

Instituto de Fisiología
Facultad de Medicina de Barcelona
Prof. S. Vidal Sivilla

Método de separación de los pigmentos biliares del suero por cromatografía en capa fina sobre poliamida *

por
R. Segura Cardona

(Recibido para publicar el 25 de septiembre de 1965)

Es conocida de tiempo (1) la presencia en el plasma de dos tipos de bilirrubina: uno de ellos reacciona directamente con el ácido sulfanílico diazotado, mientras que el otro no forma el azopigmento derivado, sino después de la adición de alcohol. Al primer tipo se le conoce como bilirrubina de reacción directa, y al segundo como bilirrubina de reacción indirecta.

Mediante cromatografía en columna y con el empleo de una fase acuosa adecuada, COLE y col. (3) han demostrado que el pigmento de la diazorreacción directa está constituido por dos subfracciones. Los dos componentes de la bilirrubina llamada directa, sometidos a análisis químico, presentan distinta composición, y corresponden, según dichos autores, uno al monoglucurónido de bilirrubina y el otro al derivado diglucurónido.

Las recientes adquisiciones sobre la constitución de la bilirrubina y de sus conjugados se debe en gran parte a las investigaciones de tipo cromatográfico de los pigmentos biliares extraídos del plas-

ma o de la bilis. El presente estudio aporta un método cromatográfico simple para el fraccionamiento de los pigmentos biliares del plasma y la confirmación de que, además de las tres fracciones detectadas por COLE y cols., se encuentran en el plasma humano otros conjugados o formas de bilirrubina circulante.

Material y métodos

Las determinaciones analíticas fueron practicadas en muestras de sueros obtenidos de pacientes afectos de ictericia hemolítica en unos casos y de ictericia obstructiva en otros.

* Trabajo presentado en septiembre de 1963 para tomar parte en las oposiciones a las Cátedras de Fisiología de las Facultades de Medicina de Granada y Cádiz y comunicado en marzo de 1964 a la primera Reunión de la Federación of European Biochemical Societies (1st. Meeting Abstracts, A 122, pág. 94, London, 1964).

Como preparado control de bilirrubina se utilizó una disolución de bilirrubina comercial (Mann Research Laboratories, Inc.).

EXTRACCIÓN DE LOS PIGMENTOS

A 1 ml de suero o plasma se añade gota a gota y agitando 1 ml de n-Propanol. Se agita durante unos minutos, se deja reposar al abrigo de la luz durante dos horas y el precipitado se elimina mediante centrifugación. El sobrenadante se guarda a 2-4° C durante 24 horas y se centrifuga nuevamente. Se desecha la pequeña cantidad de sedimento; la fracción soluble, después de filtrada a través de papel Schleicher & Schül n.º 5893, es utilizada para el análisis cromatográfico.

CROMATOGRAFÍA

7 grs de Poliamida en polvo (POLYAMID WOELM zur Dünschichtchromatographie) se suspenden en 45 ml de Metanol y se reparten por medio del extensor de Stahl sobre 5 placas de 20 x 20 cm (espesor de la capa: 300 micras). Las placas se dejan secar al aire libre y pueden ser empleadas al cabo de 1 hora, aproximadamente.

Con ayuda de una pipeta adecuada (que permite medir μ l) se depositan los extractos sobre los puntos de partida del cromatograma, facilitando la evaporación del solvente por medio de una corriente de aire. En los ensayos practicados los volúmenes de los extractos depositados oscilan entre 5 y 10 μ l, equivalentes a 0.05-1 μ g de bilirrubina total valorada con el método de MALLOY y EVELYN.

Entre los numerosos sistemas solventes ensayados para desarrollar el cromatograma se muestra adecuada la mezcla: 50 ml de n-Propanol, 15 ml de n-Buta-

nol, 20 ml de Piridina, 5 ml de agua destilada.

Con objeto de conseguir un desarrollo rápido y uniforme, la cámara se mantiene saturada con el sistema solvente.

REVELADO DEL CROMATOGRAMA

I. — Con *p*-Nitroanilina diazotada

A) 0.1 grs de n-Nitroanilina se disuelven en 2 ml de ClH concentrado (36 %) y se diluyen con agua destilada hasta 100 ml.

B) 0.2 grs de Na NO₂ se disuelven en 100 ml de agua destilada.

Ambas soluciones se conservan a 2-4° centígrados y se mezclan inmediatamente antes de su uso en la proporción de 1/1.

II. — Con el ácido diazobencensulfónico

Sol. 1: 0.5 grs ácido sulfanílico, 2 ml ClH (36 %), 50 ml agua destilada.

Se calienta a 50-60° C, agitando de vez en cuando, hasta que el ácido sulfanílico esté bien disuelto. Después de enfriar a la temperatura ambiente, se completa con agua destilada hasta 100 ml.

Sol 2: 0.5 grs NaNO₂ en agua destilada hasta 100 ml.

