

38. SULLA DETERMINAZIONE DELLA CREATININA NEGLI ESTRATTI DI CARNE CON L'ACIDO 3,5-DINITROBENZOICO.

La determinazione della creatinina ha grande importanza sia in biologia per le analisi dell'urina, del sangue ecc. che in bromatologia per le analisi degli estratti di carne e dei prodotti derivati, nei quali permette di stabilire la purezza di un estratto o la quantità di esso contenuta in un prodotto miscelato.

Vari metodi ⁽¹⁾ sono stati proposti per la sua determinazione, ma il metodo che più di ogni altro si è affermato per la sua rapidità e semplicità è quello colorimetrico di Folin, fondato sulla nota reazione di Jaffè, secondo la quale trattando la creatinina con acido picrico ed aggiungendo idrato sodico in eccesso si ha una colorazione rosso-arancione analoga a quella di una soluzione di bicromato potassico. Tale metodo venne applicato da Grindley ⁽²⁾ agli estratti di carne e fu studiato e modificato da numerosi sperimentatori ⁽³⁾, ma non è rigorosamente esatto poichè la reazione di Jaffè non è specifica per la sola creatinina essendo data anche da acetone, acetati, idrossilamina, aldeidi, destrosio, maltosio, levulosio, urea, acido tannico, semicarbazide, chinoni e da altre sostanze riducenti ⁽⁴⁾.

Secondo Weise ^(4-b), la reazione di Jaffè è data dalle sostanze che hanno un radicale metilene $=CH_2$ o metenile $\equiv CH$ il cui idrogeno viene reso attivo dalla presenza di uno dei seguenti gruppi: $-NO_2$, $-N=N-$, $=CO$, $-CH=CH_2$, $-CO-NH_2$, $-CH_2C_2H_5$.

Altra causa di errore è dovuta al colore proprio degli estratti, in soluzione acquosa, per cui è stata proposta la decolorazione per ossidazione con permanganato ⁽⁵⁾, per filtrazione attraverso candela all'ossido di alluminio idrato ⁽⁶⁾, per trattamento con idrato di zinco, ottenuto aggiungendo alla soluzione le quantità stechiometriche di solfato di zinco e di idrato sodico ⁽⁷⁾.

Recentemente Benedict e Behre ⁽⁸⁾ hanno proposto per la determinazione della creatinina nelle urine un metodo colorimetrico fondato sulla

colorazione violetta ottenuta trattando in soluzione alcalina la creatinina con l'acido 3,5-dinitrobenzoico. La reazione sarebbe sensibile alla concentrazione limite di mg. 0,01 %, ed offrirebbe il vantaggio di una maggiore specificità. Così, per esempio, il glucosio, l'acetone e l'acido aceto-acetico, che reagiscono con l'acido picrico, non danno alcuna colorazione con il nuovo reattivo, se presenti in quantità non eccessivamente forti.

Gli autori hanno inoltre studiato il comportamento dell'acido 3,5-dinitrobenzoico con alcuni derivati della creatinina trovando che la benzalcreatinina, la creatinin-ossima, la tribenzoilcreatinina e l'acetilbenzalcreatinina non reagiscono con esso e non danno neppure la reazione di Jaffè, mentre altri prodotti, quali la metil-, dimetil-, iodidrato di etil-, 4 (o 5) benzoil-, cloridrato di 5-benzil-, 2-benzilcreatinina, reagiscono con entrambi i reattivi. Gli AA. ne deducono che il meccanismo della reazione tra creatinina ed acido 3,5-dinitrobenzoico deve essere simile a quello tra creatinina ed acido picrico, studiato da Chapman, secondo cui l'acido picrico si riduce a triaminofenolo e diaminonitrofenolo.

Konm e Leinbrock ⁽⁹⁾ hanno applicata la reazione di Benedict e Behre alla determinazione della creatinina negli estratti di carne, ma Baier e Walter ⁽¹⁰⁾ criticando il lavoro degli AA., affermano che il metodo non offre alcun vantaggio rispetto a quello di Folin e dà risultati non costanti e superiori al reale contenuto di creatinina.

