

**Determinazione della vitamina D in presenza della vitamina A.  
Utilizzazione della reazione di disidratazione della vitamina A  
per realizzare la separazione cromatografica delle due vitamine**

AURELIO MARIANI, CONCETTA MARIANI VICARI, RAULINA MENDOZA (\*)  
e BRUNO CISBANI (\*)

*Laboratori di Biologia*

**Riassunto.** — È stata realizzata la separazione cromatografica su colonna della vitamina D<sub>2</sub> dalla vitamina A dopo trasformazione di quest'ultima in anidrovitamina.

Ciò ha permesso di mettere a punto un metodo di determinazione della vitamina D<sub>2</sub> in prodotti farmaceutici che contengono le due vitamine, anche in presenza di altri componenti.

Il metodo è applicabile quando il rapporto vitamina A: vitamina D<sub>2</sub> espresso in U.I. non supera 8:1.

**Summary.** (*Determination of vitamin D<sub>2</sub> in presence of vitamin A. Chromatographic separation of vitamins A and D<sub>2</sub> accomplished after dishydration of vitamin A.*) — The separation of vitamin D<sub>2</sub> from vitamin A by means of column chromatography was investigated in order to make possible the determination of the former in pharmaceutical products containing both vitamins.

It was possible to accomplish the separation after vitamin A was converted into anhydrovitamin by reaction with p-toluensulfonic acid: by chromatography on IV activity grade aluminium oxide, vitamin D<sub>2</sub> was obtained sufficiently pure to permit its determination by colorimetric method with antimony trichloride.

On this bases a method of determination of vitamin D<sub>2</sub> was performed; it may be applied to analyze pharmaceutical products which contain both vitamins, even associated with other components, when the ratio vitamin A: vitamin D<sub>2</sub>, expressed as I.U., is not higher than 8:1.

---

(\*) Borsista dei Laboratori di Biologia.

## INTRODUZIONE

La separazione della vitamina D dalla vitamina A è un problema che interessa in modo particolare il chimico analista di prodotti farmaceutici poichè in questi le due vitamine sono molto spesso associate. Mentre la determinazione della vitamina A può essere eseguita con i metodi usuali senza che la vitamina D interferisca, quest'ultima deve essere isolata dal prodotto allo stato puro per poter essere determinata sia spettrofotometricamente che con i metodi colorimetrici. In letteratura vengono descritti molti procedimenti per separare la vitamina D dalla A; noi stessi (MARIANI & VICARI, 1963) abbiamo già tentato in passato una soluzione di questo problema.

Tutti i metodi finora proposti (EWING, SCHLABACH & POWELL, 1954; MULDER, DE VRIES & KEUNING, 1965; SCHMAIL *et al.*, 1958; SHUE, 1965; THEIVAGT & CAMPBELL, 1959; WILKIE, JONES & KLINE, 1958) utilizzano procedimenti cromatografici che si possono dividere in due gruppi.

1) *Cromatografia di adsorbimento*. — La soluzione delle due vitamine in un solvente organico viene passata su una colonna di una terra attiva o attivata con acidi (Filtrol, Bentonite, ecc.). In condizioni ben definite la vitamina A reagisce con la terra fissandosi sulla colonna, mentre la vitamina D passa nell'eluato allo stato più o meno puro in ragione della quantità di vitamina A che si è fatta passare sulla colonna; infatti reagendo con la terra la vitamina A viene alterata e una parte dei prodotti di alterazione viene eluita insieme alla vitamina D. Tali prodotti reagiscono positivamente con il reattivo usato per la determinazione colorimetrica della vitamina D e ne disturbano quindi la reazione. Il procedimento, studiato in passato da uno di noi (MARIANI & CAVINA, 1953; 1955), è delicato per quanto concerne il grado di attività della terra e può essere applicato solo quando il rapporto in peso vitamina A: vitamina D non sia troppo elevato.

