

Determinazione gascromatografica della benzaldeide nello sciroppo di orzata (*)

ANGELO STACCHINI e LUIGI BONIFORTI

Laboratori di Chimica

Riassunto. — Si descrive un metodo gas-cromatografico per la ricerca ed il dosaggio dell'aldeide benzoica nell'essenza di mandorle e nello sciroppo di orzata. L'impiego del rivelatore a cattura di elettroni consente di dosare quantità di benzaldeide comprese tra 1 e 5 μg .

Summary. — A gas-chromatographic method for the detection and quantitative determination of benzaldehyde in essential oil of almonds and in « orzata » syrup is described.

Amounts between 1 and 5 micrograms of benzaldehyde can be appreciated with an electron capture detector.

In una precedente nota (1) furono consigliati alcuni indici analitici per la ricerca del latte di mandorle, sgrassato e non sgrassato, nello sciroppo di orzata. Il Ministero dell'Industria e del Commercio ha successivamente chiarito con due circolari — del 1° aprile 1953 e del 6 settembre 1962 — che per « estratto di mandorle » poteva intendersi anche il prodotto ottenuto per distillazione delle mandorle anche amare, commercialmente definito « essenza di mandorle ». Il costituente fondamentale dell'essenza di mandorle amare è l'aldeide benzoica che proviene dalla scissione enzimatica dell'amigdalina, glucoside contenente aldeide benzoica ed acido cianidrico. L'amigdalina è presente nelle mandorle in quantità comprese tra il 3,5 e il 5 % (2).

È sembrato utile pertanto mettere a punto un metodo che consentisse la ricerca ed il dosaggio dell'aldeide benzoica nello sciroppo di orzata.

L'esame dello spettro di assorbimento nell'u.v. dell'estratto etereo ottenuto dallo sciroppo di orzata (previamente alcalinizzato per impedire il passaggio nella fase organica degli acidi benzoico e cinnammico eventualmente presenti) non è sempre indicativo data la possibile presenza in tale estratto di altri componenti aromatici che possono trovarsi nelle paste aromatizzanti impiegate (benzoino, vaniglia e fiori di arancio).

(*) Questo lavoro è apparso in *Boll. Lab. Chim. provinciali*, 15, 115 (1964).

Si rendeva perciò necessario provvedere prima alla separazione dell'aldeide benzoica dagli altri componenti e poi al suo dosaggio.

Queste difficoltà hanno suggerito di sostituire il metodo spettrofotometrico con il metodo gas-cromatografico.

In una prima serie di esperienze si cercò di mettere in evidenza la presenza dell'aldeide benzoica nelle essenze di mandorle amare dal commercio e di dosarne la quantità impiegando il rivelatore ad ionizzazione di fiamma.

La benzaldeide è però presente in piccole quantità ed era pertanto necessario introdurre cospicui volumi delle soluzioni eteree; nei cromatogrammi

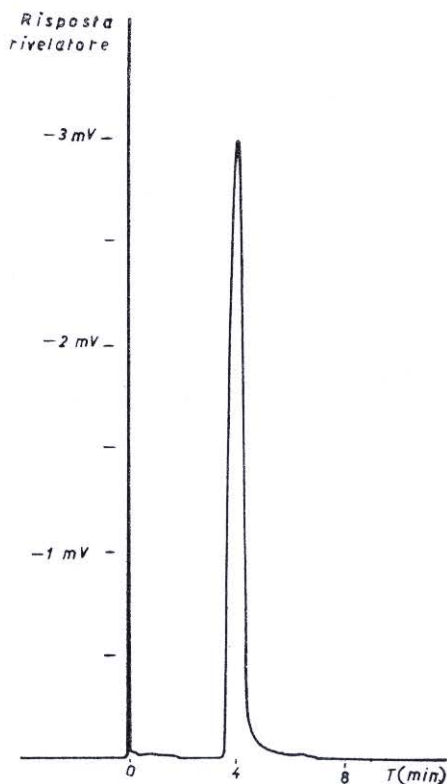


Fig. 1. — Gascromatogramma di aldeide benzoica: rivelatore a cattura di elettroni. Quantità iniettata: 1 gamma.

si aveva formazione di grosse code del solvente, con conseguente alterazione della linea di base e difficoltà di lavorare con sensibilità elevata.

