

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

ESCUELA NACIONAL DE CIENCIAS QUIMICAS

Separación de los Pigmentos Biliares por Cromatografía en Fase Reversa

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO
BIOLOGO

PRESENTA

JOSEFINA SANCHEZ MACEDO

MEXICO, D. F.

MCMLIX

1959



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

ESCUELA NACIONAL DE CIENCIAS QUIMICAS

Separación de los Pigmentos Biliares por Cromatografía en Fase Reversa

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO
BIOLOGO

PRESENTA

JOSEFINA SANCHEZ MACEDO

MEXICO, D. F.

MCMLIX

*A mis Padres
Con cariño y gratitud.*

*A mis Hermanos
Parientes y Amigos*

Este trabajo se realizó en el Instituto Nacional de la Nutrición, en el Departamento Bioquímica bajo la dirección del Dr. Guillermo Soberón, a quien hago patente mi profundo agradecimiento.

*Al Dr. Jesús Torres.
Por sus atinados consejos.*

*Por su valiosa colaboración.
Al Dr. Ricardo Marciay*

C A P I T U L O S

- I.—GENERALIDADES.
- II.—MATERIAL Y METODOS.
- III.—RESULTADOS.
- IV.—DISCUSION.
- V.—CONCLUSIONES.
- VI.—BIBLIOGRAFIA.

I.—GENERALIDADES.

GENERALIDADES

Desde que el botánico Tswett en 1916 (1) logró separar algunos pigmentos vegetales por medio de lo que él llamó cromatografía, muchos autores han introducido multitud de modificaciones a este método original. La cromatografía no es sino un método de separación de sustancias, en el que interviene un sistema de solventes compuesto de dos fases: una móvil y otra estacionaria. En la actualidad las técnicas cromatográficas se clasifican en cuatro grupos principales que son:

a). **Adsorción cromatográfica.**—La fase móvil es una masa fluída y la estacionaria es la superficie interfacial de un adsorbente.

b). **Partición cromatográfica.**—La fase móvil es una masa fluída y la fase estacionaria está suspendida en un material inerte.

c). **Separación por espuma y emulsión.**—Este tipo de cromatografía utiliza como fase móvil una masa fluída y como fase estacionaria una película interfacial formada de burbujas o gotas.

d). **Intercambio iónico.**—En ésta se realiza intercambio de iones entre la masa fluída móvil ionizada y la fase estacionaria que generalmente es una resina.

Estos cuatro tipos de cromatografía pueden efectuarse en papel o en columnas cromatográficas.

En el presente trabajo se le dedicará particular atención a la partición cromatográfica en columna,

en la que se usa un sistema de solventes constituido de dos fases líquidas. A una de ellas sostenida, por un material inerte (Kieselguhr, sílice, etc.) se le da el nombre de fase estacionaria, la otra toma el nombre de fase móvil y es la que corre a través de la columna. La separación depende de la distribución de los diferentes componentes de la mezcla analizada entre las dos fases.

El soporte utilizado puede ser de muy diversas clases y su polaridad varía desde la del agua hasta la de hidrocarburos parafínicos. La fase móvil debe tener como requisito el ser opuesta en polaridad a la fase estacionaria. La fase móvil puede correr a través de la columna ya sea por influencia de la gravedad, aplicando presión o por succión, siempre y cuando el paquete de material inerte no pierda su uniformidad.

A este tipo de cromatografía pertenece el sistema diseñado por Howard y Martin en 1950 (2) quienes describen de una manera precisa la cromatografía en fase reversa, aunque previamente Boscott y Bolding (1) hacen referencia a este procedimiento.

En este trabajo usan un sistema de solventes en el cual la fase más polar es la móvil y la menos polar la estacionaria. Para obtener esto es necesario un soporte hidrofóbico, lo que logran haciendo pasar una corriente de dicloro-metil-silano a través del Kieselguhr hasta que el material flote en agua. Después de este tratamiento lavan dicho material con alcohol metílico hasta neutralizarlo al azul de bromo timol.

El sistema de solventes que utilizan es una mezcla de agua-acetona-parafina líquida. Las columnas son de 12 mm. de diámetro y contienen 4 gr. de Kieselguhr siliconizado que ha sido homogeneizado con 3.8 ml. de la fase menos polar. De este modo logran

separar y analizar mezclas de ácidos grasos que contienen por ejemplo: palmítico, mirístico y láurico.

Este tipo de cromatografía ha permitido a Cole y Lathe (3) instituir las bases que permiten distinguir los diferentes pigmentos biliares y establecer la relación de éstos con los diferentes tipos de ictericia.

