

70. Guido CAVINA. — Comportamento colorimetrico della vitamina A con soluzioni diluite di tricloruro di antimonio. Una nuova reazione per la vitamina A (*).

Riassunto. — Nella presente Nota è stato preso in esame il comportamento di soluzioni di tricloruro d'antimonio in cloroformio alle concentrazioni del 10-8-6-4-2-1-0,4%, con il 2% di cloruro di acetile, riportando gli spettri d'assorbimento delle colorazioni ottenute. Si è osservato che dopo l'iniziale colorazione blu, compare dopo 2 minuti una colorazione rosso-viola, con massimo d'assorbimento a 550 m μ , ottenibile, nelle condizioni più favorevoli, soltanto con le concentrazioni del 0,4 ed 1% in tricloruro d'antimonio. Tale colorazione è analoga a quella ottenibile nella reazione fra vitamina A e dicloridrina glicerica attivata; il medesimo comportamento si ottiene con reattivi preparati per distillazione di soluzioni al 20% di tricloruro d'antimonio ed al 2% di cloruro d'acetile in cloroformio e cloruro di etilene. E' stato possibile dimostrare che la colorazione rosso-viola è dovuta esclusivamente al tricloruro d'antimonio e non al pentacloruro d'antimonio, il quale è presente in piccole quantità nel tricloruro, come impurezza. La differenza di comportamento fra le soluzioni diluite di tricloruro e di pentacloruro d'antimonio risulta anche nelle reazioni con il β -carotene e con la vitamina D₂.

Oltre al cloroformio, altri solventi come dicloroetano, tetracloroetano, pentacloroetano, tetracloruro di carbonio, cloridrina del glicole, glicerolo α -monocloridrina ed in misura molto minore, esano e pentano, permettono di ottenere un analogo comportamento con la vitamina A, quando vengono impiegati come solventi per il tricloruro d'antimonio.

Si descrive un metodo di analisi per la vitamina A, semplice ed accurato, basato sulla reazione descritta.

Résumé. — Dans cette Note, on a examiné le comportement de solutions de trichlorure d'antimoine en chloroforme aux concentrations 10-8-6-4-2-1-0,4%, avec le 2% de chlorure d'acétyle, en rapportant les spectres d'absorption des colorations obtenues. On a observé qu'après la coloration bleu initiale, paraît une coloration rouge-violette après deux minutes, avec un maximum d'absorption à 550 m μ , que l'on obtient seulement, dans les conditions les plus favorables, avec les concentrations de 0,4 et 1% de trichlorure d'antimoine. Cette coloration est la même que l'on obtient dans la réaction entre la vitamine A

(*) Comunicazione presentata al III Congresso Internazionale di Biochimica - Bruxelles, 4-6 agosto 1955.

et la dichlorhydrine glycérique activée; on obtient le même comportement avec des réactifs préparés par distillation de solutions au 20% de trichlorure d'antimoine et au 2% de chlorure d'acétyle dans le chloroforme et le chlorure d'éthylène. On a pu démontrer que la coloration rouge-violette est due exclusivement au trichlorure d'antimoine et non pas au pentachlorure d'antimoine, qui est présent en petite quantité dans le trichlorure, comme impureté. Les différences de comportement entre les solutions diluées de trichlorure et de pentachlorure d'antimoine se manifestent aussi dans les réactions avec le β -carotène et avec la vitamine D₂.

D'autres solvants que le chloroforme, comme le dichloroéthane, le tetrachloroéthane, le pentachloroéthane, le tetrachlorure de carbone, la dichlorhydrine du glycole, le glycérol- α -monochlorhydrine, et dans une mesure inférieure, l'exane et le pentane, permettent d'obtenir un comportement analogue avec la vitamine A, quand ils sont employés comme solvants du trichlorure d'antimoine.

On décrit une méthode d'analyse pour la vitamine A, simple et soignée, basée sur la réaction décrite.

Summary. — In the present Note the behaviour of Antimonic Trichloride solutions in chloroform has been investigated, using salt concentrations of 10-8-6-4-2-1-0,4%, with addition of 2% acetyl chloride. The absorption spectra of obtained colours are reported. It has been observed that after the well known blue colour, a red-violet colour appears after 2 minutes, with an absorbance maximum at 530 m μ . The best concentrations for the reaction is 0,4 and 1,0% of Antimonic Trichloride. The colour is the same as that for vitamin A treated with glycerol dichlorohydrin. The same behaviour can be obtained with the distillation of solutions of 20% acetyl chloride, with chloroform or ethylene dichloride as solvents, using the distilled liquids as reagents.

It has been possible to demonstrate that the red-violet colour is obtained exclusively with Antimonic Trichloride and not with Antimonic Pentachloride, which is always present in traces in the Antimonic Trichloride.

The differences in behaviour between the diluted solutions of Antimonic Trichloride and Antimonic Pentachloride are shown also in the reactions with β -carotene and vitamin D₂.

Apart from chloroform other solvents as dichloroethane, tetrachloroethane, pentachloroethane, carbon tetrachloride, glycol chlorohydrin, glycerol α -monochlorohydrin and, in much less extent, hexane and pentane, show the same behaviour with vitamin A, when used as solvents of Antimonic Trichloride.

A simple and accurate method for analysis of vitamin A is described, which is based on the forementioned reaction.

Zusammenfassung. — Die vorliegende Arbeit befasst sich mit dem Verhalten von Lösungen von Antimon-Trichlorid in Chloroform in Konzentrationen von 10%-8%-6%-4%-2%-1%-0,4%, mit 2% Acetylchlorid, wobei die Absorptionsspektren der erhaltenen Färbungen mitgeteilt werden. Es wurde beobachtet, dass nach anfänglicher Blaufärbung nach 2 Minuten eine rot-violette Färbung mit dem Absorptionsmaximum bei 550 m μ auftritt, das unter günstigsten Bedingungen nur mit Konzentrationen von 0,4 und 1% in Antimon-Trichlorid erzielt werden kann. Die Verfärbung ist derjenigen gleich, die bei der Reaktion von Vitamin A mit aktiviertem Glycerin-Dichlorhydrin erzielt wird. Das gleiche Verhalten wird mit Reaktiven erzielt, die für die Destillierung von Lösungen von 20% Antimon-Trichlorid und 2% Acetylchlorid in Chloroform und Aethylenchlorid hergestellt wurden. Es war möglich, nachzuweisen, dass die rot-violette Färbung ausschliesslich auf das Antimon-Trichlorid und nicht auf das Antimon-Pentachlorid zurückzuführen war, das als Unreinheit in kleinen Mengen im Trichlorid vorhanden war. Das unterschiedliche Verhalten der verdünnten Antimon-Trichlorid- und Antimon-Pentachloridlösungen zeigt sich auch bei den Reaktionen mit β -Carotin und Vitamin D₂.

Ausser dem Chloroform gestatten auch andere Lösemittel wie Dichloräthan, Tetrachloräthan, Pentachloräthan, Kohlenstoff-Tetrachlorid, Glykolchlorhydrin, Glycerol, α -Monochlorhydrin und in geringerem Masse auch Hexan und Pentan, ein gleiches Verhalten mit Vitamin A zu erzielen, wenn sie als Lösungsmittel für Antimon-Trichlorid eingesetzt werden.

Beschrieben wird ein einfaches und genaues Verfahren für die Analyse von Vitamin A, das sich auf die beschriebene Reaktion gründet.

E' noto da tempo il comportamento della vitamina A con soluzioni di tricloruro di antimonio in cloroformio alla concentrazione del 20%: tale reazione, nota col nome di reazione di CARR e PRICE (¹), è dovuta, secondo quanto recentemente è stato reso noto su questo argomento (^{2 a 4}) alla formazione di un sistema mesomero di idrocarburi polienici, con 5 doppi legami coniugati, il quale presenta due bande nello spettro d'assorbimento, una principale a 600-620 m μ ed una secondaria a 572-583 m μ , manifestando quindi una intensa colorazione blu. Questa reazione è stata estesamente applicata, nonostante presenti alcuni inconvenienti, tra i

quali, i principali, sono: la notevole instabilità nel tempo della colorazione e sensibili interferenze da parte di fattori estranei, come umidità, tracce di solventi ossidrilati ecc.; allo scopo di migliorare l'andamento della reazione molte sono state le modifiche proposte, come il seguire l'andamento dell'estinzione nel tempo (^{5 e 6}), le aggiunte di cloruro di acetile o di anidride acetica alla soluzione cloroformica per evitare l'interferenza dell'umidità (^{7 a 9}) ed altre, per quanto nessuna delle modifiche proposte abbia dato risultati di sostanziale importanza.

Recentemente J. BRÜGGEMAN, W. KRAUSS e J. TIEWS (^{10 e 11}) hanno potuto dimostrare che il pentacloruro di antimonio è particolarmente attivo nella reazione con la vitamina A: la reazione è bimolecolare, per cui le quantità di reattivo da impiegare sono molto limitate; in pratica, l'eccesso di reattivo usato corrisponde a 80-800 volte circa la quantità di vitamina A in molecole (circa 2,4 mg in peso per determinazione), mentre impiegando la soluzione al 20% di tricloruro di antimonio i rapporti in molecole tra reattivo e vitamina sono dell'ordine di 10^4 - 10^5 , con un consumo di 0,4-0,8 g di reattivo per determinazione. L'impiego di una soluzione meno concentrata di tricloruro di antimonio venne proposto da J. A. BROWN (¹²): lavorando con una soluzione al 6% invece che al 20% (g per 100 cm³ di solvente) tale Autore ha ottenuto una maggiore stabilità dell'estinzione nel tempo, poichè col diminuire della concentrazione tutto il processo di formazione e di trasformazione del colore blu con tricloruro di antimonio viene ad essere rallentato.

