



RENDICONTI DELLA R. ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI

Classe di Scienze fisiche, matematiche e naturali.

Estretto dal vol. XXV, serie 6^a, 2^o sem., fasc. 3-4. - Roma, agosto 1937-XV.

Fisiologia. — *Fotometro a cella fotoelettrica per la determinazione dell'emoglobina in soluzioni diluitissime di sangue*⁽¹⁾.

Nota⁽²⁾ di EUGENIA SACERDOTE, presentata dal Socio A. HERLITZKA.

Com'è noto, la determinazione qualitativa dell'emoglobina esistente in un campione di sangue, viene comunemente eseguita colla reazione di ossidazione della benzidina, in presenza di peridrolo, funzionando in tali condizioni l'emoglobina da perossidasi.

Io mi sono proposta, servendomi appunto di tale reazione, di mettere in evidenza e misurare anche minime quantità di emoglobina in soluzioni diluitissime di sangue.

Mi sono servita, a tale scopo, di un fotometro a cella fotoelettrica, che presenta il vantaggio di una grandissima sensibilità di fronte anche a minime variazioni dell'intensità del colore della reazione, non apprezzabili ad occhio nudo.

Descriverò qui brevemente la preparazione dei reagenti e il tipo di fotometro usato per determinare quantitativamente l'emoglobina.

METODO DI PREPARAZIONE DELLA BENZIDINA.

Si fanno sciogliere a caldo gr. 2 di benzidina purissima Merk in 100 cc. di acido acetico glaciale. Meno di un minuto di riscaldamento a fiamma diretta è sufficiente per sciogliere la benzidina. Anche se la sostanza contiene qualche impurità, sarà meglio non cercare di depurarla, per evitarne la facile ossidazione durante la filtrazione. Dopo aver provato numerose altre concentrazioni, sono venuta alla conclusione che la soluzione acetica di benzidina al 2% è quella che meglio si presta a dare una reazione pronta, vivace, costante; mentre la colorazione propria di una tale soluzione è praticamente trascurabile.

METODO DI PREPARAZIONE DEL PERIDROLO.

Si prepara una soluzione di peridrolo al 5%, partendo da quello Merk secondo le tabelle delle diluizioni unite ad ogni flacone.

Con soluzioni più concentrate la reazione si dimostra anche più pronta,

(1) Lavoro eseguito nell'Istituto A. Mozzo al Col d'Oleu.

(2) Pervenuta all'Accademia il 30 luglio 1937.

Autore
B
55
15



ma le numerosissime bollicine di O_2 che si liberano contemporaneamente, mascherano a lungo il caratteristico colore della reazione.

Le soluzioni dei due reagenti descritte, devono essere preparate fresche prima di ogni ricerca, perchè la benzidina in soluzione s'imbrunisce alla luce, e il peridolo in soluzione diluita, si scinde assai facilmente.

Preparate le due soluzioni dei reagenti, si introducono nell'apposito recipiente di vetro, a faccie piane e parallele, 2 cc. di benzidina al 2%, e 1 cc. di H_2O_2 al 5%.

Dopo aver sicuramente constatato la non avvenuta reazione di ossidazione prima dell'introduzione dell'emoglobina, si aggiungono 2 cc. di una soluzione diluitissima (valori intorno a 1:500.000 di emoglobina) del sangue da esaminare.

In presenza di emoglobina la reazione avviene rapidamente, e raggiunge, a seconda della concentrazione, in 1 minuto circa un'intensa colorazione bleu-verde, che comincia a virare al rosso dopo 2-3 minuti.

