

Cuantificación de la glucosa por el método de la O-Toluidina

EDUARDO BRILLA* KARL SCHOSINSKY*
MIGUEL ESQUIVEL** MIGUEL CHAVARRIA*

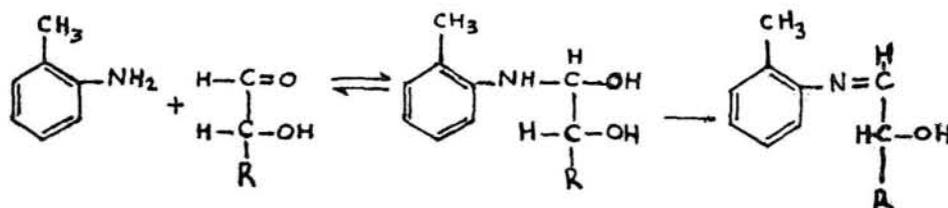
RESUMEN

Se presenta un estudio analítico en torno al método de la O-Toluidina para glucosa sérica. El límite máximo de la linealidad bajo las condiciones usadas fue de 500 mg/dl. Las pruebas de reproducibilidad mostraron coeficientes de variación para valores bajos, intermedios y altos de glucosa sérica de 3,6, 2,4 y 1,8% respectivamente. Las pruebas de recuperación en suero y en orina mostraron resultados aceptables dentro de los rangos permisibles.

Se observaron coeficientes de correlación muy buenos entre este método y los de Folin-Wu modificados ($r=0.96$) y ferriicianuro automatizado ($r=0.99$). Los valores margen normales de una población estudiantil universitaria, de uno y otro sexo, fueron de 70 a 104 mg/dl (± 2 D.S.)

La determinación cuantitativa de glucosa en sangre ha preocupado a muchos químicos clínicos desde hace muchos años. Por tratarse de un análisis rutinario, con frecuencia de informe urgente y ante la necesidad de ofrecer resultados exactos y precisos a través de procedimientos sencillos, rápidos y económicos, nos dimos a la tarea de estudiar el método de la O-toluidina, cuyas bondades mencionadas en la literatura lo señalan como método de elección para cualquier laboratorio.

La utilización de la O-toluidina en la determinación de aldosaes en un medio de ácido acético, fue establecido como método rutinario por Hultman (7), procedimiento que ha sido modificado por varios autores y utilizado en métodos manuales y automáticos (2,10). Se fundamenta el procedimiento en una reacción de condensación de la glucosa y aminas aromáticas primarias en un medio de ácido acético glacial, según la siguiente secuencia de reacciones:



El producto coloreado final es el resultado de la reacción de la O-toluidina con la glucosa, formándose glucosilamina y la

correspondiente base de Schiff (9). Este producto coloreado tiene un máximo de absorción de 625 a 635 nm (1), cuya densidad óptica se incrementa proporcionalmente de acuerdo a la ley de Beer-Lambert entre una amplia gama de concentraciones (0 a 500 mg/dl en nuestro laboratorio), sin embargo se recomienda leer el producto coloreado final entre 0.1 a 1.0 de absorbancia.

* Cátedra de Química Clínica, Departamento de Análisis Clínicos, Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica, Hospital San Juan de Dios.

** Laboratorio Clínico, Hospital San Juan de Dios.

Materiales y Reactivos:

O-toluidina, 5%

Disuelva 1.5 gramos de tiourea (grado reactivo) en 500 ml de ácido acético glacial (grado reactivo) contenido en un balón aforado de un litro. Agregue 50 ml de O-toluidina (The British Drug Houses Ltd., Englad) y complete a un litro con ácido acético glacial. Mezcle esta solución y conserve a temperatura ambiente en un frasco ámbar al abrigo de la luz. El reactivo se puede utilizar recién preparado y es estable por un período de varios meses (9).

Patrón de Glucosa de reserva (10 mg/ml)

Disuelva en un balón aforado de 100 ml un gramo (1.000 g) de glucosa anhidra (Q.P.) en una solución acuosa de ácido benzoico (0.2 g/dl). Esta solución es estable a temperatura ambiente.

Patrón de glucosa de trabajo

Diluya apropiadamente el patrón de reserva para obtener los distintos valores deseados en la calibración o para los controles diarios (una dilución 1:10 del patrón de reserva proporcionará un patrón de trabajo de 100 mg/dl).

