TERCER CASO — SULFOPIRIMIDINA o SULFODIAZINA — La formación de microcristales es relativamente lenta, produciéndose primero rápidamente formas amorfas que van adoptando, sobre todo en los bordes de la preparación, el aspecto de cristales muy semejantes a los que se obtienen con el sulfathiazol pero mucho más pequeños, debiendo utilizarse a veces mayor aumento para poder apreciarlas (Microfotografía N.o 3).

El procedimiento microquímico descrito, permite a nuestro juicio investigar estas sulfamidas en algunas formas farmacéuticas que las contienen, y muy especialmente debe ser aplicado para la diferenciación de dos sulfamidados que poseen reacciones funcionales idénticas, la sulfopiridina y la sulfopirimidina y que solo difieren en su punto de fusión, (191º y 250º respectivamente) pero para lo cual es necesario proceder a su extracción y completa purificación,

lo que no está exento de pequeños inconvenientes. En cambio, las reacciones microquímicas pueden hacerse ya sea directamente o basta una simple extracción por el alcohol o acetona para eliminar el almidón empleado como excipiente en los comprimidos u otro elemento capaz de reaccionar con el IODO, evaporando luego.

En lo que respecta a su sensibilidad, hemos podido constatar que puede alcanzar a veces hasta el 0,2 por mil, en soluciones acuosas, no siendo necesario que las soluciones sean de reciente preparación.

Debemos finalmente dejar constancia de nuestro reconocimiento al Sr. Mario Santa Rosa, estudiante de Químico Industrial de la Facultad de Química y Farmacia y Jefe del Laboratorio de Microfotografía de la Facultad de Medicina a cuya gentileza y atención debemos las microfotografías adjuntas.

Montevideo, Noviembre de 1942.

Contribución al Estudio del Contralor y Determinación del Número de Unidades en las Insulinas que se Emplean con Fines Terapéuticos

JUAN CARLOS CHIARINO Químico Farmacéutico

Laboratorio Central de Química del Ministerio de Salud Pública

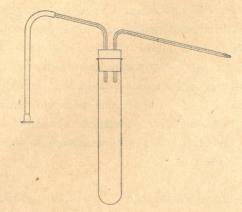
El contralor de las Insulinas que se emplean con fines terapéuticos, constituye como es notorio, una de las operaciones que por su complejidad y extensión presentan mayor número de manipulaciones de indole diversa, y delicada. A parte de que su ejecución requiere simultáneamente la intervención de varios químicos, técnicos, y de personal de servicio, adiestrado en el cuidado y manejo de animales de laboratorio.

Su técnica completa y detallada ha sido poco difundida, por lo cual nos hemos propuesto en este trabajo, contribuir a su difusión y exponerla con un poco de método y con algunos detalles del "OUTI-LLAGE" de Laboratorio que hemos empleado, así como una pequeña modificación que hemos introducido en el método para dosificar la glucosa en la sangre, según la técnica de HAGEDORN y JENSEN.

Para dar una idea del proceso de esta serie de manipulaciones, aunque sea a vuelo de pájaro, bastará observar el formulario que debe ser utilizado para hacer las anotaciones necesarias de las mismas y cuya copia adjuntamos con un solo ejemplo demostrativo, por razones de espacio, así como una nómina del material necesario para las mismas, indicándose con números, a fin de hacer las referencias respectivas en el transcurso de esta exposición, cuando ello se considere necesario.

NOMINA DEL MATERIAL NECESARIO

- Nº 1 Agujas hipodérmicas para hacer la punción en la vena marginal de la oreja del conejo.
 - 2 Hisopo con xilol. (Puede utilizarse una pinza hemostática con algodón)
 - 3 6 Palillos hemostáticos y algodón hidrófilo.
- " 4 1 Pipeta-pisseta, teniendo el pico capilar donde se recoge la sangre, un trazo que indique 0,1 cc. (fig. 1)



5 Tubos de ensayo de 20 cm. de altura por 15 mm. de diámetro, los cuales deberán adaptarse

DETERMINACION DE UNIDADES DE LA INSULINA ROTULADA

FECHA...... HORA....

