

11. A. MARIANI e Concetta VICARI. — Separazione cromatografica degli alfa, beta, gamma e delta tocoferoli. (*)

Riassunto. — Per mezzo della reazione di copulazione con orto dianisidina diazotata, in ambiente alcalino sono stati isolati da un concentrato naturale i non alfa tocoferoli sotto forma di coloranti rossi che sono stati frazionati mediante cromatografia su colonna di allumina.

Si è potuto provare, variando l'alcalinità del mezzo, che la copulazione non avviene a pH inferiore ad 8 e che a pH = 11 anche il beta tocoferolo, contrariamente a quanto viene riportato in letteratura, ha la capacità di copularsi con l'ammina aromatica diazotata.

Résumé. — Par la reaction de copulation avec orto dianisidine diazotée, on a isolé d'un concentré naturel, en milieu alcalin, les non alpha tocophéroles sous forme de colorants rouges qui ont été fractionnés par chromatographie sur colonne d'allumine.

On a pu démontrer que, variant l'alcalinité du moyen, la copulation ne s'effectue pas si le pH est inférieur à 8 et que si on a le pH = 11 même le bêta tocophérole, contrairement à ce que la littérature dit, a la capacité de se copuler avec l'ammine aromatique diazotée.

Summary. — By means of the coupling reaction with diazotated ortho-dianisidine, under alkaline conditions, the non alpha tocopherols have been isolated from a natural concentrate in the form of red dyes which were fractionated chromatographically on an allumina column.

It has been possible to show, by varying the degree of alkalinity, that the coupling does not take place at a pH less than 8 and that at pH 11 also beta tocopherol, in contrast to what the literature reports, has the capacity of coupling with the diazotated aromatic amine.

Zusammenfassung. — Die nicht alfa Tokopherole konnten aus einem natürlichen Konzentrat durch Kopulation mit orto Diazodianisidin in alkalischer Lösung als rote Farbstoffe vom alfa Tokopherol getrennt werden; diese Farbstoffe wurden dann durch Chromatographie auf Aluminiumoxydsäule fraktioniert.

Das pH der Lösung ändernd konnte bewiesen werden, dass die

(*) Comunicazione alla Riunione della Commissione delle Specialità e dei Direttori di Laboratori di Controllo della F.I.P. - Berna, settembre 1957.

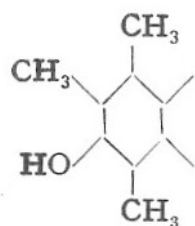
Kopulation nicht unter pH 8 stattfindet und, dass, im Widerspruch mit den Anführungen der Literatur, bei pH 11 auch das beta Tokopherol sich mit dem aromatischen Diazoamin zu kopulieren im stande ist.

In molti prodotti farmaceutici la vitamina E non viene messa come alfa tocoferolo sintetico, ma come concentrato naturale di tocoferoli liberi e ciò è dovuto al fatto che, specie nelle preparazioni che contengono anche altre vitamine liposolubili a facile ossidabilità, come la vitamina A, l'aggiunta di questi concentrati ha un effetto protettivo di molto superiore che non il prodotto sintetico costituito solamente dall'alfa tocoferolo.

Poichè tutti i tocoferoli si comportano ugualmente con il reattivo di Emmerie (mescolanza di cloruro ferrico ed alfa-alfa' dipiridile) cioè esplicano tutti l'azione riducente sul cloruro ferrico, è ovvio che determinando la vitamina E per via colorimetrica in tale modo si hanno valori che corrispondono alla totalità dei tocoferoli i quali, come è noto, hanno una attività biologica molto differente. E' vero che i tocoferoli mostrano rispetto al cloruro ferrico una differente velocità di ossidazione, ma i metodi basati su questa proprietà non possono essere sicuri specie se le miscele sono formate da più di due componenti.

La separazione dei vari tocoferoli è stata tentata in vari modi e uno dei più interessanti è quello basato sulla cromatografia con carta impregnata di vaselina impiegando come fase mobile l'alcool etilico al 70%; con tale metodo è possibile separare l'alfa e il delta, mentre non viene risolta la mescolanza di beta e gamma.

