

48. Aurelio MARIANI ed Aldo GAUDIANO. — Sulla determinazione spettrofotometrica della vitamina A.

Riassunto. — Gli Autori hanno fatto uno studio sulla determinazione spettro fotometrica della Vitamina A, soffermandosi in particolare sul metodo di correzione proposto da Morton e Stubbs.

Di tale metodo, esteso anche alle misure fatte in alcool isopropilico, essi aumentano la precisione ricorrendo ad un sistema di interpolazione. Propongono inoltre alcune modifiche alle formule di correzione per la Vitamina A non esterificata, ed i fattori di conversione per le misure fatte in alcool etilico ed in cicloesano.

Résumé — Les AA. ont fait une étude sur le dosage spectrophotométrique de la vitamine A, s'occupant plus particulièrement de la méthode de correction proposée par Morton et Stubbs pour éliminer l'erreur due à l'absorption des substances étrangères.

Ils proposent une méthode d'interpolation qui permet d'augmenter la précision du résultat.

En examinant les courbes d'absorption de la vitamine estérifiée en alcool isopropylique, ils ont trouvé qu'elles coïncident avec celles pour la solution en alcool éthylique: à celles-là, par conséquent, on peut appliquer la correction qui a été proposée par Morton et Stubbs pour son absorption dans l'alcool éthylique. Cette correction, ainsi que celle appliquée aux courbes pour la solution en cyclohexane, a donné, sauf quelques rares exceptions, des résultats satisfaisants. Pour ce qui concerne la vitamine A alcool, ils proposent par contre une correction un peu différente de celle proposée par Morton et Stubbs, et ils rapportent les nouvelles formules comme suit:

$$\text{en alcool éthylique} \quad E_{1\text{corr.}} = 7E_{325} - 2,714E_{310} - 4,286E_{334,5}$$

$$\text{en alcool isopropylique} \quad E_{1\text{corr.}} = 7E_{325} - 2,625E_{310} - 4,375E_{334}$$

$$\text{en cyclohexane} \quad E_{1\text{corr.}} = 7E_{326} - 3,062E_{312,5} - 3,938E_{336,5}$$

Ayant pris connaissance du facteur de conversion 1900 récemment fixé par le Sous-Comité pour les Vitamines Liposolubles de l'Organisation Mondiale de la Santé et basé sur les données suivantes,

$$1) \quad 1 \text{ U. I} = 0,3 \gamma \text{ de Vitamine A alcool}$$

$$2) \quad E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 1750 \text{ à } 325 \text{ m}\mu \text{ pour la vitamine A alcool en isopropanol,}$$

ils proposent le facteur 1880 pour les courbes relatives à l'alcool éthylique et 1920 pour celles en cyclohexane.

On exprime le souhait que les formules de correction et les facteurs relatifs aux divers solvants, tels qu'ils résulteront des études poursuivies dans les divers Laboratoires soient sanctionnés officiellement par l'Organisation Mondiale de la Santé.

Summary. — The authors have studied the spectrophotometric determination method of Vitamin A, particularly the correction method proposed by Morton and Stubbs.

The authors were able to increase the accuracy of the method by a system of interpolation, which applies also to measurements made in isopropyl alcohol.

The authors propose some modifications of the correction formulae of Morton and Stubbs, for non-esterified Vitamin A, and conversion factors for measurements in ethyl alcohol and cyclohexane.

Zusammenfassung. — Die V. V. haben die spektrophotometrische Bestimmung des Vitamins A studiert und sich dabei besonders mit der von Morton und Stubbs vorgeschlagenen Korrektur zur Beseitigung des durch Absorbierung fremder Stoffe verursachten Fehlers befasst.

Sie schlagen eine Interpolationsmethode vor, die es erlaubt, die Präzision der Ergebnisse zu erhöhen.

Bei der Beobachtung der Absorptionskurven der Vitaminester in Isopropylalkohol fanden sie diese mit jenen in Aethylalkohol übereinstimmend; man kann daher auch bei diesen Kurven die gleiche Korrektur von Morton und Stubbs anwenden, die für jene in Aethylalkohol vorgeschlagen wurde. Diese Korrektur, sowie auch jene, welche bei den Kurven in Cyclohexan angewendet wurde, hat, von seltenen Ausnahmen abgesehen, befriedigende Ergebnisse gegeben. Was Vitamin A Alkohol anbelangt, schlagen die V. V. hingegen eine Korrektur vor, die sich nur wenig von jener von M. und S. vorgeschlagenen unterscheidet.

Die neuen Korrekptions - formeln sind:

$$\text{in Aethylalkohol} \quad E_1 \text{ corr.} = 7E_{325} - 2,714E_{310} - 4,286E_{334,5}$$

$$\text{in Isopropylalkohol} \quad E_1 \text{ corr.} = 7E_{325} - 2,625E_{310} - 4,375E_{334}$$

$$\text{in Cyclohexan} \quad E_1 \text{ corr.} = 7E_{326} - 3,062E_{312,5} - 3,938E_{336,5}$$

Indem sie den kürzlich vom Unterkomitee für Fettlösliche Vitamine der

Weltgesundheits Organisation bestimmten Konversionsfaktor 1900 zur Kenntnis nehmen und auf Grund der Annahme dass:

1) 1 U. I. = 0,3 gamma Vitamin A in Alkohol

2) $E \frac{1\%}{1 \text{ cm}} = 1750$ bei 325 m μ für Vit. A Alkohol in Isopropyl-alkohol

schlagen sie 1880 für die in Aethylalkohol und 1920 für die in Cyclohexan dargestellten Kurven vor.

Abschliessend wird der Wunsch zum Ausdruck gebracht, es mögen die Korrektionsformel und die Faktoren in den verschiedenen Lösungsmitteln, officiell von der Weltgesundheits Organisation sanktioniert werden.

I vantaggi che la determinazione spettrofotometrica della vitamina A presenta rispetto alla determinazione colorimetrica col reattivo di Carr-Price e, soprattutto, rispetto a quella biologica, hanno generalizzato l'impiego di questo metodo chimico-fisico che, come è noto, consiste nel misurare l'estinzione di una soluzione vitaminica al suo massimo d'assorbimento nell'ultravioletto (325-328 m μ).

Perchè tale metodo risponda ai necessari requisiti di precisione, occorre tuttavia fissare accuratamente due punti, dai quali dipende tutta la attendibilità del risultato:

1) il fattore di conversione, cioè il numero per cui bisogna moltiplicare l'estinzione della soluzione in esame, riportata a concentrazione e spessore unitari, per avere il valore delle Unità Internazionali per grammo:

$$E \frac{1\%}{1 \text{ cm}} \times f = \text{U.I. /g}$$

2) la maniera di distinguere l'estinzione dovuta all'a vitamina da quella dovuta alle sostanze che l'accompagnano e che assorbono anch'esse le radiazioni intorno al massimo d'assorbimento della vitamina.

Su questi due punti ci soffermeremo separatamente, riepilogando le più significative fra le numerose ricerche esistenti sull'argomento ed esponendo i risultati delle nostre esperienze.

Descriveremo infine la tecnica che, a nostro avviso, consente di ridurre al minimo gli errori e daremo il valore medio dell'errore che si ha seguendo la tecnica descritta.

FATTORE DI CONVERSIONE:

Per poter calcolare il fattore di conversione, occorre conoscere con esattezza:

a) l'estinzione al massimo d'assorbimento di un peso noto di vitamina o, in altri termini, il valore dell'estinzione molare ϵ o dell'estinzione unitaria $E \frac{1\%}{1 \text{ cm}}$;

b) la quantità in peso di vitamina corrispondente all'U. I.

Il primo dato si può avere se si è in possesso della vitamina (o di un suo estere) allo stato puro.

In questi ultimi anni si è riusciti ad ottenere prodotti di notevole purezza, da cui sono stati calcolati valori dell'estinzione che sono in discreto accordo tra di loro. Li riportiamo nella Tabella 1, facendo rilevare subito che il valore dell'estinzione va dato unitamente al solvente impiegato (perchè varia un po' con esso) ed alla lunghezza d'onda corrispondente (la vitamina A alcool ha infatti un massimo d'assorbimento a 325-326 m μ mentre gli esteri lo hanno, a seconda del solvente, tra 325 e 328 m μ).

Il valore più attendibile appare quello di 1750 (in alcool isopropilico a 325 m μ) proposto dal Sottocomitato per le vitamine liposolubili dell'Organizzazione Mondiale della Sanità, riunitasi a Londra nell'aprile 1949 ed accettato dalla seconda Assemblea Generale dell'Organizzazione Mondiale della Sanità tenutasi in Roma dal 13 giugno al 2 luglio 1949. Nel testo della relazione presentata da detto Sottocomitato(*) non risulta il valore di $E \frac{1\%}{1 \text{ cm}}$ in solventi diversi dall'alcool isopropilico. Dai dati riportati da molti AA., e da noi riassunti nella Tabella 2, appare che il valore dell'estinzione varia un po' da solvente a solvente.

Ricordiamo, per quanto riguarda i solventi, che la seconda Conferenza Internazionale per la Standardizzazione delle Vitamine (1934) aveva consigliato l'uso dell'alcool etilico o del cicloesano, sconsigliando il cloroformio, mentre il Sottocomitato testè riunitosi a Londra parla solo di alcool isopropilico, che è il solvente consigliato dalla Farmacopea Americana.

Non è fuor di luogo far qui rilevare che la Conferenza del 1934 parla sempre di assorbimento a 328 m μ , la Sottocommissione del 1949 parla invece di assorbimento a 325 m μ , pur aggiungendo che « il massimo di assorbimento deve trovarsi nella banda 325-328 m μ ».

(*) Siamo grati al Dr. GAUTIER, Vice-Direttore Generale dell'Organizzazione Mondiale della Sanità, che ci ha gentilmente fatto avere copia della relazione.

TABELLA I. ESTINZIONE UNITARIA DELLA VITAMINA A SECONDO I DIVERSI AUTORI.
(I valori per gli esteri sono riferiti all'1% di vitamina A alcool, dopo correzione per il radicale acido).

