

19. Giuseppe PRUNER --- Applicazione della ceriometria in biologia.
1. *Determinazione volumetrica della vitamina B₁.*

Riassunto. — Viene descritto un metodo volumetrico per la determinazione della vitamina B₁, particolarmente in prodotti farmaceutici, non contenenti altre sostanze riducenti.

Il metodo è basato sull'ossidazione della vitamina con ferricianuro potassico in ambiente reso alcalino con miscela di fosfati e carbonato alcalini. Il pH = 10, è tenuto appositamente basso, in considerazione di quanto venne osservato da M. PRUD'HOMME (¹⁴), nel suo lavoro sull'equilibrio tra il ferrocianuro ed il ferricianuro in ambiente alcalino.

L'ossidazione viene effettuata a caldo, tenendo immersi i campioni da esaminare per 5' in un b.m. bollente. Il ferrocianuro formatosi nella reazione viene quindi determinato per mezzo di una soluzione titolata di Ce(SO₄)₂ N/1000, indicatore l'o-fenatrolinasolfato ferroso.

Si possono determinare con buona precisione, quantità di vitamina B₁ comprese tra 20 - 100 γ. Per il calcolo si ricorre alla seguente formula:

$$B_1 = \frac{a - c}{b - c} \cdot 100$$

in cui *a* sono i cm³ di Ce(SO₄)₂ impiegati nella determinazione della B₁ nel campione in esame; *b* nella soluzione di confronto contenente γ 100 di B₁ standard; e *c* nella prova in bianco. E' sottinteso che anche i quantitativi della B₁ standard possono variare entro i limiti di sensibilità del metodo: in tal caso il valore 100 nella formula viene sostituito dai γ di vitamina contenuti nel campione di confronto.

Operando esattamente secondo la tecnica descritta nel metodo, *b* e *c* sono costanti, ed è sufficiente in tal caso conoscere il valore di *a*, per ricavare dal grafico della fig. n. 1, i γ di vitamina corrispondenti ai cm³ di solfato di cerio impiegati.

Résumé. — L'Auteur expose une méthode volumétrique pour la détermination de la Vitamine B₁, applicable particulièrement dans les produits pharmaceutiques ne contenant pas d'autres substances réduisantes.

La méthode est basée sur l'oxydation de la Vitamine par le ferricyanure potassique dans un milieu rendu alcalin par un mélange de phosphates et carbonates alcalins. Le pH = 10, est maintenu bas exprès, eu égard à ce qui a été signalé par M. PRUD'HOMME (¹⁴) dans son étude sur l'équilibre entre le ferricyanure et le ferrocyanure dans un milieu alcalin.

L'oxydation est exécutée à chaud, tenant plongés les échantillons à examiner pendant 5', dans un bain-marie bouillant. Le ferrocyanure qui se forme au cours de la réaction est ensuite déterminé au moyen d'une solution titrée de $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$ N/1000, indicateur l'o-phénantrolina-sulfate ferreux.

On peut déterminer avec une bonne précision, des quantités de Vitamine B_1 comprises entre 20-100 γ . Pour le calcul on a recours à la formule suivante :

$$\text{B}_1 = \frac{a - c}{b - c} \cdot 100$$

où a ce sont les cm^3 de $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$ employés pour la détermination de la Vitamine B_1 dans l'échantillon examiné; b dans la solution de comparaison, contenant γ 100 de B_1 standard; et c dans l'essai en blanc. Il est sous-entendu que même les quantités de B_1 standard peuvent varier dans les limites de sensibilité de la méthode. Dans ce cas, la valeur 100 dans la formule est remplacée par le γ de vitamine contenus dans l'échantillon de comparaison.

Si on opère exactement d'après la technique décrite dans la méthode, b et c sont constants, et il suffit en ce cas de connaître la valeur de a pour tirer du graphique de la fig. 1 les γ de vitamine correspondants aux cm^3 de sulfate de cérium employés.

Summary. — The report describes a volumetric method for the determination of Vitamin B_1 , especially in pharmaceutical products not containing other reducing substances.

