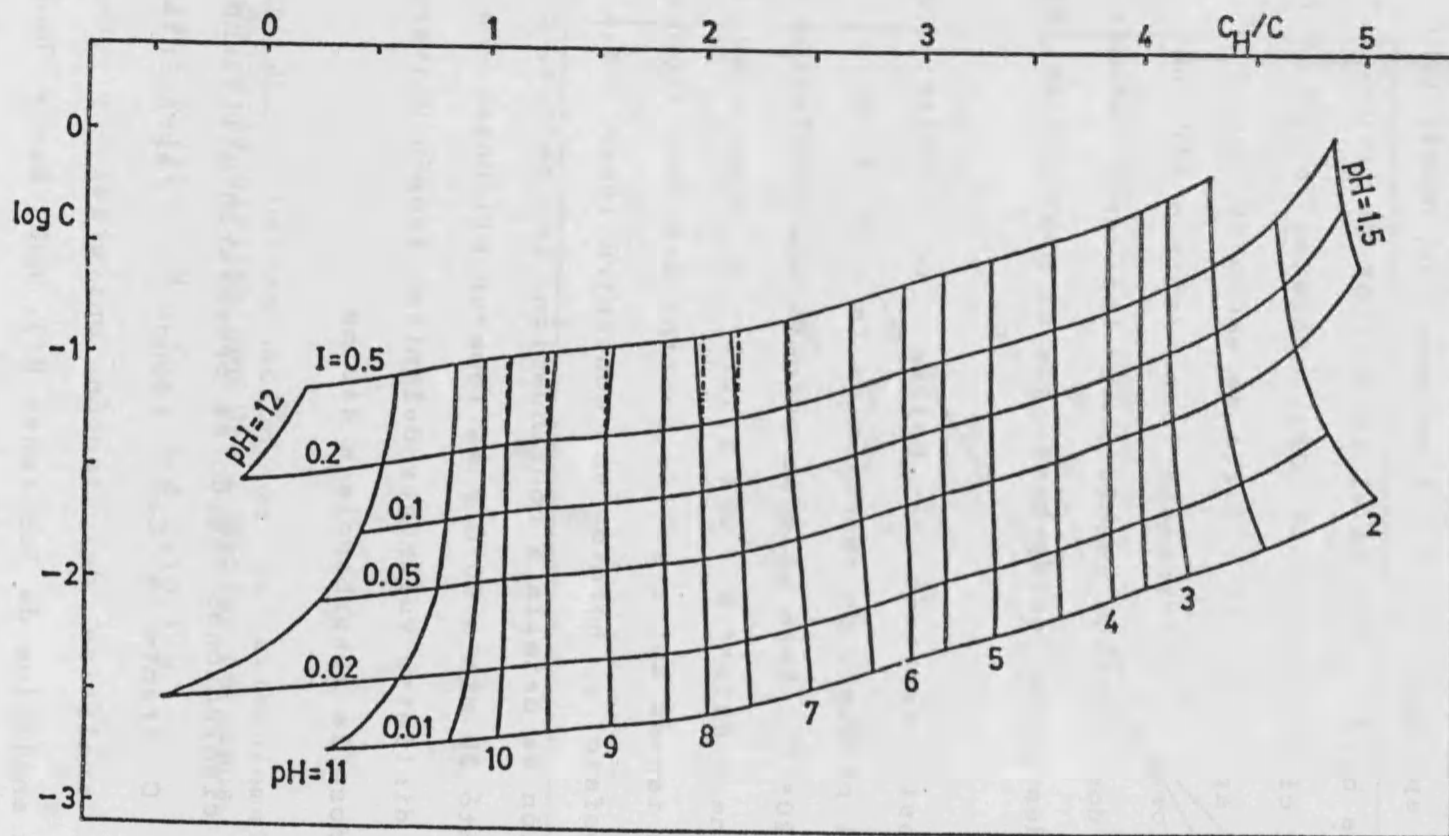


Figura 31. - Diagrama log C vs  $C_H/C$  para el tampón universal de Britton-Robinson (acetato-fosfato-borato en concentraciones iguales) a distintas fuerzas iónicas.



El diagrama fue construido tomando las siguientes constantes de protonación a 25°C y I = 0.1 .

Acido acético             $\log K_1 = 4.56$

Acido fosfórico         $\log \beta_1 = 11.74$

$\log \beta_2 = 18.46$

$\log \beta_3 = 20.46$

Acido bórico             $\log \beta_1 = 8.97$

$\log \beta_{2,s} = 19.62$

$\log \beta_{4,s} = 38.1$

Para la preparación de disoluciones de distintos valores de pH , se elaboró la Tabla 18 , detallándose a continuación el significado de cada columna :

pH :                    Valores de pH esperados.

$C_x/C$  y  $\log C$ :        Valores leídos de la Figura 31.

C:                      Concentración del tampón de Britton-Robinson.  
El tampón se prepara con concentraciones iguales de los sistemas acetato, fosfato y borato, partiendo de una disolución madre en la que los tres sistemas se hallan en concentración 0.25 M . Los reactivos utilizados para su preparación fueron  $HBO_2$ ,  $KH_2PO_4$  y acetato sódico.

**Tabla 18.** - Ajuste del pH de las disoluciones mediante el tampón de Britton-Robinson.

pH	$C_H/C$	$\log C$	C	$C_H$	$C_{HCl}$	$\Delta C$	$v_{tampon}$	$\Delta C_{HCl}$	$v_{HCl}$
9.5	1.28	-1.68	0.0209	0.0267	-0.036	0	0	0	0
9.0	1.55	-1.65	0.0224	0.0347	-0.0325	$1.5 \times 10^{-3}$	0.15	$3.5 \times 10^{-3}$	0.09
8.5	1.80	-1.62	0.0240	0.0432	-0.029	$3.1 \times 10^{-3}$	0.31	$7.0 \times 10^{-3}$	0.18
8.0	1.98	-1.60	0.025	0.050	-0.025	$4.1 \times 10^{-3}$	0.40	0.011	0.28
7.5	2.16	-1.56	0.027	0.060	-0.023	$6.1 \times 10^{-3}$	0.60	0.013	0.32
7.0	2.40	-1.50	0.031	0.076	-0.019	0.010	1.0	0.017	0.42
6.5	2.70	-1.42	0.038	0.103	-0.011	0.0171	1.7	0.025	0.62
6.0	2.92	-1.35	0.045	0.130	$-4.6 \times 10^{-3}$	0.0241	2.4	0.0314	0.79
5.5	3.08	-1.30	0.050	0.154	$4.0 \times 10^{-3}$	0.0291	2.9	0.0400	1.0
5.0	3.30	-1.24	0.058	0.190	0.0173	0.0371	3.7	0.0533	1.33
4.5	3.60	-1.14	0.072	0.261	0.043	0.0511	5.1	0.079	1.98
4.0	3.84	-1.06	0.087	0.334	0.073	0.0661	6.6	0.109	2.72
3.5	3.98	-1.02	0.095	0.38	0.095	0.0741	7.4	0.131	3.28
1.5	4.84	-0.30	0.501	2.426	0.924	-	-	0.130	3.25
1.0	-	-	-	-	-	-	-	0.199	4.97
0.5	-	-	-	-	-	-	-	0.415	10.37

$C_H$ : Representa la concentración de hidrógenos totales que debe haber en la disolución para obtener los diversos valores de pH y que pueden provenir de las formas protonadas de los sistemas acetato-fosfato-borato o de la adición de HCl .

$C_{HCl}$  Representa la concentración de HCl adicional que debe añadirse a la mezcla de acetato-fosfato-borato para obtener el pH deseado. Puesto que el sistema proporciona tres moles de protón por mol de sistema tampón, la  $C_{HCl}$  viene dada como:

$$C_{HCl} = C_H - 3 C$$

Para los pH superiores se obtienen valores de  $C_{HCl}$  negativos, lo que significa que en vez de HCl debe añadirse NaOH.

$\Delta C_{tampón}$ : Puesto que inicialmente debe reaccionar la cistina con el OPA a pH 9.5, y posteriormente deben acidificarse las disoluciones, se preparó una disolución conteniendo cistina  $3.6 \times 10^{-4}$  M , OPA  $2.5 \times 10^{-2}$  M , 126 ml de NaOH 0.178 M y 52 ml de la disolución tampón madre 0.25 M , aforando a 250 ml . De esta disolución se tomaron alícuotas de 10 ml , introduciéndose en aforados de 25 ml . Para la

obtención de los valores de pH inferiores se requiere una concentración del sistema tampón y de  $H^+$  totales mayor que a pH 9.5 , por lo que fue necesario añadir unas cantidades adicionales de tampón y de HCl para mantener constante la fuerza iónica del medio. Esta columna indica la concentración de tampón adicional que debe adicionarse. Se calculó por diferencia entre la concentración de tampón C que debe existir para cada pH y la adicionada para conseguir un pH de 9.5 .

$V_{\text{tampón}}$ : Volumen de tampón 0.25 M adicional que se añade a los aforados de 25 ml .

$\Delta C_{\text{HCl}}$ : Concentración adicional de HCl que debe añadirse a la disolución de pH 9.5 para conseguir valores de pH inferiores. Se calcula como la diferencia entre la concentración de HCl que debe adicionarse y la concentración de HCl necesaria para obtener un pH de 9.5 .

$V_{\text{HCl}}$ : Volúmenes de HCl necesarios. Para valores de pH superiores a 5.5 el HCl utilizado fue 0.1 M , mientras que para los pH inferiores se utilizó HCl 1 M .

En la Tabla 19 se muestran los valores de pH esperados y los experimentales, observándose una concordancia aceptable.

Tabla 19. - Efecto de la acidez del medio sobre el producto de reacción de la cistina con OPA obtenido en medio bórico-borato.

pH		A	
esperado	encontrado	experimental	teórica
9.5	9.504	0.155	0.201
9.0	9.006	0.174	0.201
8.5	8.288	0.180	0.201
8.0	7.680	0.190	0.201
7.5	7.355	0.200	0.210
7.0	6.927	0.212	0.210
6.5	6.346	0.230	0.234
6.0	5.816	0.267	0.275
5.5	5.303	0.309	0.314
5.0	4.897	0.350	0.340
4.5	4.302	0.403	0.398
4.0	3.780	0.467	0.465
3.5	3.003	0.561	0.564
1.5	1.258	0.588	0.607
1.0	0.942	0.604	0.609
0.5	0.515	0.617	0.609

Para la determinación de las constantes de protonación, se aplicó el método de regresión lineal múltiple. Para ello se partió de la ecuación que relaciona la absorbancia de la disolución, A, con la concentración de hidrogeniones, h:

$$A = \frac{\epsilon_0 + \epsilon_1\beta_1h + \epsilon_2\beta_2h^2}{1 + \beta_1h + \beta_2h^2} \cdot C \quad [25]$$

donde  $\epsilon_0$ ,  $\epsilon_1$  y  $\epsilon_2$  son las absortividades molares de las especies no protonada, mono y diprotonada;  $\beta_1$  y  $\beta_2$  las constantes de protonación acumuladas del sistema ácido-base y C su concentración.

La expresión [25] puede escribirse de modo que adopte la forma de la ecuación de un plano:

$$Z = a_0 + a_1X + a_2Y \quad [26]$$

donde los parámetros  $a_0$ ,  $a_1$  y  $a_2$  están relacionados con  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  y  $\epsilon_1$ , mientras que X, Y y Z son función de  $\epsilon_0$ ,  $\epsilon_2$ , h y  $\epsilon$  (siendo  $\epsilon = A/C$ ).

En realidad, al reordenar la expresión [25] se pueden obtener 4 expresiones distintas (Tabla 20).

Tabla 20. - Obtención de las constantes de protonación mediante el método de regresión lineal múltiple.

Plano	Ecuación	X	Y	Z
I	$\beta_2 z + \beta_1 \epsilon_1 Y + \beta_1 X - 1$	$-h \frac{\epsilon}{\epsilon - \epsilon_0}$	$h \frac{1}{\epsilon - \epsilon_0}$	$h^2 \frac{\epsilon_2 - \epsilon}{\epsilon - \epsilon_0}$
II	$\frac{\beta_2}{\beta_1} z + \epsilon_1 Y + \frac{1}{\beta_1} X - 1$	$h^{-1} \frac{\epsilon_0 - \epsilon}{\epsilon}$	$\frac{1}{\epsilon}$	$h \frac{\epsilon_2 - \epsilon}{\epsilon}$
III	$\frac{1}{\beta_1 \epsilon_1} z + \frac{1}{\epsilon_1} Y + \frac{\beta_2}{\beta_1 \epsilon_1} X - 1$	$h(\epsilon - \epsilon_2)$	$\epsilon$	$h^{-1}(\epsilon - \epsilon_0)$
IV	$\frac{1}{\beta_2} z + \frac{\beta_1}{\beta_2} Y + \frac{\beta_1 \epsilon_1}{\beta_2} X - 1$	$h^{-1} \frac{1}{\epsilon - \epsilon_2}$	$-h^{-1} \frac{\epsilon}{\epsilon - \epsilon_2}$	$h^{-2} \frac{\epsilon_0 - \epsilon}{\epsilon - \epsilon_2}$

C. Mongay y col. (145), en un estudio realizado sobre la bondad de las constantes obtenidas al aplicar el método de mínimos cuadrados a las cuatro expresiones, observaron que cuando la curva A-pH es ascendente o descendente, los mejores resultados se obtienen utilizando las ecuaciones II y III. En este estudio se aplicó la ecuación III.

Para aplicar el método es necesario conocer los valores de  $\epsilon_0$  y  $\epsilon_2$ . El valor de  $\epsilon_2$  es perfectamente conocido, dado que a  $\text{pH} < 1$  se obtiene una lectura constante de la absorbancia, sin embargo, el valor de  $\epsilon_0$  no es inmediato, ya que en medio básico no se obtiene una estabilización de la

señal, debido probablemente a la existencia de otra forma ácido-base con  $\log K > 8$ , que puede corresponder a la protonación de los nitrógenos isoindólicos.

Para poder aplicar el método expuesto, se supuso un valor de  $\epsilon_0$  y se siguió un procedimiento iterativo hasta que la curva experimental concordó satisfactoriamente con la teórica. Los valores obtenidos fueron:

$$\begin{aligned} \epsilon_0 &= 1249 & \epsilon_1 &= 2121 & \epsilon_2 &= 3828 \\ \log K_1 &= 5.88 & \log K_2 &= 3.70 \end{aligned}$$

En la Figura 32 se representan los puntos experimentales y la curva teórica obtenida a partir de la ecuación [25] utilizando los valores de  $\epsilon_0$ ,  $\epsilon_1$ ,  $\epsilon_2$ ,  $\beta_1$  y  $\beta_2$  obtenidos. Se observa una buena concordancia entre los valores experimentales y los teóricos.



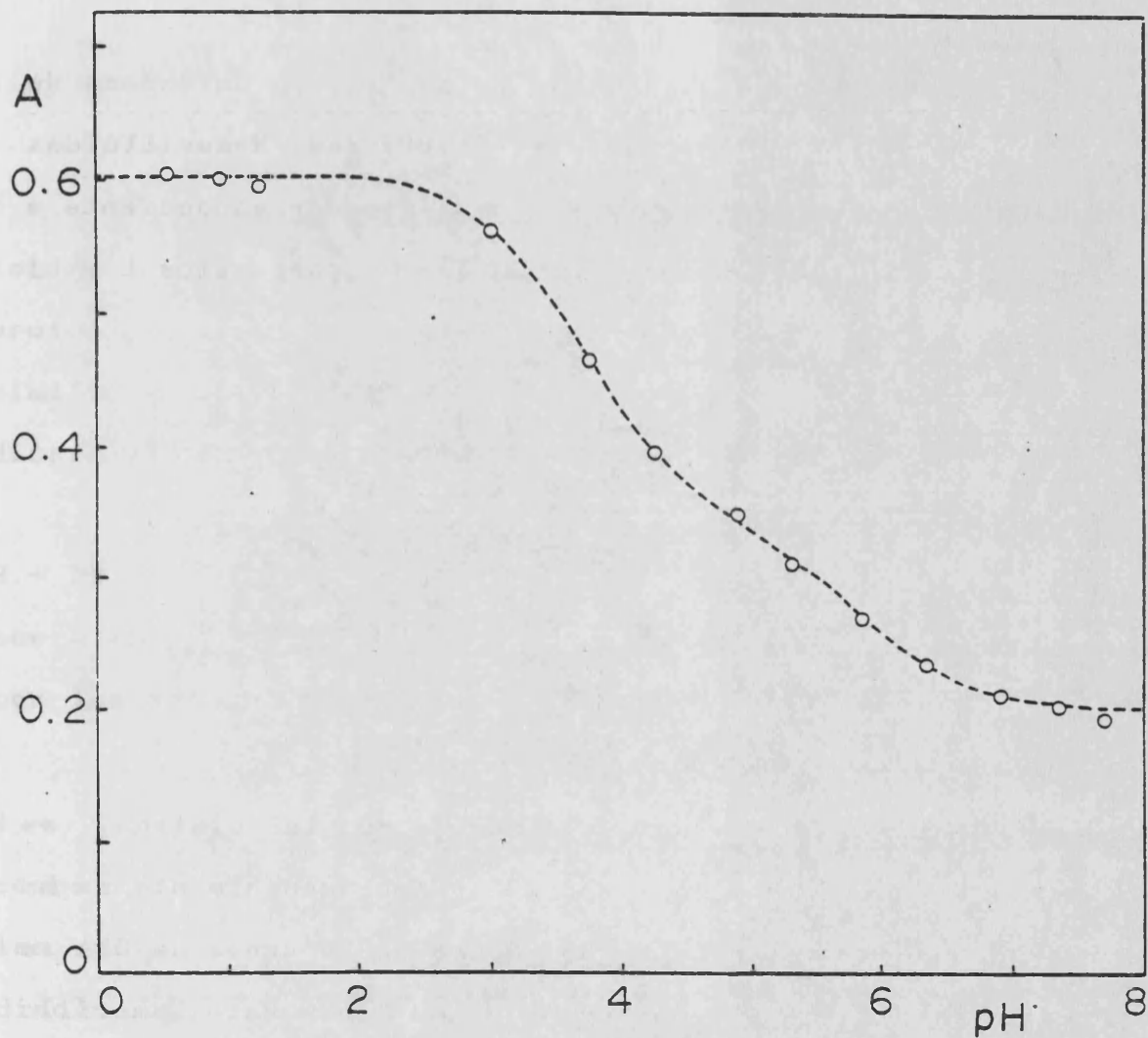


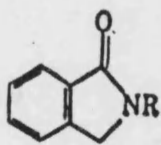
Figura 32. - Carácter ácido-base del producto de reacción de la cistina con el OPA a pH 9.5 , I = 0.1 M y 20°C .

$C_{\text{cistina}} = 1.4 \times 10^{-4} \text{ M}$  ;  $C_{\text{OPA}} = 1 \times 10^{-2} \text{ M}$

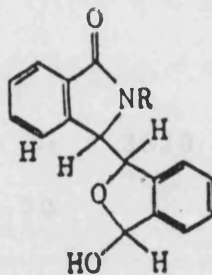
o puntos experimentales ; ---- curva teórica

d) Discusión

La reacción de las aminas primarias con un exceso de OPA en ausencia de tiol, da lugar a ftalimidas N-sustituídas (L) como producto mayoritario y el compuesto correspondiente a la estructura LI (146). La proporción de los compuestos L y LI depende de la relación OPA/amina primaria.

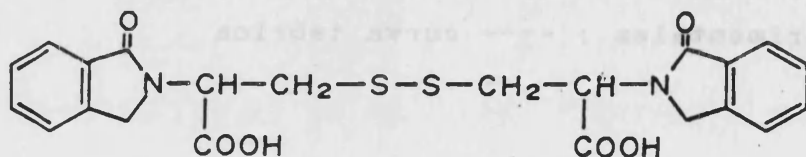


L



LI

Debido a la estructura dimérica de la cistina, se propone la formación del derivado LII. Experimentalmente se ha comprobado que en presencia de un exceso de 25 veces de OPA se produce a las 24 h la precipitación de un compuesto amarillo pálido. Esta precipitación no tiene lugar si la relación OPA/cistina es la estequiométrica. Es posible que el producto formado por reacción de la cistina y el OPA evolucione hacia una estructura análoga a la LI.



LII

La estructura LII se encuentra apoyada por los siguientes hechos experimentales:

- 1.- La estequiometría del compuesto es 1:2 .
- 2.- Se confirmó la existencia de dos grupos ácidos con  $\log K_1 = 5.88$  y  $\log K_2 = 3.71$  , que pueden atribuirse a la protonación de dos grupos carboxilo , ya que estos valores son similares a los correspondientes a otros compuestos dicarboxílicos.
- 3.- El pH óptimo de formación del compuesto es 9.5 , que puede corresponder a la desprotonación del grupo amino de la cistina con  $\log K \approx 9.0$  .
- 4.- Se ha comprobado que la cisteína presenta un comportamiento distinto en las condiciones experimentales en las que se produce la reacción OPA-cistina. Así, las disoluciones resultantes de la reacción OPA-cisteína, cuando los reactivos se encuentran en relación 1:1 son de color verde y su espectro es muy diferente al del derivado de cistina. Con concentraciones mayores de OPA (relaciones molares OPA/cisteína superiores a 5) cambia drásticamente la forma del espectro y no llega a estabilizarse la señal analítica, incluso con excesos de OPA de hasta 50 veces. Además, la acidificación de los productos de reacción produce la aparición inmediata de un precipitado verde. Por ello cabe suponer que no ha tenido lugar la reducción del puente disulfuro de la cistina, que daría lugar al derivado de la cisteína.



III.4.- UTILIZACION DE N-ACETIL-L-CISTEINA EN  
LA DETERMINACION DE AMINOACIDOS CON  
O-FALDEHIDO



#### III.4.1.- INTRODUCCION

La N-acetil-L-cisteína (XXXVII) se ha propuesto recientemente como tiol en la reacción del OPA con las aminas primarias, para la separación cromatográfica y detección fluorimétrica de aminoácidos enantiómeros (ver apartado I.2.2).

Los productos de reacción de OPA y NAC con las aminas primarias presentan las mismas características espectrales que los derivados de OPA-ME, mostrando rendimientos cuánticos de fluorescencia similares en el caso de las aminas primarias y superiores con los iminoácidos previamente oxidados con hipoclorito sódico. Asimismo, los isoindoles derivados del NAC presentan espectros de absorción muy semejantes a los de los derivados del ME, con un máximo de absorción sobre 335 nm. En ambos casos, las sensibilidades como veremos a continuación, son similares para todos los aminoácidos.

Los derivados de los aminoácidos con NAC son mucho más estables que los análogos obtenidos con ME y ET. Estudios fluorimétricos indicaron que la máxima intensidad de fluorescencia se alcanza en 1-2 min y permanece constante durante 10-30 min (78)(82-83). Sin embargo, con NAC no se han realizado estudios de estabilidad paralelos a los realizados con el ME.

Así, el objeto de este capítulo es realizar un estudio cinético-espectrofotométrico de la formación y degradación de los isoindoles derivados del NAC.

### III.4.2.- OPTIMIZACION DE LAS CONDICIONES EXPERIMENTALES

El estudio de las condiciones óptimas de formación de los derivados de aminoácido-OPA-NAC (tiempo de formación, pH, concentraciones de OPA y NAC) se llevó a cabo utilizando un aminoácido modelo, la isoleucina, que forma uno de los derivados más estables con OPA y ME.

#### 1.- Espectro de absorción y estabilidad de los isoindoles derivados de N-acetil-L-cisteína

Se preparó una disolución que contenía isoleucina, OPA y NAC en concentraciones  $1.93 \times 10^{-4}$  M,  $1.2 \times 10^{-3}$  M y  $1.2 \times 10^{-3}$  M, respectivamente, en medio bórico-borato de pH 9.5 a temperatura ambiente, y se registró el espectro de absorción, utilizando como blanco una disolución similar preparada en ausencia de isoleucina. También se registró el espectro de absorción correspondiente a la disolución del blanco.

El espectro de absorción del producto de reacción de la isoleucina con el reactivo OPA-NAC se muestra en la Figura 33. Se observa un máximo a 335 nm, longitud de onda a la que el blanco presenta una absorción muy baja. El resto de aminoácidos presentaron el mismo espectro de absorción, incluida la cistina (ver apartado III.5). La cisteína no forma un isoindol con OPA-NAC, a semejanza de lo que ocurre con OPA-ME.



Por otra parte, cabe destacar la gran estabilidad de los isoindoles derivados del NAC . Así, la estabilización de la señal analítica se alcanzó en un tiempo inferior a los 2 min de mezclar los reactivos, permaneciendo constante para la mayoría de los aminoácidos aquí estudiados durante al menos 60 min , por lo que utilizando NAC no es necesario un control estricto del tiempo de reacción, como ocurre con ME.

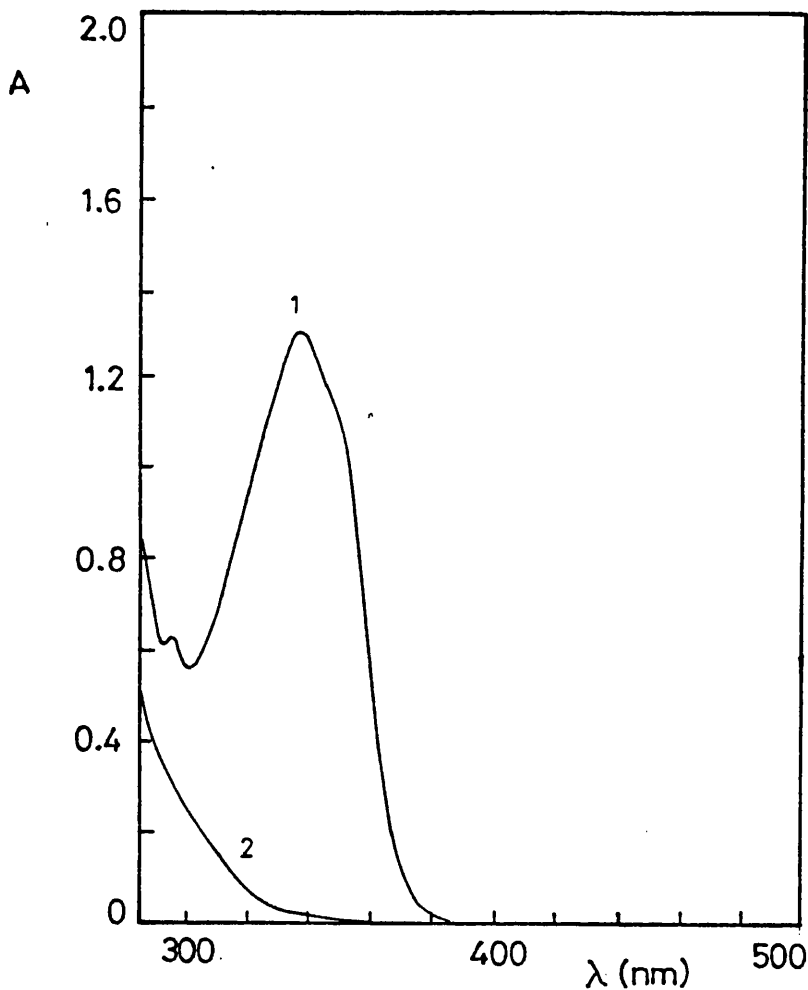


Figura 33. - Espectro de absorción de: (1) Producto de reacción de la isoleucina con el reactivo OPA-NAC ; (2) blanco.

C<sub>isoleucina</sub> =  $1.93 \times 10^{-4}$  M ; C<sub>OPA</sub> = C<sub>NAC</sub> =  $1.2 \times 10^{-3}$  M

## 2.- Influencia del pH

Se estudió la influencia del pH sobre la reacción de la isoleucina con los reactivos OPA-NAC y OPA-ME . Para ello se preparó una serie de disoluciones que contenían isoleucina  $1 \times 10^{-4}$  M , OPA  $1.2 \times 10^{-3}$  M y NAC o ME  $1.2 \times 10^{-3}$  M a distintos valores de pH ajustados con HCl, y con tampones citrato y borato de fuerza iónica 0.1 M . Se leyó la absorbancia a 335 nm frente a un blanco preparado en ausencia del aminoácido.

Los resultados obtenidos con ME y NAC se representan en la Figura 34 . Se observa en ambos casos la existencia de una meseta de máxima absorción, que abarca al menos tres unidades de pH ( 7.5-11 para NAC y 8-11 para ME ). Por otra parte, con el reactivo OPA-NAC se observó que a pH superiores a 11 la absorbancia aumentaba lentamente, aproximándose al valor máximo. El valor representado a  $\text{pH} \sim 12$  se tomó a los 10 min de mezclados los reactivos.

Para el trabajo posterior, se utilizó tampón bórico-borato de pH 9.5 , que son las condiciones normalmente empleadas en la obtención de derivados de OPA y tiol.

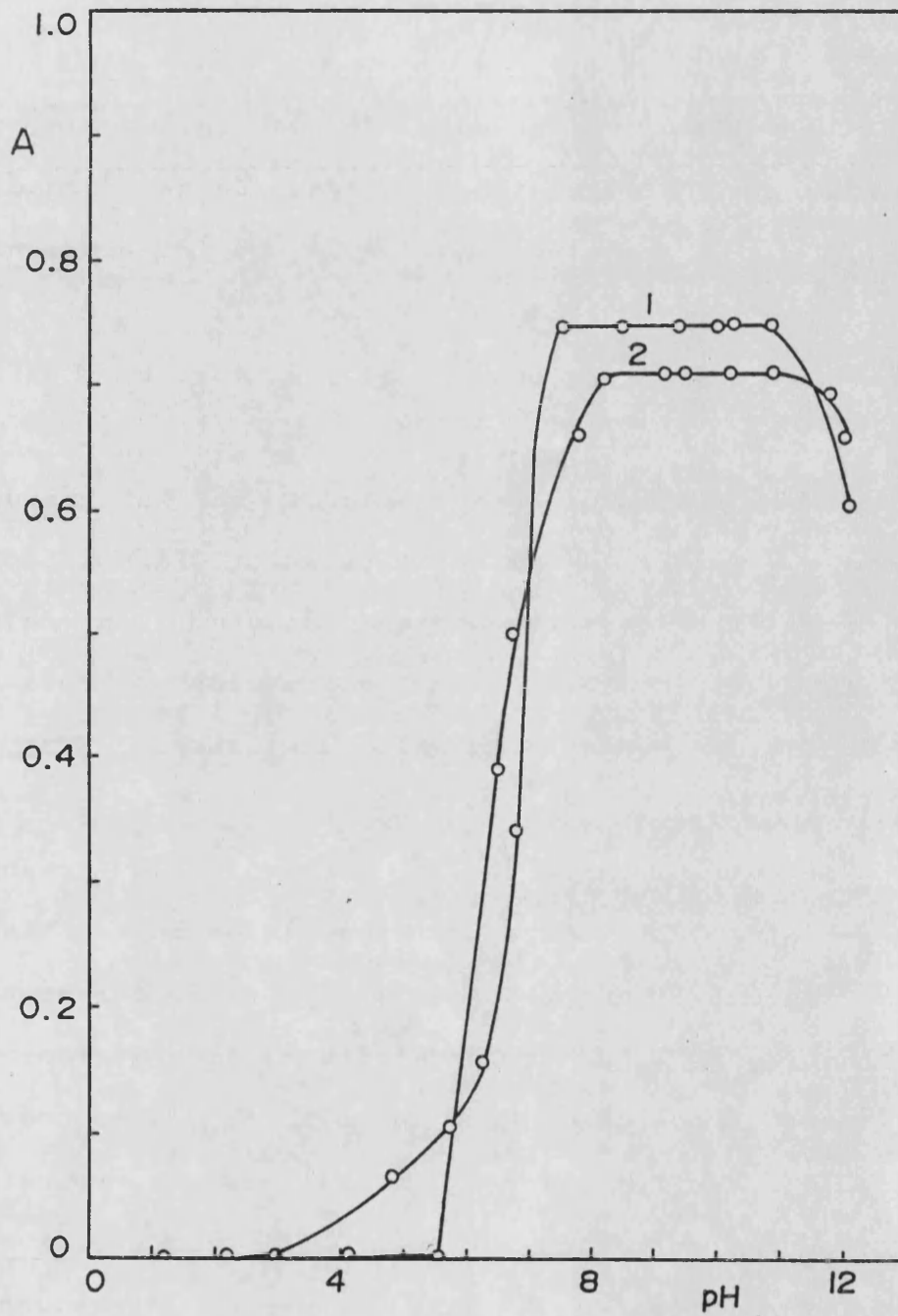


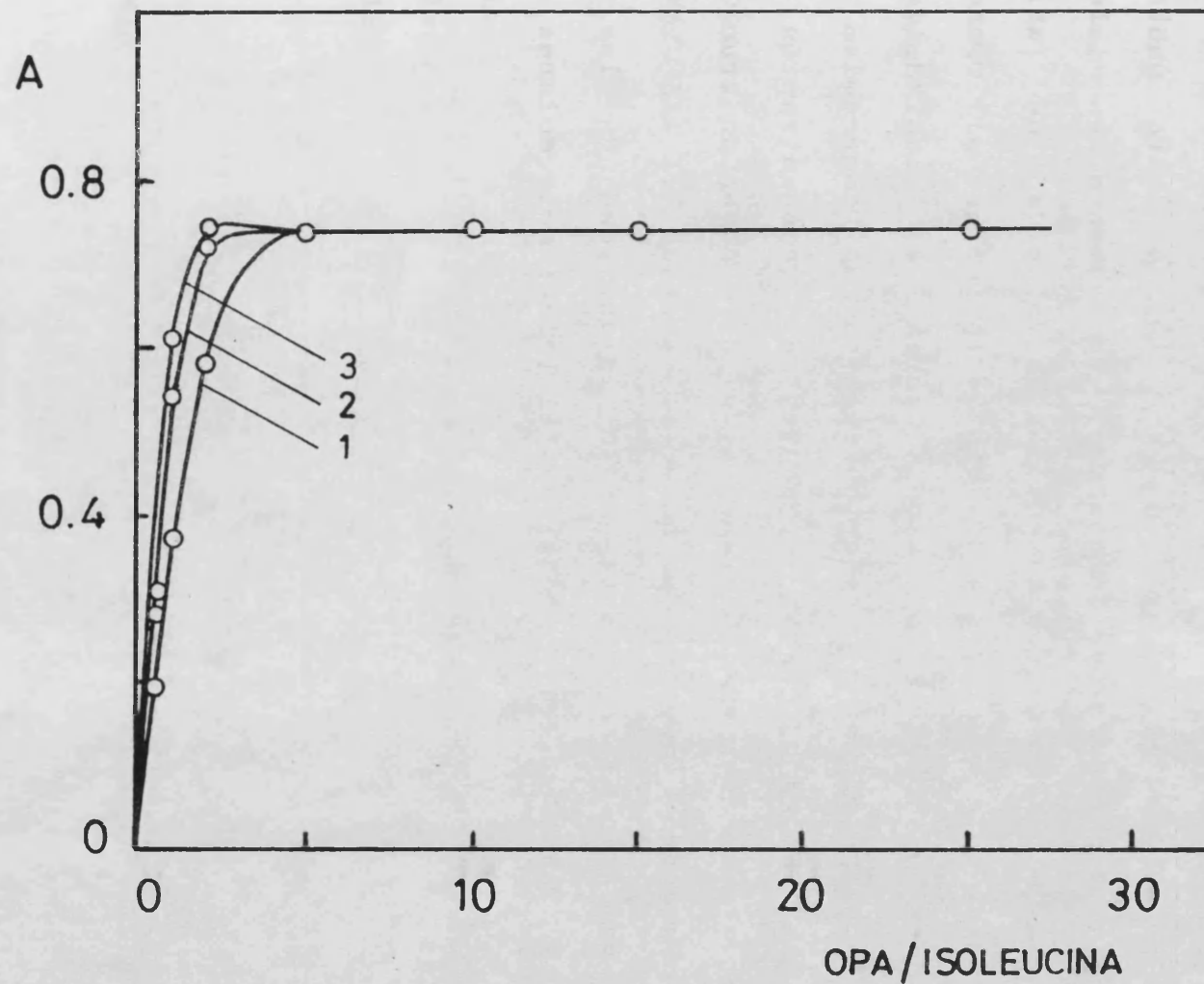
Figura 34. - Influencia del pH: (1) OPA-NAC y (2) OPA-ME .  
Cisoleucina =  $1 \times 10^{-4}$  M ; COPA = CNAC = CME =  $1.2 \times 10^{-3}$  M

### 3.- Influencia de la concentración de o-ftaldehido

Se realizó un estudio de la influencia que la concentración de OPA tiene sobre la reacción de formación de los isoindoles. Se preparó una serie de disoluciones que contenían isoleucina  $1 \times 10^{-4}$  M , NAC  $1.2 \times 10^{-3}$  M , tampón bórico-borato de pH 9.5 y concentraciones variables de OPA .

Los resultados representados en la Figura 35 muestran que a partir de una relación molar OPA/aminoácido = 5 se obtiene un valor de absorbancia constante. Con relaciones superiores a las mostradas (OPA/aminoácido = 200) no se observó variación alguna en la señal analítica.

Por otra parte, se observó que cuando la concentración de OPA es baja, se necesita un mayor tiempo de reacción. Las curvas mostradas en la Figura 35 corresponden a medidas realizadas para distintos tiempos de reacción, 5, 15 y 30 min, observándose que cuando la relación OPA/aminoácido es baja ( $<5$ ) la reacción es lenta, aumentando la velocidad al aumentar la concentración de OPA. Así, a partir de una relación OPA/aminoácido = 5 la reacción transcurre casi instantáneamente, manteniéndose la absorbancia constante al menos durante una hora.



**Figura 35.** - Influencia de la concentración de OPA sobre la reacción de la isoleucina con el reactivo OPA-NAC. En abscisas se representan relaciones molares. Tiempo de reacción: (1) 5 min ; (2) 15 min ; (3) 30 min

$C_{\text{isoleucina}} = 1 \times 10^{-4} \text{ M}$  ;  $C_{\text{NAC}} = 1.2 \times 10^{-3} \text{ M}$

Como se apuntó en la Introducción de esta Memoria (apartado I.1.5), la reacción de los aminoácidos con el OPA para formar isoindoles presenta una cinética de segundo orden respecto al aminoácido y al OPA, por lo que para una determinada concentración de aminoácido, un aumento en la concentración de OPA supone un aumento en la velocidad de la reacción. También se encuentra en la bibliografía, que el OPA presenta un efecto desestabilizador sobre el isoindol fluorescente, por lo que es necesario llegar a un compromiso adecuado. El OPA debe estar presente en concentración suficiente para que la reacción sea rápida, pero no en un gran exceso. Sin embargo, como se muestra en el apartado III.4.5 , la concentración de OPA no afecta a la estabilidad de los derivados de OPA-NAC , al menos hasta relaciones molares OPA/amina de 100 .

#### 4.- Influencia de la concentración de N-acetil-L-cisteína

Se estudió el efecto que la concentración de NAC ejerce sobre la reacción del OPA con los aminoácidos. Para ello se preparó una serie de disoluciones que contenían isoleucina  $1 \times 10^{-4}$  M , OPA  $2.5 \times 10^{-3}$  M , tampón bórico-borato, así como concentraciones variables de NAC, leyendo la absorbancia a 335 nm .

En la Figura 36 se representan los resultados obtenidos, observándose cómo a partir de una relación molar NAC/aminoácido = 3, la absorbancia permanece constante.

Por otra parte, y a diferencia del OPA, para concentraciones bajas de NAC no se observó una reacción más lenta, obteniéndose un valor de absorbancia constante antes de los 5 min de efectuada la mezcla.

Por lo tanto, las condiciones óptimas de análisis son pH 7.5 - 11 y relaciones molares OPA/aminoácido y NAC/aminoácido mayores de 5 y 3 , respectivamente.