Prodotto	Solvente	λ	$E_{1\%}^{1\text{cm}}$	Autore e data	Osservazioni
Vitam. A alcool	Etanolo	328	1810 $\pm$ 10	Mead 1939 (1)	Da cristallizz. in metanolo a bassa temp. di un distillato molecolare.
Antrachinon-2-carbossilato (forma rossa)	Isopropanolo	328	1790	»	»
2-naftoato	Isopropanolo	328	1800	»	»
Vitam. A alcool	Etanolo	328	1750 $\pm$ 21 anche 1780	Baxter e Robeson 1942 (2)	Esteri preparati dal prodotto precedente.
Acetato	Etanolo	328	1730	»	»
Palmitato	Etanolo	328	1720	»	»
Vitam. A alcool	Etanolo	324	1721 $\pm$ 9	Zscheile e Henry 1942 (3)	»
Vitam. A alcool	Isopropanolo	324	1689 $\pm$ 9	»	»
Vitam. A alcool	Cicloesano	326	1597 $\pm$ 7	»	»
Vitam. A alcool	Isopropanolo	328	1745	Morgareidge 1942 (4)	»
Vitam. A alcool	Isopropanolo	325	1783	»	»
Vitam. A alcool	Isopropanolo	327	1620	»	»
Vitam. A alcool	Cicloesano	327-28	1801	Oser e Coll. 1943 (5)	»
Acetato	Isopropanolo	325	1860	»	Della « Distill. Prod. Inc. ».
Vitam. A alcool	Isopropanolo	328	1825	»	Dal precedente per saponificazione.
Vitam. A alcool	Isopropanolo	325	1720	»	»
Vitam. A alcool	Etanolo 95%	328	1794	Isler e Coll. 1947 (6)	Prod. sintet. con p. f. 60-62°.
Vitam. A alcool	Isopropanolo	328	1732	Guerrant e Coll. 1948 (7)	Valore massimo fra 13 campioni.
Acetato	Isopropanolo	325	1743	»	Prodotto con p. f. 57,7-58,8.
Acetato	Isopropanolo	325-28	1772	»	Prodotto preparato dagli A.A. (p. f. 57,6-58,9).
Acetato	Etanolo	326	1687	Morton e Stubbs 1948 (8)	»
Vitam. A alcool	Cicloesano	325	1784	»	»
Vitam. A alcool	Etanolo	328	1692	»	»
Acetato	Cicloesano	326,5	1746	»	»
Acetato	Etanolo	326,5	1763	»	»
Acetato	Etanolo 75%	325-28	1775 $\pm$ 2	»	»
Acetato	Etanolo	325-28	1775 $\pm$ 2	Chilcote e Coll. 1949 (9)	Preparato dagli A.A. o ottenuto dalla « Hoffmann La Roche ».
Acetato	Isopropanolo	325-28	1751 $\pm$ 7	»	»
Acetato	Cicloesano	328	1706 $\pm$ 13	»	»
Acetato	Isopropanolo	325	1750	Organ. Mond. Sanità 1949	p. f. 57,8-59.
Vitam. A alcool	Isopropanolo	325	1750	»	Valore desunto dal precedente.

TABELLA 2. RAPPORTI FRA LE ESTINZIONI DELLA VITAMINA A IN VARI SOLVENTI.

PRODOTTO	S O L V E N T I							AUTORE e DATA
	Etano- lo	Metano- lo	Isopropanolo	Cicloesano	Etere di petrolio	Cloroformio	Benzolo	E t e r e
Insaponificabile di grassi animali	1	1	—	—	0,906 (p.e. 60°-80°)	0,832	0,832	—
Concentrati oleosi	1	—	—	0,95-1,02 (0,975)	0,95-1,02 (0,975) (esano)	0,86-0,935 (0,89)	—	0,995-1,165 (1,075)
Oli di pesce	1	—	0,99±0,02	—	—	—	—	—
Olio di ippoglossso e suo insaponif.	1	—	ca. 1	0,88-0,99	—	—	—	—
Vitam. A alcool crist.	1	1,01-1,03	0,97-0,99	0,93-0,94	0,97-0,99 (esano)	—	—	—
Vitam. A alcool crist. . .	—	—	1	0,91	—	—	—	—
Insaponificabile di grassi naturali	—	—	—	—	1	—	0,884	—
Vitam. A alcool crist. . .	1	—	—	0,945	—	—	—	—
Acetato crist.	1	—	0,983	0,968	—	—	—	—
Acetato crist.	1	—	1	—	—	0,915	—	—
Acetato crist.	1	—	0,985-0,989	0,953-0,971	—	—	—	—

Gillam e el Ridi 1938 (10).
 Smith e Coll. 1938 (11).
 Ewing e Coll. 1940 (12).
 Adamson e Evers 1941 (13).
 Zscheile e Henry 1942 (3).
 Morgareidge 1942 (4).
 Awapara e Coll. (14).
 Morton e Stubbs 1948 (8).
 Morton e Stubbs 1948 (8).
 Lahousse 1948 (15).
 Chilcote e Coll. 1949 (9).

Fissato ad ogni modo in 1750 il valore di $E \frac{1\%}{1\text{ cm}}$ a 325 m μ in alcool isopropilico, basterebbe conoscere il peso corrispondente all'U.I. per poter subito calcolare il fattore. La questione, tuttavia, è stata notevolmente complicata dalla mancanza di una U.I. di vitamina A univocamente definita. La Conferenza del 1931 aveva adottato come standard un preparato di «carotene» di cui 1 gamma costituiva l'U.I. A questa doveva venir riferita anche l'attività biologica della vitamina A. Essendosi in seguito messo in evidenza che il «carotene» standard era un miscuglio degli isomeri alfa e beta, di diversa attività, la Conferenza del 1934 fissò come U. I. 0,6 gamma di beta-carotene, che si ritenne dovessero equivalere ad 1 gamma del vecchio «carotene». La quantità di vitamina A corrispondente ad 1 U. I., essendo legata all'U.I. della provitamina non da un rapporto stechiometrico, ma da esperienze biologiche necessariamente incerte, non poteva essere definita con esattezza. Essendo tuttavia emerso da esperienze condotte in vari Laboratori che la vitamina aveva un'attività circa doppia del beta-carotene (che pare venga utilizzato solo per metà), si considerò da molti come U. I. 0,3 gamma di vitamina A. Questa ammissione non aveva però alcuna sanzione ufficiale e poggiava su di una base piuttosto incerta. Anche Morton, nel promemoria da lui presentato al Sottocomitato del 1949 (*), fa rilevare che l'U.I. sarebbe 0,3 gamma se l'attività doppia si riferisse al peso, 0,32 gamma se invece si riferisse alla grammo-molecola (536 g di beta - carotene danno, stechiometricamente, 572 g di vitamina A); egli consiglia pertanto di assumere arbitrariamente uno dei due valori.

Il Sottocomitato ha fissato come U.I. di vitamina A l'attività di 0,344 gamma di acetato, corrispondenti a 0,3 gamma di vitamina A alcool (si è preso come base l'acetato, che è più stabile dell'alcool; non si è tenuto conto della possibilità, tuttora controversa, che gli esteri vengano utilizzati meglio della vitamina alcool). Resta così fissato il fattore:

$$f = \frac{10^6}{0,3 \times 1750} = 1900 \quad (\text{in alcool isopropilico}).$$

Questo fattore, che sarà ora universalmente adottato, viene ultimo di una lunga serie che, come fa rilevare ARCANGELI in un suo studio di qualche anno fa (16), comprende valori da 835 a 2380. Tale grande discordanza era dovuta in gran parte da un canto alla differente tecnica usata nelle esperienze biologiche, dall'altro al poco o nessun conto in cui si teneva l'as-

(*) Ringraziamo il Prof. R. A. MORTON per il cortese invio di una copia del pro-memoria.

sorbimento delle sostanze estranee, sostanze che si credeva di poter eliminare quasi del tutto mediante saponificazione.

La Conferenza del 1934 adottò il fattore 1600, desunto dai dati di confronto fra assorbimento nell'U.V. e attività biologica ottenuti in vari Laboratori. Questo fattore si mostrò però di limitate applicazioni, anche se si seguiva la tecnica di saponificazione suggerita dalla Conferenza stessa; esso infatti risultava troppo alto per gli olii poco concentrati, troppo basso per prodotti molto puri. Pur essendo stato fatto oggetto di molte critiche, esso fu riconfermato nel 1939 ed adottato, tra l'altro, dalla nostra Farmacopea (VI Ed. 1940).

Anche in Inghilterra, in Francia e nei Paesi scandinavi è stato fino a poco tempo fa usato questo fattore.

Le Autorità Statunitensi adottarono come standard sussidiario un olio di fegato di merluzzo (U.S.P. Oil I) che conteneva 3000 Unità per grammo (determinate biologicamente per confronto col carotene del 1931); l'insaponificabile di quest'olio aveva, nel 1934, un $E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 1,58$, da cui si deduceva un fattore 1900. Misure successive dimostrarono che il valore di $E_{1\text{ cm}}^{1\%}$ andava diminuendo, segno questo che l'olio si deteriorava.

Nel 1940, essendo risultato in media $E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 1,35$, il fattore di conversione si sarebbe dovuto portare a 2222, considerando sempre il titolo dello olio uguale a 3000 Unità per grammo. Il confronto biologico col nuovo standard di beta-carotene dava però un titolo di 2600 Unità per grammo (la differenza era dovuta, oltre che al deterioramento, alla non perfetta equivalenza tra i due standard di carotene).

Nel frattempo, essendosi esaurito il I olio, se ne adottò un altro (U.S.P. Oil II), avente 1700 Unità per grammo. Per eliminare malintesi, si chiamò Unità della Farmacopea Statunitense (U.S.P.U.) quella riferita all'Olio Standard. Quest'olio aveva l' $E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 0,88 - 0,92$ (0,77 - 0,82 sull'insaponificabile).

