

# SECRECIÓN DE FÓSFORO DURANTE LA ABSORCIÓN DE AZÚCARES. I. MÉTODOS DE DETERMINACIÓN DEL FÓSFORO \*

**M. R. Q. DE KASTNER**

Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, D.F.

(Con 6 figuras en el texto)

No se conoce todavía con precisión el conjunto de procesos bioquímicos que determinan la absorción selectiva de azúcares por el intestino. Como una aportación a la resolución de este problema de la transferencia activa de sustancias a través de la membrana, hemos realizado un estudio bastante detenido de la naturaleza del fósforo segregado durante la absorción de azúcares, y así mismo, hemos intentado seguir las variaciones cuantitativas que presentaban estas distintas fracciones durante diferentes tiempos de absorción y en condiciones experimentales distintas. Parecía previsible que los cambios metabólicos inducidos en las células de la mucosa intestinal por la presencia de azúcares distintos, o de sustancias no azúcares acompañadas o no de algún inhibidor típico de la absorción selectiva, deberían también afectar al curso y cuantía de la secreción de estos distintos compuestos de fósforo por el epitelio.

El primer problema con que tuvimos que enfrentarnos fué el de escoger una técnica de determinación de las distintas fracciones de fósforo que hiciera posible valoraciones precisas dentro de las amplias variaciones previsibles de los diferentes compuestos fosforados. Esta primera parte, está dedicada a los trabajos que hemos realizado en este sentido.

El autor agradece a los Doctores: Francisco Ponz Piedrafita (Universidad de Barcelona) y Gilberto G. Villela (Instituto Oswaldo Cruz) sus varias sugerencias en la preparación de este trabajo.

---

\* Recibido para su publicación en el 24 de Agosto de 1959.

Trabajo realizado en los Laboratorios de Fisiología y Bioquímica de la Universidad de Barcelona (España) y en el Laboratorio de Bioquímica de la División de Química y Farmacología del Instituto Oswaldo Cruz.

## MÉTODOS

### 1. GENERALIDADES SOBRE TÉCNICAS

Para el estudio cuantitativo del fósforo, uno de los métodos colorimétricos mas utilizados es el de su determinación por la reacción del azul de molibdeno. Para ello, se le suele pasar al estado de fósforo inorgánico y luego es transformado en un complejo fosfomolibdico (75) que, por ulterior reducción da un complejo coloreado (6, 26, 80) estimable colorimetricamente.

Trátase de un método muy sensible que ha dado lugar a un gran número de estudios y modificaciones por sus riesgos de infidelidad. Los primeros trabajos se encaminaron a encontrar la acidez adecuada (4, 13, 75), lo que parece ser resuelto por BRIGGS (10,11) y FISKE & SUBBAROW (23), hasta el punto de que los trabajos posteriores ya muestran métodos completos que vienen siendo usados incluso hoy en día en microanálisis y en general en química biológica.

La selectividad de la reducción del fosfomolibdico parece estar condicionada a la cantidad de molibdico y a la energía del reductor (65, 43, 80).

Por otra parte, la presencia del fósforo como impureza de los reactivos y la pureza de los propios reactivos afecta la intensidad del color (59, 66).

Desde que se conoce que el molibdato acelera la catalización de la hidrólisis ácida de los compuestos del fósforo ácido lábil (52, 78, 79) se proponen previas precipitaciones (24, 17, 49), incluso cuando se trata de valorar el acetil fosfato (47) y acetil y creatin (48) en presencia del ortofosfato. Según ENNOR & ROSENBERG (19) cuando se trabaja en presencia de creatín fosfato, el ortofosfato procedente de la hidrólisis del fosfato lábil, migra al disolvente orgánico interfiriendo el análisis. Sin embargo ERNSTER *et alii* demuestran que tales objeciones fueron exageradas (21).

También tienen particular interés las interferencias producidas por reactivos necesarios en el tratamiento previo del problema. Tal es el caso del tricloroacético (50), del glicerofosfato (8, 38), etc.

Siguiendo a GLICK (31) señalaremos los cuatro grupos de métodos siguientes:

a) *Método de Fiske & Subbarow* — Principio (23). El fosfato pasa a ácido fosfomolibdico en medio ácido ( $H_2SO_4$  0.5M) y es reducido por el ácido 1-amino-2-naphtol-4-sulfónico.

Como modificaciones importantes podemos citar las obtenidas substituyendo el 1-amino-2naphtol-4sulfónico por otros reductores tales como: hidroquinona (18), 2-4diaminofenol (Reductor Final Agfa) (57, 68), monometil-p-aminofenol (32, 46, 73, 77), ácido ascórbico (2,25) tiosulfato (37), cloruro estannoso (8, 13, 14, 15, 16, 36, 43, 44, 45, 60, 69, 81) y sulfato ferroso (64, 72, 74).

Otros métodos se basan en pequeñas modificaciones (5, 33, 35, 50, 76).

Un estudio crítico del método y de sus modificaciones se debe a FURUKAWA *et alii* (27).

b) *Método de King* — Principio (51). El fosfato pasa a ácido fosfomolibdico en presencia de ácido perclórico y es reducido de acuerdo con el método de FISKE & SUBBAROW.

Se han sugerido pequeñas modificaciones (1, 42) e incluso una (58) que permite un aumento de sensibilidad unas cuatro veces mayor.

Un examen crítico del método ha sido realizado por MITSUHASHI & NAKANISHI (56).

c) *Método de Lowry & Lopez* — Principio (51). A fin de eliminar la interferencia del fósforo ácido lábil se procede a una cuidadosa desproteinización y se trabaja a un pH 4. El fosfato se convierte en fosfomolibdato en acetato buffer a un pH 4 y es reducido por el ácido ascórbico.

Se han sugerido algunas pequeñas modificaciones al método (22, 62) y se han discutido los efectos del ácido tricloroacético sobre la intensidad del color (63).

d) *Método de Berenblum & Chain* — Principio (7). Para eliminar las sustancias no fosfatos que puedan interferir, se sirve de la extrema solubilidad del ácido fosfomolibdico en los disolventes orgánicos. Así el ácido fosfomolibdico formado en solución acuosa de ácido sulfúrico, se extrae con isobutanol y luego se reduce con cloruro estannoso. Consigue intensidades de color estables por poco tiempo (61).

Una modificación clásica es la dada por MARTIN & DOTY (54) quienes substituyen el isobutanol por una mixtura de isobutanol y bencina a partes iguales. Además, presenta la ventaja de que se puede utilizar en presencia de pequeñas cantidades de proteínas.

Varios autores han dado también pequeñas modificaciones al método (3, 12, 20, 41, 67, 79).

e) Mas recientemente aparecieron algunos métodos basados en la determinación colorimétrica del fósforo, en los cuales, no se precisa reducir el ácido fosfomolibdico.

Entre ellos cabe citar el método descrito por BOLTZ & MELLON (9), basado en medir directamente el color verde amarillento del ácido fosfomolibdico.

SOYENKOFF (70, 71) determina el cambio de color ocurrido en una solución del colorante quinaldina rojo en presencia del fosfomolibdato.

MISSON (55) determina el fósforo según el método fósforo-vanadomolibdato que sigue la ley de Beer. Han aparecido también otros trabajos basándose en el mismo método (28, 29, 30, 40, 53).

Como las concentraciones de fósforo previsibles en la secreción intestinal eran relativamente bajas, e interesaba por otra parte, valorar con la mayor sensibilidad las diferencias entre las diversas fracciones a



titud y amplitud de campo de concentraciones exigidas para nuestras experiencias. A este fin, hemos realizado un estudio crítico experimental, ensayando las ventajas e inconvenientes de la reducción del complejo fosfomolibdico con cloruro estannoso, con solución amidol (Final Agfa) y con 1-amino-2naphthol-4sulfónico (reactivo de Fiske & Subbarow).

## 2. EXPERIENCIAS CON CLORURO ESTANOSO

a) *Influencia de la presencia de ácido perclórico en la determinación de fósforo inorgánico* — Dada la importancia que tiene la acidez en la reducción del azul de molibdeno, realizamos ensayos previos para ver la influencia que pudiera ejercer la presencia del ácido perclórico en una concentración semejante a la que tendría en caso de digestión previa con tal ácido.

