

Instituto Español de Fisiología y Bioquímica  
Departamento de Bioquímica. Madrid  
(Director: Prof. A. Santos-Ruíz)

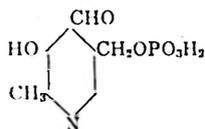
## Estudios sobre carboxilasas

### II.—Determinación cuantitativa de codescarboxilasa (piridoxal-fosfato)

por Luis Condal Bosch y Rufino Cosín García

(Recibido para publicar el 20 de septiembre de 1953)

En un lapso relativamente corto de tiempo (de 1942 a 1946), se llevó a cabo un extraordinario desarrollo en el conocimiento científico de los fermentos llamados descarboxilasas (4). Mientras por una parte se procedía a un estudio sistemático de la distribución de estos fermentos en las plantas y animales (especialmente microorganismos), por otro camino varios autores descifraban la estructura química del cofermento (6, 7, 8) como un *piridoxal-5-fosfato*:



La rapidez con que se realizó este desarrollo se debe, sin duda, a la aplicación de la técnica manométrica de Warburg (11) a la medición de velocidades de descarboxilación.

La facilidad de obtención y conservación de un polvo de *Streptococcus faecalis* R. con alto poder descarboxilásico, junto con la disponibilidad de codescarboxilasa sintética, nos permitió, en un trabajo anterior (1), estudiar el equilibrio de disociación:

Holofermento  $\rightleftharpoons$  Cofermento + Apofermento

la cual obedece a la ley de las masas :

$$K = \frac{[\text{Cofermento}] \cdot [\text{Apofermento}]}{[\text{Holofermento}]}$$

y que, ordinariamente, se escribe como relación funcional entre la *velocidad de descarboxilación*  $y$ , y la *concentración de cofermento*  $x$ , siendo  $V$  la *velocidad máxima de descarboxilación* de la cantidad de apofermento usado  $y$ , por lo tanto, una medida de la misma :

$$K = \frac{x (V - y)}{y} \quad ; \quad \text{o bien : } y = \frac{V \cdot x}{K - x}$$

Esta última, especialmente, se conoce con el nombre de *ecuación de activación*, por representar las sucesivas velocidades de descarboxilación que va desarrollando una cantidad dada de apo-descarboxilasa al aumentar gradualmente la cantidad de codescarboxilasa.

La principal conclusión de nuestro anterior trabajo fué la modificación de la ecuación anterior para que se ajustara a los resultados experimentales, corrección que consiste en tomar en consideración la cantidad de cofermento que se une para la formación del holofermento activo.

Resumiendo nuestro anterior trabajo (1) la nueva ecuación de activación es :

$$K = \frac{(x - c \cdot y) (V - y)}{y}$$

en la cual la nomenclatura queda reducida a lo siguiente :

- K . . . constante de equilibrio.
- V . . . velocidad máxima de descarboxilación ( $\mu\text{l./h.}$ , c.c.).
- y . . . velocidad de descarboxilación real ( $\mu\text{l./h.}$ , c.c.).
- x . . . concentración de cofermento total ( $\text{mg./c.c.}$ ).
- c . y . . concentración de cofermento combinado en forma de holofermento ( $\text{mg./c.c.}$ ).
- c . . . constante de equivalencia que sirve para convertir las unidades usadas en la expresión de la velocidad de descarboxilación, en las correspondientes a la concentración de cofermento.

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA ANALÍTICO

La difusión biológica de la codescarboxilasa (piridoxal-fosfato) es un dato importante que, sin duda, ha sido menos investigado que el dato paralelo de la difusión de la apodescarboxilasa (4). En realidad, no se ha desarrollado un método sencillo y científico para llevar a cabo la determinación cuantitativa de este cofermento, a pesar de que la activación que produce sobre la descarboxilasa tirosínica medida en el aparato de Warburg, permite, en principio, llevar a cabo determinaciones cuantitativas de piridoxal-fosfato a concentraciones tan pequeñas como 50  $\gamma$ ./l., con un 10 % de precisión, aparte de la gran especificidad del método, ya que las sustancias que a concentraciones razonables varían el resultado, son muy contadas.

