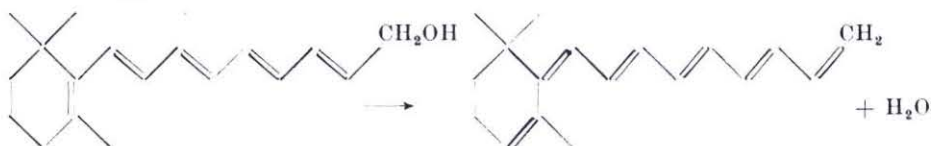


Valutazione dello stato di conservazione della vitamina A per mezzo della reazione di disidratazione

Tra i vari metodi di determinazione della vitamina A uno dei più interessanti è quello basato sulla sua trasformazione in anidrovitamina; non molto impiegato, forse perchè richiede maggior cura nella sua esecuzione, ha l'indubbio vantaggio, rispetto ai classici metodi colorimetrici e spettrofotometrici, di avere una elevata specificità.

Abbiamo avuto modo di provare ripetutamente questo metodo; esso è fondato sul fatto che la vitamina A alcool, sciolta in solventi anidri in presenza di tracce di opportuni catalizzatori, perde una molecola d'acqua dando origine ad un idrocarburo con un doppio legame in più



La comparsa della retro-struttura e l'aumento del numero dei doppi legami ha per conseguenza una variazione sostanziale nello spettro di assorbimento che diventa simile a quello dei carotenoidi. Per utilizzare la reazione a scopo quantitativo si usa come solvente il benzene anidro e come catalizzatore l'acido p. toluensolfonico, secondo le indicazioni di BUDOWSKI & BONDI¹. Lo spettro di assorbimento dell'anidrovitamina in benzene mostra massimi a 358, 377, 339 m μ , minimi a 364 e 389 m μ ed un flesso a 340-345 m μ .

La purezza dell'anidrovitamina ottenuta per disidratazione può essere giudicata dai valori di estinzione relativi ai tre picchi:

$$\frac{E_{399}}{E_{377}} = 0,870 \qquad \frac{E_{358}}{E_{377}} = 0,690$$

Misurando il cambiamento di estinzione ad adatte lunghezze d'onda in opportune condizioni sperimentali, è possibile determinare il contenuto in vitamina A di estratti insaponificabili provenienti da svariati materiali senza ulteriori purificazioni. Il massimo più adatto per la determinazione è quello a 399 m μ perchè a questa lunghezza d'onda la vitamina A praticamente non assorbe luce.

Tralasciamo qui i particolari del metodo e consideriamo soltanto la sua utilizzazione al fine di valutare la purezza e lo stato di conservazione della vitamina A.

Nell'analizzare prodotti farmaceutici contenenti vitamina A spesso ci si trova davanti al quesito se un'eventuale deficienza rispetto al dichiarato sia da attribuire al fatto che la Ditta produttrice ha messo realmente nel prodotto una quantità inferiore di vitamina (frode, errore di calcolo, ecc.) oppure alla degradazione della vitamina A in condizioni ambientali sfavorevoli.

Ci siamo già occupati del problema della rivelazione dei prodotti di degradazione della vitamina A usando la cromatografia su strato sottile ²; tale mezzo però deve essere usato con grande cautela e con particolari accorgimenti per poterne trarre giudizi veramente attendibili. Infatti la vitamina A può alterarsi durante le operazioni di laboratorio e persino sullo stesso strato; di qui la necessità di condurre la deposi-

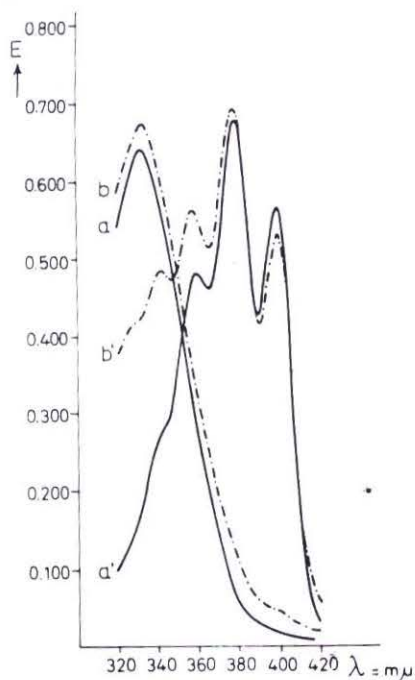


Fig. 1.

