

Instituto de Fisiología - Facultad de Medicina — Barcelona
(Prof. Dr. J. Jiménez-Vargas)

Valoración de las proteínas del suero por referencia a la media normal

por A. Sols.

(Recibido para publicar el día 15 de noviembre de 1949)

Constituye un antiguo problema en materia de determinación de proteínas en suero la amplia diversidad de resultados según distintos métodos. Consecuencia de ello es la marcada falta de uniformidad en los datos sobre valores normales¹, que de unos a otros pueden variar dentro de órdenes tan apartados como de 5,8 a 7,0 g. por cien y de 8,6 a 9,8; algo parecido ocurre con los valores típicos en algunas enfermedades².

Ahora bien, todos coinciden en que el margen de variabilidad individual es pequeño, de ± 10 a 15 por 100 de la media, cualquiera que sea el valor absoluto con que ésta aparezca. Evidentemente esto es una realidad, mientras aquellas considerables diferencias absolutas son puro artificio originado por la *relatividad* de los valores "absolutos".

Existiendo en realidad un valor medio normal típico, la referencia al mismo parece el camino más corto para uniformizar resultados en la clínica.

La mezcla de sueros normales

La mezcla de sueros de un gran número de individuos considerados normales constituiría una media aritmética *objetiva*, la media normal, y sería un standard ideal para uniformizar

¹ "Die Angaben des Schrifttums über die normalen... Werte des Gesamteiweisses... sind oft sehr abweichend." (Hatz y Korányi, '38).

² "... one can only conclude that it would be fatuous and unprofitable to expect more than purely empirical data in disease states. Unfortunately, data acceptable even on an empirical basis are not always available." (Gulman, '48).

resultados. Y este ideal, que parece quimérico en la práctica, deja de serlo al tenerse en cuenta que dado el estrecho margen de variabilidad entre los normales (e incluso el discreto margen en los casos patológicos) bastará un número de sueros no sólo limitado sino bastante pequeño para obtener una "media objetiva" prácticamente igual a la normal, es decir, suficientemente aproximada.

Esta media objetiva puede tomarse como 100 por 100, o bien se le puede asignar convencionalmente un valor. Esto último parece más conveniente ya que no supone cambio de unidades. Lo más probable es que los valores normales reales estén alrededor de 7 g. por 100 (ver tabla 1). Y dado que el valor

TABLA I

Valores normales de proteínas del suero según trabajos recientes.

DATOS REVISADOS POR	Mínimos	Medios	Máximos	Desviación standard
Muntwyler ('45)	6,0—6,1		7,7—8,0	
Youmans y col. ('43)		6,95		
Robinson y col. ('44)		7,75		
Foy y col. ('46)		7,3		
Bing y col. ('46) ¹	6,3	7,2	8,0	0,39
Milam ('46)		7,19		0,43 ²
Nitshe y Cohen ('47)		6,72		0,41
Salversen y Lödöen ('48)	6,11	6,96	7,62	
150 observaciones propias				0,39

¹ Menores de 35 años.

² De 1,135 observaciones en blancos.

que adoptemos, como hemos dicho, no puede ser más que convencional, es evidente la ventaja de adoptar un número entero, que será, pues, 7,0 g. por 100.

Tomando como índice de la dispersión una desviación standard de 0,4 (ver tabla 1) se han calculado los probables márgenes de error con mezclas de distintos números de sueros. En la fig. 1 se representa la distribución probable de desviaciones con respecto a la media real de mezclas de 6, 9, 12 y 24 sueros. A su vista puede decidirse el mínimo de sueros para una exactitud proporcionada a las circunstancias. Considerando suficiente una probabilidad de 96 por 100 de casos los errores correspondientes a mezclas de 9 sueros serían menores de 3,9 por 100, y con 12 sueros, menores de 3,3 por 100. Incluso con sólo 6 sueros el margen de presunto error (4,7 por 100) sería

notoriamente menor que el de las divergencias entre distintos métodos. Y con 24 sueros sería menor que la variabilidad inherente a la casi totalidad de los métodos en uso.