This method is based on the oxidation of the Vitamin with potassium ferro-cyanide in a medium made alkaline carbonates. The $\text{pH} = 10$ is kept low on purpose in view of M. PRUD'HOMME'S observations ⁽¹⁴⁾ in his work on the equilibrium between ferri-cyanide and ferro-cyanide in alkaline mediums.

The oxidation is effected at high temperature as the samples are immersed for 5 minutes into boiling b. m. The ferro-cyanide formed during the reaction is then determined by means of a dosed solution of $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$ N/1000 (indicator being o-phenanthroline-ferrous sulphate).

Quantities of Vitamin B_1 ranging from 20 to 100 γ can be determined with a good degree of precision. The following formula is used for the calculation :

$$\text{B}_1 = \frac{a - c}{b - c} \cdot 100$$

a represents the cubic centimetres of $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$ used in the determination of B_1 content of the sample studied; b in the solution used for comparison and containing 100 γ of standard B_1 ; c is that of the bench tests. Naturally the quantity of standard B_1 can be varied within the limits of the sensitivity of the method, and in that case the value 100 is replaced by the number of γ of vitamin contained in the comparison sample.

If the technique of the method described is followed exactly, b and c will be constant, and in that case it will be sufficient to know the value of a in order to work out from the diagram in Fig. 1 the γ of vitamin corresponding to the number of cubic centimetres of sulphate of cerium used.

Zusammenfassung. — Es wird ein volumetrisches Verfahren zur Bestimmung von Vitamin B_1 , besonders in pharmazeutischen Produkten beschrieben die keine anderen reduzierenden Substanzen enthalten. Das Verfahren beruht auf der Oxydation des Vitamins mittels Kaliumferricyanid in einem durch eine Mischung von Phosphaten und Alkalikarbonaten alkalisierten Mittel. Das $\text{pH} = 10$ wurde absichtlich niedrig gehalten, unter Berücksichtigung der Angaben von M. PRUD'HOMME (14) über das Gleichgewicht zwischen gelben und roten Blutlaugensalz in alkalischen Mittel.

Die Oxydation wird in der Wärme ausgeführt; die zu analysierenden Proben werden während 5' in einem siedenden Wasserbade gehalten. Das Kaliumferrocyanid das sich bildet wird sodann mit einer eingestellten Lösung von $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$ N/1000 und o-Phenantrolin - Ferrosulfat als Indikator titriert. Auf diese Weise lassen sich Vitamin B_1 - Mengen von 20 - 100 γ mit zufriedenstellender Genauigkeit nachweisen. Die Berechnung erfolgt folgendermassen:

$$\text{B}_1 = \frac{a - c}{b - c} \cdot 100$$

Es bedeuten: a die cm^3 $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$ die für die Vitamin B_1 - Bestimmung des Produktes verbraucht wurden; b die cm^3 $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$ die für die Titrierung der Vergleichslösung mit γ 100 B_1 verbraucht wurden; c den Verbrauch für eine blinde Probe.

Es versteht sich von selbst dass auch die Standard B_1 - Mengen innerhalb der Empfindlichkeitsgrenzen des Verfahrens schwanken können; in diesem Falle wird der Wert 100 in der Formel durch die γ Vitamin ersetzt, die im Vergleichsmuster enthalten sind.

Wenn man die beschriebene Technik genau befolgt sind b und c konstant, und es genügt den Wert a zu kennen um aus den im Bericht angege-

benen Kurvenbild die γ Vitamin abzulesen die den verbrauchten cm^3 Cerialiumsulfat entsprechen.

A motivo della grande importanza della vitamina B_1 nel metabolismo organico, sono stati elaborati numerosi metodi per la sua determinazione.

In un primo tempo si dovette ricorrere ai metodi biologici tra i quali il più importante è quello curativo sui colombi di KINNERSLEY, PETERS e READER ⁽¹⁾ ed il metodo della bradicardia di T. W. BIRCH e L. J. HARRIS ⁽²⁾.

La conoscenza della costituzione chimica e delle proprietà dell'aneurina, opera di Windaus e collaboratori, che riuscirono di ottenerla allo stato cristallino, permise anche ai chimici di studiare dei metodi quantitativi.

Numerosi sono i metodi di carattere colorimetrico, fluorimetrico e volumetrico che da allora ad oggi vennero proposti da vari autori.

