

MÈTODE PER A DOSIFICAR LA GLUCOSA EN PETITES QUANTITATS DE SANG FUNDAT EN EL MÈTODE DE SCALES PER A LA DOSIFICACIÓ DE LES SOLUCIONS DE SUCRES REDUCTORS

per

R. CARRASCO FORMIGUERA

En el curs dels treballs sobre sensibilitat tròfica que es realitzen en aquest Laboratori sota la direcció del doctor Pi Suñer va sorgir la necessitat de trobar un mètode que permetés dosificar la glucosa de la sang amb precisió i simplicitat i exigís l'empleu de petites quantitats de sang. Aquesta mateixa necessitat la sent tothom qui té interès a fer dosificacions de la glucosa de la sang amb l'home, i també qui es proposa, com és el nostre cas, fer diverses determinacions successives amb un mateix animal, en un espai de temps curt, la qual cosa amb els mètodes clàssics representaria una pèrdua de sang suficient per a pertorbar profundament les condicions fisiològiques de l'animal. El mètode de Bang (1) amb les darreres modificacions introduïdes en ell pel seu autor (2), i especialment amb les recomenades pel professor Asher (3), tal com l'ha publicat

(1) BANG. — Bioschem. Zeitschrift, 49, I; 1913.

(2) BANG. — Methoden z. Mikrobestimmung einiger Bbutbestandteile. Bergmann, Wiesbaden, 1916.

(3) ASHER. — Schweiz. Apotheke-Zeitung, 40/41; 1916.

En Josep M.^a Corral, en llengua castellana (1), omple certament les condicions d'ésser precis i exigir l'empleu de quantitats petitíssimes de sang; però el fet que amb aquest mètode és indispensable que la majoria de les substàncies químiques empleades siguin d'una puresa absoluta pot constituir en moltes circumstàncies, una dificultat molt considerable (2) i demés la precisió del dit mètode està condicionada per una escrupulositat estretíssima en la seva execució, fins al punt que el més petit manquement a la seva tècnica, que d'altra banda no és pas massa senzilla, treu tota valor als resultats obtinguts. Per aquestes raons tenia jo interès a trobar una altra tècnica que, omplint les condicions abans esmentades, fos, per dir-ho així, menys exigent que la del mètode de Bang.

Fa algun temps Scales havia donat a conèixer un mètode (3) extraordinàriament precis per a la dosificació dels sucres reductors, l'essència del qual és la següent: una quantitat determinada de la solució problema es fa bullir junt amb un excés de licor de Fehling, amb la qual cosa es forma òxid cuprós per l'acció reductora del sucre; posant el líquid que conté en suspensió l'òxid cuprós sota l'acció d'àcid clorhídric diluït, aquell es transforma en clorur cuprós; una part alíquota de la solució de clorur cuprós es porta dins un recipient que conté una quantitat determinada d'una solució titulada d'iode amb la qual cosa el clorur cuprós reacciona amb una part de l'iode lliure present, que entra en combinació; es mesura la quantitat

(1) CORRAL, JOSÉ M.^a DE.— *El Método microquímico de Bang para la determinación del azúcar de la sangre y las modificaciones de Asher*. Junta para la Ampliación de Estudios. Madrid, 1918.

(2) En les circumstàncies actuals m'ha estat impossible procurar-me, per exemple, clorur potàsic puríssim per a anàlisi, amb etiqueta de garantia Kahlbaum, únic que segons Bang pot ésser empleat; el preparat Merck puríssim per a anàlisi ja no dóna resultats satisfactoris.

(3) SCALES.— *Journal of Biol. Chem.*, XXIII, 81; 1915.

d'iode que queda lliure, mitjançant una solució titulada d'hiposulfit sòdic, usant una solució de midó soluble com a indicador. La diferència entre aquesta quantitat d'hiposulfit gastada i la que s'ha gastat amb una titulació control feta amb la mateixa quantitat empleada de la solució d'iode, diluïda amb aigua destil·lada, correspon a la quantitat d'iode que en la determinació quedava en llibertat; d'aquesta quantitat d'iode s'en dedueix la que havia entrat en combinació en reaccionar amb el clorur cuprós; d'aquesta la que s'havia format de clorur cuprós; d'aquesta la que s'havia format d'òxid cuprós, i d'aquesta la que hi havia de sucre reductor.

Cammidge va introduir algunes modificacions en aquest mètode, adaptant-lo a la dosificació de la glucosa en petites quantitats de sang segons una tècnica que pot resumir-se de la manera següent: (1) Es prenen 0,2 c. c. o be 0,1 c. c. de sang mitjançant una pipeta adequada i es posen dins un tub d'assaig que conté 3 c. c. de solució decinormal d'àcid acètic; passats uns cinc minuts s'hi afegeix solució saturada de clorur sòdic fins a fer tot plegat exactament 10 c. c.; llavors es posa el tub dins un bany d'aigua en ebullició on se'l deixa uns 2 minuts; passat aquest temps se l'en treu, es refreda per mitjà d'aigua corrent i es filtra a través d'un filtre sec de 5,5 cm. de diàmetre, despreciant les primeres gotes del filtrat; exactament 7,5 c. c. d'aquest filtrat es posen dins un petit vas de precipitats resistent al foc; s'hi afegeix 1 c. c. d'un licor cuproalcalí (reactiu qualitatiu de Benedict, lleugerament modificat) i 1 c. c. de solució saturada de carbonat sòdic i es posa a bullir, cobrint el vas amb un vidre de rellotge; després de 3 minuts comptats exactament des del moment en què el líquid ha començat a bullir es separa el foc i s'afegeixen a poc a

(1) CAMMIDGE. — *The Lancet*, CXCII, 4886; 1917.