Secondo Konm e Leinbrock, la soluzione del prodotto da analizzare, dopo il consueto trattamento con acido cloridrico per trasformare la creatina in creatinina, viene defecata con soluzione di acetato di piombo in eccesso e quindi neutralizzata con soda. Sul liquido ottenuto si determina colorimetricamente la creatinina con l'acido 3,5-dinitrobenzoico. Nei riguardi di tale trattamento Baier e Walter fanno giustamente osservare che la forte quantità di cloruri, presenti nel liquido, per aggiunta di acetato di piombo, provoca la formazione di abbondante precipitato di cloruro di piombo che, oltre a rendere disagiata il procedimento, può facilmente occludere una certa quantità di creatinina.

Konm e Leinbrock non indicano se si debba o no procedere alla eliminazione del piombo in eccesso rimasto nel liquido. Si deve rilevare che se si elimina con solfato o con fosfato di sodio, il conseguente precipitato che si forma aumenta il volume di quello preesistente rendendo più disagiata la filtrazione; se invece non si effettua lo spiombamento, si ot-

tiene all'atto della neutralizzazione con soda altro precipitato che rende necessaria una nuova filtrazione, prima di eseguire la determinazione colorimetrica.

Baier e Walter hanno controllato il metodo di Konm e Leinbrock, confrontando i risultati con quelli ottenuti in parallelo col metodo Folin all'acido picrico e concludono che il metodo all'acido 3,5-dinitrobenzoico dà valori notevolmente superiori a quello all'acido picrico, malgrado l'assorbimento di una certa quantità di creatinina da parte del precipitato di cloruro di piombo. Gli autori attribuiscono tale diversità di risultati alla non specificità della reazione dell'acido 3,5-dinitrobenzoico ed affermano di aver ottenuto con esso reazione positiva anche con estratti di lievito, non contenenti creatinina.

Un ultimo rilievo Baier e Walter oppongono alla adozione del nuovo reattivo: secondo questi AA., l'acido 3,5-dinitrobenzoico già di per sè stesso si colorerebbe in violetto per aggiunta di soluzione di soda.

Data la non specificità della reazione di Jaffè e le difficoltà che, col metodo Folin, spesso si incontrano per la determinazione della creatinina negli estratti di carne e dei prodotti derivati, ci è sembrato opportuno prendere in esame il metodo di Benedict applicato da Konm e Leinbrock agli estratti di carne per accertare se fosse veramente applicabile agli estratti stessi, almeno come metodo di controllo, e se le critiche di Baier e Walter avessero motivo di sussistere.

A tale scopo abbiamo analizzato vari estratti di carne del commercio sui quali è stata eseguita in parallelo la determinazione della creatinina sia col metodo all'acido picrico che con l'acido 3,5-dinitrobenzoico, preparato per nitratura dell'acido benzoico, secondo le indicazioni di Shukow ⁽¹¹⁾.

Il prodotto grezzo è stato purificato due volte dall'acido acetico glaciale, ed allo stato di purezza fonde a 202°.

Anzitutto abbiamo voluto accertare se l'acido trattato con soda desse la colorazione violetta riscontrata da Baier e Walter. A tale scopo operando nelle condizioni prescritte per la determinazione della creatinina, a 3 cm³ di soluzione alcoolica all'1 % di acido 3,5-dinitrobenzoico è stato aggiunto 1 cm³ di NaOH al 6 %, ottenendo una lieve colorazione giallognola; sicchè è da presumere che la colorazione violetta notata dai pre-

detti AA. sia da attribuire ad incompleta purificazione dell'acido adoperato.

