

Estudio del método de la o-toluidina para la determinación de glucógeno *

J. J. Guinovart y M. Rosell-Pérez

Cátedra de Bioquímica
Facultad de Farmacia
Universidad de Barcelona
Barcelona - 14

(Recibido el 21 de julio de 1975)

J. J. GUINOVART and M. ROSELL-PEREZ. *A Study of the o-Toluidine Method For Glycogen Measurement*. Rev. esp. Fisiol., 31, 317-322. 1975.

The application of the o-toluidine procedure for glucose estimation was studied in the determination of glycogen. Decrease in final colour formation, caused by the acid used on hydrolising glycogen, was the major problem. 90 minutes incubation periods with 1N sulphuric acid at 100° C, produced best results. Some other steps of this method and their application to glycogen measurement are also discussed. The proposed procedure leads to a stable colour formation, proportional to glycogen concentration, and allows determination of polysaccharide in small biological samples.

El reactivo de o-toluidina fue puesto en uso para la determinación de glucosa en sangre por HULTMAN (3) y por DUBOWSKI (2), independientemente. El método fue modificado más tarde por HYVARINEN y NIKKILA (4) que adicionando tiourea al reactivo mejoraron la estabilidad del mismo. Su aplicación a la determinación de glucógeno fue realizada por TARNOKY y NAGY (6) y posteriormente por HULTMAN

(3). Actualmente dicho reactivo es usado ampliamente para la determinación de glucosa en materiales biológicos, resultando en estos casos simple, cómodo, eficaz y económico, lo que parecía indicar que su aplicación en la determinación de glucógeno presentaría ciertas ventajas sobre los otros métodos usados rutinariamente, especialmente sobre el más común de ellos, el de la antrona. Sin embargo, los procedimientos empleados por los autores mencionados difieren considerablemente en algunos de sus pasos, por lo que creímos conveniente llevar a cabo un estudio de los mismos con el fin de hallar las condiciones más adecuadas para una correcta cuantificación del polisacárido.

* Este trabajo fue subvencionado parcialmente por una Ayuda a la Investigación de la Comisión Asesora a la Investigación Científica y Técnica de la Presidencia del Gobierno de España y un N. S. F. Grant GF-44115 de los Estados Unidos de América.

Material y métodos

Una alícuota del digesto alcalino del tejido objeto de estudio conteniendo entre 25 y 200 μg de glucógeno se vierte en un tubo Pyrex con tapón roscado y se precipita el glucógeno por adición de dos volúmenes de alcohol de 96 %. Tras haber dejado los tubos en reposo durante toda una noche, se centrifugan a $2.000\times g$ durante 20 minutos, se decantan y dejan secar finalmente en posición invertida sobre papel de filtro.

Para proceder a la hidrólisis del polisacárido se añaden directamente sobre el precipitado 0,2 ml de ácido sulfúrico 1N, se tapan los tubos, se agitan y se colocan en un baño de agua hirviendo durante 90 minutos.

Una vez fríos se añade a cada uno de los tubos 4 ml del reactivo de o-toluidina (o-toluidina 10 % (v/v) y tiourea 0,2 % (p/v) en ácido acético glacial), y tras mantenerlos durante 8 minutos exactamente medidos en un baño maría, se enfrían rápidamente en un baño de agua con hielo. La intensidad de la coloración verde formada se mide en un espectrofotómetro a 630 $m\mu$ frente a un blanco formado por 0,2 ml de ácido sulfúrico 1N y 4 ml del reactivo de o-toluidina, comparándose con la originada por una solución patrón de glucosa en ácido sulfúrico 1N. Se usa un factor de 0,90 en el paso de glucosa a glucógeno.

Se utilizó un espectrofotocolorímetro Coleman modelo Jr II. Los reactivos utilizados fueron o-toluidina de Carlo Erba especial para análisis de glucosa. Tiourea, sulfúrico, NaOH, acético y glucosa fueron reactivos Merck purísimos para análisis. La antrona y el glucógeno procedían de Sigma Chemical Co.

