

ATTI
DELLA
REALE ACCADEMIA NAZIONALE
DEI LINCEI

ANNO CCCXXI

1924

SERIE QUINTA

RENDICONTI

Classe di scienze fisiche, matematiche e naturali.

VOLUME XXXIII.

2° SEMESTRE.



ROMA

TIPOGRAFIA DELLA R. ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI
PROPRIETÀ DEL DOTT. PIO BEFANI

1924

Chimica. — *Sulla costituzione chimica dell'Insulina* ⁽¹⁾. Nota del dott. A. CRUTO, presentata dal Socio E. PATERNÒ ⁽²⁾.

Le ricerche chimiche sull'insulina sono ancora poche. Qualche breve notizia sulle sue proprietà chimiche e fisiche è apparsa qua e là in mezzo alle oramai abbondantissime ricerche sulle sue proprietà fisiologiche e sul suo meccanismo d'azione, ma ben poco è ciò che si conosce sulla sua costituzione.

Doisy, Somogyi e Shaffer ⁽³⁾ che hanno cercato di portare l'Insulina al massimo grado di purezza, hanno ottenuto una polvere bianca, priva di fosforo contenente il 14 % di azoto, la quale dava ancora la reazione del biuret e la reazione di Millon.

Dudley ⁽⁴⁾ precipitando l'Insulina sotto forma di pierato e trasformando poi questo in cloridrato, ha ottenuto il principio attivo ad un tal grado di purezza che 0,5-1 mmgr. erano sufficienti per provocare le convulsioni in un coniglio di due Kg. Questo prodotto (cloridrato di insulina), contiene zolfo sotto forma organica, è privo di fosforo, dà le reazioni del biuret, di Mölich, di Pauly; dà debolmente la reazione di Millon ed è negativo alla reazione del triptofano ed al saggio di Seliwanoff.

Per queste ricerche l'insulina viene considerata come un composto molto complesso, di natura proteica, ma sulla sua costituzione non si conosce ancora nulla di preciso e sussistono anche delle divergenze. Recentemente Ganasimi e Gerbino comunicarono alla Società medica di Pavia di aver costantemente riscontrata la presenza di fosforo nell'insulina, che, secondo essi, deve appartenere al gruppo dei fosfatidi od a quello dei nucleoproteidi.

Volendo eseguire delle ricerche sulla natura chimica dell'insulina, prima cura è stata quella di ottenere questo prodotto al massimo grado di purezza.

Dudley ha proposto un metodo di purificazione basato sulla insolubilità del pierato d'insulina in acqua, mediante il quale si riesce facilmente ad allontanare i sali inorganici che più tenacemente la accompagnano.

Dal pierato, reso puro, si può poi passare al cloridrato per trattamento con acido cloridrico alcoolico e lavaggio con etere anidro.

⁽¹⁾ Lavoro eseguito nel Laboratorio di biochimica dell'Istituto nazionale medico farmacologico.

⁽²⁾ Pervenuta all'Accademia il 5 luglio 1924.

⁽³⁾ Journ. of. biol. Chem., 55.

⁽⁴⁾ The Biochemical Journ., 17, 376, 1923.

Ho provato questo metodo ed ho ottenuto da esso buoni risultati, ma per eseguire il presente lavoro ho preferito adottare il seguente procedimento, che permette di avere dei migliori rendimenti.

Tratto l'insulina greggia con alcool 80% leggermente acidificato con acido solforico (30 cc. di alcool per ogni gr. di insulina greggia). Se la soluzione non riesce completa, separo per decantazione la parte insolubile ed aggiungo poi alla soluzione ottenuta un volume di alcool assoluto. Si forma un abbondante precipitato. Lascio per 24 ore a riposo in luogo fresco, poi decanto il liquido sopra un filtro. Alla soluzione alcoolica filtrata e limpida aggiungo 4-5 volumi di alcool assoluto. Precipita ora l'insulina, mentre nella prima abbondante precipitazione non erano contenute che proteine estranee e sali inorganici. Faccio essiccare il prodotto, poi lo sottopongo nuovamente allo stesso trattamento. Dopo 2-3 di queste purificazioni si ottiene una polvere bianca, leggermente giallognola, della quale bastano 0,8 mmgr. per portare il tasso glicemico di un coniglio di due chilogrammi, a digiuno da 24 ore, al 0,45‰, al qual tasso, di solito, si manifestano le caratteristiche convulsioni.

Ho cercato di raggiungere maggiori concentrazioni, sia ripetendo ancora il frazionamento con alcool, sia impiegando il metodo di Dudley, ma non mi è stato possibile oltrepassarlo, e ciò mi lascia supporre che il detto grado di attività corrisponda all'insulina pura.

Il solfato di insulina, quando è ben purificato e secco, è poco igroscopico e può benissimo essere conservato all'aria senza che si alteri. Si scioglie facilmente in acqua leggermente acidulata ($P_H = 5-6$), dando una soluzione leggerissimamente gialla, quasi incolore. È igroscopica e dà soluzioni colorate in giallo quando contiene impurità.

Di questo prodotto io ho eseguita l'analisi elementare.

Gr. 0,1536 di solfato d'insulina hanno fornito cc. 21,8 di azoto a 28°,1 ed a 720,4 mm. di pressione, ciò che rappresenta il 14,67% di azoto.

Gr. 0,0952 hanno dati cc. 13,1 di azoto a 27°,7 e 734 mm. di pressione cioè 14,46% di azoto.

Media delle due determinazioni $N = 14,53\%$.

Questo risultato corrisponde a quello già ottenuto da Doisy, Somogyi e Shaffer i quali nella loro insulina hanno riscontrato il 14% di azoto. L'insulina così purificata è priva di fosforo, contiene invece dello zolfo sotto forma organica.

