

77. G. CAVINA, E. CINGOLANI e L. TENTORI. — **Determinazione di steroidi in estratti di corteccia surrenale mediante cromatografia su carta.**

Riassunto. — Gli A.A. hanno preso in esame il problema della determinazione degli steroidi negli estratti di corteccia surrenale. Dopo aver discusso i principali lavori apparsi sull'argomento, espongono la tecnica proposta, basata sull'applicazione dei sistemi cromatografici di BUSH e di EBERLEIN e BONGIOVANNI agli estratti di corteccia surrenale opportunamente trattati. Sugli eluati dei cromatogrammi le determinazioni quantitative vengono eseguite con il reattivo al blu di tetrazolio. E' possibile determinare i seguenti steroidi: idrocortisone, tetraidroidrocortisone, cortisone, tetraidrocortisone, corticosterone, aldosterone, 11-deidrocorticosterone, 17-idrossi-11-desossicorticosterone. E' possibile inoltre riscontrare alcuni altri steroidi, presenti in piccola quantità, caratteristici degli estratti di corteccia surrenale.

Summary. — Methods which have been proposed for the determination of steroids in extracts of the supra-renal cortex are discussed; a technique is suggested based on the chromatographic systems of Bush, Eberlein and Bongiovanni, applied to suitably treated extracts of the cortex. The eluates from the chromatograms were assayed using the tetrazolium blue reagent. Hydrocortisone, tetrahydrohydrocortisone, cortisone, tetrahydrocorticosterone, corticosterone, aldosterone, 11-dehydrocorticosterone and 17-hydroxy-11-deoxycorticosterone could be determined. Other steroids present in small amounts, which are characteristic of extracts of the supra-renal cortex, could also be recognised.

L'analisi degli estratti di corteccia surrenale è a tutt'oggi un problema di difficile soluzione in quanto esistono metodi biologici non semplici, spesso molto diversi tra di loro e con diversa espressione della attività, mentre non esistono metodi chimici in grado di dare, da soli, una valutazione completa dell'attività di un estratto di corteccia surrenale. I metodi biologici, descritti per primi in ordine cronologico, hanno lo scopo di determinare l'attività di un estratto di corteccia surrenale su una funzione fisiologica fondamentale in animali generalmente surrenectomizzati: un'ampia rassegna di tali metodi è stata riportata da DORFMANN (1954) (1).

La natura chimica dei componenti attivi degli estratti di corteccia surrenale è stata studiata successivamente. REICHSTEIN ha scritto un'importante rassegna (1943) ⁽²⁾ e successivamente SIMPSON e Altri (1954) ⁽³⁾, hanno descritto l'isolamento dell'aldosterone da estratti di corteccia surrenale. In questo periodo sono stati descritti metodi chimico-fisici per la determinazione, generalmente parziale, dei componenti di un estratto di corteccia surrenale.

BANES ⁽⁴⁾, (1953) ha descritto un metodo per il frazionamento di estratti corticali mediante cromatografia su celite, impregnata di formammide, usando benzene come solvente per lo sviluppo; il riconoscimento e la determinazione dei componenti attivi (limitata a cortisone, idrocortisone, corticosterone, 11-deidrocorticosterone) venivano effettuati, mediante spettrofotometria U. V. ed I. R., ed in miscela di acido solforico ed acetico e usando le reazioni colorate al trifeniltetrazolio ed alla fenilidrazina. HEFTMAN e JOHNSON (1954) ⁽⁵⁾ hanno descritto il frazionamento quantitativo di miscele di corticosteroidi naturali mediante cromatografia su colonna di acido silicico. DOBRINER ed Altri (1954) ⁽⁶⁾ hanno descritto la cromatografia su colonna di gel di silice di estratti di surrene di maiale preparati in laboratorio e sottoposti in precedenza alla purificazione con reattivo T di Girard ed al frazionamento tra benzene ed acqua.

MOUTON ed Altri (1956) ⁽⁷⁾ hanno descritto l'applicazione ad estratti di corteccia surrenale di alcune reazioni, impiegate per la determinazione dei corticosteroidi in soluzione pura ed in estratti urinari, come la reazione con acido fosfomolibdico secondo HEARD e SOBEL ⁽⁸⁾, la reazione con 2,4-dinitrofenilidrazina secondo GORNALL e Mc DONALD ⁽⁹⁾, la reazione di ossidazione con ferricianuro di potassio secondo TALBOT ⁽¹⁰⁾, la misura dell'assorbimento nell'U. V., la purificazione con reattivo T di Girard ed il frazionamento tra benzene ed acqua secondo HEMPILL e REISS ⁽¹¹⁾, unitamente al metodo biologico della sopravvivenza al freddo secondo NIGEON-DUREUIL ed altri ⁽¹²⁾ ed alla cromatografia su carta secondo BURTON, ZAFFARONI e KEUTMAN ⁽¹³⁾. Purtroppo gli Autori sopra citati non hanno potuto stabilire valide correlazioni tra i metodi seguiti e di conseguenza questi hanno valore solo se impiegati contemporaneamente e per un giudizio di assieme.

La cromatografia su carta per l'analisi qualitativa degli estratti di corteccia surrenale è stata proposta sia da BURTON, ZAFFARONI e KEUTMAN (v. ¹³) (1951) che da BUSH ⁽¹⁴⁾ (1952) nella descrizione dei loro ben noti metodi per la cromatografia degli steroidi.

HOFMAN e STAUDINGER ⁽¹⁵⁾ (1951) hanno applicato la cromatografia su carta all'analisi di corticoidi in miscela ed in estratti urinari e di cor-

teccia surrenale; i cromatogrammi venivano trattati con trifeniltetrazolio alcalino e le macchie colorate eluite con alcool tetraidrofurfurilico; in tale modo venivano ottenuti dati quantitativi per alcuni gruppi di steroidi presenti negli estratti, p. es. cortisone + idrocortisone; corticosterone + 11-deidrocorticosterone, non ulteriormente separabili con il sistema cromatografico usato.

SCHWARZ ⁽¹⁶⁾ (1933) ha descritto l'applicazione del reattivo all'acido arsenomolibdico direttamente sui cromatogrammi ottenuti secondo i metodi di ZAFFARONI e di BUSH per la determinazione quantitativa dei corticoidi sia in miscele sintetiche che in estratti di corteccia surrenale.

DE GIUSEPPE e CASTELLI ⁽¹⁷⁾ (1936) hanno applicato le misure spettrofotometriche nell'U. V., con la correzione secondo Allen, ed il metodo colorimetrico alla fenilidrazina, secondo Porter e Silber ad estratti in toto ed a frazioni separate mediante cromatografia su carta con il metodo di EBERLEIN e BONGIOVANNI ⁽¹⁸⁾.

I risultati ottenuti con i metodi chimico-fisici sono difficilmente comparabili con quelli ottenuti con i metodi biologici. Un interessante esperimento è stato compiuto da BANES (v. ⁴) il quale, dopo aver determinato il contenuto in corticoidi attivi (cortisone, idrocortisone, corticosterone, 11-deidrocorticosterone) di un estratto di corteccia surrenale, con la tecnica in precedenza citata, ne ha dedotto l'attività biologica in termini di unità glicogeno, secondo il metodo di PABST, SHEPPARD e KUIZENGA ⁽¹⁹⁾, impiegando i valori riportati da HAINES ⁽²⁰⁾ per le attività specifiche dei vari corticoidi nel test della produzione di glicogeno e nel test della sopravvivenza. [In letteratura sono assai scarsi gli studii sulla attività specifica dei vari corticosteroidi in diversi tests biologici: uno studio analogo a quello di HAINES è riportato da PINCUS ⁽²¹⁾].