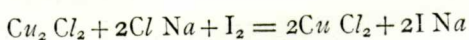
poc 2 c. c. d'àcid clorhídric concentrat (p. e. 1,16), i, ràpidament, es passa el contingut del vas dins un Erlenmeyer que conté 10 c. c. de solució mil·linormal d'iode diluïts amb 20 c. c. d'aigua destil·lada, mitjançant un embut especial de tija llarga, la punta afuada del qual està submergida en el líquid; la tija d'aquest embut travessa un forat d'un tap de goma de dos forats que porta dit Erlenmeyer, del qual tap queda lliure l'altre forat; després de rentar el vas de precipitats i la tija de l'embut amb aigua destil·lada calenta, recollint l'aigua de la loció dins l'Erlenmeyer, es dosifica l'iode que queda lliure al líquid contingut dins el mateix mitjançant una solució mil·linormal d'hiposulfit sòdic, usant midó soluble com a indicador; la diferència entre la quantitat en c. c. de la solució d'hiposulfit gastada i la quantitat de la mateixa solució gastada en una titulació control de 10 c. c. de la solució mil·linormal d'iode diluïts en 20 c. c. d'aigua destil·lada, expressada en centímetres cúbics i dècimes de c. c., multiplicada per 0,0203 o bé per 0,0406, segons que la quantitat de sang empleada hagi estat 0,2 c. c. o bé 0,1 c. c. respectivament, dóna, segons l'autor, el tant per cent de glucosa a la sang.

En assajar aquest mètode de Cammidge, seguint, al meu entendre, amb tota cura les indicacions de son autor, sigui per manca d'habilitat, sigui per impuresa dels productes químics empleats, sigui per deficiències del mètode, els resultats van ésser molt poc satisfactoris, per la qual cosa vaig emprendre una sèrie d'experiències amb l'objecte de precisar i corregir les causes d'error (1) i proporcionar-me una tècnica satisfactòria dins les condicions que abans he

(1) Les meves experiències, el detall de les quals penso donar a conèixer en una altra ocasió, crec que em permeten assegurar que la veritable o al menys la principal causa del fracàs dels meus assaigs del mètode de Cammidge consisteix en deficiències del dit mètode, o almenys de la descripció que en dóna son autor.

fixat. Actualment crec haver conseguit el meu propòsit amb la tècnica que exposo tot seguit, la qual és fruit d'alguns mesos de treball meu, si bé com se veurà i es despren del que queda dit està inspirada en els mètodes esmentats de Scales i Cammidge.

Fonament del mètode. — El fonament químic és el del mètode de Scales que es desprèn clarament del resum d'aquest mètode que es dóna més amunt. La reacció del clorur cuprós amb l'iode en presència de clorur sòdic i en mitjà de reacció àcida és aquesta:



Presa de la sang (1). — La quantitat de sang necessària és 1 c. c. (2) (aproximadament, si es vol mesurar el pes de la sang empleada, exactament, si es vol mesurar el volum de la sang empleada) o bé tan sols 0,5 c. c., si la sang és notablement hiperglucèmica. Si es tracta d'una persona, es fa una punció intravenosa amb una agulla de poc diàmetre a través de la pell (ço que acostuma resultar fàcil i poc molest); així que s'ha aconseguït introduir l'agulla dins la vena, cal suspendre la compressió del braç que s'ha fet per tal de facilitar dita punció, amb l'objecte que no quedi sang deturada; d'aquesta manera, despreciant les primeres gotes que

(1) El mètode que es descriu, pot aplicar-se a la dosificació de la glucosa al líquid cefalo-raquidià sense altra variació que substituir la punció intravenosa per la punció lumbar.

(2) Fins ara, treballant amb quantitats de sang més petites, no he pogut obtenir resultats prou satisfactoris; d'altra banda aquesta quantitat, encara que molt més gran que la que emplea Cammidge i que la que es necessita per al mètode de Bang, és de sobres prou petita per a no tenir els inconvenients de les quantitats molt més grans empleades en els mètodes clàssics. De totes maneres, jo em proposo treballar encara per a adaptar el mètode que exposo a l'empleu de quantitats més petites de sang, la qual cosa, en alguns casos, pot tenir indubtablement molts avantatges.

