

Instituto Español de Fisiología y Bioquímica  
Sección de Fisiología de Valencia  
(Prof. J. García-Blanco)

## Investigación del ácido nicotínico sanguíneo

por TOMAS ALCOBER

(Recibido para publicar el día 30 de Mayo de 1947)

Ha parecido muy conveniente ampliar el número de técnicas disponibles con la de la investigación de este factor vitamínico por la frecuente aparición de cuadros atribuidos a su falta especialmente entre los enfermos recluidos en el Manicomio. Y por otra parte se echa de menos en los trabajos en que se estudian procesos que se trata de poner en relación con falta de ácido nicotínico la valoración de éste en la sangre; los diferentes autores se limitan a hacer constar que tal investigación es excesivamente delicada, estableciendo muchas veces los buenos resultados que da el tratamiento con ácido nicotínico como criterio, lo que, como se comprende, es insuficiente. Entre nosotros LLOPIS (5) y CALVO MELENDRO (2) se han ocupado de estos trastornos psíquicos de tipo pelagroso.

En el presente trabajo se expone una técnica sencilla y sensible para la determinación del nicotínico sanguíneo, técnica por lo demás algo delicada como ocurre con casi todas las valoraciones fotométricas.

Consta de dos partes, primeramente la obtención de un filtrado incoloro parecido al que obtiene FRIEDMAN (4) y luego sobre aquél realizar la reacción KÖNIG con ortoformo como hacen MARTINECK, HIERCH y WEBSTER (6). Esta asociación es análoga a la que realizan TEERI y SHIMER (7), pero estos autores utilizan el clorhidrato de metafenileno diamina.

Con las modificaciones introducidas se simplifica la técnica y se obtienen líquidos más concentrados, con lo que el color es más evidente.

Este trabajo se ha realizado con la colaboración del Laboratorio del Manicomio Provincial de Valencia, en cuyos enfermos se han realizado las determinaciones.

*A. Digestión.*

FRIEDEMÁN (4) digiere la sangre, añadiendo a 5 c. c. otros tantos de HCl 8N, se mezclan bien y tapa con tubo de caucho hirviendo al baño de maría durante una hora.

Con objeto de que la digestión se realice con mayor facilidad y abreviar la desproteinización nosotros utilizamos un líquido que contiene ya el  $ZnSO_4$ . Su fórmula es la siguiente :

Solución I. HCl concentrado . . .	300 c. c.
$ZnSO_4 - 7 H_2O$ . . .	250 grs.
$H_2O$ c. s. p. . . . .	1.000 c. c.

De esta manera no hay necesidad de añadir ulteriormente el  $ZnSO_4$  y a la elevada concentración del 80 % como hace FRIEDEMÁN solución no siempre fácil de preparar porque requiere un  $ZnSO_4$  de calidad inmejorable que no siempre se puede tener.

Operamos como sigue. En un tubo de HAGEDORN se colocan 5 c. c. de sangre oxalatada y 10 c. c. de la solución I, se tapa con tapón de caucho y se coloca al baño maría durante una hora. Al introducir en el baño hay que destapar un momento los tubos para evitar que salten los tapones. De vez en cuando se hace girar los tubos dentro del agua hirviendo cogiéndolos por el tapón ; la mezcla se realiza mejor que con el procedimiento de FRIEDEMÁN, porque la sangre queda más diluída no formándose un contenido tan pastoso como el que resulta de la mezcla de sólo 5 c. c. de ácido con los 5 c. c. de sangre oxalatada.

*B. Desproteinización.*

Los tubos estarán fríos para lo cual, si es necesario se sumergen en agua fría. Al líquido digerido se añade poco a poco 10 c. c. de la solución II.

Esta solución es NaOH titulada de manera que dé color rosa persistente utilizando la fenolftaleína como indicador cuando se han añadido precisamente 10,1 c. c. a la mezcla de 100 c. c. de solución I y 5 c. c. de  $H_2O$ . FRIEDEMÁN la valora

frente a la mezcla preparada extemporáneamente del HCl 8N y del ZnSO<sub>4</sub> al 80 %. Con nuestro método es más cómodo utilizar una sola solución que lleve el ácido y el sulfato.

*C. Ajuste del pH.*

TEERI y SHIMER (7) que también operan sobre líquidos claros preparados según FRIEDEMÁN ajustan al pH añadiendo la solución tope al líquido desproteínizado. Al hacerlo así tropezamos con grandes dificultades porque se nos producía un precipitado que estos autores atribuyen al alcohol de la solución tope, lo cual no es cierto, porque se produce de la misma manera usando solución tope sin alcohol; para ellos no tiene gran importancia, puesto que luego añaden parafenileno diamina clorhidrato y ácido clorhídrico y éste redissuelve el precipitado, en cambio a nosotros nos obligaría a hacer una nueva centrifugación o filtración. Por ello juzgamos preferible hacer la adición antes de la separación del precipitado proteínas-hidróxido de zinc.