I risultati di BANES hanno un particolare interesse poichè la U. S. P. XV Ed. ⁽²²⁾ prescrive che gli estratti di corteccia surrenale siano titolati in unità glicogeno, aggiungendo che una unità è pari a 100 µg di idrocortisone (il composto più attivo in questo test) ed i corticosteroidi determinabili con il metodo di BANES (cortisone, idrocortisone, corticosterone, 11-deidrocorticosterone) sono praticamente quelli che determinano l'attività di un estratto di corteccia surrenale rispetto al test della produzione di glicogeno.

Il tentativo di tradurre il contenuto in corticoidi di un estratto di corteccia surrenale in unità di un metodo di mantenimento in vita non ci risulta sia stato fatto: in effetti si incontrano maggiori difficoltà sia per le diverse attività specifiche dei vari corticoidi nei diversi tests di questo tipo, sia a causa della elevata attività dello aldosterone come

mineral corticoide, il quale essendo presente negli estratti in minima quantità (qualche unità %) è di difficile determinazione quantitativa.

Gli estratti di corteccia surrenale impiegati in terapia in Italia vengono solitamente titolati in Unità Corticodinamiche (U C D) secondo il metodo di BOMSKOW e BAHNSEN (²³) eseguito sul topo surrenectomizzato: questo è un test di mantenimento in vita e non fornisce indicazioni complete sulla composizione di un estratto di corteccia surrenale ed in particolare sui corticoidi glicoattivi.

Alcuni di noi hanno avuto occasione di verificare i soddisfacenti risultati offerti dalle tecniche cromatografiche di BUSH e di ZAFFARONI nell'analisi quantitativa di steroidi corticosimili in preparazioni farmaceutiche (²⁴) e nella determinazione quantitativa di cortisone, idrocortisone ed aldosterone in estratti urinarii (²⁵): abbiamo ritenuto pertanto interessante studiare il frazionamento di un estratto di corteccia surrenale con le semplici tecniche di cromatografia su carta sopra citate, allo scopo di determinare quantitativamente il maggior numero possibile dei corticosteroidi, compreso l'aldosterone, contenuti in un estratto di corteccia surrenale.

In tale modo risulterebbe possibile affiancare al test biologico, della determinazione della attività corticodinamica di un estratto, un test che fornisce un ampio quadro della composizione qualitativa e quantitativa dell'estratto stesso e creare inoltre la base per un confronto tra i due metodi.

Le tecniche proposte ed i risultati ottenuti costituiscono l'oggetto del presente lavoro.

PARTE SPERIMENTALE

1) REATTIVI E MATERIALE.

I solventi impiegati sono del tipo puro per cromatografia o per analisi.

I reattivi sono puri per analisi.

Gli steroidi di riferimento sono puri per analisi o provengono da una raccolta di steroidi di riferimento dell'« U. S. P. Reference Standards » (Sets n. 1, 2, 3).

La carta usata per la cromatografia è del tipo Whatman n. 1 in fogli di cm 19 × 46 con 5 corsie da cm 3,8, divise a matita, oppure di cm 3, separate da un distacco di 1 cm; essa viene lavata in un apposito Soxhlet per 24 ore con metanolo e per 24 ore con cloroformio.

L'attrezzatura per la cromatografia e per la rivelazione degli steroidi è stata descritta in Note precedenti (²⁴, ²⁵).

2) CROMATOGRAFIA SU CARTA.

Per i sistemi cloroformio/formanamide di ZAFFARONI e B I (toluene 500 - eptano 500 - metanolo 700 - acqua 300) e C (toluene 900 - acetato di etile 100 - metanolo 500 - acqua 500) di BUSH, si rimanda alle Note precedenti (²⁴, ²⁵) ed a quelle originali degli AA. citati (¹³, ¹⁴).

Il sistema E 2 B di EBERLEIN e BONGIOVANNI (¹⁶) (isooctano 500 - butanolo terziario 250 - acqua 450) è stato impiegato secondo le istruzioni degli AA., ossia equilibrando la striscia nella vasca posta a 36° in termostato per 13 ore circa e sviluppando poi con la fase solvente poco polare a temperatura ambiente. Lo sviluppo a 36°, secondo la tecnica di BUSH, consigliata da NEHER (²⁶) non ci ha fornito separazioni soddisfacenti.

3) RIVELAZIONE DEGLI STEROIDI.

Si effettua con luce U. V. ottenuta da una lampada a vapori di mercurio con apposito filtro, oppure con soluzione acquosa di blu di tetrazolio allo 0,1%, diluita al momento dell'uso con NaOH 2 N (1 p + 9 p) (²⁴).

4) DETERMINAZIONE QUANTITATIVA DEI CORTICOSTEROIDI NEGLI ESTRATTI DI CORTECCIA SURRENALE.

Si effettua con il metodo colorimetrico al blu di tetrazolio secondo CHEN e Coll. (²⁷) modificato come segue:

— *Reattivi:*

- a) soluzione allo 0,5% di blu di tetrazolio in etanolo assoluto p. a.;
- b) soluzione di tetrametilammonio all'1% in etanolo assoluto p. a.;
- c) etanolo assoluto p. a.;
- d) miscela acido acetico -etanolo (1:1).

— *Preparazione del campione:*

a) soluzioni acquose: si preleva un volume di soluzione pari a circa 500 U. C. D. e si porta al volume di 20 cm³ con acqua; si estrae la

soluzione in imbuto separatore (rubinetto lubrificato con glicole) con 5 porzioni da 10 cm³ di cloroformio e si lavano gli estratti cloroformici riuniti 3 volte con 5 cm³ di NaOH 0,1 N fredda e 3 volte con 5 cm³ di acqua; gli estratti alcalini riuniti si lavano con 5 cm³ di cloroformio e con esso si lavano successivamente quelli acquosi. Gli estratti cloroformici si filtrano su cotone con poco Na₂SO₄ anidro e si evaporano alla pompa su b. m. a 50°. Si riprende il residuo con etanolo assoluto in modo da avere con due diluizioni, circa 1-2 U. C. D./cm³;

b) polveri liofilizzate: si procede come sopra descritto diluendole con acqua nei limiti indicate per le soluzioni acquose;

c) soluzioni concentrate in solvente organico (etanolo, acetato di etile): si preleva un volume pari a 100 U. C. D., si evapora il solvente e si riprende con etanolo assoluto, in modo da avere una concentrazione di 1-2 U. C. D. per cm³.

— *Procedimento.* La soluzione contenente gli steroidi da analizzare viene portata, in provetta da 10 cm³ graduata e con tappo a smeriglio, al volume di 2 cm³ con etanolo assoluto; si aggiungono nell'ordine 0,2 cm³ della soluzione di tetrametilammonio all'1% e 0,2 cm³ della soluzione di blu di tetrazolio, si agita e si lascia per 60 minuti al riparo della luce. Si aggiunge poi 1 cm³ della miscela acido acetico - etanolo (reattivo 4) e si porta a 7 cm³ con etanolo. Si misura l'estinzione a 500 m μ ad uno spettrofotometro o colorimetro contro una prova in bianco preparata con etanolo ed i reattivi e si traduce il valore dell'estinzione in μ g di steroide con una curva di taratura in precedenza preparata con idrocortisone puro a concentrazioni scalari da 5 a 40 μ g.