Secondo quanto risulta dai lavori di BRÜGGEMANN e Coll. (^{10 e 11}), il tricloruro di antimonio agirebbe nella reazione di CARR e PRICE in virtù del suo contenuto in pentacloruro (contenuto del 0,06-0,1%): ne risulterebbe l'opportunità di impiegare per la reazione, direttamente il pentacloruro. Gli Autori sopra citati impiegano una soluzione cloridrica di pentacloruro di antimonio, ottenuto per ossidazione del tricloruro con bicromato di potassio e aggiungono cm³ 0,02-0,03 di tale soluzione alla soluzione cloroformica della vitamina A, agitando cautamente per effettuare l'estrazione del pentacloruro dalla fase acquosa. Occorre ricordare che l'impiego di soluzioni di pentacloruro di antimonio venne proposto da BOEKESTEIN (¹³) nel 1942, pur facendo presenti gli inconvenienti derivanti da una scarsa stabilità delle soluzioni preparate con tale reagente. Con la tecnica proposta da BRÜGGEMANN e Coll. sorgono alcune difficoltà dovute all'impiego di un reattivo bifasico, particolarmente sentite nel caso di determinazioni di vitamina A in prodotti naturali: la presenza di sostanze concomitanti può produrre delle variazioni di tensione superficiale, verrebbero a variare le condizioni di estrazione del pentacloruro dalla soluzione acquosa, verrebbe mutato l'andamento della reazione nel tempo e quindi

sorgerebbero cause notevoli di errore, come ebbero ad osservare gli stessi Autori. Essi proposero l'impiego di un reattivo al cloruro ferrico, il quale dà la stessa reazione del pentacloruro di antimonio ed è praticamente insolubile in cloroformio, per cui la reazione avviene unicamente all'interfaccia tra le due soluzioni e sembra meno influenzabile da parte di sostanze estranee ⁽¹⁴⁾. E' infatti noto che oltre agli alogenuri di antimonio, anche quelli di ferro ed alluminio danno una analoga reazione con la vitamina A e così pure quelli di arsenico ⁽¹⁵⁾. Altre critiche a questi lavori sono state avanzate da K. H. WAGNER, G. LINDEN ed A. STUMPF ⁽¹⁶⁾, i quali hanno concluso che i reattivi proposti da BRÜGGEMANN e Collaboratori sono inferiori all'originale reattivo proposto da CARR e PRICE. E' opportuno ricordare che tutti i reattivi sopra menzionati presentano un unico tipo di reazione con la vitamina A, dando tutti la caratteristica colorazione blu, (λ max 620 m μ) in ogni caso assai poco stabile nel tempo; con il β -carotene essi danno una analoga colorazione, con massimo d'assorbimento a 589 m μ , abbastanza stabile nel tempo, mentre con la vitamina D₂ danno una colorazione giallo arancio, con massimo d'assorbimento a 500 m μ , poco stabile nel tempo. Un modo diverso di reagire della vitamina A con soluzioni contenenti alogenuri di antimonio è quello mostrato in presenza di dicloridrina glicerica, così detta attivata. Nel 1950 A. E. SOBEL ed H. WERBIN ⁽¹⁷⁾ osservarono che la dicloridrina glicerica, sia 1,2 che 1,3 o loro miscele, reagivano con la vitamina A, dando una caratteristica colorazione rosso viola, con massimo a 550-555 m μ , stabile da 2 a 10 minuti, e non influenzata da piccole quantità di alcool e di umidità presenti nel cloroformio. Con questo reattivo il β -carotene dà una colorazione verde, con massimi a 475 e 625 m μ e minimo a 550 m μ , raggiungendo il massimo d'intensità dopo sei minuti, mentre la vitamina D₂ dà anche una colorazione verde, con massimo a 625 m μ , che raggiunge il massimo d'intensità dopo circa 45 minuti, reazione tuttavia poco sensibile.

Anche per la vitamina A la sensibilità di questa reazione rispetto a quella di CARR e PRICE è minore, come risulta dal confronto dei valori delle rispettive $E_{1\text{ cm}}^{1\%}$: il valore è di circa 1.290 per la reazione con dicloridrina glicerica, mentre raggiunge il valore di 4.480, secondo BRÜGGEMANN, o di 4.285 secondo MÜLLER per la reazione con SbCl₃ al 20%. Sul meccanismo della reazione con dicloridrina glicerica poco si conosce; è noto che la reazione si verifica: a) con determinate preparazioni di dicloridrina grezza; b) con dicloridrina glicerica distillata a pressione ridotta (4-40 mm Hg) in presenza di triclورو di antimonio (contenuto dal 10 al 50 per mille) oppure per semplice aggiunta di HCl conc., ⁽¹⁸⁾ o di cloruro di acetile o di benzoile, triclورو di alluminio, pentacloruro di fosforo; l'acido solforico concentrato ed il cloruro di zinco danno una colorazione

diversa. Il metodo migliore di attivazione è quello della distillazione in presenza di tricloruro di antimonio: il distillato ottenuto contiene quantità variabili di questo alogenuro, dal 0 al 0,67%, presenta un'attività stabile per circa un mese e successivamente tende a perderla molto lentamente. E' necessario controllare preparazione per preparazione ed ognuna successivamente nel tempo. BRÜGGEMANN e Coll. (¹⁰ e ¹¹) avanzano l'ipotesi che si abbia un arricchimento di pentacloruro di antimonio nel distillato e che questo produca la reazione: la dicloridrina glicerica di per se avrebbe importanza nello stabilizzare un particolare stadio nella catena delle reazioni che si verificano tra vitamina A ed alogenuri di antimonio, favorendo la formazione di un complesso con massimo d'assorbimento a 550 mμ, relativamente stabile nel tempo; gli Autori affermano di avere ottenuto un comportamento analogo lavorando con cloruro di etilene, senza dare particolari indicazioni e senza esprimere i risultati ottenuti.

Proseguendo nelle ricerche sulle reazioni delle vitamine A e D₂ con alogenuri d'antimonio, iniziate in seguito alla pubblicazione di una Nota sulla determinazione della vitamina D₂ in presenza di vitamina A (¹⁹), ho avuto occasione di osservare il comportamento di dette vitamine in presenza di soluzioni diluite di alogenuri di antimonio ed in presenza di solventi varii, ottenuti per distillazione da soluti contenenti alogenuri di antimonio ed ho ottenuto dei risultati che ritengo interessante riferire, poichè da una parte essi costituiscono una generalizzazione ed una possibile spiegazione della reazione della dicloridrina glicerica con le vitamine A e D ed il β-carotene e dall'altra, essi possono costituire la base di metodi analitici per le vitamine sopra menzionate.

PARTE SPERIMENTALE

Apparecchi. — Le misure di assorbimento ottico delle soluzioni sono state eseguite con uno spettrofotometro di BECKMAN, modello DU, con vaschette da 1 cm di spessore e con un colorimetro Klett-Summerson, modello 900-03, con tubi, usando un filtro Corning a massimo di trasmissione a 540 mμ.

Reattivi. Cloroformio puro, lavato e seccato: 1.000 cm³ di cloroformio puro per analisi vengono lavati con acqua, 5 volte con 200 cm³ per volta, filtrati su Na₂SO₄ anidro, e disidratati con 25 g di anidride fosforica e 10 g di Na₂SO₄ anidro. Dopo circa 5 ore di contatto al riparo della luce si filtra il cloroformio su lana di vetro e lo si distilla in apparecchio intera-

mente in vetro, scartando 80-100 cm³ di testa e di coda. Il cloroformio distillato viene conservato in bottiglie di vetro scuro, contenente 25 g per litro di Al₂O₃, reso anidro per riscaldamento a 500°: il cloroformio, mantenuto in frigorifero, si conserva anidro ed esente da fosgene per almeno tre mesi. La quantità necessaria giornalmente per le prove viene prelevata dal recipiente dopo avere agitato e successivamente lasciato depositare l'allumina, filtrando su lana di vetro secca, ricoperta di uno strato di Na₂SO₄ anidro, ottenendosi così un distillato esente da umidità, cosa che non si ottiene filtrando su comune carta da filtro.

Reattivo al tricloruro di antimonio. — La soluzione viene preparata sciogliendo la quantità pesata di g 20 in 100 cm³ di cloroformio lavato e seccato, riscaldando con refrigerante a ricadere e portando a volume dopo raffreddamento: si aggiunge lo 0,5% di alcool etilico per stabilizzare il reattivo.

Da questa soluzione si preparano, diluendo con cloroformio lavato e seccato, i reattivi al 0,4 e all'1,0% in SbCl₃, aggiungendo il 2% di cloruro di acetile prima di portare a volume. Si preparano di solito piccole quantità come 25-50 cm³ di reattivo, secondo le necessità analitiche, tuttavia, conservato in bottiglia scura ed in frigorifero, il reattivo non si altera qualitativamente e quantitativamente in modo apprezzabile entro 10 giorni.

Soluzione standard di vitamina A. — La soluzione di vitamina A palmitato è stata preparata in alcool isopropilico, alla concentrazione di 1.000 U.I. per cm³, partendo da un prodotto concentrato della Ditta Roche, al titolo di 1.000.000 di U.I. per grammo.

Queste soluzioni, conservate in bottiglia scura ed in frigorifero, mantengono inalterato il loro titolo per oltre due mesi. Da esse, per accurata evaporazione dell'alcool isopropilico con corrente d'azoto, in bagnomaria a 50° e riprendendo con cloroformio (normale cloroformio, puro per analisi, con lo 0,5% di alcool etilico, oppure lavato e seccato, secondo le prove da eseguire) si preparano le soluzioni da usare giorno per giorno, per la titolazione dei reattivi.

