

RENDICONTI DELLA R. ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI

Classe di Scienze fisiche, matematiche e naturali.

Estratto dal vol. XXVII, serie 6<sup>a</sup>, 1<sup>o</sup> sem., fasc. 9. - Roma, maggio 1938-xvi

**Determinazione microchimica dell'azoto  
solubile totale e delle frazioni ureica  
ed aminica (azotemia totale, ureoazo-  
temia ed aminoazotemia) nel sangue.**

NOTA

DI

**S. BAGLIONI**



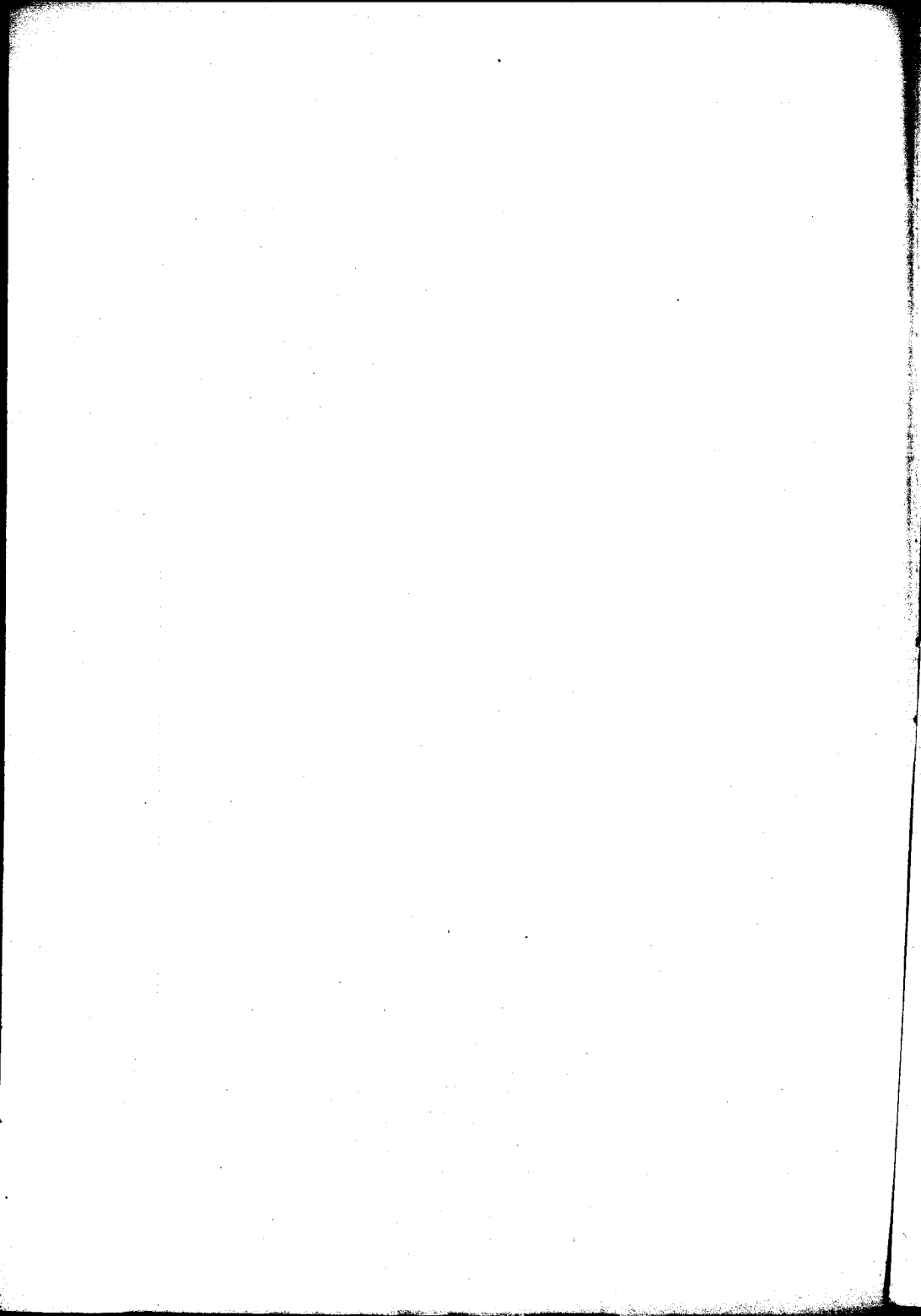
*Ariz.*  
B  
57  
64

ROMA

DOTT. GIOVANNI BARDI

TIPOGRAFO DELLA R. ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI

1938-XVI



**Fisiologia.** — *Determinazione microchimica dell'azoto solubile totale e delle frazioni ureica ed aminica (azotemia totale, ureoazotemia ed aminoazotemia) nel sangue.* Nota <sup>(1)</sup> del Corrisp. S. BAGLIONI.