Nel 1941 si propose quindi 2000 come fattore commerciale ⁽¹⁷⁾ (4).

$$E_{1\text{ cm}}^{1\%} \times 2000 = \text{U.S.P.U./g}$$

Fu però osservato da molti che questo fattore portava a valori troppo elevati, specie se applicato a prodotti non saponificati e che, di conseguenza, la U.S.P.U. risultava più piccola della U. I. Questa differenza non fu mai

fissata ufficialmente, ma si mostrò di fatto ammontare al 10-20% circa (18), (19).

Il fattore 2000 fu usato anche dopo che nel 1944, essendosi rilevato instabile l'U.S.P. Oil II, s'introdusse l'U.S.P. Oil III.

E' da notare ad ogni modo che la Farmacopea Statunitense (XIII Ed. 1947) non riporta nessun fattore, perchè dà il riconoscimento ufficiale solo alla determinazione biologica, e non a quella spettrofotometrica. Il fattore 2000 è stato usato fino a tutto il 1947 ed è stato accettato dall'«Association of Vitamin Chemists» di Chigago, che lo riporta nel volume «Methods of Vitamin Assay». Un'aggiunta fatta però quando il volume era già stampato avverte che le Autorità Statunitensi avevano adottato un nuovo olio standard (a 10.000 U.I./g), ottenuto sciogliendo l'acetato di vitamina A in olio di cotone purificato ed il cui insaponificabile aveva $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 5,28$ in alcool etilico; il fattore da adottarsi era pertanto $10.000/5,28 = 1894$. Le Autorità Statunitensi hanno però chiarito (gennaio 1948) che esse davano riconoscimento ufficiale all'olio e non al fattore 1894, in quanto solo il metodo biologico era stato riconosciuto ufficialmente dalla Farmacopea.

Le ricerche fatte nel frattempo in Inghilterra portavano ad un fattore prossimo a 1800; Morton faceva però notare che tale fattore era applicabile alla sola vitamina A e suggeriva un metodo, che fra poco prenderemo in esame, per eliminare l'assorbimento delle sostanze estranee (8) (20). Nel già ricordato pro-memoria egli tuttavia, venendo incontro agli Americani, propone un fattore 1850. Il Sottocomitato riunitosi nell'aprile 1949, avendo riconosciuto $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ per la vitamina A eguale a 1750 ed avendo ammesso $1 \text{ U.I.} = 0,3$ gamma di vitamina A alcool, ha proposto, come abbiamo già detto, il fattore 1900, che è stato successivamente accettato dalla Assemblea Generale della O.M.S. Viene così eliminato il dualismo tra U.I. e U.S.P.U. e viene data la possibilità di determinare il contenuto vitaminico per via spettrofotometrica, senza dover ricorrere al lungo e impreciso metodo biologico.

ELIMINAZIONE DELL'ASSORBIMENTO ESTRANEO.

Una volta fissato il fattore di conversione, si potrebbe eseguire con molta esattezza la determinazione spettrofotometrica della Vitamina A se l'assorbimento misurato al massimo fosse dovuto alla sola vitamina. Siccome però esso è da imputarsi, per una percentuale più o meno elevata, a sostanze varie che accompagnano abitualmente la vitamina, bisogna tener conto di questa circostanza. Si può ovviare all'inconveniente:

1) eliminando le sostanze estranee prima di sottoporre il campione alla misura spettrofotometrica;

2) facendo la misura prima e dopo l'ossidazione fotochimica della vitamina A, in modo da ricavare l'assorbimento dovuto a questa soltanto;

3) confrontando la curva d'assorbimento ottenuta con quella della vitamina A pura e « correggendola » con un metodo matematico.

Per quel che riguarda l'eliminazione preventiva, diremo subito che il metodo generalmente adottato di operare sull'insaponificabile non riesce ad eliminare tutte le sostanze estranee. Inoltre, per quante cautele si possano seguire, si hanno quasi inevitabilmente delle perdite più o meno rilevanti. Ad ogni modo, è bene ricorrere alla saponificazione quando si devono esaminare prodotti a basso titolo (< 1000 U. I./g).

Un'ulteriore purificazione può ottenersi col metodo cromatografico, che è stato impiegato sia per purificare la soluzione di vitamina A che per preparare un campione in bianco esente da vitamina (14). La cromatografia è però lontana dal permettere una separazione perfetta dei vari componenti e per di più dà spesso delle isomerizzazioni che complicano il decorso dell'analisi. Si può anche ricorrere, dopo saponificazione, all'uso di solventi (alcool a 50°) che sciolgono la vitamina a preferenza delle sostanze estranee, oppure alla distillazione molecolare.

Un altro metodo è basato, come abbiamo detto, sull'ossidazione della vitamina A, nel campione in esame, per irradiazione con luce U.V. Questa tecnica, suggerita per primo da PEACOCK (21), è stata applicata da DE (22) mettendo nella vaschetta di confronto, invece del solvente puro, il prodotto irradiato con luce U.V. e così privato di vitamina A. DEMAREST (23) e LITTLE (24) preferiscono servirsi di luce U. V. filtrata, per ottenere una distruzione selettiva. Il metodo è basato sul principio, la cui validità non è generale, che l'irradiazione elimini solo e tutto l'assorbimento della vitamina A. Secondo CHEVALLIER (25) si fa l'irradiazione con luce U.V. filtrata, in soluzione etanolica; in tal modo la vitamina A si trasformerebbe in un prodotto che ha, a 325 m μ , un assorbimento pari a 2/3 di quello della vitamina; si può così facilmente calcolare il contenuto in vitamina A. Si è però visto in seguito che il metodo non è applicabile alla Vitamina A alcool (26).

E' stato anche proposto di fare l'ossidazione, anzichè per via fotochimica, per riscaldamento a 100° in presenza di ossigeno (27).

Qualora si disponesse di un campione eguale a quello in esame, ma esente da vitamina, si potrebbe comodamente ricorrere al confronto tra i due campioni. Questo però appare possibile solo in casi speciali, a meno che non si voglia ricorrere alla già ricordata separazione cromatografica.

Passiamo ora ai metodi matematici.

Una memoria di OSER e Coll. (28) aveva fissato un metodo qualitativo, tutt'ora ampiamente adoperato, per giudicare dalla curva di assorbimento la purezza di un olio vitaminico: siccome i prodotti di ossidazione della vi-

tamina A assorbono meno della vitamina a 328 mμ, ma più intorno ai 300 mμ, un olio deteriorato presenta uno spettro d'assorbimento con il massimo a 328 mμ tanto meno pronunciato e con il ramo verso le lunghezze d'onda minori tanto più elevato quanto più spinto è il processo di ossidazione; per oli molto ossidati, si può avere addirittura la scomparsa del massimo a 328 mμ. Il rapporto delle estinzioni a 300 e a 328 mμ è quindi, secondo Oser, un indice del grado di ossidazione dell'olio; solo se $E_{300}/E_{328} < 0,72$ si può ritenere sufficientemente esatta la misura spettrofotometrica diretta, altrimenti si hanno valori troppo elevati (*). Questo criterio qualitativo è stato poi riveduto da HALPERN (30).

Egli fa notare che Oser aveva scelto il punto a 300 mμ empiricamente, non quindi basandosi su di un suo particolare significato, ma più per convenienza nell'impiego dello spettrofotometro di Beckman, che permette di rilevare letture fino a circa 300 mμ senza dover ricorrere alle vaschette di silice e alla lampada a scarica di idrogeno. Esistono, per di più, casi citati da Halpern e dallo stesso Oser, di oli che, pur avendo un rapporto E_{300}/E_{328} soddisfacente, non mostrano una potenzialità in relazione all'assorbimento che si ricava per lettura diretta al massimo. Più logico quindi risulterebbe prendere come misura dell'alterazione di un olio il rapporto degli assorbimenti al massimo (328 mμ) e al minimo (260 mμ) cioè E_{260}/E_{328} , sempre però come criterio qualitativo.

Il lavoro di Oser, che va ricordato per aver messo in evidenza la necessità di non limitarsi a fare la lettura al punto di massimo, è servito di spunto a LAHOUSSE (15) per ricavare alcuni sviluppi matematici, da cui si dedurrebbe che l'assorbimento estraneo è dovuto in massima parte ai prodotti di ossidazione della vitamina A; questa ipotesi, che, a detta dell'A., attende ancora conferma sperimentale, a noi pare molto probabile, tanto più che di essa abbiamo avuto una conferma indiretta nell'esame delle curve « incorreggibili » (vedi dopo).

Ma il metodo matematico più rigoroso, consigliato, anche dall'ultimo Sottocomitato di Londra, è quello suggerito da MORTON e STUBBS (8) (20). Siccome esso ci ha dato risultati soddisfacenti, specialmente seguendo alcuni accorgimenti da noi introdotti per aumentarne la precisione, lo descriveremo nei suoi particolari, discutendone i limiti di applicazione, le cause d'errore e gli accorgimenti per ridurre queste al minimo.