5) ANALISI CROMATOGRAFICA QUANTITATIVA.

Su di una striscia di carta per cromatografia e larga 3-3,8 cm si depongono con una micropipetta da 100 a 200 μ g di materiale dosato col metodo colorimetrico al blu di tetrazolio descritto. Si utilizzano per la cromatografia una opportuna aliquota dell'estratto cloroformico oppure direttamente le soluzioni concentrate in solvente organico; come solvente per l'estratto cloroformico si impiega una miscela metanolo-cloroformio 1:1, deponendo un volume di 100-150 μ l.

La prova si esegue con almeno 2 strisce in parallelo contenenti lo estratto, una striscia in bianco ed una o due strisce contenenti i seguenti composti di riferimento:

Sistema C di Bush: idrocortisone, cortisone, tetraidrocortisone, tetraidroidrocortisone, corticosterone e, per l'aldosterone, cortisone-aldosterone (*).

Sistema B 1 di Bush: corticosterone - 11-deidrocorticosterone (composto A), 11-desossi-17-idrossicorticosterone (composto S) - 11-desossi-corticosterone (composto Q);

Sistema E2 B: gli stessi composti del sistema B 1; per l'aldosterone: idrocortisone - aldosterone oppure cortisone - aldosterone, secondo il tipo della prima cromatografia impiegata per la separazione dello aldosterone;

Sistema cloroformio/formammide: cortisone - idrocortisone.

A cromatografia ultimata si delimitano con una matita le aree corrispondenti agli steroidi rivelabili alla luce U. V. nelle strisce ove si è deposto l'estratto ed in quelle dei composti di riferimento; successivamente si tratta una delle strisce con l'estratto e quelle con i composti di riferimento con il reattivo al blu di tetrazolio, lasciando asciugare all'aria i cromatogrammi. Si delimitano anche in questo caso le aree a reazione positiva, prendendo nota della positività o meno dei due saggi (gruppo Δ_4 -3-chetonico e catena alfa-chetolica in C_{17}). E' possibile a questo punto identificare la maggior parte degli steroidi presenti nell'estratto di corteccia surrenale; per la valutazione quantitativa si contrassegnano nel cromatogramma non sviluppato le aree corrispondenti ai vari steroidi identificati, si ritagliano queste aree e si pongono in provette a tappo a smeriglio da 15 x 110 mm, aggiungendo ad ogni provetta 5 cm³ di etanolo assoluto. Si lascia a contatto per 12 ore circa, poi si prelevano da 2 a 4 cm³ della soluzione, si trasferiscono in una provetta graduata da 10 cm³ con tappo a smeriglio, se necessario si concentra con corrente di azoto a 2 cm³ e si procede poi alla determinazione colorimetrica dei corticosteroidi con il reattivo al blu di tetrazolio come sopra descritto.

I risultati si esprimono calcolando il totale dei corticosteroidi recuperati dopo la cromatografia e i valori percentuali dei singoli corticoidi sul totale recuperato dopo cromatografia.

— *La determinazione di cortisone*, idrocortisone e loro tetraidroderivati si esegue, sugli eluati di un cromatogramma sviluppato, con il sistema C di Bush; la determinazione di corticosterone, 11-deidrocortico-

(*) L'aldosterone di riferimento può essere sostituito con idrocortisone.

sterone, 11-desossi-17-idrossicorticosterone 11-desossicorticosterone, si esegue sugli eluati di un cromatogramma sviluppato con il sistema B 1 di Bush o con il sistema E2 B.

— *Determinazione dell'aldosterone.* a) Si esegue una cromatografia con il sistema cloroformio/formammide su almeno 200 μg di materiale dosato con il metodo al blu di tetrazolio e preparato per estrazione cloroformica. La tecnica è quella di NEHER e WETTSTEIN⁽²⁸⁾, già in precedenza descritta⁽²⁵⁾. La frazione contenente l'aldosterone insieme al cortisone viene eluita, purificata da tracce di formammide mediante ripartizione cloroformio-acqua e cromatografata ulteriormente con il sistema C di Bush o con il sistema E2 B.

b) Si esegue la cromatografia preliminare con il sistema C di Bush e la seconda cromatografia con il sistema E2 B; in questo caso l'aldosterone procede, nella prima separazione cromatografica, unitamente all'idrocortisone ed è necessario eluire questa zona in luogo di quella del cortisone.

Il dosaggio dell'aldosterone si esegue come riportato in⁽²⁵⁾, effettuando la comparazione con diluizioni scalari di idrocortisone o, in casi favorevoli di concentrazione, mediante determinazione colorimetrica con il blu di tetrazolio, sull'eluato della zona corrispondente allo steroide.

L'identificazione dell'aldosterone viene eseguita mediante spettro di assorbimento o in acido solforico conc., nel quale mezzo l'aldosterone ha un unico massimo a 288 $\text{m}\mu$ ⁽²⁹⁾ o in acido fosforico al 100%, nel quale mezzo l'aldosterone ha un unico massimo a 280 $\text{m}\mu$ ⁽³⁰⁾.

— *Distinzione del corticosterone dall'11-deossi-17-idrossicorticosterone (Composto S).*

Con il sistema B 1 di Bush la separazione corticosterone (composto B) — composto S, i quali procedono nell'ordine: origine — B \rightarrow S — fronte e che in molti casi non è molto netta, può effettuarsi eseguendo una cromatografia con il sistema E2 B direttamente con l'estratto o meglio con la zona del corticosterone separata con una prima cromatografia nel sistema C di Bush.

RISULTATI E DISCUSSIONE

L'analisi cromatografica su carta permette, secondo la nostra esperienza, di isolare e determinare quantitativamente (con l'approssimazione di $\pm 10\%$) i seguenti corticosteroidi:

— idrocortisone, tetraidroidrocortisone, cortisone, tetraidrocortisone, corticosterone, aldosterone ($\pm 20\%$), 11-deidrocorticosterone, 17-idrossi-11-desossicorticosterone.

L'11-desossicorticosterone, che è contenuto in piccola quantità negli estratti di corteccia surrenale, non è stato da noi identificato in nessuno degli estratti esaminati; tuttavia esso potrebbe essere facilmente identificato e determinato, qualora vi risultasse presente.

In un estratto (N. 1 della tabella I) sono stati riscontrati anche due composti, presenti in piccolissime quantità e che precedono, nel sistema C di Bush, tra l'origine e il tetraidroidrocortisone e molto probabilmente identificabili con i componenti Aiii e Aii di Bush e facenti parte della frazione amorfa ed un composto (riscontrabile anche negli estratti 2 e 3) il quale procede, nel sistema B 1 di Bush, tra il cortisone ed il corticosterone (molto più vicino a questo), presente anch'esso in minime