Tra i primi possono essere annoverati quello di KINNERSLEY e PETERS ⁽³⁾ di BLANCPAIN e C. MEUNIER ⁽⁴⁾; di PREBLUDA e MACCOLLUM ⁽⁵⁾; e di LODI ⁽⁶⁾. Essi si basano sulle caratteristiche colorazioni che danno diazoderivati reagendo con l'anello tiazolico dell'aneurina in ambiente alcalino, colorazioni che si lasciano estrarre facilmente da solventi.

Per difetto di sensibilità e di specificità tali metodi non hanno mai acquistato grande importanza.

Meno noti sono i metodi volumetrici, i quali come i primi si possono applicare solo su preparati di B_1 relativamente puri. Tra questi si può ricordare quello di K. H. SLOTTA e K. NEISSER ⁽⁷⁾: essi hanno trovato che l'aneurina reagisce in un rapporto stechiometrico con l'ipiodito. Tanto la reazione come la determinazione dello iodio in eccesso con iposolfito di sodio devono essere effettuate ad una temperatura non superiore a 0° .

Tra i vari metodi il metodo quasi universalmente adottato è il metodo fluorimetrico di JANSEN ⁽⁸⁾. Il metodo è basato sul fatto che la vitamina B_1 per cauta ossidazione con ferricianuro di potassio in ambiente alcalino è quantitativamente trasformata in tiocromo, il quale estratto con alcool isobutilico, dà una fluorescenza confrontabile sotto una lampada a vapori di mercurio con una serie di soluzioni di confronto ottenute per ossidazione di quantità note di aneurina. L'intensità della fluorescenza può anche essere determinata con il fotometro di Pulfrich fornito di lampada di mercurio e filtro di Wood o meglio con fluorimetri a cellula fotoelettrica, come quelli di Beckman, di Coleman, ed altri. Si tratta sempre di apparecchi costosi non alla portata di tutti i laboratori.

Dovendo spesso determinare la B_1 allo stato puro, oppure in prodotti farmaceutici, come in fiale, compresse, capsule, ecc. non contenenti altre sostanze riducenti, si è studiato un metodo volumetrico, che è risultato semplice, rapido e nel contempo preciso, e che non richiede alcuna speciale apparecchiatura.

In un precedente lavoro ⁽⁹⁾, sulla valutazione dell'attività biologica dell'insulina, si è sfruttato il potere riducente di questa, operando un'ossidazione a caldo dell'insulina mediante ferricianuro in ambiente alcalino e determinando iodometricamente l'eccesso del ferricianuro con iposolfito di sodio.

Lo stesso principio venne applicato in un primo tempo con buoni risultati alla B_1 . L'unico inconveniente del metodo, è costituito dal fatto che il ferricianuro ridotto dalla B_1 viene calcolato indirettamente, dosando per via iodometrica l'eccesso di ferricianuro rimasto in soluzione, quindi con maggior possibilità di errore.

Per ovviare a tale inconveniente, si è pensato in un secondo tempo, di determinare direttamente il ferrocianuro per mezzo di solfato di cerio, e di calcolare da quest'ultimo la B_1 presente. Di questo metodo si sono di già occupati con procedimento e tecnica diversa H. WACHSMUTH ⁽¹⁰⁾, e CARLOS A. PAYVA CARBAJAL ⁽¹¹⁾.

Il presente metodo permette di determinare con buona precisione da mg. 0,020 a 0,100 di B_1 in cm^3 2 di soluzione.

Nell'ambito di detto limite e nelle condizioni che verranno più innanzi descritte, si stabilisce una netta proporzionalità, tra la B_1 presente ed il ferricianuro ridotto, proporzionalità che del resto sussiste, come risulterà da una prossima Nota, anche nelle intensità della fluorescenza del liquido, dopo eseguita l'ossidazione a caldo.