surten es té sang que no és estancada sinó corrent. Si es tracta d'animals es fa també una punció intravenosa, preferentment a una vena del coll; si es desitja sang arterial moltes vegades, amb una mica d'habilitat, pot introduir-se una agulla dins l'artèria femoral dels gossos a nivell de la ingle a través de la pell; si l'animal no té de sobreviure a l'experiment, o bé si es treballa amb les precaucions asèptiques necessàries pot dissecar-se i punxar-se l'artèria caròtida primitiva; si es tracta d'un experiment durant el qual s'ha de treure sang venosa diferents vegades és sumament pràctic el següent procediment, modificació lleugeríssima del que descriu En Corral en una de les seves publicacions (1): es posa i es fixa mitjançant una lligadura, una cànula venosa proveïda d'un mandril que ajusti bé dins una de les branques d'origen de la jugular externa i es tornen a ajuntar els llavis de la ferida cutània deixant que surti entre ells la cànula; cada vegada que es vol treure sang es treu el mandril de la cànula i es comprimeix la jugular externa fent pressió amb la mà esquerra damunt la pell del coll sobre el lloc corresponent; d'aquesta manera la sang procedent de la branca d'origen que no ha estat punxada, que quan no es fa pressió passa pel tronc de la jugular externa, en trobar obstruït aquest pas se'n va cap a l'altra branca d'origen i surt per la cànula; despreciant les primeres gotes, la sang que surt per aquesta és sang corrent; un cop presa la sang es descomprimeix la vena jugular externa i es posa el mandril dins la cànula.

En tots els casos un cop han sortit les primeres gotes de sang, que sempre es desprecien, s'encaixa a la cànula el cos de bomba d'una xeringueta d'injeccions de vidre ben neta i aixuta i s'aspira la sang que s'hi recull mitjançant

(1) CORRAL. — *Anales de la Junta para Ampliación de Estudios e Inv. Cien.* Tomo XVII. Memoria 3.ª, 1918, pág. 176.

una pipeta adequada. Un cop presa la sang, convé deturar immediatament la sortida de la mateixa per a evitar-ne pèrdues inútils.

Si es vol mesurar el pes de la sang empleada, ço que en general és preferible perquè ofereix majors garanties de precisió, serveix una pipeta qualsevol ben neta i seca, amb la qual s'aspira aproximadament un centímetre cúbic de sang o bé mig, si la sang és fortament hiperglucèmica, i tot seguit es vessa la sang aspirada dins un matràs d'uns 100 c. c. que conté 15 c. c. de solució decinormal d'àcid acètic (Sol. A) que han estat mesurats exactament, i es sacseja perquè la sang es barregi bé amb l'àcid acètic; el matràs contenint la solució d'àcid acètic, estant ben net i sec per la banda exterior té d'haver estat pesat prèviament amb una balança que aprecii centígrams; un cop s'hi ha afegit la sang es torna a pesar amb tota cura, i la diferència entre les dues pesades dóna el pes de la sang que s'ha pres. És indispensable que en aquestes pesades no es cometin errors superiors a un centígram.

Si es vol mesurar el volum de la sang empleada, ço que, encara que dóna menors garanties d'exactitud, en alguns casos resulta més pràctic, es necessita una pipeta d'un centímetre cúbic de llum estreta, exactament cubicada, comptant la cubicació fins a la mateixa punta i que ha d'estar ben neta i seca; s'aspira sang fins a una mica — molt poc — més amunt de la marca (1 c. c. ordinàriament, 0,5 c. c. si la sang es fortament hiperglucèmica); deseguida, amb molta cura, es fa que el nivell de la sang vingui ben bé al nivell de la marca, es neteja la part exterior de la pipeta, i especialment la punta, de la sang que pugui haver-hi adherida, amb cotó fluix o paper de filtre, i finalment es vessa la sang continguda a la pipeta dins un matràs d'uns 100 c. c. que conté 15 c. c. de solució decinormal d'àcid acètic (Sol. A), que han estat mesurats

exactament. La pipeta es renta tres o quatre vegades amb el contingut del matràs i es procura que es despreguin fins les darreres gotes de líquid que hi puguin quedar.

Desalbuminació de la sang. — Després d'uns cinc minuts (1) (més aviat llargs que no pas curts) d'haver posat la sang dins el matràs que contenia l'àcid acètic, s'hi afegeixen exactament 34 c. c. de solució saturada de clorur sòdic (Sol. B), o bé 34,5 c. c. si la quantitat de sang presa ha estat 0,5 c. c., i des seguida es posa el matràs dins un bany d'aigua en ebullició; al cap d'uns dos minuts se l'en treu i ràpidament (2) s'introdueixen dins el matràs uns 3 grams aproximadament de carbonat de magnèsia pur, polvoritzat (3), es sacseja per a obtenir una barreja força

(1) Quan se practica la mesuració del pes de la sang empleada aquests cinc minuts són més que suficients per a realitzar la pesada corresponent.

(2) En tota determinació de glucosa de la sang s'ha de tenir en compte el perill de la glucolisi. En la tècnica que descriu mentre la sang està en presència simplement de la solució d'àcid acètic, la concentració en hidrogenions és suficient per a impedir l'hemolisi; en afegir-hi la solució de clorur sòdic la gran dilució, que naturalment disminueix la valor de $[H^+]$, i la presència del clorur sòdic potser serien perilloses i per això convé portar immediatament el matràs al bany d'aigua bullent, ja que per sobre de 58° C. és segur que la hemolisi es suspèn; mes com que, segons en Corral, sembla que encara que s'arribi a 100° C. en baixar de nou la temperatura és novament possible l'hemolisi, convé procedir ràpidament perquè s'arribi a la filtració sense que la temperatura hagi baixat de 58° C.; en el filtrat probablement ja no pot produir-se la hemolisi (per les mateixes raons que aquesta no té lloc al sèrum totalment separat dels glòbuls sanguinis), però com que això, si bé és la cosa més probable no ho sé segur, és prudent continuar les operacions el més depressa possible, i si es volen ajornar les operacions posteriors (les anteriors no poden ajornar-se), el més prudent serà conservar el filtrat dins una estufa o un bany maria, la temperatura del qual no baixi de 58° C. fins al moment de continuar el treball. D'altra banda en pendre's els 35 c. c. de filtrat és necessari que aquest estigui a la temperatura ambient, per tal que aquests 35 c. c. siguin realment el 70 per 100 dels 50 c. c. de líquid en què estava diluïda la quantitat de sang presa.