Se hicieron varias series por duplicado y teniendo el máximo cuidado en que el tiempo en que se tardaba en hacer la lectura colorimétrica fuera exactamente el mismo para todos los problemas. Los resultados fueron a tener todos la misma intensidad de color.

b) *Aplicabilidad de la ley de Lambert Beer* — Se hicieron varios ensayos con diferentes concentraciones de fósforo y siempre por duplicado. Claramente se vió que, al aplicar el cálculo ordinario para averiguar las concentraciones problemas, se obtenían valores muy distintos de los reales; así, la reacción presentaba una manifiesta desviación a la ley de Lambert Beer. Sin embargo, estas desviaciones son sólo aparentes; calculando según el procedimiento descrito por SOLS (68) en función de los standards, se encuentran valores muy ajustados a los reales, incluso tratándose de concentraciones extremas que estén en una relación de 1 a 5.

c) *Optimo de concentración del cloruro estannoso y de tiempo de desarrollo de color* — La concentración del cloruro estannoso influye notablemente en la intensidad de la coloración y en el curso de la curva de desarrollo de la reacción (43). Por esto, quisimos ver qué concentración de cloruro estannoso ofrecía la máxima estabilidad en un tiempo dado y la mayor fidelidad a las concentraciones reales de fósforo.

Con este fin, se hicieron varias series de experiencias en cada una de las cuales se partía de cinco concentraciones distintas de fósforo, estudiando el desarrollo de color en función del tiempo y utilizando en cada serie, distinta concentración de cloruro estannoso. La figura 1 expresa la variación de intensidad de color a lo largo de 70 minutos de observación, según se empleen: 1 cc, 0,75 cc ó 0.5 cc de cloruro estannoso respectivamente. En ordenadas se toman valores de densidad óptica y en abscisas, tiempos.

Según se ve en ellas, el color es máximo en la primera lectura a los dos minutos, para ir decreciendo luego con mas o menos rapidez, tendiendo a una cierta estabilidad. Con las concentraciones más bajas suele haber, por lo general, menos variación de intensidad de color.

Como en algunos trazados la variación de intensidad es bastante rápida, parece aconsejable no hacer las lecturas fotocolorimétricas hasta un tiempo en el que se haya alcanzado la estabilidad. Por otra parte,

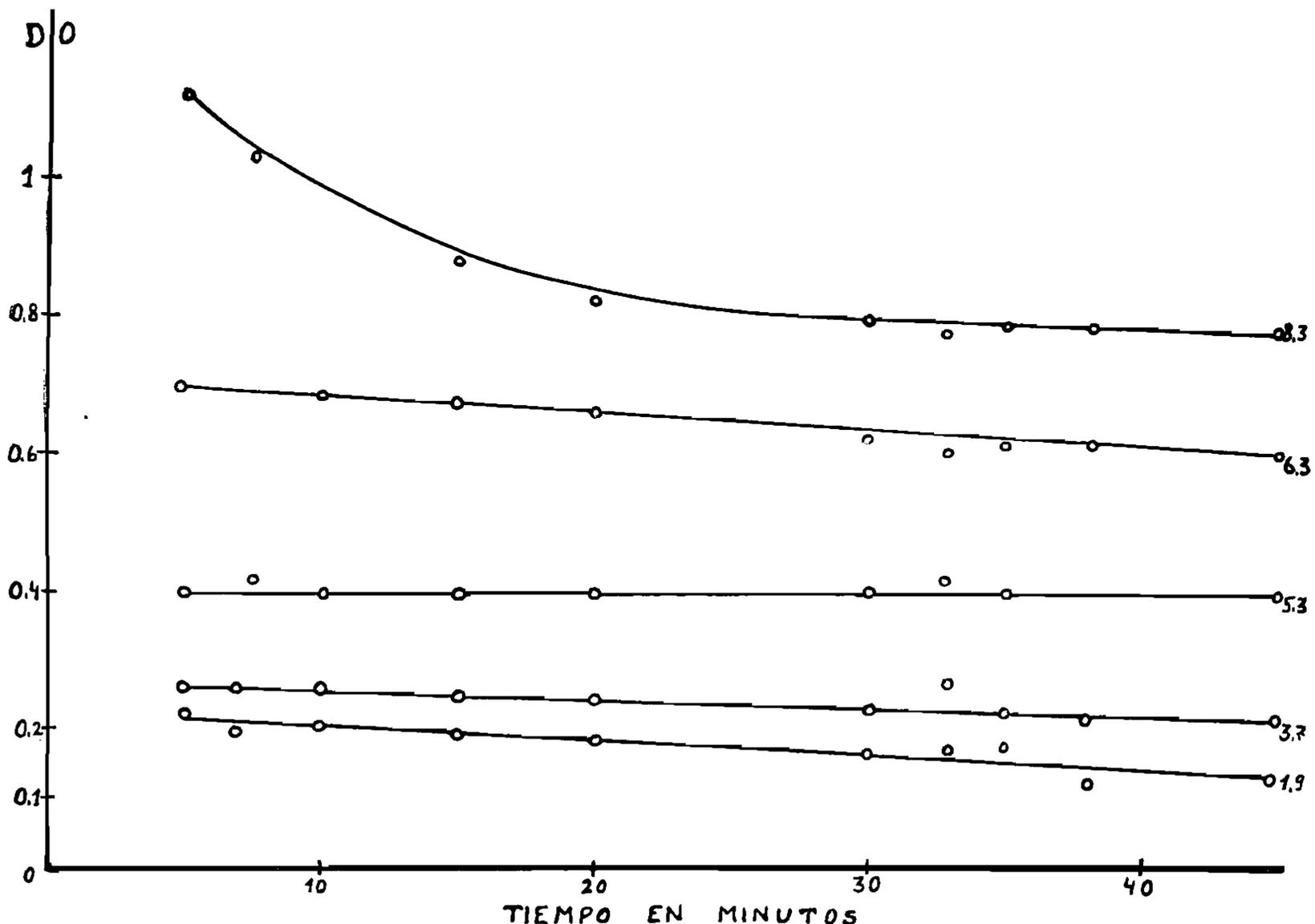


Fig. 2 — Estudio de la variación de la intensidad de color trabajando con 0.5 cc de cloruro estannoso en matraces Erlenmeyer. Las concentraciones problema son las mismas que en la fig. 3.

vemos también que las intensidades de color iniciales no son siempre proporcionales a las concentraciones, produciéndose a veces intensidades mayores con concentraciones menores. Estas anomalías y falta de relación entre concentraciones de fósforo e intensidades de color, las atribuimos a que la reducción con cloruro estannoso es tan rápida, que exige una difusión del reductor lo más instantánea posible; de ahí que, a pesar de agitarse los tubos inmediatamente después de añadido el cloruro estannoso, no se debía conseguir una reducción simultánea y homogénea en todo el volumen de disolución. Para comprobar estas ideas, pasamos a operar en matraces erlenmeyer de 50 cc de capacidad, que permitían una rápida difusión del cloruro estannoso para todo el volumen de la disolución. La figura 2 muestra los resultados obtenidos trabajando con 0.5 cc de cloruro estannoso que, por las experiencias anteriores, nos había parecido la cantidad adecuada de reductor. Como se vé en ella, apenas hay variación en la intensidad del color azul, observándose únicamente en algunos casos una disminución muy ligera a lo largo del tiempo.

Hemos querido ver de todas formas, el tiempo óptimo en el que la relación de concentración e intensidad de color fuese la más exacta. La figura 3, en que se representan en ordenadas las intensidades de color, y en abcisas las concentraciones para los tiempos de 5 y 10 minutos, revela que se encuentra una mayor regularidad a los 10 minutos.

