

Cuantificación espectrofotométrica del cloruro en suero mediante reacción con tiocianato de mercurio

KARL SCHOSINSKY NEVERMANN, Ph.D.*; Lic. ALICIA CHAVES CHAVARRÍA*;
 MANUEL JIMÉNEZ DÍAZ, Ph.D.*; Lic. ILEANA HOLST SCHUMACHER*;
 Lic. FRANK COX ALVARADO**; Lic. ZAIDA MORA CASTRO** y Lic. SANDRA VALVERDE NÚÑEZ**

* Departamento de Análisis Clínicos, Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica.
 ** Caja Costarricense del Seguro Social.

Introducción

El anión que se encuentra en mayor concentración en el fluido extracelular es el ion cloruro (1) (2), por lo que juega un papel importante en regular la distribución del agua, la presión osmótica y el balance aniónico-catiónico (2).

Los métodos más usados actualmente para la cuantificación de cloruro en suero, se fundamentan en la poca solubilidad que presentan las sales de cloruro de plata (3-5) y en la baja ionización de las sales de cloruro de mercurio (7-9).

Los métodos titrimétricos para el análisis de cloruro en fluidos biológicos, se basan en la titulación manual con nitrato de mercurio (8) (10) y en la titulación coulométrica-amperométrica (11). Otros tipos de técnicas incluyen la dilución isotópica (12), la del electrodo ion selectivo (13) y las técnicas colorimétricas que utilizan reactivos libres de mercurio (14).

Las desventajas del método titrimétrico manual, radican en la lentitud y en la poca reproducibilidad causada por la subjetividad en la detección del punto final de la titulación.

Los métodos coulométrico-amperométrico y el electrodo ion selectivo, requieren de equipo costoso que no se justifica, fundamentalmente en laboratorios pequeños que analizan un número limitado de muestras.

Sin embargo, las técnicas colorimétricas pueden ser utilizadas en estos laboratorios, que sólo disponen de un fotómetro o bien de

un espectrofotómetro para los análisis de rutina. Aun más, estos métodos utilizan reactivos de bajo costo y gran estabilidad.

De éstos, el método más utilizado es el de Levinson (5) (9) (15), que se basa en el desplazamiento cuantitativo del tiocianato unido al mercurio, por el anión cloruro, formando cloruro de mercurio. El tiocianato reacciona con nitrato férrico produciendo tiocianato de hierro III, de color rojo ladrillo, cuya absorbancia se determina espectrofotométricamente a 460-480 nm (9). La sensibilidad y el intervalo analítico se ajustan mediante un exceso de ion mercurio. El cloruro se combina primero con iones de mercurio libres, para luego desplazar al tiocianato del tiocianato de mercurio (9).

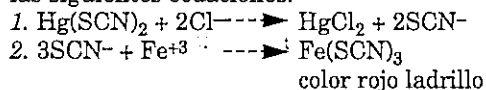
Los métodos colorimétricos basados en este principio han sido ampliamente usados en sistemas automatizados. Las principales desventajas de éstos estriban en la poca sensibilidad para el análisis de cloruro en sudor o en agua y en que el intervalo analítico abarca valores de 80 a 120 mmol/L (2), por lo que el método no cumple la ley de Lambert y Beer. Debido a lo anterior, se debe preparar una curva de calibración para cada serie de análisis y determinar frecuentemente el intervalo analítico cada vez que se utilicen reactivos de diferentes lotes.

Por lo tanto, consideramos de suma importancia modificar el método de Levinson (5), con el propósito de evitar los inconvenientes mencionados. Estas modificaciones ahorrarán reactivos, tiempo y por ende costos. Además permitirán incorporar la meto-

dología a sistemas de análisis automatizados, sin necesidad de comprar juegos de reactivos comerciales a un alto costo.

Fundamento

El fundamento del método se ilustra con las siguientes ecuaciones:



Materiales y métodos

A. EQUIPO

Las lecturas espectrofotométricas se realizaron en un espectrofotómetro Beckman modelo 34 (Beckman Instruments, Fullerton, CA 92634).

B. LAVADO DE LA CRISTALERÍA

La cristalería se sumergió durante 12 horas en una solución de ácido nítrico al 25 % (v/v) y posteriormente fue escrupulosamente lavada con agua destilada.