Il metodo consiste nel misurare l'estinzione non soltanto al massimo (λ_1), ma anche ad altre due lunghezze d'onda (λ_2 e λ_3), da una parte e dall'altra del massimo, in corrispondenza dell'e quali la vitamina A pura ha

(*) La U. S. War Food Administration fissò nel 1945 la condizione che fosse $E_{300}/E_{328} < 0,73$ e $E_{260}/E_{328} < 0,65$ (29).

un assorbimento di ugual valore e pari ad una determinata frazione dell'assorbimento massimo. In base ai tre valori delle estinzioni lette alle lunghezze d'onda suddette si può, come spiegheremo tra breve, calcolare l'assorbimento al massimo della sola vitamina A, e da questo il numero di U. I./g. Se, oltre al contenuto di vitamina A, si vuol conoscere qualitativamente, o an-

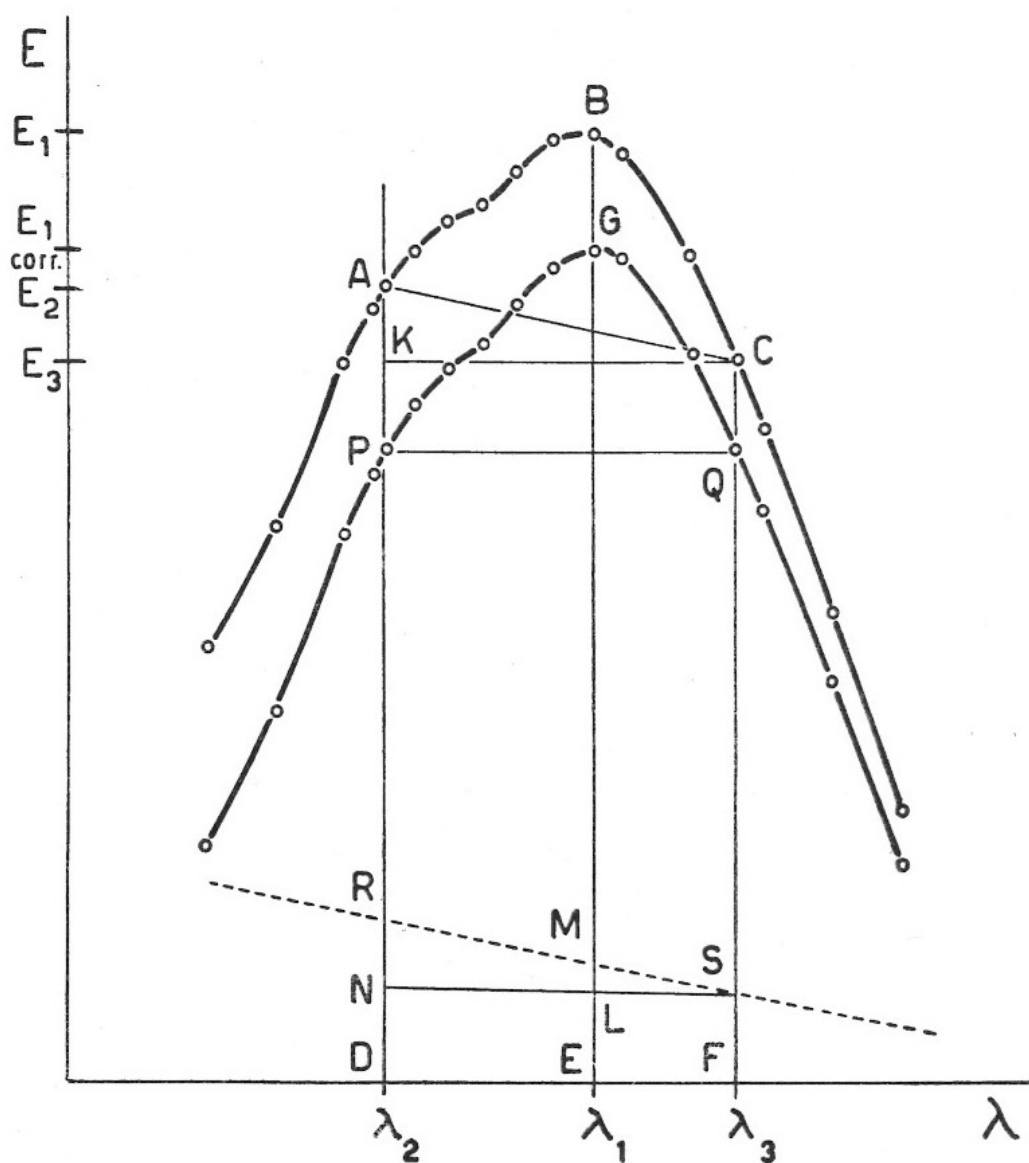


Fig. 1

che semi-quantitativamente, la composizione del prodotto in esame, quale si può rilevare dall'assorbimento delle sostanze estranee, occorre costruire per punti la curva d'assorbimento e da essa sottrarre quella dovuta alla sola vitamina A. Il metodo presenta quindi il duplice vantaggio di fornire il valore dell'assorbimento dovuto alla sola vitamina A, e contemporaneamente di poter avere un'idea delle sostanze che accompagnano la vitamina.

Supponiamo (figura 1) che la ABC sia la curva d'assorbimento, ottenuta sperimentalmente, del prodotto in esame; sia PGQ la curva d'assorbi-

mento (non ricavabile direttamente) della vitamina A contenuta nel prodotto. Sottraendo la PGQ dalla ABC si avrà la RMS, che dà l'assorbimento estraneo. La figura si riferisce al caso più comune che l'assorbimento estraneo cresca al diminuire della lunghezza d'onda; potrebbe però anche diminuire o restare costante. La condizione indispensabile perchè il metodo sia applicabile è che l'assorbimento estraneo abbia andamento rettilineo, o quasi, nel tratto RS; questa condizione è generalmente soddisfatta nei prodotti naturali. Chiamiamo E_1 l'estinzione letta al massimo, cioè alla lunghezza d'onda λ_1 ; E_2 ed E_3 le estinzioni lette agli altri due « punti base » λ_2 e λ_3 ; E_1 corr. l'estinzione (incognita) a λ_1 dovuta alla sola vitamina A (punto G). Essendo la RMS eguale alla differenza tra la ABC e la PGQ, sarà

$$(1) \quad E_1 \text{ corr.} = E_1 - BG = E_1 - ME = E_1 - (ML + LE).$$

Calcoliamo prima il valore di ML. Per la similitudine dei triangoli RNS e MLS sarà

$$(2) \quad ML = \frac{LS}{NS} RN = \frac{\lambda_3 - \lambda_1}{\lambda_3 - \lambda_2} (E_2 - E_3).$$

I due punti base laterali sono stati fissati in modo che in corrispondenza di essi la vitamina A abbia un'estinzione (determinata da Morton e Stubbs operando su prodotti cristallizzati) eguale ai 6/7 dell'estinzione al massimo. Essi sono stati scelti con una certa arbitrarietà, ma facendo in modo che la loro distanza non sia nè troppo piccola, per aumentare la sensibilità del metodo, nè troppo grande, per far sì che l'assorbimento estraneo (tratto RS) non devii dalla linearità. Sarà allora (tenendo presente che $LE = SF$).

$$(3) \quad \frac{E_1 - ML - LE}{E_3 - LE} = \frac{7}{6}.$$

Essendosi già calcolato ML, si può da questa relazione ricavare LE e, sostituendo nella (1) i due valori di ML e LE, ricavare E_1 corr. Questo valore, espresso in termini di $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ darà, moltiplicato per il fattore di conversione, il numero delle U.I./g. Se si vuole anche la curva d'assorbimento delle sostanze estranee, occorre, come si è detto, misurare l'estinzione non solo alle lunghezze d'onda base λ_1 , λ_2 e λ_3 , ma anche a diverse altre (per esempio ogni 5 m μ), e dalla curva ottenuta sottrarre quella della sola vitamina. Quest'ultima si può ottenere per semplice proporzione in base al valore di E_1 corr. ed alla tabella di M. e S (8).

Riassumiamo nella tabella 3 alcuni dati sull'assorbimento nell'U.V. e sull'attività biologica di sostanze analoghe alla vitamina A.

TABELLA 3.

Dati relativi all'assorbimento dell'U.V. e all'attività biologica di sostanze analoghe alla vitamina A.

PRODOTTO	Massimi di assorbimento nell' U. V.	Valori di E 1% 1cm	Attività biol. rispetto alla vitamina A.
Anidro-vitam. A (31)	351 371 392	2500 3650 3180	0,4 %
(Axeroftene di Meunier e C.) (32)	345-47 368 390		
Isoanidrovit. A (31)	330 349 370		0,4 %
Subvitamina A (31)	290	(150)	0
Anidrosubvit. A (31)	332 348 367-69	250 255 180	0
Axeroftene (diidroanidrovit. A) (33)			
(34)	331 346 364	108 126 95	17 %
Axeroftale (35)	368 350	1050 920	invivo dà vit. A
Acido della vit. A (36) (37) . . .	343-47	1500	10 %
Chitolo (38)	286	580	0
			a 200° dà vit. A
Epaxantina (39)	275	440	0,3 %
Prodotti di ossidazione della vit. A			
(15) (40)	280 e 313		0
Vitamina A ₂ (31) (41)	287 351	820 1460	40 %
Anidro-vit. A ₂ (31)	350 368-70 390		0

Nella tabella di M. e S. sono riportate le estinzioni fra 220 e 450 mμ, della vitamina A e del suo acetato in diversi solventi (cicloesano, alcool etilico, alcool etilico a 75°), espresse come frazioni dell'estinzione al massimo. I punti base, che variano dalla vitamina A al suo acetato e da solvente a solvente, sono riportati nella tabella 4, insieme con i valori di ε max e di E 1%
1cm.

Per semplificare i calcoli, si possono sviluppare le (1), (2) e (3), ricavandone la formula

$$E_1 \text{ corr.} = 7 \left(E_1 - \frac{\lambda_3 - \lambda_1}{\lambda_3 - \lambda_2} E_2 - \frac{\lambda_1 - \lambda_2}{\lambda_3 - \lambda_2} E_3 \right).$$

Questa formula è applicabile anche al caso che sia $E_3 \geq E_2$. Sostituendo in essa i valori numerici della tabella 4, si hanno le formule di correzione della tabella 5, in cui sono anche riportati sotto i vari fattori di correzione le mantisse dei relativi logaritmi.

TABELLA 4.

Punti di base ed estinzione al massimo della vitamina A in vari solventi secondo Morton e Stubbs.

	Vitamina A alcool		Vitamina A acetato		
	cicloesano	etanolo	cicloesano	etanolo	etanolo 75'
λ_1	326	325	328	326,5	326,5
λ_2	311	311	313	311,5	312,5
λ_3	335	335,5	338,5	337,5	338,5
$\epsilon_{\max}$	48310	51100	48460	50020	50510
$E_{1\%}^{1\text{cm}}$	1687	1784	1475 (1692)*	1523 (1746)*	1538 (1763)*

TABELLA 5.

Formule di correzione per la vitamina A (ricavate dai dati di Morton e Stubbs).

