BIBLIOTECA MEDICA ROMA
MISCELL
B 55
12

RENDICONTI DELLA R. ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI
**Classe di Scienze fisiche, matematiche e naturali.**
Estratto dal vol. XXVI, serie 6ª, 2° sem., fasc. 5-6. – Roma, settembre 1937-XV.

**Fisiologia generale.** — *Determinazione elettrometrica dell'attività peptica*[1]. Nota[2] di E. TRIA. Presentata dal Corrisp. S. VISCO.

I metodi per la determinazione dell'attività peptica si basano sulle proprietà della pepsina, la quale, come è noto, allorchè viene aggiunta a soluzioni proteiche, determina in esse una diminuzione della viscosità accompagnata dalla diminuzione della quantità di azoto proteico presente, e da un aumento dei gruppi $NH_2$ e COOH titolabili. Anche l'attività ottica e la conducibilità elettrica variano durante l'azione peptica, ma tali variazioni non sono molto accentuate, e non si prestano pertanto ad una determinazione quantitativa.

I. – Il metodo che consiste nella determinazione dell'attività peptica per mezzo delle variazioni di viscosità è indubbiamente un metodo molto rapido e esatto, specialmente adoperando la tecnica di Northrop e Hussey[3]; quattro o cinque determinazioni possono essere eseguite in meno di un'ora con un errore probabile del 5 %. Se però le determinazioni sono fatte con soluzioni proteiche differenti, si possono avere variazioni fino al 100 %, data la enorme difficoltà di preparare soluzioni proteiche aventi identiche proprietà con diversi campioni della stessa proteina.

II. – Il metodo che consiste nella determinazione a vari intervalli di tempo dell'azoto non proteico, cioè dell'azoto che non è precipitato da una soluzione di acido tricloroacetico al 10 % e alquanto più esatto del metodo viscosimetrico. Esso ha però lo svantaggio che esiste, secondo Northrop[4], una relazione diretta tra quantità di azoto non proteico prodotto e quantità di enzima, solo nel caso che si adoperino quantità molto piccole di enzima; ed evidentemente in queste condizioni la precisione del metodo non può essere molto grande.

III. – Il metodo più comunemente adoperato in questi ultimi anni, che dà dei risultati più precisi, e il cui significato chimico è ben chiaro, è il metodo che consiste nel determinare a vari intervalli di tempo l'aumento dei gruppi $NH_2$ e COOH.

(1) Lavoro eseguito nell'Istituto di Fisiologia Generale della R. Università di Roma.
(2) Pervenuta all'Accademia il 16 settembre 1937.
(3) J. H. NORTHROP, a. HUSSEY, «R. G., J. Gen. Physiol.», *5*, 352, 1933.
(4) J. H. NORTHROP, «J. of Gen. Physiol.», *616*, 41, 1932.

B 55 12

Tale determinazione può essere eseguita in varie maniere, o in soluzione alcoolica secondo Waldschmidt-Leitz [1] o in formalina secondo Northrop [3] o in acetone secondo Dickeroff e Tewes [2].

Quest'ultimo metodo è forse quello che dà dei risultati meno precisi, gli altri due presso a poco si equivalgono. Secondo Northrop, con la titolazione in formalina adoperando opportuni accorgimenti si può avere una esattezza corrispondente a ± 0,05 cc. di NaOH n/50. In realtà una precisione così grande è estremamente difficile a ottenersi. Molto spesso determinazioni da me eseguite con campioni diversi delle stesse soluzioni differivano, anche procedendo con la tecnica più accurata di 0,10 - 0,15 cc. di NaOH n/50. Questo specialmente se le determinazioni venivano eseguite a ore diverse della giornata ed in condizioni di illuminazione differente. Non è facile infatti cogliere il punto finale della titolazione, quando si adoperi come indicatore la fenolftaleina in ambiente di formalina.

D'altra parte quando si vogliono studiare le diverse condizioni sperimentali per cui un enzima può essere attivato o inibito, un errore dell'ordine di grandezza di 0,10 cc. di NaOH n/50 è tutt'altro che trascurabile.