Por ser la bilirrubina el principal pigmento presente en la bilis su metabolismo ha estado sujeto a numerosas investigaciones gracias a las cuales se han dilucidado numerosos hechos de gran trascendencia en la patología humana.

Cuando los glóbulos rojos han llegado al término de su vida son destruidos en el sistema retículo-endotelial del hígado, bazo y médula ósea, donde liberan la hemoglobina, substancia cuyo grupo heme por diferentes transformaciones da origen a los pigmentos biliares.

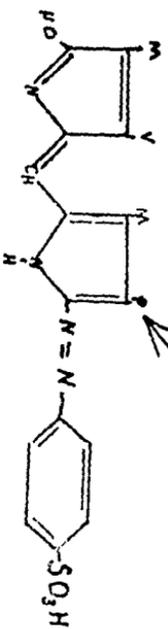
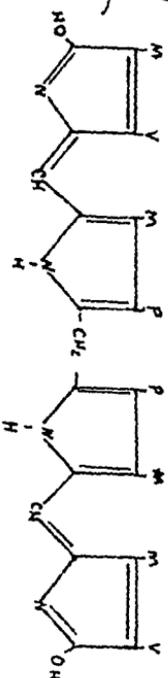
La degradación de la hemoglobina se inicia por rearreglo de las valencia del heme y oxidación de las cadenas metínicas, pero sin pérdida de la globina, ni del hierro. Estos cambios hacen inestable a la molécula, la cual se rompe entre sus anillos pirrólicos I y II con pérdida de anhídrido carbónico y formación de un compuesto llamado coeglobina, el cual por pérdida del hierro se transforma en biliverdina-globina y por separación de la globina de la biliverdina. Por acción de una dehidrogenasa, la biliverdina se reduce para producir la bilirrubina que pasa al torrente circulatorio donde es transportada al hígado unida a albúmina plasmática (5). En esta glándula la bilirrubina se conjuga con el ácido glucorónico para formar los pigmentos biliares conjugados. Este proceso se verifica en los microsomas de las células parenquimatosas en donde el ácido uridin-di-fosfato-glucuró-

nico se escinde para donar su ácido glucurónico a la bilirrubina, siendo catalizada esta reacción por la enzima glucuronil-transferasa. (6, 7).

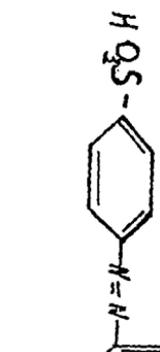
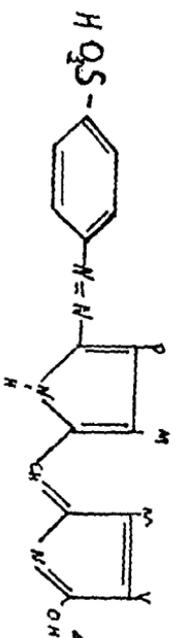
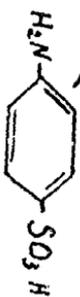
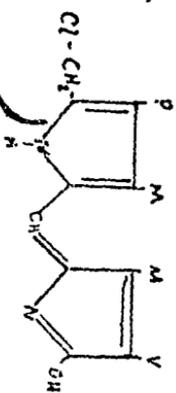
De esta manera se forman el mono y diglucuronidato de bilirrubina, llamados también pigmentos I y II respectivamente, aunque no se tiene la certeza de si el pigmento I es precursor del pigmento II o no. Por medio de estos dos pigmentos se excreta la bilirrubina en la bilis, de modo que al hacer pasar al intestino delgado son reducidos por acción bacteriana a urobilinógeno, el cual se excreta en forma de urobilina, substancia responsable del color de las heces. Cierta cantidad de urobilinógeno es reabsorbida y pasa a la circulación portal y al hígado para ser oxidada a urobilina y más tarde ser eliminada por la orina. (8).

Lo anterior se observa en condiciones normales pero hay situaciones en que los pigmentos aparecen en exceso en la sangre ya sea: por incapacidad para eliminarlos o por aumento en su producción, dando origen a la hiperpigmentación biliar o ictericia. Esta puede pues deberse al exceso de producción de pigmentos como en el caso de ictericia hemolítica o prehepática; a la falta de conjugación del ácido glucurónico como sucede en la llamada enfermedad de Gilbert, en la llamada ictericia fisiológica del recién nacido y del prematuro y en la ictericia del recién nacido tipo Crigler Najjar. También puede deberse a un defecto en su eliminación: ya sea por hepatopatía o por obstrucción de las vías biliares extrahepáticas, en cuyos casos se tiene la ictericia hepatocelular y la de tipo obstructivo o posthepática respectivamente. (9).