Se han hecho otra serie de ensayos, utilizando también el cloruro estannoso como reductor, pero substituyendo el ácido perclórico por el ácido sulfúrico 5N y el reactivo ácido molibdico por el molibdato

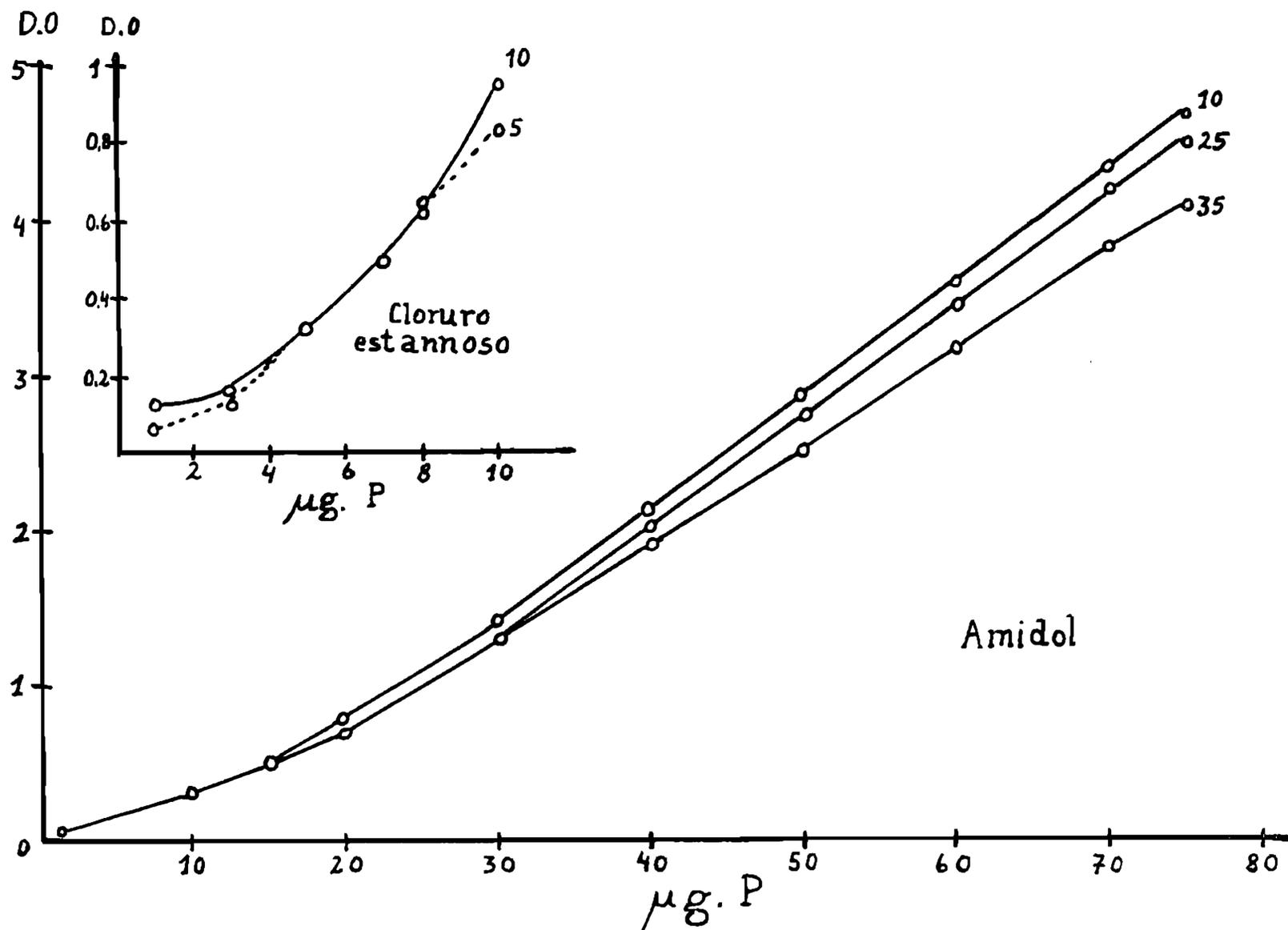


Fig. 3 — Estudios con cloruro estannoso y amidol. Lecturas a los 5, 10, 25 y 35 minutos de agregar el reductor.

amónico al 2.5% según hacen FISKE & SUBBAROW. Así: a un volumen de solución de fósforo de concentración conocida, se añade 0.5 cc de ácido tricloroacético y agua hasta 8 cc; se agrega luego 0.5 cc de ácido sulfúrico 5N y 0.5 cc de solución molibdato y, por último, 1 cc de cloruro estannoso al 1%. En algunos de los problemas antes de completar con agua, se agregaba 1 cc de glicerofosfato M/20, lo que ha revelado, que operando en dichas condiciones no hay hidrólisis del glicerofosfato.

Como conclusión a estos estudios sobre aplicabilidad del cloruro estannoso como agente reductor, podemos decir, que solo puede aplicarse a aquellos casos en que la concentración de fósforo presente esté comprendida entre las 8 y las 25  $\mu\text{g}$ . Dentro de estos límites, la lectura colorimétrica debe hacerse antes de los 40 minutos.

### 3. REDUCCIÓN CON SOLUCIÓN AMIDOL (FINAL AGFA)

La utilización del cloruro estannoso viene limitada, según hemos visto, a problemas que no difieran mucho de concentración. Como en las experiencias nuestras habíamos de encontrarnos con concentraciones de fósforo imprevisiblemente variables dentro de un campo de concentraciones mas extenso que el citado, quisimos ver si se adaptaba mas a estas necesidades el uso de otros reductores.

Desde hacía mucho tiempo, se venía utilizando en nuestro laboratorio, para la determinación del fósforo, el reductor fotográfico Final Agfa. En los siguientes ensayos, hemos querido comprobar sus límites de aplicabilidad.

En tubos de ensayo se disponen cantidades variables de solución tipo de fósforo, a las que se agregaba 0.5 cc de tricloroacético al 30% y agua hasta 8 cc; se agregaba luego 0.5 cc de ácido sulfúrico 5N y 0.5 cc de molibdato amónico al 2.5% y, por último, 1 cc de Reductor Final. Este último se preparaba disolviendo 0.25 g de amidol y 2.5 g de sulfito sódico con 50 cc de agua.

En la figura 3 se aprecian los resultados obtenidos con cantidades de fósforo presentes de 1 a 75  $\mu\text{g}$ , haciendo las lecturas a los 10, 25 y 35 minutos de agregar el reductor, durante los cuales, quedaba en baño a 37° para acelerar el desarrollo de color.

La figura 4, representa otro ensayo en que se compara la reducción con cloruro estannoso y la reducción con solución amidol. En ambos

