

Sección de Fisiología del Instituto de Investigaciones Médicas  
(Fundación de la Excelentísima Diputación de Barcelona)  
(Prof. Dr. J. Jiménez Vargas)

## Colorimetría de dos standards. III. Mezclas diluidoras

ALBERTO SOLS

El principio fundamental de igualdad de condiciones entre los líquidos a comparar se opone a diluir aquellos problemas demasiado coloreados para colorimetría, aun contando con el amplio margen que nuestro sistema permite (1). Precisamente a partir de él hemos llegado, sin embargo, a un sistema de *mezclas diluidoras* que amplía casi ilimitadamente las posibilidades de colorimetría.

Llamamos en general *mezclas diluidoras* (abreviadamente, MD) a soluciones que contienen los mismos reactivos a las mismas concentraciones que los líquidos a diluir. Su empleo puede tener lugar en distintos estadios del análisis. En cada caso la MD a emplear será la equivalente a una prueba ciega efectuada paralelamente, o en el momento, si el factor tiempo no influye.

Como caso particular, y quizá el más interesante, se puede utilizar como MD *uno de los standards* (de preferencia el más débil, naturalmente), o aún cualquier otro problema de escasa intensidad de color. Esto simplifica el trabajo, ya que no hay que preparar MD exprofeso. Y en los casos en que influye el factor tiempo economiza la preparación sistemática de MD por si fuera necesaria. En cambio introduce un pequeño cálculo. La fórmula general a utilizar, presupuesto el empleo de nuestro sistema y fórmulas de colorimetría es:

$$C_p = C_{pd} D - C_{md} \frac{V_{md}}{V_p} \quad [1]$$

en que  $C_{pd}$  = concentración problema diluido,  $D$  = dilución

( $= \frac{V_p + V_{md}}{V_p}$ ),  $C_{md}$  y  $V_{md}$ , concentración y volumen

respectivamente de la mezcla diluidora.

Si el volumen problema es 1, se simplifica el cálculo :

$$C_p = C_{pd} D - C_{md} V_{md}$$

Y cuando  $C_{md} = 0$  (mezcla diluidora en sentido estricto) :

$$C_p = C_{pd} D$$

En muchos casos en que se diluya un líquido ya coloreado a consecuencia de la lectura colorimétrica excesivamente baja, habrá pugna con el factor igualdad de tiempo. La dificultad no será más que aparente las más de las veces, ya que la mayoría de las reacciones coloreadas que se utilizan en colorimetría comparada presentan una acusada meseta en la intensidad de color a la que se llega tras un lapso de tiempo que es el que se establece como intervalo necesario entre reacción y colorimetría. Pues bien, dejando transcurrir otro intervalo entre dilución y nueva colorimetría habremos llegado a igualdad práctica de condiciones por haber alcanzado la meseta antes que el standard la haya rebasado. Y cuando la constancia de intensidad de color sea poco duradera o simplemente inferior al tiempo de demora inicial cabe recurrir a un procedimiento que nosotros utilizamos a menudo para acortar el tiempo de espera suplementaria. Con un poco de práctica se ve, mucho antes de finalizar el tiempo de espera inicial, qué problema ofrece probabilidad de pasarse del límite tolerable, pudiéndose proceder a la dilución inmediata de una parte del mismo, sin perjuicio de efectuar también la colorimetría del problema no diluido, que podrá ser más exacto si hubo falsa alarma y la dilución fué superflua,

Ejemplos :

1.º Se preparan tres standards de fósforo para fosfatasas, en condiciones similares a las indicadas en nuestro primer trabajo, de concentraciones correspondientes a 5, 10 y 100 mg. %. Mezclando bien después de la adición del último reactivo, se toma 1 c. c. del standard más fuerte mezclándolo con 9 c. c. del más débil. Después de 15' las lecturas, con el standard 5 a 20 mm. fueron :

Standard 10	. . . . .	12,0 mm.
» 100 diluido	. . . . .	8,8 »

Cálculo :

$$I = \frac{10 \times 12 - 5 \times 20}{20 - 12} = 2,5$$

$$Cpd = \frac{(5 + 2,5) 20}{8,8} - 2,5 = 14,545 (*)$$

y aplicando la fórmula [1] se obtiene :

$$Cp = 14,545 \times 10 - 5 \times 9 = 100,45 \text{ mg. \%}$$

con error de 0,5 % sobre el teórico 100.

