

58. Aldo GAUDIANO — **Determinazione della tiamina mediante misura spettrofotometrica del tiocromo.**

**Riassunto.** — Dopo aver messo in evidenza le molteplici cause d'errore che rendono poco preciso il metodo fluorimetrico oggi comunemente impiegato per la determinazione della tiamina, l'A. propone un metodo basato sulla misura spettrofotometrica del tiocromo al suo massimo d'assorbimento. Dopo aver eseguito la solita ossidazione con ferricianuro di potassio in presenza di NaOH, si esegue la misura spettrofotometrica in soluzione acquosa a 368 m $\mu$  (previo trattamento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) o, se sono presenti sostanze interferenti, in soluzione di alcool isobutilico. La misura in isobutanolo può essere eseguita direttamente a 370 m $\mu$  oppure, dopo aggiunta di acido acetico, a 392 m $\mu$ . Quest'ultimo procedimento permette l'uso di un qualsiasi fotometro per il visibile.

Il metodo, che consente di fare a meno di uno standard, richiede da 10 a 200  $\mu$ g di tiamina circa, secondo il procedimento seguito, ed è quindi particolarmente indicato per l'analisi dei prodotti farmaceutici.

**Résumé.** — Après avoir mis en évidence les multiples causes d'erreur qui rendent très peu précise la méthode fluorimétrique, aujourd'hui couramment employée pour la détermination de la thiamine, l'auteur propose une méthode basée sur la mesure spectrophotométrique du thiochrome à son maximum d'absorption. Après avoir effectué l'oxydation ordinaire avec le ferricyanure de potassium en présence de NaOH, on fait la mesure spectrophotométrique en solution aqueuse à 368 m $\mu$  (après traitement avec H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>); ou si des substances interférantes sont présentes, en solution d'alcool isobutilique. Le mesure en isobutanol peut être faite directement à 370 m $\mu$  ou bien, après adjonction d'acide acétique, à 392 m $\mu$ . Ce dernier procédé permet l'emploi de n'importe quel photomètre pour le visible.

La méthode, qui permet de se passer d'un standard, requiert 10 à 200  $\mu$ g de thiamine environ, selon le procédé que l'ont suit, et est par conséquent particulièrement indiquée pour l'analyse des produits pharmaceutiques.

**Summary.** — After having outlined the many causes of error which make the fluorimetric method commonly used today for the determination of thiamine unreliable, the author advances a method based on the spectrophotometric measure of thiochrome at its absorption maximum.

After having carried out the usual oxidation with potassium ferricyanide in the presence of NaOH, the spectrophotometric measure is made in aqueous solution at 368  $m\mu$  (previous treatment with  $H_2O_2$ ) or, if substances that might interfere are present, in a solution of isobutyl alcohol. The measurement in isobutanol can be taken directly at 370  $m\mu$  or, after adding acetic acid, at 392  $m\mu$ . The latter procedure enables any photometer to be used.

The method can be carried out without a standard and requires about 10 to 200  $\mu g$  of thiamine, following the procedure indicated, and therefore, it is particularly adapted for the analysis of pharmaceutical products.

**Zusammenfassung.** — Nachdem der Verf. die vielfältigen Fehlerquellen aufgezeigt hat, wodurch die heute allgemein zur Bestimmung des Thiamins angewandte fluorimetrische Methode wenig genau gemacht wird, schlägt er eine Methode vor, die auf der spektrophotometrischen Messung des Thiochroms beim Absorptionsmaximum beruht. Nach Durchführung der üblichen Oxydation mittels Kaliumferricyanid bei Anwesenheit von NaOH, wird die spektrophotometrische Messung in wässriger Lösung bei 368  $m\mu$  (nach vorheriger Behandlung mit  $H_2O_2$ ) vorgenommen oder, bei Anwesenheit interferierender Substanzen, in Lösung von Isobutylalkohol. Die Messung in letzterer Lösung kann direkt bei 370  $m\mu$  ausgeführt werden, oder, nach Zusatz von Essigsäure, bei 392  $m\mu$ . Das letztere Verfahren gestattet die Verwendung eines beliebigen Photometers für den sichtbaren Bereich.

