

Departamento de Bioquímica
I. E. de Fisiología y Bioquímica (Madrid)

Valoración manométrica de aminoácidos basada en la determinación de sus grupos carboxilo

por C. García del Amo

(Recibido para publicar el 10 de marzo de 1957)

En un trabajo anterior (1) hemos estudiado la manera de poner a punto una técnica manométrica para valorar aminoácidos con el aparato diseñado por el Dr. Monche (4) para la microdeterminación de gases en sangre, y en él dimos cuenta de las modificaciones introducidas por nosotros en dicho aparato y los resultados obtenidos en la determinación de los grupos —NH_2 (nitrógeno amínico) en diversos aminoácidos.

En el presente trabajo vamos a estudiar la manera de valorar los grupos —COOH de los aminoácidos libres por la reacción con la ninhidrina (6) en el mismo aparato, para lo que ha sido necesario dotarle de los dispositivos complementarios que describiremos.

Material y métodos

Fundamento. — Los aminoácidos reaccionan con la ninhidrina, al hervirles en solución acuosa a pH comprendido entre 1 y 5, desprendiendo su CO_2 cuantitativamente en pocos minutos (reacción de Ruhemann [5]).

La reacción puede servir para valorar los aminoácidos por colorimetría (8), sin embargo, es más constante el desprendimiento de CO_2 que cualquier otro aspecto de la reacción (7) y, por esto, hemos seguido esta técnica para su valoración.

APARATOS

1.º Aparato manométrico diseñado por el Dr. Monche (4), según la construcción efectuada para nosotros (*) con agitación interna (1).

2.º Vasiija especial para conservar solución de NaOH 0,5 N exenta de CO_2 (fig. 1). Un embudo de decantación de 250 c. c. va protegido con un tubo lleno de cal sodada en su parte su-

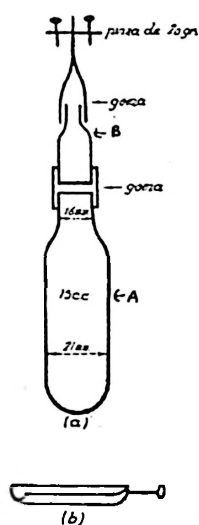


Figura 1

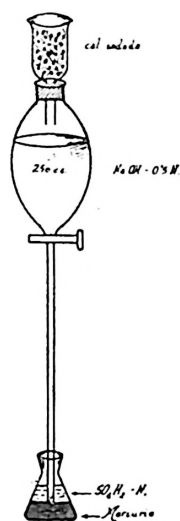


Figura 2

perior y el tubo inferior terminado en punta fina, se introduce en un pequeño recipiente con mercurio, cubierto con unos c. c. de $\text{SO}_2\text{H}_2\text{N}$.

3.º Alumina cristalizado (alumdum) o cualquier otro medio de regular la ebullición.

4.º Vasijas para la reacción: Utilizamos unos recipientes de vidrio Pirex capaces de resistir el vacío y poderse calentar hasta el punto de ebullición del agua (1 — 1,15 mm. de grosor), de capacidad de 15 c. c. (fig. 2 a). Consta de dos partes: A) El recipiente propiamente dicho, es un tubo de ensayo de 21 milímetro de ancho y la parte superior estrangulada hasta un calibre de 16 mm. B) El cierre: consiste en una pieza de igual calibre, por su parte inferior (16 mm.) que se ajusta perfectamente al cuerpo principal por una goma fuerte y flexible.

(*) Por la casa Proton (Barcelona)

La goma no debe contener azufre ; en todo caso lavarla primero con sosa, después con ácido clorhídrico caliente y abundante agua destilada antes de usarla.

5.° Pinzas — Para el cierre de las vasijas : Deben pesar más de 20 gr. (para resistir la presión del CO_2 al calentarlo a 100°). Nos han sido construídas según modelo especial, pero pueden usarse en caso necesario, dos pinzas corrientes de tornillo puestas encontradas para sumar sus pesos.

6.° Cucharillas para medir la ninhidrina y el tampón : Nos fueron construídas de 4 tamaños, para tomar 50 y 100 mm. de ninhidrina y 50 y 100 mm. de tampón de acuerdo con el diseño de VAN SLYKE (6) fig. 2 (b). Las de 50 se hacen de tubo de 3 a 4 mm. de calibre y las de 100 de tubo de 5 mm. La precisión requerida en estas medidas es de $\pm 10\%$.

