

23. Giuseppe PRUNER. — Micrometodo per la determinazione del glucosio in cm³ 0,10 di sangue con iposolfito di sodio N/1000.

Riassunto. — Vengono descritte delle modifiche al metodo di Hagedorn e Jensen, atte a migliorare la precisione e velocità di esecuzione.

I risultati soddisfacenti ottenuti sono dovuti sopra tutto alla titolazione del glucosio con iposolfito di sodio N/1000, che nelle suddescritte condizioni si dimostra abbastanza stabile e permette un preciso dosaggio.

Résumé. — On décrit quelques modifications à la méthode de Hagedorn et Jensen, par lesquelles on peut améliorer la précision et la vitesse d'exécution.

Les résultats satisfaisants obtenus sont dus surtout au titrage du glucose par l'emploi du thiosulfate de sodium N/1000, qui dans les conditions prévues se présente assez stable et permet d'effectuer un dosage précis.

Summary. — Some modifications are described in the method of Hagedorn and Jensen, whereby it is possible to obtain a greater precision and rapidity of operation.

The satisfactory results obtained are due more particularly to the titration of glucose by the use of N/1000 sodium thiosulphate, which under the conditions herein described shows a sufficient stability and ensures a greater precision in carrying out this determination.

Zusammenfassung. — Es werden Abänderungen der Hagedorn und Jensenmethode beschrieben, die die Genauigkeit und Raschheit der Ausführung verbessern.

Die zufriedenstellenden Ergebnisse hängen hauptsächlich von der Anwendung von N/1000 Natriumhyposulfidlösung bei der Titration der Glucose ab, unter den genannten Verhältnissen ist diese ziemlich stabil und ermöglicht eine genaue Dosierung.

Molti sono i micrometodi che nel decorso degli anni furono proposti per la determinazione del tasso glicemico, tra i quali possono essere ricordati i seguenti, che sono i più noti: il micrometodo di Bang ⁽¹⁾; il metodo di Lewis e Benedict ⁽²⁾; il micrometodo di Folin e Wu ⁽³⁾; ed in fine quello di Hagedorn e Jensen ⁽⁴⁾.

(¹) Biochem. Z., 49, 19; 57, 300; 87, 249 (1922).

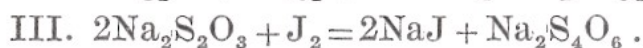
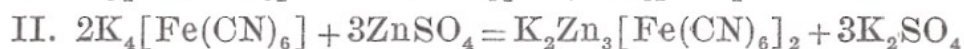
(²) J. biol. Chem., 20, 61, (1915); 34, 203, (1918).

(³) J. biol. Chem., 41, 367 (1920); 67, 357 (1926).

(⁴) Biochem. Z., 135, 46, (1923); 137, 92 (1923)

A scopi clinici e per ricerche esatte di fisiologia adottai quest'ultimo, sembrandomi il più adatto. Dopo una lunga serie di esperienze, introdussi nello stesso alcune modifiche, allo scopo di aumentarne la sensibilità e praticità di esecuzione.

Nella presente nota mi limito alla descrizione della tecnica da seguire nella determinazione del glucosio nel sangue, basata appunto sul principio utilizzato da Hagedorn e Jensen, cioè sull'impiego del ferricianuro di potassio in eccesso come ossidante del glucosio e determinazione del ferricianuro potassico residuo, non ridotto dal glucosio, secondo le seguenti reazioni



Essendo stato descritto il metodo originale di Hagedorn e Jensen in tutte le sue fasi da Rondoni ⁽⁵⁾ e Barelli ⁽⁶⁾, non credo opportuno riportarlo nei suoi particolari, e mi limito nella presente nota alla descrizione delle modifiche da me apportate, che si possono riassumere come segue:

A) Aumento della concentrazione del ferricianuro di potassio, che nel presente metodo serve tanto per il dosaggio del glucosio, come per il controllo della soluzione di iposolfito di sodio.

B) Separazione della soluzione di carbonato di sodio da quella di ferricianuro potassico, per impedire la riduzione di quest'ultima in soluzione alcalina. Con questo sistema la soluzione di ferricianuro si mantiene a lungo stabile, se preparata con acqua bidistillata, se filtrata attraverso filtro di vetro poroso e conservata in vetro scuro al riparo dalla luce.

C) Sensibilità e precisione di dosaggio vengono grandemente aumentate con l'impiego della soluzione di iposolfito di sodio N/1000 al posto di quella N/200, seguendo una tecnica speciale di dosaggio e di controllo della soluzione stessa.

