

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

## **Aplicación del aparato de Monche para la microdeterminación de gases en sangre a la valoración de aminoácidos por sus grupos amino**

por **C. García-Amo**

(Recibido para publicar el 15 de febrero de 1957)

En el mercado nacional se encuentra hoy, con facilidad, un aparato manométrico para «microdeterminación de gases en sangre» (4) simplificación del de Van Slyke y Neill (10). Completando este aparato con dispositivos ad-hoc descritos por diferentes autores (8, 9) e introduciendo modificaciones originales, con el fin de adaptar el método a valoraciones en serie, hemos puesto a punto las dos técnicas usadas para la determinación de los aminoácidos basadas en la descomposición de sus dos grupos característicos: el amino y el carboxilo.

### **Material y métodos**

En nuestros trabajos anteriores (1, 2, 3) la valoración de los aminoácidos se realizaba por el conocido método volumétrico de Van Slyke (5) que mide la variación de volumen del  $N_2$  desprendido por la reacción de los aminoácidos con el nitrito sódico en medio ácido.

Aún empleando el micro aparato descrito por dicho autor en 1915 (6) la exactitud es mucho menor que con los métodos manométricos que vamos a describir.

Usando 2 c. c. de solución el error es de  $\pm 0,001$  mg/c. c. en el micrométodo volumétrico, mientras que en el manométrico, pudiendo utilizarse 5 c. c. de problema la precisión al-

canza a  $\pm 0,0001$  mg/c. c. puesto que esta cantidad se aprecia por una variación de 1,3 mm. en el manómetro.

#### FUNDAMENTO

Valoración del grupo  $\text{NH}_2$  con nitrito sódico en el aparato manométrico.

Los aminoácidos reaccionan con el ác. nitroso con desprendimiento de nitrógeno.

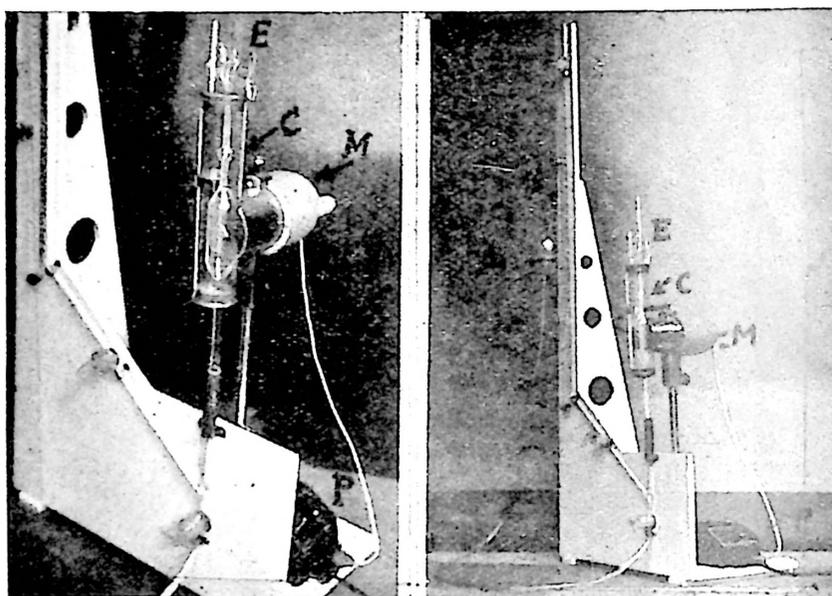


Fig. 1

Para una determinación completa el tiempo empleado es de unos 15 minutos. La máxima cantidad de nitrógeno que se puede medir en una determinación es de 0,6 mg. cantidad que, al volumen de 2 c. c. da una presión de 400 mm. y la mínima cantidad, 0,0004 mg., que en una microdeterminación a 0,5 c. c. de volumen, ejerce una variación de 1 mm.

Se pueden analizar muestras de 5 c. c. o aún mayores con concentraciones de 0,01 mg. de nitrógeno amínico por c. c. con un error menor del 1 %.

