

16. Giuseppe PRUNER. — Nuovo procedimento per la determinazione fluorimetrica della vitamina B₁ col metodo al tiocromo.

Riassunto. — Viene descritto un nuovo procedimento per la determinazione fluorimetrica della vitamina B₁, particolarmente adatto per prodotti farmaceutici, anche se contengono altre sostanze riducenti e per determinazioni in serie.

L'ossidazione con ferricianuro di potassio viene effettuata a modesta alcalinità (pH 10) per 5 minuti in b.m. bollente.

Sempre usando 3 mg di ferricianuro, si determinano con esattezza quantità di vitamina B₁ comprese fra 1 e 100 µg.

Résumé. — Un nouveau moyen de déterminer fluorométriquement la vitamine B₁, particulièrement conseillable pour les produits pharmaceutiques qui contiennent d'autres substances qui sont des réducteurs, et pour la détermination en série, est décrit dans cette étude.

L'oxydation par le ferricyanure se produit à un degré d'alcalinité modeste (pH 10) pendant 5' au bain-marie bouillant.

En se servant toujours de 3 mg de ferricyanure, on détermine avec exactitude la quantité de vitamine B₁ comprise entre 1 et 100 µg.

Summary. — A new procedure for the fluorometric detection of Vitamin B₁ is described by the author; it is particularly suited for use in pharmaceutical products which contain other reducing substances and for rapid analysis.

Oxidation with ferricyanide is produced with moderate alkalinity (pH 10) for 5' in a boiling double boiler.

Using 3 mg of ferricyanide, the quantity from 1 to 100 µg of Vitamin B₁ contained can be determined exactly.

Zusammenfassung. — Es wird ein neues Verfahren zur fluorimetrischen Bestimmung des Vitamin B₁ beschrieben, besonders geeignet für pharmazeutische Präparate, auch in Gegenwart von anderen reduzierenden Agenzien und für Serien-Bestimmungen.

Die Oxydation mittels ferricyankalium wird bei schwacher Alkalinität (pH 10) im kochenden Wasserbad 5 Minuten hindurch, vorgenommen.

Mit 3 mg, können sowohl 1 bis 100 µg vitamin B₁ mit derselben Genauigkeit bestimmt werden.

Tra i vari metodi proposti per la determinazione della vitamina B₁ (1), ha trovato larga diffusione il metodo fluorimetrico di JANSEN (2), ancora oggi universalmente adottato, per la rapidità e semplicità di esecuzione e per la elevata sensibilità che raggiunge (0,4 µg). Esso è fondato sull'ossidazione con ferricianuro della vitamina B₁ a tiocromo, estrazione con alcool isobutilico e determinazione della intensità di fluorescenza del tiocromo nella soluzione isobutilica.

Numerose modifiche (1) apportate al metodo originale non ne hanno però eliminato i principali inconvenienti: l'aneurina sotto l'azione dell'alcalinità dell'ambiente può subire delle alterazioni (apertura dell'anello tiazolico) e sfuggire così alla reazione principale di ossidazione; mentre un eccesso di ferricianuro di potassio può ossidare ulteriormente e distruggere il tiocromo per dare prodotti non più fluorescenti (3). Un eccesso dei due reattivi, idrato sodico e ferricianuro, può portare a notevoli scarti nella fluorescenza dell'estratto isobutilico, cosicchè per ottenere buoni risultati, è necessario procedere per tentativi, con quantità differenti di ferricianuro fino a cogliere il massimo della resa in tiocromo.

E. C. GROB ha studiato l'influenza del tempo di ossidazione e delle quantità di ossidante sulla resa in tiocromo (4), l'influenza delle quantità di alcool isobutilico sulla resa dell'estrazione ed infine l'influenza sulla reazione di alcune sostanze (pirogallolo, acido gallico, acido ascorbico, tannico, cisteina, ecc.; ioni metallici, come il rame, il ferro ed il manganese) spesso presenti negli estratti vegetali.

Il procedimento che si descrive nella presente Nota elimina buona parte degli inconvenienti sopra citati: l'ossidazione ha la durata di 5' e si fa alla temperatura del b.m. bollente in ambiente alcalino per una miscela di fosfati e carbonato alcalini (circa pH 10): a tale moderata alcalinità si evita l'ulteriore ossidazione del tiocromo.