Uno dei problemi scientifici e pratici che va assumendo nel campo della fisiologia umana, normale e patologica, importanza e diffusione sempre maggiore, è quello connesso colla determinazione chimica delle sostanze azotate solubili e delle loro diverse frazioni nel sangue.

Nel laboratorio dell'Istituto di Fisiologia umana della R. Università di Roma da anni ci stiamo occupando del problema studiato in varie condizioni fisiologiche. Abbiamo cercato di elaborare un metodo che anche nei minimi dettagli potesse offrire ogni possibile garanzia di esattezza. Dopo ripetuti tentativi, superando non poche difficoltà tecniche, colla intelligente e indefessa collaborazione della dott.ssa Clara Pozzi, siamo riusciti a realizzare un metodo che ci sembra adeguato allo scopo.

Essenzialmente esso si basa sui principi del metodo di Ivar BANG, descritto da DURUPP <sup>(2)</sup>, al quale abbiamo apportate alcune modificazioni che la ripetuta esecuzione della ricerca ci ha insegnato indispensabili per ottenere i migliori risultati. Tali modificazioni riguardano precisamente la determinazione fatta in via volumetrica, invece che colla pesata, dei campioni di sangue prelevato, alcuni particolari del processo di ossidazione, di distillazione e di titolazione dei mikrokjeldahl, come risultano dalla descrizione dettagliata del metodo.

I. *Prelievo del campione di sangue.* — Mediante una lancetta di FRANCK, sterilizzata, si punge il polpastrello di un dito (previa disinfezione con battuffolo di ovatta imbevuto di alcool), in modo che spicci spontaneamente una grossa goccia di sangue, della quale con una micropipetta tarata si aspira cc 0,1, che si fa immediatamente assorbire da una cartina di carta bibula di BANG (Ditta C. S. Schleicher et Schüll, Düren, N. 553) di 15/16 mm. Tali cartine, prima del loro uso, si fanno bollire con acqua bidistillata, fin-

(1) Presentata nella seduta del 1<sup>o</sup> maggio 1938.

(2) DURUPP, *Micromethodes et semi-micromethodes appliquées aux analyses chimiques du sang et des humeurs*, 2. édition, 1930, A. Poinat, Paris.

chè l'acqua di lavaggio esca limpida ed incolore; si asciugano all'aria, a debole calore, o meglio spontaneamente, e si conservano in un recipiente in essiccatore ad acido solforico.

Le cartine che hanno assorbito il sangue si fanno asciugare all'aria, appendendole su adatti uncini di vetro affidati ad un sostegno (fig. 1). Il prosciugamento esige in media 15-20 min. primi.

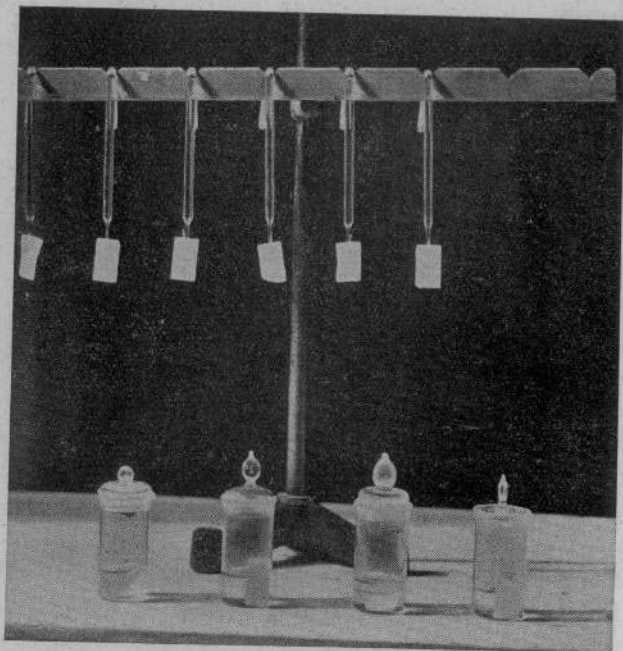


Fig. 1. — Disseccamento dei campioni ed estrazione delle frazioni.

II. *Separazione delle diverse frazioni azotate.* — Le cartine asciutte mediante pinze metalliche si introducono in speciali pesafiltri di vetro pyrex, muniti di adatto beccuccio, per evitare nelle successive manovre di travasamento ogni perdita di liquido; vi si versano 10 cc del liquido, che ha la proprietà di estrarre la frazione azotata e di precipitare i protidi.

