DISPERSIONE ANOMALA DELLA OSSIEMOGLOBINA.

Nota del Dott. L. PUCCIANTI.

(Da una comunicazione fatta alla Società Italiana di Fisica
nella adunanza tenuta in Bologna il 24 Settembre 1901).

1. Le proprietà di questa sostanza importantissima nella vita animale insieme con quelle di altre, che vi si connettono, *emoglobina*, *carbossi-emoglobina*, *metaemoglobina* ecc., sono state oggetto di molte ricerche, e si trovano ampiamente descritte nei trattati di chimica biologica.

Gli spettri di assorbimento in particolare hanno un grande interesse, perchè essi ci danno modo di riconoscere facilmente e anche, coll' aiuto dello spettrofotometro, di dosare quantitativamente queste sostanze nelle loro soluzioni acquose.

Lo spettro di assorbimento dell' ossiemoglobina presenta due bande caratteristiche: una α tra il giallo e il verde, che si estende da $\lambda = 0^{\mu},5888$ a $\lambda = 0^{\mu},570$ l'altra β tra il verde e l' azzurro verdastro, da $\lambda = 0^{\mu},550$ a $\lambda = 0^{\mu},530$ ¹⁾.

2. Ora, siccome queste bande sono visibili, anche in soluzioni molto diluite, con strati di non grande spessore e con strati sottilissimi in soluzioni mediocrementemente ricche, era da aspettarsi che esse avessero un' influenza sensibile sugli indici di rifrazione, che cioè si presentasse il fenomeno della *dispersione anomala*. Ed il Prof. Ròiti mi suggerì di farne la ricerca.

Qualche esperienza preliminare, eseguita col metodo dei prismi incrociati, mi permise già di scorgere, sebbene a gran fatica, leggerissime inflessioni nello spettro, in corrispondenza delle bande; ma mi persuase al tempo stesso, che questo metodo, il quale pure dà ottimi risultati con sostanze più

1) Hénuoque. — Applications de la Spectroscopie à la Biologie. — Rapports présentés au Congrès International. Paris 1900.

intensamente colorate, non era adatto alla mia ricerca, e che era necessario ricorrere ad un metodo molto più sensibile.

3. Adoperai adunque un metodo interferenziale coi mezzi e colla disposizione, che ora descriverò in succinto. Gli strumenti da me usati sono:

1° Un rifrattometro di Jamin costruito dalla Casa Duboscq, che munivo di una vaschettina di vetro a faccie piane e parallele, divisa in due scompartimenti.

2° Uno spettrometro di Steinheil di grande modello, munito di un prisma composto, che permetteva, con medio ingrandimento del cannocchiale, di vedere le due linee D_1 , D_2 , distintamente separate l'una dall'altra.

Questi strumenti sono disposti e fissati sopra un banco di marmo, formando la combinazione che passo a descrivere.

La luce del sole o di una lampada ad arco, raccolta da una lente L (fig. 1) traversa il rifrattometro di Jamin S_1 , S_2 ,

Fig. 1.

e per mezzo di una piccola lente acromatica l forma le frangie reali sopra la fenditura dello spettrometro, nel campo del quale si vedono tanti sottili spettri sovrapposti, quante sono le frangie chiare, separati tra loro da strisce nere, e convergenti dal rosso al violetto; anche ad essi per brevità darò il nome

di frangie. Un filo di bozzolo, teso attraverso alla fenditura, proietta nel campo una linea nera orizzontale, che serve di riferimento.

Lo spettrometro è munito, nel piano focale del cannocchiale di osservazione, di reticolo, ed è graduato, portando successivamente a coincidere il filo verticale di questo con un buon numero di righe dello spettro solare, e costruendo una curva avente per ascisse le lunghezze d'onda e per ordinate le posizioni del cerchio graduato.

4. Per fare le misure si mette a posto la vaschettina a due scompartimenti V in modo, che uno dei raggi passi per uno degli scompartimenti, e l'altro per l'altro, e si pone acqua in tutti e due.

Spostando convenientemente il compensatore C e lo specchio mobile del rifrattometro, si fa in modo che una frangia oscura coincida per tutta la lunghezza dello spettro colla linea di riferimento.