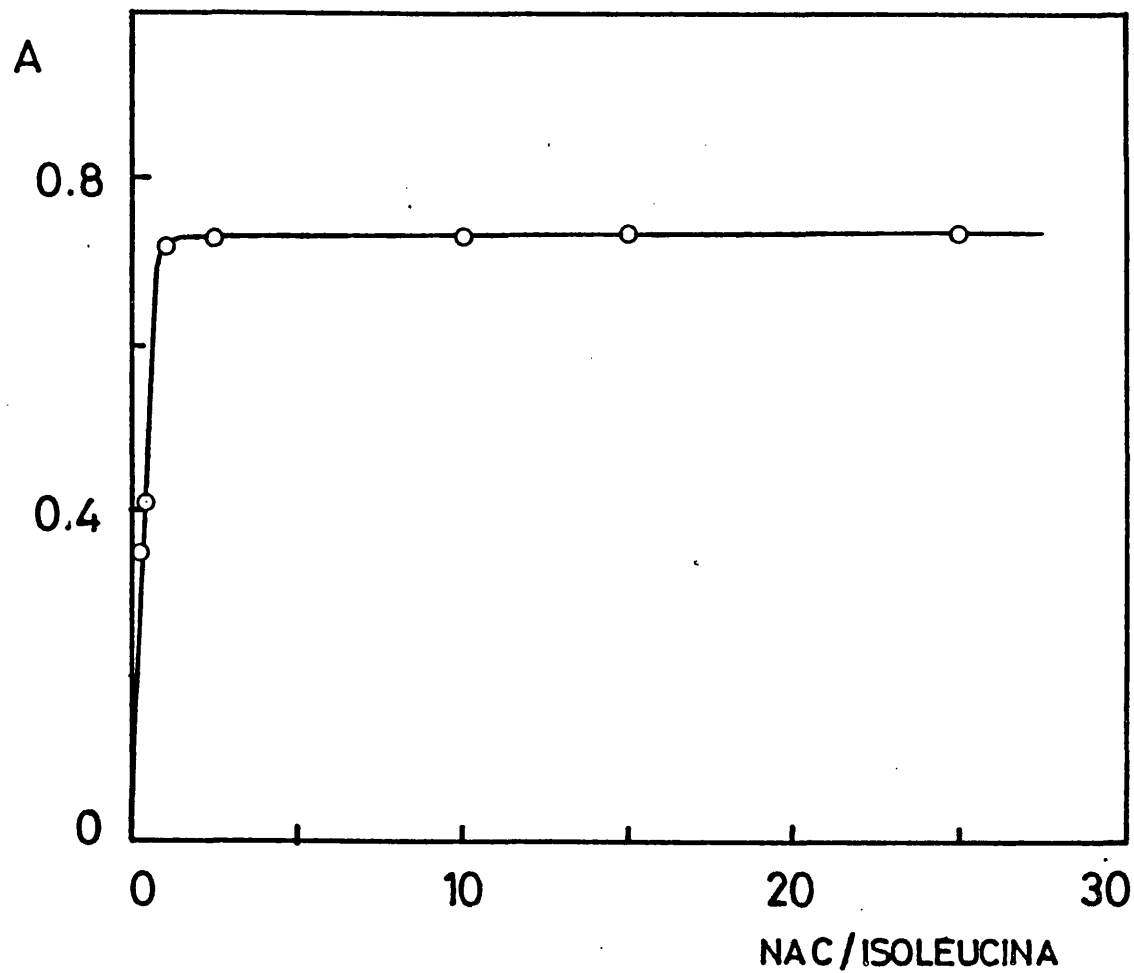


Figura 36. - Influencia de la concentración de NAC sobre la reacción de la isoleucina con el reactivo OPA-NAC . En abscisas se representan relaciones molares.

$C_{\text{isoleucina}} = 1 \times 10^{-4} \text{ M}$  ;  $C_{\text{OPA}} = 2.5 \times 10^{-3} \text{ M}$



III.4.3.- ABSORTIVIDADES MOLARES DE LOS DERIVADOS DE LOS AMINOACIDOS CON O-FALDEHIDO Y N-ACETIL-L-CISTEINA

Svedas y col. (41) realizaron un estudio espectrofotométrico sobre la interacción de los aminoácidos con OPA en presencia de ME, obteniendo las absortividades molares de algunos aminoácidos proteicos primarios (Tabla 21). Las condiciones de análisis utilizadas fueron: 25°C, pH 9.7-10, ME  $0.6-1 \times 10^{-3}$  M y una concentración de OPA dos o tres veces superior a la del aminoácido. La absortividad molar media fue  $\epsilon_m = 5130 \pm 360$  (en la obtención de este valor no se ha tenido en cuenta el derivado de la cisteína, que presenta un  $\epsilon = 1550$ , y el de la lisina, que al tener en su molécula dos grupos amino primarios, presenta un  $\epsilon = 8800$ ).

Posteriormente, Church y col. (117-118) propusieron el reactivo OPA-ME para la determinación espectrofotométrica del grado de proteólisis de la leche, así como para determinar la actividad de determinados enzimas. La absortividad molar media que obtuvieron estos autores resultó ser superior ( $\epsilon_m = 5992 \pm 144$ ) (Tabla 21). Este valor coincide con el obtenido por Rowlett y col. (73). Las menores absortividades molares obtenidas por Svedas y col. se deben seguramente a la baja concentración de OPA utilizada.

En este apartado se obtienen las absortividades molares de los isoindoles de los 20 aminoácidos proteicos primarios y cistina con el reactivo OPA-NAC .

Se prepararon disoluciones en tampón bórico-borato que contenían OPA y NAC , ambos en concentración  $2 \times 10^{-3}$  M y distintas alícuotas de disoluciones  $1 \times 10^{-2}$  M de los distintos aminoácidos, abarcando el intervalo de concentraciones  $4.0 \times 10^{-5}$  -  $2.0 \times 10^{-4}$  M . Asimismo, se realizó una serie de experiencias con el fin de comprobar las absortividades molares de algunos aminoácidos con el reactivo OPA-ME en las mismas condiciones.

En la Tabla 21 se muestran los resultados correspondientes al reactivo OPA-NAC, siendo la absortividad molar media para los aminoácidos proteicos primarios de  $\epsilon_M = 6830 \pm 350$  (sin considerar la lisina y cisteína). En la misma tabla se muestran las absortividades molares de algunos aminoácidos con el reactivo OPA-ME obtenidos por nosotros. Los valores encontrados resultaron más concordantes con los proporcionados por Church y Rowlett que con los de Svedas. En general, las absortividades molares de los derivados de OPA-NAC son algo superiores a las correspondientes a OPA-ME . Por otro lado, la dispersión de los valores de las absortividades molares de los aminoácidos proteicos primarios con el reactivo OPA-NAC es similar a la obtenida con OPA-ME . Por último, a semejanza de lo que ocurría con el reactivo OPA-ME, la prolina al ser una amina secundaria, no reacciona con OPA y NAC .

Tabla 21. - Absortividades molares de los aminoácidos proteicos primarios y cistina con los reactivos OPA-ME, OPA-ET y OPA-NAC.

Aminoácido	OPA-ME				OPA-ET	OPA-NAC
	$\epsilon^a$	$\epsilon^b$	$\epsilon^c$	$\epsilon^d$	$\epsilon^c$	$\epsilon^d$
Alanina	5400	6090	6120		6230	6830
Arginina	5700					6480
Asparagina	4600		6600		6420	6130
Ac. Aspártico	4800					6920
Cisteína	1550			1350		2700
Ac. Glutámico	4900					6910
Glutamina	-	6120				6700
Glicina	5000	5880				7180
Histidina	4800			6300		6860
Isoleucina	5000		6470	6400	6290	6740
Leucina	4800	6020	6430		6340	6860
Lisina	8800			11800		10740
Metionina	5200					6930
Fenilalanina	5700	5830	6400		6310	6590
Prolina	-					-
Serina	5500	6000				6980
Treonina	5200					6850
Triptófano	4700					7830
Tirosina	5200					6580
Valina	5600		6180		6160	6780
Cistina				4800		12200
Media	5130 ± 360				6830 ± 350	

- <sup>a</sup> Datos obtenidos por Svedas y col. (41).
- <sup>b</sup> Datos obtenidos por Church y col. (117-118).
- <sup>c</sup> Datos obtenidos por Rowlett y col. (73).
- <sup>d</sup> Datos obtenidos por nosotros.

En la Figura 37 aparecen representadas las curvas de calibrado para los aminoácidos lisina, triptófano e isoleucina con el reactivo OPA-NAC. En todos los casos estudiados se encontró una perfecta linealidad, con coeficientes de correlación,  $r > 0.9999$ .

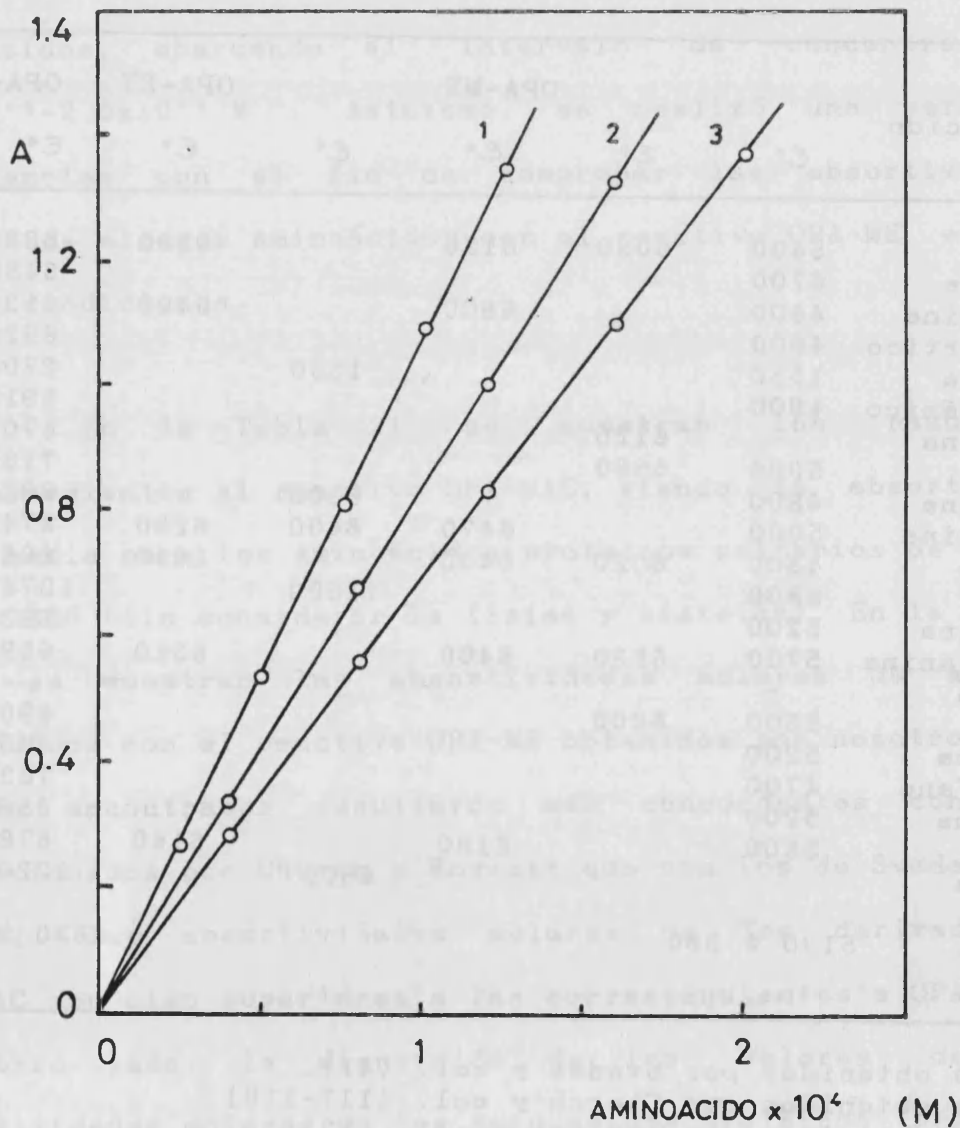


Figura 37. - Curvas de calibrado: (1) Lisina ; (2) triptófano; (3) isoleucina.

$$C_{OPA} = C_{NAC} = 2 \times 10^{-3} \text{ M}$$

### III.4.4.- ESTUDIO CINETICO DE LA FORMACION Y DEGRADACION DE LOS ISOINDOLES

#### 1.- Introducción

Svedas y col. (41) determinaron las constantes de velocidad de formación y degradación de los isoindoles obtenidos con el reactivo OPA-ME a  $25.0 \pm 0.1^\circ\text{C}$ , correspondientes al esquema indicado en el apartado I.1.5 (ecuaciones 7 y 8). Las constantes de formación de pseudo-primer orden se obtuvieron a partir de medidas espectrofotométricas, haciendo uso del método de Guggenheim (147) y utilizando excesos de OPA 10-20 veces superiores a la concentración de aminoácido. La constante bimolecular de formación de la reacción se calculó a partir de la pendiente de la recta obtenida, al representar las constantes de pseudo-primer orden frente a la concentración de OPA. El tratamiento matemático de los datos se realizó por el método de mínimos cuadrados ponderado.

Estos autores determinaron también las constantes de descomposición, de primer orden, de los productos de reacción, mediante el método de Guggenheim.

Nosotros hemos calculado las constantes de velocidad de formación de los isoindoles formados con OPA-NAC, utilizando el mismo esquema cinético y aplicando el método de Guggenheim.

2.- Método de Guggenheim

La ecuación integrada de velocidad para una cinética de primer orden es:

$$C = C_0 e^{-k(t-t_0)} \quad [27]$$

donde  $C_0$  y  $C$  son las concentraciones del reactante en el tiempo inicial,  $t_0$ , y en el tiempo  $t$ , y  $k$  la constante de velocidad de primer orden.

Sustituyendo estos valores por la magnitud de la propiedad física medida,  $\vartheta$ , en los tiempos  $t$  y  $t+x$  se tiene:

$$\vartheta_t - \vartheta_\infty = (\vartheta_0 - \vartheta_\infty) e^{-k(t-t_0)} \quad [28]$$

$$\vartheta_{t+x} - \vartheta_\infty = (\vartheta_0 - \vartheta_\infty) e^{-k(t+x-t_0)} \quad [29]$$

y eliminando  $\vartheta_\infty$ , valor de la propiedad física a un tiempo infinito, queda la ecuación:

$$\vartheta_t - \vartheta_{t+x} = (\vartheta_0 - \vartheta_\infty) e^{-k(t-t_0)} (1 - e^{-kx}) \quad [30]$$

Así, tomando una serie de valores  $\varnothing_{t+x}$  y  $\varnothing_t$  a intervalos de tiempo constantes,  $x$ , la representación de  $\ln (\varnothing_t - \varnothing_{t+x})$  frente a  $t-t_0$  corresponde a una recta de ecuación:

$$\ln (\varnothing_t - \varnothing_{t+x}) = A - k (t-t_0) \quad [31]$$

donde

$$A = \ln (\varnothing_0 - \varnothing_\infty) + \ln (1 - e^{-kx}) \quad [32]$$

y cuya pendiente coincide con la constante de velocidad  $k$ .

Cuando la propiedad física depende de la concentración del producto, la ecuación de Guggenheim se modifica :

$$\ln (\varnothing_{t+x} - \varnothing_t) = B + k (t-t_0) \quad [33]$$

El método de Guggenheim es de aplicación general a las cinéticas de primer orden, la única limitación consiste en la elección de  $x$ . Si  $x$  es elevado, el número de lecturas de la propiedad física a medir será bajo y el valor de  $k$  se calculará principalmente con los primeros y últimos puntos tomados, por lo que se cometerá un error alto en la determinación. Por otra parte, si se escoge un valor de  $x$  pequeño, se podrá trabajar con un gran número de pares de valores. Sin embargo, el error obtenido en la determinación de  $k$  es inversamente proporcional a la raíz cuadrada del número

de observaciones utilizadas, por lo que a partir de un determinado valor de  $x$  es despreciable el aumento de exactitud alcanzado. Por ello, es necesario llegar a un compromiso, siendo conveniente seguir la reacción durante tres o cuatro vidas medias.

Así, para un número total de datos,  $N$ , de la propiedad  $\varnothing$  obtenidos a intervalos de tiempo constantes, la selección de  $x$  se debe realizar como sigue: Se dividen los valores de  $\varnothing$ , en dos grupos de  $N/2$  observaciones consecutivas y se escoge  $x$  como el intervalo de tiempo de separación entre la primera observación del primer grupo y la del segundo. De esta forma, cada observación del primer grupo sólo se compara una vez con una del segundo.



### 3.- Formación de los isoindoles

Las constantes de velocidad de formación de los isoindoles, obtenidos por reacción de los aminoácidos con el reactivo OPA-NAC, se calcularon considerando que la reacción es de pseudo-primer orden en presencia de un exceso de OPA (relación molar OPA/aminoácido = 10-20).

Para ello se prepararon disoluciones  $1 \times 10^{-2}$  M de los 20 aminoácidos proteicos primarios, así como los reactivos OPA-NAC y OPA-ME ( relación molar 1:1 ) para tres niveles de concentración:  $2.5 \times 10^{-3}$  M ,  $1.75 \times 10^{-3}$  M y  $1.25 \times 10^{-3}$  M , en ambos reactivos, en tampón bórico-borato de pH 9.5 .

Para poder medir la absorbancia a los pocos segundos de mezclados los reactivos, se operó inyectando con una micropipeta graduable, 50  $\mu$ l de la disolución de aminoácido directamente en la cubeta del espectrofotómetro, conteniendo 3 ml del reactivo OPA-tiol en medio tampón bórico-borato.

Una vez homogeneizada la disolución, se leyó la absorbancia a 335 nm a los 6 s de iniciada la reacción. Se registró durante 1 min la curva de formación, tomando medidas de absorbancia con intervalos de 5 s , haciendo uso de un programa de la unidad OPI (Shimadzu UV-240 , OPI-2), que registra los valores de absorbancia para incrementos constantes de tiempo. Las experiencias se realizaron termostatando a  $25.0 \pm 0.1$  °C .

Se calcularon las constantes de formación de pseudo primer orden,  $k_1'$ , por aplicación del método de Guggenheim para los tres niveles de concentración de OPA, realizando cada determinación por duplicado. La constante de formación bimolecular  $k_1$ , viene dada por la ecuación:

$$k_1' = k_1 \times C_{OPA} \quad [34]$$

En la Figura 38 se muestra la representación de los valores de  $k_1'$  para la isoleucina, frente a la concentración de OPA.

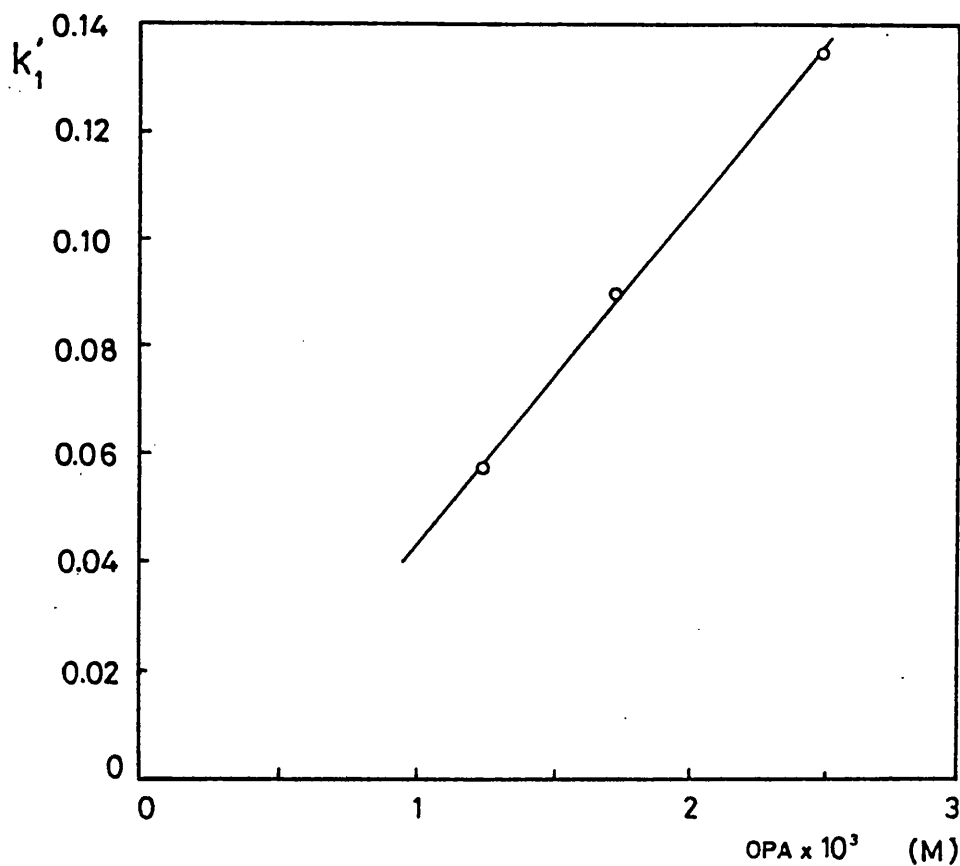


Figura 38. - Determinación de la constante de velocidad de formación del derivado de la isoleucina con OPA y NAC.

C<sub>isoleucina</sub> =  $1.2 \times 10^{-4}$  M

En la Tabla 22 aparecen los valores de las constantes de formación de los isoindoles obtenidos con OPA-NAC, junto a sus desviaciones estándar, y se comparan con las constantes obtenidas por Svedas y col. , en las mismas condiciones, para el reactivo OPA-ME .

En las Figuras 39 y 40 se muestran las curvas de formación de los isoindoles obtenidos con los aminoácidos glicina, arginina, alanina, isoleucina y treonina. En ellas se observa un incremento en la velocidad de la reacción, al aumentar la concentración de OPA . Generalmente, el uso del reactivo OPA-NAC supone un aumento en la constante de velocidad de formación respecto al OPA-ME , aunque para ambos la velocidad de formación es muy elevada. Sólo con los aminoácidos, ácido aspártico, glicina y lisina se observó claramente una menor velocidad ( Tabla 22 ).

Tabla 22. - Constantes de velocidad de formación y porcentajes de degradación de los isoindoles obtenidos por reacción de los aminoácidos proteicos primarios con OPA-NAC y OPA-ME a 25°C.

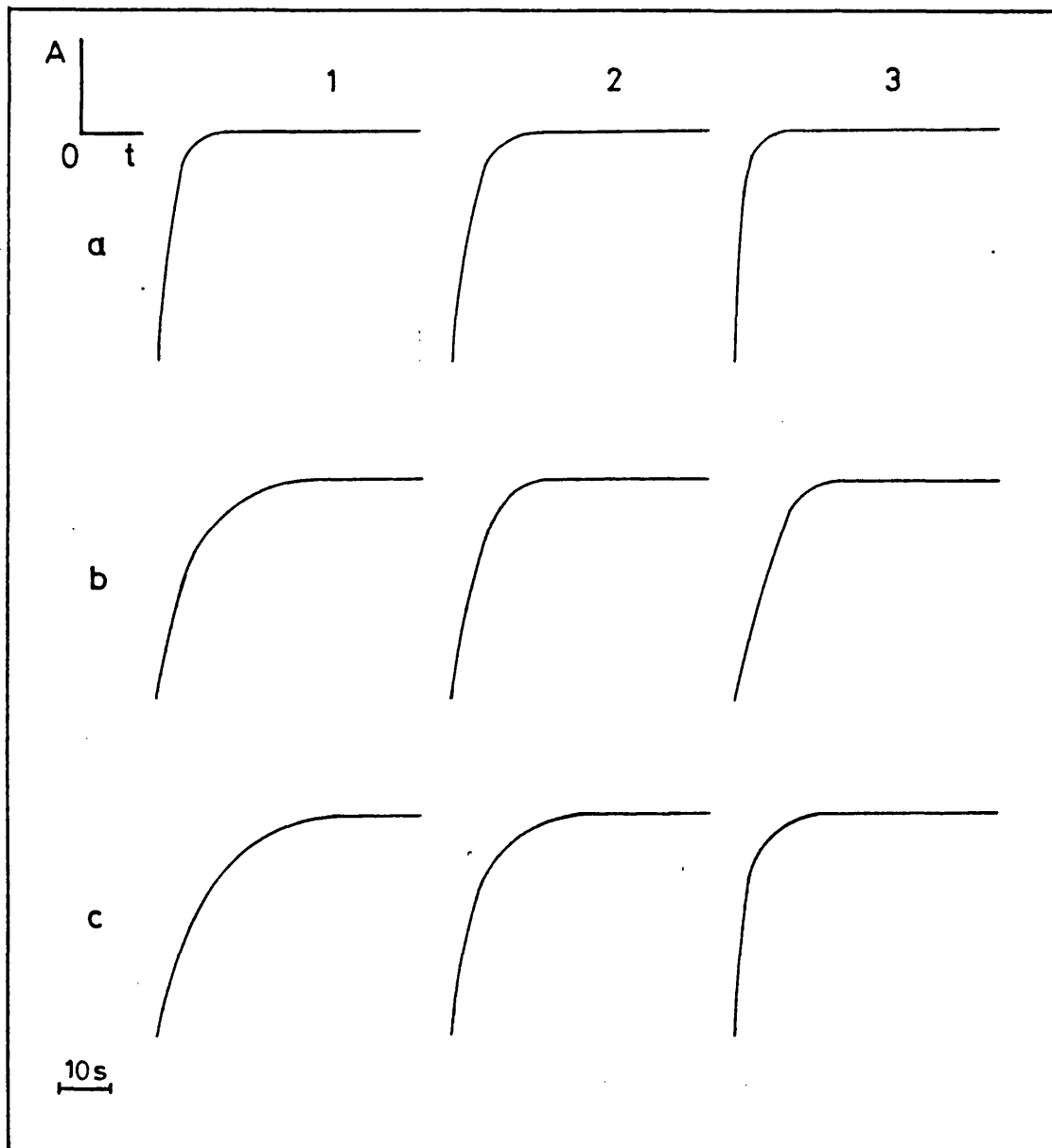
Aminoácido	OPA-ME <sup>a</sup>		OPA-NAC	
	k <sub>1</sub> <sup>b</sup>	%A <sup>c</sup>	k <sub>1</sub> <sup>b</sup>	%A <sup>c</sup>
Alanina	40±2	13.4	86±6	0
Arginina	58±6	6.3	102±11	0
Asparagina	39±1	-	36±2	0
Ac. Aspártico	44±2	-	30±3	0
Ac. Glutámico	64±3	8.6	52±6	0
Glutamina	-	-	54±3	0
Glicina	930±40	78.7	268±20	8.3 <sup>d</sup>
Histidina	22±4	25.0	40±3	9.5
Isoleucina	57±1	4.9	49±5	0
Leucina	60±20	6.6	81±1	0
Lisina	100±20	8.9	79±6	6.4 <sup>d</sup>
Metionina	80±4	7.6	81±3	0
Fenilalanina	38±2	5.9	61±6	0
Serina	44±6	-	103±7	6.7
Treonina	20±2	11.5	28±4	3.3
Triptófano	38±4	10.9	65±4	0
Tirosina	33±1	6.6	54±3	0
Valina	38±6	3.9	40±1	0

<sup>a</sup> Datos obtenidos a partir de Svedas y col. (41).

<sup>b</sup> Constantes de velocidad de formación (M<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup>).

<sup>c</sup> Porcentaje de disminución de la absorbancia a los 60 min .

<sup>d</sup> Porcentaje de aumento de la absorbancia a los 60 min .



**Figura 39.** - Curvas de formación de los isoindoles para los aminoácidos: (a) Glicina ; (b) arginina y (c) alanina.

$C_{\text{aminoácido}} = 1.2 \times 10^{-4} \text{ M}$  ; concentración del reactivo OPA-NAC (relación 1:1) : (1)  $1.25 \times 10^{-3} \text{ M}$  ; (2)  $1.75 \times 10^{-3} \text{ M}$  ; (3)  $2.5 \times 10^{-3} \text{ M}$

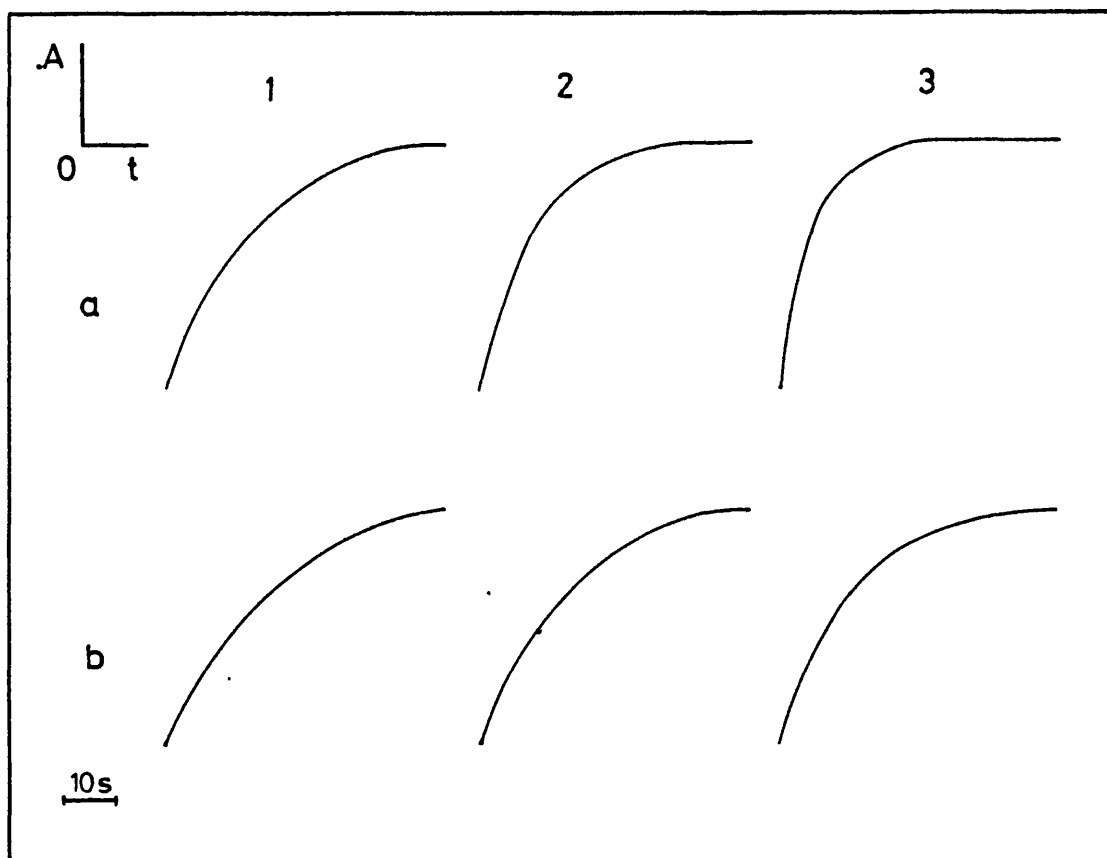
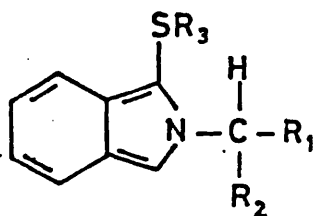


Figura 40. - Curvas de formación de los isoindoles para los aminoácidos: (a) Isoleucina ; (b) treonina.

C<sub>aminoácido</sub> =  $1.2 \times 10^{-4}$  M ; concentración del reactivo OPA-NAC (relación 1:1) : (1)  $1.25 \times 10^{-3}$  M ; (2)  $1.75 \times 10^{-3}$  M ; (3)  $2.5 \times 10^{-3}$  M.

Las distintas velocidades con las que se obtienen los isoindoles indica que la estructura del aminoácido afecta a la cinética de la reacción, tal como se observa en la Tabla 23.

Tabla 23. - Influencia de los sustituyentes  $R_1$  sobre la constante de velocidad de formación de los isoindoles de OPA-NAC ( $R_2 = -COOH$ ).



Aminoácido	$R_1$	$k_1$ ( $M^{-1}s^{-1}$ )
Serina	$-CH_2-OH$	$103 \pm 7$
Alanina	$-CH_3$	$86 \pm 6$
Leucina	$-CH_2-CH(CH_3)_2$	$81 \pm 1$
Fenilalanina	$-CH_2-C_6H_5$	$61 \pm 6$
Tirosina	$-CH_2-C_6H_4-OH$	$54 \pm 3$
Glutamina	$-CH_2-CH_2CONH_2$	$54 \pm 3$
Ac. Glutámico	$-CH_2-CH_2COOH$	$52 \pm 6$
Asparagina	$-CH_2-CONH_2$	$36 \pm 2$
Ac. Aspártico	$-CH_2-COOH$	$30 \pm 3$

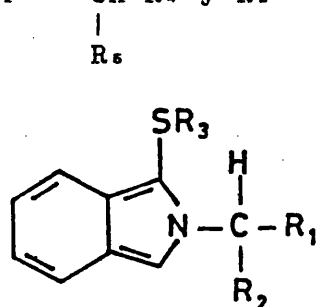
Se observa que el radical  $R_1$ , presente en el C-10, afecta a la velocidad de reacción, aumentando ésta al incrementarse el carácter dador del sustituyente (  $-OH > -R > -Ph > -CONH_2 = -COOH$  ). Estas observaciones están de acuerdo con el mecanismo propuesto por Sternson y col. (24) , en el que el carácter de la amina juega un papel importante, ya que la formación del isoindol se produce por un ataque nucleofílico intramolecular de la amina secundaria formada en un proceso intermedio, sobre el grupo carbonilo todavía intacto (ver Esquema 2, X) .

Por lo tanto, aquellos factores que aumenten el carácter nucleofílico de la amina, aumentarán la velocidad de la reacción. El poder nucleofílico de la amina depende del poder inductivo de los sustituyentes de la misma, aumentando su basicidad aquellos sustituyentes que ceden carga.

Por otra parte, se debe tener en cuenta el efecto estérico de la amina, efecto que parece explicar los resultados de la Tabla 24, donde se observa que la velocidad de formación disminuye con una sustitución adicional ( $-CH_3$ ) en el carbono adyacente al C-10.



Tabla 24. - Influencia de los sustituyentes  $R_1$  y  $R_2$  sobre la velocidad de formación de los isoindoles derivados del reactivo OPA-NAC (  $R_1 = -CH-R_1$  y  $R_2 = -COOH$  ).



Aminoácido	$R_1$	$R_2$	$k_1$ ( $M^{-1}s^{-1}$ )
Serina	-OH	-H	103 ± 7
Treonina	-OH	-CH <sub>3</sub>	28 ± 4
Alanina	-H	-H	86 ± 6
Valina	-CH <sub>3</sub>	-CH <sub>3</sub>	40 ± 1
Leucina	-CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	-H	81 ± 1
Isoleucina	-CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	-CH <sub>3</sub>	49 ± 5

#### 4.- Degradación de los isoindoles

La determinación de la constante de velocidad de descomposición de primer orden,  $k_2$ , es más problemática dada la gran estabilidad de los derivados de los aminoácidos con el reactivo OPA-NAC. Por ello, se calculó la disminución de la absorbancia de los distintos derivados a los 60 min de su formación, y se compararon los resultados con los correspondientes a los derivados del reactivo OPA-ME.

Para ello se preparó una serie de disoluciones que contenían aminoácido, OPA y NAC en concentraciones  $1.2 \times 10^{-4}$  M,  $2.5 \times 10^{-5}$  M y  $2.5 \times 10^{-3}$  M, respectivamente, y se leyó la absorbancia a 335 nm a lo largo del tiempo. Las experiencias se realizaron termostatando a  $25.0 \pm 0.1$  ° C.

Los resultados aparecen reflejados en la Tabla 22. Los datos que aparecen en la tabla para el reactivo OPA-ME se calcularon a partir de las constantes de degradación dadas por Svedas y col. (41). Los valores mostrados para el reactivo OPA-NAC se obtuvieron en las mismas condiciones.

Se observa que los derivados de OPA y NAC son mucho más estables que los análogos al OPA-ME, destacando los derivados de glicina e histidina, altamente inestables con el reactivo OPA-ME. Con OPA-NAC no se observó disminución alguna de la absorbancia para la mayoría de los aminoácidos al cabo de 60 min.

La glicina mostró un comportamiento peculiar en estas condiciones (relación molar OPA/glicina de 20), pues la absorbancia continuó aumentando lentamente a lo largo del tiempo. Por otra parte, se observó que una disolución que contenía glicina  $8.84 \times 10^{-5}$  M , OPA  $1.16 \times 10^{-3}$  M y NAC  $1.22 \times 10^{-3}$  M ( relación molar OPA/glicina de 13 ) mostró a las 7 h un descenso de la absorbancia a 335 nm de un 2.5% , contrastando con la gran inestabilidad de este derivado cuando se utiliza ME como tiol ( a los 10 min su descomposición fue del 32 % y a los 30 min de un 57 % ) ( Figura 41 ).

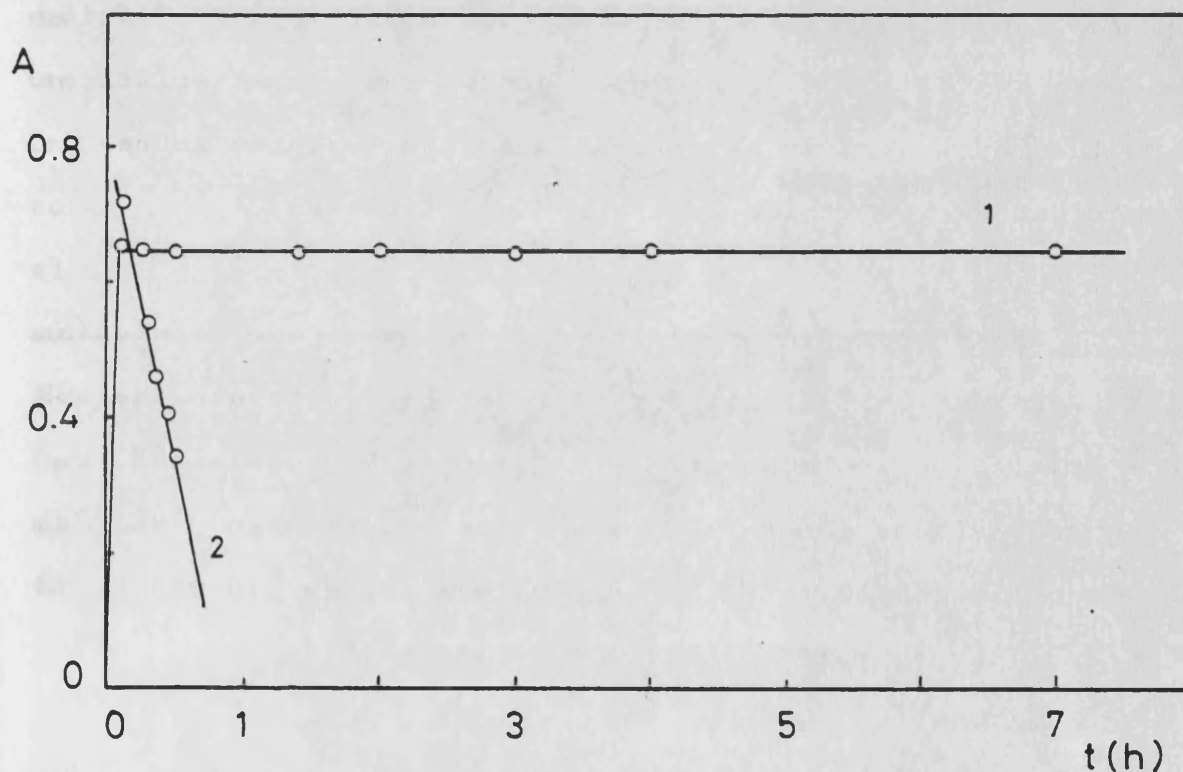


Figura 41. - Estabilidad del derivado de la glicina con el reactivo: (1) OPA-NAC ; (2) OPA-ME .

$C_{\text{glicina}} = 8.84 \times 10^{-5}$  M ;  $C_{\text{OPA}} = C_{\text{NAC}} = C_{\text{ME}} = 1.2 \times 10^{-3}$  M

5.- Factores estructurales que afectan a la estabilidad de los isoindoles .

Estudios anteriores pusieron de manifiesto la influencia de la estructura de la amina sobre la estabilidad de los isoindoles obtenidos con el reactivo OPA-ME ( ver apartado I.2.1 ). En este apartado se realiza un estudio sobre la estabilidad de diversos isoindoles derivados del NAC, comparando los resultados con los obtenidos empleando ME .