Reattivi ottenuti per distillazione. — Questi reattivi sono stati preparati distillando, in un apparecchio interamente in vetro, una soluzione al 20% di SbCl₃, in cloroformio o in cloruro di etilene, contenente il 2% di cloruro di acetile, raccogliendo il distillato in un collettore chiuso con un tubo a cloruro di calcio per evitare l'entrata di umidità: si raccolgono circa 80 cm³ di distillato su 100 di partenza. Il reattivo si conserva in recipiente di vetro scuro ed è pronto per le determinazioni.

Esecuzione della reazione. — Quando non venga altrimenti descritto nel testo, la reazione si esegue aggiungendo ad 1 cm³ di soluzione vitaminica, in cloroformio, 4 cm³ di reattivo, misurati con pipetta a stantuffo, si agita e dopo 2 minuti si iniziano le misure di estinzione che proseguono fino a 10 minuti. Si lavora al riparo dalla luce solare diretta.

COMPORTAMENTO DEI VARI REATTIVI

a) *Reattivi ottenuti per distillazione.* — Se si distilla una soluzione di tricloruro di antimonio al 20%, in cloruro di etilene od in cloroformio, con aggiunto il 2% di cloruro di acetile, si ottiene in entrambi i casi un distillato incolore, contenente quasi tutto il cloruro di acetile e piccole quantità di tricloruro d'antimonio: il liquido ottenuto reagisce con le vitamine A e D₂ e con il β -carotene in modo del tutto analogo alla dicloridrina glicerica attivata. La reazione con la vitamina A dà luogo inizialmente ad una colorazione azzurra che vira rapidamente al viola, entro circa 60 secondi, e si trasforma, entro circa 120 secondi, in una colorazione rosso-viola, con massimo d'assorbimento a 550 m μ e con intensità stabile fino a 10 minuti circa, nel caso del reattivo preparato con cloroformio, e poi lentamente decrescente nel tempo; nel caso del reattivo preparato con cloruro di etilene la colorazione presenta il medesimo massimo d'assorbimento, (v. fig. 1) è stabile per alcune ore, l'intensità cresce fino a 10 minuti, resta stabile o cresce molto lentamente fino a 30 minuti circa, dopo di che decresce lentamente nel tempo. L'andamento dell'estinzione in funzione della concentrazione è sufficientemente lineare nell'intervallo di concentrazione tra 10 e 60 U.I. per cm³ di vitamina A, (sotto forma di estere palmitico) come mostra la fig. 2, nella quale sono riportati i grafici per il reattivo preparato con cloruro di etilene. Questo reattivo si conserva per 2 mesi e più e tende ad aumentare col tempo la propria attività, comportandosi in modo opposto alla dicloridrina glicerica attivata (vedi fig. 2).

In generale, nella preparazione dei reattivi, occorre evitare la presenza di umidità, potendosi avere notevoli variazioni del grado di attivazione; impiegando cloroformio può usarsi anche il normale prodotto contenente lo 0,5% di alcool etilico, si ha però una estinzione specifica minore, rispetto a quella ottenuta con cloroformio lavato e seccato; impiegando cloruro di etilene occorre notare che vi sono delle partite di questo prodotto difficilmente purificabili: in tale caso il reattivo preparato

con 20% di cloruro di antimonio e col 2% di cloruro di acetile assume da solo una colorazione viola, per quanto il prodotto ottenuto con la successiva distillazione non presenti alcun inconveniente, anzi esso si dimostra molto attivo.

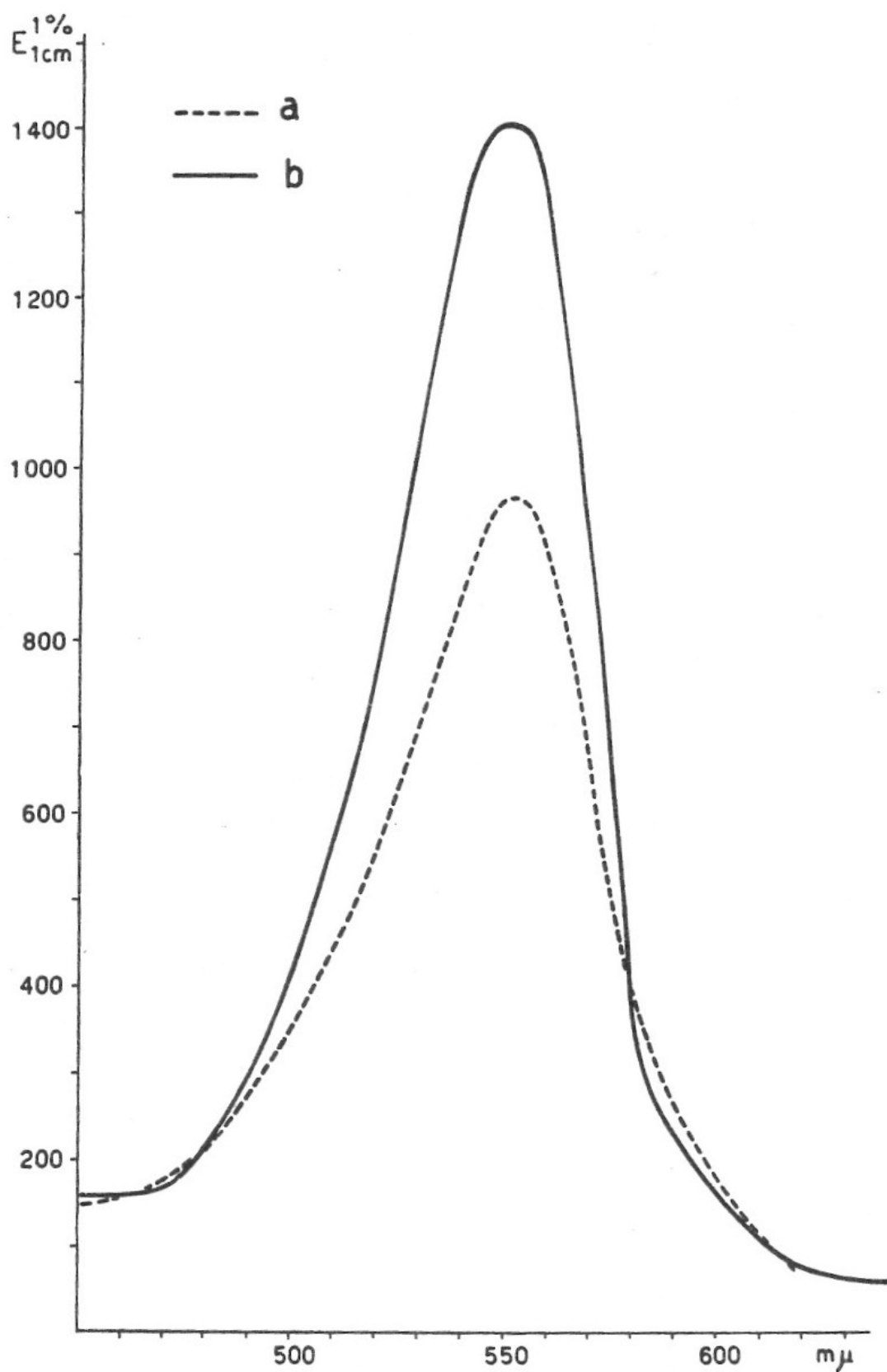


Fig. 1. - Spettro d'assorbimento del prodotto di reazione tra la vitamina A ed il reattivo in cloruro di etilene, ottenuto per distillazione (curva a) ed il reattivo al 0,4% in cloroformio, ottenuto per diluizione (curva b).

I distillati ottenuti sia con cloruro di etilene che con cloroformio, senza cloruro di acetile, manifestano lo stesso comportamento qualitativo di quelli ottenuti con cloruro di acetile; ma per la loro minore stabilità nel tempo non sono stati ulteriormente studiati.

Le prove successive, eseguite con le soluzioni diluite di tricloruro di antimonio, hanno permesso di stabilire che l'attivazione ottenuta per distillazione non è altro che una diluizione della originale soluzione. Difatti,