#### APARATOS

a) El aparato utilizado nos fué construído (\*) de acuerdo con la descripción del Dr. Monche pero introduciendo varias

(\*) Por la PROTOX de Barcelona.

modificaciones (véase fotografía n.º 1). La principal se refiere al método de agitación interna, que consiste en que un electroimán (M) que abraza a la vasija de reacción (C) a una altura conveniente y actúa sobre un pequeño imán de nialco, que se mueve fácilmente de forma graduable mediante un mando (P) situado en la base del aparato.

A causa de esta agitación interior, se ha podido suprimir la difícil conexión de la cámara con el manómetro, que a

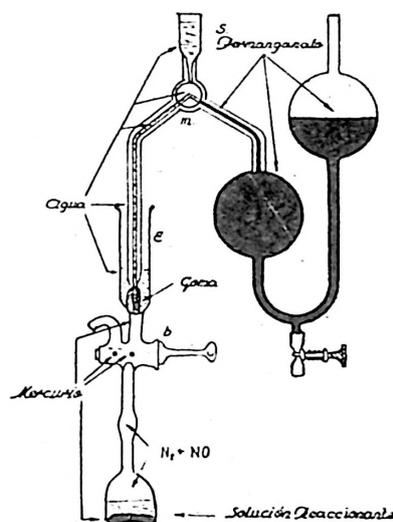


Fig. 2

la vez, tenía que ser perfecta y flexible para permitir la movilidad de la cámara (C). En nuestro aparato una simple goma de vacío une las dos piezas de vidrio Pyrex sin dejar espacio de contacto entre la goma y el mercurio, y permite una mayor solidez y seguridad.

b) Pipeta de Hempel (7) pieza adicional que nos fué construída (\*) según el esquema de la fig. 2 y se acopla en su momento a la copa (E) de la parte superior del aparato. Va provista de un tope de goma que hace un contacto perfecto y deja paso al gas de la cámara C a dicha pipeta.

#### REACTIVOS

a) Solución de nitrito sódico: Se disuelven en caliente 800 grs. de  $\text{NO}_2\text{Na}$  en 1 litro de agua, conviene preparar bastante cantidad pues el blanco determinado con este reactivo varía al principio, estabilizándose al cabo de cierto tiempo.

(\*) Por la casa Afora.

- b) Acido acético glacial.
- c) *Permanganato alcalino*. Se agita 1 litro de NaOH al 10 % con 50 gr de  $MnO_4K$  hasta saturación de la solución.
- d) Alcohol caprílico. — Se usa siempre que por la presencia de proteínas se sospeche la formación de espuma.

### MÉTODO

El ácido acético, al reaccionar con el nitrito sódico, deja libre el ácido nitroso, el que, al actuar sobre los  $\alpha$ -aminoácidos desprende cuantitativamente su nitrógeno en un tiempo que depende de la concentración y de la temperatura (véase fig. 3), al mismo tiempo, se desprende NO por la espontánea descomposición del ácido nitroso. Este es absorbido por la solución de  $MnO_4K$  de la pipeta de Hempel y el nitrógeno purificado se mide a un volumen fijo; 2 ó 0,5 c. c., según los casos. La presión ejercida por el gas se determina en el manómetro (S).

El análisis completo consta de los siguientes tiempos:

- 1.º Preparación del aparato.
- 2.º Toma de problema y de ácido acético e introducción de ambos en la cámara y extracción del aire.
- 3.º Adición del nitrito sódico, formación del ácido nitroso y reacción con el grupo  $\alpha$ -amino, en un tiempo de 3 a 4 minutos a la temperatura de 20 a 25° C.
- 4.º Paso de la mezcla  $N_2 + NO$  (esta última formada por descomposición espontánea del  $NO_2H$  a la pipeta de Hempel y absorción del NO por el  $MnO_4K$ ).
- 5.º Lavado de la cámara de reacción, para eliminar el ácido nitroso y vuelta del  $N_2$  purificado de la pipeta de Hempel a la cámara
- 6.º Medida de la presión.

