

## COMUNICACION ORIGINAL

## CUANTIFICACION DE DI- Y POLI-AMINAS MEDIANTE HPLC Y TLC: COMPARACION DE METODOS PUBLICADOS<sup>1</sup>

KEITH N. SCORER, L. SOBERANIS y V. M. LOYOLA-VARGAS

División de Biología Vegetal, Centro de Investigación Científica de Yucatán  
A.C., Apdo. Postal 87, 97310 Cordemex. Yuc., México

## RESUMEN

Recientemente se han publicado una gran variedad de técnicas describiendo la separación y cuantificación de poliaminas mediante HPLC y TLC. En el presente trabajo se hace una evaluación de algunas de estas técnicas, para determinar la viabilidad de su aplicación en el análisis de rutina en los tejidos vegetales con el equipo disponible en nuestro laboratorio. Incluimos datos que muestran que la duración de la reacción de derivatización no es crítica y definimos más claramente la estabilidad de estándares de poliaminas antes y después de la dansilación.

## ABSTRACT

Recently a variety of techniques have been published describing the separation and quantification of polyamines by HPLC and TLC. We have evaluated some of these techniques to determine their suitability for the routine analysis of polyamines in plant tissues with the equipment available in our laboratory. We include data to show that the duration of the derivatization reaction is not critical and define more precisely the stability of authentic polyamines before and after dansylation.

## INTRODUCCION

Las poliaminas son rutinariamente analizadas en los tejidos vegetales y animales mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) o cromatografía en capa fina (TLC), ambas técnicas con sus ventajas y desventajas. El objetivo del presente trabajo es examinar los méritos, tanto de la TLC como de la HPLC, para el análisis rutinario de las di y poliaminas más comunes. Estos compuestos tienen un papel muy importante en los procesos de desarrollo celular y respuesta adaptativa (Galston 1983; Slocum et. al. 1985).

## Materiales y métodos

Las poliaminas utilizadas como estándares fueron de Sigma (USA). Los disolventes y los demás reactivos fueron de Merck y J.T. Baker. Todos los reactivos utilizados fueron de la mayor pureza disponible.

## Derivatización

Normalmente, las soluciones de las poliaminas estándares se prepararon inmediatamente antes de usarse a una concentración final de 100  $\mu$ M, usando ácido perclórico al 5% (v/v) como disolvente.

La dansilación de las poliaminas fue llevada a cabo de acuerdo a Flores y Galston (1982). Para ello, alícuotas de 250  $\mu$ l de las soluciones de las poliaminas estándares se mezclaron con 400  $\mu$ l de cloruro de dansilo (5 mg/ml, acetona) recién preparado. Se le adicionaron 250  $\mu$ l de una solución saturada de bicarbonato de sodio y se agitó por 10 s antes de incubarla por una noche a 25  $\pm$  1°C. El exceso de cloruro de dansilo fue removido mediante la adición de 100  $\mu$ l de una solución de prolina (100 mg/ml H<sub>2</sub>O). La mezcla fue agitada por 10 s e incubada en la oscuridad a 25  $\pm$  1°C por 30 min. Se adicionaron 250  $\mu$ l de benceno y se agitó por 30 s antes de retirar la fase orgánica, la cual fue almacenada, hasta su análisis, en la oscuridad a -20°C.

Los estándares de poliaminas fueron benzoilados de acuerdo a Redmond y Tseng (1979), como lo describieron Flores y Galston (1982). A 500  $\mu$ l de una solución de poliaminas disueltas en ácido perclórico se le adicionó 1 ml de NaOH 2 N y 10  $\mu$ l de cloruro de benzoilo. La mezcla se agitó por 10 s y se incubó a temperatura ambiente por 20 min antes de adicionar 2 ml de NaCl saturado. Las poliaminas benzoiladas fueron extraídas con 2 ml de acetato de etilo. Un ml del extracto de acetato de etilo fue evaporado a sequedad y el residuo redisolto en 100  $\mu$ l de metanol. Las muestras benzoiladas fueron almacenadas a -20°C en la oscuridad.

## Cromatografía en capa fina

Las poliaminas dansiladas fueron separadas por TLC utilizando el método descrito por Flores y Galston (1982). Después de activar las placas de sílica gel (Whatman LK 6D) mediante calentamiento seco a 110  $\pm$  1°C por 30 min se colocaron alícuotas de 25  $\mu$ l (0.1 a 3.0 nmol de muestra) sobre las placas. Después las placas fueron desarrolladas en: (a), cloroformo: trietilamina (25:2 v/v) o, (b), ciclohexano: acetato de etilo (5:4 v/v). La visualización de las poliaminas dansiladas en las placas se realizó mediante luz UV, extraídas de las placas disueltas en 2 ml de acetato de etilo y cuantificadas mediante fluorimetría en un fluorómetro de filtros Turner 111.

<sup>1</sup> Financiado por el CONACyT, donativo  
Nº PCCBBNA-020988.

Recientemente las poliaminas dansiladas también han sido cuantificadas usando un rastreador (scanner) Shimadzu CS 930 de doble haz para la lectura de placas delgadas con una longitud de onda de excitación de 365 nm. La luz emitida pasa a través de un filtro que no permite el paso de longitudes de onda menor a 450 nm, pero si permite el paso de longitudes de onda mayores a 490 nm.

En una sola ocasión, después del desarrollo de una placa, ésta fue rociada con trietanolamina: isopropanol (2:8 v/v) como lo describió Fleischer (1979) en un intento por aumentar y estabilizar la fluorescencia. Después se secó la placa en la oscuridad bajo presión reducida por 3 h, permitiendo que 30 min antes del final se equilibrara a presión atmosférica antes de cuantificar las poliaminas dansiladas.

**Cromatografía líquida de alta resolución**

El análisis de las muestras por HPLC se llevó a cabo utilizando un cromatógrafo de líquidos Varina Vista 5000 con un volumen fijo de inyección de 10 µl y resuelto en una columna Micropak MCH-5 (Varian), o Hibar Lichrosorb RP-8 (Merck). Los resultados fueron cuantificados mediante la integración con una estación de datos Varian CDS 401.

El análisis mediante HPLC de las poliaminas dansiladas se llevó a cabo de acuerdo al método de Seiler et al. (1978). Antes de la inyección de la muestra, la columna se equilibró con metanol: agua (57.5:42.5% v/v) a un flujo de 1 ml/min durante 10 min. Las poliaminas dansiladas fueron eluidas incrementando la concentración del metanol utilizando el siguiente gradiente: Del tiempo cero hasta los 20 min la concentración de metanol se incrementó 0.5%/min, entre los 20 y los 30 min el incremento fue de 1.5%/min y después de los 30 min fue de 3%/min. La elución se continuo por 4 min con metanol al 100% para eluir las impurezas y a los 40 min se volvió a equilibrar la columna con la mezcla original de metanol:agua.

Las poliaminas dansiladas también fueron eluidas usando el gradiente de metanol:agua propuesto por Smith y Davies (1985). Entre el tiempo cero y el de 23 min, la concentración de metanol aumentó en forma lineal desde 60 hasta 95% a una velocidad de flujo de 1 ml/min. La elución se completó a los 27 min y la columna se

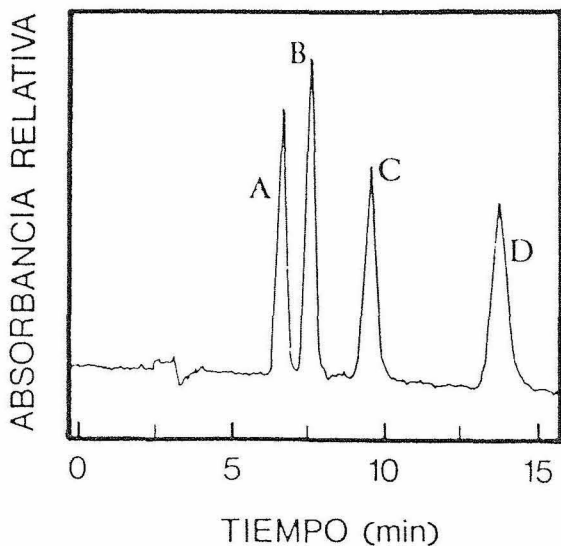


Figura 1 - Cromatograma de una mezcla de poliaminas usando una columna Varian MCH-5. (A) putrescina, (B) cadaverina, (C) espermidina y (D) espermina.

