

UN MÈTODE SENZILL PER A LA DETERMINACIÓ QUANTITATIVA DEL GLUCÒGEN EN ELS TEIXITS

per
A. PI SUÑER

En els nostres experiments sobre sensibilitat tròfica necessitàvem un mètode que còmodament i segurament ens permetés mesurar el glucogen contingut en el fetge.

El procediment de Pflüger (1), el més generalment utilitzat, dóna resultats excel·lents, però és més llarg, complicat i costós que el nostre. Consisteix, com és sabut, en digerir el teixit hepàtic pel lleixiu de potassa a 60 per 100 i en precipitar el glucogen per l'alcohol fort.

Posteriorment Bierry i Gruzewska (2) han recomanat una tècnica més complicada: tractament per la potassa a 35 per 100 a 120° durant 30 minuts, neutralització pel clorhídric, precipitació dels proteics mitjançant el nitrat mercúric, hidrolisi pel HCl a 120° durant mitja hora i determinació de la quantitat de glucosa resultant pel procediment de Bertrand.

Altres medis de separació dels proteics hepàtics inclouent-hi el procediment de Brücke i Kulz (3), no són tampoc senzills ni potser prou segurs.

(1) E. PFLÜGER. — *Das Glycogen*. 2.^a ed. pàg. 104. 1905, y també: *Archiv f. d. ges. Phys.* CXIV 246. 1906.

(2) BIERRY I GRUZEWSKA. — *C. R. de l'Acad. de Scien.* CLV, 1559, 1912.

(3) E. PFLÜGER. — *Archiv f. die gesam. Phys.* CIII, 169, 1904.

Nosaltres havem arribat a un procediment d'una simplicitat extrema i que ens ha donat els millors serveis: la coccio del fetge ben esmicolat en solucio acètica al terç per cent i tractament consecutiu per alcohol de 96, segons Pflüger. El tractament pel reactiu de Brücke (solucio d'iodur mercúric i iodur potàssic) recomanant encara per Abderhalden com a coagulant dels proteics, és, al nostre entendre, del tot superflu.

Hem reglat la tècnica com segueix: 50 cc. d'àcid acètic en aigua destil·lada a 0'33 per 100 a la temperatura gairebé d'ebullicio, es tenen tarats dins un Erlenmeyer damunt d'una balança. Es treu de l'animal un tros de fetge de 5 a 10 grams — per l'hàbit s'arriba aviat a conèixer les dimensions, — es pica ràpidament amb la mitja lluna sobre el tallador i s'incorpora a la solucio que no deu haver-se refredat (que ha d'estar molt calenta, ben per damunt de la temperatura d'inactivacio de les diastases i també de coagulacio dels proteics). Es pesa el fetge incorporat. Apuntat que és el pes — la pesada ha d'ésser feta curosament perquè és la dada que després ens donarà la proporció per cent, — es fa que s'iniciï l'ebullicio de la solucio acètica sobre flama nua i tot seguit es fica l'Erlenmeyer en un bany-maria prèviament disposat i ja en ebullicio. Es deixa en el bany un quart d'hora. Passat que és aquest, es decanta i es completa la trituracio del fetge en el morter amb poc líquid i pols de vidre. El fetge ha de quedar fet una pasta fina; s'hi torna a agregar l'aigua, conservada calenta, i altra vegada va tot al bany-maria durant una hora, assegurant-se al final de que ha desaparegut tota olor d'àcid acètic, cosa que, per l'ebullicio, succeeix molt aviat.

A la temperatura del laboratori es deixa macerar per vint-i-quatre hores, deixant el tot per un temps, si és possible, en la màquina agitadora. Després es separa el

líquid per filtració (que es pot ajudar amb la trompa) i es prova si rentant amb nova aigua, es produeix precipitat en l'aigua del lavatge tractant-la per alcohol i si dóna, a més, reacció positiva amb l'iode. En general, l'aigua del primer lavatge ja no demostra la presència de glucogen, però, per assegurar-se que no escapi res, malgrat ésser negatiu el resultat, es renta damunt del filtre amb un volum meitat del del líquid recollit. I així fins a esgotar el glucogen del teixit.

La solució aquosa aconseguida per la filtració es tracta per doble volum d'alcohol a 96° i es deixa 24 hores, o bé es precipita la depositació per centrifugació. Es renta el precipitat obtingut per l'alcohol i l'èter i es mesura el glucogen, ja sigui per pesada, després de dessecació — el millor és practicar diverses pesades a intervals regulars, guardant el glucogen en l'estufa a 55° i amb sulfúric fins i tant que s'hagi estabilitzat el pes, dessecació completa, — ja sigui per polarimetria o bé per hidrolisi mitjançant el tractament pel ClH, de manera que la solució de glucogen en contingui un 2'2 per 100. Escalfant la solució àcida al bany-maria per tres hores i deixant refredar després, s'afegeix amb una bureta la quantitat de lleixiu de potassa necessari per alcalinitzar lleugerament. S'investiga ara la proporció de glucosa per algun dels mètodes corrents: Pflüger, Benedict, Bertrand, Carrasco.

La maceració en la solució acètica s'emporta el glucogen i res entre els cossos orgànics és més orgànic que el glucogen, després que els proteics han estat fermament coagulats per l'ebullició en àcid. D'altra banda, l'acètic no hidrolitza el glucogen perquè, ultra ésser un àcid de poca dissociació electrolítica, desapareix molt aviat — essent volàtil — per destil·lació, a conseqüència de l'ebullició prolongada. Mesures comparades de la proporció de glucogen en una solució abans i després de bullir-lo en la

solució acètica per nosaltres empleada i en les condicions del mètode nostre, no demostren que hi hagi hidrolisi.

En el líquid on es dissol el glucogen obtingut després dels lavatges amb alcohol i èter no és possible revelar-li la presència d'albúmines: quedaren en el teixit coagulat, i també en l'alcohol de precipitació alguns amin-àcids, demostrables per certes reaccions colorides, tals com el Millon. Del teixit de fetge, en canvi, ja hem dit que ens n'havem emportat tot el glucogen per tal que s'hagin repetit els lavatges fins a extracció completa.

Determinacions comparades en el mateix fetge servint-nos del nostre mètode i del de Pflüger ens han donat resultats iguals.

En els nostres experiments sobre la descàrrega del glucogen pel fetge mitjançant distints mecanismes, especialment per la lligadura de l'aorta, hem obtingut resultats satisfactoris.

Remercio coralment el meu intern Sr. Gómez Bosch per la seva intel·ligent ajuda en aquests treballs.

Laboratori de Fisiologia de la Facultat de Medicina.

NOTA ADDICIONAL. — Havem assajat una major simplificació del mètode amb resultats que ens semblen favorables. Insistirem encara perquè això no és mes que una avençada.

Es prou maceració del fetge en l'aigua acètica calenta la de dues hores. Demés, separem ràpidament el teixit hepàtic del líquid de maceració per centrifugació. Pro-

cedim al rentat damunt del filtre al vuit i no precipitem el glucògen. Directament se incorpora la necessària quantitat de clorhídric — que resulti al 2,2 % en la barreja total — i procedim a la hidrolisi.

Aquesta pot obtenir-se al bany maria durant tres hores o a l'autoclavi a 120° durant 30 minuts. Es determina la quantitat de glucosa resultant, pel Benedict, 100 gr. de glucosa corresponen a 0,927 de glucògen.