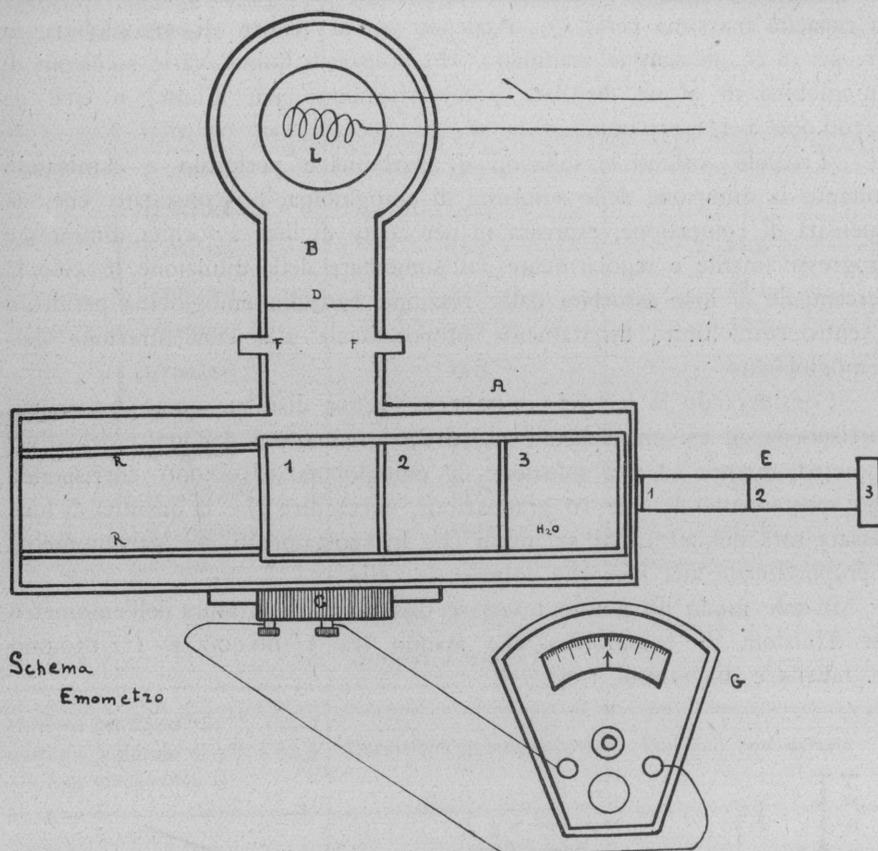
Per valutare l'intensità di colorazione della reazione, mi sono servita di un fotometro a cella fotoelettrica, col quale ho misurato la quantità percentuale di luce assorbita da tale reazione.

Il fotometro che ho adoperato consta essenzialmente di una scatola rettangolare metallica A, munita di coperchio, verniciata internamente in nero, all'interno della quale, scorrevole su una rotaia R, è situato un supporto capace di contenere 3 recipienti di vetro a faccie piane parallele. Tale supporto mobile è manovrabile dall'esterno, mediante una leva E, mentre un nottolino, spinto da una molla, consente di fermare il supporto stesso, in tre diverse posizioni, a seconda che, al fascio luminoso, si voglia far attraversare l'una piuttosto che l'altra delle soluzioni contenute nei recipienti di vetro (v. schema).

La parete posteriore della scatola, presenta al centro un orificio circolare di 1 cm. di diametro, al quale fa riscontro, sulla parete anteriore, un eguale foro, dietro al quale è montata una cella fotoelettrica C (tipo dott. Lange). I due serrafilì di detta cella sono congiunti ad un galvanometro di Pye a bassa resistenza G.

L'illuminazione è assicurata da una lampada elettrica smerigliata da 100 Watt L, situata all'interno di una scatola cilindrica verticale, comunicante per mezzo di un grosso tubo metallico B, col foro della parete posteriore della scatola rettangolare. Un diaframma ad iride D intercalato sul tubo orizzontale, consente di regolare a volontà l'intensità luminosa. Attraverso ad un'apposita fessura F, si possono introdurre adatti filtri sul decorso dei raggi luminosi. E poichè la colorazione bleu-verde della reazione presenta se non un massimo, almeno un aumento di assorbimento, per la banda da $\lambda = 580-540$, ho ricorso al filtro giallo $GC_{21}-24670$ di Schott e Genossen, ciò che mi ha permesso di aumentare notevolmente la sensibilità, inoltre dato che, come si è detto, dopo 2-3 minuti il bleu-verde

vira al rosso, l'assorbimento selettivo raggiunge un massimo per poi diminuire dopo qualche istante, quando s'inizia tale viraggio. I recipienti a faccie piane parallele per i liquidi in esame sono di 1,5 cm. di lato e 8 cm. di altezza, due delle faccie essendo trasparenti e due altre smerigliate.