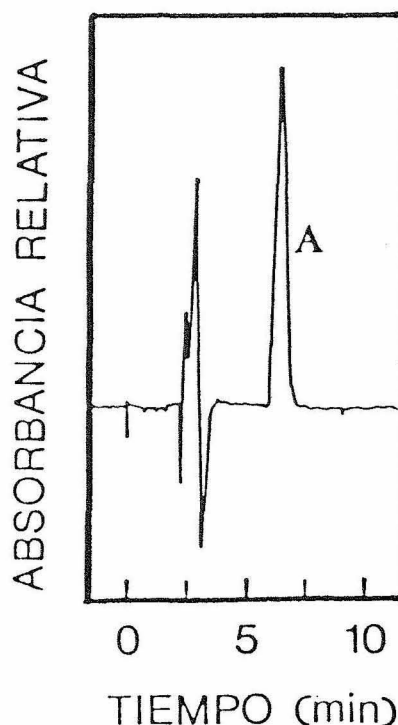


Figura 2 - Cromatograma de una mezcla de putrescina y 1, 3-diamino propano usando una columna Varian MCH-5. Los dos compuestos eluyen juntos en el pico A.

lavó con 100% de metanol durante 5 min antes de reequilibrarla con metanol:agua (60:40 v/v) durante 5 min. La detección de las poliaminas dansiladas se llevó a cabo con un detector de fluorescencia Varian Fluorichrom, y un pico de transmisión de 495 nm.

Para los análisis de HPLC de las poliaminas benzoidadas se usó una mezcla de metanol:agua (60:40 v/v) o de acetonitrilo:agua (52:48 v/v) de acuerdo con Flores y Galston (1982). La detección se llevó a cabo con un detector de UV Varian 2050 a una longitud de onda de 254 nm. Cada experimento consistió, por lo menos, de 3 réplicas y fue repetido, por lo menos, 3 veces. Las gráficas muestran resultados de un solo experimento y son típicos.

**RESULTADOS**

**Cromatografía líquida de alta resolución**

Flores y Galston (1982) reportaron una buena separación entre una variedad de di- y poliaminas benzoidadas utilizando una elución lineal de acetonitrilo:agua.

TABLA I - Tiempos de retención de las poliaminas benzoidadas en una columna Varian Micropak MCH-5. Disolvente: acetonitrilo: agua (48.7: 51.3, v/v) de acuerdo a Flores y Galston (1982).

Compuesto	Tiempo de retención (min)	±	ESM
Putrescina	6.40	±	0.004
Cadaverina	7.32	±	0.007
Espermidina	9.29	±	0.022
Espermina	13.44	±	0.070

Nosotros también obtuvimos una buena separación de los derivados benzilados de putrescina (A), cadaverina (B), espermidina (C) y espermina (D), usando una columna MCH-5 (Figura 1; Tabla I). Sin embargo, los tiempos de retención de los derivados benzilados para la putrescina y el 1, 3-diaminopropano fueron similares y no fue po-

sible resolver los dos picos (Figura 2). Resultados similares (no mostrados) se obtuvieron usando un sistema de elución lineal de metanol:agua.

Utilizando la columna Micropak de Varian MCH-5 con el gradiente de elución metanol:agua, descrito por Seiler et al. (1978), los derivados dansilados de putres-

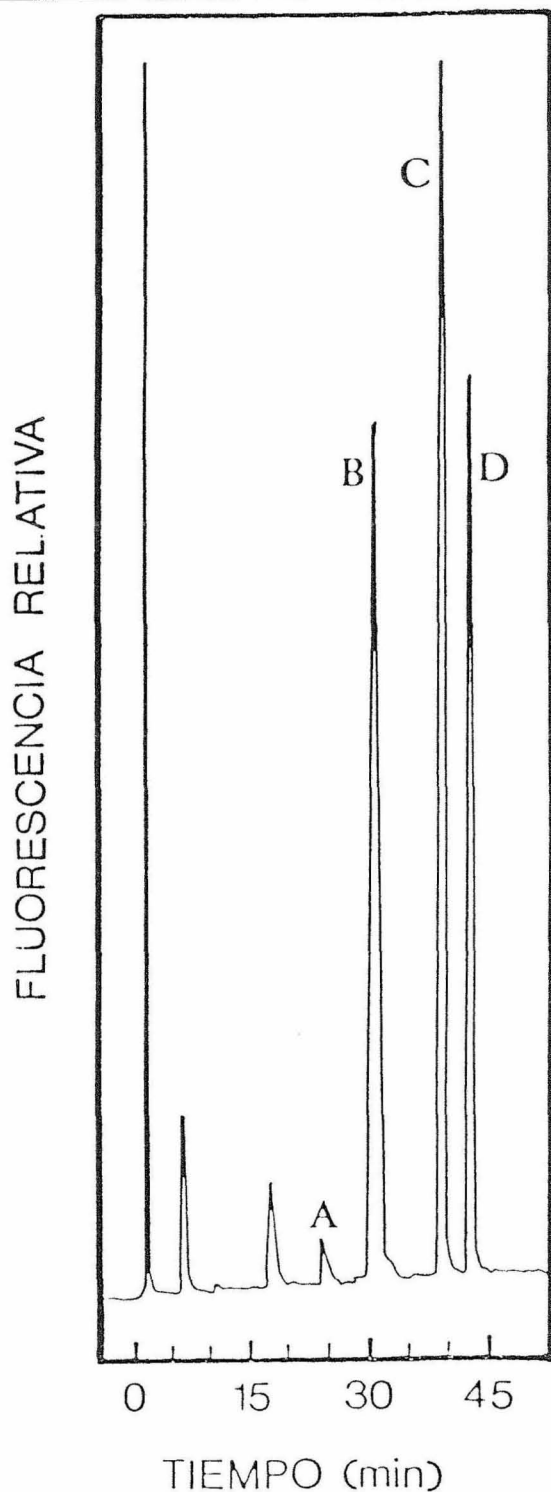


Figura 3 - Separación de los derivados dansilados de (A) agmatina, (B) putrescina, (C) espermidina y (D) espermina en una columna Micropak MCH-5 con un gradiente de elución de metanol:agua de acuerdo a Seiler et al. (1978)