Questo avveniva impiegando colonne impaccate e colonne capillari.

L'osservazione, già riportata in letteratura (3-7), che la benzaldeide è capace di «catturare» elettroni in misura notevole, ci ha indotti a sostituire al rivelatore ad ionizzazione di fiamma quello a cattura di elettroni. Si sono così ottenuti risultati migliori; sensibilità notevolmente superiore a quella fornita dal rivelatore ad ionizzazione di fiamma; eliminazione completa delle code dovute ai solventi (fig. 1); possibilità di iniettare notevoli e ben riproducibili quantità di soluzioni, rendendo il metodo rapido e preciso. Anche la grande selettività del rivelatore, per cui non viene messa in evidenza la presenza di altri prodotti volatili con minore affinità elettronica, concorre alla specificità del metodo.

PARTE SPERIMENTALE

Apparecchio: gascromatografo Perkin Elmer mod. 800, munito di rivelatore a cattura di elettroni fornito dalla stessa Ditta;

colonna: in acciaio inox., diametro interno mm 3, lunghezza m. 1,80, riempita con Chromororb W silanizzato al 10 % di poliossietilenglicole Carbowax 6000;

temperatura: colonna 135°C, evaporatore 160°C, rivelatore 120°C;

gas di trasporto: azoto purissimo, flusso misurato all'uscita del rivelatore, 200 cm³/min;

tensione applicata al rivelatore: 45 V;

attenuazione: 1×500 .

L'attenuazione deve essere regolata in ogni caso in modo da ottenersi la massima sensibilità del rivelatore affinché la quantità di benzaldeide iniettata sia sicuramente molto inferiore al limite di saturazione del rivelatore stesso.

La colonna è stata previamente condizionata per 24 ore alla temperatura di 180°C e per 6 ore a 200°C.

La linearità della risposta del rivelatore in confronto alla quantità di benzaldeide è riportata nella fig. 2.

Il diagramma analitico conc./area dei picchi (fig. 2) è stato tracciato con soluzioni di aldeide benzoica in etere etilico esente da perossidi. Questa ultima condizione è essenziale ai fini del dosaggio quantitativo poichè, soprattutto all'atto dell'iniezione della soluzione nella colonna gascromatografica, l'elevata temperatura determina l'ossidazione ad opera dei perossidi, dell'aldeide benzoica ad acido benzoico.

Per l'eliminazione dei perossidi è sufficiente dibattere l'etere in imbuto separatore con soluzione satura di solfato ferroso acidificata con acido solforico. Si separa quindi la fase acquosa e si lava l'etere due volte con acqua.

Il titolo dell'aldeide benzoica usata per la preparazione delle soluzioni è stato controllato mediante la formazione del fenilidrazone.

Il dosaggio della benzaldeide nei campioni è stato effettuato per confronto con soluzioni di riferimento contenenti quantità note di benzaldeide in etere etilico.

Per il calcolo delle quantità presenti ci si è regolati in modo da iniettare ogni volta la stessa quantità di soluzione (10 microlitri) e pertanto si

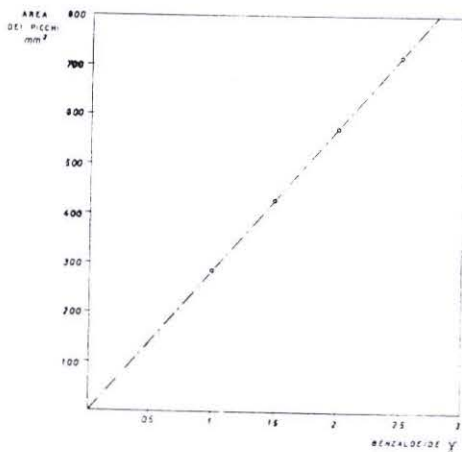


Fig. 2. — Diagramma analitico: risposta del rivelatore (espressa come area del picco in mm^2) in funzione della quantità di benzaldeide iniettata.

