

**25. Giuseppe PRUNER e Aldo GAUDIANO. — Sull'eventuale presenza della vitamina B<sub>1</sub> nella molecola dell'insulina.**

**Riassunto.** — Gli Autori hanno fatto uno studio sulla fluorescenza dell'insulina, discutendone le caratteristiche, le cause e le differenze dalla fluorescenza del tiocromo.

**Résumé.** — Les AA., partant de l'observation que l'insuline, oxydée par le ferricyanure de potassium en milieu alcalin, présente une fluorescence semblable à celle qui est produite par un traitement analogue de la vitamine B<sub>1</sub>, font une comparaison entre la fluorescence obtenue de plusieurs échantillons d'insuline hydrolysés ou non, et celle obtenue de la thiamine.

Ils arrivent à la conclusion que la fluorescence n'est pas due, comme d'autres l'ont supposé, à la présence de vitamine B<sub>1</sub> dans la molécule d'insuline, mais à des impuretés probablement d'origine protéique. Elle donc être un indice utile pour juger de la pureté des préparations d'insuline peut.

**Summary.** — The AA., starting from the observation that insulin, oxidized with potassium ferricyanide in alkaline solution, shows a fluorescence similar to that obtained by a like treatment of vitamin B<sub>1</sub>, make a comparison between the fluorescence obtained from various samples of insulin, whether hydrolyzed or not, and that obtained from thiamine.

They come to the conclusion that this fluorescence is not due, as has been supposed by others, to the presence of vitamin B<sub>1</sub> in the molecule of insulin, but to impurities, probably of proteic origin. Therefore, it can be useful indication for judging of the purity of insulin preparations.

**Zusammenfassung.** — Von der Beobachtung ausgehend, dass Insulin, in alkalischer Lösung mit Kalium Ferricyanid oxydiert eine ähnliche Fluoreszenz aufweist wie das analog behandelte Vitamin B, machen die Verfasser einen Vergleich zwischen der Fluoreszenz von Thiamin und jener, die man mit verschiedenen hydrolisierten und nicht hydrolisierten Insulinproben erhält.

Sie schliessen daraus, dass die Fluoreszenz nicht, wie andere A. annehmen von der Anwesenheit des Vitamins B im Molekül des Insulins abhängt, sondern von Unreinigkeiten, die wahrscheinlich proteischer Natur sind. Diese Fluoreszenz kann somit ein nützliches Mass, für die Reinheit der Insulinpräparate darstellen.

---

Esperimenti di confronto tra l'insulina e la vitamina B<sub>1</sub>, eseguiti da vari Autori, come p. e. da Stepp e Schröder (1), H. v. Euler e B. Högborg (2) ed altri, hanno mostrato l'esistenza di interazioni fra queste due sostanze nel metabolismo dei carboidrati, tanto da far ritenere fondata l'idea di un rapporto chimico fra l'insulina e la B<sub>1</sub> o sostanze ad essa affini.

Interessanti a tale riguardo sono le osservazioni fatte da W. Awe (Ist. Farm. Università di Breslavia) (3), il quale sostiene la possibilità della presenza, in quantità minima, della vitamina B<sub>1</sub> o di un suo derivato fosforato nella molecola dell'insulina. Egli ritiene anche possibile la formazione della vitamina dall'unione di frazioni derivanti dall'idrolisi dell'insulina.

Questa ipotesi è fondata sull'osservazione, fatta dall'Autore, che l'insulina dà una reazione simile all'aneurina, se trattata con NaOH e K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>]; estraendo il prodotto della reazione con alcool isobutilico ed osservandolo alla luce ultravioletta, si nota una fluorescenza azzurra simile a quella del tiocromo. Inoltre egli ha trovato che gli spettri di assorbimento dei prodotti di ossidazione dell'insulina accennano alla presenza di tiocromo.

Prendendo lo spunto da queste succinte osservazioni fatte da Awe, e ritenendo il problema degno di uno studio più profondo, abbiamo voluto sottoporre campioni di insulina più o meno attivi ad una serie di esperimenti, per accertare la presenza o meno della vitamina B<sub>1</sub> nella molecola di quest'ormone.

Le prove fatte fino ad oggi non hanno dato esito positivo; riteniamo comunque opportuno raccogliere in una prima nota i risultati fin qui registrati.

In una prima serie di esperienze abbiamo operato su vari campioni d'insulina, a diversa attività, senza ricorrere ad una preventiva idrolisi. Abbiamo poi voluto provare se, ricorrendo all'idrolisi chimica o enzimatica, si fosse riusciti a mettere meglio in evidenza la presenza della vitamina B<sub>1</sub>.

