

La determinazione degli acidi chinurenico e xanturenico

Di LUIGI MUSAJO e DINO COPPINI¹, Modena

Ci occupiamo da tempo di questo argomento² e riportiamo in questa nota i risultati ai quali siamo recentemente pervenuti.

Per quanto l'acido chinurenico sia stato isolato da Liebig fin dal 1853 e poi sia stato notevolmente studiato, pure un metodo di determinazione di piccole quantità non è stato finora messo a punto. Si devono naturalmente ricordare i metodi di HOFMEISTER³, SCHMIEDEBERG e SCHULZEN⁴, JAFFE⁵, CAPALDI⁶ applicabili alle urine e fondati sulla defecazione con reattivi vari (acido fosfowolframico, acetato di piombo, alcole, cloruro di bario e ammoniaca), concentrazione del filtrato, acidificazione e pesata dell'acido chinurenico che si separa. Fra questi metodi, non applicabili peraltro a piccole quantità di sostanza, quello del CAPALDI (defecazione con soluzione di cloruro di bario al 10% contenente il 5% di ammoniaca, concentrazione del filtrato, acidificazione e purificazione del precipitato ottenuto dopo lungo riposo, per soluzione in ammoniaca e riprecipitazione con acido cloridrico, quindi filtrazione e pesata) è stato tuttavia utilizzato da vari autori anche in tempi abbastanza recenti⁷. Non mancano però le critiche anche a tale metodo, e la necessità di disporre di un procedimento migliore viene nettamente indicata da ricercatori che si sono occupati dell'argomento; ricordiamo fra questi JACKSON⁸ che ha studiato l'eliminazione dell'acido chinurenico in specie differenti scelte in differenti famiglie di carnivori ospiti del Giardino Zoologico di New York.

A questo si aggiunga che il procedimento può portare a pesare insieme acido chinurenico e acido xanturenico, se quest'ultimo è presente, come accade in alcuni casi. Questa circostanza a noi nota non è stata considerata dai ricercatori che si sono occupati dell'acido chinurenico. Ne consegue che molti dati riguardanti tale acido andranno riesaminati da questo punto di vista e che per condurre indagini precise bisognerà poter determinare separatamente le due sostanze.

È noto che queste: l'acido chinurenico o acido 4-ossichinolin-2-carbonico e l'acido xanturenico o acido

4-8-diossichinolin-2-carbonico scoperto più di recente¹ si formano entrambe *in vivo* dal triptofano².

Chinurenina e 3-ossichinurenina³ sono termini intermedi. È anche noto che la importanza biologica di questi due derivati chinolinici ha dato luogo ad una larga serie di lavori, in diversi indirizzi, dall'esame dei quali risulta evidente l'interesse di disporre di metodi di determinazione sensibili.

Per l'acido xanturenico è stata utilizzata la colorazione verde che si ottiene (in condizioni diverse) con i sali ferrosi e con i sali ferrici. Noi ci siamo spesso serviti del solfato ferroso per ricerche quantitative, ma non abbiamo pubblicato lavori in proposito. MILLER e BAUMANN⁴ hanno invece utilizzato il cloruro ferrico in soluzione etilalcolica ed hanno descritto un procedimento che, applicato all'urina, si può così riassumere: l'urina diluita (p_H 2,5) addizionata di cloruro sodico, viene agitata meccanicamente con una miscela di etere etilico e alcole etilico (15:1). Il residuo dell'estratto etero-alcolico disciolto in alcole etilico assoluto e la soluzione addizionata di 1 cm³ di soluzione di cloruro ferrico al 5% pure in alcole etilico assoluto. La colorazione verde ottenuta viene quindi valutata con i metodi noti.

Se però la concentrazione dell'acido xanturenico sorpassa i 50 γ per cm³ di urina l'estrazione deve essere ripetuta tante volte finché i vari estratti esaminati separatamente non ne dimostrino la completa estrazione.

PORTER, CLARK e SILBER⁵ estraggono invece l'acido xanturenico con alcole isoamilico, diluiscono l'estratto con alcole etilico e aggiungono 0,2 cm³ di soluzione di cloruro ferrico al 5% in alcole assoluto.

Ma nonostante questi metodi il problema non è risolto perchè permane sempre la difficoltà della ricerca e determinazione dell'acido chinurenico. La separazione dei due acidi ossichinolin-carbonici non è facile: allorchè si è trattato di ottenerli allo stato puro da urine nelle quali erano entrambi contenuti, sono state necessarie molte laboriose cristallizzazioni dei prodotti grezzi⁶ oppure si è dovuto ricorrere alla sublima-

¹ Istituto di Chimica Farmaceutica dell'Università di Modena.

