

**Separazione e determinazione mediante cromatografia  
su carta di nucleosidi di interesse farmaceutico**

VITO AMORMINO e GUIDO CAVINA

*Laboratori di Biologia*

**Riassunto.** — Si descrive una metodica basata su una cromatografia bidimensionale per separare e determinare i nucleosidi adenosina, citidina, uridina e guanosina contenuti in preparazioni farmaceutiche, anche in presenza di vitamine del gruppo B.

La carta impiegata è Whatman n. 1 o 3 MM, il primo solvente è n-butano-acqua-ammoniaca concentrata 172:18:10, il secondo, isopropanolo-acqua-acido cloridrico concentrato 130:37:33 v/v.

Il procedimento, di semplice esecuzione, consente di separare i 4 nucleosidi fra di loro e da cloridrato di aneurina, riboflavina-5-fosfato, cloridrato di piridossina, nicotinammide, cianocobalamina.

I nucleosidi possono essere eluiti con HCl 0,1 N e determinati per via spettrofotometrica con recuperi soddisfacenti in relazione alla metodica impiegata.

**Summary.** — The paper describes a method of separation and determination of the adenosine, cytidine, guanosine and uridine nucleosides contained in pharmaceutical preparations, even in presence of B group vitamins.

The separation is achieved by means of bidimensional chromatography, using n-butanol-water-concentrated ammonia 172:18:10 as first solvent and isopropanol-water-concentrated hydrochloric acid 130:37:33 v/v as second, on Whatman paper n. 1 or 3 MM.

This simple technique permits us to isolate each nucleoside and to separate them from aneurine hydrochloride, riboflavine-5-phosphate, pyridoxine hydrochloride, nicotinamide and cyanocobalamine.

The nucleosides can be eluted with HCl 0,1 N and spectrophotometrically determined with satisfactory recovery.

---

La recente introduzione in terapia di farmaci contenenti nucleosidi, ha richiamato la nostra attenzione sulla necessità di disporre di metodi analitici semplici e sufficientemente precisi per il frazionamento e la determinazione

di nucleosidi che vengono impiegati in miscela tra di loro e spesso con altri componenti, generalmente vitamine del gruppo B, in preparazioni farmaceutiche per uso iniettabile e orale.

Infatti esistono ottime metodiche per la separazione e la determinazione di miscele di nucleosidi nei prodotti naturali, sia mediante cromatografia su colonna di resine a scambio ionico (COHN, 1955; HURBLERT *et al.*, 1954), sia per cromatografia su carta (COHN, 1955; HURBLERT *et al.*, 1954; WYATT, 1951; 1955; HOTCHKISS, 1948; VENNER, 1960) che su strato sottile (RANDERATH, 1961 a; b; 1961-1962; RANDERATH & STÜCK, 1961); ma la presenza di dette vitamine rappresenta in molti casi un ostacolo alla separazione dei nucleosidi e successiva determinazione spettrofotometrica.

Riteniamo utile descrivere qui una semplice metodica di cromatografia su carta bidimensionale che presenta, a nostro avviso, le seguenti caratteristiche favorevoli: 1) semplicità di esecuzione; 2) efficacia della separazione di adenosina, citidina, uridina e guanosina anche in presenza di cloridrato di aneurina, riboflavina-5-fosfato, cloridrato di piridossina, nicotinammide, cianocobalamina; 3) semplice riconoscimento dei vari nucleosidi mediante esame a luce UV del cromatogramma; 4) possibilità di eluire i nucleosidi e determinarli per via spettrofotometrica con recuperi che ammontano al 90-95 % in accordo con quelli forniti da altre metodiche.

#### MATERIALE E METODI

*Prodotti.* — Abbiamo impiegato i nucleosidi adenosina, citidina, guanosina, uridina, puri per ricerca della Zellstoff-Fabrik di Waldhof (Monaco). Si sono preparate soluzioni a 2 mg/cm<sup>3</sup> in isopropanolo al 10 % per le prove di cromatografia, conservando in frigorifero i campioni fino a 15 giorni.

*Controllo spettrofotometrico.* — Di ogni nucleoside è stato controllato lo spettro di assorbimento in HCl N/10, alla concentrazione di 10 µg/cm<sup>3</sup>, ottenendo, in accordo con la letteratura, i valori riportati nella Tabella 1.

TABELLA 1.

