

36. F. BUCCI e Anna M. CUSMANO. — Sulla ricerca e determinazione degli antitiroidei nei mangimi.

Riassunto. — Da qualche tempo è stato segnalato l'impiego del tiouracile e dei suoi derivati metiltiouracile e propiltiouracile nella preparazione dei mangimi, fondato sul fatto che questi composti, per la loro azione antitiroidea, facilitano ed accelerano l'aumento di peso nell'allevamento degli animali destinati all'alimentazione umana.

E' stato messo a punto e viene descritto un metodo colorimetrico per la determinazione, nei mangimi e negli integratori per mangimi del 2.tiouracile, del 6.metil-2.tiouracile e del 6.propil-2.tiouracile. Il procedimento è fondato sulla reazione cromatica che questi composti danno con il reattivo di Grote (nitroprussiato sodico + idrossilammina + bromo, in presenza di bicarbonato sodico), e viene applicato con modalità atte ad eliminare l'interferenza degli altri componenti dei mangimi.

Vengono anche descritte le reazioni chimiche che consentono di differenziare, nei mangimi, il tiouracile ed i suoi alchilderivati suddetti.

Summary. — For some time, the use of thiouracil and its derivatives methylthiouracil and propylthiouracil has been recognised in the preparation of feeds, based on the fact that these compounds — because of their antithyroid action — facilitate and accelerate the weight increase of cattle bred for consumption.

A method has been devised and is described for determining colorimetrically in feeds and its constituents 2-thiouracil, 6-methyl-2-thiouracil and 6-propyl-2-thiouracil. The procedure is based on the chromatic reaction which these compounds show with the Grote reagent (sodium nitroprussiate and bromine in the presence of sodium bicarbonate), and it can easily be applied in such away as to eliminate the interference of the other components of feeds.

The chemical reactions are also described which allow the differentiation in feeds of thiouracil and its alkyl derivatives mentioned above.

Tra le sostanze che si aggiungono ai mangimi per ottenere un più rapido aumento di peso degli animali ed una maggiore resa in carne sono compresi gli antitiroidei, il cui impiego è andato diffondendosi in questi ultimi anni. L'aumento di peso verrebbe in questo caso attribuito in massima parte ad una ritenzione idrica dei tessuti, e d'altra parte è da tener

presente che nei liquidi biologici (siero di sangue, urine) ed in alcune parti (tiroide; reni) degli animali cui vengono somministrati antitiroidei si rinvencono questi composti.

Sono quindi importanti, anche dal lato sanitario, la ricerca e la determinazione di queste sostanze nei mangimi, che sono rese più difficili da un lato dalla loro scarsa solubilità nei solventi organici, dall'altro dalla complessità di composizione dei prodotti nei quali debbono essere ricercate e determinate, dato che i mangimi composti, come è noto, sono costituiti da numerosi componenti della più svariata natura ed origine.

La presente Nota ha per oggetto la ricerca e la determinazione, negli alimenti per gli animali, del 2.tiouracile e dei suoi alchilderivati 6.metil-2.tiouracile e 6.propil-2.tiouracile: dei tre, quello che allo stato attuale risulta più frequentemente impiegato in Italia è il 6.metil-2.tiouracile.

Prima di esporre i procedimenti da noi applicati e messi a punto per il controllo analitico dei mangimi nei riguardi della eventuale presenza di antitiroidei, riteniamo utile, per comodità del chimico analista, dare un breve quadro d'insieme delle principali proprietà e reazioni di questo gruppo di composti, utilizzabili ai fini della loro identificazione e determinazione.