² Vedi L. MUSAJO e D. COPPINI, Atti Soc. Nat. e Mat. Modena 78, 113 (1947). - L. MUSAJO, D. COPPINI e M. MANCINI, *idem*, 79, 70 (1948). - L. MUSAJO, comunicaz. alla Sez. Emiliana della Soc. Chim. Ital. (Bologna) il 4 aprile 1948, Chimica Industria 30, 308 (1948).

³ Z. physiol. Chem. 5, 67 (1881).

⁴ Ann. Chem., 164, 155 (1872).

⁵ Vedi A. JOSEPHSOHN, Inaug. Dissertation, Königsberg, 1898.

⁶ Z. physiol. Chem. 23, 92 (1897).

⁷ Vedi ad esempio ST. CORREL, C. P. BERG e D. W. COWAN, J. Biol. Chem. 123, 151 (1938).

⁸ R. W. JACKSON, J. Biol. Chem. 131, 469 (1939).

¹ L. MUSAJO, Gazz. Chim. Ital. 67, 166 (1937). - L. MUSAJO e M. MINCHILLI, Ber. Dtsch. chem. Ges. 74, 1840 (1941).

² Vedi per l'acido xanturenico L. MUSAJO e F. M. CHIANCONE, Gazz. Chim. Ital. 67, 218 (1937).

³ Vedi A. BUTENANDT, W. WEIDEL e H. SCHLOSSBERGER, Z. Naturforschung, 4b, 242 (1949); L. MUSAJO, A. SPADA e E. CASINI, Gazz. Chim. Ital., 80, 171 (1950).

⁴ E. C. MILLER e C. A. BAUMANN, J. Biol. Chem. 157, 553 (1945).

⁵ C. C. PORTER, J. CLARK e R. H. SILBER, J. Biol. Chem. 167, 575 (1947).

⁶ L. MUSAJO, Gazz. Chim. Ital. 67, 180 (1937).

zione degli esteri metilici nel vuoto spinto, procedimenti che non si prestano per applicazioni quantitative.

Esiste però un comportamento differenziale rispetto ad alcuni reattivi e in alcune reazioni e di questo ci siamo serviti per elaborare il nostro metodo. Ricordiamo i dati più importanti:

1° *L'acido xanturenico* dà soluzioni alcaline gialle, con cloruro ferrico in soluzione alcolica colorazione verde, con solfato ferroso la soluzione acquosa del sale monosodico (leggermente gialla) dà debole colorazione verde, mentre la soluzione del sale disodico (fortemente gialla) dà colorazione verde intensissima¹. Con acido diazobenzolsolfonico alcalino colorazione rossa intensa.

2° *L'acido chinurenico* dà soluzioni alcaline incolori, e non fornisce colorazione con cloruro ferrico, solfato ferroso e con acido diazobenzolsolfonico. Viceversa dà la così detta reazione di JAFFE² che secondo JACKSON³ può essere così condotta: alla sostanza (anche in quantità molto piccola fino a 0,02 mg) contenuta in una capsulina di porcellana si aggiungono 3 gocce di soluzione satura di clorato di potassio e 5 gocce di acido cloridrico concentrato; si evapora a secchezza su bagno d'acqua e si lascia raffreddare.

Successivamente 2-3 gocce di ammoniaca concentrata vengono addizionate con precauzione: ai bordi del residuo compare una colorazione verde. L'acido xanturenico nelle stesse condizioni dà una tinta bruna, ma non si riesce a scorgere colorazione verde.

KRETSCHY inoltre nel 1881 osservava⁴ che scaldando l'acido chinurenico con anidride acetica a 140°, esso, dapprima bianco, si colora poi in rosso sangue, quindi in violetto. Agli orli del liquido si notano strie azzurre ed infine il liquido assume colorazione rosso porpora. Solo piccole quantità di una sostanza colorante azzurro indaco venivano però isolate accanto a molto acido chinurenico. Nel 1884 BESTHORN e JAEGLER⁵ notavano che un comportamento analogo era presentato da altri acidi chinolin- α -carbonici e nel 1904 BESTHORN e IBELE⁶ occupandosi della reazione fra anidride acetica e acido chinaldinico iniziano lo studio di quella che essi chiamarono «una nuova classe di sostanze coloranti dagli acidi chinolin- α -carbonici».

