

# ESTUDIS SOBRE LA DETERMINACIÓ DE L'ÀCID LÀCTIC I EN ESPECIAL DE LA LACTACIDÈMIA

per

C. PI-SUÑER I BAYO

J. FOLCH I PI

## INTRODUCCIÓ

La determinació de l'àcid làctic en diferents substractes orgànics va adquirint indubtablement i progressivament una major importància en biologia. Posteriorment als estudis de Meyerhof, Embden i llurs escoles sobre la seva formació i aïllament en el metabolisme muscular i el principal paper que hi desenrotlla — o es creia que hi desenrotlla — s'ha demostrat també la seva formació en nombrosos òrgans (fetge, cor, cervell, etc.), formació i acumulació que s'ha volgut relacionar amb diversos estats patològics (avitaminosi B, diabetis, miopaties, insuficiència cardíaca i suprarenal, etc.). Però ha estat, sens dubte, la determinació de la seva concentració a la sang, la denominada *lactacidèmia*, la que ha adquirit major importància en aquests darrers anys, de manera que per a alguns investigadors és tan interessant per al diagnòstic clínic com la glucèmia, ja clàssica, i comença a efectuar-se en gran escala en algunes clíniques. Altres, tot amb tot, opinen que la seva constància és molt in-

ferior a la d'aquesta i la hi neguen tot o gairebé tot valor diagnòstic, per creure-la susceptible de les més grans i brusques oscil·lacions a conseqüència de causes molt nombroses i diverses. Sigui com sigui, resten indubtables les íntimes relacions existents entre el metabolisme dels glúcids i la formació lateral d'àcid làctic, com a producte d'estabilització dels compostos intermediaris de tres àtoms de carbon (metilglioxal, aldehid glicèric, diòxiacetona, etc.), i, per tant, l'interès en obtenir mètodes com més ràpids i més exactes millor, que ens en facilitin la determinació.

Però en nosaltres, ultra aquest factor d'interès general, n'hi ha un altre de personal per a inclinar-nos encara més al seu estudi : des de fa quatre anys venim efectuant determinacions d'àcid làctic com a element indispensable per a diverses sèries experimentals (dismutació del metilglioxal (1), acció del complex vitamínic B (2 i 3), dels preparats de llevat de cervesa (4 i 5), pas a glucogen en el metabolisme hepàtic (6 i 7), etc., intentant sempre millorar el mètode i arribar a un major paral·lelisme en els resultats de les dobles determinacions, cosa que ens sembla haver aconseguit últimament amb la tècnica de Friedemann, Cotonio i Shaffer (8) modificada posteriorment per Friedemann i Kendall (9).

Que nosaltres sapiguem, aquest mètode, citat correntment en la literatura americana i anglesa, i que comença a ésser-ho en l'alemanya, no ho ha estat mai encara entre nosaltres. Així, Giménez-Díaz i Sánchez-Cuenca (10), en llurs interessantíssims estudis sobre la lactacidèmia — els primers a Espanya a determinar-la metòdicament en la clínica — usen el mètode colorimètric de Mendel i Goldscheider (11), del qual després parlarem, i Collazo (12), Collazo i nosaltres (13), Collazo, Puyal i col·

laboradors (14), nosaltres (l. c.), etc., el ja clàssic de Fürth i Charnas (15), modificat per Hirsch i Kaufmann (16). Finalment, al servei del Prof. Novoa Santos, de la Facultat de Medicina de Madrid, Outeriño i Hernanz (17, 18) usen el mateix mètode, i segurament per insuficient informació se l'atribueixen, mancament en el qual també incorre últimament Sebastian Herrador (19), de Valladolid, i, tant més greu, si es considera que el mètode ha estat descrit en nombrosos llibres espanyols o estrangers traduïts al castellà.

Per tant, creiem interessant la descripció del mètode, amb les petites variants que nosaltres l'usem, i que ens permeten d'obtenir inclús millors resultats que a llurs propis autors i als reportats últimament per Lieb i Zacherl (20), entre d'altres. Per a una millor perspectiva, el precedirem per una visió total dels mètodes indicats fins avui per a la determinació de l'àcid làctic, fent referència als avantatges i inconvenients de cadascun d'ells, amb la intenció de facilitar la tasca d'aquell a qui li interessi aquest problema i contribuir, al mateix temps, a l'estudi de l'evolució cronològica d'un tema tan interessant.

Descriurem després, amb tot detall, com portem a terme les valoracions i, finalment, dedicarem un últim apartat a estudiar curosament alguns dels fets més interessants a tenir en compte, tot reproduint taules dels resultats experimentals, per a basar-hi les conclusions.

#### MÈTODES PER A LA DETERMINACIÓ DE L'ÀCID LÀCTIC

Des de començaments de segle s'ha acumulat de tal manera la literatura al particular, que per a una major brevetat, agruparem els nombrosos mètodes pro-



posats en quatre grans apartats : mètodes gravimètrics, colorimètrics, gasomètrics i volumètrics.

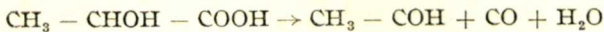
a) *Mètodes gravimètrics.* — Es basen en la determinació de l'àcid làctic a l'estat de les seves sals difícilment solubles, especialment les de zinc i liti. Un dels més coneguts és el d'Embden i Kraus (21); després de desproteïnitzar, segons Schenck, amb clorur mercuric, i eliminar l'excés d'aquest, s'extreu amb èter i precipita l'àcid làctic amb carbonat de zinc. Els cristalls obtinguts, de lactat de zinc, poden identificar-se per la determinació de llurs aigua de cristal·lització, activitat òptica, contingut en Zn., etc. Un de nosaltres (C. P-S. B.) ha usat molt satisfactòriament aquest mètode (l. c.) en la determinació de l'àcid làctic format enzimàticament per dismutació del metilglixal. Es, sens dubte, excel·lent i insubstituïble per a tals determinacions, però la seva llarga duració — una setmana — i la necessitat de força quantitat de substància i certs coneixements químics per part de qui el porta a terme, el fan inadequat en les determinacions en sèrie, per a fins clínics, on cal efectuar nombroses determinacions en un sol dia.

b) *Mètodes colorimètrics.* — Consisteixen en la transformació de l'àcid làctic a acetaldehid i subsegüent tractament d'aquest amb diversos fenols o alcaloides del grup de la morfina, amb els quals dóna lloc a compostos d'addició típicament colorejats, com demostrà Deniges. N'hi ha prou a comparar en un colorímetre la coloració obtinguda amb l'originada per una solució standard d'acetaldehid, per a calcular la concentració d'àcid làctic en el líquid problema.