(3) Aquest mètode de desalbuminació, prescindint de l'adició del carbonat magnèsic i amb la corresponent variació de les quantitats empleades, és exactament el descrit per Cammidge; en treballar amb quantitats de líquid considerables una part de les proteïnes de la sang es

completa i es filtra a través d'un filtre sec d'uns 12 cm. de diàmetre (1); es desprecien les primeres gotes que passen, i es recull el filtrat clar dins una proveta de 50 a 100 c. c. ben neta i seca.

Dosificació de la glucosa. — Quan ha passat una quantitat suficient de filtrat es refreda amb aigua corrent (el raig d'una aixeta) fins a la temperatura ambient i se'n recullen exactament 35 c. c. mesurats amb una bona pipeta cubicada fins a la punta (2) i es posen dins un matràs de vidre resistent al foc de fons rodó, d'uns 150 c. c. de capacitat. Dins d'aquest matràs s'hi posa demés 2 c. c. de la solució cuproalcalina de Cammidge (Sol. C) i 2 c. c. d'una solució saturada de carbonat sòdic (Sol. D). Aquest matràs, aguantat per una pinça amb doble nou i un suport es posa obliquament damunt un Bunsen, interposant-hi una tela metàl·lica. Aquest matràs es posa en relació amb un aparell productor o amagatzemador d'anhidrid carbònic (aparell de Kipp amb trossos de marbre i àcid clorhídric proveït de flascó rentador o bé bomba de CO₂ provista d'aparell regulador de la pressió), mitjançant un tub de goma prim, ben flexible, que porta a la seva extremitat un tubet de vidre doblegat, del qual una branca es fica dins el coll del matràs recolzant-se l'angle damunt la vora de la boca i el tub de goma damunt la pinça que subjecta el matràs; el generador

precipita en partícules tan fines que passen el paper de filtre; aquest inconvenient s'evita amb l'empleu del carbonat de magnèsia polvoritzat, que reté per adsorció les dites partícules.

(1) Convé que les dimensions del filtre siguin reduïdes per tal d'evitar la pèrdua del líquid que reté inútilment l'excés de paper.

(2) Si la graduació de la proveta en què s'ha recollit el filtrat és de tota confiança (ço que no és pas el més freqüent) no és indispensable l'empleu d'aquesta pipeta podent-se mesurar els 35 c. c. de filtrat simplement per la graduació de la proveta, si bé sempre hi ha menys causes d'error amb la pipeta. El que la pipeta sigui cubicada fins a la punta és convenient perquè la mesuració amb altre classe de pipetes exigeix que hi hagi un excés de líquid que en aquest cas no hi és pas.

o amagatzemador d'anhidrid carbònic està proveït d'una clau o pinça de pressió que permet regular la sortida del gas. Estant tancat el pas de l'anhidrid carbònic, s'encén el Bunsen i s'escalfa el contingut del matràs fins a l'ebullició; aquesta, des que comença a fer-se evident, té de durar exactament 3 minuts; uns 10 segons abans de finir aquest temps, es dona pas a l'anhidrid carbònic (1) (que no té d'entrar amb violència), i quan fa els 3 minuts justos, es separa el matràs del foc, col·locant-lo sota una bureta que conté una solució normal d'àcid clorhídric (Sol. E), de la qual se'n deixen caure 15 c. c. dins el matràs, lentament, evitant la formació excessiva de brumera i agitant suauement el matràs; desseguida, descendant la pinça al llarg del suport, es fica el matràs dins d'un bany d'aigua freda (com més freda millor; a l'estiu és quasi bé indispensable posar-hi trossos de gel) deixant-li alguns minuts, fins que el contingut del matràs es posi aproximadament a la temperatura de l'ambient (2); mentrestant es posen exactament

(1) L'empleu de l'anhidrid carbònic a partir d'aquest moment té per objecte evitar el contacte de l'aire amb la solució de clorur cuprós; és sabut que aquesta substància té una gran tendència a oxidar-se; és suficient el seu contacte amb l'aire, sobretot en calent, perquè amb una certa rapidesa vagi oxidant-se; aquesta oxidació en el nostre cas seria una causa d'error gens despreciable. Mentre dura l'ebullició la mateixa vapor d'aigua que es desprèn manté allunyat l'aire, però des del moment que termina l'ebullició fineix aquesta protecció i, al contrari, l'aspiració que es produeix dins el matràs en refredar-se el seu contingut gasós constituïria un gran perill si no es mantingués allunyat l'aire per mitjà d'algun artifici; la presència d'una gran quantitat de carbonat sòdic, preconitzada per Cammidge determina en afegir-se l'àcid clorhídric, el desprendiment d'una certa quantitat d'anhidrid carbònic, que contribueix en gran manera al desitjat allunyament de l'aire, però tement que això sigui insuficient donat que el líquid té d'ésser sacsejat i que l'aspiració de què parlava continua bona estona després que s'ha produït aquest desprendiment carbònic, m'ha semblat més prudent assegurar l'allunyament de l'aire mitjançant l'empleu d'un corrent d'anhidrid carbònic.