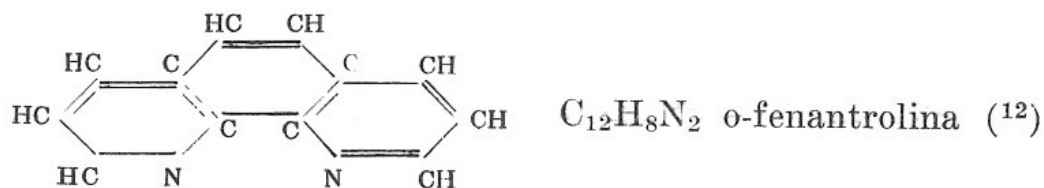
A questo punto non si ritiene inutile di inserire qualche cenno sulla ceriometria, conosciuta da molto tempo, ma in pratica però non ha trovato quella diffusione che merita per i vantaggi che offre a confronto di altri metodi volumetrici per ossidazione.

Dati precisi sulla ceriometria e sue applicazioni si possono raccogliere nei trattati di chimica analitica di L. MEDICUS ⁽¹²⁾ e di BRENNECKE ⁽¹³⁾: il secondo è corredato da numerosi riferimenti bibliografici.

Le caratteristiche principali del solfato di cerio $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$ come ossidante, si possono riassumere come segue: stabilità delle sue soluzioni anche se molto diluite p. es. N/1000. In presenza di sufficiente acido solforico le sue soluzioni possono essere mantenute per diverse ore all'ebollizione senza subire alcuna variazione. Le titolazioni si possono senz'altro eseguire in sol. acida per acido cloridrico.

La riduzione decorre normalmente, senza formazione di prodotti intermedi, come avviene p. es. per il permanganato di potassio: $Ce^{IV} \rightleftharpoons Ce^{III}$

Come già detto, l'uso dei sali di cerio in volumetria è conosciuto già da tempo, però solamente negli ultimi anni sono stati condotti degli studi sistematici sulla ceriometria, soprattutto dopo la scoperta di nuovi indicatori di ossido-riduzione, tra i quali come primo la tri-ortofenantrolina in combinazione col solfato ferroso, il cui impiego ha reso possibile di afferrare con maggior semplicità e precisione il punto di viraggio, rendendo in tal modo più accessibile la ceriometria alla pratica di laboratorio.



Lo ione ferroso forma con l'o-fenantrolina un complesso colorato intensamente in rosso della composizione $Fe(C_{12}H_8N_2)_3^{++}$. Forti ossidanti come il solfato di cerio provocano il passaggio al rispettivo complesso ferrico $Fe(C_{12}H_8N_2)_3^{+++}$ con un viraggio di colore al bleu pallido.

Mezzi riducenti producono la reazione inversa con passaggio al colore primitivo. La buona reversibilità del viraggio, la grande stabilità del complesso, fanno di questo prodotto un prezioso indicatore di ossido-riduzione, specialmente adatto per la titolazione con solfato di cerio come ossidante.

PARTE SPERIMENTALE.

Reagenti e soluzioni occorrenti.

- | | |
|--|-------------------|
| 1) Soluzione di solfato di cerio | N/500 |
| 2) Soluzione di $K_4 [Fe (CN)_6]$ | N/500 |
| 3) Soluzione di $K_3 [Fe (CN)_6]$ | 3/00 |
| 4) $Na_2HPO_{4.12}H_2O$ | g 1,665 |
| KH_2PO_4 | g 0,283 |
| H_2O dist. | q.b. a cm^3 100 |
| 5) Na_2CO_3 secco | g 0,857 |
| H_2O dist. | q.b. a cm^3 100 |
| 6) Cloridrato di o-fenantrolina | |
| Solfato ferroso | |
| 7) Soluzione standard di vitamina B_1 in HCL | |
| N/100 mg 5 %, | |

— La soluzione n. 1 si prepara, pesando approssimativamente g 0,82 di $Ce(SO_4).4H_2O$ (contenuto circa 98%), sciogliendo il sale in cm^3 500 di

acqua distillata, alla quale sono stati aggiunti cm^3 28 di H_2SO_4 conc., e portando la soluzione ad un litro.

Questa soluzione si mantiene a lungo inalterata e serve per la preparazione all'occorrenza della sol. N/1000 che si prepara dalla prima, aggiungendo a cm^3 500 cm^3 14 di H_2SO_4 conc. e portando con acqua ad un litro.

— Per la titolazione della sol. N/500 di solfato di cerio serve la sol. di $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ dello stesso titolo, che prepara sciogliendo g 0,7366 accuratamente pesati, del sale anidro, oppure g 0,8447 del sale idrato, contenente 3 H_2O , in acqua e portando ad un litro in un pallone tarato. La soluzione si conserva bene in vetro scuro ed al riparo dalla luce. E' consigliabile però di rinnovarla ogni mese.