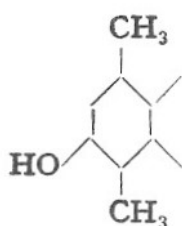
Se noi osserviamo le formule di struttura dei vari tocoferoli vediamo che essi differiscono per la posizione e il numero dei gruppi —CH_3 nell'anello benzenico e precisamente:



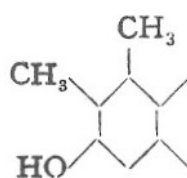
α

alfa = 3-7-8 trimetil

beta = 3-8 dimetil



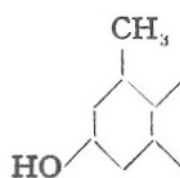
β



γ

gamma = 7-8 dimetil

delta = 8 monometil



δ

E' logico quindi pensare, per ottenere una separazione dell'alfa dagli altri tocoferoli, servirsi di quelle reazioni che siano capaci di differenziare i due gruppi di sostanze per il fatto che solo l'alfa ha tutte le posizioni dell'anello benzenico sostituite mentre gli altri hanno delle posizioni libere.

Due sono i tipi di reazioni che si basano su questo fatto: la prima per mezzo dei nitroso derivati e la seconda per mezzo di copulazione con un diazoderivato di una ammina aromatica. Nella formazione dei nitroso derivati, consigliata dal QUAIFFE ⁽¹⁾, la mescolanza dei tocoferoli in soluzione alcoolica, acidificata con acido acetico, viene trattata con nitrito sodico e, dopo, alcalinizzata con idrato potassico. Si formano in queste condizioni i nitroso derivati del beta, gamma e delta tocoferolo intensamente colorati in giallo; non reagisce il solo alfa.

Più sensibile è la reazione di copulazione con diazoderivati. Il QUAIFFE stesso ⁽²⁾ trovò che il gamma tocoferolo si copula con p.nitroanilina diazotata dando un colore rosso con massimo di assorbimento a 530 mμ, mentre l'alfa tocoferolo non si copula. Nelle condizioni in cui fece avvenire la reazione (soluzione acquoso-alcoolica a pH di circa 6) il beta tocoferolo non si copula quasi affatto.

Successivamente WEISLER ⁽³⁾ e coll. proposero di sostituire la p.nitroanilina diazotata con l'orto dianisidina diazotata ed usarono questo reattivo, proposto da TALBOT e coll. ⁽⁴⁾ per la determinazione dell'estro-ne, nella determinazione del gamma e delta tocoferolo. Essi si interessarono soltanto del gamma e del delta tocoferolo e, facendo avvenire la copulazione a due differenti alcalinità con carbonato sodico e con idrato potassico, hanno elaborato un metodo per la determinazione colorimetrica di questi due tocoferoli in miscela, determinando poi sempre la somma totale dei tocoferoli con la reazione di riduzione del cloruro ferrico. Sul comportamento del beta tocoferolo, in letteratura si trova sempre citato che esso non si copula nè con l'orto dianisidina nè con la p. nitro anilina diazotate; e ciò è dovuto al fatto che tutti si sono basati sulle prime osservazioni fatte dal QUAIFFE, il quale però ha operato a pH di circa 6.

Le nostre esperienze per la separazione dei vari tocoferoli eseguite su di un concentrato naturale proveniente da distillazione molecolare di olio di germi di grano sono iniziate con prove cromatografiche a fasi invertite. E' stato sottoposto un concentrato il cui titolo in tocoferoli totali, determinato con il metodo colorimetrico classico al cloruro ferrico ed alfa alfa' dipiridile era di circa il 65%, a cromatografia ascendente su carta impregnata con vaselina; come fase mobile è stato impiegato alcool al 70%. Per la rivelazione dei vari tocoferoli, dopo cromatografia, è stata

impiegata una soluzione alcoolica 0,25% di alfa alfa'dipiridile seguita da una soluzione alcoolica 0,1% di cloruro ferrico per la rivelazione di tutti i tocoferoli; l'orto dianisidina diazotata seguita da soluzione di carbonato sodico per la rivelazione dei non alfa tocoferoli.