El primer método analítico para la determinación de codescarboxilasa fué dado por Gale y Epps en un trabajo sobre la purificación de dicha substancia en vistas a su identificación (5). En este trabajo se define una unidad de cofermento de la siguiente manera: «Cantidad de codescarboxilasa capaz de aumetor en 1.200  $\mu$ l./h. la velocidad de descarboxilación de la cantidad de apodescarboxilasa tirosínica que posee una velocidad máxima de descarboxilación igual a 4.800  $\mu$ l./h.; haciendo las mediciones a 30° C., atmósfera de aire, pH = 5,5, cantidad de líquido por vaso 3 c.c. y procurando que la velocidad de descarboxilación medida no sobrepase la mitad de la máxima con el fin de evitar la parte no recta de la curva de activación».

El método es sencillo y no precisa de muchas determinaciones, pero, actualmente, no puede ser llevado a la práctica sin notables modificaciones. Sus principales inconvenientes son los siguientes: En primer lugar, el tener que trabajar a velocidades de descarboxilación demasiado altas para los vasos ordinarios del aparato de Warburg (17 c.c.). Con estos vasos, nosotros, hemos podido medir velocidades de 2.000  $\mu$ l./h., pero a base de varias modificaciones en los procesos de cálculo y lectura, y no recomendamos trabajar con ellos a velocidades mayores de 1.500  $\mu$ l./h. En segundo lugar, la necesidad de conocer la velocidad de descarboxilación del apofermento usado antes de proceder a la medición para tomar después la cantidad exactamente necesaria para la velocidad máxima dicha. Y, en tercer lugar, la porción suficientemente recta de la curva de activación, difícilmente se extiende más allá de una quinta parte de la velocidad máxima; esto unido a que algunas apodescarboxilasas tirosínicas presentan una descarboxilación residual de un décimo de dicha velocidad máxima, la zona útil queda reducida a muy poco.

El segundo y último método del que hemos encontrado noticia en la bibliografía corresponde a Sloane-Stanley (20), y es posterior a la identificación de la codescarboxilasa como piridoxal-fosfato. Consiste en obtener, simultáneamente, dos curvas de activación

(con 6 a 10 valores cada una de ellas), una con piridoxal-fosfato sintético tomado como «standard», y la otra con el material a analizar, diluidos ambos convenientemente y ambos con el mismo apofenmento (descarboxilasa tiro-sínica). Por comparación de ambas curvas, se deduce la concentración de codescarboxilasa en el material analizado

Este método, de un planteo más científico, debido, sin duda, a la utilización de un «standard» para efectuar la comparación, adolece de una excesiva simplicidad, ya que la comprobación entre dos curvas de activación llevada a cabo de una manera directa, no garantiza resultados mejores del 20 %. Aparte de ello, la necesidad de conservar en buen estado una substancia como el piri-

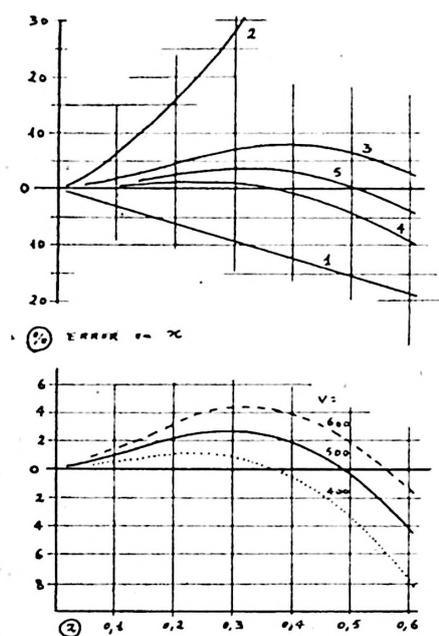


Figura 1

Error cometido al tomar una de las fórmulas aproximadas expresadas en tantos por cien del valor de  $x$  y en función de  $z$ .

doxal-fosfato que no es estable durante mucho tiempo en solución y que se utiliza a pequeñísimas concentraciones, presenta dificultades, no fácilmente solucionables, como hicimos constar ya en nuestro anterior trabajo (1).

En este trabajo nos proponemos diseñar un método analítico para la determinación de codescarboxilasa (pidoxal-fosfato), fundado en el conocimiento de la ecuación de activación desarrollada en nuestro anterior trabajo y a la que ya se ha hecho referencia, tomando en consideración las posibles aplicaciones del mismo y procurando sea, a la vez, sencillo y preciso. Para ello los puntos esenciales del planteo son :

*Primero.* — Apoyarse en los valores de  $K$  y  $c$ , constantes de la ecuación de activación modificada, para evitar las dificultades de un «standard».