*Primer tiempo:* El aparato (fig. 4) limpio, seco y bien engrasado (debe usarse grasa especial para alto vacío y silicona, alternativamente) se llena completamente de mercurio. Con ayuda del bulbo L de nivel se expulsa el aire, abriendo y cerrando las llaves convenientes. Se nota un buen grado de vacío por el golpe seco que da el mercurio sobre las llaves cerradas de los topes superiores b y c. Descendiendo al bulbo hasta que el mercurio alcance el centro de la cámara se cierran sucesivamente las llaves a y B. Se ajusta el 0 de la regla móvil al nivel del mercurio en el manómetro y el bulbo L se coloca en el soporte inferior del aparato. Abriendo la llave a el mercurio llena completamente la cámara C. En esta disposición comienza el análisis

*Segundo tiempo:* La muestra que debe contener de 4 a 8

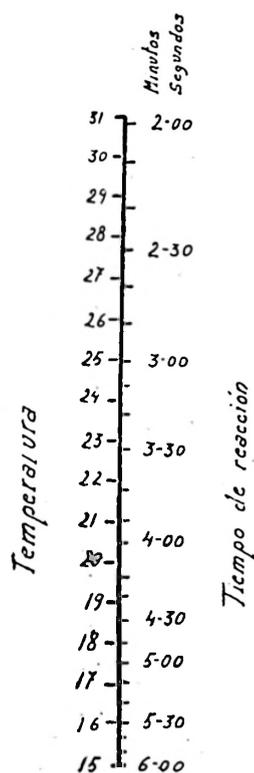


Fig. 3

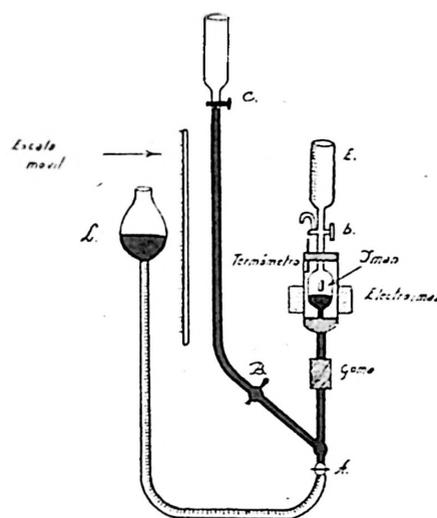


Fig. 4

mg. de aminoácido (alrededor de 0,4 mg. de nitrógeno amínico) y un volumen de 1 a 8 c. c. (lo más conveniente es un volumen de 5. c.), se deja entrar en la cámara *c* bien directamente con una pipeta de llave con tope de goma o midiéndolo con pipeta corriente en la copa y dejándolo pasar despacio, lavando a continuación la copa (es necesario conocer el volumen total que no debe ser mayor de 8 c. c.). A continuación se hace entrar por el mismo procedimiento 1 c. c. de ácido acético glacial y, con él, 1 ó 2 gotas de alcohol caprílico.

Para estas manipulaciones se pueden utilizar o la llave *b* o la llave *a*. Es más fácil de controlar los movimientos de la llave *a*. Descendiendo el nivel en la cámara hasta que la solución alcance la zona de acción del imán (I) se agita ésta enérgicamente durante 2 minutos, al cabo de los cuales se hace ascender el nivel por la entrada de mercurio a través de *a*. Situado *L* en el soporte superior, cerrada *a* y abierta *b* parte del aire extraído sale por su propia presión, abriendo *a* cuidadosamente se expulsa el resto del aire, cerrando *a* cuando

la solución alcanza el capilar de *b*. El bulbo *L* se sitúa en el nivel inferior.