I risultati ottenuti sono stati i seguenti:

— l'alfa tocoferolo si muove poco dal punto di partenza, viene rivelato bene con il dipiridile e cloruro ferrico, non dà alcuna reazione con l'orto dianisidina in soluzione alcalina;

— il beta ed il gamma tocoferolo si separano sotto forma di una unica macchia allungata che si sposta maggiormente durante la cromatografia, vengono rivelati bene sia con cloruro ferrico e dipiridile come con la orto dianisidina diazotata in ambiente alcalino;

— il delta tocoferolo è quello che si sposta più di tutti, si separa bene sotto forma di piccola macchia ben raccolta che si rivela lentamente con cloruro ferrico e dipiridile, mentre si rivela subito con l'orto dianisidina diazotata.

Nelle prove di cromatografia molta attenzione va posta alla gradazione dell'alcool impiegato come fase mobile in quanto anche piccole variazioni si fanno risentire per la separazione dei vari tocoferoli.

Il fatto di aver notato in tutte le prove cromatografiche effettuate una macchia allungata al posto del beta + gamma tocoferolo, macchia che viene ugualmente rivelata nella stessa forma sia con il cloruro ferrico e dipiridile che con l'orto dianisidina diazotata, ci ha fatto pensare che in condizioni di così forte alcalinità anche il beta tocoferolo si potesse copulare con il diazocomposto. Per appurare questo fatto si è passato a prove cromatografiche su colonna dei coloranti ottenuti per copulazione dello stesso concentrato con l'orto dianisidina diazotata. La tecnica è stata la seguente:

Un campione contenente alcuni mg di non alfa tocoferoli (nel nostro caso abbiamo lavorato con due gocce del concentrato di olio di germi di grano) sono stati sciolti in 3 cm³ di alcool assoluto in un cilindro da 50 cm³ con tappo a smeriglio, vi sono stati aggiunti 7,5 cm³ di carbonato sodico al 2%, quindi 1 cm³ di orto dianisidina diazotata. Si è agitato e si è lasciato 5' a temperatura ambiente, quindi si è aggiunto g 0,5 di solfato sodico anidro e si è estratto il colorante per sbattimento con etere di petrolio (p.e. 40-70°). Si è raccolto l'etere di petrolio in un separatore dove sono state aggiunte le successive porzioni fino a che tutto il colorante era stato portato in soluzione. La fase petroleterea è stata lavata con acqua per togliere tutte le tracce di alcool e quindi disidratata con solfato sodico. Su questo estratto in etere di petrolio contenente i colo-

ranti formati per copulazione dei vari non alfa tocoferoli sono state condotte prove di separazione cromatografica su colonna. E' stata impiegata una comune colonna per cromatografia del diametro di 14 mm e di 20 cm di lunghezza riempita con g 12 di allumina Brockman attivata prima in muffola a 500° e portata poi al 6% di umidità (corrispondente quindi al III° di attivazione).

L'estratto, concentrato per evaporazione è stato fatto assorbire sulla colonna di allumina che è stata poi lavata con varie frazioni di etere di petrolio. Si formano, in queste condizioni, due anelli, uno azzurro che rimane fermo al punto di partenza ed uno bruno che con il lavaggio con etere di petrolio si muove lentamente, lasciando dietro di sé un altro sottile anello dello stesso colore.