*Segundo.* — Rectificar la ecuación de activación usando las oportunas coordenadas para que al trazar la recta que una los diversos puntos obtenidos experimentalmente, se compensen, en lo posible,

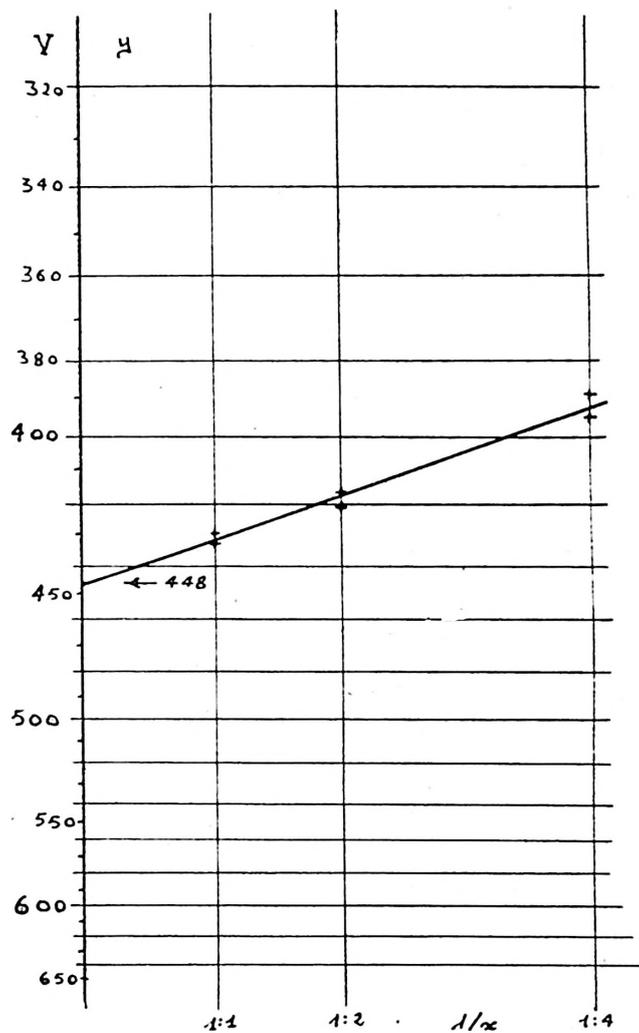


Figura 2

Extrapolación para el cálculo de la velocidad máxima de descarboxilación V.

los errores accidentalmente de los mismos y se haga más fácil leer la equivalencia.

*Tercero.* — Concretar la metódica a seguir y los cálculos a efectuar en un mínimo de operaciones, útil tanto al que tiene nece-

sidad de pocas determinaciones, como para el que tiene que realizarlas en gran número.

#### VALORES DE LAS CONSTANTES EN LA ECUACIÓN DE ACTIVACIÓN

Nosotros aceptaremos aquí los valores de  $K$  y  $c$  obtenidos en nuestro trabajo anterior (1):

$$K = 7'0 \text{ m}\mu\text{./c.c.} \quad ; \quad c = 0'041 \text{ m}\mu\text{., h./}\mu\text{l.}$$

con las salvedades siguientes:

Los valores anteriores para las constantes vienen referidos a

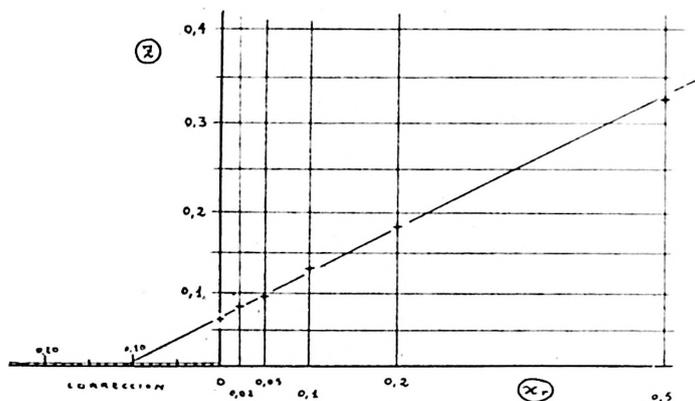


Figura 3

Extrapolación para el cálculo de la corrección por velocidad de descarboxilación residual.

peso del piridoxal-5-fosfato cálcico que nos cedió amablemente K. Folkers («Research Laboratories, Merck & Co., Inc.» Rahway, N. J., U. S. A.), y cuyo proceso de obtención no fué publicado hasta varios años después (8). Se nos indicó que la pureza de dicho muestra podía considerarse comprendida entre el 50 % (análisis químico) y el 80 % (análisis biológico) (12). Para cálculos efectuados en nuestro trabajo anterior (1) y en vista de algún análisis posterior (9) aceptamos una pureza probable del 70 %, con lo cual los valores de las constantes se pudieron dar en unidades más generales:

$$K = 1,7 \cdot 10^8 \text{ moles/l.} \quad ; \quad c = 8,1 \cdot 10^{-3} \text{ seg.}$$

valores que aquí no utilizaremos debido a la inseguridad del valor riqueza 70 %.

