

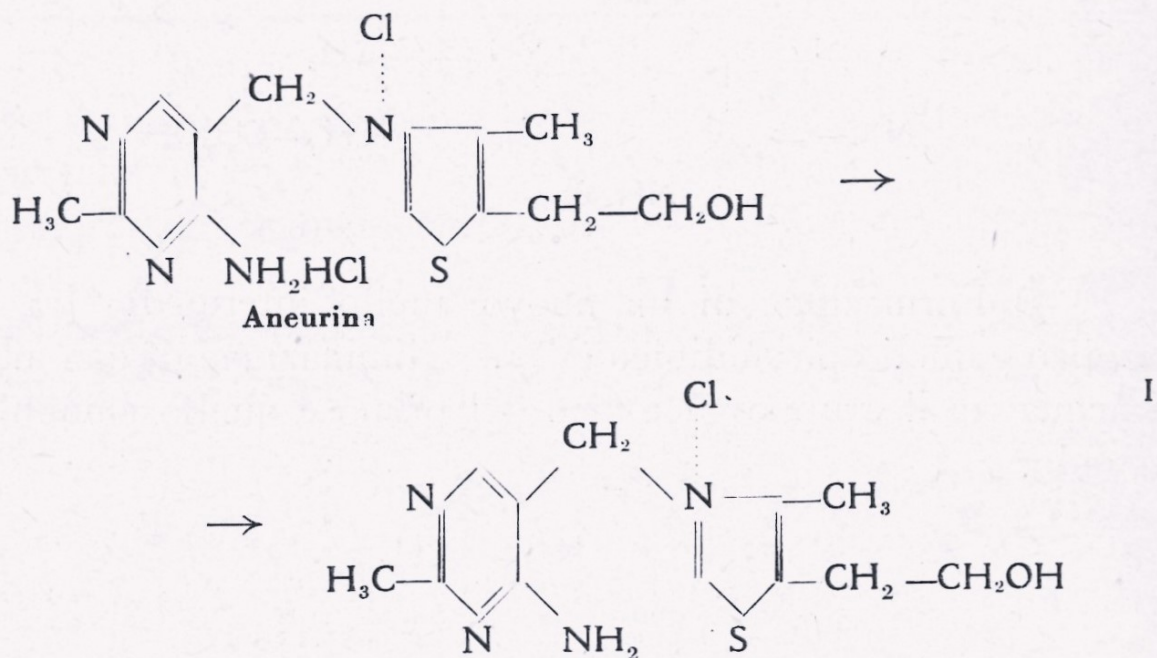
25. E. F. ARCANGELI e F. S. TRUCCO — Sulla determinazione quantitativa della vitamina B₁ col metodo del tiocromo.

Il metodo proposto da Jansen per il dosaggio per via chimica della aneurina, fondato sull'ossidazione della stessa a tiocromo e susseguente misura della fluorescenza di quest'ultimo è stato variamente modificato ⁽¹⁾.

Le modifiche riguardano non soltanto il metodo di estrazione — che nei preparati medicinali ha interesse relativo — ma specialmente il modo di condurre la reazione. Abbiamo però a questo proposito rilevato discordanze sensibili per cui si è tenuto opportuno di studiare bene la reazione stessa, che è piuttosto complessa e delicata, per definirne le condizioni di applicazione.

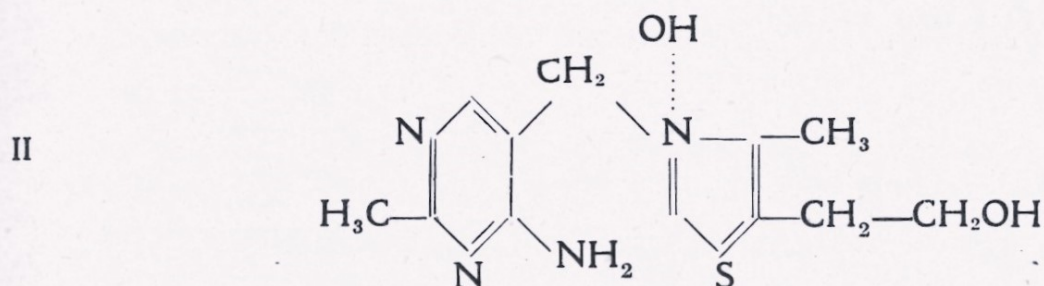
L'ossidazione dell'aneurina a tiocromo decorre attraverso le seguenti fasi :