C. MUESTRAS DE SUERO

Para evaluar el desempeño analítico del método, se obtuvo la sangre en tubos de vidrio sin anticoagulante, se dejó reposar hasta la formación del coágulo, se centrifugó y se extrajo el suero. Se utilizaron sueros con niveles normales de bilirrubina, hemoglobina y triglicéridos. Para obtener el intervalo de referencia, se analizaron muestras de suero de 146 adultos ambulatorios sin patología aparente.

Los sueros son estables en tubos tapados, por lo menos cuatro horas a 25 °C, dos días a 4 °C y varios meses a -10 °C (9).

D. REACTIVOS

1. *Ácido Nítrico Concentrado*: 60 % (p/v), grado analítico (E. Merck Darmstadt).

2. *Nitrato Férrico*: 1 mol/L. Disolver 40,4 g de $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ (Carlo Erba Milano), en un balón aforado de 100 mL que contenga 40 mL de agua desionizada, aforar con agua desionizada y mezclar.

3. *Tiocianato de Potasio*, 0,4 mol/L. Disolver 3,89 g de tiocianato de potasio puro (E. Merck Darmstadt) en un balón aforado

de 100 mL que contenga 50 mL de agua desionizada, aforar con agua desionizada y mezclar.

4. *Nitrato de Mercurio*, 0,2 mol/L. Disolver 4,33 g de óxido de mercurio rojo Q. P. (Fischer Scientific Company), con 10 mL de ácido nítrico concentrado caliente, en un balón aforado de 100 mL, enfriar y aforar con agua desionizada.

5. *Solución de Trabajo*: en un balón aforado de 1.000 mL agregar 900 mL de agua desionizada y 8 mL de ácido nítrico concentrado. Mezclar y añadir 48 mL de la solución de nitrato férrico con agitación constante y 14 mL de la solución de tiocianato de potasio. De la misma forma agregar 14 mL de la solución de nitrato de mercurio II. Ajustar esta solución a $0,230 \pm 0,030$ de absorbancia contra agua, añadiendo gota a gota solución de tiocianato de potasio 0,4 mol/L a una longitud de onda de 460 nm si la absorbancia es inferior a 0,200, o nitrato de mercurio II si ésta es mayor de 0,260. Esta solución es estable al menos durante seis meses a 25 °C, si se mantiene en botella ámbar.

6. *Patrón de cloruro*, 100 mmol/L. Disolver 0,5845 g de cloruro de sodio (grado ACS) previamente desecado, en un balón aforado de 100 mL con 50 mL de agua desionizada, mezclar y aforar. Se recomienda desecar la sal en horno a 100 °C durante dos horas.

E. PROCEDIMIENTO

1. Preparar diluciones 1:11 del patrón y de los sueros con agua desionizada.

2. Colocar 3,0 mL de la solución de trabajo en la cubeta. Medir la absorbancia de este blanco de reactivos contra agua a 460 nm.

3. Adicionar 20 μL de patrón de 100 mmol/L de cloruro previamente diluido. Mezclar suavemente por inversión y medir la absorbancia a 460 nm.

4. Repetir los pasos 2 y 3, pero sustituyendo la solución patrón por 20 μL de la muestra diluida.

5. Para el análisis de cloruros en sudor, se debe usar 10 μL de muestra sin dilución previa y multiplicar la absorbancia obtenida por 0,18. Para obtener los valores en mmol/L, se utiliza la concentración y la absorbancia del patrón, según el procedimiento descrito para suero.

6. Interferencias debidas a concentraciones de hemoglobina de 100 a 500 mg/dL, se corrigen agregando 50 μ L de nitrato de mercurio 0,2 mol/L después de la lectura del producto final coloreado. Esta absorbancia leída contra agua, debe multiplicarse por 1,016 y restarse a la absorbancia del producto final coloreado.

F. CÁLCULOS

$$\text{Cloruro en suero (mmol/L)} = \frac{A_m - A_b}{A_p - A_b} \times 100$$

$$\text{Cloruro en sudor (mmol/L)} = \frac{A_m - A_b}{A_p - A_b} \times 100 \times 0,18$$

A_m = Absorbancia de la muestra

A_p = Absorbancia del patrón

A_b = Absorbancia del blanco

100 = Concentración del patrón de cloruro en mmol/L

0,18 = Factor de dilución ($3,01/3,02 \times 1/11 \times 2/1$).