Si possono così compendiare i vantaggi del nuovo procedimento:

1) Con una stessa quantità di ferricianuro di potassio, cioè 3 mg si riesce a determinare con precisione da 1 a 100 µg di vitamina B₁. Per quantità inferiori a 1 µg è consigliabile di praticare l'ossidazione con 1 solo mg di ferricianuro di potassio.

(1) « Methods of Vitamin Assay » second Edition - Interscience Publishers, Inc., New York 1951. — GSTIRNER: « Chemisch-physikalische Vitamin - Bestimmungs-methoden » IV Aufl. 1951 - Ferdinand Enke Verlag Stuttgart.

Oltre alle tecniche più importanti i due volumi portano una bibliografia notevole anche per altri metodi di determinazione della vitamina B₁.

(2) B. C. P. JANSEN - Rec. Trav. Chim. Pays-Bas, 54, 133 (1935).

(3) ARCANGELI e TRUCCO - Ann. chim. applicata, 33, 93 (1943).

(4) Z. Vitaminforsch., 17, 98 (1946).

Il grafico della fig. 1 porta i risultati ottenuti col metodo usuale dell'ossidazione a freddo e con quello che viene qui proposto: mentre il primo metodo dà differenti intensità di fluorescenza in dipendenza delle quantità di ferricianuro (mg. 1: cerchietti pieni; mg 2: cerchietti