1) Trasformazione del cloridrato in base libera (I), con una molecola di NaOH

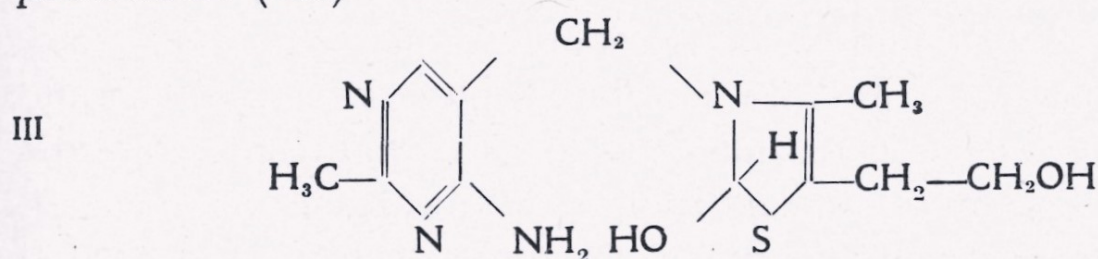


⁽¹⁾ Le tecniche più importanti sono raccolte nel volume dello GSTIRNER, « Chemisch-physikalische Vitaminbestimmungsmethoden », II Aufl. 1940, Verlag Enke, Stuttgart; in questo volume è citata la bibliografia più notevole anche per altri metodi di determinazione della Vitamina B₁.

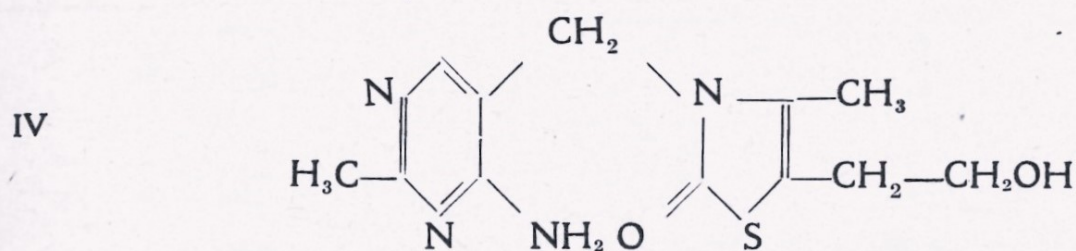
2) Passaggio ad idrato di N tiazolio (II), con una seconda molecola di NaOH



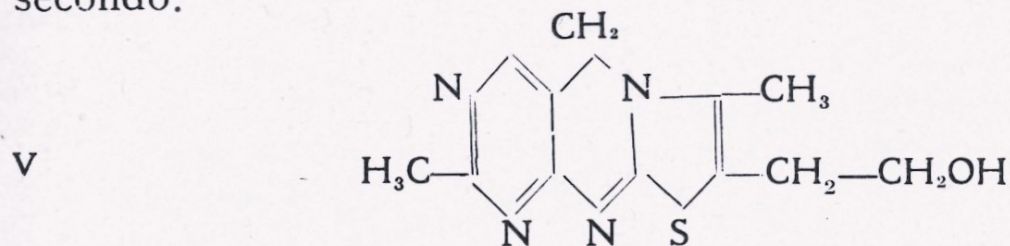
3) Trasformazione, immediata, dell'idrato di N-tiazolio a pseudobase (III)



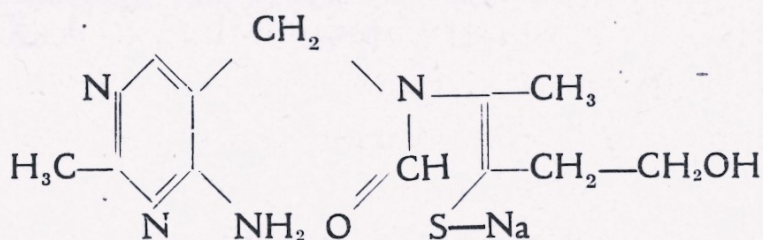
4) Ossidazione del gruppo alcolico della pseudobase a gruppo chetonico (IV) per opera del ferricianuro



5) Formazione di un nuovo anello intermedio tra quello tiazolico e quello pirimidinico (V) per eliminazione di una molecola di acqua tra il gruppo chetonico del primo e quello amminico del secondo.



