

Metodi spettrofotometrici per la determinazione delle vitamine B₆

ALDO GAUDIANO E MARIA POLIZZI-SCIARRONE

Laboratori di Biologia

Riassunto. — Vengono riportati gli spettri d'assorbimento nell'U. V. delle varie vitamine B₆ in soluzione neutra, acida e alcalina e ne vengono studiate le alterazioni col tempo e l'applicabilità a scopo analitico.

Viene inoltre fatto un esame critico dei principali metodi spettrofotometrici utilizzabili per la determinazione del piridossolo e del piridossalfosfato. Per il primo si consiglia il metodo con dietil-p-fenilendiammina oppure quello con 2,6-diclorochinonclorimide, opportunamente modificato. Per il secondo si consiglia il metodo proposto dagli AA., basato sulla formazione di una base di Schiff con glicina e sua successiva decomposizione con bisolfito; la differenza di estinzione a 395 m μ è proporzionale alla concentrazione di piridossalfosfato; in determinate condizioni di pH e di concentrazione in glicina, il piridossale non interferisce.

Summary (*Spectrophotometric methods for determining vitamins B₆*). — The spectra of the various B₆ vitamins (pyridoxol, pyridoxal, pyridoxal-phosphate, pyridoxamine, pyridoxamine-phosphate) are reported at various pH. The spectra behave similarly, except for the pyridoxal-phosphate; at pH 1 there is a maximum around 290 m μ ; at pH 7, two maxima at 252-254 and at 324-325 m μ ; at pH 13, there are the same two maxima, but in the direction of the minor wave lengths.

The spectral variations accompanying the photo-chemical alterations in the above compounds are also reported on, and the most suitable conditions for direct spectrophotometric determination are suggested.

The methods most commonly used for the spectro-photometric determination of pyridoxol and pyridoxal-phosphate are then discussed; those advised are the diethyl-p-phenylendiamine method, the method using dichlorochinon-chloroimide modified for pyridoxol and the glycine method, which is the one proposed by the Authors, or else the thiophen method for pyridoxal-phosphate.

Il nome di vitamina B₆ o piridossina viene spesso usato oggi non solo per il piridossolo (POL), prima denominato piridossina, ma anche, in senso

più lato, per i suoi derivati piridossale (PL) e piridossal fosfato (PLP), piridossamina (rM) e piridossaminofosfato (PMP).

La recente introduzione delle forme coenzimaticamente attive (PLP e PMP) in alcuni preparati farmaceutici ci ha indotto ad un esame critico dei metodi analitici applicabili ai singoli componenti del complesso vitaminico B₆ e ad una ricerca sperimentale in tal senso.

I metodi biologici, a parte i loro ben noti inconvenienti, non permettono di differenziare le varie forme vitaminiche. Per quanto riguarda i metodi microbiologici, è noto che alcuni ceppi rispondono indifferentemente ai vari tipi di vitamina B₆, altri sono specifici per le singole forme. Purtroppo non è possibile distinguere per via microbiologica gli esteri fosforici dai corrispondenti prodotti non fosforilati, mentre occorre poter fare questa distinzione nell'analisi farmaceutica, perchè i primi, che sono i veri coenzimi, hanno un prezzo notevolmente più elevato degli altri. Restano quindi i metodi chimici e chimico-fisici, ed in particolare quelli spettrofotometrici, che, per le loro doti di sensibilità, precisione, rapidità e semplicità, sono i più generalmente usati.

Dopo aver preso in esame le possibilità analitiche offerte dalla spettrofotometria diretta, esamineremo singolarmente i principali metodi finora proposti per la determinazione del POL, discutendo le loro caratteristiche e l'eventuale applicabilità agli altri componenti del gruppo B₆. Prenderemo successivamente in esame le reazioni proposte per la determinazione del PLP, che è la forma coenzimatica di questo gruppo più usata nei preparati farmaceutici.

SPETTROFOTOMETRIA DIRETTA

Abbiamo preso in esame gli spettri di assorbimento delle varie vitamine B₆ a diversi pH per vedere entro quali limiti la spettrofotometria diretta sia impiegabile a scopi analitici.

Nonostante che gli spettri di questi composti, e specialmente del POL, siano riportati da diversi AA., i risultati finora pubblicati sono lacunosi e talora contrastanti fra di loro (vedi per es.: KERESZTESY & STEVENS (1938); SCUDI, BASTEDO & WEBB (1940); HOCHBERG, MELNICK & OSER (1944); MELNICK *et al.* (1945); UMBREIT, O'KANE & GUNSALUS (1948); VACHER & FAUCQUEMBERGUE (1949); HEYL *et al.* (1951); LUNN & MORTON (1952); METZLER & SNELL (1952); WILLIAMS & NEILANDS (1954); PETERSON & SOBER (1954); BONAVITA (1960); SNELL *et al.* (1963); STORVICK *et al.* (1964)).

Le misure sono state eseguite con lo spettrofotometro registratore Beckman DK 2, su soluzioni 10⁻⁴ M a tre diversi pH.

Nella scelta dei tamponi bisogna aver cura di evitare i borati (che formano complessi con diverso spettro di assorbimento) e, nelle misure con PL e PLP, i composti amminici (glicina, tris, etanolamina), che formano basi di Schiff. Ci siamo serviti di HCl N/10 (pH 1), dei fosfati secondo Sørensen

(pH 7) e di NaOH N/10 (pH 13). Gli spettri sono stati rilevati sulle soluzioni appena preparate e poi di nuovo, a intervalli di alcuni giorni, sulle stesse soluzioni lasciate alla luce diffusa del laboratorio.