Resultados

Las condiciones usadas para cada experimento son las mismas que se especifican en el procedimiento, a menos que se indique en el texto alguna variación.

1. *Espectro de Absorción:* La absorbancia máxima se obtiene a 460 nm. Los espectros de absorción del patrón y del suero mostraron superposición, por lo que el comportamiento del patrón en la reacción es similar al que presenta el suero.

2. *Tiocianato de potasio:* Se demostró que la concentración mínima de tiocianato de potasio es de 5,6 mmol/L. Sin embargo, debido a que trazas de nitrato de mercurio consumen ion cloruro, es necesario titular el reactivo de color con la solución de tiocianato de potasio 0,4 mol/L, hasta obtener una absorbancia de $0,230 \pm 0,030$ leída contra agua a 460 nm (fig. 1).

3. *Ácido nítrico:* Se prepararon varias soluciones de trabajo con diferentes concentraciones de HNO_3 . Analizando soluciones patrón de cloruro de 50, 100 y 145 mmol/L, se demostró que el HNO_3 , es necesario para que la línea de la curva de calibración pase por el origen y mantenga el intervalo de linealidad. La concentración óptima de ácido nítrico fue de 112 mmol/L.

4. *Nitrato férrico:* Al utilizar diferentes

concentraciones de $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$ en la solución de color, se demostró que concentraciones de 40 a 80 mmol/L no afectan la linealidad del método. Sin embargo, al aumentar la concentración de $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$ se produce un ligero aumento de las pendientes, por lo que se recomienda utilizar una solución de 60 mmol/L (fig. 2).

5. *Tiocianato de mercurio:* En la figura 3 se observa que el aumentar la concentración de tiocianato de mercurio, aumenta el intervalo de linealidad del método. Una concentración de $\text{Hg}(\text{SCN})_2$ de 2,8 mmol/L, permite que se cumpla la ley de Lambert-Beer, hasta una concentración de 250 mmol de ion cloruro por litro de suero.

6. *Intervalo analítico:* Utilizando las concentraciones óptimas previamente establecidas para el reactivo de color, se demostró que el intervalo analítico del método es de al menos de 0 a 250 mmol/L (fig. 3).

Este mismo comportamiento se observó al adicionar volúmenes crecientes de 5 μ L del suero diluido a 3,0 mL de reactivo de color.

7. *Temperatura:* Al aumentar la temperatura aumenta la absorbancia del producto final de la reacción. Cuando las absorbancias de una muestra de suero y de un patrón son leídas a la misma temperatura, la concentración calculada de cloruro en la muestra no se altera. Sin embargo, si las muestras se leen a temperaturas superiores a la del patrón, los valores serán mayores que el real y viceversa.

8. *Efecto de algunos componentes séricos:*

a) Halógenos: Se evaluó el efecto del bromuro de potasio, yoduro de sodio y fluoruro de sodio. Esto se logró agregando diferentes cantidades de cada uno de ellos, a una serie de alícuotas de un suero humano

En la tabla I se muestra que tanto el yoduro como el bromuro interfieren equimolecularmente, produciendo un error positivo en los resultados. Sin embargo, no se observa interferencia por fluoruro (estos datos no se incluyen en la tabla).

b) Bilirrubina, hemoglobina y triglicéridos no producen interferencia en concentraciones de 15, 100 y 800 mg/dL, respectivamente. Interferencias debidas a concentraciones de hemoglobina de 100 a 500 mg/dL se corrigen utilizando blanco de muestra, y los producidos por triglicéridos de 800 a 1.200 mg/dL no supera el 3,8 por ciento.