E' da notare come, qualora non intervenga opportunamente un mezzo ossidante per la quarta fase di questa reazione, l'azione dell'idrato sodico sull'aneurina possa continuare provocando l'apertura dell'anello tiazolico (VI).



VI

D'altra parte un eccesso di ferricianuro può distruggere per ulteriore ossidazione il tiocromo (2) (3).

Appare quindi come sia necessario studiare accuratamente le condizioni più opportune per il trattamento sia con la soda che col ferricianuro.

JANSEN (2) dà per l'alcalinizzazione un pH di 10 come ottimo; OTTO e RUHMENKORB (3) danno una curva della dipendenza dell'intensità della fluorescenza dall'alcalinità; ma il raggiungimento di un determinato pH implica l'impiego di soluzioni tampone certamente non comode per l'uso comune; circa la curva « alcalinità-intensità di fluorescenza » degli autori accennati è da rilevare come essi impieghino quantità fisse di idrato sodico per quantità variabili di soluzione, sì che la concentrazione ossidrionica finale varia da caso a caso.

Per quanto riguarda poi la quantità di ferricianuro da impiegare nell'ossidazione si notano sperimentalmente notevoli differenze tra soluzioni di aneurina pura e liquidi biologici nei quali siano presenti altre sostanze ossidabili; così che è praticamente impossibile fissare una concentrazione ed una quantità optimum di ferricianuro, che non sia troppo scarsa per l'ossidazione dell'aneurina presente, nè troppo grande, tanto da ossidare, in parte, anche il tiocromo già formatosi.

L'impiego dell'alcole metilico (2) per ridurre la sensibilità del tiocromo di fronte al ferricianuro porta notevoli difficoltà pratiche perchè il coefficiente di ripartizione dell'alcole metilico tra alcole isobutilico e soluzioni acquose varia in funzione della concentrazione delle sostanze presenti nella fase acquosa; la quantità assoluta di alcole metilico che si scioglie nell'alcole isobutilico (che per ragioni pratiche viene usato in volume fisso) varia col variare del

(²) JANSEN, Rec. trav. chim. 55 1046 (1936); Z. Vitaminf. 7, 239 (1938).

(³) OTTO e RÜHMEKORB, Klin. Wschr. 17, 1246 (1938); D. med. Wschr. 64, 1511 (1938).

volume della fase acquosa. Il volume della fase isobulitica risulta così variato per maggiore o minore presenza di metanolo, a seconda del volume, della composizione e della concentrazione della soluzione contenente la vitamina B₁, dopo l'aggiunta della soda e del ferricianuro; una misura del volume finale della fase isobulitica è troppo poco pratica ed imprecisa.

Tentativi da noi fatti circa la possibilità d'impiegare altri ossidanti che fossero più specifici per l'aneurina non sono stati coronati da successo perchè nessuno ha dato risultati tali per i quali fosse preferibile rispetto al ferricianuro (4).

Tornando allora a questo ossidante abbiamo rilevato come un'aggiunta eccessiva potesse portare a notevoli differenze nella fluorescenza dell'estratto isobulitico, cioè nella resa in tiocromo; cosicchè per una esatta misura della quantità dell'aneurina presente è necessario procedere per tentativi facendo prove successive con quantità di ferricianuro variate opportunamente fino a trovare il massimo della resa in tiocromo.

Per la misura della fluorescenza col fotometro di Pulfrich, invece di una soluzione a titolo noto di tiocromo (soluzione poco stabile durante la misura, e comunque poco pratica) abbiamo preferito ricorrere agli standard di fluorescenza della Casa Zeiss (5).

I risultati da noi riportati nella parte sperimentale sono stati ottenuti con l'uso dello standard BB.