Los valores aceptados para las constantes sólo pueden emplearse duplicando exactamente las condiciones en que se obtienen las velocidades de descarboxilación en el aparato de Warburg; las nuestras fueron las siguientes:

Temperatura ..... 30° C.  
 pH ..... 5,5 (mezcla amortiguadora de acetato 0,2M.)  
 apodecarboxilasa ..... tirosínica obtenida del *Streptococcus faecalis* R.  
 atmósfera en los vasos ..... aire.

Estas son las condiciones corrientemente usadas por los autores, salvo la temperatura que algunos prefieren la de 28'5° C. y la atmósfera en los vasos que parece más correcto hacerla inerte mediante el desplazamiento del aire con nitrógeno.

Por parte del apofermento no parece que una mayor o menor purificación, o bien, diferencias pequeñas en el modo de obtención, puedan influir en el valor de las constantes. Por si ello pudiera ocurrir, en nuestro anterior trabajo describimos con toda exactitud el procedimiento de obtención de nuestra apodecarboxilasa tirosínica (1). Una cierta purificación, aunque no parece necesaria, podría llevarse a cabo mediante procedimientos ya estudiados por algún autor (3) y entonces sería conveniente comprobar nuevamente los valores de las constantes, aún para las condiciones dichas anteriormente.

#### RECTIFICACIÓN DE LA CURVA DE ACTIVACIÓN

El problema de encontrar un cambio de variables que nos conviertan la curva de activación en una recta, no tiene una solución exacta y sencilla. Por ello ha sido necesario buscar una fórmula aproximada.

Empezamos haciendo el cambio de variable  $y = z \cdot V$  en la cual  $z$  es la *velocidad reducida de descarboxilación* (velocidad respecto la máxima) y de ella ya hicimos amplio uso en nuestro anterior trabajo.

$$K = \frac{(x - c \cdot y) (V - y)}{y}; \quad K = \frac{(x - c \cdot z \cdot V) (1 - z)}{z}$$

Y realizando operaciones, resulta la siguiente ecuación en forma implícita:

$$c \cdot V \cdot z^2 - x \cdot z - c \cdot V \cdot z + x = 0$$

Y despejando  $x$  tendremos en forma explícita :

$$x = c \cdot V \cdot z + K \frac{z}{1 - z} \quad (\text{Fórmula exacta})$$

Esta fórmula no tiene una forma conveniente para la rectificación y para dársela se ensayan algunas simplificaciones :

Para pequeños valores de  $x$  y  $z$  los dos primeros términos de la ecuación implícita son pequeños y al ser de signo contrario puede prescindirse del primero o de ambos (la eliminación del segundo solamente, no conduce a ninguna simplificación de la ecuación); así se obtiene :

$$x = (c \cdot V + K) z \quad (\text{Fórmula simplificada núm. 1})$$

$$x = (c \cdot V + K) \frac{z}{1 - z} \quad (\text{Fórmula simplificada núm. 2})$$

mediante las cuales sería posible reducir la curva de activación a recta si fuesen suficientemente aproximadas. La aproximación que buscamos es la de un 5 % en los valores de  $x$  para un margen de valores de  $z$  comprendidos entre 0'0 y 0'6 y para el caso en que  $V$  tenga un valor alrededor de 500.

La primera fórmula simplificada representa lo que hizo Gale, pues conduce a admitir linealidad entre  $x$  y  $z$ ; la segunda corresponde a colocar en ordenadas los valores de  $z$  según la función  $z/1 - z$ , lo cual nos rindió buenos servicios en el trabajo anterior.

El error cometido en estas dos simplificaciones puede verse en la figura 1, parte superior, y no permite que sean empleadas más allá de  $x = 0'2$  (los errores están trazados para  $V = 500$ ).

El hecho de que ambas aproximaciones presenten errores de signo contrario hizo prever que una ecuación de forma general :

$$x = (c \cdot V + K) \frac{z}{1 - b \cdot z}$$

podría ser una buena aproximación si se escogía el parámetro  $b$  de acuerdo con el valor de  $V$  para el que se deseara la aproximación.