Prodotto	Solvente	Formula di correzione
Vit. A alcool	cicloesano	$E_1 \text{ corr.} = 7 E_{326} - 2,800 E_{311} - 4,200 E_{336}$ log 44716 log 62325
	etanolo	$E_1 \text{ corr.} = 7 E_{325} - 3 E_{311} - 4 E_{335,5}$
Vit. A estere	cicloesano	$E_1 \text{ corr.} = 7 E_{328} - 2,882 E_{313} - 4,118 E_{338,5}$ log 45974 log 61465
	etanolo	$E_1 \text{ corr.} = 7 E_{326,5} - 2,962 E_{311,5} - 4,038 E$ log 47152 log 60622
	etanolo 75°	$E_1 \text{ corr.} = 7 E_{326,5} - 3,231 E_{311,5} - 3,769 E$ log 50931 log 57676

Da queste formule appare evidente che, siccome i valori letti delle estinzioni vengono moltiplicati per un fattore più o meno grande, anche gli errori di lettura vengono moltiplicati per lo stesso fattore e se, per sfortunata

(*) Il valore fra parentesi è riferito all'1% di vitamina A alcool.

ipotesi, si sommano, ne risulta un errore non indifferente. Tale prerogativa limita il metodo alla spettrofotometria fotoelettrica, rendendolo troppo impreciso per la spettrografia. Ma anche disponendo di un buon spettrofotometro, come quello di Beckman mod. D. U. da noi usato, si può arrivare ad un errore di diverse unità per cento, pur operando con la massima accuratezza. L'errore commesso nella lettura al punto del massimo viene moltiplicato per 7 (vedi tabella 5), ma siccome in quel punto la curva ha una tangente orizzontale, l'errore di lettura può ridursi al minimo ($\pm 0,2\%$ circa). Più delicate sono invece le letture a λ_2 e λ_3 , perchè ivi la curva ha una notevole inclinazione; a questo aggiungasi che, nella maggior parte dei casi, λ_2 e λ_3 non sono numeri interi (v. tab. 5); siccome la scala delle lunghezze d'onda, nello spettrofotometro di Beckman, porta, in questo campo, le divisioni ad ogni $m\mu$, si commette anche, ponendo la linea di fede tra una divisione e l'altra (per es. tra 337 e 338 $m\mu$ per fare la lettura a 337,5), un errore di parallasse che, sommandosi a quello di lettura, ammonta approssimativamente al 0,5-1%. L'errore commesso a λ_2 viene moltiplicato per 3 circa, quello a λ_3 per 4.

Sarà istruttivo a questo punto un esempio numerico. Supponiamo che le letture, fatte su soluzioni di concentrazione tale che l'estinzione sia all'incirca fra 0,4 e 0,5, cioè nel campo più indicato per l'apparecchio, siano le seguenti:

$$E_2 = 0,500$$

$$E_2 = 0,440$$

$$E_3 = 0,430$$

e che i valori reali siano invece:

$$E_1 = 0,501$$

$$E_2 = 0,437$$

$$E_3 = 0,427$$

Il valore di $E_{1 \text{ corr.}}$ calcolato in base ai primi dati è (se le misure sono state fatte su un estere di vitamina A in soluzione etanolica) 0,460; in base ai secondi è 0,489. Si è commesso quindi un errore del 6,3% nella sola misura spettrofotometrica (non è incluso l'errore inerente alla pesata ed alla diluizione).

PARTE SPERIMENTALE.

Abbiamo detto che il principale errore nell'applicazione del metodo di M. e S. si commette nella lettura dell'estinzione ai due punti base laterali. Per ovviare all'inconveniente, abbiamo pensato di ricorrere ad un metodo d'interpolazione. A tale scopo, abbiamo preso in esame le curve d'assorbimento nei diversi solventi per vedere se, e in quali punti, fosse possibile fare l'interpolazione. Le misure sono state fatte con lo spettro fotometro di Beckman mod. D.U. la cui scala delle lunghezze d'onda era stata calibrata con

le linee a 546, 405 e 254 $m\mu$ della lampada a vapori di mercurio. Abbiamo constatato che le curve d'assorbimento nella zona dello spettro vicina ai due punti base laterali hanno un andamento praticamente rettilineo. E' quindi possibile fare la lettura in tre o quattro punti, a distanza di 1 $m\mu$, in prossimità del punto base e ricavarsi, per interpolazione grafica, il punto che interessa. In base all'esame delle varie curve da noi fatte, consigliamo di fare l'interpolazione fra i punti indicati dalla tabella 6.

TABELLA 6.

Punti per l'interpolazione

Punto base	Punti fra cui interpolare			
311	309	310	311	312
311,5	310	311	312	(313) *
312,5	311	312	313	(314) *
313	311	312	313	314
335,5	334	335	336	337
336	334	335	336	337
337,5	336	337	338	339
338,5	337	338	339	340

Si può così ovviare non solo all'imprecisione della lettura, ma anche ad eventuali irregolarità dell'assorbimento estraneo.

La maggior precisione raggiungibile con quest'accorgimento ci ha indotto ad estendere il metodo di correzione alle misure fatte in alcool isopropilico. Le curve in tale solvente, infatti, che è quello suggerito dalla Farmacopea Statunitense e dal Sottocomitato di Londra, non sono riportate da M. e S.

Non avendo ancora potuto procurarci la vitamina A od il suo acetato cristallizzati, abbiamo fatto le misure con l'acetato standard americano (1948). Riportiamo in un diagramma (Fig. 2) le curve d'assorbimento in cicloesano, in alcool etilico e in alcool isopropilico, esprimendo i valori delle estinzioni come frazioni del valore massimo e limitandoci, per chiarezza, alle zone nei pressi dei punti base laterali. Si può constatare in tal modo che le curve in alcool etilico e in alcool isopropilico sono praticamente identiche. Tracciando poi due orizzontali che intersecano la curva per il cicloesano nei punti base laterali si trovano sulla curva degli alcoli i punti cor-

(*) I punti messi tra parentesi già mostrano una lieve deviazione dalla linearità.

rispondenti a 311,5 e 337,5 $m\mu$, che sono le lunghezze d'onda già fissate da M. e S. per l'alcool etilico. Ne segue che alle misure effettuate con alcool isopropilico si possono applicare le stesse correzioni di quelle proposte per l'alcool etilico.

Avevamo già fatto queste misure quando è stata pubblicata una recente nota di OSER ⁽⁴²⁾. Questo A. suggerisce per l'alcool isopropilico gli stessi

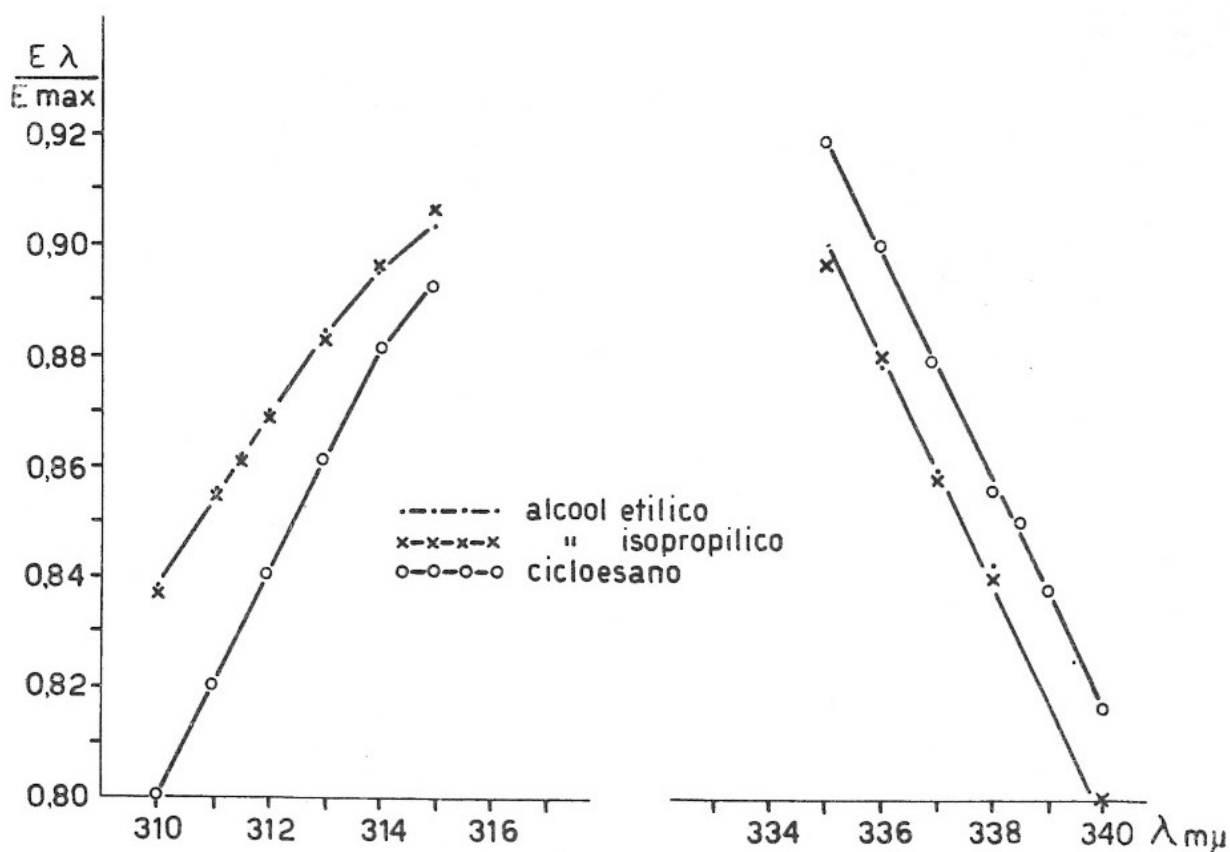


Fig. 2

punti base e quindi la stessa formula di correzione del cicloesano (*). I nostri risultati, che sono in buon accordo con i recentissimi dati pubblicati da CHILCOTE e Coll. ⁽⁹⁾, sono avvalorati dal fatto che l'alcool etilico e quello isopropilico hanno praticamente lo stesso momento dipolare, mentre il cicloesano è notoriamente apolare.