sono variate le diluizioni delle soluzioni in esame in modo da ottenere aree dei picchi dello stesso ordine di grandezza senza variare la sensibilità del rivelatore. Le quantità di benzaldeide nei campioni in esame, come pure quella delle soluzioni di riferimento, sono state calcolate in base alla media delle aree dei picchi ottenuti in almeno due introduzioni. Lo scarto delle aree e quindi la riproducibilità dei risultati è compresa tra il $\pm 2\%$.

La ricerca ed il dosaggio dell'aldeide benzoica con il metodo gascromatografico è stata eseguita su campioni di essenza di mandorle e di sciroppo di orzata preparati in laboratorio o forniti dall'industria, e su campioni di paste aromatizzanti al benzoino.

Preparazione dell'essenza di mandorle: 100 grammi di mandorle finemente triturate sono lasciate digerire in un litro di acqua per 48 ore. Si è quindi distillato in corrente di vapore raccogliendo 200 ml di distillato. La frazione di coda dopo i 200 ml è risultata priva di aldeide benzoica.

Preparazione dello sciroppo di orzata: è stata preparata una serie di campioni contenenti saccarosio 30%, pasta azomatizzante al benzoino 2% ed aldeide benzoica in quantità crescenti da 0 a 40 mg per 100 ml.

Estrazione dell'aldeide benzoica: è stata eseguita direttamente sulla essenza (g 10) o sullo sciroppo (g 50) con etere etilico esente da perossidi. Sono state sufficienti tre estrazioni con 10-15 ml di etere per volta. Si sono riuniti gli estratti eteri in pallone tarato da 50 ml e si è portato a volume con etere. La soluzione eterea proveniente dall'estrazione dell'essenza è stata ulteriormente diluita 1 a 100. Microlitri 10 di questa soluzione sono stati quindi iniettati nella colonna gas cromatografica.

In tabella 1 sono riportati gli scarti tra la quantità di aldeide benzoica aggiunta e quella ritrovata nei campioni preparati in laboratorio.

TABELLA 1

Benzaldeide presente mg/ml	Benzaldeide trovata mg/ml	Differenza
0	0	—
0,1	0,096	— 4 ‰
0,2	0,195	— 2,5 ‰
0,3	0,304	+ 1,3 ‰
0,4	0,405	+ 1,2 ‰

In tabella 2 sono riportate le quantità di aldeide benzoica presente in alcuni campioni di sciroppo di orzata e di essenza di mandorle di prepara-

TABELLA 2

C A M P I O N E	B E N Z A L D E I D E
Essenza di mandorle distillata in laboratorio	g 0,335 per 100 ml di essenza (corrispondenti a 50 g di mandorle)
Essenza di mandorle Ditta A	g 62,6 per 100 g di essenza
Essenza di mandorle Ditta B	g 2,27 per 100 g di essenza
Estratto per sciroppo di orzata Ditta A	g 3,27 per 100 g di estratto
Pasta aromatizzata per sciroppo di orzata Ditta A	g 0,436 per 100 g di pasta
Sciroppo di orzata Ditta C	g 0,230 per kg di sciroppo
Sciroppo di orzata Ditta D	g 0,200 per kg di sciroppo
Sciroppo di orzata Ditta E	g 0,600 per kg di sciroppo
Sciroppo di orzata Ditta F	g 0,100 per kg di sciroppo
Sciroppo di orzata Ditta G	g 0,110 per kg di sciroppo

zione industriale, e le quantità di aldeide benzoica presente nell'essenza di mandorle distillata in laboratorio. Quest'ultima quantità (670 mg per l'essenza ricavata da 100 g di mandorle) corrisponde ad un contenuto di amigdalina pari al 3,4 %, ed è quindi in accordo con la percentuale di amigdalina (3,5-5 %) presente nelle mandorle amare.