Resultados

Fue necesario fijar algunas de las condiciones para poder estudiar el efecto que las variaciones en las demás ejercen en la

formación del color. Así, se decidió emplear en cada determinación 4 ml de un reactivo constituido por o-toluidina al 10 % (v/v) y tiourea al 0,2% (p/v) en ácido acético glacial [concentraciones que coinciden con las fijadas por HULTMAN (3)], ya más favorables que las empleadas por otros autores. La o-toluidina especial para la determinación de glucosa en sangre resultó, en nuestras observaciones, la más sensible de las disponibles. Asimismo se decidió realizar las medidas a 630 $m\mu$ por ser esta la longitud de onda empleada por la mayoría de autores que usaron esta técnica. Similarmente se fijó en 8 minutos el tiempo de mantenimiento de las mezclas problema-reactivo en un baño de agua hirviendo. Pudo comprobarse posteriormente que también en nuestro caso éstas eran las condiciones óptimas.

Efecto del ácido en la hidrólisis. El efecto del ácido (que se añade para conseguir la hidrólisis del glucógeno) sobre el desarrollo del color fue estudiado observando la intensidad de la coloración formada por una misma cantidad de glucosa disuelta en volúmenes crecientes de agua y de ácido sulfúrico de distintas concentraciones (6, 2 y 1N) a los que se añadieron 4 ml del reactivo o-toluidina.

Los resultados obtenidos (tabla I) indican que para muestras que se diferencian sólo en el volumen de ácido en que se halla disuelta una misma cantidad de glucosa, las densidades ópticas de las coloraciones formadas diferían grandemente, mucho más de lo que podría esperarse teniendo en cuenta la dilución causada por mayores volúmenes de ácido.

Para un volumen fijo de ácido la intensidad de la coloración decrece al aumentar la concentración del mismo, siendo en todos los casos menor que la originada por soluciones acuosas. Sin embargo, el ácido sulfúrico 1N en pequeños volúmenes ejerce una influencia muy ligera sobre el desarrollo del color. La neutralización con NaOH de las muestras previamente

Tabla I. *Influencia de la concentración de ácido en la hidrólisis.*

Una misma cantidad de glucosa (90 μg) fue disuelta en distintos volúmenes de ácido sulfúrico a las concentraciones indicadas y a distintas condiciones: 100° C durante una hora, 120° C durante 3 horas, y no calentados (N.C.). Cada valor (densidad óptica) es la media de las determinaciones efectuadas sobre cinco muestras homólogas.

Normalidad del ácido	Volumen de la solución (ml)								
	0,2			0,5			1		
	N.C.	100° 1 h	120° 3 h	N.C.	100° 1 h	120° 3 h	N.C.	100° 1 h	120° 3 h
6	0,215 *	0,212	—	—	—	—	—	—	—
2	0,380	0,380	0,310	0,325	0,320	—	0,205	0,200	0,180
1	0,395	0,400	0,375	0,345	0,340	—	0,285	0,280	—
0	0,405	0,400	—	0,365	0,370	—	0,340	0,340	—

* Valores de densidades ópticas.

a la adición del reactivo dio lugar a coloraciones mucho más intensas que las originadas por tubos homólogos de los anteriores, pero que no habían sido neutralizados. Todo ello indica que el ácido ejerce una acción negativa en el desarrollo del color.

La posible acción destructora del ácido sobre la glucosa fue observada estudiando el color desarrollado por soluciones idénticas a las anteriores que habían sido mantenidas previamente, en tubo cerrado, a 100° durante 1 hora [condiciones en las que TARNOKY y NAGY (6) llevaban a cabo la hidrólisis] o a 120° durante 3 horas [condiciones de hidrólisis empleadas por HULTMAN (3)]. La densidad óptica de las coloraciones obtenidas fue comparada con muestras iguales recién preparadas que no habían sido calentadas. Pudo observarse que, excepto en el caso de emplear ácido 6N, la coloración de las soluciones que no habían sido calentadas era idéntica a la de las que se habían mantenido a 100° durante 1 hora. Sin embargo, aquellas que fueron mantenidas a 120° durante 3 horas originaron coloraciones significativamente más bajas que las de los otros dos grupos. Ello parece indicar que en estas condiciones se produce una parcial destrucción de la glucosa por el ácido.