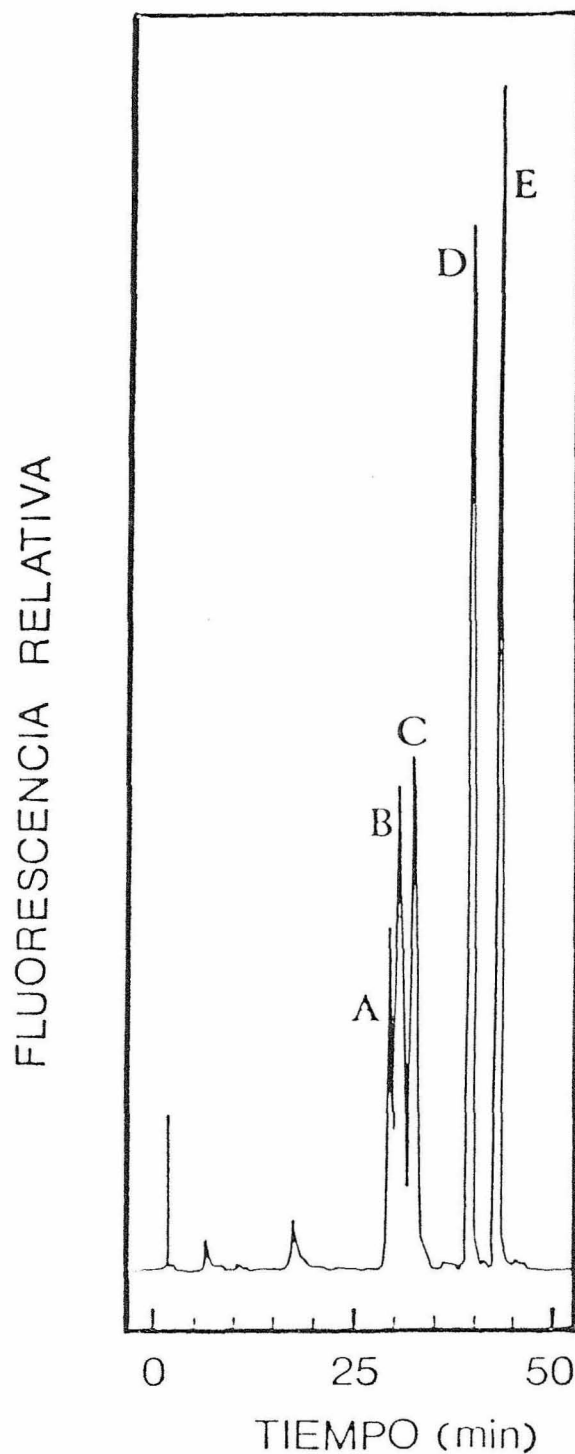


Figura 4 - Separación de los derivados dansilados de (A) 1, 3-diamino-propano, (B) putrescina, (C) cadaverina, (D) espermidina y (E) espermina usando una columna Micropak MCH-5 con un gradiente de elución de metanol:agua de acuerdo con Seiler et al. (1978)

cina, espermidina y espermina se pudieron separar muy bien (Figura 3). Bajo estas condiciones el derivado dansilado de la agmatina también se separó, si bien en base molar su señal fue considerablemente más débil que la de las otras di- y poliaminas dansiladas. Usando estas condiciones analíticas también fue posible separar los derivados dansilados del 1, 3-diaminopropano (A), la putrescina (B) y la cadaverina (C) (Figura 4). A pesar de que los tres derivados tienen tiempos de retención muy similares (Tabla II) fue posible resolver los tres picos mediante integración y las curvas estándares mostradas en las figuras 5 y 6 fueron generadas usando una sola mezcla de estándares.

Smith y Davies (1985) han reportado recientemente la separación de derivados dansilados de putrescina, es-

**TABLA II -** Tiempos de retención de los derivados dansilados de di- y poliaminas separados de acuerdo a Seiler et al. (1978) en una columna Varian Micropak MCH-5, usando un gradiente de elución de metanol: agua. Los valores son el promedio  $\pm$  1 ESM calculados de 5 corridas independientes realizadas el mismo día.

Compuesto	Tiempo de retención (min)		
Diaminopropano	24.91	$\pm$	0.22
Putrescina	26.13	$\pm$	0.22
Cadaverina	28.40	$\pm$	0.19
Espermidina	27.23	$\pm$	0.09
Espermina	41.33	$\pm$	0.05

permidina, espermina y cadaverina. Además de la alta sensibilidad del método, la mayor ventaja ofrecida fue la elución más rápida, con un tiempo total de elución de aproximadamente 30 min. Experimentos preliminares usando un gradiente lineal de elución metanol:agua en una columna Varian Micropak MCH-5 mostraron que el orden relativo de elución fue el mismo que con el método de Seiler et al. (1978) si bien se redujeron los tiempos de retención. Sin embargo, los tiempos de retención de los derivados dansilados del 1, 3-diaminopropano, la putrescina y la cadaverina fueron similares. Además, la eficiencia en la separación entre putrescina y cadaverina fue por lo menos comparable a la de Seiler et al. (1978), con la ventaja adicional de utilizar un programa de elución más rápido. Una corrida similar usando una columna Merck Hibar Lichrosorb RP-8, si bien redujo ligeramente los tiempos de retención, produjo picos menos compactos con la correspondiente reducción en la resolución entre los derivados dansilados de la cadaverina, la putrescina y el 1, 3-diaminopropano.

#### Cromatografía en capa fina

La tabla III muestra los valores de R<sub>f</sub> obtenidos para la putrescina, la espermidina, la espermina, la cadaverina y el 1, 3-diaminopropano con (a), cloroformo:triethylamina (25:2 v/v) y (b), ciclohexano:acetato de etilo (5:4 v/v). También se muestran los valores de R<sub>f</sub> de los productos alternos del proceso de dansilación en ausencia de los estándares de poliaminas. En el sistema ciclohexano:acetato de etilo los subproductos de la dansilación se resolvieron en 4 bandas fluorescentes, numeradas 1-4. Las bandas 3 y 4, con movilidades mayores que las de las poliaminas dansiladas, no interfirieron con la identificación y cuantificación de las poliaminas estándares. Sin embargo, las bandas 1 y 2 tienen valores de R<sub>f</sub> similares a los de la espermina y la cadaverina dan-

**TABLA III -** R<sub>f</sub> de las poliaminas dansiladas

Compuesto	Cloroformo: Triethylamina (25:2 v/v)	Ciclohexano: acetato de etilo (5:4 v/v)
Dansil 1.3-diaminopropano	0.25 $\pm$ 0.003 <sup>b</sup>	0.21 $\pm$ 0.011 <sup>b</sup>
Dansilputrescina	0.28 $\pm$ 0.001 <sup>a</sup>	0.24 $\pm$ 0.009 <sup>b</sup>
Dansilcadaverina	0.41 $\pm$ 0.009 <sup>b</sup>	0.26 $\pm$ 0.010 <sup>b</sup>
Dansilespermidina	0.50 $\pm$ 0.002 <sup>a</sup>	0.18 $\pm$ 0.012 <sup>b</sup>
Dansilespermina	0.65 $\pm$ 0.002 <sup>a</sup>	0.14 $\pm$ 0.009 <sup>b</sup>
Sin poliaminas		
Banda 1	0.15 $\pm$ 0.002 <sup>b</sup>	0.15 $\pm$ 0.012 <sup>b</sup>
Banda 2	0.72 $\pm$ 0.025 <sup>b</sup>	0.29 $\pm$ 0.013 <sup>b</sup>
Banda 3	-----	0.45 $\pm$ 0.011 <sup>b</sup>
Banda 4	-----	0.53 $\pm$ 0.008 <sup>b</sup>

a = promedio de 299 muestras.

b = promedio de 3 muestras.

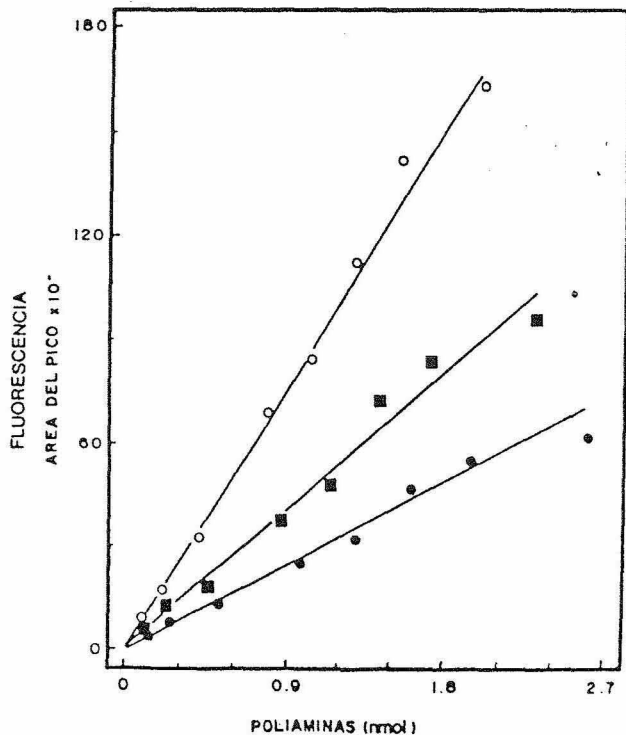


Figura 5 - Gráficas de calibración utilizando HPLC para espermina (O,  $r = 0.995$ ); putrescina ( $\blacksquare$ ,  $r = 0.991$ ) y 1, 3-diamino-propano ( $\blacktriangle$ ,  $r = 0.991$ ) utilizando una columna Varian Micropak MCH-5.