Dosaggio dell'aldeide benzoica dallo sciroppo di orzata: 50 grammi di sciroppo di orzata vengono estratti in imbuto separatore per 3 volte (3 frazioni da 10 ml) con etere etilico esente da perossidi. Gli estratti eterici vengono riuniti in pallone da 50 ml e portati a volume con etere. Tale soluzione può essere ulteriormente diluita in relazione alla quantità di benzaldeide. Microlitri 10 di questa soluzione vengono iniettati nella colonna gas cromatografica e si calcola il valore medio dell'area del picco dell'aldeide benzoica di almeno due introduzioni. La quantità di aldeide benzoica presente nello sciroppo di orzata si calcola per semplice proporzione tra questo valore e quello della media dell'area del picco ottenuto iniettando nelle stesse condizioni una soluzione standard contenente 0,1 mg/ml di aldeide benzoica.

CONCLUSIONI

Il metodo descritto consente di determinare la quantità di benzaldeide presente nello sciroppo di orzata. Resta il quesito di conoscere se l'aldeide benzoica provenga dall'essenza di mandorle o sia stata aggiunta come tale, quesito che non presenta risoluzione. Finora nell'essenza di mandorle non è stato possibile mettere in evidenza, oltre l'aldeide benzoica, altri costituenti specifici. Se nei campioni esaminati è stata adoperata essenza di mandorle si calcola facilmente che il consumo di mandorle per kg di sciroppo oscilla da g 15 a g 90.

È auspicabile una modifica della vigente legislazione che differenzi il prodotto ottenuto esclusivamente con latte di mandorle da quello ottenuto con essenze aromatiche artificiali mescolate o non con essenza di mandorle.

La parte sperimentale è stata eseguita con la collaborazione del perito chimico Sig. AMEDEO FONTANA.

Si ringrazia il Prof. ROBERTO INTONTI per l'interesse con cui ha seguito questo lavoro.

BIBLIOGRAFIA

- (1) COTTA RAMUSINO F., INTONTI R., STACCHINI A. - Boll. Lab. chim. provinciali 12, 491 (1961).
- (2) WINTON A. L. - « Structure and composition of Foods », Chapman-Hall (London) e John Wiley & Sons (New York) 1946 - Vol. I, p. 483.
- (3) LOVELOCK I. E. - Nature, 195, 488 (1962).
- (4) TAYLOR M. P. - J. Chromatog., 9, 28 (1962).
- (5) LOVELOCK I. E. - Anal. Chem., 35, 474 (1963).
- (6) LOVELOCK I. E. - Anal. Chem., 33, 1958 (1961).
- (7) RESEARCH NOTES - Wilkens Instrument and Research - 1963.

Separazione e determinazione dell'acido uridin-trifosforico in alcuni preparati farmaceutici (*)

VITO AMORMINO

Laboratori di Biologia

Riassunto. — Viene descritto un metodo per la determinazione dell'acido uridin-trifosforico da solo e associato alle vitamine B₁₂ e B₁.

Il metodo consiste nella separazione quantitativa, mediante cromatografia su carta, dell'acido uridin-trifosforico (UTP) dall'acido uridin-difosforico (UDP), dall'uridin-monofosforico (UMP) ed eventualmente dalle vitamine B₁₂ e B₁.

Summary. — A method is given for the determination of the uridin-triphosphoric acid alone or in association with vitamins B₁₂ and B₁.

The method consists in the quantitative separation by paper chromatography of uridin-triphosphoric acid (UTP) from uridin-diphosphoric acid (UDP), uridin-monophosphoric acid (UMP) and eventually from vitamins B₁₂ and B₁.

Oggetto di questa Nota è la descrizione di un procedimento che permette la determinazione dell'acido uridin-trifosforico (UTP) da solo e associato con le vitamine B₁₂ e B₁.