Per la determinazione della creatinina negli estratti di carne sono state preparate: soluzione alcoolica all'1 % di acido 3,5-dinitrobenzoico; soluzione acquosa al 6 % di idrato sodico, soluzione acquosa a 0,1 % di creatinina pura. Quindi g. 10 del campione di estratto bene omogeneizzato, sono stati trattati con 100 cm³ di acido cloridrico N/3 e riscaldati per 4 ore a bagno-maria bollente. Dopo raffreddamento, il liquido è stato versato quantitativamente in pallone tarato da 250 cm³ e portato a volume. Di questa soluzione, che indicheremo soluzione A, sono stati prelevati 10 cm³ e diluiti, in pallone tarato, a 100 cm³. Due cm³ della nuova soluzione così ottenuta sono stati trattati con 3 cm³ di soluzione alcoolica all'1 % di acido 3,5-dinitrobenzoico e con 1 cm³ di soluzione al 6 % di soda. Contemporaneamente, per avere il liquido di confronto, 2 cm³ di soluzione al 0,0025 % di creatinina, ottenuta per diluizione dalla soluzione a 0,1 % sono stati trattati nel modo sopradetto. Le due soluzioni, dopo riposo di 10 minuti, al riparo dalla luce solare, sono state aggiunte di 10 cm³ di acqua ed agitate e dopo riposo di altri 8 minuti sono state confrontate al colorimetro Dubosq fissando l'altezza del cilindro di vetro contenente la soluzione di confronto a 20 mm. La diluizione e la successiva lettura colorimetrica sono state eseguite esattamente dopo trascorsi i periodi di tempo prescritti.

Come è noto, per evitare cause di errore, l'altezza della soluzione in esame deve essere quasi uguale all'altezza fissata per la soluzione di confronto e perciò nei casi in cui ciò non avveniva, si ripeteva la determinazione prelevando, per la diluizione a 100 cm³, un numero maggiore o minore di cm³ di soluzione A.

In parallelo sono state eseguite pure le determinazioni col metodo all'acido picrico ottenendo risultati concordanti come risulta dalla tabella I.

Abbiamo voluto anche stabilire con prove di confronto con l'acido picrico e con l'acido 3,5-dinitrobenzoico, la specificità dei due reattivi nei riguardi degli estratti di lievito, che non contengono creatinina, constatando che, con i due reattivi, si ottengono colorazioni trascurabili. Possiamo quindi ritenere che la specificità dell'acido 3,5-dinitrobenzoico nei riguardi degli estratti di lievito, non è molto dissimile da quella dell'acido picrico.

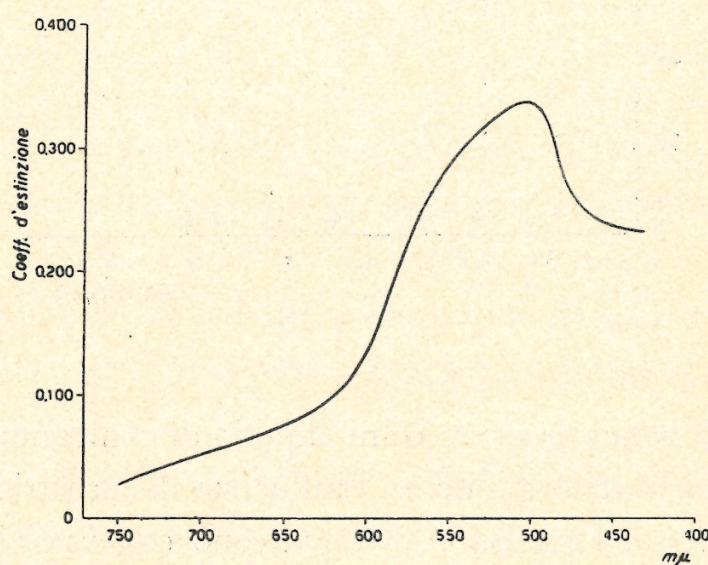
TABELLA I.

	P R O D O T T O	Creatinina per cento su sostanza secca	
		Metodo all'acido picrico	Metodo all'acido 3, 5 dinitrobenzoico
1	Estratto di carne	8,51	8,55
2	» » »	8,00	8,10
3	» » »	8,20	8,00
4	» » »	7,40	7,47
5	» » »	7,95	7,90
6	Estratto di carne con aggiunta di vegetali	6,00	6,00
7	Estratto di carne con aggiunta di vegetali	5,80	5,90
8	Estratto di carne e di vegetali . .	4,30	4,35
9	» » » » » . .	4,00	4,10
10	» » » » » . .	3,80	3,85
11	» » » » » . .	3,20	3,20
12	» » » » » . .	3,50	3,45