D) Impiego della soluzione di ferricianuro di potassio al 3‰ per il controllo della soluzione di iposolfito di sodio N/1000, della stessa soluzione che serve anche per l'ossidazione del glucosio.

Con questo sistema si viene a compensare in parte un eventuale errore che potrebbe sorgere, causa una leggera variazione nel titolo della soluzione di ferricianuro potassico.

⁽⁵⁾ Elementi di Biochimica III edz. (1933).

⁽⁶⁾ Diagnostica e tecn. di laborat., marzo (1931).

E' della massima importanza che tutte le titolazioni siano eseguite lentamente nelle identiche condizioni di volume e concentrazione dei vari reattivi, usando sempre lo stesso numero di gocce di soluzione d'amido.

E) L'amido non viene sciolto come prescritto nel vecchio metodo in soluzione satura di cloruro di sodio, bensì in acqua distillata semplice, e ciò per poter cogliere meglio durante il dosaggio, la scomparsa del colore azzurro. L'aggiunta di 5 gocce di toluolo a 100 cm³ di soluzione serve bene a renderla più stabile.

Inoltre sono da consigliare i seguenti accorgimenti: lavaggio delle pipette capillari con la soluzione B, attraverso l'imboccatura, in modo da garantire la totale raccolta dei cm³ 0,10 di sangue, e impiego di circa g 0,20 di talco nella deproteinizzazione del sangue, allo scopo di facilitare la filtrazione, ottenendo la completa separazione del coagulo formato dalle proteine del sangue, che hanno al pari degli zuccheri un potere riducente sul ferricianuro di potassio.

PARTE SPERIMENTALE

MATERIALE OCCORRENTE

Microburetta da 5 cm³ divisa in cm³ 0,01.

Pipette capillari da cm³ 0,1 con imboccatura svasata per il prelevamento del sangue.

Pipette semplici a bolla da 1, 2 e 3 cm³.

Pipette graduate da 1, 2, 5 e 10 cm³.

Tubetti di vetro da mm 95 × 6 circa, per la deproteinizzazione del sangue.

Tubi di vetro bianco speciale di Jena o Pyrex con tappo smerigliato alt. mm 115 diam. mm 22 circa, possibilmente numerati a smeriglio.

Imbutini diam. mm 30.

Bacchette di vetro lunghe cm 16 circa, schiacciate ad una estremità a forma di dischetto.

REATTIVI E SOLUZIONI OCCORRENTI

PER LA DEPROTEIZZAZIONE DEL SANGUE

A - Solfato di zinco (ZnSO₄·7H₂O) . . . g 2,50

Acido solforico N/1 cm³ 6,25

Acqua distillata q.b. a cm³ 200

B - Idrato sodico N/1 cm³ 10, acqua . . q.b. a cm³ 200

La soluzione B dev'essere preparata in maniera che 2 parti di essa neutralizzino esattamente una parte della soluzione A.

SOLUZIONE OSSIDANTE

1. - Ferricianuro di potassio 3‰.
2. - Carbonato di sodio secco 2%.

PER IL DOSAGGIO DEL GLUCOSIO

3. - Acido acetico 3%.
4. - Ioduro di potassio 25%.
5. - Solfato di zinco g 5,60
Cloruro di sodio g 28
Acqua distillata q.b. a cm³ 100.
6. - Soluzione di iposolfito di sodio N/1000, preparata con cm³ 10 di soluzione N/10, addizionati di g 0,20 di bicarbonato di sodio e portati a cm³ 1000 con acqua distillata previamente bollita in pallone fornito di valvola di Bunsen.