L'uso dell'UTP, per il suo effetto neurostimolante come agente del metabolismo neuromuscolare e correttore della fatica, è stato recentemente consigliato, anche in associazione con le vitamine B₁ e B₁₂, nella terapia delle atrofie muscolari neurogene, delle distrofie progressive, delle miasteniche e della fatica neuromuscolare (1), oltrechè, per la sua azione inotropica positiva (1-2), in quella delle cardiopatie (3).

Il metodo consiste nella separazione quantitativa mediante cromatografia su carta dell'acido uridin-trifosforico (UTP) dall'acido uridin-difosforico (UDP), dall'uridin-monofosforico (UMP) ed eventualmente dalle vitamine B₁₂ e B₁.

Rispetto ai vari metodi proposti e generalmente usati per la separazione e determinazione dell'UTP, come cromatografia su strato sottile di cellulosa (4), cromatografia con resine a scambio ionico (5), cromatografia su

(*) Questo lavoro è apparso in *Farmaco, Ed. prat.*, 19, 440 (1964).

carta speciale trattata con Polymen P (a scambio ionico) (6), quello descritto nella presente Nota è più semplice e più rapido.

Con il sistema di solventi usato, è necessario adoperare un tipo di carta particolare e precisamente il tipo Whatman n. 31; con carta diversa da questa non si ottengono buone separazioni.

PARTE SPERIMENTALE

Sostanze di riferimento:

a) Sale trisodico biidrato dell'acido uridin-5'-trifosforico ($\text{Na}_3\text{HUTP} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, peso molecolare = 586,00).

b) Sale trisodico biidrato dell'acido uridin-5'-difosforico ($\text{Na}_3\text{UDP} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, peso molecolare = 506,16).

c) Sale bisodico biidrato dell'acido uridin-5'-monofosforico ($\text{Na}_2\text{UMP} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, peso molecolare = 404,19).

Le caratteristiche spettrofotometriche della soluzione acquosa del sale sodico dell'UTP a pH 7 e 11 sono (7):

pH	7	11
mass. $m\mu$	262	262
E (1 %, 1 cm)	150 - 160	160
min. $m\mu$	230	239

La soluzione acquosa al 2 % dell' $\text{Na}_3\text{HUTP} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (pH = 4,5 circa) e quella in HCl N/1500 (pH = 3,3 circa) hanno le stesse caratteristiche spettrofotometriche della soluzione a pH 7.

L' $\text{Na}_3\text{HUTP} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ha un contenuto teorico di fosforo del 15,86 %; il campione analizzato ed usato come riferimento ne contiene il 13,5 %.

Separazione cromatografia qualitativa su carta:

Solvente: piridina 33, isobutanolo 33, acqua 33, acido acetico glaciale 1, parti in volume.

Carta : si usa la carta Whatman n. 31 tagliata in fogli da cm 9,5 o 19 per 39 o 46 possibilmente trattata con soluzione di Na_4EDTA allo 0,1 % portata a pH 8, lavata con acqua ed asciugata.

Metodo : discendente in 6 ore (oppure ascendente in 18 ore).

Procedimento. — Si preparano per pesata e per diluzione in acqua bidistillata le soluzioni di UTP, UDP e UMP alla concentrazione di 5 mg/ml e

quella contenente la miscela dei tre composti nel rapporto approssimato: 70 % UTP, 15 % UDP, 15 % UMP sempre alla concentrazione di 5 mg/ml.

Si depositano mediante una micropipetta 20 μ l di ciascuna soluzione su una striscia di carta delle dimensioni di 19 per 46 cm per 4 corsie, curando che la soluzione venga a trovarsi in una zona centrale di circa 5 cm di ampiezza. Si facilita l'evaporazione del solvente con l'aiuto di una corrente d'aria calda.

Si fa avvenire la cromatografia col metodo discendente per 6 ore. La striscia asciugata con cura all'aria fino ad *eliminazione totale della piridina* (alcune ore sotto la cappa), viene osservata alla luce U.V. e si contrassegnano a matita le zone delle macchie.

