

29. DETERMINAZIONE QUANTITATIVA COLORIMETRICA DEL FATTORE "P", O CITRINA.

Per l'esame di alcuni preparati medicinali abbiamo voluto studiare la possibilità di ricorrere ad una reazione chimica per la determinazione quantitativa del fattore P.

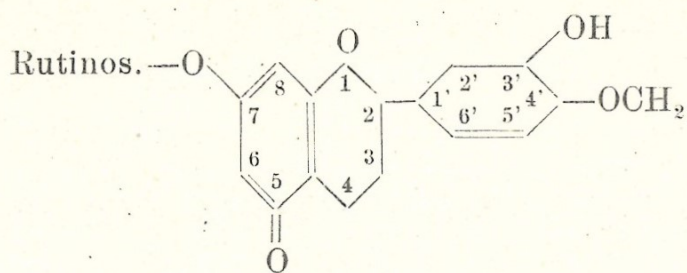
Il fattore P, fattore della permeabilità, è stato messo in evidenza da Szent-Gyorgy ⁽¹⁾, il quale aveva rilevato come con vitamina C sintetica non si ottenesse, sulla diatesi emorragica, l'effetto curativo che è invece dato dalla vitamina estratta da prodotti naturali; rielaborando questi, aveva potuto isolare ⁽²⁾, soprattutto da limoni e paprica, un complesso di glucosidi di coloranti naturali della serie del fenilbenzo- γ -pirone; complesso, da lui denominato « Citrina », che, somministrato a cavie a dieta scorbutogena, ne prolungava di molto la sopravvivenza, rendendo anche assai meno imponenti le manifestazioni emorragiche.

Questi primi brillanti risultati non furono però confermati da altri Autori ⁽³⁾, e dallo stesso Szent-Gyorgy più tardi ⁽⁴⁾; esperienze cliniche nel frattempo invece riaffermavano l'importanza del nuovo mezzo terapeutico ^(4, 5); sì che la questione si può ritenere tuttora come aperta, e si preferisce chiamare la Citrina fattore anzichè vitamina, dato soprattutto che non si è riusciti ancora ad ottenere negli animali manifestazioni di una pura avitaminosi P, ed in attesa che ulteriori studi chiariscano se la sua azione sia indipendente, o, piuttosto, di un attivatore delle proprietà biologiche dell'acido ascorbico ⁽⁶⁾.

Per la preparazione della « Citrina » Szent-Gyorgy ha dato più tardi ⁽⁴⁾ due metodi più semplici, che portano praticamente allo stesso risultato, e precisamente all'ottenimento di un preparato cristallino, e di una soluzione madre, entrambi usati nelle esperienze biologiche.

Questi preparati contengono tre glucosidi, l'esperidina, l'eriodictina e la quercitrina.

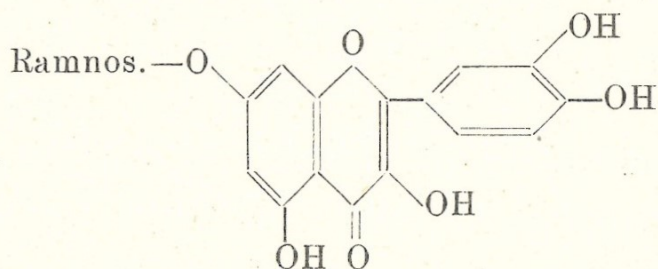
L'esperidina è il rutinoside dell'esperetina; è il principale costituente del preparato cristallino; gli spetta la formula $C_{28}H_{34}O_{15}$;



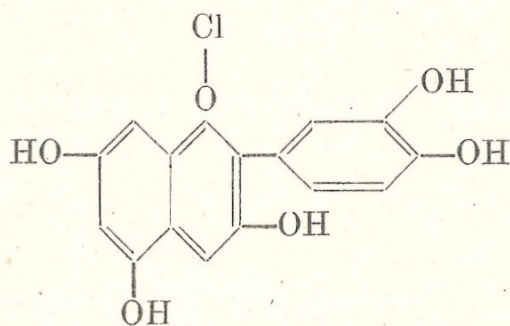
L'eriodictina ha la formula $C_{27}H_{32}O_{15}$; si differenzia dal precedente composto per il fatto che l'ossidrile in 4' non è metilato; è contenuto in maggiore quantità nella soluzione madre.

