

15. Giuseppe PRUNER. — **Micrometodo per la determinazione del Glucosio in cm^3 0,02-0,10 di sangue con solfato di cerio n/2000.**

Riassunto. — Viene descritto un micrometodo per la determinazione del glucosio in cm^3 0,02-0,10 di sangue. Esso è basato sull'ossidazione dello zucchero (μg 10-100) con ferricianuro di potassio, a caldo, in ambiente moderatamente alcalino (pH 10) e successiva titolazione del ferrocianuro che si forma con $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$ N/2000, in presenza del complesso ortofenantrolina solfato ferroso come indicatore.

Résumé. — On décrit une microméthode pour la détermination du glucose dans 0,02-0,10 cm^3 de sang. Cette méthode se base sur l'oxydation du sucre (μg 10-100) par le ferricyanure, à chaud, dans un milieu modérément alcalin (pH 10) et sur le titrage successif du ferrocyanure qui se forme avec $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$ N/2000, en présence du complexe orthophénantroline sulfate ferreux comme indicateur.

Summary. — The author describes a method for detecting glucose in 0.02-0.10 cm^3 of blood. This is based on the oxidation of the sugar (μg 10-100) with ferricyanide, heated, in moderately alkaline conditions (pH 10) and subsequent titration of the ferrocyanide which forms with $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$ N/2000, in the presence of the orthophenanthroline ferrous sulphate complex as indicator.

Zusammenfassung. — Es wird eine Mikromethode zur Blutzuckerbestimmung in 0,02-0,10 cm^3 Blut beschrieben. Sie beruht auf die Oxydation des Zuckers (10-100 μg) mit ferricyankalium in mässig alkalischer Lösung (pH 10) und anschliessender Titration des ferrocyanikalium mit $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$ N/2000; als Indikator dient der orthophenantrolin-ferrosulfat Komplex.

Dei molti metodi proposti per la determinazione del glucosio nel sangue i più diffusi sono quelli che si basano sulla riduzione di sali di rame (O. FOLIN, SHAFFER e SOMOGYI, BANG e HATLEHOEL, BENEDICT ed altri), oppure del ferricianuro potassico (HAGEDORN e JENSEN, FOLIN, VAN SLYKE, HANES, ecc.).

Essi richiedono una accurata standardizzazione per determinare il fattore empirico che consente di convertire i risultati ottenuti per via

volumetrica o colorimetrica nelle quantità di glucosio. Anche per l'eliminazione di sostanze riducenti non zuccherine, sono stati suggeriti molti metodi di deproteinizzazione: si è trovato che quello proposto da HAGEDORN e JENSEN ⁽¹⁾ basato sull'impiego del solfato di zinco, risponde pienamente allo scopo.

In un precedente lavoro ⁽²⁾ vennero proposte alcune modifiche al metodo di dosaggio di HAGEDORN e JENSEN: i buoni risultati ottenuti ci hanno spinto a continuare la ricerca nel senso di aumentare ancora la sensibilità del metodo così da poterlo applicare all'esame di quantità minime di sangue. A ciò si giunse facendo ricorso al metodo ceriometrico, mediante il quale si determina direttamente il ferrocianuro che si forma per riduzione del ferricianuro operata dal glucosio, mentre nel metodo di HAGEDORN e JENSEN si determina per via iodometrica l'eccesso di ferricianuro non ridotto nella reazione e si calcola per differenza quello ridotto.

Il procedimento che qui si propone possiede le seguenti caratteristiche:

1) Si opera con quantità di sangue molto piccole, contenenti da 10-100 μg circa di glucosio; entro questi limiti si è riscontrata una buona proporzionalità tra il glucosio presente ed il ferricianuro ridotto. Dovendo esaminare sangue (p. es. cm^3 0,10) contenente una quantità di glucosio maggiore del normale, si dovrà prelevare (dopo prove preliminari se occorre) dal liquido che si ottiene dopo la deproteinizzazione, una parte aliquota, corrispondente alle quantità di glucosio su dette.

2) La reazione avviene in ambiente a pH 10 circa, ottenuto con una soluzione di fosfati alcalini e carbonato di sodio; si raggiunge così lo scopo di rendere più blanda la reazione fra ferricianuro e zucchero e di attenuare la reazione diretta dell'alcali sullo zucchero.

3) Per la deproteinizzazione del sangue da eseguire a b.m. bollente per 3 minuti servono, come nel metodo di HAGEDORN e JENSEN, le due soluzioni A e B, la prima di solfato di zinco in soluzione acida per acido solforico, la seconda di NaOH N/10; nel presente metodo però esse vengono usate diluite: 1 parte di reattivo e 1 parte di acqua.