— La soluzione dell'indicatore (ferroina), 0,025 M, si prepara sciogliendo g 0,406 di clorid. di o-fenantrolina e g 0,695 di solfato ferroso crist. in cm^3 25 di acqua dist.

Di questa sol. madre si preleva 1 cm^3 e si porta con acqua a mc^3 20. Quest'ultima sol. conservata in un flacone contagocce serve per il dosaggio.

— La soluzione della vitamina B_1 standard si prepara, sciogliendo, dopo aver lasciato essiccare la sostanza pura, per 24 ore su anidride fosforica, mg 5 esattamente pesati con microbilancia, in HCL N/100 e conservando la soluzione in frigorifero ad una temperatura non superiore ai 5° .

DESCRIZIONE DEL METODO.

Come esempio, supponiamo di voler determinare la B_1 in due tipi di fiale da 2 cm^3 , contenenti mg 1, rispettivamente mg 2 di vitamina B_1 .

Essendo i quantitativi troppo elevati, se ne deve prelevare una porzione aliquota. A tale scopo si prendono 2 palloncini tarati da 50 cm^3 , si introducono in ciascuno 2 cm^3 di ciascun tipo di fiale e si porta a segno con HCL N/100.

Preparate così le due diluizioni, si misurano 2 cm^3 di ciascuna in altrettanti tubetti di vetro bianco di Jena o Pyrex da mm 95 per 6 circa, forniti di tappo a smeriglio. In un terzo tubo si misurano 2 cm^3 della soluzione standard di vitamina B_1 . Un quarto tubetto infine contenente 2 cm^3 di HCL N/100 serve per la prova in bianco.

La vitamina B_1 da determinare nei tre tubetti è quindi di mg 0,040, 0,080 e 0,100. Allestiti così i quattro tubetti si introduce in ciascuno, per mezzo di una semimicroburetta da 10 cm^3 , 1 cm^3 della soluzione n. 3 di $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ e 2 cm^3 della soluzione n. 4 e 5, preparata mescolando assieme parti uguali delle due soluz. Coperto ogni tubetto con una bollicina

di vetro (tipo Kjeldahl) per evitare l'evaporazione, si immergono i 4 tubetti per mezzo di un sostegno metallico, in un b. m. bollente, e vi si lasciano per 5', tempo necessario per ultimare l'ossidazione della vitamina B₁. Si è stabilito questo tempo come optimum, dopo precedenti prove condotte sia a freddo come a caldo per un tempo che va da 1' a 60'. Si è potuto constatare che per un riscaldamento più prolungato non si verifica una sensibile variazione nel quantitativo di K₃[Fe(CN)₆] ridotto.

E' importante che l'ebollizione sia regolare e continua, in modo che tutti i tubetti si trovino nelle stesse condizioni e che la durata dell'ebollizione sia sempre la stessa.

Trascorsi i 5', si toglie il sostegno con i 4 tubetti dal b.m. e si immerge in un recipiente contenente acqua fredda e vi si lasciano per 30'.

Nel frattempo si può controllare il titolo della soluzione di solfato di cerio N/500. A tale scopo servono utilmente 2 semimicroburette da 10 cm³. Nei soliti tubetti da mm 95 per 6, in due o tre, si misurano cm³ 6 di ferro-cianuro N/500, si acidifica con HCL cm³ 1, preparato con cm³ 80 di HCL conc. e 20 cm³ di acqua, e si titola con soluz. di Ce(SO₄)₂ N/500, dopo aver aggiunto ad ogni tubetto 2 gocce di ferroina. Il punto esatto è raggiunto, quando l'indicatore vira da rosso arancio a verde giallo.

E' da notare che le titolazioni con solfato di cerio devono essere condotte in ambiente fortemente acido, altrimenti si formano dei sali basici di cerio, difficilmente solubili.

Fissato il titolo della soluzione di Ce(SO₄)₂ N/500, si porta a N/1000 come sopra descritto.

