

53. A. GAUDIANO, F. TOFFOLI e M. BOCCACCI (*). — **Determinazione chimica della cocarbossilasi sintetica.**

Riassunto. — E' stato messo a punto un metodo cromatografico su carta per la determinazione chimica della cocarbossilasi sintetica. Viene suggerito a tale scopo l'impiego del solvente isobutanolo-piridina-acqua 1:1:1 (più l'1% di acido acetico) o di un nuovo solvente contenente urea al 20 %, acido formico all'85 % e n-propanolo nel rapporto 1:2:3.

Dopo aver separato sulla carta i singoli esteri tiamin-fosforici, se ne possono determinare le quantità relative o mediante una determinazione di fosforo, o determinando la tiamina sulle varie frazioni eluite con metodo capillare, oppure ricorrendo alla misura densitometrica, a 267 m μ sullo stesso cromatogramma. Per quanto si riferisce a quest'ultimo procedimento, è stata trovata una relazione lineare tra il logaritmo delle aree ed il logaritmo delle quantità.

Vengono date anche indicazioni per eseguire l'elettroforesi su carta.

Con i metodi esposti, è stato possibile mettere in evidenza, in alcuni prodotti del commercio, 6 componenti: tiamin-difosfato (cocarbossilasi), tiamin-monofosfato, tiamin-trifosfato, tiamina, clorotiamina e un probabile tiamin-polifosfato. Sono presenti, inoltre, quantità piccolissime di due componenti non identificati (forse esteri poli-tiaminici).

Résumé. — On a mis au point une méthode chromatographique sur papier pour la détermination chimique de la co-carboxylase synthétique. On suggère à cet effet l'emploi du solvant isobutanol-pyridine-eau 1:1:1 (plus le 1% d'acide acétique) ou d'un nouveau solvant contenant de l'urée à 20%, acide formique au 85% et n-propanol dans le rapport 1:2:3.

Après avoir séparé sur le papier les différents esters thiamine-phosphoriques, on peut en déterminer les quantités relatives soit au moyen d'une détermination du phosphore, soit en déterminant la thiamine sur les diverses fractions extraites par la méthode capillaire, soit en recourant à la mesure densitométrique, à 267 m μ , sur le chromatogramme lui-même. En ce qui concerne ce dernier procédé, on a trouvé une relation linéaire entre le logarithme des aires et le logarithme des quantités.

On donne aussi des indications pour l'exécution de l'électrophorèse sur papier.

Avec les méthodes exposées, on a pu mettre en évidence, dans cer-

(*) Laureando di chimica.

tains produits commerciaux, les six substances composantes suivantes: thiamine-diphosphate (co-carboxylase), thiamine-monophosphate, thiamine-triphosphate, thiamine, chlorothiamine et une probable thiamine-polyphosphate. En outre des quantités minimales de deux composants non identifiés sont présents (peut-être des esters poly-thiaminiques).

Summary. — A paper chromatographic method has been perfected for the chemical determination of synthetic co-carboxylase. For this purpose, it has been suggested the use of the solvent isobutanol-pyridine-water 1:1:1 (plus 1% acetic acid) or of a new solvent containing urea 20%, formic acid 85% and n-propanol in the proportion of 1:2:3.

After having separated on the paper the single thiamine-phosphoric esters, the respective quantities can be calculated either through a determination of phosphorus or by determining the thiamine on the various fractions eluted through a capillary method, or by using the densitometric measure at 267 m μ on the same chromatogram. In regard to the last process, a linear relation has been found between the logarithm of the areas and the logarithm of the quantities.

Indications are also given for carrying out paper electrophoresis.

It has been possible with the above mentioned methods to find out six components in some commercial products: thiamine diphosphate (co-carboxylase), thiamine monophosphate, thiamine triphosphate, thiamine, chlorothiamine and a probable thiamine polyphosphate. In addition, very small quantities of two unidentified components are present (possibly polythiaminic esters).

Zusammenfassung. — Ein Papier chromatographisches Verfahren zur chemischen Bestimmung der synthetischen Cocarboxylase ist ausgearbeitet worden. Zu diesem Zweck wird die Verwendung von einem aus Isobutanol, Pyridin und Wasser im Verhältnis 1:1:1 (zuzüglich 1% Essigsäure) oder einem neuen Lösungsmittel aus 20% Harnstoff, 85% Ameisensäure und n-Propanol im Verhältnis 1:2:3 vorgeschlagen.

Nachdem auf dem Papier die einzelnen Thiaminphosphorester getrennt sind, können die einzelnen Mengen entweder durch Bestimmung des Phosphors oder durch Bestimmung des Thiamins in den verschiedenen gelösten Fraktionen durch die Kapillarmethode bestimmt werden oder auch durch Durchlässigkeitsmessung bei 267 m μ auf demselben Chromatogramm. Bezüglich dieser letzteren Methode ist eine Linearbeziehung zwischen dem Logarithmus der Flächen und dem Logarithmus der Mengen gefunden worden.

Es werden auch Angaben über die Durchführung der Elektrophorese auf dem Papier gemacht.

Durch die genannten Verfahren ist die Möglichkeit gegeben, in einigen handelsüblichen Produkten sechs Komponenten nachzuweisen, und zwar Thiamindiphosphat (Cocarboxylase), Thiaminmonophosphat, Thiamintriposphat, Thiamin, Chlorthiamin und wahrscheinlich Thiaminpolyphosphat. Ausserdem sind kleine Mengen nicht identifizierter Komponenten vorhanden (vielleicht Polythiaminester).

La determinazione chimica della cocarbossilasi o estere pirofosforico della tiamina (brevemente TDP = Tiamin-difosfato) veniva per lo più eseguita ⁽¹⁾ ricorrendo ad un'idrolisi enzimatica (mediante takadiastasi o clarasi) e successiva determinazione, col metodo fluorimetrico al tiocromo, della tiamina liberatasi; è noto, infatti, che la misura fluorimetrica si fa sull'estratto isobutanolico del tiocromo e che il pirofosfato di tiocromo non è estraibile con alcool isobutilico.

Tale metodo, indicato per i prodotti naturali, non è applicabile ai prodotti sintetici del commercio perchè questi contengono, oltre al TDP, quantità talora rilevanti di estere monofosforico (TMP = Tiamin-monofosfato), che verrebbe anch'esso determinato come TDP, pur essendo completamente sprovvisto di attività cocarbossilasica; secondo LEUTHARDT e NIELSEN ⁽²⁾, anzi, esso non solo non è un intermedio nella sintesi biologica della cocarbossilasi dalla tiamina, ma inibirebbe leggermente la sintesi stessa.

La separazione dal TDP e dal TTP (Tiamin-trifosfato) è stata recentemente ottenuta mediante cromatografia su carta ^(3, 4, 5, 6), ma non è stato finora pubblicato un metodo chimico per la determinazione quantitativa dei vari esteri fosforici presenti in una miscela. Poichè recentemente sono stati messi in commercio numerosi preparati di cocarbossilasi, ci è sembrato urgente studiare un metodo d'analisi qualitativa e quantitativa di tali preparati.

⁽¹⁾ HENNESSY D. J.: *Ind. Eng. Chem., Anal. Ed.*, 13, 216 (1941).

⁽²⁾ LEUTHARDT F. e NIELSEN H.: *Helv. chim. Acta*, 35, 1196 (1952).

⁽³⁾ SPADONI M. A. e TECCE G.: *Quad. Nutriz.*, 11, 26 (1950).

⁽⁴⁾ BALDANTONI A., SPADONI M. A. e TECCE G.: *Quad. Nutriz.*, 11, 327 (1950).

⁽⁵⁾ ROSSI-FANELLI A., SILIPRANDI N. e FASELLA P.: *Science*, 116, 711 (1952).

⁽⁶⁾ VISCONTINI M., BONETTI G., EBNÖTHER C. e KARRER P.: *Helv. chim. Acta*, 34, 1384 (1951).

PARTE SPERIMENTALE

Prodotti. — Abbiamo preso in esame alcune preparazioni di cocarbossilasi di produzione italiana ed estera.

I solventi usati per la cromatografia, i sali per le soluzioni tampone per l'elettroforesi e gli altri reattivi usati erano prodotti puri per analisi.

Cromatografia su carta. — Abbiamo usato il metodo ascendente con i solventi appresso indicati e la carta Whatman N. 1. Altri tipi di carta da noi sperimentati hanno dato risultati meno soddisfacenti.

La soluzione acquosa, preparata al momento, della sostanza in esame veniva deposta, con una micropipetta, su di una striscia di carta a circa 5 cm da una delle estremità, curando di ottenere una macchia la più piccola possibile. In alcuni casi la soluzione veniva invece deposta lungo una linea sottile, posta anch'essa a circa 5 cm da una delle estremità; per quest'operazione ci si può servire di una riga e di un tiralinee o di un'apposita micropipetta. Appena deposta una prima porzione della soluzione, questa veniva immediatamente essiccata con una corrente d'aria di temperatura non superiore a 50°. Si deponevano quindi, nello stesso punto o sulla stessa linea, successive porzioni, che si essiccavano ogni volta, fino a raggiungere la quantità desiderata di sostanza. Questa variava da 5 a 500 µg, secondo lo scopo per cui doveva servire il cromatogramma. Con le note modalità la striscia di carta veniva infine fatta pescare per 2-3 cm nel solvente e vi si lasciava per il tempo necessario (12-72 ore circa).