2) *Cromatografia di ripartizione*. — È fondata sul fatto che la vitamina D è più idrofoba della vitamina A alcool il che offre due possibilità:

a) si usa come fase stazionaria un solvente idrofobo capace di trattenere la vitamina D mentre la fase mobile trascina la vitamina A;

b) la fase stazionaria è un solvente idrofilo e la vitamina D viene eluita con una fase idrofoba.

Dei due procedimenti, migliore fortuna ha avuto il secondo che è stato introdotto nella United States Pharmacopoeia XVI per la determinazione della vitamina D in sostituzione della determinazione per via biologica riportata nella precedente edizione. Tuttavia, anche la cromatografia di ripartizione, nella maggior parte dei casi, non permette di purificare completamente la vitamina D in modo da poter applicare il metodo colorimetrico al tricloruro di antimonio; ciò è dovuto, non tanto al rapporto vitamina A:

vitamina D che può anche essere piuttosto elevato, quanto piuttosto alla quantità di prodotti di degradazione della vitamina A che possono essere presenti e che vengono eluiti insieme alla vitamina D; si rende perciò necessario cromatografare la soluzione su una colonna di adsorbente capace di trattenere questi prodotti. Il metodo diventa così lungo e indaginoso e non porta evidentemente ad una purificazione completa se, dopo avere eseguito le due cromatografie, è necessario, secondo la U.S.P. XVI, eseguire la determinazione con tricloruro di antimonio in parallelo con una prova in bianco, effettuata aggiungendo, prima del reattivo, l'anidride acetica come inibitore della reazione tipica della vitamina D.

Si può perciò dedurre che, allo stato attuale delle cose, il problema della separazione della vitamina D dalla A non sia stato ancora risolto in maniera soddisfacente.

Da molto tempo tentiamo di arrivare ad una soluzione fondandoci su diversi principi. Finora tutte le prove effettuate per separare le due vitamine per mezzo della cromatografia di adsorbimento non avevano dato buoni risultati; impiegando allumina a tutti i gradi di attività e solventi della più svariata attività eluotropa non ci è stato possibile separare le due vitamine perchè hanno comportamento troppo simile rispetto ai mezzi adsorbenti.

Una geniale idea hanno avuto recentemente BARUA & RAO (1964; 1965) nel trasformare la vitamina A presente nella miscela o in anidrovitamina o in aldeide in modo da avere dei prodotti con comportamento differente dalla vitamina D e poter quindi isolare quest'ultima per mezzo di cromatografia di adsorbimento su allumina. L'idea ottima non ha avuto però, secondo noi, una ugualmente accettabile realizzazione pratica. Infatti per la trasformazione in anidrovitamina viene consigliato il trattamento con alcool etilico saturo di acido cloridrico gassoso e per la trasformazione in aldeide il trattamento con biossido di manganese. Ora queste due reazioni non conducono ad una trasformazione completa della vitamina A nei derivati voluti. Nel primo caso, oltre all'anidrovitamina si formano altri prodotti non bene identificati, mentre il trattamento con biossido di manganese è molto critico, dipendendo in maniera notevole dal metodo di preparazione dell'ossidante, come abbiamo potuto riscontrare nella esecuzione pratica sia dell'uno che dell'altro dei metodi proposti. Gli AA. stessi, nel descrivere i metodi, fanno uso di una separazione cromatografica tutt'altro che pratica: dopo l'adsorbimento e lo sviluppo la colonna di allumina viene estrusa e tagliata nella parte centrale per recuperare la vitamina D ivi localizzata. A parte le difficoltà di estrusione di una colonna di allumina, è ben difficile ottenere in questo modo un recupero totale della vitamina D. Tali difficoltà sussistono nei metodi proposti per il fatto che la trasformazione della vitamina A sia in anidrovitamina che in aldeide non era condotta in maniera quantitativa, così che alcuni dei prodotti di trasformazione non potevano essere separati a sufficienza dalla vitamina D presente.