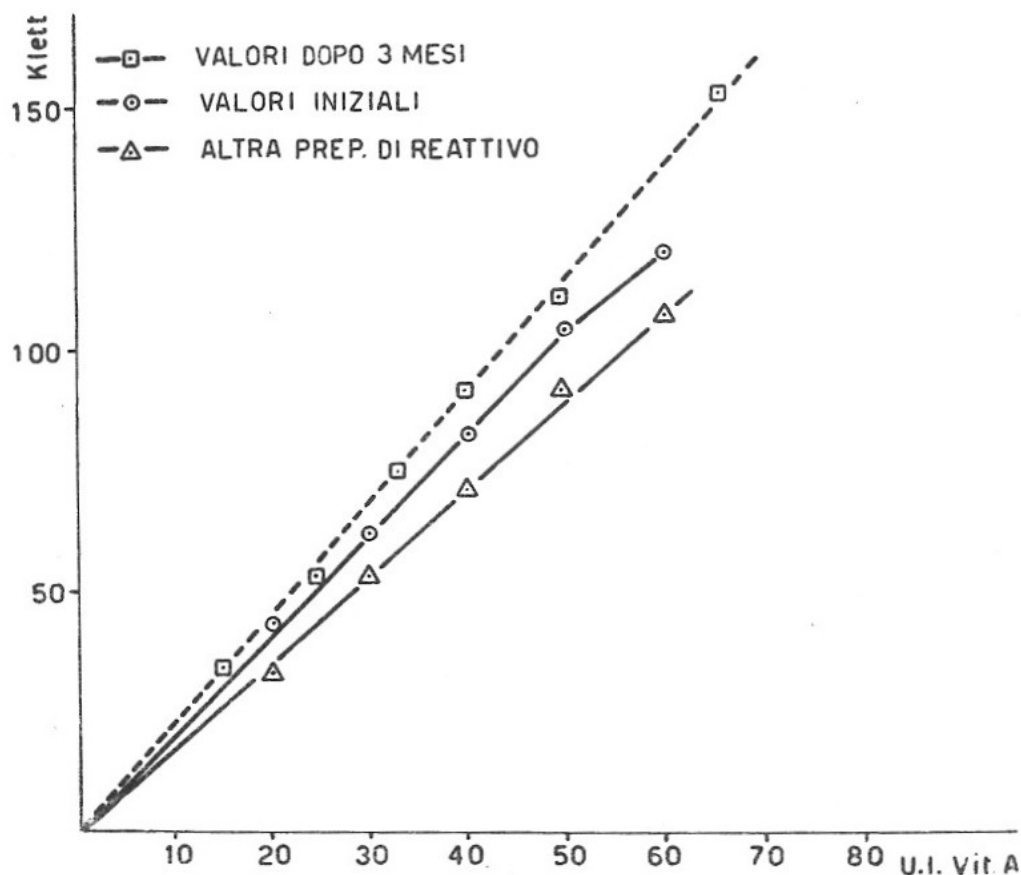


Fig. 2. - Reazione tra vitamina A (palmitato) e reattivi in cloruro di etilene ottenuti per distillazione.

l'altra ipotesi possibile, cioè quella dell'attivazione per concentrazione del pentacloruro nel distillato, emessa da BRÜGGEMANN e Collaboratori a proposito dell'attivazione della dicloridrina glicerica, non può più essere sostenuta, poichè in contrasto con i risultati delle prove sperimentali, le quali vengono qui riportate.

b) *Reattivi ottenuti per diluizione.* — Nella reazione tra vitamina A e soluzione di tricloruro di antimonio al 20% in cloroformio, si ha, dopo l'iniziale colorazione blu, un succedersi di colorazioni che vanno dall'azzurro viola al viola rossastro, fino al giallo arancio, tutte di nessun valore analitico; analogo comportamento si ha con soluzioni diluite di penta-

cloruro di antimonio. Se si diminuisce la concentrazione in tricloruro di antimonio della soluzione impiegata come reattivo, compare in ogni caso la colorazione blu che tuttavia si sviluppa più lentamente, come fu osservato da J. A. BROWN ⁽¹²⁾ per soluzioni fino al 3% in SbCl_3 ; per concentrazioni inferiori all'1% non si ha alcuna colorazione con la vitamina A.

Diverso è il comportamento se alle soluzioni diluite di SbCl_3 si aggiunge del cloruro di acetile: una soluzione al 0,4% di SbCl_3 in cloroformio, puro ed anidro, con l'aggiunta del 2% di cloruro di acetile, dà con soluzione di vitamina A una iniziale colorazione blu che vira entro due minuti nella caratteristica colorazione rosso-viola con massimo a 550 m μ , in tutto analoga a quella ottenuta con i reattivi, tipo dicloridrina, preparati per distillazione (v. fig. 1); aumentando la concentrazione in SbCl_3 , sempre con l'aggiunta del 2% di cloruro di acetile, si ha un rallentamento del tempo di formazione del colore rosso, il quale compare dopo un tempo tanto più lungo, quanto maggiore è la concentrazione in SbCl_3 . Per i reattivi alle concentrazioni del 0,4%-1,0%-2,0%-4,0% in SbCl_3 , il primo caratteristico viraggio dal blu al viola si ha rispettivamente in 30", 30", 45", 1' e 30" e lo spettro d'assorbimento del colore rosso-viola che appare entro due-tre minuti dall'aggiunta del reattivo, spettro rilevato dopo 10 minuti, in condizioni ormai di stabilità, presenta un massimo a 550 m μ , stabile a tale lunghezza d'onda entro 5 ore per i reattivi con concentrazione in SbCl_3 dello 0,4 - 1,0 - e 2,0%, mentre per la soluzione al 4,0% dopo 5 ore si trova il massimo d'assorbimento spostato a 535 m μ . Nella fig. n. 3 si possono osservare le variazioni notevoli della sensibilità della reazione in funzione della concentrazione in SbCl_3 del reattivo: a parità di concentrazione di vitamina A i valori di estinzione sono pressochè identici per i reattivi al 0,4% e all'1%, mentre già passando dalla concentrazione dell'1% a quella del 2% la diminuzione del valore dell'estinzione è sensibile.

Per i reattivi alle concentrazioni del 6%, 8% e 10% il viraggio dal blu al viola compare rispettivamente dopo 2,4 e 7 minuti circa e gli spettri sono difficilmente rilevabili dopo 7-10 minuti a causa del rapido variare delle estinzioni; è stato possibile osservare che inizialmente il massimo d'assorbimento è localizzato nella zona 570-560 m μ e tende a spostarsi verso lunghezze d'onda minori, mentre dopo 50 minuti circa si è raggiunta una situazione di equilibrio: le estinzioni restano pressochè costanti ed il colore rosso-arancio presenta un massimo d'assorbimento a 530 m μ che resta praticamente costante nel tempo, come hanno dimostrato misure effettuate dopo 6 ore; gli spettri sono riuniti nella fig. n. 3.

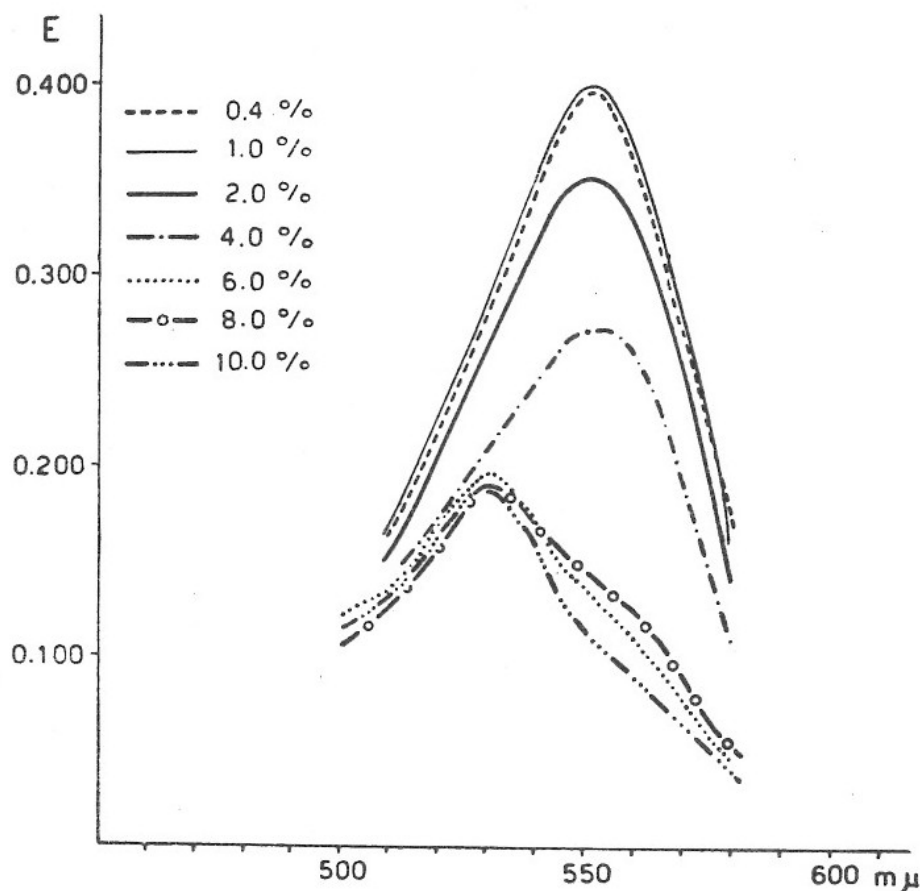


Fig. 3. - Spettri d'assorbimento, rilevati in condizioni di stabilità, relativi alle reazioni fra 50 U.I. di vitamina A palmitato ed i reattivi, ottenuti per diluizione, alle concentrazioni in SbCl_3 segnate nel grafico.

Nel caso limite delle soluzioni più concentrate, al 20% ed oltre, si ha soltanto la formazione molto lenta di un colore giallo aranciato.

Il comportamento osservato alle concentrazioni del 0,4 - 1,0% in SbCl_3 , col 2% di cloruro di acetile si ha, oltre che con cloroformio, anche coi seguenti altri solventi: dicloroetano, (cloruro di etilene) tetracloreto, pentacloro etano, tetracloruro di carbonio, cloridrina del glicole, α -monocloridrina del glicerolo ed in misura molto ridotta anche con benzina normale ed etere di petrolio.

c) *Applicazioni analitiche.* — Dal punto di vista analitico sono interessanti i risultati ottenuti con le soluzioni cloroformiche di SbCl_3 al 0,4 e 1,0%, le quali permettono di ottenere una buona linearità fra estinzione e concentrazione ed un valore sufficientemente elevato di estinzione specifica. E' importante tenere presente che il cloroformio col quale viene preparato il reattivo deve essere accuratamente disidratato, allo scopo di evitare differenze tra i valori di $E_{1\text{ cm}}^{1\%}$ presentati da reattivi preparati con diverse partite di cloroformio non completamente disidratato.