Da 0,1587 gr. di insulina cloridrata, preparata e purificata con il metodo al picrato, sono stati ottenuti gr. 0,0200 di $BaSO_4$ corrispondenti al 5,29% di H_2SO_4 ed all'1,73% di S.

Invece gr. 0,1032 di solfato di insulina hanno dato gr. 0,0276 di $BaSO_4$ corrispondenti all'11,23% di H_2SO_4 ed al 3,67% di S.

Per controllare questi risultati, ho dosato lo zolfo non organico che si trova nel solfato di insulina, vale a dire quell'acido solforico che entra in combinazione come sale nel solfato d'insulina e che è direttamente precipitabile con cloruro di bario ed ho trovato il 5,90 %. Questo risultato conferma pienamente le determinazioni precedenti, le quali, a loro volta, possono dar luogo ad una prima considerazione sulla struttura molecolare di questo composto.

Il fatto che lo zolfo organico e lo zolfo combinato sotto forma di sale si trovino in eguali quantità, può significare che la molecola di insulina deve contenere un unico atomo di zolfo e che essa entri in combinazione come una molecola bibasica. A queste osservazioni non può essere attribuito un valore assoluto, ma hanno grande importanza per formarci un concetto sulla costituzione molecolare del prodotto.

Impiegando due diversi campioni di solfato di insulina, ho poi determinate le percentuali di carbonio e di idrogeno:

1°) gr. 0,1524 di solfato d'insulina hanno dato gr. 0,2678 di CO_2 e gr. 0,0998 di H_2O e cioè 47,92 % di C e 7,27 % di H;

2°) gr. 0,1430 di solfato di insulina hanno dato gr. 0,2494 di CO_2 e gr. 0,0940 di H_2O e cioè 47,54 % di C e 7,27 % di H.

Riassumo nella seguente tabella i risultati delle varie determinazioni:

	I	II	Medie
C	= 47,92	47,54	47,73
H	= 7,27	7,27	7,27
N	= 14,60	14,46	14,53
S	= 1,73	—	1,73
H_2SO_4	= 5,90	—	5,90
O	= —	—	22,84
			<hr/> 100,00

Se, per formarci un concetto della grandezza molecolare dell'insulina vogliamo ammettere che essa contenga un unico atomo di zolfo e prendiamo questo come base, arriviamo alla formula $\text{C}_{74}\text{H}_{135}\text{N}_{20}\text{O}_{26}\text{S}-\text{H}_2\text{SO}_4$, alla quale corrisponde il peso molecolare 1849. Questi numeri non sono da considerarsi come assoluti e definitivi, perchè non si hanno ancora argomenti sufficienti per fissare lo zolfo uguale ad uno, ma essi ci rappresentano sicuramente il peso molecolare minimo del prodotto.

Per il suo comportamento chimico, l'insulina è già stata classificata tra le sostanze proteiche; la formula greggia che io le attribuisco conferma questa classificazione assegnandole un posto tra i termini più semplici della classe.

Dalle sue soluzioni acquose l'insulina viene precipitata in modo completo dal solfato d'ammonio (40 %); invece il cloruro di sodio la precipita incompletamente. È precipitata dall'acido nitrico, col quale dà la reazione xantoproteica. Sono per essa positive le reazioni del biureto e quella del Millon, che però si mostra con una debole colorazione. Sono negative le reazioni col nitroprussiato, quella di Möhlisch e quella di Adamkiewicz.

La soluzione di insulina quando è acidificata con acidi forti è assai resistente al calore; può essere portata a 90° e può essere mantenuta per più ore a 60° senza che abbia a subire alterazioni; è invece alterabile con estrema facilità quando si trova in soluzioni neutre od alcaline. È facilmente solubile in alcool 85 %; è insolubile in etere e nei comuni solventi organici.

L'acido picrico e l'acido tannico in soluzione satura la precipitano completamente.

Per questi caratteri l'insulina è stata assegnata ai gruppi delle globuline o delle albuminosi.

Può essere l'insulina un prodotto derivante dalla decomposizione di altre proteine più complesse? Dal punto di vista chimico non è ancora possibile dare una risposta a questa domanda, ma se si pensa alla enorme importanza che questa sostanza ha per il ricambio animale, pare strano che essa debba nascere dalla disaggregazione di altri composti e che non sia piuttosto un prezioso materiale accuratamente elaborato e messo in circolo con meravigliosa esattezza dal pancreas sano. Per questa considerazione sembrerebbe di dover assegnare l'insulina piuttosto al gruppo delle globuline che non al gruppo delle albumose, ma non è possibile procedere alla sua giusta classificazione finché colla scomposizione della sua molecola in corpi più semplici e con un accurato studio di questi, non ci sia possibile conoscere la sua intima struttura molecolare.

Un'altra ipotesi è stata fatta sulla natura dell'insulina, ed è che la sostanza proteica che si estrae dal pancreas e della quale si studiano le proprietà e la composizione, non sia propriamente il principio attivo ipoglicemizzante, ma sia invece una sostanza inerte, alla quale sta attaccato per assorbimento il principio attivo. Questa ipotesi è stata avvalorata dalle ricerche di Best e Macleod, i quali avrebbero preparata un'insulina molto attiva che non dava la reazione del biureto.

Però nessuno degli autori, che si sono occupati poi di queste ricerche, ha potuto confermare tale risultato.

Siamo già in possesso di una sostanza di una attività straordinaria e meravigliosa, quale dovrebbe essere l'attività di questo ipotetico principio attivo se esso rappresentasse soltanto una piccola parte della sostanza che noi studiamo?

La costanza dei risultati che si ottengono e che io ho potuto verificare con molte preparazioni e purificazioni è contro una simile ipotesi.