El primer en usar aquest mètode fou Harrop, emprant com a reactiu el guaiacol, però la deficient precipitació de les proteïnes emmascarava el to rosat, defecte que tampoc no pogué corregir Sluiter. Finalment, Mendel

i Goldscheider (l. c.) proposaren l'ús del veratrol (1-2 dimetoxifenol), per comptes del guaiacol, introduint diverses millores en la manera d'operar (22). Aquest mètode, usat avui encara per nombrosos autors, té els inconvenients de precisar un àcid sulfúric especial «pro anàlisi acidi lactic» Kahlbaum, per no oferir prou garantia l'usual, degut a portar amb freqüència nitrats i nitrits, de l'elevat preu del veratrol, i tots els inherents a les determinacions colorimètriques. A més, el fet que darrerament siguin en nombre els autors que en proposen modificacions (Derviz, Orskov, Hausen, etc.), indica la seva poca seguretat. En el mateix principi es basen també el mètode de Dische i Laszlo (23), usant com a reactiu de coloració l'hidroquinona, el de Servantie (24) amb la codeïna, etc.

c) *Mètodes gasomètrics.* — Fou Pelouze el primer a observar que l'àcid làctic lleugerament escalfat amb un excés de  $\text{SO}_4\text{H}_2$  desprenia una notable quantitat de  $\text{CO}$ , i en aquest fet es basà Hübner en atacar l'àcid làctic amb sulfúric concentrat, segons la reacció

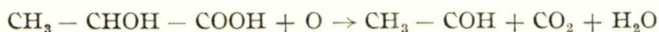


mesurant amb una campana hidroneumàtica el volum de gas després. Aquest mètode fou modificat successivament per diversos investigadors (Meissner, Schneyer, etc.) i últimament per Avery i Hastings (25) i Baumberger i Field (26), oxidant amb  $\text{SO}_4\text{Mn}$  i  $\text{MnO}_4\text{K}$ , en presència de  $\text{SO}_4\text{H}_2$ .

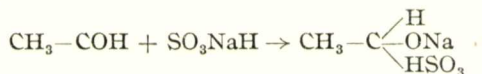
Tots aquests mètodes tenen el defecte comú de les inexactituds que reporta la medicció hidroneumàtica del despreniment de gasos i el temps que comporten, de manera que avui dia no són gairebé utilitzats.

d) *Mètodes volumètrics.* — Boas inicià aquests mètodes

todes en recomanar la determinació de l'àcid làctic existent en el suc gàstric per la seva oxidació a acetaldehid amb biòxid de manganès i àcid sulfúric, segons la reacció



i destil·lació simultània d'aquell, recollint-lo en una solució alcalina de iode, produint-se iodoform, que es valorava. Jerusalem intentà aplicar el mètode a una determinació quantitativa i Fürth i Charnas (l. c.) s'hi basaren per a publicar el seu, tan conegut i usat gairebé unànimement fins avui, consistent en substituir la fixació de l'acetaldehid pel iode, tan imperfecte, per la formació del seu compost d'addició amb el bisulfit sòdic o potàssic



a valorar després amb iode, segons Ripper (27). Però si s'usen solucions molt diluïdes de iode, no s'obtenen valors teòrics en la determinació directa de l'excés de bisulfit, i tenint en compte aquest fet, Clausen (28) proposà tirar a la solució, després de valorat el bisulfit lliure restant, un xic de bicarbonat, suficient per a descompondre el complex d'addició bisulfit-acetaldehid, posant en llibertat el bisulfit combinat que es valora en una segona titulació o *retitulació* amb solució de iode més diluïda que la primera. Avui dia aquesta retitulació, segons Clausen, s'ha fet imprescindible en tota determinació acurada de l'àcid làctic.

Finalment, un gran pas en el progrés de l'exactitud del mètode fou obtingut per Friedemann i els seus col·laboradors (l. c.) en introduir a la barreja oxidant  $\text{SO}_4\text{Mn}$ , que desprenent  $\text{MnO}_2$  fa que aquest actui de catalit-

zador, activant i regulant el procés oxidatiu. (Per a detalls respecte a la influència del biòxid de manganès sobre la cinètica de la reacció, vegeu el treball original d'aquests autors).

#### TÈCNICA EMPRADA PER NOSALTRES

Es basa, com hem dit repetidament, en la de Friedemann, oxidant l'àcid làctic a acetaldehid, que s'arrossega per un intens corrent d'aire fins al matrasset amb bisulfit; valorant l'excés d'aquest, que ha quedat lliure; descomposant el complex acetaldehid-bisulfit amb bicarbonat i retitulant per iodometria la quantitat de bisulfit que existia combinat. D'aquesta es dedueix la d'acetaldehid després, i d'aquesta la d'àcid làctic existent en solució problema. Operant així, són necessaris els següents reactius.

#### A) *Reactius necessaris*

a) *Per a la precipitació de les proteïnes, segons Folin-Wu:*

1. Solució de tungstat sòdic al 10 per 100. Emprant aigua destil·lada recentment, la solució es conserva bé durant molt de temps, inclús a la llum.