(4) Gli ossidanti da noi provati sono i seguenti: AgNO₃, K₂CrO₄, KMnO₄, Br, J, KNO₂, HgCl₂, CuSO₄, reattivo di Fehling; H₂O₂; FeCl₃; la scelta è stata limitata a quelli noti per la proprietà di ossidare il gruppo alcolico secondario a gruppo chetonico.

Hanno dato risultati positivi: KMnO₄, CuSO₄, soluzione di Fehling, ma non si è mai raggiunta una fluorescenza pari a quella ottenibile con ferricianuro.

(5) Gli standard di fluorescenza ad emissione simile, per colore, a quella del tiocromo sono due, contraddistinti uno col numero 42 e l'altro con la sigla BB; il primo ha un'intensità luminosa assai limitata; il secondo che è stato introdotto più recentemene, è molto più luminoso, e quindi assai comodo per la lettura; per quantità di aneurina varianti da 0,5 a 15γ occorre, nel fotometro di Pulfrich, ridurre, col tamburo di misura, l'intensità della luce dello standard; col 42 invece occorre sempre ridurre l'intensità luminosa della soluzione di tiocromo in esame; in (6) si rende nota una comunicazione privata della Casa Zeiss che avverte che lo standard BB dopo 3 ore di ininterrotta irradiazione ultravioletta perde il 2,5 % dell'intensità iniziale di emissione luminosa; ma al buio, più lentamente, riprende il valore iniziale.

Alcuni autori (3) (7) (8) consigliano per l'eliminazione delle fluorescenze estranee l'uso della prova in bianco, senza aggiunta di ferricianuro; contro la quale, d'altra parte (9), si rileva come la fluorescenza non sia una proprietà additiva ma due fluorescenze possano tanto rafforzarsi che indebolirsi. Ma anche l'assorbimento della vitamina B₁ su terra da follare, proposto da altri (7) (10) (11), non è quantitativo (3), per cui, a seconda dei casi, può essere preferibile ricorrere all'uno o all'altro metodo. Riteniamo utile segnalare una recente nota (12) in cui si propone di effettuare la prova in bianco previa aggiunta di Na₂S₂O₄ alla soluzione di vitamina B₁ prima dell'alcalinizzazione, per evitare la formazione di una sostanza a fluorescenza blu che sempre compare per semplice estrazione di una soluzione alcalina di vitamina B₁ con isobutanolo.

Nella misura della fluorescenza la relazione che collega i dati della lettura sul tamburo del fotometro (13) con le quantità del tiocromo presenti non è lineare; nella rappresentazione grafica non si è avuta quindi una retta ma una curva.

PARTE SPERIMENTALE

Relazione tra intensità di fluorescenza ed alcalinità.

Per stabilire la concentrazione optimum di idrato sodico abbiamo ritenuto necessario di fare in modo che la concentrazione di NaOH rimanesse costante anche dopo l'aggiunta del ferricianuro in quantità variabili.

(6) RITSEBT, Klin. Wschr., 446 (1940).

(7) KARRER e KUBLI, Helv. Chim. Acta 20, 369, 1147 (1937).

(8) RITSERT, D., Med. Wschr, 64, 481 (1938).

(9) VASTAGH, Pharm., Zentr. 81, 113, 124 (1940).

(10) FLAVIER e GENEVOIS, Compt. Rend. Soc. Biol. 130, 497 (1939).

(11) WESTENBRINK e GOUDSMITH, Rec. Trav. Chim. 56, 803 (1937).

(12) KUHN e GERHARDT, Klin. Wschr. II, 56, 803 (1937).

867 (1941).

(13) In tutti i grafici riportati abbiamo segnato sull'asse delle ordinate l'indicazione D%; abbiamo ritenuto preferibile questa scrittura per maggiore chiarezza, intendendo che l'intensità di fluorescenza della soluzione in esame è espressa come percentuale dell'intensità dello standard BB; praticamente quindi tale indicazione è data dalla lettura diretta sul tamburo del fotometro.