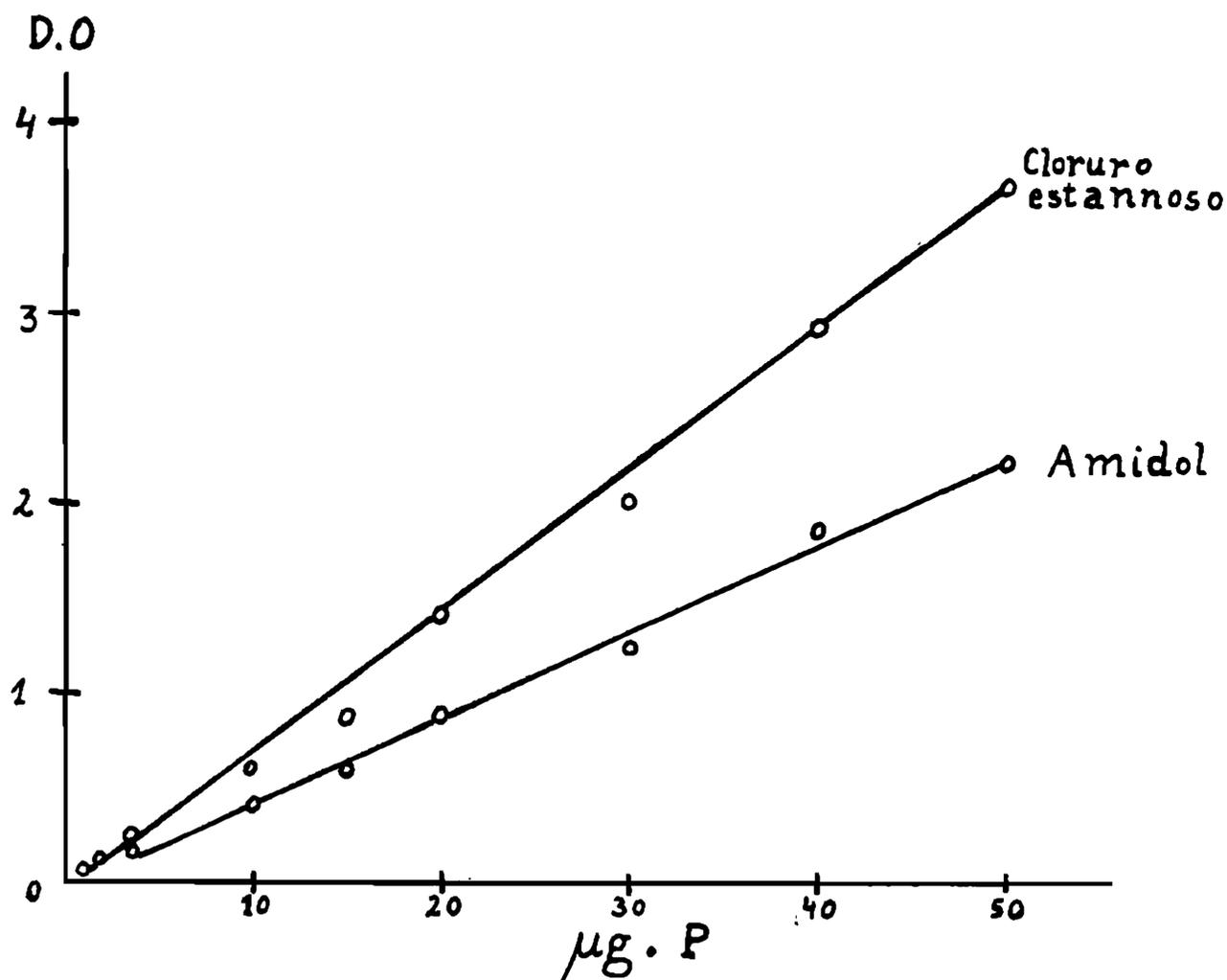


Fig. 4 — Ensayo en el que se compara la reducción con cloruro estannoso y la reducción con solución amidol. En ambos casos el tiempo era de 15 minutos después de agregado el reductor.

casos el tiempo era de 15 minutos después de agregar el reductor, con la diferencia de que en el caso del cloruro estannoso se dejaba a la temperatura ambiente. La intensidad de la coloración es mayor con cloruro estannoso, especialmente por encima de los 10  $\mu\text{g}$ ; sin embargo, con el reductor Final, se obtiene una regularidad mucho mayor en la relación de concentración e intensidad de color en todo el campo de 1 a 50  $\mu\text{g}$  experimentado.

El reductor Final resulta así ser muy adecuado para la valoración del fósforo, siguiendo la ley de Lambert Beer dentro de límites de concentraciones entre las 2 y 75  $\mu\text{g}$ . Cuando menos, siempre que se active el desarrollo de color, manteniendo los tubos a 37° unos 10 a 15 minutos.

#### 4. REDUCCIÓN CON 1-AMINO-2-NAFTOL-4-SULFÓNICO

Durante mucho tiempo trabajamos con el reductor Final Agfa en vista de los estudios anteriores, máximo, no existiendo por entonces en el comercio español el reactivo clásico de Fiske & Subbarow, ácido 1-amino-2-naftol-4-sulfónico. Posteriormente, conseguimos este producto y quisimos compararlo con el Final Agfa.

En tubos de ensayo, se disponen cantidades variables de solución tipo de fósforo, a las que se agrega 1 cc de ácido sulfúrico 5N y luego agua hasta 8 cc; se añade después, 1 cc de solución molibdato y 1 cc de reductor.

La figura 5, representa en ordenadas la densidad óptica y en abcisas el tiempo de desarrollo de color a 37° para concentraciones de 25 a 200  $\mu\text{g}$  de fósforo presentes. Puede decirse que se alcanza suficiente estabilidad para poder hacerse las lecturas fotocolorimétricas a partir de los 15 minutos de agregado el reductor, tanto en uno como en otro caso.

La figura 6, relaciona densidades ópticas y concentraciones para tiempos de desarrollo de color distintos (8 a 35 minutos) y, permite deducir que las intensidades de color conseguidas con el 1-amino-2-naftol-4-sulfónico, son ligeramente superiores a con Agfa Final y, una vez dejado pasar 15 minutos de desarrollo de color, hay tanto en uno como en otro reductor, suficiente regularidad entre concentraciones y densidades ópticas, por lo que ambos son igualmente utilizables.

#### DESCRIPCIÓN DE LA TÉCNICA ADOPTADA PARA LA DETERMINACIÓN DE LAS DISTINTAS FRACCIONES DE FÓSFORO EN EL CONTENIDO INTESTINAL

Las líneas generales del método son las de FISKE & SUBBAROW para la determinación de fósforo en sangre, aunque se ha cambiado el reductor y las cantidades de problema y se han hecho algunas variaciones en la concentración de los reactivos.

Se ha tratado de reducir al mínimo el número de reactivos necesarios y de hacer que todos sirvan para la determinación de las distintas fracciones de fósforo; así, en lugar de preparar tres soluciones de molibdato, se ha preparado solamente la que corresponde al molibdato III de Fiske & Subbarow, adicionando aparte el ácido sulfúrico. Las concentraciones finales de ácido sulfúrico son poco distintas de las utiliza-

