

21. A. MARIANI. — **Determinazione contemporanea della vitamina A e del beta carotene nel fegato per via spettrofotometrica.**

Riassunto. — Per la determinazione della vitamina A e del beta-carotene negli organi, con speciale riguardo al fegato, dove le sostanze grasse non sono in quantità troppo rilevanti, è possibile eliminare il lungo procedimento di preventiva essiccazione ed estrazione con etere etilico il quale porta facilmente ad una parziale ossidazione del prodotto. Operando per saponificazione diretta con potassa alcoolica ed estrazione con etere di petrolio le operazioni si abbreviano molto e si evitano i pericoli di alterare la vitamina A.

L'estratto così ottenuto permette di eseguire la contemporanea determinazione della vitamina A e del beta-carotene per via spettrofotometrica evaporando l'etere di petrolio in corrente di azoto e riprendendo il residuo con cicloesano.

Varie misure eseguite impiegando lo spettrofotometro del Beckman hanno dimostrato che è possibile eseguire con le semplici letture ai due massimi di assorbimento della vitamina A saponificata (325 m μ) e del beta-carotene (456 m μ) il calcolo dei quantitativi presenti.

Unica accortezza da prendere nell'operazione è di impiegare per la saponificazione potassa alcoolica fatta con alcool purificato su ossido di argento (g 1,50 di AgNO₃ e g 3 di KOH per litro) impiegare azoto purificato da tracce di ossigeno, ed eseguire tutte le operazioni con grande rapidità.

Il metodo, lungamente sperimentato, permette di eseguire le determinazioni in meno di 45' e su più campioni in serie.

Résumé. — Pour le dosage de la vitamine A et du bêta-carotène dans les organes, et tout particulièrement dans le foie, où les substances grasses ne sont pas dans des quantités très considérables, il est possible d'éliminer le long procédé de la dessiccation préalable et de l'extraction par l'éther éthylique, qui peut facilement provoquer une partielle oxydation du produit. Si par contre on fait une saponification directe par la potasse alcoolique et une extraction par l'éther de pétrole, les opérations sont abrégées de beaucoup et l'on évite tout danger d'altérer la vitamine A.

L'extrait ainsi obtenu permet d'effectuer simultanément le dosage de la vitamine A et du bêta-carotène par la méthode spectrophotométrique en évaporant l'éther de pétrole dans un courant d'azote et dissolvant le résidu dans le cyclohexane.

Diverses mesures effectuées par l'emploi du spectrophotomètre de Beckman ont démontré la possibilité de faire, par les seules lectures aux

deux maxima d'absorption de la vitamine A saponifiée (325 $m\mu$) et du bêta-carotène (456 $m\mu$), le calcul des quantités présentes de ces deux substances.

Les seules choses qu'il faut particulièrement recommander dans ce procédé consistent à employer pour la saponification une potasse alcoolique préparée avec de l'alcool purifié sur l'oxide d'argent (g 1,50 AgNO_3 et g 3 KOH par litre), à employer de l'azote purifié de toute trace d'oxygène et à effectuer toutes les opérations avec une grande rapidité.

Cette méthode, longuement expérimentée, permet d'effectuer les dosages en moins de 45' et sur plusieurs prises d'essai en série.

Summary. — For the determination of vitamin A and beta-carotene in organs, especially the liver, where fat substances are not in too considerable amounts, it is possible to do away with the long procedure of previous desiccation and extraction with ethyl ether, which is likely to bring about a partial oxidation of the product. By making a direct saponification with an alcoholic solution of potassium hydroxide and by extraction with petroleum ether, the operations are greatly shortened and all dangers of altering vitamin A are avoided.

The extract thus obtained makes it possible to carry out a simultaneous determination of vitamin A and beta-carotene by the spectrophotometric procedure, by evaporating the petroleum ether in a current of nitrogen and redissolving the residue in cyclohexane.

Various measurements effected by the use of Beckman spectrophotometer have shown that it is possible, by the only readings at the two absorption maxima of the saponified vitamin A (325 $m\mu$) and beta-carotene (456 $m\mu$), to make a calculation of the amounts present of the said two substances.