Los aminoácidos seleccionados para realizar este estudio fueron: glicina (GLY), alanina (ALA) ,  $\beta$ -alanina (BALA) , ácido  $\beta$ -amino-butírico (BABA) y ácido  $\gamma$ -amino-butírico (GABA) , ya que dadas sus características estructurales, permiten obtener algunas conclusiones sobre la estabilidad de los isoindoles formados ( Tabla 25).

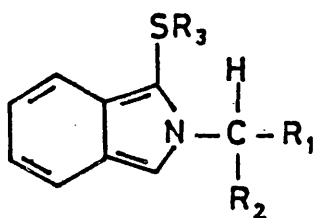
Se preparó una serie de disoluciones que contenían OPA  $2.5 \times 10^{-3}$  M , NAC  $2.5 \times 10^{-3}$  M , tampón bórico borato de pH 9.5 y aminoácido en concentración  $1 \times 10^{-4}$  M . Asimismo, se prepararon disoluciones similares que contenían ME en concentración  $2.5 \times 10^{-3}$  M . La temperatura fue de  $40.0 \pm 0.1$  °C para facilitar el estudio cinético de la reacción.

En las Figuras 42 y 43 aparecen las curvas de degradación de los derivados de los distintos aminoácidos con los reactivos OPA-ME y OPA-NAC , respectivamente. En estas figuras se representa en ordenadas las absorbancias normalizadas,  $A_r$ , que se calculan asignando el valor unidad a la máxima absorbancia alcanzada para cada disolución. En la Tabla 25 se muestran los valores de  $t_{10}$  (tiempo necesario para que la descomposición sea del 10 % ). De la observación de las figuras destacan varios hechos:

En primer lugar, si comparamos las curvas de degradación de los derivados de glicina y alanina ( 3 y 5 ) y de la  $\beta$ -alanina y ácido  $\beta$ -amino-butírico (2 y 4), se observa un importante efecto estabilizador del grupo metilo en el C-10, efecto que es mucho más acusado cuando se utiliza NAC como tiol, puesto que en este caso los isoindoles derivados de alanina y ácido  $\beta$ -amino-butírico no se descomponen en absoluto al cabo de 5 h , presentando los derivados de glicina y  $\beta$ -alanina una descomposición próxima al 50 % (Figura 42). Cuando se utiliza ME, el tiempo necesario para alcanzar la misma degradación con estos aminoácidos es de 10 min (Figura 43).

En segundo lugar, la posición del grupo ácido en el sustituyente  $R_1$  ( derivados 1, 2 y 3 de la Tabla 25) (GABA, BALA y GLY) no presenta una clara influencia sobre la estabilidad. Sin embargo, destaca nuevamente la mayor estabilidad de los derivados del NAC.

Tabla 25 .- Efecto de los factores estructurales sobre la estabilidad de los isoindoles.



Aminoácido	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	t <sub>10</sub> (min)*		
			ME	NAC	NAC/ME
1. GABA	-H	-CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CO <sub>2</sub> H	2.75	103	37.5
2. BALA	-H	-CH <sub>2</sub> CO <sub>2</sub> H	3.5	62	17
3. GLY	-H	-CO <sub>2</sub> H	4.5	108	24
4. BABA	-CH <sub>3</sub>	-CH <sub>2</sub> CO <sub>2</sub> H	6.0	>270	>45
5. ALA	-CH <sub>3</sub>	-CO <sub>2</sub> H	11	>270	>25

\* Tiempo necesario para que se alcance una disminución de la absorbancia del 10 %.

R<sub>2</sub> = -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH (ME) ; -CH<sub>2</sub>CH(NHCOCH<sub>3</sub>)COOH (NAC)

1. Acido  $\gamma$ -amino-butírico; 2.  $\beta$ -alanina; 3. Glicina;  
4. Acido  $\beta$ -amino-butírico; 5. Alanina.

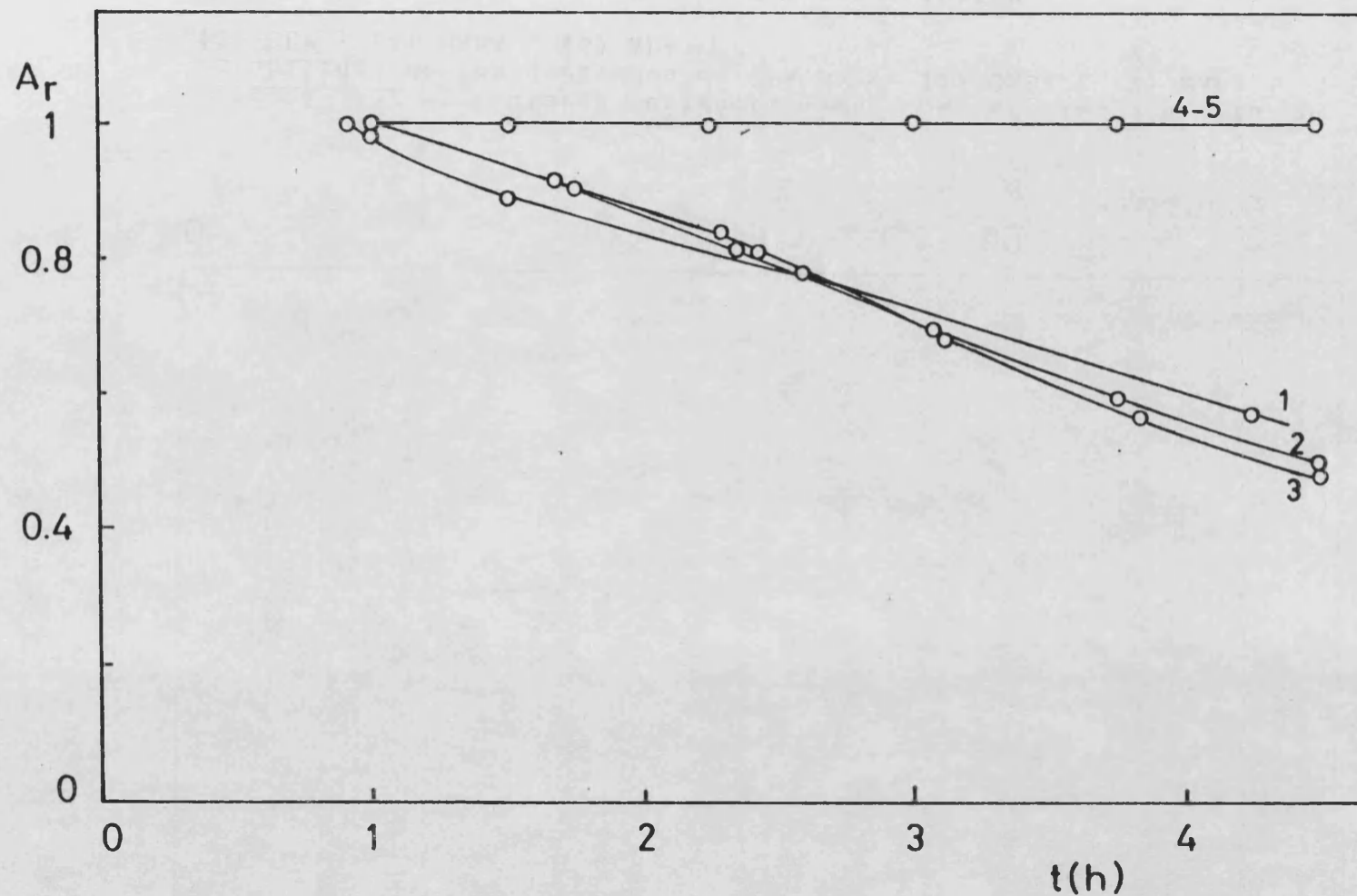


Figura 42. - Factores estructurales que afectan a la estabilidad de los derivados de OPA-NAC y: (1) GABA ; (2) BALA ; (3) GLY ; (4) BABA ; (5) ALA

$C_{\text{aminoácido}} = 1 \times 10^{-4} \text{ M}$  ;  $C_{\text{OPA}} = C_{\text{NAC}} = 2.5 \times 10^{-3} \text{ M}$

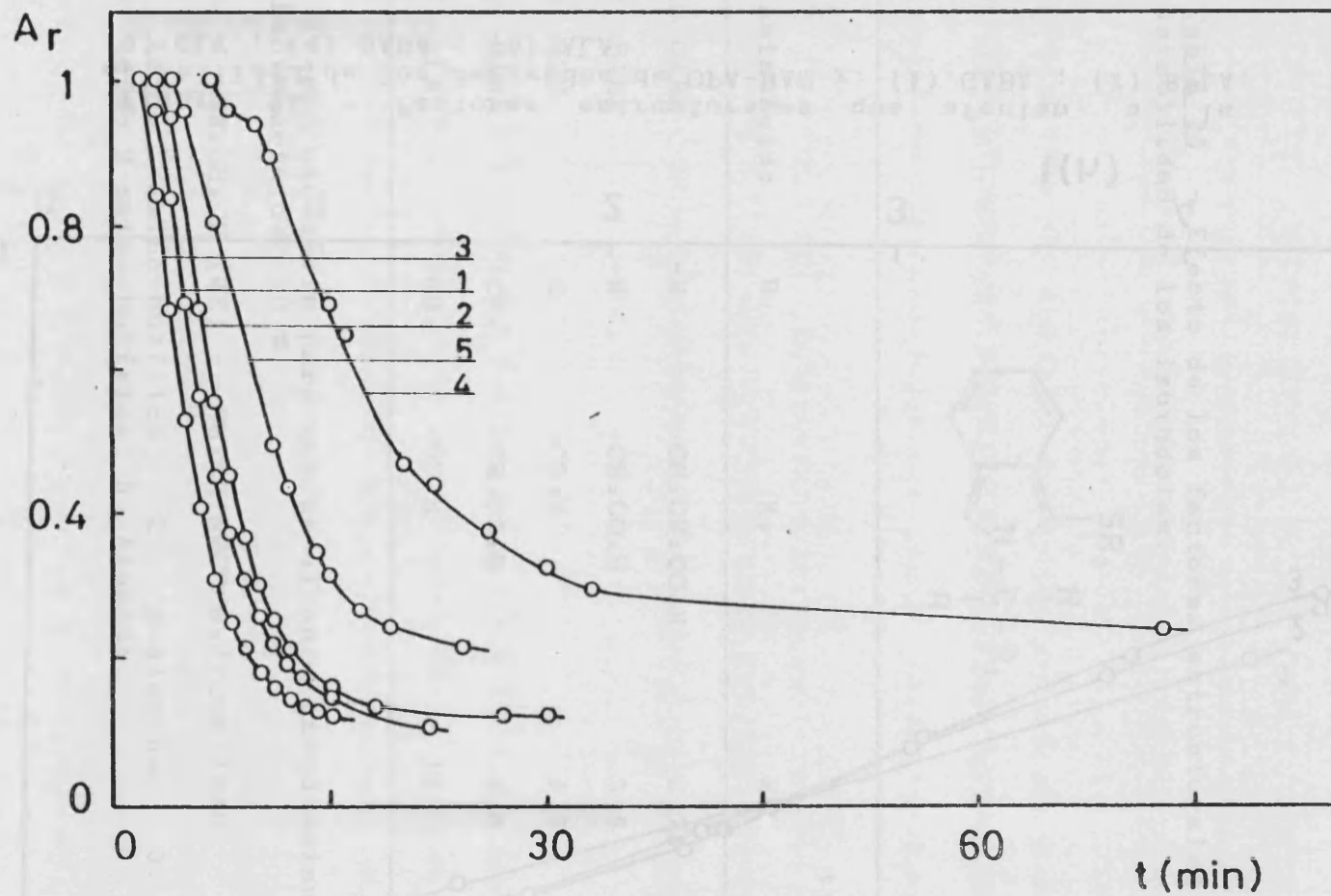


Figura 43. - Factores estructurales que afectan a la estabilidad de los derivados de OPA-ME y: (1) GABA ; (2) BALA ; (3) GLY ; (4) BABA ; (5) ALA

$C_{\text{aminoácido}} = 1 \times 10^{-4} \text{ M}$  ;  $C_{\text{OPA}} = C_{\text{ME}} = 2.5 \times 10^{-3} \text{ M}$



Así, parece ser que el factor más importante determinante de la estabilidad de los isoindoles es el factor estérico ( existencia de un sustituyente N-alquilo adyacente al anillo del isoindol) más que el efecto electrónico ejercido por el grupo carboxilo.

Por otra parte, el gran aumento en la estabilidad de los isoindoles, que supone el empleo de NAC, puede ser debido al mayor volumen del tiol (apartado I.2.2), obteniendo en el peor de los casos (BALA, 2) un aumento de la estabilidad con respecto al derivado de ME de 17 veces.

III.4.5.- INFLUENCIA DE LA CONCENTRACION DE O-FTALDEHIDO Y TIOL SOBRE LA FORMACION Y ESTABILIDAD DE LOS ISOINDOLES

Para establecer el efecto de la concentración de OPA y tiol sobre la estabilidad de los isoindoles, se escogieron como isoindoles modelo los derivados de la isoleucina e histidina con los reactivos OPA-NAC y OPA-ME . La histidina origina uno de los isoindoles más inestables, entre los aminoácidos proteicos primarios (Tabla 22), mientras que, como hemos comentado anteriormente, la isoleucina forma un derivado altamente estable.

Para realizar este estudio se prepararon disoluciones de los reactivos OPA, NAC y ME en concentración  $5 \times 10^{-2}$  M todos ellos, y de los aminoácidos isoleucina e histidina  $2 \times 10^{-3}$  M en ambos, y se realizaron experiencias en las que se variaron las concentraciones de los reactivos OPA, amina y tiol, examinándose las relaciones tiol:OPA:amina siguientes:

- 1.- 100:1:15
- 2.- 100:25:1
- 3.- 25:25:1
- 4.- 25:100:1

El valor unidad corresponde a una concentración  $1 \times 10^{-4}$  M . Las experiencias se realizaron en baño termostático a  $25.0 \pm 0.1^\circ\text{C}$ .

En las Figuras 44 y 45 se muestran las absorbancias normalizadas,  $A_r$ , obtenidas a diversos tiempos con el reactivo OPA-NAC, correspondientes a las relaciones indicadas anteriormente, para isoleucina e histidina, respectivamente. Para la isoleucina (curva 1 de la Figura 44) se tomó como valor de referencia para calcular  $A_r$ , la absorbancia alcanzada a las 3 h, a pesar de que ésta seguía aumentando. En las Figuras 46 y 47 se presentan los valores correspondientes al reactivo OPA-ME. De la observación de estas figuras se pueden obtener varias conclusiones:

1.- Cuando se trabaja con un exceso de NAC, en presencia de concentraciones de OPA inferiores a la de la amina (curva 1 de las Figuras 44 y 45), la velocidad de la reacción de formación de los isoindoles es menor, siendo este efecto más acusado en el caso de la isoleucina, donde se observa un continuo aumento de la absorbancia a lo largo de un tiempo de 3 h. Las curvas de formación correspondientes al ME (curvas 1) en las Figuras 46 y 47 no se han representado, debido a que la formación de los isoindoles era excesivamente lenta. Así, con la isoleucina e histidina, el tiempo necesario para alcanzar una formación de un 5 % fue de 30 y 17 min, respectivamente, mientras que en estos tiempos, utilizando las condiciones habituales de trabajo (curvas 3), la formación es próxima al 100 %.

Anteriormente (apartado III.4.2.3) se mostró que la velocidad de formación de los derivados de OPA-NAC disminuía para relaciones OPA/aminoácido inferiores a 5.



2.- Asimismo, la disminución de la velocidad de formación al aumentar la concentración de tiol, en presencia de concentraciones moderadas de OPA, resulta evidente cuando se utiliza ME como tiol (curvas 2 y 3 de las Figuras 46 y 47), no observándose este efecto con NAC.

En la bibliografía, en general, se encuentra que con las concentraciones de tiol normalmente utilizadas, éste no tiene efecto sobre la cinética de la reacción. Sin embargo, Trepman y col. (44) encontraron, al utilizar grandes excesos de ME, un efecto parecido al mostrado aquí. Estos autores apuntaron que aunque la razón de este comportamiento no estaba clara, se podría explicar por la formación de un compuesto OPA(ME), que impediría la formación del isoindol.

3.- Por otra parte, un aumento en la concentración de ME, inhibe la degradación de los isoindoles (curvas 2 y 3 de las Figuras 46 y 47). Como se comentó anteriormente (apartado I.1.3), estudios fluorimétricos sobre la formación y degradación de isoindoles han puesto de manifiesto que cuando el tiol se encuentra en concentraciones bajas, no interviene ni en la cinética de formación ni de degradación. Sin embargo, en la bibliografía se muestra que una concentración elevada de tiol (ME) actúa como inhibidor del efecto catalítico del OPA sobre la degradación de los isoindoles fluorescentes. Este efecto no se observó con NAC (curvas 2 y 3 de la Figura 44) o se observó el efecto contrario (curvas 2 y 3 de la Figura 45).

4.- Por último, el aumento en la concentración de OPA no produce un efecto importante sobre la estabilidad de los derivados, al menos hasta una relación molar OPA/aminoácido de 100 (curvas 3 y 4 de las Figuras 44-47). Estudios fluorimétricos realizados anteriormente indicaron que el OPA presenta un efecto desestabilizador sobre el isoindol fluorescente ( I.1.5), aumentando su velocidad de degradación al aumentar la concentración de OPA desde relaciones OPA/aminoácido de 150 (relación recomendada para realizar los análisis) hasta 750 .

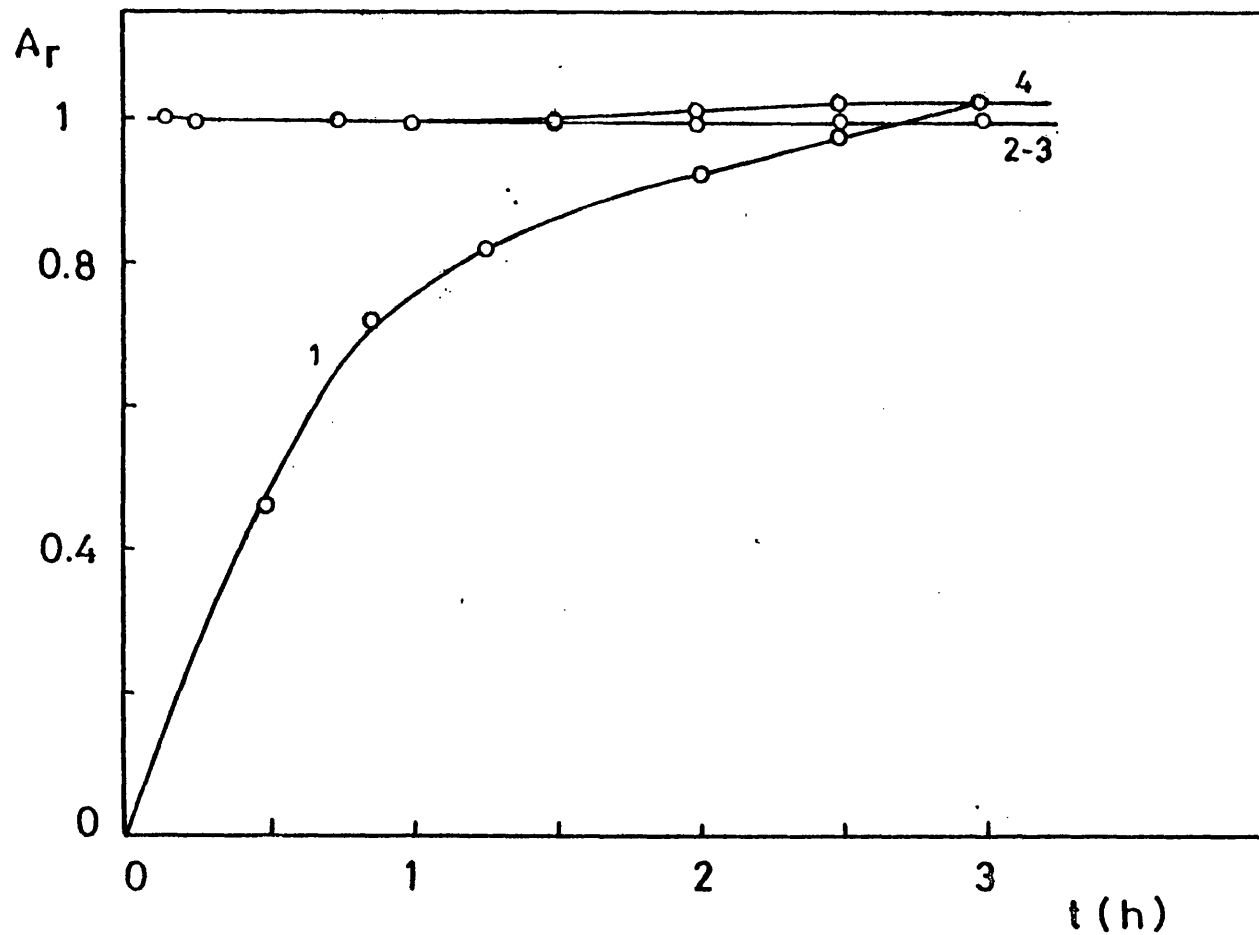


Figura 44. - Efecto de la concentración de OPA y NAC sobre la formación y estabilidad del isoindol de la isoleucina. Relaciones NAC:OPA:isoleucina : (1) 100:1:25 ; (2) 100:25:1 ; (3) 25:25:1 y (4) 25:100:1 . El valor unidad corresponde a una concentración de  $1 \times 10^{-4}$  M.

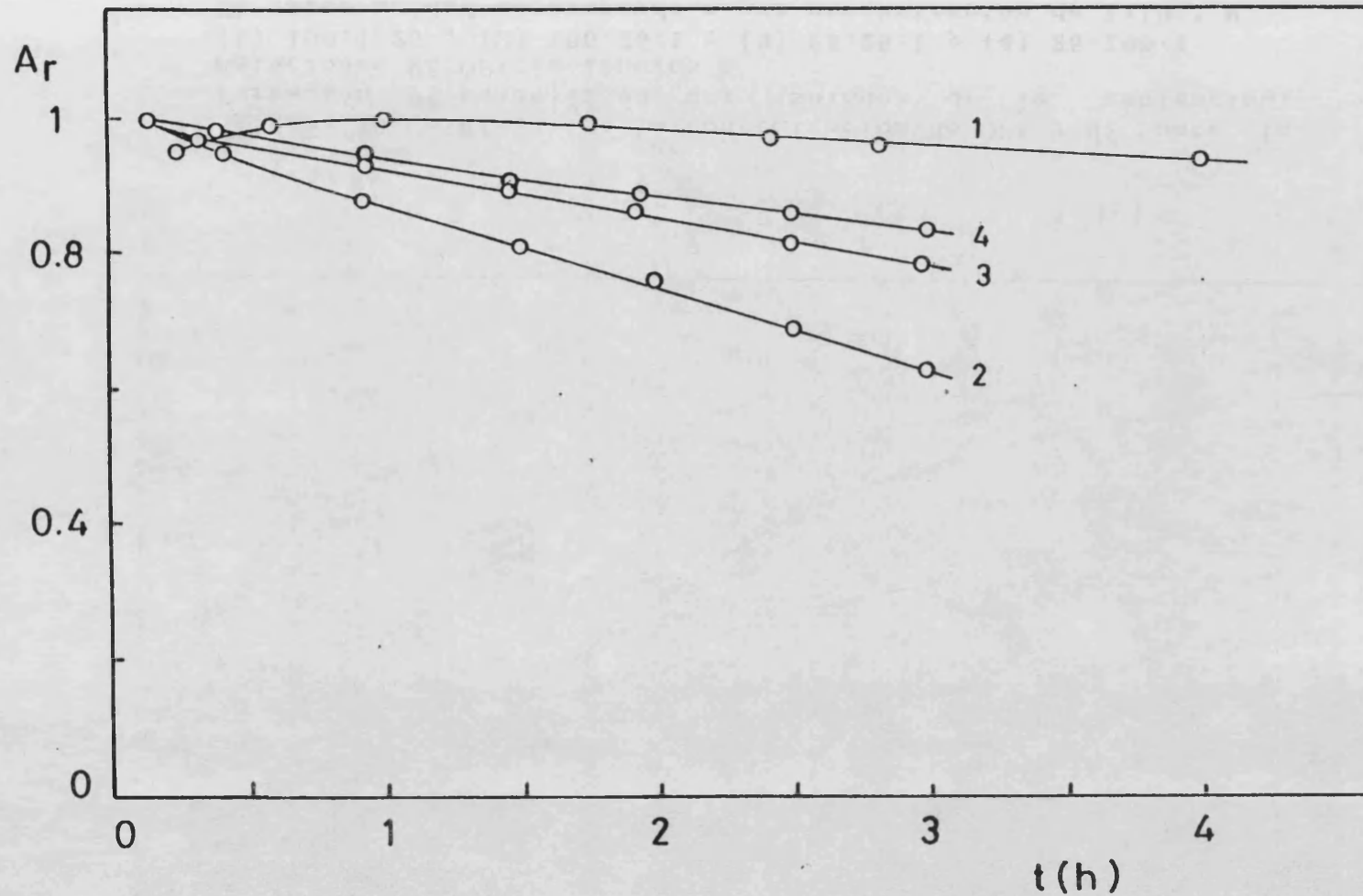


Figura 45. - Efecto de la concentración de OPA y NAC sobre la formación y estabilidad del isoindol de la histidina. Relaciones NAC:OPA:histidina : (1) 100:1:25 ; (2) 100:25:1 ; (3) 25:25:1 y (4) 25:100:1 . El valor unidad corresponde a una concentración de  $1 \times 10^{-4}$  M.

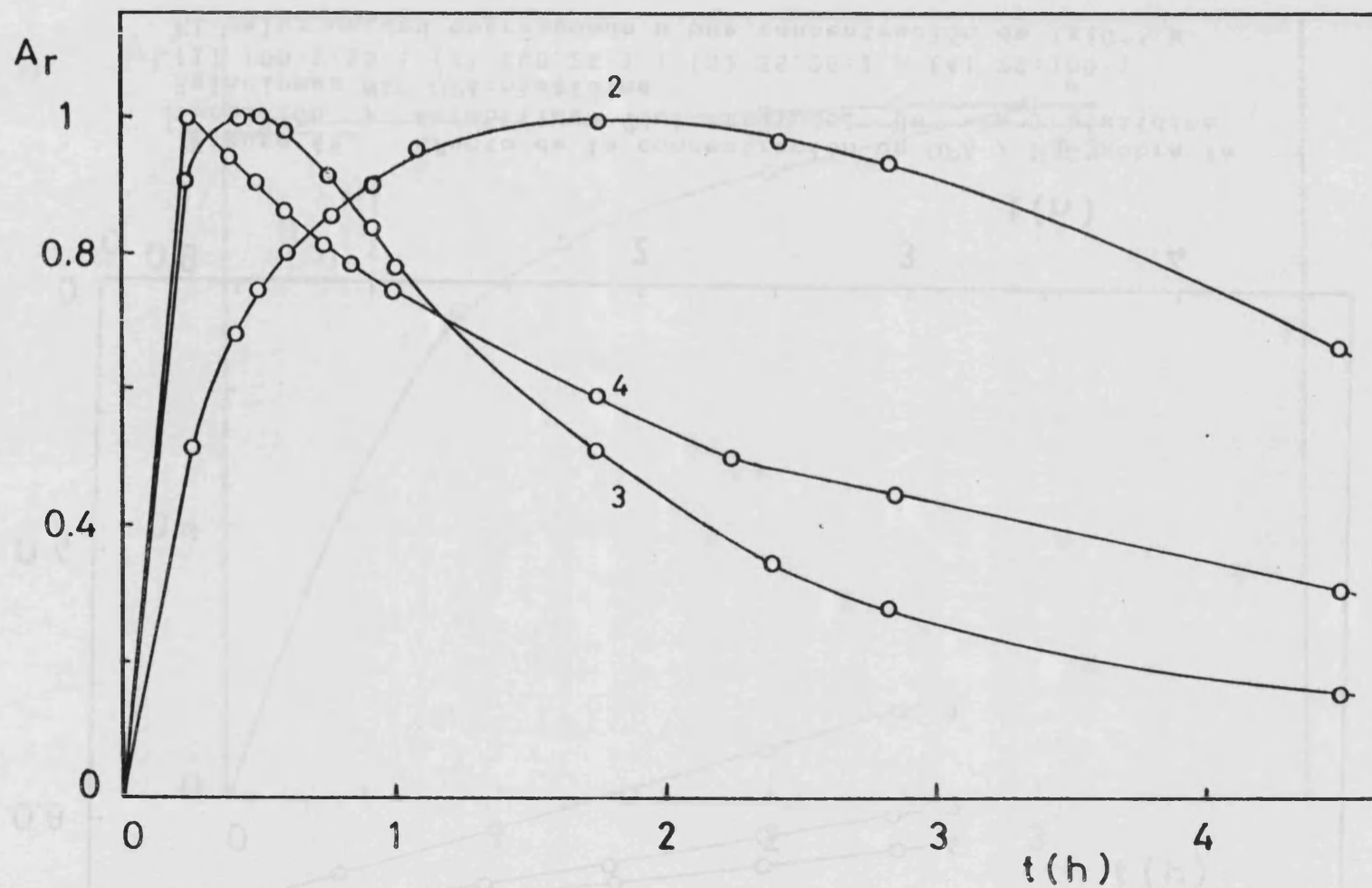
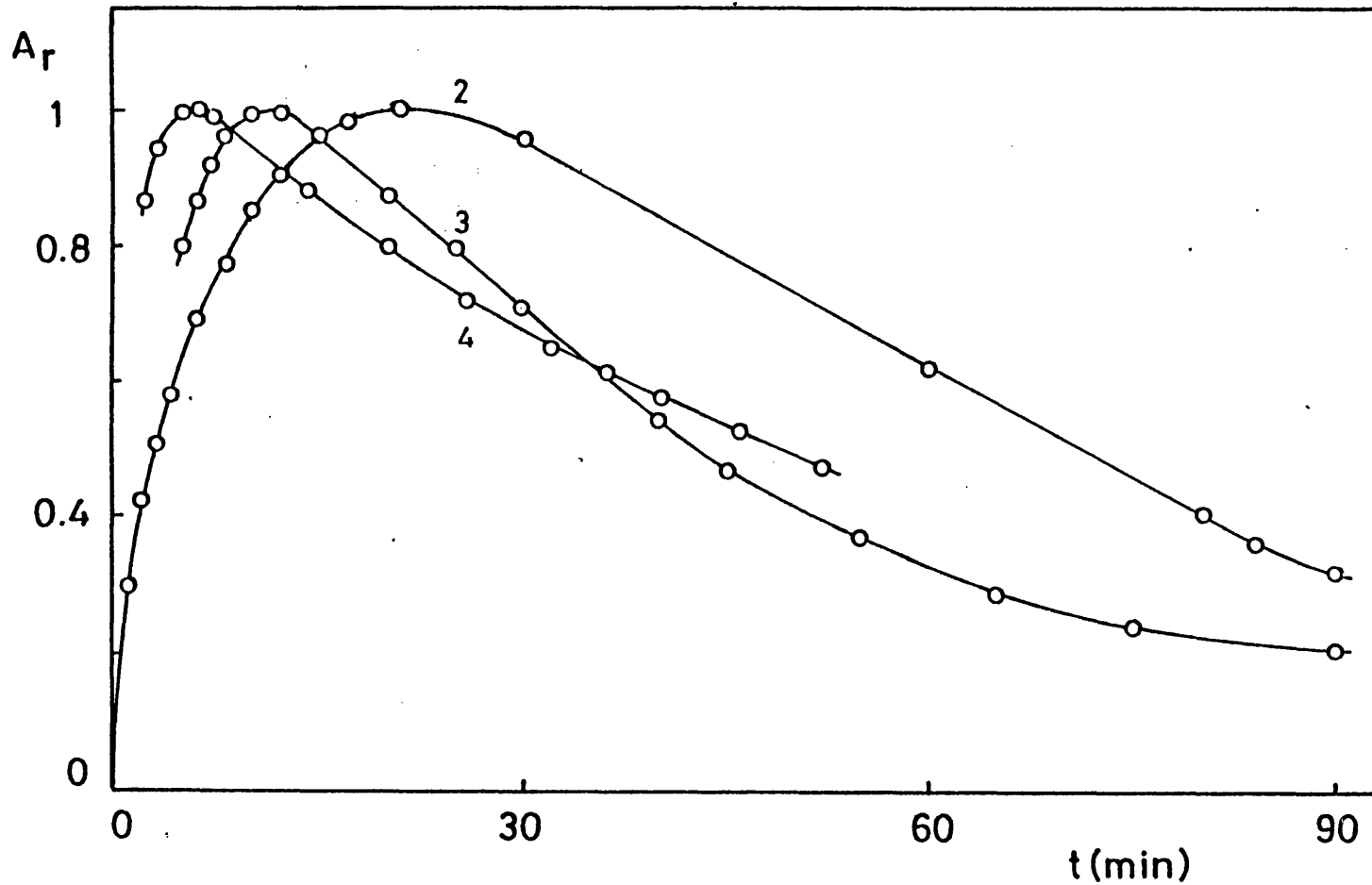


Figura 46. - Efecto de la concentración de OPA y ME sobre la formación y estabilidad del isoindol de la isoleucina. Relaciones ME:OPA:isoleucina : (1) 100:1:25 ; (2) 100:25:1 ; (3) 25:25:1 y (4) 25:100:1 . El valor unidad corresponde a una concentración de  $1 \times 10^{-4}$  M.





**Figura 47.** - Efecto de la concentración de OPA y ME sobre la formación y estabilidad del isoindol de la histidina. Relaciones ME:OPA:histidina : (1) 100:1:25 ; (2) 100:25:1 ; (3) 25:25:1 y (4) 25:100:1 . El valor unidad corresponde a una concentración de  $1 \times 10^{-4}$  M.



III.5.- DETERMINACION DE CISTINA CON O-FTALDEHIDO  
Y N-ACETIL-L-CISTEINA



Como se comentó en el apartado III.4.2.1 , todos los aminoácidos originan el mismo espectro de absorción al reaccionar con OPA y NAC , incluyendo la cistina, que con ME da lugar a un compuesto distinto. La cisteína , por el contrario, no muestra el espectro característico de los isoindoles. En este apartado se muestran diversos estudios sobre el derivado de la cistina con OPA-NAC .

### III.5.1.- OPTIMIZACION DE LAS CONDICIONES EXPERIMENTALES

#### 1.- Espectros de absorción

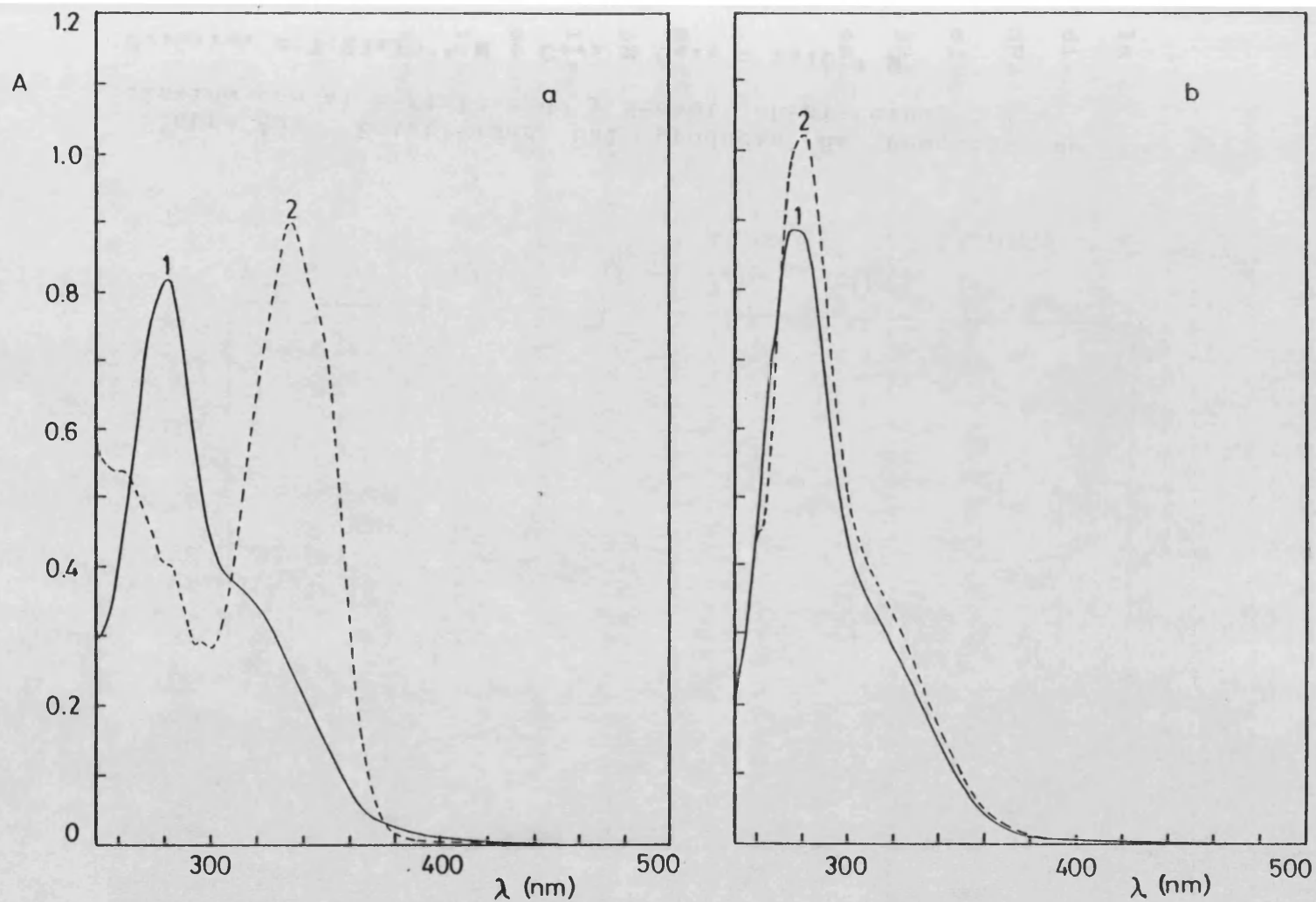
Se preparó una disolución que contenía cistina  $7.2 \times 10^{-5}$  M y OPA y NAC, ambos en concentración  $2 \times 10^{-3}$  M , y otra conteniendo cisteína en concentración  $1.3 \times 10^{-4}$  M , y OPA y NAC  $2 \times 10^{-3}$  M . Las disoluciones se prepararon a temperatura ambiente en medio bórico-borato a pH 9.5 . Paralelamente se realizaron experiencias similares utilizando ME como tiol en concentración  $2 \times 10^{-3}$  M . Se registraron los espectros de absorción utilizando como blanco disoluciones preparadas en ausencia del aminoácido.

En la Figura 48 se muestran los espectros de absorción de la cistina y cisteína con los reactivos OPA-NAC y OPA-ME. Se observa, por una parte, que la cistina origina el espectro característico de los isoindoles cuando reacciona con OPA-NAC , mientras que el producto de reacción de la cisteína

presenta un espectro de absorción distinto, con un máximo a 280 nm y que es muy semejante al espectro obtenido con el reactivo OPA-ME (Figura 48 b). El espectro correspondiente a la cistina con OPA-ME es el mismo que el obtenido con la cisteína, debido a que con este tiol la cistina se reduce a cisteína.

Así, es probable que al reaccionar la cistina con OPA-NAC se forme un isoindol, en el que el enlace disulfuro de la molécula de cistina permanezca intacto, sin reducir. En la bibliografía no se ha descrito anteriormente la formación de un isoindol con cistina.

Se comprobó que una disolución que contenía cistina  $7.23 \times 10^{-5}$  M, en presencia de OPA-NAC (relación 1:1) en concentración  $2 \times 10^{-3}$  M, alcanzó el máximo de absorbancia en un tiempo inferior a los 2 min y permaneció estable al menos durante 5 min, mostrando una degradación del 24 % a los 60 min (Figura 49). Por lo tanto, el isoindol formado es menos estable que los obtenidos con otros aminoácidos (Tabla 22).