Spettri di assorbimento in benzolo di:

- a) Vitamina A integra;
- a') Anidrovitamina ottenuta da a);
- b) Vitamina A ad uno stadio iniziale di alterazione;
- b') Anidrovitamina ottenuta da b).

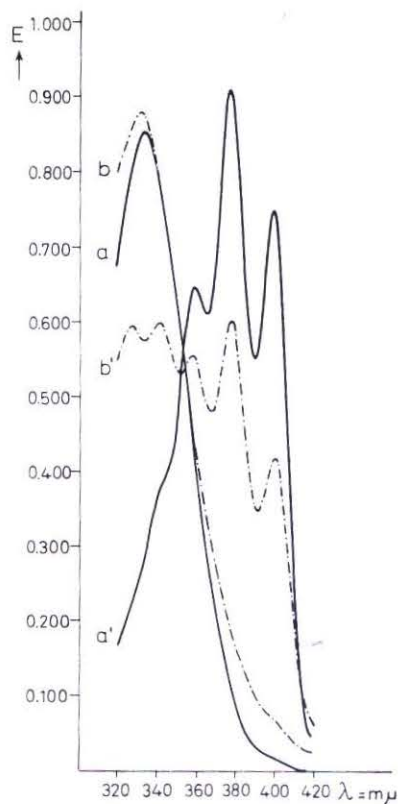


Fig. 2.

Spettri di assorbimento in benzolo di:

- a) Vitamina A integra;
- a') Anidrovitamina ottenuta da a);
- b) Vitamina A alterata;
- b') Anidrovitamina ottenuta da b).

zione delle macchie e la cromatografia in atmosfera di azoto. Nel lavoro citato ² avevamo anche studiato la variazione dello spettro di assorbimento della vitamina A con il progredire della degradazione ed avevamo potuto rilevare che per avere una variazione notevole dello spettro la vitamina doveva essere fortemente alterata e ciò era dovuto al fatto che i primi prodotti di alterazione hanno curve di assorbimento molto simili a quella della vitamina di partenza; se ne deduceva quindi che dalla curva di assorbimento non si poteva trarre un giudizio sullo stato di conservazione della vitamina.

Nello studiare la specificità della reazione vitamina A $\rightarrow$ Anidrovitamina per la determinazione della prima, ci interessava poter conoscere l'effetto del reattivo sui primi prodotti di degradazione della vitamina. Abbiamo perciò trattato con il reattivo disidratante soluzioni di vitamina A integra e soluzioni fatte da pochi giorni, non limitandoci alla sola lettura spettrofotometrica a 399 m μ , ma rilevando l'intero andamento della curva tra 350 e 420 m μ del prodotto finito. Si è così potuto constatare che la curva di assorbimento del prodotto ottenuto da una vitamina A all'inizio della sua alterazione è profondamente differente da quella corrispondente all'anidrovitamina ottenuta dalla vitamina A non alterata; ciò che è più interessante far notare è che questa differenza tra gli spettri è rilevabile in modo indubbio anche quando le curve di assorbimento delle vitamine di partenza più o meno alterate sono praticamente uguali. Nelle Fig. 1 e 2 sono messi a confronto gli spettri dell'anidrovitamina ottenuta da una vitamina A intatta e da una vitamina a due stadi di alterazione.

Applicando tale metodo di analisi ad alcuni prodotti farmaceutici contenenti vitamina A siamo stati in grado di poter affermare che, in alcuni casi, la deficienza quantitativa riscontrata era imputabile ad una alterazione subita dal prodotto e non ad un errato dosaggio iniziale.

14 maggio 1966.

AURELIO MARIANI, CONCETTA MARIANI-VICARI
e RAULINA MENDOZA
Laboratori di Biologia

¹ BUDOWSKI, P. & A. BONDI, *Analist*, **82**, 751 (1957).

² MARIANI, A. & C. VICARI, *Boll. Chim. Farm.*, **104**, 23 (1965).

Separazione e determinazione di alcuni coenzimi per cromatografia su strato sottile

In alcune specialità medicinali si ritrovano associati coenzimi e derivati fosforilati delle vitamine con alcuni nucleotidi, che è spesso difficile separare e determinare, specialmente quando i componenti di dette miscele sono numerosi [ad es. UTP o ATP o DPN associati tra di loro e con cocarbossilasi (TDP) e con piridossal-5'-fosfato (PLP)] (*). Allo scopo di risolvere questi problemi analitici più rapidamente che con altre tecniche (cromatografia su carta o su resina scambiatrice di ioni) siamo ricorsi alla cromatografia su strato sottile di cellulosa basica (ECTEOLA). Gli strati di cellulosa (DEAE^{1,2}, ECTEOLA^{1,4}, polietilenimina⁵) sono infatti da preferirsi, nella separazione dei nucleosidi e nucleotidi, a quello di gel di silice, che invece è più indicato per separare le basi puriniche e pirimidiniche.