Procedimiento

- 1) Coloque 5 ml del reactivo de O-toluidina en un tubo de rosca de 25 ml (esta operación debe efectuarse mediante una pipeta automática).
- 2) Agregue 0.1 ml de suero, plasma u orina. Agite y cierre flojamente con un tapón adecuado.
- 3) Coloque los tubos en baño de agua de 95° a 100°C por 10 minutos.
- 4) Enfríe por 2 a 3 minutos en agua del tubo.
- 5) Lea a una longitud de onda de 630 nm con una celdilla de 12 mm de diámetro previo ajuste a cero de absorbancia con un blanco de reactivos utilizando agua en lugar de muestra.

El blanco de reactivos y los patrones, recibirán idéntico tratamiento que la muestra.

El espectrofotómetro usado en este trabajo fue un Coleman Junior II A.

Calibración

Para establecer la curva de calibración recomendamos determinar los siguientes puntos: 50, 100, 200, 300 y 500 mg/dl. Con las concentraciones de más de 350 mg/dl se obtienen absorbancias de más de 1.0.

Cálculos

La concentración de glucosa en las muestras se calcula a partir de la siguiente expresión:

$$\text{glucosa (mg/dl)} = \frac{\text{Absorbancia de la muestra}}{\text{Absorbancia del patrón}} \times \text{Concentración del patrón}$$

La concentración del patrón usado en este trabajo fue de 100 mg/dl.

Los mg/dl de glucosa se pueden obtener también haciendo uso de la curva de calibración.

Resultados y comentarios

El procedimiento manual para determinar glucosa con el reactivo de la O-toluidina es sensible, rápido, no requiere desproteínización y utiliza un solo reactivo, el cual es estable. El color final, a la longitud de onda utilizada en la técnica es relativamente específico para la glucosa. La adición de tiourea al reactivo de O-toluidina, produce un color final verde, transparente, con escaso color en el blanco de reactivos y más estabilidad en el reactivo en sí (3).

Como la reacción es muy sensible al agua, su concentración no debe exceder el 10% (7). Las proteínas (hasta 11 g/dl) y la bilirrubina (hasta 18,0 g/dl), no interfieren en la determinación (4). La hemoglobina en concentraciones mayores a 700 mg/dl causa interferencia importante, por lo que estos casos se debe recurrir a un filtrado libre de proteínas obtenido con ácido tricloroacético. En ciertas ocasiones la solución final lista para la lectura puede presentar turbidez, lo cual puede deberse a temperaturas de reacción inferiores a las recomendadas; pero de ordinario este problema sucede con muestras lipémicas. En estos casos el análisis deberá repetirse con un filtrado libre de proteínas (9). La ley de Beer y Lambert se cumple en nuestras condiciones de trabajo hasta un máximo

CUADRO I
EFECTO DE CONSTITUYENTES SERICOS EN EL METODO
DE LA O-TOLUIDINA

(PRUEBAS DE RECUPERACION)*

Muestra	Glucosa (mag/dl)		recuperación
	Valor observado	Valor esperado	
Suero	83.9	—	—
Suero + 20 mg/dl	104.8	103.9	20.9
Suero + 50 mg/dl	135.8	133.9	51.9
Suero + 100 mg/dl	183.6	183.9	99.7

* Promedio de valores obtenidos por triplicado.

de 500 mg/dl de glucosa. Muestras con su efecto interferente es despreciable. Basados en los resultados obtenidos en las pruebas de recuperación en orina (cuadro II)

Los resultados de las pruebas de recuperacion superiores requieren previa dilución. (cuadros I y II) muestran que no hay efecto apreciable de los constituyentes séricos o urinarios normales, lo que señala buena exactitud del método en cuestión; sin embargo, debe tomarse en consideración que la reacción de la O-toluidina no es específica para la glucosa, siendo que la galactosa y la manosa reaccionan equimolecularmente en relación a glucosa (1,9). Otras sustancias reportadas como interferentes son: lactosas, arabinosas, maltosa (1,9), ribosa, xilosa y fructuosa (1,6). Debido a que estos componentes se encuentran generalmente en concentraciones muy bajas en suero,

podemos considerar este método, como un buen procedimiento para cuantificar glucosa en orina. Sin embargo no hay que dejar de considerar los posibles interferentes positivos que pueden producir otros aldosa-cáridos presentes en la misma.

Las pruebas de precisión consistieron en 20 determinaciones por el método en estudio, el de Folin-Wu modificado —conocido en nuestro medio como método modificado de Somogyi Nelson— (8) y el automatizado del ferricianuro.* Los análisis, por cada uno de los métodos, comprendieron concentraciones bajas, intermedias y altas de glucosa sérica. Las determinaciones se llevaron a cabo en un lapso de 40 días. En el cuadro III puede observarse que los

* Autoanalyzer, Basic II, Technicon Corporation Instruments Corp., Tarrytown, N. Y. 10591.