En los laboratorios clínicos pueden utilizarse como sueros

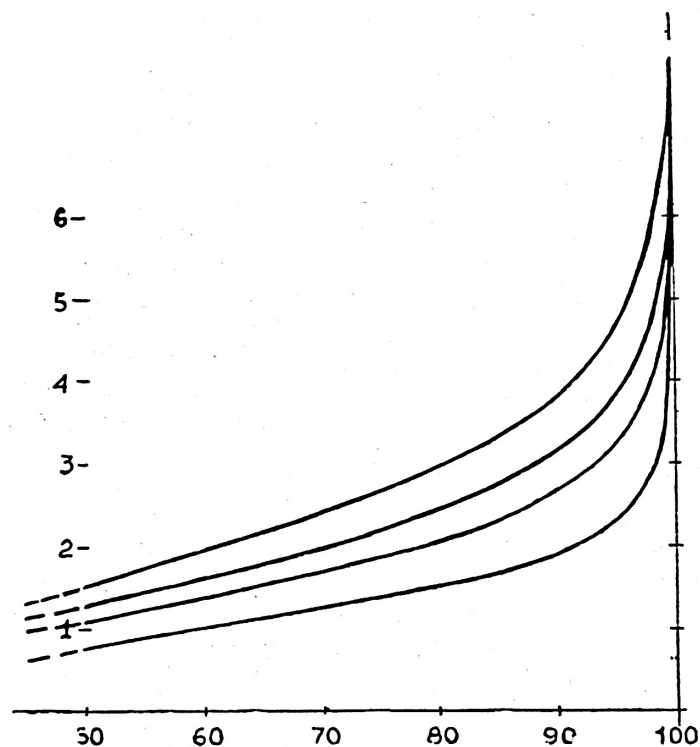


Fig. 1

Distribución de las desviaciones con respecto a la media normal de mezclas de 6, 9, 12 y 24 sueros de individuos normales. En abscisas $\%$ de casos. En ordenadas desviaciones $\%$.

presuntos normales los procedentes de reacciones de Wassermann negativas, pruebas de coagulación, etc., de individuos aparentemente normales, preferentemente hombres jóvenes. En todo caso deben evitarse los viejos y las embarazadas, y los hospitalizados, sea cual sea la afección que padezcan, por la frecuente hipoproteinemia que presentan (4, 6, 12).

Resultados y discusión

Hemos examinado 12 mezclas de 9 sueros presuntos normales cada una, procedentes de distintos laboratorios³ y de

³ Damos las más expresivas gracias a los Drs. Gras, Permanyer, Vives, Pellicer y Muns y a los Srs. Salazar y Mestres por habernos suministrado sueros.

personal de nuestro laboratorio. Aun sin haber tenido en cuenta el sexo ni edad, las desviaciones máximas respecto a nuestra mezcla standard fueron 2,6 y 3,4 por 100. En cinco de los casos la desviación no llegó al 1 por cien⁴.

Aun esta confirmación práctica no descarta la *posibilidad* de errores mayores. Pero esta posibilidad se da en cualquier método analítico, con independencia de su presunta exactitud, e incluso más fácilmente en los que pretenden ser más exactos, ya que su mayor complejidad deja pie a más posibilidades de error. Quien conozca bien los problemas de la exactitud en los métodos analíticos en general⁵ y en los de proteínas en particular encontrará bastante tolerables los márgenes indicados de presunto error.

Por otra parte, si el margen de variabilidad de la proteinemia es pequeño, la proteinemia no es precisamente una constante individual al margen de fluctuaciones, y de fluctuaciones no pequeñas. A lo largo del día hay oscilaciones hasta del 17 por 100 del valor medio (18). El ejercicio eleva la proteína sérica hasta en más de 0.75 g. por 100 (14). Dos minutos de estasis venoso en la extracción pueden elevarla por hemoconcentración hasta un 4 por 100. (18).