Ambedue sono quindi dei glucosidi flavanonici.

Il terzo costituente, la quercitrina, contenuto in minima quantità, è un ramnoside flavonolico; gli spetta la formula $C_{21}H_{20}O_{11}$:



E' nota da tempo la possibilità di ridurre la quercetina (aglicone della quercitrina) con Mg ed HCl; si forma il cloruro di cianidina:



La reazione è generale per tutti i flavonoli, che passano a sali di antocianidine, caratterizzati da una colorazione rossa in soluzione acida e blu in ambiente alcalino (questa seconda colorazione è in generale più debole della prima).

Soltanto più recentemente (7) è stata studiata la possibilità che derivati flavanonici diano prodotti colorati con riduzione con Mg ed HCl.

Dato che il fattore P è una mescolanza di più componenti, che portano singolarmente un contributo non noto alla colorazione con Mg ed

HCl, e dato che l'attività biologica è pure una funzione non ancora definita della presenza dei tre glucosidi (pare che il più attivo sia quello eriodictiolico) non si può evidentemente utilizzare la reazione di riduzione per una misura dell'attività biologica di fattore P di materiali naturali o di concentrati di diversa provenienza; e meraviglia veramente che Szent-Gyorgy la adoperi (⁴) per una titolazione del fattore P nel suo prodotto cristallino e nella soluzione madre, che egli stesso dichiara di composizione molto diversa.

Sorge quasi il dubbio che almeno una parte dell'incertezza delle prove biologiche possa provenire dall'uso di preparati diversi, dei quali si fosse stabilita, erroneamente, una equivalenza di contenuto di fattore P in base alla reazione colorata di riduzione.

Riteniamo invece che tale reazione si presti assai bene, data la sua sensibilità, a titolare preparati di uguale provenienza ed elaborazione; e, dato che per il momento l'unica tecnica nota è quella di Szent-Gyorgy, abbiamo applicato la reazione stessa al dosaggio del prodotto cristallino; condizione essenziale è il mantenimento di una acidità ben definita, dato che la colorazione è assai influenzata dal pH; rispettando tale premessa si sono avuti dei risultati molto precisi, come appare dal grafico della pagina seguente.

PARTE SPERIMENTALE.

REAGENTI.

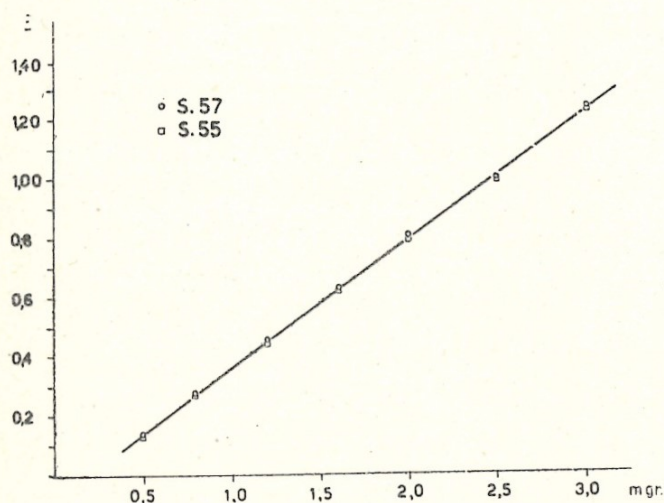
- 1) Acido cloridrico al 20 %, esattamente titolato.
- 2) Magnesio tornitura.

ESECUZIONE DEL METODO.