Es interesante hacer notar que en las hepatopatías aumenta proporcionalmente el pigmento I y en



+



las ictericias obstructivas se incrementa también proporcionalmente, el pigmento II. (17).

El estudio de los pigmentos biliares da comienzo en 1913 cuando Van den Bergh y Snapper (10) vieron la necesidad de desarrollar un método para determinar cuantitativamente la bilirrubina en sangre, para lo cual aplicaron la prueba de Erhlich para la orina. Esta reacción en la que se basan todos los métodos existentes hasta la fecha, consiste en romper la molécula de la bilirrubina en dos partes, por medio de un agente diazotante que se obtiene al tratar ácido sulfanílico con nitrito de sodio. Para que esta reacción resulte positiva se necesita que el compuesto a reaccionar tenga una unión $-\text{CH}_2-$ la cual según Fischer y Haberland (10) sufre una hidrólisis preliminar. Ordinariamente sólo uno de los dipirroles resultantes reacciona con la sal diazotante y da los azobilirrubinógenos, pero con suficiente cantidad de agente acoplante reacciona la otra mitad de la bilirrubina. Para el desarrollo de la reacción se necesita que la bilirrubina y el agente acoplante se encuentren en la misma fase y puesto que la primera es insoluble en agua se adiciona alcohol al medio de reacción.

Van den Bergh y Muller (10) omitieron accidentalmente el alcohol, encontrando que había desarrollo de color sobre todo cuando se usaba bilis como fuente de pigmentos biliares. Este tipo de reacción era también positiva en el plasma de pacientes con ictericia obstructiva y hepatitis, pero no así en los que tenían ictericia hemolítica, casos en los que era necesario agregar alcohol para producir desarrollo del color. A esta última se le dió el nombre de reacción indirecta y a la primera reacción directa. En razón de estos hallazgos se hicieron pruebas para diferenciar los dos tipos de bilirrubina y encontraron los siguientes hechos.

Propiedades**Bilirrubina**

	indirecta	directa
Solubilidad en agua.	—	+
Solubilidad en CHCl ₃ .	+	—
Presente en la bilis.	—	+
Presente en la orina de ictericos.	—	+
Afinidad con las prot. desnaturaliz.	—	+
Unión con proteínas plasmáticas.	+	+
Oxidación.	+	++
Asociada con ictericia hemolítica.	+	—
Asociada con ictericia obstructiva	+	++
Hepatitis.	+	++

Más tarde Cole y Lathe (3) aplican la cromatografía particional de fase reversa a sueros ictericos y logran separar dos pigmentos: uno que reacciona de manera indirecta y otra de manera directa.

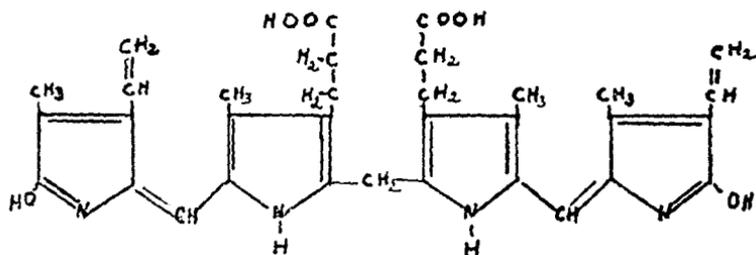
Esta separación la hicieron en columnas de vidrio de 18 mm de diámetro, usando Kieselguhr como material inerte y soporte de la fase estacionaria, en la cual esté previamente tratado con silicona con objeto de impermeabilizarlo. El sistema de solventes consiste en la mezcla de 25 partes de cloroformo, 25 de tetracloruro de carbono y 38 partes de alcohol metílico, 6 partes de agua y 6 partes de solución amortiguadora de fosfatos pH6. El suero se desproteíniza con alcohol y sulfato de amonio, se seca al vacío y se pasa por la columna con lo que se obtienen dos tipos de pigmentos, uno, que se mueve más rápidamente y por consiguiente es más soluble en agua y da una reacción directa a la prueba de Van den Berght, el otro es más soluble en solventes orgánicos y corre más lentamente en la columna y da una reacción indirecta.

En 1954 estos mismos autores (11) logran separar del pigmento que se mueve más rápidamente en el sistema anterior, dos fracciones que llamaron I y II. Para ello usan amortiguador de fosfatos pH6 y butanol como sistema de solvente, ambos pigmentos I y II dan una reacción directa y el más soluble o sea el que corre más rápidamente se encuentra en mayor proporción en la bilis y está presente junto con el pigmento I en la orina de pacientes con ictericia obstructiva y hepatitis.