Diese Methode, die auf die Benutzung eines Standards verzichten kann, erfordert ungefähr 10 bis 200  $\mu g$  Thiamin, je nach dem gewählten Verfahren, und ist daher für die Analyse pharmazeutischer Produkte besonders geeignet.

---

Il metodo più comunemente impiegato per la determinazione della tiamina è basato sulla sua ossidazione a tiocromo con ferricianuro in ambiente alcalino, successiva estrazione del tiocromo con alcool isobutilico e misura fluorimetrica dell'estratto isobutanolico.

Dal 1936, anno in cui JANSEN <sup>(1)</sup> propose questo metodo, fino ad oggi sono stati pubblicati oltre un centinaio di lavori in cui si propongono modificazioni più o meno importanti al metodo originario; la comparsa, anche in questi ultimi mesi, di nuove pubblicazioni sull'argo-

---

<sup>(1)</sup> JANSEN B. C. P.: Rec. Trav. Chim., 55, 1046 (1936).

mento indica che il metodo non è ancora soddisfacente. Il coefficiente di variazione medio che esso comporta è risultato, in uno studio collaborativo eseguito fra 38 diversi analisti, dell'11,1% (2); VASTAGH (3) ha trovato che l'errore va dal +8% al -16%.

Le cause d'errore si possono così schematizzare:

1) Le quantità di ferricianuro e di NaOH vanno accuratamente regolate, specialmente se la tiamina è accompagnata da altre sostanze riducenti.

2) Il tempo durante il quale si fa agire l'ossidante dev'essere anch'esso esattamente misurato.

3) Il volume della soluzione, dopo aggiunta della quantità necessaria di ossidante (variabile da caso a caso), dovrebbe essere portato a un valore costante, altrimenti durante l'agitazione con isobutanolo questo non estrae sempre la stessa percentuale di tiocromo e la fase acquosa scioglie quantità variabili di alcool isobutilico.

4) La durata dell'estrazione con isobutanolo deve stare entro certi limiti (1-2 minuti).

5) L'isobutanolo dovrebbe essere anidro e, dopo l'estrazione, dovrebbe essere trattato con un eccesso di  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anidro, in modo da eliminare non solo l'acqua che vi si trova in sospensione, ma anche quella disciolta. Per di più, la solubilità reciproca dell'alcool isobutilico e dell'acqua dipende dalla temperatura e dalle sostanze presenti nella fase acquosa.

6) L'alcool isobutilico è spesso fluorescente e difficilmente purificabile per distillazione.

7) Il solfato di sodio può contenere impurezze fluorescenti.

8) L'estratto isobutanolico alcalino può intorbidarsi perchè, in presenza della  $\text{CO}_2$  dell'aria, si forma  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , poco solubile in isobutanolo. L'intorbidamento, che permane dopo il trattamento con  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , mal si presta ad essere eliminato mediante filtrazione su ovatta o su carta da filtro perchè queste sostanze possono cedere impurezze fluorescenti.

---

(2) SKOVHOLT O. e Coll.: *Cereal Chem.*, 20, 607 (1943); cfr. *Chem. Abstr.* 38, 469 (1944).

(3) VASTAGH G.: *Pharmaz. Zentralh.*, 81, 409 e 424 (1940); cfr. *Chem. Abstr.*, 34, 4524 (1940); *Mag. Gyógyszer. Társ. Ert.*, 16, 36 (1940); cfr. *Chem. Abstr.* 34, 2135 (1940).

(4) ELLINGER P. e HOLDEN M.: *Biochem. J.*, 38, 147 (1944).

9) Il tiocromo, specialmente se in soluzione diluita, si altera facilmente alla luce, soprattutto alle radiazioni U.V. intense come quelle emesse dalle lampade di certi fluorimetri.