Senza addentrarci nell'esame particolareggiato di questo e dei successivi lavori su tale argomento ricorderemo che l'acido chinaldinico per azione dell'anidride acetica a 140° per mezz'ora, elimina anidride carbonica e dà luogo alla formazione di una sostanza colorante rossa $C_{19}H_{12}N_2O$, ottenuta da due molecole di acido chinaldinico con eliminazione di una molecola di

anidride carbonica ed una di acqua. Per riscaldamento con acido bromidrico si ottiene dal colorante chinolina ed acido chinaldinico. Le soluzioni che presentano fluorescenza, in benzolo fluorescenza rossa, sono straordinariamente sensibili alla luce; un'esposizione di pochi minuti alla luce solare è sufficiente per scolorarle completamente.

La stessa sostanza colorante si può ottenere con anidride benzoica (ma non con anidride ftalica, nè con anidride succinica) ed anche per azione del cloruro dell'acido chinaldinico sulla chinolina in soluzione benzenica¹. Altre sostanze coloranti di questo tipo sono state poi descritte da BESTHORN², il quale stabilì anche che la decolorazione delle soluzioni per azione della luce avviene soltanto in presenza d'aria.

Anche l'acido chinurenico come è già stato detto fornisce con anidride acetica una sostanza colorante simile, ma molto più lentamente che non l'acido chinaldinico³ ed anche in questo caso le soluzioni presentano fluorescenza rossa ed alla luce divengono incolori.

*

Ciò premesso riportiamo le esperienze che abbiamo condotte per trovare i procedimenti analitici più adatti.

Acido xanturenico

La colorazione verde che si ottiene con i sali ferrosi in soluzione di bicarbonato sodico è preferibile a scopo quantitativo per la indubbia maggiore specificità che essa presenta su quella ottenuta con cloruro ferrico in soluzione etilalcolica (od etil-isoamilalcolica)⁴ ed anche su quella che si può ottenere con acido diazobenzolsolfonico. Noi operiamo nella maniera seguente: a mg 0,1-3 di acido xanturenico esattamente pesati contenuti in palloncino tarato da 10 cm³ si aggiungono 6-7 cm³ di soluzione acquosa di bicarbonato sodico all'1% e dopo soluzione 0,4 cm³ di soluzione all'1% di sale di Mohr. Si porta a volume con soluzione di bicarbonato sodico e dopo agitazione e riposo di 5 minuti si filtra per doppio filtro. Nell'intervallo sperimentato la legge di BEER è risultata applicabile ed usando il fotometro di PULFRICH, filtro S 61 (liquido di confronto: acqua) il logaritmo negativo della trasparenza, spessore 1 cm, moltiplicato per 0,95 (essendo 1/0,95 la pendenza del diagramma di taratura) dà l'acido xanturenico in milligrammi, contenuto nei 10 cm³ di soluzione esaminata.

La presenza di acido chinurenico, il quale come si è detto non dà colorazione con i sali ferrosi o con i sali ferrici, non disturba.

¹ L. MUSAJO, Gazz. Chim. Ital. 67, 174 (1937).

² M. JAFFÉ, Z. physiol. Chem. 7, 299 (1883).

³ R. W. JACKSON, J. Biol. Chem. 131, 469 (1939).

⁴ Monatsh. Chem., 2, 76 (1881).

⁵ Ber. Dtsch. chem. Ges. 27, 913 (1894).

⁶ Ber. Dtsch. chem. Ges. 37, 1236 (1904).

¹ Ber. Dtsch. chem. Ges. 38, 2127 (1905).

² Ber. Dtsch. chem. Ges. 46, 2762 (1913).

³ Ber. Dtsch. chem. Ges. 54, 1333 (1921).

⁴ E. C. MILLER e C. A. BAUMANN, J. Biol. Chem. 157, 553 (1945). - C. C. PORTER, J. CLARK e R. H. SILBER, J. Biol. Chem. 167, 575 (1947).

Acido chinurenico

Sono state studiate le reazioni con anidride acetica, con cloruro di tionile e chinolina, con anidride benzoica, nei modi cioè indicati nei lavori più sopra ricordati¹. Queste vie portano alla formazione di una sostanza colorante, ma i risultati migliori sono stati ottenuti con pentacloruro di fosforo, ossicloruro di fosforo e chinolina:

Riferiamo brevemente sui vari procedimenti sperimentati:

1° *Procedimento A. Con anidride acetica.* Pochi milligrammi (1–2) di acido chinurenico vengono riscaldati a ricadere con cm³ 1 di anidride acetica su una piccola fiamma.