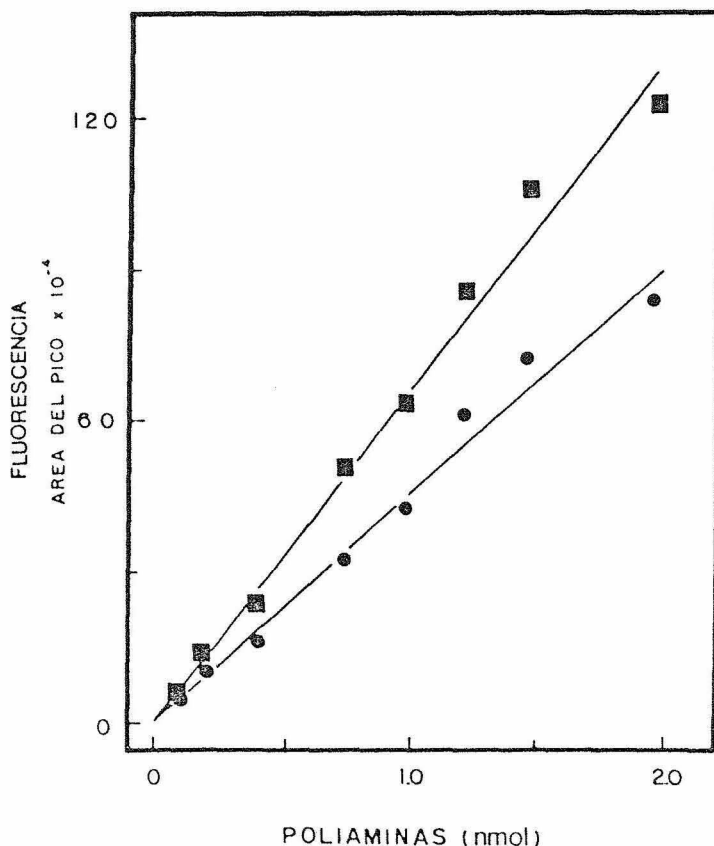


Figura 6 - Gráficas de calibración utilizando HPLC para espermidina ( $\blacksquare$ ,  $r = 0.995$ ) y cadaverina ( $\blacktriangle$ ,  $r = 0.994$ ) utilizando una columna Varian Micropak MCH-5.

siladas, respectivamente. De tal manera que, si bien fue posible la identificación de las diferentes poliaminas utilizando este sistema, fue difícil cuantificar cadaverina y espermina. En el sistema cloroformo:trietilamina los productos alternos de la reacción de dansilación se resolvieron en 2 bandas numeradas 1 y 2 en la tabla III. El valor de  $R_f$  de las bandas 1 y 2 difiere grandemente de los estándares de las poliaminas dansiladas y ninguna banda interfiere con la identificación y cuantificación de las poliaminas dansiladas. También, en contraste con el sistema ciclohexano:acetato de etilo, la diferencia entre los valores de  $R_f$  de cada una de las poliaminas dansiladas fue mayor, lo cual facilitó tanto la identificación como la cuantificación. A la luz de estos resultados todos los experimentos subsecuentes se llevaron a cabo usando el sistema cloroformo:trietilamina. Se examinaron los  $R_f$  de los productos de la dansilación de una variedad de compuestos comúnmente encontrados en los extractos de tejidos vegetales para determinar si los productos de su dansilación interfieren en la separación y cuantificación de las poliaminas por TLC. Además de agmatina, urea y cloruro de amonio, los aminoácidos menos polares, L-valina, L-triptofano, L-leucina, L-isoleucina y L-alanina fueron dansilados por separado y se determinaron los valores de  $R_f$  de los productos de su dansilación. Usando como disolvente al sistema cloroformo:trietilamina, ninguna de las sustancias mencionadas arriba produjeron bandas fluorescentes con valores de  $R_f$  que se parecieran a los de los estándares de las poliaminas dansiladas. Además, sin excepción, los productos fluorescentes producidos por la dansilación de los compuestos mencionados permanecieron en, o cerca del origen.

#### Reacción de dansilación

En la literatura las condiciones usadas para la incubación durante la dansilación de las poliaminas varían desde una noche a 25°C (Flores y Galston, 1982) hasta 1 h a 60°C (Smith y Davies, 1985). En vista de que se ha reportado que las poliaminas dansiladas son inestables a temperatura ambiente (Smith y Best, 1977) fue de interés establecer el tiempo óptimo para la reacción de dansilación. Las muestras de putrescina fueron dansiladas en la oscuridad a 25°C por diferentes tiempos, hasta un máximo de 24 h. A los diferentes intervalos de tiempo las muestras fueron rápidamente congeladas con nitrógeno líquido y almacenadas a -20°C en la oscuridad hasta el final del experimento. Todos los tratamientos de un experimento fueron procesados simultáneamente y cuantificados en la misma placa. En el figura 7 se muestran los resultados de un experimento típico. Como puede apreciarse el tiempo de dansilación, hasta un máximo de 24 h, no tiene efecto en la intensidad de la fluorescencia obtenida. Sorprendentemente, la fluorescencia obtenida con la muestra del tiempo cero, o sea la muestra que fue congelada inmediatamente después de la adición del cloruro de dansilo y del carbonato de sodio y almacenada a -20°C por 24 h, fue similar a la fluorescencia obtenida con las muestras dansiladas desde 3 hasta 24 h. Por lo tanto, en vista de que el nivel de fluorescencia obtenido no es afectado por el tiempo, al menos por 24 h, se seleccionó un tiempo de 16 h a 25°C para los experimentos subsecuentes.

#### Estabilidad de las soluciones concentradas de poliaminas

De acuerdo con Flores y Galston (1982) las soluciones concentradas de poliaminas disueltas en HCl (10 mM) y almacenadas a -20°C en la oscuridad son estables por lo menos durante 6 meses. Sin embargo, observaciones preliminares en nuestro laboratorio sugerían que las

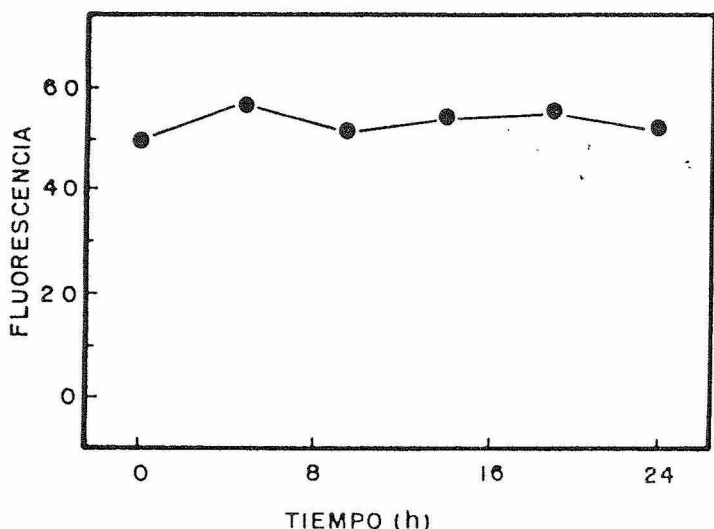


Figura 7 - Efecto del tiempo de dansilación de putrescina sobre la producción de fluorescencia.

poliaminas disueltas en ácido perclórico al 5% (v/v) eran menos estables. Para examinar la estabilidad de las soluciones de poliaminas, se preparó una solución de putrescina, espermidina y espermina en ácido perclórico al 5% (v/v) y se almacenó en la oscuridad a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Cada semana se obtuvieron muestras que fueron dansiladas y las 3 poliaminas fueron cuantificadas mediante TLC. Comparando la fluorescencia obtenida con la solución recién preparada se ve una disminución con el tiempo de la fluorescencia (Figura 8). Después de 7 días de almacenamiento, la disminución observada para la putrescina y la espermina fue mínima (1.1%) mientras que para la espermidina esta disminución fue del 5.5%. Después de 5 semanas de almacenamiento la fluorescencia había disminuido a 15.0, 14.5 y 14.0 % para putrescina, espermidina y espermina respectivamente (Figura 8).