CUADRO II
EFECTO DE CONSTITUYENTES DE LA ORINA EN EL METODO
DE LA O-TOLUIDINA

(PRUEBAS DE RECUPERACION)*

Muestra	Glucosa (mg/dl)		recuperación
	Valor observado	Valor esperado	
Orina	23.1	—	—
Orina + 25 mg/dl	49.8	48.1	24.1
Orina + 50 mg/dl	75.1	73.1	52.0
Orina + 200 mg/dl	212.5	223.1	192.6

* Promedio de valores obtenidos por triplicado.

CUADRO III

ESTUDIO COMPARATIVO DE LOS TRES METODOS CON BASE EN PRUEBAS DE PRECISION

Expresiones estadísticas	Valores bajos			Valores intermedios			Valores altos		
	O-tol	Folin	Ferri. CN	O-tol	Folin	Ferri. CN	O-tol	Folin	Ferri. CN
D.S. (mg/dl)	75	76	76	120	124	120	183	193	191
X (mg/dl)	2.7	3.8	2.9	2.9	3.4	3.8	3.3	9.2	9.2
C.V. (%)	3.6	5	3.8	2.4	2.9	3.2	1.8	4.8	4.8

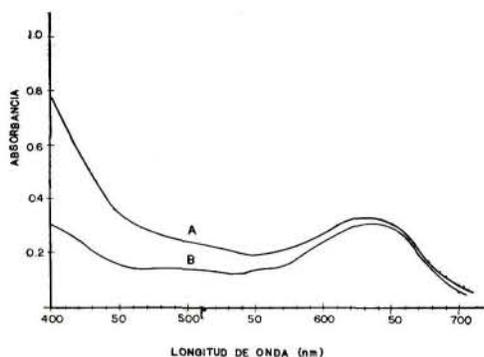


Fig. 1 Espectros de absorción del producto coloreado producido por la reacción de la O-toluidina con glucosa.

- A. Espectro de absorción contra agua
- B. Espectro de absorción contra blanco de reactivos.

valores más bajos en cuanto a desviación estándar y coeficiente de variación correspondieron al método de la O-toluidina, lo que lo señala, en las condiciones en que se realizaron los experimentos, como el más preciso de los tres. Los parámetros obtenidos para los otros dos métodos los señalan como de semejante precisión. Sin embargo, deben tenerse en consideración que se tuvo cuidados extremos con los métodos de la O-toluidina y el de Folin-Wu modificado, mientras que las muestras analizadas por el método automatizado del ferricianuro representan la forma como se corren de rutina en un laboratorio clínico hospitalario.

Se observa también en las pruebas de precisión que con el método de la O-toluidina, se obtuvo en menor coeficiente de variación con el suero de mayor concentración de glucosa (193 mg/dl), mientras que para los otros dos métodos sucedió lo contrario. Por el método del ferricianuro, los valores altos fueron los más imprecisos.

La mejor precisión obtenida con el método de la O-toluidina se puede atribuir a la sencillez del método que requiere de dos operaciones de pipeteo por muestra.

Otro de los parámetros estudiados y que deben tenerse presente son el tiempo y la temperatura a la que se lleva a cabo la reacción. Si los tubos se dejan en agua a ebullición por medio de 10 o más de 12 minutos la intensidad del color final será menor a la óptima. Reacciones con tiempo y temperatura, diferentes a las anotadas

puede dar origen a resultados poco fidedignos. Recomendamos por lo tanto ajustarse al máximo a las condiciones propuestas en el procedimiento. Observamos que la velocidad de desarrollo del color es, en cuanto a tiempo, independiente de la concentración; lo anterior coincide con los hallazgos de Dubowski (1).

La figura 1 muestra el espectro de absorción del producto de reacción final leído contra agua y contra blanco de reactivos. Como puede observarse, la absorbancia máxima del producto coloreado se obtiene a 630 nm, lo que coincide con los hallazgos de Dubowski (1). Cuadros I, II y III).

Las pruebas de correlación comprendieron el análisis de 98 muestras de suero por tres métodos, el de la O-toluidina, el de Folin-Wu modificado y el del ferricianuro automatizado. Todos los sueros fueron obtenidos del Laboratorio Clínico del Hospital San Juan de Dios, de pacientes internados con diversos padecimientos. La escogencia de las muestras a analizar fue al azar.