Número del conejo	1
Color	Gris
Peso	2.110
Promedio del Nº de cc. de S ₂ O ₃ Na ₂ N/200 para las sol. TIPOS (T).	1.93
Nº de cc. de S₂O₃Na₂ N/200 para la Glicemia INICIAL. (Gl. I)	1.35
Diferencia de los valores en la Tabla de Gl. I y T.	1.15 0.12
	1.03
Valor de Gl. I en Glucosa.	1.03
Promedio del Nº de cc. de S ₂ O ₃ Na ₂ N/200 para las sol. TIPOS (T).	1.93
Nº de cc. de S ₂ O ₃ Na ₂ N/200 para la Glicemia Media. (Gl. M.)	1.60
Diferencia de los valores en las tablas Gl. M. y T.	0.70
	0.58
Valor de Gl. M. en Glucosa	0.58
Diferencia entre Gl. I. y Gl. M.	1.03 0.58
Descenso = D.	0.45 0.45
Descenso % ($X = 100 \times \frac{D}{Gl. I.}$)	43.68
Valor promedio de los 6 descensos de C/d INSULINA A y S.	39.80 y 40.80
Relación del valor promedio de la Insulina A y la Insulina S. $A/S = \alpha$	$\frac{39.80}{40.80} = 0.975$
α $ imes$ dilusión de la Insulina a analizar.	0.975 × 20
	19.50
Nº de unidades de la Insulina analizada	19.50

todos perfectamente al tapón de goma de la pipeta-pisseta y numerados del 1 al 12, por duplicado.

- 6 Un soporte de madera, de tres pisos, con capacidad para 36 tubos de ensayo del tipo antes descrito.
- " 7 Tubos de ensayo chicos de 8,5 cm. de altura por 1 cm. de diámetro.
- " 8 Un soporte bajo de madera para estos tubos de ensayo.
- " 9 Un soporte de metal para colocar 15 tubos de ensayo grandes (Nº 5) para llevar al B.M.
- " 10 30 embuditos de 3 cm. de diámetro por 3 cm. de altura.
- " 11 24 pipetas de 10 cc. divididas en centímetros y décimas de centímetro cúbico.
- " 12 12 pipetas de 1 o 2 cc. divididas en centésimas
- " 13 Pipetas en general de 2, 5, 10, 25 cc. contrastadas.
- " 14 4 burefas comunes de 25 cc. con lfave de vidrio.
- " 15 2 microburetas de 2 cc. divididas en centésimas de centímetro cúbico.
- " 16 Filtros de papel chicos que se adapten exactamente a los embuditos; en cantidad abundante.
- " 17 6 matraces de Erlenmeyer de 300 cc.
- " 18 2 jeringas para inyecciones, con agujas hipodérmicas, de 2 y 5 cc. respectivamente.
- " 19 1 BañoMaría grande, para introducir el soporte de metal citado en el párrafo Nº 9.
- " 20 Matraces aforados de 100, 200 cc., embudos de vidrio, cápsulas de porcelana, probetas, etc.
- " 21 Jaulas individuales para conejos.

CONSIDERACIONES GENERALES

Actualmente el contralor de las Unidades de la Insulina se efectúa siguiendo con algunas variantes la técnica indicada por el "Codex Francés" de 1937, con el aditamento de que para efectuar el dosage de glucosa en la sangre, dicho Codex no indica método alguno, quedando librada su elección a juicio del operador.

La unidad de Insulina según ha sido establecido por la Sociedad de las Naciones, es la cantidad de este polipéptido que introducido en solución, por vía subcutánea, en el organismo de un conejo, es capaz de hacer descender la glucosa normalmente existente en la sangre, de este animal (alrededor de 1.14 gramo) en un 40 %, vale decir que una glicemia normal que tuviera esa cantidad, descendería a 0,68 grs.

Un producto por consiguiente que declare en sus envases poseer 20 Unidades por cc., deberá ser diluído para proceder al ensayo de forma tal que 1 cc. posea una Unidad. Prácticamente es mejor tomar 2 cc. y llevar a 40 cc., obteniendo entonces una Unidad en 2 cc.

De una manera general de acuerdo con el número de Unidades, las diluciones deberán hacerse siguiendo esta tabla:

10	U	2	cc.	llevados	a	20	cc.
20	U	2	"	"	"	40	"
40	U	2	"	"	"	80	"
80	U	2	"	"	"	160	"

Utilizando como disolvente suero fisiológico conteniendo V gotas de ácido cresílico por litro. El descenso se constata sobre doce conejos machos o hembras que posean dos kilos más o menos, de peso natural, no artificial y en buen estado de salud, verificando primero la glicemia de cada uno de ellos en ayunas e inyectado de inmediato una Unidad de Insulina o sea 2 cc. de la solución obtenida en la forma antedicha y realizando nuevamente la glicemia 1 hora y 2½ horas después de la inyección. (Codex 1937).