Un factor práctico importante en cuanto al empleo de mezclas de sueros normales como standard es la facilidad de conservación. Componentes muy inestables pueden considerarse al margen de este sistema. Pero las proteínas del suero cumplen muy bien este requisito, al menos frente a los métodos colorimétricos, ya que los sueros conservados en la nevera se mantienen inalterados varias semanas. Reunido suficiente número de sueros, la conservación de la mezcla puede prolongarse mucho más por distintos medios, incluso sin permanencia en la nevera, como luego diremos.

Con este sistema pasan desapercibidas en principio posibles diferencias entre distintos pueblos o en distintas circunstancias. No siempre, porque en determinados casos será precisamente un medio de ponerlo rápidamente de relieve la comparación de mezclas de sueros procedentes de distintos grupos de población, como en el caso de los hospitalizados que hemos referido. Hasta cierto punto este inconveniente teórico de poder ocultar diferencias en el tiempo y en el espacio (más aparente

⁴ Confirmando la frecuente hipoproteinemia entre los hospitalizados, aún entre aquellos en que no hay razón particular para presumirla hemos encontrado en 3 mezclas de 9 sueros de este origen desviaciones de -4,5 a -6,0 %.

⁵ "As for estimating the accuracy of his work, it can be said that the determinator is usually an optimist in thought and expression, while the analyst is a confirmed pessimist. The determinator reports silica in glass as 71.61, if not 71.611. The analyst, who knows that he is doing nicely to insure results in the first decimal place, reports 71.6 and thus is honest with himself and deceives no one as to his powers. (Lundell, '33).

que real, ya que para fijar "constantes" siempre se acudirá a métodos absolutos) se convierte en ventaja en cuanto a la valoración clínica de la proteinemia en que lo fundamental es la desviación *individual*, de lo normal en su ambiente.

En todo caso es conveniente hacer referencia a la media "normal". La forma de expresión puede ser "(MN 7)", a continuación del valor en gramos por cien. Con otros métodos la referencia a valores normales podría ser en cambio "(N 6,4 8.1)", "(N 5,8-7,3)", etc.

Valoración de proteínas

Reacción del biuret

La reacción del biuret es actualmente el procedimiento de elección para la valoración colorimétrica de las proteínas del plasma. El poder cromógeno de las distintas proteínas de plasmas normales y anormales parece perfectamente constante. Lloyd y col. ('48) han encontrado en el edema de hambre cambios cualitativos en las proteínas del suero que hacen variar la proporción de nitrógeno sin alterar la respuesta a la reacción del biuret. Una observación en contra de Mehl y col. ('49) que refieren una diferencia de 15 por 100 entre albúmina y globulina no parece suficientemente convincente.

A la par que se generalizan los métodos colorimétricos se ha hecho norma general la referencia al kjeldahl para valorar el suero que servirá de standard. Pero ni el factor de conversión es constante ni hay completo acuerdo en cuanto a su valor normal (una observación reciente en plasmas normales (2) ha dado 6,73 en lugar del clásico 6,25), ni deja de tener el kjeldahl, sobre todo en forma de micrométodo, un notorio margen de errores experimentales (3). La mezcla de sueros normales será más segura que un suero "valorado" en muchos casos.

La aplicación directa al suero simplifica mucho la determinación. El aislamiento previo da valores más bajos, aunque algunos (24) no lo han observado, pero no precisamente los valores reales, ya que si con la aplicación directa reaccionan los polipéptidos, con los usuales precipitantes (ácido tricloroacético sobre todo) no precipitan *todas* las proteínas (7). En todo caso el margen de posible error es mucho menor que entre los métodos basados en reacciones de aminoácidos. (cf. (1)).

La reacción del biuret ha alcanzado el máximo de simplificación con los reactivos "de una pieza". Gornall y col. ('49) obtienen los mejores resultados empleando como estabilizador el tartrato sódico potásico, en una modificación al reactivo de Weichselbaum. Los reactivos con tartrato tienen un color ver-

de azulado que hace impracticable la colorimetría si no se emplea un filtro adecuado. El reactivo con glicerina propuesto por nosotros (31) tiene un color azul mucho más parecido al violeta de la reacción, resultando que mientras fotométricamente dan el mismo resultado los reactivos con tartrato y con glicerina, éste es mucho mejor para colorimetría visual. Además nuestro reactivo es el más simple y de estabilidad ampliamente comprobada: tenemos muestras en perfecto estado después de dos años y medio de conservación.

