

ATTI
DELLA
REALE ACCADEMIA DEI LINCEI

ANNO CCCXII.

1915

SERIE QUINTA

RENDICONTI

Classe di scienze fisiche, matematiche e naturali.

VOLUME XXIV.

2° SEMESTRE.



ROMA

TIPOGRAFIA DELLA R. ACCADEMIA DEI LINCEI

PROPRIETÀ DEL DOTT. PIO BEFANI

1915

Fisiologia. — *Microtitolazione alla formaldeide, e sue applicazioni in fisiologia*. I. *Generalità sulla microtitolazione alla formaldeide* (1). Nota del dott. A. CLEMENTI, presentata dal Socio L. LUCIANI (2).

I.

Generalità sulla microtitolazione alla formaldeide.

TEORIA.

La *microchimica* ha per scopo di trasformare in micrometodi, i metodi dell'analisi quantitativa, introducendo nella tecnica dei metodi stessi modificazioni tali, che ne sia resa possibile l'applicazione anche quando la quantità della sostanza da esaminare (solida o liquida) sia estremamente piccola (3).

Se si consideri quale grande difficoltà, anzi quale ostacolo spesso insuperabile, rappresenta nella ricerca biologica la scarsità del materiale d'indagine, è facile comprendere di quanto ausilio sia questa nuovissima branca della chimica, applicata alla fisiologia e alla biologia. Basterà in proposito ricordare due micrometodi entrati recentemente nella pratica fisiologica: la microanalisi elementare delle sostanze organiche secondo Pregl (4), e la microdeterminazione del glicosio nel sangue secondo Bang (5). Il Pregl ha trasformato gli ordinari apparecchi, usati nella analisi elementare delle sostanze organiche, in microapparecchi (ricordo ad es.: il microazotometro, la microbilancia, la quale permette di fare delle pesate con l'approssimazione di più o meno un millesimo di milligrammo), mercè l'uso dei quali si può eseguire l'analisi elementare di una sostanza organica adoperando anche solo 10 milligrammi della sostanza stessa; senza l'uso di questo micrometodo, sarebbe stato impossibile di condurre a termine ricerche importantissime come quelle eseguite recentemente da Tamura (6) nel Laboratorio di Kossel, sulla composizione chimica del protoplasma dei batterii, e quelle di Kossel

(1) Lavoro eseguito nell'Istituto di chimica fisiologica della R. Università di Roma.

(2) Pervenuta all'Accademia il 2 luglio 1915.

(3) F. Emich, *Lehrbuch der Mikrochemie*. Wiesbaden, Bergmann, 1911.

(4) Pregl, *Die Mikroelementaranalyse*. Handbuch der biochemisch. Arbeitsmethode.

(5) Bang, *Der Blutzucker*, pag. 20. *Eine Mikromethode zur Bestimmung des Blutzuckers* (Wiesbaden, Bergmann, 1913). — *Ein Verfahren zur Mikrobestimmung von Blutbestandteilen*. Biochemische Zeitschrift, 49, 1913.

(6) Tamura, *Zur Chemie der Bakterien* (I, II, III, IV Mittheilung). Zeitschr. f. physiologische Chemie, Bd. 87 e 88 (1913, 1914).

e Edlbacher ⁽¹⁾ su alcuni prodotti di scissione di due protamine, la percina e la tinuina.

Bang ha elaborato, apportando modificazioni ingegnose, nella tecnica per raccogliere il sangue e nella concentrazione delle soluzioni un micrometodo per la determinazione del glicosio nel sangue; servendosi di questo micrometodo è stato possibile al Bang stesso di eseguire assai interessanti ricerche ad es. sul contenuto in glicosio del sangue di vertebrati e invertebrati (rettili, anfibi, insetti, cefalopodi ecc.) di piccole dimensioni.