Dei numerosi solventi provati, i più adatti si sono rivelati: *a*) quello consigliato da BALDANTONI e Coll. (4) (isobutanolo p. 33, piridina p. 33, acqua p. 33, acido acetico p. 1) e *b*) uno che noi qui proponiamo: soluzione acquosa di urea al 20% (peso/vol.) p. 1, acido formico all'85% p. 2, n-propanolo p. 3 (le parti sono espresse in volume). In entrambe le miscele si raggiunge una completa miscibilità, e quindi il vantaggio di una composizione costante, indipendente dalla temperatura. Nessuna di esse dà luogo a idrolisi apprezzabile del TDP durante la cromatografia. I valori degli R_F variano un poco con la temperatura e, specialmente per il solvente *b*), col tempo trascorso dalla data di preparazione. Il solvente *a*) dà valori degli R_F più costanti, ma è più lento; i vari componenti con esso separati sono disposti in zone più piccole e più nette, ma meno distanziate, perchè gli R_F sono minori. Il solvente *b*) presenta sul solvente *a*) il vantaggio di avere un odore meno sgradevole.

Nella Fig. 1 sono riportati alcuni cromatogrammi ottenuti con una cocarbossilasi del commercio usando il solvente *a*) (durata della cro-

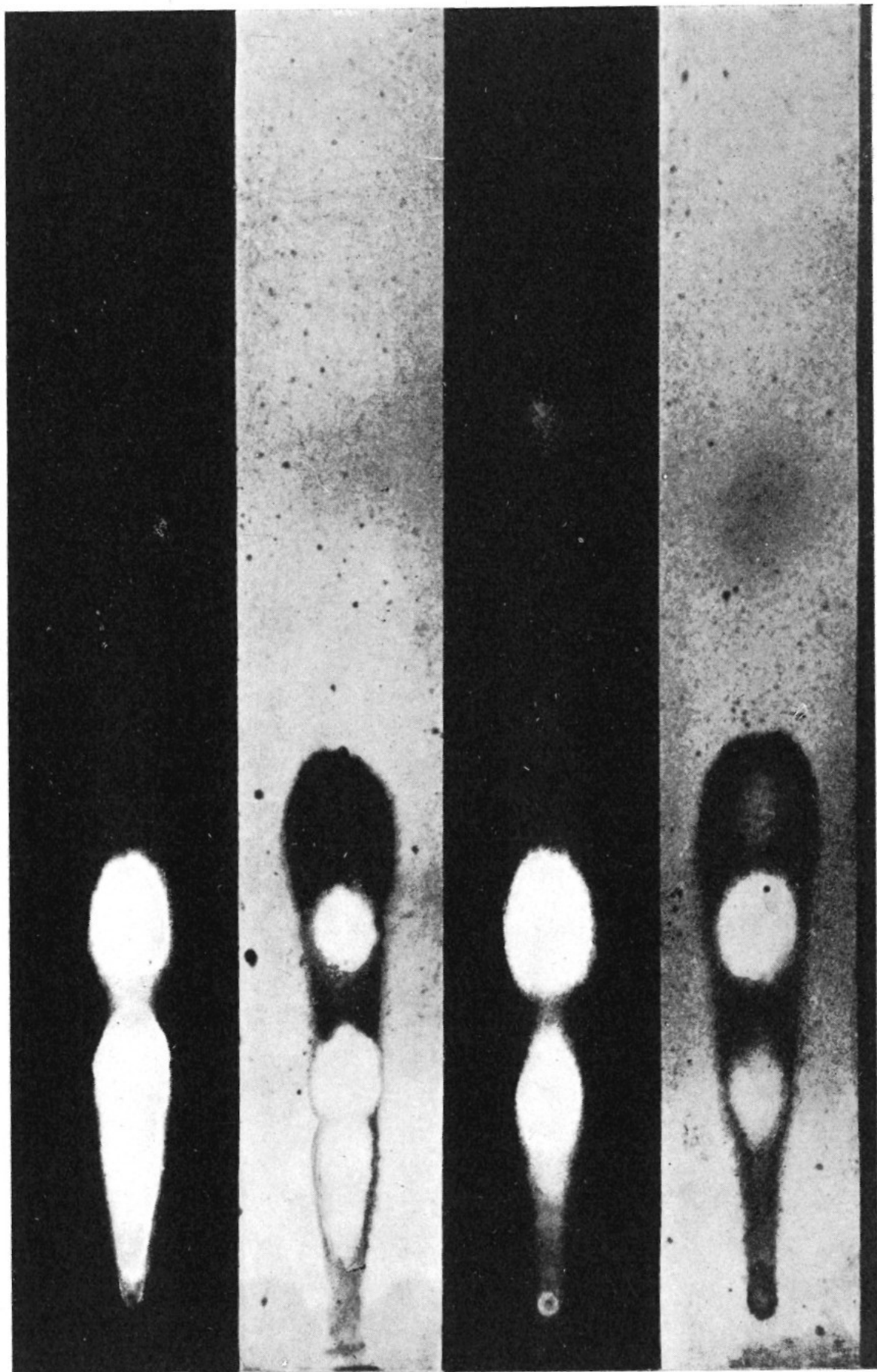


Fig. 1. - Cromatogrammi di un campione di cocarbossilasi ottenuti col solvente *a*, prima (1° e 2°) e dopo (3° e 4°) idrolisi acida, rivelati con soluzione alcalina di ferricianuro (1° e 3°) e con soluzione di molibdato di chinina (2° e 4°). Le figure 1, 2, 3, 4, 6, si riferiscono sempre allo stesso campione di cocarbossilasi.

matografia: 24 ore; temperatura ambiente 20°-25°). La prima e la terza striscia sono state spruzzate con un reattivo ottenuto mescolando parti eguali di NaOH acquosa al 20% e alcool a 95° e aggiungendo qualche goccia di ferricianuro di potassio all'1% sino a colorazione gialla persistente; il reattivo così preparato si mantiene poche ore, ma può essere rinnovato, per qualche tempo, aggiungendo ancora poche gocce della soluzione di ferricianuro. I cromatogrammi così spruzzati (sotto cappa!) presentano, alla luce di Wood, delle macchie con fluorescenza azzurra corrispondenti al tiocromo ed ai suoi esteri fosforici. Nel primo cromatogramma si vede superiormente una macchia ($R_F = 0,25$) dovuta al TMP; sotto ad essa si vede la macchia del TDP ($R_F = 0,15$); segue una « coda » in cui è possibile, con una certa difficoltà, identificare altre due macchie, con $R_F = 0,10$ e $0,04$ circa. Nel terzo cromatogramma, ottenuto dallo stesso prodotto previamente idrolizzato con HCl N/1 per 30 minuti a b.m. bollente, si vede che la macchia del TMP si è ingrandita, mentre quella del TDP si è rimpiccolita e la « coda » è quasi scomparsa; contemporaneamente è comparsa, molto più in alto, una macchiolina corrispondente alla tiamina ($R_F = 0,50$).

Altri prodotti presi in esame non davano la « coda » e mostravano piccole quantità di tiamina e talora di clorotiamina ($R_F = 0,61$). Quest'ultimo componente, nel quale l'ossidrile alcoolico della tiamina è stato sostituito dal cloro e che, secondo L. VELLUZ e J. BARTOS⁽⁷⁾, si forma in quantità talora rilevanti (fino al 35%) durante la sintesi della cocarbossilasi con acido metafosforico, è stato trovato anche nelle tiamine commerciali⁽⁸⁾. Nessuna delle macchie fluorescenti era visibile prima dello spruzzamento con ferricianuro (assenza di tiocromo e suoi esteri).

La seconda e la quarta striscia della stessa Fig. 1 sono state spruzzate con un reattivo preparato secondo L. VELLUZ e M. PESEZ⁽⁹⁾ sciogliendo 0,5 g di molibdato d'ammonio in 400 cm³ d'acqua, aggiungendo, poi, 0,05 g di solfato basico di chinina e 4 cm³ di HNO₃ concentrato e portando infine a 500 cm³ con acqua (si conservi preferibilmente in bottiglia di resina, per es. polietilenica). Con questo reattivo è possibile mettere in evidenza gli ortofosfati inorganici, che compaiono sulla carta come macchie nere su sfondo fluorescente azzurro. La reazione è sensibilissima, ma è ostacolata dalla presenza di tiamina (o suoi esteri): in-

(7) Bull. Soc. chim. [5] 48, 448 (1954).

(8) GAUDIANO A., SPADONI M. A. e TECCE G.: Boll. Soc. Ital. Biol. Sper., 28, 701 (1952) e Rend. Istituto Sup. Sanità (in corso di stampa).

(9) Bull. Soc. chim. [5] 47, 863 (1950).