De acuerdo con ello se ensayan dos nuevas fórmulas, cuya aproximación figura también en la parte superior de la fig. 1 :

$$x = (c \cdot V + K) \frac{z}{1 - \frac{z}{2}} \quad (\text{Fórmula simplificada núm. 3})$$

$$x = (c \cdot V + K) \frac{z}{1 - \frac{z}{3}} \quad (\text{Fórmula simplificada núm. 4})$$

las cuales suponen ya una gran mejora sobre las anteriores.

Haciendo el parámetro  $b = 0,4$ , se obtiene la ecuación definitiva para la aproximación buscada :

$$x = (c \cdot V + K) \frac{z}{1 - 0,4 z} \quad (\text{Fórmula simplificada núm. 5})$$

Para darnos cuenta del grado de aproximación que representa esta ecuación, en la parte inferior de la figura 1 hemos trazado el error de la misma a mayor escala para el valor  $V = 500$  acompañando también las curvas de error para los valores  $V = 400$  y  $V = 600$ , lo cual nos demuestra que es suficientemente aceptable para valores de  $V$  que no se separen mucho de 500.

Esto representa que el valor  $\frac{z}{1 - 0,4 z}$  puede tomarse como proporcional a  $x$  en el intervalo de valores de  $z$  comprendido entre 0,0 y 0,6.

#### APLICACIÓN DE LA ECUACIÓN SIMPLIFICADA AL PROBLEMA ANALÍTICO

Tratándose de llevar a cabo la determinación cuantitativa de una muestra de codescarboxilasa (piridoxal-fosfato) se supone que dicha substancia ha sido disuelta y diluída hasta una concentración conveniente (anotando pesada y diluciones) para el análisis (ver su valor más adelante) que llamaremos  $r$ . De esta *disolución madre* es difícil tomar cantidades menores de 0'5 c.c. con cierta precisión y, por ello, se practican diluciones sucesivas para obtener concentraciones menores cuyo valor referido a la solución madre serán de 0'5, 0'2, 0'1, 0'05 y 0'02; números a los cuales llamaremos  $x$  (concentración relativa).