Condiciones para la hidrólisis. Se efec-

tuaron experiencias encaminadas a hallar las condiciones óptimas de hidrólisis teniendo en cuenta que el problema, que estribaría tan sólo en conseguir una hidrólisis completa del glucógeno sin la posterior destrucción de la glucosa formada, se veía afectado en este caso por la influencia del ácido sobre el desarrollo del color. Téngase en cuenta que interesaba añadir el reactivo directamente sobre el hidrolizado sin someterlo a neutralización previa, lo que implicaría una complicación molesta que haría perder al método una de sus mejores características: la sencillez.

Se utilizaron en la experiencia (tabla II) diversos volúmenes de ácido sulfúrico (0,1, 0,2 y 1 ml) de distintas concentraciones (6, 2, 1 y 0,6N) que se añadieron sobre cantidades iguales de glucógeno previamente separado de sus soluciones por precipitación con etanol. Una vez disuelto el glucógeno en el ácido, las soluciones se dividieron en dos grupos iguales. Uno de ellos se mantuvo durante 2 horas en baño maría y el otro a 120° durante 3 horas. Una vez frías las muestras se siguió el desarrollo del método. Pudo observarse que los resultados más satisfactorios se obtuvieron al emplear ácido sulfúrico 1N y temperatura 100°. Se rechazó el empleo de una temperatura de 120°, ya que en este caso (excepto para ácido 0,6N)

Tabla II. *Influencia de distintas condiciones en la hidrólisis del glucógeno.*
Una misma cantidad de glucógeno (60 μg) fue hidrolizada en distintos volúmenes de ácido sulfúrico de diferentes concentraciones y en distintas condiciones (2 horas a 100° C o 3 horas a 120° C). Cada valor (densidad óptica) es la media de las determinaciones efectuadas sobre cinco muestras homólogas.

Normalidad del ácido	Volumen de la solución (ml)					
	0,1		0,2		1	
	100° 2 h	120° 3 h	100° 2 h	120° 3 h	100° 2 h	120° 3 h
6	—	0,100 *	0,140	—	—	—
2	0,255	0,210	0,270	—	0,165	0,135
1	0,265	0,237	0,295	—	0,195	0,143
0,6	0,245	0,255	0,222	—	0,120	—

* Valores de densidades ópticas.

los valores obtenidos eran inferiores a los alcanzados en muestras homólogas hidrolizadas a 100°, lo que se atribuyó a parcial destrucción de la glucosa. Asimismo se descartó el uso de ácido 6N por producir una disminución muy grande en la intensidad del color. El ácido 0,6N parece no ser capaz de llevar a cabo la hidrólisis del glucógeno a 100° durante 2 horas.

Por neutralización de las soluciones una vez llevada a cabo la hidrólisis durante 2 horas a 100° pudo comprobarse que los resultados obtenidos eran iguales siempre que la concentración del ácido fuera inferior a 3N. Pudo asimismo observarse que la neutralización de las soluciones de ácido sulfúrico 1N prácticamente no daba lugar a ningún incremento respecto a las muestras homólogas no neutralizadas. El que concentraciones de ácido mayores de 1N no dieran, tras ser neutralizadas, valores más altos que ésta, fue tomado como indicación de que la hidrólisis en ácido sulfúrico 1N era completa en estas condiciones. Se comprobó asimismo que el ácido clorhídrico, a concentraciones iguales que el ácido sulfúrico, interfería más que éste en la formación del color.

Por ello se eligió para llevar a cabo la hidrólisis el empleo de 0,2 ml de ácido sulfúrico 1N. En estas condiciones la influencia del ácido sobre la formación del color es prácticamente insignificante. Po-

dría parecer que con 0,1 ml se lograría mayor sensibilidad; sin embargo, con tan poca cantidad de líquido pueden producirse evaporaciones que originan carbonizaciones y de hecho los resultados presentan mucha más dispersión que cuando se usa 0,2 ml.

