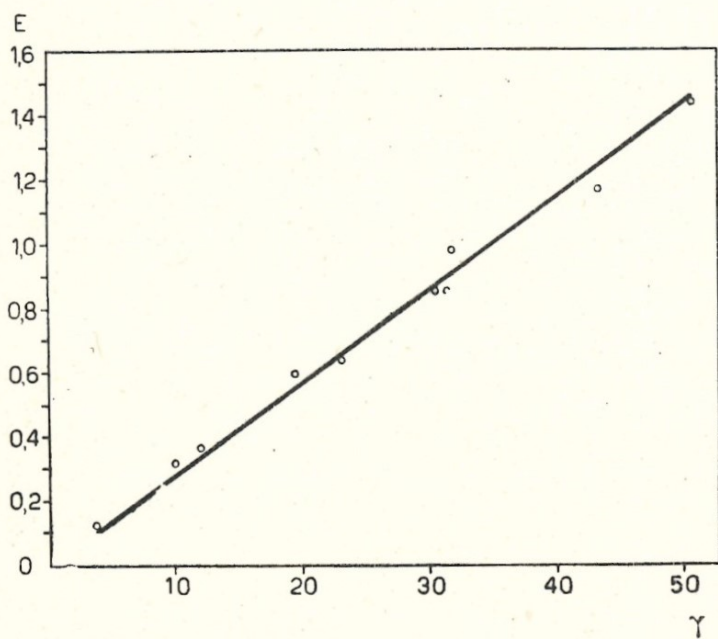


6. Enzo F. ARCANGELI. † — Su di un nuovo metodo colorimetrico di determinazione delle vitamine D.

Pochi metodi si conoscono per la determinazione delle vitamine D (¹⁻³); oltre a quello spettrografico che richiede la necessaria costosa attrezzatura, più noti sono quello di Halden (²) e quello di Brockmann (³), basati entrambi su una reazione colorata; il primo, con tricloruro di alluminio, il secondo con tricloruro di antimonio; entrambi i reattivi sono assai delicati da preparare e poco stabili, nel complesso tutt'altro che pratici (⁴).



Nel 1940 è stata proposta da Autori americani (⁵) una modifica al reattivo di Brockmann che, anche secondo la nostra esperienza, dà un metodo effettivamente semplice e comodo. L'aggiunta del 2% di cloruro di acetile rende il reattivo stabile per parecchi mesi; la colorazione giallo-arancio raggiunge il massimo

di intensità dopo circa 30 secondi e rimane stabile per circa 4 minuti, tempo più che sufficiente per un'accurata determinazione; la colorazione ottenuta ha un massimo di assorbimento a 500 m μ ; l'assorbimento a 550 m μ è nullo, per cui gli Autori consigliano, per sottrarre l'azione di eventuali altre sostanze presenti, di eseguire la misura fotometrica a queste due lunghezze d'onda, e di riferirsi sempre alla differenza fra le due estinzioni. La colorazione è uguale per le vitamine D₂ e D₃; ad

(¹) SOLYANIKOVA, Lab. Prakt. U.R.S.S., 6, 19 (1938).

(²) HALDEN, Naturw., 24, 296 (1936); TZONI, Biochem. Z., 287, 18 (1936); HALDEN e TZONI, Nature, 137, 909 (1936).

(³) BROCKMANN e CHEN, 2. physiol. Chem. 241, 129 (1936).

(⁴) EMMERIE e EEKELEN, Acta Breviux Neezl., 6, 133 (1936); REERINK e NIEKERK, Z. Vitaminif., 7, 269 (1938); WOLFF, Z. Vitaminif., 7, 277 (1938); RITSERT-Merck's J., 52, 27 (1938).

(⁵) NIELD, RUSSELL e ZIMMERLI, J. Biol. Chem., 136, 73 (1940).

altre sostanze simili per struttura vitamine D₄, D₅, D₆, tachisterina ecc.) nella memoria originale non si accenna; è probabile però che dette sostanze diano colorazioni uguali o almeno simili. La presenza di alcool disturba soltanto per concentrazioni superiori al 0,3%. Gli Autori americani danno una curva di riferimento per il fotometro di Bausch e Lom; qui si riporta la curva ottenuta col fotometro di Pulfrich; si è calcolato anche l'errore medio cui si è incorso nello stabilire la curva di riferimento valutandolo a $\pm 9\%$.