2. Solució 2/3 n. de  $\text{SO}_4\text{H}_2$ . Si els reactius estan ben preparats, la precipitació de les proteïnes és sempre excel·lent.

b) *Per a la precipitació dels sucres, segons Clausen:*

1. Solució de  $\text{SO}_4\text{Cu}$  al 10 per 100.

2. Lletada de calç al 10 per 100. L'hidròxid càlcic cal polvoritzar-lo bé en un morter, de manera que la



lletada resultant sigui ben fina i no obturi les pipetes de forat petit.

c) *Per a la determinació pròpiament dita, segons Friedemann:*

1. Solució de  $\text{SO}_4\text{Mn}$  al 10 per 100 en  $\text{SO}_4\text{H}_2$  10 n. Es dissolen 100 gr. de sulfat de manganès en un xic d'aigua destil·lada continguda en un matràs de litre i s'hi van afegint lentament 285 cc. d'àcid sulfúric concentrat, de densitat 1'84. Com que el sulfat de manganès precipita a una acidesa superior a la representada per la solució 10 n. de sulfúric, cal tirar l'àcid i el sulfat simultàniament, de manera que la concentració d'aquell no passi mai per sobre de la indicada.

2. Solució saturada de bicarbonat sòdic. Tenint en compte que la seva solubilitat a  $50^\circ$  és del 13 per 100, dissoldrem a aquesta temperatura 125 gr. en un litre d'aigua destil·lada, filtrarem i deixarem refredar. Cal tenir cura de no escalfar massa per sobre d'aquesta temperatura, car a  $63\text{-}64^\circ$  el bicarbonat comença a descompondre's, lliurant àcid carbònic i formant carbonat.

3. Solució  $n/400$  o  $n/500$  de  $\text{MnO}_4\text{K}$ . Preparada a partir d'una solució mare  $n/10$ , aproximadament en la quantitat necessària per a cada dia d'experiència.

4. Solució de  $\text{SO}_3\text{NaH}$  aprox.  $n/25$  preparada diàriament dissolent 100 mgr. de bisulfit en 50 cc. d'aigua destil·lada i lliure de  $\text{CO}_2$ .

5. Solució concentrada de iode (normal) per a la titulació directa. Solució diluïda ( $n/250$ ) per a la re-titulació. En lloc d'aquesta pot usar-se solució de iodat que, en presència d'un xic de iodur i àcid acètic, desprèn iode  $n/100$ , el que té l'avantatge de la millor conservació i evitar titulacions diàries del iode amb solució standard de tiosulfat.



6. Midó pur, en pols, soluble. Des dels primers moments abandonarem la seva solució a l'1 per 100 saturada de ClNa, per ésser-nos impossible trobar sal suficientment pura.

### B) Manera d'operar

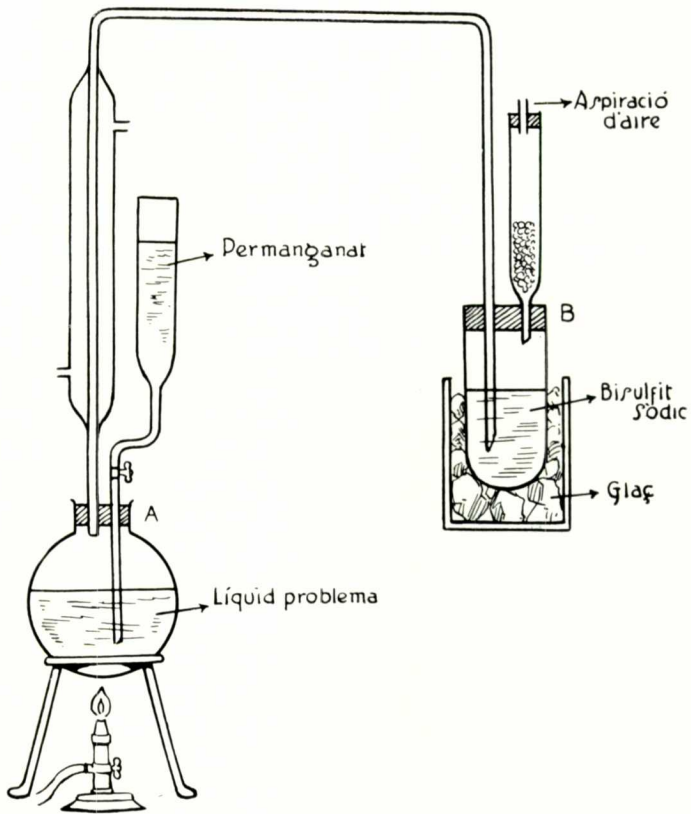
a) *Presa de la sang.* — Com que generalment es determina simultàniament la glucèmia i la lactacidèmia, acostumem d'emprar 5 cc. de sang oxalatada o fluorurada, extreta d'una vena. De tota manera, si manca sang, efectuem la determinació amb 1-2 cc. La sang s'hemolitza amb 6-7 vegades el seu volum d'aigua en un matrasset aforat de 100 cc.

b) *Precipitació de les proteïnes.* — Aleshores es tira al matrasset la mateixa quantitat de solució de tungstat, agitant ben bé, i després, lentament i agitant, igual quantitat d'àcid sulfúric. Enrasem amb aigua destil·lada fins a 100 cc., agitem, abandonem una estona i filtrem per un filtre corrent, a provetes de 100 cc. Operem així, i no seguint la tècnica original de Folin-Wu, per tenir aquesta l'inconvenient de retenir amb el precipitat del 40 al 45 per 100 del volum total de sang emprada, mentre nosaltres en perdem tan sols un 30 per 100. El filtrat cal que sigui ben clar i, en cas contrari, refusar-lo.