The only things to observed in this procedure consist in using, for the saponification, potassium hydroxide in alcohol purified by distillation on silver oxide (g 1.50 AgNO_3 and g 3 KOH per litre), in using nitrogen purified from all traces of oxygen, and in carrying out all operations as rapidly as possible.

This method, which has been tested for a very long time, enables to make the above determinations in less than 45' and serially on a number of samples.

Zusammenfassung. — Bei der Vitamin A und β Karotenbestimmung in den Organen und im besonderen in der Leber, wo die Fettsubstanzen nicht in allzugrossen Mengen vorhanden sind, kann man das langwierige Verfahren der vorhergehenden Trocknung und Extraktion mit Aethyläther, welches leicht eine teilweise Oxydation des Produktes hervorruft,

beseitigen. Bei direkter Verseifung mit alkoholischer Kalilauge und Extraktion mit Petroläther, wird das Verfahren beschleunigt und die Gefahr der Alteration des Vitamins vermieden.

Der dabei erhaltene Extrakt, ermöglicht es, das Vitamin A und das β -Karoten gleichzeitig spektrophotometrisch zu bestimmen, indem der Petroläther im Stickstoffstrom verdampft und der Rückstand in Cyclohexan gelöst wird.

Mehrfache, mit Beckman's Spektrophotometer ausgeführte Messungen haben gezeigt, dass es möglich ist, die Berechnung der anwesenden Mengen des verseiften Vitamins A und β Karotens durch einfache Able- sung der zwei Absorptionsmaximum (325 m μ für Vitamin A und 456 m μ für β Karoten) zu ermitteln.

Die einzige Vorsichtsmassnahme besteht in der Anwendung von über Silberoxyd (g 1,50 AgNO₃ und g 3 KOH per l) gereinigtem Alkohol bei der Bereitung der alkoholischen Kalilauge und von jeglichen Sauerstoffspu- ren befreitem Stickstoff. Rasches Arbeiten ist Vorbedingung.

Diese lang erprobte Methode ermöglicht es, die Bestimmung bei meh- reren Proben in Reihenfolge und in längstens 45 Minuten auszuführen.

La vitamina A contenuta negli organi, viene determinata con suffi- ciente esattezza quasi esclusivamente servendosi della reazione di Carr e Price, seguendo varie tecniche per quanto riguarda la saponificazione e l'estrazione.

Tutti i procedimenti tendono ad assicurare, dopo una saponificazione condotta nelle condizioni più adatte per non far avvenire la ossidazione della vitamina, una estrazione completa di questa ed una eliminazione delle so- stanze che possono poi interferire con la determinazione colorimetrica.

In generale i procedimenti più in uso, e che hanno dato finora i migliori risultati, richiedono molto tempo ed una accuratezza nelle manipolazioni che li rendono non adatti per lavori in serie.

La contemporanea presenza di vitamina A e di beta carotene obbliga, inoltre, a variare la tecnica in modo da eseguire le determinazioni dei due componenti su frazioni separate e ad introdurre fattori di correzione che possono condurre a sensibili errori.

A risolvere la questione si sono particolarmente interessati Ecklen, Emmerie e Wolff ⁽¹⁾, Dann e Evelyn ⁽²⁾, Kohen e Sherman ⁽³⁾, Oser e colla-

⁽¹⁾ Zeits. Vitaminforsch, 6, 150 (1937).

⁽²⁾ Biochem. Journ., 32, 1008 (1938).

⁽³⁾ Journal Biol. Chem., 132, 527 (1940).

boratori ⁽⁴⁾, Willstaedt e With ⁽⁵⁾, Dost ⁽⁶⁾, Brockmann e Teclenburg ⁽⁷⁾. Più recentemente Fujita e Sakamoto ⁽⁸⁾, che hanno studiato accuratamente il problema, consigliano di essiccare l'organo con solfato di sodio, di eseguire poi una estrazione con etere, di saponificare il residuo del soluto eterico, di estrarre l'insaponificabile, di purificare questo con successivi lavaggi, di essiccare di nuovo, evaporare, sciogliere in cloroformio e di eseguire su una porzione la reazione di Carr e Price per la vitamina A e sull'altra la lettura diretta al Pulfrich per la determinazione del beta carotene.