## PARTE SPERIMENTALE

Descriviamo brevemente la tecnica seguita.

Abbiamo operato in genere con soluzioni contenenti 5 mg di insulina

(1) Münch. med. Woch., 82, 1311 (1935); 83, 763 (1936).

(2) Münch. med. Woch., 85, 88 (1938).

(3) Naturwissensch., 28, 91 (1940).



per  $\text{cm}^3$ . Le soluzioni venivano fatte in acqua distillata, addizionata della minima quantità di HCl necessaria ad avere completa solubilità dell'insulina. Queste soluzioni erano talora (nel caso di campioni a scarsa attività) leggermente colorate in giallo-bruno, e mostravano in tale caso una certa fluorescenza ai raggi U.V. I campioni più attivi (25 U.I./mg) davano invece soluzioni perfettamente incolori, ma anch'esse un po' fluorescenti, sebbene in misura molto minore. Su  $2 \text{ cm}^3$  di questa soluzione procedevamo alla determinazione della vitamina  $B_1$  secondo il metodo di Jansen al tiocromo, attenendoci alle modalità di esecuzione consigliate da Arcangeli e Trucco (4).

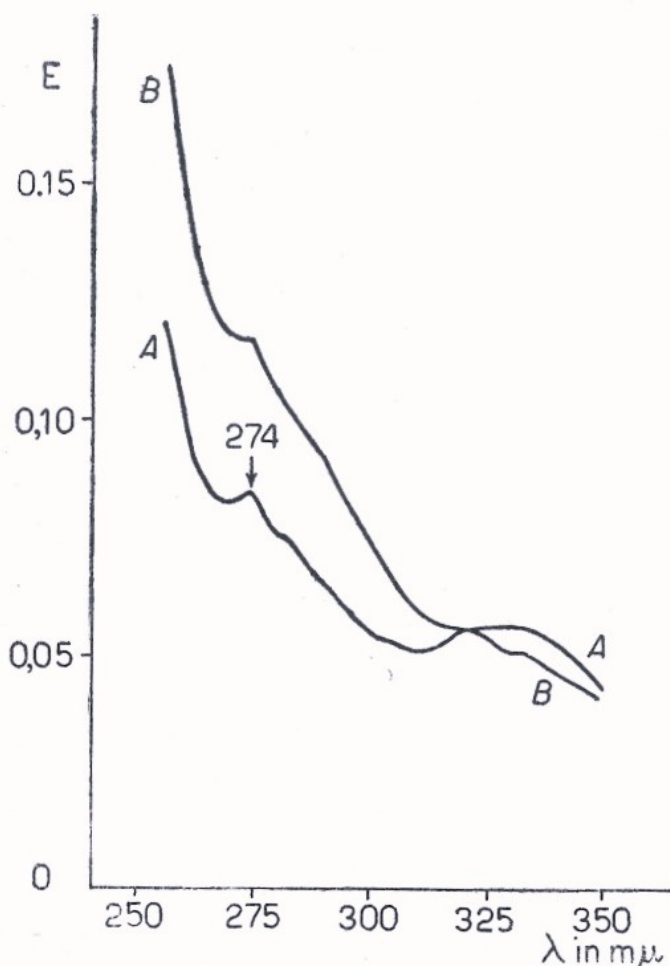


FIG. 1. — A: Spettro d'assorbimento dell'insulina N. 2 (25 U.I./mg) ossidata (estratto isobutanolico). — B: Id. non ossidata.

fluorescenti, sebbene in misura molto minore. Su  $2 \text{ cm}^3$  di questa soluzione procedevamo alla determinazione della vitamina  $B_1$  secondo il metodo di Jansen al tiocromo, attenendoci alle modalità di esecuzione consigliate da Arcangeli e Trucco (4).

Abbiamo notato anzitutto che la fluorescenza della soluzione isobutilica non era, come nel caso del tiocromo, bleu-viola, ma tendeva un po' al verdognolo. Aggiungendo HCl, il colore passava al bleu-viola, intensificandosi. È noto invece che, aggiungendo HCl ad una soluzione isobutilica di tiocromo, la fluorescenza scompare quasi del tutto perchè si forma il cloridrato di tiocromo, che ha solo una debole fluorescenza giallastra.

Abbiamo inoltre notato che durante l'estrazione con alcool isobutilico del prodotto fluorescente, questo si ripartiva in misura pressochè uguale fra la fase acquosa e quella isobutilica, mentre il tiocromo ha un coefficiente di ripartizione molto spostato in favore della fase alcoolica.