Un inconveniente general de los reactivos de una pieza es que dan lugar a una marcada desviación a la ley de Beer. Fotométricamente se obtienen buenos resultados descontando una prueba en blanco. En colorimetría comparada el cálculo clásico es inexacto y puede dar lugar a errores considerables, aun empleando varios standards y aun comparando con dos de ellos como preconiza Weichselbaum ('46). Nuestra "colorimetría de dos standards" (29) permite obtener resultados exactos en todos los casos. Con la particularidad de que por la estabilidad del reactivo y de la reacción la "desviación" suele mantenerse constante, por lo que una vez establecida mediante el standard auxiliar bastará vigilarla de tiempo en tiempo. El standard auxiliar se prepara diluyendo al medio el ordinario.

La expresión $\frac{C_s L_s - C_{s/2} L_{s/2}}{L_{s/2} - L_s}$ da la magnitud del factor I,

que sustituido en $\frac{(C_s + 1) L_s}{L_p} - 1$ da la concentración problema. Más cómodo es el empleo de nuestras tablas (29). Sin filtro la desviación que corresponde al reactivo y técnica que indicamos es tal que el standard 1/2 da una lectura de 28.5-29 cuando se le compara con el ordinario a 20 mm. Por la frecuencia con que se presentará esta desviación damos la tabla correspondiente adaptada al caso (tabla 2).

Fraccionamiento

Para el fraccionamiento de las proteínas del suero utilizamos el sulfito sódico. Este precipita todas las globulinas a concentración de 26.8 por 100 (Cohn y Wolfson '48). A análoga concentración, pero más lentamente, lo hace el sulfato sódico (Majoor, '42, '46, '47, Milne '47) que a su vez permite la separación de albúmina + α globulina y albúmina + α + β globulinas a concentraciones de 19 y 15 por 100 respectivamente (Majoor, Milne; Kibrick y Blonstein '48). Así, pues, es factible la valoración por colorimetría de albúmina, α , β y γ globulinas, fácilmente y con satisfactoria concordancia con los resultados electroforéticos. Para simplificar reactivos utilizamos el sulfito para todos los fraccionamientos. Que la separación de

TABLA II

 $L_S = 20$ mm. $L_{S/2} = 28,8$ $C_S = 7,0$

Lp	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
12	14,6	14,4	14,3	14,1	14,0	13,9	13,7	13,6	13,4	13,3
13	13,2	13,0	12,9	12,7	12,6	12,5	12,4	12,2	12,1	12,0
14	11,9	11,8	11,7	11,5	11,4	11,3	11,2	11,1	11,0	10,9
15	10,8	10,7	10,6	10,5	10,4	10,3	10,2	10,1	10,0	9,96
16	9,87	9,78	9,69	9,60	9,51	9,43	9,35	9,27	9,19	9,10
17	9,02	8,94	8,87	8,79	8,71	8,64	8,57	8,49	8,42	8,34
18	8,27	8,20	8,13	8,07	8,00	7,93	7,87	7,80	7,73	7,67
19	7,60	7,54	7,48	7,42	7,36	7,29	7,23	7,18	7,12	7,06
20	7,00	6,95	6,89	6,83	6,78	6,72	6,67	6,62	6,56	6,50
21	6,45	6,40	6,35	6,30	6,25	6,20	6,15	6,10	6,05	6,00
22	5,96	5,91	5,87	5,82	5,77	5,73	5,69	5,64	5,59	5,55
23	5,51	5,47	5,43	5,39	5,35	5,31	5,26	5,22	5,18	5,14
24	5,10	5,06	5,02	4,98	4,95	4,91	4,87	4,83	4,79	4,76
25	4,72	4,68	4,65	4,61	4,58	4,54	4,51	4,47	4,44	4,40
26	4,37	4,34	4,31	4,27	4,23	4,20	4,16	4,13	4,10	4,07
27	4,04	4,00	3,97	3,94	3,91	3,88	3,85	3,82	3,79	3,76
28	3,73	3,70	3,67	3,64	3,61	3,59	3,56	3,53	3,50	3,48
29	3,45	3,42	3,39	3,37	3,34	3,32	3,29	3,26	3,24	3,21
30	3,19	3,16	3,14	3,12	3,09	3,07	3,04	3,02	3,00	2,97
31	2,95	2,92	2,90	2,88	2,85	2,83	2,80	2,78	2,75	2,73
32	2,71	2,68	2,66	2,64	2,62	2,60	2,58	2,56	2,54	2,52
33	2,50	2,48	2,46	2,44	2,42	2,40	2,38	2,36	2,33	2,30