Abbiamo quindi preparato una serie di soluzioni optimum di idrato sodico contenenti 2, 5, 10, 15, 18, 20, 25, 30, 35, 40 g. % cm^3 ; di queste soluzioni si impiegava un numero di cm^3 pari al volume della soluzione di aneurina; la concentrazione finale, dopo alcalinizzazione, risultava così della metà del campione di soda usato.

Per l'ossidazione delle soluzioni alcalinizzate si impiegava una serie di soluzioni di $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ preparate unendo, a volumi eguali, una soluzione al 2°/0 di $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ e la soluzione di soda usata per l'alcalinizzazione. La concentrazione delle soluzioni di ferricianuro risultava così dell'1°/0 rispetto al ferricianuro e di un titolo di soda pari a quello dei singoli campioni di aneurina dopo alcalinizzazione.

Così si aveva che anche variando le quantità di ferricianuro l'alcalinità della soluzione all'atto dell'ossidazione risultava sempre la metà di quella del campione di soda impiegato.

Precisamente si operava così: a 2 cm^3 di una soluzione contenente 5y di aneurina si aggiungevano 2 cm^3 di una soluzione al 2% di NaOH; a questa soluzione si addizionava 1 cm^3 di una soluzione contenente l'1°/0 di $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ e l'1% di NaOH; si procedeva secondo la tecnica che verrà descritta più tardi, estraendo con alcole isobutilico e si misurava al fotometro dell'intensità della fluorescenza. Si ripeteva la prova con quantità differenti di soluzione alcalina di ferricianuro sino a raggiungere il massimo di fluorescenza dell'estratto isobutilico.

Tutta la serie di determinazioni è stata ripetuta per ogni concentrazione di NaOH.

Nella tabella I riportiamo i dati dei nostri esperimenti limitandoci ai soli valori massimi ottenuti per ciascuna concentrazione di NaOH; è risultato che col variare della concentrazione di NaOH non varia la quantità di $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ necessaria per l'ossidazione.

TABELLA I.

Concentraz. soda	D %	Concentraz soda	D %
1	26,6	10	36,75
2,5	29,8	12,5	36,1
5	34,1	15	35
7,5	36,3	17,5	33,75
9	36,75	20	32,2

Il grafico della figura 1 riunisce i dati della tabella I; appare evidente come la concentrazione optimum corrisponda all'impiego di una soluzione dal 18 al 20% di NaOH e conseguentemente ad una concentrazione, nel liquido di reazione, dal 9 al 10% di NaOH; nelle successive nostre esperienze abbiamo sempre usato una soluzione di NaOH al 20% e una di ferricianuro all'1% col 10% di soda.

Quantità di ferricianuro.

Come avevamo rilevato nella parte generale molti autori usano quantità fisse di ferricianuro per la ossidazione; dalle nostre esperienze è risultato che per una soluzione di aneurina pura in acqua distillata la quantità di ferricianuro è praticamente costante anche per quantità diverse (entro limiti da 0,5 a 15 γ) di aneurina, ma notevolmente superiore alle quantità

stechiometriche; è anche funzione del volume delle soluzioni contenenti l'aneurina; però per preparazioni non pure o per liquidi che contengano altre sostanze e specialmente per liquidi fisiologici o estratti vegetali la quantità necessaria varia notevolmente sicchè soltanto con prove successive con quantità diverse di ferricianuro si può raggiungere il massimo di fluorescenza dell'estratto isobulitico.

Nello stabilire la curva di riferimento, il numero delle prove con quantità diverse di ferricianuro è stato piuttosto elevato; ma normalmente, in una determinazione, specialmente qualora si sia acquistata una certa pratica, si arriva a stabilire l'optimum di fer-