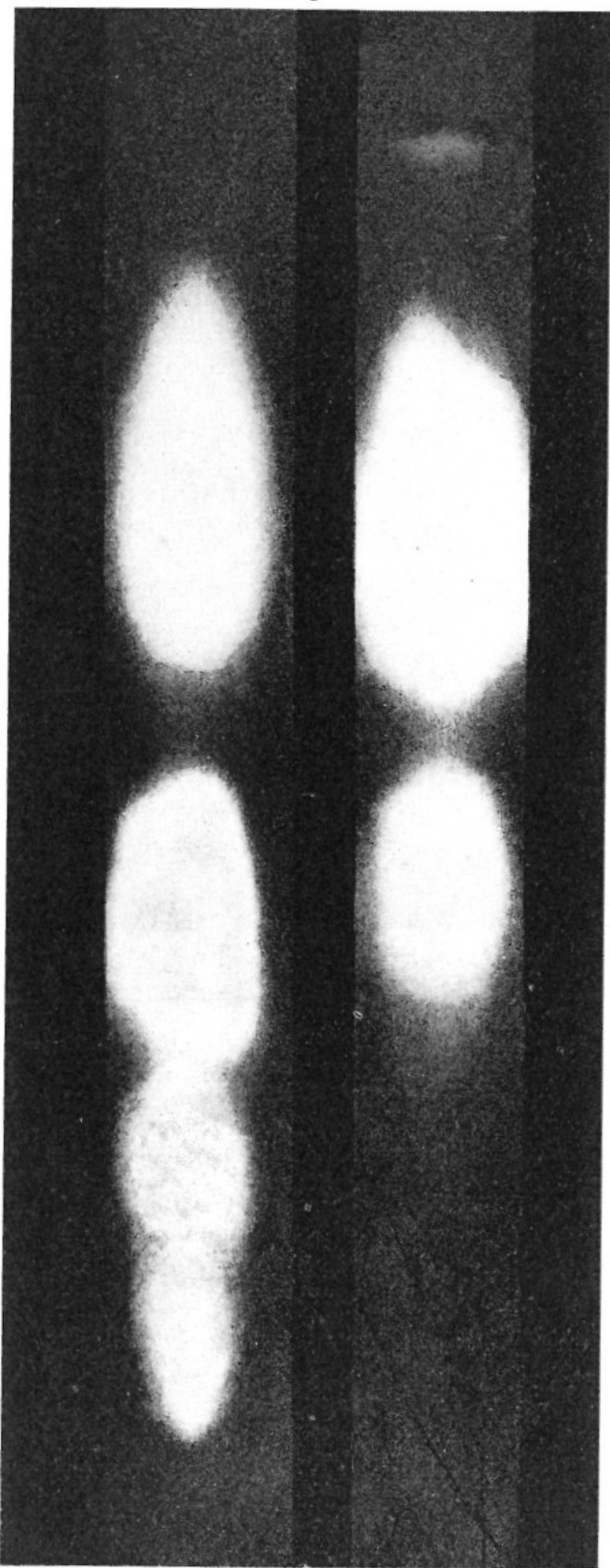


Fig. 2. - Cromatogrammi ottenuti col solvente *b* prima (1°) e dopo (2°) idrolisi acida, rivelati con soluzione alcalina di ferricianuro.

fatti, in corrispondenza alle maggiori concentrazioni di tiamina, la macchia nera è interrotta da zone fluorescenti. L'aumento di ioni PO_4''' conseguente all'idrolisi è evidente dal confronto tra il cromatogramma N. 2 e quello N. 4: in quest'ultimo, eseguito, come il cromatogramma N. 3, sul prodotto idrolizzato, la macchia nera è di maggiore estensione. Quando la quantità relativa di ortofosfati è molto piccola, si osserva semplicemente una macchia nera immediatamente al disopra di quella del TMP e talvolta parzialmente coincidente con essa.

Nella Fig. 2 sono riportati i cromatogrammi ottenuti con lo stesso prodotto usando il solvente *b*); la cromatografia è durata 24 ore; dopo completa eliminazione del solvente in corrente d'aria calda, si è spruzzato col reattivo al ferricianuro. La prima striscia mostra, dall'alto verso il basso, le macchie del TMP ($R_F = 0,65$), del TDP ($R_F = 0,50$), del TTP ($R_F = 0,40$) e un'altra ad $R_F = 0,35$. La seconda striscia, ottenuta col prodotto idrolizzato, mostra soltanto le macchie del TMP e del TDP; il rapporto fra le quantità del TMP e del TDP è aumentato a favore del primo, mentre le altre due macchie so-

no scomparse ed è comparsa una macchiolina dovuta alla tiamina libera ($R_F = 0,80$) (*).

Sui cromatogrammi ottenuti col solvente *b*), lo sviluppo delle macchie dei fosfati col citato reattivo di Velluz e Pesez è molto poco sensibile, presumibilmente per la presenza di urea. Buoni risultati ha dato invece, anche col solvente *b*), l'immersione dei cromatogrammi nel reattivo di BURROW e Coll. ⁽¹⁰⁾, che si prepara sciogliendo 1 g di molibdato d'ammonio in 8 cm³ d'acqua, aggiungendo 3 cm³ di HCl concentrato e 3 cm³ di HClO₄ al 60-70% e portando a 100 cm³ con acetone. In corrispondenza agli ortofosfati inorganici, al TDP e al TTP compaiono delle macchie gialle, che dopo qualche tempo passano all'azzurro; il passaggio all'azzurro si può ottenere più rapidamente esponendo i cromatogrammi all'idrogeno solforato. La macchia del TMP compare solo tardivamente (non è consigliabile accelerare la comparsa lasciando il cromatogramma per alcuni minuti in stufa a 85° perchè questo trattamento rende la carta molto fragile). Dopo parecchie ore tutto il cromatogramma assume un colore di fondo celeste, che può essere eliminato per esposizione ai vapori di ammoniacca ⁽¹¹⁾.

Riepiloghiamo nella Tab. I i valori degli R_F medi ottenuti con i solventi *a*) e *b*).

TABELLA I — Valori degli R_F (vedi nel testo).

	Clorotiamina	Tiamina	TMP	TDP	TTP	Tiamin- polifosfato (?)
Solvente <i>a</i>)	0,61	0,50	0,25	0,15	0,10	0,04
Solvente <i>b</i>)	0,97	0,95	0,65	0,50	0,40	0,35

Un tentativo di cromatografia bidimensionale con l'uso dei due solventi *a*) e *b*) non ha dato risultati migliori di quelli ottenibili con la cromatografia unidimensionale.

Determinazione del fosforo. — Per determinare il fosforo sui singoli esteri tiamin-fosforici isolati cromatograficamente, venivano eseguite, su di uno stesso foglio, tre o quattro cromatografie affiancate, con

(*) In questo caso si è ottenuto un valore di R_F più basso del normale (0,95) perchè la cromatografia era stata eseguita in un recipiente poco alto (cilindro da 1 litro) e non era stata interrotta prima che la fronte del solvente raggiungesse l'estremità del cromatogramma.

⁽¹⁰⁾ BURROW S., GRYLLES F. S. M. e HARRISON J. S.: Nature (London), 170, 800

⁽¹¹⁾ BANDURSKI R. S. e AXELROD B.: J. biol. Chem., 193, 405 (1951).

quantità di circa 500 µg di prodotto. Terminata la cromatografia, le strisce venivano essiccate in corrente d'aria calda sino a completo allontanamento del solvente. Si ritagliavano quindi i due cromatogrammi laterali, sui quali venivano segnate a matita le aree fluorescenti alla luce di Wood, dopo trattamento col reattivo al ferricianuro. Servendo di guida questi due cromatogrammi, si ritagliavano quelli centrali (non trattati con ferricianuro) in modo da separare le macchie dei singoli esteri tiaminfosforici. I ritagli di carta così ottenuti venivano singolarmente pesati; è necessario infatti conoscere il peso della carta, perchè questa contiene piccole quantità di fosfati (o di silicati), che vanno poi sottratte dal valore trovato; la carta Whatman da noi usata dà un valore colorimetrico medio corrispondente a un contenuto di circa 10 µg di fosforo per grammo. (Sottoponendo la carta a lavaggio con HCl N/10, il contenuto in fosforo si riduce a circa 1/3, ma la separazione cromatografica sulla carta così lavata risulta meno netta). I ritagli pesati venivano poi introdotti in palloncini di Kjeldahl da 10 cm³ contenenti 2 cm³ di HNO₃ concentrato e 1,2 cm³ di HClO₄ al 60%. Si portava quindi con una piccola fiamma a moderata ebollizione, che veniva interrotta quando nel collo del palloncino cominciavano ad apparire fumi bianchi (5-10 minuti di ebollizione). Dopo tale processo di mineralizzazione, si determinava il fosforo col metodo colorimetrico di I. BERENBLUM e E. CHAIN⁽¹²⁾. Nell'esecuzione di tale metodo, anche per le prove di confronto si usava sempre 1 cm³ di HClO₄ al 60% al posto dei 0,5 cm³ di H₂SO₄ N/10.

Ricavato il contenuto in fosforo di ogni singola macchia, ci si assicurava, per controllare la validità del metodo, che la somma dei valori trovati coincidesse col contenuto di fosforo totale determinato separatamente su di un campione del prodotto in esame. La percentuale di fosforo totale nei prodotti da noi esaminati variava dal 12 al 17%; il contenuto teorico per la cocarbossilasi (peso mol. 478) è del 12,95%.

Come indice dell'attività del prodotto, bisogna calcolare la percentuale di TDP, alla quale va eventualmente aggiunta la percentuale di TTP espressa in TDP. Difatti il TTP deve considerarsi attivo in quanto si trasforma in TDP; assumendo per il TDP il peso molecolare 478 (vedi dopo nella discussione), la percentuale di prodotto attivo, intesa come detto sopra, si può ricavare dalla formula

$$\frac{7,72 (P_1 + 0,67 P_2)}{Q} \times 100$$

⁽¹²⁾ Biochem. J., 32, 295 (1938).

dove P_1 e P_2 sono le quantità trovate per il fosforo rispettivamente del TDP e del TTP, e Q è la quantità di sostanza cromatografata.

Il valore così trovato può essere troppo alto quando il prodotto contenga quantità rilevanti di fosfati inorganici; questi infatti, durante la cromatografia su carta, sovrapponendosi alle macchie degli esteri tiamin-fosforici, possono far aumentare i valori di P_1 e P_2 , falsando così i risultati.