PARTE SPERIMENTALE

Preparazione del reattivo. — Cloroformio Erba, con il 0,5% di alcool, viene lavato sei volte con lo stesso volume di acqua; si dibatte per un paio di volte con CaCl₂ anidro, poi con anidride fosforica, si filtra rapidamente e si distilla, scartando il primo distillato torbido e l'ultimo decimo circa; la frazione centrale si raccoglie su anidride fosforica. In pallone munito di tappo con tubo a cloruro di calcio si scioglie il tricloruro di antimonio nel cloroformio, nuovamente filtrato, scaldando leggermente (35°-40°); il tricloruro di antimonio deve essere stato preventivamente ben seccato su acido solforico; se ne impiega una quantità pari a circa 30 g per 100 cm³ di cloroformio. La soluzione ottenuta si filtra rapidamente e si addiziona del 2% di cloruro acetile distillato di recente; un momentaneo intorbidamento scompare immediatamente per agitazione.

Condizione essenziale per la riuscita del reattivo è che si lavori il più rapidamente possibile, al buio od a luce diffusa molto bassa e con recipienti e reattivi ben secchi.

La soluzione ottenuta è soprasatura e dopo qualche tempo depone cristalli di SbCl₃; comunque può essere adoperata anche subito ché, nei limiti dal 15 al 30% la concentrazione del tricloruro di antimonio non modifica il risultato della reazione (⁵).

Il reattivo si conserva nel modo migliore in essiccatore su cloruro di calcio.

Preparazione della soluzione di Vitamina D. — Come solvente nelle determinazioni della curva di riferimento si è impiegato cloroformio Erba, conservato al buio su cloruro di calcio (⁶); si è usata vitamina D₂ Lepetit, con punto di fusione dichiarato 124°-27°; se ne è controllata la purezza spettrograficamente; sono state eseguite in tutto

(⁶) Tenuto conto che il cloroformio del reattivo è praticamente esente da alcool, e che se ne impiega 3,5 volte di più del cloroformio solvente della vitamina, la presenza del 0,5% di alcool in questo non disturba la reazione.

cinque pesate alla microbilancia, portando a 10 cc in palloncino tarato; tutte le soluzioni sono state preparate pochi minuti prima del loro impiego.

Esecuzione della reazione. — 1 cm³ di soluzione cloroformica di vitamina (quando se ne prelevava meno si portava ad 1 cm³ con lo stesso solvente) viene posto nella vaschetta del fotometro; 3,5 cm³ ⁽⁷⁾ di reattivo si fanno scolare rapidamente da apposita microburetta, costruita in modo che l'ingresso dell'aria possa avvenire soltanto attraverso un tubo a cloruro di calcio; contemporaneamente all'apertura della microburetta si fa scattare un contasecondi; si lascia scolare il reattivo dalla microburetta per i primi 15 secondi; poi si copre la vaschetta con l'apposito vetrino; si inizia la lettura al 45° secondo; si legge successivamente coi filtri S50 ed S55, usando in confronto una vaschetta con cloroformio ⁽⁸⁾; entro il quarto minuto primo la lettura è finita comodamente, invertendo anche la posizione delle due vaschette; si sottrae quindi il valore della estinzione misurata col filtro S55 a quella determinata col filtro S50; non essendo i filtri perfettamente monocromatici, la lettura col filtro S55 non è pari a zero. Nella curva di riferimento sono riportati i valori differenza dell'estinzioni misurate con questi due filtri.

Nella tabella seguente si riportano i risultati ottenuti:

Pesata µgr (a 10 cc.)	Prelevati cc.	Quantità in reazione in γ	Differenza di estinzione S50 - S55
503	0,2	10,06	0,312
	0,6	30,18	0,852
	1	50,3	1,444
197	0,2	3,94	0,115
	0,6	11,82	0,362
	1	19,7	0,591
623	0,5	31,15	0,854
	0,7	43,61	1,169
317	1	31,7	0,981
448	0,5	22,4	0,606

RIASSUNTO

Si riporta la curva di riferimento per la determinazione quantitativa delle vitamine D₂ e D₃ al fotometro di Pulfrich, usando come reattivo una soluzione satura di tricloruro di antimonio in cloroformio col 2 % di cloruro di acetile.

⁽⁷⁾ Il volume di 4,5 cm³ è esattamente sufficiente per una vaschetta rettangolare da 10 mm del fotometro di Pulfrich.

⁽⁸⁾ Usando un metodo differenziale non sarebbe necessaria la vaschetta di confronto.

SUMMARIUM

Curvatura exhibetur, qua indice numerus determinatur vitaminarum D_2 et D_3 idque photometro Pulfrichii adhibito nec non, pro reactivo, trichloruri antimonii solutione satura in chloroformio, additis chloruri acetilis duabus centesimis (2) %).

Roma. — Istituto Superiore di Sanità - Laboratorio di Biologia.