El mismo standard de 100 mg. % se diluyó al 1/10 con MDF (mezcla diluidora final = prueba ciega), dando de lecturas :

inmediata . . .	13,8
a los 10' . . .	12,3
a los 15' . . .	12,1
a los 30' . . .	12,1

$$\text{con lo que } Cpd = \frac{(5 + 2,5) 20}{12,1} - 2,5 = 9,9$$

$$\text{y } Cp = 9,9 \times 10 = 99 \text{ mg. \%}$$

con error del 1 %, dentro de la variabilidad accidental. La lectura del standard 100 no diluído fué 2,5, a la que correspondería una concentración de 57, 5, superior al máximo establecido (1) de alrededor de 40 mg. %, según los reactivos (en la práctica hay que *desconfiar* ya por encima de 30).

2.º Reproducimos un caso práctico expuesto en nuestra tesis doctoral (2).

Un autolizado de intestino dió al determinar fosfatasas una lectura que hacía sospechar exceder los límites de cumplimiento de la ley de Beer. Entonces se diluyó al 1/6 una muestra del filtrado desalbuminado sobrante con MDT (agua, glicerofosfato, tampón y tricloroacético), una muestra de filtrado-molíb-dico (\*\*\*) con mezcla diluidora que comprendía este reactivo, y una muestra del líquido coloreado con MDF. Añadimos a la primera dilución el molíb-dico y reductor correspondientes, a la se-

(\*) Nuestra tabla  $L_{2,5}^D$  12,0 da directamente para la lectura 8,8 el valor 2,19 que multiplicado por 5 resulta 14,55.

(\*\*) Esta variante tiene interés en nuestra técnica simplificada de determinación de fosfatasas en ciertos medios biológicos.

gunda el reductor que le faltaba, y, dejados transcurrir 15', dieron los tres el mismo resultado:  $50 \pm 0,7$  unidades BODANSKY por 100 c. c. de autolizado de intestino.

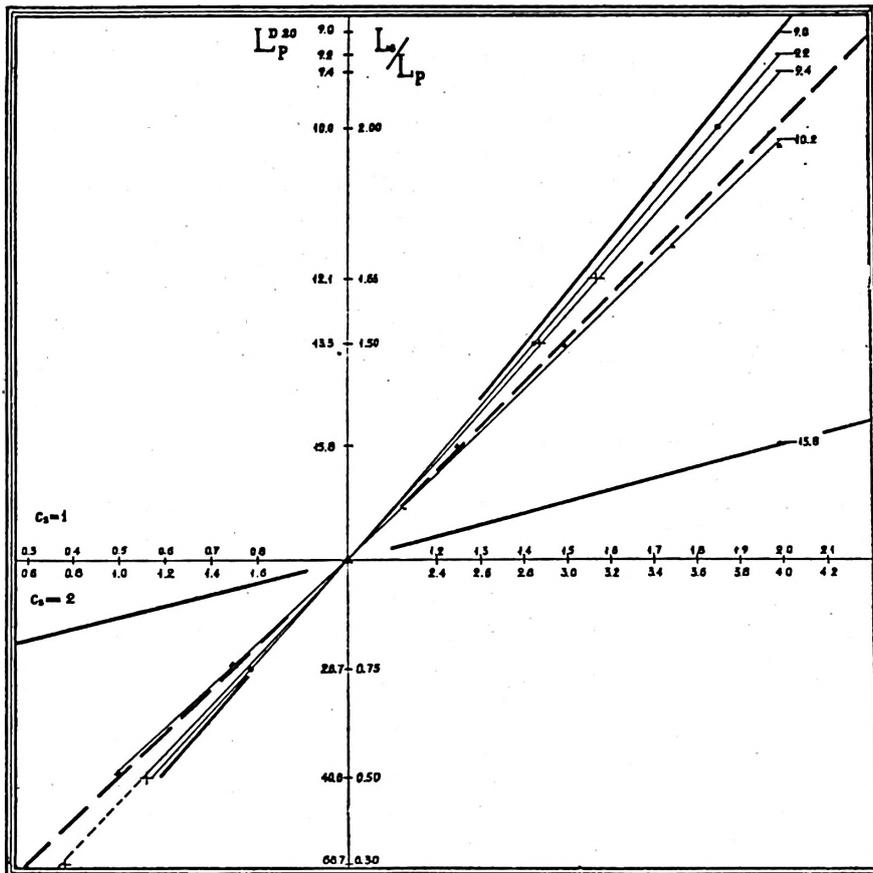
*Algunas aplicaciones de la colorimetría de dos standards*