Con una formula abbastanza semplice è possibile infine ricavare il contenuto vero di vitamina A sottraendo dal valore ottenuto con la reazione di Carr e Price quello dovuto alla reazione del beta carotene con il tricloruro di antimonio.

A parte la determinazione colorimetrica eseguita al fotometro di Pulfrich ed agli inconvenienti che sono insiti a tale metodo di determinazione quando sia eseguita con il reattivo di Carr e Price sulla stessa soluzione che contiene i due componenti, e che verrò in seguito a segnalare, è da notare che tutti i sopracitati AA. impiegano l'etere etilico per l'estrazione dell'insaponificabile. Ora questa tecnica conduce a tre grandi inconvenienti:

1) l'etere deve essere assolutamente privo di perossidi per evitare una parziale ossidazione della vitamina;

2) l'estratto eterico deve essere sottoposto ad un lavaggio accurato per allontanare i saponi formati;

3) l'estratto eterico deve essere disidratato ed evaporato in corrente di azoto.

Mentre la prima difficoltà può essere superata impiegando l'etere privato di perossidi, al momento dell'uso, con idrato ferroso, restano le altre due per cui l'impiego dell'etere etilico per l'estrazione richiede un tempo molto lungo con conseguente pericolo di ottenere un residuo sensibilmente ossidato e valori difficilmente riproducibili.

Dovendo eseguire un numero rilevante di determinazioni di beta carotene e vitamina A in fegati particolarmente arricchiti in beta carotene, ho potuto constatare che i metodi consigliati non si prestavano sia per il tempo troppo lungo necessario alla loro esecuzione, sia perchè, trovandomi in presenza di quantità eccezionali di beta carotene, questo aveva

⁽⁴⁾ Ind. Eng. Chem. An. Ed., 15, 724 (1943).

⁽⁵⁾ Z. physiol. Chem., 253, 40 (1938).

⁽⁵⁾ Z. physiol. Chem., 253, 40 (1938); Z. Vitaminforschung, 9, 8 (1939).

⁽⁶⁾ Klin. Woch., 16, 273, (1937).

⁽⁷⁾ Z. physiol. Chem., 221, 117, (1933).

⁽⁸⁾ Biochem. Zeitschr., 308, 334 (1941).

una forte influenza sulla determinazione della vitamina A con il reattivo di Carr e Price. Infatti, pur non coincidendo i massimi di assorbimento per le due reazioni con il tricloruro di antimonio (con il beta carotene si ha un massimo a 590 $m\mu$, mentre con la vitamina A a 620 $m\mu$), il valore dell' $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ per il beta carotene, che è uguale a 420, è troppo elevato. Nei casi in cui il beta carotene viene ad essere in quantità maggiore di quella normalmente riscontrabile in un fegato, ho praticamente sperimentato che, con i metodi colorimetrici, non era possibile ottenere una esatta determinazione delle due sostanze.

Nel fegato la vitamina A si trova in quantità molto più rilevante che non negli altri organi, per cui è possibile eseguire l'estrazione con procedimenti molto più rapidi ed impiegando quantitativi molto ridotti di materiale di partenza.

Recentemente Gallup e Hoefer ⁽⁹⁾, eliminando la preventiva essiccazione con solfato sodico, hanno messo a punto un metodo molto rapido con il quale si può determinare la vitamina A nel fegato con il reattivo di Carr e Price in poco più di mezz'ora. La rapidità del metodo è ottenuta con i seguenti accorgimenti:

- 1) saponificazione a caldo con potassa alcolica eseguita direttamente su un grammo di fegato;
- 2) estrazione con unico sbattimento con etere di petrolio dal saponificato portato al 50% di alcool;
- 3) evaporazione di una aliquota dell'estratto nella stessa vaschetta del colorimetro dove si fa avvenire la reazione con il tricloruro di antimonio.

Il metodo, da me applicato su fegati normali, praticamente esenti di beta carotene, mi ha dato risultati buonissimi e soprattutto la possi-

bilità di lavorare in serie con una rapidità sorprendente ottenendo buona concordanza di dati.