Lo stesso comportamento abbiamo trovato sia con soluzioni oleose di acetato sintetico non purificato (al titolo di 1000000 U.I./g), sia con concentrati di esteri naturali. Qualche volta la curva in alcool isopropilico è

(*) Avendo noi fatto rilevare ad Oser la divergenza fra i nostri dati e quelli da lui pubblicati, egli ha creduto di poterla attribuire ad una inesatta calibrazione della scala delle lunghezze d'onda del nostro apparecchio. In tal caso però avremmo dovuto trovare uguale spostamento per i tre solventi.

un po' spostata verso sinistra, rispetto a quella in alcool etilico, specialmente nel ramo a destra del massimo. Lo spostamento è però di pochi decimi di $m\mu$, non arrivando mai a 0,5 $m\mu$.

Queste misure ci sono servite anche a calcolare l'esatto rapporto esistente tra le estinzioni al massimo dell'acetato di vitamina A nei tre solventi da noi impiegati. Come si vede dalla tabella 2, esistono, in materia, dati alquanto discordanti ed incerti, mentre è necessario conoscere esattamente il valore di $E_{1\text{ cm}}^{1\%}$ nei vari solventi allo scopo di poter stabilire per ognuno di essi il fattore di conversione, calcolato in base a quello in alcool isopropilico, recentemente fissato in 1900. La media delle nostre misure ha dato per i tre solventi il rapporto:

$$\text{etanolo} : \text{isopropanolo} : \text{cicloesano} = 1 : 0,989 : 0,979 = 1,012 : 1 : 0,991$$

Per l'alcool etilico si ha quindi un fattore 1878, per il cicloesano 1918. Per comodità i due fattori possono essere arrotondati a 1880 e 1920, tanto più che i rapporti, come già osservato da altri (4) (10), sono suscettibili di lievi variazioni in dipendenza delle sostanze che accompagnano la vitamina nel prodotto in esame. I dati che riportiamo sono calcolati in base a varie misure da noi eseguite con l'acetato standard americano del 1948 (capsule gelatinose contenenti 2500 U.S.P.U. di acetato di vitamina A in olio di cotone purificato: 1 g = 10000 U.S.P.U. di vitamina A). Secondo le Autorità Statunitensi il valore di $E_{1\text{ cm}}^{1\%}$ in alcool etilico è 5,37; misure fatte in vari laboratori hanno dato in alcool isopropilico un valore di $E_{1\text{ cm}}^{1\%}$ a 326 $m\mu$ = 5,23 $\pm$ 1,45%. Noi abbiamo trovato in alcool etilico assoluto 5,30, in alcool isopropilico 5,24, in cicloesano 5,19. I rapporti E_{300}/E_{max} nei tre solventi sono risultati 0,646 per i due alcoli e 0,617 per il cicloesano (i valori per l'acetato cristallizzato sono, secondo M. e S., 0,604 per l'alcool etilico e 0,571 per il cicloesano). Siccome queste nostre misure sono state fatte senza previa saponificazione, abbiamo voluto misurare separatamente l'assorbimento dell'olio di cotone. Dato che le Autorità Statunitensi non forniscono lo stesso olio usato per le soluzioni dello standard, ci siamo serviti di un olio di cotone U.S.P. Questo, a differenza di quello dello standard, era giallino. L'assorbimento a 300 m , pur essendo apprezzabile ($E_{1\text{ cm}}^{1\%}$ = 0,164), non è tuttavia tale da giustificare un così notevole aumento del rapporto E_{300}/E_{max} , che deve quindi ascrivarsi ad impurezze contenute nell'acetato o a suoi prodotti di alterazione. Di ciò abbiamo avuto conferma facendo le misure sull'insaponificabi-

le; i rapporti sono diventati 0,63 (negli alcoli) e 0,60 (in cicloesano). Nel tratto compreso fra i punti base l'assorbimento dell'olio di cotone è sensibilmente lineare, ma di così modesta entità da non poter praticamente influire sulla curva d'assorbimento dello standard. Questa curva presenta però una anomalia che, pur non essendo di grande portata, merita di essere ricordata: se ad essa si applica la correzione di M. e S., si vede che questa non è possibile perchè il valore corretto risulterebbe un po' più alto di quello letto ($6 E_1 > f_2 E_2 + f_3 E_3$). Mentre il valore di E_2 , è, come di norma, un po' maggiore di quello inerente all'acetato puro ($6/7 E_1$), quello di E_3 è leggermente inferiore. Le cose vanno come se l'assorbimento estraneo fosse nullo, o quasi nullo, a λ_3 , cominciando invece ad un punto compreso fra λ_1 e λ_3 e crescendo poi al diminuire della lunghezza d'onda. In tal caso la RS (vedi figura 1) intersecherebbe l'asse delle ascisse in un punto del tratto EF, di modo che, non essendo più lineare l'assorbimento estraneo nel tratto fra λ_2 e λ_3 , la correzione risulterebbe impossibile. Noi siamo però più propensi a ritenere che l'acetato standard abbia un diverso grado di purezza di quello usato da M. e S. e che il rapporto E_3/E_1 (e forse anche quello E_2/E_1) debba essere effettivamente un po' minore di $6/7$. Tale ipotesi sembra avvalorata dalle recentissime misure di CHILCOTE e Coll. (9) che, operando su prodotti di diversa provenienza, hanno trovato, a 350 m μ (e anche, in minor misura, a 300 e a 310 m μ) un rapporto rispetto al massimo sensibilmente inferiore a quello trovato da M. e S. Purtroppo Chilcote e Coll. non riportano le misure ai punti base.

Le curve da noi ottenute con concentrati di prodotti naturali o con soluzioni oleose di acetato grezzo si sono sempre potute correggere col metodo di M. e S. salvo rarissime eccezioni. Citeremo come tipico l'esempio di un concentrato di olio di fegato di pesci marini (di provenienza americana) che dava una curva di assorbimento non correggibile: il valore dell'estinzione al massimo, corretto, era, in tutt'e tre i solventi da noi usati, circa il 3 % più alto di quello non corretto. Riportando graficamente (figura 3) il rapporto $E_\lambda/E_{\max}$ in funzione della lunghezza d'onda e confrontando i diagrammi ottenuti con quelli ricavabili dalla tabella di M. e S., si vede che il ramo sinistro della curva è solo leggermente più alto di quello di M. e S. fino a 315 m μ (in alcool); l'ossidazione sarebbe quindi piccolissima; da 315 a 326,5 m μ è quasi coincidente (solo lievemente più basso); il ramo destro è invece decisamente più basso e quindi la curva risulta incorreggibile.

Causa di questo fatto pensiamo possa essere la presenza di percentuali diverse di neovitamina A (isomero geometrico della vitamina), che è stata trovata da ROBESON e BAXTER (43) in molti oli di pesce e da SCHWARZKOPF e Coll. (44) nell'acetato sintetico.

Essa ha un massimo spostato di 3-4 m μ verso le lunghezze d'onda maggiori rispetto alla vitamina ed ha un $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ un po' inferiore.

E' quindi da auspicare che si facciano in diversi Laboratori esatte misure d'assorbimento su di un acetato di vitamina A più puro possibile e che da

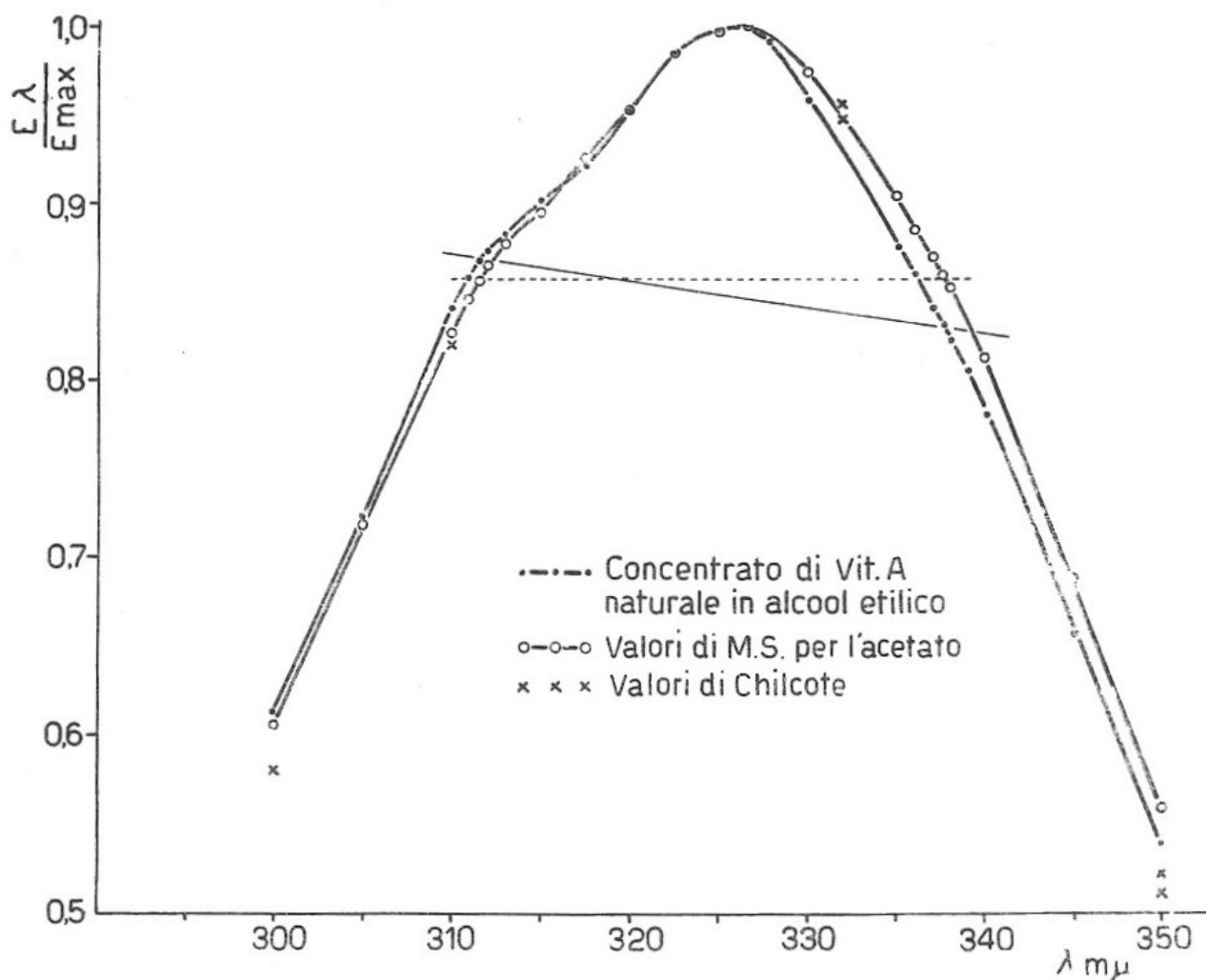


Fig. 3

questo studio collaborativo si possano ottenere formule di correzione che più rispondano al vero.