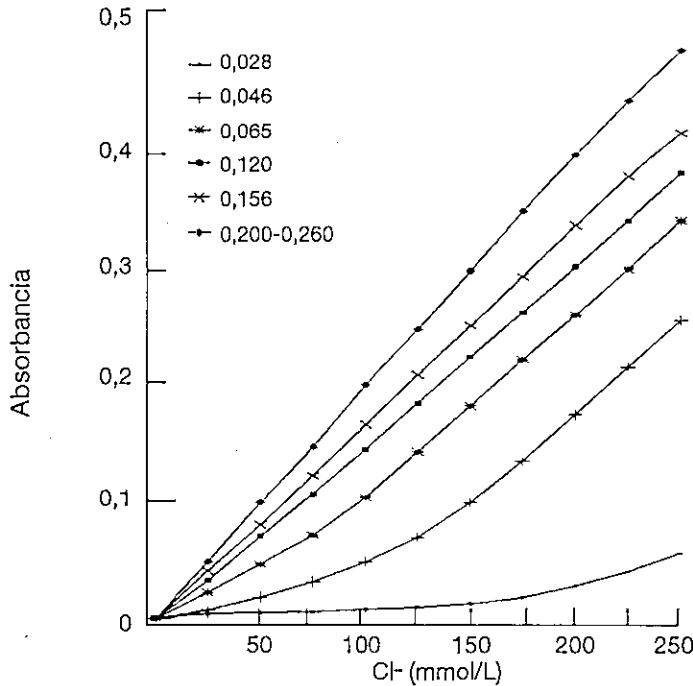


FIG. 1. Efecto de la absorbancia del reactivo de color en la linealidad del método.

TABLA I. EFECTO DEL IODURO Y DEL BROMURO EN LA CUANTIFICACIÓN DEL ION CLORURO.

	Cloruro (mmol/L)		
	Sin aditivo	Con aditivo	Interferencia ^a
Ioduro (mmol/L)			
5,7	85,2	89,8	0,81
8,5	85,2	93,5	0,97
11,3	85,2	96,4	0,99
17,0	85,2	103,6	1,08
			$\bar{x} = 0,96$
Bromuro (mmol/L)			
6,6	88,6	95,2	1,0
9,8	88,6	99,1	1,07
13,1	88,6	101,2	0,96
19,6	88,6	111,0	1,14
			$\bar{x} = 1,04$

$$^a \text{ Interferencia (mmol/L)} = \frac{\text{valor aditivo} - \text{valor sin aditivo}}{\text{cantidad de halógeno agregado}}$$

9. *Recuperación:* La tabla II muestra que al agregar de 25 a 100 mmol de cloruro por litro de suero, se obtuvo porcentajes de recuperación de 99,4 a 100,6 por ciento ($\bar{x} = 99,8\%$).

10. *Imprecisión:* La tabla III muestra las imprecisiones obtenidas en un mismo día y día a día, en sueros que contenían concen-

traciones aproximadas de ion cloruro en suero de 70, 100 y 130 mmol/L.

11. *Estudio comparativo:* La figura 4 muestra el estudio comparativo del método propuesto con el método amperométrico-coulométrico (14) usado como referencia, en muestras de suero con concentraciones de cloruro de 75 a 120 mmol/L.

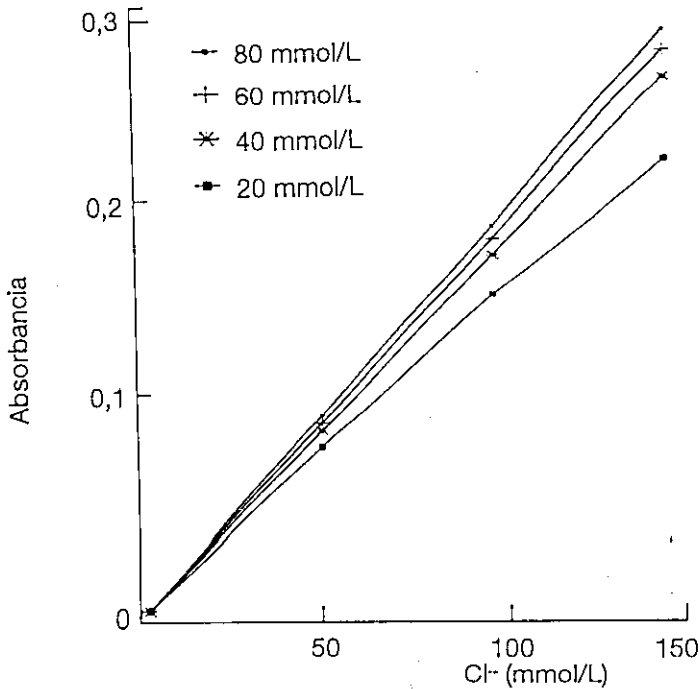


FIG. 2. Efecto del nitrato férrico en la linealidad del método.

El estudio comparativo se llevó a cabo en 46 muestras de suero utilizando la misma solución patrón para ambos métodos. Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

$$\gamma = 0,987 X \text{ (mmol/L)} + 2,9 \text{ (mmol/L)}.$$

El coeficiente de correlación (r) fue de 0,988 y el error estándar del estimado ($S_{y,x}$) de 1,824 mmol/L.