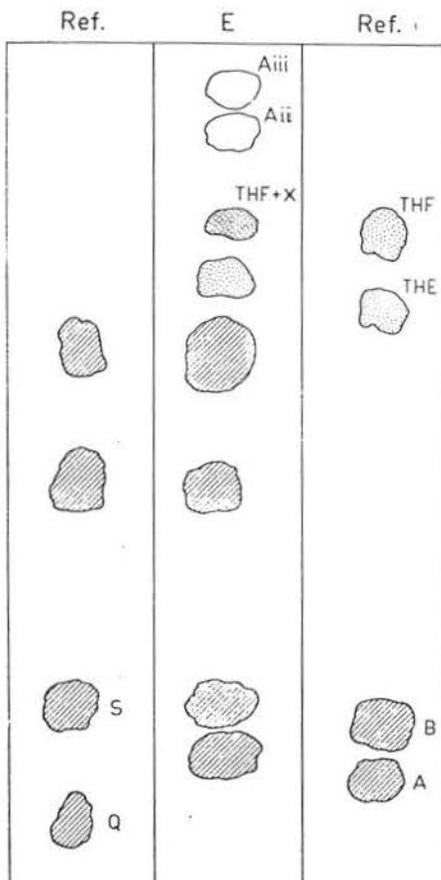


Fig. 4. - Cromatografia di un estratto (E) di corteccia surrenale con il sistema C di Bush. (I composti di riferimento sono: colonna di sinistra da alto in basso, idrocortisone, cortisone, 11-desossi-17-idrossicorticosterone, 11-desossicorticosterone. Colonna di destra, da alto in basso: tetraidroidrocortisone, tetraidrocortisone, corticosterone, 11-deidrocorticosterone). Il tratteggio indica: fluorescenza nell'U.V. positiva, reazione con B.T. positiva. L'intensità della reazione è proporzionale al tratteggio. Le zone punteggiate indicano: assenza di fluorescenza nell'U.V., reazione con B.T. positiva.

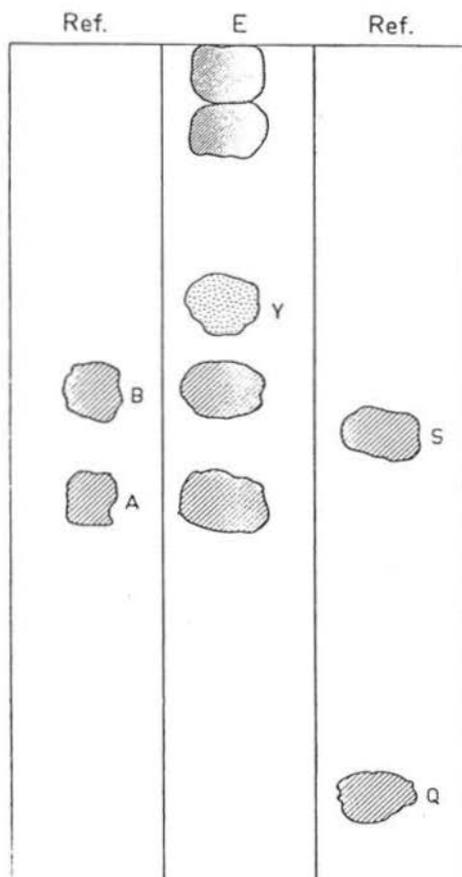


Fig. 2. - Cromatografia di un estratto (E) di corteccia surrenale con il sistema B 4 di Bush. (I composti di riferimento sono: colonna di sinistra da alto in basso, corticosterone, 11-deidrocorticosterone; colonna di destra: 11-desossi-17-idrossicorticosterone, 11-deossicorticosterone. Il tratteggio indica: fluorescenza nell'U.V. positiva, reazione con B.T. positiva. L'intensità della reazione è proporzionale al tratteggio. Le zone punteggiate indicano: assenza di fluorescenza nell'U.V., reazione con B.T. positiva.

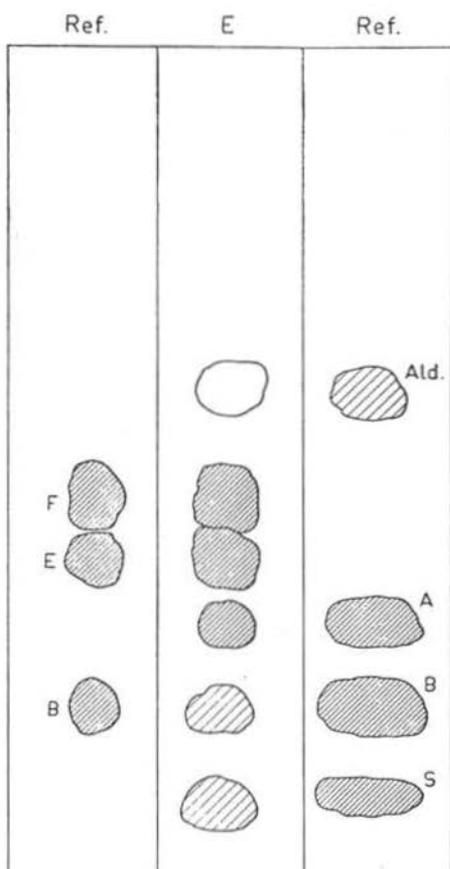


Fig. 3. - Cromatografia di un estratto (E) di corteccia surrenale con il sistema E 2 B. (I composti di riferimento sono: colonna di sinistra, da alto in basso: idrocortisone, cortisone, corticosterone; colonna di destra da alto in basso: aldosterone, 11-deidrocorticosterone, corticosterone, 11-desossi-17-idrossicorticosterone). Il tratteggio indica: fluorescenza nell'U.V. positiva, reazione con B.T. positiva. L'intensità della reazione è proporzionale al tratteggio. Le zone punteggiate indicano: assenza di fluorescenza nell'U.V., reazione con B.T. positiva.

quantità ed identificabile, probabilmente, con il composto Y di Busu (figg. 1, 2 e 3).

TABELLA I

Estratto	Contenuto in sostanze BT riducenti espresse in idrocortisone mg/cm ³ di estratto	Contenuto in sost. BT rid. espresse in idrocortisone, mg/cm ³ di estratto dopo cromatografia	Contenuto percentuale in THF e THE	Contenuto percentuale in idrocortisone	Contenuto percentuale in cortisone	Contenuto percentuale in corticosterone e composto S.	Contenuto percentuale in 11-deidro corticosterone	Contenuto percentuale in aldosterone
N. 1 in aceto-efile 100 UCD/cm ³	2,12	2,02 (95,5'/ _o)	8,56	27,6	30,1	19,0	8,3	1,9
N. 2 in acqua 100 UCD/cm ³	0,255	0,230 (90,5'/ _o)	6,24+19,8 (^(*)) (^(*))	15,0	17,0	9,65+16,7 (^(*)) (^(*))	15,6	0,8
N. 3 in acqua, 80 UCD/cm ³	0,069	0,061 (88,5'/ _o)	15,10	28,5	15,5	16,2	5,5	—
N. 4 in glicerolo-acqua 80 UCD/cm ³	0,113	—	—	—	—	—	—	—
N. 5 in fiale liofiz. 6 UCD/cm ³	0,6632	0,057 (90,4'/ _o)	8,9	15,7	55,5	8,1	11,7	1,2
N. 6 in acqua 100 UCD/cm ³	0,442	0,383 (87,3'/ _o)	8,4	12,3	35,8	18,7	12,5	—

(^(*)) THF
(^(*)) THE

(^(*)) Composto Y
(^(*)) Corticosterone

I risultati delle analisi eseguite sono raggruppati nella tabella I; i dati riportati in essa dimostrano:

a) buon accordo per gli estratti esaminati, tra il contenuto in materiale riducente il blu di tetrazolio dell'estratto cloroformico e la somma dei singoli corticoidi identificati ed analizzati dopo la separazione cromatografica.

Le perdite dovute al procedimento cromatografico di separazione sono contenute entro limiti compatibili con il metodo: l'estratto N. 1 analizzato quasi subito dopo la preparazione e conservato in soluzione di acetato di etile, in frigorifero, ha dato un recupero totale, dopo la cromatografia, del 93,3%.