Usando per la cromatografia il solvente butanolo-acido acetico-acqua 4:1:5 (strato superiore), la macchia dei fosfati si trova al disopra di quella del TMP e nettamente separata da esso; con questo solvente, però, non si ha una buona separazione fra TMP, TDP e TTP.

Gli ortofosfati inorganici presenti si possono determinare sulla soluzione del prodotto in esame preparata al momento; se si trova un contenuto in fosforo superiore all'1-2%, il metodo sopra descritto dà risultati troppo alti. In alcuni casi si possono ottenere risultati troppo alti anche se si ha un basso contenuto in ortofosfati inorganici, per la presenza di piro-, meta-, o polifosfati, che non sono determinabili direttamente col metodo di Berenblum e Chain. E' consigliabile quindi confrontare i valori del fosforo ottenuti per le singole frazioni isolate cromatograficamente con quelli della tiamina totale o con i rapporti trovati densitometricamente (vedi dopo). Nel caso che i risultati così vagliati diano adito a incertezze, è preferibile ricorrere all'eluizione capillare delle frazioni isolate cromatograficamente e alla determinazione in esse della tiamina secondo il metodo appresso descritto.

Eluizione capillare e determinazione della tiamina. — Individuate sul cromatogramma le posizioni dei singoli esteri tiamin-fosforici (servendo di guida due cromatogrammi sviluppati come già descritto), si può ritagliare il cromatogramma in strisce orizzontali corrispondenti ai vari componenti, eseguire su di esse una determinazione di tiamina e da questa risalire al contenuto in esteri fosforici. Mentre l'eluizione della tiamina riesce per semplice agitazione con acqua della zona di carta in cui essa si trova, gli esteri fosforici non possono essere eluiti quantitativamente con tale sistema, perchè aderiscono fortemente alla carta. Abbiamo trovato che si può applicare con buoni risultati il metodo capillare di C. E. DENT⁽¹³⁾, che viene realizzato introducendo un'estremità della striscia da eluire fra due vetrini porta-oggetti da microscopio sovrapposti, che pescano da un lato in una capsula di Petri contenente acqua. L'eluizione si fa durare per 24 ore circa, dopo di che si controlla che

⁽¹³⁾ Biochem. J., 41, 240 (1947).

essa sia stata completa, spruzzando la carta col reattivo al ferricianuro. Su di un'aliquota nota dei liquidi raccolti si determina la tiamina totale col metodo al tiocromo. Siccome col procedimento usuale il tiocromo viene estratto con alcool isobutilico, che però non estrae i suoi esteri fosforici, bisognerebbe procedere prima all'idrolisi enzimatica⁽¹⁾. E' preferibile però eseguire la determinazione in soluzione acquosa, dopo aver ridotto l'eccesso di ferricianuro con H₂O₂, 1) con la misura spettrofotometrica, a 368 m μ , del tiocromo⁽¹⁴⁾, quando la concentrazione è superiore a 30 μ g/cm³; 2) col metodo fluorimetrico⁽¹⁵⁾, di confronto con una soluzione di tiamina a titolo noto, per concentrazioni più basse.

Per l'esecuzione del metodo occorrono i seguenti reattivi:

a) reattivo al ferricianuro ottenuto mescolando, al momento dell'uso, 9 parti (in volume) di NaOH al 20% con 1 parte di ferricianuro di potassio all'1%;

b) reattivo all'H₂O₂: a 90 cm³ di alcool a 95° si aggiungono 0,5 cm³ di H₂O₂ al 3% e si porta a 100 cm³ con acqua.

1) Per l'esecuzione della misura spettrofotometrica, ad 1 cm³ di soluzione, contenente almeno 30 μ g di estere tiamin-fosforico, si aggiunge 1 cm³ di reattivo a), si mescola e, dopo 1 minuto, si aggiungono 2 cm³ di reattivo b); si torna a mescolare bene e, cessato lo sviluppo gassoso, si determina l'estinzione a 368 m μ facendo il confronto con una prova in bianco contenente i soli reattivi. Se si usa uno spettrofotometro a sufficiente potere risolutivo, come quello di Beckman Mod. DU, l'estinzione letta, moltiplicata per 103, dà i microgrammi di vitamina B₁ anidra nel cm³ di soluzione esaminata. La percentuale di prodotto attivo (nel senso indicato sopra, cioè come somma del TDP e del TTP, espressa come TDP) si può ricavare dalla formula

$$149 \times \frac{(E_1 V_1 + E_2 V_2)}{Q} \times 100$$

dove E₁ ed E₂ sono i valori dell'estinzione a 368 m μ ottenuti con la soluzione del TDP e del TTP, V₁ e V₂ sono i volumi in cm³ dei liquidi raccolti con l'eluizione del TDP e del TTP, Q è la quantità in microgrammi di sostanza cromatografata.

2) Se la concentrazione in esteri tiaminfosforici nei liquidi dell'eluizione è inferiore a circa 30 mg per cm³, si consiglia di ricorrere, dopo eventuale diluizione, al metodo fluorimetrico. Si opera come il

⁽¹⁴⁾ GAUDIANO A.: Rend. Istituto Sup. Sanità (in corso di stampa).

⁽¹⁵⁾ BESSEY O. A., LOWRY O. H. e DAVIS E. B.: J. Biol. Chem., 195, 453 (1952).

metodo spettrofotometrico: oltre ad una prova in bianco con i soli reattivi, serve una prova con una soluzione standard di vitamina B₁. Dal contenuto in vitamina B₁ si passa a quello in cocarbossilasi (o a quello in TTP espresso come TDP) moltiplicando per il fattore 1,42. Per controllo ci si assicurerà che la somma dei valori trovati per la tiamina delle singole frazioni coincida con la tiamina totale determinata sul prodotto originario col metodo spettrofotometrico sopra indicato.

Per la determinazione della tiamina totale ci siamo anche serviti, per prodotti allo stato solido, della misura diretta nell'U.V. in tampone di fosfati a pH 7,4; in queste condizioni la tiamina ha, secondo DEADLE e Coll. ⁽¹⁶⁾, due massimi di assorbimento: a 235 m μ e a 265 m μ , coi rispettivi valori di ϵ pari a 10'885 e 8'290 (standard U.S.P.); più esattamente, nelle stesse condizioni ⁽¹⁴⁾, i massimi di assorbimento sarebbero a 233-234 m μ ed a 266-267 m μ , con valori di ϵ , per il prodotto anidro, dell'1-2% circa più alti di quelli riportati da DEADLE e Coll. I risultati della spettrofotometria diretta nell'U.V. sono in buon accordo con quelli del metodo al tiocromo. E' però da tener presente che i prodotti di demolizione della tiamina hanno uno spettro di assorbimento molto simile nell'insieme a quello della tiamina inalterata: la determinazione diretta nell'U.V. è quindi sconsigliabile per l'esame dei prodotti in soluzione. E' sconsigliabile anche per la determinazione della tiamina nei liquidi ottenuti per eluizione capillare perchè la carta cede sostanze che assorbono nell'U.V. Nei prodotti da noi presi in esame la percentuale di vitamina B₁ totale variava dal 55 all'83%. Il contenuto teorico per la cocarbossilasi (p. mol. 478) è del 70,5%.

Misura densitometrica. — Poichè gli esteri tiaminfosforici hanno, come la tiamina, un notevole assorbimento nell'U.V., abbiamo voluto provare a misurare, sulla stessa striscia di carta usata per la cromatografia, l'assorbimento dei raggi U.V. Abbiamo scelto la lunghezza d'onda di 267 m μ , dato che ad essa corrisponde il massimo d'assorbimento della tiamina più vicino al visibile. La misura è stata eseguita con uno speciale dispositivo (*) che può introdursi al posto del porta-vaschette nello spettrofotometro di Beckman e permette di mandare, attraverso un'apposita fenditura, un raggio di luce monocromatica sulla striscia di carta che viene fatta scorrere di un paio di millimetri per volta. Questo dispositivo è stato ideato da TENNENT e Coll. ⁽¹⁷⁾, che lo hanno applicato alla cromatografia di basi puriniche e pirimidiniche e di ormoni corti-

⁽¹⁶⁾ DEADLE B. W., GREENWOOD D. A. e KRAYBILL H. R.: J. Biol. Chem., 149,

⁽¹⁷⁾ TENNENT D. M., WHITLA J. B. e FLOREY K.: Anal. Chem., 23, 1748 (1951).

(*) Costruito dalla Ditta Ing. A. Rastelli e C. (Roma).

cali. La tecnica da noi seguita differisce però da quella dei suddetti Autori in quanto la sostanza da cromatografare viene deposta sul cromatogramma lungo una linea sottile che si estende per tutta la larghezza della striscia, anzichè in un unico punto. Ciò permette alla fenditura del dispositivo densitometrico di abbracciare un'eguale estensione, pari alla sua lunghezza, di ogni frazione separatasi sul cromatogramma. Sottoponendo a cromatografia una quantità non pesata di sostanza, con questa tecnica è possibile ricavare i rapporti fra i singoli componenti, come fra poco spiegheremo, e da essi, nota la percentuale di tiamina totale, risalire alla quantità di detti componenti.

Il procedimento che consigliamo è il seguente. Preparata al momento una soluzione del prodotto in esame contenente circa 40 mg per cm^3 , se ne depone, con l'aiuto di un tiralinee o di un'adatta micropipetta, una sottile striscia lungo una linea orizzontale tracciata a matita a circa 7 cm da un'estremità del cromatogramma largo 6-7 cm. Si asciuga in corrente d'aria e si ripete l'operazione sulla stessa linea ancora una o due volte, asciugando ogni volta. Si ritagliano i margini della striscia per una larghezza di ca. 5 mm per parte e per tutta la sua lunghezza, in modo da eliminare le regioni estreme della linea nelle quali generalmente la soluzione si espande più che nella regione centrale. La cromatografia viene eseguita, come già detto, usando di preferenza il solvente b); questo infatti, oltre a dare una risoluzione migliore in un tempo minore, assorbe meno nell'U.V.