Si è osservata una differenza tra le misure eseguite impiegando per preparare le soluzioni di vitamina A, in un caso, cloroformio lavato e

seccato e nell'altro, cloroformio contenente lo 0,5% di etanolo: i risultati sono rappresentati nei diagrammi estinzione — concentrazione riportati nelle figure n. 4 e n. 5, riferentisi a misure eseguite con spettrofotometro e colorimetro. Per quanto possa sembrare un particolare di trascurabile importanza l'usare per il cm^3 di soluzione vitaminica, cloroformio puro ed anidro o cloroformio con lo 0,5% di etanolo, tuttavia, l'uso

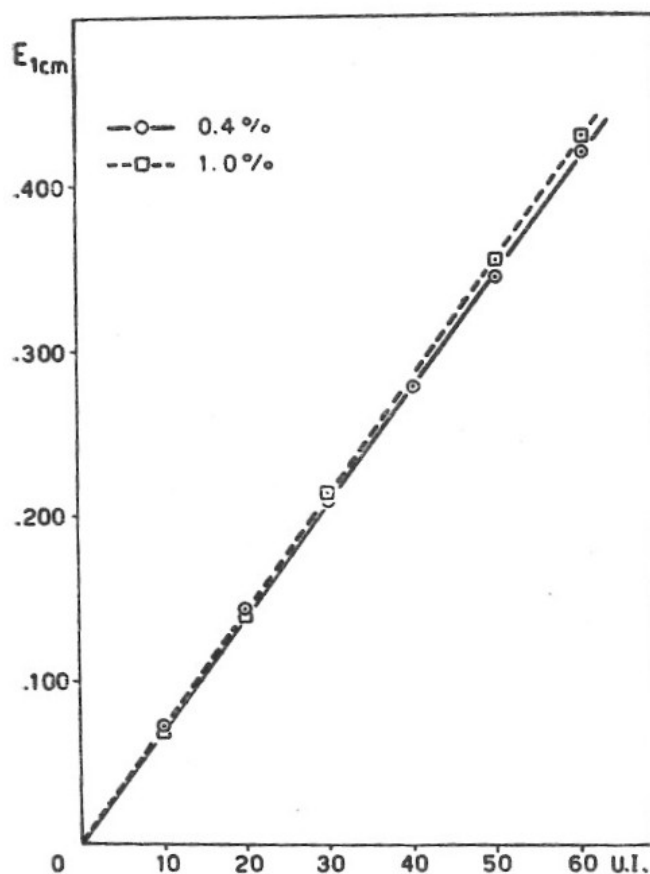


Fig. 4.

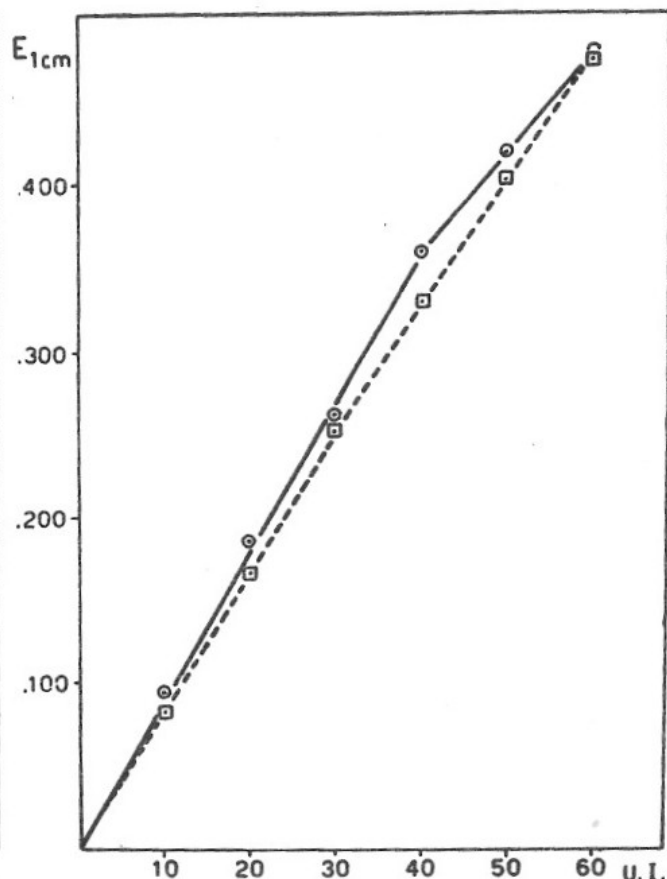


Fig. 4a.

Fig. 4 e 4a. - Andamento delle estinzioni (misurate allo spettrofotometro) rispetto alle concentrazioni, per la reazione tra vitamina A ed i reattivi al 0,4 ed 1,0% in SbCl_3 , ottenuti per diluizione.

Fig. 4: soluzione di vitamina A in cloroformio con lo 0,5% di etanolo.

Fig. 4a: soluzione di vitamina A in cloroformio lavato e seccato.

di cloroformio con lo 0,5% di etanolo per sciogliere la vitamina, permette di ottenere una buona stabilità dell'estinzione nel tempo (da 2 a 10 minuti primi), una perfetta linearità fra estinzione e concentrazione e la necessaria riproducibilità delle misure con diverse preparazioni di reattivo. Si è osservato inoltre che le condizioni sopra esposte sono meglio soddisfatte impiegando il reattivo all'1% piuttosto che quello al 0,4%: infatti con la concentrazione dell'1% si ha una maggiore conservabilità del reattivo stesso, senza variazioni apprezzabili del coefficiente d'estinzione per 10 giorni circa.

Nelle misure eseguite preparando la soluzione vitaminica con cloroformio anidro, la relazione tra estinzione e concentrazione non è perfetta-

mente lineare e non è consigliabile superare il valore di 50 U.I., come già osservato da A. E. SOBEL e H. WERBIN (¹⁷ e ¹⁸) nel caso della reazione tra vitamina A e dicloridrina glicerica; con questo procedimento si ottengono però valori più elevati di $E_{1\text{ cm}}^{1\%}$ rispetto a quelli ottenuti con la

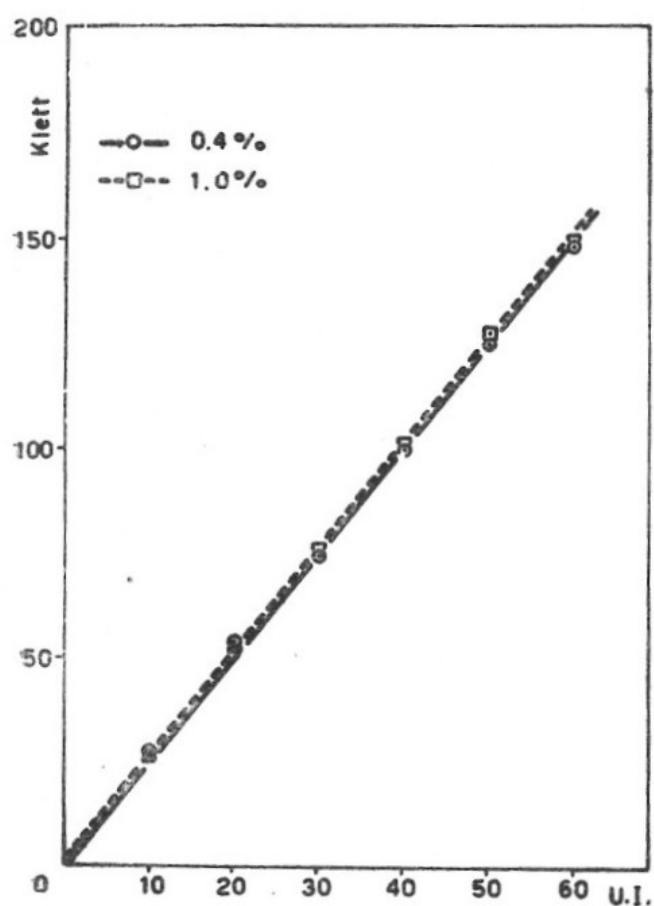


Fig. 5.

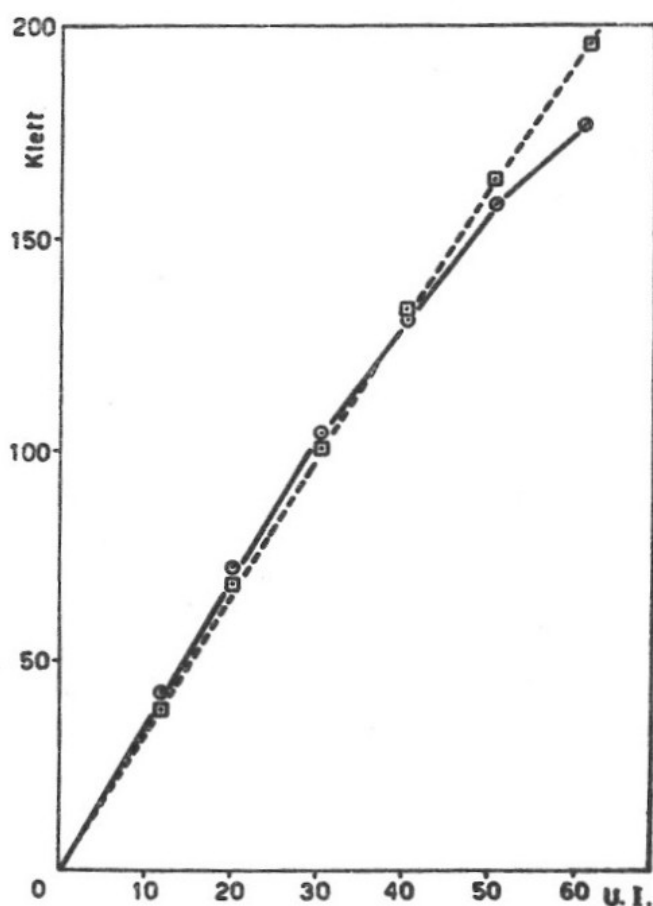


Fig. 5a.