Nella tabella II, inoltre sono riuniti i valori di recupero ottenuti cromatografando una miscela di steroidi corticali puri da noi preparata.

TABELLA II

Sostanza	Quantità cromatografata in µg	Quantità recuperata in µg	Recupero in %
Tetraidrocortisolo	22,8	19,5	86,5
Cortisolo	20,0	18,0	90,0
Cortisone	40,0	34,25	85,5
Corticosterone	16,8	14,5	86,4
Totale	99,6	86,25	86,8

I risultati possono ritenersi soddisfacenti in quanto il recupero dell'87-93% è in accordo con quanto ottenibile in generale dopo separazione cromatografica accurata, tenendo inoltre conto che i dati di estinzione ottenuti con la reazione al blu di tetrazolio vengono riferiti ad una curva di taratura ricavata con idrocortisone mentre le estinzioni specifiche dei vari corticosteroidi sono un po' diverse fra di loro;

b) relativamente all'estratto N. 1 abbiamo calcolato le unità glucogeno, definite secondo il metodo di PABST e Coll. (19), in base alla composizione percentuale dell'estratto, analogamente a quanto eseguito da BANES (4), ottenendo i risultati riportati nella tabella III.

TABELLA III

Steroide	Contenuto in mg/cm ³ dei singoli steroidi	Unità per mg di steroide (2°)	Unità per cm ³ di estratto
Idrocortisone . . .	0,276 · 2,02 = 0,550	10	5,5
Cortisone	0,301 · 2,02 = 0,607	5	3,03
Corticosterone . . .	0,190 · 2,02 = 0,382	3,6	1,37
11-deidrocorticosterone	0,089 · 2,02 = 0,167	2,8	0,46
Totale			10,36

Il risultato può ritenersi soddisfacente in quanto l'estratto N. 1 è un estratto concentrato ed il titolo espresso in Unità glicogeno sarebbe equivalente, secondo le prescrizioni della Farmacopea Americana XV Ed., a mg 4,036 di idrocortisone per cm³ di estratto;

c) la determinazione dell'aldosterone è stata condotta con soddisfacenti risultati su 3 estratti, ottenendo valori compresi tra l'1 ed il 2% circa dei corticoidi totali: si raccomanda sempre, nei casi incerti e quando il materiale è disponibile, di eseguire uno spettro in acido solforico o fosforico concentrati per controllarne l'identità. Nella fig. 4 è riportato lo spettro della frazione contenente aldosterone di un estratto di corteccia surrenale e di un campione di aldosterone puro.

In conclusione i risultati ottenibili con il metodo proposto permettono di conseguire i seguenti obiettivi:

1) integrare i dati ottenuti col test biologico di mantenimento, secondo BOMSKOW e BAHNSEN, con la conoscenza della composizione qualitativa e quantitativa di un estratto;

2) controllare eventuali aggiunte di steroidi corticosimili di sintesi (p. es.: fluoroderivati, Δ_1 -derivati, ecc.);

3) determinare la composizione tipo degli estratti di corteccia surrenale preparati sempre con la medesima tecnica di preparazione;

4) controllare eventuali aggiunte di corticosteroidi sintetici in misura tale da rappresentare una sofisticazione e da falsare le titolazioni biologiche (p. es. aggiunte di desossicorticosterone, cortisone, idrocortisone, ecc.);

5) stabilire un nesso tra il contenuto in steroidi glico-attivi come cortisone, idrocortisone, corticosterone, 11-deidrocorticosterone e contenuto in unità glicogeno dell'estratto, analogamente a quanto proposto da BANES per il metodo cromatografico su colonna.

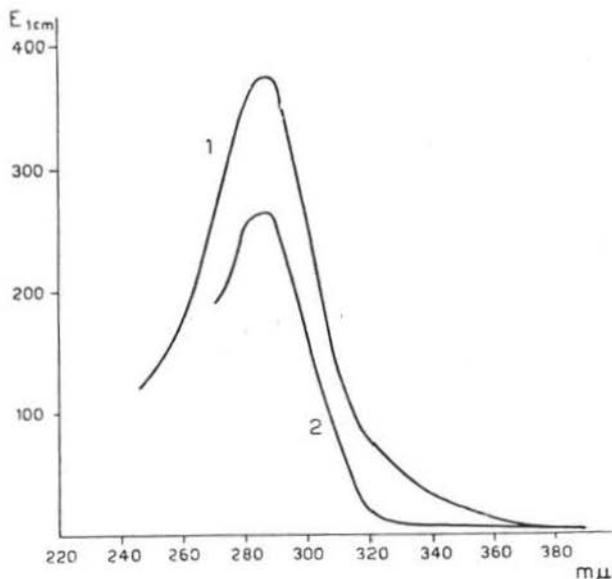


Fig. 4. - Spettri di assorbimento in acido solforico concentrato di: (1) campione puro di aldosterone; (2) campione di aldosterone eluito da cromatografia. Questo spettro è stato ottenuto sottraendo lo spettro della prova in bianco, effettuata sull'eluato della sola carta.

L'insieme di questi risultati, che riteniamo positivi, ci incoraggia ad ampliare le nostre esperienze con l'applicazione di questa metodica ad un più elevato numero di estratti di corteccia surrenale e a tentare un confronto tra i dati in tal modo ottenuti e quelli ottenuti invece con l'applicazione del metodo biologico di BOMSKOW e BAHSEN.

Roma — Istituto Superiore di Sanità - Laboratori di Biologia.

BIBLIOGRAFIA

- (¹) DORFMANN R. I. - *Physiol. Rev.*, 34: 138 (1954).
- (²) REICHSTEIN T. e SHOPPEE C. W. - *Vitamins and Hormones*, 1: 345 (1943).
- (³) SIMPSON S. A., TAIT J. F., WETTSTEIN A., NEHER R., v. EUW J., SCHINDLER O. e REICHSTEIN T. - *Helv. chim. Acta*, 37: 1163 (1954).