12. *Intervalo de referencia:* Se utilizó una muestra aleatoria de una población aparentemente sana, que consistió en sueros de 146 personas (50 mujeres y 96 hombres), cuyas edades estaban comprendidas entre

los 18 y los 60 años. Los intervalos de referencia ($\bar{x} \pm 2DS$) obtenidos son los siguientes: mujeres $102,5 \pm 5,6$, hombres $101,3 \pm 5,0$ e incluyendo ambos sexos $101,8 \pm 5,5$ mmol/L.

Discusión y conclusiones

La concentración de nitrato de mercurio agregada al reactivo de color, disminuye la sensibilidad del método y establece el intervalo de linealidad (17).

Varios métodos han sido desarrollados basados en la reacción del tiocianato, per-

TABLA II. RECUPERACIÓN ANALÍTICA DEL ION CLORURO EN SUERO.

Agregada	Concentración del ion cloruro (mmol/L)			% recuperación ^a
	Obtenida	Calculada		
0	91,7	—	—	—
25	116,0	116,7		99,6
50	141,4	141,7		99,4
75	166,3	166,7		99,5
100	192,3	191,7		100,6
				$\bar{x} = 99,8$

^a % recuperación = $100 (\text{valor obtenido} - 91,7) / \text{cloruro agregado}$.

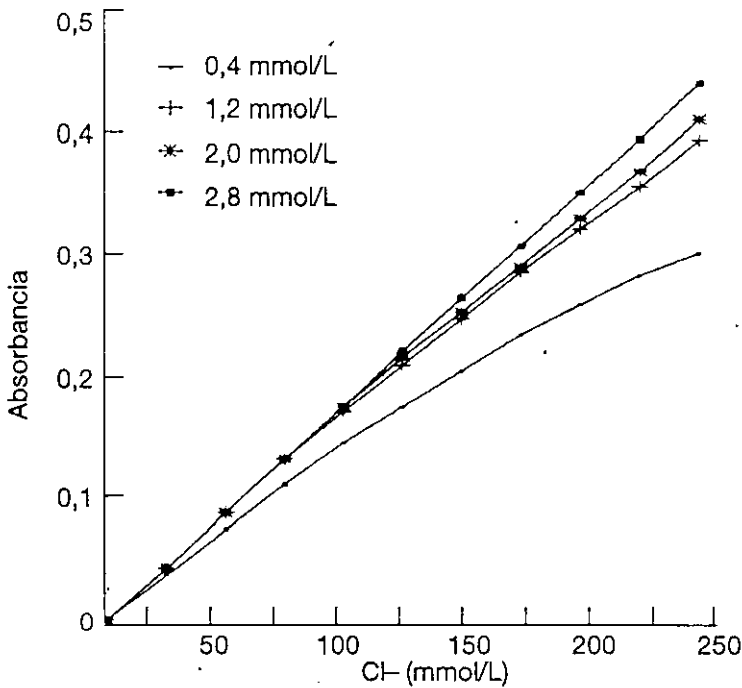


FIG. 3. Curva de calibración de cloruro por el método colorimétrico usando diferentes concentraciones de $Hg(SCN)_2$.

TABLA III. IMPRECISIÓN EN LA DETERMINACIÓN DEL ION CLORURO POR EL MÉTODO EN ESTUDIO.

Mismo día (n = 21)			Día a día (n = 21)		
mmol/L			mmol/L		
\bar{x}	DS	CV%	\bar{x}	DS	CV%
77,3	0,96	0,96	77,5	1,29	1,67
104,1	1,10	1,10	102,7	1,64	1,60
128,7	1,52	1,52	130,5	2,04	1,57

mitiendo linealidad entre 80 y 120 mmol de cloruro por litro de suero, por lo que muestras con niveles fuera de este intervalo deben ser concentradas o diluidas, según el caso (18-21).

Debido a esto se tratará de establecer las condiciones adecuadas al método colorimétrico que permitieran obtener una linealidad continua hasta aproximadamente 250 mmol/L.

Esto se logró eliminando el exceso de nitrato de mercurio, mediante la adición de tiocianato de potasio hasta obtener una absorbancia del reactivo de color de 0,230 ± 0,030 leído contra agua a 460 nm.