Si fa durare la cromatografia per 12-24 ore e si asciuga la carta in corrente d'aria calda, avendo cura di allontanare bene ogni traccia di solvente. Se ne ritaglia una striscia centrale larga 3 cm e si spruzzano le due striscioline laterali col reattivo al ferricianuro, in modo da localizzare nella striscia centrale le zone dove si son raccolte le singole frazioni. S'introduce quindi la striscia centrale non sviluppata nel dispositivo densitometrico ponendo davanti alla fenditura (di 2×21 mm) un punto del cromatogramma che disti ca. 5 cm da dove cominciano le macchie dei componenti. Sistemato il tutto al posto del portavaschette dello spettrofotometro di Beckman, si azzerà prima, al solito, col bottone della corrente di fondo (« dark current »); si porta quindi il quadrante della lunghezza d'onda a 267 μ , l'interruttore selettore su 0,1, il quadrante dell'estinzione a 0,100, la fenditura a 1,8 mm e si azzerà con il bottone della sensibilità. Siccome l'assorbimento di fondo della carta non è molto costante (anche da questo punto di vista la carta Whatman n. 1 si è dimostrata la migliore), è consigliabile porre inizialmente il quadrante dell'estinzione a 0,100 per evitare di dover poi fare delle letture sotto lo zero. Si fa procedere il cromatogramma di 2 mm per

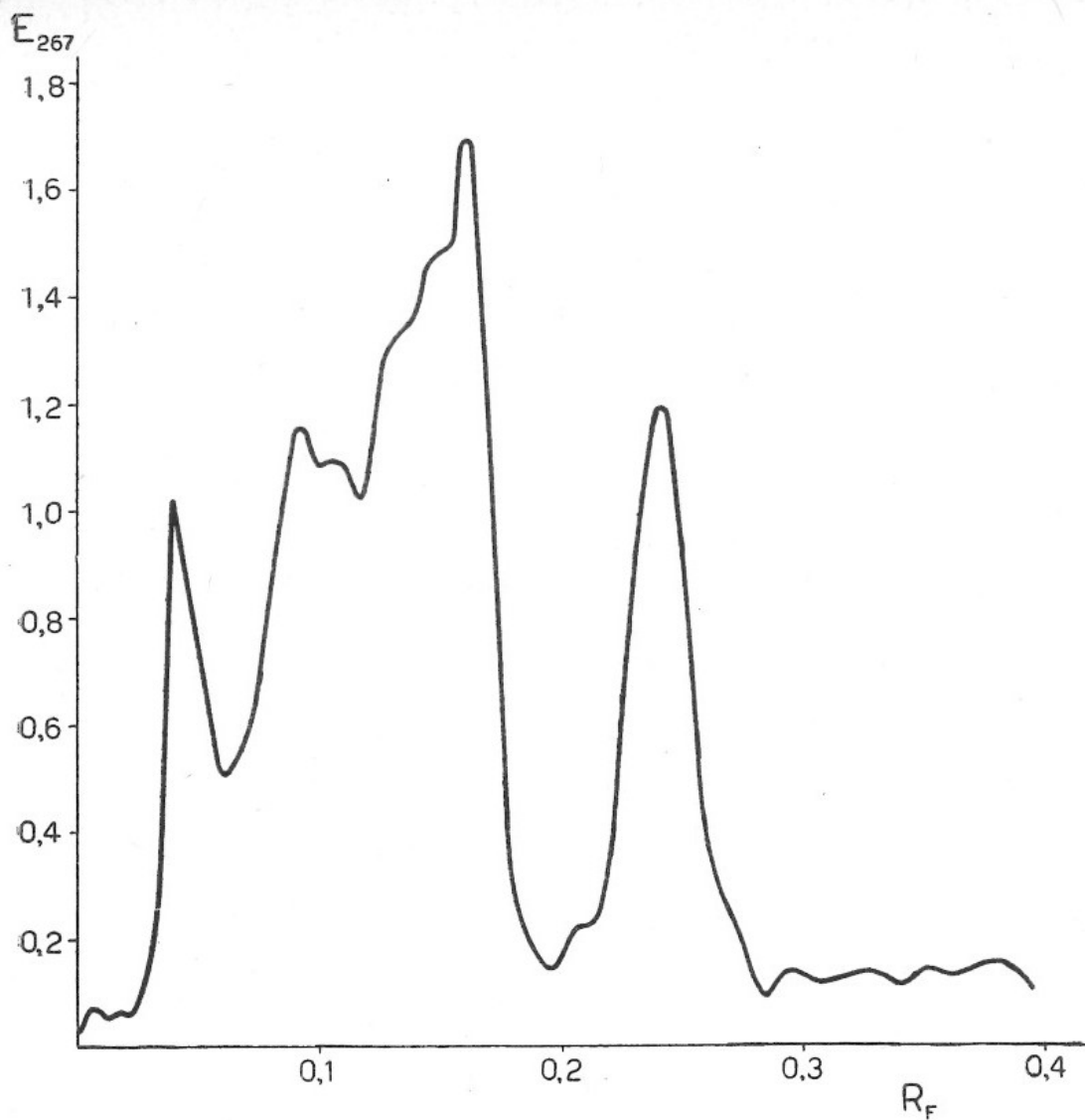


Fig. 3. - Diagramma densitometrico da un cromatogramma ottenuto con il solvente *a*.

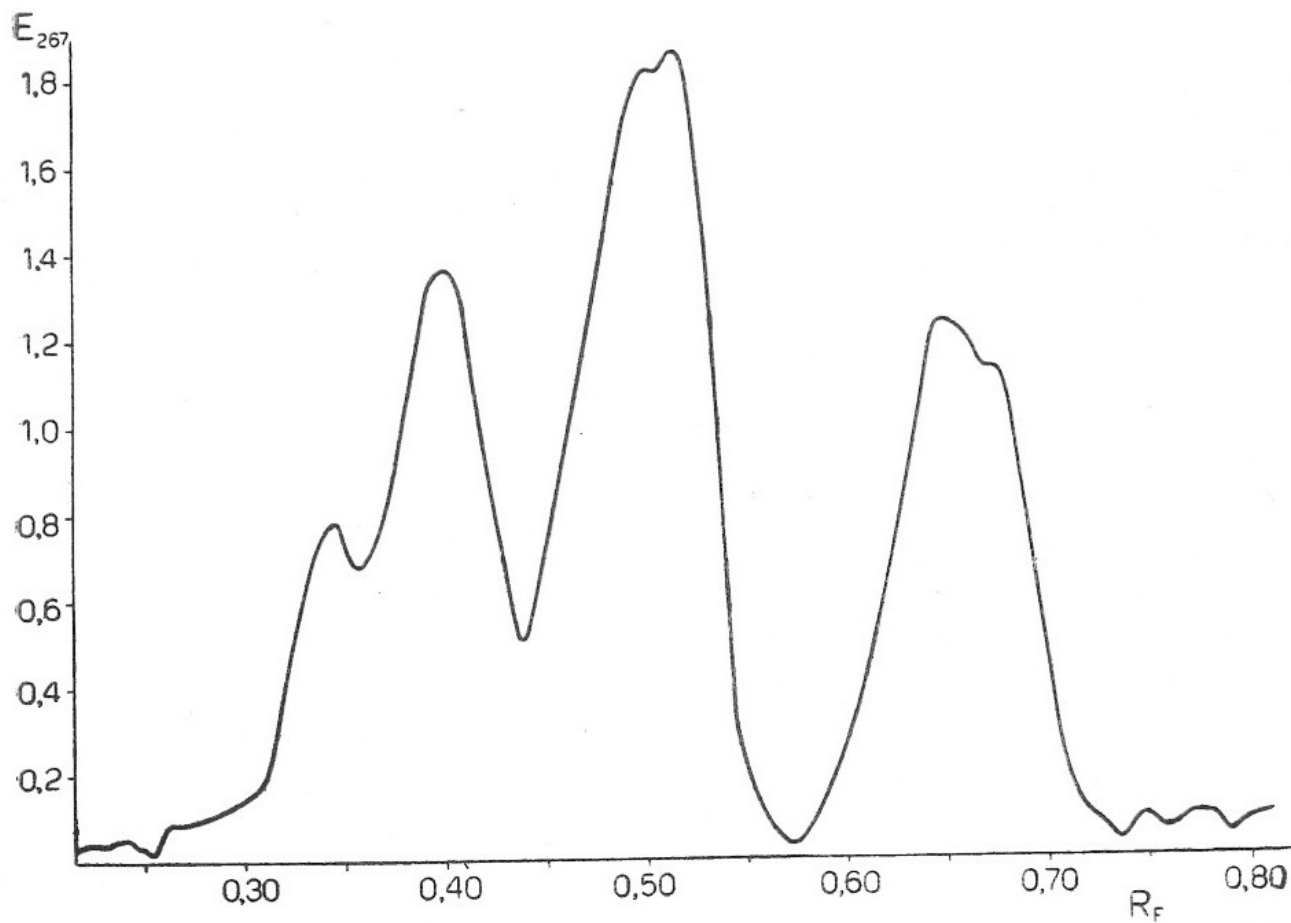


Fig. 4. - Diagramma densitometrico da un cromatogramma ottenuto con il solvente *b*.

volta misurando ogni volta il valore dell'estinzione. Finite le macchie, si continuano le letture per altri 5 mm ca. Si riportano quindi su un grafico i valori trovati dell'estinzione in funzione delle lunghezze percorse sul cromatogramma o dell' R_F (figg. 3 e 4). Si ottiene così una curva con tanti massimi quanti sono i componenti isolati sul cromatogramma che assorbono a 267 m μ . La curva intorno ad ogni massimo è abbastanza simmetrica, avvicinandosi al tipo ideale della gaussiana; ciò significa che durante la cromatografia i fenomeni di ripartizione hanno la prevalenza su quelli di adsorbimento.