Fig. 5 e 5a. - Misure eseguite in condizioni analoghe a quelle espresse in fig. 4 ma eseguite con un colorimetro a filtro.

dicloridrina glicerica. Lavorando in queste condizioni si guadagna in sensibilità ma è necessario procedere ad una rigorosa standardizzazione del reattivo.

Le differenze tra le due diverse condizioni nell'eseguire la reazione risultano dalla seguente tabella:

Vitamina A in μg	$E_{1\text{ cm}}^{1\%}$ per la soluzione della vitamina in cloroformio con lo 0,5% EtOH	$E_{1\text{ cm}}^{1\%}$ per la soluzione della vitamina in cloroformio puro e anidro
3,0	1.178	1.378
6,0	1.162	1.374
9,0	1.158	1.376
12,0	1.160	1.348
15,0	1.135	1.325
18,0	1.155	1.309

E' importante osservare che se si eseguono diverse preparazioni di reattivo con lo stesso cloroformio lavato e seccato, mantenuto anidro ed esente da fosgene per trattamento con allumina anidra, i risultati ottenuti nella determinazione di vitamina A con tali reattivi concordano tra di loro con uno scarto massime dell'1-2%. Conviene quindi controllare rispetto alla vitamina A ogni preparazione di cloroformio lavato e seccato (tra due diverse preparazioni, più o meno bene disidratate possono aversi scarti del 5-6%), il solvente si può conservare in frigorifero per tre mesi almeno senza inconvenienti, in presenza di allumina anidra, ed in fine preparare giorno per giorno la quantità di reattivo necessaria per le determinazioni. In effetti un reattivo, conservato al riparo della luce ed in frigorifero si conserva inalterato per molti giorni (20-22), dopo di che può aversi la formazione di fosgene che ossida il tricloruro a pentacloruro di antimonio, il quale come verrà dimostrato tra poco, con vitamina A dà solo la colorazione blu e non la rossa; queste alterazioni nella composizione del reattivo provocano variazioni dell'estinzione specifica della colorazione dovuta al reattivo stesso. Le prove sopra riportate sono state tutte eseguite con soluzioni di vitamina A palmitato (prodotto sintetico della Ditta Roche) al titolo di 1.000.000 U.I. per g.

Considerazioni sull'andamento della reazione. E' stato possibile stabilire che questo particolare comportamento delle soluzioni diluite di tricloruro di antimonio è dovuto al tricloruro stesso e non alle tracce di pentacloruro in esso contenuto, tracce che secondo BRÜGGEMANN e Coll. (^{10 e 11}) sarebbero responsabili della attivazione della dicloridrina glicerica nel trattamento di distillazione. Infatti se si considera una soluzione al 0,4% in SbCl_3 (concentrazione minima alla quale si verifica l'effetto descritto nella presente Nota), per un contenuto di SbCl_5 nello SbCl_3 pari al 0,1-0,06% (¹⁰), si avrebbe un contenuto in SbCl_5 dello 0,0004% circa nella soluzione; ora una soluzione a questo titolo in SbCl_5 preparata con pentacloruro di fresco distillato, addizionata del 2% di cloruro di acetile, reagisce con una soluzione di vitamina A per dare soltanto il colore blu, senza virare al rosso viola. Analogamente si comporta il pentacloruro in soluzione più concentrata, per esempio al 0,4% (1000 volte più conc. rispetto alla precedente) sempre col 2% di cloruro di acetile: il comportamento è simile a quello delle soluzioni concentrate di tricloruro di antimonio al 20%: colore blu iniziale e lenta successione di colorazioni con colore giallo arancio finale, con massimo a 515 m μ dopo alcune ore.

E' stato anche osservato che la dicloridrina glicerica distillata, e di per se già capace di dare la reazione rosso-viola con vitamina A, addi-

zionata di SbCl_5 in soluzione cloroformica concentrata, in modo da avere una concentrazione finale in pentacloruro dello 0,1%, reagisce con la vitamina A dando soltanto la colorazione blu, che si decolora lentamente nel tempo, senza dare luogo al caratteristico colore rosso-viola.

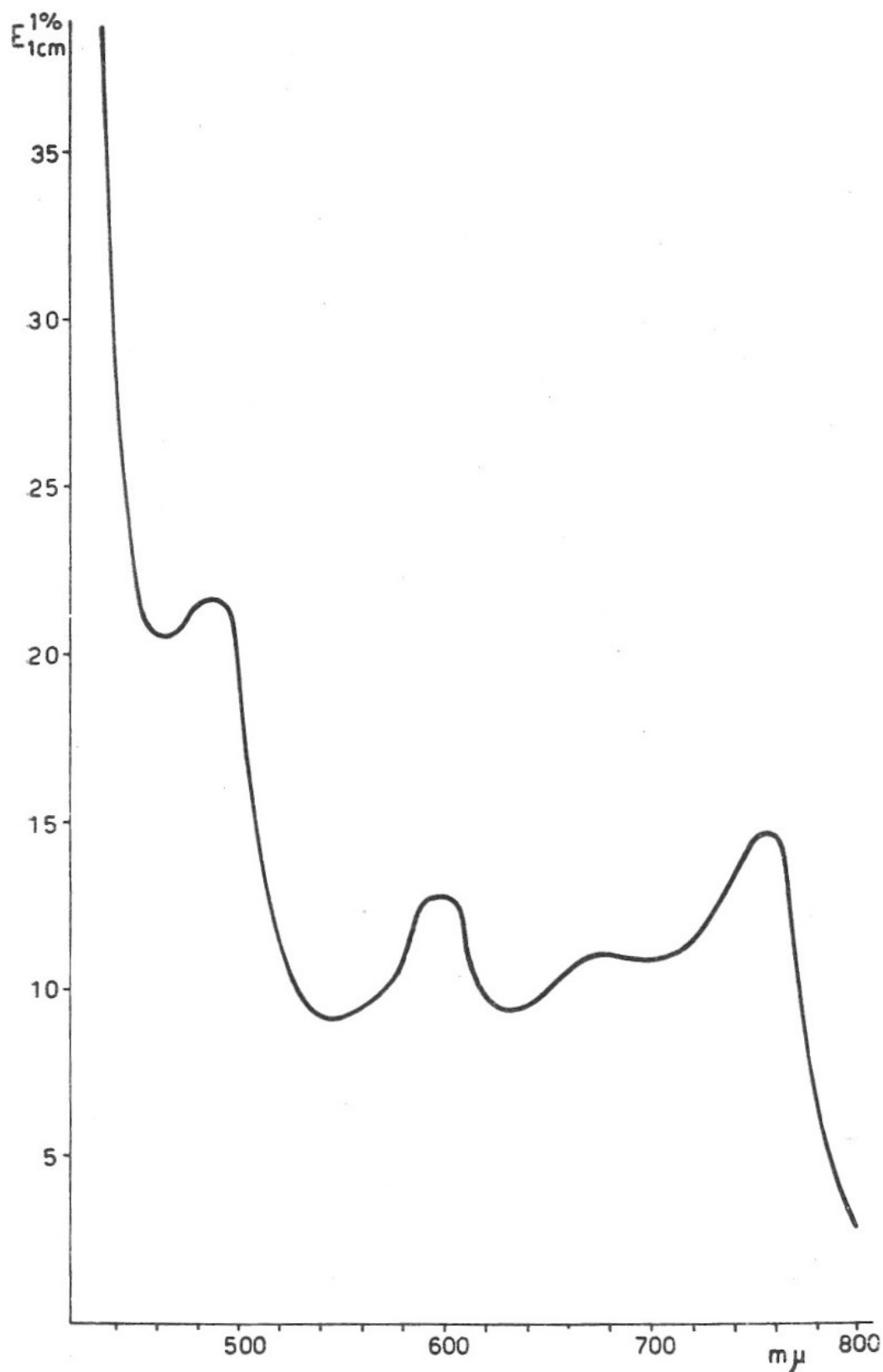


Fig. 6. - Spettro d'assorbimento del prodotto di reazione tra la vitamina D_2 ed il reattivo all'1,0% in cloroformio.

La diversità di comportamento tra le soluzioni di SbCl_3 e quelle di SbCl_5 risulta ancora in modo assai notevole se si considerano le reazioni con la vitamina D_2 e con il β -carotene. Con la vitamina D_2 alla concentrazione da 5 a 20 μg per cm^3 le soluzioni di SbCl_5 al 0,0004 e al 0,4%, col 2% di cloruro di acetile, danno la caratteristica colorazione gialla aran-