*Tercer tiempo: Descomposición de los grupos aminos.* Se miden 2 c. c. de nitrito sódico y se dejan entrar en la cámara (manejando la llave *a*) sin que entre nada de aire. El capilar *b* se seca con una gota de mercurio y la cámara se desaloja hasta que el mercurio alcance un nivel próximo a la marca 50 c. c. El nitrito sódico actúa sobre el problema durante el tiempo conveniente que depende del volumen y de la temperatura (para 8 c. c. a 15° C., 6 minutos; a 20° C., 3 minutos. Durante el último minuto, la mezcla se agita enérgicamente, para lo que abriendo *a* se deja entrar mercurio hasta que la solución alcance la zona de acción del iman.

*Cuarto tiempo: Paso de la mezcla  $N_2$ -NO a la pipeta y absorción del NO.* Cuando ha terminado el tiempo de reacción y, con el bulbo *L* en el soporte superior se abre la llave *a* hasta que los gases adquieran una presión positiva y se vuelve a cerrar dicha llave. En la copa *E* se colocan 2 ó 3 c. c. de agua exenta de aire y se introduce en ella el extremo de la pipeta de Hempel con el capilar lleno de agua. La llave *m* se hace girar hasta la posición mostrada en la fig. 2, abriendo *b* los gases por su propia presión, entran en la pipeta a través del capilar *y*, para terminar de empujar la solución, se abre poco a poco la llave *a*. Cuando ésta alcanza el capilar de la llave *m* se cierran, sucesivamente, *a*, *b* y *m*. Es preferible que no pase nitrito al depósito del  $MnO_4K$  porque se agota éste inútilmente.

Se desconecta la pipeta, se hace girar la llave *m* para que entre agua de la copita (*S*) al capilar que va a la primera bola con el fin de arrastrar los últimos restos de  $N_2$  y se agita enérgicamente en un plano horizontal, dejándola en su soporte hasta la etapa siguiente.

El agua restante de la copita *S* se hace salir por la rama larga para expulsar la solución de nitrito que contiene.

*Quinto tiempo: Vuelta del  $N_2$  a la cámara.* Antes de que el  $N_2$  ya purificado retorne a la cámara, se expulsa la mezcla reaccionante a través del capilar lateral de la llave *b* y, accionando el bulbo de nivel, de forma adecuada, se lava por 2 ó 3 veces con agua destilada, que en proporción de 10 a 15 c. c. cada vez, se hace entrar por la copa *E* y se expulsa elevando *L*.

Cada lavado debe durar unos 30 segundos. A continuación, se introducen 10 c. c. de agua medidos en la copa, en dos porciones de 5 c. c., y se agita durante un minuto al nivel de la zona de acción del imán. Se eleva el bulbo *L* y, abriendo *a*, se expulsa el aire extraído a través de *b*, dejando pasar

a la copa 1 c. c. de esta agua para recibir el extremo del capilar de la pipeta. Se cierra *a*, se conecta de nuevo la pipeta con la cámara. Abriendo *a* y manipulando con *m* se llena con agua de la cámara el capilar que va de *b* a *m*, dejando entrar algo en la copa S. Cerrada de nuevo la llave *a* se hace girar *m* para conectar la bola que contiene el gas con la cámara y descendiendo el bulbo L y, abriendo *a* con mucho cuidado, se hace pasar el nitrógeno a la cámara, cerrando *a* en el momento en que la columna de permanganato alcanza el capilar de *b*. Se cierra *m* y se separa la pipeta hasta otra determinación. Es preferible este pequeño error en la medida del nitrógeno que permitir que entre mucho permanganato en la cámara, pues el líquido se colorearía impidiendo tener un menisco claro para la lectura del nivel.

Una vez separada la pipeta se eleva la copa E con agua destilada para arrastrar el  $MnO_4K$  que pudiera contener y se echa 1 c. c. de mercurio debajo del agua para que, al hacerlo pasar al interior de la cámara, arrastre todo el permanganato que pudiera existir en la llave y en el capilar.