I prodotti da noi presi in esame in gran parte forniscono curve con due soli massimi, corrispondenti al TMP e al TDP; altri danno un numero maggiore di massimi. Il prodotto a cui si riferiscono la fig. 3 (solvente *a*) e la fig. 4 (solvente *b*) è lo stesso i cui cromatogrammi sono stati riportati nelle figure 1 (prime due striscie) e 2 (prima striscia). Le cromatografie relative alle figg. 3 e 4 hanno avuto la durata di 24 ore come quelle riportate nelle figg. 1 e 2. E' evidente il notevole potere risolutivo della misura densitometrica che permette di differenziare composti ad R_F molto vicini, mal distinguibili ad occhio (osservare la « coda » della fig. 1).

Per utilizzare a scopi quantitativi i diagrammi ottenuti, abbiamo eseguito una serie di misure con miscele a composizione nota di TMP e TDP. Nei diagrammi ricavati come sopra descritto, le aree relative ai due massimi ottenuti venivano misurate con un planimetro (Salmoiraghi Tipo 236), prendendo come linea di base una orizzontale corrispondente al valore medio dell'assorbimento di fondo della carta.

Confrontando i rapporti delle aree riferentisi al pirofosfato ed allo ortofosfato di tiamina A_p/A_o coi rapporti molari delle due sostanze (P/O), abbiamo potuto constatare che esiste, entro certi limiti, una relazione lineare tra i logaritmi dei due rapporti. Una relazione analoga era stata trovata da J. A. BROWN e M. M. MARSH⁽¹⁸⁾ per alcune vitamine idrosolubili. La relazione si può esprimere con l'equazione:

$$\log \frac{A_p}{A_o} = 0,041 + 0,63 \log \frac{P}{O}$$

o con il grafico della fig. 5. In tale figura sono indicati con punti i valori ottenuti dai cromatogrammi sviluppati col solvente *a*), con cerchietti quelli ottenuti con solvente *b*). Come si vede, l'andamento è praticamente lineare per rapporti P/O compresi fra 0,2 e 5 ca.

(18) Anal. Chem., 24, 1952 (1952).



Al rapporto $P/O=1$ corrisponde un rapporto $A_p/A_o=1,1$, mentre teoricamente si potrebbe prevedere un rapporto uguale all'unità. La retta sperimentale della fig. 5 risulta quindi un po' più alta di quella teorica, ovverossia sul diagramma le aree del TDP sono relativamente maggiori di quelle del TMP. Ciò si può spiegare ammettendo che il TDP, avendo

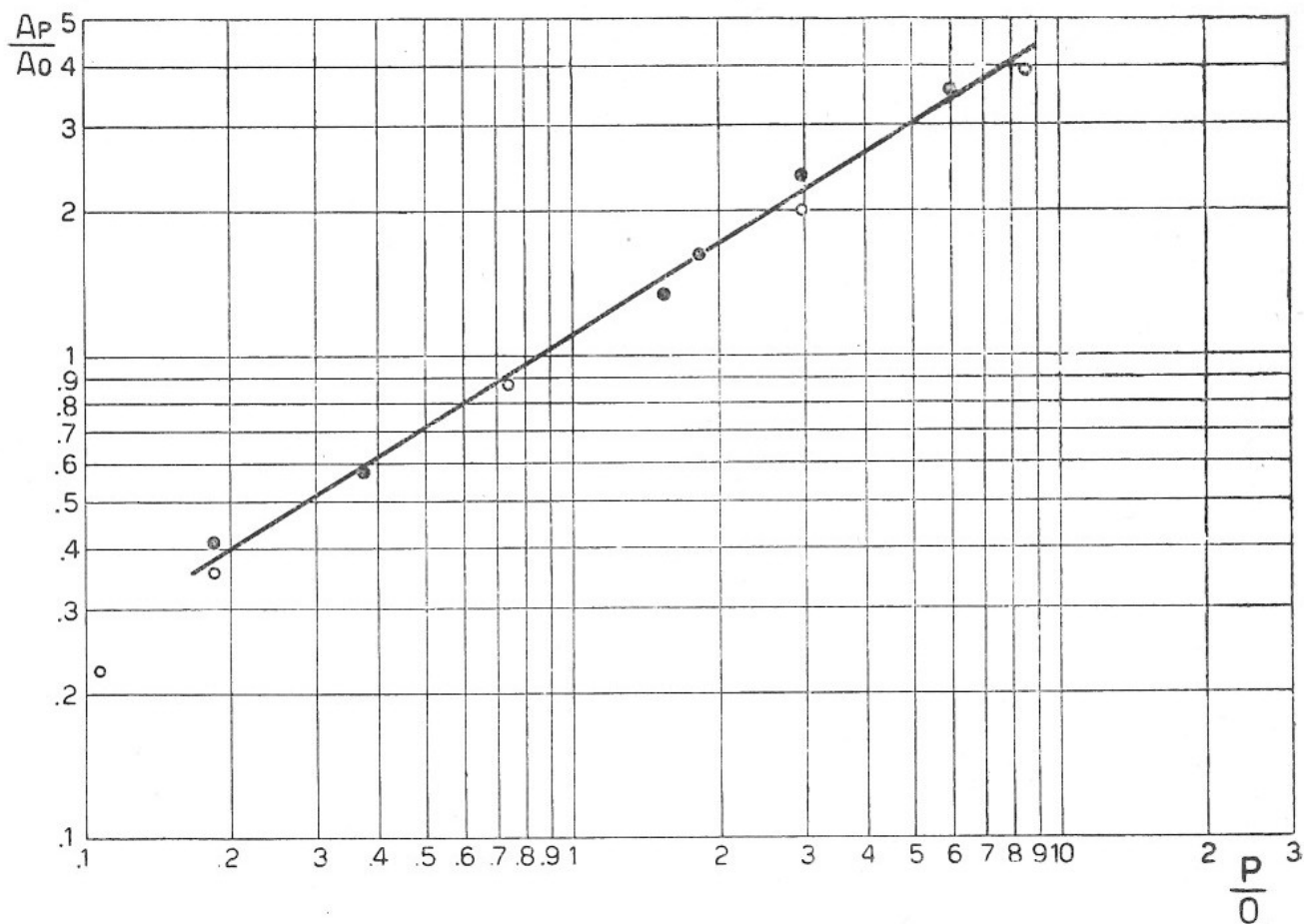


Fig. 5. - Rappresentazione grafica della relazione $\log \frac{A_p}{A_o} = 0,041 + 0,63 \log \frac{P}{O}$

un R_F minore di quello del TMP e percorrendo quindi sulla carta un tratto più breve, sia meno soggetto a perdite per adsorbimento lungo il percorso. Si noti che nel diagramma i « punti » [solvente a)] hanno tendenza a porsi più in alto dei « cerchietti » [solvente b)], probabilmente perchè nel solvente a) il rapporto tra gli R_F del TDP e del TMP è $\frac{0,15}{0,25} = 0,60$, mentre nel solvente b) è $\frac{0,50}{0,65} = 0,77$, cioè più vicino all'unità. La differenza non è tuttavia tale da giustificare l'impiego di due rette diverse. Riteniamo che la retta da noi riportata sia valida anche per altri solventi in cui il rapporto degli R_F non si scosti molto dai valori suddetti.

Che il coefficiente del $\log \frac{A_P}{A_0}$ cioè il coefficiente della retta della figura 5 sugli assi sia differente e minore dell'unità, significa che le variazioni del rapporto fra le aree (nel diagramma della fig. 4) sono attenuate rispetto alle variazioni del rapporto fra le quantità; ovvero sia che le piccole macchie del cromatogramma assorbono relativamente più energia luminosa delle macchie grandi.

Le aree relative ai singoli massimi delle curve densitometriche si possono misurare, mediante un planimetro, con una precisione dell'1%; nel caso che esse si sovrappongano in basso, è bene tener presenti i suggerimenti di A. WALLNER e R. ULKE⁽¹⁹⁾. Si possono anche semplicemente sommare i valori delle estinzioni misurate ogni 2 mm; oppure tagliare le singole regioni del diagramma e pesare i ritagli di carta così ottenuti.