(2) Aquest refredament és necessari perquè d'altra manera en afegir el midó soluble en presència de la solució d'iode, estant el líquid calent o tebi, la color de l'iodur de midó no apareixeria o seria poc perceptible.

25 c. c. d'una solució cinccentinormal d'iode (Sol. F) mesurats amb una bona pipeta dins un Erlenmeyer d'uns 200 c. c. i es dilueixen amb 25 c. c. d'aigua destil·lada; des d'aquest moment el contingut d'aquest Erlenmeyer deu mantenir-se allunyat de l'aire mitjassant una atmòsfera d'anhidric carbònic per a la qual cosa s'emplea un dispositiu idèntic al descrit en la pàg. 8; el generador de CO_2 pot ésser un sol per als dos dispositius mitjassant l'empleu d'un tub de vidre en T o en Y. Quan el contingut del matràs és fred posat aquest en posició vertical, s'aspira dit contingut lentament amb una pipeta de 50 c. c., i, sense deixar-ne caure gens, es passa a l'Erlenmeyer que conté l'iode, ficant-hi la pipeta de manera que la seva punta quedi submergida en el líquid, deixant que el contingut de la dita pipeta vagi baixant per l'acció de la gravetat, i sacsejant suaument l'Erlenmeyer; després es posen uns 25 c. c. d'aigua destil·lada dins el matràs, es sacseja i es torna a aspirar el contingut del mateix amb la mateixa pipeta, amb la qual se'l porta, de la mateixa manera que abans dins l'Erlenmeyer que conté l'iode (I); un cop finida aquesta segona aspiració es tanca el pas de la corrent de carbònic que arriba al matràs; un cop ha passat dins de l'Erlenmeyer la darrera gota del contingut de la pipeta procedent de la segona aspiració, se'l torna a sacsejar suaument perquè es barregi ben bé el seu contingut i se'l posa sota una bureta de 50 c. c. plena de solució cinccentinormal d'hiposulfit sòdic (Sol. G);

(I) Procedint de la manera que queda descrita el pas de la solució de clorur cuprós a l'Erlenmeyer que conté l'iode es fa evitant quasi bé en absolut el contacte amb l'aire i de tal manera que el clorur cuprós que va entrant es troba en cada moment en presència de la major quantitat possible d'iode lliure, la qual cosa sembla ser que facilita la reacció. D'altra banda, essent el matràs de fons rodó, a la primera aspiració es pren ja la quasi totalitat de son contingut, i en diluir-se després el poc líquid que queda i aspirar-se novament pot assegurar-se que pràcticament és presa la totalitat del clorur cuprós que s'ha format.

es tanca el pas de la corrent de carbònic que hi arriba i es procedeix a dosificar l'iode que queda lliure a dit contingut de l'Erlenmeyer; per a això es deixa caure lentament solució d'hiposulfit sacsejant suaument el recipient, i quan la color bruna groguenca de l'iode ha esdevingut ja poc perceptible s'hi tiren 6 gotes d'una solució al 1 per 100 de midó soluble (Sol. H) amb la qual cosa el líquid pren una coloració blava, de vegades porpra; allavors es continua afegint solució d'hiposulfit molt lentament, sacsejant sempre, fins que mirant a través el contingut de l'Erlenmeyer sobre un fons blanc no brillant, amb llum blanca difusa, hagi desaparegut tot vestigi de color blava o porpra, quedant el líquid incolor, llegint-se llavors la quantitat de solució d'hiposulfit que s'ha gastat.

Càlcul del resultat.— Tenint en compte que gairebé sempre la solució cinccentinormal d'hiposulfit amb què es treballa no és d'una exactitud suficient, és precís titular-la per tal de saber a quina quantitat d'hiposulfit o d'iode correspon exactament una quantitat donada de la dita solució d'hiposulfit. Per a això es posen a un Erlenmeyer 25 c. c. de solució cinccentinormal d'iode, exactament mesurats, es dilueixen amb 25 c. c. d'aigua destil·lada, i es fa una titulació amb la solució d'hiposulfit, de la manera descrita, fins a obtenir la decoloració completa, usant, com abans havem dit, sis gotes de solució de midó com a indicador, llegint-se i anotant-se la quantitat gastada de solució d'hiposulfit. Aquesta titulació control ha de fer-se cada dia que es treballa, i si un mateix dia es prepara més d'una vegada la solució d'hiposulfit, cal repetir-la per cada nova solució.