- (4) BANES D. - J. am. pharm. Ass., (Sci. Ed.), 42: 669 (1933).
 - (5) HEFTMANN E. e JOHNSON D. F. - Anal. Chem., 26: 319 (1934).
 - (6) DORRNER K. KATZENELLENBOGEN E. R., e SCHNEIDER R. - Arch. Biochem. Bioph., 48: 167 (1954).
 - (7) MOUTON M., CHALOPIN H. e RABINOWICZ M. - Bull. Soc. Chim. biol., 38: 203 (1936).
 - (8) HEARD R. D. H. e SOBEL H. - J. biol. Chem., 163: 637 (1946).
 - (9) GORNALL A. G. e Mc DONALD M. P. - Ibidem, 201: 279 (1933).
 - (10) TALBOT N. B., SALTZMANN A. H., WIXON R. L. e WOLFE J. K. - Ibidem, 160: 535 (1946).
 - (11) HEMPILL R. E. e REUSS M. - Endocrinol., 41: 17 (1947).
 - (12) NIGEON-DUREIL M., RABINOVICS M., RAHANDRAHA T. e RATSIMANGA A. R. - Therapie, 9: 481 (1934).
 - (13) BURTON R. B., ZAFFARONI A. e KEUTMAN H. - J. biol. Chem., 193: 769 (1931).
 - (14) BUSH I. E. - Biochem. J., 50: 370 (1932).
 - (15) HOFMAN H. e STAUDINGER H. - Biochem. Z., 322: 230 (1931).
 - (16) SCHWARZ V. - Biochem. J., 53: 148 (1933).
 - (17) DE GIUSEPPE L. e CASTELLI B. - Boll. Soc. ital. Biol. sper., 32: 4203 (1936).
 - (18) EBERLEIN W. R. e BONGIOVANNI A. M. - Arch. Biochem. Biophys., 59: 90 (1933).
 - (19) PABST M. L., SHEPPARD R. e KUIZENGA M. H. - Endocrinol., 41: 33 (1947).
 - (20) HAINES W. J. - Recent Progress in Hormone Research, 7: 233, Acad. Press Inc., New York, 1932.
 - (21) PINCUS G. e THIMANN K. V. - The Hormones, 1: 398, Acad. Press Inc., New York, 1948.
 - (22) United States Pharmacopoeia, XV Ed., p. 22 (1933). New and Non Official Drugs, 1960, p. 530 - Lippincott J. B. Co., Philadelphia, 1960.
 - (23) BOMSKOW C. e BAHNSEN K. - Arch. exp. Path. Pharmacol., 178: 1 (1933).
 - (24) CAVINA G. e CINGOLANI E. - Farmaco (Ed. Pr.), 13: 246 (1960).
 - (25) CAVINA G. e ARATA L. - Rend. Ist. sup. Sanità, 22: 1030 (1939).
 - (26) NEHER R. - Chromatographic Reviews, Elsevier Publ. Co., p. 175 (1939).
 - (27) CHEN C., WHEELER J., TEWELL H. E. - J. Lab. clin. Med., 42: 749
 - (28) NEHER R. e WETTSTEIN A. - J. clin. Invest., 33: 800 (1933).
 - (29) NOWACZYNSKI W., KOIW E. e GENEST J. - Canad. J. Biochem., 33: 423 (1957).
-

78. A. GALAMINI e Lucia MAGGIORE. — Effetto di alcuni antibiotici e della vitamina B₁₂ sull'accrescimento e sulla metamorfosi dei girini di *Bufo Vulgaris*.

Riassunto. — Si è studiata l'azione di alcuni antibiotici e della vitamina B₁₂ sull'accrescimento e sulla metamorfosi di girini di *Bufo vulgaris*. Sono state adoperate: Penicillina, Diidroestreptomicina, Cloramfenicolo, Ossitetraciclina alle dosi di mg 500 e 1000/l, Clortetraciclina alle dosi di mg 200 e 500/l, Tetraciclina ed Eritromicina alla dose di mg 500/l, Vitamina B₁₂ alla dose di 4γ/l.

Sono stati fatti 14 gruppi di 15 elementi ciascuno, omogenei per età e per sviluppo, tenuti nelle stesse condizioni di luce e di temperatura, in vaschette contenenti ciascuna l 1 di acqua di fonte e riceventi per alimento g 2 di miscela di tuorlo d'uovo essiccato e polverizzato e pane grattugiato.

Dai risultati ottenuti risulta che:

a) favoriscono l'accrescimento e la metamorfosi la Penicillina e la Diidroestreptomicina alla dose di 500 mg, la Vitamina B₁₂ alla dose di 4 γ;

b) Si è osservato accrescimento corporeo inferiore ai precedenti e ritardo della metamorfosi per la Penicillina e la Diidroestreptomicina alla dose di 1000 mg;

c) Hanno esercitato in generale inibizione della crescita e della metamorfosi gli altri antibiotici somministrati alla dose di 500 mg;

d) Si è dimostrata del tutto tossica l'Aureomicina alla dose di 500 mg; somministrata alla dose di 200 mg ha prodotto un'inibizione della crescita che si è accompagnata con accelerazione della metamorfosi.

Summary. — The effects of some antibiotics and of vitamin B₁₂ on the growth and metamorphosis of *Bufo vulgaris* tadpoles have been studied. Penicillin, Dihydrostreptomycine, Chloramphenicol and Oxytetracycline were tested in doses of 500 and 1000 mg/l; Chlortetracycline was tested at 200 and 500 mg/l and Tetracycline and Erythromycine were tested at 500 mg/l Vitamin B₁₂ was tested at 4 μg/l.

Fourteen groups, each of 15 individuals were set up. The individuals were selected as homogeneous for age and development and each group was held under identical conditions of lighting and temperature in baths holding 1 l of tap water. They were fed with 2 g of a dried and powdered mixture of egg yolk and bread crumbs.

The following results were obtained.

Penicillin and Dihydrostreptomycine in 500 mg doses and vitamin B₁₂ in a 4 γ g dose favoured growth and metamorphosis.

Doses of 1000 mg of Penicillin and Dihydrostreptomycine produced inferior body growth and retarded metamorphosis when compared with these previous results.

All the other antibiotics in 500 mg doses produced a general inhibition of growth and metamorphosis.

Aureomycin in a 500 mg dose proved to be completely toxic but in a 200 mg dose it inhibited growth but accelerated metamorphosis.

E' noto che la crescita di alcuni microrganismi è stimolata dall'aggiunta al mezzo di cultura di opportune quantità, in genere minime, di fattori vitaminici idrosolubili e anche di alcuni antibiotici, in dosi estremamente piccole, quali ad es.: la Penicillina e la Streptomina.

E' anche noto che altri antibiotici, come l'Aureomicina, aggiunti al cibo, promuovono la crescita in numerosi animali a sangue caldo: pulcino, tacchino, maiale, vitello, ratto e che questo effetto è più pronunciato se il cibo somministrato contiene Vitamina B₁₂.

Con la presente ricerca si è voluto studiare la eventuale presenza di questa azione stimolante i processi metabolici delle cellule in attiva moltiplicazione, sulla crescita e sulla metamorfosi dei girini di Bufo Vulgaris. I girini di rospo, nei quali tali processi regolati dalla tiroide sono particolarmente attivi, costituiscono a giudizio di numerosi AA. un ottimo test per lo studio dei fenomeni dell'accrescimento e dei rapporti esistenti fra i fattori di crescita esogeni ed endogeni.

Scarse sono le osservazioni attualmente esistenti in letteratura: esse riguardano unicamente la Penicillina e l'Aureomicina.

TELKKÄ e MUSTAKALLIO (1) trovarono che l'Aureomicina promuoveva la crescita dei girini di Rana Temporaria alimentati con polvere di fegato, ma non osservarono differenze nel decorso della metamorfosi.

In successive ricerche (2) trovarono che il ritardo della metamorfosi dei girini era il principale fattore dell'aumento di peso corporeo degli stessi dopo trattamento con l'Aureomicina. Pertanto l'Aureomicina non esercitava nei girini l'azione di fattore proteico animale osservata invece nei microrganismi (3).

Gli stessi AA. hanno osservato che nè la vitamina B₁₂, nè l'acido folico esercitano alcuna azione sulla metamorfosi.

L'azione inibente dell'Aureomicina sulla metamorfosi è stata più recentemente confermata da SANFILIPPO (4).

CHIUNI (5) ha studiato sui girini l'azione della Penicillina sull'accre-

scimento e sulla differenziazione ed ha dimostrato che l'aggiunta di piccole dosi al cibo provoca un accrescimento corporeo proporzionale alla quantità di prodotto somministrato e che sulla metamorfosi può agire turbando l'armonia del processo.

MATERIALE E TECNICA

Abbiamo adoperato, per i nostri esperimenti, girini di *Bufo Vulgaris* provenienti da uova di una stessa deposizione. I girini furono divisi in 14 gruppi di 15 elementi ciascuno, omogenei per età (41 gg. di vita larvale, per peso complessivo di 550 mg circa) e stadio di sviluppo non essendo ancora macroscopicamente visibile la gemma di formazione degli arti.