Añadimos al líquido neutralizado 5 c. c. de la solución tope análoga a la de MARTINECK, pero con más alcohol (para evitar luego precipitación del ortoformo).

Solución III	Acido fosfórico siruposo (1,87) . . . . .	5 c. c.
	NaOH al 15 % . . . . .	5 c. c.
	Alcohol absoluto . . . . .	250 c. c.
	Agua . . . . .	1.000 c. c.

Con los 5 c. c. de sangre se obtiene un volumen total de 30 c. c. ya ajustada la reacción, esto es, cada c. c. de sangre equivale a 6 c. c. del líquido desproteínizado, volumen muy pequeño comparado al que se obtiene con los otros métodos.

*D. Separación del precipitado.*

Se aconseja la centrifugación dos veces, pero resulta más sencillo, cómodo y rápido si se manejan series de pruebas como es lo habitual, filtrar un par de veces. En la primera filtración se comprime cuidadosamente el contenido del filtro para obtener cantidad suficiente; es necesaria una segunda filtración, el líquido queda claro con un ligero tinte amarillento como indica FRIEDEMÁN. En general hacemos la primera filtración en

el Laboratorio del Manicomio y la segunda en el de Fisiología cuando procedemos a distribuir los líquidos desproteinizados para la producción de la reacción.

El líquido filtrado tiene un pH comprendido entre 8,3 y 8,4 correspondiendo a las indicaciones de FRIEDEMANN de que no debe dar color apreciable con la fenolftaleína y rojo con el rojo fenol. Este es el pH con el cual marcha luego la reacción y es muy notable que MARTINECK HIERCH y WEBSTER lo ajusten a pH entre 6,2 y 7,05 entre cuyos valores no hemos obtenido el color de la reacción.

Como FRIEDEMANN antes de filtrar completa a 35 c. c. para obtener la cantidad de líquido equivalente a 1 c. c. de sangre hay que tomar 7 c. c., pero luego todavía hay que añadir 6 c. c. de solución tope, resulta para un c. c. 13 c. c. en lugar de los 6 del procedimiento recomendado.

#### *E. Producción del color.*

A 6 c. c. del filtrado (con reacción ya ajustada como hemos dicho anteriormente) se agregan 3 c. c. de la solución de CNBr y se espera 20 minutos agitando para que se mezcle bien.

La solución de CNBr se prepara sencillamente decolorando cuidadosamente agua de Br con solución de NaOH al 10 % (Solución IV).

Durante el contacto entre el líquido problema y el CNBr se produce un color amarillo que no hemos visto descrito en parte alguna. Este color es debido a reacción entre el ácido nicotínico y el CNBr, puesto que aparece también si se coloca la vitamina con el CNBr y una solución tope de pH 8,3 — 8,4.

Después de 20 minutos de contacto se agrega 1 c. c. de una solución de ortoformo al 0,5 % en alcohol de 96° (solución V). MARTINECK HIERCH y WEBSTER la usan al 1 %, pero al 0,5 % da un color suficientemente intenso y no hay tanto peligro de producción de precipitados.

5 minutos después de la adición del ortoformo y antes de pasados 15 realizamos la lectura con el colorímetro fotoeléctrico utilizando el filtro 445, el más adecuado entre los que disponemos.

Como dijimos anteriormente al agregar la solución tope a los líquidos desproteinizados se opera sobre volúmenes mayores, esto es, sangre más diluída, con lo cual el color es menos

intenso. Así MARTINECK HIERCH y WEBSTER toman 6 c. c. del líquido problema, 7 de la solución tope, 6 de CNBr y 1 c. c. de la de ortoformo, total 20 c. c. que no llegan a corresponder cuando el líquido problema es sangre digerida desproteïnizada, a 1 c. c. de sangre.

#### *E. Tubos en blanco.*

Los líquidos desproteïnizados tienen un ligero tinte amarillento que hay que tener en cuenta; por eso para cada determinación colocamos dos tubos con 6 c. c. de líquido desproteïnizado cada uno, en uno de los tubos se verifica la reacción como se ha dicho mientras que al otro se agregan simplemente 4 c. c. de agua, se restan los valores de estos tubos testigos de los correspondientes a los tubos de la reacción y se tiene el incremento de color producido por la reacción y reactivos.

Como los reactivos, especialmente el ortoformo, tiene algo de color hay que tomarlo en cuenta y restarlo también. Para ello en cada serie de determinaciones incluimos un tubo con 6 c. c. de agua, al que se añaden el CNBr y el ortoformo; del valor obtenido se resta el correspondiente al agua destilada, con lo cual se obtiene un pequeño resto que hay que restar del valor correspondiente a las diferencias anteriores.