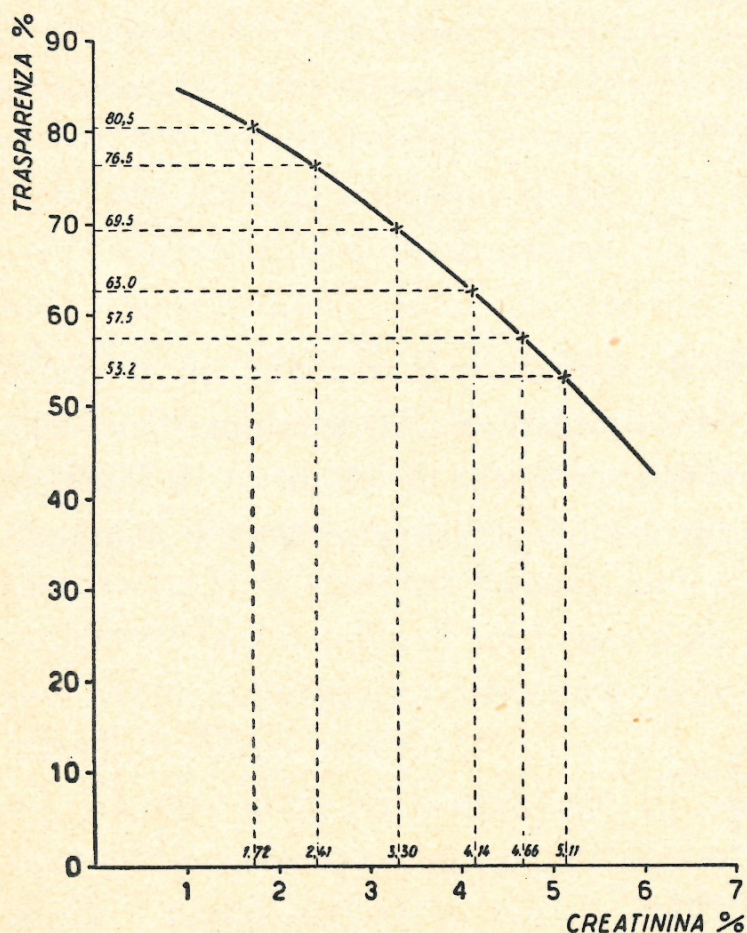
In considerazione dei risultati soddisfacenti ottenuti con il nuovo reattivo, abbiamo ritenuto utile di impiegare per la determinazione della creatinina con l'acido 3,5-dinitrobenzoico anche il fotometro di Pulfrich, che, rispetto agli ordinari colorimetri, è più preciso e sensibile e soprattutto non richiede di preparare

volta per volta la soluzione di confronto e consente inoltre di tenere conto della colorazione propria della soluzione in esame. A tal fine, abbiamo anzitutto determinato la curva di assorbimento caratteristica del prodotto colorato che si ottiene dalla reazione della creatinina con l'acido 3,5-dinitrobenzoico per potere

razionalmente scegliere la luce monocromatica più conveniente per eseguire le misure colorimetriche. Tale curva di assorbimento ottenuta con soluzione al 0,0025 % di creatinina ed usando vaschette di 10 mm. è rappresentata dal grafico 1 nel quale sono riportate sulle ascisse le lunghezze di onde e sulle ordinate i corrispondenti coefficienti di estinzione.



Si rileva da esso che il filtro più opportuno per le misure colorimetriche, quello cioè per il quale si ha il massimo di assorbimento è il filtro S 50, del quale ci siamo pertanto serviti. Per rendersi indipendenti da eventuali spostamenti dalle leggi di Beer e Lambert ⁽¹²⁾, è stata determinata la curva di assorbimento in funzione della concentrazione di creatinina, usando soluzioni di creatinina a concentrazioni note. Nella tabella II sono riportati i valori del coefficiente di estinzione riguardanti 6 soluzioni di



creatinina di diversa concentrazione, e con i valori ottenuti è stato ricavato il grafico 2. Le modalità per la determinazione della creatinina negli estratti di carne con il fotometro Pulfrich differiscono poco da quelle già menzionate: si prelevano costantemente 10 cm³ di soluzione A e si diluiscono fino a 100 cm³; 2 cm³ del liquido così ottenuto vengono trattati con il reattivo all'acido 3,5-dinitrobenzoico nel modo già detto. Altri 2 cm³ dello stesso liquido, trattati con 1 cm³ di soluzione al 5 % di soda e diluiti con 13 cm³