I diversi gruppi sono stati tenuti nelle stesse condizioni di luce e di temperatura, in vaschette contenenti ciascuna 1 l di acqua di fonte e ricevevano per alimento g 2 di miscela in parti uguali di tuorlo essiccato e polverizzato e pane grattugiato.

Il primo gruppo è stato mantenuto come controllo senza alcun trattamento.

I successivi 13 gruppi ricevevano giornalmente l'aggiunta, in polvere, di un supplemento di antibiotico, come è indicato nel seguente schema:

Gruppo	Supplemento giornaliero	Quantità
1	—	—
2	Penicillina sodica I.S.S.	mg 500
3	Penicillina sodica I.S.S.	mg 1000
4	Diidrostreptomina solfato (Squibb)	mg 500
5	Diidrostreptomina solfato (Squibb)	mg 1000
6	Cloramfenicolo (Parke Davis) o Cloromicetina	mg 500
7	Cloramfenicolo (Parke Davis) o Cloromicetina	mg 1000
8	Clorotetraciclina (Lederle) o Aureomicina	mg 500
9	Clorotetraciclina (Lederle) o Aureomicina	mg 200
10	Ossitetraciclina cloruro (Pfizer) o Terramicina	mg 500
11	Ossitetraciclina cloruro (Pfizer) o Terramicina	mg 1000
12	Tetraciclina cloruro (Pfizer)	mg 500
13	Eritromicina stearato (Abbott)	mg 500
14	Vitamina B ₁₂	γ 4

L'acqua, l'alimento, l'antibiotico e la Vitamina B₁₂ (per il gruppo che la riceveva) venivano rinnovati ogni giorno.

Le dosi di antibiotico impiegate erano state da noi precedentemente stabilite con una serie di prove orientative di tossicità.

Per ciascun gruppo il trattamento è stato proseguito sino alla me-

tamorfofi completa con un periodo massimo di osservazione di 55 gg. per i gruppi che non avevano manifestato alcun accenno di metamorfosi.

Il peso dei girini di ciascun gruppo veniva rilevato ogni 5 giorni: i girini, tolti dalle rispettive vaschette, asciugati su carta bibula, venivano pesati gruppo per gruppo in pesafiltri tarati.

Giornalmente veniva effettuato il rilievo della eventuale comparsa degli arti e scomparsa della coda.

RISULTATI

I risultati ottenuti sono riportati nei grafici e nella tabella.

Il grafico n. 1 riguarda le curve di accrescimento medio dei diversi

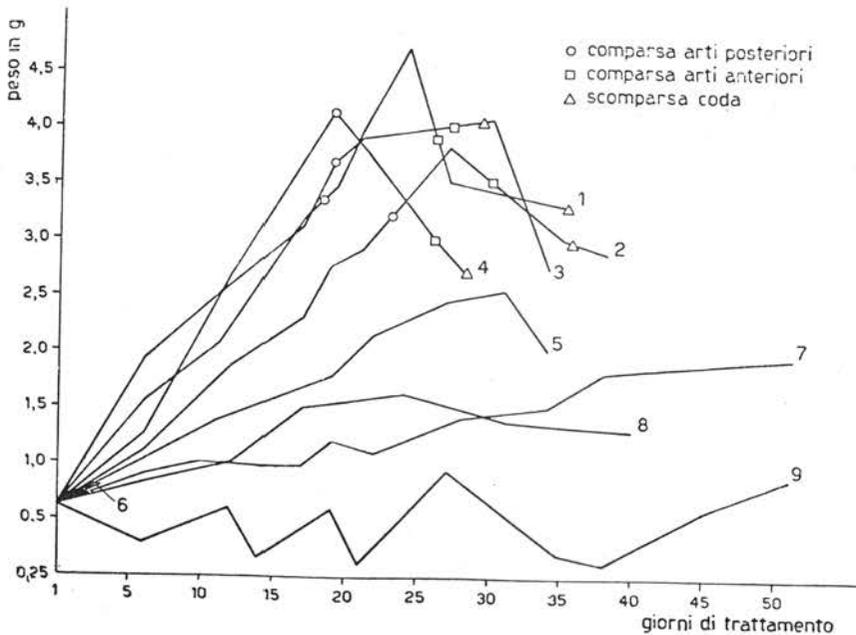


Fig. 1. - Curva di accrescimento con contrassegni della comparsa degli arti e scomparsa della coda:

1) Diidrostreptomicina	dose mg 500 pro die
2) Controllo	» » » » »
3) Penicillina	» » » » »
4) Vitamina B ₁₂	» γ 4 » »
5) Eritromicina	» mg 300 » »
6) Clorotetraciclina	» » » » »
7) Ossitetraciclina	» » » » »
8) Cloramfenicolo	» » » » »
9) Cloramfenicolo	» » » » »

gruppi trattati giornalmente con 500 mg di un antibiotico e del gruppo trattato con 4 γ di Vitamina B₁₂.

Il grafico n. 2 riporta invece le curve di accrescimento ottenute dopo trattamento giornaliero con 1 g di antibiotico ad eccezione della Clorotetraciclina.

Un gruppo di girini riportato in questo grafico ha ricevuto infatti

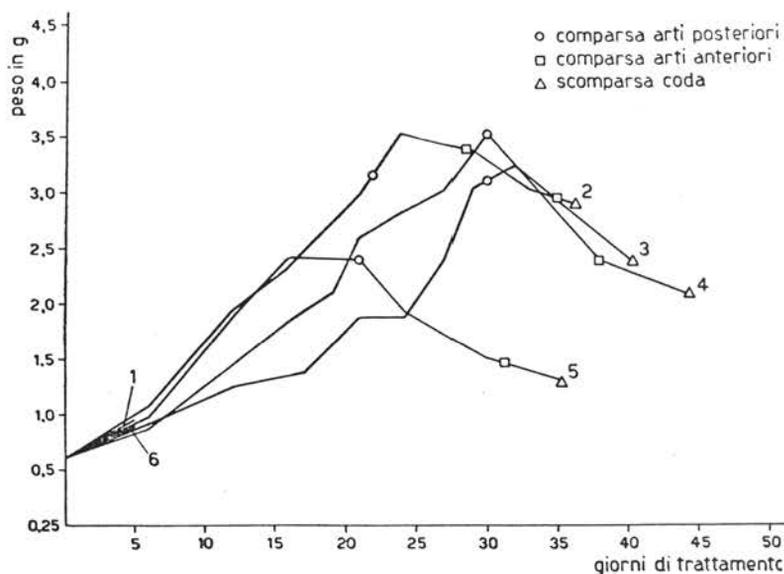


Fig. 2. - Curve di accrescimento con contrassegni della comparsa degli arti e della scomparsa della coda:

- 1) Cloramfenicolo dose g 1 pro die
- 2) Controllo
- 3) Diidrostreptomicina dose g 1 pro die
- 4) Penicillina dose g 1 pro die
- 5) Clorotetraciclina dose mg 200 pro die
- 6) Ossitetraciclina dose g 1 pro die

le dosi giornaliere di 200 mg di questo antibiotico che sin dalle prime prove di orientamento si era dimostrato tossico alle dosi di 500 mg.

Nelle curve ponderali dei girini sono posti contrassegni indicanti la comparsa degli arti posteriori, degli arti anteriori e la scomparsa della coda. I contrassegni sono stati posti in corrispondenza dei giorni nei quali le modificazioni morfologiche risultavano completate.