Caratteristiche spettrofotometriche dei nucleosidi impiegati

Nucleoside	$\lambda$	$E$ (1 %, 1 cm)	$\epsilon \times 10^{-3}$	$\epsilon \times 10^{-3}$	$\lambda$	$\epsilon \times 10^{-3}$	$\epsilon \times 10^{-3}$	Referenze
	Max	trovato	trovato	secondo altri AA.	Min	trovato	secondo altri AA.	
Adenosina . .	257	538	14,4	15,1	230	3,4	3,6	(a)
Citidina . . .	280	525	12,7	13,0	241	1,5	1,6	(b)
Guanosina . .	255	412	11,6	12,3	230	1,9	2,1	(b)
Uridina . . .	262	407	9,9	10,0	228	2,5	2,6	(c)

(a) MORELL & BLOCK, 1954; (b) VOLKIN & COHN, 1954; (c) PLOESER & LORING, 1949.



*Sistemi di solventi.*— Sono stati usati i seguenti sistemi di solventi.

I) n-butanolo - acqua - ammoniacca concentrata (d. 0,880) 172:18:10 secondo WYATT (1951), (1955) e MAC NUTT (1952) che in questi rapporti risulta monofasico oppure n-butanolo 66 - acqua 33 - ammoniacca conc. 1 (d. 0,925), impiegando lo strato organico separato.

II) isopropanolo - acqua - HCl conc. (d. 1,19) 130:37:33, secondo WYATT (1951) e SMITH & MARKHAM (1950) che risulta monofasico.

*Carta.* — È stata usata carta Whatman n. 1 oppure 3 MM, in precedenza lavata per scorrimento con acqua per 24 ore e successivamente per 24 ore con metanolo, tagliata in fogli di dimensioni di  $28 \times 46$  cm e successivamente asciugata all'aria.

*Determinazione cromatografica quantitativa.* — Si prepara una soluzione contenente  $2 \text{ mg/cm}^3$  di ciascuno dei quattro nucleosidi, come descritto precedentemente, e poi si mescolano volumi eguali delle varie soluzioni, in modo da ottenere una concentrazione singola di  $0,5 \text{ mg/cm}^3$ .

Per le prove in presenza di vitamine, a questa soluzione sono state effettuate le seguenti aggiunte, nella misura qui elencata (corrispondente ai dosaggi riscontrabili in prodotti farmaceutici di questo tipo): vitamina  $B_{12}$   $0,050 \text{ mg/cm}^3$ ; aneurina cloridrato  $0,8 \text{ mg/cm}^3$ ; riboflavina-5-fosfato  $0,2 \text{ mg/cm}^3$ ; nicotinammide  $2,0 \text{ mg/cm}^3$ ; piridoxina cloridrato  $0,2 \text{ mg/cm}^3$ .

Si depongono 100 o 200  $\mu\text{l}$  con micropipetta a vite micrometrica (Chemtron, Milano) in un punto equidistante 6 cm dal lato superiore e da quello destro del foglio (100  $\mu\text{l}$  per la carta Whatman n. 1 e 200  $\mu\text{l}$  per la carta Whatman 3 MM) e si inizia la cromatografia con il solvente I.

Tale cromatografia si fa avvenire in senso discendente per 22-24 ore, lasciando poi asciugare all'aria il cromatogramma. In questo tempo il solvente oltrepassa il limite inferiore del foglio, contribuendo alla migliore risoluzione della miscela. Si taglia poi il cromatogramma a 1 cm dopo la linea di partenza e in fondo fino ad una distanza di 26-28 cm dalla linea di partenza (controllare che vi sia inclusa la macchia dell'adenosina) e si cromatografa con il solvente II, in direzione ortogonale alla prima, con senso discendente per 16-18 ore circa. Si lascia asciugare all'aria e al riparo della luce per eliminare l'acido cloridrico proveniente dal solvente II.

Si identificano le macchie corrispondenti ai quattro nucleosidi con l'aiuto di un cromatogramma di riferimento con sostanze pure (Fig. 1), si ritagliano le aree corrispondenti ai singoli nucleosidi e si portano in provette con tappo a smeriglio contenenti 5 o 10  $\text{cm}^3$  di HCl N/10, secondo la quantità cromatografata (50 o 100  $\mu\text{g}$ ) di ogni nucleoside.