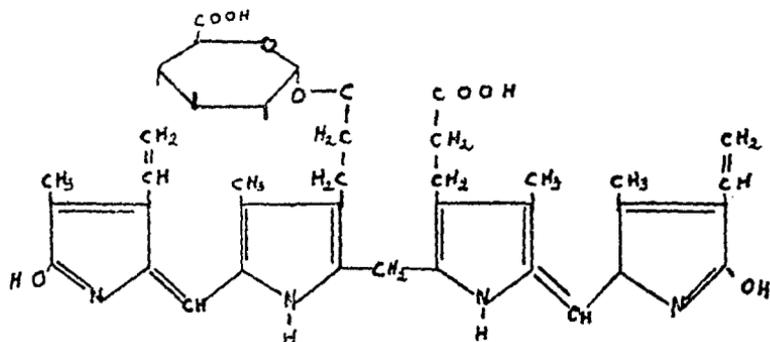
En el mismo trabajo informaron que si se corren los sueros previamente diazotados en cromatografía de fase reversa, con Kieselguhr tratado con silicona y usando un sistema de solventes de butanol agua solución amortiguador de fosfatos de pH4 aparecen dos tipos de pigmentos diazo positivos que llamaron A y B. Posteriormente Billing mostró (13) que el pigmento II da lugar al azopigmento B, más soluble y que corre más rápidamente que el azo-pigmento A que se origina a partir de bilirrubina. El pigmento I produce una mezcla de azo pigmentos A y B.

Tanto el azo pigmento A como el B a causa del arreglo asimétrico de las cadenas laterales de los pigmentos biliares, constan de una mezcla de isómeros que se diferencian únicamente en la posición de los grupos vinilos y metilos en la cadena. Estos isómeros se han podido separar cromatográficamente pero como se comportan de manera similar en el sistema descrito se les toma como si fueran una sola sustancia.

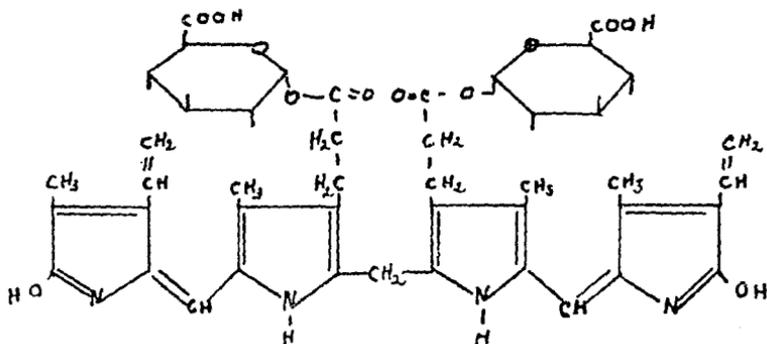
De estudios cromatográficos, enzimáticos y determinaciones cuantitativas se ha llegado a la conclusión de que los pigmentos biliares que reaccionan directamente en la prueba de Van den Bergh, están formados de bilirrubina y ácido glucorónico. Talefant



Bilirubina



Monoglucuronidato de Bilirubina



Diglucuronidato de Bilirubina

(6) al tratar bilis purificada de perro por electroforesis comprobó que el pigmento II está siempre asociado al ácido glucurónico en una proporción de 1 a 2. Esta unión es de tipo éster y en ella participan los grupos carboxílicos de la bilirrubina (7). Shachter ha comprobado que la unión es de tipo carboxil glucurónico, por su capacidad de reaccionar con la hidroxil amina para formar hidroxamatos.

También se ha observado que el tratamiento con álcali da lugar a una conversión completa de pigmento directo a bilirrubina. En el pigmento I se identifica ácido glucurónico en proporción de 1 a 1 y al diazotar produce los azopigmentos A y B por lo que se ha llegado a la conclusión de que el pigmento I es el monoglucuronidato de bilirrubina. Puesto que en el pigmento II el ácido glucurónico está en mayor cantidad (relación 1 a 2 y sólo produce pigmento B al diazotarse) se ha concluido que el pigmento II es el diglucurónico de la bilirrubina.

En el Instituto Nacional de la Nutrición donde hay gran concentración de enfermos hepáticos, existe gran interés en estudiar la distribución de los pigmentos biliares en los mismos, por lo cual se estudió el método de separación de los compuestos por cromatografía en fase reversa según lo han descrito Cole, Lathe y Billing (3, 8).

II.—MATERIAL Y METODOS.

MATERIAL Y METODOS

El método desarrollado está basado en la técnica descrita por Cole, Lathe y Billing (3, 8) en la que se usa el evaporado de un suero desproteínizado que se pasa a través de una columna cromatográfica donde se separan los pigmentos I y II.