L'applicazione di questo tipo di cromatografia alla separazione dei nucleotidi ed in generale dei prodotti di idrolisi degli acidi nucleici è stata ampiamente descritta da RANDEATH¹⁻⁵. Con lo strato di ECTEOLA, detto A, ha ottenuto la separazione di nucleobasi e nucleosidi usando acqua come solvente, e di nucleotidi sia con soluzione di NaCl 0,15 N, in un tempo di circa 15' per una corsa di 8 cm, sia con HCl diluito (0,01 - 0,07 M), in un tempo sensibilmente più breve¹. Con lo stesso solvente su DEAE cellulosa e per separazioni analoghe occorrono da 40' a 90'^{1,2,3,6}. Con gli altri solventi proposti si richiede un tempo maggiore (da 50' a 120'), in ogni caso però, la separazione che con essi si ottiene è indiscutibilmente migliore e più rapida di quella che si ha con la cromatografia su carta (Wh. n. 1, S.S. 2043 b, M.N. 263, ecc.)⁴.

Materiali e metodi. — Lo strato è costituito da polvere di cellulosa MN 300 ECTEOLA anionica (capacità di scambio 0,35 m Eq/g) e di cellulosa MN 300 della Ditta Macherey e Nagel.

Grammi 8 di cellulosa MN 300 ECTEOLA e g 2 di cellulosa MN 300 vengono sospesi in 55 ml di acqua e mescolati in agitatore per 30''; la sospensione viene posta nello stratificatore Desaga con apertura regolata a 0,5 mm; si stratifica sulla lastre di vetro (10 × 20 o 20 × 20) ben lavate e sgrassate con etere di petrolio. Le lastre così preparate si lasciano asciugare all'aria a temperatura ambiente e si essicca poi lo strato in stufa a 40° per 30'. Sulle lastre così preparate si depongono le soluzioni da esaminare: dalla soluzione acquosa contenente 1-2 mg/ml di ciascun composto si preleva, con una micropipetta, un volume di liquido (25-30 µl) contenente non più di 50 µg di ciascun coenzima o nucleotide, e si depone sulla lastra lungo una linea orizzontale, anziché in macchia circolare, per favorire la separazione. Per agevolare l'evaporazione del solvente acquoso la lastra si riscalda con aria calda dalla parte opposta allo strato. È bene eseguire queste operazioni a luce ridotta. Il solvente è costituito da una soluzione acquosa 0,05 M di cloruro ammonico.

(*) Per il significato delle abbreviazioni, vedere Tab. 1.

La cromatografia si effettua al buio con il metodo ascendente; per una corsa di 13-14 cm occorrono circa 40'. Dopo tale tempo si pone la lastra ad asciugare in stufa per alcuni minuti a 60°. Il PLP è colorato in giallo e la vitamina B₁₂ in rosso. La rivelazione degli altri composti si effettua a luce U.V. con lampada a massimo di emissione a 254 mμ.

Per l'analisi quantitativa, effettuata la cromatografia e localizzate le macchie, l'area di cellulosa corrispondente ai singoli componenti viene raschiata e fatta digerire con agitazione occasionale con 5 ml di opportuno eluente (vedi sotto) per 8-10 ore ed ogni composto determinato, dopo filtrazione, per via spettrofotometrica nell'U.V. in vaschette da 1 cm, contro un bianco limpido ottenuto mescolando 5 ml di eluente con un'area uguale di cellulosa.

Risultati e discussione. — I valori di R_f osservati sono riportati nella Tab. 1.

TABELLA 1.

Valori di R_f osservati per i coenzimi

COMPOSTI	R _f *	COMPOSTI	R _f *
Adenosin-trifosfato (ATP) . . .	0,04	Estere monofosforico della tiamina (TMP)	0,47
Adenosin-difosfato (ADP) . . .	0,12	Uridin-trifosfato (UTP)	0,07
Adenosin-5'-monofosfato (AMP)	0,39	Uridin-difosfato (UDP)	0,14
Difosfo-piridin-nucleotide (DPN)	0,40	Uridin-5'-monofosfato (5'-UMP)	0,19
Piridossal-5'-fosfato (PLP) . . .	0,04	Vitamina B ₁₂	0,9
Cocarbossilasi (TDP)	0,28		

* Cromatografia su stratto sottile, solvente NH₄Cl 0,05M.