La reazione più importante e più frequentemente applicata nell'analisi sia di preparati medicamentosi sia di materiali biologici vari (per quanto concerne i mangimi non abbiamo rinvenuto indicazioni specifiche in letteratura), è senza dubbio quella di GROTE ⁽¹⁾: nel 1931 questo A. ha segnalato che con un reattivo ottenuto aggiungendo bromo ad una soluzione di nitroprussiato sodico e cloridrato di idrossilammina in presenza di bicarbonato sodico, i composti contenenti i gruppi $\equiv \text{C-SH}$ (ad esempio cisteina, acido tioglicolico, acido tiosalicilico ecc.) oppure $=\text{C}=\text{S}$ (tiourea, acido tiobarbiturico, acido tioacetico, tioacetammide ecc.) nonché i disolfuri organici (in quest'ultimo caso dopo aggiunta di una soluzione di cianuro potassico) come pure i tiocianati ed i tiosolfati alcalini danno colorazioni varie: rosso porpora nel caso dei composti contenenti il gruppo solfidrile, verde azzurro nel caso dei composti contenenti il gruppo tiocarbonile e dei tiocianati e tiosolfati alcalini. Sull'applicazione di questa reazione alla ricerca ed alla determinazione della tiourea e di composti organici solforati diversi, tra cui il tiouracile ed i suoi derivati, si ha in letteratura un'abbondante fioritura di pubblicazioni, tra le quali ci limitiamo a segnalare alcune concernenti tra l'altro i composti tiouracilici ⁽²⁾.

Tra le reazioni proposte per la ricerca e la determinazione di questi ultimi composti citiamo inoltre: la reazione con cloruro di rutenio ⁽³⁾, con formazione di una colorazione rosso-viola; quella con isopropilammina ed acetato di cobalto ⁽⁴⁾ (colore rosso-viola); quella con 2,6.diclo-

rochinonecloroimmide ⁽⁵⁾ (colorazione gialla estraibile con cloroformio). Per quanto concerne la sola ricerca qualitativa dei composti in questione segnaliamo la reazione con soluzione alcoolica di dimetilamminobenzaldeide ⁽⁶⁾ addizionata di acido solforico (colorazione rosa; reazione alla tocca, su carta); quella con o.toluidina e cloruro di rame ⁽⁷⁾, in presenza di acetato sodico (su placca, colorazione azzurra); quella con soluzione di cloruro mercurico ⁽⁸⁾ (formazione di un precipitato cristallino) e quella con solfato di rame ed idrato sodico ⁽⁹⁾ (formazione di un precipitato di colore diverso secondo la natura del composto tiouracilico). Tra queste reazioni segnaliamo quella con 2,6.diclorochinonecloroimmide, che è dotata di una buona sensibilità.

In aggiunta ai metodi di determinazione che abbiamo menzionato a proposito delle reazioni caratteristiche dei tiouracili, citiamo i seguenti fondati su principi vari:

- 1) determinazione spettrofotometrica diretta ⁽¹⁰⁾;
- 2) determinazione per titolazione potenziometrica con idrato sodico N/10 ⁽¹¹⁾;
- 3) determinazione argentometrica ⁽¹²⁾: aggiunta di nitrato d'argento N/10 in eccesso, filtrazione, titolazione dell'argento in eccesso nel filtrato, acidificato con acido nitrico, mediante solfocianato N/10;
- 4) aggiunta di nitrato d'argento N/10 in eccesso, previo aggiustamento del pH, e titolazione con idrato sodico N/10, indicatore l'azzurro di bromotimolo ⁽¹³⁾;
- 5) titolazione con sali mercurici (cloruro, acetato), indicatore il difenilcarbazono ⁽¹⁴⁾;
- 6) titolazione bromometrica: aggiunta di soluzione titolata di bromato potassico e di bromuro potassico in eccesso ed acidificazione con acido cloridrico, infine titolazione del bromo in eccesso mediante aggiunta di ioduro potassico e titolazione dello iodio con tiosolfato N/10 ⁽¹⁵⁾, oppure mediante aggiunta di soluzione titolata di arsenito sodico in eccesso e titolazione dell'eccesso di quest'ultimo con bromato potassico N/10, indicatore la p.etossicrisoidina ⁽¹⁶⁾;
- 7) metodo iodometrico ⁽¹⁷⁾: aggiunta di soluzione N/10 di iodio in eccesso, in ambiente alcalino; infine acidificazione e titolazione dello iodio in eccesso con tiosolfato N/10;
- 8) titolazione con acido perclorico N/10, in soluzione acetica ed in presenza di acetato mercurico, indicatore il Violetto cristalli od il Rosso Chinaldina ⁽¹⁸⁾.