Le varie prove sono state fatte riscaldando per 10, 20 e 30 minuti, ma in ogni caso si sono notate particelle bianche di sostanza inalterata. Con benzolo si ha colorazione rosso-viola (fluorescenza rossa), ma la lettura al fotometro non è stata possibile perchè la colorazione scompare per azione della luce con una rapidità eccezionale. Anche impiegando altri solventi in luogo del benzolo (cloroformio, tetracloruro di carbonio, metanolo) ed accorgimenti per evitare il contatto con aria, non è stato possibile praticamente eseguire determinazioni.

La reazione con anidride acetica presenta due inconvenienti non facilmente superabili: rendere costante il decorso della reazione stessa; stabilizzare la colorazione. Per queste ragioni non è stata ulteriormente studiata.

2° *Procedimento B. Con cloruro di tionile e chinolina.* BESTHORN e IBELE², come abbiamo già detto, hanno messo in evidenza che la stessa sostanza colorante che si ottiene da acido chinaldinico e anidride acetica può essere ottenuta dal cloruro dell'acido chinaldinico (preparato con cloruro di tionile) e chinolina in benzolo.

Noi abbiamo studiato anche questo metodo con l'acido chinurenico e operato nel modo seguente: 1–2 mg di acido chinurenico vengono riscaldati a ricadere per 30 minuti con 1–2 cm³ di cloruro di tionile, il quale viene successivamente allontanato a pressione ridotta ed il residuo tenuto tre ore in essiccatore nel vuoto su acido solforico e potassa caustica. Dopo tale tempo si aggiungono 2 gocce di chinolina e 2–3 cm³ di benzolo. Si nota colorazione rossa già a freddo. Si riscalda a ricadere, per 10 minuti (colorazione rosso-viola), si lascia raffreddare e si porta a volume (10 cm³) con benzolo. Anche in questa esperienza abbiamo notato rapida decolorazione della soluzione benzenica. Impiegando invece del benzolo il metanolo la soluzione risulta più stabile tanto da permettere la lettura foto-

metrica, ma i risultati sono variabili ed anche in condizioni identiche non si ottengono dati concordanti.

3° *Procedimento C. Con anidride benzoica.* L'impiego dell'anidride benzoica conduce a buoni risultati. Dopo varie prove abbiamo trovato che le condizioni migliori sono le seguenti: all'acido chinurenico (0,5–2 mg) contenuto in un piccolo palloncino si aggiungono mg 50 di anidride benzoica e 2–4 gocce di piridina purissima come solvente (la reazione avviene anche in assenza di piridina ma più stentatamente). Il palloncino viene immerso in un bagno d'olio di vaselina riscaldato a 160° e tenuto a questa temperatura per 4 minuti (un riscaldamento più lungo è da evitare) agitando dolcemente. Operando con precauzione si riesce a portare tutta la sostanza in soluzione. Il residuo color viola viene, dopo raffreddamento, ripreso con benzolo e portato a volume (10 cm³) e sulla soluzione rosso-viola viene eseguita la lettura al fotometro.

La stabilità della colorazione è discreta e la presenza di piccole quantità di acido xanturenico, che non dà questa reazione, non disturbano notevolmente.

Tuttavia questo metodo è risultato utilizzabile solo con campioni di acido chinurenico relativamente puro. Allorchè si è cercato di trasportarlo a determinazioni nelle urine incontrammo difficoltà tali da doverlo abbandonare.

4° *Procedimento D. Con pentacloruro di fosforo e chinolina.* Per azione del pentacloruro di fosforo sull'acido chinurenico e reazione del prodotto ottenuto con chinolina siamo riusciti a preparare una sostanza colorante rossa con soluzioni notevolmente stabili.

Il procedimento è stato applicato a piccole quantità di acido chinurenico nel modo seguente:

Ad 1–2 mg di questa sostanza contenuti in un palloncino da 25 cm³ con raccordo smerigliato si aggiungono 50 mg di pentacloruro e 10 cm³ di benzolo secco. Dopo ebollizione a ricadere per un ora il benzolo è stato distillato completamente ed il residuo addizionato di 10 cm³ di etere anidro e di 0,1 cm³ di chinolina. Si fa ancora bollire a ricadere per 30 minuti. L'etere viene decantato e sostituito con altri 10 cm³ di etere anidro. Dopo nuova ebollizione per 10 minuti l'etere viene ancora decantato ed il residuo rosso-viola¹ sciolto in alcole etilico di 95°.

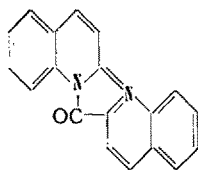
¹ Il colorante ottenuto con pentacloruro di fosforo e chinolina è insolubile in acqua, solubile in acido acetico con colorazione rossa, un po' meno in alcole etilico e alcole metilico, abbastanza solubile in cloroformio e diossano con intensa fluorescenza rosso-viola.