A pH 1 il POL ha un massimo di assorbimento a 290-291 $m\mu$; col passare del tempo la lunghezza d'onda del massimo resta invariata, mentre l'intensità dell'assorbimento diminuisce di pochissimo. Analogamente si comportano PL, PM, PMP, i cui massimi sono, rispettivamente, a 286-287, a 292 e a 292-293 $m\mu$.

La pratica inalterabilità dello spettro dipende dalla grande stabilità in ambiente acido e non dal fatto che a pH 1 i prodotti di alterazione abbiano lo stesso spettro delle vitamine inalterate: infatti soluzioni neutre o alcaline alterate avevano, dopo acidificazione, un assorbimento molto minore di quello delle soluzioni preparate di fresco e, d'altra parte, soluzioni acide preparate da tempo presentavano, una volta portate a pH 7 o 13, il relativo spettro delle vitamine inalterate. Comportamento diverso ha il PLP, il cui spettro ha due massimi: uno a 294-295 e un altro, assai meno intenso, a 333-335 $m\mu$. L'alterazione del prodotto influisce specialmente sul secondo massimo, che tende a scomparire.

A pH 7 il POL presenta due massimi di assorbimento a 253-254 e a 324 $m\mu$ (Fig. 1); man mano che la soluzione si altera, il primo massimo subisce uno spostamento ipercromo e batocromo, il secondo mostra solo una diminuzione di intensità, mentre la lunghezza d'onda resta quasi costante.

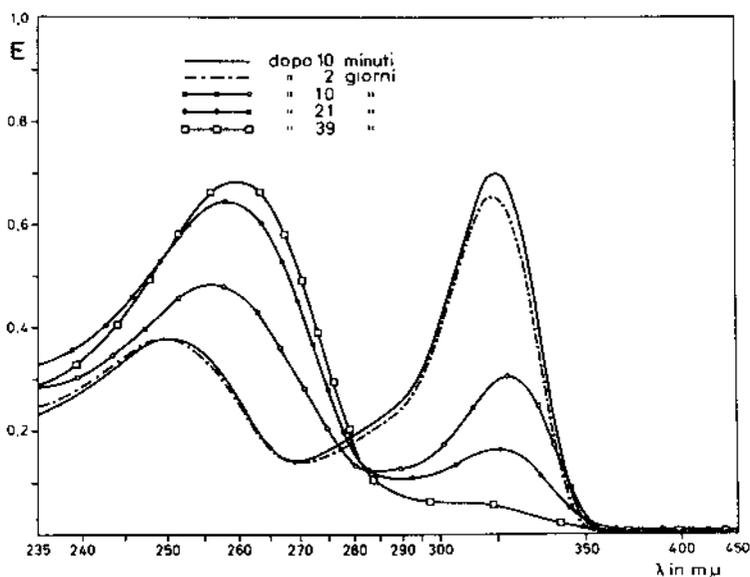


Fig. 1. - Spettri di assorbimento, a tempi diversi, del piridossolo ($10^{-4}M$) in tampone fosfato M/15 a pH 7.

Il PL ha uno spettro simile al precedente, con due massimi a 252-253 e a 315 $m\mu$ (Fig. 2); al procedere dell'alterazione entrambi i massimi, soprat-

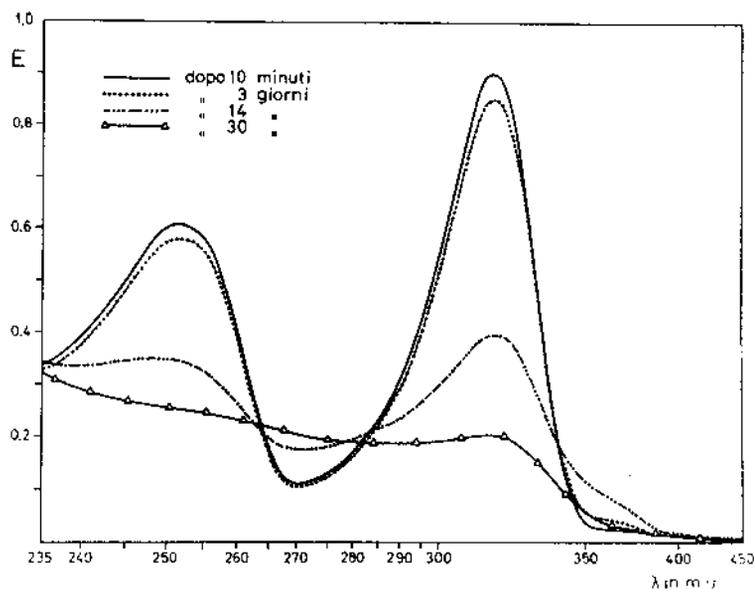


Fig. 2. — Spettri di assorbimento, a tempi diversi, del piridossale (10^{-4} M) in tampone fosfato M/15 a pH 7.

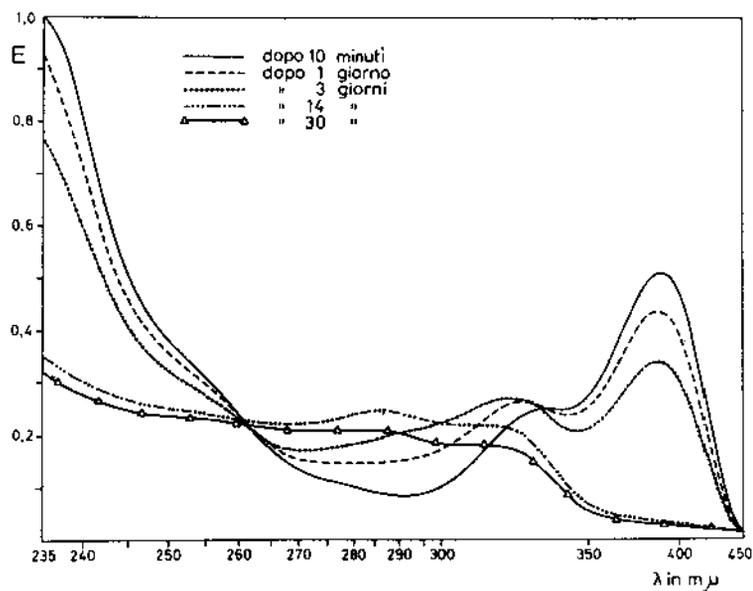


Fig. 3. — Spettri di assorbimento, a tempi diversi, del piridossal-fosfato (10^{-4} M) in tampone fosfato M/15 a pH 7.