7.° Baño de agua : Se precisa alcanzar una temperatura de 99 a 100° a los dos minutos de introducir las vasijas de reacción en el baño, y que la temperatura no descienda por debajo de 98° al sumergirlas en él. Para esto es preciso un baño cilíndrico de bastante capacidad y de altura de 20 a 25 cm. y en el que entre cómodamente una gradilla circular para sostener las vasijas verticalmente. En Madrid la temperatura de ebullición del agua no pasa de los 97° . Después de diversos ensayos adoptamos una mezcla de dos partes de agua y una parte de glicerina para conseguir un punto de ebullición de 100° .

REACTIVOS

a) Ninhidrina Merck en polvo (tubitos de 1 gr.).

b) Citrato tampón. Se preparan dos tampones diferentes, para pH 4,7 y para pH 2,5. El primero es una mezcla de 17,65 gr. de citrato trisódico ($\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \text{Na}_3, 2\text{H}_2\text{O}$) y 8,40 gr. de ác. cítrico ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7, \text{H}_2\text{O}$). El segundo tampón se prepara con 2,06 gr. de citrato trisódico y 19,15 gr. de ácido cítrico. Los componentes deben estar finamente pulverizados, en mortero de ágata, antes de mezclarlos en las proporciones dichas. En una prueba en blanco deben estar exentos de CO_2 .

c) solución 0,5 N de NaOH, con mínima cantidad de CO_2 . Se prepara bien esta solución de la siguiente manera : Se mezclan partes iguales en peso de NaOH de buena calidad y agua destilada. Se deja depositar el carbonato, durante un par de días. Con una pipeta se toman 7 c. c. y se llevan a un matraz de 250 c. c. dejando caer la solución en el interior del agua. Se valora la solución, que debe ser aproximadamente 0,5 M y se calcula la cantidad de solución exacta (aproximadamente 7 c. c.) que son necesarios para obtener dicha concentración. Para preparar la solución definitiva, se coloca en un matraz aforado de

250 c. c. 240 c. c. de agua destilada y se introduce en él la cantidad calculada de sosa concentrada. Se añaden unas gotas de sulfato de alizarina al 1 % (indicador) y se completa el volumen. La solución se trasbasa a la vasija especial que hemos descrito (fig. 1).

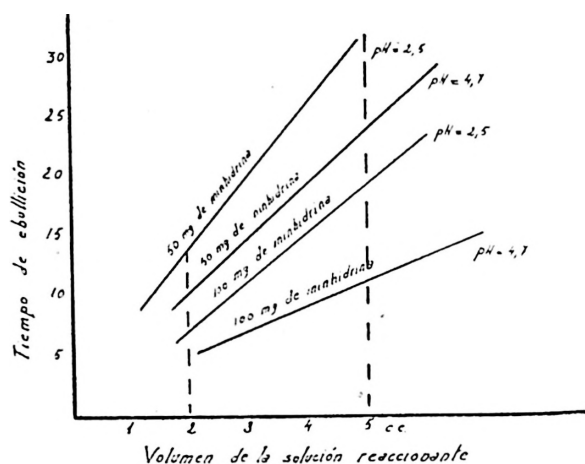


Figura 3

Esta solución si está bien preparada, desprende una cantidad de CO_2 que ejerce la presión aproximadamente de 6 mm. en la prueba «en blanco» efectuada con 2 c. c. de NaOH 0,5 N.

d) Solución de NaOH aproximadamente 5 N: Se prepara a partir de la solución madre de NaOH 1/1 diluyendo un volumen en 3 de agua.

e) Ácido láctico aproximadamente 2N: Se prepara mezclando 2 volúmenes de ácido láctico ($d = 1,20$) con 10 volúmenes de agua destilada.

Con nuestro aparato (*) pueden hacerse submicro y micro-determinación, los límites de tamaño de muestra para cada tipo de análisis y demás condiciones se resumen en la tabla I.