$$I = 4,454; (C_S + I) L_S = 229,1$$

la γ globulina puede obtenerse también con sulfito sódico, se desprende de los resultados consignados en la tabla 3. Con ello la simplificación es máxima.

Método

Reactivos

Reactivo biuret (Sols, '47). — Disolver 4 g. de sulfato de cobre cristalizado ($\text{SO}_4\text{Cu} \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) en 50-100 c.c. de agua. Añadir 2 c.c. de glicerina: Mezclar. Añadir mezclando 400 c.c. de hidróxido sódico al 20 por 100. Completar con agua a 1 litro. El reactivo suele conservarse indefinidamente (excepcionalmente puede deteriorarse formando un precipitado negro con aclaramiento del líquido, en cuyo caso debe descartarse).

Sulfito sódico 28 por 100. — Disolver 28 g. de sulfito sódico anhidro en 93 c.c. de agua a 28°, lo que sólo se consigue removiendo bastante, y completar con agua a 100 c.c. La solución resultante es inestable. Debe conservarse en frasco claro y cuando se vaya a usar observar si hay sal cristalizada en el fondo; en caso de haberla, calentar y agitar hasta disolución completa⁶.

Sulfito sódico 19,8 por cien⁷ y 15,6 por cien⁸. Son estables.

Solución conservadora de Weichselbaum ('46). — Disolver 300

TABLA III

Resultados obtenidos por fraccionamiento con sulfito sódico en sueros normales y patológicos. Para comparación se determinó la globulina con sulfato sódico, en algunos casos.

Origen suero	Proteína total	Albumina	Globulinas			γ globulina con sulfato sódico	Diferencia entre γ globulina con sulfato sódico y sulfato
			α	β	γ		
Normal	6,71	4,40	1,01	0,50	0,85	0,72	-0,13
»	7,05	4,38	1,04	0,52	1,10	1,10	0,00
»	6,34	4,14	0,85	0,16	1,19	1,20	+0,01
»	6,59	3,97	0,59	0,85	1,18	—	—
»	6,78	4,82	0,50	0,85	0,61	—	—
»	7,30	4,19	1,18	0,80	1,12	—	—
»	6,90	3,58	1,55	0,53	1,24	—	—
medias:			0,96	0,60	1,04		
Cirrosis	8,00	2,27	2,02	0,87	2,84	2,78	-0,06
»	7,02	1,48	1,24	0,83	3,46	3,30	-0,16
»	6,35	1,33	0,72	0,90	3,40	3,49	+0,09
»	8,62	2,49	1,09	1,62	3,43	3,33	-0,10
»	7,91	4,10	1,03	0,38	2,39	2,32	-0,07
»	5,64	1,12	0,92	0,70	3,00	—	—
»	6,19	1,71	1,22	0,82	2,44	2,60	+0,16
	7,35	3,89	1,18	0,33	1,95	—	—
	6,35	3,13	1,32	0,58	1,32	1,25	-0,07
Afecciones varias	5,70	3,55	0,66	0,66	0,82	0,92	+0,10
	2,71	0,91	0,52	0,48	0,80	0,78	-0,02
	5,36	1,89	0,80	1,28	1,40	1,50	0,00
	3,67	1,10	0,45	0,40	1,72	1,72	0,00
							-0,02

⁶ Es fácil comprobar la concentración de esta solución determinando su densidad que debe ser 1,220 (cada gramo % por debajo de 28 disminuye la densidad en 0,008).