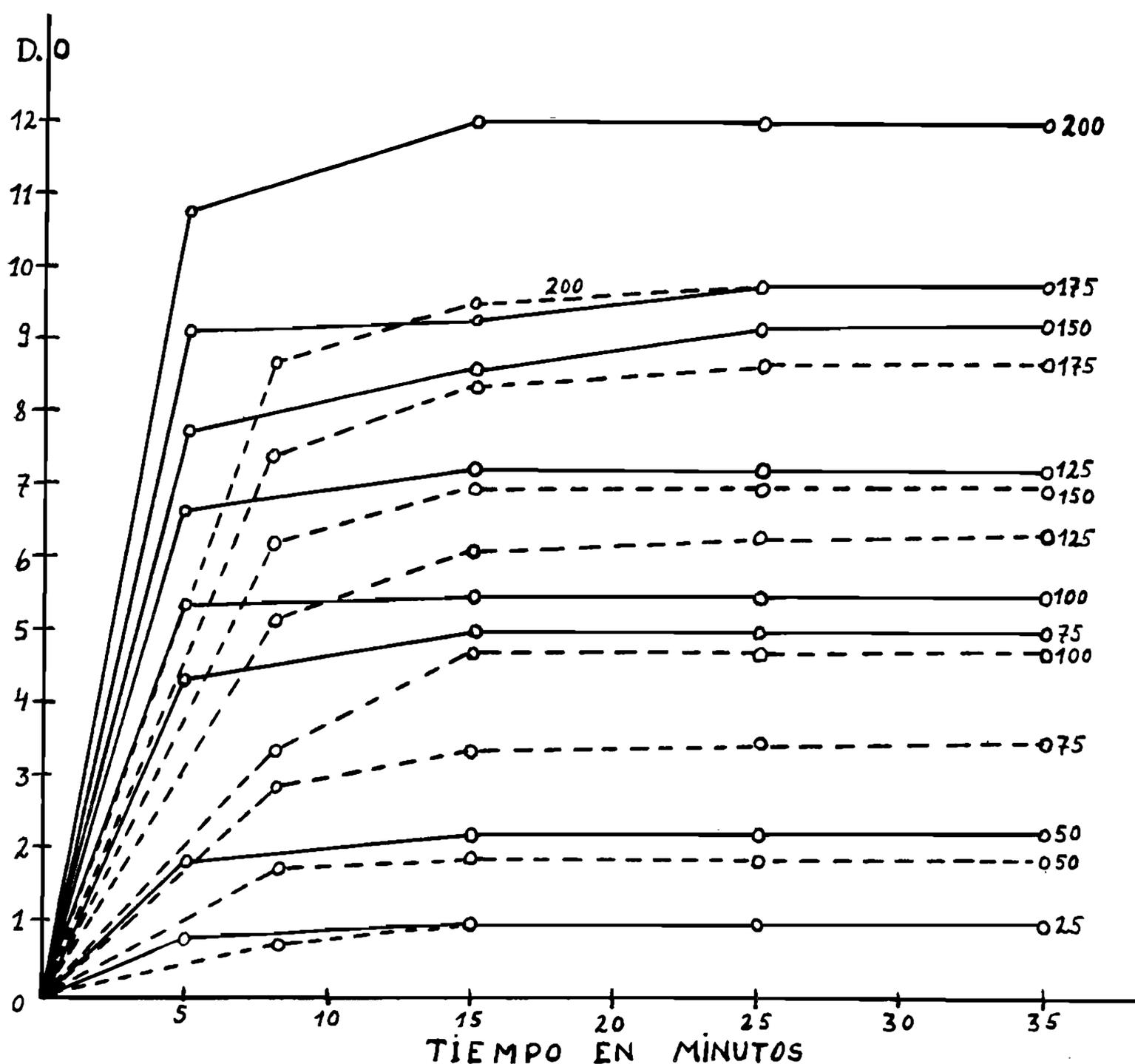


Fig. 5 — Ensayo en el que se compara la reducción con solución amidol y la reducción con el 1-amino-2-naftol-4-sulfónico. Concentraciones comprendidas entre las 25 y 200 µg.

das en el método de Fiske & Subbarow y se han comprobado, como hemos visto antes, adecuadas para la variación de fósforo en sus distintas formas entre límites de concentración bastante extensos.

#### 1. SOLUCIONES NECESARIAS

*Ácido sulfúrico 5N* — 450 cc de ácido sulfúrico concentrado añadidos a 650 cc de agua.

*Molibdato amónico* — 2.5% en agua. Tan pronto como aparezca en esta solución un considerable sedimento (trimolibdato amónico), debe ser renovada.

*Ácido tricloroacético al 30%*. Merck.

*Fosfato standard* — a) Solución madre: 1.2 g de fósforo por mil cc (5.2714 g de  $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$  Merck p.a. desecado sobre  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , disueltos y llevados hasta 1000 cc con agua destilada acidulada con 4 cc de ácido sulfúrico). Se guarda indefinidamente. b) Soluciones tipo 5 y 10 mg% de fósforo, preparadas a partir de la solución madre y conservadas en cloroformo.

*Solución de reductor* — En una solución de 2.5 g de sulfito sódico en 50 cc de agua se disuelven 0.25 g de amidol (Final Agfa).

*Alcohol-eter* — Mezcla de 90 partes de alcohol absoluto y 10 partes de eter.

*Ácido nítrico concentrado*

## 2. PROBLEMAS

El contenido intestinal era arrastrado con suero fisiológico a un matraz aforado de 20 cc enrasando con el mismo suero. Después de agitar bien, se tomaban 10 cc para determinar el fósforo total ácido soluble y el fósforo inorgánico. Otros dos cc se utilizaban para determinar el fósforo total y 1 cc para el fósforo lipídico.

a) *Determinación del fósforo inorgánico* — Se verificaba inmediatamente. A los 10 cc de problema, se añadian 2 cc de tricloroacético al 30%, filtrando por algodón después de unos minutos. A 2 cc del filtrado se añadian 1 cc de ácido sulfúrico 5N, completando hasta 8 cc con agua.

Dada la escasa cantidad de fósforo presente en el contenido intestinal, a la que correspondían coloraciones poco valorables con el reductor empleado, adoptamos la resolución de agregar en todas las determinaciones 10  $\mu\text{g}$  de fósforo inorgánico en forma de 0.1 cc de solución fosfato standard 10 mg%; una vez adicionada esta cantidad de fósforo, se agrega 1 cc de solución molibdato y después 1 cc de solución reductor Final, llevando los tubos al baño a 37° y haciendo la lectura con fotolorímetro después de unos 10 o 15 minutos.

Junto con los tubos problemas (dos muestras para cada determinación), se preparaban otros con soluciones standard como sigue: En cada tubo de ensayo, se vierte 0.1 cc de solución standard de fósforo de 10 mg% y en otros dos sólo 0.05 cc de igual solución. A todos se agrega 1 cc de ácido sulfúrico y agua hasta 8 cc. Luego se añade 1 cc de solución molibdato y 1 cc de reductor. La adición de molibdato y reductor a los problemas y a los tubos se hace a la vez, de modo que desde la adición de reductor hasta que se hace la lectura fotolorimétrica en cada tubo pase exactamente el mismo tiempo.

Cálculos — Siendo  $l_s$ ,  $l_{2s}$  y  $l_p$ , las lecturas fotocolorimétricas en densidades ópticas correspondientes a los tipos con 5  $\mu\text{g}$ ; 10  $\mu\text{g}$  y al

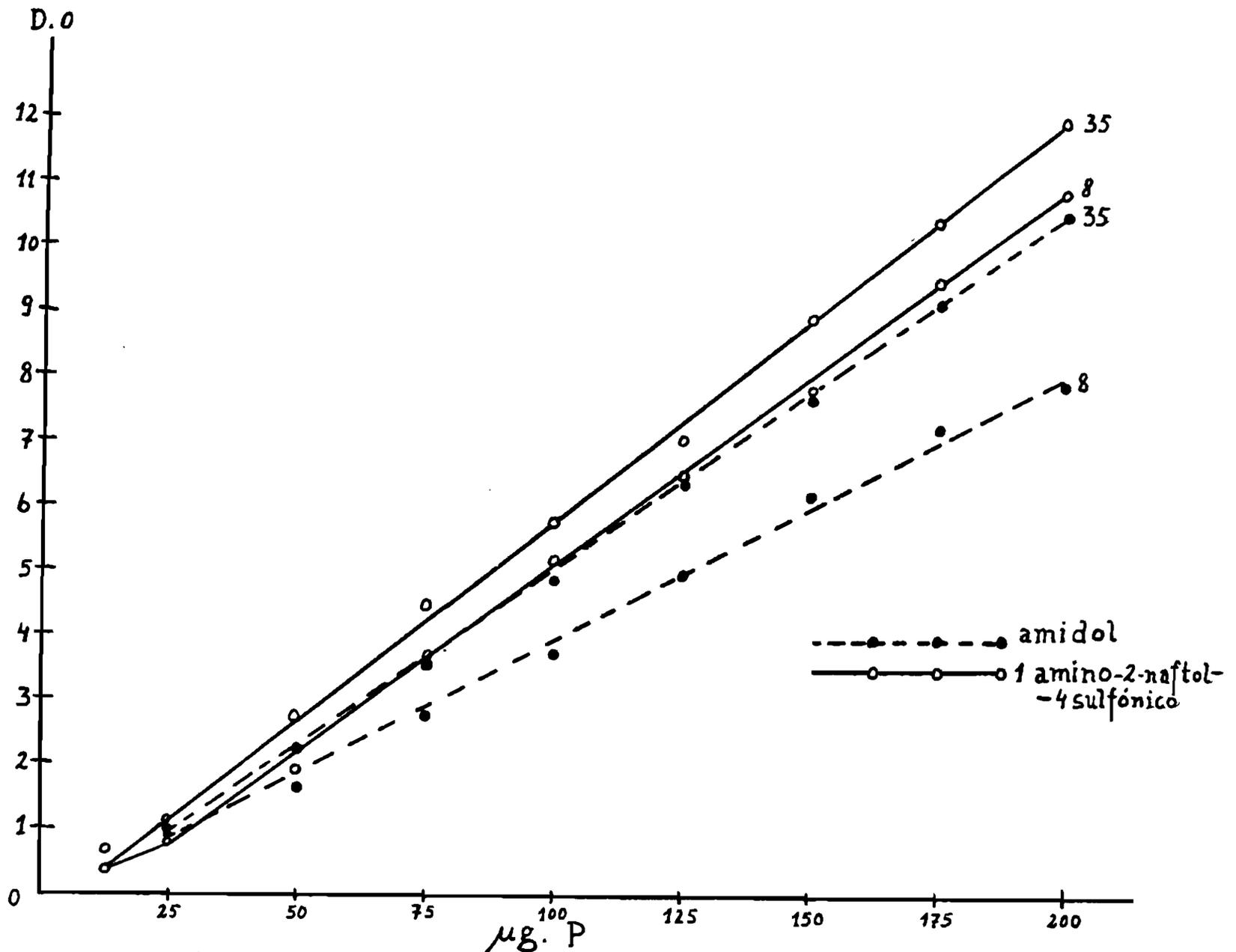


Fig. 6 — Estudio comparativo entre intensidades de color conseguidas con solución amidol y 1-amino-2-naftol-4-sulfónico, para tiempos de 8 y 35 minutos.