Ultimata la reazione (10' a b.m. bollente), si raffredda, si acidifica e si titola con solfato di cerio N/2000 in presenza di ortofenantrolina come indicatore.

⁽¹⁾ Biochem. Z., 135, 46, (1923); 137, 92 (1923).

⁽²⁾ Ann. chim. applicata, 39, 481 (1949).

PARTE SPERIMENTALE

Il materiale occorrente, vetreria, portaprovette e bagno, è quello elencato nella Nota citata (2).

PREPARAZIONE E CONTROLLO DEI REATTIVI

I. - Per la deproteinizzazione del sangue.

A - solfato di zinco ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$)	g	2,50
acido solforico N/1	cm ³	6,25
acqua distillata	q.b. a »	400
B - idrato sodico N/1	cm ³	10
acqua distillata	q.b. a »	400

La soluzione B dev'essere preparata in maniera che 2 parti neutralizzino esattamente una parte della soluzione A. Una mescolanza delle due soluzioni in detta proporzione non deve assumere colore rosso con fenoltaleina, e con un'ulteriore aggiunta di soluzione B, il liquido sovrastante chiaro non deve dare un'ulteriore precipitato di idrato di zinco.

II. - Per l'ossidazione del glucosio.

1. - Ferricianuro di potassio 3‰		
2. - Fosfato monopotassico anidro	g	0,283
Fosfato bisodico dodecaidrato	g	1,665
Acqua distillata	q.b. a cm ³	100
3. - Carbonato di sodio secco	g	0,857
Acqua distillata	q.b. a cm ³	100

III. - Per il dosaggio del glucosio.

4. - Soluzione di solfato di cerio N/100.

Si pesano circa g 2,10 di sale, si sciolgono, in un matraccio tarato da 500 cm³, in circa 200 cm³ di acqua alla quale sono stati aggiunti cm³ 14 di acido solforico concentrato e dopo completa soluzione si porta a segno.

5. - Soluzione di ferrocianuro potassico ($K_4[Fe(CN)_6]$) N/100.

Serve per la titolazione della soluzione di solfato di cerio e si prepara sciogliendo g 0,3683 esatti di sale anidro in cm^3 100 di acqua distillata.

6. - Soluzione di solfato di cerio N/2000.

Si misurano cm^3 10 di soluzione N/100 e si portano a cm^3 200 dopo aggiunta di cm^3 6 di acido solforico conc. Si controlla il titolo anche di questa soluzione più diluita, con una soluzione dello stesso titolo di $K_4Fe(CN)_6$ che si prepara sciogliendo mg 36,83 esatti in cm^3 200 di acqua distillata. Le soluzioni di ferrocianuro potassico, al contrario di quelle di solfato di cerio, sono poco stabili e devono essere preparate volta per volta. La soluzione di $Ce(SO_4)_2$ N/2000 si mantiene inalterata per una settimana se tenuta in frigorifero.

Per il controllo si misurano cm^3 8 della soluzione N/2000 di ferrocianuro potassico preparata come già detto sopra, si acidifica con 3 cm^3 di HCl (parti 80 di HCl conc. e parti 20 di H_2O) e si titola con la soluzione di $Ce(SO_4)_2$, usando come indicatore 4 gocce di ferroina.

7. - Soluzione dell'indicatore (ferroina) 0,025 M.

Si prepara sciogliendo g 0,406 di cloridrato di o-fenantrolina e g 0,174 di solfato ferroso crist. in cm^3 25 di acqua distillata. Di questa soluzione madre si preleva 1 cm^3 e si porta con acqua a cm^3 20, e si conserva in flacone contagocce.

8. - Soluzione di glucosio all'1% in soluzione d'acido benzoico 0,25%.

Si prepara, sciogliendo g 0,25 di acido benzoico a caldo in cm^3 100 di acqua. Dopo raffreddamento si filtra e vi si scioglie g 1 di glucosio tenuto per 24 ore in essiccatore sopra H_2SO_4 e si porta a cm^3 100.

Questa soluzione, diluita opportunamente, serve per il controllo del metodo.

DESCRIZIONE DEL METODO

Supponendo dover eseguire 3 glicemie facenti parte di una serie di determinazioni per il controllo dell'attività biologica dell'insulina, occorrono 4 tubetti o piccole provette: le prime tre servono per il sangue, la quarta per la prova in bianco. Mediante una buretta di 25 cm^3 , si mette 1 cm^3 della soluzione A in ciascun tubetto.