tutto il secondo, diminuiscono di intensità. Il PLP mostra un massimo a 388-390 $m\mu$ e un'inflexione intorno a 330-335 $m\mu$ (Fig. 3); nel prodotto alterato il massimo si appiattisce, fin quasi a scomparire, mentre cresce l'assorbimento alle lunghezze d'onda più basse. PM e PMP hanno uno spettro quasi uguale, con due massimi: uno a 252-253 e l'altro, più alto, a 324-325 $m\mu$; l'alterazione della soluzione si manifesta con un aumento di intensità del primo massimo e una diminuzione del secondo.

A pH 13 il POL ha due massimi, a 245 e a 309 $m\mu$, che diminuiscono d'intensità, specialmente il secondo, nella soluzione alterata, mentre la lunghezza d'onda subisce solo piccoli spostamenti. Lo spettro del PL presenta tre massimi, a 240-241, a 299-300 e a 388-390 $m\mu$ (Fig. 4). Tutti e tre i mas-

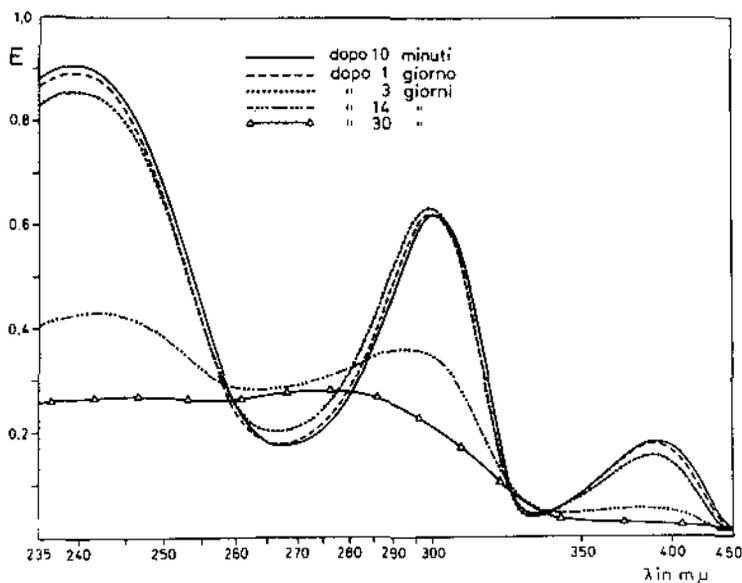


Fig. 4. — Spettri di assorbimento, a tempi diversi, del piridossale (10^{-4} M) in NaOH N/10.

simi, ma specialmente il terzo, diminuiscono di intensità nelle soluzioni alterate. Non molto diverso è, questa volta, lo spettro del PLP, che presenta un flesso intorno a 265 $m\mu$, un massimo poco accentuato intorno a 300 $m\mu$ e un altro massimo, assai evidente, a 388-390 $m\mu$ (Fig. 5). Man mano che la soluzione si altera, si sviluppa il massimo a 300 $m\mu$, che si sposta a 296 $m\mu$, mentre subisce uno spostamento debolmente ipsocromo e si appiattisce fin quasi a scomparire il massimo a 388-390 $m\mu$. Quasi uguali fra di loro sono gli spettri del PM e del PMP, con due massimi a 244-245 e a 308-310 $m\mu$;

l'alterazione delle soluzioni causa una diminuzione dell'intensità, insieme con piccoli spostamenti della lunghezza d'onda.

Si può concludere che, a parte il PLP, lo spettro delle altre vitamine B₆ mostra un comportamento analogo: a pH 1 un solo massimo, intorno a 290 m μ ; a pH 7 due massimi: uno a 252-254 e l'altro, più alto, a 324-325 m μ ; a pH 13 POL, PM e PMP mostrano gli stessi due massimi che a pH 7, ma entrambi spostati verso le lunghezze d'onda minori; il PL, oltre a questi due massimi, ancora più spostati nello stesso senso, ne ha un terzo, meno accentuato, a 388-390 m μ . Lo spettro del PLP a pH 13 non è molto diverso da quello del PL; se ne differenzia maggiormente a pH 1 e, soprattutto, a pH 7.

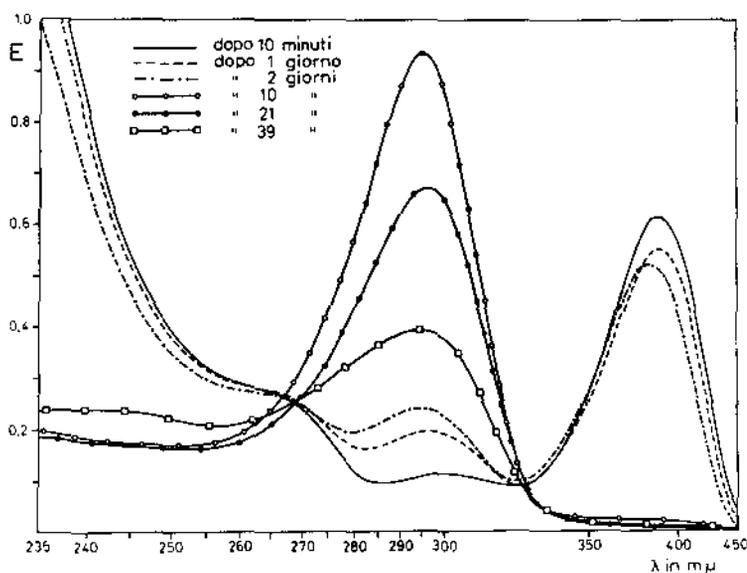


Fig. 5. — Spettri di assorbimento, a tempi diversi, del piridossal-fosfato (10^{-4} M) in NaOH N/10.