Allo scopo di vedere se la fluorescenza fosse dovuta, come nel caso del tiocromo, a un prodotto di ossidazione per opera del ferricianuro, abbiamo fatto parallelamente varie prove su soluzioni d'insulina non ossidate con ferricianuro, ma aventi sempre la stessa concentrazione in NaOH. Abbiamo potuto constatare un aumento della fluorescenza nei campioni ossidati; tale aumento non era però sempre egualmente evidente.

(4) Ann. chim. applicata, 33, 95 (1943).



Ci sembra interessante far rilevare che la fluorescenza era alquanto maggiore nei prodotti a minore attività (10 U.I./mg), mentre era assai debole, ma sempre visibile, in quelli più attivi (25 U.I./mg). Le caratteristiche di questa fluorescenza erano in ogni caso corrispondenti a quelle sopradescritte.

Allo scopo di individuare le sostanze responsabili della fluorescenza abbiamo eseguito gli spettri di assorbimento nell'UV delle soluzioni isobutiliche ottenute come già detto. Tali spettri abbiamo eseguito, servendoci dello spettrofotometro a quarzo di Beckman mod. DU, su soluzioni ossidate e non ossidate di insuline variamente attive. Riportiamo gli spettri ottenuti con due tipi di insulina (fig. 1 e fig. 2), accanto a quello dato da una soluzione isobutilica di tiocromo (fig. 3). Come si vede, questo ha un massimo di assorbimento a 276-277 m $\mu$ , mentre negli altri tale

massimo non compare. E' da notare la differenza fra gli spettri delle varie insuline, anche se prodotte dalla stessa Casa. Su tale punto, che ci sembra suscettibile di interessanti sviluppi nel campo analitico contiamo di tornare in una prossima nota.

Un'altra prova, che pensavamo potesse essere decisiva, è stata da noi tentata facendo agire sulle soluzioni di insulina un estratto di tiaminasi, ottenuto dai mitili (*Mytilus galloprovincialis*) secondo le modalità indicate da Fabriani, Fratoni, e Spadoni <sup>(5)</sup>. Anche dopo l'azione