Los conejos son colocados, (una vez que han sido pesados y anotados su peso y color de la piel), en jaulas individuales numeradas, permaneciendo 24 horas a dieta hydrica, por ejemplo desde las 7 de la mañana hasta las 7 de la mañana del día siguiente, en que se efectuará la operación, pudiendo tomar agua hasta antes de la primera extracción de la sangre, después de lo cual se le suprime de inmediato.

La temperatura del lugar donde se encuentran los conejos debe ser constante y superior a 18°.

Para facilitar la interpretación de esta exposición, la dividiremos en varias partes:

PRIMERA PARTE:

DETERMINACION DE UNIDADES

Una vez que se tienen los 12 conejos en condiciones, se dividen en dos lotes de seis cada uno, seis servirán para ser inyectados con la Insulina a ensayar y seis con la Insulina "Standard", se procederá luego de anotar la hora en que se hace la operación en el formulario respectivo, a la extracción de la sangre, la cual se hace en la vena marginal de la oreja, previamente y débilmente friccionada con un pequeño hisopo impregnado en xilol (Nº 2). La toma de 0,1 cc. de sangre se efectúa con una pipeta especial (fig. 1) siguiendo la técnica que será descrita en la 2.a parte de esta experiencia y que omitimos aquí a fin de tratarla con mayores detalles. Esta sangre defecada será utilizada para determinar la glicemia inicial. (Ver formulario adjunto) a la cual designaremos "Glicemia I".

De inmediato se inyectará a cada conejo de dos kilos de peso 2 cc. de solución de Insulina, conteniendo la concentración antedicha o sea una Unidad, y preparada en la forma ya expresada.

En los casos en que el peso del conejo oscile alrededor de dos kilos, variando entre 1,900 y 2,100 deberán inyectarse cantidades de solución de Insulina de acuerdo con el peso del conejo, así por ejemplo, si pesa 1,900, se le inyectará 1,9 cc., si fuera 2.100, 2,1 cc. (0,95 de Unidades ó 1,05 respectivamente) o sean cantidades proporcionales al peso de esos conejos.

Deberán ser observados los conejos, una vez inyectados, permanentemente, a los efectos de constatar si sufren convulsiones, en cuyo caso se les suministrará por vía bucal, rápidamente, un poco de jarabe simple, que debe tenerse a mano a fin de eliminar la acción

hipoglicémica, que puede ser de resultados fatales para la vida del animal. En el caso que hubiera ocurrido el fenómeno arriba citado, el animal deberá ser eliminado de las experiencias siguientes. Al término de una hora, después de la inyección de Insulina, se procede a extraer nuevamente de cada conejo una toma de sangre de 0,1 cc., que será reservada con la sustancia defecante en la forma que se establecerá más adelante, en un tubo numerado correspondiente al número del conejo.

Una hora y media después de esta operación se procede a hacer una nueva extracción de sangre en cada conejo, en forma idéntica a la antedicha, recibiendo la sangre en el mismo tubo correspondiente a la anterior extracción, agitando luego conveniente a fin de homogeneizar bien.

Se procederá luego a tomar exactamente por medio de una pipeta (Nº 13) la mitad del volumen total, o sea (6 cc. 2), el resultado analítico obtenido corresponderá al promedio de las glicemias 2º y 3º a la cual denominaremos "Glicemia M". Obtenidos esos dos datos se obtendrá por diferencia, el descenso, y el descenso por ciento se obtendrá mediante un sencillo cálculo de regla de tres. (Véase el formulario adjunto).

Una vez que se han calculado todos estos descensos porcentuales, se procede a sumar los correspondientes a los seis primeros conejos, o sea los que han recibido la Insulina a ensayar y esa suma dividida por seis dará un factor promedial "A".

Se hace lo mismo con los descensos porcentuales de los correspondientes a los otros seis conejos, los que han recibido Insulina Standard obteniéndose por tanto un nuevo factor "S"

La relación A/S, la cual debe oscilar alrededor de 1, será multiplicada por la dilución que se ba efectuado con la Insulina a dosificar, así por ejemplo: si fué de 2 en 40, o sea 1/20 será multiplicada por 20 y se obtienen así el número de Unidades de la Insulina sometida al control, por ejemplo:

A/B = 0,98. 0,98 × 20 = 19,60 Unidades Para mayor exactitud se repite toda la operación, después de 15 días, utilizando los conejos que se emplearan para la Insulina a ensayar, con la Insulina Standard y viceversa, tomando cómo resultado el promedio de los dos datos obtenidos.