Per procedere alla misura, si riempie uno dei recipienti di H_2O distillata, e gli altri delle soluzioni da esaminare. S'introducono i 3 recipienti negli appositi spazi del supporto mobile: chiusa la scatola col suo coperchio, manovrando dall'esterno, si porta il recipiente contenente l' H_2O distillata sull'asse dei due fori, si accende la lampadina, e si regola l'intensità luminosa col diaframma dimodochè, l'indice del galvanometro percorra tutta la scala. Si sposta allora immediatamente il supporto mobile, in modo da sostituire, sul percorso del fascio luminoso, la soluzione in esame all' H_2O distillata, e subito si legge la nuova posizione assunta dall'indice del galvanometro. Dopo qualche istante si ripete la lettura, e così di 20 in 20 secondi, finchè l'assorbimento da parte della soluzione abbia raggiunto il massimo, cioè finchè lo spostamento dell'indice galvanometrico sia diven-

tato minimo. Occorre verificare prima di ogni lettura, attraverso l'H₂O distillata, l'intensità della sorgente luminosa, correggendo col diaframma nel caso che risulti cambiato.

Per la taratura del fotometro ho ricorso a campioni di sangue umano, di cane e di cavia, dei quali, coll'apparecchio di Van Slyke, ho misurato la capacità massima per l'O₂, risalendo poi al tenore di emoglobina in gr. per 1 cc. di sangue esaminato. Ho preparato quindi varie soluzioni di emoglobina in acqua distillata progressivamente più diluite, e cioè da 1/100.000 a 1/1.150.000.

Tenendo costanti le soluzioni di benzidina e peridrolo e cambiando soltanto la diluizione delle soluzioni di emoglobina, ho constatato che, la intensità di colorazione, espressa in per cento di luce assorbita, diminuisce progressivamente e regolarmente coll'aumentare della diluizione, e cioè la percentuale di luce assorbita dalla reazione benzidin-emoglobina-peridrolo è, entro certi limiti, direttamente proporzionale alla concentrazione dell'emoglobina.

Considerando la luce che attraversa l'acqua distillata come 100 a cui corrisponda ad es. uno spostamento di 50 graduazioni dell'indice del galvanometro, mentre ad una soluzione di emoglobina 1/100.000 corrisponde uno spostamento di sole 10 graduazioni, vorrà dire che la quantità di luce passata sarà del 20%. Si sa infatti che lo spostamento del galvanometro è proporzionale alla luce che colpisce la cella.

In tale modo ho potuto tracciare una curva di taratura dell'emometro per diluizioni di emoglobina che stanno fra 1/100.000 e 1/1.150.000 (v. tabelle e diagrammi 1-2).

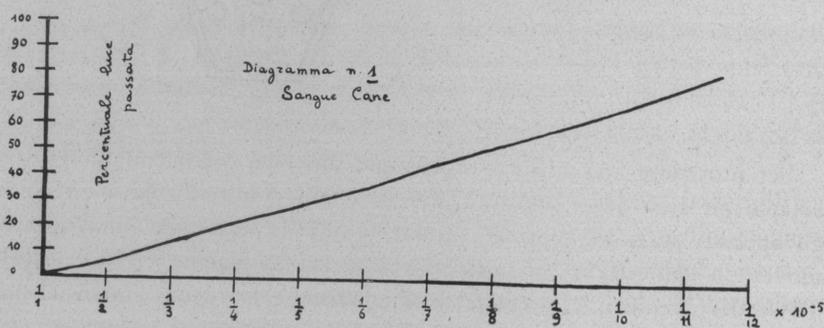


Fig. 1. - Soluzioni di emoglobina da 1/100.000 a 1/1.150.000.