Este exceso de tiocianato de potasio garantiza que todo el nitrato de mercurio fue transformado en tiocianato de mercurio y

permite que se cumpla la ley de Lambert-Beer hasta 250 mmol de cloruro por litro de suero.

Esta modificación elimina la necesidad de preparar constantemente curvas de calibración y permite cuantificar la concentración de ion cloruro en diferentes fluidos biológicos, sin tener que alterar el volumen de muestra agregado.

La longitud de onda en la cual se obtiene la máxima absorbancia es de 460 nm, con una meseta entre 450 y 470 nm, lo que permite el uso de fotómetros que tengan incorporados filtros de 450 nm.

Al evaluar el método propuesto, se encontró que la intensidad del producto final coloreado depende en gran medida de la temperatura. Como la absorbancia aumen-

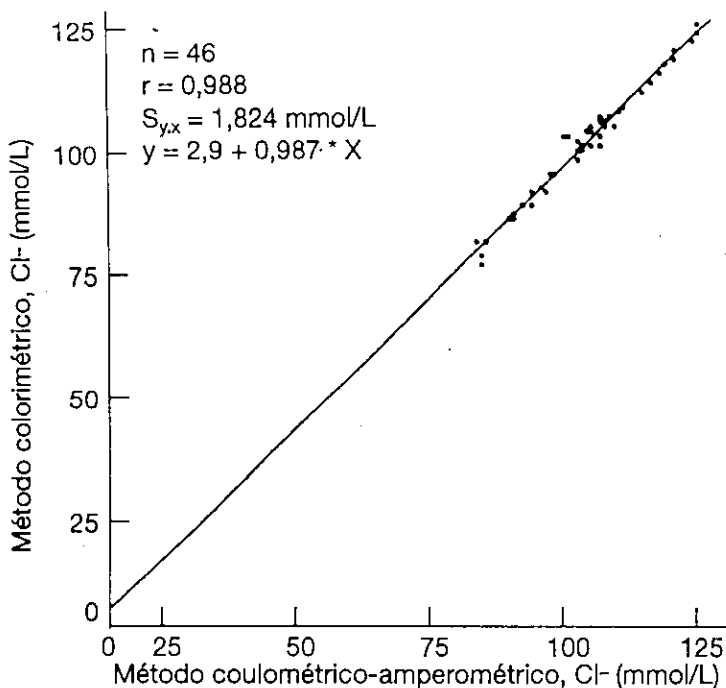


FIG. 4. Regresión lineal del estudio comparativo entre un método amperométrico-coulométrico y el método colorimétrico.

ta al aumentar la temperatura, el patrón y la muestra deben leerse a la misma temperatura, de lo contrario se obtiene un error de aproximadamente 0,5 mmol/L por cada grado centígrado de diferencia entre el patrón y la muestra. Este mismo efecto se reporta en el método descrito por Anderson y Miller (5).

Debido a la alta sensibilidad de la reacción, se debe diluir la muestra previamente 1:11 con agua destilada, siendo a la vez uno de los inconvenientes del método. Sin embargo, esta propiedad permite cuantificar el ion cloruro en muestras con niveles muy bajos del anión, como por ejemplo en sudor para el diagnóstico de enfermedad fibroquística del páncreas (22). Publicaciones previas, describen la formación de precipitado cuando el suero es adicionado al reactivo (19) (20). Para eliminar este efecto, Hamilton (20) sugirió la adición de ácido perclórico y urea al reactivo. Este efecto interferente no se presenta en el método descrito, debido a la alta dilución del suero con agua destilada.

Los halógenos compiten con el cloruro por el desplazamiento del tiocianato unido al mercurio, sin embargo, proporcionalmen-

te el total de halógenos en suero no contribuye en más del uno por ciento, por lo que su efecto es insignificante (18) (19).

Pseudohipercloremias pueden ser el resultado del uso de drogas que contengan bromuro o bien por ingestión del mismo. Esta interferencia se presenta en varias técnicas, por lo que pueden producir errores imponentes en la interpretación del análisis de cloruro en suero (23-27).

En el método propuesto, se observa que el bromuro y el yoduro interfieren equimolecularmente, produciendo un error positivo en los resultados (tabla I). Sin embargo, un valor elevado de cloruro sérico será la primera o única clave que evidencie un posible bromismo. Por lo tanto, hay cierta justificación en utilizar métodos de laboratorio para el análisis de cloruro sensibles a la interferencia por bromuro (27).