El mínimo período de tiempo necesario para conseguir una hidrólisis completa se determinó hidrolizando distintas cantidades de glucógeno durante tiempos crecientes a 100° en 0,2 ml de ácido sulfúrico 1N. En todos los casos la hidrólisis se completó en 90 minutos.

Desarrollo del color. La coloración originada por este método es considerablemente estable. A la temperatura ambiente y lejos de la acción directa de los rayos solares la pérdida es menor del 2 % en media hora.

La densidad óptica aumenta linealmente con la concentración de glucosa hasta concentraciones de 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (para volúmenes de 0,2 ml); por encima de este valor pudo observarse una ligera desviación de la linealidad. Asimismo se observó un adecuado cumplimiento de la ley de Beer cuando se usaron soluciones de glucógeno. La desviación del comportamiento ideal disminuía con el volumen de ácido empleado en la hidrólisis (fig 1).

Al analizar muestras de una misma so-

lución de glucógeno ($66,6 \mu\text{g/ml}$) se obtuvo un valor para la desviación tipo de $0,84 \mu\text{g/ml}$ y para el error tipo de $0,26 \mu\text{g/ml}$. En experimentos en los que se añadió a las muestras glucógeno previamente purificado se consiguieron recuperaciones comprendidas entre el 98,1 y el 102,1 %.

Evaluación del método. Finalmente, se procedió a la comparación del método desarrollado con el de la antrona en la modalidad descrita por CARROLL *et al.* (1). El reactivo estaba constituido por antrona al 0,05 % en ácido sulfúrico del 72 %.

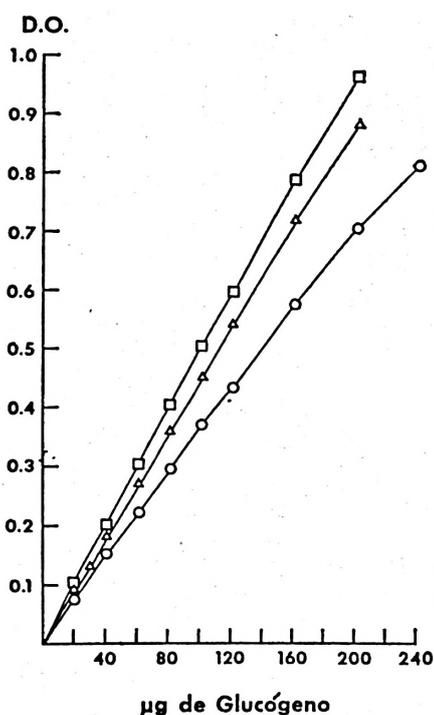


Fig. 1. Cumplimiento de la ley de Beer. Se representan las densidades ópticas a que dieron lugar, según el procedimiento descrito, distintas cantidades de glucógeno hidrolizado en distintos volúmenes de ácido sulfúrico 1N. □—□, con 0,1 ml; △—△, con 0,2 ml, y ○—○, con 0,3 ml. Cada uno de los puntos representa la medida de los valores obtenidos en cinco muestras homólogas.

Se determinó por ambos métodos el glucógeno contenido en distintos materiales biológicos, pudiendo observarse que con el método de la o-toluidina se obtenían valores ligeramente más bajos que los obtenidos por el método de la antrona. Esta diferencia en los valores obtenidos (aproximadamente del 4 %) se atribuyen a la mayor especificidad del reactivo de o-toluidina.

Discusión

El método aquí estudiado, en su forma final, goza de características muy favorables. Tiene buena reproducibilidad y su sensibilidad permite determinaciones de glucógeno en muestras del orden de magnitud de las obtenidas en las biopsias. Es además específico para las aldohexosas, lo que libera de las interferencias de algunas sustancias comunes que sí son capaces de reaccionar con la antrona.