La differenza di comportamento fra PL e PLP è stata attribuita da HEYL *et al.* (1951) alla possibilità che ha il PL di esistere nella forma aldeidica normale, in quella aldeidica chinoide (colorata) e in una forma ciclica emiacetalica, mentre il PLP, avendo il gruppo alcolico esterificato, può esistere solo nelle prime due forme; più recentemente ANDERSON & MARTELL (1964) hanno messo in evidenza, mediante la spettrofotometria I.R., che a bassi valori di pH il carbonile del PL è idratato e forma un emiacetale, ma è trasformato in carbonile libero in maggiore misura man mano che il pH cresce. Infatti noi troviamo che a pH 13 la differenza fra gli spettri del PL e del PLP si attenua.

Per quanto riguarda le applicazioni analitiche, la spettrofotometria diretta non permette di distinguere nettamente fra loro POL, PM e PMP, a nessun pH.

A pH 1 e a pH 7 si possono distinguere dai precedenti e fra di loro il PLP e il PL. A pH 13 si accentua la differenza fra POL, PM e PMP da un canto e PL e PLP dall'altro, ma si attenua la differenza tra PL e PLP.

Le condizioni migliori per la determinazione quantitativa sono per POL, PM e PMP a 324 $m\mu$ in soluzione a pH 7 (i rispettivi valori di $E_{1cm}^{1\%}$ sono 350 per POL. HCl, 340 per PM. 2HCl e 345 per PMP anidro), per PL a 315 $m\mu$ a pH 7 ($E_{1cm}^{1\%} = 435$) o a 389 $m\mu$ a pH 13 ($E_{1cm}^{1\%} = 90$), per PLP a 389 $m\mu$ a pH 7 ($E_{1cm}^{1\%} = 205$) o a pH 13 ($E_{1cm}^{1\%} = 260$).

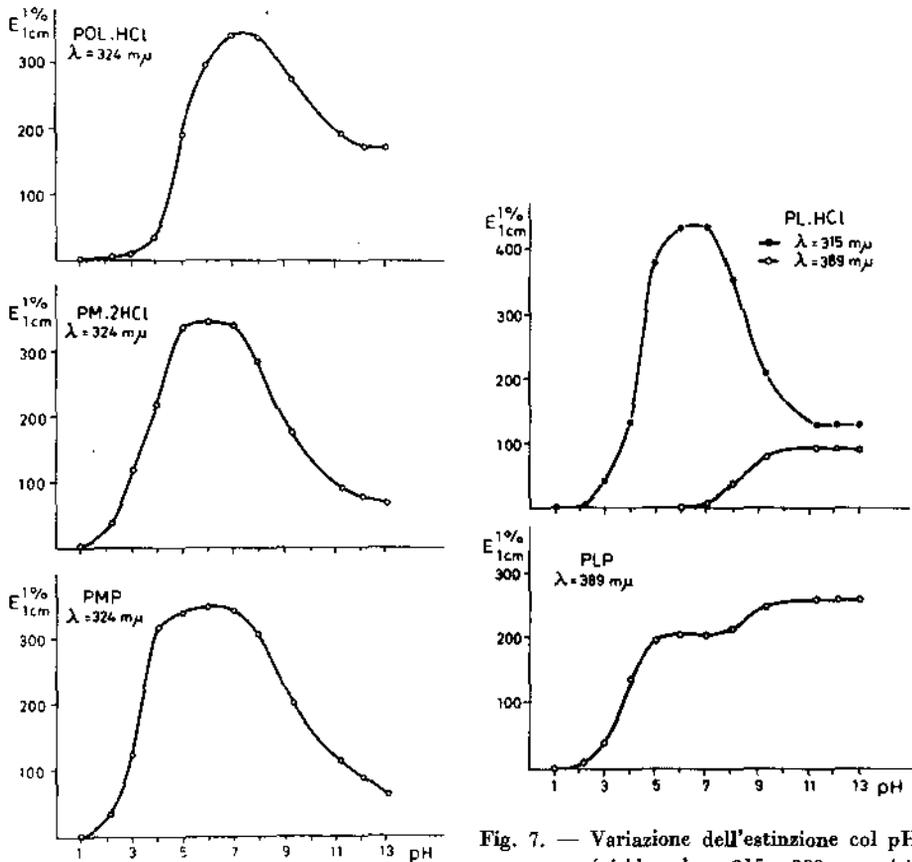


Fig. 6. — Variazione dell'estinzione a 324 $m\mu$ col pH (piridossolo, piridossamina e piridossaminfosfato).

Fig. 7. — Variazione dell'estinzione col pH (piridossale a 315 e 389 $m\mu$, piridossal-fosfato a 389 $m\mu$). PL.HCl = piridossale cloridrato; PLP = piridossalfosfato.