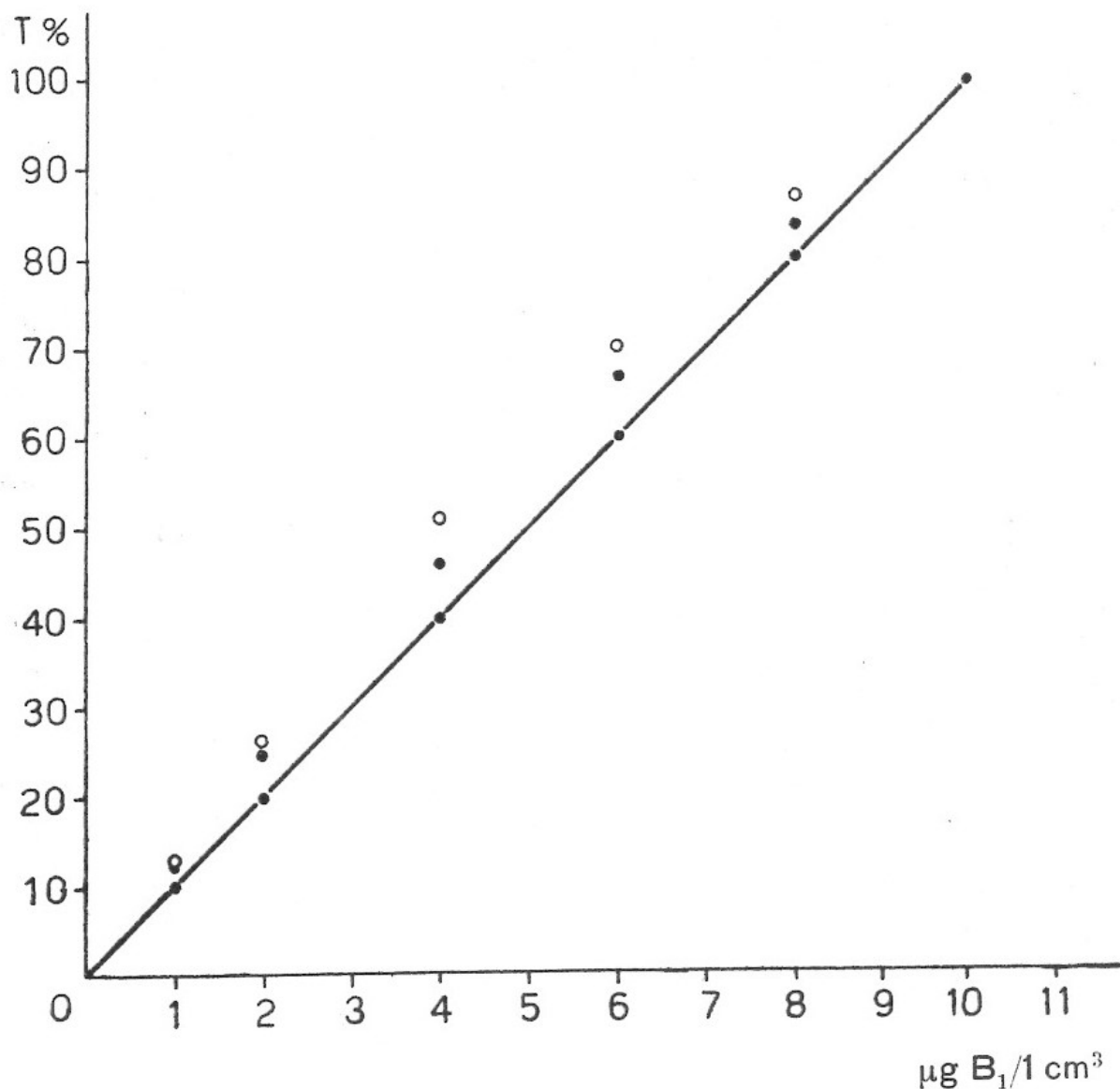


Fig. 1. — I cerchietti vuoti e pieni indicano l'intensità di fluorescenza in dipendenza delle quantità di ferricianuro di potassio impiegato nel metodo usuale dell'ossidazione a freddo (mg 2: cerchietti vuoti; mg 1: cerchietti pieni). I cerchietti pieni sulla riga indicano l'intensità di fluorescenza, esattamente proporzionale alle quantità di aneurina, nel metodo descritto.

vuoti) ed in ogni caso letture non proporzionali alle quantità di vitamina B₁, il secondo invece dà intensità di fluorescenza esattamente proporzionali alle quantità di aneurina, e ciò conforme ai risultati della determinazione ceriometrica precedentemente studiata ⁽⁶⁾.

⁽⁵⁾ Z. Vitaminforsch., 19, 179 (1947); Helv. Physiol. Acta (1947, C. 15).

⁽⁶⁾ Rend. Ist. Sup. Sanità, 14, 222 (1951).

2) Non avendo più alcuna influenza il tempo che trascorre fra l'ossidazione a caldo e le successive operazioni, risultano assai facilitate le determinazioni in serie.

3) Diversamente da quanto avviene col metodo comune, la separazione delle due fasi, acquosa e isobutilica, avviene rapidamente senza che sia necessario centrifugare.

4) Mentre col metodo usuale, l'alcool isobutilico, anche se di buona qualità, riduce rapidamente l'eccesso di ferricianuro, col procedimento che qui si propone, nell'agitazione della soluzione acquosa con alcool isobutilico, l'eccesso di ferricianuro non viene ridotto, grazie alla moderata alcalinità del mezzo acquoso. Riesce così possibile controllare la quantità di ferricianuro che è stato consumato nella reazione e ciò è utile quando si dubita che il prodotto in esame contenga forti quantità di sostanze riducenti.

E' stato trovato che 3 mg di ferricianuro sono sufficienti all'ossidazione di 5 µg di B₁ in presenza anche di 200 µg di acido ascorbico, senza che venga alterata l'intensità di fluorescenza. Maggiori quantità di acido ascorbico conducono alla completa decolorazione della soluzione durante il riscaldamento e ad un abbassamento dell'intensità di fluorescenza.

La Fig. 2 riassume i risultati ottenuti.

Fig. 2

Vitamina B ₁ misurata µg	Acido ascorbico aggiunto µg	Intens. di fluoresc. T' %
5	—	100
..	10	100
..	25	100
..	50	100
..	200	100
..	300	96
..	400	84
..	500	52

Inconveniente, se si può chiamare tale, del presente metodo può essere la minor intensità di fluorescenza, circa del 30% più bassa di quella ottenuta con l'ossidazione a freddo, inconveniente che può essere facilmente compensato con una minore diluizione della soluzione isobutilica del tiocromo per comodità di lettura allo spettrofotometro.