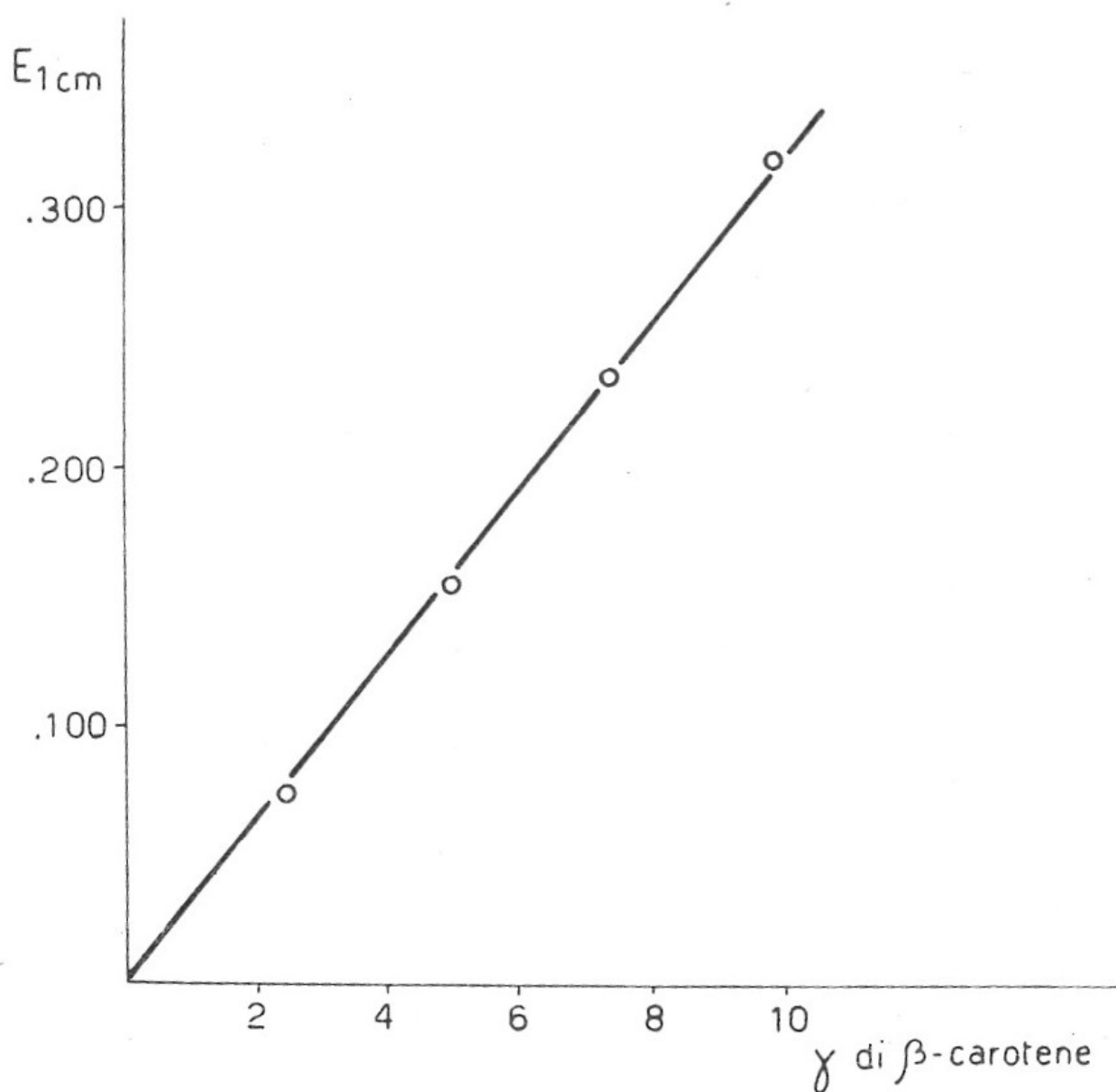


Fig. 7. - Andamento dell'estinzione rispetto alla concentrazione per la reazione tra vitamina D_2 ed il reattivo all'1,0% in cloroformio.

cio, con massimo d'assorbimento a 500 $\text{m}\mu$, come osservato da BRÜGGEMANN e Coll. (¹⁰ e ¹¹), reazione già nota per le soluzioni al 20% di SbCl_3 in cloroformio (⁵), con o senza cloruro di acetile e per le soluzioni analogamente preparate con cloruro di etilene (²⁰); con queste concentrazioni di vitamina D_2 la soluzione al 0,4% o 1,0% di SbCl_3 in cloroformio, col 2% di cloruro di acetile non dà nessun colore; con soluzioni contenenti da 200 almeno a 1000 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ di vitamina D_2 tali reattivi presentano un comportamento analogo a quello osservato da SOBEL, MAYER e

KRAMER per la reazione con dicloridrina glicerica attivata ⁽²¹⁾; si ha una iniziale colorazione giallo arancio che dopo 10 minuti circa vira al verde, crescendo di intensità nel tempo; tale intensità è misurabile conveniente-

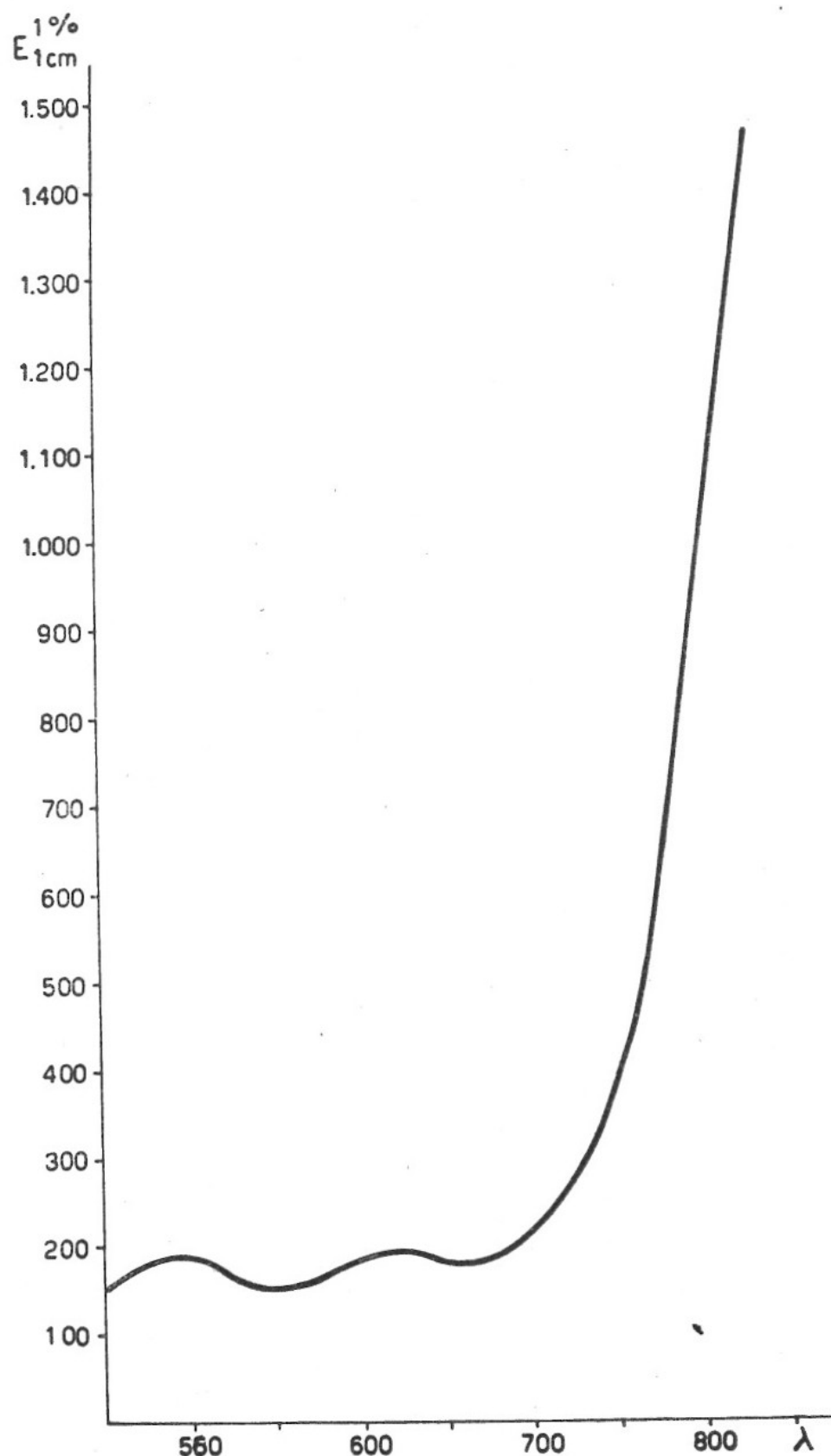


Fig. 8. - Spettro d'assorbimento del prodotto di reazione fra il β -carotene ed il reattivo all'1,0% in cloroformio.

mente dopo 45-60 minuti ed è stabile per alcune ore. Nella fig. n. 6 è riportato lo spettro della colorazione ottenuta nella reazione fra vitamina D₂ e reattivo all'1% in SbCl₃: a differenza della reazione con dicloridrina glicerica, nella quale si ha il massimo principale a 625 mμ con questo reattivo si ha un primo massimo a 595 mμ ed un altro più elevato a 755 mμ, di maggiore interesse per la determinazione in presenza di vitamina A,