10) La fluorescenza del tiocromo è influenzata dalle più svariate sostanze presenti nella soluzione: ossigeno, ferricianuro di potassio e altri sali inorganici, sostanze organiche, ecc. (4).

11) In presenza di sostanze fluorescenti o suscettibili di diventare tali per azione del ferricianuro, l'estrazione del tiocromo con alcool isobutilico non è sempre sufficientemente selettiva da eliminare del tutto le fluorescenze estranee. L'esecuzione di una prova in bianco, comunque ottenuta, non tiene conto del fatto che le fluorescenze non sempre sono additive, ma due fluorescenze dovute a sostanze diverse danno una fluorescenza totale che può essere maggiore o minore della loro somma (3).

12) La misura fluorimetrica in sé è meno precisa di una misura spettrofotometrica, anche se si usa un buon fluorimetro fotoelettrico, sul tipo di quelli oggi in commercio.

13) La misura fluorimetrica non è assoluta, ma richiede uno standard di confronto, che può essere costituito da un vetrino fluorescente (non scevro d'inconvenienti e oggi pressochè abbandonato) o da una soluzione di sostanza fluorescente (tiocromo, solfato di chinina, cloridrato di 1-metil-5-amminoacridina, tutti prodotti più o meno fotosensibili). E' preferibile eseguire ogni volta il confronto con una soluzione standard di tiamina (conservata a 0° in ambiente leggermente acido), trattandola allo stesso modo della soluzione in esame.

A tutte queste cause d'errore va aggiunto che il metodo è molto sensibile; se questo è un pregio, diventa uno svantaggio quando si dispone di soluzioni vitaminiche relativamente concentrate (per es. prodotti farmaceutici), perchè in tal caso si può commettere anche un certo errore di diluizione.

E' facile constatare che le cause d'errore sopra elencate dipendono quasi tutte da due « passaggi obbligati »:

a) l'estrazione con alcool isobutilico e la conseguente disidratazione con  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ;

b) la misura fluorimetrica.

Il metodo che qui verrà esposto (I procedimento), basato su di una misura spettrofotometrica del tiocromo in soluzione acquosa, a 368  $\text{m}\mu$ , evita i suddetti « passaggi obbligati », con le cause d'errore connesse, ed è inoltre molto più rapido. Esso è meno sensibile del metodo fluori-

metrico, ma, come già detto, ciò si risolve in un vantaggio quando la soluzione di tiamina è sufficientemente concentrata. Esso è quindi particolarmente indicato per l'analisi di prodotti farmaceutici.

Il I procedimento è applicabile a soluzioni di tiamina [anche sotto forma fosforilata (5)] relativamente pure; non interferiscono i cloruri, solfati, fosfati, glicerofosfati e formiati alcalini, il saccarosio, la vitamina PP, la vitamina B<sub>6</sub>, l'acido pantotenico, l'inositolo, la biotina, la colina, l'acido p-amminobenzoico (queste sostanze possono trovarsi associate alla vitamina B<sub>1</sub> nei prodotti farmaceutici); alcuni riducenti (vitamina C, glucosio) non interferiscono nella misura spettrofotometrica se non sono in concentrazioni troppo elevate, ma richiedono un maggior quantitativo di ferricianuro.

Quando sono presenti sostanze interferenti, che assorbono anch'esse a 368 m $\mu$  (vitamina B<sub>2</sub>, vitamina B<sub>12</sub>, acido folico, ecc.), si può ricorrere al II procedimento, con cui la misura spettrofotometrica del tiocromo viene eseguita sull'estratto isobutanolico (a 370 m $\mu$ ). Un procedimento analogo era già stato indicato da URBAN e GOLDMAN (6) per la determinazione della tiamina nell'urina, ma era così complicato che, pur essendo stato proposto 9 anni fa, non ha trovato seguaci nella letteratura. Se le sostanze estranee presenti sono estraibili, anche parzialmente, con alcool isobutilico e assorbono a 370 m $\mu$ , occorrerà fare una prova in bianco; questa può essere eseguita, nella maggior parte dei casi, semplicemente omettendo l'aggiunta del ferricianuro; solo in qualche caso sarà necessaria una prova in bianco più selettiva, eseguita bloccando il gruppo amminico della tiamina con benzen-solfonilcloruro (6, 7). Entrambi questi metodi danno buoni risultati con la misura spettrofotometrica perchè le estinzioni sono normalmente additive, mentre, come già detto, non sempre lo sono le fluorescenze.