Come abbiamo già avuto occasione di accennare, il 2.tiouracile ed i suoi derivati sono in linea generale poco solubili nei solventi organici. Noi abbiamo eseguito alcune prove orientative tendenti a stabilire quali solventi organici consentissero di ottenere una buona estrazione di questi composti dai materiali e prodotti nei quali sono contenuti. In linea generale si può dire che il più solubile è il 6.propil-2.tiouracile; tra il 2.tiouracile ed il 6.metil-2.tiouracile c'è poca differenza di solubilità, ma il meno solubile di solito è quest'ultimo. In metodologie varie riportate in letteratura per la ricerca e la determinazione di questi composti in materiali biologici diversi ed in preparati usati in terapia vengono non di rado impiegati, come solventi, l'alcool etilico e l'acetone, talora l'alcool metilico.

In base alle predette prove da noi eseguite l'alcool etilico e l'acetone praticamente si equivalgono; alquanto migliore è la solubilità dei prodotti in questione in alcool metilico ed anche (fatta eccezione per il propilderivato) in diossano, mentre la solubilità in piridina è notevolmente più elevata per tutti.

Abbiamo ritenuto opportuno accennare ai risultati di queste prove perchè in parte li abbiamo applicati, come diremo più avanti, alla ricerca degli antitiroidei nei mangimi e perchè in casi particolari potrebbero trovare qualche altra utilizzazione per scopi analitici o per speciali ricerche.

La ricerca dei tiouracilici nei mangimi può esser fatta in modo agevole mediante l'impiego del reattivo di Grote, con le modalità che descriveremo dettagliatamente più avanti. Se la reazione di Grote è positiva, per stabilire quale dei tre composti da noi presi in considerazione è contenuto nel prodotto in esame abbiamo applicato alcune reazioni atte alla loro differenziazione che parimenti verranno descritte più avanti. A tale riguardo è però da rilevare che mentre non presenta difficoltà la identificazione del tiouracile e del propiltiouracile se presenti in percentuali non troppo esigue, come pure del metiltiouracile quando è contenuto da solo nel prodotto in esame, non altrettanto può dirsi per questo ultimo quando è accompagnato con il tiouracile o con il propiltiouracile, o con ambedue. Per risolvere questo problema analitico abbiamo in corso ricerche sperimentali di separazione dei tre composti mediante cromatografia su carta, sui cui risultati riferiremo in una Nota successiva.

Per quanto concerne la determinazione, che come la ricerca qualitativa è fondata sull'impiego del reattivo di Grote preparato con le modalità descritte da CHRISTENSEN ⁽¹⁹⁾, è da rilevare che questo reattivo, sia per la sua natura e per il modo con il quale viene preparato che non ne rende possibile la rigorosa standardizzazione; sia per l'influenza che sulla intensità della reazione esercita la temperatura, esplica un'azione

alquanto variabile nel senso che, per una determinata quantità di composto tiouracilico, l'intensità della colorazione ottenuta con reattivi distinti ed operando a temperature ambiente diverse non è costante. Ne deriva la necessità di stabilire, in ogni determinazione o gruppo di determinazioni eseguite in un determinato momento, il diagramma di tarratura densità ottica-quantità di composto tiouracilico, operando in parallelo sul prodotto in esame e su soluzioni a contenuto noto di composto tiouracilico. Ciò non costituisce però una grave complicazione, perchè entro opportuni limiti è valida la legge di Beer-Lambert ed il diagramma suddetto è quindi una retta, per tracciare la quale è sufficiente fissare due-tre punti del diagramma.

Anche operando in tal modo, nelle prime determinazioni eseguite su mangimi addizionati di percentuali note di composti tiouracilici abbiamo però ottenuto risultati errati per eccesso. Ciò è da attribuire alla circostanza, già segnalata da CHRISTENSEN ⁽¹⁹⁾, che la colorazione che il reattivo di Grote dà con i tiouracilici viene intensificata dalla presenza di diverse sostanze (tra cui glicolla, glucosio, acido ascorbico), mentre è attenuata da altre (ammoniaca, tamponi a base di borati che per tale motivo non sono consigliabili, come abbiamo riscontrato anche noi). Abbiamo però trovato che eseguendo la reazione in presenza del tampone suggerito dall'A. suddetto (a base di Veronal sodico, glicocolla ed acido cloridrico) queste interferenze vengono eliminate od almeno fortemente attenuate ed i risultati che si ottengono sono soddisfacenti. Ciò è stato controllato operando su parecchi campioni di mangimi composti di diversa natura e composizione, addizionati di quantitativi di tiouracilici compresi tra il 0,1 ed il 10%.