Como los líquidos que se manejan tiene una gran facilidad para la producción de enturbiamientos hay que tener sumo cuidado especialmente con la limpieza del prisma del fotómetro.

#### *G. Ejemplo y cálculos.*

Solemos hacer las determinaciones por series de 5, lo que permite realizar las lecturas en el espacio de tiempo de que se dispone.

Al lado de cada nombre se encuentran dos valores, el primero corresponde al tubo en que se ha verificado la reacción, el segundo es el testigo, son lecturas en el fotómetro a las que corresponde en la columna siguiente los valores de coeficientes de absorción que da la tabla que lleva el aparato. En la columna siguiente se encuentran las diferencias entre cada par de valores de cada enfermo y en la última columna lo que queda después de haber restado lo correspondiente a la absorción de los reactivos (6 en este ejemplo).

Nombre y apellidos	Lecturas	Valores	1.ª diferencia	2.ª diferencia
María Virtudes E. . . . .	30	60	25	-6
	42	-35		
Eloísa B. . . . .	30	60	27	-6
	43	33		
Amparo C. . . . .	31	58	25	-6
	43	33		
Ana M. . . . .	32	55	23	-6
	44	32		
María G. . . . .	31,5	56	23	-6
	43	33		
Testigos reactivos . . . . .	44	32	6	(a restar de las diferencias)
	48	26		

#### H. Equivalencia con los valores de ácido nicotínico.

Se hacen pruebas análogas a las de la reacción, pero utilizando en lugar de los filtrados 5 c. c. de soluciones que contienen cantidades crecientes de vitamina (de 1 a 5 gamas) se añade un c. c. de una solución tope de pH 8,3 — 8,4 (con lo cual se tiene ya 6 c. c. como en los filtrados) y luego los reactivos en la forma ya expuesta.

De este modo se obtiene en cada caso la relación entre la cantidad de color producida y el contenido de ácido nicotínico que debe ser la misma aproximadamente para todos los tubos. En nuestros experimentos ha resultado ligeramente inferior a 5, por lo tanto dividiendo por 5 los valores correspondientes a las segundas diferencias obtendremos el contenido de ácido nicotínico de la sangre problema expresado en gamas por c. c.

En los ejemplos expuestos vienen a resultar entre 3-4 gamas por c. c. valores muy parecidos a los obtenidos por CARTER y O'BRIEN (3) con el método BANDIER HALD (1) (metol).

En general los resultados oscilaron poco, pero hemos tropezado con dos casos de pelagra muy acentuada, uno de un

enfermo demenciado, largo tiempo recluso, que dió valores muy bajos y otro recién ingresado diagnosticado de psicosis pelagrosa en el que existía un déficit alimenticio global muy acentuado en el que las dos primeras investigaciones no pudieron revelar la presencia de ácido nicotínico que apareció más tarde tras su administración en inyecciones.

#### Resumen

El autor ha puesto en práctica un método para la valoración del ácido nicotínico de la sangre, delicado pero sensible y sencillo, en el cual se obtiene un desproteínizado incoloro de pH ajustado según una modificación del procedimiento de FRIEDEMÁN y luego se produce el color utilizando la conocida reacción del bromuro de cianógeno y una amina aromática, siendo ésta el ortoformo como recomiendan MARTINECK y colaboradores. La reducción de las cantidades de líquidos necesarios para la reacción hace que el color sea muy evidente, perfectamente apreciable a simple vista; la valoración se realiza fotométricamente.

#### Summary

The author has put into practice a method for the evaluation of the nicotinic acid in the blood, delicate but sensitive, in the course of which one obtains a colourless disproteinized of pH, adjusted in accordance with a modification of the FRIEDEMÁN procedure, and the colour is then obtained by resorting to the well-known reaction of the cyanogen bromide and an aromatic amine, being this the orthoform, as MARTINECK and collaborators recommend. The reduction of the quantities of liquids evident and perfectly appreciable to the naked eye. The evaluation is done photometrically.

#### Bibliografía

1. BANDIER y HALD (1939). *Biochem. T.* 33 p. 264.
2. CALVO MELENDRÓ (1946). *Rev. Clin. Esp. T.* XX núm. 3 página 223.
3. CARTER y O'BRIEN (octubre 1945). *J. of Med.* p. 197.
4. FRIEDEMÁN (1941). *J. Biol. Chem. T.* 138 p. 785.
5. LLOPIS (1946). *Las Psicosis pelagrosas.*
6. MARTINECK, HIERCH y WEBSTER (1943) *J. of Biol. Chem. T.* 149 p. 245.
7. TEERI y SHIMER (1944). *J. of Biol. Chem. T.* 153 p. 307.