Separazione cromatografica quantitativa su carta. — Si adopera una striscia di carta di 9,5 per 36 cm per 4 corsie; si depositano 20 μ l della soluzione acquosa di UTP a 5 mg/ml nella I e nella II corsia lasciando vuote le altre due corsie di uguali dimensioni e si fa avvenire la cromatografia con la tecnica descritta sopra.

La striscia, asciugata all'aria fino ad eliminazione totale della piridina, viene osservata alla luce U.V. e si contrassegnano a matita le zone corrispondenti all'UTP, all'UDP ed eventualmente all'UMP.

Si ritagliano le aree corrispondenti all'UTP, all'UDP e all'UMP ed altre analoghe dalle corsie vuote, per la prova in bianco. Si introducono i frammenti in altrettante provette ben pulite si agita con 4 ml di HCl N/1500, si lascia a contatto per 3-6 ore e quindi si filtra per cotone.

Si determina la estinzione delle soluzioni a 262 $m\mu$, azzerando con gli eluati della cromatografia in bianco.

Il contenuto in $\text{Na}_3\text{HUTP}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ si calcola dalla formula:

$$\frac{E\ 262\ m\mu \cdot 10.000 \cdot 4}{160} = \% \text{Na}_3\text{HUTP}\cdot 2\text{H}_2\text{O} \text{ nel prodotto in esame.}$$

La validità del metodo suddetto è dimostrata dal fatto che la somma di E 262 $m\mu$ trovato per l'eluato della macchia corrispondente all'UTP e per quelli dell'UDP e dell'eventuale UMP è uguale all'E 262 $m\mu$ trovato allo stesso pH per una soluzione contenente 25 μ g/ml del campione in esame.

Determinazione del fosforo. — I frammenti di carta corrispondenti all'UTP e all'UDP vengono mineralizzati in palloncini Kjeldahl con 2 ml di HNO_3 conc. e 1 ml. di HClO_4 al 60 % per circa due ore, fino a completa chiarificazione della soluzione e scomparsa dei vapori nitrosi. Le soluzioni percloriche si raccolgono quantitativamente in imbutini separatori da 25 ml, lavando i palloncini con 5 ml di acqua che si raccolgono nei rispettivi separatori. Si aggiungono 3 ml di soluzione di molibdato ammonico al 5 %, si agita e si estraggono con 9 ml di isobutanolo. Gli estratti isobutanolici si

raccogliono in provette graduate, si lavano i separatori con 1 ml di alcool etilico assoluto che si aggiunge alle soluzioni isobutanoliche che vengono infine portate a 10 ml con l'etanolo.

L'estinzioni delle soluzioni alcooliche colorate in giallo, si misurano allo spettrofotometro in vaschette da 1 ml, a 360 m μ .

Il contenuto in fosforo si ricava dai valori di E con l'ausilio di una curva di taratura allestita con soluzione a contenuto di fosforo standardizzato (fosfato alcalino).

La prova in bianco viene allestita mineralizzando un'area di carta corrispondente delle cromatografie in bianco.

La validità del metodo suddetto è dimostrata dal fatto che la somma dei valori trovati per il fosforo nelle macchie eluite e corrispondenti all'UTP, UDP ed eventualmente UMP (che difficilmente si ritrova nei buoni prodotti commerciali) coincide con il contenuto in fosforo totale determinato separatamente su di un campione del prodotto in esame.

RISULTATI E DISCUSSIONE

La curva di assorbimento nell'U.V. della soluzione dell'UTP eluito dalla carta e riportata nella fig. 1 è perfettamente assimilabile a quella della soluzione di UTP nello stesso solvente.