Verrà esposto infine un III procedimento, secondo cui la determinazione spettrofotometrica del tiocromo viene eseguita in ambiente di isobutanolo-acido acetico, a 392 m $\mu$ ; il massimo d'assorbimento mostrato dal tiocromo in queste condizioni (8) è talmente vicino al visibile (le soluzioni sono leggermente gialle) che viene diminuita l'interferenza di sostanze estranee e, inoltre, viene resa possibile la misura con un qualsiasi fotometro per il visibile.

Per la messa a punto di questo metodo analitico che, come già detto,

---

(5) GAUDIANO A., TOFFOLI F. e BOCCACCI M.: Rend. Istituto Sup. Sanità (in corso di pubblicazione)

(6) URBAN F. e GOLDMAN M. L.: J. biol. Chem., 152, 323 (1944)

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

(8) GAUDIANO A. e CINGOLANI E.: Rend. Istituto Sup. Sanità, 15, 408 (1952).

è particolarmente indicato per i prodotti farmaceutici, si cercò di fare riferimento ad un buon prodotto commerciale. Furono scelti campioni aventi punto di fusione 248°-250° e valori dell'assorbimento nell'U.V. vicini a quelli riportati da DEADLE e coll. <sup>(9)</sup>; secondo questi AA. la tiamina ha, in tampone di fosfati a pH 7,4, due massimi d'assorbimento, a 235 e a 265 m $\mu$ ; i rispettivi valori di  $\epsilon$  sono, per lo standard USP, 10885 e 8290 e per il prodotto Merck 10843 e 8383; in termini di  $E_{1\text{cm}}^{1\%}$  questi valori diventano, per il cloruro-cloridrato di tiamina, 321-323 e 246-249. I massimi d'assorbimento dei campioni qui esaminati sono stati trovati a 233-234 m $\mu$  e a 266-267 m $\mu$ ; i valori di  $E_{1\text{cm}}^{1\%}$  ottenuti per diversi campioni (Merck, Roche, Winthrop) di produzione recente (1950-1952) sono in buon accordo fra loro e dell'1-2% più alti di quelli riportati da DEADLE e coll. se riferiti al prodotto anidro. Siccome però il prodotto commerciale contiene intorno al 4-5% di umidità (che corrisponde all'incirca a 1 mol. H<sub>2</sub>O per mol. di tiamina), i valori sotto riportati sono stati riferiti a un buon prodotto commerciale contenente il 4,5% di umidità. Si ricordi, a questo proposito, che la Farmacopea Internazionale I e quella Statunitense XIV ammettono non più del 5,0% di umidità, la Farmacopea Britannica 1953 prescrive un'umidità non inferiore al 3,1% e non superiore al 5,0%, mentre il Codex Francese VII considera ufficiale il prodotto monoidrato (5,07% di acqua).

E' utile far notare, incidentalmente, che la misura spettrofotometrica diretta nell'U.V. non è indicata per la determinazione della tiamina nelle soluzioni che la contengono perchè, alle lunghezze d'onda suddette, si ha l'interferenza di molte sostanze, ivi compresi i prodotti di demolizione della stessa vitamina B<sub>1</sub>.

L'ossidazione a tiocromo, spostando l'assorbimento verso il visibile per l'effetto batocromo dei tre anelli condensati, elimina o riduce l'interferenza di molte sostanze estranee e fornisce un metodo sufficientemente specifico per la determinazione della tiamina.