Per calcular el resultat en cada determinació cal restar la quantitat que s'ha gastat de solució d'hiposulfit de la que s'ha gastat en la titulació control; amb la diferència

obtinguda, expressada en centímetres cúbics i dècimes de c. c., pot establir-se la següent proporció: $C : 25 = D : I$, en la qual C representa la quantitat de solució d'hiposulfit gastada a la solució control, 25 és la quantitat de solució d'hiposulfit que s'hauria gastat en la dita titulació si aquesta solució fos exactament cincentinormal, D representa l'esmentada diferència entre les quantitats de solució d'hiposulfit gastades a la determinació que s'està portant a cap i a la titulació control, i I la quantitat de solució d'hiposulfit que no s'hauria gastat en la determinació que es porta a cap, si la solució empleada fos exactament cincentinormal, o el que és igual, la quantitat d'iode que s'ha combinat al reaccionar amb la solució de clorur cuprós, expressada en centímetres cúbics i dècimes de c. c. de solució cincentinormal. D'aquesta proporció se'n dedueix la següent fórmula, que es plantejarà substituint els símbols D i C per les seves valors respectives: (1)

$$I = \frac{D \times 25}{C}.$$

Resolta aquesta fórmula, amb la valor de I se'n planteja i resol aquesta altra:

$$g = \frac{I - (I \times 0.12)}{10},$$

i la valor de g dóna en mil·ligrams la quantitat de glucosa

(1) Si s'han de fer diverses determinacions succesives un mateix dia pot estalviar-se el plantejament i resolució d'aquesta proporció preparant la solució cincentinormal amb tota exactitud, de la manera que es descriu a la nota de la pàgina 17. Treballant amb una solució exactament cincentinormal la valor de I s'obté senzillament restant de 25 la quantitat d'aquesta solució que s'ha gastat en la determinació que es porta a cap, expressada en centímetres cúbics i dècimes de c. c. Si s'ha de fer una sola o molt poques determinacions resulta més curt fer aquests càlculs que no pas preparar exactament la solució.

existent al líquid que ha entrat a la determinació efectuada, és a dir, en el nostre cas a la quantitat de filtrat procedent de la desalbuminació de la sang que s'ha empleat; coneguda aquesta valor, pot calcular-se fàcilment el tant per mil (o tant per cent) de glucosa existent a la sang examinada, tenint en compte que els 35 c. c. de filtrat que s'han empleat contenen el 70 per 100 de la glucosa existent a la sang presa.

Representant per g la valor que s'acaba d'obtenir, i per G la quantitat de glucosa en mil·lígrams existent a la sang presa, pot plantejar-se la proporció: $g : G = 70 : 100$, de la qual es desprèn la fórmula

$$G = \frac{g \times 100}{70} = g \times 1,428.$$

Si s'ha mesurat el pes de la sang presa encara cal plantejar la proporció: $G : x = S : 1000$ en la qual S representa la quantitat de sang que s'ha pres expressada en mil·lígrams; d'aquesta proporció es desprèn la fórmula

$$x = \frac{G \times 1000}{S},$$

resolta la qual, la valor de x dóna el tant per mil en pes de glucosa a la sang examinada.

Si s'ha mesurat el volum de la sang presa, es poden abreujar aquests darrers càlculs: si s'ha pres un centímetre cúbic, la valor de G dóna directament el tant per mil, i si s'ha pres mig centímetre cúbic, el tant per mil és igual a la valor de G multiplicada per 2. S'ha de tenir en compte que si s'ha mesurat el volum de la sang presa, les xifres que s'obtenen corresponen a tant de sucre en pes per mil de sang en volum i són per consegüent una mica superiors a les que corresponen al tant per mil en pes.

SOLUCIONS NECESSÀRIES

A. *Solució decinormal d'àcid acètic.* — Es prepara amb exactitud suficient diluint àcid acètic cristal·litzable pur amb aigua destil·lada a la proporció de 1 : 125 en volum.

B. *Solució saturada de clorur sòdic.* — Es barreja clorur sòdic puríssim per a anàlisi amb aigua destil·lada aproximadament a la proporció de 37 de sal per 100 d'aigua, en pes; es sacseja fortament, i al cap d'una llarga estona (com més temps passi millor) es filtra.

C. *Solució cuproalcalina de Cammidge.* — Es dissolen en calent 200 grams de citrat sòdic puríssim i 100 grams de carbonat sòdic anhidre puríssim (o bé 200 grams de la mateixa sal cristal·litzada) amb uns 600 c. c. d'aigua destil·lada; es deixa refredar; quan la solució és tèbia, s'hi dissolen 10 grams de bicarbonat sòdic puríssim, després s'hi afegeix lentament i remenant constantment una solució que s'ha preparat prèviament dissolent 21 grams de sulfat cúpric cristal·litzat pur amb uns 150 c. c. d'aigua destil·lada i finalment, quan la solució obtinguda és a la temperatura ambient, s'hi afegeix aigua destil·lada fins a fer 1000 c. c. de solució. Aquesta solució es conserva indefinidament (tenint-la ben tapada i millor amb pot de color) i, com diu son autor, serveix per a l'examen qualitatiu de la glucosa a l'orina usant-la de la mateixa manera que el reactiu de Benedict qualitatiu.

D. *Solució saturada de carbonat sòdic.* — Es barreja carbonat sòdic anhidre puríssim amb aigua destil·lada a la proporció de 20 de sal per 100 d'aigua, en pes; es remena fortament, es deixa passar una estona i es filtra.

E. *Solució normal d'àcid clorhídric.* — A la majoria dels laboratoris es prepara habitualment aquesta solució amb tota exactitud. Pot preparar-se amb exactitud sufi-

cient per a les necessitats del mètode diluint 84,8 c. c. de solució concentrada d'àcid clorhídric pur de densitat 1,18 (22° Baumé) amb aigua destil·lada per a fer un litre de solució.