Naturalmente ciascuno dei tre composti tiouracilici ha un proprio diagramma di densità ottica. Per determinazioni molto precise si dovrebbe quindi, a rigore, stabilire preventivamente quale sia il composto presente nel prodotto in esame e riferire il risultato ottenuto nella determinazione al diagramma relativo, che come si è detto deve essere stabilito di volta in volta operando in parallelo, con lo stesso reattivo. Se il prodotto in esame contenesse più di un composto tiouracilico, la densità ottica osservata dovrebbe essere riferita al diagramma del composto predominante. Tuttavia è da tener presente che i diagrammi del tiouracile e del metiltiouracile sono tra loro assai prossimi anzi quasi coincidenti, mentre si discosta più sensibilmente quello del propiltiouracile, composto che a parità di peso dà la colorazione più debole. Quando il prodotto contiene più di un composto tiouracilico o comunque quando non sia stato possibile identificare i medesimi, conviene riferire sempre la densità ottica trovata al diagramma del metiltiouracile che è intermedio fra i tre. I risultati in tal modo ottenuti sono approssimativi ma pur sempre

sufficienti per gli scopi pratici (a titolo di esempio, riferendo al diagramma del metiltiouracile la densità ottica osservata per il contenuto del 2% di tiouracile si ottiene il valore del 2,1% invece del teorico 2%).

DESCRIZIONE DEI PROCEDIMENTI

A) RICERCA DEI TIOURACILICI

Reattivi:

1) Reattivo di Grote modificato secondo CHRISTENSEN ⁽¹⁹⁾ - g 0,5 di nitroprussiato sodico e g 0,5 di cloridrato di idrossilammina vengono disciolti in ml 10 di acqua distillata, in beutina da ml 50; si aggiunge 1 g di bicarbonato di sodio, si agita e si immerge in bagno d'acqua a circa 20° per 10'. Si aggiungono quindi a poco a poco ed agitando ml 0,1 di bromo, si agita con cura, si tiene la beutina immersa in bagno d'acqua a 37° per 20' ed in fine si porta al volume di ml 25. Conservato in frigorifero a 5°, in bottiglia di vetro giallo, il reattivo può essere usato per circa un mese.

Il reattivo diluito e tamponato da impiegare per la ricerca e per la determinazione dei composti tiouracilici si prepara al momento dell'uso aggiungendo ad un volume del reattivo di Grote suddetto nove volumi della soluzione tampone. Il liquido che in tal modo si ottiene viene tenuto prima dell'uso per un'ora a temperatura ambiente o per 25' a 37°: il colore passa dal bruno porpora al giallo.

2) Soluzione tampone - g 5,74 di Veronal sodico e g 2,08 di glicocolle vengono disciolti in circa ml 450 di acqua distillata, si aggiungono ml 11,7 di acido cloridrico N, si porta al volume di ml 500 e si conserva alla temperatura di 5° (pH = 8).

3) Acido acetico diluito - ml 1,7 di acido acetico glaciale vengono portati, mediante aggiunta di acqua distillata, a ml 100.

4) Soluzione di idrato sodico al 5%.

g 3-4 di mangime, preventivamente ben macinato ed omogeneizzato, vengono dibattuti per 20' con ml 50 di acqua distillata e ml 2,5 di idrato sodico al 5%. Si porta poi, con acqua distillata, al volume di ml 100. Si centrifuga ed a ml 10 di liquido centrifugato si aggiungono, a poco a poco ed agitando, ml 1 di acido acetico diluito e quindi si filtra per filtro a pieghe, se necessario ripassando ripetutamente il filtrato sullo stesso filtro fino ad ottenere un liquido per quanto possibile limpido. A ml 4-5

di tale filtrato si aggiungono ml 2 di reattivo di Grote diluito con il tampone. In presenza di composti tiouracilici si ottiene, subito o dopo alcuni minuti, una colorazione verde o verde pisello più o meno intensa in dipendenza del quantitativo di antitiroidei presenti nel prodotto.

Operando su g 4 di mangime si ottiene una colorazione debole, ma ancora evidente rispetto alla prova in bianco eseguita di confronto (ml 4 di acqua + ml 2 di reattivo di Grote diluito), con il 0,02% di tiouracilici (200 p.p.m.).