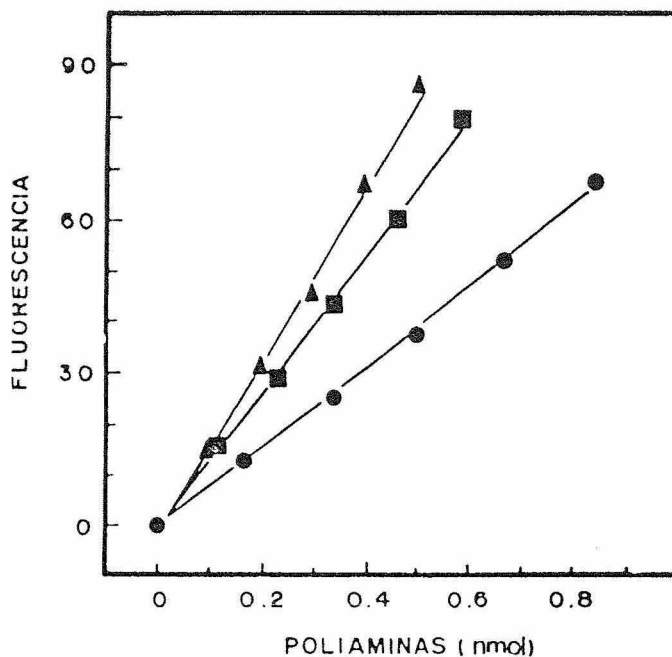


Figura 9 - Graficas de calibración utilizando la técnica de TLC para espermina ( $\Delta$ ,  $r = 0.995$ ), espermidina ( $\blacksquare$ ,  $r = 0.996$ ) y putrescina ( $\bullet$ ,  $r = 0.997$ ) midiendo la fluorescencia en el fluorómetro Turner 111.

Estos resultados indican que las soluciones de los estándares de poliaminas disueltos en ácido perclórico y, por extrapolación, los extractos de ácido perclórico de los tejidos vegetales no pueden almacenarse a  $-20^{\circ}\text{C}$  por períodos mayores de 7 d sin incurrir en el riesgo de pérdida de la fluorescencia, a consecuencia de una disminución en la cantidad de las poliaminas. En base a estos datos todos los experimentos subsecuentes se realizaron con soluciones de poliaminas recién preparadas.

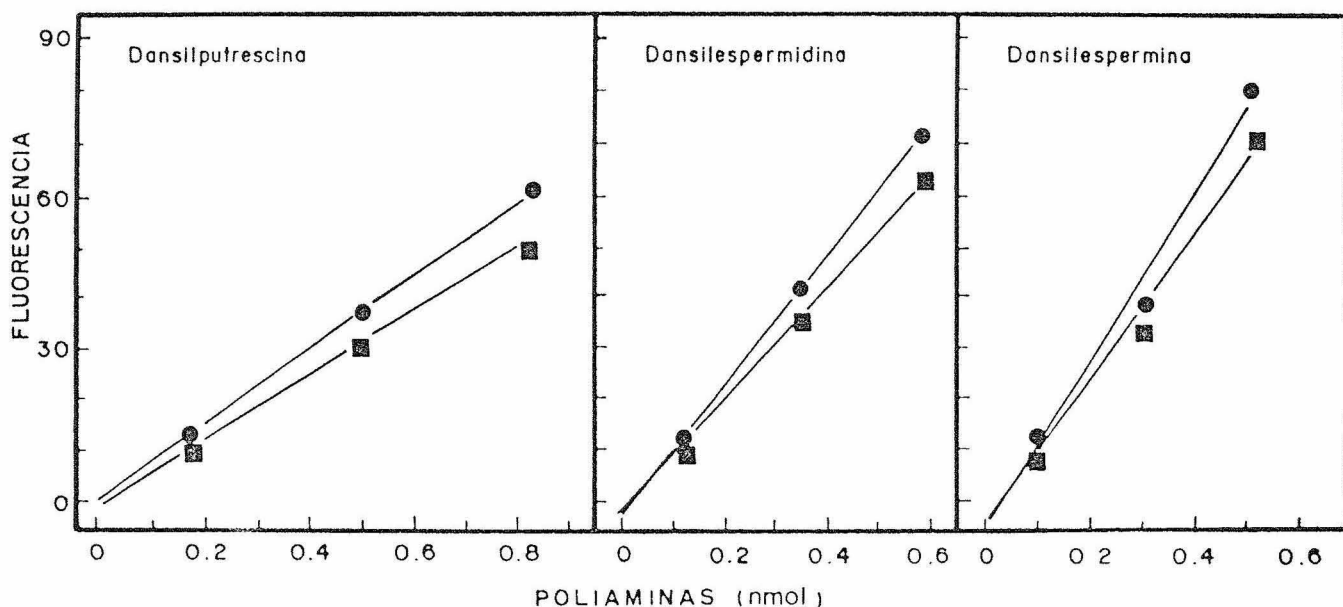


Figura 8 - Efecto del tiempo de almacenamiento sobre la estabilidad de una solución de putrescina, espermidina y espermina. Recién preparada ( $\bullet$ ); después de almacenadas en la oscuridad a  $-20^{\circ}\text{C}$  por 5 semanas ( $\blacksquare$ ).

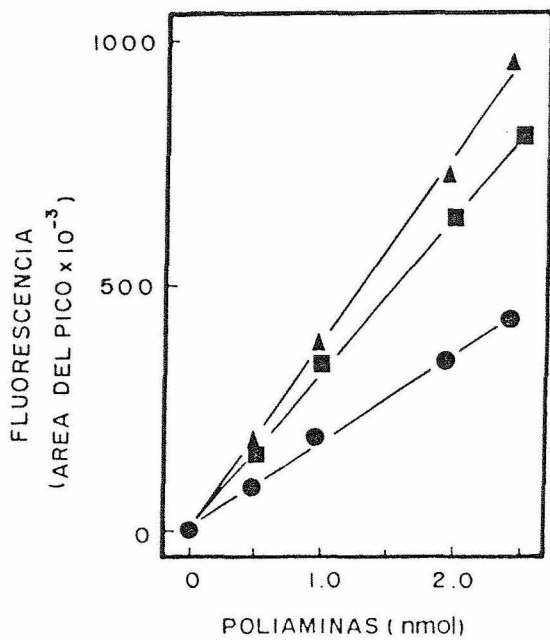


Figura 10 - Gráficas de calibración utilizando la técnica de TLC para espermina (▲,  $r = 0.999$ ), espermidina (■,  $r = 0.999$ ) y putrescina (●,  $r = 0.998$ ) midiendo la fluorescencia en el rastreador Shimadzu CS 930.

Curvas de calibración

Las curvas de calibración obtenidas con putrescina, espermidina y espermina utilizando el fluorómetro de filtros y el Shimadzu Cs 930 se muestran en las figuras 9 y 10, respectivamente. En todos los casos se obtuvieron líneas rectas ( $r \geq 0.99$ ) indicando que la fluorescencia es directamente proporcional a la cantidad de poliamina dansilada presente. El límite inferior de detección es de aproximadamente 100 pmolH.

