

Instituto de Fisiología. — Facultad de Medicina, Barcelona
(Director: Profesor J. Jiménez-Vargas)

Micrométodo colorimétrico para la determinación de la glucemia

por A. Sols

(Recibido para publicar el 30 de mayo de 1949)

El clásico método para la determinación de la glucemia de Folin y Wu ('20) basado en la reducción de un reactivo de cobre alcalino y ulterior formación de azul de molibdeno por acción del cobre reducido sobre un complejo molibídico ha sido objeto de numerosas modificaciones por parte del propio Folin ('26, '29) y otros, entre los que últimamente figuran Haslewood y Strookman ('39), Nelson ('44), Somogyi ('45) y Polis y Sortwell ('46). Las modificaciones principales han tendido a la obtención de valores sensiblemente coincidentes con la glucemia verdadera, a la utilización como micrométodo y a la máxima estabilidad de color para las determinaciones fotométricas. King y Garner ('47) han estudiado distintas combinaciones de varios de los reactivos propuestos.

El macrométodo original de Folin no seguía la ley de Beer. Esto dió lugar a la propuesta de distintos artificios para la correcta valoración colorimétrica (ver Folin '29). Ulteriormente la difusión creciente de la fotometría ha venido a casi hacer olvidar la cuestión, ya que por compensación con la ciega o por curva de calibración parece no existir problema. En realidad la calibración no es segura a menos que se repita cada vez, como indica Reinhold ('49), que preconiza el empleo sistemático de tres standards. Pero en colorimetría comparada el problema no sólo subsiste, sino que ha aumentado considerablemente, ya que de la primitiva ligera y bastante constante desviación del método de Folin se ha pasado en las microadaptaciones a desviaciones importantes y variables. En una comunicación sobre corrección de desviaciones aparentes a la ley de Beer (Sols '46) indicábamos que el método de Folin daba resultados correctos con nuestro sistema de cálculo en función de la desviación entre dos standards. Esta validez subsiste en los micrométodos, lo que tiene mucho mayor interés.

Sobre estas directrices hemos desarrollado el método que exponemos a continuación y cuyos detalles discutiremos luego.

Método

REACTIVOS

Solución isotónica de cobre. 80 c. c. de una solución de sulfato de cobre al 10 % (de $\text{SO}_4\text{Cu} \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) diluidos hasta 1 litro con solución salina fisiológica (ClNa al 9 por 1.000).

Tungstato sódico al 10 %.

Reactivo de cobre alcalino de Somogyi ('45). Disolver 28 gr. de fosfato disódico (PO_4HNa_2) y 40 gr. de tartrato sódico potásico en unos 700 c. c. de agua; añadir 100 c. c. de sosa normal y, agitando, 80 c. c. de sulfato de cobre al 10 %. Añadir 180 gr. de sulfato sódico y después de disuelto diluir a 1 litro con agua. Después de 1 ó 2 días decantar y filtrar. Consérvese en frasco oscuro bien cerrado.

Standards. Preparar una solución madre de glucosa al 2'5 por 1.000 en solución isotónica de cobre.¹ A partir de ella se preparan las soluciones standards diluyendo 2 y 1 c. c. a 100 c. c. con solución isotónica de cobre diluida al 1/2 con agua. En frascos bien cerrados se conservan indefinidamente. Estos standards de concentración 0'05 y 0'025 gr. por 1.000, respectivamente, corresponden a glucemias de 2 y 1 gr. por 1.000 si se emplean 0'05 c. c. de sangre según la técnica descrita.

Reactivo molibdico. Acido fosfomolibdico $2\text{H}_3\text{PO}_4 \cdot 20\text{MoO}_3 \cdot 48\text{H}_2\text{O}$ (British Drug Houses o Merck)² ó $\text{P}_2\text{O}_5 \cdot 24\text{MoO}_3 \cdot x\text{H}_2\text{O}$ (Merck) al 2 % en ácido sulfúrico 2N (60 por 1.000, v/v)².

TÉCNICA

A 1'85 c. c. de solución isotónica de cobre colocada en un tubo de centrífuga añadir 0'05 c. c. de sangre, mezclar y dejar unos minutos. Añadir 0'1 c. c. del tungstato sódico, mezclar y centrifugar (basta un par de minutos), o filtrar a través de un papel pequeño de buena calidad. Poner 1 c. c. del líquido claro en un tubo de ensayo estrecho (de unos 10 mm. de diámetro); en otros tubos iguales poner 1 c. c. de los standards 1 y 2. Añadir a cada tubo 1 c. c. del reactivo de cobre alcalino. Tener los tubos 8 minutos en un baño de agua hirviendo, pasarlos a agua a la temperatura ambiente, en la que se dejan enfriar 2 minutos y añadir 1 c. c. del reactivo molibdico. Pasados al menos otros 2 minutos añadir 2 c. c. de agua³ y mezclar. Comparar el standard 1 con el 2 y el problema y calcular con las fórmulas

$$\frac{2L_2 - L_1}{L_1 - L_2} = I \text{ y } \frac{(1 + I)L_1}{L_p} - I = \text{g. de glucosa por l. de sangre}$$

o buscar el resultado en nuestras tablas (Sols '45).