In un palloncino tarato da 25 cc. si introducono 5 cc. di soluzione di citrina (da 0,5 a 3 mg.) in alcool metilico e 0,3 gr., esattamente pesati, di tornitura di magnesio. Quindi, raffreddando il palloncino sotto getto di acqua (15°) oppure immergendolo in un bicchiere con acqua e ghiaccio,

si aggiunge con una spruzzetta, una soluzione di acido cloridrico al 20 %, a $\frac{1}{2}$ cc. circa per volta.

Quando l'effervescenza accenna a finire si aggiunge altro acido e si continua finchè tutto il magnesio ha reagito. La riduzione deve avere la



durata di $\frac{1}{2}$ ora circa. Si lascia quindi in riposo per $\frac{1}{4}$ d'ora perchè la soluzione si stabilizzi alla temperatura ambiente — eventualmente si filtra — e si porta a volume adoperando sempre la stessa soluzione di acido cloridrico al 20 %. Dopo di che si lascia riposare ancora per $\frac{1}{2}$ ora, durante la quale la colorazione rossa della soluzione raggiunge il massimo d'inten-

sità. La colorazione si mantiene ora stabile per oltre un'ora. Si fanno quindi le letture al fotometro di Pulfrich con filtri S. 55 ed S. 57, dei quali il secondo dà valori leggermente più alti.

Nella tabella seguente sono riportati i dati ottenuti:

Citrina mg.	Estinzione		Citrina mg.	Estinzione	
	S. 55	S. 57		S. 55	S. 57
0,5	0,131	0,143	2	0,799	0,815
0,8	0,271	0,279	2,5	1,015	1,030
1,2	0,445	0,457	3	1,241	1,252
1,6	0,624	0,634			

RIASSUNTO

Viene dato un metodo di determinazione quantitativa colorimetrica del fattore P, o Citrina, (preparato secondo Szent-Gyorgy), basato sulla comparsa di una colorazione rosso-violacea per riduzione con Mg ed HCl. Si fanno alcune considerazioni critiche sulla possibilità di dosare chimicamente il fattore di permeabilità.

SUMMARIUM

Methodus quaedam profertur apta ad colorimetrice determinandum quae quotae partes sint factoris P, id est Citrinae, Szent-Györgyi ratione confecti: quae methodus, ubi Mg et HCl adhibueris, praesenti visione innititur rubro-violacei coloris.

Accedunt criticae quaedam animadversiones, an fieri possit ut permeabilitatis quoque ratio chymice determinetur.

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

BIBLIOGRAFIA

(¹) RUSZNYAK e SZENT-GYORGYI, *Nature*, 138, II, 27, (1936); BENTSATH, RUSZNYAK e SZENT-GYORGYI, *Nature*, 138, II, 798, (1936); BRUCKNER e SZENT-GYORGYI, *Nature*, 138, II, 1057, (1936).

(²) ARMENTANO, BENTSATH, BERES, RUSZNYAK e SZENT-GYORGYI, *Deut. med. Wochensch.*, 33, II, 1325, (1936).

(³) ZILVA, *Biochem. J.*, 31, 915, 1488, (1937); MOLL, *Klin. Wochensch.*, 1653, (1937); ZILVA, *Nature*, 140, II, 588, (1937); LOTZE, *Z. Ges. exp. Med.*, 102, 527, 697, (1938); LOTZE, *Deut. med. Wochensch.*, 64, I, 477, (1938).

(⁴) *Z. physiol. Chem.*, 255, 126, (1938).

(⁵) SCARBOROUGH, *Biochem. J.*, 33, 1400, (1939); SCHABER, *Munch. med. Wochensch.* 88, 986, (1941).

(⁶) BENTSATH, RUSZNYAK e SZENT-GYORGYI, *Nature*, 139, I, 326, (1937).

(⁷) SHINODA, *J. pharm. Soc. Japan*, 48, 35, (1928).