Per eseguire la determinazione spettrofotometrica del tiocromo in soluzione acquosa, si era pensato in un primo tempo di ricorrere, per l'ossidazione della tiamina, al cloruro mercurico in ambiente alcalino, secondo il metodo di HOLMAN <sup>(10)</sup> modificato da PATRICK e WRIGHT <sup>(11)</sup>, dato che il HgCl<sub>2</sub>, a differenza del ferricianuro, non assorbe a 368 m $\mu$ . Per semplificare il metodo, si è tentata l'eliminazione del riscaldamento a 40°. Seguendo la velocità di reazione mediante misura dell'estinzione a

<sup>(9)</sup> DEADLE B. W., GREENWOOD D. A. e KRAYBILL H. R.: J. Biol. Chem., 149, 339 (1943).

<sup>(10)</sup> HOLMAN W. T. M.: Biochem. J., 38, 388 (1944).

<sup>(11)</sup> PATRICK R. e WRIGHT J. F. H.: Analyst, 74, 303 (1949).

368 m $\mu$  a brevi intervalli di tempo, si è potuto constatare che la reazione raggiunge quasi il suo massimo di rendimento dopo 15-20 minuti, ma continua poi lentamente anche dopo molte ore, senza tuttavia raggiungere il rendimento teorico. La cinetica si è dimostrata piuttosto complessa, trattandosi probabilmente di due reazioni distinte, ma su questo punto si spera di poter tornare in seguito. Facendo avvenire la reazione a 40°, il rendimento è un po' più elevato, ma la reazione continua poi a procedere lentamente per molte ore. E' necessario quindi eseguire la misura dopo un tempo esattamente misurato. Un altro inconveniente è la formazione occasionale di un lieve precipitato. Si è quindi tornati al vecchio metodo al ferricianuro, studiando un sistema per eliminarne l'eccesso. La precipitazione con un sale di zinco è risultata piuttosto laboriosa. Si è dimostrato preferibile il trattamento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, che riduce l'eccesso di ferricianuro a ferrocianuro; l'assorbimento di questo ultimo a 368 m $\mu$  è molto modesto in ambiente alcalino. La misura era intralciata dalle bollicine dell'ossigeno svolto. Essendo però stato pubblicato nel frattempo un lavoro di BESSEY e coll. (6), in cui viene eseguita la misura fluorimetrica in soluzione acquosa, dopo aver eliminato l'eccesso di ferricianuro con una soluzione idro-alcoolica molto diluita di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, si è sperimentato, con ottimi risultati, il reattivo di questi AA., che è stato infine adottato. Il reattivo è stabile per parecchi mesi. Buoni risultati dà anche una semplice soluzione acquosa di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 0,015%, che, pur essendo un po' meno stabile della soluzione idro-alcoolica, mantiene la sua attività per 4-5 mesi.

Nelle condizioni appresso indicate, il tiocromo formatosi è il 61% del teorico; la resa è la stessa qualunque sia la concentrazione di tiamina, purchè compresa entro i limiti indicati; CONNER e STRAUB (12) trovano, in condizioni un po' diverse, una resa del 67%.

Ecco le modalità per l'esecuzione di questo

### *I Procedimento.*

Sono necessari i seguenti reattivi:

a) Reattivo al ferricianuro ottenuto mescolando, al momento dell'uso, 9 parti (in volume) di NaOH al 20% con una parte di ferricianuro di potassio all'1% (questo va conservato in bottiglia di vetro scuro). La soluzione di NaOH si può conservare convenientemente in una bottiglia di resina polietilenica anzichè in una di vetro.

---

(12) CONNER R. T. e STRAUB G. J.: Ind. Eng. Chem., Anal. Ed., 13, 380 (1941).

b) Reattivo all' $\text{H}_2\text{O}_2$ : a  $90 \text{ cm}^3$  di alcool a  $95^\circ$  si aggiungono  $0,5 \text{ cm}^3$  di  $\text{H}_2\text{O}_2$  al 3% e si porta a  $100 \text{ cm}^3$  con acqua. Il reattivo è stabile per parecchi mesi. Se ne può saggiare l'attività provando se  $2 \text{ cm}^3$  sono capaci di decolorare completamente  $1 \text{ cm}^3$  di reattivo a) addizionato di  $1 \text{ cm}^3$  di acqua.