Volendo eliminare i sopracitati inconvenienti della determinazione colorimetrica con il reattivo di Carr e Price, ho voluto provare se l'estratto ottenuto da un grammo di fegato secondo il procedimento sopracitato potesse essere sottoposto a lettura diretta spettrofotometrica a 325 $m\mu$.

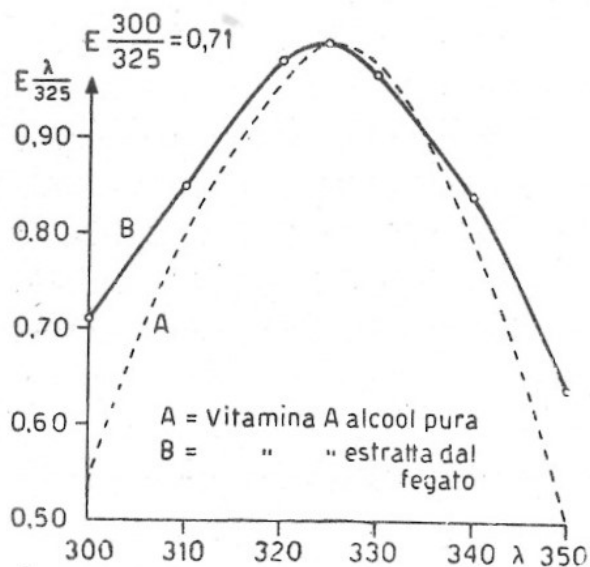


FIG. 1.

⁽⁹⁾ Ind. Eng. Chem. An. Ed., 18, 288 (1946).

Per fare questo ho sciolto il residuo dell'evaporazione dell'estratto in etere di petrolio in circa 5 cm³ di cicloesano e ne ho ricavato la curva di assorbimento nel campo 275-500 m μ . Dopo alcuni infruttuosi tentativi, dovuti alla ossidazione del prodotto per effetto dell'alcool impiegato nella saponificazione che non era stato purificato a sufficienza, ho ottenuto infine una curva che riporto nella fig. 1. Dall'andamento di tale curva, che rappresenta la variazione del rapporto $E \frac{\lambda}{325}$ in funzione della lunghezza

