

27. METODO SPECIFICO PER LA DETERMINAZIONE DELLA VITAMINA B₆ SINTETICA.

Da che fu stabilita la struttura della vitamina B₆ diverse reazioni sono state proposte per il riconoscimento e la determinazione di essa.

Molto seguito è il metodo fondato sulla nota reazione di copulazione con acido solfanilico o p. nitroanilina diazotati.

Anche la reazione di Folin-Denis (¹) è stata adottata per la determinazione colorimetrica della vitamina B₆.

Recentemente Scudi, Koones e Keresztesy (²), apportando alcune modifiche alla reazione di Gibbs (³) con 2-6-dicloro- o 2-6-dibromochinone-clorimmide, hanno introdotto un nuovo metodo di determinazione da loro stessi poi seguito in successive ricerche.

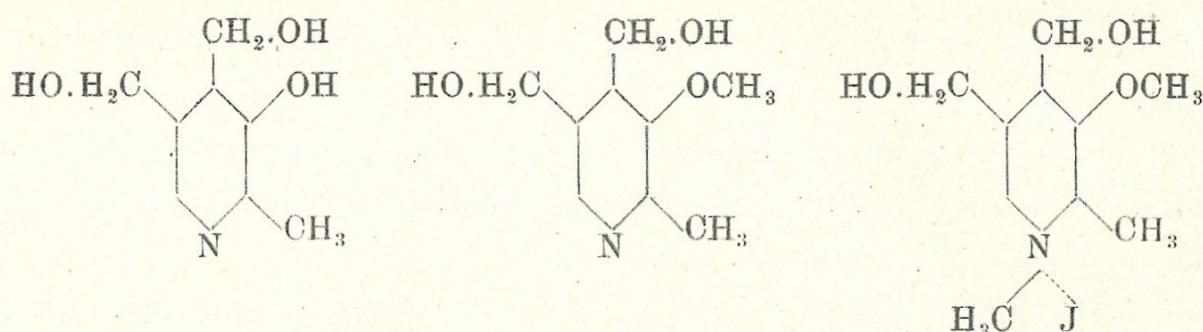
Le reazioni però su cui sono fondati questi metodi non sono specifiche per la vitamina B₆, poichè esse riescono positive non solo con fenoli, ma anche con diversi amminoacidi (⁴) e con altri componenti cellulari (⁵).

R. Kuhn e I. Löwe (⁶), basandosi sul fatto che l'adermina è un derivato dell' α -picolina, hanno elaborato una reazione che si può ritenere specifica per la vitamina B₆, poichè altri derivati dell' α -picolina finora non sono stati trovati nel regno animale, nè in quello vegetale (⁶).

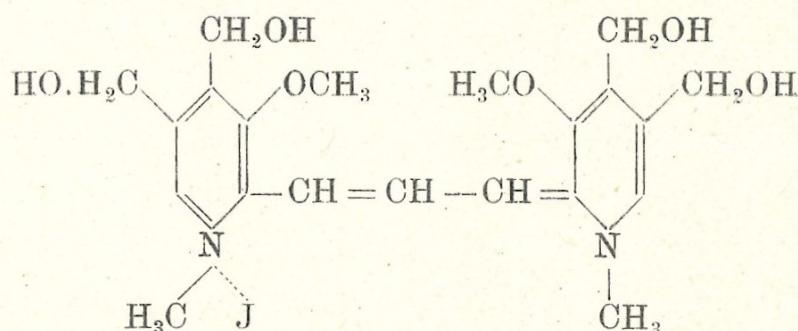
Gli alogeno-alchilati dell' α -picolina e derivati hanno la proprietà di dare per breve riscaldamento con cloroformio e soda acquosa, in presenza di alcool, una magnifica serie di sostanze coloranti del gruppo piridincarbocianine.

Nel caso dell'adermina è necessario eterificare prima il gruppo fenolico libero. La reazione procede nella maniera seguente:

Per azione del diazometano l'adermina viene eterificata e quindi, con joduro di metile, trasformata in un composto di piridinio quaternario:



Per trattamento ulteriore con cloroformio ed etilato sodico si ha una condensazione di due anelli con formazione di una sostanza intensamente colorata in violetto a cui si può assegnare la formula seguente:



La formazione di questa sostanza colorante, che gli autori chiamano « violetto-adermina », è quindi da considerare specifica per la vitamina B₆.

Scopo di questo lavoro è stato perciò quello di elaborare, sulla base di questa reazione, un metodo che potesse servire per la determinazione colorimetrica quantitativa della vitamina B₆, stabilendone le condizioni e la tecnica migliori per l'esecuzione.

P A R T E S P E R I M E N T A L E

REAGENTI.

- 1) Soluzione eterea di diazometano;
- 2) joduro di metile;
- 3) cloroformio;
- 4) soluzione di etilato sodico, preparata di fresco sciogliendo 1 g di sodio in 20 cm³ di alcool etilico assoluto;
- 5) miscela cloroformio alcool (1:2).