c) *Precipitació dels sucres.* — Per a facilitar els càlculs, afegim al filtrat quantitats de sulfat de coure i lletada de calç que es corresponen entre elles com 1 : 2 en volum, i la suma de les quals representa un 10 per 100 del volum del filtrat. Així, si s'han filtrat 75 cc. de líquid s'hi tiren 2'5 cc. de solució de sulfat de coure i 5 cc. de lletada de calç, etc. S'agita el líquid, es deixa

sedimentar i al cap d'una estona, quan sobreneda líquid incolor, es filtra xopant abans el filtre amb un xic de líquid.

d) *Oxidació de l'àcid làctic segons Friedemann.* — En el filtrat resultant de la precipitació dels sucres, es comprova amb sulfúric i  $\alpha$ -naftol l'absència de substàncies reductores. Aleshores s'agafen dues vegades 33 cc. del filtrat i es posen en dos sengles matrassets de Jena, de boca ampla i 250 cc. de cabuda. S'hi ajunten 10 cc. de la barreja oxidant de Friedemann i suficient aigua destil·lada perquè el volum total sigui de 75-90 cc. No cal afegir pols de talc, perquè el pas del corrent d'aire regularitza suficientment l'ebullició. Aleshores connectem el matraset amb el tap de goma A corresponent, encenem el Bunsen situat a sota d'ell i connectem amb el tap de l'altre extrem lliure de l'aparell de destil·lació B, un tub de vidre contenint uns 5 cc. d'aigua destil·lada, de manera que la punta afilada del tubet se submergeixi un xic dintre del líquid. D'aquesta manera, el corrent d'aire aspirat per la trompa d'aigua, borbolleja a través del líquid contingut en el tubet. La intensitat del corrent ha de controlar-se de forma que, sense que arribi a ésser continu, sigui ràpida la formació de bombolles. Aleshores es deixa bullir el líquid problema en el matràs durant cinc minuts, per a eliminar totes les possibles substàncies volàtils a fixar pel bisulfit, i, transcorregut aquest temps, substituïm el tub B contenint tan sols aigua destil·lada per un altre amb uns 2 cc. de solució de bisulfit i aigua destil·lada fins a arribar al mateix nivell d'abans. Aquest tub es volta d'un bany de gel en un vas de precipitats i es comença a deixar caure, gota a gota, la solució de permanganat sobre el líquid problema. La velocitat de caiguda d'aquest ha d'ésser



Esquema de l'aparell per a la determinació de l'àcid làctic segons Friedemann





d'unes 60-70 gotes per minut. A velocitats superiors s'acumula un excés de permanganat en el matràs i l'àcid làctic s'oxida insuficientment, prenent el líquid el color torrat característic d'haver-se oxidat totalment, quan encara queda quelcom d'àcid làctic per atacar.

La caiguda del permanganat es perllonga fins al moment en què el líquid del matràs pren un color fosc; aleshores s'apaga la flama i es deixa passar encara el corrent d'aire durant uns cinc o sis minuts, transcorreguts els quals se sospèn el pas de l'aire i decanta el contingut del tubet de vidre col·lector en un matrasset de 100 cc. de boca ampla i s'hi recull l'aigua de dos rentats successius de l'aparell, de manera que el volum total vingui a ésser d'uns 50 cc.

e) *Valoració de l'acetaldehid format, segons Clausen.*

— Per a la titulació directa, es posa en una bureta corrent de 50 cc. solució  $n/10$  de iode i es deixa caure sobre el líquid problema contingut en el matrasset — i al qual s'ha afegit un xic de midó — fins a aparèixer una coloració blavosa. Aleshores tirem unes gotes de bisulfit fins a decolorar de nou i d'una pipeta de 10 cc. contrastada, deixem caure solució de iode  $n/250$  fins a tenuíssim color blau. Com que nosaltres no donem cap valor a la xifra obtinguda en la valoració directa i tot, en canvi, a la assolida en la retitulació, es comprèn la possibilitat de l'addició de quelcom de bisulfit sense alterar el resultat final, i també la necessitat d'establir amb la més gran cura i exactitud possible el punt precís del viratge.

Obtingut aquest punt, afegim al líquid 5 cc. de solució saturada de bicarbonat, que el decolora instantàniament, degut a descompondre's el complex d'addició acetaldehid-bisulfit, i quedar aquest en llibertat. La quantitat de bisulfit combinat alliberada es valora per

addició, amb la pipeta dita, de la solució  $n/250$  de iode, fins a debilíssima coloració blau-rosada. La solució de iode ha de comprovar-se cada dia amb un altre control de tiosulfat, a guardar ben tapada i lluny de l'acció de la llum, i valorada al seu temps amb una altra standard de iodat.

f) *Càlcul del resultat.* — A partir del nombre de centímetres cúbics de solució de iode gastats, el càlcul s'efectua tenint en compte que els 33 cc. de filtrat desproteïnit i lliurat de substàncies reductores, corresponen a 1'5 cc. de sang, si partírem de 5 cc. d'aquesta; a 0'6 cc., si partim de 2 cc., i a 0'3 cc. si ho fem d'1 cc. i que, per altra banda, cada centímetre cúbic de solució  $n/100$  de iode correspon a 0'45 mgr. d'àcid làctic. Per tant, n'hi haurà prou amb multiplicar el nombre de centímetres cúbics de iode gastats pel factor de la solució respecte al tiosulfat; dividir el resultat obtingut per 2'5 si la solució de iode usada era  $n/250$  per comptes de  $n/100$ , i multiplicar-lo per 0'45, per a obtenir la quantitat d'àcid làctic, en mil·ligrams, continguda en 1'5; 0'6 o 0'3 cc. de sang; i a partir d'aquesta, calcular la corresponent a 100 cc. de sang.