Le soluzioni in alcole etilico o diossano si decolorano più rapidamente delle altre alla luce solare. Non è di facile cristallizzazione.

Questa sostanza verrà studiata in seguito, ma riteniamo, in base alle prime analisi, probabile la formula C₁₉H₁₁O₂N₂Cl e consideriamo la sostanza stessa come appartenente al gruppo dei coloranti chinolinici sensibili alla luce, di BESTHORN e IBELE, i quali vengono riferiti a costituzione del tipo (vedi anche WIELAND, Ber. Dtsch. chem. Ges. 61, 2371 (1928) e Ann. Chem. 530, 34 (1937).

¹ Monatsh. Chem. 2, 76 (1881). – Ber. Dtsch. chem. Ges. 27, 913 (1894). – Ber. Dtsch. chem. Ges. 38, 2127 (1905).

² Ber. Dtsch. chem. Ges. 37, 1236 (1904).



I risultati sono stati dal punto di vista quantitativo discreti, ma non in maniera costante. Abbiamo notato che in questo procedimento, un po' troppo laborioso, restano delle piccole particelle di acido chinurenico inattaccato. Abbiamo perciò ritenuto di dover migliorare ancora il metodo e siamo perciò passati al:

5° Procedimento E. Con pentacloruro di fosforo, ossicloruro di fosforo e chinolina. In un palloncino da 25 cm³ munito di smerigliatura ed allunga, perfettamente secchi, si introduce l'acido chinurenico, da 0,1 a 4 mg e successivamente 50 mg di pentacloruro di fosforo pesato in piccolo bicchierino e 1 cm³ di ossicloruro di fosforo. Si scalda all'ebollizione su dischetto di amianto mediante una microfiamma per 15 minuti e si aggiungono dopo raffreddamento 0,1 cm³ di chinolina purissima (distillata su idrato potassico): si ha formazione di un precipitato bruno scuro. A questo punto si può distillare l'ossicloruro di fosforo nel vuoto e sciogliere il residuo in alcole etilico di 95° il quale assume una bellissima colorazione rosso-viola. Ma abbiamo notato che la distillazione dell'ossicloruro conduce a delle perdite, per cui abbiamo preferito aggiungere direttamente l'alcole. La reazione è vivace, ma operando con precauzione, sotto cappa, e aggiungendo l'alcole goccia a goccia i risultati sono buoni. La stabilità della soluzione così ottenuta, a differenza degli altri procedimenti, è notevolissima; soluzioni alcoliche di colorante (da acido chinurenico 0,04 mg/cm³) si decolorano solo dopo esposizione di un'ora alla luce solare.

È necessario adoperare, come è stato detto, apparecchiatura perfettamente secca e reattivi molto puri.

Operando con le quantità ricordate di acido chinurenico cioè comprese fra 0,1 e 4 mg, seguendo le condizioni di esperienza sopra descritte, ed infine diluendo dopo i 15 minuti di ebollizione con alcole di 95° al volume di 25 cm³, si ottengono soluzioni che seguono la legge di BEER. Con il fotometro di PULFRICH, adoperando per ragioni di sensibilità il filtro S 47 (liquido di confronto: le stesse quantità dei vari reattivi, pentacloruro, ossicloruro, poi chinolina e alcole, naturalmente acido chinurenico escluso) il logaritmo negativo della trasparenza per 1 cm di spessore moltiplicato per 0,68 dà i milligrammi di acido chinurenico contenuto nei 25 cm³ di soluzione. I risultati sono buoni.

Le soluzioni alcoliche così ottenute, opportunamente diluite, presentano sempre un massimo di assorbimento ben evidente a 556–557 mμ (spettrofotometro BECKMANN, mod. D. U.).

La determinazione degli acidi chinurenico e xanturenico contemporaneamente presenti

È già stato detto come la determinazione dell'acido xanturenico mediante i sali ferrosi possa essere condotta anche in presenza di acido chinurenico, quindi questa parte del problema non presenta difficoltà. Nelle reazioni cromatiche dell'acido chinurenico la presenza dell'acido xanturenico può essere invece causa di interferenza.

In quella con pentacloruro, ossicloruro di fosforo e chinolina (procedimento E), l'acido xanturenico, anche quello purissimo di sintesi, dà una debole colorazione rosea. Se l'ebollizione con pentacloruro ed ossicloruro viene prolungata oltre i 15 minuti (per una ora ad esempio) la colorazione aumenta di intensità. Non va dimenticato che anche l'acido xanturenico è un acido chinolin- α -carbonico e che con ossicloruro si trasforma in acido 4-cloro-8-ossichinolin-2-carbonico¹ e per quanto reagisca stentatamente, non si può quindi escludere la formazione di un colorante del tipo di quelli di BESTHORN. Anche questo fatto potrà essere motivo di studio quando questi coloranti saranno esaminati più da vicino.