di acqua, servono come liquido di confronto e consentono di eliminare, come è stato già detto, l'influenza disturbatrice del colore bruno del liquido stesso. Le misure si eseguono con vaschette da 10 mm. e con il filtro S 50. L'acido dinitrobenzoico, di per sè stesso incolore, in ambiente alcalino dà una lieve colorazione gialla che è bene non trascurare. Per tenerne conto abbiamo una volta per sempre determinato l'assorbimento dovuto ad essa, il cui valore numerico nelle nostre condizioni è 0,009. In ogni determinazione è quindi opportuno sottrarre tale cifra dal valore del coefficiente di estinzione corrispondente alla trasparenza letta sul tamburo

dell'apparecchio. Dal coefficiente di estinzione così ottenuto si risale con le apposite tabelle alla trasparenza relativa, in corrispondenza della quale si legge sul grafico 2 la percentuale di creatinina nel prodotto in esame. Tale grafico ha lo scopo di consentire la determinazione rapida, col fotometro di Pulfrich, della creatinina contenuta in un campione di estratto, ed è stato ottenuto riportando sull'asse delle ordinate le trasparenze percentuali ($D\%$) che si leggono sull'apparecchio e sull'asse dell'ascisse le corrispondenti percentuali di creatinina contenute nei prodotti analizzati, con le modalità descritte. Naturalmente i valori che si leggono sul grafico debbono poi con il calcolo essere riferiti a sostanza secca.

TABELLA II.

COEFFICIENTI DI ESTINZIONE DI 6 SOLUZIONI A TITOLO NOTO DI CREATININA.

	Soluzione di creatinina in g. ‰	Coefficienti di estinzione		Soluzione di creatinina in g. ‰	Coefficienti di estinzione
1	0,0069	0,095	4	0,0166	0,201
2	0,0096	0,117	5	0,0186	0,240
3	0,0132	0,158	6	0,0205	0,274

L'acido 3,5-dinitrobenzoico è sempre incolore e presenta il vantaggio di non interferire sulla determinazione colorimetrica, contrariamente a quanto avviene con l'acido picrico. Di contro il reattivo presenta lo svantaggio di essere meno disponibile dell'acido picrico, per quanto di facile preparazione, e di richiedere per il confronto, usando il colorimetro Dubosq, una soluzione di creatinina ottenuta volta per volta per diluizione da soluzione di creatinina pura ed a titolo noto, dato che le soluzioni acquose di essa si alterano con il tempo, mentre la soluzione di bicromato di potassio $N/2$, usata come confronto nel metodo all'acido picrico è di facile preparazione e si conserva indefinitamente. Si deve infine considerare che il composto colorato che si forma dalla reazione dell'acido 3,5-dinitrobenzoico con la creatinina è fotosensibile e che la intensità della colorazione dipende dal tempo in misura assai più notevole che nel caso della reazione di Jaffè, ed è quindi necessario seguire una tecnica

precisa e rigorosa nella determinazione, nel senso che occorre esattamente eseguire la diluizione e la lettura colorimetrica dopo i tempi prescritti. Riteniamo tuttavia che ciò non giustifichi l'opinione di Baier e Walter, secondo cui la variazione della colorazione in funzione del tempo costituisce ostacolo alla utilizzazione ai fini analitici della reazione, in quanto già la piccola differenza di tempo tra l'aggiunta della soda alla soluzione in esame ed a quella di confronto produrrebbe una apprezzabile differenza di colorazione tale da rendere difficile la esatta lettura al colorimetro. Nelle nostre ricerche non abbiamo incontrato tale inconveniente e la differenza di tempo cui gli AA. si riferiscono può essere agevolmente ridotta a non più di trenta secondi ed allora diventa non apprezzabile.

In conclusione, la reazione con l'acido dinitrobenzoico è applicabile alla determinazione della creatinina negli estratti di carne. Rispetto all'acido picrico, il nuovo reattivo offre il vantaggio di essere incolore e di rimanere praticamente tale in ambiente alcalino, ma per la necessità di preparare volta per volta il liquido di confronto da soluzione titolata di creatinina, per la maggiore difficoltà di avere a disposizione sia il reattivo che la creatinina allo stato di purezza e per la tecnica più rigorosa necessaria ad ottenere risultati esatti, si ritiene che il metodo sia meno vantaggioso di quello dell'acido picrico.