Dopo aver a lungo provato la ossidazione della vitamina A con il biossido di manganese in varie condizioni ed aver constatato, come del resto è riportato in letteratura, che la reazione è estremamente delicata e tutt'altro che quantitativa, abbiamo invece posto la nostra attenzione alla trasformazione della vitamina A in anidrovitamina.

Avevamo avuto occasione di sperimentare la determinazione della vitamina A con il metodo all'anidrovitamina secondo BUDOWSKI & BONDI (1957) ed avevamo quindi già potuto constatare che seguendo le condizioni descritte dagli AA. era possibile trasformare in maniera quantitativa la vitamina A in anidrovitamina. Ci siamo quindi proposti di mettere a punto il procedimento di trasformazione in anidrovitamina su quantità elevate di vitamina A anzichè su campioni di poche decine di unità, di provare che il trattamento con il reattivo disidratante fosse senza effetto sulla vitamina D e di attuare infine la possibilità di separare cromatograficamente la vitamina D dall'anidrovitamina A.

#### PARTE SPERIMENTALE

*Reattivi* (prodotti puri per analisi):

— Benzolo cristallizzabile: viene distillato di fresco eliminando le prime frazioni (circa 10 %);

— Etere di petrolio p.e. 40-70° C;

— Etere etilico;

— Cloruro di etilene;

— Acido p-toluensolfonico;

— Cloruro di acetile;

— Anidride acetica;

— Sodio solfato anidro;

— Carbonato di sodio;

— Tricloruro di antimonio;

— Ossido di alluminio standardizzato secondo Brockmann;

— Ossido di alluminio con 10 % di acqua (grado IV di attività): l'ossido di alluminio standardizzato viene tenuto in muffola a 600° C per 4 ore; si lascia raffreddare in essiccatore. In una beuta con tappo a smeriglio 50 g vengono agitati energicamente con 5 ml di acqua distillata; si deve impiegare dopo almeno 24 ore.

— *Reattivo per la disidratazione*;

15 mg di acido p-toluensolfonico vengono riscaldati a refluxo con 100 ml di benzolo distillato di fresco fino a soluzione dei cristalli. Da questa soluzione, in un apparecchio per distillazione con giunti a smeriglio, viene distillato tanto solvente finchè il benzolo distilla limpido (almeno 10 ml).

In tal modo viene allontanata l'acqua contenuta nell'acido p-toluensolfonico impiegato. Si lascia raffreddare la soluzione nel pallone da distillazione al riparo dalla umidità e si riporta il volume a quello iniziale con benzolo anidro. La soluzione così preparata viene usata subito. Si può impiegare anche dopo qualche giorno, ma, prima di ogni uso, deve essere riattivata ripetendo la distillazione. Ciò si ottiene nel modo migliore aggiungendo per ogni 100 ml di reattivo 10-20 ml di benzolo anidro ed eliminandone altrettanti per distillazione (in ogni caso questa deve essere continuata fin quando il benzolo distilla limpido).

— *Reattivo al tricloruro di antimonio* ;

Soluzione *A*: g 110 di tricloruro di antimonio secco si sciolgono in ml 400 di cloruro di etilene, scaldando leggermente. Alla soluzione si aggiungono 2 g di allumina anidra e si filtra attraverso filtro asciutto in pallone tarato, portando a volume di 500 ml con cloruro di etilene.

Soluzione *B*: 20 ml di cloruro di acetile si portano a 100 ml con cloruro di etilene.

Il reattivo per l'analisi si ottiene mescolando 90 ml della soluzione *A* con 10 ml della soluzione *B*. Si mantiene per una settimana.

— *Inibitore della reazione*: si mescolano volumi uguali di anidride acetica e cloruro di etilene.