Rispetto a quelli di PETERSON & SOBER (1954), che sembrano fra i più attendibili della letteratura, i nostri valori di estinzione hanno uno scarto che rientra nei limiti degli errori sperimentali per POL (Roche), PLP (Roche) e PMP (Calbiochem, *A grade*). Per PM (Calbiochem, *A grade*) il nostro valore è del 6,5 % più alto, mentre per PL (Calbiochem, *C grade*: l'unico in listino) i nostri valori sono dell'11 % più bassi. In effetti il nostro campione di PL, cromatografato su carta (Whatman n. 1, fase mobile isobutanolo-piridina-acqua-acido acetico 33:33:33:1 in vol.) dava, oltre alla macchia principale con R_F 0,77, altre due macchioline, fluorescenti a luce U.V., con R_F 0,65 e 0,86.

Le condizioni suddette rispondono ai seguenti requisiti:

1) l'estinzione diminuisce, almeno fino ad un certo punto, proporzionalmente all'alterazione:

2) trattandosi di lunghezze d'onda non inferiori a 315 $m\mu$, l'assorbimento estraneo non è, in genere, molto rilevante; inoltre le misure si possono eseguire anche con la lampada al tungsteno e in vaschette di vetro;

3) trattandosi di massimi di assorbimento, le misure sono molto sensibili e poco influenzate da piccoli errori nella lunghezza d'onda;

4) le misure non sono praticamente influenzate da piccoli spostamenti del pH (Figg. 6 e 7).

Bisogna, specialmente per il PLP, evitare che le soluzioni restino lungamente esposte alla luce.

METODI PER LA DETERMINAZIONE DEL PIRIDOSSOLO

Metodo alla 2,6-diclorochinonclorimide.

Per reazione con questa sostanza si forma, in ambiente alcalino, una colorazione azzurra (massimo d'assorbimento a 620 $m\mu$ in soluzione acquosa). Analoga colorazione si ottiene con vari composti, ma si può aumentare la specificità della reazione facendo una prova in bianco con acido borico che, data la sua capacità di complessare la vitamina, impedisce la formazione del colore (SCUDI, BASTEDO & WEBB, 1940; HOCHBERG, MELNICK & OSER, 1944; MELNICK *et al.*, 1945; SCUDI, KOONES & KERESZTESY, 1940; SCUDI, UNNA & ANTOPOL, 1940; SCUDI, 1942; BIRD, VANDENBELT & EMMET, 1942).

Abbiamo trovato che l'acido borico, alla concentrazione abitualmente usata (1 ml di soluzione al 5 % per 10 ml di soluzione finale), mentre inibisce praticamente del tutto il colore del POL, inibisce solo per una metà circa il colore di PLP, PM, PMP, e per il 25 % circa il colore del PL. Tali percentuali di inibizione diminuiscono se si usa una concentrazione di ammoniacca minore di quella impiegata abitualmente (27%) (MELNICK *et al.*, 1945).

La colorazione ottenuta scompare rapidamente; il massimo di intensità si ottiene dopo 1-3 minuti, a seconda del tipo di composto in esame e del titolo dell'ammoniaca (Fig. 8). È quindi conveniente eseguire rapidamente più letture, per riconoscere il valore più alto.

La reazione presenta all'incirca la stessa sensibilità per POL e PL (concentrazione finale circa $0,5 \mu\text{g/ml}$), una sensibilità di circa metà per PM e PMP e di circa un decimo per PLP.

L'interferenza della vitamina C si può eliminare per ossidazione con MnO_2 (HOCHBERG, MELNICK & OSER, 1944).

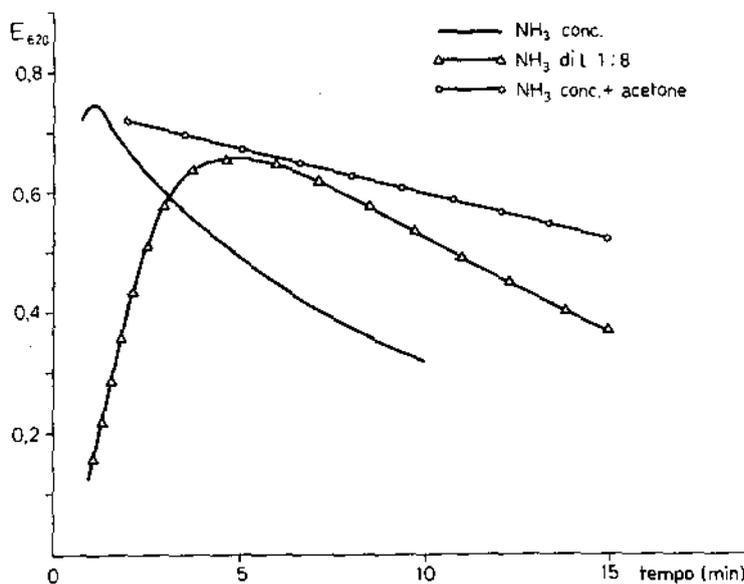


Fig. 8. — Andamento della reazione fra piridossolo (conc. finale $4 \mu\text{g/ml}$) e 2,6-dicloro-chinon-clorimide: con ammoniaca concentrata, con ammoniaca diluita 1:8, con ammoniaca concentrata e diluizione finale con egual volume di acetone.

L'inconveniente principale di questo metodo è l'instabilità della colorazione ottenuta. Si può rendere il colore più stabile

- a) operando in tampone meno alcalino;
- b) aggiungendo diossano o acetone;
- c) estraendo il colore con un adatto solvente.

La diminuzione della concentrazione di ammoniaca rende la reazione più lenta, e quindi il colore più stabile (MELNICK *et al.*, 1945). Riducendo la concentrazione a $1/8$ di quella abituale (20 ml di ammoniaca concentrata anzi-

chè 160 per ogni 160 g di NH_4Cl per litro), il massimo sviluppo di colore si ha dopo circa cinque minuti e l'intensità decresce poi lentamente (Fig. 8).