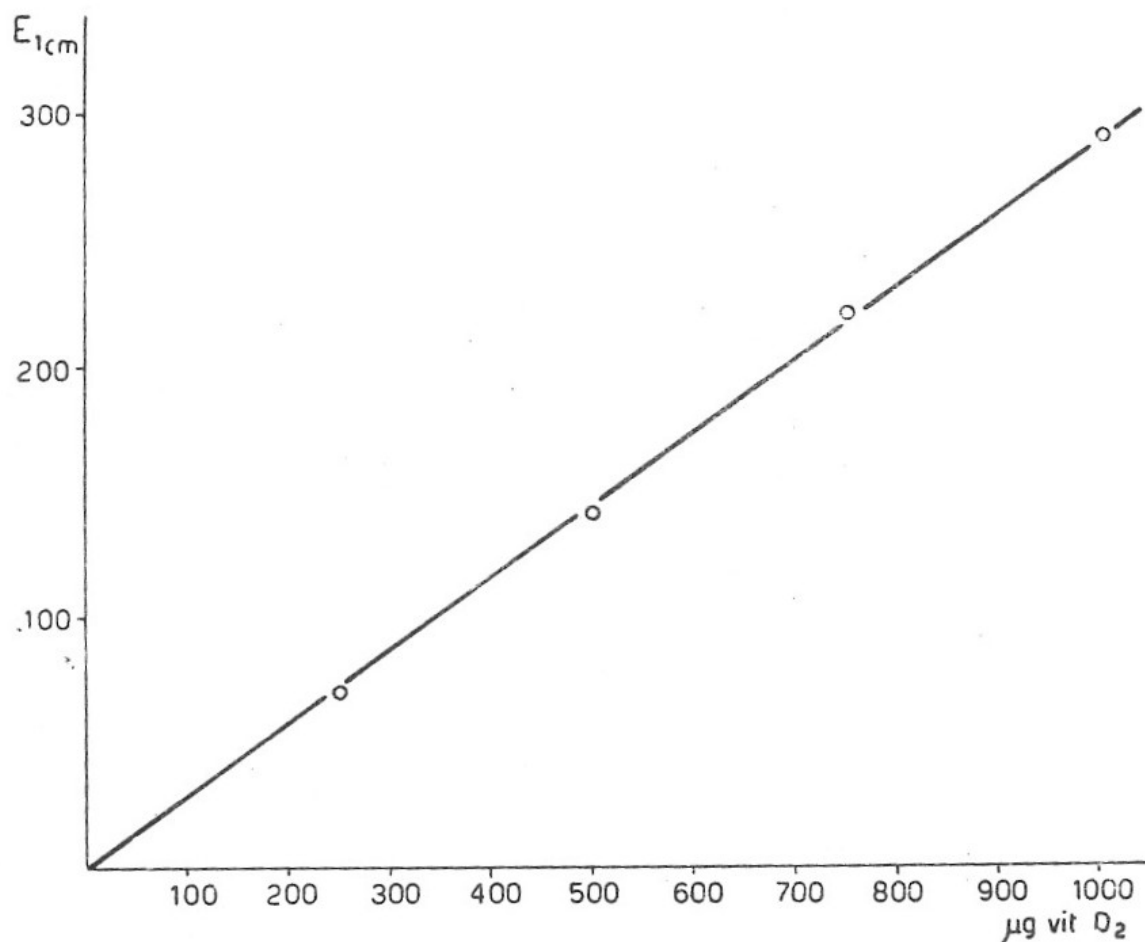


Fig. 9. - Andamento dell'estinzione rispetto alla concentrazione per la reazione tra il β -carotene ed il reattivo all'1,0% in cloroformio.

essendo più distante dal massimo a 550 mμ presentato dalla vitamina A stessa.

La sensibilità delle due reazioni, quella con dicloridrina glicerica attivata e quella con soluzioni cloroformiche diluite di SbCl₃ è del medesimo ordine di grandezza e quindi piuttosto bassa, circa 1/70 di quella fornita dalla vitamina A, il che limita molto le applicazioni analitiche del reattivo, tuttavia ci ripromettiamo di studiare ulteriormente questa reazione e di precisarne gli esatti limiti di applicabilità. In fig. 7 è tracciato l'andamento dell'estinzione rispetto alla concentrazione per la reazione fra vitamina D₂ ed il reattivo all'1% in cloroformio.

Con il β -carotene la reazione con le soluzioni cloroformiche diluite di

SbCl_3 col 2% di cloruro di acetile procede in modo del tutto diverso da quanto osservato con soluzioni al 20% di SbCl_3 o più diluite di SbCl_3 ed in modo analogo alla reazione descritta con la dicloridrina glicerica attivata: si ha una colorazione verde-azzurra, misurabile dopo 5-6 minuti, con massimi d'assorbimento a 500 e 625 $\text{m}\mu$, poco pronunciati e con forte assorbimento nell'estremo rosso, il che ne permette la determinazione quantitativa con misure a 830 $\text{m}\mu$, analogamente a quanto proposto da A. E. SOBEL e S. D. SNOW ⁽²²⁾ per la reazione con dicloridrina glicerica attivata. Nella fig. 8 si riporta lo spettro d'assorbimento del prodotto di reazione tra β -carotene e reattivo all'1,0% di SbCl_3 in cloroformio ed in fig. 9 l'andamento dell'estinzione rispetto alla concentrazione per la reazione fra il β -carotene e lo stesso reattivo.

Dagli elementi riportati nella presente Nota risultano le seguenti conclusioni: le soluzioni cloroformiche diluite di SbCl_3 e di SbCl_5 , contenenti il 2% di cloruro di acetile, si comportano diversamente reagendo con soluzioni di vitamina A, di vitamina D_2 e di β -carotene; il comportamento della vitamina A è stato studiato più estesamente, dato il maggiore interesse da esso presentato.

Si deve presumere che nelle condizioni indicate per aversi la colorazione rosso-viola, la reazione tra vitamina A e tricloruro di antimonio possa dar luogo ad un sistema mesomero di idrocarburi polienici, dotato di maggiore stabilità rispetto a quello formato con soluzioni più concentrate di tricloruro di antimonio e con diverso numero di doppi legami, presentando un massimo d'assorbimento a 550 $\text{m}\mu$ invece che a 620 $\text{m}\mu$.

Poco si può dire sul meccanismo della reazione: riferendosi a 50 U.I. di vitamina A, per un rapporto tra reattivo e soluzione vitaminica di 4 cm^3 a 1, l'eccesso di molecole di SbCl_3 rispetto alla vitamina A è di 3.500 circa a 1: riducendo la quantità di SbCl_3 fino ad avvicinarsi al rapporto equimolecolare, viene a ridursi proporzionalmente l'intensità del colore, sino ad aversi dei valori nulli, il che testimonia la necessità di un certo eccesso di molecole di reattivo rispetto alla vitamina. Per quanto riguarda l'azione del cloruro di acetile, con la concentrazione del 2% si ha un rapporto in molecole tra cloruro di acetile e tricloruro di antimonio di circa 5,8 a 1: anche per un rapporto molecolare di: 1 a 1 (conc. 0,35%) e di 0,33 a 1 (conc. 0,115 %) l'azione attivante si manifesta, mentre senza cloruro di acetile la sola soluzione all'1% di SbCl_3 dà con vitamina A dei valori di $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ pari a circa 1/3 di quelli riscontrati alle concentrazioni del 2%, 0,35 e 0,115% di cloruro di acetile, con uno sviluppo molto lento del colore.

Nel caso della vitamina A, la reazione con soluzioni diluite di tricloro-

ruro di antimonio ha permesso di mettere a punto un metodo analitico che presenta sulla reazione di CARR e PRICE tutti i vantaggi della reazione con dicloridrina glicerica attivata, e su quest'ultima reazione, una maggiore semplicità e rapidità di preparazione del reattivo e più vaste possibilità di applicazione, senza perderne le principali caratteristiche.

Roma — Istituto Superiore di Sanità - Laboratorio di Biologia.

BIBLIOGRAFIA

- (¹) CARR e PRICE - *Bioch. J.*, 20: 497 (1926).
 - (²) MEUNIER P. - *Bull. Soc. Chim.*, [5], 13: 73 (1946).
 - (³) MEUNIER P. e RAOUL Y. - *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 20: 861 (1938).
 - (⁴) MEUNIER P. e JOUANNEAU J. - *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 30: 260 (1948).
 - (⁵) BROCKMANN H. e CHEN Y. H. - *Z. Physiol. Chem.*, 241: 129 (1936).
 - (⁶) GSTIRNER F. - *Chemisch-physikalische Vitamin-Bestimmungsmethoden*, Ed. F. Enke, Stuttgart (1951), pag. 54.
 - (⁷) WODSAK W. - *Pharmazie*, 4: 370 (1949).
 - (⁸) MÜLLER B. P. - *Mitt. Geb. Lebensmittelunters. u. Hyg.*, 40: 376 (1949) idem, *Helvetica Chim. Acta*, 8: 1172 (1947).
 - (⁹) FUJITA A. e SAKOMOTO T. - *Bioch. Z.*, 308: 334 (1941).
 - (¹⁰) BRÜGGEMAN J.; KRAUSS W. e TIEWS J. - *Ber.*, 85: 315 (1952).
 - (¹¹) BRÜGGEMAN J.; KRAUSS W. e TIEWS J. - *Z. Anal. Chem.*, 135: 241 (1952); 137: 421 (1953).
 - (¹²) BROWN J. A. - *J. Am. Pharm. Ass. Sci.*, Ed., 39: 699 (1950).
 - (¹³) BOEKESTEIN - *Acta Brevia Ned.*, 12: 89 (1942).
 - (¹⁴) BRÜGGEMANN J.; KRAUSS W. e TIEWS J. - *Z. Anal. Chem.*, 141: 161, 173 (1954).
 - (¹⁵) DRUMMOND J. G. - *Bioch. J.*, 19: 257 (1925).
 - (¹⁶) WAGNER K. H., LINDEN G. e STUMPF A. - *Z. Physiol. Chem.*, 296: 193 (1954); *Vitamine u. Hormone*, 6: 112 (1954).
 - (¹⁷) SOBEL A. E. e WERBIN H. - *J. Biol. Chem.*, 159: 681 (1945); *Ind. Eng. Chem. Anal. Ed.*, 18: 570 (1946).
 - (¹⁸) Ibidem, 19: 107 (1947).
 - (¹⁹) MARIANI A. e CAVINA G. - *Rend. Istituto Sup. Sanità*, 16: 725 (1953); 18: 232 (1955).
 - (²⁰) NIELD C.; RUSSEL W. e ZIMMERLI A. - *J. Biol. Chem.*, 136: 73 (1940).
 - (²¹) SOBEL A. E.; MAYER M. e KRAMER B. - *Ind. Eng. Chem. Anal. Ed.*, 17: 160 (1945).
 - (²²) SOBEL A. E. e SNOW S. D. - *J. Biol. Chem.*, 171: 617 (1947).
-