Per eseguire la determinazione, ad  $1 \text{ cm}^3$  della soluzione in esame, contenente circa  $50 \mu\text{g}$  di tiamina (limiti  $10\text{-}100 \mu\text{g}$ ) si aggiunge, in provetta,  $1 \text{ cm}^3$  di reattivo a); si mescola e, dopo 1 minuto, si aggiungono  $2 \text{ cm}^3$  di reattivo b); si torna a mescolare bene e, cessato lo sviluppo gassoso, si versa in vaschetta da  $1 \text{ cm}$  e si misura l'estinzione a  $368 \text{ m}\mu$ , usando come prova in bianco  $1 \text{ cm}^3$  d'acqua addizionata con  $1 \text{ cm}^3$  di reattivo a) e  $2 \text{ cm}^3$  di reattivo b). Se si fanno diverse determinazioni con uno stesso reattivo, ci si può servire di un'unica prova in bianco; il valore della corrispondente estinzione è risultato, con lo spettrofotometro di Beckman, intorno a  $0,050$ . Il valore dell'estinzione letta, moltiplicato per  $110$ , dà i  $\mu\text{g}$  di vitamina  $\text{B}_1$  (cloruro-cloridrato) presenti nella soluzione. Siccome la precisione del metodo dipende dall'esattezza con cui vengono prelevati i singoli volumi, è consigliabile, quando si dispone di sufficiente soluzione, operare in pallone tarato: per es., si aggiungono  $5 \text{ cm}^3$  di reattivo a) a  $5 \text{ cm}^3$  della soluzione in esame e si porta a volume, in pallone tarato da  $20 \text{ cm}^3$ , col reattivo b).

Se, dopo l'aggiunta del reattivo a), non permane il colore giallo (presenza di sostanze riducenti), occorre aggiungerne in maggior quantità e decolorare, poi, col quantitativo necessario di reattivo b); si terrà conto, poi, del volume finale della soluzione.

Se si sospetta l'esistenza di sostanze interferenti, si può misurare l'estinzione, a  $368 \text{ m}\mu$ , della soluzione in esame addizionata di  $\text{NaOH}$ , senza ferricianuro nè  $\text{H}_2\text{O}_2$ , oppure di benzen-solfonilcloruro, secondo le modalità descritte da BESSEY e coll. (7) e riportate più avanti. Se l'estinzione non è trascurabile, conviene ricorrere ad uno dei procedimenti seguenti.

### *II Procedimento.*

Sono necessari i seguenti reattivi:

- a) come per il I procedimento;
- b) alcool isobutilico anidro;
- c) solfato di sodio anidro.

Per eseguire la determinazione, ad  $1 \text{ cm}^3$  della soluzione in esame, contenente circa  $100 \mu\text{g}$  di tiamina (limiti  $20\text{-}200 \mu\text{g}$ ), si aggiunge, in

imbutino separatore o in provetta munita di tappo a smeriglio, 1 cm<sup>3</sup> di reattivo a) e si mescola. Se non permane il colore giallo, occorre un maggior quantitativo di ferricianuro; sarà allora conveniente, anzichè usare un maggior volume di reattivo a), prepararne un altro con una soluzione più concentrata di ferricianuro; in tal modo resta invariato il volume della soluzione acquosa che verrà estratta con isobutanolo. Passato 1 minuto dall'aggiunta del reattivo, si aggiungono 7 cm<sup>3</sup> di alcool isobutilico, si tappa l'imbutino o la provetta e si agita energicamente per 2 minuti. Si fa quindi riposare per qualche minuto, in modo da avere netta separazione delle due fasi; si preleva (anche non quantitativamente) la fase isobutanolica e la si disidrata con un eccesso di Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Si versa cautamente nella vaschetta (da 1 cm) dello spettrofotometro e si misura l'estinzione a 370 m $\mu$ ; nella vaschetta di confronto si mette una prova in bianco ottenuta operando come sopra, salvo la sostituzione del reattivo a) con NaOH al 20%. Talora può essere consigliabile eseguire la prova in bianco bloccando la tiamina con benzen-solfonilcloruro: a 1 cm<sup>3</sup> della soluzione in esame si aggiunge 1 goccia di NaOH al 20% e 1 goccia di benzen-solfonilcloruro; si agita energicamente per 1-2 minuti, poi si aggiunge 1 cm<sup>3</sup> del reattivo a), ecc.