L'aggiunta di certi solventi ha effetto stabilizzante. Secondo LERQUIN & HERMANN (1962) la reazione viene eseguita a pH 8,5 (con NH_4Cl e ammoniaca diluita al 25 %) in presenza di diossano; diossano viene anche usato come solvente per il reattivo.

Per evitare il congelamento del diossano che si ha conservando la soluzione in frigorifero, abbiamo trovato conveniente aggiungere il 10 % di alcool isopropilico.

Ad ogni modo, l'uso del diossano stabilizza notevolmente il colore, ma dà un bianco piuttosto elevato. È preferibile eseguire la reazione con la solita tecnica (HOCHBERG, MELNICK & OSER, 1944) e aggiungere, dopo un minuto, un egual volume (10 ml) di acetone.

Il colore ne risulta alquanto stabilizzato: dopo cinque minuti dall'aggiunta del solvente, la diminuzione di assorbimento è del 10 %, mentre con la solita tecnica la diminuzione è, cinque minuti dopo raggiunto il massimo, del 40 % e, usando ammoniaca diluita 1 : 8, del 20 % circa (Fig. 8).

Si può anche stabilizzare il colore mediante estrazione con un solvente organico; RICHTER (1962) usa l'alcool amilico; abbiamo trovato più adatti l'acetato di etile e l'etere.

Metodo al p-amminoacetofenone diazotato.

Per copolazione con questo reattivo in soluzione idro-alcoolica secondo BROWN, BINA & THOMAS (1945) si ottiene una colorazione che va, per le varie vitamine B_{12} , dall'arancione al giallo-oro. I massimi di assorbimento sono a 475 $m\mu$ per POL, a 455 $m\mu$ per PL, a 430 $m\mu$ per PLP, a 445 $m\mu$ per PM e a 448 $m\mu$ per PMP.

Singolare è il comportamento dell'acido bórico. Con POL e PLP si ha, a concentrazioni crescenti, un graduale appiattimento del massimo, mentre ne compare un altro a 395 $m\mu$ e quindi la soluzione risulta notevolmente decolorata; con PL e PM si hanno solo piccole variazioni di intensità, secondo la concentrazione; con PMP si ha un aumento di intensità per basse concentrazioni di acido bórico, una diminuzione per concentrazioni più elevate.

Il colore si sviluppa in 3-5 minuti e si mantiene stabile per almeno una ora. È critica, ma entro limiti piuttosto ampi, la concentrazione dell'alcool.

La sensibilità è minore di quella con diclorochinonclorimide, ma sempre buona: circa 2 μg per ml di soluzione finale; è un po' maggiore per PL e PM, un po' minore per PLP e PMP.

L'interferenza della vitamina C si può eliminare come detto sopra.

L'inconveniente di questa reazione è rappresentato dall'interferenza data dalle vitamine B_1 e B_2 : la prima si copula anch'essa (ma la sensibilità è circa 30 volte minore), la seconda interferisce per il suo colore giallo.

Analoga è la reazione con acido solfanilico diazotato (KUHNS & LÖW, 1939; SWAMINATHAN, 1940; BINA, THOMAS & BROWN, 1943; ORMSBY, FISHER & SCHLENK, 1947).

Con questo reattivo si ha una colorazione arancione (massimo a 460 $m\mu$) con POL, giallo brillante (massimo a 440 $m\mu$) con PL e arancio-rosa (massimo a 490 $m\mu$) con PM. Il colore è però assai poco stabile: raggiunge il massimo d'intensità dopo circa un minuto e poi declina rapidamente. Per di più, questa reazione è meno specifica di quella con p-amminoacetofenone.

Metodo alla dietil-p-fenilendiammina.

Aggiungendo ad una soluzione di POL, esattamente neutralizzata, dietil-p-fenilendiammina e un ossidante (ferricianuro di potassio), si ottiene un colorante indofenolico azzurro, estraibile con benzene e notevolmente stabile in questo solvente (HRDY & URBANOVA, 1957).

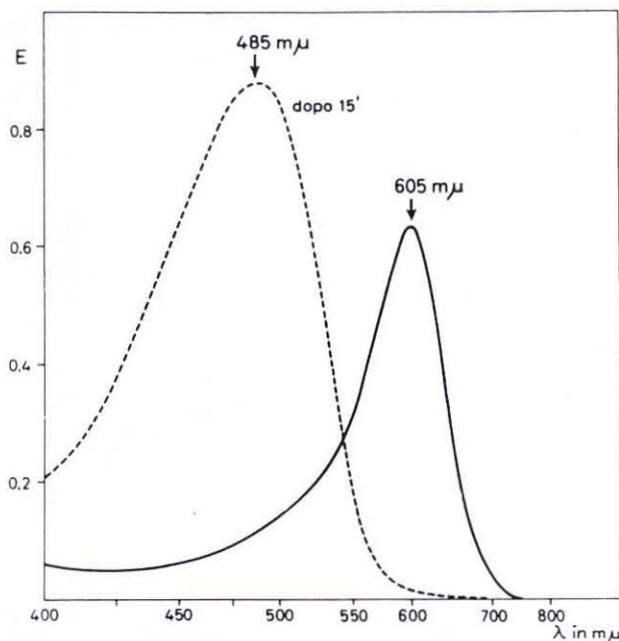


Fig. 9. — Spettri di assorbimento, in benzene, del prodotto di reazione fra piridossolo e dietil-p-fenilendiammina: estratto subito e dopo 15 minuti.

Tutti i membri del gruppo B₆ danno questa reazione, ma il colore ottenuto dagli esteri fosforici (PLP e PMP) non è estraibile con benzene. In questo solvente il massimo d'assorbimento del colorante ottenuto dal POL è a 605 $m\mu$ (Fig. 9), quello del colorante ottenuto con PL e PM è a 597 $m\mu$.