La representación gráfica del sistema (3) facilita la interpretación de protocolos experimentales con vista al cumplimiento del mismo, salvando la variabilidad accidental. OSER y KARR (4) publicaron hace 20 años los resultados obtenidos determinando glucosa por el método de FOLIN y WU, «que no sigue la ley de Beer». Llevando los resultados experimentales a un sistema de coordenadas y observando que daban lugar a dos rectas calcularon con las ecuaciones de éstas dos tablas que daban los verdaderos valores de glucosa para cada lectura del colorímetro con respecto a los standards 1 ó 2 (ya aconsejados por FOLIN y WU) según la intensidad del color del problema.

En la gráfica adjunta, esqueleto de nuestro sistema gráfico, representamos por cruces cuatro datos de su tabla 1 y por puntos tres datos de su tabla 2. La línea de trazos representa la ley de Beer en sentido estricto. Las dos líneas gruesas, los límites de nuestras tablas (no los del sistema). Dos líneas finas representan las tablas 9,4 y 9,2. Los otros datos corresponden a otro protocolo de que luego hablaremos. Resulta que los puntos coinciden con la línea 9,2 y las cruces están entre la 9,2 y la 9,4, muy cerca de la última. Y efectivamente con nuestra tabla 9,2 se obtienen los mismos resultados que con su tabla 1. En el segundo caso la concordancia podría aumentarse calculando a partir de  $L_{2S}^{D_{20}} = 9,35$ , a la que corresponde  $I = 0,122$ ; con lo que a  $L_P^{D_{20}} = 12,1$  corresponde una  $C_p = 1,573$ , siendo el valor de la tabla 2 de OSER y KARR, 1,572; a 40, 0,561 frente a 0,560 y a 66,6, 0,386 frente a 0,384.

Se trata, pues, de un caso particular de nuestro sistema, que en modo alguno requiere *tablas especiales*. Pero hay más; en nuestra propia experiencia hemos encontrado, con distintos reactivos o pequeñas diferencias de ejecución, *desviaciones* variables desde algo mayores que las señaladas por OSER y KARR hasta nulas (compensación de los dos componentes de  $\hat{y} : \hat{y}-p$ ) o de signo contrario ( $i > p$ , de donde  $I$  positivo). Un caso más en que la inconstancia de la desviación impone la colorimetría so-

bre la base de dos standards preparados al menos a cada cambio de reactivos. Como ya hemos indicado (3), el desconocimiento de este hecho ha llevado a algunos a rechazar fórmulas o tablas



des de estrógeno standard, se dan en la tabla I». Dicha tabla tiene tres partes: las correspondientes a dietilestilbestrol y hexoestrol muestran una típica variabilidad accidental. Pero las correspondientes al dienoestrol dan pequeños errores por exceso en las concentraciones inferiores al standard y por defecto en las superiores, como sucede cuando I es positivo. Efectivamente, trasladando sus lecturas colorimétricas a la gráfica «universal» (los triángulos negros) se puede trazar una recta que pasa por el centro de coordenadas y coincide aproximadamente con la mayoría de los puntos. Dicha línea resulta corresponder a la desviación «10, 2», mientras que es evidente la no coincidencia con la línea de trazos que representa la ley de Beer. (En el cuarto dato del protocolo \* parece haber error accidental.)