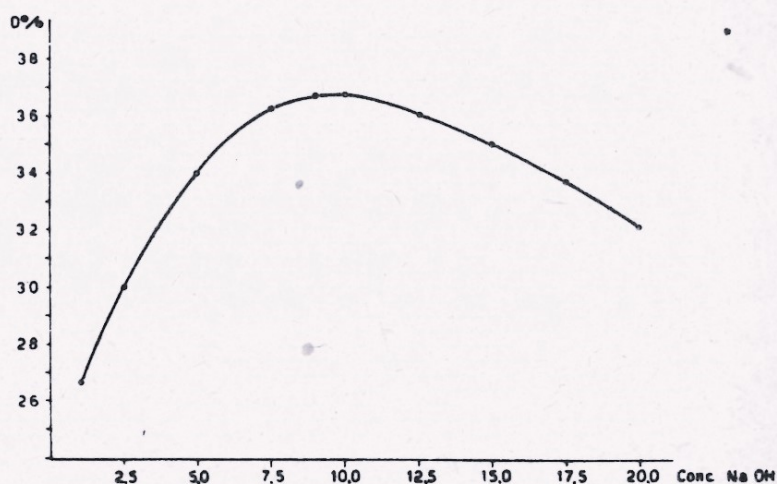


Fig. 1.

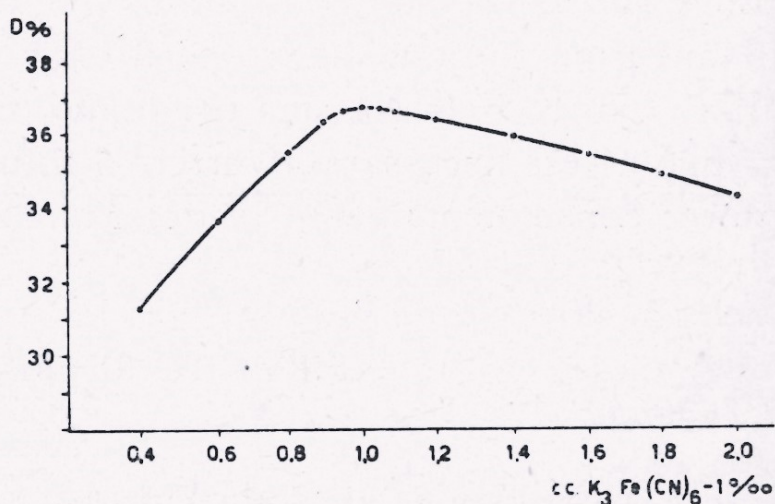


Fig. 2.

ricianuro, e quindi il massimo di fluorescenza, con 5-6 determinazioni successive.

Come esempio riportiamo una serie di determinazioni per una soluzione di 5 γ di aneurina in 2 cm³ di acqua distillata.

TABELLA II.

cc. di ferricianuro	D ‰	cc. di ferricianuro	D ‰
0,4	31,3	1,05	36,67
0,6	33,6	1,1	36,57
0,8	35,5	1,2	36,35
0,9	36,3	1,6	35,4
0,95	36,6	2,0	34,25
1,0	36,75		

Dal grafico della figura 2 risulta evidente la necessità di fare prove successive con quantità diverse di ferricianuro. Per soluzioni di aneurina pura in acqua distillata è utile usare una soluzione all'1‰ di $K_3Fe(CN)_6$, ma per liquidi che contengono altre sostanze può essere necessario ricorrere a soluzioni a concentrazione maggiore; conseguentemente la determinazione diventa meno precisa.

CURVA DI RIFERIMENTO

Reagenti:

- 1) Soluzione di soda caustica al 20% (20 g. in 100 cm³).
- 2) Soluzione di ferricianuro di potassio all'1‰ e di soda al 10%, ottenuta mescolando, in volumi eguali, una soluzione di ferricianuro al 2‰ ed una di soda al 20%.
- 3) Alcole isobutilico (su Na_2SO_4 secco).
- 4) Solfato di sodio anidro.

Esecuzione del metodo:

Ad un certo volume di una soluzione acquosa di vitamina B₁ purissima, di concentrazione nota, posto in una provetta a tappo

smerigliato, con rubinetto sul fondo, della capacità di 25-30 cm³, si aggiunge un egual volume di soda; si mescola e si addiziona di una quantità misurata di soluzione alcalina di ferricianuro; si mescola ancora e dopo 1 minuto vi si fanno scolare da una pipetta 5 cm³ di alcole isobutilico; si agita per 2 minuti e si fa riposare fino a netta separazione delle due fasi; si fa scolare ora la fase acquosa e la soluzione isobutilica, rimasta nella provetta, si disidrata con la addizione di una piccola quantità (circa 1g) di Na₂SO₄ secco, agitando fino a che la soluzione diventi perfettamente limpida; si versa in una vaschetta da 0,5 cm., e si misura l'intensità della fluorescenza usando di confronto lo standard BB (0 42) (14).