**Figura 48.** - Espectros de absorción de los productos de reacción de : (a) cistina y (b) cisteína con los reactivos (1) OPA-ME y (2) OPA-NAC .

$C_{\text{cisteína}} = 1.31 \times 10^{-4} \text{ M}$  ;  $C_{\text{cistina}} = 7.23 \times 10^{-5} \text{ M}$   
 $C_{\text{OPA}} = C_{\text{NAC}} = C_{\text{ME}} = 2 \times 10^{-3} \text{ M}$

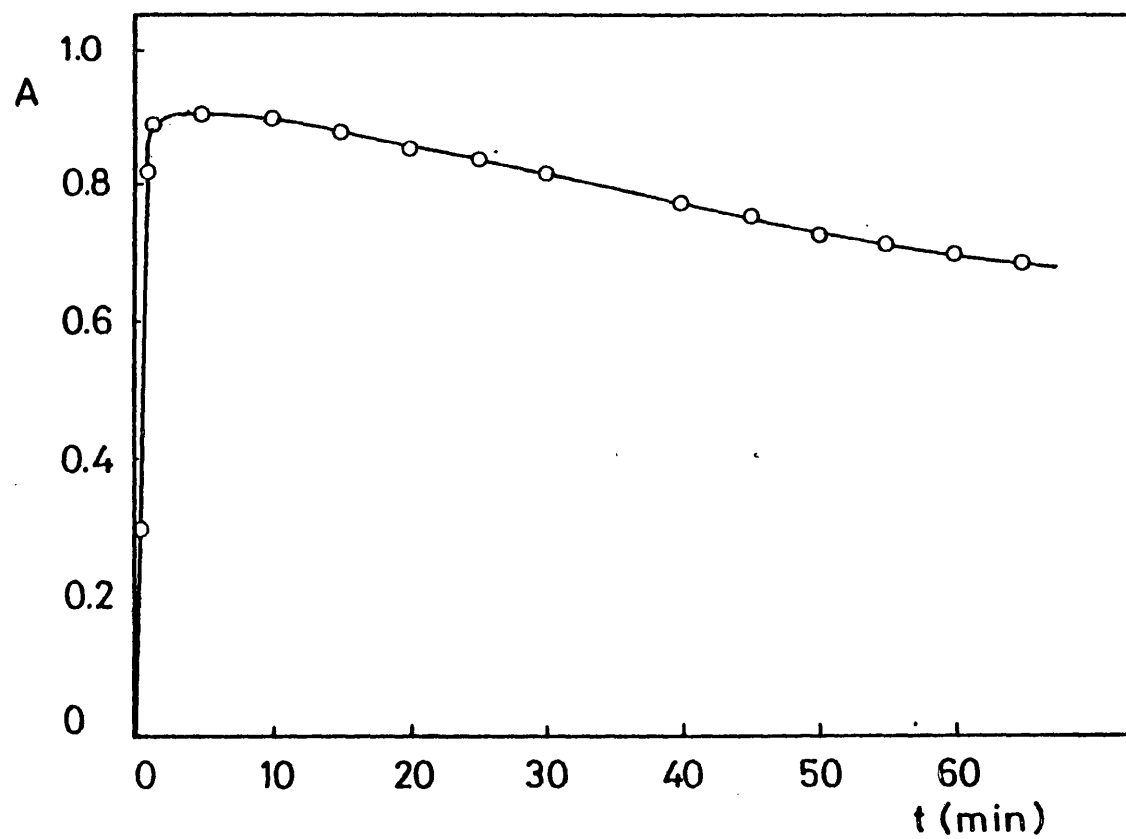


Figura 49. - Estabilidad del producto de reacción de la cistina con el o-ftaldehido y N-acetil-L-cisteína.

$C_{\text{cistina}} = 7.23 \times 10^{-5} \text{ M}$  ;  $C_{\text{ofa}} = C_{\text{nac}} = 2 \times 10^{-5} \text{ M}$



## 2.- Influencia del pH

Se estudió la influencia del pH sobre la reacción de la cistina con el reactivo OPA-NAC . Para ello se prepararon disoluciones que contenían cistina  $6.87 \times 10^{-5}$  M y reactivo OPA-NAC en concentración  $2 \times 10^{-3}$  M a distintos valores de pH , ajustados con HCl y tampón borato. Se leyó la absorbancia a 335 nm frente a un blanco preparado en ausencia del aminoácido.

Los resultados se representan en la Figura 50, mostrando la máxima absorbancia en el intervalo de pH 8-9.5. A pH > 10 se observó una reacción muy lenta, que con el tiempo llegaba a alcanzar el valor máximo de absorbancia, lo que iba acompañado de la aparición de una coloración amarilla. Para el trabajo posterior se eligió un pH entre 9-9.5 , ajustado con tampón bórico-borato.

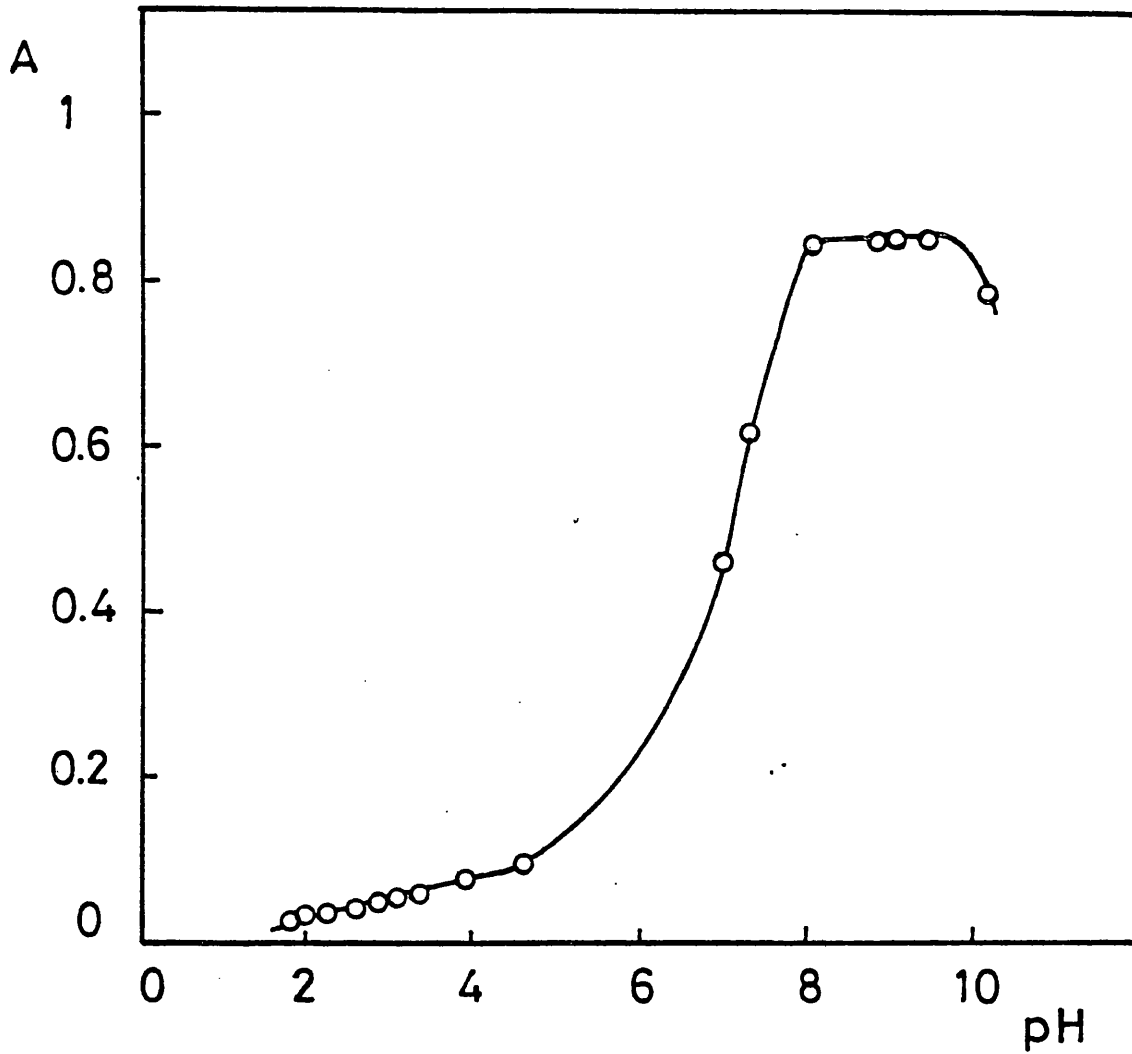


Figura 50. - Influencia del pH .

Cristina =  $6.87 \times 10^{-5}$  M ; COPA = CNAC =  $2 \times 10^{-9}$  M

3.- Influencia de la concentración del reactivo o-ftaldehido-  
N-acetil-L-cisteína

No es posible estudiar independientemente la influencia de la concentración de OPA y de NAC sobre la formación del derivado de la cistina debido, por una parte, a que la cistina reacciona con el OPA en ausencia de tiol, como se mostró en el apartado III.3.3 , y por otra, a que la reacción de la cistina con el reactivo OPA-NAC en presencia de relaciones NAC:OPA elevadas es muy lenta. Por ello, se realizaron experiencias añadiendo cantidades crecientes del reactivo OPA-NAC , preparado en concentraciones equimolares.

Se realizó una valoración fotométrica de cistina  $6.87 \times 10^{-5}$  M en medio tampón bórico-borato, utilizando como valorante el reactivo OPA-NAC en concentración  $6 \times 10^{-4}$  M , leyéndose la absorbancia a 335 nm frente a blanco agua. Asimismo, se realizó una valoración en blanco para compensar la variación de absorbancia al aumentar la concentración de OPA . Se realizó una segunda serie de experiencias añadiendo sobre disoluciones de OPA-NAC en concentración  $4 \times 10^{-5}$ - $4.8 \times 10^{-4}$  M , cistina  $6.87 \times 10^{-5}$  M . Los resultados se muestran en la Figura 51, donde se observa que :

1.- Cuando se adicionó lentamente el reactivo OPA-NAC sobre una disolución de cistina, la reacción transcurrió muy lentamente (se espero 5 min después de cada adición, para alcanzar una señal estable) (curva 1), encontrando que a

partir de una concentración de OPA-NAC próxima a  $3.5 \times 10^{-4}$  M (correspondiente a una relación molar OPA-NAC/cistina = 5) se obtiene una lectura de absorbancia constante, correspondiendo a una absortividad molar del orden de 6400, valor que es característico de la formación de un único isoindol.

2.- Al añadir cistina sobre disoluciones de OPA-NAC (relaciones molares OPA-NAC/cistina comprendidas entre 0.6 y 7) se obtuvo también un valor de absorbancia constante a partir de relaciones molares OPA-NAC/cistina superiores a 5 (curva 2), presentando en esta ocasión el compuesto formado una absortividad molar próxima a 12000. Asimismo, no se observó modificación alguna en los espectros de absorción obtenidos en los dos casos, que mostraron el espectro característico del isoindol, variando tan sólo la intensidad de la banda.

Estos resultados parecen indicar que, cuando se adiciona el reactivo OPA-NAC lentamente, se produce la reacción de uno de los grupos amino de la cistina, para formar un isoindol simple, que parece inhibir la reacción del otro grupo amino del aminoácido con este reactivo. Por otra parte, cuando la cistina se mezcla rápidamente con una disolución que contiene reactivo OPA-NAC, se favorece la formación de un isoindol doble, por reacción de los dos grupos amino de la cistina, a semejanza de lo que ocurre con lisina (10) y etilenamina (123), siendo en este caso la absortividad molar del compuesto formado prácticamente el doble de la de los isoindoles de otros aminoácidos.

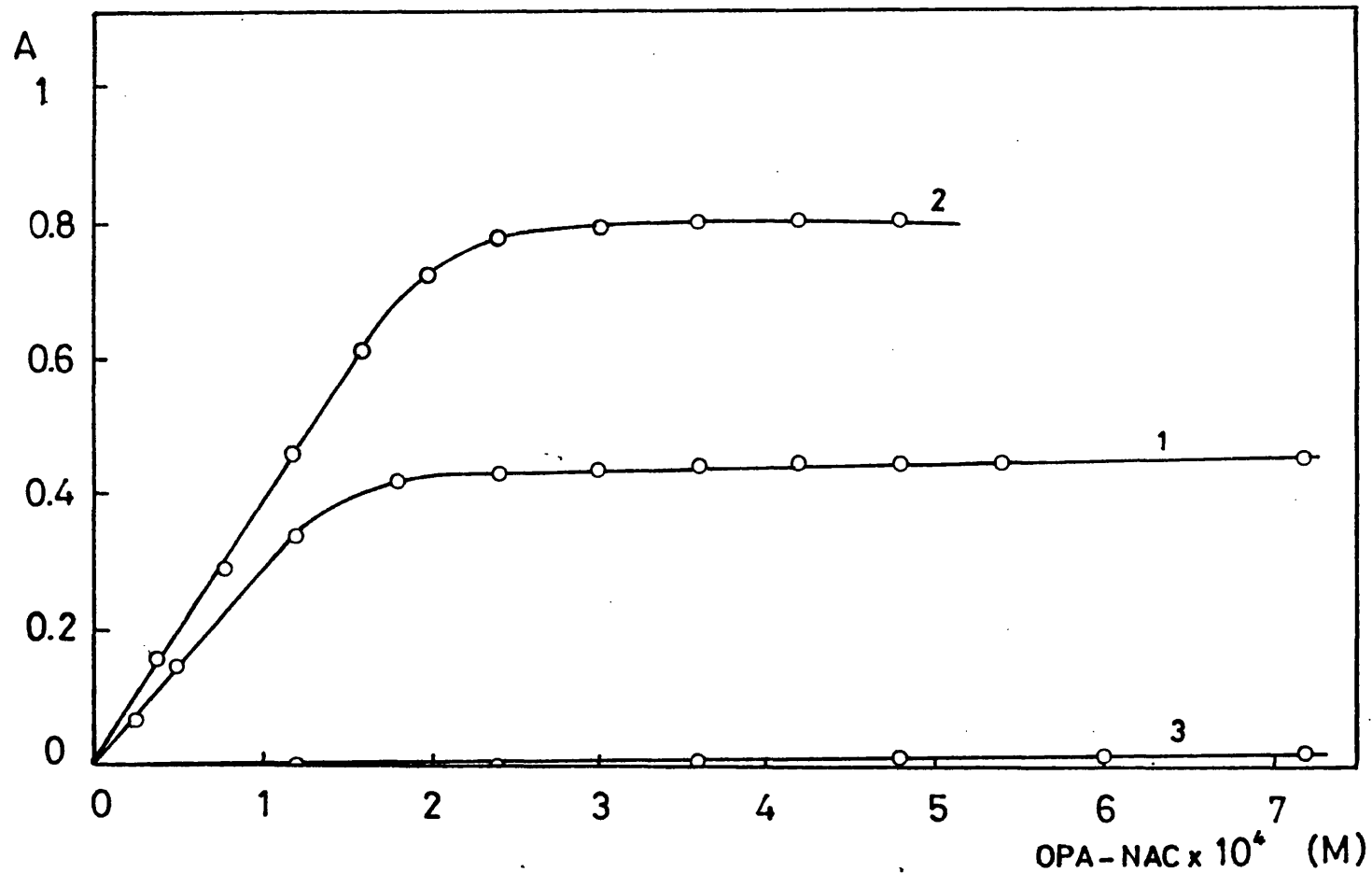


Figura 51. - Influencia de la concentración del reactivo OPA-NAC : (1) Adición lenta del reactivo sobre una disolución de cistina; (2) Adición de cistina sobre el reactivo ; (3) en ausencia de cistina.

Cistina =  $6.87 \times 10^{-5}$  M

Por otra parte, se observó que la proporción de alcohol presente en la disolución (la disolución de OPA es etanólica), influye tanto sobre la velocidad de la reacción de cistina con OPA-NAC como sobre la absorbancia de las disoluciones, para proporciones superiores al 10 % respecto al volumen total. Así, unas disoluciones que contenían cistina en concentración  $6.87 \times 10^{-6}$  M, OPA y NAC en concentración  $1 \times 10^{-3}$  M y etanol en proporciones del 0-10 %, alcanzaron el máximo de absorbancia a los 3 min de mezclados los reactivos, mientras que la misma disolución en presencia de un 35 % de etanol, tardó 8 min para alcanzar una señal analítica constante, que resultó ser un 9 % inferior a la anterior.

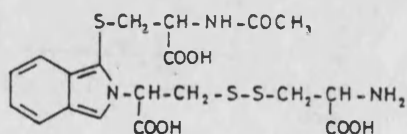
4.- ESTRUCTURA DEL PRODUCTO DE REACCION

1.- Determinación de la estequiometría

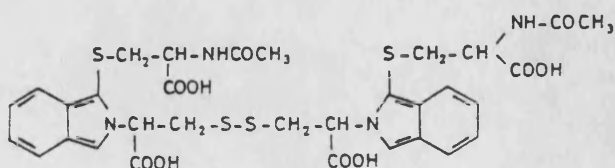
Se utilizó el método de Asmus (apartado III.2.4) para determinar la estequiometría de la reacción de la cistina con el reactivo OPA-NAC .

El método se aplicó a los puntos experimentales indicados en la Figura 51 (curvas 1 y 2). En la Figura 52 se muestra el diagrama obtenido en el primer caso, que indica una estequiometría 1:1:1 , lo que está de acuerdo con la absorptividad molar de este producto de reacción ( $\epsilon \sim 6400$ ). la ecuación de la recta obtenida mostró una constante de formación aproximada de  $\log \beta_1 = 6.2$  .

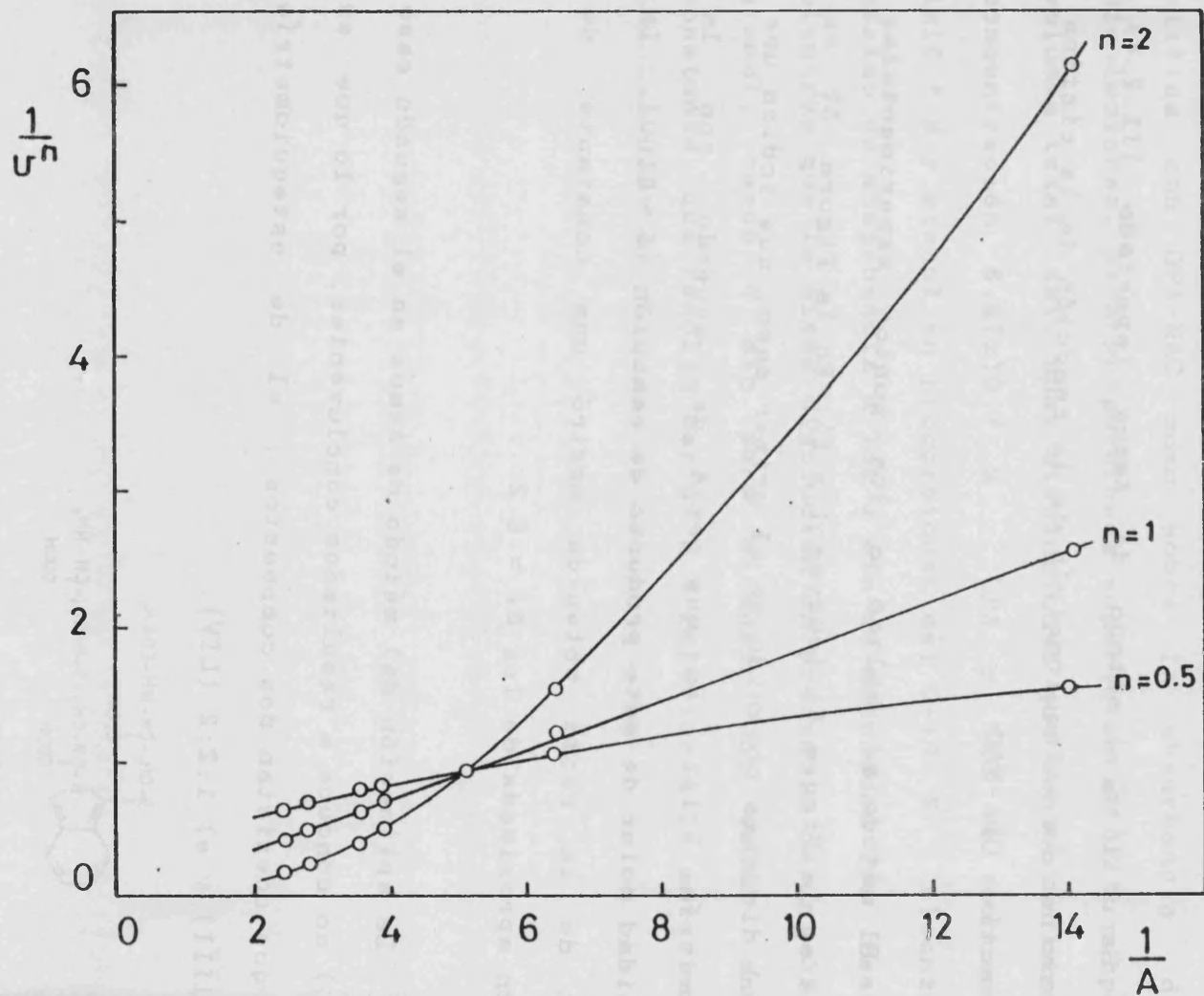
La aplicación del método de Asmus en el segundo caso (curva 2) no conduce a resultados concluyentes, por lo que es posible que coexistan dos compuestos ; el de estequiometría 1:1:1 (LIII) y el 1:2:2 (LIV).



LIII



LIV



**Figura 52.** - Determinación de la estequiometría del producto de reacción de la cistina con el reactivo OPA-NAC, obtenido por adición lenta del reactivo. Método de Asmus.

$C_{\text{cistina}} = 6.87 \times 10^{-5} \text{ M}$  ;  $C_{\text{OPA}} = C_{\text{NAC}} = 6 \times 10^{-3} \text{ M}$



## 2.- Acidificación del producto de reacción

Se realizó una valoración fotométrica ácido-base del producto de reacción de la cistina con el reactivo OPA-NAC, en la que se utilizó como valorante HCl 0.01 M . En la celda de valoración termostatada a 25°C , se introdujo cistina en concentración  $3.5 \times 10^{-5}$  M y reactivo OPA-NAC en concentración  $2 \times 10^{-3}$  M a pH 9.5 , y se observó la variación de la absorbancia a 335 nm al acidificar la disolución.

Los resultados aparecen en la Figura 53 , observándose un acusado descenso de la absorbancia a  $\text{pH} < 3.5$ . Asimismo, como se muestra en la Figura 54 , al acidificar el producto de reacción de la cistina con el reactivo OPA-NAC hasta  $\text{pH} = 1$  , se produce un desplazamiento hipsocrómico del máximo de absorción desde 335 nm a 325 nm , a la vez que se acelera su descomposición. Al cabo de 2 min la absorbancia descendió un 50% . Al añadir NaOH 0.1 M al producto obtenido en medio ácido, volvió a obtenerse la banda a 335 nm , característica del isoindol formado en medio básico. Así, el cambio espectral es muy probable que se deba a la protonación del isoindol. Sin embargo, la gran inestabilidad de este derivado impidió obtener los valores de la(s) constante(s) de protonación.

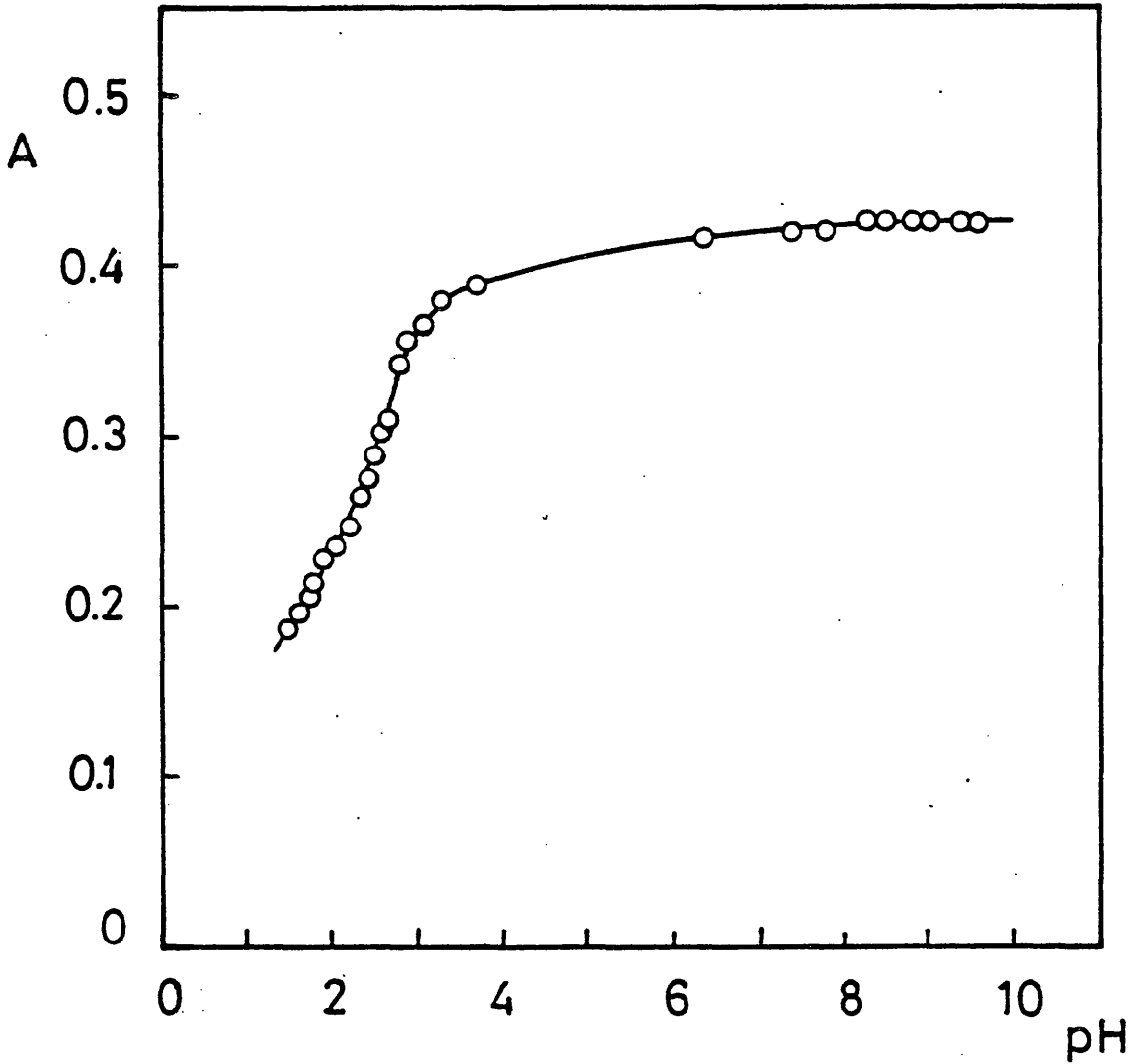


Figura 53. - Variación de la absorbancia a 335 nm al acidificar el producto de reacción de la cistina con el reactivo OPA-NAC.

Cistina =  $6.87 \times 10^{-5}$  M ;  $C_{OPA} = C_{NAC} = 2 \times 10^{-3}$  M

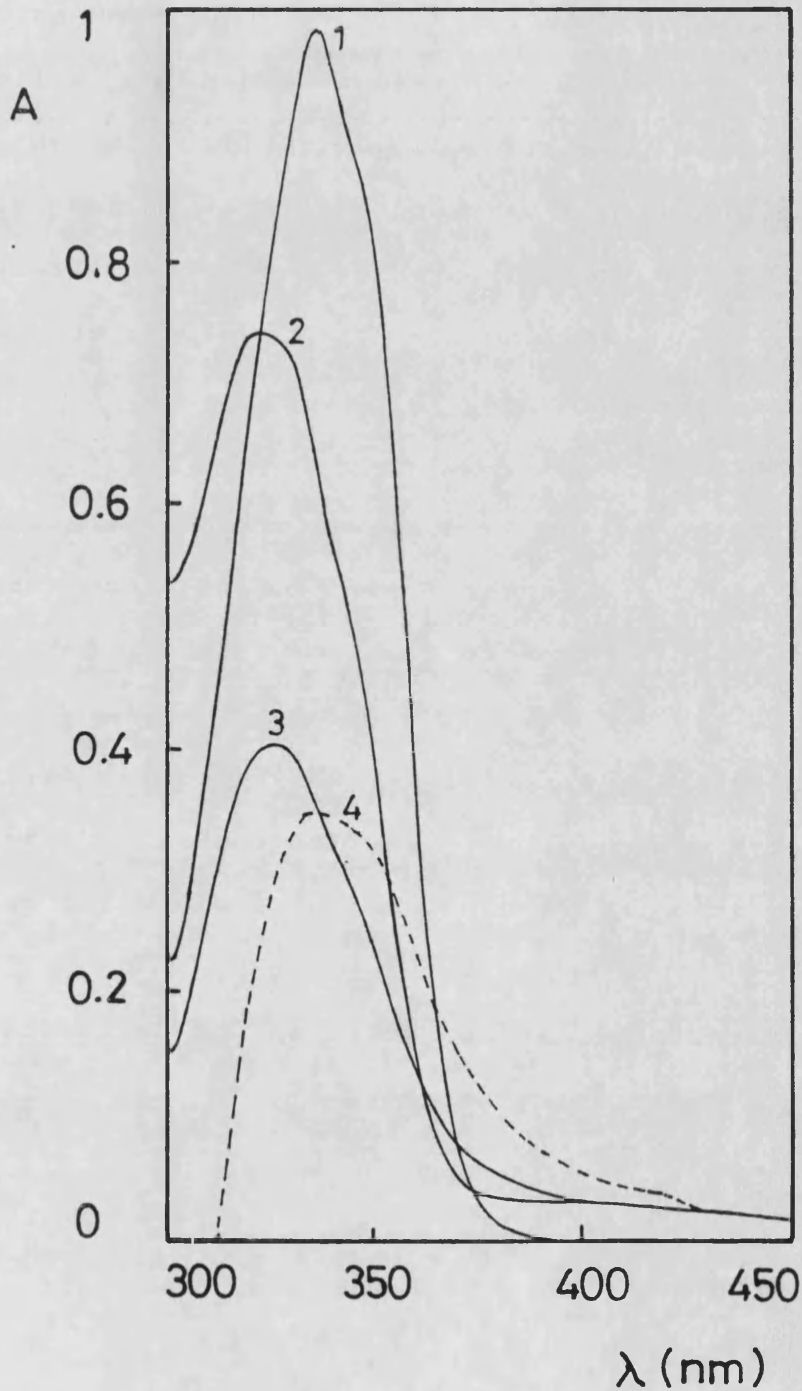


Figura 54. - Espectros de absorción del producto de reacción de la cistina con el reactivo OPA-NAC en: (1) medio bórico-borato (2) medio ácido; (3) medio ácido (a los 2 min ); (4) tras alcalinizar el producto obtenido en (3).

$C_{\text{cistina}} = 6.87 \times 10^{-5} \text{ M}$  ;  $C_{\text{OPA}} = C_{\text{NAC}} = 2 \times 10^{-3} \text{ M}$

Estos resultados ponen de manifiesto que el producto de reacción de la cistina con el reactivo OPA-NAC es distinto al obtenido cuando la cistina reacciona con el o-ftaldehido, en ausencia de tiol (apartado III.3 , LII). En este último caso se forma lentamente un producto a pH 9.5, que absorbe a 335 nm ( $\epsilon = 4.5 \times 10^3$ ) y que tras su acidificación, presenta una banda de absorción a 440 nm ( $\epsilon = 3.83 \times 10^3$ ), que permanece estable durante varias horas.

El hecho de que la cistina forme un isoindol con el reactivo OPA-NAC , a diferencia de lo que ocurría con el reactivo OPA-ME puede deberse a dos causas:

1.- Al mayor carácter reductor del ME respecto del NAC , lo cual no resulta probable, ya que el potencial de reducción no se halla demasiado influenciado por el resto de la molécula.

2.- A la mayor estabilidad que muestran los derivados del NAC , muy superior a la obtenida con ME.

### 3.- Fluorescencia del producto de reacción

Para comprobar si el producto de reacción de la cistina con el reactivo OPA-NAC muestra el comportamiento fluorescente del resto de los isoindoles, se prepararon disoluciones que contenían OPA y NAC en concentración  $1 \times 10^{-3}$  M en ambos, y los aminoácidos isoleucina y cistina en concentración  $5 \times 10^{-6}$  M. Asimismo, se prepararon disoluciones análogas con el reactivo OPA-ME en las mismas concentraciones.

En la Figura 55 aparecen representados los espectros de excitación y emisión de los derivados de la isoleucina y cistina para ambos reactivos. Las longitudes de onda para los derivados del reactivo OPA-NAC fueron  $\lambda_{ex} = 344$  nm y  $\lambda_{em} = 445$  nm, mientras que para los derivados de ME éstas fueron 336 y 456 nm, respectivamente.

A pesar de que la cistina presenta los mismos máximos de emisión y excitación que el isoindol formado por la isoleucina, su intensidad de fluorescencia fue inferior, al igual que ocurre cuando se utiliza ME como tiol. Sin embargo, el uso del reactivo OPA-NAC supone un aumento del 50% de la intensidad de fluorescencia, respecto a la obtenida con OPA-ME.

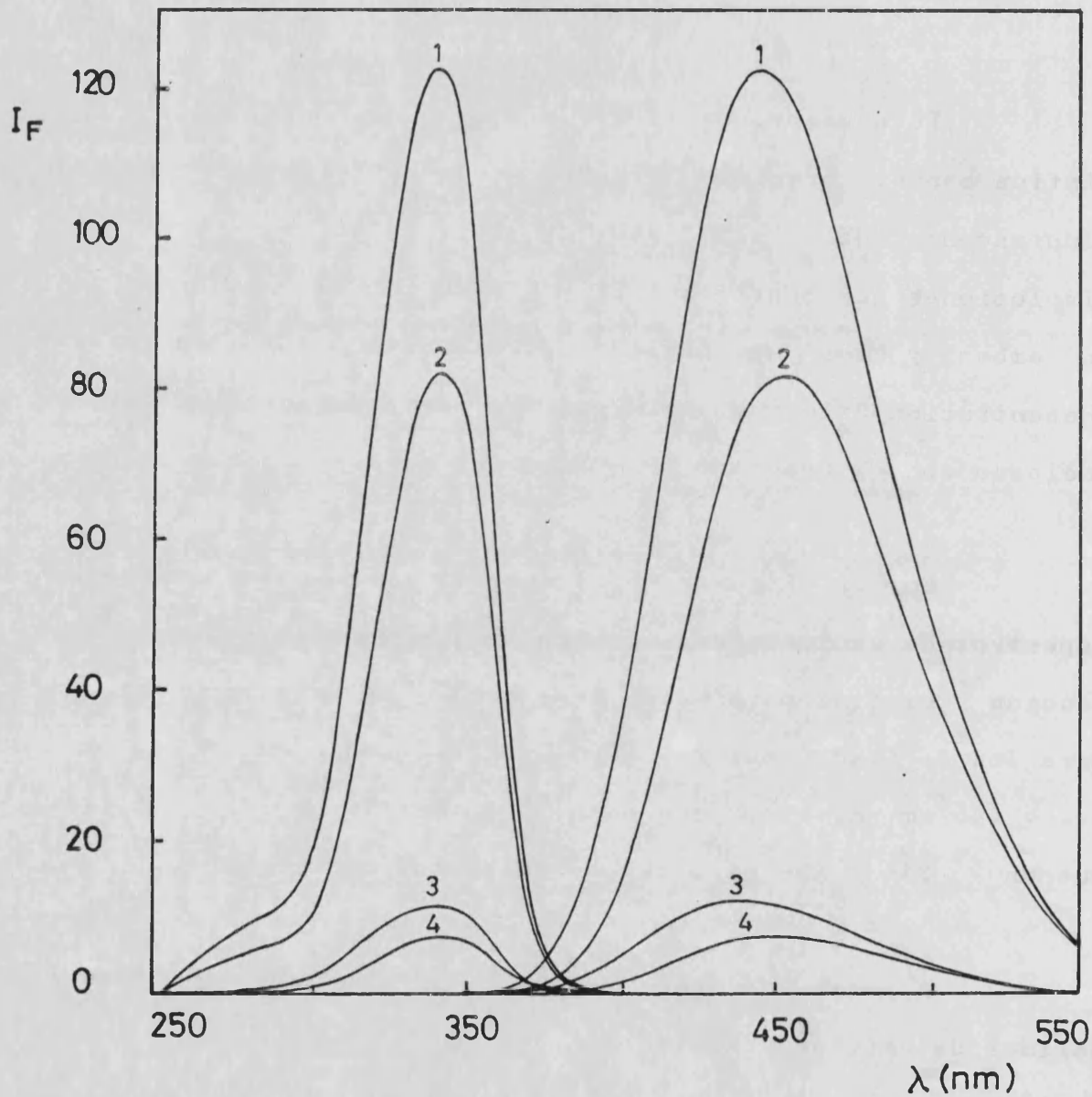


Figura 55. - Espectros de excitación y emisión del producto de reacción de la isoleucina y cistina con los reactivos OPA-NAC (1 y 3) y OPA-ME (2 y 4), respectivamente.

$C_{ILE} = C_{cistina} = 5 \times 10^{-6} \text{ M}$  ;  $C_{OPA} = C_{NAC} = C_{ME} = 1 \times 10^{-3} \text{ M}$

La menor intensidad de fluorescencia podría justificarse por la presencia del átomo de azufre en la molécula de cistina. Además se debe tener en cuenta que no todos los isoindoles son fluorescentes.

Por otra parte, el carácter dimérico de la molécula de cistina la hace semejante a la lisina, que presenta un comportamiento peculiar con el reactivo OPA-ME. Cuando se adiciona SDS a una disolución de lisina se produce un aumento importante en la fluorescencia del isoindol derivado, por lo que se añadió SDS (concentración final 0.4%) a la disolución de cistina. Sin embargo no se observó efecto alguno.

Este comportamiento no implica, sin embargo, que no se haya formado un isoindol doble. Chen y col. (10) observaron también un aumento en la fluorescencia del péptido leucil-triptófano al añadir SDS. Debe considerarse que la distancia entre el isoindol formado por el grupo  $\alpha$ -amino del leucil-triptófano y el grupo indol del triptófano es la misma que la existente entre los dos grupos isoindol de la lisina disustituída (115). Así, si las interacciones isoindol-isoindol e isoindol-indol causan la extinción de la fluorescencia en los derivados de lisina y de leucil-triptófano, respectivamente, es razonable esperar en ambos el mismo efecto de aumento de fluorescencia al añadir SDS. La distancia entre los dos grupos amino de la cistina es mayor, por lo que podría explicarse que no se haya producido el efecto exaltador de la fluorescencia.

### III.5.3.- PARAMETROS ANALITICOS SIGNIFICATIVOS

La formación de un isoindol de cistina resulta adecuada para su utilización en la determinación del aminoácido. En este apartado se muestra el intervalo de linealidad, límites de detección y determinación, y repetitividad, correspondientes a esta determinación.

#### 1.- Curva de calibrado

Se preparó una serie de disoluciones que contenían OPA-NAC en concentración  $2 \times 10^{-3}$  M y cantidades variables de una disolución de cistina  $8.63 \times 10^{-4}$  M, abarcando el intervalo de concentraciones  $1-8 \times 10^{-5}$  M.