L'acido borico inibisce la reazione in maggior misura per POL e PM, in misura molto minore per PL. Anzichè aggiungerlo in soluzione acquosa all'estratto benzenico e poi separare e disidratare questo, si può aggiungerlo in soluzione alcoolica saturo e ripetere la lettura spettrofotometrica, tenendo poi conto, ovviamente, dell'aumento di volume.

È indispensabile eseguire subito l'estrazione benzenica perchè il colorante in soluzione acquosa è pochissimo stabile (Fig. 10).

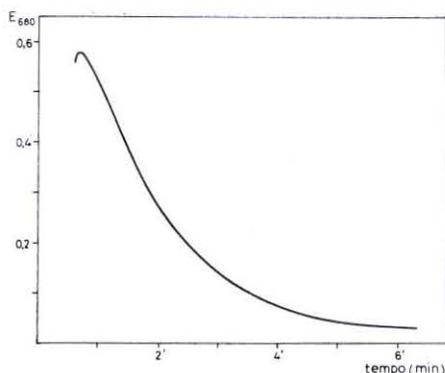


Fig. 10. — Andamento della reazione fra piridossolo e dietil-p-fenilendiammina.

L'iniziale colorazione azzurra (massimo d'assorbimento a 670-685 $m\mu$) si trasforma rapidamente, dopo 30-40 secondi, dando luogo ad una colorazione arancione (POL e PM) o rosso-violacea (PL, PLP, PMP), cui corrispondono, in soluzione acquosa, quattro massimi di assorbimento tra 460 e 575 $m\mu$. Anche il colore che si forma secondariamente è, nel caso dei derivati non fosforilati, estraibile con benzene; in questo solvente il massimo di assorbimento è a 485 $m\mu$ per POL (Fig. 9), a 494 per PL e a 483 per PM. L'estrazione con benzene serve anche ad eliminare il colore proprio del reattivo, colore che varia notevolmente col tempo, specialmente alla luce, passando da un rosso-viola chiaro a un verde brillante.

La sensibilità è di 4-5 μg per ml di soluzione benzenica.

L'interferenza dei riducenti si può eliminare facilmente usando una maggior quantità di ferricianuro. Le vitamine del gruppo B non interferiscono.

Questo metodo ci sembra preferibile agli altri proposti per la determinazione del POL; è bene però non servirsi di un diagramma di taratura, ma eseguire ogni volta contemporaneamente una prova con soluzione standard.

METODI PER LA DETERMINAZIONE DEL PIRIDOSSALE
E DEL PIRIDOSSALFOSFATO

I metodi generalmente impiegati per la determinazione del PL e del PLP sono basati su reazioni del gruppo aldeidico.

Tralasciando quelle molto generali (per esempio la reazione con 2,4-dinitro-fenilidrazina o con cianuro), parleremo di alcune dotate di una certa specificità, che riportiamo nell'ordine cronologico in cui sono state proposte.

Metodo al tiofene.

Riscaldando a 75° una soluzione acquosa di PL o PLP con soluzione alcolica di tiofene (0,5 %) e acido solforico all'80 % (v/v) nel rapporto volumetrico di 1 : 1 : 8, si sviluppa una colorazione verde, che raggiunge il suo massimo d'intensità dopo 15-20 minuti di riscaldamento (LEVINE & HANSEN, 1959). La lettura spettrofotometrica si fa a 615 m μ , contro un bianco dei reattivi. La reazione, che è data in egual misura dal PL e dal PLP, non viene inibita dall'acido borico. La colorazione ottenuta è stabile per almeno un'ora.

La sensibilità è buona: 1-1,5 μ g/ml di soluzione finale.

La reazione è notevolmente specifica: altre aldeidi danno colorazione gialla o arancione; l'allossana dà colorazione azzurra. Le vitamine del gruppo B non interferiscono; la vitamina C dà un lieve imbrunimento, che interferisce solo a concentrazioni molto elevate. Il colore non si sviluppa in presenza di ossidanti energici.

La durata del riscaldamento non è critica; lo è, invece, la concentrazione dell'acido solforico.

Si tratta, in complesso, di una buona reazione, che ha però l'inconveniente di rispondere sia al PL che al PLP.

Metodo all'acetone alcalinizzato.

Se ad una soluzione acquosa di PL o PLP si aggiungono acetone e NaOH al 10 %, nel rapporto volumetrico 5 : 3 : 2, si ottiene una colorazione gialla (massimo d'assorbimento a 420 m μ) (SIEGEL & BLAKE, 1962).

Su questa reazione l'acido borico ha una certa azione inibitrice, maggiore per il PL che per il PLP: il suo uso è però reso poco pratico per la necessità di impiegarne un gran volume della soluzione satura per complessare la notevole quantità di vitamina richiesta dalla scarsa sensibilità della reazione.

L'intensità di colore cresce lentamente col tempo fino a un'ora almeno. Questo fatto, insieme con la modesta sensibilità (circa 20 μ g/ml di soluzione finale per PL e circa 10 per PLP) e con la possibilità di interferenza da parte di altre vitamine del gruppo B, rende questa reazione poco adatta.

Abbiamo notato che un riscaldamento di alcuni minuti in b.m. bollente, mentre esalta un po' la colorazione gialla, decolora la riboflavina, purchè questa non sia presente in forte eccesso.

Si può distinguere il PL dal PLP perchè la colorazione data dal primo è estraibile con isobutanolo, dopo saturazione con solfato di sodio. Nelle stesse condizioni viene estratta la riboflavina e la lieve colorazione gialla data dalla tiamina, mentre non vengono estratti il riboflavin-fosfato nè la lieve colorazione giallo-bruna data dall'acido ascorbico.