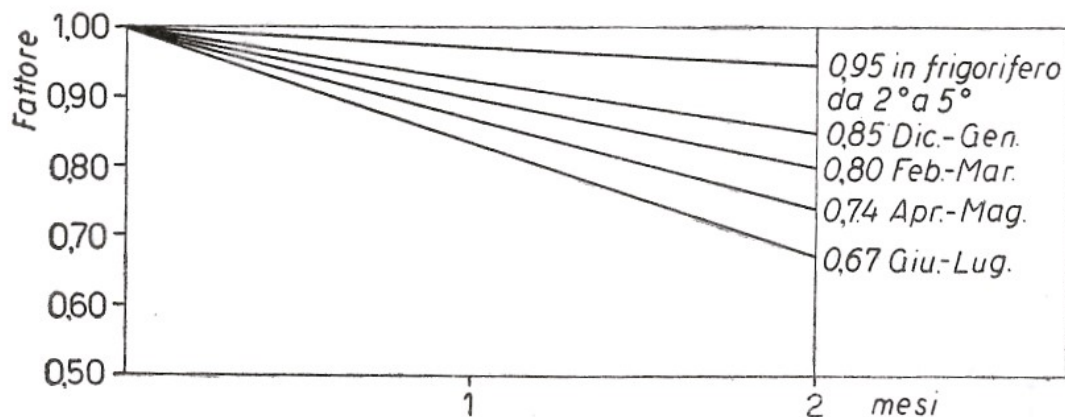


FIG. 1.

Data la instabilità della soluzione, il controllo dev'essere effettuato giornalmente, nel modo indicato nel procedimento. Dal seguente grafico, si può ricavare l'abbassamento subito dal fattore della soluzione in un periodo di due mesi, come si vede, l'ossidazione è accelerata dall'aumento della temperatura ambiente.

L'ossidazione avviene secondo le seguenti reazioni:



Soluzione di amido solubile g 0,50 a caldo in cm³ 100 di acqua. Dopo raffreddamento si aggiungono gocce 5 di toluolo, che serve a renderla più stabile.

DESCRIZIONE DEL PROCEDIMENTO

Al fine di una maggiore chiarezza, il procedimento è diviso in 5 tempi.

1° - *Deproteinizzazione del sangue.* — Supponendo di aver una glicemia da determinare, basteranno normalmente 2 provette. La prima per il sangue e la seconda per la prova in bianco. Mediante la pipetta graduata

da 1 cm³ si mettono cm³ 0,80 della soluzione A in ciascun tubetto. Prelevati cm³ 0,10 di sangue con l'apposita pipetta capillare, si fa scolare lo stesso lungo la parete del primo tubetto. Appoggiata quindi una pipetta da 2 cm³ all'imboccatura della prima, si fanno passare cm³ 1,60 della soluzione B attraverso la stessa, ciò che riesce facile con un pò di pratica, in modo da raccogliere tutto il sangue nel tubetto. Immessa la stessa soluzione nel secondo tubetto, si tengono questi per 2 minuti primi in un b. m. bollente. Si tolgono, si aggiungono circa g 0,20 di talco in polvere ad ogni tubetto e si centrifuga per 2 minuti a 2000 giri. Per evitare la rottura dei tubetti, essi vengono avvolti in carta da filtro, prima di essere introdotti negli astucci della centrifuga.

Si versa quindi il contenuto di ogni provetta sugli imbutini, forniti di un batuffolo di cotone bagnato e sovrapposti a due tubi grandi. Il contenuto dei due tubetti viene quindi lavato per due volte, la prima con 2,50, la seconda con 3 cm³ di acqua, agitando ogni volta il liquido con una bacchettina di vetro e centrifugando prima di versare il liquido sull'imbutino. Raccolte le varie frazioni del filtrato, nel complesso cm³ 8 di liquido, e tolti gli imbutini, senza muovere il cotone, si passa al secondo tempo.

2° - *Ossidazione del glucosio.* — Con due pipette da 1 cm³ si aggiunge in ogni tubo 1 cm³ di soluzione N. 1 e N. 2. Coperti i due tubi con imbutini, per evitare un'eccessiva evaporazione, si pongono in un b. m. bollente per 15', si tolgono, si raffreddano e si passa quindi al terzo tempo.

3° - *Riduzione del residuo di K₃[Fe(CN)₆].* — Dopo raffreddati i tubetti, si versano in ognuno di essi 2 cm³ della soluzione n. 3 e 3 cm³ di una soluzione, preparata poco prima in cilindro graduato da 10 cm³, con 1 cm³ di soluzione n. 4 e 9 cm³ di sol. n. 5. Si chiudono i tubi col tappo di vetro, si agita leggermente e, dopo 5' di riposo, si passa al dosaggio.

4° - *Dosaggio con iposolfito di sodio N/1000.* — Riempita con la soluzione titolata la microburetta da 5 cm³, dopo averla lavata per più volte, se dovesse contenere del liquido vecchio, si inizia la titolazione con l'aggiunta di 5 gocce di soluzione d'amido e lasciando lentamente defluire l'iposolfito di sodio nel tubo, agitando continuamente con l'apposita bacchettina. Non appena il liquido è divenuto azzurro pallido, si continua la titolazione aggiungendo goccia a goccia l'iposolfito, e si osserva la colorazione, guardando dall'alto, come si usa fare in colorimetria, il tubo tenuto sopra un fondo bianco. Con questo sistema dopo un pò di pratica, si riesce a cogliere con precisione la scomparsa della colorazione azzurra, mediante l'aggiunta di mezza goccia di iposolfito di sodio N/1000.