Si denominem  $x$  als centímetres cúbics de iode  $n/250$  gastats i  $f$  al factor de la solució respecte la de tiosulfat, els càlculs anteriors poden resumir-se en les fórmules següents:

*Primer cas.* — *Partint de 5 cc. de sang* : Quantitat d'àcid làctic per 100 cc. de sang =  $\frac{x \cdot f \cdot 0'45 \cdot 100}{2'5 \cdot 1'5} = x \cdot f \cdot 12.$

*Segon cas.* — *Partint de 2 cc. de sang* : Quantitat d'àcid làctic per 100 cc. de sang =  $\frac{x \cdot f \cdot 0'45 \cdot 100}{2'5 \cdot 0'6} = x \cdot f \cdot 30.$

*Tercer cas.* — *Partint d'1 cc. de sang* : Quantitat d'àcid làctic per 100 cc. de sang =  $\frac{x \cdot f \cdot 0'45 \cdot 100}{2'5 \cdot 0'3} = x \cdot f \cdot 60.$

Amb la mateixa sang cal efectuar sempre dues determinacions paral·leles, que no han de diferir més d'un 2'5 per 100. En cas contrari, ha de menysprear-se la determinació.

#### ESTUDIS COMPARATIUS DELS RESULTATS, I TAULES

Són diversos els punts de què volem ocupar-nos en aquest apartat, tots ells factors importantíssims de l'exactitud del mètode, quan són resolts de manera favorable: manera de precipitar les proteïnes, avantatges de la barreja oxidant de Friedemann, duració del procés oxidatiu, refrigeració, necessitat d'efectuar sempre una determinació en blanc — amb tots els reactius de les altres — etcètera. Per a acabar, reproduïrem unes taules de resultats paral·lels de determinacions efectuades amb lactat de zinc i en sang.

a) *Precipitació proteïnes.* — Segons l'escola d'Emden, el millor mètode per a eliminar les proteïnes és el de Schenk, amb el clorur mercuric, emprat gairebé sempre en les determinacions en múscle de Meyerhof i col·laboradors. Però en les determinacions seriades en la sang és inaprofitable, degut a llur complicació i llarga durada. Nosaltres, en vista d'això, férem algunes determinacions precipitant les proteïnes pels tres mètodes més corrents en la sang (Benedict. Folin i Somogyi) i amb àcid tricloracètic, i obtinguérem els següents resultats:

TAULA I

Ac. tricolor.	Benedict	Somogyi	Folin	Sense pptar. proteïnes
8'3	8'9	5'4	9'9	10'8
9'1	10'1	5'6	9'9	10'3
3'0	3'0	3'7	3'4	3'8
2'4	2'7	3'1	3'4	3'8

Com es veu, si bé el nombre de determinacions és petitíssim per a permetre treure'n conseqüències, els resultats ens indiquen que la precipitació de proteïnes que ofereix un filtrat on els dobles d'àcid làctic són més exactes, és l'efectuada segons Folin. Respecte al mínim d'àcid làctic que retenen totes les precipitacions, és molt difícil tenir-ne una idea clara, degut a no saber la quantitat real existent abans. Els nostres resultats, a més, atorgant la superioritat a la desalbuminització segons Folin-Wu coincideixen amb els de Jervell (29) i Ronzoni (30), autors que s'han ocupat amb detall de la mateixa qüestió. La poca experiència que tenim amb l'àcid metafosfòric és desfavorable.

Però hi ha un altre fet interessantíssim, que estudia en l'actualitat un de nosaltres (J. F. P.) : la gran desigualtat dels resultats obtinguts en la mateixa sang, precipitada dues vegades, per separat, d'igual manera i amb iguals reactius. Aquestes diferències arriben a ésser algunes vegades tan grans, que obliguen, sempre que es tingui un gran interès en l'exactitud de les determinacions, a efectuar la doble precipitació; en el qual cas, per a estalviar feina, pot prescindir-se de la doble determinació en cada filtrat, efectuant-ne tan sols una en cadascun d'ells.

b) *Barreja oxidant de Friedemann*. — No hem portat a terme estudis comparatius seriats entre el rendiment



obtingut amb la barreja oxidativa de Fürth ( $\text{SO}_4\text{H}_2$ ,  $\text{MnO}_4\text{K}$ ) i la de Friedemann (els mateixos, més  $\text{SO}_4\text{Mn}$ ) per no creure-ho necessari, després dels extensos estudis d'aquest i col·laboradors. Tan sols hem de recordar que el mateix Fürth dóna com a resultats ideals amb el seu mètode, els que mostren un error del 3-4 per 100, i nosaltres obtenim correntment, amb el Friedemann, errors inferiors al 2 per 100. També Collazo, segons comunicació oral seva, en estudis comparatius amb els dos medis oxidants, ha observat la indubtable superioritat del de Friedemann, l'ús del qual nosaltres li recomanàvem.

Hem assajat el reactiu de Friedemann i Kendall, últimament proposat, on es substitueix l'àcid sulfúric pel fosfòric, sense obtenir-ne cap resultat satisfactori. Efectivament, aquest, en oxidar-se, origina una coloració gris fosca que desapareix a la poca estona d'haver suspesa l'addició de permanganat, de manera que es fa del tot impossible jutjar clarament el moment en què l'oxidació ha estat completa, inclús si es perllonga l'oxidació més enllà de l'hora. Pel que pertoca al biòxid de manganès col·loïdal, últimament proposat, no tenim experiència al particular.

c) *Duració del procés oxidatiu.* — Les nostres experiències, d'acord amb les d'altres nombrosos investigadors, demostren que l'oxidació ha de tenir lloc a una velocitat mitjana; tant si és massa lenta com massa ràpida, s'obtenen resultats inferiors als deguts, si bé en el darrer cas l'aproximació és més gran. El temps ideal sembla ésser el d'un quart d'hora, segons demostra la taula següent.