Komaiko, Hussein, Brecher y col. (26) reportan que una brecha aniónica negativa, es causada posiblemente por bromismo. Drogas que contienen bromuro se utilizan clínicamente en el control de enfermedades agudas, miastenia gravis y glaucoma (26).

El método propuesto presenta una precisión adecuada, con coeficientes de variación

día a día no mayores de 1,67 %, para concentraciones de 77 a 131 mmol/L.

Levinson (9) reporta coeficientes de variación de 2,5 y 2 % para concentraciones de 105 y 111 mmol/L respectivamente, lo que demuestra que el método propuesto posee menor imprecisión. Aun más, recientemente Legaz y colaboradores desarrollaron un método colorimétrico con reactivos libres de mercurio (14). Estos autores encontraron coeficientes de variación de 1,76 y 2,93 %, en muestras analizadas en un mismo día y día a día, respectivamente.

El método muestra una alta correlación con el amperométrico-coulométrico de Cotlove (28). Al comparar 46 muestras con valores de cloruro sérico entre 75 y 120 mmol/L, por ambos métodos, el coeficiente de correlación fue de 0,988 y la ecuación de regresión lineal $Y = 0,987 X \text{ (mmol/L)} + 2,9 \text{ mmol/L}$. Determinando el valor calculado para una concentración de cloruro de 96 mmol/L, se obtiene un valor de 97,6 mmol/L y para una concentración de 108 mmol/L un valor de 109,5 mmol/L. Esto demuestra que utilizando los intervalos de referencia, el porcentaje de error no es mayor de 1,7 al comparar estos valores con los resultados obtenidos por el método de referencia.

El intervalo de referencia obtenido en 146 adultos ambulatorios fue de 96 a 108 mmol/L, intervalo que coincide con los reportados en la literatura (18) (29).

CORRESPONDENCIA

Karl Schosinsky Nevermann, Ph.D.
 Facultad de Microbiología,
 Departamento de Análisis Clínicos
 Universidad de Costa Rica
 San José, Costa Rica

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ANDERSON, F. P. and MILLER, W. G., "Chloride", in: Kaplan, L. A. and Pesce, A. J. (eds.), *Methods in Clinical Chemistry*, The C.V. Mosby Company, St. Louis, Missouri, 73-85, 1987.
2. TIETZ, N. W.; PRUDEN, E. L. and SIGGAARD, O., "Electrolytes", in: Norbert W. Tietz (ed.), *Fundamentals of Clinical Chemistry*, W.B. Saunders Company, Philadelphia, second edition, 1.172-1.181, 1976.
3. COTLOVE, E., "Determination of Chloride in Biological Materials", in: Glick, D. (ed.), *Methods of Biochemical Analysis*, Ed. New York, Interscience Publishers Inc., vol. 12, 277-391, 1964.
4. SCHOSINSKY, K.; CHAVARRIA, M. and LEHMANN, P.,

"Micromethod for analysis for chloride in physiological fluids", *Clin. Chem.*, 22, 1.339-1.342, 1976.