tubo problema, se tiene que la concentración de éste último es:

$$C_2 = \frac{C_s \cdot l_p}{l_s} \text{ en el caso de que siga la ley de Beer. En caso contrario,}$$

que es lo más corriente, se precisa hacer la corrección según el método de SOLS (68) para lecturas en colorímetros de comparación tipo Dubosq, sabiendo que si  $L_s = 20$ ,

$$L_{2s} = \frac{l_s \cdot 20}{l_{2s}} \qquad L_p = \frac{l_s \cdot 20}{l_p}$$

También puede ser calculada  $C_p$  por representación gráfica, tomando  $l$  en ordenadas y  $C$  en abscisas y trazando en papel milimetrado la recta que une  $l_s$  y  $l_{2s}$ , correspondientes a  $C_s$  y  $C_{2s}$  y deducir el valor de  $C_p$  correspondiente a  $l_p$  en dicha recta.

El valor de  $C_p$  obtenido considerando  $C_s = 1$ , significa que, en las soluciones que se comparan, la relación de concentraciones es  $C_p$ .

La cantidad de fósforo en  $\mu\text{g}$  en el tubo problema será:  $C_p \cdot 5$  y  $C_p \cdot 10$ , ya que son 5 y 10 las  $\mu\text{g}$  de fósforo presentes en los dos standards.

Como se han agregado 10  $\mu\text{g}$  para facilitar la comparación, el fósforo que había en los 2 cc de filtrado que se han tomado, será:

$$5 C_p - 10 = (C_p - 2) 5$$

El líquido total recogido del intestino se había llevado a un volumen de 20 cc. De ellos, se han tomado 10 para tratar con 2 cc de tricloroacético y los 2 cc de filtrado tomados para la determinación son así 1/12 del total recogido. La cantidad de fósforo inorgánico que había en el contenido intestinal será pues:

$$(C_p - 2) 5 \cdot 12 = 60 (C_p - 2)$$

b) *Determinación del fósforo total ácido soluble* — A otros dos cc del filtrado — el de después de precipitar con tricloroacético — se agrega 1 cc de ácido sulfúrico y un trocito de porcelana porosa, y se procede a la digestión, procurando que no hierva y que se vayan desprendiendo humos blancos. Para que la oxidación de la materia orgánica sea más rápida, puede ser necesario añadir una gota de ácido nítrico; en este caso, se sigue calentando unos minutos después que la mezcla se ha hecho incolora para eliminar el exceso de reactivo. Se deja enfriar, se añade 0.1 cc de fósforo 10 mg% y se completa hasta 8 cc con agua destilada. Se añade 1 cc de solución molibdato y 1 cc de reductor Final, haciendo la lectura fotocolorimétrica como en el caso anterior.

Cálculos — Exactamente como para el fósforo inorgánico.

c) *Determinación del fósforo total* — En cada tubo de ensayo se disponía: 2 cc del problema — el contenido intestinal completado a 20 cc más 1 cc de ácido sulfúrico y se procedía a la digestión como para el fósforo total ácido soluble. Se completa a 8 cc con agua destilada (después de agregar 0.1 cc de fósforo 10 mg%) y luego se agregaba 1 cc de solución molibdato y 1 cc del reductor Final. Colorimetría.

Cálculos — Se calcula  $C_p$  como para el fósforo inorgánico. En los 2 cc de que se ha partido, habrá:  $(C_p - 2) 5$ . Como el líquido total recogido era de 20 cc y sólo se han tomado 2 cc, el fósforo total será:

$$(C_p - 2) 5 \cdot 10 = 50 (C_p - 2)$$

d) *Determinación del fósforo lipídico* — Se añade 1 cc de problema, gota a gota y agitando, a 15 cc de una mezcla de alcohol-éter en matraz de 25 cc. Se calienta en baño hasta ebullición, luego se deja enfriar y seguidamente se completa con alcohol-éter hasta 25 cc, agitando fuertemente. Se filtra. En tubo de ensayo, se evapora a sequedad 10 cc del filtrado. El fosfato se determina por digestión con ácido sulfúrico, como se ha dicho para el fósforo total ácido soluble.

Se puede obtener también por diferencia entre el fósforo total y el fósforo ácido soluble.

Cálculos — Se calcula  $C_p$  como siempre. En los 10 cc de filtrado evaporado a sequedad habrá pues:  $(C_p - 2) 5$ . Esta cantidad es  $1/5$  de la que había en los 25 cc a que se había completado y por tanto de la que había en 1 cc de problema que se había tomado inicialmente. Luego con los 20 cc del problema total habrá:

$$(C_p - 2) 5 \cdot 2.5 \cdot 20 = 250 (C_p - 2)$$

e) *Determinación del fósforo ester* — Se obtiene por diferencia entre el fósforo ácido soluble y el fósforo inorgánico.

f) *Determinación del fósforo lábil* — En tubos de ensayo se disponen 2 cc de filtrado a los que se agrega 1 cc de ácido sulfúrico 5N y se dejan 30 minutos en baño hirviendo, completando luego con agua hasta 8 cc; se añade después, 1 cc de solución molibdato y 1 cc de reductor Final (34). Colorimetría.

## RESUMEN

Se hace un estudio bastante detenido de los métodos colorimétricos para la determinación del fósforo y se ensayan tres agentes reductores.

a) *Cloruro estannoso* — Cuando se utiliza este reductor, se presenta una aparente desviación a la ley de Lambert Beer; los valores se ajustan a los reales mediante el procedimiento descrito por Sols. Es un reductor adecuado para concentraciones de fósforo comprendidas entre las 8 y las 25  $\mu\text{g}$ ; la lectura colorimétrica debe hacerse antes de los 40 minutos.

b) *La reducción con solución amidol* (Final Agfa) es muy adecuada para la valorización del fósforo y sigue la ley de Beer dentro de límites de concentración entre las 2 y las 75  $\mu\text{g}$ . Los tubos deben mantenerse a  $37^\circ$ .

c) *Las intensidades de color* conseguidas con el 1-amino-2-naftol-4-sulfónico son buenas después de los 15 minutos de desarrollo de color. Hay suficiente regularidad entre concentraciones y densidades ópticas.

Se propone un método original para el estudio del fósforo durante la absorción intestinal. Se basa en ligeras modificaciones del clásico método de FISKE & SUBBAROW.

## SUMMARY

Colorimetric determination of Phosphorus has been studied extensively and three reducing agents were tested:

Some determinations of Phosphorus were carried out by reduction with stannous chloride. The deviation from Beer's law is considerable

but we have used the Sols' tabulation for correcting the values. The amount of Phosphorus which can be accurately determined is 8-25  $\mu\text{g}$ .

Phosphorus has been also estimated by amidol and the color which it produce, is not as intensive as that obtained by stannous chloride. It shows a satisfactory degree of accuracy for Phosphorus contents between 2 and 75  $\mu\text{g}$ .

The values obtained by 1-amino-2-naphtol-4-sulphonic acid, were slightly higher than those obtained by amidol. They gave a stable blue color proportional to the Phosphorus present.

A slight modification of FISKE & SUBBAROW's method for the determination of Phosphorus during the intestinal absorption was worked out.