*Sexto tiempo: Medida del nitrógeno.* Se hace descender el nivel del agua abriendo la llave *a* y bajando, poco a poco, el bulbo L hasta que el menisco se encuentre exactamente al enrarse de 0,5 o de 2,0 c. c., según la cantidad de gas que exista. Si al enrarse a 2,0 c. c., la presión ejercida en el manómetro es menor de 100 mm., es preferible llevar el gas hasta el volumen 0,5 c. c., con lo que aumentará la presión. Debe utilizarse una lupa para asegurarse de que el menisco coincide exactamente con la marca elegida. Abriendo la llave B, se hace la lectura en el manómetro exactamente al volumen elegido y, esa lectura, es la presión  $p_1$ . Se expulsa el gas de la cámara por el mismo método que se utiliza para expulsar el aire en el primer tiempo y, llevando el menisco al mismo volumen que en la primera lectura, se lee  $P_0$ .

*Prueba en blanco:* Todo el análisis se repite, sustituyendo únicamente la solución problema, por un volumen idéntico de agua destilada. La diferencia  $p_1 - p_0 = c$  nos da la corrección necesaria para el cálculo de la presión resultante, debida al nitrógeno.

Durante algunos días y aún semanas, después de preparada la solución de nitrito sódico, el valor de *c* tiende a disminuir, estacionándose al cabo de algún tiempo. Se aconseja, pues, preparar bastante cantidad de reactivo, a fin de tener una solución estable.

Con buenos reactivos (Merck, por ejemplo) el valor de *c* es para el volumen de 0,5 c. c. del orden de 20 a 30 mm. y, una cuarta parte, cuando la medida se hace a 2,0 c. c. En

nuestras pruebas, y con un nitrito de fabricación nacional, el valor de  $c$  para 2,0 c. c., es de 16-17 mm.

Cuando la presión es mayor de 100 mm. al volumen de 2,0 c. c., las correcciones de  $c$  por las variaciones de temperatura son despreciables, entre los límites ordinarios, no así cuando se hace la medida a 0,5 c. c. en que  $c$  debe determinarse para una temperatura próxima a la del análisis.

*Cálculos:* La presión debida al nitrógeno amínico, se calcula con la siguiente fórmula:

$$PN_2 = P_1 - P_0 - C$$

El peso del nitrógeno se obtiene de la fórmula (2)

$$\text{mg de Na} = PN_2 \times f.$$

Los valores del factor vienen dados en la Tabla I. Fueron calculados con la fórmula de Van Slyke y Neill (10) que simplificada es:

$$m \text{ M gas} = PN_2 \times k \times a \left( 1 + \frac{S}{A - S} a' \right)$$

$PN_2$  = presión media. (1)

$k$  = una serie de correcciones.

$a$  = es el volumen a que se mide el nitrógeno (0,5 ó 2,0 centímetros cúbicos).

$S$  = volumen total de la fase líquida (en nuestro caso 8 c. c.).

$A$  = volumen total de la cámara (50 c. c.).

$a'$  = coeficiente de solubilidad de Ostwald del gas en la solución.

El número de milimoles calculados se multiplica por  $\frac{28,02}{2}$   
 = 14,01 para obtener el peso del nitrógeno en mg correspondiente a 1 mm. de presión ya que, sólo la mitad del nitrógeno de la mol  $N_2$ , procede del aminoácido.