Los resultados se representan en la Figura 56, mostrando una buena linealidad. La ecuación de la recta obtenida fue:

$$A = -0.0047 + 1.207 \times 10^4 C_{\text{cistina}} \quad r = 0.9999$$



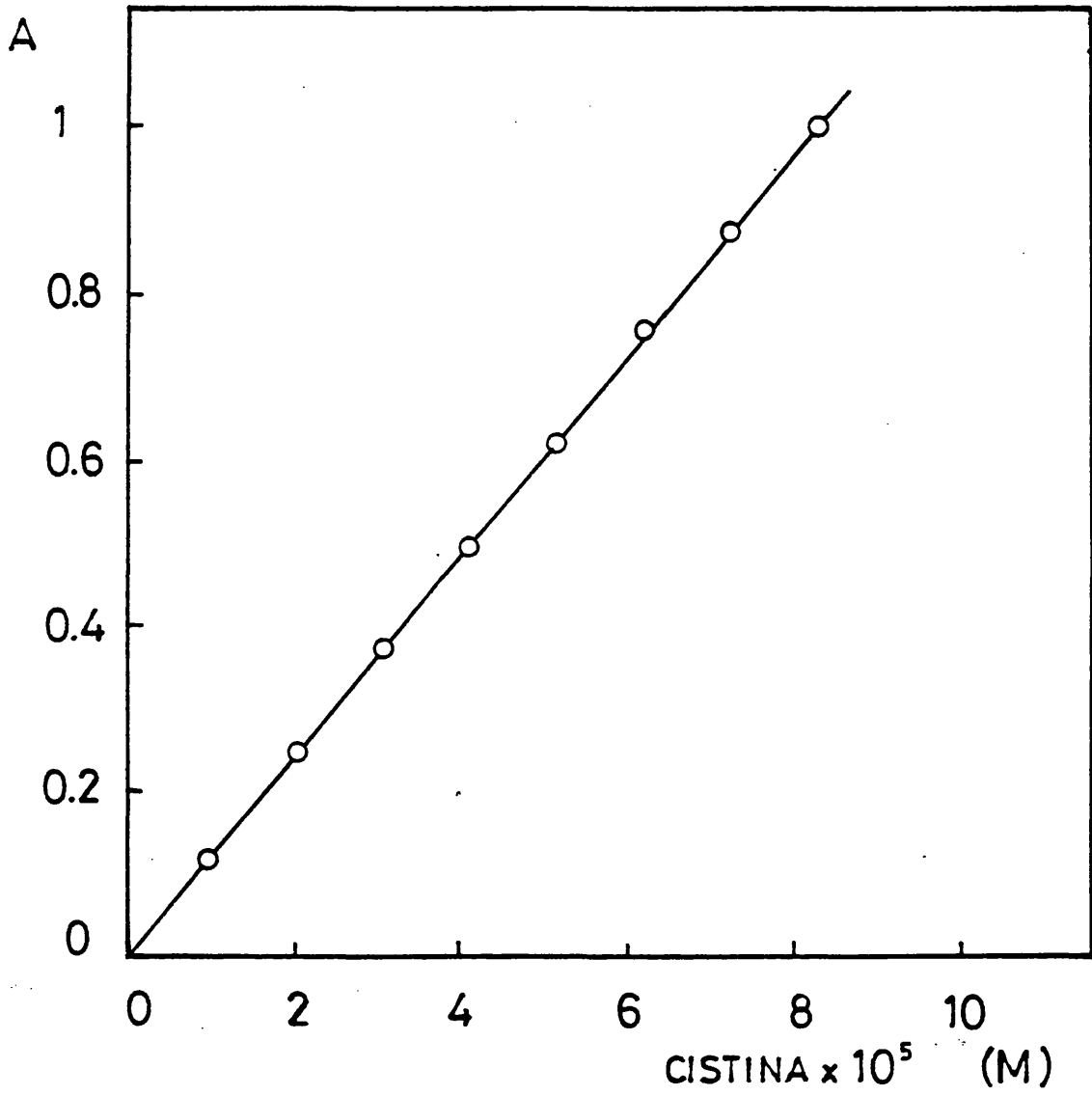


Figura 56. - Curva de calibrado.

$C_{OPA} = C_{NAC} = 2 \times 10^{-3} \text{ M}$

## 2.- Límites de detección y determinación

En este apartado se halla la concentración mínima de cistina que puede detectarse y determinarse por este procedimiento. Para ello se preparó una serie de disoluciones que contenían OPA y NAC en concentraciones  $2 \times 10^{-3}$  M , en tampón bórico-borato, leyendo la absorbancia a 335 nm frente a blanco agua.

Los resultados se muestran en la Tabla 26 . Los límites de detección y determinación, según los criterios 3s y 10s , resultaron ser de  $8.92 \times 10^{-7}$  M (0.21  $\mu\text{g/ml}$ ) y  $2.06 \times 10^{-6}$  M (0.50  $\mu\text{g/ml}$ ), respectivamente.

Tabla 26. - Límites de detección y determinación

Experiencia n°	A
1	0.033
2	0.030
3	0.028
4	0.030
5	0.033
6	0.033
7	0.028
8	0.028
9	0.029
10	0.029
$\bar{x}$	0.030
s	0.0020

3.- Repetitividad

Se prepararon 10 disoluciones independientes que contenían cistina  $6.87 \times 10^{-5}$  M y reactivo OPA-NAC en concentración  $2 \times 10^{-3}$  M , leyéndose la absorbancia frente a un blanco preparado en ausencia de cistina.

Los resultados se muestran en la Tabla 27 , mostrando que el método presenta una buena repetitividad, siendo el coeficiente de variación del 0.5 % .

Tabla 27. - Repetitividad.

Cistina =  $6.87 \times 10^{-5}$  M ; C<sub>OPA-NAC</sub> =  $2 \times 10^{-3}$  M

Experiencia n°	A
1	0.862
2	0.864
3	0.860
4	0.856
5	0.854
6	0.854
7	0.853
8	0.854
9	0.850
10	0.851
$\bar{x}$	0.856
s	0.0045

#### 4.- Discusión

El método propuesto para la determinación de cistina con el reactivo OPA-NAC en medio bórico-borato, presenta las ventajas de su sensibilidad, rapidez y reproducibilidad, si bien tiene los inconvenientes de la falta de selectividad y la mayor inestabilidad del producto formado, si lo comparamos con el método para la determinación de cistina propuesto en el apartado III.2. Por ello, para aplicar este procedimiento es necesario utilizar algún método de separación.

En contraposición, el procedimiento propuesto para la determinación de cistina con o-ftaldehído en ausencia de tiol, en medio bórico-borato y posterior acidificación del producto de reacción a pH 1, si bien es un método menos sensible ( $\epsilon = 4830$ ) presenta la ventaja de su mayor selectividad y mayor estabilidad de los productos formados.

La determinación de la concentración de cistina es muy importante en la diagnosis de la cistinuria, enfermedad que se caracteriza por un aumento en la concentración de este aminoácido en la orina. Otros tipos de muestra en los que se determina cistina son: productos cosméticos capilares, cereales, cerveza, harina, chocolate y cacao, tabaco, mostos, levaduras, huevos y productos derivados, gelatinas, e insulina y caseína.

III.6.- DETERMINACION DE PROTEINAS CON O-FTALDEHIDO  
Y N-ACETIL-L-CISTEINA



### III.6.1.- INTRODUCCION

La determinacion de la concentracion de proteínas en una muestra puede llevarse a cabo sobre las proteínas intactas o previa hidrólisis de las mismas, tomando como referencia una proteína en el primer caso y un aminoácido o mezcla de aminoácidos en el segundo. Sin embargo, los métodos basados en la hidrólisis son más exactos y sensibles.

#### 1.- Análisis de péptidos y proteínas intactas

Joys y Kim (148), en un estudio sobre la Salmonella flagelar, utilizaron los reactivos OPA y ninhidrina para la detección de péptidos, encontrando que mientras que la ninhidrina era capaz de detectar los 5 péptidos existentes, el reactivo OPA-ME tan sólo reaccionaba con aquellos péptidos que contenían un residuo de lisina terminal. Posteriormente se confirmó que la respuesta fluorescente de los derivados de péptidos o proteínas con OPA depende tan sólo del grupo  $\alpha$ -NH<sub>2</sub> terminal de la cadena de aminoácidos y de los grupos  $\epsilon$ -amino de los residuos de lisina (149):

$$I_f = \frac{W_P}{M} (n_{\alpha} I_{\alpha}^{\circ} + n_{\epsilon} I_{\epsilon}^{\circ}) \quad [35]$$

donde  $w_p$  y  $M$  son el peso de la proteína o péptido y su peso molecular,  $n_\alpha$  y  $n_\epsilon$  el número de moles de los grupos  $\alpha$ - y  $\epsilon$ -amino por mol de proteína, y  $I_\alpha^0$  y  $I_\epsilon^0$  la fluorescencia por mol de proteína de los grupos  $\alpha$ - y  $\epsilon$ -amino, respectivamente.

La respuesta fluorescente de los derivados de péptidos y proteínas con el reactivo OPA-ME varía ampliamente, ya que depende casi exclusivamente de un solo aminoácido, la lisina. Por esta razón, cuando se realiza un calibrado para determinar un péptido o proteína, es muy importante la elección del patrón. Así, por ejemplo, el derivado de la albúmina en general es más fluorescente que el de las globulinas y si éstas se determinan en suero, utilizando albúmina como patrón, se obtienen valores anormalmente bajos (150).

En realidad, con excepción del método Kjeldhal, casi todos los métodos existentes para determinar proteínas intactas proporcionan valores variables, por lo que el resultado debe expresarse como equivalentes de la proteína determinada, respecto a una proteína tomada como referencia.

Puede lograrse una respuesta más uniforme y sensible con los diversos péptidos y proteínas, si previamente se hidrolizan, incrementándose así el número de grupos amino disponibles para la reacción (151-154).



## 2.- Análisis de péptidos y proteínas hidrolizadas

En los procedimientos empleados en la hidrólisis de péptidos y proteínas se utilizan ácidos (2), bases (155-156) o enzimas (157). La hidrólisis ácida, debido a su mayor exactitud y sencillez, es generalmente la más utilizada.

Butcher y Lowry (153) determinaron albúmina de suero bovino con el reactivo OPA-ME, tras su hidrólisis ácida, utilizando alanina como aminoácido de referencia. Las recuperaciones fueron tan sólo de un 70 %, lo que es debido a que no todos los aminoácidos originan compuestos igualmente fluorescentes e incluso algunos no reaccionan con OPA y ME.

En realidad, el único método seguro para determinar una proteína consiste en analizar mediante HPLC, los aminoácidos obtenidos tras hidrolizar la proteína, y sumar los pesos de sus residuos. Sin embargo, el procedimiento es largo y requiere un equipo especializado.

Hortsman (158) describió un procedimiento para la determinación de proteínas, que proporciona una respuesta prácticamente independiente de la composición de la misma, y que se basa en su hidrólisis y la reacción de los aminoácidos liberados con ninhidrina. Esta reacción proporciona una respuesta similar para todos los aminoácidos proteicos (159). La cantidad de proteína fue obtenida multiplicando los moles de aminoácidos libres hallados por el peso molecular medio de los residuos de los aminoácidos.

Posteriormente, Peterson (160) propuso el uso del reactivo OPA-ME en vez de la ninhidrina, utilizando alanina como patrón, e incluyó un factor de corrección en los cálculos para compensar las diferencias de la respuesta fluorescente de los distintos aminoácidos. Sin embargo, el método no es muy aconsejable, debido a la inestabilidad de los derivados del reactivo OPA-ME .

### III.6.2.- UTILIZACION DEL REACTIVO O-FALDEHIDO-N-ACETIL-L-CISTEINA

Como se puso de manifiesto en el apartado III.4, los aminoácidos reaccionan con el OPA en presencia de NAC a pH 9.5 para formar isoindoles, que presentan una banda de absorción con máximo a 335 nm y sensibilidades similares ( $\epsilon_m = 6830 \pm 360$ ). Los derivados formados presentan una alta estabilidad, por lo que no se requiere un estricto control del tiempo de reacción.

En este apartado proponemos un método espectrofotométrico para la determinación de aminoácidos totales y proteínas con este reactivo. Como referencia se utilizó isoleucina, que tiene un peso molecular y una absorptividad molar intermedios ( $\epsilon = 6740$ ). En el método propuesto se incorporan factores de corrección, que tienen en cuenta las diferencias entre las absorptividades molares de los distintos isoindoles y la recuperación de los aminoácidos tras el proceso de hidrólisis.

1.- Procedimiento de hidrólisis

En tubos de vidrio de 15 cm de longitud y 1 cm de diámetro, previamente limpios con mezcla sulfonítrica, se introduce la proteína sólida o en disolución y el HCl necesario para que su concentración final sea 6 M ( volumen final 1-2 ml ). Los tubos se sellan al vacío y se calientan a 110° C durante 24 h . Para facilitar el proceso de sellado al vacío, se realiza un pequeño estiramiento en la zona media del tubo y se congela la muestra, introduciendo los tubos en un frasco Dewar que contiene una mezcla frigorífica ( CO<sub>2</sub> sólido y acetona ) para evitar las pérdidas de muestra en el proceso de sellado. A continuación se conecta el tubo de hidrólisis a una bomba de vacío y una vez realizado éste, se aplica la llama del soplete sobre el estrechamiento, sellándose así el tubo. Una vez finalizado el proceso de hidrólisis, las muestras se guardan en frigorífico .

Para abrir el tubo de hidrólisis, se calienta su extremo superior, se toca sin ejercer presión con unas pinzas metálicas húmedas, para favorecer la formación de grietas y, por último, se golpea ligeramente esta zona. Se lleva el contenido del mismo hasta un volumen final de 25 ml, aforando con agua. A 10 ml de esta disolución neutralizada previamente con NaOH 1 M , se añaden 10 ml del reactivo OPA-NAC en tampón borato de pH 9.5 y se afora a 25 ml , leyendo la absorbancia a 335 nm frente a un blanco preparado en las mismas condiciones, en ausencia de proteína.

2.- Recuperación de algunos aminoácidos sometidos al tratamiento de hidrólisis

Se realizó una serie de experiencias para averiguar el efecto de las condiciones experimentales utilizadas en la hidrólisis de las proteínas, sobre la recuperación de algunos aminoácidos. Los aminoácidos elegidos fueron aquéllos, que según la bibliografía, se destruyen total o parcialmente, así como otros que se consideran estables.

Para ello se prepararon disoluciones en HCl 6 M de los distintos aminoácidos en concentración 0.1 g/100 ml y se procedió a su hidrólisis tomando 1 ml de la muestra. Los ensayos se realizaron por duplicado o triplicado.

En la Tabla 28 se muestran las recuperaciones obtenidas considerando las absorptividades molares de cada aminoácido incluídas en la Tabla 21. Se observó en todos los casos una buena reproducibilidad tras el proceso de hidrólisis. Las recuperaciones correspondientes a isoleucina, tirosina, glicina, leucina, valina y serina resultaron próximas al 100 % , lo que indica que estos aminoácidos no son afectados por el proceso de hidrólisis. Este proceso sólo afectó de manera importante a la cisteína, siendo menos acusada la destrucción de treonina y triptófano. Durante la hidrólisis, la asparagina y la glutamina se descomponen formando amoníaco y ácido aspártico o glutámico, respectivamente (159) .

Tabla 28. - Análisis de aminoácidos.

Aminoácido	mg introducidos	Recuperación (%)
Isoleucina	1.017	99.1
Tirosina	1.015	102.8
Glicina	1.008	103.8
Leucina	1.005	99.5
Valina	1.015	101.0
Serina	1.011	97.3
Triptófano	1.009	84.0
Treonina	1.004	90.0
Cisteína	1.008	21.0

3.- Cálculo del peso molecular promedio y factores de corrección

Si se conoce la composición de la proteína, se puede calcular la cantidad de la misma (mg) a partir de la siguiente expresión:

$$m = n \times W \times F \quad [36]$$

en donde n representa los mmoles de isoleucina equivalentes a los aminoácidos totales obtenidos en el proceso de hidrólisis; W es el peso molecular promedio de los residuos de los aminoácidos que constituyen la proteína ( el peso de estos residuos varía desde 57 para la glicina hasta 186 para el triptófano). Así, si se conoce la composición de la proteína, y teniendo en cuenta que la prolina no reacciona con el reactivo OPA-NAC, por no ser una amina primaria, se puede calcular W (158) a partir de la expresión:

$$W = \frac{\sum_{i=1}^{19} a_i b_i}{1 - \sum_{i=1}^{19} a_i} \quad [37]$$

donde  $a_i$  es la fracción molar del aminoácido i y  $b_i$  el peso molecular de los residuos de cada aminoácido, que aparecen reflejados en la Tabla 29. El subíndice i representa a los 20 aminoácidos proteicos primarios exceptuando a la prolina.

Por otro lado, F es un factor de corrección que viene dado por:

$$F = \frac{1}{\sum_{i=1}^{19} a_i f_i R_i} \quad [38]$$

donde  $f_i$  tiene en cuenta las diferencias entre las absorptividades molares de los distintos aminoácidos respecto a la isoleucina:

$$f_i = \frac{\epsilon_i}{\epsilon_{ILE}} \quad [39]$$

y  $R_i$  es el factor de recuperación del aminoácido  $i$  tras el proceso de hidrólisis. A la asparagina y glutamina se les asigna los valores de  $f_i$  correspondientes a los ácidos aspártico y glutámico, respectivamente.

Tabla 29. - Peso molecular de los residuos de aminoácidos, absorptividades molares de los derivados de OPA-NAC y cociente de absorptividades respecto a la isoleucina.

Aminoácido		$b_1$	$\epsilon$	$f_1$
Alanina	ALA	71	6830	1.013
Arginina	ARG	154	6480	0.961
Asparagina	ASN	114	6130	1.027
Ac. Aspártico	ASP	115	6920	1.027
Cisteína	CYS	103	2700	0.400
Ac. Glutámico	GLU	129	6910	1.025
Glutamina	GLN	128	6700	1.025
Glicina	GLY	57	7180	1.065
Histidina	HIS	138	6860	1.018
Isoleucina	ILE	113	6750	1.000
Leucina	LEU	113	6860	1.018
Lisina	LYS	128	10740	1.593
Metionina	MET	131	6930	1.028
Fenilalanina	PHE	147	6590	0.978
Serina	SER	87	6980	1.036
Treonina	THR	101	6850	1.016
Triptófano	TRP	186	7830	1.162
Tirosina	TYR	163	6580	0.976
Valina	VAL	99	6780	1.006



### III.6.3.- APLICACION DEL METODO

#### 1.- Análisis de mezclas de aminoácidos

Se prepararon disoluciones de los aminoácidos tirosina, glicina, leucina, valina, isoleucina, triptófano y treonina en concentración 0.1 g/100 ml . Se tomaron distintas cantidades de estas disoluciones para preparar las mezclas deseadas. Por último, se sometió al tratamiento de hidrólisis 1 ml de estas mezclas, siguiendo el procedimiento anteriormente descrito.

Las recuperaciones obtenidas aparecen en la Tabla 30. Los valores mostrados se calcularon según dos procedimientos, que utilizan como referencia a la isoleucina. En el primero, se calculó el peso molecular promedio de la mezcla de aminoácidos,  $W$ , y se multiplicó por los  $\mu$ moles de isoleucina hallados. En el segundo, se introdujo además el factor de corrección  $F$ , que tiene en cuenta las distintas absorptividades de los aminoácidos que componen la mezcla, así como sus recuperaciones. Como se observa, el empleo del factor de corrección,  $F$ , supone una mejora en los resultados, próxima al 5 % .

Tabla 30. - Análisis de mezclas de aminoácidos.

Muestra	mg introducidos	W	F	Recuperación (%)	
				R <sup>a</sup>	R <sup>b</sup>
LEU + GLY	1.0065	95.5	0.954	108.8	103.8
GLY + TYR	1.0115	106.3	0.962	109.0	104.8
GLY+TYR+LEU	0.9084	113.5	0.968	108.4	104.9
TYR+LEU+GLY+ +VAL+ILE+TRP+ +THR	0.9984	114.0	0.974	105.5	102.8

<sup>a</sup>  $m = n \times W$

<sup>b</sup>  $m = n \times W \times F$

## 2.- Determinación de N-amínico en suero y orina

Muchas alteraciones del metabolismo de los aminoácidos se caracterizan por un aumento indiscriminado de la concentración de éstos en orina y/o suero.

Todos los métodos existentes para la determinación de este parámetro hacen uso de un aminoácido de referencia. Ello supone que los diversos  $\alpha$ -aminoácidos reaccionan con el reactivo analítico con sensibilidades iguales, lo que generalmente no ocurre.

El reactivo OPA-ME se ha utilizado para la determinación fluorimétrica de aminoácidos libres en suero y plasma desproteínizado con buenos resultados (LOD = 0.05 mg/l) (161), haciendo uso de norleucina como aminoácido de referencia. Este aminoácido es el utilizado en el procedimiento estándar que emplea ninhidrina (162). Sin embargo, los resultados difieren en función del aminoácido o mezcla de aminoácidos utilizados como referencia. Tsai y col. (163) también describieron un método fluorimétrico con OPA-ME para analizar aminoácidos totales en suero desproteínizado con tricloroacético, consiguiendo un límite de detección de 0.1 nmol de aminoácido y requiriendo tan sólo 5  $\mu$ l de suero sanguíneo. Compuestos como la urea, ácido úrico y creatinina no interfieren el análisis.

En realidad, hasta el momento, el único método que proporciona resultados exactos es el método gasométrico de la ninhidrina de Van Slyke (164). Sin embargo, el procedimiento es lento y actualmente está en desuso.

Un procedimiento espectrofotométrico que haga uso del reactivo OPA-NAC puede resultar muy adecuado para estas determinaciones, debido a que proporciona sensibilidades similares para los diversos aminoácidos. En el procedimiento propuesto se utiliza la isoleucina como aminoácido de referencia y se calcula el contenido en nitrógeno amínico, introduciendo el valor de la absorbancia de la muestra tras derivatizarla con el reactivo OPA-NAC, en la recta de calibrado de la isoleucina, aplicando a continuación las expresiones [40] y [41] para la orina y suero, respectivamente:

$$\text{mg de N-amínico} = n \times 10^3 \times 14 \times V(24 \text{ h})/V(\text{muestra}) \quad [40]$$

$$\text{mg de N-amínico} = n \times 10^3 \times 14 \times 100 \text{ ml}/V(\text{muestra}) \quad [41]$$

donde n corresponde a los moles de isoleucina equivalentes a los aminoácidos totales y 14 es el peso atómico del nitrógeno.

Sin embargo, es aconsejable introducir un factor de corrección F, que tenga en cuenta las pequeñas variaciones de sensibilidad de los distintos aminoácidos al reaccionar con OPA-NAC:

$$F = \frac{\sum_{i=1}^n a_i}{\sum_{i=1}^n a_i f_i} \quad [42]$$

donde  $a_i$  son los moles del aminoácido  $i$  y  $f_i$  la absortividad molar relativa a la isoleucina, que se calcula según la expresión [39] y cuyos valores aparecen reflejadas en la Tabla 29.

Para que el método sea viable, es necesario que este factor no varíe demasiado con la composición de la muestra. Así, a continuación se calcularon los valores máximo y mínimo que puede alcanzar el factor de corrección F.

Para ello se utilizó, en primer lugar, el método Simplex modificado MSM (165). Este método de optimización multivariable permite hallar los valores máximo y mínimo de una función dependiente de una serie de parámetros, que pueden variar en un intervalo conocido. La función a optimizar en este caso es el factor de corrección dado por la ecuación [42], siendo las variables, los contenidos de cada aminoácido en suero y en orina. Los límites de los contenidos máximos y mínimos normales en cada tipo de muestra, expresados como

$\mu\text{mol}/24 \text{ h}$  para la orina y  $\mu\text{mol}/100 \text{ ml}$  para el suero son los indicados en la Tabla 31. Los valores normales de aminoácidos totales expresados como nitrógeno amínico son para el suero 4-6 mg de aminoácidos/ 100 ml y de 175-530 mg de aminoácidos/ 24 h para la orina (166).

El Simplex inicial se obtuvo para un tamaño inicial de 1. El primer vértice se situó en los valores mínimos de las variables, y la región de variables se estandarizó según la modificación propuesta por Morgan y Deming (167). El programa utilizado se basa en el diagrama de flujo propuesto por Nelder y Mead (168), que posteriormente fue descrito por Cela y col. (169). Se realizaron los ciclos necesarios para que el error en la obtención del valor máximo o mínimo de la función fuera inferior al 0.01 % . Los resultados obtenidos fueron:

$F_{\text{max}} = 0.978$  ,  $F_{\text{min}} = 0.824$  ,  $\bar{F} = 0.90 \pm 0.08$  para orina y

$F_{\text{max}} = 0.940$  ,  $F_{\text{min}} = 0.810$  ,  $\bar{F} = 0.88 \pm 0.07$  para suero.

Sin embargo, los valores del factor de corrección  $F$  sólo deben interpretarse como la máxima dispersión que puede aparecer por aplicación del método.

Tabla 31. - Contenido en aminoácidos en orina y suero (166).

Aminoácido	Valores normales	
	$\mu\text{mol}/24 \text{ h}^{\text{a}}$	$\mu\text{mol}/100 \text{ ml}^{\text{b}}$
Alanina	60-800	17-50
Arginina	-	4.6-15
Asparagina	270-700	2.6-8.6
Acido Aspártico	-	1.1-5.4
Cisteína	-	-
Acido Glutámico	50-270	0-12
Glutamina	140-860	42-76
Glicina	160-4200	13-49
Histidina	130-2100	5.6-12
Isoleucina	18-210	3.5-10
Leucina	21-200	6.9-16
Lisina	48-640	9.0-26
Metionina	20-95	1.8-3.9
Fenilalanina	24-190	3.4-12
Prolina	-	-
Serina	160-700	6.1-19
Treonina	85-400	7.5-25
Triptófano	-	-
Tirosina	40-270	3.2-8.7
Valina	14-51	12-33
Taurina	63-2300	3.5-14
Cistina	20-130	3.1-44

<sup>a</sup> Orina.  
<sup>b</sup> Suero.

Por otra parte, se realizó un segundo estudio en el que se supuso una muestra ideal conteniendo todos los aminoácidos mostrados en la Tabla 31 en concentraciones correspondientes a sus valores medios. Se calculó, por un lado, el factor F para esta muestra y a continuación, se calcularon los factores F, asignando a cada uno de los aminoácidos su valor máximo y mínimo y manteniendo para el resto de aminoácidos, el valor medio. El proceso se repitió para cada aminoácido.

Los resultados se muestran en la Tabla 32, encontrando para la orina unos factores F que varían entre 0.931-0.968, siendo el valor medio de  $0.948 \pm 0.005$ , que coincide con el valor de F obtenido con la muestra ideal. Para el suero se encontró una mayor variación en los factores (0.864-0.941), debido a que el número total de moles de los aminoácidos es inferior y a que el contenido de cistina es muy variable. Así, cualquier pequeña variación en este aminoácido, que tiene un f: distinto del resto, afecta en gran medida al resultado final, tal como se muestra en la Tabla 32. El valor medio de F es  $0.90 \pm 0.01$ , correspondiendo asimismo este valor al de la muestra ideal.



Tabla 32. - Valores del factor de corrección para orina y suero, obtenidos asignando a cada uno de los aminoácidos su valor máximo y mínimo, manteniendo el resto de los aminoácidos su valor medio.

Aminoácido	ORINA		SUERO	
	F = 0.949		F = 0.898	
	F <sub>MIN</sub> <sup>a</sup>	F <sub>MAX</sub> <sup>b</sup>	F <sub>MIN</sub> <sup>a</sup>	F <sub>MAX</sub> <sup>b</sup>
Alanina	0.947	0.950	0.893	0.902
Arginina	-	-	0.896	0.900
Asparagina	0.945	0.952	0.896	0.900
Acido Aspártico	-	-	0.898	0.899
Acido Glutámico	0.948	0.949	0.897	0.900
Glutamina	0.947	0.950	0.894	0.902
Glicina	0.952	0.946	0.896	0.900
Histidina	0.944	0.952	0.897	0.899
Isoleucina	0.948	0.949	0.897	0.899
Leucina	0.948	0.949	0.897	0.899
Lisina	0.968	0.931	0.910	0.887
Metionina	0.948	0.949	0.898	0.898
Fenilalanina	0.948	0.949	0.896	0.900
Prolina	-	-	-	-
Serina	0.948	0.949	0.897	0.899
Treonina	0.948	0.949	0.896	0.900
Tirosina	0.947	0.949	0.897	0.899
Valina	0.948	0.949	0.895	0.901
Taurina	0.940	0.955	0.896	0.900
Cistina	0.953	0.944	0.941	0.864
$\bar{F}$	0.948 ± 0.005		0.90 ± 0.01	

<sup>a</sup> Valores F obtenidos con los valores mínimos.  
<sup>b</sup> Valores F obtenidos con los valores máximos.

Como se observa, los valores medios obtenidos por el método Simplex son ligeramente menores. Como en la práctica resulta más conveniente utilizar un factor de carácter general, independiente de la matriz, se eligió el valor  $F = 0.90$ , que es intermedio entre los obtenidos para ambos tipos de muestra. La aceptación de este factor supone, en el peor de los casos, un error que no excede del 7.5%, lo que es plenamente aceptable en la determinación de nitrógeno amínico total en aplicaciones clínicas.

El procedimiento propuesto para el análisis de  $\alpha$ -aminoácidos totales en suero, consistente en añadir a un volumen de muestra del orden de 100  $\mu$ l, reactivo OPA-NAC y lectura de la absorbancia a 335 nm, es rápido y sencillo, siendo fácil de automatizar, lo que puede ser muy apropiado para los laboratorios clínicos. El LOD previsto es de 1-5 mg/l (referido a la isoleucina).

### 3.- Análisis de proteínas

#### a) Sensibilidad y recuperación

El método propuesto se aplicó al análisis de dos proteínas de composición conocida, albúmina de suero bovino (BSA), normalmente utilizada como patrón en el análisis de proteínas, y que presenta una riqueza del 96% , y caseína parcialmente hidrolizada, con una riqueza del 86% . La composición de BSA (170) y caseína (171) (fracciones molares de los aminoácidos que las constituyen) aparece en la Tabla 33. Los valores indicados para la caseína se obtuvieron a partir de las fracciones en peso dadas por el fabricante.

Se prepararon disoluciones de BSA y de caseína, conteniendo la primera 0.2567g /100 ml (correspondientes a 0.2464 g/100 ml de BSA pura) y la segunda 0.2268 g/100 ml (correspondientes a 0.1950 g/100 ml de caseína pura), respectivamente y se tomaron distintas alícuotas que se sometieron al proceso de hidrólisis ácida descrito.

Tabla 33. - Composición de la albúmina de suero bovino y de la caseína.

Aminoácido	BSA (170)	a <sub>1</sub> x 100 <sup>a</sup>	caseína (171)
Alanina	8.13		2.90
Arginina	3.89		3.72
Asparagina	} 9.36 <sup>b</sup>	}	7.20 <sup>b</sup>
Acido Aspártico			
Cisteína	6.18		-
Acido Glutámico	} 13.25 <sup>b</sup>	}	21.60 <sup>b</sup>
Glutamina			
Glicina	2.83		1.63
Histidina	3.00		2.90
Isoleucina	2.30		5.11
Leucina	10.78		8.86
Lisina	9.89		7.90
Metionina	0.71		2.90
Fenilalanina	4.59		4.76
Prolina	4.95		9.41
Serina	4.59		5.81
Treonina	5.65		4.41
Triptófano	0.35		1.16
Tirosina	3.36		3.37
Valina	6.18		6.39

<sup>a</sup> Fracciones molares.

<sup>b</sup> El valor indicado corresponde a la suma de las fracciones molares de los dos aminoácidos.

A partir de los resultados obtenidos con las distintas concentraciones de proteína se ajustaron las rectas de calibrado:

Para BSA:  $A = 0.0067 + 3.514 \times 10^6 C_{BSA}$   $r = 0.9990$

Para caseína:  $A = 0.0062 + 1.283 \times 10^6 C_{caseína}$   $r = 0.9995$

La hidrólisis de las proteínas y consiguiente determinación de los aminoácidos libres con OPA-NAC supone un aumento de la sensibilidad, respecto a la determinación de las proteínas intactas con el mismo reactivo en un factor  $\sim 10$  (ver apartado III.6.3.5. a y b).

En la Tabla 34 se muestran los resultados obtenidos tomando isoleucina como referencia y utilizando, por una parte, el peso molecular promedio, W (procedimiento a), y por otra, el factor WF (procedimiento b). En los dos casos se obtuvieron recuperaciones aceptables, mejorándose en un 5 % cuando se aplica el factor WF.

Tabla 34. - Análisis de proteínas.

Muestra	mg introducidos	W	F	Recuperación (%)	
				R <sup>a</sup>	R <sup>b</sup>
Albúmina de suero bovino	0.386	119.5	1.043	96.6	100.7
	0.676			100.8	105.1
	0.740			94.2	98.1
	0.966			94.8	102.4
	0.979			93.7	97.7
	1.232			89.0	92.8
	1.725			90.0	93.8
	Valor medio:		94.2±4.0	98.7±4.5	
Caseína	0.194	120.4	1.042	96.8	100.9
	0.390			99.8	104.1
	0.585			96.1	100.2
	0.780			94.5	98.6
	0.975			96.7	100.8
	Valor medio:		96.8±1.9	100.9±2.0	

<sup>a</sup> m = n x W  
<sup>b</sup> m = n x W x F

b) Límites de detección y determinación

Se realizó una serie de experiencias con el fin de determinar la cantidad mínima de proteína, que puede determinarse y detectarse mediante el método propuesto. Para ello se hicieron diez hidrólisis independientes de 1 ml de agua y 1 ml de HCl , siguiéndose a continuación el procedimiento habitual.

Los resultados se muestran en la Tabla 35. El límite de detección y determinación según los criterios 3s y 10s fue de  $9.22 \times 10^{-6}$  M (0.62  $\mu\text{g/ml}$ ) y  $3.07 \times 10^{-6}$  M (2.06  $\mu\text{g/ml}$ ) para BSA , y  $2.53 \times 10^{-6}$  M (0.61  $\mu\text{g/ml}$ ) y  $8.4 \times 10^{-6}$  M (2.02  $\mu\text{g/ml}$ ) para la caseína (correspondientes a la hidrólisis de 0.0388 mg y 0.1292 mg de BSA , y 0.0381 y 0.1271 mg de caseína, respectivamente).

Tabla 35. - Límite de detección.

Experiencia nº	A
1	0.001
2	0.002
3	0.005
4	0.023
5	0.002
6	0.008
7	0.003
8	0.007
9	0.033
10	0.018
$\bar{x}$	0.0102
s	0.011

c) Reproducibilidad

Para obtener la reproducibilidad del método, se introdujo en diez tubos de hidrólisis 1 ml de una disolución que contenía 55 mg/100 ml de BSA y HCl 6 M y se sometió a hidrólisis.

Los resultados aparecen en la Tabla 36, indicando que el método presenta una buena reproducibilidad, siendo el coeficiente de variación del 2.4%. Por otra parte, los coeficientes de variación correspondientes a las recuperaciones de distintas cantidades de proteína (Tabla 34) fueron de un 4.5% para BSA y un 2% para la caseína.

Tabla 36. - Reproducibilidad.  
CASA = 55 mg/100 ml (en el tubo de hidrólisis).

Experiencia nº	A
1	0.453
2	0.458
3	0.440
4	0.451
5	0.445
6	0.457
7	0.436
8	0.424
9	0.439
10	0.453
$\bar{x}$	0.446
s	0.011



#### 4.- Generalización del método

Para que el método propuesto sea de aplicación general, es conveniente que exista un factor WF de carácter universal, que permita conocer el contenido en proteínas de una mezcla o de una proteína de composición desconocida.

Para ello, es importante por una parte, que exista una mínima variación del factor F al modificarse la composición de la muestra de proteínas, lo que depende de los coeficientes  $f_i$  [39] (en el caso ideal, el factor F será constante y  $f_i = 1$ ). En este sentido, los procedimientos espectrofotométricos que hacen uso de OPA resultan más ventajosos que los fluorimétricos, puesto que las absorptividades molares presentan menor variabilidad que los rendimientos cuánticos de fluorescencia, al estar menos afectada la absorción por el entorno molecular.

Por otro lado, la distribución de los aminoácidos en las proteínas de distintos organismos es bastante homogénea. Doolittle y col. (172) realizaron un estudio en el que se mostraba la distribución de aminoácidos encontrados en 1081 péptidos y proteínas, listados en el *Atlas of Protein Sequences and Structure* y en 184 péptidos y proteínas recogidas en la *Enciclopedia Newat*. En la Tabla 37 se muestran ambas distribuciones.

Tabla 37. - Distribución de los aminoácidos (172).

Aminoácido	Atlas	a: x 100*	Newat
Glicina	9.09		8.12
Alanina	8.48		7.75
Leucina	7.56		8.75
Serina	7.47		6.16
Lisina	7.12		6.36
Valina	6.57		6.10
Treonina	6.19		5.59
Prolina	5.49		4.96
Acido Glutámico	5.39		6.89
Acido Aspártico	5.16		6.66
Arginina	4.37		5.29
Isoleucina	4.02		5.18
Fenilalanina	4.02		3.98
Asparagina	3.84		4.11
Glutamina	3.50		3.78
Tirosina	3.28		3.48
Cisteína	3.28		2.00
Histidina	2.42		2.30
Metionina	1.60		2.12
Triptófano	1.11		1.45
W	109.3		113.1
F	1.035		1.011
WF	113.1		114.3

\* Fracciones molares.

En la misma tabla se muestra el valor WF para cada distribución, siendo el valor medio,  $WF = 113.7$ . Así, es posible calcular el contenido (mg) de una proteína de composición desconocida o de una mezcla de proteínas, a partir de la expresión:

$$m = n \times 113.7 \quad [43]$$

Horstman (158) aplicó su procedimiento que utiliza ninhidrina como reactivo, al análisis de mezclas de proteínas en membrana de eritrocito, obteniendo recuperaciones próximas al 100 %, mientras que al aplicar a la misma muestra el método de Lowry (173) y el del biuret (174), las recuperaciones fueron tan sólo del 80% y 50%, respectivamente. Sin embargo, el método con ninhidrina posee una serie de inconvenientes: El reactivo es inestable, debe prepararse en atmósfera inerte y almacenarse en la oscuridad; la reacción es lenta y requiere calentamiento a 100°C durante 20 min y además, la absorbancia del blanco es alta. Estos inconvenientes, como hemos demostrado, no los presenta el método aquí propuesto.

Este procedimiento puede aplicarse también al análisis de micromuestras, haciendo uso de capilares (volúmenes de muestra del orden de 15  $\mu$ l), lo que permitiría la determinación de 1-100  $\mu$ g de proteína.

5.- Análisis de aminoácidos libres en proteínas parcialmente hidrolizadas

Los aminoácidos libres presentes en una proteína parcialmente hidrolizada deben determinarse por diferencia entre los resultados obtenidos, al analizar la proteína parcialmente hidrolizada y después de su hidrólisis total, debido a que las proteínas intactas también reaccionan con el reactivo OPA-NAC.

Efectivamente, como se comentó en el apartado III.6.1.1, el OPA reacciona con los grupos  $\epsilon$ -amino de la lisina y con el grupo  $\alpha$ -amino terminal de las proteínas intactas. Church y col. (117) examinaron la absorbancia de derivados proteína-OPA-ME, y obtuvieron una relación lineal de la absorbancia con la concentración de  $\beta$ -lactoglobulina, con una pendiente de  $1 \times 10^5$ . A partir del cociente de las absorptividades molares de la proteína intacta,  $\epsilon_r$  y la de un grupo amino,  $\epsilon_m$ , calcularon el número de grupos amino de la proteína,  $(n_{Lys} + 1)$ , que contribuyen a la absorbancia:

$$(n_{Lys} + 1) = \frac{\epsilon_r}{\epsilon_m} \quad [44]$$

El valor obtenido fue de 16.7 grupos amino por mol de  $\beta$ -lactoglobulina, siendo el valor teórico de 16 grupos amino: un grupo amino terminal y 15 residuos de lisina. Por su parte,

la protombina humana presentó una absorptividad molar de  $1.77 \times 10^5$ , que corresponde a 29.5 grupos amino por mol de proteína, frente al valor teórico para esta proteína de 30 grupos amino: uno terminal y 29 residuos de lisina.

a) Estimación de la absorptividad molar del derivado de una proteína intacta

Para determinar el contenido en aminoácidos libres en una proteína parcialmente hidrolizada, es necesario conocer la absorptividad molar de la proteína intacta con el reactivo OPA-NAC. Sin embargo, en muchos casos, aunque la proteína parcialmente hidrolizada sea soluble, la proteína intacta es poco soluble, incluso en medio ligeramente básico, por lo que no resulta sencillo realizar un calibrado para obtener su absorptividad molar.

