

Instituto de Fisiología. - Facultad de Medicina - Barcelona
Prof. J. Jiménez Vargas

Estudio experimental sobre el fenoltaleín-hidro- xisulfonato sódico como reactivo en microdeter- minaciones cuantitativas de acetona y cuerpos cetónicos en sangre. Su comparación con otros reactivos

por **S. Vidal-Sivilla y J. Monche**

(Recibido para publicar el día 31 de enero de 1950)

Conseguida finalmente la puesta a punto del micrométodo colorimétrico para la determinación directa cuantitativa de acetona en sangre, propuesto por MONCHE y VIDAL-SIVILLA en un trabajo anterior (1), en condiciones adecuadas para su aplicación práctica, sencilla y rápida, en la clínica, se plantea, como es lógico, la conveniencia de obtención de los datos experimentales comparativos necesarios para una comprobación inicial del nuevo micrométodo, que permita apreciar sus ventajas e inconvenientes e ir introduciéndole, en todo caso, las modificaciones pertinentes que la práctica aconseje, deducidas de un mayor conocimiento del mismo.

Y como contribución al fin indicado, nos hemos propuesto en este trabajo un estudio comparativo de nuestro método con el de LUBLIN (2), muy generalizado, conforme es sabido, así como con el de GREENBERG y LESTER (3).

Parte experimental

Hemos aplicado el micrométodo de LUBLIN, operando exactamente en las condiciones descritas por MEYER y LENHARTZ (4). Para el estudio comparativo de nuestro método hemos transformado el ácido *beta*-hidroxibutírico en acetona mediante un microaparato de reflujo idéntico al descrito detalladamente por MARENZI y cola-

boradores (5), según el método de GREENBERG y LESTER de determinación de cuerpos cetónicos totales (3).

Para la adaptación de nuestro reactivo a dicho método, en sustitución de la 2,4-dinitrofenilhidrazina, reactivo fundamental del mismo, los 3 c.c. de líquido final, resultante de la oxidación del ácido *beta*-hidroxibutírico a acetona por el dicromato potásico en medio ácido, equivalentes a 0,0975 c.c. de sangre, se neutralizan igualmente, aunque en ligero exceso, con la disolución de sulfito sódico (0,5 c.c. de disolución al 15 por 100 de sulfito sódico anhidro, purísimo, exento de bisulfito), y el líquido se mezcla con 14 c.c. de la disolución 1/15 molar de fosfato disódico para agregarle seguidamente 3,5 c.c. de nuestro reactivo, o sea operando en condiciones idénticas a las descritas por MONCHE y VIDAL-SIVILLA en un trabajo anterior (1).

La disolución patrón la preparamos partiendo también de 3 c.c. de disolución tipo final, resultante de la adición del dicromato en medio ácido y equivalente a 0,00675 mgrs. de acetona, pero operando conforme se acaba de exponer, una vez efectuada la neutralización con el sulfito sódico en exceso.

Las determinaciones de acetona preformada las efectuamos según el método de MONCHE y VIDAL-SIVILLA (1) y el de GREENBERG y LESTER (3). Para comparar ambos métodos con el de LUBLIN (2), modificamos este último, sustituyendo la destilación en el microkjeldahl a la presión atmosférica, por la práctica de la misma a baja temperatura (presión reducida), de modo que la temperatura del líquido a destilar no exceda de los 30°, a fin de impedir toda posibilidad de liberación de acetona por descarboxilación de ácido acetilacético.

Se empeló sangre de perro, procedente de un animal de experimentación en ayunas, al que le fueron extraídos 90 c.c. de sangre y mezclada con 10 c.c. de una disolución acuosa de acetona al uno por mil; correspondiente, por lo tanto, a un contenido de 7,972 mgr. de acetona por 100 c.c. de líquido (sangre), tomando como densidad de la acetona a 15° el valor de 0,7972. Los resultados hallados se indican seguidamente:

Método	Acetona preformada mgr. ‰	Cuerpos cetónicos totales mgr. ‰
Fenoltalein-hidro- xisulfonato-sódico. (Monche y Vidal-Sivi- lla)	8,19	21,31
	8,18	21,32
	8,19	21,31
	8,19	21,33
	8,20	21,33
	8,20 Promedio: 8,19	21,32 Promedio: 21,32
2, 4-dinitrofenilhi- drazina (Greenberg y Lester)	10,09	24,98
	10,10	24,98
	10,08	24,97
	10,10	24,99
	10,08	24,99
	10,08 Promedio: 10,08	24,97 Promedio: 24,98