B) IDENTIFICAZIONE DEI TIOURACILICI

Tiouracile:

g 2,5 di mangime vengono dibattuti per 10'-15' con ml 5 di diossano. Si filtra versando sul filtro il liquido separato per decantazione dalla parte insolubile, e su quest'ultima si ripete lo stesso trattamento con altri ml 5 di diossano. I filtrati riuniti si evaporano a b.m. fino a totale eliminazione del solvente organico.

Il residuo viene addizionato, goccia a goccia, di acqua di bromo fino a colorazione gialla persistente dovuta al bromo in eccesso. Si scalda a b.m. per eliminare quest'ultimo ed al liquido (che a questo punto ha di solito il volume di ml 2-3) si aggiungono ml 3-4 di acqua di barite preparata di recente. In presenza di tiouracile si ottiene un precipitato bianco che quasi subito diventa di color viola intenso.

Questa reazione, che viene utilizzata come saggio di purezza per il metiltiouracile e per il propiltiouracile per controllare che non contengano tiouracile (²⁰), nel caso dei mangimi dà risultato decisamente positivo con il 0,5% di tiouracile, indipendentemente dalla presenza o meno del metiltiouracile e del propiltiouracile i quali in queste condizioni danno un precipitato di color bianco stabile.

Propiltiouracile:

g 1,5 di mangime vengono dibattuti per 15' con ml 5 di alcool etilico. Si filtra ed una goccia del filtrato si pone su una cartina preparata immergendo una striscia di carta da filtro in una soluzione al 5% di solfato di rame pentaidrato e lasciandola poi asciugare all'aria.

Si osserva la cartina, dopo asciugamento all'aria della goccia, sotto una lampada a raggi ultravioletti (²¹): se nel punto della macchia non si osserva fluorescenza, si pongono nello stesso punto altre gocce di liquido facendo asciugare dopo la deposizione di ogni singola goccia.

Per un prodotto contenente il 2% di propiltiouracile basta una sola goccia di liquido per avere una bella macchia fluorescente rossa; con il mangime al 0,5% di propiltiouracile la fluorescenza si vede bene con 4-5 gocce e diventa molto bella con 7-8 gocce.

C) DETERMINAZIONE

Reattivi:

1) Reattivo di Grote modificato secondo Christensen, da diluire al momento dell'uso con la soluzione tampone nel modo indicato per la ricerca qualitativa.

2) Soluzione tampone (vedere A) *Ricerca*).

3) Acido acetico diluito: ml 1 di acido acetico glaciale viene portato con acqua distillata ai volume di ml 300.

4) Soluzione acquosa di idrato sodico al 5%.

5) Soluzione campione di tiouracile.

6) Soluzione campione di metiltiouracile.

7) Soluzione campione di propiltiouracile.

Queste soluzioni campione si preparano, in parallelo con l'esecuzione della determinazione nel prodotto in esame, pesando g 0,1000 di ciascuno dei tre composti, portandoli in soluzione mediante aggiunta di qualche ml di acqua e di ml 1,5 di soluzione di idrato sodico al 5% e diluendo infine con acqua distillata fino ad un litro.

Per la determinazione, la reazione cromatica con il reattivo di Grote deve essere eseguita su una quantità di composto tiouracilico preferibilmente compresa tra γ 60-180 ed in ogni caso non inferiore a γ 30. Poichè il contenuto dei mangimi e degli integratori per mangimi in tiouracilici può variare entro limiti assai estesi, per la preparazione della soluzione sulla quale deve eseguirsi la determinazione è opportuno regolarsi nel modo seguente, quando nella ricerca qualitativa si sia ottenuta una reazione piuttosto intensa indicante che il contenuto in antitiroidei non è esiguo.

g 1,2 di mangime, finemente macinato e bene omogeneizzato, si dibattono per 20'-25' con ml 200 di acqua distillata e ml 5 di soluzione di idrato sodico al 5% e si porta quindi al volume di un litro. Si filtra su-

bito, se necessario per doppio filtro e su parti aliquote del filtrato, non superiori a ml 3,5, si esegue la reazione (*).