TAULA II

<u>Temps oxidació</u>	<u>Rendiment per 100</u>
<i>Minuts</i>	
1'3	85'6
3'0	92'8
5'0	97'1
15'0	100'0
30'0	99'2

Per a obtenir una oxidació que s'efectuï en aquest lapsus de temps, cal graduar la velocitat de gotejament del permanganat, de manera que caiguin unes 50-60 gotes per minut, i escalfar la barreja amb un bon Bunsen al començament a tota flama i després menys intensament. L'addició del permanganat es perllongarà fins que el líquid es mantingui amb el color fosc, característic d'excés de barreja oxidativa, inclús després de certa estona de suspesa la caiguda del permanganat.

d) *Importància de la refrigeració.* — Creiem que la bona refrigeració del tubet col·lector, contenint el bisulfit, té una màxima importància, i hem observat una notable disminució en el rendiment de l'aparell quan es prescindeix d'ella. A continuació copiem els resultats d'algunes determinacions paral·leles, efectuades les unes refrigerant amb gel el tub recol·lector i les altres prescindint-ne:

TAULA III

<u>Rendiment</u>	<u>Rendiment</u>
<u>sense refrigerar</u>	<u>refrigerant</u>
<u>per 100</u>	<u>per 100</u>
90'2	100'0
85'2	99'8
87'2	98'8
88'0	99'5

Cal fer constar la major necessitat de refrigeració en ple estiu que no pas en els mesos d'hivern, on les diferències entre les determinacions paral·leles, refrigerades i no, són força més petites.

e) *Necessitat d'efectuar determinacions en blanc.* — Un altre punt de la major importància, i oblidat en absolut per molts autors que han parlat d'aquestes qüestions, és el de la ineludible necessitat d'efectuar determinacions en blanc, o sigui determinar la quantitat de bisulfit fixat per als reactius sols, *sense àcid làctic o substracte que el contingui.* Aquest valor fictici d'àcid làctic que donen sempre els reactius i que, de no interpretar-lo de la manera deguda, ens farà obtenir lactacidèmies més elevades del que són realment, ens ha arribat a representar algunes vegades fins el 50 per 100 de la xifra total obtinguda, si la quantitat de sang emprada ha estat molt petita. És innecessari insistir sobre la gran importància d'aquesta qüestió i com és de desitjar arribar a obtenir sempre un «blanc» constant per a cada aparell i que sigui el més petit possible. Sobre els diversos factors que intervenen a elevar excessivament el valor del «blanc» en parlarà detalladament un de nosaltres (J. F. P.) en la seva tesi doctoral, en preparació.

f) *Resultats paral·lels amb lactat de zinc.* — Ocupeu-nos, ara, de les determinacions paral·leles de control, portades a terme amb lactat de zinc, per a convèncer-nos de la bondat del mètode, abans de passar a efectuar les lactacidèmies. Degut a les diferències existents entre els lactats de zinc de les diverses firmes, respecte a llur contingut en aigua de cristallització, puresa, etc., nosaltres hem operat amb el lactat preparat per nosaltres mateixos segons la tècnica de Clausen (l. c.). Consisteix



a afegir a una quantitat determinada d'àcid làctic pur, la corresponent de clorur de zinc, neutralitzant prèviament aquell amb tota cura amb NaOH. La sal obtinguda es recristal·litza sis vegades en aigua (a les tres últimes ja no ha de donar reacció, indicadora de la presència de clorurs, amb el  $\text{NO}_3\text{Ag}$ ) i es desseca a l'estufa a  $90^\circ$  fins a pes constant. Aquest lactat de zinc conté tres molècules d'aigua de cristal·lització.

Creiem que val la pena d'insistir sobre un concepte que, tot i ésser d'una claredat meridiana, dóna lloc, per part de bastants investigadors, a certes confusions: ens referim a la diferència existent entre l'*exactitud* i el *rendiment* d'un mètode. Així veiem que alguns d'aquests escriuen que un mètode és d'una exactitud excel·lent, perquè arriba a donar resultats del 99'5 per 100 del teòric... I és evident que ambdues coses són ben diferents i que un mètode pot donar un magnífic rendiment, tot obtenint-se amb ell dobles deficients, el que ens en indica la poca exactitud i, a la inversa, ésser d'un pobre rendiment, però donar resultats dobles que coincideixen de manera gairebé absoluta; entre ambdues circumstàncies, té, al nostre entendre, un major valor la segona que la primera. Efectivament, ¿què en treurem que el rendiment que ens doni una determinació aïllada sigui excel·lent, si, en canvi, els dobles ens mostren diferències tan acusades que mai no sabrem quin prendre com a bo? Però si els dobles coincideixen bé, tot i que el rendiment sigui deficient, podrem treure valor dels resultats obtinguts, bastant-nos saber el coeficient de rendiment del mètode, per a multiplicar aquells resultats per ell, obtenint les xifres reals. Aquest és el cas del Fürth primitiu, en el qual calia multiplicar per un factor el nombre de centímetres cúbics de iode gastats.

Doncs bé, els resultats que obtenim nosaltres amb



el Friedemann, són absolutament satisfactoris, tant pel que pertoca a rendiment, com a exactitud dels dobles (en el ben entès d'efectuar-los en el mateix filtrat de la precipitació de les proteïnes). Per a convèncer-nos d'això, copiem a continuació unes taules de resultats obtinguts en determinacions en lactat de zinc, la xifra d'àcid làctic del qual oscil·la entre 3'27 i 207'2 mgr., o sigui un marge molt extens.

TAULA IV

Àcid làctic teòric	Àcid làctic trobat	Rendiment	Oscil·lació màxima
3'27	3'30	101'0	—
3'27	3'25	99'6	—
3'27	3'30	101'0	—
3'27	3'30	101'0	—
3'27	3'32	101'4	—
3'27	3'34	102'0	+ 2'0
3'27	3'29	100'6	—
3'27	3'24	99'4	— 0'6
3'27	3'24	99'4	—
3'27	3'27	100'0	—

Com veiem, el rendiment en aquestes determinacions és excel·lent — en el cas més dolent, del 99'4 per 100 — i així mateix llur paral·lelisme.