5° - *Controllo della soluzione di Na₂S₂O₃ N/1000.* — A questo scopo servono 2 tubi grandi. In ognuno di essi si versano 8 cm³ di acqua, 1 cm³

della soluzione N. 1 e N. 2, quindi 2 cm³ della soluzione N. 3 e 3 cm³ della soluzione combinata (N. 4 e N. 5).

Il dosaggio viene quindi effettuato nelle stesse condizioni e con la stessa tecnica seguita sopra.

CALCOLI

A tale scopo serve meglio di tutto un esempio.

Dosaggio dell'iposolfito di sodio N/1000 (Sol. N. 6).

1 cm³ di sol. K₃[Fe(CN)₆] 3‰ corrisponde a cm³ 9,113 di sol. N. 6.

Sol. N. 6 impiegata cm³ 9,168

$$9,168 : 9,113 = 1 : x$$

$$x = 0,9940 \text{ fattore delle sol. N. 6}$$

Determinazione del glucosio.

1) Glucosio nel sangue:

Sol. N. 6 impiegata cm³ 5,48

$$5,48 \cdot 0,9940 = 5,45$$

Dalla tabella seguente si ricavano i mg di K₃[Fe(CN)₆] e i mg% di glucosio corrispondenti all'iposolfito di sodio impiegato.

P. e. nel nostro caso, in corrispondenza di cm³ 5,45, si trova per interpolazione un contenuto di glucosio uguale a 0,141 mg%.

TABELLA I.

$$\frac{0,141}{- 0,014}$$

RISULTATO MG 0,127% DI GLUCOSIO NEL SANGUE.

Na ₂ S ₂ O ₃ N/1000	K ₃ Fe (CN) ₆	mg ‰ di zucchero
0,00	0,000	0,350
0,50	0,165	0,331
1,00	0,329	0,312
1,50	0,494	0,293
2,00	0,658	0,273
2,50	0,823	0,254
3,00	0,987	0,235
3,50	1,152	0,216
4,00	1,316	0,196
4,50	1,480	0,177
5,00	1,645	0,158
5,50	1,809	0,139
6,00	1,975	0,120
6,50	2,140	0,100
7,00	2,304	0,081
7,50	2,469	0,062
8,00	2,633	0,043
8,50	2,798	0,024
9,00	2,962	0,004
9,113	3,000	0,000

Da questo dato va alla fine tolta la quantità di glucosio corrispondente al potere riducente della soluzione derivante dalla prova in bianco.

2) Prova in bianco:

Sol. N. 6 impiegata cm^3 8,80

$$8,80 \cdot 0,9940 = 8,75$$

Secondo la tabella I, $8,75 \text{ cm}^3$ di iposolfito di sodio danno 0,014% di glucosio

PROVE DI CONTROLLO

Una prima serie di prove di controllo è stata eseguita su una soluzione di glucosio.

I risultati sono i seguenti:

Glucosio presente	Glucosio trovato	Differenze	
		assolute	%
mg 0,050	mg 0,0505	0,0005	+ 1
» 0,050	» 0,0520	0,0020	+ 4
» 0,100	» 0,1037	0,0037	+ 3,7
» 0,200	» 0,1990	0,0010	— 0,5
» 0,350	» 0,3410	0,0090	— 2,57

Una seconda serie di prove è stata eseguita, aggiungendo a cm^3 0,10 di sangue quantitativi crescenti di glucosio. Per differenza tra i due dati ottenuti, prima e dopo l'aggiunta, si ottiene il valore rappresentante il glucosio aggiunto. I risultati, come si vede dalla seguente tabella, sono stati soddisfacenti.

Glucosio aggiunto	Glucosio ritrovato	Differenze	
		assolute	%
mg 0,050	mg 0,0520	0,0020	+ 4
» 0,050	» 0,0490	0,0010	— 2
» 0,100	» 0,1001	0,0001	+ 0,10
» 0,100	» 0,0942	0,0058	— 5,80
» 0,150	» 0,1445	0,0055	— 3,66

Roma. — Istituto Superiore di Sanità - Laboratorio di biologia. 15 dicembre 1948.