Quando il primo anello è stato completamente raccolto nell'eluato, la colonna è stata lavata con etere di petrolio contenente l'1% di etere etilico con il quale è stato raccolto nell'eluato il secondo anello. Per eluire il terzo anello si è dovuto aumentare il contenuto in etere etilico fino al 20%. Si è raccolta così nell'eluato l'ultima frazione di colore più violaceo. Le tre frazioni ottenute, evaporate e riprese con etere di petrolio, sono state sottoposte ad analisi spettrofotometrica nel campo dai 320 ai 600 mμ. Le tre curve sono riportate in grafico (fig. 1) in modo da renderle indipendenti dalla concentrazione (sulle ordinate $\frac{E\lambda}{E_{\max}}$). I due primi anelli rosso bruni hanno praticamente la stessa curva di assorbimento con due massimi a 387 e 500 mμ, mentre il terzo, violaceo, ha i due massimi spostati di alcuni mμ verso le lunghezze d'onda maggiori e precisamente a 405 e 530 mμ. Poichè anche nelle prove di cromatografia su carta il delta tocoferolo si rivelava con orto dianisidina diazotata sotto forma di macchia violacea nettamente differente da quella rosso bruna del beta e gamma tocoferolo, dato che il concentrato naturale, proveniente dall'olio di germi di grano conteneva in maggiore quantità il gamma tocoferolo è logico ammettere che nella cromatografia su allumina l'anello più mobile sia appunto costituito dal colorante proveniente dal gamma tocoferolo, seguito dal beta tocoferolo, mentre l'ultimo anello dovrà essere costituito dal colorante proveniente dal delta tocoferolo. Ciò è anche dimostrato dalle caratteristiche spettrofotometriche rilevate praticamente uguali per il beta e per il gamma tocoferolo (che hanno la sola differenza di struttura nella posizione dei due —CH₃ nell'anello benzenico) mentre la differenza è più notevole per il delta tocoferolo che ha nello stesso anello un unico —CH₃.

Dalle prove effettuate risulta chiaro che anche il beta tocoferolo, nelle condizioni di alcalinità in cui si è lavorato, è capace di copularsi

con l'orto dianisidina diazotata; ciò sembrerebbe in contrasto con le affermazioni di molti autori i quali riportano che il beta tocoferolo non ha questa capacità. Con molta probabilità le loro affermazioni sono basate sulla prima osservazione fatta dal QUARF il quale però condusse le sue esperienze ad un pH di circa 6.

Per confermare questo asserto, abbiamo provato a condurre la copulazione del concentrato naturale con orto dianisidina a vari pH, e pre-