SEGUNDA PARTE

DOSIFICACION DE LA GLUCOSA EN LA SANGRE (Método de Hagedorn y Jensen, Modificado)

A) SOLUCIONES NECESARIAS

SOLUCION Nº 1 — Previamente a toda operación, el operador debe poseer, preparadas con un día de antelación las soluciones reactivos que preceden y conservados en la heladera hasta tanto llegue el momento de la operación, a excepción de la soda N/10 decarbonatada, la cual puede ser preparada algunos días antes y en la forma que es corriente en los Laboratorios de Análisis para obtenerla en estas condiciones, empleando legía de soda saturada (al 66 % aproximadamente) a fin de evitar la presencia de

Carbonatos, diluída en agua destilada hervida y tomando ácido oxálico puro, como sustancia tipo para su control.

SOLUCION Nº 2 — Solución de 0,45 % de Sulfato de Zinc, puro cristalizado con 7 moléculas de H₂O, en 100 cc. de agua destilada.

SOLUCION Nº 3 — Solución de Ferricianuro de "K" N/200, preparado con un producto puro y en la forma siguiente: el peso normal de esta sal es 329 y por consiguiente la cantidad para obtener un litro de una solución N/200 será de 1.645 grs. y para 200 cc. de 0,329, pero los autores aconsejan pesar en realidad 0,330 grs.

Se pesa por tanto en la balanza de precisión grs. 0,330 de Ferricianuro de "K" y se pasa a un matraz aforado de 200 cc., se agrega 2,12 de Carbonato de Sodio cristalizado puro, pesado en un trebouchet y se completa a 200 cc. con agua destilada hervida. Aconsejamos seguir esta técnica en la forma expuesta estrictamente.

SOLUCION Nº 4 — Se pesan en un Trebouchet 10 gramos de sulfato de Zinc cristalizado y 50 gramos de Cloruro de Sodio puro, se pasan a un vaso de Bohemia y se agrega agua destilada, se lleva a ebullición hasta disolver estas sales, se enfría, se filtra si es preciso, se enrasa a un matraz de 200 cc. con agua destilada.

En el momento de la operación se agregan a estos 200 cc. puestos en un frasco, 5 gramos de loduro de Potasio puro, pesados en un Trebouchet, dado que este reactivo es alterable y suceptible de poner lodo en libertad.

SOLUCION Nº 5 — Solución de ácido acético al 3 % preparado con ácido acético cristalizado puro, exento de trazas de hierro, en agua destilada.

SOLUCION Nº 6 — Solución de Almidón soluble al 1 % preparado disolviendo 1 gramo de este producto en 3 ó 4 cc. de agua destilada, completando hasta 100 cc. con solución saturada de Cloruro de Sodio.

SOLUCION Nº 7 — Solución de Hiposulfito de Sodio N/200, preparado disolviendo 10 cc. exactamente medidos de Solución de Hiposulfito de Sodio N/10 y llevando a un matraz de 200 cc. con agua destilada hervida y enfriada.

Esta solución debe ser controlada mediante una solución exacta de Iodo N/10 pues para 1 cc. exactamente medidos de ésta, deberá emplearse 20 cc. de hiposulfito N/200.

Todas estas soluciones que sólo servirán para una sola operación, son conservadas en envases de color caramelo y tapón al esmeril, dada la alterabilidad que pueden experimentar en el transcurso de la misma o sea en 6 horas.

B) FUNDAMENTOS DE LAS REACCIONES QUIMICAS DEL DOSAGE

La reacción fundamental que sirve de base para el método de dosificación de la glucosa sanguínea y que enseguida describiremos, está fundada en las propiedades oxidantes que tiene el ácido Ferricianhídrico, el cual es capaz de poner un átomo de iodo en libertad procedente del ioduro de potasio en medio

ácido, vale decir que posee una unidad de oxidación y de oxidar también por via indirecta la glucosa, pasando el ácido ferricianhídrico a ferrocianhídrico,

(B)
$$4Fe (CN)_a H_a + 4H^+ + 4OH^- = 4F$$

 $Acido + Iones =$
 $ferricianhídrico del agua ferro$
(C) $O + Glucosa = Productos de oxidación$

C) PRUEBA EN BLANCO

De acuerdo con el mecanismo químico de la ecuación "A" se procede a efectuar una prueba en blanco. Si las soluciones han sido correctamente preparadas deberán emplearse 2 cc. de hiposulfito de Sodio N/200 o una cantidad muy próxima, siendo la diferencia alrededor de la centésima, por cuanto 2 cc. de solución de ferricianuro de potasio N/200 puestos en las condiciones que se mencionan, son capaces de reaccionar en medio acético frente a la solución de ioduro de potasio y poner el iodo correspondiente a 2 cc. de una solución N/200, las cuales deberán consumir a su vez 2 cc. de solución de hiposulfito de sodio N/200, tomando engrudo de almidón como indicador.