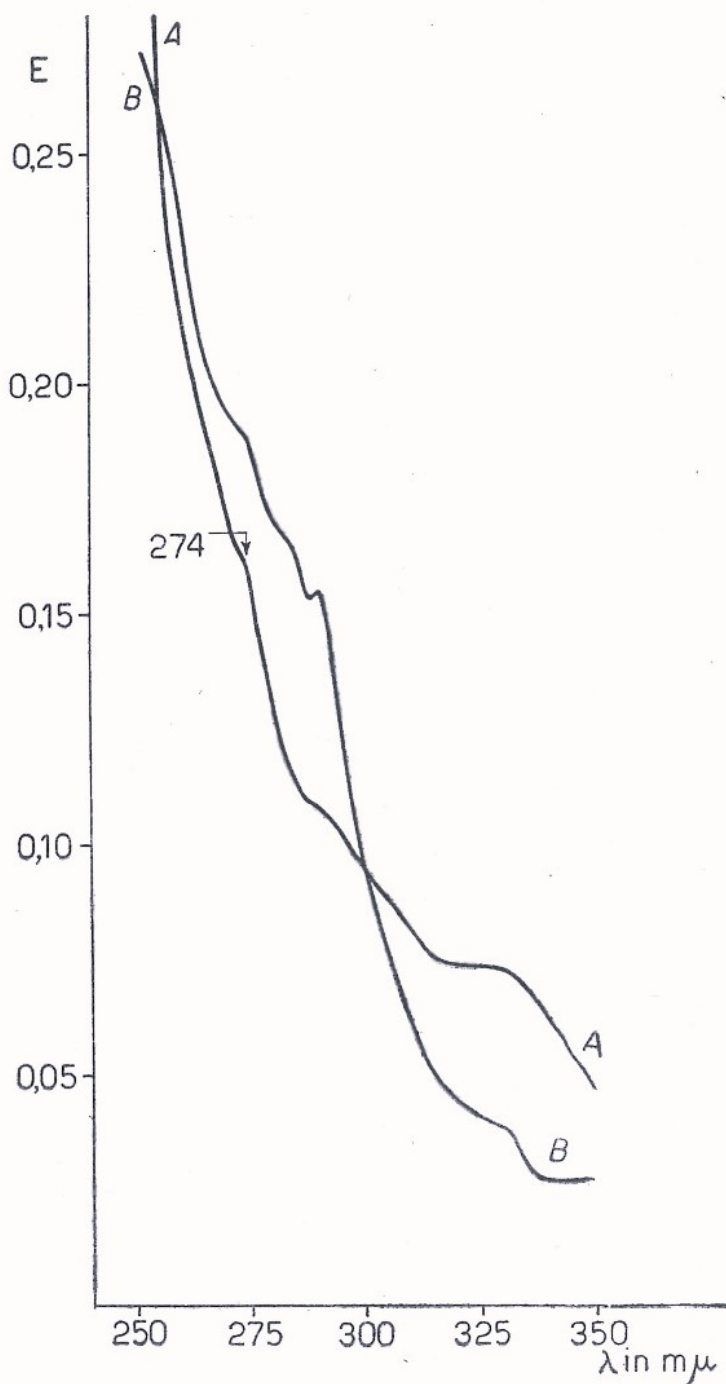


FIG. 2. - A: Spettro d'assorbimento dell'insulina N. 10 (10 V.I./mg) ossidata) estratto isobutanolico). - B: Id. non ossidata.

<sup>(5)</sup> Quad. nutriz., 10, 98 (1947).



di tale enzima, che distrugge la vitamina  $B_1$ , abbiamo ottenuto, in genere, soluzioni che avevano una maggiore fluorescenza dopo l'ossidazione con ferricianuro. Le misure erano però complicate dal fatto che gli estratti enzimatici erano anch'essi fluorescenti, e non sempre in egual misura.

Diremo ora brevemente delle prove fatte su insulina variamente idrolizzata. Elenchiamo prima i sistemi d'idrolisi da noi seguiti:

1) Idrolisi a pH 2 con pepsina (in lamelle) all'1%, di soluzioni di insulina al 0,5% tenute a 45° per 24, 48, 72 ore.

2) Idrolisi con estratto enzimatico di fegato, allo scopo di determinare la  $B_1$  eventualmente presente nel nucleo dell'insulina come estere dell'acido pirofosforico — per quanto fino ad oggi il fosforo non sia stato trovato nell'insulina —. L'estere pirofosforico della tiamina, la cocarbossilasi, non dà infatti la reazione del tiocromo perchè non è estraibile con alcool isobutilico, ma la dà dopo l'idrolisi enzimatica.

Per la preparazione dell'estratto enzimatico dal fegato abbiamo seguito il metodo suggerito da Hennessey e Cerecedo <sup>(6)</sup>.

Ottenuto l'estratto secco, abbiamo eseguito la prima prova come

segue: 50 mg di insulina, sciolti in 4 cm<sup>3</sup> di acido acetico al 2%, sono stati riscaldati per 15' a b. m. a ricadere; quindi il liquido è stato portato con NaOH N/10 a pH 7.

Dopo aggiunta di g 0,20 di estratto di fegato, si è tenuto il campione in termostato a 37° per 3 ore. Il liquido è stato acidificato con una goccia di acido acetico, bollito, raffreddato e centrifugato.

Su 2 cm<sup>3</sup> è stata fatta la solita prova della  $B_1$ .

3) Idrolisi come la precedente, ma con l'impiego della takadiastasi al posto dell'estratto epatico.

4) Idrolisi con poltiglia di fegato fresco di coniglio, tenendo l'insulina intimamente mescolata a questo preparato per 4 ore in termostato a 37°. In questo caso la fluorescenza è risultata identica a quella data dal

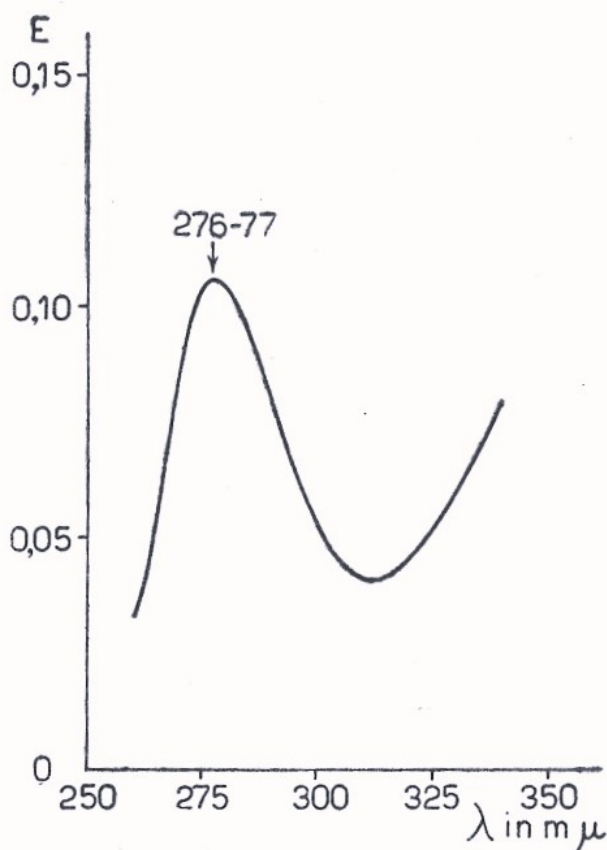


FIG. 3. - Spettro d'assorbimento del tiocromo (in isobutanolo).