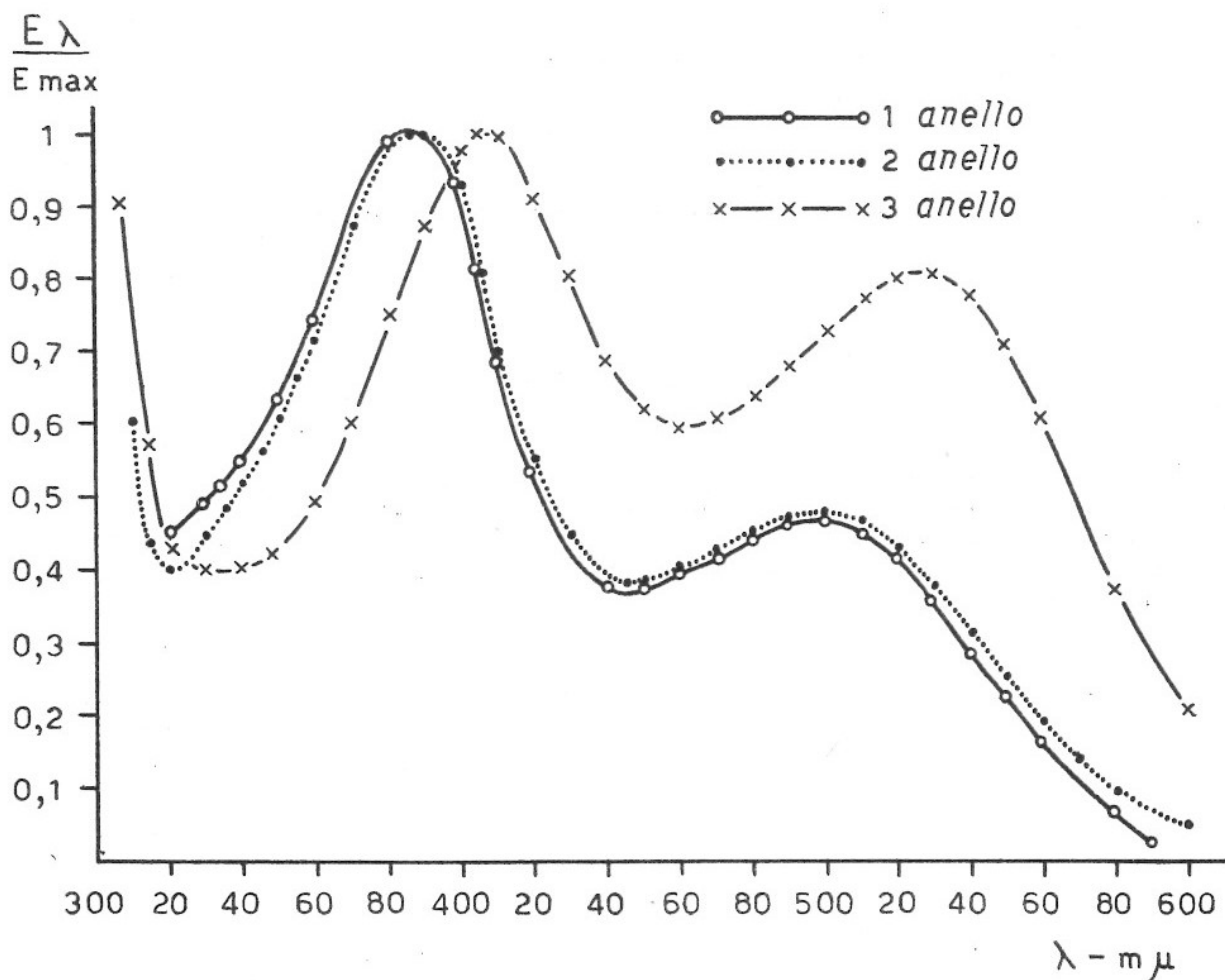


Fig. 1. - Curve di assorbimento dei prodotti colorati ottenuti dai vari tocoferoli.

cisamente: 6; 7; 7,5; 8; 9 dato che le nostre prove erano state fatte in ambiente di carbonato sodico (pH di circa 11). Abbiamo così potuto notare che la copulazione non avviene a pH inferiore di 8. Facendo avvenire la copulazione a pH 8 e 9 i coloranti ottenuti, separati per cromatografia su allumina, hanno mostrato che mentre il primo anello, corrispondente al gamma tocoferolo, rimane quasi invariato, sia il secondo che il terzo anello sono appena percettibili. Ciò prova che l'alcalinità del mezzo ha una differente influenza sulla capacità di copulazione dei vari tocoferoli

e che, conducendo la copulazione in ambiente fortemente alcalino non soltanto il gamma e il delta ma anche il beta tocoferolo ha la capacità di copularsi con l'orto dianisidina diazotata.

Le osservazioni rilevate nel condurre le prove cromatografiche permettono di chiarire un punto non ancora ben delucidato sul comportamento dei non alfa tocoferoli, mentre il metodo da noi descritto permette di rilevare, in particolare nelle specialità medicinali contenenti la vitamina E, se esse contengono, oltre che l'alfa tocoferolo, anche altre forme ad attività biologica quasi nulla ma capaci di falsare i risultati analitici ottenuti con il classico metodo colorimetrico al cloruro ferrico e di piridile.

Roma — Istituto Superiore di Sanità - Laboratorio di Biologia.

BIBLIOGRAFIA

- (¹) QUAIFE MARY LOUISE - J. Biol. Chem., 175: 605 (1948).
 - (²) QUAIFE MARY LOUISE - J. Am. Chem. Soc., 66: 308 (1944).
 - (³) WEISLER L., ROBESON C. D., BAXTER J. G. - Anal. Chem., 19: 906 (1947).
 - (⁴) TALBOT N. B., WOLFE J. K., MACLACHLAN E. A., KARÚSH F., BUTLER A. M. - J. Biol. Chem., 134: 319 (1940).
-