Tolti ora i quattro tubetti dall'acqua, si introduce in ognuno cm³ 1 di HCL e 2 gocce di indicatore, come per la titolazione della soluz. di Ce(SO₄)₂, usando per la titolazione al posto della semimicroburetta una microburetta.

Per il calcolo della vitamina B₁ presente in uno dei due campioni in esame, basta conoscere i seguenti tre valori : a : i cm³ di Ce(SO₄)₂ impiegati per la determinazione della vitamina B₁ nel campione in esame, b : della vitamina standard, e c : della prova in bianco. Si può quindi calcolare la vitamina B₁ dalla seguente formula:

$$B_1 = \frac{a - c}{b - c} \cdot 100$$

Operando esattamente secondo la tecnica descritta, ed avendo cura soprattutto di filtrare bene tutte le soluzioni, preferibilmente attraverso imbuti con setto di vetro poroso, b diventa una costante e corrisponde, come è emerso da una lunga serie di esperimenti a cm³ 1,330 di Ce(SO₄)₂. In

tal caso si potrebbe ricavare direttamente dal seguente diagramma della fig. n. 1 la vitamina B₁ corrispondente al Ce(SO₄)₂ impiegato nella titolazione.

Nella seguente tabella I, in prima colonna si trovano segnati i cm³ di Ce(SO₄)₂ N/1000, corrispondenti ai γ di vitamina B₁ raccolti in terza co-

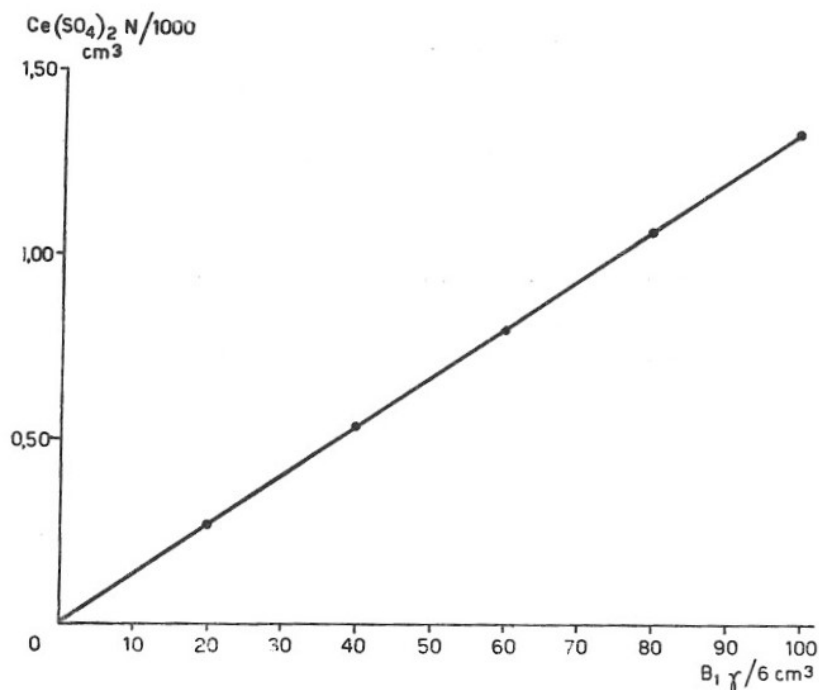


Fig. 1.

lonna. Nella seconda colonna i mg. di K₃[Fe(CN)₆] ridotti dalla vitamina B₁, ed in quarta colonna gli equivalenti di ossidazione.

Tabella I.

Ce (SO ₄) ₂ N/1000 cm ₃	K ₃ [Fe (CN) ₆] mg	Vitamina B ₁ γ	Equivalenti di ossidazione
1,330	0,438	100	4,50
1,197	0,394	90	4,05
1,064	0,350	80	3,05
0,931	0,307	70	3,15
0,665	0,219	50	2,25
0,532	0,175	40	1,80
0,399	0,131	30	1,35
0,266	0,0876	20	0,90

E' da notare che dai quantitativi di Ce(SO₄)₂ sono stati detratti cm³. 0,249, corrispondenti alla prova in bianco.

Dalla tabella si desume che una molecola di vitamina viene ossidata da 4,5 molecole di ferricianuro, anzichè da 2 sole molecole, come risulterebbe dalle reazioni proposte da vari autori che si sono occupati dell'argomento, i quali però operano in condizioni ben diverse.