Da tre conigli trattati, con le apposite pipette capillari si prelevano

cm³ 0,05 di sangue che si fanno scolare lungo le pareti dei tubetti. Appoggiata quindi all'imboccatura delle pipette capillari la punta affilata di un tubetto di vetro applicato ad una seconda buretta da 25 cm³, si fanno scendere cm³ 2 della soluzione B attraverso le pipette, in modo da raccogliere tutto il sangue nel tubetto; si immette la stessa soluzione nel quarto tubetto, si tengono i tre tubetti contenenti il sangue per 3 minuti in un b.m. bollente, si tolgono dal bagno, si spezza il precipitato del sangue nei tubetti con altrettante bacchettine sottili di vetro, allo scopo di facilitare il deposito del coagulo e si centrifugano assieme alla prova in bianco per 2 minuti a 2000 giri.

Si versa quindi il contenuto di ogni provetta su imbutini forniti di un batuffolo di cotone bagnato e sovrapposti a 4 tubi come quelli descritti nella Nota precedente. Il contenuto dei 3 tubetti viene quindi lavato per due volte, per la maggior precisione d'analisi, la prima con 3, la seconda con 2 cm³ d'acqua, agitando ogni volta il liquido con le apposite bacchettine di vetro e centrifugando prima di versare il liquido sugli imbutini. Si raccolgono le varie frazioni del filtrato, nel complesso cm³ 8 di liquido, e si tolgono gli imbutini, senza muovere il cotone. Per la prova in bianco si ricorre ad un'unica centrifugazione, completando i cm³ 8, con l'aggiunta di 5 cm³ di acqua al filtrato delle due soluzioni A e B.

Per l'ossidazione si aggiunge ad ogni tubetto 1 cm³ di soluzione di ferricianuro potassico e 2 cm³ di soluzione tampone, preparata mescolando assieme a parti uguali le due soluzioni n. 2 e 3. I quattro tubetti, coperti con bolle di vetro del tipo Kjeldahl per evitare un'eccessiva evaporazione e montati su un sostegno metallico, si immergono in un b.m. bollente e vi si tengono per 10 minuti. Trascorso questo tempo si toglie dal b.m. il sostegno con i 4 tubetti e lo si immerge in un recipiente contenente acqua fredda, dove si lascia per 15 minuti circa. Si toglie dal bagno d'acqua, e si versa da una buretta in ogni tubo 3 cm³ di HCl (HCl conc. p. 80 e 20 p. di acqua) e si titola, dopo aggiunta di 4 gocce di ferroina, con Ce(SO₄)₂ N/2000 che si fa defluire da una microburetta.

Il contenuto di glucosio G, espresso in µg su 100 cm³ di sangue viene calcolato con la seguente formula:

$$G = \frac{Ce \cdot 19,21}{0,05} \cdot 100$$

dove Ce, rappresenta i cm³ di soluzione N/2000 di cerio adoperati corretti sottraendo quelli usati nella prova in bianco e 19,21 rappresentano i µg di glucosio che corrispondono ad 1 cm³ di cerio N/2000.

PROVE DI CONTROLLO

Una prima serie di prove di controllo è stata eseguita con la soluzione di glucosio diluita; cioè 1 cm³ di soluzione all'1% portata a 200 cm³ con acqua bidistillata. Questa soluzione dev'essere preparata giornalmente, essendo poco stabile.

I risultati ottenuti sono i seguenti:

Glucosio misurato µg	Glucosio trovato µg	Differenze	
		assolute	percentuali
100	101,0	1,0	+ 1,0
80	79,28	0,72	— 0,90
60	59,23	0,77	— 1,28
50	50,60	0,60	— 1,20
40	40,86	0,86	— 2,0
30	29,80	0,20	— 0,66
20	20,13	0,13	+ 0,65
10	9,84	0,16	— 1,60

Una seconda serie di prove è stata eseguita, aggiungendo a cm³ 0,05 e 0,02 di sangue quantitativi diversi di glucosio. Per differenza tra i due risultati ottenuti, prima e dopo l'aggiunta, si ottiene il valore del glucosio, aggiunto. I risultati, come si vede dalla seguente tabella, sono stati soddisfacenti.

Sangue impiegato cm ³	Glucosio aggiunto µg	Glucosio ritrovato µg	Differenze %
0,05	50	48,04	— 3,92
0,05	30	30,55	+ 1,83
0,02	20	20,79	+ 3,92
0,02	30	30,80	+ 2,66