Se il diagramma delle estinzioni rispetto agli R^F presenta soltanto i due massimi del TDP e del TMP (caso più frequente), dal grafico della fig. 5 si ricava senz'altro il valore del rapporto TDP/TMP. La percentuale del TDP nel prodotto in esame si può ricavare dalla formula $TDP\% = 1,42 \cdot \frac{r}{r+1} T$ dove $r = \frac{P}{O}$ e T è la percentuale, nel prodotto in esame, di tiamina (cloruro-cloridrato) determinata come precedentemente descritto. Se invece il diagramma presenta più di due massimi, si possono misurare i rapporti di singole coppie di aree, avendo cura, per quanto è possibile, che in ogni coppia gli R_F relativi alle due aree stiano fra loro in un rapporto compreso fra 0,6 e 0,8 ca. (vedi quanto detto sopra), per poter adoperare sempre il grafico della fig. 5. Ricavati, da questo, i rapporti fra le quantità molari delle singole coppie di sostanze e determinata a parte la percentuale di vitamina B₁, è possibile, con un semplice calcolo, risalire alla percentuale dei composti attivi. Nel caso, per es., delle figg. 3 e 4, in cui si hanno quattro massimi cui corrispondono quattro aree che indicheremo con A₁, A₂, A₃ ed A₄ (in ordine di R_F crescente), conviene per il motivo suddetto considerare i tre rapporti:

$$A_1/A_2 = a ; \quad A_2/A_3 = b ; \quad A_3/A_4 = c.$$

Da questi rapporti delle aree si ricavano, in base al grafico della fig. 5, i rapporti molari dei rispettivi componenti; siano essi:

$$C_1/C_2 = \alpha ; \quad C_2/C_3 = \beta ; \quad C_3/C_4 = \gamma \quad (I).$$

Essendo poi:

$$C_1 + C_2 + C_3 + C_4 = \text{Tiamina moli} \quad (II)$$

(19) Z. physiol. Chem., 290, 81 (1952).

le moli C_1 , C_2 , C_3 , C_4 di uno qualunque dei componenti si potranno facilmente ottenere risolvendo il sistema delle quattro equazioni indicate in I e II. Introducendo, poi, i rapporti fra i pesi molecolari di ciascun componente e quello della tiamina (cloridrato-cloruro) ed indicando con T la percentuale di tiamina nel preparato in esame, sarà facile conoscere la percentuale ponderale di uno qualunque di essi. Ad es., per il TDP (il terzo) si avrà:

$$\text{TDP \%} = \frac{1,42 T}{\alpha\beta + \beta + \frac{1}{\gamma} + 1}$$

La percentuale dei singoli componenti (espressa però in tiamina) può venir dedotta dai valori di α , β , γ e T più semplicemente nel seguente modo. Si fa arbitrariamente uguale all'unità uno qualunque dei componenti, ad es. il terzo, così che risulterà:

$$C_3 = 1, \quad C_4 = \frac{1}{\gamma}, \quad C_2 = \beta \quad \text{e} \quad C_1 = \alpha\beta;$$

e poi si ricavano le frazioni di T proporzionali a detti valori per via aritmetica o col noto metodo geometrico per dividere un segmento in parti proporzionali a più valori dati.

La tiamina libera nel prodotto in esame (determinata col metodo al tiocromo nell'estratto isobutanolico) è stata trovata sempre presente in quantità trascurabile. Nel caso però che detta sostanza fosse presente in quantità non trascurabile è conveniente: determinare sul prodotto sciolto di recente (o sull'eventuale soluzione in esame) la tiamina libera e calcolare, sottraendo questo valore da quello della tiamina totale, la percentuale di tiamina esterificata; limitare poi la misura densitometrica alla zona comprendente gli esteri tiaminfosforici, escludendo quindi la tiamina libera (e la clorotiamina); porre quindi nella formula suddetta $T =$ percentuale di tiamina esterificata.

Nel caso delle figg. 3 e 4, ed in casi analoghi, conviene misurare tutte insieme le aree A_1 , A_2 e A_3 , perchè la prima è dovuta, con ogni probabilità, ad un estere tiaminpolifosforico, mentre la seconda e la terza sono dovute al TTP ed al TDP, tutti prodotti biologicamente attivi. Il rapporto di quest'area totale rispetto ad A_4 (relativa al TMP, componente inattivo) rappresenterà il valore A_p/A_0 , dal quale si può ricavare, in base al grafico della fig. 5, il valore di P/O. Si rientra quindi nel caso, precedentemente trattato, di due componenti.

I prodotti da noi esaminati mostrano due componenti principali (TDP e TMP), accompagnati talora da quantità più o meno rilevanti di altre sostanze che danno la reazione del tiocromo. Non abbiamo mai tro-

vato sui cromatogrammi sostanze asorbenti a 267 m μ che non fossero rilevabili per spruzzamento con ferricianuro.

La percentuale di TDP (includendovi anche l'eventuale « coda » dovuta al TTP ed all'altro probabile estere polifosforico) non superava mai, nei prodotti commerciali da noi presi in esame, il 90%; in qualche caso era solo di qualche unità per cento; nella maggior parte dei prodotti era intorno al 50-60%.

Accenneremo anche ad alcuni tentativi che non hanno dato risultati soddisfacenti.

Allo scopo di rendere più trasparente la carta e permettere quindi, nella misura densitometrica, l'uso di una fenditura più stretta (o di una maggior sensibilità), ne abbiamo tentato la diafanizzazione con olio di vaselina: si raggiungeva in effetti lo scopo desiderato, ma non si aveva più la relazione logaritmica di cui abbiamo parlato.

Per poter fare le misure densitometriche ad una lunghezza d'onda per la quale la carta mostrasse una maggior trasparenza ed un più omogeneo assorbimento di fondo, abbiamo tentato alcune misure su cromatogrammi sviluppati con ferricianuro. La lettura veniva eseguita a 368 m μ , massimo di assorbimento del tiocromo. Abbiamo però dovuto abbandonare questo metodo perchè la trasformazione della tiamina in tiocromo non avveniva con rendimento costante ed inoltre lo spruzzamento dei cromatogrammi, anche se eseguito con opportune cautele, causava una deformazione delle macchie.

Abbiamo anche tentato un metodo di valutazione quantitativa molto semplice, basato sulla misura diretta della lunghezza o dell'area delle macchie ottenute sul cromatogramma, dopo spruzzamento con ferricianuro. Non si è potuto trovare però una relazione nè lineare nè logaritmica tra questi valori e le quantità relative.

Infine, per chi volesse utilizzare la cromatografia su carta per determinare i rapporti fra le quantità molari dei vari esteri della tiamina con una semplice stima visuale delle intensità delle macchie fluorescenti, suggeriamo il seguente procedimento. Sulla stessa carta si eseguano contemporaneamente più cromatografie con quantità variabili e note di una stessa soluzione del prodotto in esame. Identificate sul cromatogramma due macchie di uguale intensità di due differenti componenti, il rapporto secondo il quale essi si trovano nel prodotto sarà inversamente proporzionale alle rispettive quantità cromatografate di soluzione.

Se invece si dispone di un campione di confronto, di cui sia noto il contenuto in uno o più componenti, di tali componenti si può conoscere la percentuale nel campione in esame operando in modo simile a quello descritto su quantità variabili e note di ciascuno dei due prodotti. Iden-

tificate sul cromatogramma due macchie di uguale intensità per lo stesso componente nei due campioni messi a confronto, è facile desumere il valore assoluto nel campione in esame, senza che occorra (come occorre invece nel primo caso) determinare la quantità di tiamina totale sul campione in esame.

Elettroforesi su carta. — E' stata eseguita con l'apparecchio della Ditta « Label » (Roma), analogo a quello descritto da Grassmann e Hannig ⁽²⁰⁾.

Come era da aspettarsi, gli esteri tiaminfosforici migrano verso l'anodo in ambiente alcalino; abbiamo quindi fatto alcune prove con tamponi a reazione lievemente alcalina, dato che a pH più elevati la tiamina si altera facilmente. Buoni risultati sono stati ottenuti con un tampone a pH 7,65 avente la seguente composizione: veronal sodico g 2,94, acetato sodico crist. g 1,94, ossalato potassico crist. g 0,69, HCl N/1 10 cm³, acqua distillata q. b. a 1 litro. Si sono usate strisce di carta Whatman n. 1 di dimensioni 4 × 27 cm ca. Segnato a matita, a 7 cm da un'estremità, il punto (o i punti) in cui sarebbe poi messa la sostanza, la striscia di carta veniva bagnata col tampone e, dopo averla fatta sgocciolare un po', veniva adagiata, ben tesa, sull'apposita staffa dell'apparecchio (in plexiglas) munita di tre sostegni a coltello che impediscono l'imbarcamento della striscia. Fatte pescare le estremità della staffa nei compartimenti anodico e catodico, si stabiliva agli elettrodi una differenza di potenziale di ca. 200 volt e si lasciava passare la corrente per 15-30 minuti. Raggiunto così l'equilibrio, si deponava una goccia di soluzione (ad una concentrazione di ca. 40 mg/cm³) sul punto previamente segnato a matita, servendosi di una micropipetta, e si faceva passare la corrente per alcune ore, da 3 a 12, secondo il voltaggio applicato e la temperatura. Operando a temperatura ambiente (20-25°) con 200 volt, si hanno buone separazioni in 4-5 ore. Finita l'operazione, la striscia veniva asciugata rapidamente sulla stessa staffa, con una corrente d'aria calda e si completava poi l'essiccazione lasciandola pochi minuti in posizione orizzontale dentro una stufa a 100°. Lo sviluppo veniva fatto, come per i cromatogrammi, spruzzando con ferricianuro alcalino. E' conveniente tornare a seccare brevemente la striscia in stufa e, dopo eseguite le osservazioni alla luce di Wood, conservarla in essiccatore: l'umidità difatti diminuisce la nettezza dei contorni delle macchie.