Metodo alla glicina.

Per aggiunta di ammine primarie il PL e il PLP subiscono variazioni spettrali dovute alla formazione di basi di Schiff. Si possono trovare, scegliendo opportunamente il pH e la concentrazione dell'ammina, le condizioni in cui il PLP reagisce, mentre il PL non reagisce (GAUDIANO & POLIZZI SCIARRONE, 1963).

In particolare, il PLP in soluzione di glicina 0,1 M a pH 5,4 mostra una colorazione giallo-paglierino con massimo d'assorbimento a 395 m μ (anzichè a 387 m μ , come lo ha in altro tampone allo stesso pH), mentre, nelle stesse condizioni, il PL resta incolore, avendo, a quella lunghezza d'onda, un assorbimento trascurabile. Per evitare l'interferenza di sostanze estranee che assorbono anch'esse a 395 m μ , si può decomporre la base di Schiff con bisolfito; da una misura dell'assorbimento prima e dopo l'aggiunta di bisolfito si può risalire alla concentrazione in PLP.

La colorazione data dal PLP si sviluppa istantaneamente ed è sufficientemente stabile, specialmente al buio.

La sensibilità è di circa 5 μ g/ml.

Interferiscono le sostanze dotate di forte assorbimento intorno a 395 m μ , come la riboflavina ad alta concentrazione.

In assenza di tali interferenze, questo metodo ci sembra il migliore di quelli finora proposti; se però ci sono interferenze, è consigliabile il metodo al tiofenè, purchè si separi il PL dal PLP.

Mentre questo lavoro era in stampa, è stata pubblicata una rassegna sui metodi di determinazione della vitamina B₆ (STORVICK *et al.*, 1964).

16 ottobre 1964.

BIBLIOGRAFIA

- ANDERSON, F. J. & A. E. MARTELL, 1964. *J. Am. Chem. Soc.*, **86**, 715.
BINA, A. F., J. M. THOMAS & E. B. BROWN, 1943. *J. Biol. Chem.*, **148**, 111.
BIRD, O. D., J. M. VANDENBELT & A. D. EMMETT, 1942. *J. Biol. Chem.*, **142**, 317.
BONAVITA, V., 1960. *Arch. Biochem. Biophys.*, **88**, 366.

- BROWN, E. B., A. F. BINA, & J. M. THOMAS, 1945. *J. Biol. Chem.*, **158**, 455.
- GAUDIANO, A. & M. POLIZZI SCIARRONE, 1963. *Boll. Soc. Ital. Biol. Sper.*, **39**, 1874.
- HEYL, D., E. LUZ, S. A. HARRIS & K. FOLKERS, 1951. *J. Am. Chem. Soc.*, **73**, 3430.
- HOCHBERG, M., D. MELNICK & B. L. OSER, 1944. *J. Biol. Chem.*, **155**, 109 e 119.
- HRDY, O. & L. URBANOVA, 1957. *Ceskoslov. Farmac.*, **6**, 510, citato in: *Z. Anal. Chem.*, 1958. **163**, 234.
- KERESZTESY, J. C. & J. R. STEVENS, 1938. *J. Am. Chem. Soc.*, **60**, 1267.
- KUHN, R. & I. LÖW, 1939. *Chem. Ber.*, **72**, 305.
- LERQUIN, J. L. & J. C. HERMANN, 1962. *J. Pharm. Belg.*, **17**, 111.
- LEVINE, V. E. & W. G. HANSEN, 1959. *Biochim. Biophys. Acta.*, **31**, 248.
- LUNN, A. K. & R. A. MORTON, 1952. *Analyst.*, **77**, 718.
- MELNICK, D., M. HOCHBERG, H. W. J. HIMES & B. I. OSER, 1945. *J. Biol. Chem.*, **160**, 1.
- METZLER, D. E. & E. E. SNELL, 1952. *J. Am. Chem. Soc.*, **74**, 979.
- ORMSBY, A. A., A. FISHER & F. SCHLENK, 1947. *Arch. Biochem.*, **12**, 79.
- PETERSON, E. A. & H. A. SOBER, 1954. *J. Am. Chem. Soc.*, **76**, 169.
- RICHTER, H. E., 1962. *Mikrochim. Acta*, 455.
- SCUDI, J. V., 1942. *J. Biol. Chem.* **145**, 637.
- SCUDI, J. V., W. A. BASTEDO & T. J., WEBB, 1940. *J. Biol. Chem.*, **136**, 399.
- SCUDI, J. V., H. F. KOONES & J. C. KERESZTESY, 1940. *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, **43**, 118.
- SCUDI, J. V., K. UNNA & W. ANTOPOL, 1940. *J. Biol. Chem.*, **135**, 371.
- SIEGEL, F. P. & M. I. BLAKE, 1962. *Anal. Chem.*, **34**, 397.
- SNELL, E. E. P. M. FASELLA, A. E. BRAUNSTEIN & A. ROSSI FANELLI, 1963. *Chemical and biological aspects of pyridoxal catalysis*, Pergamon Press.
- STORVICK, C. A., E. M. BENSON, M. A., EDWARDS & M. J., WOODRING, 1964. in: *Methods of Biochemical Analysis*, Glick D., Ed. vol. XII, p. 183.
- SWAMINATHAN, M., 1940 *Nature.*, **185**, 780.
- UMBREIT, W. W., D. J. O'KANE & I. C., GUNSALUS, 1948. *J. Biol. Chem.*, **176**, 629.
- VACHER, M. & D. FAUCQUEMBERGUE, 1949. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **31**, 1626.
- WILLIAMS, V. R. & J. B. NEILANDS, 1954. *Arch. Biochem. Biophys.*, **53**, 56.