⁷ Densidad = 1,164.

⁸ Densidad = 1,132.

gramos de urea en unos 700 c.c. de agua. Añadir un cristal de timol del tamaño de un guisante y unos 3 g. de carbón activado. Calentar a la llama, dejando hervir unos minutos. Enfriar, filtrar y completar a 1 litro con agua. Guárdese en frasco oscuro.

Mezcla de sueros diluída. — Mezclar volúmenes iguales de 9-12 sueros de individuos normales, de preferencia hombres de menos de 40 años. Diluir un volumen de la mezcla con 24 volúmenes de la solución conservadora. Guárdese en frasco oscuro. Se conserva muchos meses a la temperatura del laboratorio.

Técnica

Con colorímetro

a) *Proteína total:*

Poner en un tubo de ensayo 4,8 c.c. de agua ⁹ y 0,2 c.c. de suero; en otro "S" 5 c.c. de la mezcla de sueros diluída; y en otro "S/2" 2,5 c.c. de ésta y 2,5 c.c. de agua. Añadir 5 c.c. de reactivo biuret a cada uno y mezclar. Después de un cuarto de hora comparar S con S/2 y el problema y calcular con la (s) tabla (s) o con las fórmulas:

$$\frac{7 L_s - 3,5 L_{s/2}}{L_{s/2} - L_s} = 1, y \frac{(7 + 1) L_s}{L_p} - 1 = g. \text{ de proteína por } 100$$

c.c. de suero.

b) *Proteína total y albúmina:*

Poner en un tubo de ensayo 12 c.c. de sulfito sódico 28 por 100, añadir 0,5 c.c. de suero, mezclar por inversión (no agitar), trasladar 2 c.c. del líquido turbio a un tubo "T" y filtrar el resto enseguida a través de doble papel duro de gran retentividad. El filtrado debe de ser claro desde el principio; en caso contrario volver a pasar por el mismo filtro ¹⁰. Trasladar 2 c.c. del filtrado claro a otro tubo "A".

Poner 2 c.c. de la mezcla de sueros diluída en un tubo "S" y 1 c.c. más 1 c.c. de agua en otro "S/2".

Añadir a cada tubo 4 c.c. de reactivo biuret diluído al 1/2 con agua.

Colorimetría y cálculos como en a). (Si la albúmina es muy baja puede mejorarse la colorimetría utilizando 4 c.c. del filtrado con 2 c.c. del reactivo biuret sin diluir).

⁹ Weichselbaum y después otros emplean solución conservadora para la dilución del suero y para la ciega. Pero habiendo observado que la mezcla de sueros diluída se mantiene límpida si se conserva en frasco oscuro creemos superflua esta medida (sobre todo en colorimetría).

¹⁰ Cohn y Wolfson ('48) aconsejan desechar la primera porción de filtrado para evitar posibles pérdidas de albúmina por adsorción en el filtro. Pero como indica Mojoor ('47) tal adsorción es inapreciable si el papel es duro. Lo mismo hemos encontrado nosotros (con filtros Albet n.º 252).

c) *Fraccionamiento completo:*

Además de todo lo indicado en b) preparar dos tubos con 12 c.c. de los sulfitos 19,8 y 15,6 por 100 ("A α " y "A $\alpha \beta$ " respectivamente) y 0,5 c.c. de suero. Mezclar por inversión y después de 10 minutos filtrar y tratar 2 c.c. de cada filtrado como en b). Obtenidos los valores de T, A, A α y A $\alpha \beta$ se deducen los de las fracciones globulínicas: A α — A = α ; A $\alpha \beta$ — A = β ; T — A $\alpha \beta$ = γ globulina.