Per il dosaggio dell'azoto ureico serve una miscela in parti uguali di alcool etilico ed etere solforico puri per analisi; per il dosaggio dell'azoto totale serve la soluzione sproteinizzante fosfomolibdica (acido fosfomolibdico cristallizzato, gr. 5, +  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  gr. 5, +  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , gr. 15 + glicosio, gr. 0,25 in 1000 cc. di acqua bidistillata). Le stesse cartine con il sangue dalle quali si è estratto l'N ureico servono per il dosaggio della frazione dell'azoto aminico, che però effettivamente rappresenta l'insieme delle restanti frazioni azotate, detratta quella ureica, insieme a piccola (trascurabile) quantità di N

proveniente dai fosfatidi. Dopo che hanno perduto ogni traccia di odore di alcool e di etere, si pongono in nuovi pesafiltri, ai quali si aggiunge la surricordata soluzione fosfomolibdica.

Dopo un soggiorno di 24 ore si è sicuri che le varie sostanze azotate solubili sono passate nelle diverse soluzioni.

III. *Ossidazione.* — Il contenuto dei pesafiltri si decanta cautamente e quantitativamente in speciali palloncini mikrokjeldahl (fig. 2); vi si aggiungono poi 3 gocce di soluzione di  $\text{CuSO}_4$  10% e 1 cc. di  $\text{H}_2\text{SO}_4$  p. p. a. Portati quindi su un bagno di sabbia a riscaldamento elettrico, vi si lasciano a calore moderato finchè il liquido, mediante evaporazione di acqua, si concentra a 2 o 3 cc. Portati quindi su adatti fornellini a gas (fig. 2) riscaldando intensamente, si completa l'ossidazione, che si riconosce quando

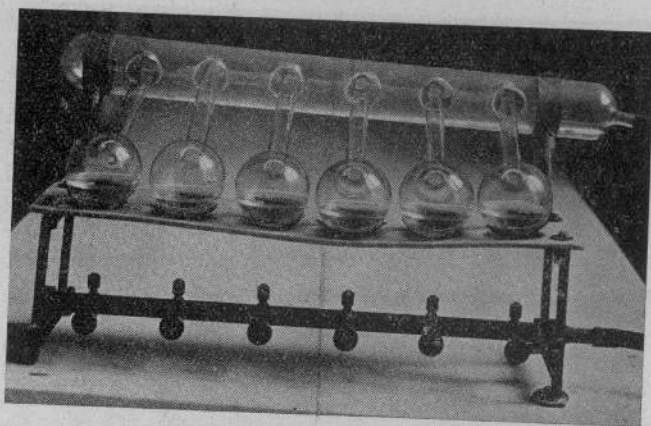


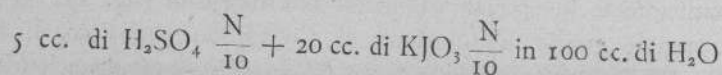
Fig. 2. - Ossidazione.

il liquido diviene completamente trasparente di color verde o azzurro chiaro, a caldo, e incolore a freddo.

Nei palloncini, nei quali si versa la soluzione contenente alcool ed etere, è necessario, prima di versare  $\text{H}_2\text{SO}_4$  per l'ossidazione, far evaporare tutto l'etere e quasi tutto l'alcool. A tal fine si aggiungono a ciascuno 5 cc. di  $\text{H}_2\text{O}$  e 1 goccia di  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ; si portano quindi sul bagno di sabbia elettrico, ove si lasciano sino alla scomparsa dell'odore di alcool e di etere. Si trattano poi come gli altri.

IV. *Distillazione.* — La distillazione si compie contemporaneamente per quattro dosaggi, mediante un apparecchio di vetro pyrex che abbiamo fatto costruire (dalla ditta Donati di Roma) sul principio di quello di PARNAS e WAGNER, abolendo ogni chiusura con tappo di gomma (fig. 3). Il contenuto dei palloncini mikokjeldahl è versato quantitativamente nel rispettivo pallone di distillazione; si aggiunge  $\text{NaOH}$  (33%) fino a evidente formazione dell'idrato di  $\text{Cu}$ , divenendo il colore del liquido nettamente azzurro:

10 cc. della soluzione alcalina sono sufficienti allo scopo. Si riscalda la grande beuta centrale, che contiene l'acqua distillata per la formazione del vapore che va a gorgogliare entro i palloni, riscaldando le soluzioni e favorendo la liberazione dell' $\text{NH}_3$ , allo stato gassoso, che passando per i tubi di quarzo si condensa e in gocce si raccoglie negli speciali cilindretti graduati, contenenti ciascuno 2 cc. esattamente misurati con microburetta della seguente soluzione



che corrispondono a 2 cc. di  $\text{H}_2\text{SO}_4 \frac{\text{N}}{200}$ .