TECNICA DE LA PRUEBA EN BLANCO

En un tubo de ensayo (Nº 5) introducir 12 cc. de agua destilada, tomar con una pipeta divida al centésimo 2 cc. de solución de Ferricianuro de "K" N/200, llevar a B.M. 4 minutos, enfriar y agregar 3 cc. de solución (Ioduro de potasio, Sulfato de Zinc y Cloruro de Sodio) luego 2 cc. de la solución de Acido Acético al 3 %, homogeneizar bien, y aparecerá de inmediato el color característico del iodo puesto en libertad, disuelto en el exceso de ioduro de potasio.

De una micro-bureta, se deja caer la solución de hiposulfito de sodio N/200 hasta débil coloración amarilla, se agrega en este momneto III gotas de engrudo de almidón y se sigue agregando solución de dicho hiposulfito hasta completa decoloración.

D) MECANISMO QUIMICO DEL DOSAGE

La reacción principal o sea el dosage de glucosa se fundamenta en que si se pone en presencia del ferricianuro de "K" en exceso una cantidad X de glucosa en un medio alcalino, ésta es capaz de ser oxidada por aquel; bastará pues dosificar el exceso de ferricianuro, no reaccionante para conocer por diferencia la cantidad que se ha combinado con la glucosa y como una molécula de ferricianuro de "K" es capaz de oxidar media molécula de glucosa, los valores serían teóricamente los siguientes, para una solución N/200:

Fe (CN)₆K₃ N/200
$$\sqrt{\text{Glucosa}} = 0,00180$$

Pero prácticamente se toma como factor del Ferricianuro de "K" en glucosa el de 0,00177 en lugar de 0,00180, y dado que no es una reacción absoluta-

ocurriendo los hechos de acuerdo con las siguientes reacciones químicas:

mente cuantitativa, debe acudirse a las Tablas y tomar para cada caso el valor que le corresponde experimentalmente, utilizados en los cálculos del método original.

E) CALCULO DEL DOSAGE

Para proceder con mayor exactitud dadas las causas de errores que inevitablemente se producen en los micrométodos, lo que debe hacerse es una reacción en blanco tal como se indicó anteriormente pero por triplicado y hallar el promedio y luego de obtenido ese dato, se resta el valor que da la tabla para aquel, al correspondiente de la cantidad de hiposulfito, capaz de decolorar el lodo puesto en libertad por el exceso de Ferricianuro, que ya ha reaccionado con la Glucosa.

Así por ejemplo: si con la prueba a analizar se gastaron 1,32 cc. de Hiposulfito y con la prueba en blanco 1,98 cc. se obtendrán los valores siguientes: (Ver Tabla al final de este trabajo)

1,32 cc. 1,20 gr. de Glucosa por litro de sangre 1,98 cc. 0,03 gr. de Glucosa por litro de sangre

1,17 gr. de Glucosa por litro de sangre

TERCERA PARTE:

DETALLES DE LA MARCHA DE LA EXTRACCION Y MICRODOSAGE DE LA GLUCOSA EN LA SANGRE EN EL ENSAYO DE LAS INSULINAS

Esta operación, la más importante del proceso de la determinación de las unidades de Insulina, y la cual requiere el máximo de atención, limpieza y control de material, debe ser considerada para su estudio en varias etapas:

1º EXTRACCION DE LA SANGRE — Una vez friccionada la vena marginal de la oreja del conejo se hace una punción con una aguja hipodérmica, y cuando se' observa que la cantidad de sangre es suficiente para ser succionada, se hace una aspiración por medio de la pipeta en forma de pisseta, ya citada, y la cual posee como recipiente un tubo de ensayo del tamaño grande (Nº 5), ya referidos, de los cuales se deberán tener doce, colocados en un soporte grande, que se adapten todos al tapón de goma, de la pipeta.

Este dispositivo que presenta grandes ventajas para poder hacer una toma de ensayo lo más exactamente posible es el que, se sigue en casi todos los laboratorios que se dedican a este género de operaciones, debiendo dejar por nuestra parte constancia que el material que nosotros hemos utilizado ha sido confeccionado bajo nuestra dirección por la sección que para este tipo de material, posee la Cristalería del Uruguay, habiendo obtenido amplios resultados en la práctica.