A un ml., de suero icterico, se le adicionan 0.18 ml. de solución saturada de sulfato de amonio y 2.5 ml. de alcohol etílico, se agita y se deja reposar en la obscuridad por medio hora, se centrifuga, y se toma una alícuota. Esta se evapora al vacío a menos de 40 grados C. El evaporado se trata con 0.5 ml. de la fase acuosa de un sistema de solventes compuesto de: butanol, agua y amortiguador de fosfatos pH6 (50, 45 y 5 partes respectivamente).

Los pigmentos biliares disueltos en medio mililitro de la fase acuosa, son transferidos a la parte superior de la columna, la cual está formada de tubos de vidrio de 12 mm. de diám. que contienen 1.5 g. de Kieselguhr tratado con silicona. El Kieselguhr ha sido homogeneizado con 0.8 ml de la fase menos polar y 10 ml de la más polar del sistema de solventes usado.

Los pigmentos se separan al hacer pasar a través de la columna 4.5 ml de la fase acuosa. Una vez separados, se sacan en fracciones para determinar la intensidad de color según la reacción de Van den Bergh pero en el que se usa diazo reactivo unido a alcohol y a una solución amortiguadora de fosfato dibásico, dando un pH de 4.1. Estas soluciones eluyen los pigmentos de la columna.

Además de los reactivos empleados en el método anterior se describen otros que fueron usados al estudiar la influencia de algunos factores que pueden modificar la determinación, según se verá en resultados.

Alcohol etílico de 98%.
Alcohol metílico absoluto.
Cloroformo Q. P.
Bilirrubina cristalina.
Acido sulfanílico.
Nitrito de sodio.
Sulfato de amonio.
Fosfato di básico anh.
Fosfato monobásico, anh.
Acido tricloroacético.
Acido clorhídrico.
Alcohol butílico.
Celita.
Syl Gard 17.
Azul de bromo timol.

Solución de ácido sulfanílico.

1 gr. de ácido sulfanílico llevado a un lt. con HCl 0.25 N.

Solución de nitrito de sodio.

0.5 gr. de nitrito de sodio en 100 ml. de agua destilada.

Diazo reactivo.

0.3 ml. de solución de nitrito de sodio con 10.0 ml. de solución de ácido sulfanílico. Este reactivo debe ser de reciente preparación.

Diazo Blanco.

Solución 0.25 N de HCl.

Solución de fosfato al 1.43%.

14.3 gr. de fosfato dibásico en un lt. de agua destilada.

Diazo reactivo alcohólico.

Solución de ácido sulfanílico.	10.0 ml.
Solución de nitrito de sodio.	0.3 ml.
Solución de fosfatos 1.43%	20.0 ml.
Alcohol etílico.	90.0 ml.

Modificaciones:

Diazo reactivo alcohólico (a).

Solución de ácido sulfanílico.	10.0 ml.
Solución de nitrito de sodio.	0.3 ml.
Solución de fosfatos 1.43%	20.0 ml.
Alcohol etílico	50.0 ml.

Diazo blanco alcohólico (a).

Solución de ácido clorhídrico 0.25 N	10.0 ml.
Solución de fosfatos 1.43%	20.0 ml.
Alcohol etílico.	50.0 ml.

Diazo alcohólico (b).

Solución de ácido sulfanílico.	20.0 ml.
Solución de nitrito de sodio	0.06 ml.
Solución de fosfatos 1.43%	20.0 ml.
Alcohol etílico.	50.0 ml.

Acido sulfanílico "doble".

0.2 gr. de ácido sulfanílico en 100 ml. de solución 0.25 N de HCl.

Diazol alcohol doble (c).

Acido sulfanílico doble.	10.0 ml.
Solución de nitrito de sodio	0.06 ml.
Solución de fosfatos 1.43%	20.0 ml.
Alcohol etílico.	50.0 ml.

Acido tricloroacético.

Soluciones de ácido tricloroacético al 10, 20, 40, y 60%.

Amortiguador de fosfatos 0.5 M.

Solución A.

0.69 gr. de fosfato monobásico en 100 ml. de agua destilada.

Solución B.

0.71 gr. de fosfato dibásico en 100 ml. de agua destilada.

Solución amortiguadora de

fosfatos pH6

Solución A 8.7 ml.

Solución B 1.4 ml.

Sistema de solventes.

Butanol. 50.0 ml.

Agua. 45.0 ml.

Amortiguador de fosfatos pH6 5.00 ml.

Dicizo alcohol metanol doble.

Solución doble de ácido sulfanílico. 10.0 ml.

Solución de nitrito de sodio. 0.6 ml.