Estabilidad de la fluorescencia

Se investigaron los efectos de la luz y la temperatura sobre la estabilidad de las poliaminas dansiladas. Los estándares se dansilaron y se almacenaron bajo condiciones apropiadas. La fluorescencia de las muestras almacenadas en la luz a 25°C decayó rápidamente con el tiempo y después de 10 d solo permanecía alrededor del 30% de la fluorescencia original (Figura 11). También se observó una marcada disminución en la fluorescencia después de 2 d, particularmente en el caso de la espermina (Figura 11). Sin embargo, en la oscuridad a -20°C no se observó pérdida alguna de la fluorescencia después de 10 d (Figura 11). A la luz de estos resultados, las poliaminas dansiladas fueron almacenadas rutinariamente en la oscuridad a -20°C antes de la cromatografía en placa delgada, pero nunca por períodos de tiempo mayores a 7 d. La recuperación de cada una de las poliaminas de la placa delgada, previa a su cuantificación en el fluorómetro de filtros, es un proceso lento. De igual manera, el rastreo de una placa puede tomar varias horas, dependiendo de los parámetros seleccionados para el análisis. Por ello, fue de interés examinar la estabilidad de las poliaminas dansiladas siguiendo su separación en las placas de cromatografía. Para ello se colocaron muestras de una mezcla de poliaminas dansiladas estándares en placas de cromatografía, las cuales después de desarrolladas fueron almacenadas bajo iluminación continua a 25°C, o envueltas en papel aluminio y colocadas en la oscuridad a -20°C. A diferentes intervalos de tiempo se removieron los estándares y se cuantificaron en el fluorómetro de filtros. Los resultados se muestran en la Figura 12. Es claro que las condiciones de almacenamiento afectan grandemente la estabilidad de la fluorescencia. En luz continua a 25°C se nota una considerable disminución en la fluorescencia después de sólo 24 h, la cual continúa disminuyendo rápidamente con el tiempo hasta que, como en el caso de la espermina, llega a valores de solo el 15% de la fluorescencia inicial después de 5 d. El decaimiento de la

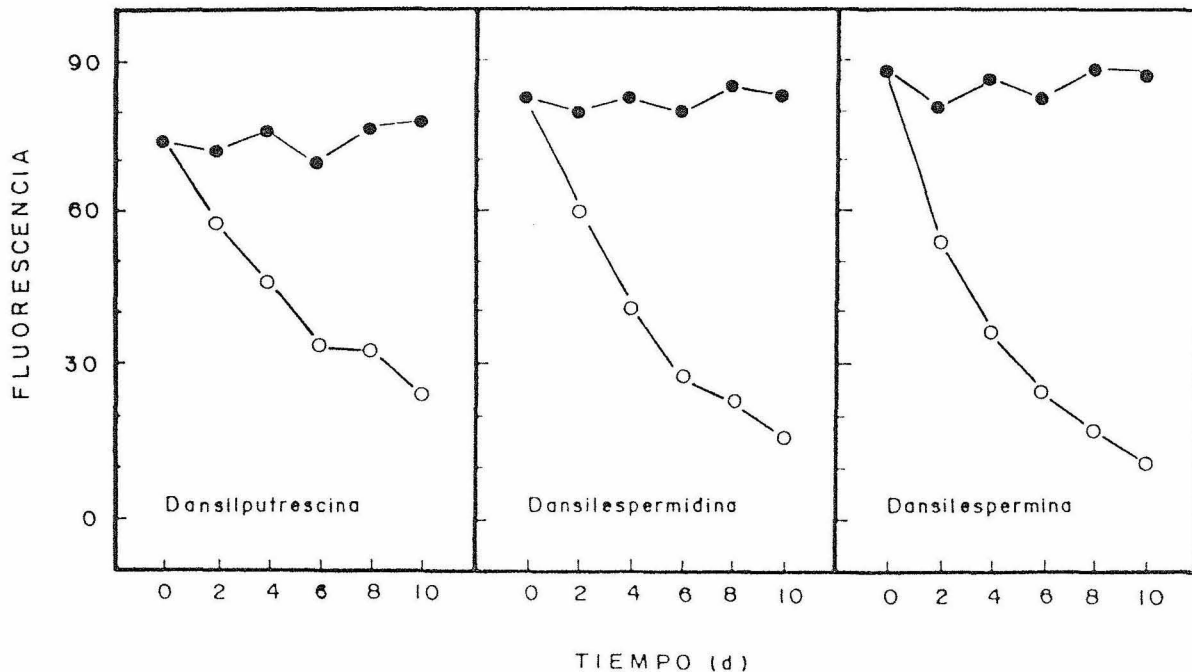


Figura 11 - Estabilidad de la fluorescencia de las muestras dansiladas almacenadas en la luz a 25°C ( O ) y en la oscuridad a -20°C ( ● ).

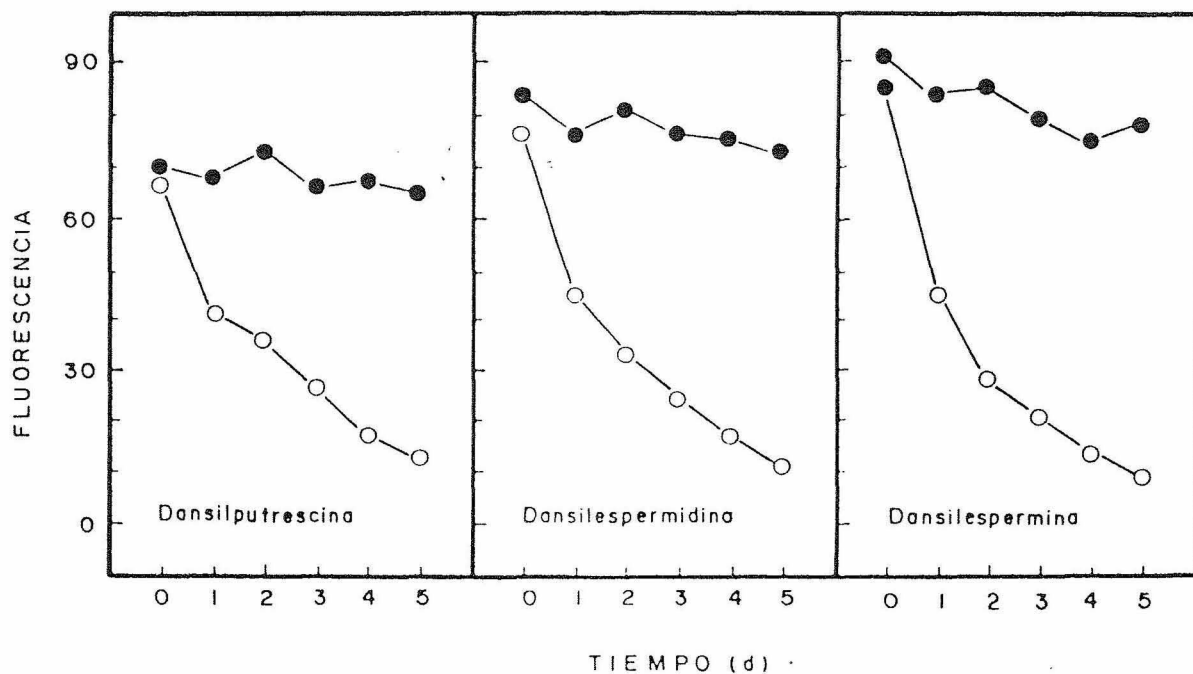


Figura 12 - Estabilidad de la fluorescencia en placas almacenadas bajo iluminación continua a 25°C ( O ) o envueltas en papel aluminio a -20°C ( ● ).

fluorescencia es retardado grandemente cuando las placas son almacenadas en la oscuridad a -20°C, como en el caso de la espermina, en la cual la fluorescencia solo disminuye 10% después de 5 d de almacenamiento (Figura 12).