PARTE SPERIMENTALE

REAGENTI E SOLUZIONI OCCORRENTI

1) Soluzione di ferricianuro di potassio	3‰
2) Fosfato monopotassico anidro	g 0,283
Fosfato bisodico dodecaidrato	g 1,665
Acqua distillata q.b. a	cm ³ 100
3) Carbonato sodico secco	g 0,857
Acqua distillata q.b. a	cm ³ 100
4) Soluzione standard di vitamina B ₁ in HCl N/100 mg 5/100	cm ³

DESCRIZIONE DEL METODO

Determinazione fino a 10 µg di vitamina B₁

Si trasferisce un cm³ esatto di soluzione da esaminare, contenente da 1 a 10 µg di vitamina B₁, in un tubo di vetro bianco di Jena o Pyrex da mm 95 × 6 circa, fornito di tappo a smeriglio e si diluisce con 1 cm³ di soluzione N/100 di HCl.

A parte si diluisce la soluzione standard portandone 1 cm³ al volume di 10 cm³ con soluzione di HCl N/100. In un secondo tubetto si versano 2 cm³ di questa soluzione, contenente 10 µg. In ciascun tubetto si aggiungono prima 1 cm³ di soluzione di ferricianuro e poi 2 cm³ di soluzione di fosfati e carbonato alcalini, preparata, mescolando parti uguali delle due soluzioni n. 2 e 3. Coperto ogni tubetto con una bolla di vetro (tipo Kjeldahl) per limitare l'evaporazione, si immergono i due tubi, montati su un sostegno metallico, nel b.m. bollente, e vi si lasciano per 5 minuti; un riscaldamento più prolungato non porta una sensibile variazione nella resa di tiocromo e quindi nell'intensità di fluorescenza, ciò risulta da prove eseguite per tempi compresi fra 1 e 60 minuti. Trascorsi i 5 minuti si toglie dal b.m. il sostegno con i due tubetti, lo si immerge in un recipiente contenente acqua fredda, dove si lascia per 10 minuti circa. Si toglie dal bagno d'acqua, si versa da una buretta in ogni tubetto 8 cm³ di alcool isobutilico e si agita per 2 minuti. Avvenuta la separazione delle due fasi, mediante pipette si trasferiscono le soluzioni isobutiliche in due tubetti, si disidratano con una piccola quantità di solfato anidro di sodio, agitandole fino a che sono diventate perfettamente limpide e si versano in due vaschette dello spettrofotometro di Beckman. Una terza vaschetta viene riempita col solvente (alcool isobutilico).

Le misure della fluorescenza sono state eseguite con il detto apparecchio Mod. DU fornito del dispositivo per la fluorescenza.

I migliori risultati con tale apparecchio si ottengono diluendo la soluzione isobutilica così che un cm³ di questa contenga il tiocromo corrispondente a circa 1 µg di aneurina; con quantità maggiori viene a mancare la proporzionalità fra lettura e concentrazione.

Per determinazioni di quantità di aneurina inferiori ad 1 µg, si porta, se necessario, il commutatore selettore in posizione 0,1, moltiplicando così di 10 volte la sensibilità dell'apparecchio.

Per quantità di vitamina inferiori ad 1 µg il procedimento è sempre lo stesso; solo che nell'ossidazione si adopera 1 cm³ di ferricianuro all'1 per mille invece che al 3 per mille. L'estrazione del tiocromo si effettua poi come nel primo caso con 8 cm³ di alcool isobutilico.

Determinazione di 10 a 100 µg di B₁

In questo caso cambia solamente la concentrazione della soluzione standard che è di 100 µg in 2 cm³ e di quella del campione in esame che è pure 10 volte maggiore che nella prova precedentemente descritta. L'estrazione del tiocromo viene poi praticata con 10 cm³ di alcool isobutilico anzichè con 8 cm³. Di questi 10 cm³ si preleva, dopo disidratazione, 1 cm³ e si porta a 8 cm³ con alcool isobutilico per avere la concentrazione necessaria per la lettura della fluorescenza.

Col presente metodo non occorre servirsi, come nell'ossidazione a freddo, di una curva di taratura, in quanto le letture risultano proporzionali alle quantità.

Il presente procedimento si rende specialmente utile per la determinazione della vitamina B₁ in medicinali, come soluzioni iniettabili, compresse semplici e confettate, capsule, ecc. anche in presenza di altre sostanze riducenti: basta che il ferricianuro sia presente in quantità sufficiente all'ossidazione della B₁ e delle altre sostanze riducenti eventualmente presenti.

Buoni risultati si sono pure ottenuti con questo metodo, nell'esame della vitamina B₁ in prodotti alimentari.