*Metodi.*

A) *Trasformazione della vitamina A in anidrovitamina*. — Quantità crescenti di vitamina A alcool (da 2.000 a 50.000 U.I.) sciolte in 5 ml di benzolo anidro sono state trattate con 20 ml di reattivo disidratante; dopo 2 minuti è stata bloccata la reazione per aggiunta di 1 g di  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ . Dopo 1 minuto dall'aggiunta di questo la soluzione è stata opportunamente diluita con benzolo e ne è stato registrato lo spettro di assorbimento nel campo di lunghezze d'onda da 420 a 320  $\text{m}\mu$  (Fig. 1), calcolando poi i rapporti tra i massimi  $\frac{E_{399}}{E_{377}}$

e  $\frac{E_{358}}{E_{377}}$  [i rapporti teorici sono rispettivamente 0,870 e 0,690 (BUDOWSKI & BONDI, 1957)] per giudicare la purezza dell'anidrovitamina A ottenuta.

Si è potuto concludere che, operando nelle condizioni descritte, si possono trasformare fino a 30.000-35.000 U.I. di vitamina A.

B) *Influenza del reattivo disidratante sulla vitamina D*. —  $\mu\text{g}$  25, 50, 100, 200 di vitamina  $\text{D}_2$  sciolti in 5 ml di benzolo anidro sono stati trattati con 20 ml di reattivo disidratante; dopo 2 minuti è stato aggiunto 1 g di  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ . Nella soluzione benzenica ottenuta è stata poi determinata la vitamina D

con il reattivo al tricloruro di antimonio: si è potuto constatare che la vitamina D non viene alterata dall'azione disidratante del reattivo a temperatura ambiente.

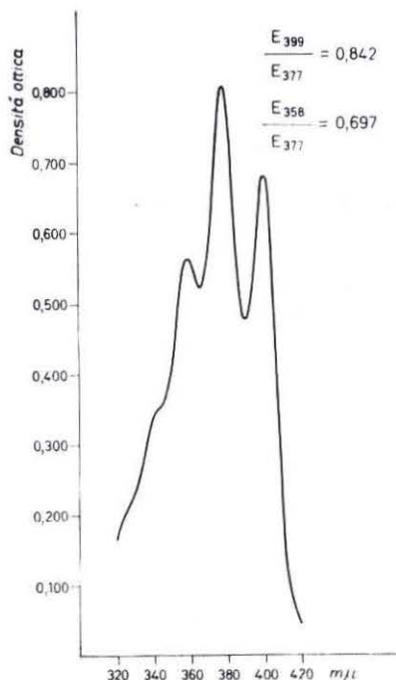
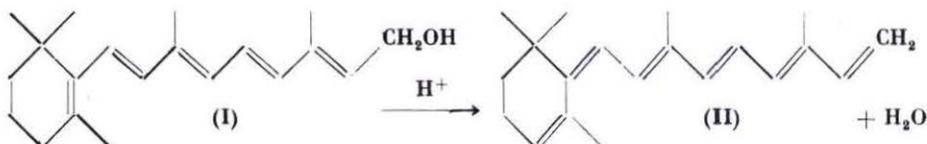


Fig. 1. — Spettro di assorbimento della anidrovitamina A in benzolo.

C) *Comportamento cromatografico.* — La trasformazione della vitamina A (I) in anidrovitamina (II) determina una sostanziale variazione della struttura, dovuta all'aumento ed allo spostamento dei doppi legami ed alla eliminazione della funzione alcolica:



L'eliminazione dell'ossidrilè determina nel composto una diminuzione di affinità verso l'allumina e ne accentua così la differenza di comportamento cromatografico con la vitamina D.

Nelle prove preliminari è stato impiegato ossido di alluminio per cromatografia secondo Brockmann; dopo attivazione a 600° C per 4 ore, l'allumina è stata portata a vari gradi di attività per aggiunta di acqua.

Sono state effettuate prove di adsorbimento di anidrovitamina A e vitamina D singolarmente e in miscele con proporzioni variabili su colonne di allumina di diverso grado di attività e con diversi solventi.

Si è giunti alla conclusione che, impiegando una colonna di 14 mm di diametro e 70 mm di altezza di allumina al 10 % di H<sub>2</sub>O (8 g), la vitamina D in etere di petrolio-benzolo 90:10 viene trattenuta dall'adsorbente e non passa nell'eluato neppure lavando con quantità notevoli (fino a 250 ml) dello stesso solvente.