Es claro con estos resultados que las condiciones del almacenamiento afectan grandemente la estabilidad de las poliaminas dansiladas por lo que siempre fueron cuantificadas inmediatamente después del desarrollo de las placas. Sin embargo, como se mencionó anteriormente, el rastreo completo de una placa con el Shimadzu CS 930 puede tomar varias horas y esto, combinado con la mayor sensibilidad ofrecida por el equipo, puede producir una cuantificación errónea. Consecuentemente, se rastreó a diferentes intervalos de tiempo un carril de una placa recién desarrollada conteniendo putrescina, espermidina y espermina dansiladas. Entre los rastreos la placa permaneció dentro del aparato a temperatura ambiente. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 13 e indican que bajo estas condiciones de almacenamiento hay poca variación en el nivel de fluorescencia durante las primeras 12 h después del desarrollo de la placa y para todos los propósitos la fluorescencia puede considerarse estable. Se ha reportado que una aplicación mediante rociado de trietanolamina:isopropanol (2:8 v/v) a la placa aumenta tanto la fluorescencia como la estabilidad de las poliaminas dansiladas (Fleischer, 1979). Un experimento preliminar mostró que el rociado de la placa después de haber sido desarrollada incrementó la fluorescencia aproximadamente 3 veces. Esto incrementa notablemente la sensibilidad del método. Sin embargo, también fue claro que, en contradicción con lo reportado por Fleischer (1979), la fluorescencia de las poliaminas dansiladas tratadas de esta manera disminuyó rápidamente y se produjo una pérdida importante de la fluorescencia durante el tiempo que lleva a realizar el rastreo de la placa con el Shimadzu CS 930. Esto, claramente, hace imposible la cuantificación, por lo que no se hicieron nuevos intentos por mejorar la sensibilidad del método.

#### DISCUSION

En este trabajo se llevó a cabo la dansilación y benzilación de estándares de poliaminas así como su separación mediante técnicas de HPLC y TLC como se había reportado previamente. No se hicieron intentos de comparar las sensibilidades entre TLC y HPLC, puesto que rápidamente fue evidente que la TLC ofrece ciertas ventajas para el procesamiento rutinario de un gran número de muestras. Sin embargo, deberá hacerse notar que la agmatina no puede resolverse mediante TLC y que la cuantificación de este importante precursor de la putrescina en los tejidos vegetales necesariamente involucrará el uso de técnicas de HPLC. Estudios preliminares indican que la selección de la técnica de HPLC será deter-

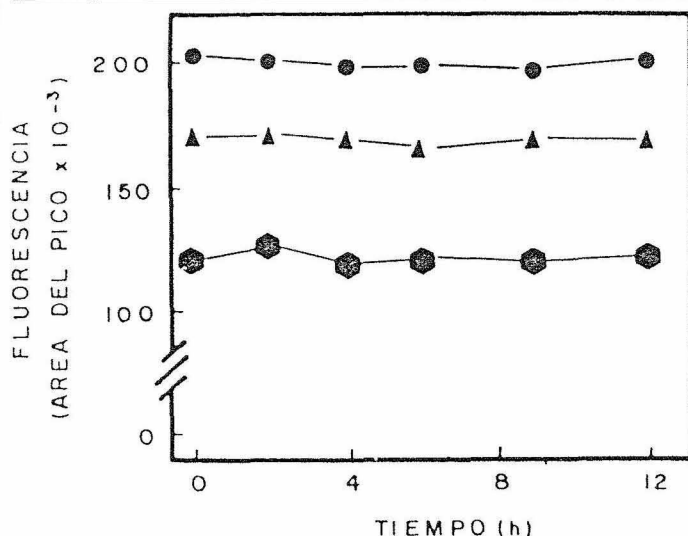


Figura 13 - Estabilidad de la fluorescencia de los estándares de espermina ( ● ), espermidina ( ▲ ) y putrescina ( ◐ ) en placas mantenidas dentro del Shimadzu CS 930 a temperatura ambiente.



minada principalmente por las poliaminas en estudio y el equipo disponible. La cadaverina, la putrescina, la espermidina y la espermina, así como los derivados benzilados o dansilados fueron separados mediante todos los métodos examinados. Sin embargo, el 1, 3-diaminopropano y la putrescina dansilados eluyen como un solo pico de una columna Micropak MCH-5 (Figura 2) usando el método de Flores y Galston (1982). El método del gradiente de elución de Seiler et al. (1978) y el de Smith y Davies (1985) resolvieron este problema y los derivados dansilados del 1, 3-diaminopropano, la putrescina y la cadaverina pudieron ser eluidos cada uno como picos simples. De los dos métodos utilizados, el de Seiler et al. (1978) dio mejores resultados en lo que respecta a la separación de los tres derivados dansilados (Figura 4). Consecuentemente si el 1, 3-diaminopropano, la agmatina, la putrescina y la cadaverina son componentes importantes de los extractos vegetales, deberán efectuarse rastreos preliminares para determinar cual de los tres métodos da la mejor resolución con el equipo disponible. En ausencia de 1, 3-diaminopropano las técnicas de Smith y Davies (1985) y la de Flores y Galston (1982) tienen la ventaja de un tiempo de elución menor, si bien Seiler et al. (1978) describieron modificaciones a su método para tener una elución más rápida de la espermina y la espermidina. Sin embargo, estas modificaciones no fueron examinadas en el presente estudio.

En base a nuestros resultados con TLC, el sistema de disolventes cloroformo:trietilamina parece ser superior al otro sistema empleado para la separación de las muestras dansiladas de putrescina, espermidina, espermina, cadaverina y 1, 3-diaminopropano. Comparándolo con el sistema ciclohexano:acetato de etilo, la dispersión de las poliaminas dansiladas y de los productos colaterales de la reacción de dansilación es mayor, lo cual facilita grandemente la cuantificación. Además, se ha reportado que la fluorescencia de las poliaminas dansiladas es más estable después de su separación en TLC en cloroformo:trietilamina (Flores y Galston, 1982).

Se ha reportado que altas concentraciones de amoníaco o de aminoácidos interfieren en la separación de las poliaminas dansiladas por TLC (Flores y Galston, 1982). Nosotros examinamos algunos compuestos que están comúnmente presentes en extractos de plantas para ver si los productos fluorescentes producidos durante la dansilación pudieran interferir con la cuantificación de las poliaminas comunes. Se incluyó amoníaco y urea, los cuales se espera que se encuentren en forma abundante en los extractos vegetales, particularmente después de una hidrólisis ácida. También se estudiaron algunos aminoácidos menos polares, potencialmente solubles en benceno. Ninguno de los compuestos ensayados produjo bandas fluorescentes que interfirieran en la cuantificación de las poliaminas dansiladas. Sin embargo, permanece la posibilidad de que pueda producirse fluorescencia durante la dansilación de las poliaminas en presencia de tales compuestos.