A continuación reproducimos los datos de MALPRESS, añadiendo una columna con los resultados obtenidos a partir de sus lecturas (referidas a  $L_{\text{D}} = 20$ ) con nuestra tabla 10,2:

Concentración final estrógeno mg./50 c. c.	Lectura (S a 25 mm)	Recuperación % del teórico	
		Seg. Malpress	Seg. nuestro cálculo
0,50	49,0	102,1	98,0
0,75	32,9	101,2	100,0
1,00	25,0	100,0	100,0
1,25	19,8 *	101,0	101,6
1,50	16,8	99,4	100,7
1,75	14,5	98,6	100,0
2,00	12,8	97,7	99,7
Medias desviaciones absolutas		1,23	0,66
id. descartando el 4.º dato (*)		1,09	0,43

El error medio se ha reducido a menos de la mitad, *calculando sobre las propias lecturas del autor.*

El ángulo que forman las líneas que representan la ley de Beer y la desviación 10,2 es pequeño. Numéricamente podía pasar desapercibido.

Pero si la desviación es pequeña no deja de ser real, y resultados exactos sólo pueden obtenerse con el cálculo en función de dos standards.

Nuestro método *suprime* errores que hasta ahora podían a

lo sumo disminuirse, como reconoce KING (6) al decir «Cuando se compara una solución desconocida con un standard conocido de la misma substancia, se incrementa la exactitud usando el filtro de luz que muestra máxima absorción; y se disminuye la interferencia por otros colores contaminantes...». Con la particularidad de que esta supresión de error se obtiene sin ningún artificio de técnica, por la simple y clásica colorimetría comparada, sin más que calcular *en función de dos standards*.

#### Resumen

Se expone un procedimiento de diluciones complementarias a la colorimetría comparada que amplía la utilización del sistema del autor, y se demuestra la utilidad de éste en la determinación de glucosa y estrógenos.

#### Summary

We give a procedure of complementary solutions to the compared colorimetry which makes more widely the application of the own method of the author and it is proved the usefulness of the same in the estimation of glucose and estrogenic substances.

#### Resume

L'on expose un procédé de solutions complémentaires à la colorimétrie comparée; lequel élargit l'utilisation de la méthode de l'auteur et l'on montre aussi son utilité dans la détermination du glucose et des estrogènes.

#### Zusammenfassung

Es wird eine Methode komplementärer Verdünnungen zur vergleichenden Kolorimetrie beschrieben, die einen weitumfassenden Gebrauch des Systems des Verfassers gestattet und es wird die Nützlichkeit jener zur Bestimmung der Glykose und Östrogenus bewiesen.

#### Bibliografía

1. SOLS, A. — Fórmulas y tablas colorimétricas para corregir las aparentes desviaciones a la ley de Beer. Rev. esp. Fisiol., 1, 355 (1945).
2. Id. — Las fosfatasas en la absorción selectiva de glúcidos. Tesis doctoral (Abril de 1946).

3. Id. — Representación gráfica de la ecuación general de la colorimetría comparada. *Anal. Fis. y Quim.*, en prensa.
4. OSER, B. L. y KARR, W. G. — The correction of Folin-Wu blood sugar values. *J. Biol. Chem.*, 67, 319 (1926).
5. MALPRESS, F. H. — The colorimetric estimation of diethylstilboestrol, hexoestrol and dienoestrol. *Biochem. J.*, 39, 95 (1945).
6. KING, E. J. — *Micro-analysis in medical biochemistry*. Churchill, Londres (1946) (pág. 144).