La *trasformazione in micrometodo del metodo di Schiff-Sørensen* ⁽²⁾ della titolazione al formolo degli aminoacidi è l'oggetto delle presenti ricerche. A risolvere tale problema sono stato indotto non solo dalla importanza, che lo studio degli aminoacidi ha acquistato in fisiologia, ma anche dal sempre crescente numero di applicazioni fisiologiche del metodo di Schiff-Sørensen ⁽³⁾. Ricorderò, ad esempio, che mediante l'applicazione di questo metodo mi è riuscito possibile di elaborare un nuovo procedimento per la determinazione dell'azione dell'arginasi, che mi ha permesso di condurre a termine la ricerca sistematica dell'arginasi nel fegato e in svariati organi di tutte le classi di vertebrati, dalla quale è scaturita la dimostrazione biologica della importanza fisiologica dell'arginasi ⁽⁴⁾ nell'organismo; e mi è riuscito possibile di elaborare un procedimento per la determinazione dell'azione dei fermenti peptidolitici, che permette di portare la dimostrazione quantitativa assoluta del principio della azione asimmetrica dei fermenti peptidolitici sui polipeptidi racemici ⁽⁵⁾.

Dalla trasformazione del metodo di Schiff-Sørensen in micrometodo è lecito di sperare quindi le più feconde applicazioni non solo nelle ricerche sul contenuto in aminoacidi del sangue o di altri liquidi dell'organismo, ma anche nelle ricerche sui fermenti che scindono i polipeptidi, e nelle ricerche sull'arginasi, le quali sono state ostacolate e rese ardue dalle difficoltà tecniche, che presentano la preparazione in quantità sufficiente dell'arginina e la sintesi artificiale dei polipeptidi.

⁽¹⁾ Kossel und Edlbacher, *Ueber einige Spaltungsprodukte des Thymins und Percins*. Zeitschr. f. physiol. Chemie, Bd. 88 (1913).

⁽²⁾ Schiff, Ann. der Chemie, 310 (1899), 319 (1901), 325 (1902).

⁽³⁾ Sørensen, *Enzimstudien*. Biochemische Zeitschr., Bd. 7.

⁽⁴⁾ Clementi A., *Ueber die Verbreitung der Arginase in Tierwelt*. Relazione sul IX Congresso internazionale dei fisiologi di Groningen. Arch. di fisiologia, vol. XII; *Ricerche sull'arginasi*. (Un nuovo metodo titrimetrico per la ricerca dell'arginasi. Rend. Acc. Lincei); *Sulla diffusione nell'organismo e nel regno dei vertebrati e sulla importanza fisiologica dell'arginasi* (Archivio di fisiologia, vol. XIII, 1915).

⁽⁵⁾ Clementi A., *Contributo allo studio dei fermenti peptolitici sui Polipeptidi*. Rendic. Acc. Lincei, vol. XXIV (1915).

PARTE SPERIMENTALE.

Il punto fondamentale per la soluzione del problema della trasformazione del metodo di Sørensen in *micrometodo* consiste nel dimostrare che i risultati, che si ottengono mediante la microtitolazione nell'analisi delle soluzioni di *aminoacidi allo stato chimicamente puro*, non differiscano molto dai risultati che sono da attendersi in base al calcolo teorico. Il quesito, la cui soluzione apparisce più difficile e a cui mi propongo di rispondere con altre ricerche, è quello riguardante l'applicazione della microtitolazione al formolo, quando nei liquidi da esaminare sono presenti sostanze le quali turbano l'esattezza dei risultati, come ad esempio nel caso in cui si voglia eseguire la determinazione quantitativa assoluta degli aminoacidi nel sangue.

Nelle seguenti analisi dirette a dimostrare sperimentalmente la possibilità di trasformare in micrometodo il metodo della titolazione al formolo, ho introdotto le seguenti modificazioni alle modalità della tecnica indicate da Sørensen:

- 1° uso di una soluzione 1/50 *n* di idrato di sodio;
- 2° uso di soluzioni 1/1000 *n* di aminoacidi o polipeptidi acqua priva di CO²;
- 3° uso di burette da 1 cmc. divise in 200 parti;
- 4° per 10 o 20 cmc. di soluzione di aminoacidi, 1 cmc. di miscela di formolo, in cui l'alcalinità è spinta possibilmente fino al rosso evidente (secondo stadio di Sørensen).