Los valores normales se analizaron en población estudiantil. Para ello se obtuvieron 86 muestras de la ficha médica de la Universidad de Costa Rica, de estudiantes de 18 a 32 años de edad, de uno y otro sexo, y aparentemente sanos. El valor promedio obtenido fue de 87 mg/dl de suero, con valores margen de 70 a 104 mg/dl, (± 2 desviaciones estándar).

Por los datos indicados en las figuras 2 y 3, queda evidente la buena correlación entre los tres métodos ($r=0.99$ y $r=0.96$ respectivamente); de lo que se infiere la ventaja en la aplicación del método de la O-toluidina en nuestro medio ya que los valores normales obtenidos corresponden,

con ligeras diferencias, a los valores margen séricos y plasmáticos, reportados para el método de Folin-Wu modificado (5), y el automático del ferricianuro (70 a 100 mg/dl). Esta buena correlación entre los tres métodos coincide con lo reportado por Dubowski (1) y Feteris (3).

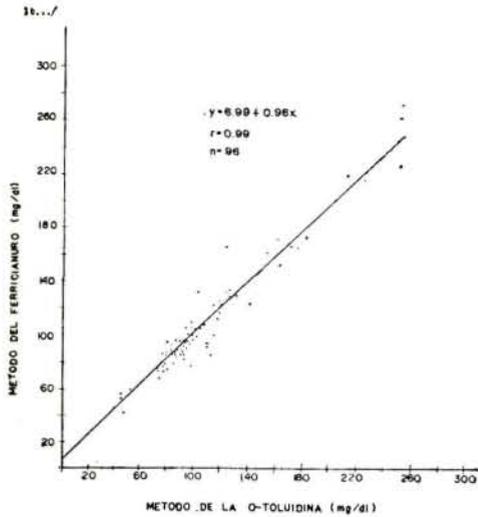


Fig. 2 Comparación entre el Método de la O-Toluidina y el del Ferricianuro Automatizado.

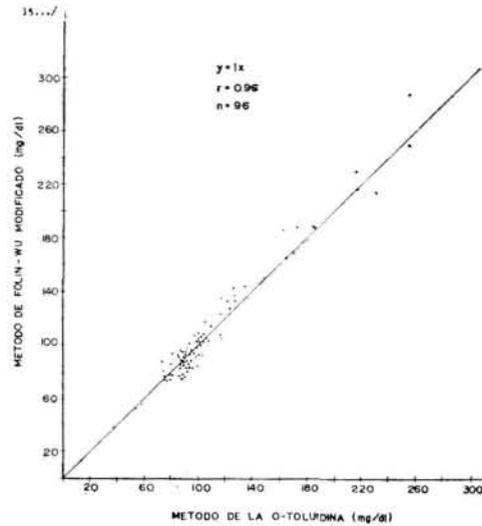


Fig. 3 Comparación entre el Método de O-Toluidina y el de Folin-Wu Modificado.

BIBLIOGRAFIA

- 1.—DUBOWSKI, K. M.
An O-toluidine method for body-fluid glucose determination. *Clin. Chem.* 8:215, 1962.
- 2.—ELSER, R. C., AND SAVORY, J.
Comparison of manual automated, and "kit" methods for the measurement of glucose and urea in plasma.
Am. J. Clin. Path. 54(6):820, 1970.
- 3.—FETERIS, W. A.
A serum glucose method without protein precipitation.
Am. J. Med. Tech. 31:17, 1965.
- 4.—FRINGS, C. S., RATLIFF, C. R., AND DUNN, R. T.
Automated determination of glucose in serum or plasma by a direct O-toluidine procedure.
Clin. Chem. 16(4):282, 1970.
- 5.—HENRY, R. J.
Química Clínica. Principios y Técnicas. Tomo II, Jims, Barcelona, 1969, p. 795-796.
- 6.—GOODWIN, J. F.
Method for simultaneous direct estimation of glucose and xylose in serum. *Clin. Chem.* 16:85, 1970.
- 7.—HULTMAN, E.
Rapid specific method for determination of aldoses in body fluids.
Nature, 183:108, 1959.
- 8.—SÁENZ, G. F., VINOCOUR, E., VALENCIANO, E., ARROYO, G. Y. ATMETLLA, F.
Mediciones de glucosa verdadera en sangre venosa, sangre capilar y suero, en adultos sanos costarricenses.
Act. Méd. Cost. 15(2):143, 1972.
- 9.—TIETZ, N. W.
Química Clínica Moderna. Interamericana, México, 1872, p. 162-163.
- 10.—YEE, H. Y., JENEST, E. S., AND BOWLES, F. R.
Modified manual or automated O-toluidine system for determining glucose in serum, with an improved aqueous reagent.
Clin. Chem. 17(2):103, 1971.