Solución de fosfatos 1.43%. 20.0 ml.

Alcohol metílico. 50.0 ml.

Solución saturada de sulfato de amonio.

III.—RESULTADOS.

R E S U L T A D O S

Se estudiaron algunos factores que pueden influenciar la técnica anteriormente descrita a fin de precisar que tanto afecta a la determinación las variaciones que se introducen, de modo de hacer el método lo más reproducible posible así como también para tener especial precaución en el manejo de aquellos factores que tengan una influencia más marcada.

Los factores estudiados son:

- a). Preparación de la columna.
 - b). Precipitación de proteínas.
 - c). Variaciones al eliminar el alcohol del sistema.
 - d). Variaciones en el desarrollo de color.
- α). Preparación de la columna.**

Debido a que no fué posible adquirir el Kieselgurh usado por Cole y Lathe se probaron otro tipo de materiales como son: Caolin Atapulgit, Attasorb, y celita que fue la que dió mejores resultados. Esta debe siliconizarse previamente, para lo cual se hizo uso del Syl gard 17 de Dow Chemical, que se diluye previamente en agua caliente y a éste líquido se le añade la celita, se agita, se deja reposar y se filtra. Cuando ha quedado seca se ve si flota en agua, lo que indica que la siliconización fué efectiva, después se comprueba si está neutra el azul de bromo timol, en caso contrario se lava con alcohol metílico. Se seca a 110 grados centígrados y queda lista para usarse.

Se emplearon como columnas tubos de vidrio de 8 mm. de diámetro interior con un tapón horadado en su parte inferior que se cubre con una pequeña capa de algodón, se llenan con una mezcla homogeneizada de 1.5 g. de celita con 0.8 ml. de butanol y 10 ml. de la fase acuosa del sistema de solventes. La celita se homogeniza primero con el butanol y después se le añade la fase acuosa. La columna se empaqueta por corriente de aire a una presión constante. Y al terminar ésta se coloca en la parte superior un circulito de papel filtro con objeto de que al agregar el problema, la columna no pierda su uniformidad.

Las columnas hechas con 1.5 g. de celita quedan muy pequeñas (8 cm.) y al hacer la separación del pigmento II por correr más rápido, se sale de la columna, por lo que mejor se hicieron de 2 g. Para estas se utiliza 1 ml. de fase estacionaria y 13ml. de la móvil; se obtiene así la columna de 10 cm. de longitud que permite separar más nitidamente los pigmentos.

La separación queda de la manera siguiente:

1.—La bilirrubina libre, que no corre y se queda en la parte superior de la columna. En esta determinación no se toma en cuenta la bilirrubina libre.

2.El pigmento I que se encuentra en el primer tercio.

3.—El pigmento II que se localiza en la parte inferior.

Las tres bandas son aparentes aun antes de la elución y desarrollo del color.

La columna se saca del tubo de vidrio y se divide en tres porciones que contengan cada uno un pigmento y se les extrae con 2.5 ml. de diazo doble alcohol, se centrifuga, se separa el sobrenadante, el

residuo se vuelve a extraer con 2.5 ml. de etanol, se juntan los dos extractores y se leen en Bausch & Lomb. Co. a una longitud de onda de 525 mμ.

La Preparación de la columna es uno de los factores importantes en la determinación. Se debe preparar la celita en pequeñas cantidades (alrededor de 50 g.) y aun así no todos los lotes resultan convenientes, sin que haya sido posible precisar las causas de las fallas.

b). Variaciones al precipitar proteínas.

1.—Se precipitaron las proteínas con una cantidad fija de etanol: 2.5 ml., y cantidades variables de solución saturada de sulfato de amonio de 0.09 a 0.36 ml. y se observó que aparecía turbidez en algunos tubos que impedía el correcto desarrollo de la reacción colorimétrica. Al parecer la combinación más conveniente fué aquella en la que se usó 0.18 ml. aun cuando con 0.09 y 0.27 ml. se encuentra mayor porcentaje de recuperación hecho que por lo demás no fué constante.

2.—Con una cantidad fija de etanol de 2 ml. y haciendo las mismas variaciones de sulfato de amonio se observa una turbidez en todos los tubos a excepción de los que contienen 0.18 ml. de la solución saturada de sulfato de amonio. El mayor porcentaje de recuperación para las mezclas de etanol y sulfato de amonio fué de 80%.

3.—Se estudió también la precipitación de proteínas con diferentes concentraciones de ácido tricloroacético, para este objeto se usaron 2.5 ml. de etanol y 0.18 ml. de soluciones de ácido tricloroacético al 10, 20, 40 y 60%. Solamente se observó desarrollo de color en la solución al 10% pero en menor intensidad comparada con la que se usó sulfato de c...

nio. Con las otras concentraciones se observó un color verde debido tal vez a la transformación de los pigmentos.