Con respecto a su practicabilidad el método es simple y económico, mucho más que los métodos enzimáticos, y tiene una razonable rapidez de análisis. Utiliza un reactivo considerablemente estable, mucho más que el de la antrona, y cuyos componentes son muy fáciles de obtener comercialmente en forma pura. Cumple en una considerable escala de valores la ley de Beer y goza de considerables ventajas para ser utilizado en largas series de análisis.

El llevar a cabo la hidrólisis con ácido sulfúrico 1N durante una hora y media está de acuerdo con las experiencias de SAHYUN y ALSBERG (5) y con las de otros autores. El empleo de un tiempo mayor alargaría innecesariamente el método. Esta concentración de ácido da lugar a una interferencia menor, en la formación del color, que la que origina una concentración 2N (especialmente si el volumen utilizado es considerable) como se observa en la tabla II. El empleo de ácido sulfúrico 6N y de una temperatura de 120° (3) parece por completo desaconsejable por

producir una gran disminución en la intensidad del color y destruir parte de la glucosa formada en la hidrólisis del glucógeno debido a oxidaciones y rotura de la molécula.

Para aumentar la sensibilidad se ha utilizado un volumen relativamente pequeño de reactivo; 4 ml, y se ha aumentado la concentración de o-toluidina en el mismo, con respecto a la usada por TARNOKY y NAGY (6) y por DUBOWSKY (2), llevándola al 10 % (v/v), límite fijado por este último autor y por HULTMAN (3). Con el mismo fin el volumen de ácido empleado en la hidrólisis se ha fijado en 0,2 ml; menores volúmenes presentan algunos inconvenientes.

En cuanto a la longitud de onda encontrada por nosotros como óptima (630 m μ) coincide prácticamente con la utilizada por todos los demás autores (625-635 m μ).

Nuestras experiencias están de acuerdo con las de otros autores (3, 6) al considerar que 8 minutos es el tiempo óptimo durante el cual deben mantenerse a 100° los tubos que contienen la mezcla glucosa-reactivo para que se lleve a cabo la reacción cromogénica. Un tiempo menor implicaría pérdida de sensibilidad, debiéndose además tener en cuenta que para tiempos inferiores a 7 minutos, pequeñas variaciones en el tiempo de ebullición implican considerables cambios en la intensidad del color formado.

Dada la considerable estabilidad de la coloración formada, que se ve incrementada con la adición de tiourea al reactivo (4), no deben tomarse precauciones especiales para prevenir la decoloración, si no se deja transcurrir un largo período de

tiempo entre la formación y la medida del color.

Agradecimientos

Agradecemos a los doctores C. Villar-Palasi y M. Alemany sus sugerencias para la preparación del manuscrito.

Resumen

Se ha estudiado la aplicación del método de la o-toluidina, empleado para la determinación de glucosa, a la cuantificación de glucógeno. El mayor problema estriba en que el ácido empleado en la hidrólisis del polisacárido produce una disminución en la intensidad de la coloración final. Los mejores resultados se obtuvieron llevando a cabo la hidrólisis en ácido sulfúrico 1N a 100° C durante 90 minutos. Se discuten asimismo otros pasos del método y su adaptación a la medida de glucógeno. El procedimiento descrito da lugar a coloraciones considerablemente estables que siguen adecuadamente la ley de Beer y permite la cuantificación del polisacárido en pequeñas muestras biológicas.

Bibliografía

1. CARROLL, N. V., LONGLEY, R. W. y ROE, J. H.: *J. Biol. Chem.*, **220**, 583, 1956.
2. DUBOWSKI, K. W.: *Clin. Chem.*, **8**, 215, 1962.
3. HULTMAN, E.: *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, **19**, 209, 1967.
4. HYVARINEN, A. y NIKKILA, E. A.: *Clin. Chim. Acta*, **7**, 143, 1962.
5. SAHYUN, M. y ALSBERG, C. L.: *J. Biol. Chem.*, **93**, 235, 1931.
6. TARNOKY, K. y NAGY, S.: *Clin. Chim. Acta*, **8**, 627, 1963.