#### PROCEDIMIENTO ABREVIADO PARA ANÁLISIS EN SERIE

Cuando se precisa hacer determinaciones en serie, puede simplificarse el método de la siguiente forma:

Se omite la lectura de  $p_0$  en cada análisis, dando por concluido éste al hacer la lectura  $p_1$ . La lectura  $p_1$  del blanco, se toma como  $p_0$  para toda la serie de análisis (llamémosla  $p_2$ ).

$$PN_2 = p_1 - p_2$$

TABLA I

*Factores para el cálculo del nitrógeno aminico*

°C	a = 2,0 c. c.	a = 0,5 c. c.
15	0,000390	0,001561
16	389	55
17	387	49
18	386	44
19	385	38
20	383	33
21	382	27
22	380	22
23	379	16
24	378	11
25	376	06
26	375	00
27	374	0,001495
28	372	90
29	371	85
30	370	80
31	368	74
32	366	69
33	367	64
34	365	59

TABLA II

Aminoácidos	P. M.	N. a. (teórico)	N. a. (experimental)
Glicocola . . . . .	75,05	18,7	19,0
Valina . . . . .	117,0	11,90	11,73
Acido glutámico . . . . .	147,0	19,53	9,43
Acido aspártico. . . . .	133,0	10,53	10,10
Lisina (monocloruro) . . . . .	183,0	15,25	14,60
Arginina . . . . .	174,0	16,0	15,91
Metionina . . . . .	149,0	9,39	9,47
Triptófano. . . . .	204,22	6,86	6,80

En este  $p_2$  van incluidas todas las correcciones de una forma aproximada, las diferencias no son apreciables para un análisis ordinario. Solamente si se tarda mucho tiempo en el análisis completo y hay variación en la temperatura, se debe sumar o restar 1,5 mm. a  $p_2$ , por cada grado de más o de menos en la temperatura de  $p_1$  respecto a  $p_2$ . Si la variación es mayor de 2.°, es mejor volver a determinar  $p_2$ .

#### APLICACIÓN

Hemos utilizado los siguientes aminoácidos representantes de los distintos tipos. Monoamino monocarboxílico alifático: Glicocola y Valina. — Monoamino dicarboxílico alifático: ácido aspártico y ácido glutámico. — Di-amino-monocarboxílico alifático: lisina y arginina. Monoamino-monocarboxílico azufrado: metionina. — Monoamino-monocarboxílico aromático: triptófano. En todos ellos hemos determinado el valor del nitrógeno amínico por el procedimiento descrito. Los valores encontrados van en la tabla n.º II.

#### Discusión

Los números encontrados están de acuerdo con los teóricos para aminoácidos puros, viéndose que los diamino-monoácidos (arginina y lisina) dan un valor más elevado que los demás.

En el caso de determinar el porcentaje de nitrógeno amínico para calcular el grado de hidrólisis o la concentración de aminoácidos libres en un hidrolizado, el utilizar este dato, puede inducirnos a un error si hay una proporción alta de este tipo de aminoácidos.

#### Resumen

Con el aparato descrito por el Dr. Monche para la micro-determinación de gases en sangre, basado en el Van Slyke y Neill, e introduciendo en él modificaciones encaminadas a una más perfecta y fácil agitación de la mezcla reaccionante, merced a un sistema electromagnético (formado por un electroimán exterior, que actúa sobre un pequeño imán interior), lo que permite dar mayor solidez y sencillez a la unión de la cámara con el tubo manométrico, hemos puesto a punto en este trabajo la técnica de Van Slyke para la micro y submicro determinación de aminoácidos, basándonos en la descomposición de los grupos  $-\text{NH}_2$ . Medimos, pues, el nitrógeno amínico (N.a). Los resultados obtenidos, son media, por lo menos, de tres determinaciones, y tienen una precisión del orden de 0,001 mg/c. c.

### Summary

#### Manometric evaluation of aminoacids based on the determination of the aminic groups

The manometric apparatus designed by Dr. Monche and presented in this journal (June 1953) for the microdetermination of blood gases, is here applied to the evaluation of aminoacids. This apparatus was constructed for us (figure 1) introducing some modifications directed towards a handier and more complete shaking, for which it was endowed with an exterior electromagnetic system which actuates on an interior magnet of niáleo. The immobility of the reaction chamber permits a noteworthy simplification of the joining of the manometric system which in the original apparatus is one of the details most difficult to procure when the union must be perfect and flexible. In our apparatus a simple vacuum rubber joins the two parts of Pyrex glass which are in direct contact, avoiding any possible loss of gases.