2º DEFECACION - Previamente a la extracción, deben disponerse colocados en un soporte de madera bajo (Nº 8) o sea de los empleados para tubos de Wasserman, 14 o más tubos de los usados corrientemente para esa reacción (Nº 7) en los cuales se ha introducido y mezclado convenientemente 1,1 cc. de la solución de soda N/10 y 5 cc. de la solución de Sulfato de Zinc al 0,45 %, sustancias que mezcladas dân lugar a la formación de hidrato de zinc que actúa como defecante. Una vez efectuada la toma de ensayo según la técnica anterior, el operador debe aspirar de inmediato (a fin de impedir la coagulación de la sangre en el tubo capilar de la pisseta), todo el contenido del tubo pequeño conteniendo la sustancia defecante, y pasarla al tubo de gran tamaño (Nº 5). Procediendo, una vez efectuadas las 12 extracciones al calentamiento al B.M. de 4 minutos para lo cual es necesario pasar todos los tubos grandes de ensayo que contienen la mezcla bien homogeneizada de sangre y de hidrato de zinc a un so-

TUBO	A	5	cc.	SO ₄ Zn	0,45 %
"	В	5	33	"	"
**	C	5	22	"	"
"	D	5	"	"	"
"	E	5	"	"	22

Debemos hacer constar que hemos observado que en el tubo "E" se nota un principio de hemolisis y que llevado al B.M. para proseguir la defecación, el líquido filtrado es completamente turbio lo cual ha imposibilitado el dosage por cuanto en esas condiciones se obtienen cifras exageradas.

Efectuando el dosage de glucosa en los tubos A, B, C y D hemos hallado, repetidamente, que con la cantidad de soda N/10 empleada de 1,1 cc., se obtienen las cantidades mínimas de glucosa, lo cual significa a nuestro juicio que las cantidades de sustancias reductoras no fermentescibles en esas condiciones se encuentran en un mínimo de concentración.

Ahora bien determinado el pH de la mezcla defecante hecha en esa proporción hemso constatado que le corresponde al valor de 7,5, pH óptimo, en el cual se efectúa la defecación en condiciones capaces de no dejar pasar las antedichas sustancias perturbadoras del dosage, en lugar de 6,8 que es el que corresponde para la mezcla primitiva o sea la del método original.

De ahí la importancia enorme que tiene en este método de dosage, la reciente preparación de las dos soluciones que forman la mezcla defecante a fin de mantener invariable el pH.

En nuestro dosage hemos tomado la cantidad óptima de solución de soda N/10 de 1,1 cc. obteniendo siempre buenos resultados y creemos que puede sustituir con ventaja al método de defecación de Somogyi por cuanto la técnica original, no es alterada fundamentalmente, consistiendo simplemente como se

porte de metal. A esta altura debemos hacer un pa réntesis de esta relación para hacer notar las pequeñas modificaciones que hemos introducido en esta técnica y que constituyen la parte básica de nuestra exposición, prosiguiendo lucgo con el método general.

Hemos dicho anteriormente que la defecación de la sangre constituye una de las operaciones más fundamenta!es. En efecto, en general, en todos los métodos de defecación, el ideal lo constituye emplear una sustancia defecante que sea capaz de eliminar las demás sustancias extrañas que acompañan a la que se debe investigar o dosificar, dejando intacta la misma.

Los autores de este método han hecho de esta parte un estudio metódico habiendo llegado a adoptar la mezcla antedicha, sin embargo, más tarde Miguel Somogyi, ha constatado que por aquel procedimiento pasan sustancias reductoras no fermentescibles que falsean los resultados dando cantidades más altas, proponiendo una defecación en frío, no excenta también de ciertos inconvenientes, y cuya modificación básica la constituye el empleo de una sustancia defecante que posea un pH alcalino. Nosotros hemos podido constatar los resultados que más abajo se detallan modificando las cantidades de Na OH N/10, únicamente dejando constantes las cantidades de solución de sulfato de zinc al 0,45 % y 0,1 de sangre, en la forma siguiente:

1,1	cc.	NaOH N/10	0,1	sangre
191		"	0,1	"
1,2	13	***	0,1	"
1,3	27	"	0,1	3*
1,4	27	"	0,1	23

ve, en una variación a efectuarse en la toma de solución de soda N/10 siendo 1,1 cc. en lugar de 1 cc.

Prosiguiendo ahora a la descripción del método Hagedorn-Jensen, es decir una vez obtenida la defecación; sin enfriar, se filtra la mezcla sanguínea sobre papel de filtro liso previamente mojado con agua caliente (Nº 16).

Debe lavarse el contenido del filtro dos veces con 3 cc. de agua destilada hirviente, recibiendo el líquido filtrado en doce tubos numerados del 1 al 12, de gran tamaño, ya indicados (Nº 5).