Mi è sembrato pertanto indispensabile, per il proseguimento di alcuni studi sulla pepsina attualmente in corso, di modificare i metodi esistenti allo scopo di avere una sensibilità maggiore. E siccome il metodo che, e dal punto di vista teorico e per la sua relativa semplicità, mi sembra preferibile è quello di Northrop, ho cercato di modificare opportunamente questo metodo. Come si è detto, l'unica grande difficoltà che presenta il metodo di Northrop, è quello di cogliere il punto finale della reazione. Se si riesce a trovare la maniera di ovviare a questa difficoltà, il metodo può dare dei risultati perfetti.

Si è pensato in primo tempo a sostituire alla fenolftaleina un altro indicatore; ma prescindendo dal fatto che il meccanismo della reazione in ambiente di formalina è tutt'altro che ben chiaro [3], per cui non è indifferente adoperare un indicatore piuttosto che un altro, sta di fatto che in questo modo un notevole vantaggio non si ottiene, perchè sempre difficile rimane cogliere il punto finale della reazione.

L'unica probabilità, a me pare, che permette di ovviare a questo inconveniente, è quello di sostituire alla titolazione in presenza di indicatore, la titolazione elettrometrica.

Si potrebbe eseguire la titolazione elettrometrica per mezzo di un potenziometro, adoperando un elettrodo a campana ad idrogeno contro un elettrodo a calomelano, e aggiungendo acidi o alcali fino ad ottenere un determinato pH costante. Ma questo metodo offre l'inconveniente che per una

(1) WALDSCHMIDT-LEITZ, H. u., G. KÜNSTNER, « Zeitschr. f. physiol. Chem. », *171*, 70, 1927.

(2) H. DYCKERHOFF, u., G. TEWES, « Zeitschr. f. physiol. Chem. », *215*, 93, 1933.

(3) D. VAN SLYKE, « J. Biol. Chem. », 1926.

determinazione di questo genere occorre molto tempo per cui non è pratico quando si tratti di determinare l'attività peptica di numerose soluzioni. È d'altra parte inutile determinare volta per volta il pH finale della soluzione; quello che interessa è soltanto che il pH che si raggiunge sia sempre lo stesso.

Per raggiungere questo scopo basta servirsi di un comune elettrometro capillare, che funzioni da strumento di 0 e che viene intercalato tra due soluzioni, l'una quella in esame, l'altra una soluzione tampone avente un determinato pH. Come soluzione tampone mi sono servito di una soluzione di $NH_4Cl$ e $NH_3$. Entrambe le soluzioni erano tenute in due elettrodi a campana ed in esse veniva fatto gorgogliare idrogeno fino a saturazione.

Recentemente un metodo simile è stato usato da Cattaneo e Scoz [1] per la determinazione del potere esteratico del sangue.

## Esecuzione pratica del metodo.

A 25 gr. di caseina Hammersten si aggiunge una piccola quantità di acqua e alcune goccie di $NH_3$ 5n. Si continua ad aggiungere acqua agitando in modo da impedire la formazione di grumi, ed infine si aggiungono 25 cc. di HCl n. Si porta con acqua a 500 cc. in un pallone tarato.

Si prelevano 10 cc. della soluzione così preparata e ad essa si aggiungono 2 cc. di una soluzione di NaOH di concentrazione tale da avere una reazione nettamente alcalina alla fenolftaleina, e tale che il colore rosso scompaia con l'aggiunta di 1 cc. di formalina.

Si prepara la soluzione di $NH_3 - NH_4Cl$, ed anche a 10 cc. di questa soluzione si aggiunge un cc. di formalina. Tale soluzione è fatta in modo che essa è leggermente più alcalina della soluzione di caseina da titolare, per cui con la fenolftaleina si ha una debole colorazione rosa.