TABELLA I.
Sangue di cane.

Soluzione benzidina al 2‰ - cc. 2 Soluzione peridolo al 5‰ - cc. 1 Soluzione emoglobina al	Deviazione galvanometro	Percento luce passata
1/100.000	0	0‰
1/200.000	2.5	6.1
1/300.000	5.0	14.3
1/400.000	7.5	21.4
1/500.000	10.0	28.5
cc. 2 } 1/600.000	12.5	35.7
1/700.000	15.5	44.3
1/800.000	18.0	52.8
1/900.000	21.0	60.0
1/1.000.000	24.0	68.5
1/1.150.000	29.0	82.8

TABELLA II.
Sangue umano.

Soluzione benzidina al 2‰ - cc. 2 Soluzione peridolo al 5‰ - cc. 1 Soluzione emoglobina al	Deviazione galvanometro	Percento luce passata
1/100.000	0	0‰
1/200.000	3.0	8.5
1/300.000	5.5	15.7
1/400.000	7.5	21.4
1/500.000	10.5	30.0
cc. 2 } 1/600.000	12.5	35.7
1/700.000	15.5	44.2
1/800.000	17.0	48.5
1/900.000	19.0	54.2
1/1.000.000	21.5	61.4
1/1.150.000	25.5	72.8

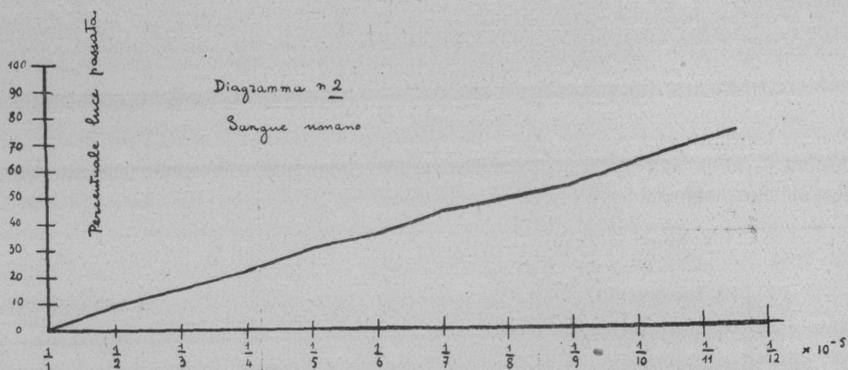


Fig. 2. - Soluzioni di emoglobina da 1/100.000 a 1/1.150.000.

Entro questi limiti mantenendo costanti le quantità di H_2O_2 e di benzidina, si può ammettere all'incirca, che la relazione esistente fra luce assorbita e soluzioni progressivamente più diluite di emoglobina, sia espressa da un'equazione di 1° grado. La costante di proporzionalità è eguale alla decima parte della percentuale di luce che attraversa uno spessore di 1,5 cm. di una soluzione di emoglobina di 1×10^{-6} .

La sensibilità dell'emometro è tale da registrare variazioni di emoglobina corrispondenti a 0.001-0.002 di mmgr. di emoglobina per cc. di soluzione.

Data l'intensità della reazione non mi è stato possibile esaminare soluzioni di emoglobina più concentrate di 1/100.000. D'altra parte, per forti diluizioni di emoglobina, superiori cioè a 1/1.000.000, si incontrano difficoltà d'altro genere. La reazione infatti si fa sempre più debole e le cause d'errore si fanno sentire in maniera più evidente.