Con fotómetro

a) *Proteína total:*

Poner en un tubo de ensayo 4,8 c.c. de agua y 0,2 c.c. de suero y en otro "S" 5 c.c. de la mezcla de sueros diluída. Añadir 5 c.c. de reactivo biuret y fotometrar después de un cuarto de hora con filtro verde (óptimo 540 m μ .) compensando con reactivo biuret diluído al 1/2 con agua.

Cálculo: $Ep \frac{7}{Es} = g.$ de proteína por 100 c.c. de suero.

b) *Proteína total y albúmina:*

Poner en un tubo de ensayo 12 c.c. de sulfito sódico 28 por 100, añadir 0,5 c.c. de suero, mezclar por inversión (*no* agitar), trasladar 2 c.c. del líquido turbio a un tubo "T" y filtrar el resto en seguida a través de doble papel duro de gran retentividad. El filtrado debe ser claro desde el principio; en caso contrario volver a pasar por el mismo filtro¹⁰. Trasladar 2 c.c. del filtrado claro a otro tubo "A".

A ambos tubos y a otro "S" con 2 c.c. de la mezcla de sueros diluída añadir 4 c.c. de reactivo biuret diluído al 1/2 con agua.

Fotometría y cálculo como en a), compensando con reactivo biuret al 1/3. T = proteína total; A = albúmina; T-A = globulina.

c) *Fraccionamiento completo:*

Además de todo lo indicado en b) preparar dos tubos con 12 c.c. de los sulfitos 19,8 y 15,6 por 100 ("A α " y "A $\alpha \beta$ " respectivamente). Añadir a cada uno 0,5 c.c. de suero, mezclando por inversión; después de 10 minutos filtrar, etc., como en b). Obtenidos los valores de T, A, A α y A $\alpha \beta$ se deducen los de las fracciones globulínicas: A α — A = α ; A $\alpha \beta$ — A = β ; T — A $\alpha \beta$ = γ globulina.

Resumen

Se propone el empleo de una mezcla de sueros de individuos considerados normales como standard para la valoración de las proteínas del suero. Convencionalmente se toma como valor medio nor-

mal 7,0 g. por 100. El margen de error probable si se utiliza una mezcla de 9 sueros es menor de 4 por 100 (0,3 g. por 100), es decir, no mayor que el de la mayoría de los métodos usuales. Por este procedimiento se trata de evitar las conocidas divergencias entre los valores obtenidos con distintos métodos.

Entre los métodos colorimétricos se prefiere el de la reacción del biuret con el reactivo "de una pieza" del autor. La desviación a la ley de Beer en colorimetría comparada se corrige por la colorimetría de dos standards.

Albúmina y globulina y las fracciones α , β y γ de ésta pueden separarse fácilmente con sulfito sódico a las concentraciones de 26,8, 19, y 15 por 100.

Se exponen técnicas detalladas para la determinación de proteína total y sus fracciones por colorimetría o fotometría.

Summary

It is proposed the employ of a pool of sera of normal subjects as a standard for the estimation of serum proteins. 7.0 g. per cent is adopted as average normal value. The range of probable error when using a pool of 9 sera is less than 4 per cent (0.3 g. per cent), i. e., not greater than that of most usual methods. By this procedure, the known divergences among different methods will be avoided.

Among the colorimetric methods it is preferred that of the biuret reaction with the author's "one piece" reagent. Beer law deviation in visual colorimetry is corrected by the two standards colorimetry.

Albumin and globulin, and the α , β and γ fractions of the later may be easily separated with sodium sulfite at 26.8, 19, and 15 per cent.

Detailed techniques are described for the estimation of total serum protein and its fractions either by colorimetry or photometry.