TABLA I

Tipo de análisis	Volumen de la lectura en c. c.	Nitrógeno carboxílico Nco_2 en mg.	Carbono carboxílico Cco_2 en mg.
Submicro	0,5	0,035 — 0,18	0,04 — 0,21
Micro	2,0	0,14 — 0,7	0,2 — 0,8

(*) Véase fig. 4 de nuestro trabajo anterior (1)

Para nuestro trabajo hemos adoptado el tipo «micro» a 2,0 c. c. de volumen. Partimos de una muestra de 4 a 8 mg. de aminoácido o la disolución que lo contenga, en un volumen de 1 a 5 c. c. que se llevan a la vasija de reacción (fig. 2) y a continuación se añade el tampón para conseguir el pH deseado, (en nuestro caso 2,5). Si en el problema no existen más ácidos álcalis o sustancias tampón que los propios aminoácidos, directamente se añade con la cucharilla correspondiente 50 mg. del tampón, si el volumen es de 1 a 2 c. c. Si el volumen es de 3 a 5 c. c. añadiremos en la misma forma 100 mg. de tampón.

Si en el problema hay ácidos o álcalis en exceso se añade una gota de azul de bromofenol al 1 % u otro indicador con zona de viraje entre 3 y 4; se agrega álcali o ácido hasta alcanzar la zona ácida del indicador antes de añadir el tampón en la forma indicada anteriormente.

Extracción del CO_2 que contenga el problema. — Se añaden unos cuantos trocitos de Alumdum o cualquier otro medio de evitar ebullición tumultuosa y una gota de alcohol caprílico si se sospecha la formación de espuma. Se hace hervir el problema en una llama fuerte durante 20 a 30 segundos, y en caliente se cierra la vasija con una pinza de las descritas (5.º).

La vasija, conteniendo la solución, debe enfriarse por lo menos a 20° si el pH es 4,7 y a 25° para pH 2,5, pero para más seguridad enfriando en hielo 3 minutos, (unos 10°), se pueden tardar varios minutos en la operación siguiente, sin pérdida apreciable de CO_2 .

Adición de ninhidrina y evacuación de la vasija. — Se tienen dispuestos los cierres (B) de las vasijas de reacción (fig. 2), para lo cual previamente se sumergen en agua o en un lubricante líquido para que puedan conectarse con rapidez y cierran perfectamente. La pinza puesta en la goma y adaptada a la bomba de vacío. A la solución enfriada se añade la ninhidrina medida con la cucharilla descrita (6.º), a razón de 50 mg. si el volumen es de 1 a 2 c. c. y 100 mg. si es de 3 a 5 c. c. Se adapta rápidamente las dos partes que forman la vasija completa, se hace el vacío con la trompa de agua, cerrándola con las pinzas antes de desconectar la trompa.

En análisis en serie es conveniente preparar hasta aquí todas las muestras que se calentarán juntas.

Calentamiento. — Las vasijas así preparadas se sumergen en el baño a 100° colocadas en un soporte ad-hoc (7.º). El tiempo que dura el calentamiento depende del volumen, de la cantidad de ninhidrina añadida y del pH (fig. 3). Transcurrido el primer minuto de calentamiento, las vasijas deben agitarse sin sacarlas del baño para repartir bien la ninhidrina y deben quedar cubiertas de agua hasta la pinza.

En nuestro análisis a pH fué 2,5, el tiempo requerido es :

2 c. c. de solución.	12 a 14 minutos.
5 c. c. de solución.	32 minutos.

para 50 mg. de ninhidrina.

Enfriamiento de la solución. — Las vasijas se trasladan a otro baño de agua cuya temperatura sea de 40 a 50°, donde espera a ser conectados al aparato de absorción.

Absorción del CO₂ por la solución alcalina en nuestro aparato manométrico. — Durante el período de calentamiento de la solución se prepara el aparato de extracción. (**) 1.º. Se llena de agua la envoltura externa de la cámara para que tome la temperatura ambiente que se mide con el termómetro T.

2.º) Manipulando las distintas llaves se expulsa totalmente el aire del aparato, lo que se comprueba por el golpe seco que da el mercurio sobre las llaves *c* y *b* (1) al hacerlo ascender.

3.º) Se hace descender el mercurio con ayuda del bulbo de nivel L, hasta que alcance la zona del agitador magnético y en este momento se cierra la llave de conexión con el manómetro y se desplaza la escala móvil para hacer coincidir el O con el nivel del mercurio.