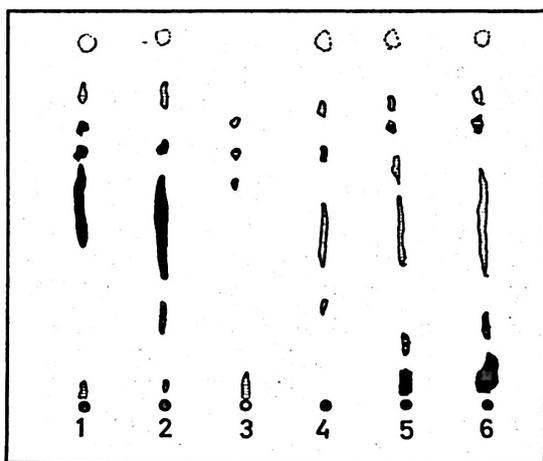
El diazorreactivo se prepara inmediatamente antes de revelar el cromatograma mezclando 10 ml de la Sol. 1 con 0.25 ml de la solución 2.

En ambos casos conviene renovar las soluciones de Nitrito sódico cada diez días. Es recomendable no pulverizar demasiada cantidad de reactivo sobre el cromatograma con objeto de evitar que se difuminen las manchas.

Resultados

En todos los casos investigados, el análisis cromatográfico mediante Poliamida en capa fina de los pigmentos biliares del

suero demostró la presencia de más de tres tipos de bilirrubina. La pluralidad de los pigmentos separados, que ya se insinúa al simple examen con luz natural se puede observar con nitidez incluso antes del revelado, si se examina el cromatograma con luz ultravioleta.



Medio de desarrollo: Isobutanol/*n*-Propanol/ H_2O /tampón fosfatos (pH 5,5; 0,2 M). 40/35/25/5 — revelado = *p*-Nitroanilina diazotada 1-5 μ l. Extracto obtenido con *p*-Propanol del suero de un paciente con ictericia hemolítica (Bilirrubina total: 10 mg %).
 2-5 μ l. Extracto obtenido con *n*-propanol/metanol (50/50) del suero analizado en 1.
 3-0,5 μ g de Bilirrubina comercial.
 4-10 μ l extracto obtenido de un suero normal.
 5-5 μ l extracto obtenido del suero de un paciente con ictericia obstructiva (Bilirrubina total: 6 mg %).
 6-10 μ l del mismo extracto que en 5.

En el revelado con los diazorreactivos todas las fracciones reaccionan inmediatamente y no se aprecian diferencias en la velocidad de formación de los diversos azopigmentos.

El azopigmento resultante de la acción de la *p*-Nitroanilina diazotada sobre la bilirrubina presenta una fluorescencia roja cuando es activado por la luz ultravioleta.

En el esquema adjunto se reproduce un cromatograma en el cual se ha practicado simultáneamente la separación de los pigmentos biliares de sueros humanos procedentes de diversos pacientes. En el esquema se ha procurado indicar la diversa intensidad de las manchas mediante rayado de densidad proporcional a la fluorescencia emitida.

En general, se observa en todos los sueros analizados la presencia de más de 3 fracciones de bilirrubina que varían cuantitativamente de una muestra a otra. En todas las muestras, a excepción de la bilirrubina comercial, se aprecia una mancha de Rf 0.92 que reacciona lentamente con la *p*-Nitroanilina y con el Diazobencensulfónico; esta mancha adquiere fluorescencia gris-azulada cuando se activa con la luz ultravioleta y parece que no está constituida por bilirrubina.

Discusión

COLE y col. (3) identificaron en el suero humano dos derivados polares de la bilirrubina que corresponden al monoglucuronato y al diglucuronato, fácilmente desdoblados por los álcalis. Además demostraron en la bilis la presencia de un componente polar y de diazo-reacción directa, pero resistente a la acción de los álcalis. SOMMERHALDER y col. (7), con una modificación de la técnica de COLE y cols., hallaron en el suero de ratas con ligadura experimental del colédoco 4 fracciones, correspondiendo una a bilirrubina libre y las otras tres a bilirrubina conjugada. Estas observaciones sugieren la existencia de otros conjugados de bilirrubina, además de los glucuronatos.

Es posible que la bilirrubina sea «detoxicada» en el hígado y en otros tejidos no sólo mediante conjugación con el ácido glucurónico, sino también con otros grupos químicos como sulfato, mercaptúrico, taurina, etcétera, ISSELBACHER y

MCCARTHY (4) demostraron, después de la inyección de S^{35} , la presencia de sulfato de bilirrubina en la bilis de las ratas, en la de gatos y en la del hombre; por otra parte, incubando cortes de hígado con sulfato amónico y bilirrubina consiguieron la formación de sulfato de bilirrubina. Por los resultados obtenidos, dichos autores sugieren además la existencia en la bilis humana de otros tipos de bilirrubina conjugada que no contienen ácido glucurónico ni sulfato.