Volendo dunque determinare la quantità di emoglobina esistente in un dato campione di sangue basterà prepararne una soluzione diluitissima. Una volta introdotti 2 cc. di tale soluzione nel recipiente, già contenente 2 cc. di benzidina e 1 cc. di peridolo, ed avvenuta la reazione nel modo sopra descritto, si leggerà lo spostamento dell'indice del galvanometro. L'assorbimento percentuale di luce relativa a tale spostamento dell'indice, corrisponde a un dato valore di emoglobina sulla curva di taratura, onde, con un semplice calcolo di proporzionalità, tenendo presente la diluizione adoperata, si risale alla concentrazione di emoglobina nel campione di di sangue in esame.

Occorre però avvertire che l'emoglobina perde col tempo la sua capacità perossidica, perciò è necessario fare la lettura entro le prime ore dal prelievo del sangue.

Nella tabella III e relativo diagramma è messa in evidenza la curva di variazione della capacità perossidica della emoglobina in funzione del tempo trascorso dal momento di prelievo.

TABELLA III.
Sangue cavia.

Soluzione benzidina al 2% - cc. 2 Soluzione peridolo al 5% - cc. 1 Soluzione emoglobina al		Deviazione galvanometro					Percento luce passata				
		1 h	15 h	24 h	48 h	72 h	1 h	15 h	24 h	48 h	72 h
cc. 2	1/100.000	0	0	0	1	4	0	0	0	2.8	11.4
	1/200.000	2	2	3	5	8	5.7	5.7	8.5	14.3	22.8
	1/300.000	6	7	7	8	12	17.1	20.0	20.0	22.8	34.4
	1/400.000	8	10	11	12	16	22.8	28.5	31.4	34.2	45.7
	1/500.000	10.5	12	14	17	20	30.0	34.2	40.0	48.5	57.1
	1/600.000	14	15.5	17	20	23	40.0	44.2	48.5	57.1	65.7
	1/700.000	17	20	21	23	27	48.5	57.1	60.0	65.7	77.1
	1/800.000	19	22	23	26	30	54.2	62.8	65.7	74.2	85.7
	1/900.000	21	23	24	28	32	60.0	65.7	68.5	80.0	91.4
	1/1.000.000	24	26	27	—	—	68.5	74.2	77.1	—	—
1/1.150.000	27	29	—	—	—	77.1	82.8	—	—	—	

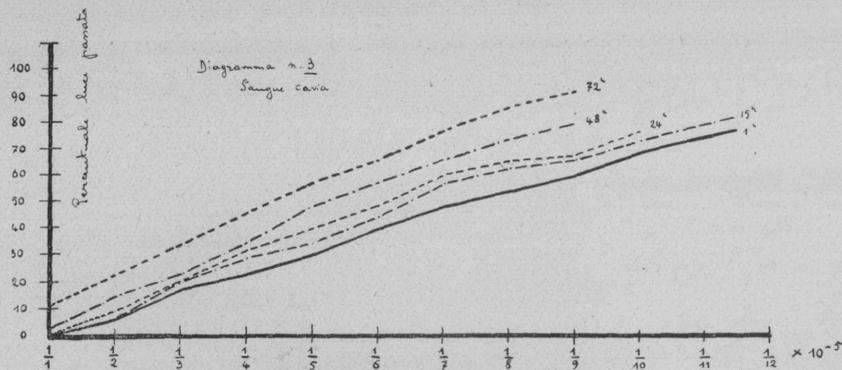


Fig. 3. - Soluzioni di emoglobina da 1/100.000 a 1/1.150.000. Curve di variazione della capacità perossidica dell'emoglobina in funzione del tempo trascorso dal momento del prelievo del sangue (dalla 1^a h alla 72^a h).

Concludendo, servendomi nel modo detto delle curve di taratura ho eseguito numerose determinazioni in materiale poverissimo di emoglobina ed ho potuto convincermi della bontà del metodo descritto specialmente per quanto riguarda la sensibilità e la velocità di determinazione.



55656

~~320235~~