Nuestros experimentos también establecieron que la duración de la reacción de dansilación no es crítica y las condiciones estándares para la reacción para subsecuentes trabajos se establecieron como 16 h en la oscuridad a 25°C. El nivel de fluorescencia obtenido con la muestra de tiempo cero fue similar a la obtenida con las muestras dansiladas desde 3 hasta 24 h (Figura 7). Esto puede indicar que la dansilación ocurre, si bien a muy bajas velocidades, a temperaturas bajo cero. Sin embargo, la concentración de cloruro de dansilo en la mezcla de reacción se encuentra en exceso (800 veces) respecto a la concentración de las poliaminas y

esto puede ser suficiente para que la reacción de dansilación se complete durante el corto período de tiempo utilizado para congelar las muestras. Flores y Galston (1982) reportaron que soluciones (1 mM) de poliaminas estándares disueltas en HCl 10 mM y extractos de tejido vegetal en ácido perclórico son estables a -20°C por unos meses. Sin embargo, nuestros experimentos muestran que la estabilidad de los estándares de poliaminas es mucho menor y que ocurre una disminución sustancial en la fluorescencia después de 4 semanas a -20°C en la oscuridad (Figura 8). Por esta razón nosotros proponemos que las soluciones concentradas de los estándares de poliaminas nunca deberán ser almacenadas por períodos mayores a 7 d y que los extractos perclóricos de los tejidos vegetales deberán ser dansilados y cuantificados dentro de las 48 h siguientes a la extracción. También se ha reportado que las poliaminas dansiladas y disueltas en disolventes orgánicos son estables por más de 4 semanas (Flores y Galston, 1982). A la luz directa y temperatura ambiente, la vida media de la fluorescencia puede medirse en horas (Smith y Best, 1977). Nuestros resultados también indican que la estabilidad de las poliaminas dansiladas es fuertemente afectada por la luz y la temperatura (Figura 8). Las poliaminas dansiladas, disueltas en benceno y almacenadas en la oscuridad a -20°C permanecieron sin pérdida de la fluorescencia por lo menos durante 10 d (Figura 11). Sin embargo, después de la separación por TLC la estabilidad de la fluorescencia disminuyó grandemente (Figura 12), presumiblemente debido a la dispersión de las poliaminas dansiladas en la sílica gel. Sin embargo, como muestra la figura 13, la fluorescencia es estable en las primeras horas en la oscuridad a temperatura ambiente. Por lo tanto, y siempre que las poliaminas dansiladas sean cuantificadas inmediatamente después de la separación mediante TLC, la inestabilidad inherente a la fluorescencia no tiene efecto en la cuantificación.

Tanto con el fluorómetro de filtros como con el Shimadzu CS 930, se obtuvieron líneas rectas en las gráficas de calibración de los estándares de poliaminas (Figuras 9 y 10). Sin embargo, puesto que la integración de los picos facilita la obtención de las curvas estándares y además de que con el Shimadzu CS 930 se cubre un rango mucho más amplio de concentraciones que con el fluorómetro de filtros, el equipo Shimadzu CS 930 se ha seguido usando rutinariamente para la cuantificación de poliaminas. En cuanto a las características de operación, la cuantificación de las poliaminas dansiladas usando el Shimadzu CS 930 es superior al fluorómetro de filtros. La cuantificación directa en la placa elimina la necesidad de remover la sílica gel de ésta y la elución de las poliaminas dansiladas con lo cual se elimina una tarea laboriosa y una probable fuente de error. Además, como ya se mencionó, la integración del pico incrementa la sensibilidad en la detección y permite la cuantificación rutinaria de las poliaminas dansiladas en un amplio rango de concentraciones. El Shimadzu CS 930 permite mantener constante el sistema geométrico de medida de la fluorescencia, el cual puede influir grandemente en los resultados. La única variable fuera de control es el espesor de cada placa. Para eliminar este problema, así como los provocados por las manipulaciones normales, se corrieron muestras de poliaminas estándares junto con los extractos vegetales en cada placa.

Comparando los méritos relativos de las técnicas de HPLC y TLC para la separación y cuantificación de poliaminas comunes es claro que la TLC posee ciertas ventajas. Estas ventajas se aumentan cuando la TLC se combina con la cuantificación directa de la fluorescencia en la placa usando el Shimadzu CS 930. Utilizando

placas acanaladas Whatman LK 6D se pueden analizar 38 muestras por día. El análisis de un número similar de muestras mediante HPLC requiere de aproximadamente 35 h de operación continua del equipo. Como el límite de detección por los dos métodos es similar, es claro que la TLC posee una gran ventaja sobre la HPLC para el análisis rutinario de un gran número de muestras.

#### AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al CINVESTAV, Unidad Mérida, el préstamo del fluorómetro de filtros Turner 111.

#### BIBLIOGRAFIA

Galston A.W. (1983), Polyamines as modulators of plant development, *BioScience*, 33: 382-388.  
Fleischer J.H. (1979), Diamines and polyamines, en *Densitometry in Thin Layer Chromatography* (Eds. J.C. Touchstone y J. Sherma), John Wiley and Sons, New York, pp. 241-250.  
Flores H.E. y A. W. Galston (1982), Analysis of poly-

amines in higher plants by high performance liquid chromatography, *Plant Physiol.*, 69: 701-706.

Redmond J.W. y A. Tseng (1979), High-pressure liquid chromatographic determination of putrescine, cadaverine, spermidine and spermine, *J. Chromatog.*, 170: 479-481.  
Seiler N., B. Knödgen y F. Eisenbeiss (1978), Determination of di- and polyamines by high-performance liquid chromatographic separation of their 5-dimethyl-1-aminonaphthalene-1-sulfonyl derivatives, *J. Chromatog.*, 145: 29-39.

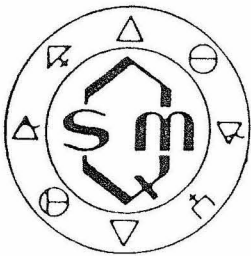
Slocum R.D., R. Kaur-Sawhney y A. W. Galston (1985), The physiology and biochemistry of polyamines in plants, *Arch. Biochem. Biophys.*, 235: 283-303.

Smith M.A. y P.J. Davies (1985), Separation and quantitation of polyamines in plant tissue by high performance liquid chromatography of their dansyl derivatives, *Plant Physiol.*, 78: 89-91.

Smith T.A. y G.R. Best (1977), Polyamines in barley seedlings, *Phytochem.*, 16: 841-843.

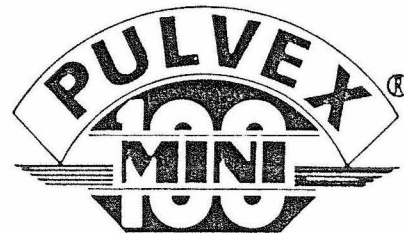
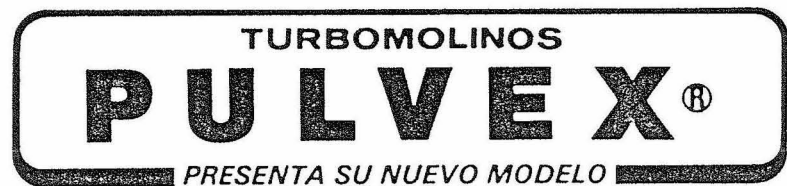
## XXIV CONGRESO MEXICANO DE QUIMICA PURA Y APLICADA

## VIII CONGRESO NACIONAL DE EDUCACION QUIMICA

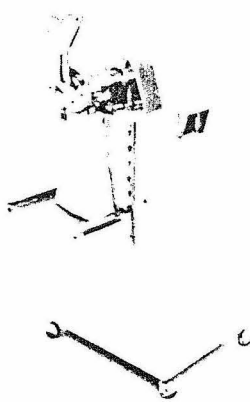


**REVISTA OFICIAL**  
**¡ YA PUEDE  
CONTRATAR  
SU  
ANUNCIO !**

**572-2584**  
**o 572-2473**



PARA PRUEBAS A NIVEL LABORATORIO



**EL NUEVO MODELO PULVEX MINI 100 ESTA CONSTRUIDO EN ACERO INOXIDABLE Y CON MOTOR DE 1/2 H.P. MONOFASICO. ESPECIALMENTE CONSTRUIDO PARA ATENDER LAS NECESIDADES DE LA INDUSTRIA EN GENERAL EN SUS DEPARTAMENTOS DE:**

- INVESTIGACION
- CONTROL DE CALIDAD.
- DESARROLLO DE NUEVOS PRODUCTOS.
- ANALISIS.

**¡RESOLVEMOS SUS PROBLEMAS DE MOLIENTA!**

**REALIZAMOS PRUEBAS**

MAQUINARIA PARA



MOLIENJAS Y MEZCLAS, S. A.

PLAYA LANGOSTA No. 25  
COL. REFORMA IZTACCIHUATL  
MEXICO 13, D.F.

579-78-67, 579-23-25, 579-36-93 Y 579-14-51.