Aggiungendo allora goccia a goccia una soluzione di ossiemoglobina di media concentrazione, e agitando via via il liquido, si nota lo spostamento delle frangie, e si conta quante ne passano attraverso alla linea di riferimento in una determinata posizione spettrale.

Dopo aggiunta una certa quantità di soluzione, l'aspetto dello spettro frangiato è quello indicato schematicamente dalla figura 2.

Le frangie sono più nette nella parte rossa e aranciata, e più sfumate nel resto dello spettro, dove l'assorbimento della ossiemoglobina indebolisce uno dei raggi rispetto all'altro, e massimamente in corrispondenza delle due bande α e β . Ciò segna un limite alla sensibilità del metodo, perchè, se si continuasse ad aggiungere altra sostanza colorante, si renderebbe troppo slavata l'immagine, nella parte appunto che più interessa di osservare.

5. Ma quel che più è degno di nota è la forma che prendono le frangie. Lo spostamento è avvenuto nel caso nostro dal basso all'alto, ma siccome son passate più frangie nella

parte più rifrangibile, ecco che tutto il sistema delle frangie è inclinato, ed oltre a ciò in corrispondenza delle bande di assorbimento α e β le frangie presentano un'inflessione, la quale

Fig. 2.

mostra che in questa regione dello spettro il ritardo del raggio trasmesso dalla soluzione rispetto a quello trasmesso dall'acqua varia colla lunghezza d'onda, in modo non regolare; mostra cioè che vi è in corrispondenza delle due bande d'assorbimento una irregolarità anche nella curva di dispersione.

Spostando ora il cannocchiale, si può determinare in ciascun punto dello spettro, la cui posizione si ha dalla lettura del circolo graduato, quante frangie sono passate attraverso alla linea di riferimento.

Io facevo questa determinazione nei punti d'incontro delle frangie nere colla linea di riferimento, e poi anche in altri punti, apprezzando a occhio il decimo di frangia. Siccome in tutti i punti dello spettro facevo sempre passare più di dodici frangie, l'errore che potevo commettere sullo spostamento totale non poteva superare l'uno per cento, dato che non intervenissero altre cause d'errore. L'errore sulla lunghezza d'onda era del tutto insignificante per tal genere di misure.

Moltiplicando il numero di frangie passate per la rispettiva lunghezza d'onda, si ottiene il ritardo di fase, misurato in lunghezza, e così si può costruire la curva dei ritardi, che basta già da sola a dare idea delle anomalie di dispersione, e può servire a calcolare la curva degli indici di rifrazione della soluzione, relativi all'acqua, che è il fine della ricerca.

Per tal calcolo serve la formula :

$$n = 1 + \frac{r}{n_1 s}$$

dove n è l'indice ricercato, n_1 l'indice dell'acqua relativo all'aria, r il ritardo e s lo spessore dello strato nella stessa unità di misura per es. in μ . Nel mio caso era $s = 9000$.

6. Io ho fatto le esperienze nel modo descritto con un preparato di emoglobina commerciale (estratto di emoglobina della farmacia Krewell e C^o. di Colonia) che, sciolto in acqua, in presenza di aria, offriva ben netto lo spettro caratteristico dell'ossiemoglobina.

La figura 3 contiene le curve dei ritardi N.^o 1, 2, 3, 4, 5. In esse le ascisse rappresentano le lunghezze d'onda che sono indicate in μ dai numeri sopra e sotto. Le ordinate rappresentano i ritardi indicati in μ dai numeri scritti a sinistra di ciascuna curva.

Le esperienze sono state fatte in modo che nella regione della banda α , ove le frangie hanno sempre un piccolo tratto orizzontale, passassero tutte le volte 15 frangie; quindi le curve ottenute dovrebbero esser tutte identiche, e le divergenze sono da imputare a errori di misura, o ad alterazioni della sostanza.

Ho fatto adunque la media delle ordinate corrispondenti a un gran numero di ascisse di queste curve, e ho tracciato la curva media N.^o 6, da cui per mezzo della formula riferita sopra, sono passato alla curva N.^o 8 *a* avente per ordinate gli indici relativi all'acqua.

