

NOVA SIMPLIFICACIÓ DE LA TÈCNICA DE PI SUÑER PER LA DETERMINACIÓ DEL GLUCOGEN EN ELS TEIXITS

per

A. PI SUÑER

R. CARRASCO FORMIGUERA

L'experiència adquirida amb l'ús del mètode per a la determinació quantitativa del glucogen en els teixits, que un de nosaltres (1) va descriure l'any 1918, ens ha conduït a introduir-hi algunes modificacions que el fan encara més senzill del que ja era, restant igualment precís.

La tècnica, tal com la practiquem actualment, és la següent: es posen 30 c. c. d'aigua destil·lada dins un matràs de boca ampla d'uns 150 c. c. que es posa al bany-maria. Es treu de l'animal un tros de fetge de 5 a 10 gr., es tritura ràpidament amb la mitja lluna o altre aparell triturador; es pesa acuradament amb una balança que apreciï bé 0,05 gr., i es posa dins el matràs que està al bany-maria; s'agita de tant en tant amb una vareta de vidre o bé sacsejant el matràs, i al cap d'un quart, aproximadament, es decanta incompletament el líquid, recollint-lo dins d'un matràs aforat de 100 c. c.; se'n decanta

1

(1) A. PI SUÑER. — Un mètode senzill per la determinació de glucogen en els teixits. TREBALLS DE LA SOCIETAT DE BIOLOGIA, VI 43-47, 1918.

la quantitat que bonament pot separar-se (sense que segueixin partícules de teixit), i es buida tot el que queda al matràs (fragments de teixit i una certa quantitat de líquid) dins un morter ben net i sec; s'hi afegeixen uns cinc grams de sorra fina rentada i es tritura amb la mà de morter fins a obtenir una pasta fina; aquesta pasta es torna a posar dins el mateix matràs, rentant el morter tres vegades amb aigua destil·lada (50 c. c. entre les tres rentades); la reincorporació del teixit al matràs cal que sigui quantitativa; es deixa el matràs al bany-maria durant mitja hora, agitant de tant en tant; passat aquest temps, el contingut del matràs es passa a tubs de centrifugador i es centrifuga enèrgicament durant cinc minuts; mentrestant, al matràs que s'ha buidat, on queden sempre algunes miques de teixit i sorra, s'hi posen 20 c. c. d'aigua destil·lada que es fan escalfar al bany-maria; un cop terminada la centrifugació, s'aspira el líquid, i se l'ajunta al líquid recollit amb la decantació anterior; de seguida es treu del bany-maria el matràs que conté els 20 c. c. d'aigua, s'agita de manera que aquesta aigua renti les parets del matràs, i, després d'assegurar-se que la temperatura de l'aigua, tot i essent elevada, no ho és prou per a trencar els tubs del centrifugador, s'afegeix aquesta aigua al sediment que ha quedat de la centrifugació; s'agita ben bé amb una vareta de vidre i es centrifuga novament durant cinc minuts, per a equilibrar el pes dels tubs afegim sorra fina al que pesa menys); s'aspira el líquid i s'incorpora al recollit abans, fent tot junt una mica menys de 100 c. c.; s'hi afegeix 0,5 c. c. d'àcid acètic cristal·litzable i es completa amb aigua destil·lada fins a 100 c...c.; aquest líquid conté tot el glucogen del tros de fetge que s'ha pres diluït en 100 c. c. de líquid; amb el mateix matràs aforat es posa al bany-maria, durant tres minuts, amb la qual cosa es precipiten les