TAULA V

Àcid làctic teòric	Àcid làctic trobat	Rendiment	Oscil·lació màxima
6'06	5'98	98'7	—
6'06	5'94	98'0	— 2'0
6'06	6'07	100'2	—
6'06	5'98	98'7	—
6'06	6'12	100'9	+ 0'9
6'06	6'12	100'9	—
6'06	6'07	100'2	—

L'oscil·lació màxima d'aquests set resultats és de 98 per 100 a 100'9 per 100.

TAULA VI

Àcid làctic teòric	Àcid làctic trobat	Rendiment	Oscil·lació màxima
7'105	7'082	99'6	—
7'105	7'059	99'2	—
7'105	7'082	99'6	—
7'105	7'202	101'3	+ 1'3
7'105	7'105	100'0	—
7'105	7'036	98'9	- 1'1
7'105	7'082	99'6	—
7'105	7'082	99'6	—
7'105	7'059	99'2	—
7'105	7'105	100'0	—
7'105	7'152	100'6	—
7'105	7'105	100'0	—
7'105	7'152	100'6	—

Aquestes tretze determinacions paral·leles ens mostren una màxima oscil·lació entre 98'9 i 101'3, o sigui, més petita que en les anteriors.

TAULA VII

Àcid làctic teòric	Àcid làctic trobat	Rendiment	Oscil·lació màxima
9'09	9'18	101'0	—
9'09	9'22	101'3	+ 1'3
9'09	9'01	99'2	- 0'8
9'09	9'09	100'0	—

La diferència màxima entre les quatre determinacions paral·leles és de 99'2 a 101'3, menor encara que l'anterior, si bé també és molt més petit el nombre de determinacions.

TAULA VIII

Àcid làctic teòric	Àcid làctic trobat	Rendiment	Oscil·lació màxima
18'18	18'18	100'0	—
18'18	18'22	100'2	+ 0'2
18'18	18'18	100'0	—
18'18	18'22	100'2	—

Els quatre resultats són excel·lents, amb una diferència màxima de 100'0 a 100'2 per 100. Si bé el nombre de determinacions és reduït, podem afirmar que és amb aquesta quantitat d'àcid làctic a determinar on el mètode dona resultats d'un més perfecte paral·lelisme.

TAULA IX

Àcid làctic teòric	Àcid làctic trobat	Rendiment	Oscil·lació màxima
26'7	26'37	98,8	- 1'2
26'7	26'7	100'0	—
26'7	26'45	99'1	—
26'7	26'78	100'3	+ 0'3

Les diferències d'aquests quatre resultats ja tornen a ésser més grans que en la darrera taula, oscil·lant entre 98'8 i 100'3.

TAULA X

Àcid làctic teòric	Àcid làctic trobat	Rendiment	Oscil·lació màxima
13'35	13'43	100'8	—
13'35	13'35	100'0	—
19'8	19'8	100'0	—
23'0	23'2	100'8	—
27'3	27'3	100'0	—
32'7	32'8	100'3	—
62'4	62'5	100'2	—
112'1	113'7	101'4	+ 1'4
168'5	168'7	100'1	—
183'1	182'1	99'5	—
207'2	205'0	98'9	- 1'1

Com veiem, les xifres d'àcid làctic contingudes en aquesta taula oscil·len entre límits molt amples : de 13'35 a 207'2 mgr., i els resultats van essent pitjors, a mesura que augmenta la quantitat d'àcid làctic. Aquesta taula, com totes les anteriors, ens mostra que el contingut òptim en àcid làctic per a obtenir bons resultats

amb el mètode de Friedemann, oscil·la entre 15-20 mgr. De tota manera, els resultats obtinguts amb les dues xifres extremes determinades en conjunt : 3'27 i 207'2 mgr., ens demostren que el mètode té un marge immens d'aplicació, i que, inclús en el pitjor cas, dona resultats molt millors que els del Fürth, ja que l'error màxim és d'un 2 per 100 i en aquest del 3-4 per 100. En la zona òptima del mètode, o sigui entre 15-20 mg., l'error màxim que hem obtingut és del 0'2 per 100, xifra, al nostre entendre, gairebé immillorable amb cap altre mètode quantitatiu.

g) *Resultats d'algunes lactacidèmies.* — Observat, doncs, aquest immillorable comportament del mètode en les determinacions amb lactat de zinc, reproduïm a continuació algunes xifres de les innombrables determinacions de lactacidèmia portades a cap, amb aquest mètode, per un de nosaltres (J. F. P.) prescindint aquí, per no venir a què, de fer referència als diversos estats patològics dels malalts en què s'efectuà la determinació. La tècnica seguida fou sempre exactament igual a la descrita, que ha esdevingut el corrent en el nostre Institut. Els resultats de setze determinacions paral·leles, escollits a primera vista entre el nombre total de què disposem, que arriben avui dia gairebé al miler, són els següents:

TAULA XI

<u>Resultats dobles</u>	<u>Diferència per 100</u>
18'8 — 18'6	1'07
17'2 — 16'8	2'3
13'1 — 13'3	1'5
14'0 — 14'0	0'0
15'1 — 15'2	0'66
18'2 — 18'3	0'54
19'2 — 19'4	1'04
22'3 — 22'7	1'79



<u>Resultats dobles</u>	<u>Diferència per 100</u>
25'3 — 25'9	2'31
10'2 — 10'1	1'0
13'1 — 13'1	0'0
17'8 — 17'8	0'0
12'3 — 12'4	0'80
19'2 — 19'2	0'0
20'1 — 20'1	0'0
21'1 — 21'1	0'0
23'0 — 23'0	0'0

Si no fos que alguns autors encara ho confonen, gairebé no valdria la pena d'insistir sobre el fet que l'error d'aquests dobles nostres està calculat *en per cent sobre les xifres absolutes obtingudes*, mentre que aquells ho interpreten com *la diferència existent entre els dos resultats obtinguts per a 100 cc. de sang*. O sigui, aclarint el concepte, que suposant com a lactacidèmia normal la de 20 mgr. per 100 centímetres cúbics, l'error, segons la nostra manera de calcular, es fa cinc vegades més gros que el que s'obté segons ells... Doncs bé, alguns dels autors a què ens hem referit al començament d'aquest treball, consideren com a dobles excel·lents resultats que, d'acord amb llur càlcul, difereixen de 4-5 per 100, o sigui d'un 20-25 per 100 en realitat. No creiem necessari insistir més sobre aquest punt.