4.º) Abriendo la llave *a* la cámara de reacción se llena por completo de mercurio. Para introducir en la cámara la solución de NaOH 0,5N directamente desde la vasija especial (fig. 1) se ponen en la copa E unas gotas de mercurio para recibir el extremo de dicha vasija. La admisión del álcali se regula mejor abriendo la llave *b* y controlando el flujo de mercurio con la llave *a* y se detiene cuando el mercurio C está a 1 mm. por encima de la señal 2 c. c. (El bulbo estará en la anilla inferior del soporte). El recipiente, se retira y con mucho cuidado se deja entrar el mercurio suficiente para sellar el capilar de la llave *b*, la pequeña cantidad de solución alcalina que ocupaba el capilar hace llegar el enrase justo a 2,0 c. c.

La copa E se lava con solución de ácido láctico diluída, pues nunca deben permanecer las paredes de la llave mojadas con álcali.

La vasija de reacción se conecta con la cámara manométrica por el capilar lateral de la llave *b*. En este momento el mercurio debe alcanzar el centro de la cámara y frasco y cámara se ponen en conexión separando la pinza y haciendo girar la llave *b*.

El CO₂ se hace pasar de la vasija de reacción a la solución alcalina por ascenso y descenso del nivel de mercurio, tardando en cada embolada unos 10 segundos y agitando constantemente

(**) Véase la figura 4 de nuestro trabajo anterior (1).

la vasija de reacción. El número de emboladas depende del volumen de la solución. Con 1 c. c. son necesarios 6, con 2 c. c. 7, con 3 c. c. 8, con 4 c. c. 9 y con 5 c. c. hacen falta 10, si la temperatura se mantiene de 35 a 40°. Si la temperatura ha descendido a 20° hacen falta 3 veces más emboladas, agitando constantemente la vasija.

Al terminar la última embolada el mercurio debe quedarse al mismo nivel que al comenzar, es decir, en el centro de la cámara. Se cierran las llaves *a* y *b* y se desconecta la vasija de reacción, sellando con mercurio el capilar de enlace, mediante una especie de frasquito lavador conteniendo mercurio (8).

DETERMINACIÓN DEL CO₂ EN EL APARATO MANOMÉTRICO

Expulsión de los gases no absorbidos. — Una vez absorbido el CO₂ por la solución alcalina y cerrada la llave *b* los gases en la cámara C están a una presión positiva, cuando el bulbo de nivel L está situado en la anilla superior. Cerrada *a* y abierta *b* parte de los gases salen por su propia presión. Manejando *a* cuidadosamente se deja entrar mercurio hasta que la solución alcalina alcance el capilar de la llave *b*, cerrando sucesivamente *a* y *b*.

El bulbo se sitúa en la posición inferior y con una pipeta se ponen unas gotas de mercurio en la copa E y con él se sella el capilar correspondiente. Si en esta operación entrase una pequeña burbuja de aire no tiene importancia si no está cargado de CO₂.

Extracción del CO₂ y lectura de P₁. — Con una pipeta de llave provista de tope de goma, se mide exactamente 1 c. c. de ácido láctico 2 N, que se deja entrar directamente en la cámara con ayuda de la llave *a*, sellando con mercurio de nuevo el capilar correspondiente. Se hace descender el mercurio en la cámara hasta la zona de acción del imán y se agita durante 20 ó 30 segundos. Si el gas extraído hace descender ligeramente el nivel de la solución, se consigue corregirlo dejando entrar algo más de mercurio y se agita de nuevo durante dos minutos para completar la extracción del CO₂. Abriendo la llave *a* entra mercurio en la cámara hasta enrasar el volumen deseado (2,0 c. c. en nuestro caso) cerrándola a continuación.

En este momento se conecta el aparato de extracción con el manómetro abriendo la llave B y se hace la lectura de P₁ exactamente a 2,0 c. c. Se cierra la llave B.

Reabsorción de CO₂ y lectura de p₂. — Leído p₁ se abre la llave *a* estando el bulbo de nivel en la anilla inferior con lo que el gas en la cámara se encuentra a una presión ligeramente negativa. En la copa E se miden 0,5 c. c. de NaOH 5N y se deja

pasar el álcali cuidadosamente sin que entre nada de aire, sellando el capilar con mercurio y lavando la copa E con ácido láctico diluido. Para mezclar bien la solución alcalina y asegurar la absorción del CO_2 se hace ascender y descender el mercurio unas tres veces, pero no hasta el tope de la cámara si no aproximadamente hasta el volumen a que se hizo la medida, y enrasando al mismo nivel que la primera vez se mide la presión p_2 .