3º DOSAGE — Una vez efectuada la anterior operación se agrega ahora a cada tubo 2 cc. de solución de ferricianuro de potasio N/200 exactamente medidos, (para lo cual puede emplearse una pipeta de 2 cc. graduada al centésimo o una microbureta) aparte se introducen en tres tubos de ensayo iguales a los anteriores marcados con la letra T₁ T₂ T₃ 12 cc. de agua destilada y luego 2 cc. de la antedicha solución de ferricianuro de potasio que servirán para la prueba en blanco indicada anteriormente, llevándose los 15 tubos una vez sus contenidos muy bien homogeneizados al B.M. hirviente, durante 15 minutos.

En este intervalo se prepara una cuba grande o mejor una pileta de Laboratorio llena de agua fría, terminado el calentamiento anterior, el soporte de metal conteniendo los 15 tubos se introduce en la pileta durante tres minutos, para su enfriamiento.

Una vez fríos deberá adicionarse al contenido de cada tubo 3 cc. de la solución Nº 4 (ioduro de potasio,

sulfato de zinc y cloruro de sodio) agitando luego y agregando después 3 cc. de la solución de ácido acético al 3 %, de inmediato el líquido adquiere un color amarillo, lo cual es producido por el iodo en libertad librado por el exceso de ferricianuro de potasio que no ha reaccionado frente a la glucosa. Se deja caer de una microbureta la solución de Hiposulfito de sodio N/200 hasta débil color amarillo llegado lo cual se adicionan III gotas de la solución de En-

grudo de almidón y se continúa agregando solución de hiposulfito de sodio hasta completa decoloración.

Repitiéndose esta operación en todos los tubos, de acuerdo a la tabla adjunta, se procede al cálculo ya expresado, al considerar el cálculo del dosage.

Damos a continuación un resumen que sintetiza todo lo expuesto y que debe ser tomado como guía por el Químico que tiene a su cargo la parte analítica directiva de este complejo método.

TUBOS TESTIGOS 1, 2 y 3 (Prueba en blanco) Esta operación se hace simultáneamente con la dosificación de Glucosa

Número d Orden de l Operación	a Material	Reactivos que se utilizan y operaciones
1	Tubos Nº 5	12 cc. de agua destilada
II	Pipeta Nº 13	2 cc. de solución de Fe(CN) _e K ₃ N/200
III	B.M. Nº 19	15' al B.M.
1000	Sop. de metal Nº 9	
IV	Cuba o pileta con	3' enfriar
	agua fria.	
V	Pipeta Nº 4	3 cc. de sol. de (SO ₄ Zn-NaCl-IK) AGITAR
		2 cc. de sol. ácido acético al 3 % AGITAR
VI	Microbureta Nº 15	Dejar caer solución de S ₂ O ₃ Na ₂ N/200
VII		III engrudo de almidón casi al final agregando S2O2Na2 N/200 hasta
1		completar decoloración.
VIII		Calcular por las tablas.

TUBOS PARA EL DOSAGE

Orden de la Operación		Soluciones reactivos
700 PI	Tubo Nº 7 Pipetas Nº 12 y 13	1,1 de sol de NaOH N/10 y 5 cc. de sol. de Sulfato de Zinc al 0,45 %
II	Pisseta Nº 4 con tubos Nº 5	Toma de ensayo de 0,1 de sangre y luego absorción del contenido total del tubo anterior, y pasarlo al tubo Nº 5
ш	Soporte Nº 9 y B.M. Nº 19	Llevar al B.M. 4' y enfriar luego 3' en agua fresca.
IV	Embudos Nº 10 Filtro Nº 16 y Tubos Nº 5	Filtrar y lavar dos veces con 3 cc. de agua destilada y caliente, recogiendo en tubos de ensayo Nº 5. Enfriese.
V	Pipetas Nº 13	Agregar al tubo anterior 2 cc. de solución de Fe(CN) ₆ K₃ agitar bien.
VI	Soporte Nº 9 y B.M. Nº 19	Llevar al B.M. 15' y enfriar luego en agua fresca 3'.
VII (Pri o series) (Pri o series)	Pipetas Nº 11	Agregar al contenido del tubo anterior 3 cm. de la solución de (IK-SO ₄ Zn y NaCl), luego 2 cc. de la solución de ácido acético al 3 %, homogeneizar bien.
VIII	Microbureta Nº 15	Dejar caer solución N/200 de S ₂ O ₃ Na ₂ , tomando como indicados engrudo de almidón.
IX	ompres Visit in	Cálculos.