Nella fig. 6 è fotografato (alla luce di Wood) un elettrocromatogramma dello stesso campione di cocarbossillasi di cui abbiamo già par-

⁽²⁰⁾ GRASSMANN W. e HANNIG K.: Z. physiol. Chem., 290, 1 (1952).

lato (a sinistra il campione originario, a destra quello idrolizzato). Dal-

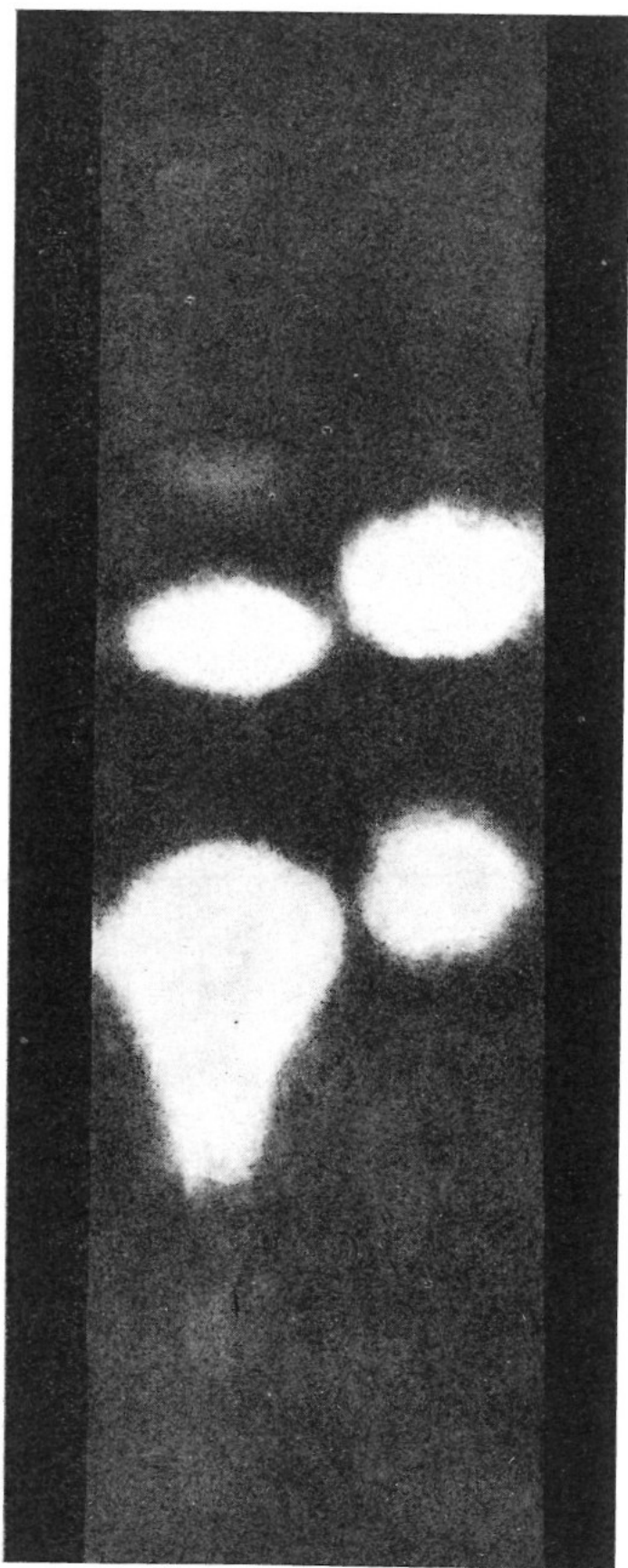


Fig. 6. - Elettroforesi prima (1°) e dopo (2°) idrolisi acida.

l'alto verso il basso, cioè nel senso della migrazione (dal catodo verso l'anodo) si notano prima due macchioline, rispettivamente di mobilità $\mu = 0,5 \cdot 10^{-4}$ e $1,1 \cdot 10^{-4} \text{ cm}^2 \text{sec}^{-1} \text{volt}^{-1}$ (cioè $\frac{\text{cm}}{\text{sec}} : \frac{\text{volt}}{\text{cm}}$ seguono le macchie del TMP ($\mu = 1,5 \cdot 10^{-4}$) e del TDP ($\mu = 2,3 \cdot 10^{-4}$); in coda a questa si osserva una macchia più piccola ($\mu = 2,7 \cdot 10^{-4}$) dovuta presumibilmente al TTP. Si noti che, contrariamente a quanto avviene nella cromatografia, la velocità di migrazione cresce passando dal TMP al TDP e al TTP, perchè dipende dalla carica ionica. Nessuna macchia era visibile alla luce di Wood prima dello spruzzamento con ferricianuro. La macchia del TTP è assente nel prodotto idrolizzato.

L'elettroforesi era stata condotta col tampone suddetto a 200 volt per 5 ore e 35 minuti a temperatura ambiente (22°). Con questo tampone, causa la presenza del veronal, non è stato possibile svelare i fosfati col reattivo di Velluz al molibdato di chinina. Per poter usare questo reattivo ci siamo serviti per l'elettroforesi di un tampone di borati M/10 a pH 8,9. Le separazioni sono in tal caso meno nette, ma il quadro generale è simile a quello della fig. 6.

Spruzzando col reattivo di Velluz, si osserva che i fosfati si dispongono lungo la striscia che va dal punto di partenza fin oltre la macchia del TDP. Da questo punto di vista la situazione è quindi meno vantaggiosa di quella che si ha con la cromatografia su carta.

Con qualsiasi tampone, la tiamina e la clorotiamina non si muovono dal punto di partenza. Esse sono invece capaci di migrare a pH 4,8⁽⁸⁾, ma in tal caso gli esteri tiaminfosforici non migrano.

L'elettroforesi su carta presenta, rispetto alla cromatografia, il vantaggio di una maggior rapidità, pur richiedendo un'attrezzatura un po' più costosa; si presta alla determinazione del fosforo e della tiamina coi metodi che abbiamo indicati; è invece meno adatta alla misura densitometrica perchè, essendo le macchie più compatte, si hanno, con le concentrazioni utilmente impiegabili, valori troppo alti delle estinzioni. Non abbiamo provato se, anche in questo caso, è valida una relazione logaritmica analoga a quella trovata per i cromatogrammi.

DISCUSSIONE DEI RISULTATI

Dalle nostre esperienze risulta che i prodotti che si trovano in commercio sotto il nome di cocarbossilasi hanno un contenuto variabile di impurezze la cui somma è talora superiore alla quantità della vera cocarbossilasi. Le impurezze che abbiamo potuto mettere in evidenza con sicurezza sono il TMP (che costituisce in genere l'impurezza più cospicua), il TTP, la tiamina e la clorotiamina. Di queste, il TTP non si dovrebbe a rigore considerare un'impurezza perchè ha praticamente la stessa attività biologica di una quantità equimolecolare di TDP⁽²¹⁾. È interessante a questo proposito ricordare che ROSSI-FANELLI e Coll.⁽⁵⁾ hanno messo in evidenza il TTP nel fegato di ratto. Il composto che, nella cromatografia su carta, resta subito dietro il TTP, dev'essere maggiormente polare di questo e si potrebbe quindi identificare come un estere tiaminopolifosforico; esso è infatti facilmente idrolizzabile. L'abbiamo perciò incluso fra i prodotti attivi. Esso si trova, però, solo di rado ed in piccola quantità; nell'elettroforesi su carta probabilmente esso si confonde col TTP.

Più difficile è l'identificazione delle due macchioline che abbiamo messo in evidenza con l'elettroforesi su carta. Avendo una mobilità minore del TMP, devono avere anche una carica minore. Probabilmente la loro molecola contiene un solo idrogeno ionizzabile; può quindi trattarsi degli esteri ditiaminfosforico e tritiaminfosforico o tritiaminpirofosforico.

⁽²¹⁾ VISCONTINI M., BONETTI G. e KARRER P.: *Helv. chim. Acta*, 32, 1478 (1949).

Per quanto si riferisce ai problemi quantitativi, abbiamo già detto come, dalla determinazione del fosforo, da quella della tiamina o dalla misura densitometrica si possa, dopo effettuate la cromatografia, calcolare la quantità di cocarbossilasi. Nei calcoli abbiamo attribuito alla cocarbossilasi il peso molecolare 478. Come fanno osservare VELLUZ e BARTOS (7), i vari AA. non sono d'accordo sul numero delle molecole d'acqua di cristallizzazione (che varia da 1 a 3); essi propendono per la formula del monoidrato. Si ha inoltre un peso molecolare diverso secondo che si consideri la cocarbossilasi come tale o il suo cloridrato. Il valore di 478 è stato da noi scelto perchè è il peso molecolare sia del triidrato $C_{12}H_{18}N_4O_7P_2S \cdot 3 H_2O$, sia del cloridrato monoidrato $C_{12}H_{19}N_4O_7P_2S \cdot H_2O$, così riportato anche dal Merck Index (22). Tale coincidenza attenua l'arbitrarietà della scelta. Del resto i prodotti commerciali hanno un contenuto variabile sia in cloro che in acqua.

Ed infine poche parole sugli aspetti farmaceutici della questione. Abbiamo detto che tutti i prodotti commerciali contengono quantità talora molto elevate di TMP, prodotto biologicamente inattivo. D'altra parte la difficoltà della sintesi e la facile idrolizzabilità del TDP in presenza di quantità anche minime di umidità rendono oggi praticamente impossibile la produzione commerciale di una cocarbossilasi pura, per cui bisognerebbe ammettere un limite di tolleranza. Inoltre le cocarbossilasi in soluzione acquosa dovrebbero venir usate a breve distanza di tempo dalla loro preparazione; la conservazione in ghiacciaia, però, ritarda notevolmente i processi d'idrolisi.

Roma — Istituto Superiore di Sanità - Laboratorio di biologia.

(22) The Merck Index of Chemical and Drugs, VI Ed. (Merck & Co., Inc., Rahway - 1952).