substàncies protèiques que encara quedaven dissoltes; es filtra, es deixa o es fa refredar fins a la temperatura del laboratori, i del filtrat se'n prenen llavors exactament 80 c. c., que es posen dins d'un matràs aforat de 100 c. c.; s'hi afegeixen 5 c. c. d'àcid clorhídric concentrat (22° B.) i es completa fins a 100 c. c.; llavors es posa aquest líquid dins un matràs d'uns 150 c. c., s'hi posa un refrigerant de reflexe i es porta al bany-maria, on es deixa durant tres hores; passat aquest temps, es treu del bany-maria, es deixa o es fa refredar, es prenen exactament 50 c. c. del líquid fret i s'hi afegeixen, poc a poc, exactament, 40 c. c. de solució saturada de carbonat sòdic; a la barreja resultant s'hi té exactament el 40 per cent del glucogen del tros de fetge que s'ha pres, convertit en glucosa i dissolt en un volum de 80 c. c., dissolució equivalent a la del 50 per 100 del glucogen en 100 c. c.; es fa la dosificació de la glucosa continguda en aquesta solució per algun mètode exacte; el tant per cent obtingut per a aquest líquid, multiplicat per 200, ens dóna la quantitat de glucogen continguda en el tros de fetge que s'ha pres expressada en glucosa, i, coneguda aquesta xifra, del pes d'aquest tros de fetge se'n dedueix fàcilment el tant per cent de glucogen expressat en glucosa del fetge examinat; la xifra de glucosa, multiplicada per 0,927, dóna la xifra de glucogen.

Aquest procés, que en conjunt dura menys de cinc hores, pot ésser interromput les hores que convingui (sempre menys de vint-i-quatre hores per cada interrupció) en els moments següents: Primer, després que el teixit triturat amb sorra, fins a convertir-se en pasta, ha estat mitja hora en maceració al bany-maria i abans de la 1.^a centrifugació. Segon, després de la 2.^a centrifugació, quan s'ha incorporat la darrera porció de líquid a les dues porcions procedents de la decantació i la 1.^a centrifugació.

i abans d'afegir-hi l'àcid acètic. Tercer, després de filtrar i abans d'afegir l'àcid clorhídric. Quart, després de les tres hores d'hidròlisi i abans d'afegir el carbonat sòdic.

Amb aquesta tècnica obtenim resultats constants i absolutament coincidents amb els de la tècnica Pi Suñer primitiva i amb els del mètode de Pflüger; aquesta coincidència l'hem comprovada amb nombroses determinacions de control, dels resultats de les quals són exemples les següents xifres:

Primer. Valors obtingudes pel mètode nou amb dos fragments pròxims de fetge presos simultàniament.

Primer fragment	4,75 per 100
Segon fragment	4,71 per 100

Segon. Valors obtingudes amb dos fragments pròxims de fetge presos simultàniament, i examinats, l'un, pel mètode antic i l'altre pel mètode nou.

Primer fragment (mètode antic)	3,28 per 100
Segon fragment (mètode nou)	3,30 per 100

Tercer. Valors obtingudes amb dos fragments pròxims de fetge presos simultàniament, examinats, l'un, pel mètode nostre (nou) i l'altre pel mètode de Pflüger.

Primer fragment (mètode nostre (nou)	5,30 per 100
Segon fragment (mètode de Pflüger)	5,29 per 100

La tècnica que descobrim ofereix sobre la de Pflüger els avantatges d'ésser molt més curta, comportar menys manipulacions exposades a produir errors per pèrdua de

substància (pèrdua, per dir-ho així, mecànica i pèrdua química per glucogenòlisi) i ésser moltíssim més econòmica (estalvi de la potassa càustica i de l'alcohol). Té nomès el desavantatge d'amidar junt amb el glucogen els hidrats de carbó de molècula més senzilla que hi hagi al teixit. Això, en la immensa majoria dels casos, no és cap inconvenient: quan ho sigui, a partir del moment en què s'ha filtrat la solució de glucogen, es procedeix segons la tècnica antiga.

Si, en lloc de treballar-se amb fetge, es treballa amb un altre teixit més pobre en glucogen, convé pendre major quantitat de teixit per a la mateixa quantitat d'aigua.

Laboratori de Fisiologia, Facultat de Medicina.