Sarebbe poi particolarmente importante che si potessero fissare con esattezza anche le formule inerenti alla vitamina A alcool, in modo da poter ridurre a questo stesso comune denominatore, mediante saponificazione, qualsiasi concentrato naturale o sintetico, prescindendo dal radicale acido (acetico, oleico, palmitico, ecc.). Ci sembra infatti che i punti base laterali riportati per la vitamina A alcool da M. e S. e da Oser andrebbero lievemente ritoccati: M. e S. riportano 311 e 336 in cicloesano, 311 e 335,5 in alcool etilico; Oser riporta 312 e 336 in alcool isopropilico. Uno studio collaborativo condotto in 23 Laboratori ha suggerito, in America, i punti 310 e 334 in alcool

isopropilico (*). Operando sull'insaponificabile dello standard americano, e applicando la tecnica grafica già descritta, abbiamo potuto mettere in evidenza (figura 4) che, in vicinanza dei punti base laterali:

1) le curve in alcool etilico e in alcool isopropilico sono quasi coincidenti nella parte a sinistra del massimo; nell'a parte destra, la curva in al-

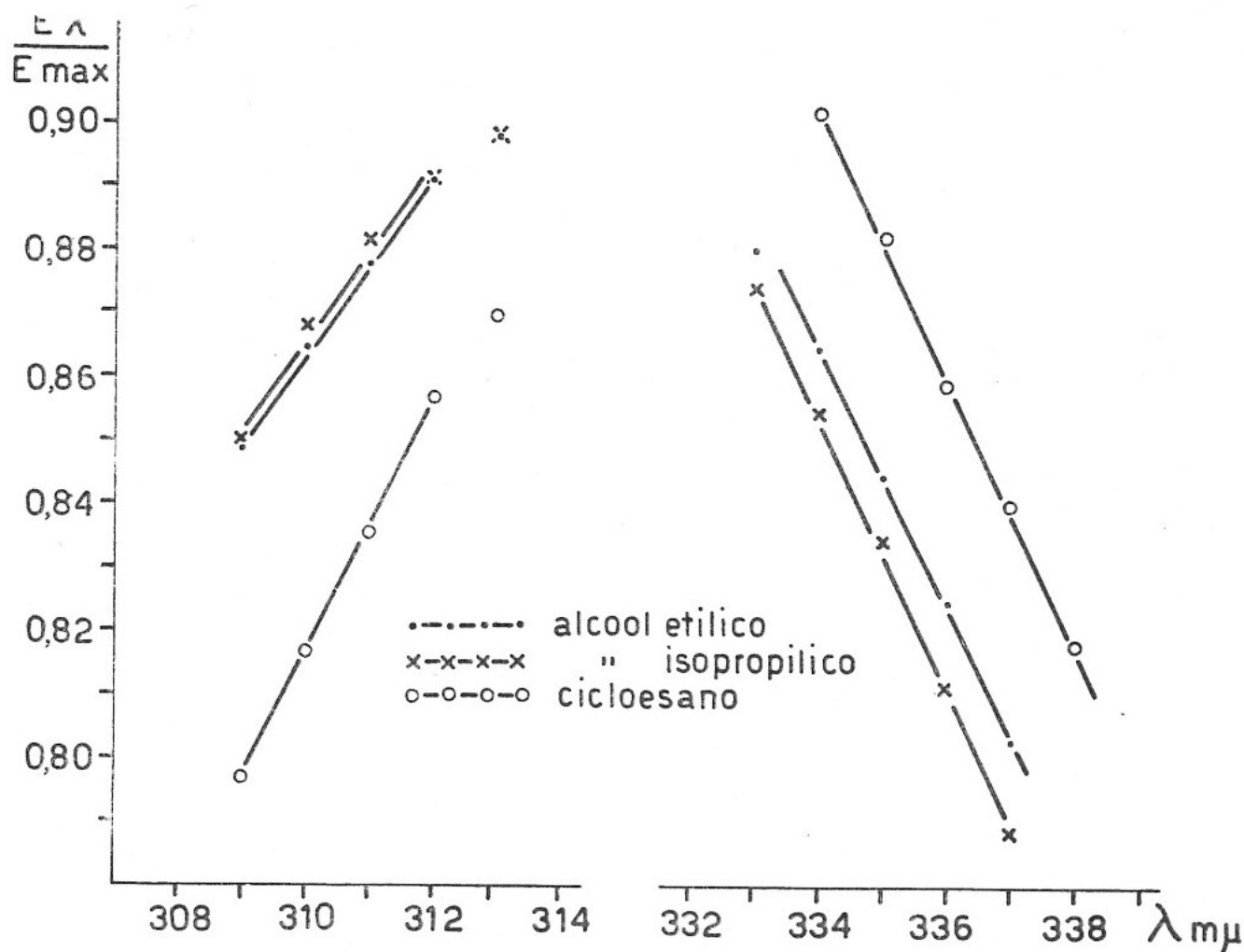


Fig. 4

cool isopropilico è leggermente spostata (di circa 0,5 μ) verso le lunghezze d'onda minori rispetto a quella in alcool etilico;

2) la curva in cicloesano è spostata verso le lunghezze d'onda maggiori, rispetto a quella in alcool etilico, di circa 2,5 μ nel ramo sinistro e 2 μ nel ramo destro.

Ne segue che, se i punti base in cicloesano fossero, come ammettono M. e S., 311 e 336, quelli in alcool etilico dovrebbero essere 308,5 e 334, quelli in alcool isopropilico 308,5 e 333,5. Noi abbiamo trovato, per l'insaponificabile dell'acetato standard in alcool isopropilico (figura 4) dei rapporti

(*) Comunicazione privata del Dr. B. L. OSER.

di poco discosti dal valore 6/7 (e precisamente 0,864 e 0,853 anziché 0,858) in corrispondenza dei punti a 310 e 334 mμ che sono quelli emersi dal sopra accennato studio collaborativo. I punti ad essi corrispondenti sono 310 e 334,5 per l'alcool etilico, 312,5 e 336,5 per il cicloesano. Qualora venisse assodato che in corrispondenza di queste lunghezze d'onda il rapporto ha effettivamente un valore, che chiameremo R, un po' diverso da 6/7, la formula di correzione sarà

$$E_1 \text{ corr.} = \frac{1}{1 - R} \left(E_1 - \frac{\lambda_3 - \lambda_1}{\lambda_3 - \lambda_2} E_2 - \frac{\lambda_1 - \lambda_2}{\lambda_3 - \lambda_2} E_3 \right)$$

Restando fermi, per ora, sul valore 6/7, noi proponiamo, sia pure in via provvisoria, per la vitamina A alcool le formule di correzione della tabella 7

TABELLA 7.

Formule di correzione per la vitamina A alcool

Solvente	Formula di correzione
Isopropanolo . .	$E_1 \text{ corr.} = 7 E_{325} - \frac{2,625}{\log 41913} E_{310} - \frac{4,375}{\log 64098} E_{334}$
Etanolo . . .	$E_1 \text{ corr.} = 7 E_{325} - \frac{2,714}{\log 43366} E_{310} - \frac{4,286}{\log 63202} E_{334,5}$
Cicloesano . .	$E_1 \text{ corr.} = 7 E_{326} - \frac{3,0625}{\log 48608} E_{312,5} - \frac{3,9375}{\log 59522} E_{336,5}$

Precisiamo che queste formule sono di applicazione generale, perchè misure eseguite sull'insaponificabile di concentrati naturali hanno mostrato che tra le curve nei tre solventi si trova sostanzialmente la stessa relazione riportata per l'acetato standard.

TECNICA CONSIGLIATA.

Pesatura del campione. — Il campione da pesare per l'analisi deve essere di almeno mg 50, in modo che, con un errore di pesata massimo di mg 0,1 l'errore percentuale non superi il 0,2 %.

Saponificazione. — Si ricorrerà alla saponificazione solo per prodotti a basso titolo (meno di 1000 U.I./g) oppure quando il metodo di correzione di M. e S. dà risultati incerti. L'operazione va eseguita rapidamente e a luce ridotta (meglio sarebbe operare con recipienti di vetro scuro). Si potrà seguire la procedura della Farmacopea Inglese (Ed. 1948, pag. 720); in ag-

giunta a quanto ivi detto, consigliamo di usare per la saponificazione alcool purificato (esente da aldeidi!) e di assicurarsi che l'estrazione della vitamina con etere sia completa evaporando su un pezzetto di carta da filtro una goccia dell'ultimo estratto eterico e saggiando con reattivo di Carr-Price.

Solventi. — Dei tre solventi più consigliabili (alcool etilico, alcool isopropilico, cicloesano), ognuno ha dei vantaggi e degli svantaggi. Il potere solvente sugli oli aumenta passando dal primo al terzo; il cicloesano è piuttosto volatile e richiede quindi rapidità nell'esecuzione delle misure; l'alcool isopropilico è notevolmente vischioso e richiede molta cautela nelle diluizioni con pipette o burette; l'alcool etilico assoluto, d'altronde, è notoriamente igroscopico. La trasparenza ai raggi U. V. è maggiore per il cicloesano, poi per l'alcool etilico ed infine per l'alcool isopropilico; se però questi solventi vengono opportunamente purificati, la trasparenza è per tutti e tre molto elevata.