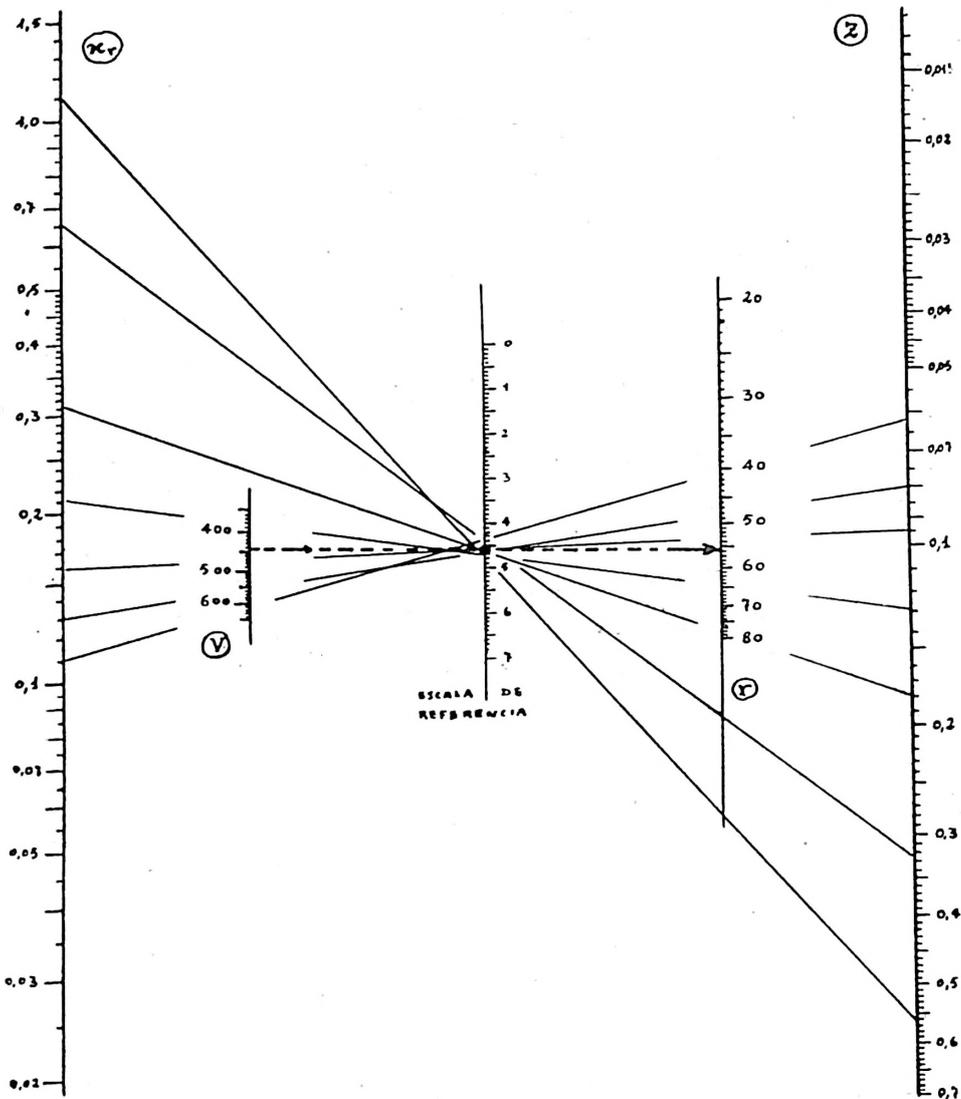


Figura 4

Abaco para el cálculo final del análisis.

Teniendo en cuenta (ver técnica manométrica más adelante y en nuestro anterior trabajo) que se toma 1 c.c. de solución de cofermento por cada vaso que totalizará 3 c.c. de líquido, la concentración de cofermento será :  $\frac{x \cdot r}{3}$  y, con ello, la ecuación simplificada de activación queda transformada en :

$$\frac{x \cdot r}{3} = (c \cdot V + K) \frac{z}{1 - 0'4 z}$$

Para resolver esta ecuación y hallar el valor de  $r$  basta, matemáticamente hablando, con un solo par de valores  $x$ ,  $z$ , pero, como son precisos varios de ellos para corregir la descarboxilación residual, a la vez que el método de Warburg resulta más seguro con varios valores, creemos recomendables efectuar seis mediciones de la velocidad de descarboxilación con las cinco diluciones de cofermento antedichas más otras sin él, esto aparte de las que son necesarias para determinar  $V$  (ver más adelante).

Una vez llevada a cabo la corrección por descarboxilación residual, se puede llevar los valores de  $z$  a un gráfico de abscisas  $z$  lineales y, en ordenadas, la función  $\frac{z}{1 - 0'4 z}$ , con lo cual se podrán fácilmente unir con una recta los diversos puntos y el origen de coordenadas:

$$\frac{z}{1 - 0'4 z} = \frac{r}{3(c \cdot V + K)} \cdot x$$

de la pendiente de la recta se puede deducir, por cálculo, el valor de  $r$  o concentración de la disolución madre, ya que  $(c \cdot V + K)$  es conocido. Este cálculo se puede realizar con un mínimo de tiempo y esfuerzo mediante un ábaco y en dos fases según las ecuaciones:

$$\frac{z}{1 - 0'4 z} = A \cdot x ; A = \frac{r}{3(c \cdot V - K)}$$

en donde  $A$  es una variable auxiliar. Para ello, se ha escogido un ábaco de rectas paralelas (2) conforme a las ecuaciones:

$$\log \frac{z}{1 - 0'4 z} = \log A - \log x$$

$$\log A - \log 3 - \log (c \cdot V - K) = \log r$$

El ábaco es de construcción sencilla para el que esté mediana-

mente versado en este campo y lo damos al final del trabajo junto con un ejemplo (fig. 4).

### Material y métodos

#### ESQUEMA ANALÍTICO

Mediante un piridoxal-fosfato relativamente concentrado (no «standard») se determinan tres puntos, por duplicado, de la curva de descarboxilación a relativamente altas concentraciones de cofermento (piridoxal-fosfato) con el fin de determinar, por extrapolación gráfica, la velocidad máxima de descarboxilación de la cantidad de apodescarboxilasa usada. Si el material a analizar permite concentraciones del mismo 1  $\gamma$ /c.c., esta determinación puede realizarse con él sin necesidad de tener una muestra de piridoxal-fosfato sintético.

Se determinan seis puntos de la curva de descarboxilación mediante diversas diluciones adecuadas de la materia a analizar.

Se traza parte de la curva de activación en forma rectificada para determinar la corrección por descarboxilación residual y para detectar algún valor muy erróneo. Nótese bien que sólo debe depreciarse un valor (repitiéndolo o no) cuando se aleja de la recta trazada en más de cuatro veces, lo que acostumbran a oscilar a un lado y otro.