No obstante, la absorptividad molar del derivado proteína-OPA-NAC puede calcularse de una forma aproximada, teniendo en cuenta la ecuación [44] :

$$\epsilon_1 = (n_{lys} + 1) \epsilon_M \quad [45]$$

Se puede suponer que la absorptividad molar de los isoindoles formados con los grupos  $\alpha$ - y  $\epsilon$ -amino es semejante a la de los aminoácidos libres, que presentan con OPA-NAC un valor medio de  $\epsilon_M = 6830$ . Por otra parte, el número de grupos de lisina

puede obtenerse multiplicando el número de aminoácidos existentes en un mol de proteína,  $n_o$ , por la fracción molar de lisina en esa proteína,  $alys$ :

$$nlys = n_o \times alys \quad [46]$$

Si no se conociera el valor de  $n_o$ , éste puede calcularse de una forma aproximada, dividiendo la absortividad molar de la proteína totalmente hidrolizada,  $\epsilon_m$ , por la absortividad molar media para cada grupo amino ( $\epsilon_m = 6830$ ):

$$n_o = \frac{\epsilon_m}{\epsilon_m} \quad [47]$$

Para comprobar la validez del método, éste se aplicó a la determinación de la absortividad molar de una proteína soluble en agua, la BSA, comparando el valor estimado con el obtenido experimentalmente.

Se calculó el número de aminoácidos presentes por mol de proteína a partir de la recta de calibrado, obtenida en el apartado III.6.3.3 para la albúmina hidrolizada:

$$A = 0.0067 + 3.514 \times 10^6 C_{BSA} \quad r = 0.999$$

A partir del valor de  $\epsilon_R$ , y aplicando la expresión [47], se obtiene:

$$n_o = \frac{3.514 \times 10^6}{6830} = 514$$

es decir, cada mol de albúmina contiene 514 moles de aminoácidos, de los cuales 50.8 serán de lisina (fracción molar de lisina,  $a_{lys} = 0.0989$ ) (Tabla 33). Así, el valor estimado de la absorptividad molar de la proteína intacta es  $3.470 \times 10^6$  [45].

Para conocer la absorptividad molar de la albúmina intacta se preparó una serie de disoluciones que contenían cantidades variables de BSA y reactivo OPA-NAC en concentración  $2 \times 10^{-3}$  M en medio bórico-borato. La ecuación de la recta obtenida fue:

$$A = 0.04 + 3.363 \times 10^6 C_{BSA} \quad r = 0.9999$$

Como se observa, el valor estimado de  $\epsilon_R$  coincide prácticamente con el obtenido experimentalmente.

b) Determinación del contenido en aminoácidos libres en caseína parcialmente hidrolizada

En este apartado se desarrolla un procedimiento para determinar los aminoácidos libres en una proteína parcialmente hidrolizada, aplicándolo a la determinación de una muestra de caseína.

El número de moles totales de proteína,  $n_T$ , es la suma del número de moles de la proteína intacta,  $n_I$ , y de la proteína hidrolizada,  $n_H$ :

$$n_T = n_I + n_H \quad [48]$$

A su vez, el número de moles de aminoácidos libres se puede calcular multiplicando el número de moles de proteína hidrolizada,  $n_H$ , por el número de aminoácidos existentes por mol de proteína,  $n_a$ :

$$n_{A_{\text{lib}}}} = n_H \times n_a \quad [49]$$

A la absorbancia contribuyen tanto los aminoácidos libres,  $n_{A_{\text{lib}}}}$ , como los grupos  $\alpha$ -amino terminal y  $\epsilon$ -amino de los residuos de lisina de la proteína intacta:

$$A \times V = n_{A_{\text{lib}}}} \times \epsilon_M + n_I \times \epsilon_I \quad [50]$$

donde  $V$  es el volumen de la disolución.



Por último, el número de moles de proteína hidrolizada,  $n_H$ , se obtiene a partir de [48] y [50], llegando a la expresión:

$$n_H = n_T - \frac{A \times V - n_{AM} \times \epsilon_M}{\epsilon_I} \quad [51]$$

y a partir de [49] y [51]:

$$n_{AM} = \frac{n_T - (A \times V / \epsilon_I)}{(1/n_o) - (\epsilon_M / \epsilon_I)} \quad [52]$$

Se comprobó la validez del método propuesto aplicándolo a caseína parcialmente hidrolizada, con una riqueza del 86 % y un contenido en aminoácidos libres del 44.18 %, siendo su peso molecular 24000. El valor de  $n_T$  se obtuvo considerando la riqueza en caseína indicada por el fabricante. Si este valor no se conociera,  $n_T$  podría calcularse a partir de los resultados obtenidos, tras hidrolizar totalmente la proteína y hacerla reaccionar con OPA-NAC, tal como se ha descrito en el apartado III.6.3.3. Por su parte,  $\epsilon_I$  y  $n_o$  se obtuvieron a partir de las ecuaciones [45] y [47], siendo  $a_{1rs} = 0.0790$  y  $\epsilon_H = 1.283 \times 10^6$  (apartado III.6.3.3).

Los valores hallados fueron :

$n_0 = 187.8$  ,  $n_{175} = 15$  ,  $\epsilon_1 = 16 \times 6830 = 1.093 \times 10^5$ . El volumen final de las disoluciones fue de 25 ml .

Los resultados aparecen reflejados en la Tabla 38, mostrando una buena concordancia con los valores declarados, siendo el contenido medio del 42.7 % (CV = 3.0 %).

Tabla 38. - Determinación del contenido en aminoácidos libres en caseína parcialmente hidrolizada.

mg introducidos	$n_{rxn.}$ $\times 10^3$	$n_{Am}$ $\times 10^3$	Riqueza ( % )
0.1952	1.53	0.85	44.5
0.3904	3.06	1.76	42.4
0.5856	4.59	2.65	42.2
0.9761	7.65	4.47	41.6
Valor medio:			42.7 $\pm$ 1.3

El procedimiento puede aplicarse a la determinación de la actividad proteolítica de diversas enzimas. Church y col. (117-118) desarrollaron un procedimiento en el que hicieron uso del reactivo OPA-ME, sin embargo, debido a la inestabilidad de los isoindoles obtenidos, es necesario un estricto control del tiempo de reacción. La gran estabilidad de los derivados de OPA-NAC puede facilitar enormemente estas determinaciones.



III.7.- DETERMINACION DE N-ACETIL-L-CISTEINA EN  
PREPARADOS FARMACEUTICOS CON O-FTALDEHIDO  
E ISOLEUCINA.



### III.7.1.- IMPORTANCIA FARMACOLOGICA

La N-acetil-L-cisteína, generalmente su sal sódica, es un agente mucolítico que se usa junto a otras terapias para reducir la viscosidad de las secreciones pulmonares en la fibrosis cística del páncreas y en otras afecciones, donde se requiere una terapia mucolítica, presentando su mayor actividad en concentraciones del 10-20% a pH 7-9 .

El NAC es un compuesto soluble en 5 partes de agua y en 4 de alcohol, y prácticamente insoluble en cloroformo y éter. El pH de una disolución de NAC al 1% es 2-2.75 y una disolución al 4.58% es isoosmótica con el suero.

Es incompatible con la mayoría de los metales, caucho, oxígeno y sustancias oxidantes, así como con lactobionato de erimicina, fosfato de cleandomicina, hidrocioruro de oxitetraciclina e hidrocioruro de tetraciclina. .

### III.7.2.- METODOS DE ANALISIS

La N-acetil-L-cisteína puede determinarse a través de cualquiera de los grupos funcionales que contiene (carboxilo, acetamida o tiol) o evaluando el nitrógeno por el método Kjeldahl.

En general, los métodos analíticos de determinación de NAC se basan en la reaccionabilidad del grupo tiol. En 1975, Friedman hizo una revisión de estos métodos (175). Los procedimientos analíticos existentes para la determinación del grupo tiol incluyen valoraciones amperométricas, potenciométricas y espectrofotométricas, cromatografía de intercambio iónico, gas-líquido, papel y capa fina.

Los métodos propuestos para el análisis de NAC en productos farmacéuticos se pueden clasificar, atendiendo a la reacción que tiene lugar en :

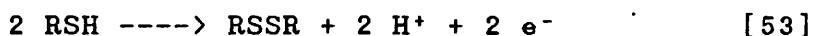
- 1.- Oxidación del grupo tiol
- 2.- Formación de mercapturos metálicos
- 3.- Reacciones con compuestos cromóforos

Sin embargo, en general dichos métodos se han aplicado tan sólo a disoluciones acuosas de NAC.



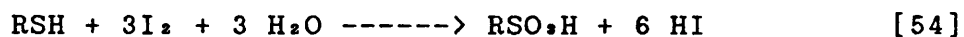
1.- Oxidación del grupo tiol

La oxidación del grupo tiol puede dar lugar a la formación de un disulfuro:



Con oxidantes fuertes puede incluso pasar a S(IV) o S(VI), sin embargo, los procedimientos basados en estas últimas oxidaciones son escasas, ya que son difíciles de controlar y pueden reaccionar también otros grupos reductores.

El iodo se ha propuesto como oxidante en la valoración potenciométrica de NAC (176). Sin embargo, el consumo de iodo puede ser superior al que correspondería a la reacción [53], dependiendo principalmente de la concentración del tiol. Las disoluciones diluídas del tiol tienden a oxidarse a grados de oxidación superiores (177). Motonaka y col. (178) propusieron la siguiente reacción:



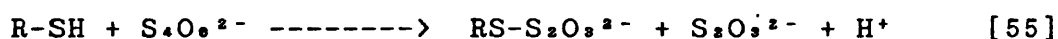
aplicándola a la determinación de NAC en el intervalo ( 0.008-8.6 mg ) y valorando potenciométricamente el ioduro liberado con Ag(I), haciendo uso de un electrodo selectivo de ioduro.

Análogamente, la oxidación del grupo tiol con cloro o bromo da lugar a la formación del correspondiente ácido sulfónico [54]. Aunque la reacción con cloro es unas 50 veces mas rápida que con bromo, en análisis volumétrico se utiliza con preferencia el bromo debido a la mayor facilidad de manejo y estabilidad de sus disoluciones (179).

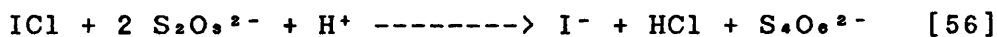
Los problemas derivados de la inestabilidad de las disoluciones de cloro pueden evitarse valorando con cloro electrogenerado. Se ha propuesto un método cloroculombimétrico (180), que utiliza rojo de metilo como indicador, para determinar NAC en estado puro y en fármacos. El método se ve interferido por otras sustancias que reaccionan con cloro (reductores y compuestos insaturados). La valoración con bromo electrogenerado no conduce a resultados satisfactorios debido a la lentitud de la reacción.

Verma (181) evaluó comparativamente el potencial analítico del tetrionato, hierro(III), cistina y ferricianuro como oxidantes en la determinación de tioles, entre ellos NAC. De los cuatro reactivos, el tetrionato fue el mejor oxidante, ya que es de acción rápida y selectiva, incluso en presencia de sustancias que interfieren cuando se utilizan los otros oxidantes, a excepción de sulfuro, sulfito, tiourea y ácido ascórbico.

El tetrionato no reacciona a pH ácidos con el tiol y sin embargo en tampón fosfato, a pH 7, tiene lugar rápida y cuantitativamente la siguiente reacción:

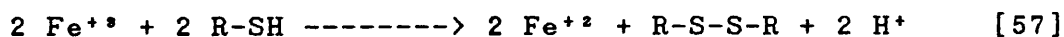


La valoración con iodo del tiosulfato formado puede utilizarse para la determinación cuantitativa del tiol. Sin embargo, debido a que las disoluciones muy diluídas de iodo ( $\sim 5 \times 10^{-3}$  M) son bastante inestables, es preferible utilizar como valorante del tiosulfato formado el monocloruro de iodo, siendo la reacción de valoración:



El punto final se pone de manifiesto por la formación de iodo, que se detecta con almidón.

Otro método basado en el poder reductor del grupo tiol es el propuesto por Raggi y col. (182). La oxidación del tiol con Fe(III) en presencia de 1,10-fenantrolina, da lugar a la formación cuantitativa del complejo tris(1,10-fenantrolina) hierro(II), el cual se mide espectrofotométricamente a 515 nm ( $\epsilon = 10800$  para NAC) después de 20 min .



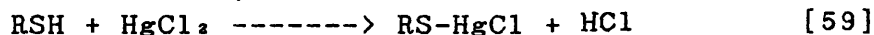
La aplicación del método a disoluciones inyectables de NAC conduce a recuperaciones del 100.1% respecto al valor declarado, con una desviación estándar relativa del 0.6% , no interfiriendo el Na<sub>2</sub>EDTA presente en algunos preparados.

## 2.- Formación de mercapturos metálicos

Las valoraciones con sales de Hg(II) o Ag(I) son la base de la mayoría de los métodos de análisis de los tioles de importancia biológica (183-184).

La reacción de los tioles con las sales mercurícas da lugar a la formación de mercapturos metálicos, e.g. , R-SHgX, (RS)<sub>2</sub>Hg o (RS)<sub>2</sub>Hg<sub>2</sub>. La estequiometría del compuesto formado depende principalmente de la sal mercuríca elegida, ya que si el Hg(II) forma complejos estables con el anión de la sal, éste puede competir con el tiol. También pueden influir razones de tipo estérico asociadas a la interacción de dos grupos tiol con un ion mercurio; en consecuencia, a veces es difícil conocer la estequiometría de la reacción.

Los tioles reaccionan con HgCl<sub>2</sub> según:

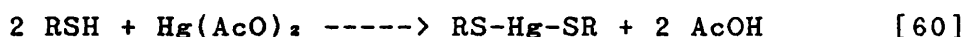


La valoración del ácido formado, utilizando fenolftaleína como indicador, permite la determinación del tiol (185). Para evitar la formación del hidróxido mercúrico, se compleja el exceso de Hg(II) con ioduro. Sin embargo, este método no puede ser aplicado directamente a muestras que contengan otros grupos ácidos (como el NAC), ni ácidos libres, ya que es necesaria la neutralización previa de los mismos. Puesto que todos los tioles son ácidos a la fenolftaleína, no puede neutralizarse previamente la muestra si se utiliza este indicador.

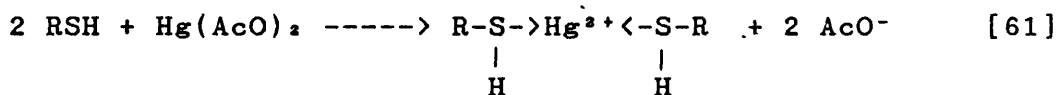
Verma y Gulati (186) modificaron el método anterior utilizando rojo de fenol como indicador, tanto para la valoración final como para la neutralización previa de la muestra, y lo aplicaron a la determinación de NAC. Si en el fármaco existiera sulfuro, se formaría HgS, siendo entonces preferible la detección potenciométrica del punto final.

El método oficial para determinar NAC (187-188) se basa en la valoración potenciométrica directa del grupo tiol con nitrato mercúrico, usando un sistema de electrodos oro-calomelanos. Sin embargo, este método posee algunas ambigüedades, debido a la incertidumbre de la estequiometría del producto formado (189).

Por otro lado, cuando se utiliza acetato mercúrico,  $\text{Hg}(\text{AcO})_2$ , en medio acuoso, tiene lugar la siguiente reacción:



mientras que en medio acético la reacción puede transcurrir sin liberación de protones por parte del grupo tiol:



Dado que ambas reacciones, [60] y [61], pueden coexistir, resulta inviable la determinación del tiol a partir de la valoración del ácido liberado. Billabert y Hammon (190) propusieron la valoración potenciométrica de tioles con  $\text{Hg}(\text{AcO})_2$  en medio acético, utilizando un electrodo de gotas de mercurio como electrodo indicador. Para el NAC la curva potencial vs  $\text{pHg}$  muestra dos saltos diferenciados. El primero corresponde a la formación del compuesto NAC:Hg(II) de estequiometría 2:1 y el segundo, al de estequiometría 1:1. Este último se formaría a través de los grupos tiol y carboxilo de la molécula de NAC. El método se aplicó a la determinación de NAC en disoluciones utilizadas en aerosoles.

Existen otros métodos más elaborados para determinar tioles, basados también en la formación de mercapturos de Hg(II). El ácido o-hidroximercuribenzoico (HMB) ha sido propuesto para la valoración directa de tioles en presencia de ditiofluoresceína como indicador. La ditiofluoresceína y el HMB forman un complejo incoloro, menos estable que el complejo HMB-tiol. Por otra parte, la adición de un exceso de HMB a la muestra, seguido de la adición de ditiofluoresceína y determinación espectrofotométrica (588 nm) del exceso de ditiofluoresceína, permite evaluar el contenido de tiol (191).

Walendziak y Jadcak (192) propusieron la detección selectiva de tioles ionogénicos (ácidos tioglicólico y 2-mercaptopropiónico, NAC y glutatión) después de su separación por electroforesis. La ditiofluoresceína, de color azul, liberada en la reacción del complejo HMB-ditiofluoresceína con tioles, se determinó fotométricamente.

La Ag(I) reacciona también con NAC según:



Vogel (193) determinó NAC en gotas oculares conteniendo hidrocloreuro de policarpina y NAC, mediante valoración potenciométrica con AgNO<sub>3</sub>, utilizando un sistema de electrodos calomelanos/Ag. Los errores cometidos fueron del 10%.

Santi y Peillon (194) aplicaron la reacción con Ag(I) en medio ácido a la determinación de aminoácidos que contienen grupos tiol, en presencia de ácido ascórbico y citrato, midiendo el cambio de potencial entre dos electrodos de Pt a los que se aplicó una corriente constante de 0.7 mA .

Jovanovic y col. (195) determinaron NAC puro y en un fármaco con un error del 1% , mediante valoración potenciométrica con PdCl<sub>2</sub> , formándose un complejo amarillo pálido de estequiometría Pd:NAC 1:2, estable entre pH 2 y 11 . El máximo cambio de potencial se obtuvo a pH 3.4 . El método permite la determinación de NAC en el intervalo 16.3-261 µg/ml con un CV < 1% .

### 3.- Reacciones con compuestos cromóforos

Talley y col. (196) usaron la espectrofotometría UV directa para determinar NAC en disolución. Sin embargo, este método ha sido criticado debido a las interferencias que presenta, especialmente la debida a su producto de degradación N,S-diacetilcisteína (197). El método oficial propuesto (198) para la determinación de NAC como compuesto puro, en disoluciones estériles del mismo y en disoluciones inhaladoras que contienen también isoproterenol, se basa en la separación del compuesto mediante cromatografía líquida y detección UV a 214 nm .



El reactivo de Ellman, ácido 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoico) se ha utilizado en la determinación de NAC como compuesto puro y en disoluciones comerciales al 10 y 20% (189). El método se basa en la medida de la absorbancia a 412 nm del anión del ácido 2-nitro-5-tiobenzoico liberado en la reacción del NAC con el reactivo de Ellman a pH 8. El color se desarrolla en 3 min y la curva de calibrado es lineal entre 1 y 6 µg/ml de NAC. Según comentan los autores del trabajo, el error obtenido, del + 5 % respecto al método oficial de 1975 (187), es debido probablemente a que los efectos de oxidación aérea son más acusados con este último.

El ácido acetilhidroxámico, que se forma en la reacción de NAC con hidroxilamina, da un producto coloreado con Fe(III), cuya medida a 510 nm permite la determinación de NAC entre 50 y 500 µg/ml (199).

Por último, cabe señalar que también se puede determinar NAC (0.1 - 10 µg/ml) fluorimétricamente a través del derivado fluorescente que forma con monobromobimane (200). El método se ha utilizado en estudios farmacocinéticos de NAC, mediante HPLC y detección fluorimétrica del derivado formado.

### III.7.3.- ENSAYOS PREVIOS

#### 1.- Elección de la amina

La reacción de las aminas primarias con OPA y NAC para formar un isoindol con absorción sobre 335 nm , puede también aprovecharse en la determinación espectrofotométrica del tiol.

Existen algunas referencias sobre la aplicación de la reacción OPA-amina-tiol en la determinación de tioles. Nakamura y col. (45) establecieron un procedimiento fluorimétrico para la determinación de tioles, que no incluye a la N-acetil-L-cisteína, y que hace uso de OPA y triptófano como reactivos. El método propuesto consiste en adicionar, con agitación continua, OPA en concentración  $3.2 \times 10^{-5}$  M a la mezcla de reacción conteniendo triptófano  $6.3 \times 10^{-4}$  M , tampón bórico-borato (pH 9.5) y el tiol en el intervalo de concentraciones  $0.63-6.3 \times 10^{-6}$  M (relación molar mínima OPA/tiol de 5).

Se realizaron unos ensayos previos utilizando las condiciones anteriores, ( relación molar triptófano:OPA:NAC 100:5:1), aunque midiendo la absorbancia. Se observó que tanto la disolución de NAC como el blanco presentaban una coloración muy intensa ( de amarillo a rojo ), con valores de absorbancia superiores a 3 . Esto es debido probablemente a la reacción

lateral OPA-aminoácido que ya se ha puesto de manifiesto en el apartado III.3.3.4 , donde se demostró que los aminoácidos reaccionan con el OPA en medio bórico-borato en ausencia de tiol, originando un producto de reacción con una amplia banda de absorción sobre 335 nm . Esta reacción es lenta a temperatura ambiente y se acelera al calentar. La velocidad de la reacción depende del aminoácido implicado.

En la Figura 57 se muestran los espectros del producto de reacción OPA-triptófano, así como el espectro de absorción del isoindol obtenido al adicionar diversas cantidades de NAC. Se observa que la absorbancia del blanco es bastante elevada y que al aumentar la concentración de NAC se produce un corrimiento hipsocrómico del máximo de absorbancia desde 335 a 330 nm.

Con una concentración de triptófano menor se observó, que aunque inicialmente la absorbancia del blanco era inferior, ésta aumentaba con el tiempo. Por otra parte, la absorbancia de las disoluciones que contenían NAC disminuía gradualmente, lo que indica una mayor inestabilidad del isoindol formado en estas condiciones.

La absorptividad molar encontrada para NAC fue del orden de 3000 para concentraciones de OPA y triptófano  $1 \times 10^{-3}$  M y  $2.1 \times 10^{-4}$  M , respectivamente. Las lecturas de absorbancia se tomaron inmediatamente después de mezclados los reactivos.

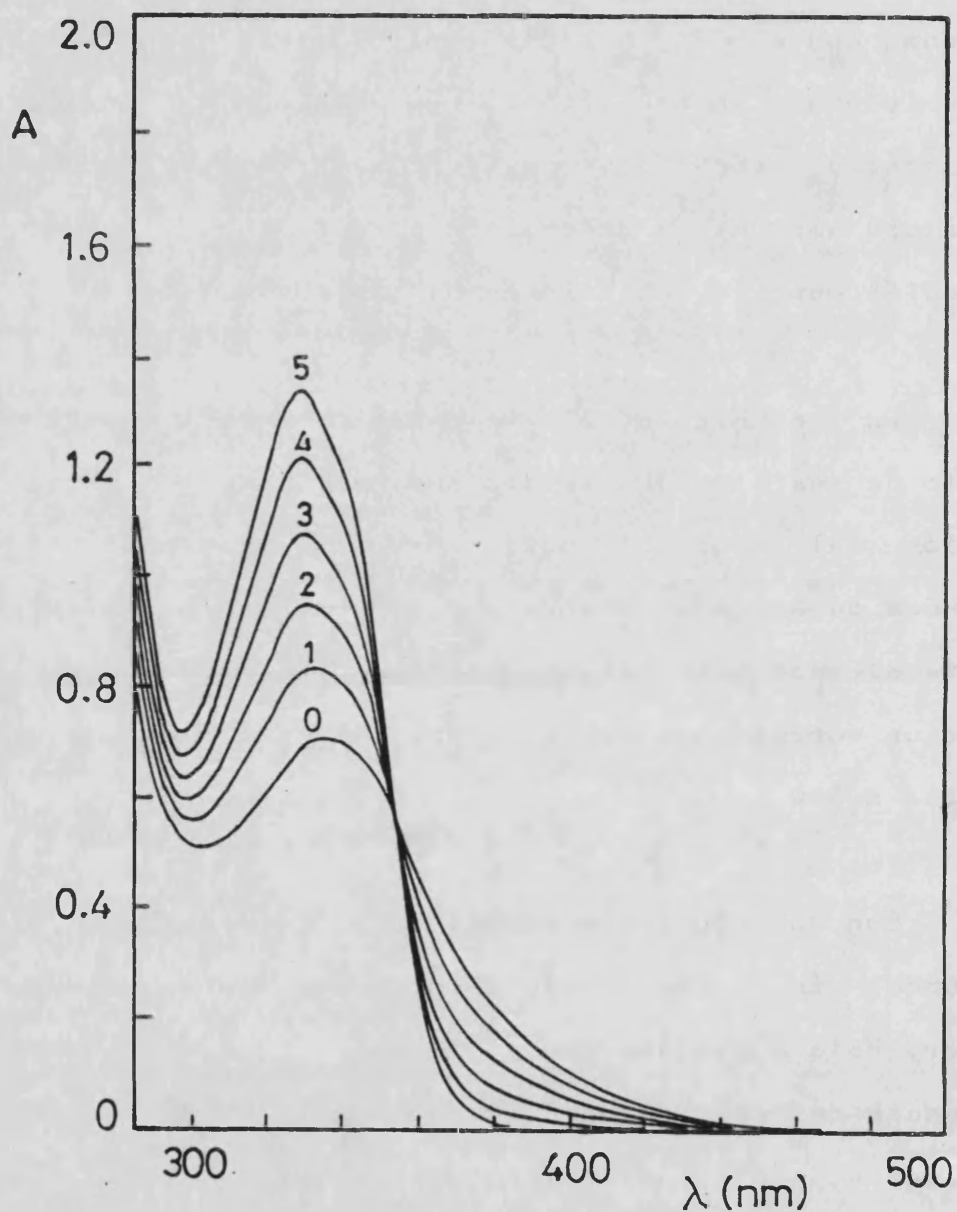


Figura 57. - Espectro de absorción del producto de reacción de OPA-triptófano-NAC.

$C_{\text{triptófano}} = 2.1 \times 10^{-4} \text{ M}$  ;  $C_{\text{OPA}} = 1 \times 10^{-3} \text{ M}$  ;  $C_{\text{NAC}} (\text{M})$ : (0) 0 ;  
(1)  $4.2 \times 10^{-5}$  ; (2)  $8.4 \times 10^{-5}$  ; (3)  $1.26 \times 10^{-4}$  ; (4)  $1.68 \times 10^{-4}$  ;  
(5)  $2.1 \times 10^{-4}$

Por otro lado, en el apartado III.3.3.4 observamos que la isoleucina muestra una reactividad baja con el OPA en ausencia de tiol, si se compara con el resto de aminoácidos, por lo que esta amina puede ser la más apropiada para su utilización como reactivo derivatizante.

En la Figura 58 se pone de manifiesto la escasa reactividad de la isoleucina con OPA para concentraciones  $8 \times 10^{-4}$  M en ambos reactivos (en ausencia de NAC). En la misma figura se muestra el espectro de absorción del isoindol obtenido utilizando isoleucina como amina, que presenta un máximo de absorción a 335 nm. Por otra parte, se observó que la sensibilidad de la reacción es mayor que la obtenida con triptófano ( $\epsilon_{\text{NAC(isoleucina)}} \approx 6000$  y  $\epsilon_{\text{NAC(triptófano)}} \approx 3000$  para OPA  $1 \times 10^{-3}$  M y aminoácido  $1 \times 10^{-3}$  M), probablemente debido, por un lado, a que la reacción lateral OPA-isoleucina en las condiciones utilizadas es despreciable, mientras que la de OPA-triptófano es importante. Por otro lado, la formación del isoindol del triptófano es poco favorable en estas condiciones. Las absorptividades molares correspondientes a los derivados de isoleucina y triptófano con el reactivo OPA-NAC, utilizando disoluciones  $2 \times 10^{-3}$  M de OPA y de NAC, son 6700 y 7800, respectivamente (apartado III.4.3).

Debido a las características apropiadas de la isoleucina, se escogió ésta como amina para la determinación de NAC. A continuación se muestra un estudio de optimización de las concentraciones de los reactivos OPA y amina primaria, junto con la obtención de los parámetros analíticos significativos y su aplicación a muestras farmacológicas.

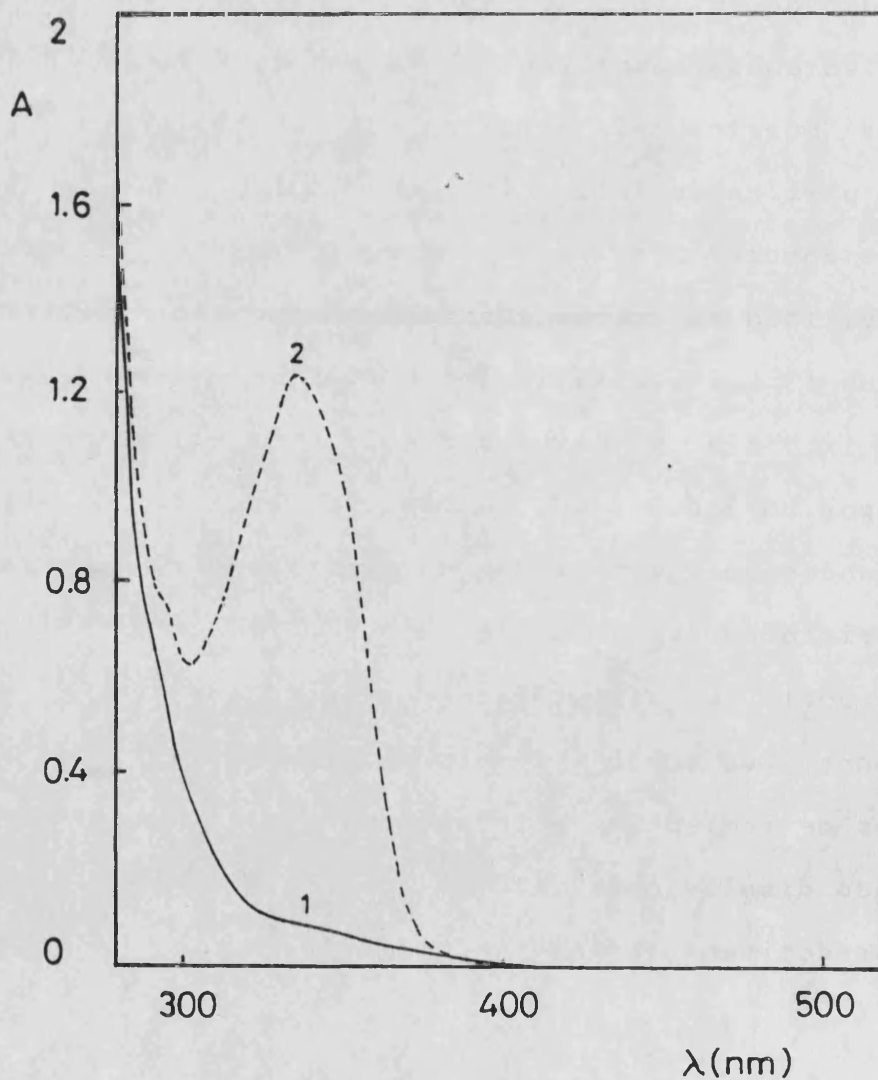


Figura 58. - Espectro de absorción de: (1) Producto de reacción de OPA-isoleucina-NAC ; (2) blanco.

$C_{NAC} = 2.1 \times 10^{-4} \text{ M}$  ;  $C_{OPA} = C_{isoleucina} = 8 \times 10^{-4} \text{ M}$

## 2.- Absorbancia del blanco

La reacción lateral OPA-isoleucina tiene lugar en mayor medida conforme aumenta la concentración de ambos reactivos. En el procedimiento desarrollado, la isoleucina y el OPA deben encontrarse en exceso. Sin embargo, no es conveniente trabajar con concentraciones elevadas de estos reactivos, ya que originarían blancos excesivamente altos. Así, es necesario estudiar la evolución de la absorbancia del blanco al variar la concentración de isoleucina y OPA.

Se preparó una serie de disoluciones que contenían cantidades variables de isoleucina en medio bórico-borato, para dos niveles de concentración de OPA ( $6.1 \times 10^{-3}$  M y  $1 \times 10^{-3}$  M). La absorbancia se leyó a los 10 min de mezclar los reactivos.

En la Tabla 39 se muestran los resultados obtenidos, donde se observa que para una concentración de OPA alta ( $6.1 \times 10^{-3}$  M) se obtienen blancos elevados, incluso en presencia de concentraciones bajas de isoleucina. Por otra parte, una concentración de OPA  $1 \times 10^{-3}$  M es más adecuada, puesto que la absorbancia del blanco es inferior a 0.1 en presencia de concentraciones de isoleucina  $1 \times 10^{-4}$ - $1 \times 10^{-3}$  M.

Tabla 39. - Variación de la absorbancia del blanco.

CILX10 <sup>4</sup> (M)	COPAX10 <sup>3</sup> (M)	A <sub>225</sub>
1.21	6.1	0.139
2.42		0.193
6.06		0.358
12.1		0.617
30.3		1.472
60.6		3.420
1.25	1.0	0.020
5.00		0.025
10.0		0.050
20.0		0.135
50.0		0.495
62.5		0.571
100.0		0.807



### 3.- Estabilidad de las disoluciones

Se preparó una disolución que contenía NAC  $1.36 \times 10^{-4}$  M y OPA e isoleucina, ambos en concentración  $1 \times 10^{-3}$  M, en medio bórico-borato, y se leyó la absorbancia a 335 nm frente a un blanco preparado en ausencia de NAC.

Se estudió también la estabilidad de la disolución del blanco preparada a partir de OPA e isoleucina, en concentraciones  $1 \times 10^{-3}$  M en ambos, en medio bórico-borato, leyendo la absorbancia frente a agua a lo largo del tiempo.

Los resultados aparecen representados en la Figura 59, observándose que si bien inicialmente la absorbancia del blanco es baja (curva 2), ésta aumenta lentamente, por lo que es conveniente preparar simultáneamente el blanco y la muestra.

Por otra parte, las disoluciones del derivado de NAC, OPA e isoleucina son altamente estables. (Figura 59, curva 1), observándose a las 2 h un descenso de la absorbancia de tan sólo un 2%.



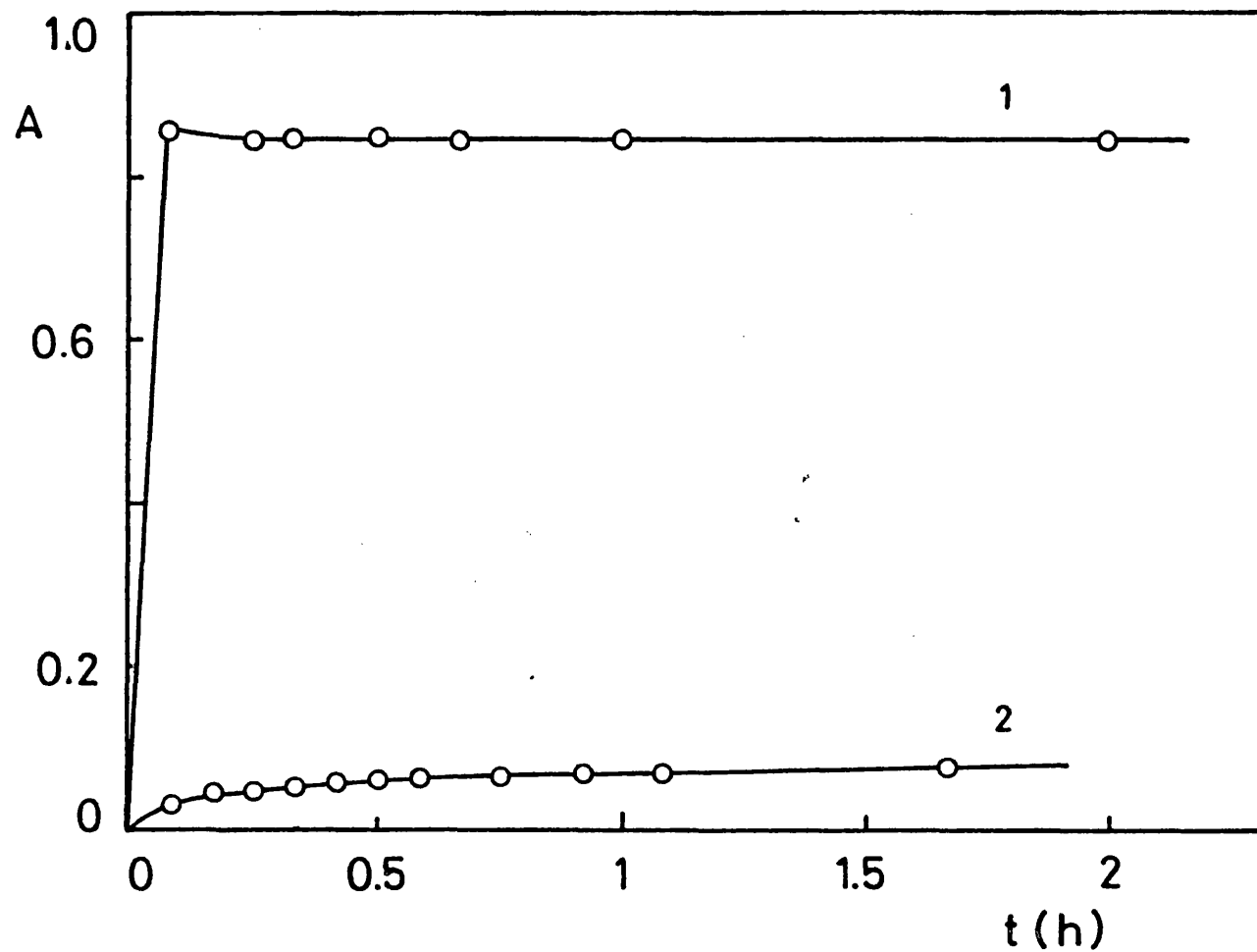


Figura 59. - Estabilidad de las disoluciones de:  
 (1) OPA-isoleucina-NAC ; (2) OPA-isoleucina.

$C_{NAC} = 1.36 \times 10^{-4} \text{ M}$  ;  $C_{OPA} = C_{isoleucina} = 1 \times 10^{-9} \text{ M}$

#### III.7.4.- OPTIMIZACION DE LAS CONDICIONES EXPERIMENTALES

##### 1.- Influencia de la concentración de o-ftaldehido

Se estudió la influencia que tiene la concentración de OPA sobre la reacción del NAC con el reactivo OPA-isoleucina. Para ello se preparó una serie de disoluciones que contenían NAC  $1.36 \times 10^{-4}$  M , isoleucina  $8 \times 10^{-4}$  M y tampón bórico-borato de pH 9.5 , así como cantidades variables de OPA , leyendo la absorbancia a 335 nm frente a blancos preparados en ausencia de NAC y conteniendo cantidades variables de OPA .

Los resultados se muestran en la Figura 60. Se observa que a partir de una relación OPA/NAC = 5 se obtienen lecturas constantes de la absorbancia hasta relaciones OPA/NAC de al menos 25 .

Se escogió para el trabajo posterior una concentración de OPA tal, que la relación molar OPA/NAC se encuentre en el intervalo 5-25 .