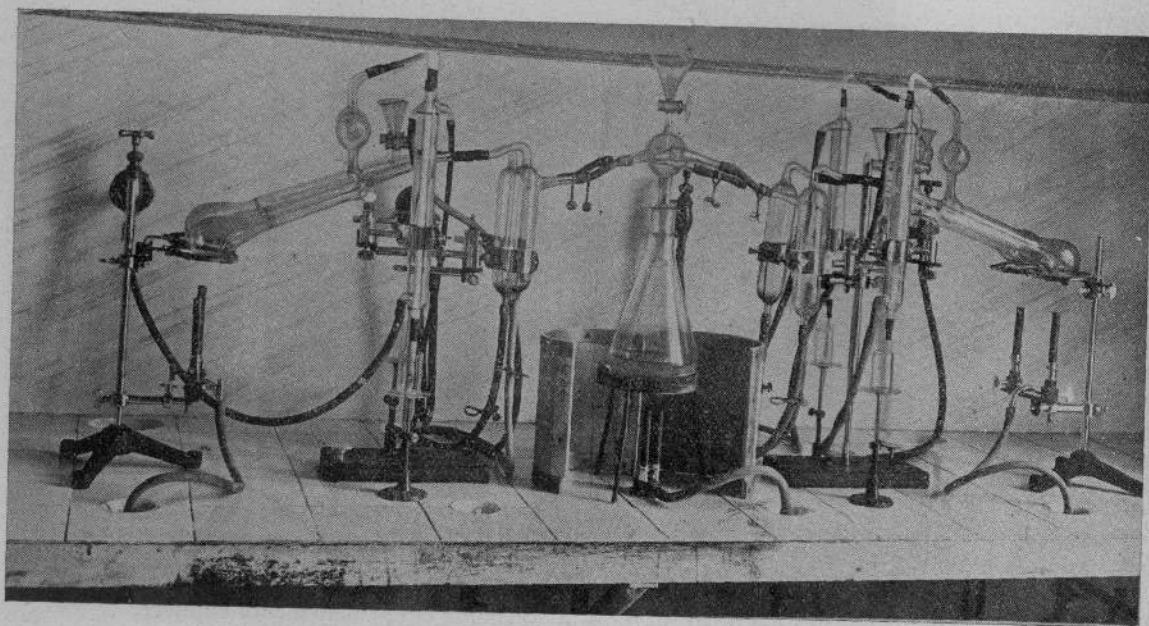


Fig. 3. - Distillazione contemporanea di quattro campioni.

I singoli palloni di distillazione sono anche riscaldati con debole fiamma, in modo da produrre, nell'ultima fase della distillazione, vapore acqueo che serve a lavare il tubo di quarzo.

Quando tutta l' $\text{NH}_3$  è distillata (al controllo con cartina di tornasole), si toglie il cilindretto graduato, avendo cura che per tutti i campioni si abbia la stessa quantità di liquido, in media di 5-6 cc. È questo un particolare della massima importanza, poiché avvenendo la titolazione per via jodimetrica, la sua sensibilità dipende dal grado di diluizione, come risulta dalla seguente tabella di nostri risultati:

01712

H <sub>2</sub> O cc.	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> $\frac{N}{70}$ cc.	KJ 10% cc.	KJO <sub>3</sub> 5% cc.	Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> $\frac{N}{140}$ cc.
20	+ 2	+ 1	+ 1	4.67
25	+ 2	+ 1	+ 1	4.52
30	+ 2	+ 1	+ 1	4.45
40	+ 2	+ 1	+ 1	una goccia
45	+ 2	+ 1	+ 1	0
50	+ 2	+ 1	+ 1	0

Con altre parole, quando la diluizione raggiunge un certo grado, la reazione iodimetrica più non avviene.

È pertanto che abbiamo munito ogni apparecchio di distillazione di adatti cilindretti di vetro pyrex, del diametro di 2 cm. e dell'altezza di 5 cm., graduati da 5 a 8 cc.

V. *Titolazione.* — Al contenuto di ogni cilindretto si aggiungono cc. 2 di KJ 5%; si chiude con un coperchietto; dopo 5 primi si aggiungono 3 gocce di salda d'amido 1%; da una microburetta si fa quindi gocciare una soluzione di Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>  $\frac{N}{200}$  fino a che il liquido agitato con un bastoncino non si decolori.

VI. *Calcolo.* — Il numero dei cc. di Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>  $\frac{N}{200}$  adoperato per la prova in bianco, meno il numero dei cc. di Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>  $\frac{N}{200}$  del campione, moltiplicato per 0,7 dà il contenuto per mille dell'N nel sangue. Il fattore costante 0,7 risulta dal calcolo che una soluzione di NH<sub>3</sub>  $\frac{N}{200}$  contiene gr. 0,07 di N per litro.

Prima di procedere alle analisi, per controllare le soluzioni e tutto il materiale usato, si prepari una soluzione di urea nota e se ne determini il contenuto in N, operando nel modo descritto.

Le analisi per ogni frazione si eseguono in doppio campione.

~~225130~~