5. ANDERSON, F. P. and MILLER, W. G., "Chloride", in: Kaplan, L. A. and Pesce, A. J. (eds.), *Clinical Chemistry: theory, analysis and correlation*, The C.V. Mosby Company, St. Louis, Missouri, second edition, 872-875, 1989.
6. DIETZ, A. A. and EPPERSON, E. B., "Chloride: colorimetric amperometric method", in: Faulkner, W. R. and Meites, S. (eds.), *Selected methods of Clinical Chemistry*, vol. 9, 149-152, 1982.
7. HAMILTON, R. H., "Direct photometric method for chloride in serum, employing mercuric thiocyanate and perchloric acid", *Clin. Chem.*, 7, 581-587, 1961.
8. SCHALES, O. and SCHALES, S. S., "Chloride", *Stand. Methods Clin. Chem.*, 1, 37-42, 1953.
9. LEVINSON, S. S., "Chloride, colorimetric method", in Faulkner, W. R. and Meites, S. (eds.), *Selected Methods of Clinical Chemistry*, American Association for Clinical Chemistry, Washington, DD, vol. 9, 143-148, 1982.
10. KLEIN, B., "Chloride", *Stand. Methods Clin. Chem.*, 2, 22-25, 1958.
11. COTLOVE, E., "Chloride", *Standard Methods of Clinical Chemistry*, Academic Press, Inc, New York, vol. 3, 81-92, 1961.
12. COTLOVE, E., "Determination of true chloride content of biological fluids and tissues II-analysis by simple non-isotopic methods", *Anal. Chem.*, 35, 95-99, 1963.
13. LUSTGARTEN, J. A.; WENK, R. E.; BYRD, C. and HALL, B., "Evaluation of an automated selective ion-electrolyte for measuring Na⁺, K⁺ and Cl⁻ in serum", *Clin. Chem.*, 20, 1.217-1.221, 1974.
14. LEGAZ, M. E.; SANDSTROM, R. E.; TATARKO, T. M. and LIEDTKE, R., "A mercury free reagent with no bilirubin interference", *Clin. Chem.*, 40, 1.060, 1994.
15. MATHER, A., "Chlorides: an introduction to three methods", in: Faulkner, W. R. and Meites, S. (eds.), *Selected Methods of Clinical Chemistry*, American Association for Clinical Chemistry, Washington, DC, vol. 9, 143, 1982.
16. DIETZ, A. A. and BOND, E. E., "Chloride, colorimetric amperometric methods", in: Faulkner, W. R. and Meites, S. (eds.), *Selected Methods of Clinical Chemistry*, American Association for Clinical Chemistry, Washington, DC, vol. 9, 149-152, 1982.
17. LEVINSON, S. S. and RIEDER, S. V., "The effect of free mercuric ion on apparent bromide concentrations when measured by the Standard Auto Analyzer method for chloride", *Clin. Chim. Acta*, 52, 249-251, 1974.
18. ZALL, D. M.; FISHER, D. and GARNER, M. O., "Photometric determination of chlorides in water", *Anal. Chem.*, 18, 1.665-1.668, 1956.
19. SCHOENFELD, R. G. and LEWELLEN, C. J., "A colorimetric method for determination of serum chloride", *Clin. Chem.*, 10, 533-539, 1964.
20. HAMILTON, R. H., "A direct photometric method for chloride in biological fluids, employing mer-

- curic thiocyanate and perchloric acid", *Clin. Chem.*, 12, 1-7, 1966.
21. LEVINSON, S. S., "Direct determination of serum chloride with a semiautomated discrete analyzer", *Clin. Chem.*, 22, 273-274, 1976.
 22. TIETZ, N. W.; RINKER, A. R. and HENDERSON, A. R., "Gastric, Pancreatic and Intestinal Function", in: Norbert W. Tietz (ed.), *Fundamentals of Clinical Chemistry*, W.B. Saunders Company, Philadelphia, second edition, 1.434-1.493, 1976.
 23. ELIN, E. J.; ROBERTSON, E. A. and JOHNSON, E., "Bromide interferes with determination of chloride by each of four methods", *Clin. Chem.*, 27, 778-779, 1981.
 24. WENK, R. E.; LUSTGARDEN, J. A.; PAPPAS, J.; LEVY, R. I. and JACKSON, R., "Serum chloride analysis, bromide detection and the diagnosis of bromism", *Am. J. Clin. Pathol.*, 64, 49-57, 1976.
 25. RICCI, N.; THOMA, P. N.; PAZZI, P.; STABELLINI, G. and VANARA, F., "Bromide can interfere with chloride estimation", *Lancet*, ii, 100, 1982.
 26. KOMAIKO, W.; HUSSAIN, S.; BRECHER, M. and BISSELL, M., "Positive Interference with Ektachem Chloride and carbon dioxide methods by bromide containing drugs", *Clin. Chem.*, 34, 429-430, 1988.
 27. PRESSAC, M.; JARDEL, C.; DURAND, D. and AYMARD, P., "Interference of Bromide in determination of serum chloride", *Clin. Chem.*, 33, 415-417, 1987.
 28. COTLOVE, E.; TRANTHAM, H. V. and BOWMAN, R. L., "An instrument and method for automatic, rapid, accurate and sensitive titration of chloride in biological samples", *J. Lab. Clin. Med.*, 51, 461-468, 1958.
 29. TIETZ, N. W. (ed.), *Textbook of Clinical Chemistry*, W.B. Saunders Co., Philadelphia, P.A., 1.818, 1986.