¹ Como solución madre puede utilizarse también una conservada con ácido benzoico.

² Sobre la posibilidad de empleo de otros reactivos molibdicos ver la discusión.

³ Si se requiere un volumen mayor de 5 c. c. para la colorimetría añadir en vez de los 2 c. c. de agua el volumen oportuno de ácido sulfúrico normal.

Discusión

El método expuesto permite obtener buenos resultados con colorimetría comparada. Naturalmente también puede utilizarse un fotómetro, con filtro rojo, y calculando:

$$\frac{E_p - (2 E_1 - E_2)}{E_1 - (2 E_1 - E_2)} = g. \text{ } ^0/_{00}$$

Las desviaciones posibles son en extremo variables, habiendo encontrado con un reactivo de cobre preparado con productos de baja calidad un $I = 2$, con el que una sangre con 1'53 g. por 1.000 de glucosa hubiera dado por el cálculo ordinario 1'18 ó 1'76, según se comparase con el standard 1 ó 2.

La desproteinización de sangre no lacada permite obtener glucemias prácticamente verdaderas. El método del tungstato de cobre (adaptado del de Somogyi, '31) tiene la ventaja de que el cobre impide la glucolisis, permitiendo demora en la ejecución del análisis. El método del sulfato de bario propuesto últimamente por Somogyi ('45) es menos manejable, y las ventajas invocadas por su autor parecen meramente teóricas en este caso. El sencillo método del ácido perclórico propuesto por Polis y Sortwell ('46) plantea problemas de incertidumbre del pH final.

Precisamente este problema del desplazamiento del pH del reactivo de cobre alcalino nos ocupó largo tiempo con motivo de que intentamos utilizar soluciones standard de glucosa en solución saturada de ácido benzoico, cuya eficacia conservadora fué bien demostrada por Folin. La acidez de estas soluciones daba lugar a resultados anómalos. Soluciones acuosas de glucosa a concentraciones tan débiles como las empleadas han de prepararse casi diariamente, pudiendo conservarse hasta un mes por adición de toluol. Al fin encontramos que el sulfato de cobre al 4 por 1.000 (concentración mínima necesaria para la desproteinización) era el agente conservador ideal, ya que a perfecta eficacia y ausencia de influjo en los resultados unía la ventaja de ser uno de los reactivos del método, con la consiguiente simplificación. Para hacer más semejantes las condiciones entre standards y problemas doblamos dicha concentración de cobre en la solución isotónica, diluyéndola al 1/2 para preparar los standards. Soluciones de glucosa al 0'025 y 0'05 g. por 1.000 preparadas en esta forma y conservadas a la temperatura del laboratorio permanente inalteradas después de dos años y medio⁴.

La fórmula de Somogyi para el reactivo de cobre alcalino parece

⁴ Naturalmente no se puede garantizar una conservación tan larga para soluciones de las que se haga uso frecuente. Pero con un mínimo de precauciones normales en estos casos pueden considerarse indefinidamente estables.

la mejor ideada hasta la fecha para un reactivo de una pieza de buena estabilidad (mientras se guarde en buenas condiciones) y especialmente adecuado para descartar por completo los tubos especiales de Folin.

El reactivo molibdico es muy importante, sobre todo en fotometría. Los de Folin dan color inestable. La combinación reactivo de cobre de Somogyi y fosfomolibdico de Folin ('20) da resultados anómalos (King y Garner, '47). El reactivo mejorado de Folin ('26) puede utilizarse para colorimetría comparada siempre que se realice la comparación sin demora (y empleando 3 c. c. de reactivo en lugar del 1 c. c. del que proponemos). El reactivo arsenofosfotúngstico de Benedict ('22) da colores proporcionales, pero que desvanecen muy rápidamente. El reactivo arsenomolibdico de Nelson ('44) es de preparación insegura y da ciegas bastante altas; incluso la estabilidad del color no siempre es buena. Los mejores resultados pueden obtenerse con la simple solución sulfúrica de algunos ácidos fosfomolibdicos del comercio ($2\text{H}_3\text{PO}_4 \cdot 20\text{MoO}_3 \cdot 48\text{H}_2\text{O}$ Merck (Polis y Sortwell, '46) o British Drug Houses ó $\text{P}_2\text{O}_5 \cdot 24\text{MoO}_3 \cdot x\text{H}_2\text{O}$ Merck). Una concentración de 2 % basta en las condiciones expuestas para valorar glucemias hasta de 15 g. por 1.000.