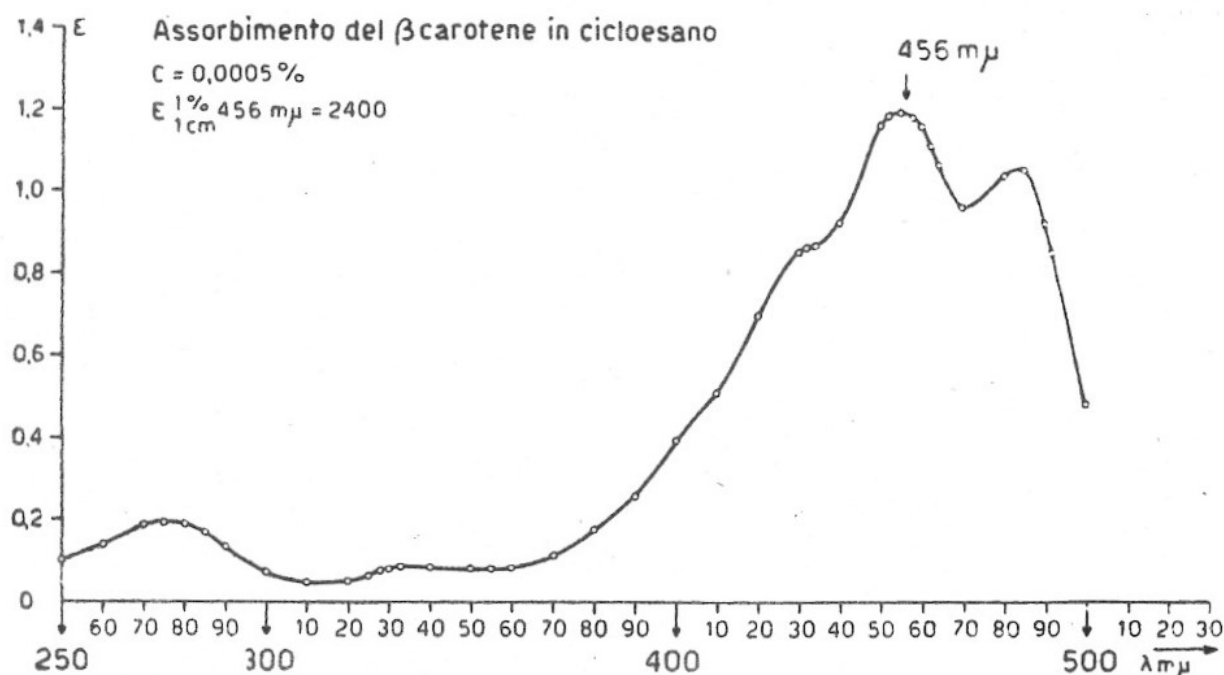


FIG. 2.

d'onda (riportato solo nel campo 300-350 m μ), è possibile rilevare il massimo netto a 325 m μ caratteristico della vitamina A nella forma alcoolica ed un rapporto fra gli assorbimenti a 300 e 325 m μ di circa 0,70. Tale rapporto, secondo quanto riportato da Oser e coll. ⁽¹⁰⁾ permette una valutazione diretta della vitamina A dal valore dell'assorbimento al massimo. I valori infatti ricavati col metodo spettrofotometrico diretto applicato a più fegati di ratti normali, mi hanno dato una buona concordanza con il metodo colorimetrico al cloruro di antimonio.

Avendo in mente di determinare sulla stessa soluzione il beta carotene anche se presente in forti quantità, ho tracciato una curva di assorbimento di questo in soluzione di cicloesano tra i 250 e i 500 m μ .

Dalla fig. 2 che mostra tale curva per una concentrazione di 0.0005% si rileva il massimo caratteristico che questa sostanza mostra a 456 m μ e la concordanza dell' $E \frac{1\%}{1\text{cm}}$ a questo massimo = 2400, con i dati riportati in letteratura ⁽¹¹⁾.

⁽¹⁰⁾ Ind. Eng. Chem. An. Ed., 17, 559 (1945).

⁽¹¹⁾ Biochem. Journ., 35, 693 (1941).

La curva di assorbimento del beta carotene in soluzione di cicloesano mostra una caratteristica rispetto a quella della vitamina A. Infatti a 325 m μ essa è molto prossima al minimo di assorbimento. Per tale fatto, trovandosi in contemporanea presenza la vitamina A ed il beta carotene, l'assorbimento della prima a 325 m μ viene ad essere variato di pochissimo anche quando il beta carotene è presente in forti quantità.

Ponendo questo fatto in termini quantitativi si rileva la grande differenza dei valori dell' $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ a 325 m μ , che per la vitamina A è di 1750 mentre per il beta carotene è di appena 73.