Evaluation of aminoacids can be made, by the determination of  $-\text{NH}_2$  groups or by that of  $-\text{COOH}$  groups. In this first work we have laid down the first technique on the basis of the reaction with sodium nitrite.

The maximum quantity of nitrogen that can be measured in a microdetermination is 0.5 mg; this quantity at a volume of 2cc. gives a pressure of 400 mm. and the minimum is 0.0004 mg. which in a submicro determination at 0.5 ml. volume gives a variation of 1mm.

Samples of 5 ml. and even more containing 0.01 mg. of nitrogen can be used with a error less than 1 %.

For purification of the gas mixture ( absorption of NO formed by spontaneous decomposition of nitrite) it is necessary to attach a Hempel pipette to the apparatus. This was constructed for us according to the original Van Slyke design (figure 2) which is joined at the appropriate moment to the E glass of the apparatus and is provided with a rubber top which makes perfect contact.

The steps of evaluation are :

- 1.° Preparation of the apparatus.
- 2.° Taking of the problem and of acetic acid and introduction of both to the chamber ; extraction of air.
- 3.° Addition of sodium nitrite, formation of nitrous acid and reaction with the amine group, during 3 to 4 minutes at a temperature of 20 to 25°.
- 4.° Passage of the mixture  $\text{N}_2$  - NO to the Hempel pipette and absorption of NO by  $\text{MnO}_4\text{K}$ .

5.° Washing of the reaction chamber to eliminate nitrous acid and return of the purified N<sub>2</sub> from the Hempel pipette to the chamber.

6.° Measurement of pressure.

Calculation : Pressure due to aminic nitrogen is calculated in the following form :

$$PN_2 = pI - pO - c$$

Weight of nitrogen is obtained thus :

$$\text{Mg of aminic nitrogen} = PN_2 \times f.$$

The factores are given in the corresponding table. C corresponds to a blank test.

The procedure has been applied to evaluation of a series of aminoacids of various origin and various compositions : aliphatic monocarboxylic monoamino : Glucine and Valine. — Aliphatic monoamidicarboxylic : lysine and arginine. Sulphuretted monoami-monocarboxylic : methionine. Aromatic monocarboxylic monoamino : tryptophane. In all of them we determined aminic nitrogen value by the procedure described.

The figures found agree with theoretical ones for pure aminoacids ; the diamino-monoacids (arginine and lysine) give a much higher value than the others.

### Bibliografía

- (1) GARCÍA DEL AMO, C., VILLAR-PALASÍ, V. y SANTOS-RUIZ, A. : *Anal. R. Soc. Esp. F. y Q.*, **48 B**, 605, 1952.
- (2) GARCÍA DEL AMO, C., VILLAR-PALASÍ, V. y SANTOS-RUIZ, A. : *Anal. R. Soc. Esp. F. y Q.*, **48 B**, 597, 1952.
- (3) GARCÍA DEL AMO, C. : *Anal. R. Soc. Esp. F. Q.*, **48 B**, 793, 1954.
- (4) MONCHE, J. : *R. esp. Fisiol.*, **9**, 129, 1953.
- (5) VAN SLYKE, D. D. : *J. Biol. Chem.*, **12**, 295, 1912.
- (6) VAN SLYKE, D. D. : *J. Biol. Chem.*, **23**, 407, 1915.
- (7) VAN SLYKE, D. D. : *J. Biol. Chem.*, **83**, 425, 1929.
- (8) VAN SLYKE, D. D. y DILLON, R. T., Mc FADYEN, D. A. y HAMILTON, P. : *J. Biol. Chem.*, **141**, 627, 1941.
- (9) VAN SLYKE, D. D. y FOLCH, J. : *J. Biol. Chem.*, **136**, 509, 1940.
- (10) VAN SLYKE, D. D. y NEILL, J. H. : *J. Biol. Chem.*, **61**, 532, 1924.