Colocación de los resultados corregidos en el ábaco y lectura en el mismo de la concentración de piridoxal-fosfato en la disolución madre. Sabiendo la pesada y las diluciones hasta la disolución madre, se llega al resultado definitivo del análisis.

#### MATERIAL

Como apodescarboxilasa se ha utilizado la tirosínica procedente del *Streptococcus faecalis* R., obtenida tratando los microbios con acetona, según el procedimiento dado en nuestro anterior trabajo (1).

Como solución concentrada de piridoxal-fosfato para la determinación de  $V$ , se ha usado una disolución de piridoxal-fosfato cálcico en hidróxido sódico 0'005 M. a la concentración de 1 mg./l. Esta disolución no es tan estable como la preparada en mezcla amortiguadora borato pH = 8'5, pero se la puede usar hasta que haya perdido un 30 % de su actividad.

Para la extracción de la codescarboxilasa del material a analizar, no hemos comprobado ninguno de los métodos reseñados en la bibliografía a ese respecto, ya que son función del material a trabajar y de las posibilidades del laboratorio; pero la trituración

con arena de cuarzo, u otro material inerte, con la adición de pequeñas cantidades de hidróxido sódico 0'1 M. hasta conseguir un pH de 8 a 10, puede ser una técnica útil cuando no se ocurre otra cosa. Por centrifugación se separan los restos celulares insolubles, después de un cierto calentamiento para inactivar todos los fermentos que pudieran estorbar. Esta disolución puede conservarse en nevera (no mucho tiempo) y realizar una dilución hasta la concentración adecuada de 30-60  $\text{mg./c.c.}$  (solución madre). La pesada inicial y las diluciones hasta llegar a esta disolución madre, deben anotarse, ya que el ábaco final sólo da la concentración de esta disolución madre.

#### EJEMPLO

A continuación figura un ejemplo ilustrativo que corresponde al análisis cuantitativo de un piridoxal-fosfato cálcico que se mezcló con arena de cuarzo pulverizada, en la relación de 1 : 200 y se guardó en nevera y atmósfera seca varios meses.

De ella se tomaron 12  $\text{mg.}$  y se disuelven en 1 l. de hidróxido sódico 0'005 M. (60  $\text{mg.}$  de piridoxal-fosfato/c.c.) y se toma como disolución madre, de la cual llevan a cabo diluciones hasta las concentraciones : relativas (x ) 0'5, 0'2, 0'1, 0'05 y 0'02, mediante una pipeta graduada de 10 c.c. (tomar 10 u 8 según la disolución) y un balón aforado de 20 c.c. Diluir con hidróxido sódico 0'05 M. siempre, para el cofermento. De cada una de estas diluciones se toma 1 c.c. para el vaso del aparato de Warburg correspondiente y, en un sexto vaso, se usa 1 c.c. de hidróxido sódico 0'005 M.

La cantidad de apodescarboxilasa tirosínica por vaso fué de 3  $\text{mg.}$ , conseguida disolviendo unos 46  $\text{mg.}$  (la cantidad exacta no importa mientras se consiga que V esté comprendido entre 400 y 600) en unos 20 c.c. de solución amortiguadora de acetato 0'2 M. de  $\text{pH} = 5'5$  y usando 1'3 c.c. de esta suspensión bien homogenizada por vaso.

La suspensión de tirosina contenía 60  $\text{mg.}$  de l.-tirosina recristalizada en 11 c.c. de solución amortiguadora de acetato de  $\text{pH}$  y concentración antedichos. Se usan 0'7 c.c. por vaso del aparato de Warburg y se colocan en el brazo lateral.

El cálculo de la velocidad de descarboxilación se ha llevado a cabo por el procedimiento gráfico detallado en nuestro anterior trabajo (1) y aquí sólo es menester remarcar que, para nosotros, y es siempre velocidad de descarboxilación por c.c. de líquido y, por tanto, teniendo en cuenta que a dicha velocidad por vaso se la llama Q, será  $y = Q/3$ .