7. Per riprova eseguii una serie di misure anche usando il sangue fresco. Questo venne estratto dalla giugulare di un cane, e immediatamente sbattuto all'aria con un fuscellino per ossigenarlo, e nello stesso tempo per defibrinarlo; quindi, tolto il coagulo, fu molto diluito con acqua, e il liquido agitato e filtrato.

Con questa rapida preparazione ero certo che la ossiemo-

Fig. 3.

globina, (unica sostanza colorante che si trovi nella soluzione) non si era alterata ¹⁾).

La curva dei ritardi è quella N. 7, la curva degli indici è quella N. 8 *b*.

Anche questa volta si fecero passare 15 frangie nella regione α , ma le caratteristiche di queste curve sono più pronunziate di quelle delle corrispondenti, ottenute col preparato; e ciò a causa della maggior purezza del composto.

8. Dopo ciascuna serie di misure, portavo il vasetto davanti alla doppia fenditura di uno spettrofotometro di Glan in modo che lo scompartimento pieno d'acqua coprisse la semifenditura inferiore, e lo scompartimento contenente la soluzione quella superiore, e determinavo il coefficiente di estinzione nella regione $\lambda = 0\mu,554 - 0\mu,565$, e da esso calcolavo ²⁾ la concentrazione che è scritta a lato destro delle curve (fig. 3).

Per il sangue fresco si ottiene un numero notevolmente maggiore; e ciò conferma quanto è detto sopra riguardo alla purezza del composto.

Per mostrare la relazione tra le curve dei ritardi e degli indici colla curva di assorbimento, ho riprodotto nella fig. 3 N.° 9 una porzione di spettro di assorbimento determinato collo spettrofotometro Glan, usando l'estratto di emoglobina Krewell. Queste determinazioni furono eseguite dal Dott. Giulio Marzichi.

9. I risultati delle mie esperienze mancano di un accordo quantitativo soddisfacente, che non sarebbe facile, io credo, di ottenere, visto che la sostanza nelle soluzioni si mantiene inalterata poco tempo, e che le variazioni dell'indice che si misuravano, sono piccolissime, comprese tutte dentro 3 unità della 5^a decimale.

L'accordo qualitativo è invece perfetto, perchè i tratti ascendenti e discendenti si corrispondono in tutte le curve senza eccezione.

1) Compio il gradito dovere di ringraziare il Prof. Filippo Bottazzi che mi sovvenne di consigli e d'opera per la parte fisiologica di questa ricerca.

2) Hufner Arch. f. Physiolog. 1894.

Le due curve degli indici, se non danno valori esatti, descrivono fedelmente la maniera della dispersione, e permettono di concludere:

1° Le soluzioni acquose di ossiemoglobina presentano il fenomeno della dispersione anomala nella parte visibile dello spettro.

2° L'indice di rifrazione relativo all'acqua cresce colla lunghezza d'onda nell'interno delle bande caratteristiche, e decresce nel resto dello spettro.

Ringrazio il Prof. Ròiti dei mezzi che ha posto a mia disposizione per la presente ricerca.

Firenze, R. Istituto di Studi superiori, Luglio 1901.

**SUL COEFFICIENTE MEDIO DI TRASPARENZA DELL'ARIA
PER GRANDI VISUALI TERRESTRI,
di EMILIO ODDONE ¹⁾.**

Sul coefficiente medio di trasparenza dell'aria per l'insieme delle radiazioni luminose che compongono un raggio solare si hanno esperienze, le quali sono o tutte comprese entro distanze minori di un chilometro o subito di gran lunga sorpassano questa distanza, riferendosi agli ipotetici spessori dell'atmosfera nelle varie direzioni.

Le determinazioni terrestri per distanze decrescenti a partire da un chilometro sono dovute per lo più a Saussure, Beer e Schlagintweit, ed a Wild quelle di laboratorio per distanze di qualche metro.

Le determinazioni astronomiche per una trasmissione attraverso l'intera atmosfera richiamano i nomi ben noti di Bouguer, Seidel, Pritchard, Muller, Langley ed Abney.

Queste serie di determinazioni, entro qualche centinaio di metri e subito oltre un'atmosfera, presentano una tale inter-

¹⁾ Rendiconti del R. Ist. Lomb. di Sc. e Lett., serie 2, vol. 34, 1901. Nota di pag. 24.