Parallelamente si eluiscono due zone vuote del cromatogramma, per avere le prove in bianco della carta. Dopo 12 ore di eluzione, con occasionale agitazione, si decanta il liquido nelle vaschette dello spettrofotometro, attraverso un filtro con cotone per trattenere le fibre della carta e si procede alla determinazione spettrofotometrica dei singoli nucleosidi alle lunghezze d'onda corrispondenti ai loro massimi. Si controlla l'esistenza del massimo e si rileva in parallelo l'assorbimento della prova in bianco contro HCl N/10. Per il calcolo si usano i valori di E (1 %, 1 cm) trovato riportati nella Tabella 1.

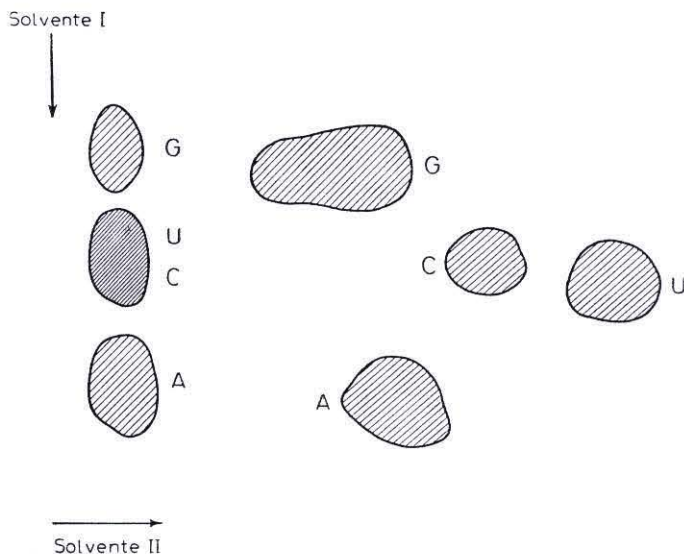


Fig. 1. — Cromatografia bidimensionale di nucleosidi puri.  
A: adenosina - C: citidina - G: guanosina - U: uridina.

### RISULTATI E CONCLUSIONI

Nella Fig. 2 si osserva come nella cromatografia con il solvente I si separa la maggior parte delle vitamine del gruppo B che procede avanti alla adenosina mentre la riboflavina-5-fosfato e la vitamina B<sub>12</sub> restano vicino alla origine; in questo solvente la successione dei nucleosidi è la seguente (dall'origine al fronte): guanosina (Rf=0,02) - uridina (Rf=0,04) - citidina (Rf=0,09) - adenosina (Rf=0,15).

Prima della corsa con il secondo solvente vengono tagliate via le zone del cromatogramma verso il fronte ove si trovano nicotinammide e parte delle vitamine B<sub>1</sub> e B<sub>6</sub> e quella a breve distanza dell'origine, eliminando la riboflavina-5-fosfato e la vitamina B<sub>12</sub>. Tracce di riboflavina, sempre presenti nell'estere fosforico, migrano nella zona uridina-citidina ma vengono

separate nella seconda corsa. Con questo solvente la successione dei nucleosidi è la seguente (dall'origine al fronte): guanosina ( $R_f=0,32$ ) - adenosina ( $R_f=0,37$ ) - citidina ( $R_f=0,45$ ) - uridina ( $R_f=0,67$ ) e pertanto la coppia citidina-uridina viene nettamente separata e si ottiene inoltre una più efficace separazione di questi nucleosidi dalla guanosina.

Nella Tabella 2 sono riportati i valori ottenuti nella analisi della miscela di nucleosidi con e senza aggiunta di vitamine. Ogni valore è la media di due dati, provenienti da due cromatografie eseguite in parallelo: come si può osservare dai valori riportati i recuperi sono buoni e così pure la riproducibilità.