### RESUMO

Fizemos um estudo detalhado dos métodos colorimétricos para determinação do fósforo e dentro desses métodos escolhemos três técnicas que achamos as mais adequadas para o nosso caso.

a) *Agente redutor clorêto estanoso* — As experiências com este agente nos mostraram um desvio da lei de Lambert-Beer que pode ser corrigido aplicando-se as tabelas de correção de Sols. Este método é bom nas concentrações entre 8 a 25 $\mu\text{g}$  de fósforo; a leitura colorimétrica tem que ser feita dentro de 40 minutos.

b) Utilizando a solução de amidol (Final Agfa), as determinações de fósforo seguem a lei de Beer nas concentrações de 2 a 75  $\mu\text{g}$ ; os tubos devem ser mantidos a 37°C.

c) Experiências com ácido 1-amino-2-naftol-4-sulfônico dão bom resultado depois de 15 minutos de desenvolvimento da cor e seguem a lei de Beer.

Finalmente, apresentamos um método original para a dosagem do fósforo, durante a absorção intestinal, baseado no de FISKE & SUBBAROW.

### BIBLIOGRAFIA

1. ALLEN, R.J.L., 1940, The estimation of phosphorus. *Biochem. J.*, 34: 858-865.
2. AMMON, R. & HINSBERG, K., 1936, Colorimetrische phosphor und Arsen-säurebestimmung mit Ascorbinsäure. *Hoppe-Seyl. Z.*, 239: 207-216.
3. BAJAJ, V. & KRISHNAN, P.S., 1953, A note on phosphate partition in trichloroacetic acid extracts of mold tissue. *Arch. Biochem.*, 47: 34-38.
4. BELL, R.D. & DOISY, E.A., 1920, Rapid colorimetric methods for the determination of phosphorus in urine and blood. *J. Biol. Chem.*, 44: 55-67.
5. BENEDICT, S.R. & THEIS, R.C., 1924, A modification of the molybdic method for the determination of inorganic phosphorus in serum. *J. Biol. Chem.*, 61: 63-66.
6. BERENBLUM, J. & CHAIN, E., 1938, Studies on the colorimetric determination of phosphate. *Biochem. J.*, 32: 286-295.

7. BERENBLUM, J. & CHAIN, E., 1938, An improved method for the colorimetric determination of phosphate. *Biochem. J.*, 32: 295-298.
8. BODANSKY, A., 1932, Phosphatase Studies, I. Determination of inorganic phosphate. Beer's Law and interfering substances in the Kuttner-Lichtenstein method. *J. Biol. Chem.*, 99: 197-206.
9. BOLTZ, D.F. & MELLON, M.G., 1948, Spectrophotometric determination of phosphorus as molybdiphosphoric acid. *Anal. Chem.*, 20: 749-751.
10. BRIGGS, A.P., 1922, A modification of the Bell-Doisy phosphate method. *J. Biol. Chem.*, 53: 13-16.
11. BRIGGS, A.P., 1924, Some applications of the colorimetric phosphate method. *J. Biol. Chem.*, 59: 255-264.
12. DAVIDSON, J.N. & WAYMOUTH, C., 1943, Factors influencing the nucleoprotein content of fibroblasts growing in vitro. *Biochem. J.*, 37: 271-277.
13. DENIGES, G., 1920, Réaction de coloration extrêmement sensible des phosphates et des arsénates. Ses applications. *C.R. Acad. Sci., Paris*, 171: 802-804.
14. DENIGES, G., 1921, Détermination quantitative des plus faibles quantités de phosphates dans les produits biologiques par le méthode céruleomolybdique. *C.R. Soc. Biol., Paris*, 84: 875-877.
15. DENIGES, G., 1929, Molybdenum-blue method for microchemical determination of phosphate and arsenate ions. *Mikrochem. pregl Festschr.*, 27-45.
16. DICKMAN, S.R. & BRAY, R.H., 1940, Colorimetric determination of phosphate, *Industr. Eng. Chem., Anal. Ed.*, 12: 665-668.
17. EGGLETON, G.P. & EGGLETON, P., 1929, A method of estimating phosphagen and some other phosphorus compounds in muscle tissue. *J. Physiol.*, 68: 193-211.
18. EGGLETON, P. & EGGLETON, G.P., 1927, The inorganic phosphate and a labile form of organic phosphate in the gastrocnemius of the frog. *Biochem. J.*, 21: 190-195.
19. ENNOR, A.H. & ROSENBERG, H., 1952, Observations on the determination of the specific activity of the inorganic phosphate fraction of trichloroacetic acid extracts of liver. *Biochem. J.*, 50: 524-530.
20. ERNSTER, L., ZETTERSTROM, R. & LINDBERG, O., 1950, A method for the determination of tracer phosphate in biological material. *Acta Chem. Scand.*, 4: 942-947.
21. ERNSTER, L., ZETTERSTROM, R. & LINDBERG, O., 1952, On the determination of  $P^{31}$  and  $P^{32}$  in biological material. *Acta Chem. Scand.*, 6: 804-805.
22. FERRARI, C., 1953, Microphotometric determination of inorganic phosphoric acid in the presence of its esters. *Ann. sper. agrar.*, Rome, 7: 477-500.
23. FISKE, C.H. & SUBBAROW, Y., 1925, The colorimetric determination of phosphorus. *J. Biol. Chem.*, 66: 375-400.
24. FISKE, C.H. & SUBBAROW, Y., 1929, Phosphocreatine. *J. Biol. Chem.*, 81: 629-679.
25. FOGG, D.N. & WILKINSON, N.T., 1958, The colorimetric determination of phosphorus. *Analyst*, 83: 406-414.
26. FONTAINE, T.D., 1942, Spectrophotometric determination of phosphorus. *Industr. Eng. Chem., Anal. Ed.*, 14: 77-78.
27. FURUKAWA, M., OIDA, M., NAKAMURA, Y., KASUGA, S. & YOSHIKAWA, H., 1952-53 Colorimetric determination of phosphorus. *J. Japan, Biochem. Soc.*, 24: 76-82 C.A., 47: 12120e).
28. GEE, A. & DEITZ, V.R., 1953, Determination of phosphate by differential spectrophotometry. *Anal. Chem.*, 25: 1320-1324.