En estas condiciones, y usando material en las debidas condiciones de limpieza, el empleo de sólo 0'05 c. c. de sangre no impide obtener resultados correctos. Incluso puede reducirse la cantidad de sangre si es necesario, sobre todo tratándose de glucemias elevadas. Hemos obtenido excelentes resultados en curvas de glucemia de ratas diabéticas utilizando 0'02 c. c. de sangre (con 1'88 c. c. de la solución isotónica).

Resumen

Se describe un método para la determinación de glucosa en 0'05 c. c. de sangre sobre la base de reducción de un reactivo cúprico y formación de azul de molibdeno. La solución isotónica de sulfato de cobre empleada para desproteinizar la sangre no lacada constituye un conservador excelente para los standards de glucosa. Los resultados se valoran con ayuda de dos standards y el sistema del autor para corregir la desviación a la ley de Beer, que permite el empleo indistinto de colorimetría o fotometría. El método es exacto y sencillo y permite efectuar una determinación en 20 minutos.

Summary

An improved copper reduction method for the estimation of sugar in 0.05 ml. of blood by colorimetry is described. The isotonic copper sulphate solution employed for deproteinize unlaked blood serves as an excellent agent for the conservation of the glucose standards. Different

commercially available phosphomolybdic acids may be employed for the development of an intense and stable colour. The results are evaluated with the aid of two standards by the author's system for correcting the deviation to Beer law, which permits to employ colorimetry as well as photometry. The method is accurate and simple, and permits to realize an estimation in 20 minutes.

Reagents

Isotonic copper sulphate-sodium chloride solution (ICS): 80 ml. of 10 per cent copper sulphate ($\text{SO}_4\text{Cu} \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) are diluted with saline (0.9 per cent ClNa) till 1 l.

10 per cent sodium tungstate.

Somogyi's alkaline copper reagent.

Standards: A stock solution is made by dissolving 0.25 g. glucose in ICS and making up to 100 ml.; 1 and 2 ml. of the stock solution are diluted with 50 ml. of ICS and water to 100 ml. to obtain standards of 2.5 and 5 mg. per cent respectively (equivalent to 100 and 200 mg. glucose per 100 ml. of blood).

Phosphomolybdic reagent: 20 g. of phosphomolybdic acid ($2\text{H}_3\text{PO}_4 \cdot 20 \text{MoO}_3 \cdot 48 \text{H}_2\text{O}$ or $\text{P}_2\text{O}_5 \cdot 24\text{MoO}_3 \cdot x\text{H}_2\text{O}$) are dissolved in 1 l. of 2N H_2SO_4 .

Procedure

To 1.85 ml. of ICS in a centrifuge tube add 0.05 ml. of blood, mixing and allowing to stand for some minutes. Add 0.1 ml. of sodium tungstate, mix and centrifuge briefly (or filter). Transfer 1 ml. of the clear liquid to a narrow (about 10 mm.) test tube, and in other two put 1 ml. of standards 100 and 200. To each tube add 1 ml. of alkaline copper reagent. Heat for 8 minutes in a boiling water bath, cool for 2 minutes in tap water and add to each tube 1 ml. of phosphomolybdic reagent. After another 2 minutes dilute if necessary (if more than 2 ml. of liquid must be added employ 1 N H_2SO_4 instead of water) for colorimetry or photometry (red filter), calculating respectively:

$$\frac{2 R_{200} - R_{100}}{R_{100} - R_{200}} \cdot 100 = I, \text{ and } \frac{(100 + I) R_{100}}{R_u} - I =$$

$$\text{or } \frac{E_u - (2 E_{100} - E_{200})}{E_{100} - (2 E_{100} - E_{200})} \cdot 100 =$$

= mg. glucose per 100 ml. of blood.

R being colorimeter readings, E extinctions, and U unknown.

Bibliografía

- Benedict, S. R. (1922): *J. Biol. Chem.*, **51**, 187.
Folin, O. (1926): *J. Biol. Chem.*, **67**, 357.
— (1929): *J. Biol. Chem.*, **82**, 83.
— y Wu, H. (1920): *J. Biol. Chem.*, **41**, 367.
Haslewood, G. A. D. y Strookman, T. A. (1939): *Biochem. J.*, **39**, 920.
King, E. J. y Garner, R. J. (1947): *J. Clin. Path.*, **1**, 30.
Nelson, N. (1944): *J. Biol. Chem.*, **153**, 375.
Polis, B. D. y Sortwell, M. (1946): *Arch. Biochem.*, **11**, 229.
Reinhold, J. G. (1949): *Science*, **109**, 376.
Sols, A. (1945): *R. esp. Fisiol.*, **1**, 355.
— (1946): *R. esp. Fisiol.*, **2**, 167.
Somogyi, M. (1931): *J. Biol. Chem.*, **90**, 725.
— (1945): *J. Biol. Chem.*, **160**, 61.