F. *Solució cinccentinormal d'iode*.— Aquesta solució té d'ésser preparada amb la més gran escrupulositat, ja que de la seva exactitud depèn primordialment la dels resultats obtinguts; una solució tant diluïda no es conserva fàcilment, de manera que convé preparar-la cada dia que s'hagi d'empresar; com que les solucions més concentrades es conserven bé durant molt temps, el més pràctic és preparar (o adquirir d'un Laboratori de tota confiança) solució decinormal d'iode, que guardada en bones condicions es conserva bé moltes setmanes, i partint d'ella preparar per dilució la solució cinccentinormal cada vegada que es necessita. La solució decinormal d'iode es prepara dissolent uns 19 grams d'iodur potàssic puríssim (1), en uns 200 c. c. d'aigua destil·lada afegint 12,692 grams d'iode pur resublimat (pesats amb la major escrupulositat) remenant una mica fins que es dissolgui i afegint aigua destil·lada fins a fer exactament un litre de solució. Per preparar la solució cinccentinormal es prenen 10 c. c. de la solució decinormal, mesurant-los amb la més gran escrupulositat i es dilueixen amb 490 c. c. d'aigua destil·lada per a fer exactament 500 c. c. de solució, i finalment es remena.

G. *Solució cinccentinormal d'hiposulfit sòdic*.— Com la solució anterior, es fa nova cada dia que s'ha de fer servir, i es prepara diluint la solució decinormal, que es conserva bé algun temps. La solució decinormal d'hiposulfit sòdic es prepara de la següent

(1) L'iodur potàssic empleat té d'estar rigorosament lliure d'iodat perquè d'altra manera en trobar-se la solució en presència d'un líquid de reacció àcida l'iodat lliberaria una certa quantitat d'iode que desferia el títol de la solució.

manera: es dissolen uns 26 grams de la sal cristal·litzada pura amb uns 500 c. c. d'aigua destil·lada, i es completa després amb aquesta fins a 1000 c. c.; passades al menys 12 hores, i millor alguns dies, de feta la solució, es titula amb solució decinormal d'iode usant unes gotes de solució de midó com a indicador, i atenint-se al resultat de la titulació, es corregeix la solució afegint-hi la quantitat d'aigua destil·lada necessària, que es dedueix de la següent fórmula:

$$C = \frac{N \times d}{n},$$

en la qual C representa la quantitat d'aigua que cal afegir, N la quantitat de solució d'hiposulfit que ha quedat després de treure'n la que s'ha pres per a la titulació i és la que té de diluir-se, *d* la diferència entre la quantitat de solució d'hiposulfit que s'ha gastat a la titulació i la que s'hauria tingut de gastar, i *n* la quantitat de solució d'hiposulfit que s'ha gastat a la titulació, totes aquestes quantitats expressades en centímetres cúbics.

La solució cincentinormal es prepara prenent exactament 10 c. c. de solució decinormal, afegint-hi 490 c. c. d'aigua destil·lada per a fer exactament 500 c. c. de solució, i agitant (1).

(1) La solució decinormal d'hiposulfit acostuma a alterar-se lleugerament, de manera que la solució cincentinormal preparada de la manera que s'acaba de descriure no acostuma a ésser d'una exactitud perfecta i això és el que fa necessària la seva titulació i la realització dels càlculs necessaris per a trobar la valor de I descrits a la pàgina 10.

Per preparar aquesta solució amb tota exactitud per als casos a que es fa referència a la nota de la pàgina 13 es prenen 10'5 c. c. de solució decinormal d'hiposulfit, es dilueixen amb 489'5 c. c. d'aigua destil·lada i es remena, després es titula aquesta solució amb la solució cincentinormal d'iode i es corregeix, afegint-hi l'aigua destil·lada necessària valent-se de la fórmula exposada en descriure la preparació de la solució decinormal.

H. *Solució de midó.* — Es posen dins un recipient que pugui anar al foc 0,5 grams de midó soluble (Merck, Kahlbaum o Poulenc) i 50 c. c. d'aigua destil·lada, es sacseja i s'escalfa fins a l'ebullició, que es sosté durant un minut aproximadament; després es deixa refredar i es filtra. La solució té d'ésser ben clara i s'ha d'emplear sempre en fred. Si no es té midó soluble, també pot emplear-se engrut de midó al 1 per 100 preparat de fresc.

MATERIAL NECESSARI

No es necessita cap aparell especial; la llista del material indispensable es desprèn fàcilment de la descripció de la tècnica. Es convenient que cada una de les pipetes empleades es destini sempre al mateix ús, i exclusivament a un sol ús. Han d'extremar-se les habituals precaucions de netedat pròpies de tot treball químic delicat.