Tuttavia nei casi in cui il colore proprio degli estratti di carne rende difficile di stabilire con esattezza, col metodo all'acido picrico, l'uguaglianza di colore al colorimetro, il metodo all'acido 3,5-dinitrobenzoico può essere utilmente impiegato come controllo.

RIASSUNTO.

Si prende in esame l'impiego dell'acido 3,5-dinitrobenzoico proposto da Benedict e Behre come reattivo per la determinazione colorimetrica della creatinina negli estratti di carne. I risultati concordano con quelli ottenuti col metodo all'acido picrico. Si mettono in rilievo i vantaggi e gli svantaggi che presentano i due metodi e si conclude che il nuovo reattivo può essere impiegato nei casi in cui necessita un metodo di controllo.

Si applica il fotometro di Pulfrich alla determinazione della creatinina con l'acido 3,5-dinitrobenzoico onde eliminare l'inconveniente di preparare di volta in volta la soluzione di creatinina come soluzione di confronto.

SUMMARIUM

Acidum 3,5-dinitrobenzoicum a doctis viris Benedict et Behre commendatum est, ut reactivum per quod, observato colore, creatininae proportio in carnis extractis determinaretur. Huius acidi usu accurate perspecto, Auctores contendunt experimenta non alios exitus habuisse quam quos picrico acido adhibito consequamur. Utriusque autem methodi commodis incommodisque perpensis illud concluditur: recens hoc reactivum optime adhiberi posse quotiens ad collationis certam rationem ac viam confugiendum necessario sit. Photometro autem Pulfrichii acidoque 3,5-dinitrobenzoico ad creatininam utemur agnoscendam, ne totiens creatininae solutionem apparemus, quotiens collatio facienda sit.

Roma. — Istituto di Sanità Pubblica - Laboratorio di Chimica.

BIBLIOGRAFIA

(¹) NEUBAUER, Ann., 119, 33; WEIL., Ber., 11, 2175; JAFFÈ, Z. physiol. Chem., 10, 399 (1886); FOLIN, J. biol. Chem., 17, 469 (1914); BAUR e BARSCHALL, Z. Nahr. Genussm., 13, 353 (1907); EDLEFSEN, Chem. Zentr., 13, I, 108 (1909); MICKO, Z. Nahr. Genussm., 19, 426 (1910).

(²) GRINDLEY, J. Biolog. Chem., 3, 491 (1901).

(³) HEHNER, Pharm. J., 78, 683 (1907); BENEDICT e MYERS, Am. J. Physiol., 18, 397 (1907); PEKELHERIN e HOOGENHUYRE, Z. physiol. Chem., 64, 262 (1910); THOMPSON, WALLACE, CLOTWORTHY, Biochem. J., 7, 445 (1913); MYERS e FINE, J. Biol. Chem., 14, 9 (1913); BAUMANN, J. Biol. Chem., 17, 15 (1914); BAUMANN e HINES, J. Biol. Chem., 24, 439 (1916); BAUER e TRÜMLER, Z. Nahr. Genussm., 27, 697 (1919).

(⁴) CHAPMANN, Analyst., 34, 475 (1909); WIELAND, Konserven Ztg., 14, 249 (1913).

(^{4-b}) WEISE, Z. physiol. Chem., 178, 125 (1928).

(⁵) SUDENDORF e LAHRMANN, Z. Nahr. Genussm., 29, 1 (1915).

- (⁶) REMY, Z. Unters. Lebensm., 74, 383 (1937).
- (⁷) KACL e FINK, Z. Unters. Lebensm., 75, 529 (1938).
- (⁸) BENEDICT e BEHRE, J. Biol. Chem., 114, 515 (1936).
- (⁹) KONM e LEIBROCH, Med. Klin., 32, 1303 (1936).
- (¹⁰) BAIER e WALTER, Z. Nahr. Genussm., 74, 281 (1937).
- (¹¹) SHUKOW, Ber., 28, 1800.
- (¹²) TOFFOLI, questi Rendiconti, 2, 575 (1939).