L'anidrovitamina al contrario passa rapidamente nell'eluato e può essere eliminata lavando la colonna con quantità di etere di petrolio:benzolo 90:10 variabili da 125 a 250 ml in proporzione alla quantità di vitamina A di partenza.

La vitamina D, fissata sulla colonna, può essere poi recuperata quantitativamente eluendo con 100 ml di etere di petrolio:etere etilico 90:10; il recupero è stato verificato facendo adsorbire quantità variabili da 50 a 600 µg di vitamina D ed eluendo poi sempre con 100 ml di solvente.

Su aliquote dell'eluato, dopo evaporazione in corrente di azoto, è stata determinata la vitamina D con il reattivo al tricloruro di antimonio e si è potuto constatare che la totalità della vitamina è recuperabile, indipendentemente dalla sua quantità.

In base ai risultati ottenuti nelle prove preliminari sopra riportate, abbiamo messo a punto il seguente metodo analitico che si descrive in particolare.

1) *Saponificazione*. — Una quantità di materiale da analizzare viene saponificata a freddo secondo la tecnica già descritta altrove (MARIANI & VICARI, 1965). Si preferisce effettuare la saponificazione con tale procedimento per due ragioni: operando a freddo si è sicuri di non alterare la vitamina A e impiegando l'etere di petrolio per l'estrazione dell'insaponificabile la vitamina D passa in soluzione molto più facilmente.

2) *Trasformazione della vitamina A alcool in anidrovitamina*. — La soluzione dell'insaponificabile in etere di petrolio viene evaporata nel vuoto ed il residuo viene ripreso con benzene anidro in modo da ottenere una soluzione che contenga in 5 ml non più di 35.000 U.I. di vitamina A e non meno di 100 µg di vitamina D. A 5 ml di tale soluzione in un palloncino o beuta con t.s. si aggiungono 20 ml di reattivo disidratante a temperatura ambiente, si agita e si attende 2 minuti perchè la reazione sia completa. Si aggiunge poi 1 g di Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> e dopo un minuto si filtra la soluzione in un pallone tarato da 50 ml lavando pallone e filtro con piccole porzioni di benzene anidro che vengono poi riunite alla soluzione che si porta a volume.

Una aliquota della soluzione così ottenuta viene opportunamente diluita e se ne registra lo spettro nel campo di lunghezze d'onda 420-320  $m\mu$ : si calcolano i rapporti  $\frac{E_{399}}{E_{377}}$  e  $\frac{E_{358}}{E_{377}}$  per giudicare la purezza dell'anidrovitamina ottenuta e si verifica l'assenza di massimo o flesso a 331  $m\mu$  (che denoterebbe la presenza di vitamina A alcool).

Se il benzene è perfettamente anidro e il reattivo disidratante è stato preparato di fresco o riattivato prima dell'uso, la curva del prodotto ottenuto deve avere l'aspetto di quella riportata in Fig. 1 corrispondente ad anidrovitamina A pura e non si deve riscontrare nella soluzione presenza di vitamina A.

3) *Separazione cromatografica.* — 25 ml della soluzione vengono concentrati in Rotavapor ad una temperatura non superiore a 38° C fino al volume di 5 ml: a questi si aggiungono 45 ml di etere di petrolio. La evaporazione richiede particolare attenzione, in quanto l'anidrovitamina, molto stabile a temperatura ambiente, viene rapidamente alterata ad una temperatura superiore ai 38° C dando origine a composti difficilmente separabili dalla vitamina D.

In una colonna cromatografica di cm 1,4 di diametro e circa 25 cm di lunghezza sul cui fondo si mette un fiocco di ovatta si versano g 8 di allumina al 10% di acqua (IV grado di attività); si lava la colonna con 20 ml di etere di petrolio e vi si fa passare la soluzione precedentemente preparata; si lava quindi la colonna con 100 ml di etere di petrolio: benzene 90:10.