4.—También se hicieron experimentos variando las cantidades de alcohol de 0.5—4 ml. sin usar sulfato de amonio, se obtuvo buen desarrollo de color en los tubos que contenían 2, 2.5 y 3 ml. de alcohol.

Debido a que la mayor estabilidad de la reacción se obtiene con 0.18 ml. de sulfato de amonio y 2.5 ml. de alcohol etílico, los experimentos posteriores se hicieron con estas cantidades.

Variaciones en el tiempo de reposo.

5.—Se investigó el efecto de la luz, obscuridad y enfriamiento durante el tiempo de reposo antes de desarrollar el color. Se encontró que los pigmentos no se conservan en la luz y a lo que parece es paradójico tampoco en frío.

6.—Variación del tiempo de precipitación de proteínas. Se observó una variación mínima entre los 30 y 60 min.

c).—Variación al eliminar el alcohol del sistema.

Por la necesidad de eliminar el alcohol del sobrenadante que se obtiene al precipitar las proteínas, se empleó liofilización y evaporación al vacío. (evaporador Vollrath. Co.) Se decidió por el segundo por ser menos elaborado. Se hicieron pruebas variando la temperatura de evaporación desde 30 hasta 50 grados C. aunque por supuesto la rapidez del proceso está en función de la temperatura y del vacío, la bilirrubina se destruyó más rápidamente a temperaturas elevadas. Se comprobó que el tiempo de evaporación es importante, ya que el pigmento se daña cuando la duración del método es mayor. La tempe-

ratura escogida fué de 38 grados a la cual se efectúa la evaporación en unos cuantos min.

d). Variaciones en el desarrollo de color.

1.—Para los experimentos que se hicieron al precipitar las proteínas se usó un ml. de diazo reactivo y 5 ml. de alcohol. Se utilizó alcohol etílico y alcohol metílico, dando mejores resultados el alcohol metílico.

2.—Más tarde de acuerdo con la técnica original, se emplearon 8 ml. de diazo reactivo, mezclado previamente con alcohol etílico y fosfato al 1.43% pero con menor cantidad de etanol (50 ml.) ya que con 90 queda turbio. También se comprobó que si se agrega un ml. extra de diazo reactivo, el color se intensifica y para no tener un exceso de volumen se hizo el "diazó doble"

Como en un principio se obtuvieron mejores resultados al utilizar alcohol metílico, se hizo un diazo alcohólico con metanol, pero se observó que al agregarlo al problema éste queda turbio, por lo que se siguió trabajando con el diazo alcohol etílico "doble"

e). Por ciento de recuperación.

Para sacar el porcentaje de recuperación, se tomó como 100%, a lectura obtenida en el suero original según la técnica de Malloy Eveling (18), a la que se refirieron las lecturas obtenidas en las diferentes condiciones anteriormente descritas.

Los porcentajes obtenidos fluctúan de 50 a 80%. Estas discrepancias al parecer se deben, no tanto, a las modificaciones hechas, como al suero en sí, ya que se hicieron varias determinaciones con el mismo procedimiento, pero con diferente suero, no encontrando nunca una tendencia igual en las recuperaciones obtenidas.

Enfermo	Diagnóstico	Comprobado por	Bilirrubina		Cromatografía pig. biliares	
			Directa	Indirecta	%I	%II
F. N.	Metástasis de adenocarcinoma poco diferenciado.	Biopsia	19.8	1.62	57.5	42.5
P. L.	Cirrosis hepática.	Clínica, biopsia de hígado, laboratorio.	9.30	3.72	65.5%	34.5%
A. D.	Hepatitis por virus.	Laboratorio clínica.	2.66	0.40*	66.1	33.9
J. M.	Ca del páncreas*	Biopsia	5.0	1.37	59.4	45.1
G. C. T.	Hepatitis reactiva.	Radiografía peritoneoscopia.	12.16	0.28	62.2	37.8
R. V.	Colostitis crónica	Autopsia laboratorio.	6.52	0.85	58.0	42.0
S. C.	Hepatitis, Letiasis vesicular y coledosiana.	laboratorio.	57.40	9.20	35.7	64.3
Ma. V.	Hepatitis.	Laboratorio clínica.	3.48	0.70	04.4	35.6

* El padecimiento tenía un tiempo de evolución prolongado

IV.—DISCUSSION.

En la tabla I se presentan los datos de 8 enfermos en los que se realizó el procedimiento.