Dato che se la percentuale di tiouracilici è del 2% ml 3,5 di filtrato ne contengono γ 87 e se la percentuale è dell'8% o del 12% ml 1 ne contengono rispettivamente γ 100 e γ 150, conviene prelevare due distinte porzioni di filtrato ciascuna di ml 3,5 ed altre due di ml 1 ciascuna, e ad ogni porzione aggiungere, mediante pipetta tarata da ml 1, la soluzione di acido acetico diluito nel quantitativo di ml 0,1 per ogni ml di filtrato alcalina (cioè, rispettivamente, ml 0,35 e ml 0,1), e poi acqua distillata in modo da portare a ml 4 il volume complessivo di liquido di ciascuna prova (rispettivamente, ml 0,15 e ml 2,9 per le due coppie di prove).

A due prove, l'una con ml 3,5 e l'altra con ml 1 di filtrato, si aggiungono ml 2 di reattivo di Grote diluito; alle altre due prove si aggiungono invece ml 2 di soluzione tampone.

L'intensità della colorazione ottenuta con il reattivo di Grote si misura entro 10'-25' dal momento della esecuzione della reazione, allo spettrofotometro (vaschetta da 1 cm, lunghezza d'onda 690 m μ) od in un colorimetro fotoelettrico (lunghezza d'onda per quanto possibile prossima a 690 m μ). Come bianco di confronto si usa il reattivo di Grote diluito (ml 2) addizionato di acqua distillata (ml 4).

Poichè si deve tener conto della colorazione del filtrato alcalino che è debole ma non trascurabile, oltre che di quella del reattivo di Grote, si esegue anche la misura delle densità ottiche delle due prove addizionate della sola soluzione tampone, contro acqua (ml 4) + tampone (ml 2) e dalle densità ottiche delle prove cui si è aggiunto il reattivo si detraggono quelle delle due rispettive prove addizionate di soluzione tampone.

Se in ambedue le prove (con ml 3,5 e con ml 1 di filtrato) le densità ottiche così trovate e riportate sul diagramma di taratura di cui si dirà più avanti corrispondono a quantitativi di composto tiouracilico compresi tra γ 60 e γ 180, come risultato della determinazione si può assumere la media tra i valori relativi alle due prove. Se invece nella prova con ml 3,5 di filtrato il quantitativo di tiouracilico è superiore a quello massimo suddetto il valore corrispondente a questa prova si trascura e come risultato si adotta quello della prova con ml 1.

Nel caso di prodotti con non elevata percentuale di tiouracilici (inferiore all'1,5%), e cioè quando la ricerca qualitativa abbia dato una non intensa reazione positiva o quando, operando nel modo sopra de-

(*) L'analista tenga presente che le soluzioni alcaline dei composti tiouracilici sono instabili e diminuiscono rapidamente di titolo. E' quindi opportuno condurre a termine di seguito, senza interruzioni, l'intero procedimento di determinazione.

scritto, anche la prova con ml 3,5 di filtrato abbia dato un risultato inferiore a γ 60 di tiouracilico, è necessario eseguire la determinazione su soluzioni più concentrate. In questi casi si opera nel modo seguente. g 1-2 di mangime si agitano per 20' con ml 40 di acqua distillata e ml 1 di soluzione di idrato sodico al 5%, e quindi si portano al volume di ml 200. Si filtra per filtro a pieghe, ripassando ripetutamente il filtrato sul filtro medesimo fino ad ottenere un filtrato limpido per quanto possibile. Si procede quindi esattamente nel modo già descritto, senza preoccuparsi se nella neutralizzazione del filtrato con acido acetico si produce un intorbidamento, che del resto si attenua per aggiunta sia del reattivo tamponato sia del solo tampone. Nel caso di un prodotto contenente il 0,1% di tiouracilici la prova con ml 3,5 di filtrato (prodotto g 2 $\rightarrow$ ml 200) contiene γ 35 di composto tiouracilico, quantitativo ancora determinabile come si è già detto.

Diagramma di taratura.

Si richiama quanto è stato precedentemente prospettato circa il fatto che i diagrammi del tiouracile e del metiltiouracile sono tra loro assai prossimi e circa l'opportunità di riferire il risultato trovato al diagramma del metiltiouracile quando l'esame qualitativo ha rivelato che il prodotto in esame contiene più di un composto tiouracilico, come pure quando non sia stata possibile l'identificazione dei medesimi.