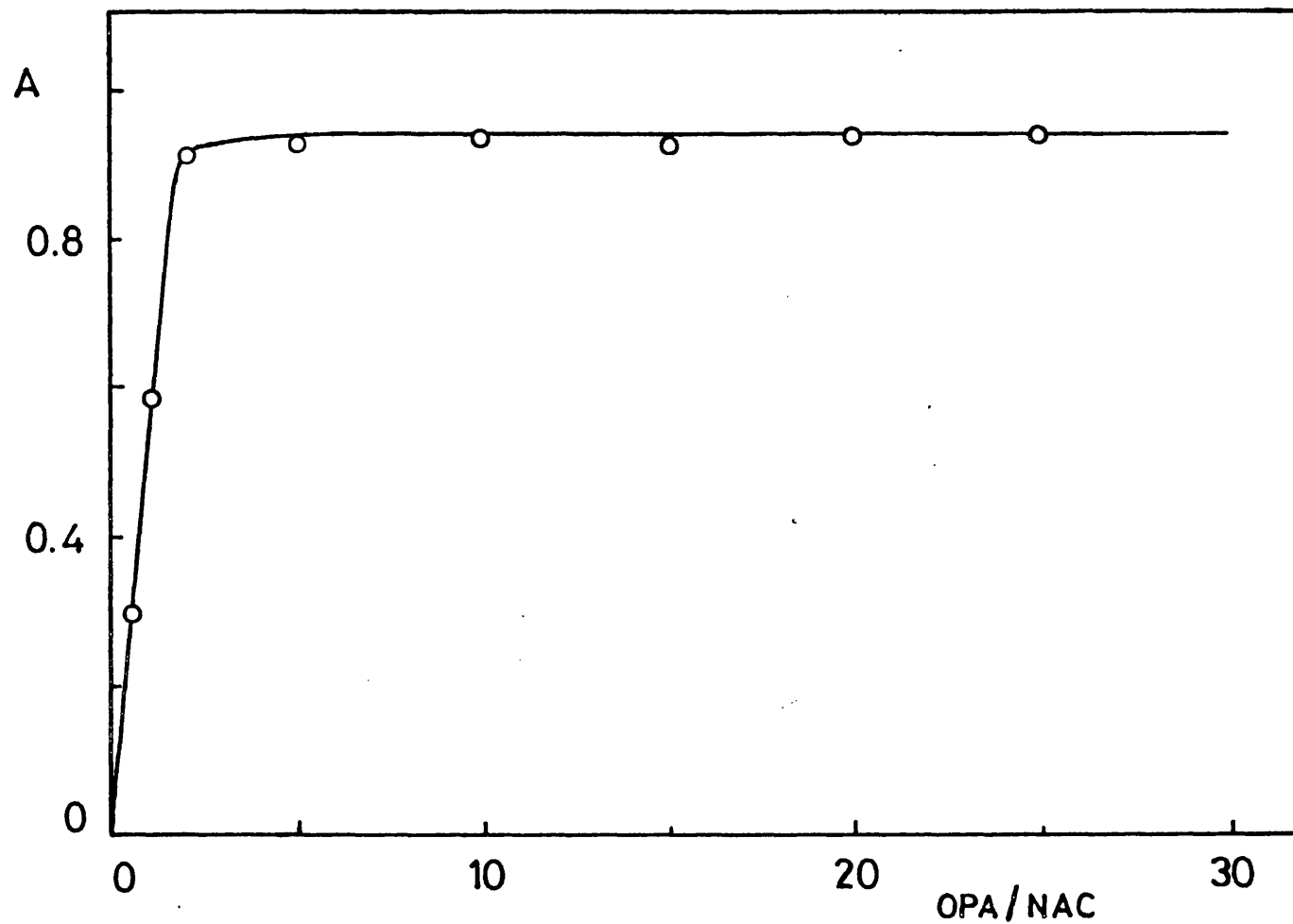


Figura 60. - Influencia de la concentración de OPA sobre la reacción del NAC con el reactivo OPA-isoleucina. En abscisas se representan relaciones molares.

$C_{NAC} = 1.36 \times 10^{-4} \text{ M}$  ;  $C_{isoleucina} = 8 \times 10^{-4} \text{ M}$

2.- Influencia de la concentración de isoleucina

Se estudió la influencia que presenta la concentración de isoleucina sobre la reacción estudiada. Se prepararon disoluciones que contenían NAC  $1.23 \times 10^{-4}$  M , OPA  $9.8 \times 10^{-4}$  M y cantidades variables de isoleucina.

Los resultados aparecen representados en la Figura 61, observándose cómo a partir de una relación isoleucina/NAC de 3 la absorbancia se mantiene constante hasta relaciones de 25. El uso de relaciones superiores ( $\sim 50$ ) origina una disminución de la absorbancia, debido a la reacción lateral existente entre la isoleucina y el OPA.

Para el trabajo posterior se escogió una concentración de isoleucina tal, que la relación isoleucina/NAC se mantenga en el intervalo 3-25 veces.

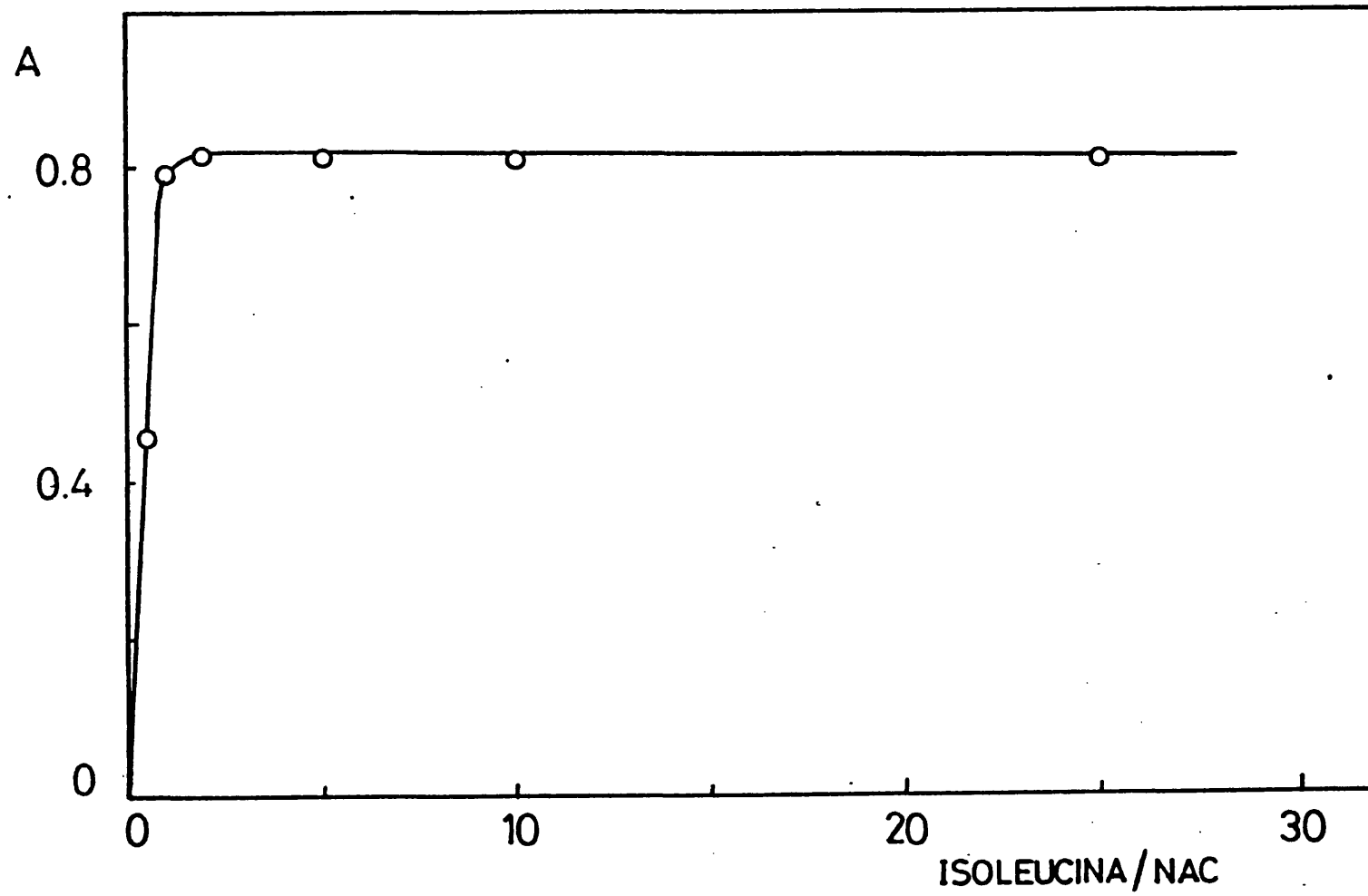


Figura 61. - Influencia de la concentración de amina sobre la reacción del NAC con el reactivo OPA-isoleucina. En abscisas se representan relaciones molares.

$C_{NAC} = 1.23 \times 10^{-4} \text{ M}$  ;  $C_{OPA} = 9.8 \times 10^{-4} \text{ M}$

### III.7.5.- PARAMETROS ANALITICOS SIGNIFICATIVOS

Se obtuvieron los intervalos de linealidad, límites de detección y determinación, y repetitividad, correspondientes a la determinación de NAC con el reactivo OPA-isoleucina.

La curva de calibrado se preparó con disoluciones que contenían tampón bórico-borato de pH 9.5 , OPA  $1 \times 10^{-3}$  M , isoleucina  $1 \times 10^{-3}$  M y cantidades variables de una disolución de NAC  $1.57 \times 10^{-3}$  M .

Asimismo, para determinar la concentración mínima de NAC que puede detectarse y determinarse según el procedimiento propuesto, se prepararon 10 disoluciones del blanco que contenían OPA e isoleucina, ambos en concentración  $1 \times 10^{-3}$  M .

Por último, para obtener la repetitividad del método, se prepararon 10 disoluciones que contenían NAC  $1.26 \times 10^{-4}$  M y OPA e isoleucina, ambos  $1 \times 10^{-3}$  M .

1.- Curva de calibrado

En la Figura 62 se muestra la curva de calibrado para el NAC , observándose que el rango dinámico lineal se extiende hasta una concentración de NAC  $3.0 \times 10^{-4}$  M (49  $\mu\text{g/ml}$ ).

La ecuación de la recta obtenida fue:

$$A_{555} = 0.0032 + 6.26 \times 10^3 C_{\text{NAC}} \quad r = 0.99998$$

2.- Límites de detección y determinación

Los resultados se muestran en la Tabla 40. Los límites de detección y determinación según los criterios 3s y 10s resultaron ser de  $9.1 \times 10^{-7}$  M (0.15  $\mu\text{g/ml}$  de NAC) y  $3.03 \times 10^{-6}$  M (0.49  $\mu\text{g/ml}$  de NAC), respectivamente.



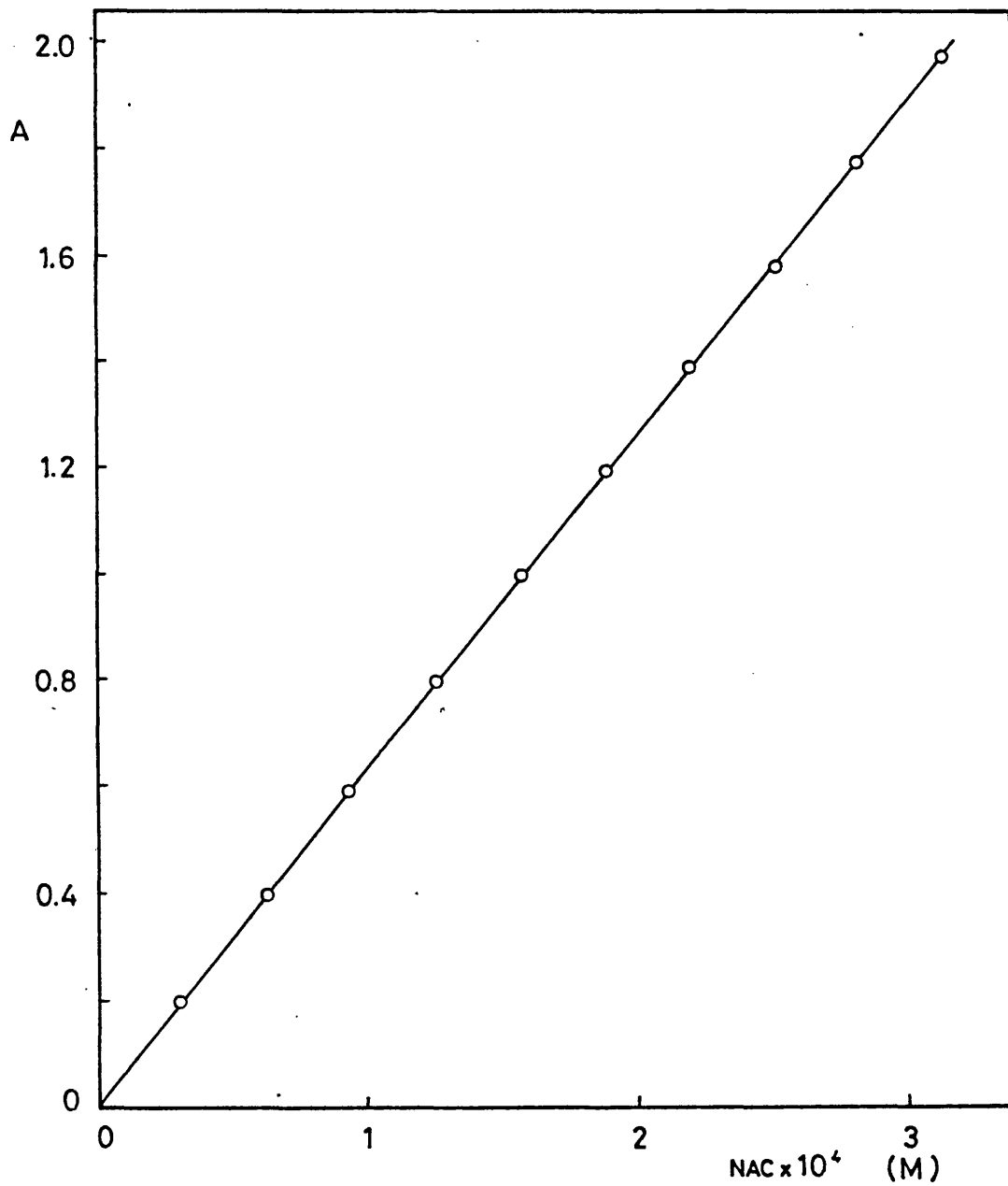


Figura 62. - Gráfica de calibrado.

CoPA = Cisoleucina =  $1 \times 10^{-9}$  M

Tabla 40. - Cálculo del límite de detección.  
Absorbancia de disoluciones de OPA e isoleucina.

---

Experiencia nº	A
1	0.049
2	0.050
3	0.047
4	0.044
5	0.045
6	0.047
7	0.046
8	0.045
9	0.045
10	0.046
$\bar{x}$	0.046
s	$1.90 \times 10^{-3}$ M

---

3.- Repetitividad

En la Tabla 41 se muestran los resultados obtenidos. El método presenta una buena repetitividad. El coeficiente de variación correspondiente a NAC  $1.26 \times 10^{-4}$  M fue del 0.3 %.

Tabla 41. - Repetitividad.

C<sub>NAC</sub> =  $1.26 \times 10^{-4}$  M ; C<sub>OPA</sub> = Cisoleucina =  $1 \times 10^{-9}$  M

Experiencia n°	A
1	0.795
2	0.798
3	0.794
4	0.791
5	0.793
6	0.791
7	0.789
8	0.790
9	0.794
10	0.791
$\bar{x}$	0.793
CV	0.3 %

### III.7.6.- ANALISIS DE N-ACETIL-L-CISTEINA EN DIVERSOS FARMACOS

#### 1.- Descripción y preparación de las disoluciones de los fármacos

Se aplicó el método propuesto a la determinación del contenido en N-acetil-L-cisteína en diversos fármacos. Los medicamentos que se encuentran disponibles en el comercio son:

*Fluimucil oral.* Laboratorio Zambon S.A. Granulado indicado en todos los procesos donde existen secreciones mucosas y mucopurulentas. Cada sobre contiene 200 mg de NAC, 8 mg de sacarina y 4.8 g de excipiente.

*Fluimucil antibiótico.* Laboratorio Zambon S.A. Vial liofilizado que contiene 405 mg de tiamfenicol glicinato acetilcisteinato ( equivalente a 250 mg de tiamfenicol levógiro y a 113 mg de NAC ) y 2 ml de agua bidestilada. El tiamfenicol glicinato acetilcisteinato posee destacadas características antibiótico-mucolíticas y es activo por vía intramuscular, tópica y oral. Está indicado en las afecciones bacterianas respiratorias producidas por gérmenes gram + y -, en las cuales la presencia de fenómenos de mucoestasis complica o hace más lenta la evolución clínica.

*Superpeni mucolítico*. Laboratorios Rousell. Suspensión cuya composición por cada 100 ml es: 5000 mg de amoxicilina (trihidrato), 50 mg de terbutalina sulfato, 150 mg de guayacolgliceriléter, 330 mg de citrato de oxolamina, 250 mg de N-acetil-L-cisteína, 300 mg de sacarina sódica y excipiente. Está indicado para el tratamiento de enfermedades de las vías respiratorias causadas por gérmenes sensibles a la amoxicilina, en las que la abundante secreción bronquial justifica la presencia simultánea de un mucolítico y un expectorante.

*Rinofluimucil*. Laboratorios Zambon S.A. Gotas nasales con un contenido por ml de: 10 mg de N-acetil-L-cisteína estabilizada, 5 mg de tuaminoheptano sulfato, 0.125 mg de benzalconio cloruro y vehículo acuoso. Este medicamento está indicado en la rinitis aguda y subaguda, especialmente con exudados mucopurulentos de lenta resolución, rinitis vasomotoras o alérgicas, sinusitis y reacciones inflamatorias exudativas después de intervenciones quirúrgicas de las cavidades nasales o paranasales.

*Flubiotic 250 mg*. Laboratorio Zambon S.A. Granulado cuya composición por sobre es: 250 mg de amoxicilina trihidrato, 100 mg de N-acetil-L-cisteína, 4 mg de sacarina y 5 g de excipiente. Este medicamento presenta propiedades antibiótico-mucolíticas debidas a la asociación de la amoxicilina, antibiótico de amplio espectro, y a la N-acetil-L-cisteína, mucolítico fluidificante.

Se prepararon las siguientes disoluciones:

Fluimucil: Se disolvió en agua un sobre del preparado, aforando a 200 ml y se diluyó 10 veces.

Fluimucil antibiótico: Se disolvió en agua el contenido del vial liofilizado, y se aforó a 250 ml .

Rinofluimucil: Se tomó 1 ml de las gotas nasales y se aforó a 50 ml con agua.

Superpeni mucolítico: Se disolvió la suspensión en agua y se filtró con placa del nº 2 , aforando a continuación a 500 ml .

Flubiotic: Se disolvió un sobre del preparado en agua y se filtró con placa del nº 1, aforando la disolución resultante a 250 ml .

## 2.- Utilización de métodos comparativos

Para la determinación del contenido en N-acetil-L-cisteína en los distintos preparados, se aplicó además del método aquí propuesto, dos métodos alternativos basados en el poder reductor del grupo tiol presente en la molécula de NAC: Valoración del tiosulfato formado por reacción del NAC con tetrionato (181) y determinación colorimétrica del Fe(II) formado con 1,10-fenantrolina tras la oxidación del tiol con Fe(III) (182). El fundamento de estos métodos se ha detallado en el apartado III.7.2.1, habiéndose utilizado el primero de ellos en varias publicaciones como método de referencia.

### a) Método del tetrionato

Se prepararon las siguientes disoluciones:

Tetrionato 0.025 M, obtenido valorando con iodo 0.05 M tiosulfato 0.05 M. La disolución debe mantenerse en atmósfera de nitrógeno y guardarse en frasco de topacio.

Monocloruro de iodo 0.005 M, preparado añadiendo a una mezcla de iodato  $2 \times 10^{-3}$  M y ioduro potásico  $1 \times 10^{-3}$  M, ácido clorhídrico concentrado de una vez. Tras agitar la disolución, se añadió iodato potásico hasta la desaparición del iodo

formado. Por último, se adicionó ioduro potásico hasta obtener una ligera coloración violeta al agitar una alícuota de esta disolución con  $\text{Cl}_2\text{C}$ . Esta disolución se estandarizó iodimétricamente utilizando una disolución patrón de tiosulfato, que a su vez se normalizó iodimétricamente frente a iodato potásico patrón.

El procedimiento seguido para el análisis de NAC fue: A la disolución que contenía 16-49 mg de NAC se añadió tampón fosfato (pH 7) y 10 ml de la disolución de tetrionato, agitando durante 1 min. A continuación se añadieron 0.5 g de KI, 1 ml de almidón al 0.5% , agua y 3 ml de HCl 0.1 M , valorando el tiosulfato formado con monoclóruo de iodo, hasta la aparición del color azul. Se realizaron también determinaciones en blanco.

En la Tabla 42 se muestran los resultados obtenidos para los distintos medicamentos, expresados como la media aritmética de tres determinaciones, encontrándose en todos los casos factores de recuperación superiores al 100% , incluso cuando se analizó una disolución de NAC patrón. El método presenta una buena precisión, siendo la desviación estándar relativa  $\leq 0.7\%$  .



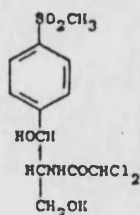
Tabla 42. - Determinación de N-acetil-L-cisteína en fármacos.  
Método del tetratonato.

Fármaco	mg decla- rados	mg obte- nidos	R <sup>a</sup>	CV %
Fluimucil	200	224.0	112	0.53
Fluimucil antibiótico	113	445	-	0.46
Rinofluimucil	10	11.66	117	0.51
Superpeni mucolítico	150	156.7	104.5	0.71
Flubiotic	100	101.1	101	0.57
NAC	490	509	104	0.40

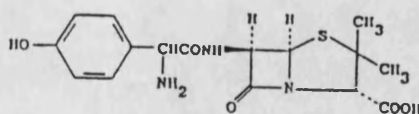
• Factor de recuperación en %.

Cabe destacar sin embargo, el resultado anormalmente alto para el medicamento Fluimucil antibiótico, preparado que contiene además de NAC, tiamfenicol levogiro (LV). Este compuesto presenta en su molécula un ácido sulfínico, capaz de oxidarse a ácido sulfónico, que puede ser la causa del alto error positivo obtenido.

Por otra parte, se obtuvieron puntos finales indefinidos (el viraje del almidón retrocedía) con los medicamentos Superpeni mucolítico y Flubiotic, que presentan en su composición amoxicilina (LVI), antibiótico que posiblemente reacciona con el iodo formado en el punto final. En estos casos se tomó como punto final el volumen correspondiente a la aparición del primer color azul.



LV



LVI

b) Determinación colorimétrica de N-acetil-L-cisteína con Fe(III) y 1,10-fenantrolina

Se prepararon disoluciones de 1,10-fenantrolina del 0.25 % , Fe(III)  $4.8 \times 10^{-3}$  M , tampón acético 0.1 M-acetato 0.3 M , así como NAC  $1.6 \times 10^{-3}$  M . El procedimiento seguido fue: Se añadió sobre la disolución de NAC 5 ml de Fe(III), 2.5 ml de 1,10- fenantrolina y 5 ml de tampón acético-acetato (pH final 4), aforando con agua hasta un volumen final de 25 ml . Al cabo de 20 min se leyó la absorbancia a 515 nm ( $\epsilon = 10800$ ) frente a un blanco preparado en ausencia de tiol.

Se construyó una curva de calibrado en el intervalo de concentraciones  $3 \times 10^{-5}$ - $1.2 \times 10^{-4}$  M de NAC , según el procedimiento descrito. Para calcular el contenido en NAC en los distintos preparados, se realizaron determinaciones por triplicado de cada uno de los medicamentos, tomando 1 ml de sus disoluciones. La ecuación de la recta de calibrado fue:

$$A = 0.0185 + 10755 C_{\text{NAC}}$$

$$r = 0.99995$$

En la Tabla 43 se muestran los resultados obtenidos para los distintos preparados. Se observa que el factor de recuperación oscila entre 94-111 % , presentando el método una buena precisión, con coeficientes de variación inferiores en todos los casos al 1.2% .

Sin embargo, aunque en el procedimiento descrito en la bibliografía se indica que después de 20 min la absorbancia se mantiene inalterada, se observó en el caso de los medicamentos Superpeni mucolítico y Flubiotic un aumento constante de la misma, como se muestra en la Figura 63. Esto puede deberse a la presencia de amoxicilina (LVI) en estos preparados, que probablemente también reduzca al hierro(III) , aunque más lentamente que el tiol. Los datos que aparecen en la Tabla 43 para estos preparados se calcularon leyendo la absorbancia a los 20 min de iniciada la reacción.

Tabla 43. - Determinación de N-acetil-L-cisteína en fármacos. Método del Fe(III)-1,10-fenantrolina.

Fármaco	mg decla- rados	mg obte- nidos	R*	CV %
Fluimucil	200	187	94	1.1
Fluimucil antibiótico	113	111.5	99	0.19
Rinofluimucil	10	11.08	111	0.25
Superpeni mucolítico <sup>b</sup>	150	164	109	1.2
Flubiotic <sup>b</sup>	100	100.1	100	0.62

\* Factor de recuperación en % .

<sup>b</sup> Se leyó la absorbancia a los 20 min de mezclados los reactivos.

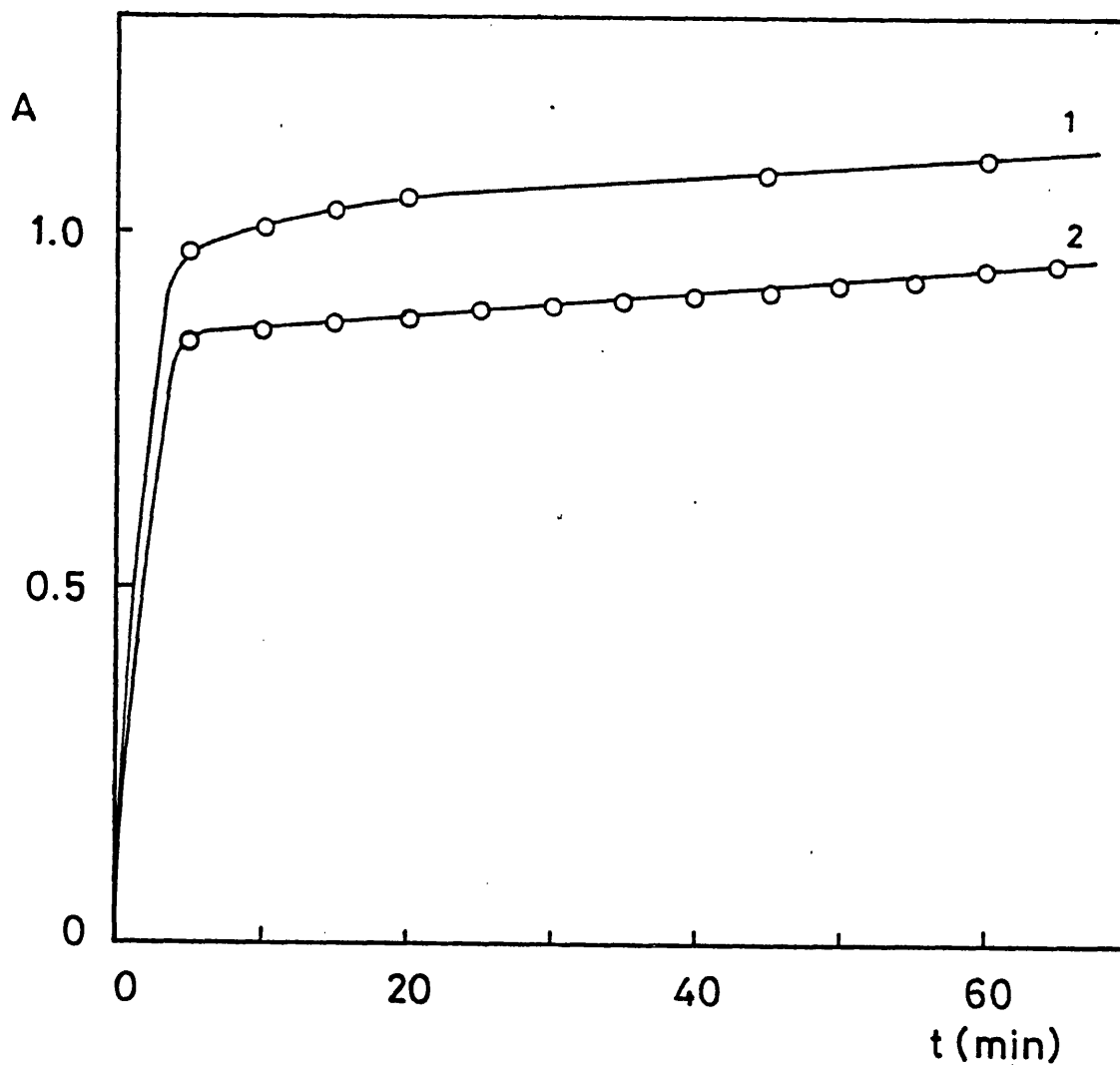


Figura 63. - Variación de la absorbancia a 515 nm con el tiempo para los preparados: (1) Flubiotic y (2) Superpeni mucolítico. Método del Fe(III)-1,10-fenantrolina.

3.- Determinación de N-acetil-L-cisteína con o-ftaldehído e isoleucina

Para la determinación del contenido en NAC en los preparados, se aplicó el método de adición estándar. Para ello se preparó una serie de disoluciones que contenían OPA  $1 \times 10^{-3}$  M , isoleucina  $1 \times 10^{-3}$  M , 1 ml de los distintos medicamentos, tampón bórico-borato (pH 9.5) y cantidades crecientes de una disolución de NAC  $1.58 \times 10^{-3}$  M , leyendo la absorbancia a 335 nm frente a un blanco en ausencia de NAC . Se observó en todos los casos que los componentes que acompañan al NAC en los preparados presentan una absorbancia muy baja ( $<0.01$ ) a la longitud de onda de medida, lo que se comprobó preparando una disolución que contenía 1 ml del fármaco y tampón.

Los resultados aparecen en la Tabla 44 , donde se observa una buena concordancia entre los valores declarados y los obtenidos, con recuperaciones que oscilan entre 98-114 % , presentando el método una buena precisión, con desviaciones estándar relativas inferiores al 1.2% . Por otra parte, los componentes que acompañan al NAC en los medicamentos no interfieren en la determinación, como lo demuestra la exactitud de los resultados obtenidos

Tabla 44. - Determinación de N-acetil-L-cisteína en fármacos.  
Método OPA-isoleucina.

Farmaco	mg decla- rados	mg obte- nidos	R*	CV %
Fluimucil	200	207	103.5	0.78
Fluimucil antibiótico	113	119	106	1.2
Rinofluimucil	10	11.4	114	1.1
Superpeni mucolítico	150	151.9	101	0.38
Flubiotic	100	98.0	98	0.59

\* Factor de recuperación en %.

En la Tabla 45 aparece una comparación de los resultados obtenidos para los fármacos investigados por aplicación de los tres métodos ensayados.

Tabla 45. - Determinación de N-acetil-L-cisteína en fármacos. Comparación de los métodos ensayados.

Fármaco	mg decla- rados	mg <sup>a</sup> obte- nidos	mg <sup>b</sup> obte- nidos	mg <sup>c</sup> obte- nidos
Fluimucil	200	224.0	187	207
Fluimucil antibiótico	113	445	111.5	119
Rinofluimucil	10	11.66	11.08	11.4
Superpeni mucolítico	150	156.7	164	151.9
Flubiotic	100	101.1	100.1	98.0

- <sup>a</sup> Método del tetrionato.
- <sup>b</sup> Método del Fe(III)-1,10-fenantrolina.
- <sup>c</sup> Utilización del reactivo OPA-isoleucina.

Cabe destacar que el contenido en NAC obtenido por los distintos métodos para el medicamento Rinofluimucil, ha resultado siempre superior al declarado por el fabricante, encontrando para el resto una concordancia aceptable, salvo en el caso de los fármacos comentados anteriormente: Fluimucil antibiótico (método del tetrionato) y Superpeni mucolítico y Flubiotic (métodos del tetrionato y del Fe(III)-1,10-fenantrolina) .

Tanto el método del tetrionato, como el colorimétrico, están basados en el carácter reductor del grupo tiol, por lo que los reductores presentes en los medicamentos pueden interferir. Así, el tiamfenicol parece ser una grave interferencia en el método del tetrionato y la amoxicilina en este método y en la determinación con Fe(III) y 1,10-fenantrolina.

Por su parte, el método espectrofotométrico que utiliza OPA e isoleucina, se basa en la formación de un isoindol a partir del tiol, por lo que la única interferencia que cabría esperar son otros tioles, normalmente ausentes en estos preparados. Asimismo, se trata de un método rápido, sencillo y fácil de automatizar, en contraposición con el método volumétrico del tetrionato, que además de los inconvenientes derivados de la propia técnica, presenta la desventaja de la inestabilidad de los reactivos. Por otra parte, como se comentó anteriormente, el método colorimétrico del Fe(III)-1,10 -fenantrolina, aparte de los inconvenientes ya comentados, es un método más lento que el aquí propuesto, que requiere un corto tiempo de análisis.



#### IV. - CONCLUSIONES



ESTUDIOS SOBRE LA FORMACION DE UN PRODUCTO FLUORESCENTE POR REACCION DE LA CISTEINA CON O-FALDEHIDO

A temperatura ambiente, la cisteína no reacciona con el o-ftaldehido en ausencia de otro tiol, sin embargo al calentar se observa la formación de un compuesto fluorescente de gran estabilidad, ( $\lambda_{ex} = 364 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{em} = 424 \text{ nm}$ ) . Esta observación contrasta con la realizada por Mezt y col. (107), que en condiciones experimentales similares obtuvieron en pocos segundos un compuesto fluorescente ( $\lambda_{ex} = 356 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{em} = 438 \text{ nm}$ ), que se descompuso rápidamente.

La temperatura afecta notablemente a la formación del derivado de la cisteína. Los mejores resultados se obtuvieron por calentamiento a  $50^\circ\text{C}$ , siendo sin embargo muy lenta su formación: se obtiene una fluorescencia constante a partir de las  $3-3\frac{1}{2}$  h de calentamiento, que permanece estable al menos durante 3 h . Una temperatura mayor aumenta la velocidad de formación, pero el producto se descompone rápidamente. La fluorescencia es máxima en el intervalo de pH 9.3-10 y con relaciones molares OPA/cisteína mayores de 2000.

El margen dinámico lineal se extiende hasta una concentración de cisteína de  $2.5 \times 10^{-6} \text{ M}$ , con una sensibilidad de  $2.82 \times 10^7$ . El coeficiente de variación, correspondiente a una disolución de cisteína  $9.92 \times 10^{-7} \text{ M}$  fue del 1.9% .

La aplicación del método de Asmus indicó que el derivado obtenido se forma por reacción de un mol de cisteína con un mol de o-ftaldehído, siendo su constante de formación  $\log K \sim 3$ . Otros aminoácidos que no poseen el grupo tiol, no originan productos fluorescentes con o-ftaldehído, en ausencia de un tiol externo, por lo que el grupo tiol de la cisteína debe estar implicado en la reacción. Es muy probable que se forme un isoindol.

Al reaccionar la cistina en concentración menor de  $1-2 \times 10^{-6}$  M con un gran exceso de o-ftaldehído, se produce el derivado de cisteína, sin embargo la reducción de la cistina es sólo parcial y depende en gran medida de las condiciones experimentales. Además, en presencia de grandes excesos de o-ftaldehído parece tener lugar una reacción lateral, que reduce la fluorescencia del derivado.

Al añadir o-ftaldehído sobre una mezcla de cisteína y otros aminoácidos proteicos primarios, se obtiene una intensidad de fluorescencia menor que la producida por la cisteína en su ausencia, lo que indica una inhibición de la formación del isoindol derivado de este aminoácido. Por otra parte, cuando los aminoácidos se añaden después de mezclar la cisteína con el o-ftaldehído, la fluorescencia disminuye en menor medida.

La disminución de la fluorescencia parece no depender tanto de la naturaleza del aminoácido como de su concentración. Al variar la concentración de alanina, la fluorescencia disminuyó linealmente, siendo el valor de la pendiente de la recta de calibrado aproximadamente de  $-3 \times 10^7$ , mientras que la recta de calibrado correspondiente a la cisteína presentó una pendiente positiva de  $\sim 3 \times 10^7$ . Así, por cada mol de alanina añadida, deja formarse un mol de derivado fluorescente de cisteína. Es muy probable que la cisteína reaccione con alanina y o-ftaldehído, actuando como tiol, sin embargo el isoindol formado no es fluorescente.

Los estudios realizados muestran cómo la cisteína, al reaccionar con o-ftaldehído puede actuar como amina, como tiol y a través de ambos grupos simultáneamente.

#### DETERMINACION DE CISTINA CON O-FTALDEHIDO

La cistina reacciona con el o-ftaldehído y mercaptoetanol en medio bórico-borato a pH 9.5, originando un compuesto amarillo con un máximo de absorción a 330 nm. La reacción procede rápidamente a temperatura ambiente, alcanzándose la máxima absorbancia a los 4.5 min de mezclados los reactivos. Sin embargo, el compuesto formado no es muy estable e inmediatamente se descompone.

Al acidificar hasta  $\text{pH} < 1$  las disoluciones del compuesto formado a  $\text{pH} 9.5$ , se modifica la forma del espectro, apareciendo bandas a  $440 \text{ nm}$  y  $510 \text{ nm}$ , y permaneciendo la absorbancia constante durante  $20 \text{ min}$ . Sin embargo, debido a que es necesario un estricto control del tiempo de reacción, la reacción de la cistina con el reactivo o-ftaldehído-mercaptoetanol no es apropiada para el desarrollo de un procedimiento analítico de determinación de cistina.

Por otra parte, se observó que cuando la concentración de cistina es mayor de  $2-3 \times 10^{-6}$ , ésta reacciona con el o-ftaldehído en ausencia de tiol formando un derivado distinto al de la cisteína. El compuesto obtenido en medio bórico-borato presenta una banda de absorción a  $335 \text{ nm}$ . Al aumentar la temperatura se incrementa la velocidad de formación del derivado obtenido en medio básico. A  $60-70^\circ\text{C}$  el compuesto se forma en  $30 \text{ min}$  y una vez enfriadas las disoluciones, la absorbancia se mantiene prácticamente inalterada durante al menos  $24 \text{ h}$ . Es necesaria una concentración de o-ftaldehído al menos  $25$  veces superior a la de cistina para obtener una absorbancia constante, con un valor máximo en el intervalo de  $\text{pH} 9.2-9.7$ .

Al acidificar las disoluciones obtenidas en medio básico, se observa una disminución gradual de la banda a  $335 \text{ nm}$  y la aparición de una banda a  $440 \text{ nm}$ . Asimismo, se observan dos puntos isobésticos hacia  $\text{pH} 6$  ( $\lambda = 355 \text{ nm}$ ) y  $3$  ( $\lambda = 400 \text{ nm}$ ). Al aumentar nuevamente el  $\text{pH}$  se obtiene el espectro del

compuesto formado a pH 9.5 , a diferencia de lo que ocurre con los isoindoles derivados de o-ftaldehído y mercaptoetanol, en los que la adición de un ácido origina la destrucción irreversible del compuesto. La variación del espectro al disminuir el pH corresponde a la protonación del derivado formado en medio básico.

Se obtuvieron los parámetros analíticos significativos correspondientes a los compuestos formados a pH 9.5 y tras su acidificación a pH < 1. En el primer caso ( $\lambda = 335$  nm) se obtuvo un  $\epsilon = 4.54 \times 10^3$  , LOD =  $8.39 \times 10^{-7}$  M y CV = 0.5 % (para cistina  $1.3 \times 10^{-4}$  M). En medio ácido ( $\lambda = 440$  nm) :  $\epsilon = 3.83 \times 10^3$  , LOD =  $5.54 \times 10^{-7}$  M y CV = 1.0 % (para cistina  $1.3 \times 10^{-4}$  M).

A pH 9.5 otros aminoácidos originan bandas de absorción a 335 nm , lo que supone una grave interferencia en la determinación de cistina. En medio ácido la selectividad es mayor pues sólo la cistina muestra la banda a 440 nm, aunque las anchas bandas a 335 nm de los otros aminoácidos llegan a interferir. La mayor interferencia proviene de algunos aminoácidos que absorben a  $\lambda > 440$  nm y de otros que precipitan por encima de una cierta concentración. Así, el procedimiento no es lo suficientemente selectivo para permitir la determinación de cistina en fluidos biológicos, pero es útil tras una separación cromatográfica.