Si eluisce la vitamina D con etere di petrolio: etere etilico 90:10 portando al volume di 100 ml; una porzione di questa soluzione contenente 8-12  $\mu g$  di vitamina D viene evaporata in corrente di azoto, il residuo si riprende con 3 ml di cloruro di etilene. A questi si aggiungono 5 ml del reattivo al triclorigenio di antimonio e dopo 1 minuto dall'aggiunta del reattivo, si misura l'estinzione a 500  $m\mu$  contro cloruro di etilene. Da questo valore si sottrae l'estinzione di una prova in bianco eseguita su una uguale porzione della soluzione a cui, dopo evaporazione in corrente di azoto, sono stati aggiunti 2 ml di cloruro di etilene e 1 ml di inibitore prima dei 5 ml di reattivo al triclorigenio di antimonio. Per mezzo di una curva di taratura del reattivo allestita con vitamina D pura, si calcola la quantità di vitamina presente nella soluzione e quindi nel materiale di partenza.

## RISULTATI

Abbiamo provato il metodo su:

1) miscele da noi preparate di vitamina A alcool e vitamina D<sub>2</sub> a cui veniva applicato il procedimento a partire dal trattamento con il reattivo disidratante (Tab. 1);

TABELLA 1.

Recupero della vitamina D<sub>2</sub> da miscele vitamina A + vitamina D<sub>2</sub> dopo trattamento con reattivo disidratante e cromatografia su colonna.

Contenuto in 5 ml di benzolo	Trovato	% del teorico
1) Vitamina A alcool U. I. 10.000 Vitamina D <sub>2</sub> µg      180 . . . . .	180	100
2) Vitamina A alcool U. I. 15.000 Vitamina D <sub>2</sub> µg      180 . . . . .	180	100
3) Vitamina A alcool U. I. 30.000 Vitamina D <sub>2</sub> µg      180 . . . . .	176	98
4) Vitamina A alcool U. I. 50.000 Vitamina D <sub>2</sub> µg      180 . . . . .	196	109 (*)
5) Vitamina A alcool U. I. 10.000 Vitamina D <sub>2</sub> µg      100 . . . . .	99	99
6) Vitamina A alcool U. I. 15.000 Vitamina D <sub>2</sub> µg      100 . . . . .	100	100
7) Vitamina A alcool U. I. 30.000 Vitamina D <sub>2</sub> µg      100 . . . . .	96	96

(\*) L'errore in più è imputabile al fatto che la correzione del valore di assorbimento per sottrazione del bianco con inibitore non è esatta quando il contenuto in vitamina A del campione in esame è molto elevato rispetto a quello in vitamina D<sub>2</sub>; infatti è stato notato che l'azione dell'inibitore non è nulla sulla vitamina A e sui prodotti di trasformazione e quindi le letture di assorbimento corrette sono leggermente troppo alte.

2) soluzioni oleose di vitamina A palmitato e vitamina D<sub>2</sub> preparate sciogliendo i prodotti puri in olio di oliva (Tab. 2);

TABELLA 2.

Recupero della vitamina D<sub>2</sub> da miscele oleose.

Contenuto per g di olio	Trovato	% del teorico
1) Vitamina A palmitato U.I. 10.000 Vitamina D <sub>2</sub> µg      200 . . . . .	197	99
2) Vitamina A palmitato U.I. 20.000 Vitamina D <sub>2</sub> µg      200 . . . . .	193	97
3) Vitamina A palmitato U.I. 30.000 Vitamina D <sub>2</sub> µg      200 . . . . .	195	98

## 3) alcuni prodotti farmaceutici (Tab. 3).

TABELLA 3.

Recupero della vitamina D<sub>2</sub> da prodotti farmaceutici.