Así los resultados obtenidos son los siguientes :

para la extrapolación y determinación de  $V$

concentración de piridoxal-fosfato concentrado	1	1/2	1/4
velocidad de descarboxilación (y)	430	422	397
	432	417	390

para la curva de activación

concentración relativa (x)	1	0'5	0'2	0'1	0'05	0'02	0'00
velocidad de descarboxilación (y)	248	146	81	58	42	36	28

A continuación se lleva a cabo la determinación de  $V$  para la cantidad de apofermento usada, extrapolando los valores obtenidos hasta  $x = \text{infinito}$  en un gráfico en que se toma como abscisas  $1/x$  y en ordenadas  $1/y$ . En la figura 2 damos el correspondiente gráfico con las escalas de inversos trazadas con cierta amplitud para que pueda servir para otras extrapolaciones aparte de la presente. El resultado es de  $V = 448$ .

La segunda determinación a realizar, es la del cofermento que corresponde a la descarboxilación que presenta el apofermento, para lo cual se utiliza el gráfico antedicho con la escala funcional

$z$

en ordenadas. En la figura 3, se puede ver el conjunto

$1 - 0'4 z$

de los datos y cómo se halla el valor para la corrección, aquí de 0'11 en unidades  $x$  (respecto la solución madre). El punto correspondiente a  $x = 1$  no conviene incluirlo en este gráfico, ya que perdería precisión y los puntos que se toman son ya suficientes.

Aumentando todos los valores de  $x$  en 0'11 unidades y dividiendo los de  $y$  por el valor  $V = 448$ , obtendremos la tabla definitiva de valores para el cálculo final:

x (corregidos)	1'11	0'66	0'31	0'21	0'16	0'13	0'11
z	0'554	0'326	0'181	0'130	0'094	0'080	0'082

Ahora se llevan estos valores a las escalas correspondientes del ábaco (fig. 4) y se unen cada par con una recta notando sobre la escala de referencia central el punto medio de los que produce cada recta al cortar la dicha escala de referencia; uniendo con una recta este punto con el correspondiente valor de  $V$  en la escala pequeña de la izquierda y prolongando hacia la derecha se encuentra el valor de  $r$ , en nuestro caso igual a 56  $\text{m}\mu\text{/c.c.}$  Esto corresponde a un 93 % del piridoxal-fosfato que debía contener la muestra analizada.

### Resumen

Se describe un método de determinación de cod Descarboxilasa (piridoxal-fosfato) que no precisa de un «standard» y que solamente se basa en el

conocimiento de las constantes de la ecuación de activación modificada según un trabajo de los mismos autores.

Se obtiene una ecuación aproximada que permite llevar a cabo la rectificación de la curva de activación, utilizando ésta para determinar la corrección por descarboxilación residual.

El cálculo del análisis se simplifica extraordinariamente por la utilización de un ábaco construido al efecto.

### Summary

The authors describe a method of determination of codescarboxylasa (pyridoxal-phosphate) which does not require a «standard» and is based only on the knowledge of the constants of equation of activation modified according to a work of the same authors.

An approximate equation is obtained which permits carrying out a rectification of the activation curve, utilizing the latter to determine the correction by residual descarboxilation. The calculation of the analysis is extraordinarily simplified by the use of an nomogram constructed for the purpose.

### Bibliografía

1. CONDAL, L. y COSIN, R. : *R. esp. Fisiol.* **8**, 153. 1952.
2. DAVIS, D. S. : *Empirical Equations and Nomography.* 1943.
3. EPPS, H. M. R. : *Biochem. J.* **38**, 242. 1944.
4. GALE, E. F. : *Advances in Enzymologie.* **6**, 1. 1946.
5. GALE, E. F. y EPPS, H. M. R. : *Biochem. J.* **88**, 250. 1944.
6. GUNSALUS, I. C., BELLAMY, W. C. y UMBREIT, W. W. : *J. Biol. Chem.* **155**, 685. 1944.
7. GUNSALUS, I. C., UMBREIT, W. W., BELLAMY, W. D. y FORST, C. E. : *J. Biol. Chem.* **161**, 743. 1945.
8. HEYL, D., LUZ, E., HARRIS, S. A. y FOLKERS, K. : *Jour. Am. Chem.* **155**, **73**, 3.430. 1951.
9. MCNUTT, W. S. y SNELL, E. E. : *J. Biol. Chem.* **173**, 801. 1948.
10. SLOANE-STANLEY, G. H. : *Biochem. J.*, **44**, 567. 1949.
11. UMBREIT, W. W., BURRIS, R. H. y STAUFFER, U. F. : *Manometric Techniques and related Methods for the Study of Tissue Metabolism.* 1945.
12. UMBREIT, W. W., BELLAMY, W. D. y GUNSALUS, I. C. : *Arch. Biochem.* **7**, 185. 1945.