La lettura deve avvenire nel più breve tempo possibile, perchè già dopo circa 30 secondi di esposizione all'irradiazione ultravioletta l'intensità di fluorescenza cala sensibilmente

Si ripete il procedimento con quantità differenti di soluzione alcalina di ferricianuro, fino ad ottenere il massimo di fluorescenza.

Nello stabilire la curva di riferimento abbiamo ritenuto opportuno ripetere la determinazione di ciascun punto 6 volte con soluzioni differenti di aneurina preparate di fresco.

Nella tabella III riportiamo i dati da noi ottenuti, media delle diverse determinazioni, e, nella fig. 3, la rappresentazione grafica di essi.

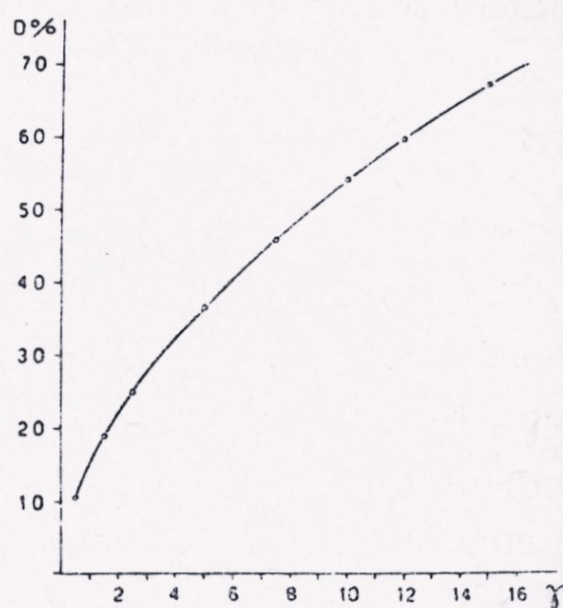


Fig. 3.

TABELLA III.

γ	D %	γ	D %
0,5	10,55	7,5	46,00
1,5	19,10	10	54,50
2,5	25,05	12	60,00
5	36,75	15	67,50

(14) E' da notare che la soluzione isobutilica di tiocromo, purchè sottratta all'azione della luce, si mantiene molto stabile, per cui una misura ritardata, anche di 24 ore, non manifesta differenze sensibili.

Ricordiamo come sia necessario accendere la lampada circa una mezz'ora prima di iniziare le misure per permettere che l'intensità di emissione luminosa si stabilizzi; abbiamo anche notato come diverse lampade possano dare differenze sensibili nelle letture; per cui per misure precise è consigliabile che ogni ricercatore stabilisca una curva di riferimento con la propria lampada oltre che col proprio standard di fluorescenza.

RIASSUNTO

Avendo rilevato nelle tecniche finora proposte per l'esecuzione del metodo del tiocromo, per la determinazione della vitamina B₁, discordanze ed inesattezze che ne rendono problematico il risultato, si sono studiate le condizioni sperimentali migliori per la condotta della reazione.

RESUMÉ

A la suite des discordances et inexactitudes que l'on a relevées dans les procédés techniques proposés jusqu'ici pour l'application de la méthode du thiochrome en vue de la détermination de la vitamine B₁, et qui en rendent les résultats tout à fait problématiques, on a étudié les conditions expérimentales les plus convenables pour la conduite de la réaction.

SUMMARY

Having realized that in the various technical procedures so far proposed for carrying out the thiochrom method for the determination of vitamin B₁ considerable discrepancies and inaccuracies are found, whereby there is no relying at all on their results. the most favourable experimental conditions have been investigated for a proper conduct of the reaction.

ZUSAMMENFASSUNG

Da in den bisher vorgeschlagenen technischen Ausarbeitungen der Thiocrommethode der Vitamin B₁ Bestimmung, Unstimmigkeiten und Ungenauigkeiten wahrgenommen wurden, die das Ergebniss unsicher machen, wurden die günstigsten experimentellen Bedingungen für den Ablauf der Reaktion erforscht.