Ho sottoposto all'analisi la glicocola, la leucina, il dipeptide *dl*-leucil-glicina, e il guanidopolipetide glicociamiliglicina. Qui sotto sono riportati per esteso anche i dati ottenuti nelle diverse fasi in un caso di microtitolazione al formolo:

Indicatore	Controllo	Soluzione di glicocola 1/1000 <i>n</i>
Fenolftaleina	1 cmc. miscela di formolo	9 cmc. di soluzione
	9 cmc. di acqua distillata priva di CO ² .	1 cmc. miscela di formolo
	cmc. di Na OH 1/50 <i>n</i> adoperati nella titolazione	cmc. di Na OH 1/50 <i>n</i> adoperati nella titolazione
Colore rosa	0,550	0,080
Colore rosso (evidente) . .	0,650	0,160
Colore rosso intenso . . .	0,750	0,260

TABELLA I. — Glicocola.

Sostanza adoperata nella analisi	Indicatore adoperato: fenoltaleina	Quantità della soluzione 1/1000 n	Quantità adoperata di Na OH 1/50 n	
			in ccm.	in % del calcolato
Preparato di glicocola Kahlbaum	Colore rosso evidente	10	0,490	98
		20	0,965	96,5
	Colore rosso intenso	10	0,490	98
		20	0,965	99,5

In 10 ccm., rispettivamente in 20 della soluzione di glicocola adoperata, erano contenuti mgr. 0,751, rispettivamente mgr. 1,502; la microtitolazione ne dà presenti mgr. 0,735, rispettivamente mgr. 1,470.

TABELLA II. — Leucina.

Sostanza adoperata nella analisi	Indicatore adoperato: Fenoltaleina	Quantità della soluzione 1/1000 n	Quantità adoperata di Na OH 1/50 n	
			in ccm.	in % del calcolato
Preparato di leucina Kahlbaum	Colore rosso evidente	10	0,490	98
		20	0,950	95
	Colore rosso intenso	10	0,500	100
		20	0,975	97,5

TABELLA III. — dl-leucilglicina.

La dl-leucilglicina fu preparata da me secondo il procedimento indicato da Fischer e Brunner (<i>Synthese von Polypeptiden XI Liebigs' annalen der Chemie</i> , 340. 1905). . . .	Colore rosso evidente	10	0,500	100
	Colore rosso intenso	10	0,500	100

TABELLA IV. — Glicociamilglicina.

Sostanza adoperata nella analisi	Indicatore adoperato: fenoltaleina	Quantità della soluzione 1/1000 n	Quantità adoperata di Na OH 1/50 n	
			in ccm.	in % del calcolato
La glicociamilglicina adoperata su secondo il procedimento da me indicato (Clementi, <i>Sintesi della Guanidoglicilglicina</i> , Gazz. chimica italiana, an. XIV, parte I, fasc. 1).	Colore rosso evidente	10	0,000	0
		20	0,000	0
	Colore rosso intenso	10	0,000	0
		20	0,000	0

La glicociamilglicina si comporta come un corpo neutrale, nella titolazione al formolo.

I risultati ottenuti nell'analisi surriferite portano alle seguenti conclusioni:

1° la trasformazione della titolazione al formolo in microtitolazione è praticamente possibile e da nel caso di soluzioni pure di aminoacidi, risultati conformi alla teoria;

2° risultati conformi alla teoria si ottengono non solo nel caso in cui si analizzano soluzioni pure di aminoacidi come la glicocolle e la leucina, ma anche nel caso in cui si analizzano soluzioni pure di polipeptidi, come la leucilglicina e la glicociamilglicina;

3° la quantità di aminoacidi sufficiente per compiere un'analisi applicando il metodo della microtitolazione alla formaldeide può essere anche inferiore al milligrammo.

Fisica. — *Altre ricerche sul fenomeno di Stark-Lo Surdo nell'elio.* Nota di RITA BRUNETTI ⁽¹⁾, presentata dal Corrispondente A. GARBASSO.

Ho completate le osservazioni sullo spettro dell'elio in campo elettrico col metodo di Lo Surdo, i cui primi risultati sono stati pubblicati nei Rendiconti dei Lincei, seduta dell'11 aprile 1915.

Col semplice metodo spettroscopico non mi era riuscito di osservare una scomposizione sensibile delle righe 6678, 5876 (D₃), 5016, 4713 dell'elio. Ho attribuito questo a difetto di risoluzione, e ho preso a esaminare con uno scaglione le dette righe.

⁽¹⁾ Lavoro eseguito nel R. Istituto di Studi superiori.