

R. Esp. Fisiol.
Tom. II, núms. 3 y 4, páginas 203 a 209, 1946.

Cátedra de Fisiología de la Facultad de Medicina de Valladolid
(Prof. E. Romo Aldama).

Sobre el método de Terwen para dosificación de glucosa en sangre

por los Dres. E. ROMO ALDAMA, Catedrático de Fisiología
y F. FERNANDEZ DE LA CALLE, Prof. Ayudante

(Recibido para publicar el 26 de Julio de 1946)

J. A. TERWEN publicó en la revista *Deutsches Archiv für klinische Medizin* (180-27-1937) un artículo titulado: «Determinación sencilla y exacta del azúcar sanguíneo a la cabecera del enfermo». Atraídos por el título del trabajo y su contenido y, con ocasión de ocuparnos en el estudio de los comas insulínicos, hemos practicado numerosas determinaciones de glucemia por el método del referido autor, por lo que nos parece oportuno dar a conocer su fundamento, técnica y juicio crítico que de él hemos formado.

Del trabajo antes mencionado tomamos los detalles de fundamento y técnica que a continuación detallamos:

Fundamento. — El método está basado en la determinación colorimétrica del ferrocianuro que se forma al ser reducido el ferricianuro por la glucosa en caliente. Por medio del cloruro férrico es transformado dicho ferrocianuro potásico en ferrocianuro férrico (azul Berlín), el cual se mantiene en solución por un nuevo procedimiento, siendo, en estas condiciones fácilmente susceptible de ser determinado por el colorímetro.

Previamente se desalbuminiza la sangre completa con ácido fosfotúngstico, según SCHAFFER y HARTMANN; se calienta el filtrado con solución alcalina de ferricianuro potásico (siendo el fosfato trisódico el álcali más adecuado), y por fin se transforma, como dijimos, el ferrocianuro potásico en «azul Berlín» por el cloruro férrico.

Las mayores dificultades las ofrece la composición del reactivo de ferricianuro potásico que debe mantener en solución el «azul Berlín» originado. La precipitación del «azul Berlín» se impide por tres procedimientos principales: la acidez, la concentración de iones férricos y la temperatura.

Para evitar la disociación de la sal férrica, el autor encontró que el ácido pirofosfórico era el más apropiado y con objeto de dar mayor estabilidad al reactivo de cloruro férrico, se agrega el primero al fosfato trisódico (reactivo núm. 2), lo que no altera en manera alguna el resultado final. La estabilidad del «azul Berlín» formado en la concentración de ClH elegida es tan grande que se puede verter el reactivo final de la solución ácida de cloruro férrico al líquido de ebullición, pero con la condición de que se vierta rápida y directamente sobre el líquido, sin que discurra por la pared nada de líquido ácido. La temperatura alta acelera intensamente la formación del «azul Berlín», influenciándose también por la concentración de ClH, ya que si ésta es elevada se produce el color rápidamente, pero con tendencia a formar copos; y, por el contrario, si la concentración es pequeña, la formación del azul es demasiado lenta. En la proporción utilizada, se forma el azul en 3 minutos y permanece durante horas o días.

Para la comparación del color formado con el que obtiene con una solución tipo de glucosa al 1 por 1.000 utilizó el principio del hemómetro de SAHLI, empleando dicho aparato con dos tubitos de anchura exactamente igual y con la misma distribución á iguales alturas, diluyéndose la solución más oscura con una solución diluída de ferricianuro potásico, ya que éste persiste en parte, por lo que si se empleara agua para la dilución, se tornaría la solución en otra de un color azul más puro, lo que dificultaría y haría errónea la comparación.

Reactivos. — Sol. núm. 1. Líquido para la desalbuminización: Acido fosfotúngstico pro anal.: 5 gramos. Sulfato sódico crist. pro anal.: 20 gramos. Acido sulfúrico concentrado: 2 gramos. Agua destilada hasta 1.000. Filtrar hasta que salga completamente claro por un papel de filtro muy limpio.

Sol. núm. 2. Alkali para la reducción: Fosfato trisódico Kahlbaum: 32,5 grs. Pirofosfato sódico Kahlbaum: 8,25 gramos. Agua destilada hasta 1.000. Filtrar por filtro poroso

de vidrio neutro (Schott-Jena) y conservarla igualmente en frasco de vidrio neutro (exento de álcali) y bien tapada.

Sol. núm. 3. Ferricianuro potásico Merck o Kahlbaum (exento de ferrocianuro): 2,5 grs. (buscar cristales claros, no erosionados, lavarlos en un embudo con agua destilada y secarlos a la oscuridad entre papeles de filtro). Agua destilada hasta 500. Conservarla en frasco oscuro, no olvidándose nunca de cerrarlo.

Sol. núm. 4. Acido clorhídrico normal (de CIH muy puro): 450 c. c. Sol. de cloruro férrico (sol. volumétrica Merck de 10 mgs. de Fe por c. c.): 30 c. c. Agua destilada hasta 1.000.