Prodotto	Dichiarato	Trovato	% del dichiarato
Soluzione oleosa per uso parenterale . . . . .	Vitamina A U. I. 50.000		
	Vitamina D <sub>2</sub> mg 10	1) mg 10,7	107
		2) » 10,6	106
Soluzione oleosa per uso parenterale . . . . .	Vitamina A U. I. 50.000		
	Vitamina D <sub>2</sub> mg 2,5	3) » 10,6	106
		1) mg 2,2	88
Soluzione oleosa per uso orale . . . . .	Vitamina A U. I. 10.000		
	Vitamina D <sub>2</sub> mg 0,05	2) » 2,3	92
		3) » 2,3	92
Soluzione oleosa per uso orale . . . . .	Vitamina A U. I. 10.000		
	Vitamina D <sub>2</sub> mg 0,05	1) mg 0,039	78
		2) » 0,039	78
		3) » 0,040	

## DISCUSSIONE

Il metodo da noi messo a punto presenta indubbiamente dei punti delicati e richiede particolari cautele, soprattutto per quanto riguarda la preparazione del reattivo all'acido p-toluensolfonico e l'evaporazione della soluzione ottenuta dopo aver eseguito la disidratazione. Operando secondo le modalità descritte, queste difficoltà sono facilmente superate ed una volta eseguita la saponificazione l'analisi completa non richiede più di 3-4 ore.

Per quanto riguarda la determinazione colorimetrica finale, abbiamo dato la preferenza al sistema di WILKIE, JONES & KLINE (1958), che fa uso di un bianco contenente un inibitore della reazione vitamina D-tricloruro di antimonio: abbiamo però notato che l'effetto d'inibizione non è specifico per la vitamina D. L'inibitore agisce anche sulla reazione tra il tricloruro di antimonio e i prodotti di alterazione della vitamina A (che possono essersi formati in medicinali conservati per lungo tempo o in condizioni sfavorevoli) e soprattutto sulla reazione tra il tricloruro di antimonio e la vitamina A alcool che eventualmente non è stata trasformata in anidrovitamina e che viene quindi fissata sull'allumina ed eluita poi insieme alla vitamina D. È pertanto indispensabile accertarsi che la vitamina A sia stata trasformata completamente in anidrovitamina.

In base ai risultati ottenuti, possiamo per ora concludere che il metodo è applicabile ai prodotti farmaceutici contenenti vitamina A e vitamina D, anche in presenza di altri componenti, quando il rapporto tra le due vitamine (espresso in U.I.) non supera 8:1.

31 gennaio 1967.

#### BIBLIOGRAFIA

- BARUA, R. K. & M. V. K. RAO, 1964. *Analyst*, **89**, 534.  
BARUA, R. K. & M. V. K. RAO, 1965. *Analyst*, **90**, 571.  
BUDOWSKI, P. & A. BONDI, 1957. *Analyst*, **82**, 751.  
EWING, D. T., T. D. SCHLABACH & M. J. POWELL, 1954. *Anal. Chem.*, **26**, 1406.  
MARIANI, A. & G. CAVINA, 1953. *Rend. Ist. Super. Sanità*, **16**, 725.  
MARIANI, A. & G. CAVINA, 1955. *Rend. Ist. Super. Sanità*, **18**, 232.  
MARIANI, A. & C. VICARI, 1963. *Farm. Aikakaustehti*, **11**, 267.  
MARIANI, A. & C. VICARI, 1965. *Boll. Chim. Farm.*, **104**, 26.  
MULDER, F. J., E. J. DE VRIES & K. J. KEUNING, 1965. *Pharm. Weekblad*, **100**, 1457.  
SCHMAIL, M., B. SENKOWSKI, R. COLARUSSO, E. G. WOLLISH & E. G. E. SHAFER, 1958. *J. Am. Pharm. Assoc.*, **47**, 839.  
SHUE, G. M., 1965. *J. Assoc. Offic. Agr. Chemists*, **48**, 855.  
THEIVAGT, J. G. & D. J. CAMPBELL, 1959. *Anal. Chem.*, **31**, 1375.  
WILKIE, J. B., S. W. JONES & O. L. KLINE, 1958. *J. Am. Pharm. Assoc.*, **47**, 385.