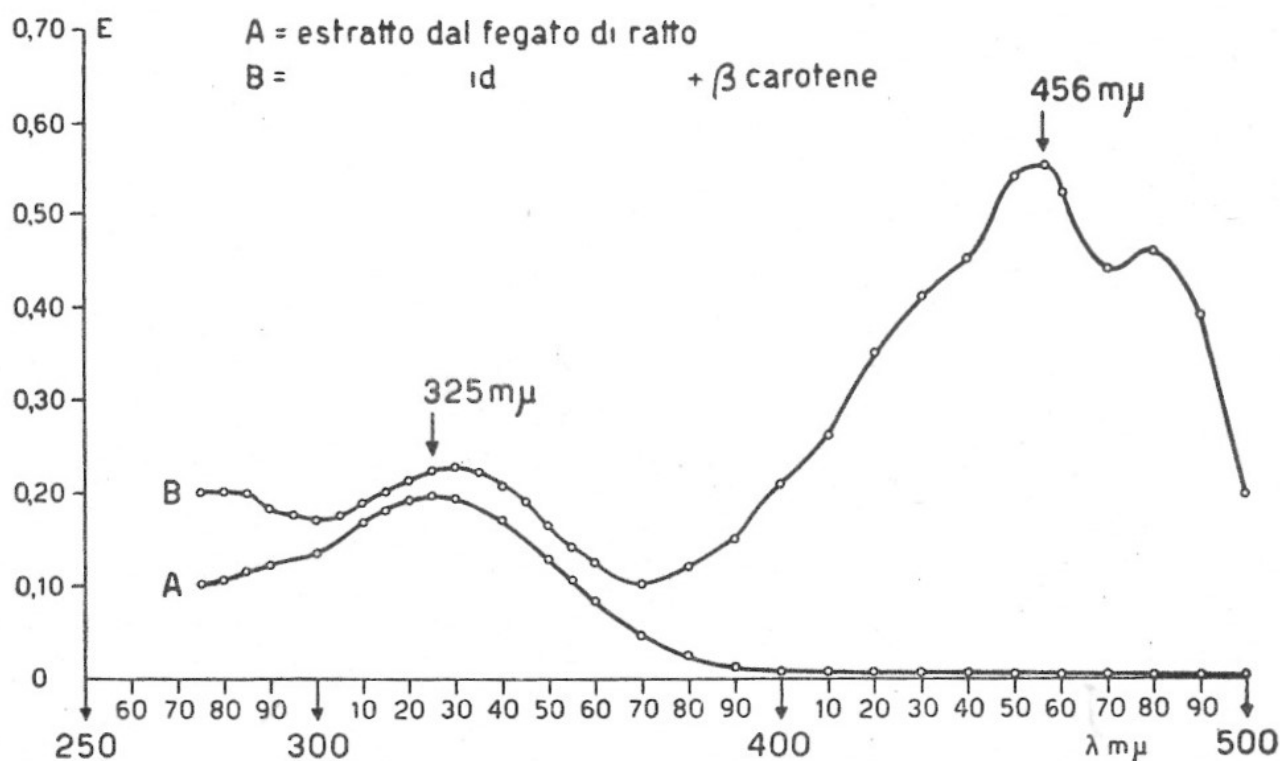


FIG. 3.

Per confermare la possibilità della determinazione spettrofotometrica contemporanea della vitamina A e del beta carotene estratti dal fegato, ho sottoposto due campioni di g 1 ciascuno di uno stesso fegato al procedimento di estrazione rapido sopra accennato aggiungendo ad uno di essi, prima della saponificazione mg 0,05 di beta carotene puro.

Nella fig. 3 sono riportate in confronto le due curve.

Come si può rilevare, l'aumento dell'assorbimento a 325 m μ che l'estratto dal fegato ha subito per l'aggiunta di beta carotene ed il valore dell'assorbimento a 456 m μ corrispondono ambedue al quantitativo di beta carotene aggiunto, dato che nel fegato di partenza esso era praticamente assente.

Al fine di poter accertare l'errore massimo del metodo nella determinazione spettrofotometrica della vitamina A, su quattro porzioni di g 1 di un medesimo fegato omogeneizzato nelle sue parti è stata determinata la vitamina contenuta naturalmente e su altre due la vitamina

totale dopo aggiunta di cm^3 0,1; 0,2 e 0,3 di soluzione titolata precedentemente per via spettrofotometrica.

Nella tabella seguente sono riportati i risultati ottenuti.

N.	Vit. A aggiunta	Assorbimento a 325	Vit. A totale trovata	Vit. A recuperata
1	—	0.416	47,6	
2	—	0.405	46,7	
3	—	0.420	48,0	
4	—	0.411	48,2	
		media 47,6 scarto 1,25 %		
5	12	0.524	60,0	12,4 (103 %)
6	24	0.612	70,0	22,4 (94 %)
7	36	0.725	83,0	35,4 (98 %)

Dai dati ottenuti sperimentalmente ho fissato il metodo completo per la determinazione contemporanea della vitamina A e del beta carotene nel fegato che riporto di seguito nei particolari.

APPARECCHIO DI MISURA

Per le misure di assorbimento fra i 300 e i 500 $\text{m}\mu$ è stato impiegato uno spettrofotometro Beckman tipo DU a cellula fotoelettrica. Come sorgente luminosa è stata adoperata la lampada a filamento di tungsteno alimentata da batterie di accumulatori. Tutte le misure sono state eseguite mantenendo fisso il bottone della sensibilità e variando la fenditura per ottenere il 100% di trasmissione con il cicloesano puro.