Tal es lo que acabamos de describir, a grandes rasgos, la descripción del contralor bioquímico de la actividad farmacológica de la Insulina en solución inyectable.

Nuevamente dejamos constancia que no nos ha guiado otro propósito que el de contribuir en la medida de nuestro esfuerzo a la difusión de este complicado procedimiento de elevada trascendencia, para la especificación de las condiciones de pureza de ese producto.

En lo que respecta a las reacciones y constantes físicas que trae el Codex 1937, para determinar su ensayo, citamos los que a continuación se expresan, por cuanto a nuestro juicio son las que poseen más valor prááctico y experimental, y cuya técnica omitimos por ser conocida.

- a) Investigación de amino-ácidos
- b) Investigación de proteínas inactivas
- c) Determinación del pH
- d) Determinación del punto isoeléctrico.

TABLA DE CALCULOS

	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
0,0	3,85	3,82	3,79	3,76	3,73	3,70	3,67	3,64	3,61	3,58	0,0
0,1	3,55	3,52	3,50	3,48	3,45	3,43	3,41	3,38	3,36	3,33	0,1
0,2	3,31	3,29	3,27	3,25	3,23	3,21	3,18	3,16	3,14	3,12	0,2
0,3	3,10	3,08	3,06	3,04	3,02	3,00	2,98	2,96	2,94	2,92	0,3
0,4	2,90	2,88	2,86	2,84	2,82	2,80	2,78	2,76	2,74	2,72	0,4
0,5	2,70	2,68	2,66	2,64	2,62	2,60	2,59	2,57	2,55	2,53	0,5
0,6	2,51	2,49	2,47	2,45	2,43	2,41	2,40	2,38	2,36	2,34	0,6
0,7	2,32	2,30	2,28	2,26	2,24	2,22	2,21	2,19	2,17	2,15	0,7
0,8	2,13	2,11	2,09	2,08	2,06	2,04	2,02	2,00	1,99	1,97	0,8
0,9	1,95	1,93	1,91	1,90	1,88	1,86	1,84	1,82	1,81	1,79	0,9
1,0	1,77	1,75	1,73	1,72	1,70	1,68	1,66	1,64	1,63	1,61	1,0
1,1	1,59	1,57	1,55	1,54	1,52	1,50	1,48	1,46	1,45	1,43	1,1
1,2	1,41	1,39	1,38	1,36	1,34	1,32	1,31	1,29	1,27	1,25	1,2
1,3	1,24	1,22	1,20	1,19	1,17	1,15	1,13	1,11	1,10	1,08	1,3
1,4	1,06	1,04	1,02	1,01	0,99	0,97	0,95	0,93	0,92	0,90	1,4
1,5	0,88	0,86	0,84	0,83	0,81	0,79	0,77	0,75	0,74	0,72	1,5
1,6	0,70	0,68	0,66	0,65	0,63	0,61	0,59	0,57	0,56	0,54	1,6
1,7	0,52	0,50	0,48	0,47	0,45	0,43	0,41	0,39	0,38	0,36	1,7
1,8	0,34	0,32	0,31	0,29	0,27	0,25	0,24	0,22	0,20	0,19	1,8
1,9	0,17	0,15	0,14	0,12	0,10	0,08	0,07	0,05	0,03	0,02	1,9

Los números de la primera columna vertical representan cc. y décimas de cc.; los de la primera horizontal, centésimas de cc. En la intersección de las

BIBLIOGRAFIA

B. Housay — Apuntes de Química Biológica.

Rondoni — Química Biológica. Ultima edición.

Deulofeu y Marenzi — Química Biológica. 1940.

Lebeau et Curtois — Traité de Pharmacie Chim. 1938

Codex Francés 1937

H. C. Hagedorn y B. Norman Jensen — Microdeterminación del azúcar sanguíneo. 1922.

Goodman y Gilman — The Pharmacological Basis of Therapeutics. 1940.

Braier y Furrer — Glucosa y Sustancias Nitrogenadas

coordenadas correspondientes, se encuentra el valor en grs. de glucosa por 1.000 cc. de sangre.

de la sangre. 1937 Collip — Journal of Biol. Chem. 1923 Practical Physiological

Miguel Somogyi — Journal of Biol. Chem. Nº 86

E. Merck — Método de Análisis 1935 Federal Register — Febrero 1942

Remy Collin _ Las Hormonas. 1939

Jeane Levy — Essais et Dosages Biologiques des Sustances Medicamenteuses. 1930

Edg. Zunz — Elements de Pharmacodynamie Gén. 1930