Quanto alla stabilità delle soluzioni vitaminiche, è stato riscontrato (9), e possiamo confermarlo, che è massima col cicloesano, minore con l'alcool isopropilico e ancora minore con l'alcool etilico. E' bene, ad ogni modo, procedere alla misura spettrofotometrica subito dopo aver preparato le soluzioni. Nel caso ciò non fosse possibile, tener presente che le soluzioni si mantengono tanto meglio quanto più sono concentrate e quanto più sono protette dall'aria, dalla luce e dal caldo.

Misura spettrofotometrica. — Riferendoci all'apparecchio di Beckman, da noi usato, il campo migliore per la misura delle estinzioni è fra 0,4 e 0,5 (l'optimum teorico è 0,4343), ma la precisione non diminuisce sensibilmente fra 0,2 e 0,8. Siccome la scala delle estinzioni porta le divisioni ogni 0,010 al di sopra di 0,4, ogni 0,005 al disotto di 0,4, consigliamo di fare in modo che le letture si trovino tra 0,3 e 0,4. Bisognerà quindi usare, per le vaschette da 1 cm, soluzioni contenenti 6-7 U.I./cm³. Si possono usare vaschette di silice o di vetro Corex e la lampada a scarico d'idrogeno o quella a filamento di tungsteno. E' bene tenere il bottone della sensibilità a 3-5 giri dal suo limite destrorso; se però l'ago del galvanometro si mostrasse instabile (il che può accadere con la lampada ad idrogeno quando la corrente della rete non è costante), conviene diminuire un po' la sensibilità girando in senso antiorario il relativo bottone. Abbiamo constatato che l'apertura della fenditura non deve essere superiore ad 1 mm, altrimenti si hanno letture erronee; questo va tenuto presente quando si usa la lampada a filamento di tungsteno alle basse lunghezze d'onda. Se non si vuol ricorrere alla lampada ad idrogeno, si potrà stringere la fenditura a condizione di diminuire un po' la sensibilità, od usare le vaschette di silice anziché di Corex, o ricorrere a solventi più trasparenti.

Nel corso della misura, è consigliabile controllare di tanto in tanto che la corrente di fondo (*dark current*) resti costante.

Calcoli. — Eseguite le misure al massimo ed ai punti di interpolazione vicini ai punti base laterali (vedi tabella 5), si riporteranno le letture su carta millimetrata; le lunghezze d'onda in ascisse, lasciando un cm fra un μ e l'altro; in ordinate le estinzioni, lasciando 1 o 2 cm per ogni 0,010 di estinzione (vedi figure 2 e 3). Per interpolazione grafica si ricaveranno i valori ai punti base e, da essi, il valore di E_1 corr. che, diviso per la concentrazione percentuale, darà il valore di $E_{1\text{ cm}}^{1\%}$. Per i prodotti non saponificati, ci si servirà delle formule della tabella 4 (per l'alcool isopropilico vale la stessa formula dell'alcool etilico); per i prodotti saponificati si useranno invece le formule della tabella 7.

Riportiamo come esempio i dati ottenuti con l'insaponificabile di un olio, misurati in tutti e tre i solventi; per renderci indipendenti dalla concentrazione e dall'effetto del solvente sull'altezza del massimo, riportiamo

nella tabella 8 i valori $\frac{E\lambda}{E_{\text{max}}}$; seguono i valori, ottenuti per interpolazione, di E_1 ed E_2 (l'asterisco indica i valori riferentesi alle lunghezze di onda suggerite da M. e S. e da Oser) e, infine, quelli di E_1 corr. (anche qui l'asterisco indica i valori ottenuti secondo i suddetti AA).

Speriamo che queste discordanze, anche se, in genere, di non grande entità, possano essere eliminate dall'adozione internazionale di determinati punti base risultanti dalla media dei dati forniti da più Laboratori. Si potrà così eliminare anche l'inconveniente dell'incorreggibilità di alcune curve della vitamina esterificata, inconveniente che, per ora, abbiamo trascurato in considerazione del fatto che lo abbiamo riscontrato solo in rari casi di prodotti particolarmente puri (per questi si prenderà, per i calcoli, il valore non corretto).

Sarà bene anche che vengano sanciti ufficialmente i fattori di conversione per l'alcool etilico e per il cicloesano; per essi noi proponiamo, rispettivamente, i valori 1880 e 1920, fermo restando il valore 1900 per l'alcool isopropilico. Sarà così possibile l'adozione universale del metodo di M. e S., che per la sua semplicità e per la relativa precisione, merita di essere più ampiamente usato.

Ricordiamo ancora che premessa necessaria per l'applicabilità del metodo è che l'assorbimento estraneo decorra pressochè linearmente fra i punti base. Ciò si verifica quasi sempre, ma qualora, in casi dubbi, si volesse aver-

ne conferma, si potrà costruire il diagramma $\frac{E\lambda}{E_{\text{max}}}$ in funzione di λ e da

esso sottrarre la curva della vitamina A pura. Ciò servirà anche a valutare le altre sostanze presenti, di cui qualcuna (vitamina A₂) potrebbe essere dotata di attività vitaminica.

TABELLA 8

Assorbimento dell'insaponificabile di un concentrato di vitamina A.

λ	Etanolo	Isopropanolo	Cicloesano
308	0,8722	0,8662	—
309	0,8896	0,8880	0,8574
340	0,9055	0,9012	0,8730
311	0,9143	0,9143	0,8898
312	0,9287	0,9252	0,9022
313	0,9344	0,9340	0,9206
325	1	1	0,9328
326	—	—	1
333	0,9095	0,8989	—
334	0,8904	0,8902	0,9206
335	0,8770	0,8716	0,9040
336	0,8588	0,8531	0,8849
337	0,8377	0,8279	0,8682
338	—	—	0,8509
E ₂ int.	0,9012	0,9012	0,9114
E ₃ int.	0,8832	0,8842	0,8771
E ₁ corr.	0,769	0,766	0,755
E* int.	0,9152	0,9280	0,8883
E* int.	0,8657	0,8480	0,8857
E* ₁ corr.	0,792	0,832	0,795

Errore. — Operando con precisione, l'errore di pesata non supera il 0,2%; quello di diluizione può oscillare fra il 0,5 e l'1%. La correzione delle letture spettrofotometriche porterà ad un errore intorno al 3%. L'errore finale non dovrebbe quindi superare il 4-5%. Consigliamo di fare le misure in doppio e di ripeterle se lo scarto fra di esse fosse superiore al 5%.

Roma, Istituto Superiore di Sanità, Laboratorio di Biologia, Novembre 1949.

Addendum. — Viene comunicato (agosto 1950) (45) che nella XIV Edizione della Farmacopea Americana verrà raccomandato di eseguire la determinazione spettrofotometrica della vitamina A sull'insaponificabile e di applicare la correzione di M. e S. prendendo come punti base 310 e 334 m μ (in alcool isopropilico).

BIBLIOGRAFIA



- 1) Biochem. J. 33, 589 (1939).
- 2) J. Am. Chem. Soc. 64, 2407 e 2411 (1942).
- 3) Ind. Eng. Chem. An. Ed. 14, 422 (1942).
- 4) Ind. Eng. Chem. An. Ed. 14, 700 (1942).
- 5) Ind. Eng. Chem. An. Ed. 15, 717 (1943).
- 6) Helv. Chim. Acta, 30, 1911 (1947).
- 7) Anal. Chem. 20, 465 (1948).
- 8) Biochem. J. 42, 195 (1948).
- 9) Anal. Chem. 21, 960 (1949).
- 10) Biochem. J. 32, 820 (1938).
- 11) Nature (London) 141, 551 (1938).
- 12) Ind. Eng. Chem. An. Ed. 15, 639 (1940).
- 13) Analyst 66, 106 (1941).
- 14) Science 104, 602 (1946).
- 15) Chimie et Industrie 60, 443 (1948).
- 16) Rend. Istituto Sup. Sanità 6, 448 (1943).
- 17) Oil, Paint & Drug. Reprtr. 139, 4 (1941).
- 18) Chemistry & Industry 38, 574 (1947).
- 19) Saertr. Tid. Kjem. Bergv. Metall. 10, 163 (1948).
- 20) Analyst 71, 348 (1946).
- 21) Lancet 11, 328 (1926).
- 22) Indian J. Med. Research 24, 737 (1937).
- 23) Z. Vitaminforsch. 9, 20 (1939).
- 24) Ind. Eng. Chem. An. Ed. 16, 288 (1944).
- 25) Z. Vitaminforsch. 7, 10 (1938).
- 26) Compt. rend. Soc. Biol. 131, 372 (1939).
- 27) Biochem. Z. 308, 344 (1941).
- 28) Ind. Eng. Chem. An. Ed. 17, 559 (1945).
- 29) J. Assoc. Off. Agric. Chem. 28, 174 (1945).
- 30) Ind. Eng. Chem. An. Ed. 18, 621 (1946).
- 31) J. Am. Chem. Soc. 65, 901 e 906 (1943).
- 32) Bull. Soc. Chim. Biol. 25, 371 (1943).
- 33) Helv. Chim. Acta. 31, 1055 (1948).
- 34) Helv. Chim. Acta. 32, 232 (1949).
- 35) J. Chem. Soc. 1944, 411.
- 36) Nature (London) 157, 190 (1946).
- 37) Rec. Trav. Chim. 65, 338 (1946).
- 38) J. Am. Chem. Soc. 65, 910 (1943).
- 39) Helv. Chim. Acta. 30, 559 (1947).
- 40) Compt. rend. 198, 2207 (1934).
- 41) Science 108, 417 (1948).
- 42) Anal. Chem. 21, 529 (1949).
- 43) J. Am. Chem. Soc. 69, 136 (1947).
- 44) Helv. Chim. Acta. 32, 443 (1949).
- 45) Am. Chem. Abstracts 44, 7493 (1950).