BOURRILLON (2) demostró la existencia en la bilis de un tipo de bilirrubina unida en forma compleja a las sales biliares y JIRSA y cols. (5) consiguieron sintetizar tauro-bilirrubina que da la reacción directa con el diazobencensulfónico.

Suponiendo que los diversos tipos de bilirrubina, los conocidos y los supuestos, se diferencian entre sí en el número de grupos capaces de establecer puentes de hidrógeno, pensamos que con el empleo de la poliamida podría conseguirse la diferenciación de los distintos pigmentos biliares del suero, de la bilis y de la orina. La cromatografía sobre poliamida se diferencia de la clásica cromatografía de adsorción en el mecanismo de fijación de la sustancia. La intensidad con que un compuesto es retenido por la Poliamida depende del número y fuerza de los puentes de hidrógeno que se establecen entre ambos. Este fenómeno permite la separación o diferenciación de mezclas constituidas por sustancias físicamente muy afines y difíciles de separar por medio de los soportes ordinarios.

Aunque las fracciones separadas sobre Poliamida no han sido identificadas, los resultados obtenidos indican la presencia en el suero humano de múltiples tipos de bilirrubina.

Los diversos pigmentos biliares separados sobre la capa de Poliamida reaccionan inmediatamente con el diazo-reactivo y no es posible apreciar diferencias en la dinámica de la reacción que

permitan la distinción entre la bilirrubina directa e indirecta. En realidad, la diferencia sustancial entre las bilirrubinas de reacción directa y la bilirrubina de reacción indirecta no está bien dilucidada. Según BOURRILLON (6), la bilirrubina requiere la presencia de un activador — alcohol, cafeína — para formar el azopigmento sólo cuando está insuficientemente disuelta; si a una disolución acuosa de bilirrubina de sodio, que reacciona directamente con el ácido diazobencensulfónico, se le añade suero, la bilirrubina se comporta como el pigmento biliar de reacción indirecta presente en los sueros hemolíticos. En nuestros ensayos es posible que la poliamida facilite la reacción entre el diazo-reactivo y los diferentes tipos de bilirrubina, hasta el punto de que no sea posible distinguir modalidades de reacción. También es posible que los componentes alcohólicos del sistema empleado para el desarrollo cromatográfico actúen sobre la bilirrubina libre facilitando su reacción inmediata, lo que podría explicar el comportamiento uniforme de todas las fracciones frente a la p-Nitroanilina diazotada.

La cromatografía sobre Poliamida en capa fina de los pigmentos biliares del suero posee una gran sensibilidad. Con este método es posible la observación de las fracciones contenidas en 0.05 μg de bilirrubina total, mientras que el método propuesto por COLE y cols. no permite la observación de las tres fracciones correspondientes más que cuando el suero a analizar tiene un contenido en bilirrubina superior a 5 mg-%.

Resumen

Se describe un método simple para la separación cromatográfica sobre Poliamida en capa fina de los pigmentos biliares del suero. El método posee una gran sensibilidad permitiendo apreciar al examen con luz ultravioleta cantidades de bilirrubina diazotada inferiores a 0,1 μg .

La aplicación al estudio de sueros procedentes de enfermos con ictericia de diversa naturaleza demuestra la presencia de distintos tipos o formas de bilirrubina circulante.

Summary

Method for the separation of bile pigments of serum by thin-layer chromatography on polyamide

A method is proposed to separate bile pigments by thin-layer chromatography.

Bile pigments are extracted from serum by means of n-propanol. The extracts are subjected to chromatographic analysis using a Polyamide thin-layer (250 μ thick) as adsorbent and a mixture of alcohol, pyridine and water as a solvent system. Chromatoplates are sprayed with a solution of diazotized p-nitroaniline and the spots are examined with ultraviolet light.

Cole and allied have separated and identified three different pigments from jaundiced sera. In the samples we have examined the chromatographic analysis

on Polyamid thin-layer permits the separation of more than three pigments, all fractions reacting immediately with diazotized p-nitroaniline. When examined with ultraviolet light of 365 m μ , all spots show a reddish fluorescence.

This new method is of greater sensitivity than that of any used until now as it allows the detection of bilirubin in amounts down to 50 μ grs.

Bibliografía

- (1) BERGH, A. A. H. van der und P. MÜLLER : *Biochem. Z.*, **77**, 90, 1916.
- (2) BOURRILLON, R. : Tesis doctoral, París, 1952.
- (3) COLE, P. G., G. H. LATHE and G. H. BILLING : *Biochem. J.*, **57**, 514, 1954.
- (4) ISSELBACHER, K. J. and E. A. MCCARTHY : *J. Clinical Invest.*, **38**, 645, 1959.
- (5) JIRSA, M., B. VEGEREK and M. LEDVINA : *Nature*, **1956**, 177, 1956.
- (6) POLONOVSKI, M. et R. BOURRILLON : *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **34**, 963, 1952.
- (7) SOMMERHALDER, M., C. KUENZLE, J. R. RÜTTNER and C. MAIER : *Med. Exp.*, **7**, 196, 1962.