La presión es $P_{\text{co}_2} = p_1 - p_2 - c$ (I) en el que c es una corrección debida a los reactivos o prueba «en blanco», que se obtiene repitiendo la operación en idénticas condiciones, pero sustituyendo el problema por el mismo volumen de agua destilada. El nitrógeno carboxílico o el carbono carboxílico se calculan con las fórmulas II.

$$\begin{aligned} \text{Mg } C_{\text{co}_2} &= P_{\text{co}_2} f_1 \\ \text{(II)} \quad \text{Mg } N_{\text{co}_2} &= P_{\text{co}_2} f_2 (*) \end{aligned}$$

Los valores de los factores están dados en la tabla II y han sido calculados de acuerdo con la ecuación de V. SLVKE y FOLCH (8).

$$f_1 = \frac{0,007099 i \cdot a}{1 - 0,00384 t} \quad \left(1 - \frac{S}{A - S} \alpha'\right)$$

a = Volumen a que se hace la determinación (0,5 c. c.).

A = Volumen total de la cámara (50 c. c.).

S = Volumen de la solución presente (3 c. c.).

i = Una corrección empírica debida a la absorción del CO_2 por la solución al disminuir el volumen de $A-S$ a a c. c. (es prácticamente despreciable en análisis corrientes).

α' = es el coeficiente de OSTWALD.

APLICACIÓN

Hemos utilizado los siguientes aminoácidos representantes de los distintos tipos. Monoamino monocarboxílico alifático Glicocola y Valina. — Monoamino-carboxílico alifático, á. aspártico y á. glutámico. Diamino-monocarboxílico alifático, lisina y arginina. — Monoamino monocarboxílico azufrado: metio-

(*) El «nitrógeno carboxílico» es igual al carbono carboxílico multiplicado por la relación $\frac{14,01}{12,01}$.

TABLA II

Factores por los que hay que multiplicar P_{CO_2} para obtener Mg de Carbono carboxílico o Nitrógeno carboxílico.

Temperatura °C	Carbono carboxílico (f_1)		Nitrógeno carboxílico (f_2) (%)	
	$\alpha = 2,0$	$\alpha = 0,5$	$\alpha = 2,0$	$\alpha = 0,5$
15	0,001447	0,0003688	0,001688	0,0004303
16	39	69	79	0,0004280
17	32	50	71	58
18	25	32	62	37
19	18	14	54	16
20	11	0,0003596	46	0,0004195
21	04	78	38	74
22	0,001397	61	30	54
23	91	44	23	35
24	84	28	15	16
25	78	12	08	0,0004097
26	71	0,0003496	0,001599	79
27	65	80	93	60
28	59	65	85	42

nina. — Monoamino-monocarboxílico aromático : triptófano. En todos ellos hemos determinado el valor del nitrógeno carboxílico y del carbono carboxílico por el procedimiento descrito.

Los valores encontrados van en la Tabla III comparados con los obtenidos en la valoración del Nitrógeno amínico (N. a.) de nuestro trabajo anterior (1).

TABLA III

Aminoácidos	P. M.	Valores teóricos			Valores experimentales		
		Cco ₂	Nco ₂	N. a.	Cco ₂	Nco ₂	N. a.
Glicocola	75,05	16,0	18,7	18,7	16,07	18,80	19,00
Valina	117,0	10,20	11,90	11,90	9,95	11,59	11,73
A. glutámico	47,0	16,33	19,00	9,53	16,71	19,50	9,83
A. aspártico	133	18,04	21,0	10,53	17,8	20,6	10,10
Lisina	183,5	6,54	7,62	15,25	6,35	7,41	14,60
(monocloruro)							
Arginina	174	7,50	8,70	16,0	7,21	8,50	15,91
Metionina	149	8,06	9,39	9,39	7,96	9,30	9,47
Triptófano	204,22	5,88	6,86	6,86	5,80	6,84	6,80