L'inconveniente analitico sopra citato è stato però anche esso superato tenendo presente il diverso comportamento dei due acidi ossichinolin-carbonici rispetto al permanganato. Mentre l'acido chinurenico viene solo lentamente ossidato dal permanganato ad acido chinurico od ossalil-antranilico, l'ossidazione dell'acido xanturenico procede molto rapidamente e profondamente e non conduce a composti caratteristici. Limitando la durata dell'ossidazione a pochi minuti l'acido xanturenico viene distrutto e l'acido chinurenico rimane inattaccato.

In base ai dati fin qui esposti, abbiamo elaborato il metodo di determinazione dei due acidi ossichinolin-carbonici in presenza l'uno dell'altro, basato 1° sulla estrazione dei due acidi stessi con alcole isoamilico, 2° sulla colorazione che i sali ferrosi danno con acido xanturenico, 3° sulla distruzione di questo con permanganato, 4° sulla reazione dell'acido chinurenico con pentacloruro, ossicloruro di fosforo e chinolina.

I. Determinazione su prodotti puri

Piccole quantità pesate di acido chinurenico e acido xanturenico puri di sintesi vengono introdotti in un palloncino tarato da 20 cm³, si aggiunge soluzione all'1% di bicarbonato sodico ed in tal modo i due acidi si sciolgono facilmente. Si porta a volume con lo stesso bicarbonato e dalla soluzione ottenuta (soluzione A) si prelevano 8 cm³ che si introducono in un palloncino tarato da 10 cm³, si aggiungono 0,4 cm³ di soluzione al

¹ L. MUSAJO, Gazz. Chim. Ital. 67, 166 (1937). — L. MUSAJO e M. MINCHILLI, Ber. Dtsch. chem. Ges. 74, 1840 (1941).

1% di $\text{FeSO}_4 \cdot (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, si porta a volume di 10 cm³ con la stessa soluzione di bicarbonato sodico all'1%, si agita, si lascia in riposo per cinque minuti e se la soluzione colorata in verde non risulta perfettamente limpida si filtra per doppio filtro e si esegue la lettura fotometrica secondo quanto è stato detto prima (fotometro di PULFRICH, filtro S 61).

Per l'acido chinurenico si prelevano 10 cm³ della soluzione in bicarbonato (soluzione A) si portano in un tubo da centrifuga (3,5 × 10 cm) e si aggiungono successivamente 1 cm³ di idrato sodico *N*/1 e 5 cm³ di permanganato potassico *N*/10. Si agita dolcemente il tubo e si lascia in riposo esattamente per cinque minuti, trascorsi i quali mediante una piccola quantità di bisolfito sodico (solido) si riduce l'eccesso di permanganato. Si introduce per pochi istanti il tubo in b. m. tiepido e dopo si centrifuga il biossido di manganese. Il liquido limpido si travasa in un altro tubo da centrifuga uguale al precedente e il residuo si lava con 3-4 cm³ di acqua, che dopo centrifugazione viene unita al liquido precedente. Si porta ora a p_H 2 (indicatore esterno) con acido cloridrico 2 *N* aggiunto goccia a goccia e si aggiungono 10 cm³ di alcole isoamilico (prima lavato con idrato sodico *N*/1, acido cloridrico *N*/1, acqua e quindi distillato). Si agita meccanicamente per dieci minuti e si travasa in imbuto separatore. La estrazione amilica viene ripetuta altre due volte con 5 cm³ di alcole isoamilico e per cinque minuti per volta.