Els resultats que donem parlen prou a favor del mètode de Friedemann, portat a terme segons la tècnica corrent en el nostre Institut, perquè encara calgui estendrenos-hi. Diguem, tan sols, que basant-nos en ells, ens creiem autoritzats a recomanar-lo a tots aquells a qui interessi obtenir xifres de lactacidèmia que mereixin algun crèdit i de les que se'n puguin deduir algunes conseqüències; fent-los observar, ensems, la senzillesa de les operacions i la rapidesa amb què s'arriben a efectuar simultàniament tres o quatre determinacions, quan ja s'ha adquirit una certa pràctica.

## CONCLUSIONS

1.<sup>a</sup> S'efectua un estudi comparatiu de tots els mètodes proposats fins avui per a la determinació en sèrie de la lactacidèmia, arribant-se a la conclusió de la superioritat del de Friedemann i col·laboradors.

2.<sup>a</sup> Es descriu la tècnica standarditzada, senzillíssima, amb què es porta a terme aquesta determinació en el nostre Institut.

3.<sup>a</sup> S'insisteix sobre la capital importància de diversos factors, per al bon èxit de les determinacions: temps d'oxidació, refrigeració, barreja oxidativa, determinació en blanc de control, manera de precipitar les proteïnes, etc.

4.<sup>a</sup> Es reproduïxen una sèrie de taules de determinacions d'àcid làctic efectuades amb solucions de lactat de zinc preparat per nosaltres mateixos, amb excel·lents resultats paral·lels. La zona de concentració en àcid làctic, òptima per a l'exactitud del mètode, sembla oscil·lar al voltant dels 15-20 mgr., però hem obtingut resultats molt bons entre 3'27 i 207'2 mgr. com extrems inferior i superior.

5.<sup>a</sup> Finalment, es reproduïxen setze resultats dobles de lactacidèmies, escollits a primera vista entre el gran nombre que portem efectuades fins avui — gairebé un miler — amb un error màxim del 2'5 per 100 *absolut* (en relació amb això, s'insisteix sobre la manera equivocada com alguns autors calculen els resultats per 100 de llurs determinacions).

*Institut de Fisiologia.  
Facultat de Medicina. Barcelona.*

## BIBLIOGRAFIA

1. C. Pi-Suñer Bayo, Anal. Soc. Esp. Fis. Quim., 371, 28; 1930.
2. J. A. Collazo i C. Pi-Suñer Bayo, Rev. Med. Barcelona, 99, 92; 1931.
3. J. A. Collazo i C. Pi-Suñer Bayo, Rev. Med. Barcelona, 105, 86; 1931.
4. C. Pi-Suñer Bayo i G. Liss, Anal. Soc. Esp. Fis. Quim., 200, 29; 1931.
5. C. Pi-Suñer Bayo, G. Liss i T. Osuka, Anal. Soc. Esp. Fis. Quim., 193, 29; 1931.
6. C. Pi-Suñer Bayo i J. Folch Pi, Anal. Soc. Esp. Fis. Quim., 560, 29; 1931.
7. C. Pi-Suñer Bayo i J. Folch Pi, Anal. Soc. Esp. Fis. Quim., 76, 30; 1932.
8. T. E. Friedemann, M. Cotonio i P. Shaffer, Journ. Biol. Chem., 335, 73; 1927.
9. T. E. Friedemann i A. I. Kendall, Journ. Biol. Chem., 82, 23; 1929.
10. C. Jiménez-Díaz i B. Sánchez-Cuenca, Anales de la Clínica; 1928-29.
11. B. Mendel i I. Goldscheider, Bioch. Zeitschr., 163, 164; 1925.
12. J. A. Collazo, nombrosos treballs dels anys 1924-31.
13. J. A. Collazo, G. Liss i C. Pi-Suñer Bayo, Rev. Med. Barcelona, 468, 84; 1930.
14. J. A. Collazo, J. Puyal i I. Torres, Anales de la Casa de Salud Valdecilla, 1931.
15. O. Fürth i D. Charnas, Bioch. Zeitschr., 199, 26; 1910.
16. Hirsch i Kauffmann, Zeitschr. f. Physiol. Chem., 25, 140; 1924.
17. J. Outeriño i M. Hernanz, Medicina Ibero, 853, 707, 1931.
18. J. Outeriño i M. Hernanz, Medicina Ibero, 152, 717; 1931.
19. M. Sebastián Herrador, Medicina Ibero, 533, 780; 1932.
20. Lieb i Zacherl, Zeitschr. f. Physiol. Chem., 211, 211; 1932.
21. G. Embden i F. Kraus, Bioch. Zeitschr., 6, 45; 1912.
22. B. Mendel, Bioch. Zeitschr., 390, 202; 1928.
23. Dische i Laszlo, Bioch. Zeitschr., 344, 187; 1927.
24. L. Servantie, Compt. Rend. Soc. Biol., 700, 92; 1925.
25. B. F. Avery i A. B. Hastings, Journ. Biol. Chem., 273, 94; 1931.
26. Baumberger i Field, Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 87, 25; 1927.
27. Ripper, Sitzungsber. d. Wien. Akad., 845, 109; 1900.
28. Clausen, Journ. Biol. Chem., 263, 52; 1922.
29. O. Jervell, Acta Medica Scand., suplement 24; 1928.
30. E. Ronzoni i Z. Wallen-Laurence, Journ. Biol. Chem., 263, 74; 1931.