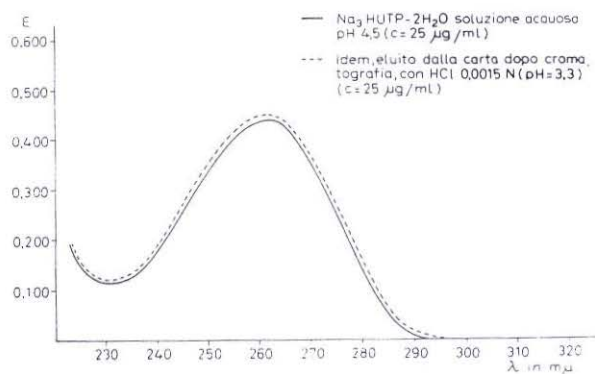


Fig. 1. — Curve di assorbimento nell'U.V. della soluzione acquosa di UTP (pH = 4,5) e di quella ottenuta dopo eluzione dal cromatogramma (pH = 3,3).

Nel cromatogramma riportato (fig. 2), si nota come la separazione dei tre componenti la miscela sia netta e distinta. Gli Rf sono: UTP 0,22 - UDP 0,29 - UMP 0,45.

Si rileva inoltre che, l'UTP contiene piccole quantità di UDP; il prodotto commerciale adoperato e analizzato contiene infatti il 10 % circa di UDP come impurezza.

L' $\text{Na}_3\text{HUTP}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ha un contenuto teorico di fosforo del 15,86 %; il

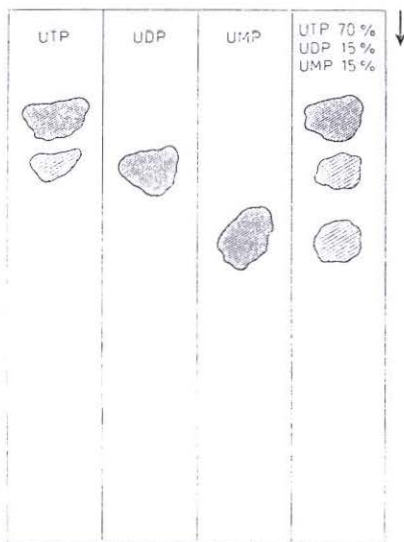


Fig. 2. — Separazione cromatografica di UTP, UDP e UMP.

tipo commerciale ne contiene dal 13,5 al 15 % corrispondente ad una purezza dell'85-89 %.

Si tenga presente che i buoni prodotti commerciali contengono dal 10 al 20 % di UDP e dal 5 al 10 % di impurezze varie (vedere fosforo totale). Quindi se si considera l'effettivo contenuto in UTP, la purezza è del 70-85 %.

Il campione esaminato ha un contenuto effettivo in UTP dell'80 %, come risulta dall'esempio riportato :

Titolo spettrofotometrico	90 %
Fosforo totale organico	14 % (purezza 90 %)

Cromatografia su carta :

- determinazione spettrofotometrica : moli UTP / moli UDP = 90/10
- fosforo sulle macchie : moli UTP / moli UDP = 90/10

APPLICAZIONE DEL METODO AI PREPARATI FARMACEUTICI

A) UTP associato a vitamina B_{12} e vitamina B_1 in fiale liofilizzate. — Nei preparati liofilizzati, il supporto (mannitolo, glicina) disturba notevol-

mente la cromatografia, tuttavia operando nelle condizioni indicate si ottiene una buona separazione dell'UTP dall'UDP, dall'eventuale UMP e dagli altri componenti.

Il contenuto di alcune fiale si scioglie in acqua in modo da avere una concentrazione di 1 mg/ml di $\text{Na}_3\text{HUTP}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$. Col metodo descritto sopra si

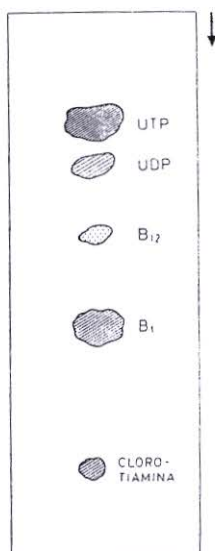


Fig. 3.

Separazione cromatografica di una miscela liofilizzata di UTP e vitamine B_1 e B_{12} .