L'estratto amilico seccato con solfato sodico anidro viene filtrato attraverso cotone in un palloncino a collo smerigliato da 25 cm³, al quale si innesta un refrigerante a raccordo per distillazione. La distillazione viene effettuata (bagno di olio di vaselina) nel vuoto e in due tempi (o più se fosse necessario). Si distillano dapprima circa i $\frac{2}{3}$ dell'estratto (9-10 cm³) e poi la seconda porzione dell'estratto più l'alcole amilico impiegato per lavare l'imbuto. Il palloncino nel quale è contenuto l'acido chinurenico viene seccato per 45 minuti a 105° in stufa e successivamente si introducono in esso 50 mg di pentacloruro di fosforo e 1 cm³ di ossicloruro di fosforo, si innesta una allunga (accuratamente seccata) con smerigliatura corrispondente e si fa bollire a ricadere su un dischetto di amianto con microfiamma per quindici minuti. Dopo raffreddamento si aggiungono 0,1 cm³ di chinolina (pura) distillata su potassa caustica e quindi dopo raffreddamento, con grande precauzione sotto cappa, alcole etilico di 95° goccia a goccia. Quando si sono introdotti 6-7 cm³ di alcole la soluzione rosso-viola viene travasata quantitativamente in palloncino tarato da 25 cm³ portando a volume con alcole. Si esegue quindi la lettura tenendo presente i dati riportati a proposito del procedimento E. Non occorre prendere eccessive precauzioni per la luce, ma è bene evitare dopo la formazione del colorante l'esposizione alla luce solare diretta.

Analisi n°		pesato mg	trovato mg
1	acido chinurenico	1,944	1,840
	acido xanturenico	1,921	1,862
2	acido chinurenico	1,461	1,384
	acido xanturenico	2,499	2,409
3	acido chinurenico	2,148	2,086
	acido xanturenico	1,414	1,382
4	acido chinurenico	2,758	2,656
	acido xanturenico	2,783	2,690

Risultati ancora netti si hanno quando la soluzione A contiene circa 10 γ/cm^3 di ciascuno dei due acidi.

II. Applicazione ad alcuni prodotti naturali

I prodotti naturali esaminati sono stati i miscugli grezzi degli acidi ossichinolincarbonici isolati da urine di animali sottoposti a diete iperproteiche o a carichi di triptofano o a somministrazione di l-chinurenina.

1° *Campione proveniente da urine di ratti a dieta iperproteica* (fibrina). Prodotto grezzo ottenuto da urine defecate con barite, l'eccesso di questa allontanato con anidride carbonica, quindi concentrazione e acidificazione.

Analisi: sostanza (secca) 3,819 mg.

acido chinurenico trovato 0,544 mg 14,24%

acido xanturenico trovato 2,906 mg 76,11%

È noto infatti che in queste condizioni i ratti eliminano prevalentemente acido xanturenico.

2° *Campione proveniente da urine di coniglio a dieta di fibrina e dopo carico di triptofano* (3 iniezioni di 2,5 g di triptofano a distanza di 48 ore l'una dall'altra).

Prodotto grezzo ottenuto dopo semplice acidificazione delle urine.

Analisi: sostanza (secca) 3,842 mg.

acido chinurenico trovato 3,168 mg 82,45%

acido xanturenico trovato 0,252 mg 16,55%

3° *Campione proveniente da urine di ratti ai quali era stato somministrato solfato di l-chinurenina.*

Prodotto grezzo ottenuto per acidificazione delle urine.

Analisi: sostanza (secca) 4,366 mg.

acido chinurenico trovato 3,318 mg 76,00%

acido xanturenico trovato 0,499 mg 11,43%

A differenza degli animali tenuti a dieta iperproteica, gli animali trattati con triptofano e con chinurenina eliminano prevalentemente acido chinurenico.

III. Determinazione nelle urine

Questa determinazione è stata dapprima eseguita, per quanto riguarda l'acido chinurenico, con la reazione pentacloruro di fosforo-chinolina¹ cioè col proce-

¹ Vedi L. MUSAJO e D. COPPINI, Atti Soc. Nat. e Mat. Modena 78, 113 (1947). - L. MUSAJO, D. COPPINI e M. MANCINI, *idem*, 79, 70 (1948). - L. MUSAJO, comunicaz. alla Sez. Emiliana della Soc. Chim. Ital. (Bologna) il 4 aprile 1948, *Chimica Industria* 30, 308 (1948).

dimento D. Dalle molte analisi eseguite ci convincemmo della necessità di migliorare le condizioni. Fu così che arrivammo alla reazione pentacloruro-ossicloruro di fosforo-chinolina (procedimento E) sulla quale è basata la seguente applicazione alle urine.