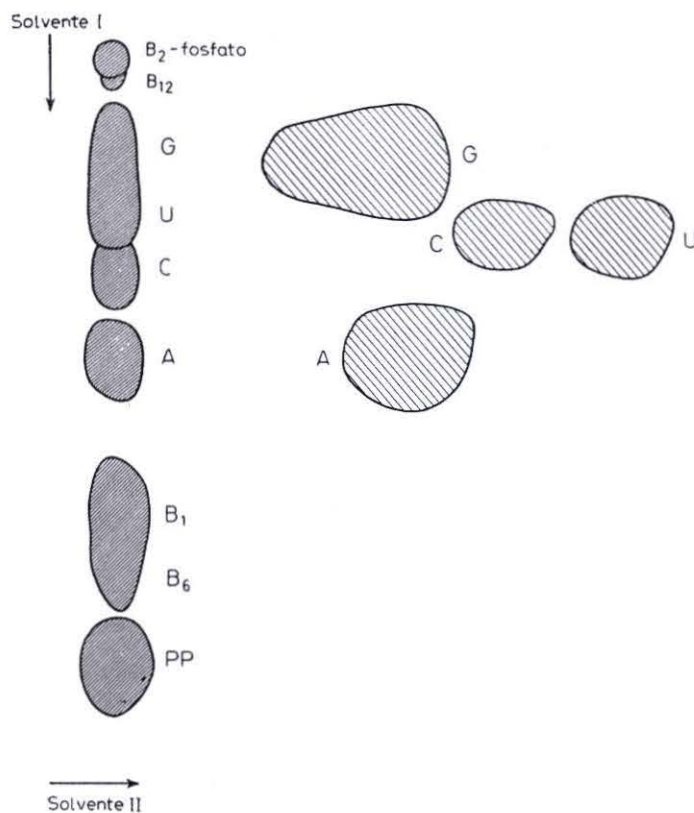


Fig. 2. — Cromatografia bidimensionale di nucleosidi in miscela con vitamine del gruppo B. Prima della corsa con il secondo solvente vengono eliminate le zone contenenti le vitamine.

A: adenosina - C: citidina - G: guanosina - U: uridina.  
Le vitamine del gruppo B sono indicate dalle denominazioni abbreviate: B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>-fosfato, B<sub>12</sub>, B<sub>6</sub> e PP.



## Risultati delle analisi

Campione	Carta	Recuperi percentuali			
		Adeno- sina	Citidina	Guanosina	Uridina
1) Miscela di nucleosidi, 50 µg di ciascun nucleoside . . . . .	Whatman 1	97,0	92,0	90,0	84,0
2) Idem . . . . .	Whatman 1	90,0	95,8	96,0	93,0
3) Miscela di nucleosidi, 50 µg di ciascun nucleoside + vitamine	Whatman 1	96,0	98,0	96,0	96,0
4) Idem con 100 µg di ciascun nucleoside . . . . .	Whatman 3MM	92,8	101,5	100,0	93,5
5) Idem con 100 µg di ciascun nucleoside . . . . .	Whatman 3MM	93,8	100,0	97,5	91,3

Si può concludere affermando che questa semplice metodica, purchè correttamente eseguita, ed almeno in doppio campione, consente di risolvere con mezzi modesti un problema analitico che richiederebbe per altre vie un insieme di prove notevolmente più complesso.

9 maggio 1964.

## BIBLIOGRAFIA

- COHN, W. E., 1955. In: *The nucleic acids*, E. Chargaff e J. N. Davidson, Ed., Academic Press, New York, Vol. 1, Cap. 6.
- HOTCHKISS, R. D., 1948. *J. Biol. Chem.*, **175**, 515.
- HURBLERT, R. B., H. SCHMITZ, A. F. BRUMEL & V. R. POTTER, 1954. *J. Biol. Chem.* **209**, 23.
- MAC NUTT, W. S., 1952. *Biochem. J.*, **50**, 384.
- MORELL, S. A. & R. M. BLOCK, 1954. *Abstracts Am. Chem. Soc. 126th Meeting N. Y. Div. of Biol. Chem.*, p. 44 c.
- PLOESER, J. M. & H. S. LORING, 1949. *J. Biol. Chem.*, **178**, 431.
- RANDERATH, K., 1961 a. *Angew. Chem.*, **73**, 436.
- RANDERATH, K., 1961 b. *Angew. Chem.*, **73**, 674.
- RANDERATH, K., 1961-1962. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **6**, 452.
- RANDERATH, K., & H. STUCK, 1961. *J. Chromatog.*, **6**, 365.
- SMITH, J. D. & R. MARKHAM, 1950. *Biochem. J.*, **46**, 509.
- VENNER, H., 1960. *Physiol. Chem.*, **322**, 122.
- VOLKIN, E. & W. E. COHN, 1954. In: *Methods of biochemical analysis*, D. Glick, Ed., Interscience, New York, p. 304.
- WYATT, G. R., 1951. *Biochem. J.*, **48**, 584.
- WYATT, G. R., 1955. In: *The nucleic acids*, E. Chargaff e J. N. Davidson, Ed., Academic Press, New York, Vol. 1.