29. GERICHE, S. & KURMIES, B., 1952, Colorimetrische bestimmung der Phosphorsäure mit vanadat-molibdat. *Z. anal. Chem.*, 137: 15-22.
30. GERICHE, S. & KURMIES, B., 1952, The colorimetric determination of phosphoric acid with ammonium-vanadate-molybdate and its application in plant analysis. *Z. Pflanzenernähr. Düng. Bodenk.*, 59: 235-247.
31. GLICK, D., 1956, *Methods of Biochemical Analysis*. Determination of organic phosphorus compounds by phosphate analysis, 3: 1-22.
32. GOMORI, G., 1942, A modification of the colorimetric phosphorus determination for use with the photoelectric colorimeter. *J. Lab. Clin. Med.*, 27: 955-960.
33. GRISWOLD, B.L., HUMOLLER, F.L. & MCINTYRE, A.R., 1951, Inorganic phosphates and phosphate esters in tissue extracts. *Anal. Chem.*, 23: 192-194.
34. HAWK, P.B., OSER, B.L. & SUMMERSON, W.H., 1947, *Practical Physiological Chemistry*, New York, (cf. p. 248).
35. HORECKER, B.L., MA, T.S. & HAAS, E., 1940, Note on the determination of microquantities of organic phosphorus. *J. Biol. Chem.*, 136: 775-776.
36. HORWITT, B.N., 1952, Determination of inorganic serum phosphate by means of stannous chloride. *J. Biol. Chem.*, 199: 537-541.
37. IKEDA, N., 1951, New colorimetric determination of the phosphate ion. *J. Chem. Soc. Japan, Pure Chem. Sect.*, 72: 23-6. (C.A. 46: 3457g).
38. KAY, H. D., 1930, Plasma Phosphatase. I. Method of determinations. Some properties of the enzyme. *J. Biol. Chem.*, 89: 235-247.
39. KING, E. J., 1932, The colorimetric determination of phosphorus. *Biochem. J.*, 26: 292-297.
40. KOENIG, R.A. & JOHNSON, C.R., 1942, Colorimetric determination of phosphorus in biological materials. *Industr. Eng. Chem., Anal. Ed.*, 14: 155-156.
41. KOSHLAND, D.E. & CLARKE, E., 1953, Mechanism of hidrolysis of adenosine-triphosphate catalyzed by lobster muscle. *J. Biol. Chem.*, 205: 917-924.
42. KUBY, S.A., NODA, L. & LARDY, H.A., 1954, Adenosinetriphosphate-creatine transphosphorylase. I. Isolation of crystalline enzyme from rabbit muscle. *J. Biol. Chem.*, 209: 191-202.
43. KUTTNER, T. & COHEN, H.R., 1927, Micro colorimetric studies. I. A molibdic acid, stannous chloride reagent. The micro estimation of phosphate and calcium in pus, plasma, and spinal fluid. *J. Biol. Chem.*, 75: 517-531.
44. KUTTNER, T. & LICHTENSTEIN, L., 1930, Micro colorimetric studies. II. Estimation of phosphorus: molybdic acid-stannous chloride reagent. *J. Biol. Chem.*, 86: 671-676.
45. KUTTNER, T. & LICHTENSTEIN, L., 1932, Micro colorimetric studies. III. Estimation of organically bound phosphorus. A system of analysis of phosphorus compounds in blood. *J. Biol. Chem.*, 95: 661-670.
46. LEIBOFF, S.L., 1931, The reduction of phosphomolibdic acid by monomethyl-paramidophenol and its use in the quantitative determination of phosphorus in blood. *J. Lab. Clin. Med.*, 16: 495-499.
47. LIPMANN, F., 1940, A phosphorylated oxidation product of pyruvic acid., *J. Biol. Chem.*, 134: 463-464.
48. LIPMANN, F. & TUTTLE, L.C., 1944, Acetyl phosphate: chemistry, determination and synthesis. *J. Biol. Chem.*, 153: 571-582.
49. LOHMANN, K., 1928, Über die Isolierung verschiedener natürtlischer Phosphorsäureverbindungen und die Frage ihrer Einheitlichkeit. *Biochem. Z.*, 194: 306-327.

50. LOHMANN, K. & JENDRASSIK, L., 1926, Kolorimetrische Phosphorsäurebestimmungen in Muskelextrakt. *Biochem. Z.*, 178: 419-426.
51. LOWRY, O.H. & LOPEZ, J.A., 1946, The determination of inorganic phosphate in the presence of labile phosphate esters. *J. Biol. Chem.*, 162: 421-428.
52. LUTWAK, L. & SACKS, J., 1953, The catalytic effect of molybdate on the hydrolysis of organic phosphates. *J. Biol. Chem.*, 200: 565-659.
53. MA, T.S. & MCKINBY, J.D., 1953, Determination of phosphorus in organic compounds: a new microprocedure. *Microchim. Acta*: 4-13.
54. MARTIN, J.B. & DOTY, D.M., 1949, Determination of inorganic phosphate. Modification of isobutyl alcohol procedure. *Anal. Chem.*, 21: 965-967.
55. MISSON, G., 1908, Colorimetrische Phosphorbestimmung im Stahl. *Chem. Ztg.*, 32: 633.
56. MITSUHASHI, S. & NAKANISHI, A., 1953, Colorimetric determination of phosphorus. *Igaku to Seibutsugaku*, 27: 16-96, (C.A., 48: 1199i).
57. MÜLLER, E., 1935, Die Phosphatasebestimmung in kleinen Serummengen. *Hoppe-Seyl. Z.*, 237: 35-39.
58. NAKAMURA, G.R., 1952, Microdetermination of phosphorus. *Anal. Chem.*, 24: 1372.
59. NORBERG, B., 1942, On the Histo- and cytochemical determination of phosphorus. *Act. Physiol. Scand.*, 5, Supl. XIV.
60. OSMOND, F., 1887, Colorimetric estimation de phosphoreux. *Bull. soc. chim. biol.*, 47: 745.
61. PONS, W.A. & GUTHRIE, J.D., 1946, Determination of inorganic phosphorus in plant materials. *Industr. Eng. Chem., Anal. Ed.*, 18: 184-186.
62. POTTER, V.R., 1947, The assay of animal tissues for respiratory enzymes. VI Further studies on oxidative phosphorylation. *J. Biol. Chem.*, 169: 17-37.
63. POTTER, V.R., SIEKEVITZ, P. & SIMONSON, H.C., 1953, Latent adenosine-triphosphatase activity in resting rat liver mitochondria. *J. Biol. Chem.*, 205: 893-908.
64. ROCKSTEIN, M. & HERRON, P.W., 1951, Colorimetric determination of inorganic phosphate in microgram quantities. *Anal. Chem.*, 23: 1500-1501.
65. ROE, J.H., IRISH, O.J. & BOYD, J.I., 1926, A study of the molybdic oxide colorimetric method for the estimation of the phosphorus compounds of the blood. *J. Biol. Chem.*, 67: 579-584.
66. ROE, J.H. & KAHN, B.S., 1926, A colorimetric method for the estimation of blood calcium. *J. Biol. Chem.*, 67: 585-591.
67. SCHAFFER, F.L., FONG, J. & KIRK, P.L., 1953, Microgram and submicrogram determination of phosphate. Application of sealed tube digestion and capillary cell spectrophotometry. *Anal. Chem.*, 25: 343-346.
68. SOLS, A., 1945, Fórmulas y tablas colorimétricas para corregir las aparentes desviaciones a la Ley de Beer. *Rev. esp. Fisiol.*, 1: 355-415.
69. SOLS, A. & PONZ, F., 1946, Nueva técnica para el estudio de la absorción intestinal y datos para la mejor interpretación del mecanismo de la absorción selectiva de glúcidos en relación con la fosfatasa de la secreción intestinal. *Rev. esp. Fisiol.*, 2: 283-384.
70. SOYENKOFF, B., 1947, A micromethod of phosphate determination. *J. Biol. Chem.*, 168: 447-457.
71. SOYENKOFF, B.C., 1952, An improved micromethod of phosphate determination. *J. Biol. Chem.*, 198: 221-227.

72. SUMNER, J.B., 1944, A method for the colorimetric determination of phosphorus. *Science*, 100: 413-414.
73. TAKAHASHI, Y., 1953, Colorimetric determination of phosphorus. *Igaku to Seibutsugaku* (Med. and Biol.), 26: 235-237 (C.A., 47: 11076g).
74. TAUSSKY, H.H. & SHORR, E., 1953, A microcolorimetric method for the determination of inorganic phosphorus. *J. Biol. Chem.*, 202: 675-685.
75. TAYLOR, A.E. & MILLER, C.W., 1914, On the estimation of phosphorus in biological materials. *J. Biol. Chem.*, 18: 215-224.
76. TEORELL, T., 1931, Spektrophotometrische Mikrobestimmung des Phosphors. *Biochem. Z.*, 230: 1-9.
77. TSCHOPP, E. & TSCOHPP, E., 1932, The reduction of phosphomolybdic acid to molybdenum blue and the determination of phosphate, silicate and arseniate ions in Biology. *Helv. Chim. Acta*, 15: 793-809.
78. WEIL-MALHERBE, H., 1953, The catalytic effect of molybdate on the hydrolysis of organic phosphates. *Biochem. J.*, 55: 741-745.
79. WEIL-MALHERBE, H. & GREEN, R.H., 1951, Catalytic effect of molybdate on the hydrolysis of organic phosphate bonds. *Biochem. J.*, 49: 286-292.
80. WOODS, J.T. & MELLON, M.G., 1941, The molybdenum blue reaction, *Industr. Eng. Chem., Anal. Ed.*, 13: 760-764.
81. YOUNGBURG, G.E. & YOUNGBOURG, M.V., 1930, Phosphorus metabolism. I. A system of blood phosphorus analysis. *J. Lab. Clin. Med.*, 16: 158-166.