Da 3 a 5 cm³ di urine esattamente misurati, vengono portati in tubo da centrifuga e diluiti con 10 cm³ di acqua. Con qualche goccia di acido cloridrico 2 N si porta il p_H ad 1,5-2, si aggiungono 10 cm³ di alcole isoamilico (purificato), si introduce nel tubo un agitatore di vetro, si agita per dieci minuti. Si travasa in imbuto a rubinetto ed il liquido acquoso si estrae ancora due volte con 5 cm³ di alcole isoamilico (cinque minuti) per volta. Gli estratti amilici riuniti, più ancora un po' di alcole isoamilico di lavaggio del tubo e dell'imbuto, vengono trasportati in un altro tubo da centrifuga ed agitati per tre volte meccanicamente con 5 cm³ per volta di soluzione di bicarbonato sodico all'1% (dieci minuti di agitazione per la prima estrazione, cinque minuti per le altre due). La soluzione acquosa in bicarbonato sodico che viene dopo ogni estrazione separata in imbuto a rubinetto viene raccolta in un palloncino tarato da 20 cm³ nel quale vengono ancora raccolte le piccole quantità di liquido di lavaggio, sempre bicarbonato sodico all'1%, con il quale, anche, si porta a volume. La soluzione così ottenuta corrisponde alla soluzione A indicata precedentemente a proposito di «Determinazione su prodotti puri» e le operazioni successive sono perfettamente corrispondenti, cioè su una parte della soluzione (8 cm³) si determina l'acido xanturenico e su di un'altra parte (10 cm³) l'acido chinurenico così come è stato detto precedentemente. Occorre notare che se le urine contengono quantità molto forti di acidi chinurenico e xanturenico, l'estrazione amilica deve essere ripetuta varie volte; 5 mg complessivamente dei due acidi vengono certamente estratti col procedimento indicato.

Anche per quanto riguarda le urine la sensibilità è dell'ordine che abbiamo già avuto occasione di indicare. La determinazione è ancora possibile quando nel volume di urina preso per l'analisi sono contenuti 200 γ rispettivamente di ciascuno dei due acidi ossichinolincarbonici.

Riportiamo alcune analisi eseguite su urine alle quali erano state aggiunte quantità note dei due acidi:

Analisi n°		pesato mg	trovato mg
1	acido chinurenico	2,080	1,994
	acido xanturenico	1,962	1,898
2	acido chinurenico	2,892	2,771
	acido xanturenico	3,002	2,894
3	acido chinurenico	1,504	1,514
	acido xanturenico	1,498	1,469

Due determinazioni eseguite su un campione di urine di ratti a dieta di fibrina ci hanno dato i risultati seguenti:

	I	II
acido chinurenico in 100 cm ³ di urina	66,64 mg	63,10 mg
acido xanturenico in 100 cm ³ di urina	152,12 mg	158,60 mg

Questo metodo presenta, una certa laboriosità ed i risultati in genere sono un po' bassi. Riteniamo tuttavia che esso rappresenti un utile mezzo di ricerca e di studio quando si presenti la necessità di sperimentare sull'eliminazione dei due acidi ossichinolincarbonici.

Ringraziamo vivamente il Dott. MARIO MANCINI, la Sig.na Dott. FRANCA FIOCCA e gli altri studenti che hanno volentiersamente collaborato allo svolgimento di queste lunghe ricerche.

Summary

Although kynurenic acid (4-hydroxyquinoline-2-carboxylic acid) was isolated by LIEBIG in 1853, a method for the determination of small quantities of it has not been brought to perfection. Macromethods based on precipitation and weighing are known, but they do not give any guarantee about specificity and precision and can lead to the mistake of determining simultaneously with kynurenic acid also xanthurenic acid (4,8-dihydroxyquinoline-2-carboxylic acid), which has been more recently discovered by MUSAJO.

From this stand point many numerical results concerning kynurenic acid must necessarily be re-examined.

Our analytical procedure has been perfected after many attempts and is based on the transformation of kynurenic acid into a substance of the type of the quinolinic dyes of BESTHORN but more stable towards the light.

By chlorinating the kynurenic acid with phosphorus pentachloride and phosphorus oxychloride and by successive action of quinoline on the reaction product, we were able to obtain a colored substance which upon solution in ethanol has a beautiful red-violet color (maximum of absorption 556-557 μ) of remarkable stability with regard to light.

The xanthurenic acid is determined through the green coloration obtained by adding small quantities of ferrous salt to its solution in sodium bicarbonate. If the two acids are simultaneously present, the determination of xanthurenic acid is not influenced by the presence of kynurenic acid; on the other hand the presence of xanthurenic acid can interfere with the determination of kynurenic acid. To avoid such interference a short and cautious oxydation with potassium permanganate is necessary, which destroys only the xanthurenic acid.

After oxydation, the unchanged kynurenic acid is extracted ($p_H = 2$) with isoamyl alcohol and consecutively chlorinated and reacted upon with quinoline.

The method is suitable for solutions containing the two acids and also for urines, from which the two acids are extracted with isoamyl alcohol. The method still gives good results when the analysed sample contains 200 μ g of kynurenic and 200 μ g of xanthurenic acids respectively.