Il metodo è stato da noi applicato, oltre che per stabilire la purezza dei composti citati, anche per effettuare la separazione da miscele così come si ritrovano in alcune preparazioni farmaceutiche. Per questo vi abbiamo anche incluso la vitamina B₁₂ e la glutamina (Glu).

I migliori risultati sono stati ottenuti con le miscele seguenti:

- 1) UTP (UDP, UMP) - TDP (TMP) - DPN - vit. B₁₂
- 2) ATP (ADP, AMP) - TDP (TMP)
- 3) PLP - 1-Glu-NH₂
- 4) PLP - TDP - DPN - vit. B₁₂
- 5) DPN - TDP (TMP)
- 6) UTP (UDP) - DPN

Alcuni esempi di separazioni ottenute sono riportate nella Fig. 1. Come si è detto il metodo è quantitativo, ed ogni composto, eluito dallo strato è stato determinato per via spettrofotometrica utilizzando i valori di estinzione molare (ε) riportati nella Tab. 2. I recuperi, in miscele precostituite, non sono mai stati inferiori al 90 % e si aggirano su di una media del 95 %.

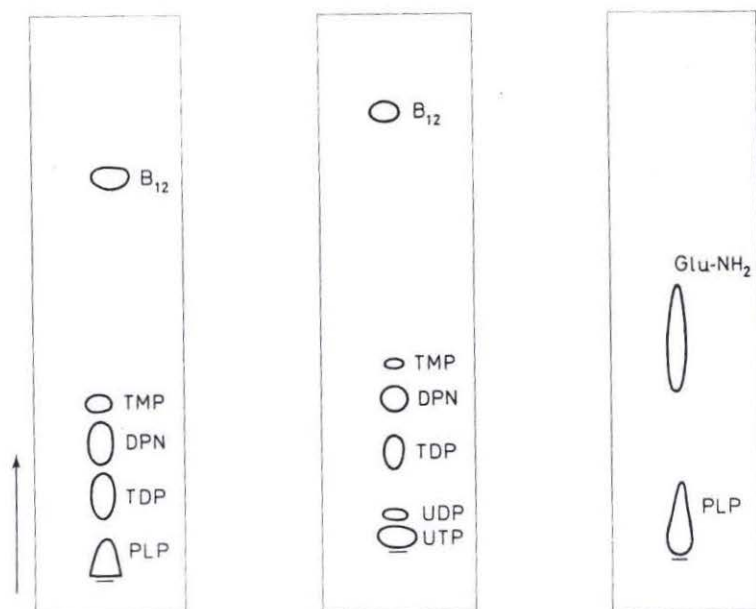


Fig. 1. — Cromatogrammi su stratto sottile di tre diverse miscele contenenti vari coenzimi. Solvente NH_4Cl 0,05M.

Come prevedibile i monofosfati migrano più velocemente dei difosfati, e questi dei trifosfati; i derivati della tiamina migrano più velocemente di quelli dell'ade-

TABELLA 2.

Valori di λ_{max} e di ϵ dei coenzimi nei solventi

COMPOSTI	Eluente	λ_{max}	Estinzione molare ϵ
AMP-ADP-ATP	HCl 0,1 N	260	14210
DPN	HCl 0,1 N	260	18700
PLP	NaOH 0,1 N	388	6600
TDP-TMP	HCl 0,1 N	246	14500
UMP-UDP-UTP	HCl 0,1 N	262	9500

nosina; i derivati della tiamina e dell'adenina hanno valori di R_f superiori a quelli dei corrispondenti derivati dall'uridina.

29 luglio 1966.

VITO AMORMINO e ENRICO CINGOLANI
Laboratori di Biologia

¹ RANERATH, K. *Angew. Chem.*, **74**, 484 (1962)

² RANERATH, K. *Nature*, **194**, 768 (1962).

³ RANERATH, K. *Angew. Chem.*, **73**, 674 (1961).

⁴ RANERATH, K. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **6**, 452 (1961/62).

⁵ RANERATH, K. *Angew. Chem.*, **74**, 780 (1962).

⁶ RANERATH, K. *Angew. Chem.*, **73**, 436 (1961).