Sol. standard de glucosa: 0,1 grs. de glucosa seca (!) en 100 c. c. de ácido sulfúrico 1/5 normal. Por lo menos hay que renovarla 2 veces al año. La glucosa se puede secar en la estufa a 100-105° durante 3 a 6 horas o en el Exsiccator sobre P₂O₅ durante algunos días.

6. Piedra de ebullición de arcilla vidriada (por ejemplo, de vasos o tazas rotas).

Determinación: Técnica. — A) En una pipeta (Mc LEAN) de 0,2 c. c. previamente lavada con agua destilada (húmeda por consiguiente) se aspira 0,2 c. c. de sangre de una fuerte puntura de un dedo o de la oreja, se limpia la punta de la pipeta por fuera con algodón y se vierte el contenido en el fondo de un tubo de ensayo muy limpio. La pipeta se lava inmediatamente con agua algunas veces, con lo que no se obstruye. Se vierte con una pipeta sobre la sangre 4 veces un c. c. de la sol. desalbuminizadora núm. 1, se agita y se espera a que la mezcla se vuelva oscura. Entonces se filtran, tomando un c. c. del filtrado que se pone en un tubo muy limpio C.

B) Con la misma pipeta Mc LEAN humedecida de nuevo se pipetea 0,2 c. c. de la sol. standard de glucosa (5) en un tubito limpio y sobre ella 2 veces un c. c. de agua destilada y 2 veces un c. c. de sol. núm. 1 y se agita: de esta mezcla se pone un c. c. en un tubito limpio D. Ahora se pipetea en C y en D un c. c. de líquido (2) y un c. c. de líquido (3) poniendo una piedra de ebullición. Los dos tubitos se hierven uno tras otro a ebullición lenta en una pequeña llama de alcohol durante un minuto exactamente. Luego se vierte rápidamente y en seguida de retirarlo de la llama, un c. c. de líqui-

do (4) llevando la punta de la pipeta casi hasta la superficie del líquido, agitando inmediata y fuertemente durante poco tiempo. Después de esperar 3 minutos se llevan por medio de una pipeta capilar las dos soluciones a los tubitos del hemómetro de SAHLI, poniendo del coloreado más fuertemente hasta la señal 50 y del menos en cantidad variable a voluntad.

El líquido de dilución (siempre preparado de antemano) se compone de un c. c. de líquido (3) y 5 c. c. de agua destilada. Cuando se ha encontrado que para igualdad de color hay que llenar hasta la señal 85, el azúcar sanguíneo, según qué solución se haya diluido, será:

a) Si se ha diluido el filtrado sanguíneo, 85 : 50.

b) Si se ha diluido la sol. standard glucosa, 50 : 85, siendo la cifra encontrada el tanto por mil de glucosa en sangre. Si ésta es muy elevada, se pone el líquido más oscuro hasta la señal 25, dividiendo por esta cifra.

Instrumentos. — Son muy sencillos. Se utilizan solamente dos pipetas y otra con suplemento de goma y señal hasta un centímetro cúbico. No son necesarias medidas muy exactas, porque el filtrado sanguíneo y la sol. standard se miden exactamente de igual forma con las mismas pipetas. La pipeta de un c. c. se lava entre dos pipeteos, rápidamente 4 veces con agua destilada.

La llama pequeña del alcohol de quemar tiene los fines siguientes: No sobrecalentar las orillas del líquido, alargar algo el tiempo de calefacción y disminuir la pérdida del vapor. Por ello también se calienta, prescindiendo del pequeño volumen del líquido, en un tubito de ensayo de 15 mm. de diámetro interior.

Los dos tubitos del hemómetro de SAHLI deben tener, después de su colocación en el aparato, la señal 140 en plano exactamente horizontal.

Observaciones. — Cuando se tienen dispuestos los reactivos, se hace una prueba en blanco, es decir, se procede como para los tubitos B y D se ha descrito, sin añadir glucosa y se filtra el contenido del D, aun cuando sea claro. Si se obtiene coloración verdosa se debe a las siguientes posibilidades:

1. En los reactivos hay una sustancia reductora.

2. El ferricianuro potásico contiene ferrocianuro como impureza.

3. Uno de los reactivos contiene iones ferrosos, pues no solamente el ferrocianuro, sino el ferro-ferricianuro es azul.

En lugar de hervir durante un minuto, se pueden colocar los tubitos durante tres minutos en un baño maría, siendo éste el método preferible cuando se hacen determinaciones en serie. En este caso se colocan los tubitos con intervalos de medio minuto en agua hirviendo, con lo que queda tiempo para agregar el reactivo final. Debe procurarse en este caso obturar con algodón el extremo de cada tubo.

Los tubos con precipitado azul se pueden limpiar con arena fina y agua.

La solución standard de glucosa contiene solamente la mitad de cantidad de reactivo (1) porque las albúminas sanguíneas se apoderan de la mitad aproximadamente del medio desalbuminizador.