Yodométrico	8,99	22,86
(Lublin)	9,00	22,87
	9,01	22,87
	8,98	22,89
	8,98	22,88
	8,99 Promedio: 8,99	22,85 Promedio: 22,87

Discusión

Conforme se observa, los valores obtenidos mediante los dos últimos métodos concuerdan bastante, manteniéndose sin embargo más altos respecto a los correspondientes al primero, de modo muy notorio.

El método de LUBLIN, se funda, como es sabido, en la determinación final de acetona mediante oxidación de la misma por yodometría. En cuanto al de GREENBERG y LESTER, en la capacidad de reacción de la 2,4-dinitrofenilhidrazina con los grupos carbonilo de los aldehídos y cetonas para formar las dinitrofenilhidrazonas correspondientes, de colores que viran del rojo al amarillo o violeta, según el aldehído o cetona de partida, cuya propiedad permite la aplicación del reactivo a la microdeterminación colorimétrica cuantitativa, según el método de GREENBERG y LESTER.

Pero la oxidación de la acetona por yodometría, que ocurre con formación de yodoformo, conforme es sabido, es específica en cuanto a su transformación en yodoformo, mas no, en cambio, en cuanto a la formación de otros productos de oxidación, como consecuencia de la acción oxidante del yodo sobre sustancias diferentes y fácilmente oxidables, presentes en los complejos líquidos biológicos a analizar y todavía no muy conocidas, algunas de ellas.

Por otra parte, la 2,4-dinitrofenilhidrazina, estudiada ampliamente en España hace años, por TORRES y colaboradores, como reactivo de compuestos carbonílicos (6), se caracteriza precisamente por su gran capacidad de formación de las hidrazonas correspondientes, incluso con los azúcares.

Nuestro reactivo, en cambio, basado en un proceso de trans-hidroxisulfonación (7), se caracteriza, pues, fundamentalmente, por una especificidad muy superior, concordante en absoluto con los valores más bajos que hemos obtenido mediante el mismo.

Pero su empleo analítico para la microdeterminación colorimétrica cuantitativa de cuerpos cetónicos totales en sangre, podrá sin duda simplificarse mucho más respecto a la técnica utilizada por nosotros en este trabajo con fines comparativos,

y ello es objeto de estudio en la actualidad en estos laboratorios.

Resumen

Se estudia comparativamente con los métodos de LUBLIN, y de GREENBERG y LESTER, la aplicación del fenolftaleín-hidroxisulfonato sódico a la microdeterminación cuantitativa de acetona preformada y de cuerpos cetónicos totales en sangre, resultando valores más altos mediante los dos primeros métodos, que se interpretan como una menor especificidad de los reactivos correspondientes respecto al último.

Summary

The author has tested comparatively with the methods of LUBLIN, and GREENBERG and LESTER, the application of sodium phenolphthalein-hydroxysulfonate to the quantitative microdetermination of the preformed acetone and of the total Ketonic bodies in blood, obtaining high values by means of the two former which are interpreted as a low specificity of the corresponding reagents compared with the latter.

Bibliografía

- (1) MONCHE, J. y VIDAL-SIVILLA, S.: "Nuevo micrométodo para la determinación directa de acetona en sangre". R. esp. fisiol., en prensa.
- (2) LUBLIN, W.: Klin. Wschr., 1748-2285 (1922).
- (3) GREENBERG, L. A. y LESTER, D.: J. Biol. Chem., 154, 177 (1944).
- (4) LENHARTZ, H. y MEYER, E.: "Análisis Clínicos", 113 (Editorial Labor, 1936).
- (5) MARENZI, A. D. y colaboradores: "Bioquímica Analítica Cuantitativa", 324-327 (El Ateneo — Buenos Aires, 1947).
- (6) TORRES, C. y colaboradores: Anales. R. Sdad. Esp. Fis. y Química, 30, 37 y 477 (1932); 31, 34 (1933).
- (7) MONCHE, J. y VIDAL-SIVILLA, S.: R. esp. fisiol., 5, 35 (1949).