Discusión

Comparando los resultados obtenidos para el N_{CO_2} y los obtenidos para el N. a. nos encontramos con una diferencia bien marcada, de acuerdo con lo que era de esperar dada la constitución de los distintos aminoácidos. El ácido aspártico y el ácido glutámico dan un porcentaje de N_{CO_2} muy elevado. Si calculamos la concentración en aminoácidos libres a partir de este dato en un problema, el resultado no estará de acuerdo con el obtenido al medir el nitrógeno amínico (N. a.) (8) y sólo coincidirán si no existen aminoácidos de este tipo o si están compensados con el porcentaje de aminoácidos diamino-monocarboxílicos. Comparando ambos datos (N_{CO_2} y N. a.) se puede deducir en una mezcla de dos o más aminoácidos el porcentaje que existe de cada uno de ellos.

Summary

Manometric evaluation of the aminoacids based on the determination of the carboxyl groups (second procedure)

As a continuation of a previous work in which we reported the modifications introduced by us in Dr. Monche's apparatus for microevaluation of blood gases to make it applicable to the evaluation of aminoacids, we here report a second method of aminoacid evaluation, based on the reaction of Rohemann, in which the —COOH groups react with ninhydrin liberating CO_2 which is measured manometrically with the same apparatus.

This reaction serves to evaluate the aminoacids by colorimetry, however measurement of CO_2 given off is surer and more constant.

The apparatus used was the same as the previous work in which special cubettes were provided in which the reaction with ninhydrin was produced and which at a given time are joined to the base apparatus for extraction and measurement of resulting gas.

Phases of evaluation are the following :

- 1.º Extraction of initial CO_2 contained in test solution.
- 2.º Addition of ninhydrin and evacuation of cubette.
- 3.º Heating of cubette to exactly 100° to produce the reaction.
- 4.º Cooling of solution to 40-50° for the CO_2 absorption.
- 5.º Absorption of CO_2 by the alkaline solution in the manometric apparatus.

6.º Determination of the CO_2 absorbed after decomposition with lactic acid, and measurement of p_1 .

7.º Reabsorption of CO_2 and reading of p_2 .

Pressure is $P_{\text{co}_2} - p_2 - C$; it is a correction due to the blank test obtained by repeating the operation in identical conditions substituting the problem for the same volume of distilled water.

Carboxyl nitrogen and carboxyl carbon are calculated by the following formulas:

$$\text{Mg C}_{\text{co}_2} = P_{\text{co}_2} \times f_1$$

$$\text{Mg N}_{\text{co}_2} = P_{\text{co}_2} \times f_2$$

Values of the factors are given in the corresponding table.

The procedure has been applied to the evaluation of the same series of aminoacids as the previous work, in all of them we have determined the value of carboxylic nitrogen and of carboxylic carbon and the values found were compared with those obtained in the evaluation of aminic nitrogen of our previous work.

Results obtained agree with that expected given the constitution of the different aminoacids. Aspartic acid and glutamic acid give a very high percentage of N_{co_2} . If we calculate the concentration of free aminoacids from these data, the result will not agree with that obtained by measuring the aminic nitrogen (N.a) and will only coincide with it there are no aminoacids of this type or if they are compensated by the percentage of diaminomono-carboxylic aminoacids. Comparing both data one can deduce, in a mixture of two or more aminoacids, the percentage which exists of each one of them.

Bibliografía

- (1) GARCÍA DEL AMO, C.: *R. esp. Fisiol.*, **13**, , 1957.
- (2) HAMILTON, P. B. y VAN SLYKE, D. D.: *J. Biol. Chem.*, **150**, 231, 1943.
- (3) JACOBS, S.: *The Analyst*, **81**, 963, 1956.
- (4) MONCHE, J.: *R. esp. Fisiol.*, **9**, 129, 1953.
- (5) RUHEMAN: *J. Chem. Soc.*, **99**, 792, 1911.
- (6) VAN SLYKE, D. D., DILLON, R. T., Mc FADYEN, D. A. y HANNDON, P.: *J. Bull. Chem.*, **141**, 627, 1941.
- (7) VAN SLYKE, D. D. y DILLON, R. T.: *Proc. Soc. Exp. Bull. and Med.*, **34**, 362, 1936.
- (8) VAN SLYKE, D. D. y FOLCH, J.: *J. Bull. Chem.*, **136**, 569, 1940.