<sup>(6)</sup> J. Amer. Chem. Soc., 61, 179 (1939).



campione in bianco, preparato con solo fegato, quindi dovuta alla B<sub>1</sub> normalmente contenuta nel fegato.

5) Idrolisi per 15' su b. m., a ricadere, con HCl N/1 e 2,5 N, di soluzioni di insulina all'1,2%. Dopo queste idrolisi abbiamo neutralizzato e fatto agire l'estratto epatico e la takadiastasi come ai nn. 2 e 3.

6) Idrolisi con HCl N/30 e N/1 di soluzioni di insulina al 0,5% autoclavate 30' a 120°.

7) Idrolisi per 20' a 45° con NaOH N/1 di soluzioni al 0,5%.

In tutti questi esperimenti abbiamo riscontrato una fluorescenza sempre molto limitata, corrispondente, per le insuline più fluorescenti, a un contenuto ipotetico di vitamina B<sub>1</sub> nel rapporto 1:20000 circa. Se si pensa che il rapporto fra i pesi molecolari della tiamina e dell'insulina è 337:35100, cioè 1:104, si vede che siamo sempre ben lungi dall'avere anche una sola molecola di B<sub>1</sub> per ognuna di insulina. Ciò anche volendo fare astrazione dal fatto che il rapporto 1:20000 si verifica per i campioni più fluorescenti (cioè più impuri) e che tale rapporto è calcolato sulla fluorescenza totale della fase isobutilica, le cui diversità della fluorescenza del tiocromo abbiamo già messo in evidenza.

Le nostre esperienze, anche se non possono considerarsi definitive, portano tuttavia a ritenere che i rapporti tra vitamina B<sub>1</sub> ed insulina sono puramente funzionali e non derivano da diretti legami di natura chimica. Questo è d'altronde in accordo con le osservazioni di Awe <sup>(3)</sup> che, pur formulando l'ipotesi, basata su ricerche chimiche, della presenza di tiamina nella molecola dell'insulina, ammette che nessuna attività antiberiberica ha mostrato l'insulina nei piccioni.

Ci si può domandare ora a che cosa sia dovuta la fluorescenza dei preparati di insulina, trattati nella maniera sopraindicata. Il fatto che tale fluorescenza è maggiore nei composti meno attivi fa supporre che essa sia dovuta ad impurezze; non resta però esclusa la possibilità che una piccola parte di questa fluorescenza sia dovuta all'insulina come tale; anche i campioni più attivi, infatti, sono debolmente fluorescenti. Sulla natura delle sostanze a fluorescenza estranea non è facile dare indicazioni precise. Tutto lascia però supporre che si tratti di impurezze costituite da sostanze proteiche o dai loro prodotti di demolizione, provenienti o no dalla stessa molecola dell'insulina. Molte sostanze di questo tipo presentano infatti una notevole fluorescenza, come hanno mostrato di recente gli studi di F. Vlès <sup>(7)</sup>. Per avvalorare tale ipotesi, abbiamo eseguito alcune prove con un idrolisato di caseina esente da B<sub>1</sub>. Sottoposto al trattamento già descritto, esso presenta una fluorescenza assai

<sup>(7)</sup> Arch. phys. biol., 16, 137 (1943).



simile, per colore e per le altre caratteristiche, a quella mostrata dall'insulina.

Se, come pare assodato dalle nostre ricerche, la fluorescenza è dovuta ad impurezze di natura proteica, essa può essere un utile indizio per giudicare sull'attività e sulla purezza del prodotto. Mentre da un canto, infatti, era noto da tempo che spesso i preparati di insulina presentano un'attività tanto maggiore quanto minore è il loro contenuto di N, dall'altro è stato segnalato di recente da A. Friedmann <sup>(8)</sup> che essi danno disturbi se impuri per sostanze proteiche.

Il criterio della misura della fluorescenza, pur non avendo ancora quel carattere rigorosamente quantitativo che speriamo potergli conferire col proseguimento dei nostri studi, può servire utilmente per giudicare in maniera rapida e abbastanza sicura della purezza dei preparati insulinici.

Roma. — Istituto Superiore di Sanità - Laboratorio di biologia. 7 febbraio 1949.

(<sup>8</sup>) Schweiz. med. Woch., 72, 916 (1942).

---