Operando in parallelo con l'esecuzione della reazione nel prodotto in esame, si prelevano ml 0,5, ml 1, ml 1,5 di soluzione campione contenenti rispettivamente γ 50, γ 100 e γ 150 di composto tiouracilico, e si addizionano di ml 3,5, ml 3, e ml 2,5 di acqua distillata (volume complessivo di ogni prova ml 4). A ciascuna prova si aggiungono ml 2 di reattivo di Grote diluito e si esegue la misura delle densità ottiche operando con le modalità sopra indicate. Come liquido di confronto si usa la prova in bianco ottenuta aggiungendo a ml 4 di acqua distillata ml 2 di reattivo di Grote diluito.

Roma — Istituto Superiore di Sanità - Laboratori di Chimica.

BIBLIOGRAFIA

- (¹) GROTE I. W. - J. biol. Chem., 93: 25 (1931).
- (²) WILLIAMS R. H., JANDORF B. J. e KAY G. A. - J. Labor. clin. Med., 29: 329 (1944); ANDERSON A. B. - Lancet, 247: 242 (1944); PASCHKIS K. E., CANTAROW A., RAKOFF A. E. e TILLSON E. K. - J. Pharmacol., 83: 270 (1945); CHRISTENSEN H. - J. biol. Chem., 162: 27 (1946); OLSON K. J., ELY R. E. e REINEKE E. P. - J. biol. Chem., 169: 681 (1947); VAN ASPEREN K. - Bioch. bioph. Acta, 6: 187 (1950).

- (3) REINHARDT F. - Z. physiol. Chem., 293: 268 (1953).
 - (4) HOLT W. L. e MATTSON L. N. - Anal. Chem., 21: 1389 (1949).
 - (5) MC ALLISTER R. A. e HOWELLS K. W. - J. Pharm. Pharmacol., 4: 239 (1952).
 - (6) COOPER P. - Pharm. J., 177: 493 (1956).
 - (7) NILSSON G. - Sci. Rev. (Holland) 8a: 86 (1957).
 - (8) ROSENTHALER L. - Pharm. Acta Helv., 24: 184 (1949).
 - (9) METELLO METTO J. M. e PINTO DE FIGUEIREDO A. - Rev. Brasil Farm., 31: 17 (1949).
 - (10) SMITH G. - J. Ass. offic. agr. Chemists, 34: 576 (1951); 35: 572 (1952); Official Methods of Analysis Ass. offic. agr. Chemists 9th Ed., Washington (1960) pag. 536; MORTIMER J. KAMLET - Organic Electronic Spectral Data vol. I, Interscience Publishers, New York, London (1946-1952) pag. 50.
 - (11) ANASTASI A., MECARELLI E. e NOVACIC L. - Mikrochemie ver. Mikrochim. Acta, 38: 160 (1951).
 - (12) MIDDELDORF R. - Arzneimittelforsch., 1: 311 (1951).
 - (13) CANBACK T. - Farm. Revy, 29: 465 (1947); BERGGREN A. e KIRSTEN W. - Farm. Revy, 50: 245 (1951).
 - (14) ABBOTT C. F. - J. Pharm. Pharmacol., 5: 53 (1953); CYNAJEK F. e SZLANGA J. - Farm. Polska, 10: n. 1, 17 (1954).
 - (15) DRUCKER M. - J. Ass. offic. agr. Chemists, 31: 544 (1948); Official Methods of Analysis Ass. offic. agr. Chemists 9th Ed. Washington (1960) pag. 537.
 - (16) WOJAHN H. e WEMPE E. - Pharm. Zhal., 92: 124 (1953).
 - (17) WOJAHN H. e WEMPE E. - Arch. Pharm., 285: 280 (1952).
 - (18) ALICINO J. F. - Microchem. J., 4: 551 (1960).
 - (19) CHRISTENSEN H. - J. biol. Chem., 160: 425 (1945).
 - (20) BUCHER K. - Pharm. Acta Helv., 26: 145 (1951).
 - (21) KEDVESSY G. - Magyar Kém. Folyoirat, 56: 447 (1950) e Chem. Abstr., 46: 375 e (1952); BUCHER K. - l. c. (20).
-