Le due soluzioni si introducono in due elettrodi a campana di recente platinati e in esse si fa gorgogliare idrogeno per 10 minuti. I due elettrodi sono connessi tra di loro per mezzo di un tubo ad agar cloruro di potassio saturo, ed entrambi riuniti ad un elettrometro capillare. Quando la saturazione con idrogeno si è raggiunta, si osserva, chiudendo il circuito che il livello del mercurio nel capillare è più alto del punto preso come zero. Questo perchè, non essendo le due soluzioni allo stesso pH, si stabilisce una differenza di forza elettromotrice. Per mezzo di una microburetta si comincia ad aggiungere goccia a goccia NaOH n/100 alla soluzione di caseina, ed ogni volta si chiude il circuito. La differenza di forza elettromotrice va sempre più riducendosi per cui il livello del mercurio sempre più si avvicina allo zero, fino a passare al disotto di esso. Si segna la quantità di NaOH in tal modo consumata, necessaria ad annullare la forza elettromotrice ed a portare quindi allo stesso pH le due soluzioni.

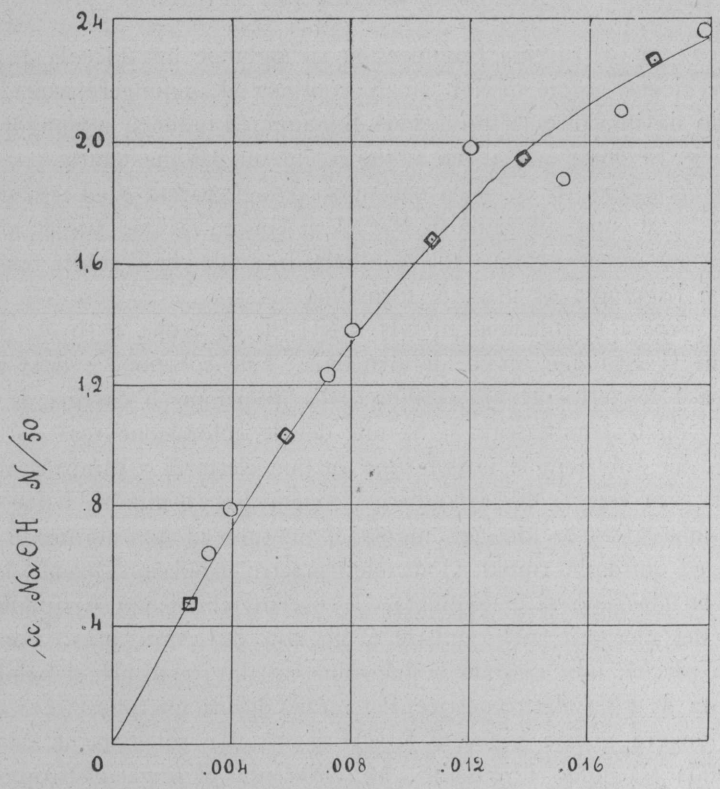
(1) C. Cattaneo e G. Scoz, «Ann. Ist. C. Forlanini», vol. IV, n. 4, 1937.

Ad altri campioni di 10 cc. della stessa soluzione di caseina si aggiungono 0,1 cc. di soluzione di pepsina alla concentrazione che si vuole studiare; questi campioni vengono tenuti in termostato a 35°,5 C. per un tempo variabile (da 15′ a 24 h) dopo di che vengono titolati nella maniera sopra descritta.

La differenza tra la quantità di cc. di NaOH adoperati in queste titolazioni successive e la quantità adoperata nella prima titolazione indicano la digestione peptica ai vari intervalli di tempo.

In tale maniera si riesce ad ottenere l'esattezza di 0,1 cc. di NaOH n/100.

A titolo di esempio si riportano i valori ottenuti titolando una soluzione di caseina dopo un'ora di digestione a 35,5 C. con quantità diverse di pepsina cristallizzata di Northrop. Nella figura annessa accanto a tali va-



lori vengono riportati i valori trovati da Northrop nelle stesse condizioni adoperando come indicatore la fenolftaleina.

*Conclusioni.* — Si è modificato il metodo di Northrop per la determinazione dei gruppi carbossilici messi in libertà per effetto della digestione peptica, sostituendo alla titolazione in presenza di fenolftaleina la titolazione elettrometrica per mezzo di un elettrometro capillare.

55653

314164