Bibliografía

- (1) ALBANESE, A. A., SAUR, B. y IRBI, V. (1947) *J. Lab. Clin. Med.*, 32, 296.
- (2) ARMSTRONG, S. H., Jr., BUDKA, M. J. E. y MORRISON, K. C. (1947) *J. Am. Chem. Soc.*, 69, 416.
- (3) BERRY, B. J. y PERKINS, E. (1947) *Am. J. Clin. Path.*, 17, 487.
- (4) BING, J. (1946) *Acta Med. Scand.*, 126, 273.
- (5) BING, J., NAESER, J., RASCH, G. y ROJEL, K. (1946) *Acta Med. Scand.*, 126, 351.
- (6) CAYER, D. y NABORS, G. C. (1947) *Southern Med. J.*, 40, 744.
- (7) CHRISTENSEN, H. N. y LYNCH, E. L. (1946) *J. Biol. Chem.*, 166, 87.
- (8) COHN, C. y WOLFSON, W. Q. (1948) *J. Lab. Clin. Med.*, 33, 367.

- (9) FOY, H., RETTER, K., DAMKAS, Ch., DEPANIAN, M., MITCHELL, V. y PITCHFORD, R. J. (1946) *Brit. Med. J.*, 486.
- (10) GORNALL, A., BARDAWILL, C. J. y DAVID, M. M. (1949) *J. Biol. Chem.*, 177, 751.
- (11) GUTMAN, A. B., (1948) *Advances in protein chemistry*, 4, 155.
- (12) GUTMAN, A. B., MOORE, D. H., GUTMAN, E. B., MC CLELLAN, V. y KABAT, E. A. (1941) *J. Clin. Invest.*, 20, 765.
- (13) HATZ, E. B. y KORÁNYI, A. (1948) Bestimmungsmethoden der Bluteiweisse, en *Die Eiweisskörper des Blutplasmas de Benhold*, Kylin y Rusznyak.
- (14) HYNES, M., ISHAQ, M. y MORRIS, T. L. (1946) *Lancet*, 251, 590.
- (15) KIBRICK, A. C. y BLONSTEIN, M. (1948) *J. Biol. Chem.*, 176, 983.
- (16) LUNDELL, (1933) *Ind. Eng. Chem., Anal. Ed.*, 5, 221.
- (17) LLOYD, B. B., SINCLAIR, H. M. y TWEEDIE, M. C. K. (1948) *Biochem. J.*, 43, 17 P.
- (18) MAJLOOR, C. L. H. (1942) *Over de Beteekenis van het serum-albumine*. Tesis Amsterdam.
- (19) MAJLOOR, C. L. H. (1946) *Yale J. Biol. Med.*, 18, 419.
- (20) MAJLOOR, C. L. H. (1947) *J. Biol. Chem.*, 169, 583.
- (21) MEHL, J. W., PACOVSKA, E. y WINZLER, R. J. (1949) *J. Biol. Chem.*, 177, 13.
- (22) MILAM, D. F. (1946) *J. Lab. Clin. Med.*, 31, 285.
- (23) MILNE, J. (1947) *J. Biol. Chem.*, 169, 595.
- (24) MOGLIA, J., VILALLONGA, F. y MARENZI, A. D., (1945) *Pub. Centro Invest. Tisiol.*, 9, 133.
- (25) MUNTWYLER, E. (1945) *J. Lab. Clin. Med.*, 30, 526.
- (26) NITSHE, G. A., Jr. y COHEN, P. P. (1947) *Blood.*, 2, 363.
- (27) ROBINSON, W. D., PAYNE, G. C. y CALVO, J. (1944) *J. Am. Dietet. A.*, 20, 289.
- (28) SALVERSEN, H. A. y LODOEN, O. (1948) *Acta Med. Scand.*, 130, 525.
- (29) SOLS, A. (1945) *R. esp. Fisiol.*, 1, 355.
- (30) SOLS, A. (1946) *R. esp. Fisiol.*, 2, 175.
- (31) SOLS, A. (1947) *Nature*, 160, 89.
- (32) WEICHSELBAUM, T. E. (1946) *Am. J. Clind. Path. Tech. Suppl.*, 10, 40.
- (33) YOUNG, J. B., PATTON, E. W., SUTTON, W. R., KERN, R. y STEINKAMP, R. (1943) *Am. J. Pub. Health*, 33, 955.