Sul significato di tale nuovo risultato si conta di tornare quanto prima.

PROVE DI CONTROLLO.

A tale scopo si prepara una serie di tubetti, contenenti quantitativi noti di vitamina B₁ standard da 20 a 100 γ che si misurano servendosi di una microburetta e portando il volume a cm³ 2 con HCL N/100. Un tubo contenente cm³ 2 di HCL N/100 serve per la prova in bianco. Si procede quindi nel modo descritto più sopra.

I risultati medi di una serie di esperimenti sono raccolti nella tabella II, dove figurano per ogni quantitativo di B₁ misurato i rispettivi dati ottenuti. Il calcolo venne per ogni dosaggio eseguito secondo la formula nota, prendendo come base di confronto i cm³ di Ce(SO₄)₂ impiegati per la titolazione di γ 100 di vitamina B₁.

Dovendo determinare la vitamina B₁ in compresse o capsule, si ricorre all'estrazione della stessa mediante HCL N/100 a freddo, si porta poi l'estratto acquoso a volume, e si preleva una quantità di soluzione corrispondente a mg 0,02 ÷ 0,10 di vitamina.

Volendo anche fare una prova di identità della vitamina B₁, basta neutralizzare il campione acido con NaOH, dopo aver eseguita la determinazione, ed estrarre il tiocromo con alcool isobutilico, ed esaminare la fluorescenza ad una lampada a vapori di mercurio. In tal caso la fluorescenza non è esattamente proporzionale alla quantità di vitamina B₁ presente.

La determinazione della B₁ in presenza di sostanze riducenti che non permettono l'impiego del presente metodo ed in casi in cui si vuole deter-

Tabella II.

γ di vitamina B ₁		Differenze	
Misurati	Trovati	Assolute	o/o
100	100	—	—
90	88,31	— 1,69	— 1,87
80	78,25	— 1,75	— 2,18
70	69,80	— 0,20	— 0,29
60	60,96	+ 0,96	+ 1,60
50	50,92	+ 0,92	+ 1,84
40	39,16	— 0,84	— 2,10
20	20,40	+ 0,40	+ 2,00

minare la vitamina in quantità inferiori ai 20 γ si potrà ricorrere al metodo fluorimetrico, che verrà descritto in una successiva nota, e che rappresenta una modifica al metodo di Jansen al tiocromo, avendo come principio l'ossidazione a caldo della vitamina B₁ come testè descritto.

Roma - Istituto Superiore di Sanità - Laboratorio di Biologia.

BIBLIOGRAFIA

- (1) PETERS e READER: Biochem. - J., 19, 820 (1928).
 - (2) T. W. BIRCH e L. J. HARRIS: Biochem. - J., 28, 602 (1934).
 - (3) KINNERSLEY e PETERS: Biochem. - J., 667 (1934); 32, 1516 (1932); Zschr. anal. Chem., 102, 147 (1935).
 - (4) BLANCPAIN e C. MEUNIER: Bull. soc. chim. biol. - 21, 649 (1939).
 - (5) PREBLUDA e MACCOLLUM: J. biol. chem. - 127, 495 (1939).
 - (6) LODI: La Chimica e l'Industria. - 27, 80 (1945).
 - (7) K. H. SLOTTA e K. NEISSER: Ber. D. Chem. Ges. - 71, 1984 (1938).
 - (8) B. C. P. JANSEN: Rec. Trav. chim. Pays-Bas. - 55, 1046 (1936).
 - (9) G. PRUNER: Rend. Istituto Sup. Sanità. - 13, 127 (1950).
 - (10) H. WACHSMUTH: Bull. Soc. chim. Belg. - 56, 261 (1947).
 - (11) CARLOS A. PAYVA CARBAJAL: Bol. soc. quim. Peru. - 8, 105, 19 (1942).
 - (12) LUDWIG MEDICUS: Massanalyse. - Verlag Steinkopff 1942.
 - (13) E. BRENECKE: Die chemische Analyse. - 33, 21 (1935).
 - (14) MAURICE PRUD'HOMME: C. II, 1320, 21 (1903).
-