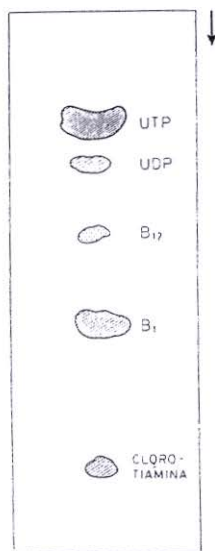


Fig. 4.

Separazione cromatografica di una miscela acquosa di UTP e vitamine B_1 e B_{12} .

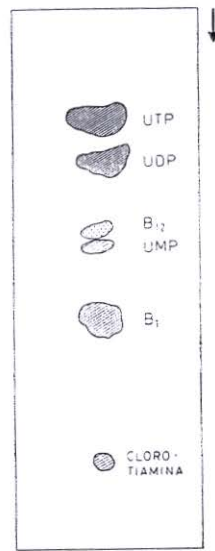


Fig. 5.

Separazione cromatografica della stessa soluzione alla figura precedente ma dopo 30 giorni dalla preparazione.

cromatografa una quantità di soluzione corrispondente a 40 μg , cioè 40 μl . Avvenuta la cromatografia (una corsia per il riferimento, una o due corsie per l'eluzione e determinazione spettrofotometrica, una o due per la determinazione del fosforo, una per i bianchi) si procede al riconoscimento e alla determinazione.

Si eluiscono le macchie dell'UTP e dell'UDP con HCl N/1500 e si fa la lettura a 262 $\text{m}\mu$, calcolandone il contenuto per fiala dal valore di E (1 %, 1 cm) = 160 e tenendo conto della quantità cromatografata.

Si determina il fosforo sull'area di carta corrispondente all'UTP e all'UDP. È consigliabile in questo caso, data la esigua quantità di fosforo presente (5-6 μg), adoperare il metodo al blu di molibdeno.

In un preparato di questo tipo, una parziale o totale idrolisi dell'UTP verrebbe rivelata dalla comparsa nel cromatogramma della macchia del-

l'UMP che verrebbe a trovarsi attaccata o addirittura sovrapposta a quella della vitamina B₁₂, dato che i corrispondenti valori degli Rf sono molto vicini. In questo caso, eluite le macchie con le modalità descritte, bisognerà sottrarre dal valore di E₂₆₂ dell'UMP quello di E₂₆₂ della vitamina B₁₂, la cui concentrazione può essere determinata direttamente sulla fiala a 548 mμ.

B) *UTP associato a vitamina B₁₂ e vitamina B₁ in fiale non liofilizzate* (soluzioni acquose). — In questo caso la separazione è molto più agevole: infatti l'assenza del supporto permette di usare una concentrazione di UTP molto più elevata, per cui se ne possono deporre sulla carta fino a 100 μg (cromatogramma fig. 4).

Come poteva già prevedersi, con il tempo e a temperatura ambiente, l'UTP, in questa soluzione, si altera idrolizzandosi in parte a UDP e a UMP.

La stessa soluzione esaminata dopo 30 giorni dà il cromatogramma della fig. 5 con i seguenti risultati:

UTP	trovato	:	40 %
UDP	»	:	40 %
UMP	»	:	20 %

BIBLIOGRAFIA

- (1) LEVY J., MICHEL-BER E., MASBERNARD A., DESCLOS S., DE LA FOUCHOIS, MAZINGOUT F. e COIRAULT R. - *Presse Méd.* 68, 1127 e 1169 (1960).
- (2) MINELLI R. e MAGGI G. C. - *Boll. Soc. Ital. Biol. Sper.* 37, 1600 (1961).
- (3) BARDI G. - *Gazz. Med. Ital.* 122, 246 (1963).
- (4) RANDEKATH K. - *Nature* 194, 768 (1962).
- (5) MARINI-SCOTTI M. - *Farmaco*, (Ed. prat.) 18, 332 (1963).
- (6) RANDEKATH K. - *J. Chromatog.* 10, 235 (1963).
- (7) BOCK R. M. e MAN-SING-LING - *Arch. Biochem. Biophys.* 62, 253 (1957).