Aunque en presencia de mercaptoetanol la cistina origina con o-ftaldehído un derivado de cisteína, en su ausencia, los productos de reacción de cistina y cisteína son muy distintos, apareciendo un precipitado verde a violeta al acidificar las disoluciones que contienen cisteína.

El método de Asmus indicó que el derivado de cistina se forma por reacción de un mol de cistina con dos moles de o-ftaldehído (constante de formación,  $\log \beta_2 = 7.7$ ). Asimismo, se confirmó la existencia de dos grupos ácidos con  $\log K_1 = 5.88$  y  $\log K_2 = 3.71$  a  $I = 0.1$  y  $20^\circ\text{C}$ , que pueden corresponder a la protonación de dos grupos carboxilo. El producto de reacción es probable que sea una ftalimida en la cual el puente disulfuro de la cistina permanece intacto.



UTILIZACION DE N-ACETIL-L-CISTEÍNA EN LA DETERMINACION DE  
AMINOACIDOS CON O-FTALDEHIDO

El bloqueo del grupo amino de la cisteína origina tioles que pueden ser utilizados en las derivatizaciones con o-ftaldehido. Con N-acetil-L-cisteína se forman isoindoles de gran estabilidad, con un máximo de absorción a 335 nm.

El derivado de isoleucina-N-acetil-L-cisteína presenta la máxima absorción en el intervalo de pH 7.5-11. Asimismo, la absorbancia es constante para relaciones o-ftaldehido /isoleucina y N-acetil-L-cisteína/isoleucina mayores de 5 y 3, respectivamente. En estas condiciones, la reacción transcurre rápidamente a temperatura ambiente y el derivado formado es estable durante al menos una hora.

La absorptividad molar media de los isoindoles de los aminoácidos proteicos primarios formados con o-ftaldehido y N-acetil-L-cisteína es  $\epsilon_m = 6830 \pm 350$ , siendo este valor algo superior que el correspondiente a los derivados de o-ftaldehido y mercaptoetanol.

Se obtuvieron las constantes de velocidad de formación de los isoindoles derivados de o-ftaldehido y N-acetil-L-cisteína con los aminoácidos proteicos primarios, y se compararon con los correspondientes a o-ftaldehido-

mercaptoetanol. En general, el uso de N-acetil-L-cisteína supone una mayor velocidad de formación, aunque para ambos tioles es muy elevada, del orden de unos pocos segundos.

La comparación de las constantes de velocidad de formación indica que la naturaleza del radical  $R_1$ , presente en el C-10, es determinante en la formación de los isoindoles, aumentando su velocidad de formación al incrementarse el carácter dador del sustituyente, lo que se halla de acuerdo con el mecanismo de formación de isoindoles propuesto por Sternson y col. (24). Por otro lado, la sustitución adicional en el carbono adyacente al C-10 disminuye la velocidad de formación de los isoindoles.

No es posible obtener las constantes de velocidad de degradación de los isoindoles derivados de N-acetil-L-cisteína, debido a su gran estabilidad. Sin embargo, se comparó la disminución de la absorbancia a los 60 min de los derivados del mercaptoetanol y de la N-acetil-L-cisteína, observándose un aumento importante de estabilidad en estos últimos, destacando los derivados de glicina e histidina, que son altamente inestables con mercaptoetanol.

Por otro lado, un estudio sobre la degradación de los isoindoles del ácido  $\gamma$ -amino-butírico,  $\beta$ -alanina, glicina, ácido  $\beta$ -amino-butírico y alanina indicó que el factor determinante de la estabilidad es el factor estérico, más que el efecto electrónico ejercido por el grupo carboxilo.

Por último, el gran aumento en la estabilidad de los isoindoles, que supone el empleo de N-acetil-L-cisteína, puede ser debido al mayor volumen del tiol.

Se realizaron también estudios sobre la influencia de la concentración de o-ftaldehído y tiol sobre las velocidades de formación y descomposición de los isoindoles. Se observó que con relaciones o-ftaldehído/aminoácido inferiores a 5, la velocidad de formación es menor. Por otro lado, con una concentración moderada de o-ftaldehído, la velocidad de formación disminuye al aumentar la concentración de mercaptoetanol, lo que puede ser debido a la formación de un compuesto o-ftaldehído-tiol, que inhibe la formación del isoindol. Este efecto no se observó con N-acetil-L-cisteína.

En cuanto a la velocidad de degradación, ésta disminuye al aumentar la concentración de mercaptoetanol, lo que puede ser debido a la inhibición del efecto catalítico del o-ftaldehído sobre la degradación de los isoindoles. Este efecto tampoco se observó con N-acetil-L-cisteína. Por otro lado, no se produjo disminución en la estabilidad de los isoindoles al aumentar la concentración de o-ftaldehído, al menos hasta una relación molar o-ftaldehído/aminoácido de 100.

DETERMINACION DE CISTINA CON O-FTALDEHIDO Y N-ACETIL-L-CISTEINA

La cistina origina con o-ftaldehido y N-acetil-L-cisteína un isoindol suficientemente estable, mientras que con otros tioles la cistina se reduce a cisteína. Sin embargo, el isoindol de cistina-o-ftaldehido-N-acetil-L-cisteína es menos estable que los formados con otros aminoácidos. La máxima absorbancia se alcanza en el intervalo de pH 8-9.5 .

Se observó que, dependiendo de la forma como se mezcle el reactivo o-ftaldehido-N-acetil-L-cisteína con la cistina, se forma un isoindol simple o uno doble. Al adicionar o-ftaldehido-N-acetil-L-cisteína lentamente sobre una disolución de cistina, esperando 5 min después de cada adición para alcanzar una señal estable, se obtiene un valor constante de la absorbancia para una relación molar o-ftaldehido-N-acetil-L-cisteína/cistina de 5, con una absortividad molar aproximada del orden de  $\epsilon = 6400$ , valor que es característico de la formación de un único isoindol. El método de Asmus confirmó la estequiometría 1:1:1 .

Por otro lado, al añadir cistina sobre disoluciones de o-ftaldehido-N-acetil-L-cisteína, también se logra un valor constante de la absorbancia para una relación molar reactivo/ /cistina de 5, pero en esta ocasión el compuesto formado muestra una absortividad del orden de 12000 , característico

de un isoindol doble. Sin embargo, el método de Asmus no proporcionó su estequiometría, probablemente debido a la coexistencia de los isoindoles simple y doble. Ambos compuestos mostraron el mismo espectro de absorción, con máximo a 335 nm.

La cantidad de alcohol presente en la disolución (la disolución de o-ftaldehído es etanólica) influye tanto sobre la velocidad de la reacción como sobre la absorbancia, para proporciones superiores al 10% respecto al volumen total.

Al acidificar el producto de reacción de la cistina con o-ftaldehído-N-acetil-L-cisteína se produce un desplazamiento hipsocrómico del máximo de absorción, hasta 325 nm a pH próximos a 1, acelerándose su descomposición. Alcalinizando de nuevo se vuelve a obtener el compuesto formado a pH 9.5, por lo que el cambio espectral es probablemente debido a la protonación del isoindol. Sin embargo, la gran inestabilidad de este derivado impidió obtener las constantes de protonación del compuesto.

A pesar de que la cistina presenta los mismo máximos de emisión y excitación que el isoindol formado por la isoleucina, su intensidad de fluorescencia es inferior. Sin embargo, el uso del reactivo o-ftaldehído-N-acetil-L-cisteína supone un aumento del 50% de la intensidad de fluorescencia, respecto a la obtenida con o-ftaldehído-mercaptoetanol.

La formación del isoindol de la cistina resulta adecuada para su utilización en la determinación del aminoácido. La absorptividad molar es de 12070, con un límite de detección de  $8.92 \times 10^{-7}$  M y un CV de 0.5% (para cistina  $6.87 \times 10^{-6}$  M).

#### DETERMINACION DE PROTEINAS CON O-FTALDEHIDO Y N-ACETIL-L-CISTEINA

Se propone un método espectrofotométrico para la determinación de aminoácidos totales y proteínas con el reactivo o-ftaldehido-N-acetil-L-cisteína, utilizando como referencia isoleucina, aminoácido que tiene un peso molecular intermedio y que forma un isoindol con una absorptividad molar también intermedia.

Las proteínas se determinan tras su hidrólisis, haciendo reaccionar los aminoácidos liberados con el reactivo o-ftaldehido- N-acetil-L-cisteína. A continuación, la cantidad de proteína existente se halla multiplicando los moles de isoleucina equivalentes a los aminoácidos totales obtenidos en el proceso de hidrólisis,  $n$ , por el peso molecular medio de los residuos de los aminoácidos,  $W$ , e incorporando un factor de

corrección, F, que tiene en cuenta las diferencias entre las absorptividades molares de los distintos isoindoles obtenidos, así como la recuperación de los aminoácidos tras el proceso de hidrólisis:

$$m = n \times W \times F$$

La hidrólisis de las proteínas y consiguiente determinación de los aminoácidos libres con o-ftaldehído y N-acetil-L-cisteína supone un aumento de la sensibilidad, en un factor de 10 , respecto a la determinación de las proteínas intactas con el mismo reactivo.

Las recuperaciones medias obtenidas con albúmina de suero bovino y caseína fueron del 98.7% y 100.9%, respectivamente. La cantidad mínima de proteína que puede detectarse por este procedimiento fue de 0.62  $\mu\text{g/ml}$  para albúmina de suero bovino y de 0.62  $\mu\text{g/ml}$  para caseína (correspondientes a la hidrólisis de 0.0388 mg de albúmina y 0.0381 mg de caseína) (CV = 2 - 4%).

Debido a que la distribución de aminoácidos en las proteínas de distintos organismos es bastante homogénea, es posible proponer un factor WF de carácter universal, que permita conocer el contenido de una mezcla de proteínas o de una proteína de composición desconocida. Para obtener unos resultados óptimos, es conveniente que se produzca una mínima variación del factor F, al modificarse la composición de una

muestra, lo que depende de la relación entre las respuestas de cada aminoácido respecto al aminoácido tomado como referencia. En este sentido, los procedimientos espectrofotométricos, que hacen uso de o-ftaldehído, resultan más ventajosos que los fluorimétricos, puesto que las absortividades molares presentan menor variabilidad que los rendimientos cuánticos de fluorescencia, al estar menos afectada la absorción por el entorno molecular.

Los aminoácidos libres presentes en una proteína parcialmente hidrolizada deben determinarse por diferencia entre el resultado obtenido al analizar la proteína parcialmente hidrolizada, y después de su hidrólisis total, debido a que las proteínas intactas también reaccionan con el reactivo o-ftaldehído-N-acetil-L-cisteína.

Así, para determinar el contenido en aminoácidos libres en una proteína parcialmente hidrolizada, es necesario conocer la absortividad molar de la proteína intacta con el reactivo o-ftaldehído-N-acetil-L-cisteína. Sin embargo, la proteína intacta es a menudo poco soluble, por lo que no resulta sencillo realizar un calibrado para obtener su absortividad molar. No obstante, ésta puede calcularse aproximadamente puesto que la absortividad de la proteína sólo se debe a los grupos  $\epsilon$ -amino de los residuos de lisina y  $\alpha$ -amino terminal, y su absortividad molar es similar a la de los grupos  $\alpha$ -amino libres ( $\epsilon_M = 6830$ ).



El método se aplicó al análisis de caseína parcialmente hidrolizada, obteniéndose un contenido en aminoácidos libres del 42.7% (CV = 3.0%), siendo el declarado por el fabricante del 44.18%.

DETERMINACION DE N-ACETIL-L-CISTEINA EN FARMACOS CON O-FTALDEHIDO E ISOLEUCINA

Se propone un procedimiento espectrofotométrico para determinar N-acetil-L-cisteína, haciendo uso de su reacción con las aminas primarias y o-ftaldehido a pH 9.5 para formar isoindoles. La reacción lateral aminoácido-o-ftaldehido, que origina un producto de reacción con máximo a 335 nm, restringe la elección de la amina. Sin embargo, la isoleucina, que muestra una reactividad baja con o-ftaldehido en ausencia de tiol, resultó apropiada.

La isoleucina y el o-ftaldehido deben utilizarse en exceso respecto a la N-acetil-L-cisteína, sin embargo sus concentraciones no pueden ser excesivas ya que originarían blancos muy elevados. Se observó que concentraciones de o-ftaldehido  $1 \times 10^{-3}$  M y de isoleucina  $1 \times 10^{-4}$ - $1 \times 10^{-3}$  M originan blancos con absorbancias inferiores a 0.1. Sin embargo, la absorbancia del blanco aumenta lentamente, por lo que es conveniente preparar simultáneamente el blanco y la muestra.

Las condiciones óptimas para la determinación de N-acetil-L-cisteína se obtienen con relaciones molares o-ftaldehído/N-acetil-L-cisteína e isoleucina/N-acetil-L-cisteína en los intervalos 5 - 25 y 3 - 25 , respectivamente. El derivado formado es totalmente estable al menos durante 2 h.

El intervalo dinámico lineal se extiende hasta una concentración de N-acetil-L-cisteína de  $3.0 \times 10^{-4}$  M, siendo  $\epsilon = 6.26 \times 10^3$ . El LOD es  $9.1 \times 10^{-7}$  M y el CV del 0.3 % para N-acetil-L-cisteína  $1.26 \times 10^{-4}$  M .

El procedimiento se aplicó con muy buenos resultados a la determinación de N-acetil-L-cisteína en diversos fármacos. Los resultados se compararon con los obtenidos a partir de la valoración del tiosulfato formado por reacción de la N-acetil-L-cisteína con tetrionato (181) y la determinación colorimétrica del Fe(II) formado con 1,10-fenantrolina tras la oxidación del tiol con Fe(III) (182).

En general, los tres procedimientos condujeron a recuperaciones aceptables, siendo los valores obtenidos con Rinofluimucil siempre superiores al declarado por el fabricante. El método del tetrionato originó resultados anormalmente altos con Fluimucil antibiótico, presumiblemente debido a la presencia de tiamfenicol, y los puntos finales fueron indefinidos para Superpeni mucolítico y Flubiotic,

debido probablemente a la amoxicilina presente. Con estos dos últimos fármacos, los valores de absorbancia no llegaron a estabilizarse al aplicar el método del Fe(III)-1,10-fenantrolina.

Por su parte, la única interferencia que cabría esperar con el método espectrofotométrico que utiliza o-ftaldehído e isoleucina son otros tioles, normalmente ausentes en estos preparados. Además, el método es rápido, sencillo y fácil de automatizar.



V. - BIBLIOGRAFIA



- (1) M. Rubenstein, S. Chen-Kiang, S. Stein y S. Udenfriend; Anal. Biochem. 1979, 95 , 117-21.
- (2) K.S. Lee y D.G. Drescher; Int. J. Biochem. 1978, 9 , 457-67.
- (3) D.W. Hill, F.H. Walters, T.D. Wilson y J.D. Stuart; Anal. Chem. 1979, 51 , 1338-41.
- (4) T.P. Davis, C.W. Gehrke, C.W. Gehrke, Jr., T.D. Cunningham, K.C. Kuo, K.O. Gerhardt, H.D. Johnson y C.H. Williams; J. Chromatogr. 1979, 162 , 293-310.
- (5) P. Lindroth y K. Mopper; Anal. Chem. 1979, 51 , 1667-74
- (6) D.L. Hogan, K.L. Kraemer y J.I. Isenberg; Anal. Biochem. 1982, 127 , 17-24.
- (7) C. DeJong, G.J. Hughes, E. Wieringen y K.J. Wilson; J. Chromatogr. 1982, 241 , 345-59.
- (8) J.-Y. Chang, R. Knecht y D.G. Braun; Biochem. J. 1982, 203 , 803-6.
- (9) Y. Watanabe y K. Imai; Anal. Biochem. 1981, 116 , 471-2.
- (10) R.F. Chen, C. Scott y E. Trepman; Biochim. Biophys. Acta 1979, 576 , 440-55.
- (11) S.S. Simons, Jr. y D.F. Johnson; J. Am. Chem. Soc. 1976, 98 , 7098-99.
- (12) S.S. Simons, Jr. y D.F. Johnson; Anal. Biochem. 1977, 82 , 250-4.
- (13) S.S. Simons, Jr. y D.F. Johnson; J. Org. Chem. 1978, 43 , 2886-91.
- (14) J.R. Cronin y P.E. Hare; Anal. Biochem. 1977, 81 , 151.
- (15) S.S. Simons, Jr. y D.F. Johnson; Anal. Biochem. 1978, 90 , 705-25.
- (16) D.J. Reeder, L.T. Sniegowski y R. Schaffer; Anal. Biochem. 1978, 86 , 490.
- (17) B.R. Larsen, D.S. Grosso y S.Y. Chang; J. Chromatogr. Sci. 1980, 18 , 233.
- (18) C. Buteau, L. Duitschaever y G.C. Ashton; J. Chromatogr. 1981, 212 , 23.
- (19) M. Roth; Anal. Chem. 1971, 43 , 880-2.

- (20) S.S. Simons, Jr. y D.F. Johnson; J. Chem. Soc. Chem. Commun. 1977, 11 , 374-5.
- (21) R.C. Simpson, J.E. Spriggle y H. Veening; J. Chromatogr. 1983, 261 , 407-14.
- (22) W.P. Jencks; Prog. Phys. Org. Chem. 1964, 2 , 63-128.
- (23) E.H. Cordes y W.P. Jencks; J. Am. Chem. Soc. 1963, 85 , 2843-48.
- (24) L.A. Sternson, J.F. Stobaugh y A.J. Repta; Anal. Biochem. 1985, 144 , 233-46.
- (25) R.S. McDonald y E.V. Martin; Canad. J. Chem. 1979, 57 , 506-16.
- (26) R. Barnett y W.P. Jencks; J. Am. Chem. Soc. 1967, 89 , 5963-4.
- (27) R. Barnett y W.P. Jencks; J. Am. Chem. Soc. 1969, 91 , 6758-65.
- (28) R.G. Kallen; J. Am. Chem. Soc. 1971, 93 , 6236-48.
- (29) D.F. Veber y W. Luowski; J. Am. Chem. Soc. 1964, 86 , 4152-8.
- (30) M. Roth y A. Hampai; J. Chromatogr. 1973, 83 , 353-6.
- (31) J.R. Benson y P.E. Hare; Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1975, 72 , 619-22.
- (32) M. Roth; J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 1976, 14 , 361-4.
- (33) W.S. Gardner y W.H. Miller, III; Anal. Biochem. 1980, 101 , 61-5.
- (34) B.N. Jones, Pääbo y S. Stein; J. Liq. Chromatogr. 1981, 4 , 565-86.
- (35) J.C. Hodgins; J. Liq. Chromatogr. 1979, 2 , 1047-59.
- (36) L.D. Mell, Jr. , A.R. Dasler y A.B. Gustafson; J. Liq. Chromatogr. 1978, 1 , 261-77.
- (37) M.J. Winspear y A. Oaks; J. Chromatogr. 1983, 270 , 378-80.
- (38) J.F. Stobaugh, A.J. Repta, L.A. Sternson y K.W. Garren; Anal. Biochem. 1983, 135 , 495-504.
- (39) W.A. Jacobs, M.W. Leburg y E.J. Madaj; Anal. Biochem. 1986, 156 , 334-40.



- (40) J.D.H. Cooper, G. Ogden, J. McIntosh y D.C. Turnell; Anal. Biochem. 1984, 142, 98-102.
- (41) V.-J.K. Svedas, I.J. Galaev, I.L. Borisov y I.V. Berezin; Anal. Biochem. 1980, 101, 188-95.
- (42) D.C. Turnell y J.D.H. Cooper; Clin. Chem. 1982, 28, 527-31.
- (43) M. Griffin; S.J. Price y T. Palmer; Clin. Chim. Acta 1982, 125, 89-95.
- (44) E. Trepman y R.F. Chen; Arch. Biochem. Biophys. 1980, 204, 524-32.
- (45) H. Nakamura, A. Matsumoto y Z. Tamura; Anal. Lett. 1982, 15, 1393-1410.
- (46) J.C. Emmett y W. Lwowski; Tetrahedron 1966, 22, 1011.
- (47) R. Bonnett y R.F.C. Brown; J. Chem. Soc. Chem. Commun. 1972, 393.
- (48) R. Kreher y H. Henninge; Tetrahedron Lett. 1973, 1911.
- (49) R. Kreher y K.J. Herd; Tetrahedron Lett. 1976, 1661.
- (50) B. Capon y S.P. McManus; "Neighboring Group Participation", Vol.1, Plenum, New York, 1976.
- (51) R. Bonnet y S.A. North; Adv. Heterocycl. Chem. 1981, 29, 341-399.
- (52) J.K. Kochi y E.A. Singleton; Tetrahedron 1968, 24, 46-9.
- (53) J.D. White y M.E. Mamm; Adv. Heterocycl. Chem. 1969, 10, 113.
- (54) L.J. Kricka y J.M. Vernon; J. Chem. Soc. C. 1971, 2667.
- (55) M. Ahmed, L.K. Kricka y J.M. Vernon; J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1, 1975, 71.
- (56) G. Cignarella, R. Cerri, G. Guisepe y P. Sanna; Gazz. Chim. Ital. 1976, 106, 65-75.
- (57) J.F. Stobaugh, A.J. Repta y L.A. Sternson; J. Org. Chem. 1984, 49, 4306-9.
- (58) J.F. Stobaugh, A.J. Repta y L.A. Sternson; J. Pharm. Biomed. Anal. 1986, 4, 341-51.



- (59) M. Aiura y Y. Kanaoka; Chem. Pharm. Bull. 1975, 23, 2835.
- (60) M. Aiura y Y. Kanaoka; Heterocycles 1973, 1, 237.
- (61) J.D. White y M.E. Mann; Adv. Heterocycl. Chem. 1969, 10, 134-6.
- (62) R. Kreher y H. Henninge; Tetrahedron Lett. 1969, N53, 4695-8.
- (63) O.S. Wong, L.A. Sternson y R.L. Schowen; J. Am. Chem. Soc. 1985, 107, 6421-2.
- (64) R.H.D. Denken, J. Broekhuysen, J. Bechet y A. Mortier; Biochim. Biophys. Acta 1956, 19, 45-52.
- (65) J.P. Danehy y C.J. Noel; J. Am. Chem. Soc. 1960, 82, 2511-15.
- (66) G.E. Lienhard y W.P. Jencks; J. Am. Chem. Soc. 1966, 88, 3982-95.
- (67) R.P. Bell; Adv. Phys. Org. Chem. 1966, 4, 1-29.
- (68) Y. Ogata y A. Kawasaki en "The Chemistry of the Carbonyl Compound", (S. Patai, Ed.), Vol. 2, págs. 1-69. Wiley, New York, 1970 .
- (69) K. Bowden, F.A. El-Kaissi y N.S. Nadvi; J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2, 1979, 642-5.
- (70) L. Reich y S.S. Stivala, "Autoxidation of Hydrocarbons and Polyolefins", págs. 404-8. Marcel Dekker, New York, 1969 .
- (71) J.R. Cronin, S. Pizzarello y W.E. Gandy; Anal. Biochem. 1979, 93, 174-9.
- (72) L.A. Allison, G.S. Mayer y R.E. Shoup; Anal. Chem. 1984, 56, 1089-96.
- (73) R. Rowlett y J. Murphy; Anal. Biochem. 1981, 112, 163-9.
- (74) P. Kucera y H. Umagat; J. Chromatogr. 1983, 255, 563-79.
- (75) T.A. Graser, H.G. Godel, S. Albers, P. Foeldi y P. Fuerst; Anal. Biochem. 1985, 151, 142-52.
- (76) M. Tanaka, H. Oba, T. Ito; Jpn. Kokai Tokkyo Koho JP 61, 187,657 (86,187,657) (Cl.G01N31/00), 21 Ag. 1986, Apl. 85/27,679, 15 Feb. 1985.

- (77) F.H. Walters y K.B. Griffin; Anal. Lett. 1983, 16 , 485-90.
- (78) D.W. Aswad; Anal. Biochem. 1984, 137 , 405-9.
- (79) I. Ishida, M. Fujiwara, T. Kinoshita y N. Nimura; Eur. Pat. Apl. EP138,092 (Cl.G01N33/68), 24 Abr. 1985. JP Apl. 83/193,070 (14 Oct. 1983); 29 págs.
- (80) Shimadzu Corp. Jpn. Kokai Tokyo Koho JP 60 38,652 (85, 38,652) (Cl.G01N31/22), 28 Feb. 1985. Apl. 83/147,079, 11 Ag. 1983; 4 págs.
- (81) J.J. Usher, M.A. Lewis y D.W. Hughes; Anal. Biochem. 1985, 149 , 105-10.
- (82) N. Nimura y T. Kinoshita; J. Chromatogr. 1986, 352 , 169-77.
- (83) R.H. Buck y K. Krumen; J. Chromatogr. 1987, 387 , 255-65.
- (84) M. Fujiwara, Y. Ishida, N. Nimura, A. Toyama y T. Kinoshita; Anal. Biochem. 1987, 166 , 72-8.
- (85) R.H. Buck y K. Krumen; J. Chromatogr. 1984, 315 , 279-85.
- (86) S. Lam; J. Chromatogr. 1986, 355 , 157-64.
- (87) S. Lam y A. Karmen; J. Liq. Chromatogr. 1986, 9 , 291-311.
- (88) H. Heaney, S.V. Ley, A.P. Price y R.P. Sharma; Tetrahedron Lett. 1972, 3067-70.
- (89) P. de Montigny, J.F. Stobaugh, R.S. Givens, R.G. Carlson, K. Srinivasachar, L.A. Sternson y T. Higuchi; Anal. Chem. 1987, 59 , 1096-1101.
- (90) A. Sano, M. Takezawa y S. Takitani; Anal. Sci. 1986, 2 , 491.
- (91) R.G. Carlson, K. Srinivasachar, R.S. Givens y B.K. Matuszewski; J. Org. Chem. 1986, 51 , 3978-83.
- (92) M.C. Roach y M.D. Harmony; Anal. Chem. 1987, 59 , 411-5.
- (93) A. Sano, M. Takezawa y S. Takitani; Talanta 1987, 34 , 743-4.
- (94) H.N. Singh y W.L. Hinze; Analyst (London) 1982, 107 , 1073-80.

- (95) C. Schwabe y J.C. Catlin; Anal. Biochem. 1974, 61 , 302-4.
- (96) A. Himuro, H. Nakamura y Z. Tamura; Anal. Chim. Acta 1983, 147 , 317-24.
- (97) K.S. Lee y D.G. Drescher; J. Biol. Chem. 1979, 254 , 6248-51.
- (98) J.D.H. Cooper y D.C. Turnell; J. Chromatogr. 1982, 227 , 158-61.
- (99) H. Umagat y P. Kucera; J. Chromatogr. 1982, 239 , 463-74.
- (100) P. Böhlen y R. Schroeder; Anal. Biochem. 1982, 126 , 144-52.
- (101) S. Moore y W.H. Stein; en "Methods in Enzymology" (editado por S.P. Colowick y N.O. Kaplan), Vol.6, págs. 819-831. Academic Press, New York, 1963 .
- (102) C.H.W. Hirs, en "Methods in Enzymology" (editado por C.H.W. Hirs), Vol.11, págs. 52-62. Academic Press, New York , 1967 .
- (103) B. Bermúdez, F. Lázaro, M.D. Luque de Castro y M. Varcárcel; Microchem. J. 1987, 35 , 315-20.
- (104) H. Nakamura y Z. Tamura; Anal. Chem. 1981, 53 , 2190-93.
- (105) H. Nakamura y Z. Tamura; Anal. Chem. 1982, 54 , 1951-55.
- (106) K. Mopper y D. Delmas; Anal. Chem. 1984, 56 , 2557-60.
- (107) P.A. Metz, J. Gehas, J.E. Spriggle y H. Veening; J. Chromatogr. 1985, 330 , 307-13.
- (108) P.G. Jocelyn y A. Kamminga; Anal. Biochem. 1970, 37 , 417-21.
- (109) E. Weidekamm, D.F.H. Wallach y R. Fluckiger; Anal. Biochem. 1973, 54 , 102-14.
- (110) C. Atack y M. Linqdvist; Nanunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 1973, 279 , 267-84.
- (111) K.H. Tachiki y M.H. Aprison; Anal. Chem. 1975, 47 , 7-11.
- (112) A.V. Kulikov; Vorpr. Med. Khim. 1982, 28 , 135-9.
- (113) J. Korf y T. Valkenburg-Sikkema; Clin. Chim. Acta 1969, 26 , 301.

- (114) T. Miura, M. Kashiwamura y M. Kimura; Anal. Biochem. 1984, 139 , 432-7.
- (115) D.H. Porter, H.E. Swaisgood y G.L. Catignani; Anal. Biochem. 1982, 123 , 41-8.
- (116) S. Taylor y A.L. Tappel; Anal. Biochem. 1973, 56 , 140.
- (117) F.C. Church, H.E. Swaisgood, D.H. Porter y G.L. Catignani; J. Dairy Sci. 1983, 66 , 1219-27.
- (118) F.C. Church, D.H. Porter, G.L. Catignani y H.E. Swaisgood; Anal. Biochem. 1985, 146 , 343-8.
- (119) P.J. Claes, R. Busson y H. Vanderhaeghe; J. Chromatogr. 1984, 298 , 445-57.
- (120) M.K. Radjai y R.T. Hatch; J. Chromatogr. 1982, 196 , 319-22.
- (121) D. Bernstein; Fresenius Z. Anal. Chem. 1978, 293 , 411-2.
- (122) V. Svedas, I.Yu Galaev y I.V. Berezin; Bioorg. Khim. 1978, 4 , 130-2.
- (123) G. Hihara, H. Miyamae y N. Nagata; Bull. Chem. Soc. Jpn. 1981, 54 , 2668-71.
- (124) E. Asmus; Z. Anal. Chem. 1960, 178 , 104.
- (125) H. Zahn y K. Taumann; Melliand Textilber. 1954, 35 , 1069.
- (126) P. Dubouloz, J. Fondarai y R. Pavone-Marville; Anal. Chim. Acta 1962, 26 , 249.
- (127) R.J. Georges y W.M. Politzer; Clin. Chim. Acta 1970, 30 , 737.
- (128) M. Friedman y A.T. Noma; Text. Res. J. 1970, 40 , 1073.
- (129) J.F. Cavins, L.H. Krull, M. Friedman, D.E. Gibbs y G.E. Inglett; J. Agric. Food Chem. 1972, 20 , 1124.
- (130) P. Felker y G. Waines; Anal. Biochem. 1978, 87 , 641.
- (131) G. Gundlach, G. Hoppe-Seyler y H.J. Backes; Z. Klin. Chem. Klin. 1974, 12 , 578.
- (132) F. Holz; Landwirtsch. Forsch. 1981, 34 , 35.
- (133) S. Ohmiri, M. Ikeda, H. Hattori, K. Hagiwara y C. Iwase; J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 1983, 21 , 851.

- (134) W. Berg, O. Kilian, P. Brunding y G. Peck; Z. Urol. Nephrol. 1986, 79 , 373.
- (135) S.C. Datta; J. Agric. Food Chem. 1974, 22 , 867.
- (136) R. Yamamoto, T. Suzuki y H. Tateda; J. Nutri. Sci. Vitaminol 1981, 27 , 455.
- (137) N.V. Anikina y M.E. Pudel; Khim-Farm. Zh. 1983, 17 , 244.
- (138) W. Zimmerman; Z. Physiol. Chem. 1930, 198 , 4-6.
- (139) G. Klein y H. Linser; Z. Physiol. Chem. 1932, 205 , 251-8.
- (140) A.R. Patton; J. Biol. Chem. 1935, 108 , 267-72.
- (141) A.R. Patton y E.M. Foreman; Science 1949, 109 , 339-40.
- (142) G. Curzon y J. Giltrow; Nature 1954, 173 , 314-5.
- (143) H. Wachsmuth, R. Denissen y L. von Koeckhoven; J. Pharm. Belg. 1959, 14 , 386-91.
- (144) G. Ramis Ramos, M.C. García Álvarez-Coque, R.M. Villanueva Camañas y C. Mongay Fernández; Mikrochim. Acta 1986 I, 115-21.
- (145) C. Mongay, G. Ramis y M.C. García; Spectrochim. Acta 1982, 38A , 247-52.
- (146) T. Dominh, A.L. Johnson, J.E. Jones y P.P. Senise, Jr.; J. Org. Chem. 1977, 42 , 4217-21.
- (147) C.H. Bamford y C.F.H. Tipper (editores); "Comprehensive Chemical Kinetics", Vol. 1, págs. 389-90. Elsevier, Amsterdam, 1969 .
- (148) T.M. Joys y H. Kim ; Anal. Biochem. 1979, 94 , 371-7.
- (149) C.C. Goodno, H.E. Swaisgood y G.L. Catignani; Anal. Biochem. 1981, 115 , 203-11.
- (150) J.W. Viets, W.M. Deen, J.L. Troy y B.M. Brenner; Anal. Biochem. 1978, 88 , 513-21.
- (151) S.A. Robrish, C. Kemp y W.H. Bowen; Anal. Biochem. 1978, 84 , 196-204.
- (152) E.C. Butcher y O.H. Lowry; Anal. Biochem. 1976, 76 , 502-23.
- (153) E. Mendez y J.G. Gavilanes; Anal. Biochem. 1976, 72 , 473-9.

- (154) C.Y. Lai; en *Methods in Enzymology* (editado por C.H. Hirs y S.N. Timasheff), Vol. 47, págs. 236-43, Parte E. Academic Press, New York, 1977.
- (155) M. Friedman y J.W. Finley; *J. Agricol. Food Chem.* 1971, 19, 626-31.
- (156) H.M. Munro y A. Fleck; en *Methods of Biochemical Analysis* (editado por D. Glick), Vol. 14, págs. 113-76. Interscience, New York, 1966.
- (157) R.L. Hill; en *Advances in Protein Chemistry* (editado por C.B. Anfinsen, Jr., M.L. Anson, J.T. Edsall y F.M. Richards), Vol. 20, págs. 37-107. Academic Press, New York, 1965.
- (158) H.J. Horstmann; *Anal. Biochem.* 1979, 96, 130.
- (159) S. Moore y W.H. Stein; *J. Biol. Chem.* 1954, 211, 907-13.
- (160) G.L. Peterson; *Methods in Enzymology* 1983, 91, 95-119.
- (161) B. Klein y F. Standaert; *Clin. Chem.* 1976, 22, 413-6.
- (162) National Committee for Clinical Laboratory Standards, Standardized Protein Solution (Bovine serum albumin) Approved Standard: ACC-1, October, 1972.
- (163) C.H. Tsai, Y.H. Chi, C.J. Chao, T.M. Rong y Y.C. Chen; *Sheng Wu Hua Hsueh Yu Sheng Wu Wu Li Hsueh Pao* 1979, 11, 51-6.
- (164) R.J. Henry, D.C. Cannon y J.W. Winkelman; "Química Clínica. Bases y Técnicas". Editorial Jims, Barcelona, 1980.
- (165) L.A. Yarbrow y S.M. Deming; *Anal. Chim. Acta* 1973, 73, 391.
- (166) E. Merck; "Clinical Laboratory, 11th edition of Medico-Chemical Investigation Methods". Darmstadt, Federal Republic of Germany, 1974.
- (167) S.L. Morgan y S.N. Deming; *Anal. Chem.* 1974, 46, 1170.
- (168) J.A. Nelder y R. Mead; *Comput. J.* 1965, 7, 308.
- (169) R. Cela y J.A. Pérez Bustamente, *Quím. Anal.* 1984, 111, 87.
- (170) Peters and Hawn; *J. Biol. Chem.* 1967, 242, 1566.
- (171) Catálogo de Fluka, Chemika-Biochemika, 1986-87.

- (172) R.F. Doolittle; Science 1981, 214 , 149-59.
- (173) O.H. Lowry, H.I. Rosebrough, A.L. Farr y R.I. Randall; J. Biol. Chem. 1951, 193 , 295-75.
- (174) C.R. Noller, "Química Orgánica"; 3ª edición. Interamericana, México, 1968.
- (175) M. Friedman; The Chemistry and Biochemistry of the Sulfhydryl Group in Amino Acids and Proteins. Pergamon Press, New York, 1973.
- (176) R. Franquesa; Rev. Real Acad. Farm. 1970, 2 , 17-35.
- (177) J.P. Danehy, C.P. Egan y J. Switalski; J. Org. Chem. 1971, 36 , 2530.
- (178) J. Motonaka, S. Ikeda y N. Tanaka; Bunseki Kagaku 1981, 31 , 669-74.
- (179) S. Siggia y R.L. Edsberg; Anal. Chem. 1948, 20 , 938.
- (180) K. Nikolic, K. Velasevic y T. Jovanovic; Pharmazie 1987, 42 , 134.
- (181) K.K. Verma; Talanta 1979, 26 , 277-82.
- (182) M.A. Raggi, V. Cavrini y A.M. di Pietra; J. Pharm. Sci. 1982, 71 , 1384-6.
- (183) M. Wronski; Chem. Listy. 1965, 59 , 1079.
- (184) I.M. Kolthoff y J. Eisenstädter; Anal. Chim. Acta 1961, 24 , 83.
- (185) K.K. Tiwari y R.M. Verma; Talanta 1981, 28 , 397-98.
- (186) K.K. Verma y A.K. Gulati; Anal. Chem. 1982, 54 , 2633-35.
- (187) Anon: The National Formulary, 14ª ed. págs. 22-23. American Pharmaceutical Association, Washington D.C., 1975.
- (188) The United States Pharmacopeia, 20ª ed. pág. 17. U.S. Pharmacopeial Convention Rockville, Md, 1979.
- (189) B.S.R. Murty, J.N. Kapoor y M.W. Kim; Am. J. Hosp. Pharm. 1977, 34 , 305-6.
- (190) A. Billabert y M. Hammon; Analisis 1977, 5 , 29-33.
- (191) M. Wronski; Biochem. J. 1967, 104 , 978-86.



- (192) L. Walendziak y J. Jadczyk; J. Chromatogr. 1985, 331 , 193-9.
- (193) E. Vogel; Pharm. Prax. 1986, 41 , 257-60.
- (194) N. Santi y E. Peillon; Ann. Pharm. Fr. 1968, 26 , 177-8.
- (195) T. Jovanovic, B. Stankovic y A. Stefanovic; Pharmazie 1987, 42 , 136-7.
- (196) J.R. Talley, R.A. Magarian y E.B. Sommers; Am. J. Hosp. Pharm. 1973, 30 , 526-30.
- (197) R.J. Bequette; Am. J. Hosp. Pharm. 1975, 32 , 460.
- (198) The United States Pharmacopeia, 21<sup>a</sup> ed. , pág. 19. U.S. Pharmacopeial Convention, Rockville, Md, 1985.
- (199) R. Valerio y G.C. Ceschel; Boll. Chim. Farm. 1966, 105 , 675-81.
- (200) I.A. Cotgreave y P. Moldeus; Biopharm. Drug. Dispos. 1987, 8 , 365-75.

Reunido el Tribunal que suscribe, en el día de la fecha, acordó otorgar, por unanimidad, a esta Tesis doctoral de D.<sup>a</sup> M. José Medina Hernández

la calificación de Apto cum laude

Valencia, a 16 de febrero de 1989

El Secretario,



Handwritten signature of the Secretary

- (181) R. K. Verma; Talanta 1973. 22. 277-82.
(182) M. A. Bazzi, V. Cavrioli y A. M. di Pietro; J. Pharm 1982. 21. 1384-9.
(183) M. Wronski; Chem. Listy 1985. 19. 1079.
(184) J. M. Kolthoff y J. Eirenstetter; Anal. Chim. Acta 23. 83.
(185) R. K. Verma y H. M. Verma; Talanta 1981. 20. 977-80.
(186) R. K. Verma y A. K. Gulati; Anal. Chem. 1982 2013-15.
(187) Anon; The National Formulary. 14th ed. page 74 American Pharmaceutical Association, Washington D 1975.
(188) The United States Pharmacopoeia. 20th ed. page 17 Pharmacopoeial Convention Rockville, Md. 1979.
(189) S. S. K. Murty, J. N. Hager y H. V. Kim; Am. J. Pharm. 1977. 11. 305-9.
(190) A. Billabert y M. Hanson; Analysis 1977. 5. 75-77.
(191) M. Wronski; Biochem. J. 1987. 104. 179-86.