Se non sono presenti, oltre al tiocromo, sostanze estraibili con isobutanolo che assorbono a 370 m $\mu$ , basta mettere nella vaschetta di confronto il solo alcool isobutilico.

Usando lo spettrofotometro di BECKMAN Mod. DU, l'estinzione letta, moltiplicata per 210, dà i  $\mu$ g di vitamina B<sub>1</sub>.

### III Procedimento.

Sono necessari i seguenti reattivi.

- a) come per il I procedimento;
- b) alcool isobutilico anidro;
- c) solfato di sodio anidro;
- d) acido acetico glaciale.

Per eseguire la determinazione, ad 1 cm<sup>3</sup> della soluzione in esame, contenente intorno ai 200  $\mu$ g di tiamina (la quantità da impiegare dipende dal tipo di fotometro usato) si aggiunge, in imbutino separatore o in provetta munita di tappo a smeriglio, 1 cm<sup>3</sup> di reattivo a) e si mescola. Se non permane il colore giallo, si usi un reattivo contenente più ferricianuro (v. II procedimento). Passato 1 minuto dall'addizione del reattivo, si aggiungono 4 cm<sup>3</sup> di alcool isobutilico, si tappa l'imbutino o la provetta e si agita energicamente per 2 minuti. Si fa quindi ripo-

sare per qualche minuto, in modo da avere netta separazione delle due fasi; si preleva (anche non quantitativamente) la fase isobutanolica e la si disidrata con un eccesso di  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . A  $2 \text{ cm}^3$  della fase isobutanolica disidratata si aggiungono  $2 \text{ cm}^3$  di acido acetico glaciale, si agita e si misura l'estinzione contro un'adatta prova in bianco. Per questa, ci si regola come descritto al II procedimento; in assenza di sostanze interferenti, basta mettere nella vaschetta di confronto una miscela 1:1 (in volume) di alcool isobutilico e acido acetico. Si misura l'estinzione a  $392 \text{ m}\mu$  (se si può disporre di uno spettrofotometro) o ad una lunghezza d'onda quanto più possibile vicina a questa: se si dispone di un fotometro per il solo visibile, si può operare intorno a  $400 \text{ m}\mu$ ; col fotometro di PULFRICH si userà il filtro S43, con quello di KLETT il filtro 40.

La concentrazione di tiamina e i volumi da usare dipendono dal tipo di fotometro che si ha a disposizione; quelli sopra consigliati sono semplicemente indicativi. Inoltre, l'analista dovrà controllare, una volta per tutte, il campo in cui, con l'apparecchio da lui usato, si ha linearità fra estinzione e concentrazione e tener presente che, se il suo apparecchio è poco sensibile, dovrà impiegare un maggior quantitativo di tiamina e, conseguentemente, una soluzione più concentrata di ferricianuro. Una volta costruito il diagramma di taratura, o trovato il fattore di conversione, la determinazione si riduce, come per gli altri due procedimenti, ad una misura assoluta, che non abbisogna, quindi, di soluzione campione di tiamina o altro standard.

La soluzione acetica di tiocromo, ottenuta col III procedimento, è stabile anche alla luce, cosicchè la misura può essere eseguita anche dopo alcune ore. Essa offre inoltre il vantaggio di essere molto meno fluorescente delle soluzioni ottenute col I e II procedimento, cosicchè presenta un più vasto campo di validità della legge di BEER.