Per le misure a $\lambda < 300 \text{ m}\mu$ è stata impiegata la lampada ad idrogeno alimentata dal trasformatore livellatore adattabile allo stesso spettrofotometro.

REATTIVI

A) Potassa alcoolica al 5% ottenuta impiegando dell'alcool a 95° purificato per distillazione su ossido di argento ;

B) etere di petrolio puro a p. e. 40-70° C di densità 0,650-0,670 ;

C) cicloesano purificato per distillazione frazionata.

PROCEDIMENTO

Il fegato, asportato di fresco, e tenuto alcuni minuti su carta da filtro dura, viene tagliuzzato in piccoli pezzi.

Grammi 1 di esso viene posto in un grosso tubo da centrifuga dove vengono messi 5 cm^3 di potassa alcoolica ; il tubo, chiuso da un piccolo re-

frigerante a ricadere o da una semplice canna sfinata, viene immerso in b. m. a 75° C. Dopo circa 30', o quando il fegato si è completamente disgregato, il tubo viene tolto dal b. m. e raffreddato in acqua corrente. Il contenuto del tubo, diluito con egual volume di acqua distillata, viene posto in una grande provetta a tappo smerigliato ove si dibatte per 2' con 10 cm³ di etere di petrolio. Il liquido, parzialmente emulsionato, viene posto di nuovo nel tubo da centrifuga e centrifugato, chiuso con tappo di sughero, per pochi minuti a bassa velocità, in modo da far separare la fase eterea. Di questa vengono presi 5 cm³ che sono posti in una capsulina di vetro e portati in una stufa autoregolata a 40° nella quale può essere fatto del vuoto. Regolando la depressione in modo da avere una leggera ebollizione, si può ottenere la completa evaporazione del solvente in meno di 10'.

Il residuo viene ripreso con cicloesano, portato a 10 cm³ e, nel più breve tempo possibile, sottoposto a misura spettrofotometrica diretta a 456 e 325 mμ. Dal valore letto a 456 mμ si ricava la quantità di beta carotene sapendo che a questo massimo il valore dell' $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ è uguale a 2400. Dal quantitativo di beta carotene trovato si calcola il valore da sottrarre alla lettura fatta a 325 mμ per ricavare la vitamina A e questo si fa sapendo che l' $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ del beta carotene al massimo di assorbimento della vitamina A è uguale a 73. Dal valore dell'assorbimento a 325 mμ, corretto per la presenza del beta carotene, si ricava la quantità di vitamina, sapendo che il valore dell' $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ di questa a 325 mμ è uguale a 1750.

Esempio: Grammi 1 di fegato, saponificato, viene estratto con 10 cm³ di etere di petrolio; 5 cm³ di questi vengono evaporati nel vuoto ed il residuo portato a 10 cm³ con cicloesano. Sottoposto ad analisi spettrofotometrica, per uno spessore di liquido di 1 cm, si sono avute le seguenti letture:

$$E_{325\text{ m}\mu} = 0,225$$

$$E_{456\text{ m}\mu} = 0,550$$

Beta carotene presente:

$$1 : 2400 = X : 0,550$$

$$X = \text{mg } 0,23 \text{ in } 100 \text{ cm}^3$$

$$\text{mg } 0,046 \text{ in g } 1 \text{ di fegato}$$

Valore da sottrarre alla lettura a 325 mμ:

$$73 \times 0,00023 = 0,017$$

Assorbimento a 325 mμ dovuto alla vitamina A:

$$0,225 - 0,017 = 0,208$$

Vitamina A presente :

$$1 : 1750 = Y : 0,208$$

$$Y = \text{mg } 0,12 \text{ in } 100 \text{ cm}^3$$

mg 0,024 in g 1 di fegato

Il metodo, così concepito, permette la determinazione dei due componenti in breve tempo, eliminando tutti gli inconvenienti dei metodi precedentemente adottati e si presta particolarmente ai lavori in serie con risultato sicuro.

Roma. — Istituto Superiore di Sanità - Laboratorio di Biologia, novembre 1948.