Debe emplearse cloruro férrico de garantía, pues el corriente del comercio contiene frecuentemente sal ferrosa. Los tubitos de ensayo deben mantenerse muy limpios de precipitados en el líquido final, conservándose muy bien en solución de bicromato potásico-ácido sulfúrico. En la ejecución de las experiencias se debe atender minuciosamente a las prescripciones indicadas, y las concentraciones de los reactivos deben ser exactamente las indicadas, pues de lo contrario, se producen variaciones del color azul.

En las determinaciones en líquido céfallo-raquídeo, se toman de éste 0,4 c. c. con 2 c. c. de líquido (1) y 2 c. c. de agua destilada. En el cálculo se divide por 2 el número final. Cuando las cifras encontradas sobrepasan el valor de 3,5 por 1.000, debe repetirse la experiencia diluyendo el filtrado de la desalbuminización a partes iguales con agua destilada, multiplicando el resultado final por 2; la razón de este proceder es la escasa cantidad de ferricianuro de que se dispone cuando la glucemia es demasiado alta.

El autor ha encontrado errores máximos de 6 mgs. operando con sangre de ternera, a la que se añaden cantidades fijas de glucosa.

A las anteriores indicaciones, tomadas de la revista mencionada al principio, nos hemos sujetado nosotros para practicar numerosas determinaciones, controladas a la vez con el

método de HAGEDORN-JENSEN, habiendo encontrado grandes concordancias y errores mínimos que, incluso le hacen adecuado para trabajos de investigación, exigiéndose entonces mayor escrupulosidad en la ejecución de la técnica.

Damos a continuación una serie de valores obtenidos por los procedimientos de HAGEDORN, CRECELIUS y TERWEN.

Muestra	Hagedorn	Creelius	Terwen
Sangre de perro en coma insulínico. . .	0,40	0,25	0,40
» » » » » . . .	0,28	0,37	0,26
» » » » » . . .	0,39	0,30	0,38
» » » fuera del coma . . .	1,10	1,05	1,04
» » » » » . . .	0,98	0,95	0,96
» » » inyectado con glucosa.	2,64	2,66	2,61

Para la conservación de la solución standard de glucosa, hemos procedido a la tinalización de la misma exactamente pesada y envasada en ampollas cerradas, con lo que creemos se mantiene en perfectas condiciones, aunque también hemos comprobado la buena conservación de dicha solución por el procedimiento que recomienda el autor.

Critica del método. — Este procedimiento nos ha parecido de una sencillez técnica extrema y de exactitud también grande. Además, los valores bajos de glucemia son apreciados con precisión suficiente, desde luego mucho mayor que la que se alcanza con el método colorimétrico de CRECELIUS-SEIFERT, en el que el cambio de la tonalidad amarilla de las bajas cifras se valora difícilmente. En cambio, el tono azul que da este procedimiento es muy sensible a una pequeña dilución, con lo que las diferencias de intensidad y tonalidad de color se acusan inmediatamente. (Véanse las cifras del cuadro.)

Sin embargo, un pequeño inconveniente (no presentado por el método colorimétrico de CRECELIUS-SEIFERT) para el médico práctico es la relativa complejidad de los reactivos, dificultad que no existe en los laboratorios regularmente montados y anulada en Holanda, país del autor, en donde una casa de solvencia se ha encargado de preparar los reactivos y demás útiles necesarios para la ejecución del método que comentamos.

En resumen, creemos que el médico práctico puede dis-

poner de un método «sencillo y exacto», como dice su autor, para dosificación de glucosa en sangre, incluso a la cabecera del enfermo, dato de tanto interés en numerosas ocasiones que no es del caso señalar. Pero también el investigador tiene un procedimiento dotado de las inestimables cualidades de rapidez de ejecución y precisión suficiente, tanto en los valores altos, como en los bajos de glucemia, ya que los errores no son mayores de 6 mgs. cuando se presta atención en los siguientes pasos: toma exacta de sangre y en análogas condiciones que la solución tipo; medidas también precisas de los reactivos y, especialmente del centímetro cúbico sobre el que se vierten los reactivos 2, 3 y 4, así como ebullición en las circunstancias dichas, supuesto, como es lógico, adecuada preparación de los reactivos (imprescindible para un «azul Berlín» estable y libre de precipitados) y exactitud de la concentración de glucosa de la solución standard. Las soluciones «tipo» de glucosa y cloruro férrico preparadas por la casa «Panreac» son, según hemos comprobado, muy aptas para la preparación de los reactivos 4 y 5 que, por ello, está muy facilitada.

Para terminar diremos que, a nuestro juicio, si la determinación colorimétrica final se realizara por procedimientos más sensibles (fotómetro), los errores llegarían a ser tan pequeños como los de los procedimientos volumétricos más finos y sensibles, ya que la tonalidad y la variación de la intensidad del color azul son especialmente apropiados para observarse con gran claridad.