D I S C U S I O N

El desarrollo de esta técnica es de gran importancia en la clínica, ya que es prometedora en el sentido que con ella se puede obtener una diferenciación entre las ictericias hepatocelulares y las de tipo obstructivo, según se encuentre una mayor proporción de pigmento I ó II en el suero del paciente.

Se ha encontrado que en cada uno de los factores que intervienen en la reacción presentan fallas de difícil solución, por lo cual se debe tener especial cuidado durante el desarrollo de este método.

Es necesario tomar en cuenta los siguientes hechos:

Hay pérdida al precipitar proteínas, ya que se nota la presencia de color amarillo en el paquete de proteínas precipitadas, y además da una reacción positiva a la prueba de Van den Bergh. (Se trató de extraer el pigmento perdido, probando diferentes solventes, pero no se obtuvieron resultados satisfactorios con ninguno de ellos.

Por ser muy pequeña la cantidad de líquido en la que se disuelve evaporado, no llega a ser suficiente y parte del pigmento se queda adherido a las paredes del matraz donde se evapora. Esta pérdida se atribuye más bien a bilirrubina libre y no a pigmento I y II, ya que el líquido en el que se disuelven es agua saturada con butanol en la que los pigmentos I y II son bastantes solubles, y la bilirrubina se disuelve en solventes orgánicos.

Por otro lado no es posible aumentar la cantidad de líquido de disolución ya que se afectarían las condiciones de la columna.

Por todo lo anterior puede decirse aunque la técnica no es absolutamente cuantitativa, es de gran importancia ya que puede precisar cual de los dos pigmentos I y II se encuentra en mayor proporción.

En vista de que la técnica presenta dificultades para su desarrollo que son difíciles de vencer, es preciso, en vista de su importancia, seguir trabajando en este campo hasta obtener un procedimiento de más fácil manejo que esté al alcance de los laboratorios de análisis clínicos.

V.—CONCLUSIONES.

RESUMEN Y CONCLUSIONES

1.—Se estudió la técnica de separación de los pigmentos biliares (monoglucurónico y diglucurónico de bilirrubina por cromatografía en fase reversa según el método descrito por Cole, Lathe y Billing. (3, 12, 13).

2.—Se logró la separación de los pigmentos que dichos autores han descrito, y se estudiaron algunos factores que intervienen en la determinación: Precipitación de proteínas, variaciones durante la evaporación, durante la preparación de la columna, y variaciones durante el desarrollo del color.

3.—Muchos de estos factores afectan de manera importante, con pequeñas variaciones que no son fáciles de controlar por lo que hay que ajustarse estrictamente al método descrito.

VI.—BIBLIOGRAFIA.

VI.—BIBLIOGRAFIA.

BIBLIOGRAFIA

- 1.—HAROLD GOMEZ CASSIDY.—Fundamentals of Chromatography.
a) vol. X págs. 107-124, 7, 75.
b) vol. VII págs. 297-9.
- 2.—HOWARD Y MARTIN.—J. Biol. Chem., 46:532 (1950).
- 3.—COLE, P. G. Y LATHE, G. H.—J. Clin. Path. 6:96 (1953).
- 4.—LEMBERG, R.—Reve Pure Appl. Chem., 6:1, (1956).
- 5.—MANN T. C., SHEARD, C. BOLLMAN.—Am. J. Physiol., 76:306 (1926)
- 6.—TALFANT, E.—Nature London. 178:312 (1956).
- 7.—SCHACHTER, D.—Science. 126:507 (1957).
- 8.—HANS POPPER Y FENTON SHAFFNER.—Liver Structure and Function The Blakinton Division: 70-79 (1957).
- 9.—HAWK, OSER. SUMMERSON.—Química fisiológica Práctica trad.: J. Sáiz Astolfi. Editorial Americana.—México 1949.
- 10.—BILLING B. H. Y LATHE G. H.—Am. J. Med. 24: 111 (1959)
- 11.—COLE, P. G. Y LATHE, G. H.—J. Biol. Chem., 56. XXX (1954).
- 12.—BILLING, B. H.—J. Clin. Path. 8: 126 (1955).
- 13.—BILLING, B. H.—J. Clin. Path. 8: 130 (1955).
- 13.—SCHMID, R.—Science 124: 6 (1956).
- 15.—COLE, P. G., LATHE, G. H. Y BILLING, B. H.—J. Biol. Chem. 57: 514, (1954).
- 16.—BILLING, B. H., LATHE G. H.—J. Biol. Chem. 65: 774, (1957)
- 17.—HUGH, R., BUTT, M. D. Moderator, Gastroenterology 36: 161 (1959).
- 18.—MALLOY Y EVELYN.—J. Biol. Chem. 119: 481 (1937).