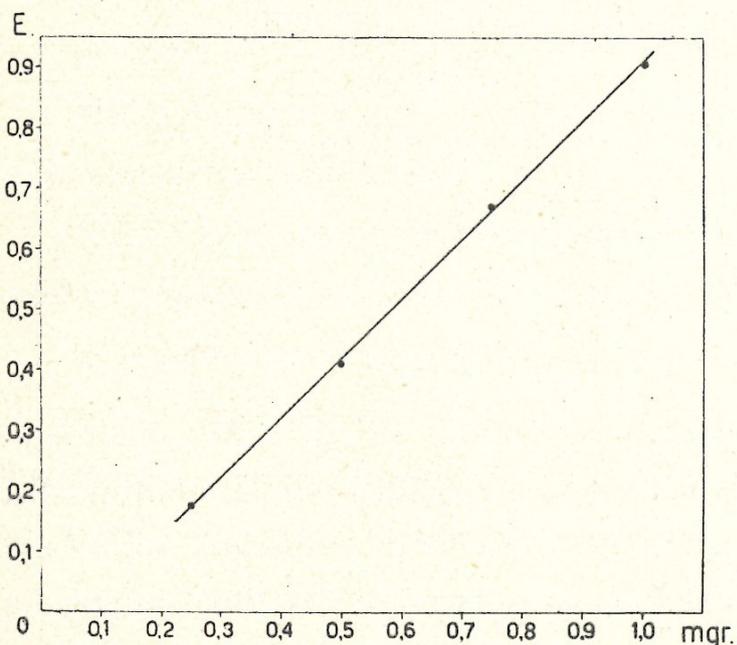
DESCRIZIONE DEL METODO

In un tubicino della capacità di 8 cm³ circa, con un rigonfiamento sul fondo e sfilato all'altra estremità, si introducono 1-2 cm³ di soluzione metilalcolica di cloridrato di adermina e quindi, a goccia a goccia, una

soluzione eterea di diazometano sino a colorazione leggermente gialla persistente.

Si lascia in riposo per due ore circa e quindi si evapora cautamente il solvente. Si ottiene così il prodotto metilato sotto forma di goccioline oleose leggermente colorate in giallo.

Si raffredda il tubicino immergendolo in acqua e ghiaccio e si aggiungono con un imbutino, avendo cura di non bagnare le pareti, 0,1 cm³ di ioduro di metile, si chiude il tubicino alla fiamma e si riscalda per



2 ore in stufa alla temperatura di 100°. E' da tener presente che questa reazione non si effettua in modo quantitativo, però qualora si operi nelle stesse condizioni il rendimento si può praticamente considerare costante dentro un limite di errore del 5%.

Dopo raffreddamento si apre il tubicino e si evapora l'eccesso di ioduro di metile.

Al residuo oleoso, giallo, si aggiunge 1 cm³ di cloroformio, si riscalda alla temperatura di 40-45° e quindi si aggiungono 0,5 cm³ di soluzione di etilato sodico. Nella zona di contatto dei due liquidi appare subito una colorazione che agitando si propaga a tutto il liquido e dal rosso-violetto passa gradualmente all'azzurro-violetto. Appena la colorazione raggiunge il massimo di intensità si raffredda il tubicino immergendolo in una vaschetta d'acqua tenuta alla temperatura di 10° circa e si diluisce con 2-3 cm³ di miscela cloroformio-alcool. E' questo il punto più delicato del metodo, poichè a temperatura inferiore ai 20° la reazione non avviene, mentre riscaldando a temperatura superiore ai 55° o per un tempo più prolungato il violetto-adermina rapidamente si distrugge.

Si travasa quindi il liquido in un matraccino tarato da 10 cm³ e, con la stessa miscela cloroformio-alcool, si lava il tubicino e si porta a volume.

Si filtra infine in una vaschetta da 2 cm³ e si esegue la lettura al fotometro di Pulfrich, inserendo il filtro S. 59. La colorazione della soluzione

si presenta sufficientemente stabile, tuttavia è bene procedere subito alle letture poichè dopo 5-10 minuti dalla filtrazione la soluzione comincia a intorbidarsi.

Nella tabella seguente sono riportati i valori dell'estinzione riferiti al peso di vitamina B₆ (cloridrato) e nella figura il diagramma corrispondente. Ogni punto rappresenta la media di 6 determinazioni che da questa differivano per scarti mai superiori al 5 %.

mg. di cloridrato di adermina	. 1,00	0,75	0,50	0,25
estinzione	. 0,910	0,668	0,412	0,174

RIASSUNTO

Si descrive un metodo colorimetrico di determinazione quantitativa della vitamina B₆ sintetica, fondato sulla formazione del violetto-adermina.

SUMMARIUM

Methodus quaedam describitur colorimetrica, qua vitamina B₆ synthetica quantitate determinatur. Haec autem methodus violaceo — aderminae formatione innititur.

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

BIBLIOGRAFIA

- (¹) O. FOLIN e W. DENIS, J. biol. Chem., 12, 239 (1912); 22, 305 (1915).
 - (²) Am. J. Physiol., 129, 459 (1940); Proc. Exper. biol. med., 43, 118 (1940).
 - (³) J. biol. Chem., 72, 649 (1927).
 - (⁴) K. K. KOESSLER e M. T. HANKE, J. biol. Chem., 39, 497 (1919); R. KAPPELLER-ADLER, Biochem. Z., 264, 131 (1933).
 - (⁵) Ber., 72, 1453 (1939).
-
-