DOBLES DETERMINACIONS

Per tal d'aminorar el marge d'error possible, és molt convenient fer sistemàticament dobles determinacions. Poden fer-se per duplicat totes les operacions, ja des de la presa de sang; però el més pràctic és pendre d'una sola vegada la sang necessària per a les dos determinacions, empleant una pipeta adequada, rebre aquesta sang dins un matràs que contingui solució decinormal d'àcid acètic en quantitat doble de la que abans s'ha indicat (30 c. c. en comptes de 15 c. c.); afegir una quantitat també doble de la que s'ha dit de solució de clorur sòdic (68 c. c. o 69 c. c. en comptes de 34 c. c. o 34,5 c. c., respectivament); posar una quantitat doble de carbonat magnèsic (6 grams en lloc de 3 grams) i filtrar; del filtrat s'en recullen per separat dos vegades 35 c. c. i les altres operacions es realitzen ja per duplicat.

Les diferències entre els resultats de les dues operacions d'una doble determinació, no acostumen ésser superiors a 0,10 mgr., i molt sovint són molt més petites, de manera que tenint en compte que es treballa sempre amb quantitats de sucre d'una mica menys d'un mg. fins a 2 ó 3 mgr. el marge d'error del mètode resulta pràcticament tant petit almenys com el del mètode de Bang.

Agraeixo moltíssim l'ajuda que amb llurs consells o d'altra manera he rebut del meu mestre, Dr. Pi Suñer, dels Professors Dr. Bellido, Dr. Rocasolano, P. Vitoria, Dr. Garcia Banús i Dr. Casamada i dels ajudants d'aquest Laboratori Sr. Gómez Bosch i Sr. Duran.

Laboratori de Fisiologia de la Facultat de Medicina.

NOTA ADDICIONAL. — Durant el temps comprès entre la presentació d'aquest treball a la SOCIETAT DE BIOLOGIA i la correcció de les proves del mateix, l'autor ha pogut convencer's de la conveniència d'introduir les següents lleugeres modificacions a la tècnica descrita:

1.^a Quan cal fer vàries preses de sang successives a un mateix animal en comptes de deixar dins la vena una cánula permanent, en la forma descrita a la pàg. 92, és millor dissecar incompletament la vena que es desitgi i fer una punció cada vegada amb una cánula prima.

2.^a Quan es desitja mesurar el pes de la sang empleada, en comptes de pendre aquesta deixant que penetri dins el cos de bomba d'una xeringa (v. pàg. 92) de la qual s'aspira amb una pipeta, és millor emplear una xeringa completa,

ben neta i seca, amb la qual s'aspira la quantitat aproximada de sang que es desitja, i amb la qual és aquesta projectada dins el matràs que conté l'àcid acètic.

3.^a Per a la pesada de la sang, quan no es disposa de balances que tinguin a l'hora precisió d'uns 0,005 gr. i força de més de 50 gr., en contes de fer la pesada en el mateix matràs en que s'ha de fer la desalbuminació (vegis pàg. 93), és millor fer la pesada dins un matrasset o Erlenmeyer d'uns 50 c. c. dins el qual s'ha posat la solució d'àcid acètic i ha estat tarat i després tapat amb un vidre de rellotge fins el moment d'introduir-hi la sang; després de la pesada, passats al menys 5 minuts de l'introducció de la sang, es vessa el contingut del matrasset dins un altre de més gran (100 a 150 c. c.) al qual s'hi afegeix la solució saturada de clorur sòdic (v. pàg. 94) amb la qual es renta prèviament el matrasset petit per tal de que els darrers residus del contingut d'aquest passin dins el matràs gran.

4.^a L'empleu d'una solució saturada de carbonat sòdic és innecessari (v. pàg. 101); en canvi convé emplear major quantitat de reactiu cupro-alcalí; així doncs dins el matràs en que es té que realitzar la reducció, demés el filtrat procedent de la desalbuminació, en lloc de posar-hi 2 c. c. de solució de Cammidge i 2 c. c. de solució saturada de carbonat sòdic, cal posar-hi 6 c. c. de solució de Cammidge i no posar-hi solució saturada de carbonat sòdic.

5.^a No és indispensable l'empleu de tela metàl·lica; mes cal aixugar ben bé la superfície externa del matràs abans de posar-lo damunt el foc.

6.^a Com a conseqüència de la modificació 4.^a, en contes d'afegir-se 15 c. c. de solució normal de CIH (v. pàg. 96) cal afegir-n'hi 26 c. c.

7.^a La solució normal de CIH deu ésser preparada amb tota exactitud i per consegüent no te valor la preparació aproximada de la mateixa que es descriu a la pàg. 102.

8.^a No convé que per l'Erlenmeyer que conté la solució de iode (v. pàg. 97) hi passi una corrent d'anhídrid carbònic, de manera que per tal d'evitar el contacte del seu contingut posterior amb l'aire cal fer passar una corrent de CO₂ per l'Erlenmeyer abans de posar-li el iode; un moment abans de posar-li deu deturar-se el pas de la corrent, i després cal tapar l'Erlenmeyer amb un tap de goma fins al moment d'introduir-hi el contingut del matràs en que s'ha fet la reducció; després d'aquesta introducció deu fer-se *immediatament* i ràpida la titulació.

9.^a Com a conseqüència de la modificació 4.^a al terminar-se la titulació, el líquid en contes de quedar incolor resta amb un lleuger to verdós, que es distingeix molt bé dels darrers vestigis del to blau del iodur de midó.

La precisió del mètode a què es fa referència a la pàgina 105 s'obté amb seguretat tan sols empleant les modificacions descrites, que ja havien estat assajades en donar a l'impremta els dos darrers paràgrafs del treball que precedeix.