I dati relativi a tali fenomeni possono essere anche esaminati nella tabella e nelle fotografie dei girini fatte al 20° giorno di trattamento.

T A B E L L A

Gruppo	Trattamento	Dose mg	Arti posteriori a)	Parti anteriori b)		Scomparsa coda c)		Peso iniziale g	Peso massimo/gg.
				gg	b-a gg.	gg.	c-b gg.		
1	Controllo	—	22	30	8	40	10	0,550	g 3,250 in 26 gg
2	Penicillina Sodica	500	20	26	6	28	2	0,550	» 3,520 » 26 »
3	»	1000	30	38	8	44	6	0,550	» 2,962 » 30 »
4	Diidrostreptomina Solfato	500	18	26	8	35	9	0,550	» 4,800 » 23 »
5	»	1000	30	35	5	40	5	0,550	» 2,890 » 30 »
6	Cloramfenicolo	500	—	—	—	—	—	0,550	» 1,080 » 26 »
7	»	1000	—	—	—	—	—	0,550	—
8	Clorotetraciclina	500	—	—	—	—	—	0,550	—
9	»	200	21	31	10	36	5	0,550	» 2,450 » 46 »
10	Ossitetraciclina Cloruro	500	—	—	—	—	—	0,550	» 1,920 » 68 »
11	»	1000	—	—	—	—	—	0,550	—
12	Tetraciclina Cloruro	500	—	—	—	—	—	0,550	» 0,750 » 46 »
13	Eritromicina Stearato	500	—	—	—	—	—	0,550	» 2,570 » 30 »
14	Vitamina B ₁₂	4	19	24	5	27	3	0,550	» 3,550 » 19 »

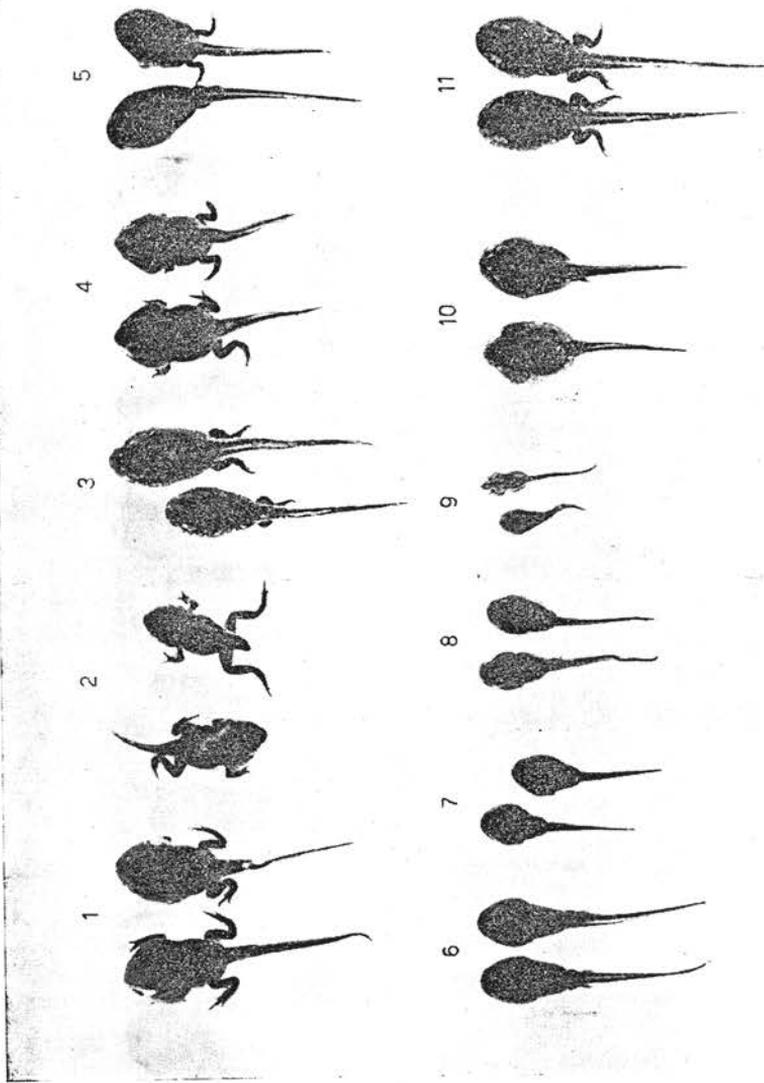


Fig. 3. - Stadio di sviluppo dei singoli gruppi al 20° giorno di trattamento:

- | | | | | | |
|-------------------------|----|------|------------------------------------|---|-----|
| 1) Controllo | | | 6) Cloromicetina | » | 500 |
| 2) Penicillina | mg | 500 | 7) Clorotetraciclina | » | 200 |
| 3) » | | 1000 | 8) Ossitetraciclina | » | 500 |
| 4) Dihydrostreptomicina | » | 500 | 9) Tetraciclina | » | 500 |
| 5) » | | 1000 | 10) Eritromicina | » | 500 |
| | | | 11) Vitamina B ₁₂ gamma | γ | |

Dal complesso dei dati riportati emergono i seguenti fatti:

a) Sia la Penicillina che la Diidrostreptomicina, somministrate ai girini alle dosi di 500 mg, hanno esercitato una azione favorente la crescita e accelerante la metamorfosi.

L'attività della Diidrostreptomicina è stata più evidente di quella della Penicillina ed anche della B₁₂ con la quale però la metamorfosi completa si è avuta in un tempo più breve (inizio 19^o - termine 27^o giorno).

Da notare come la metamorfosi inizi con la Diidrostreptomicina prima (18^o giorno) che con la Penicillina (20^o giorno) ma si completa più tardi (33^o giorno) (Fig. 3).

Alla dose di 1000 mg, con ambedue gli antibiotici, si è osservata una lieve inibizione dell'accrescimento corporeo e un ritardo della metamorfosi, che, peraltro, è avvenuta in modo completo.

b) Gli altri antibiotici, somministrati alle dosi di 500 mg, hanno esercitato, in generale, inibizione della crescita e assenza di metamorfosi, secondo il seguente ordine crescente di tossicità:

1) *Eritromicina* (assenza di metamorfosi, inibizione della crescita; morte al 33^o giorno);

2) *Cloramfenicolo* (assenza di metamorfosi, maggiore inibizione della crescita; morte al 40^o giorno);

3) *Tetraciclina* (inibizione totale della crescita e della metamorfosi; sopravvivenza sino al 51^o giorno);

4) *Terramicina* (assenza di metamorfosi, inibizione della crescita, ma più lunga sopravvivenza; morte al 51^o giorno);

c) L'Aureomicina si è dimostrata del tutto tossica alla dose di 500 mg avendo causato la morte dei girini al 3^o giorno di trattamento. Somministrata alla dose di 200 mg, (grafico n. 2), ha prodotto a conferma dei dati riportati in letteratura, una inibizione della crescita, che si è accompagnata con l'accelerazione della metamorfosi.

Roma — Istituto Superiore di Sanità - Laboratori di Biologia.

BIBLIOGRAFIA

- (1) TELKKA A. e MUSTAKALLIO K. K. - Ann. Med. exp. Biol. Fenn., 31: 91 (1952).
- (2) TELKKA A. e MUSTAKALLIO K. K. - Ann. Med. exp. Biol. Fenn., 32: 9 (1953).
- (3) SCANGA F. - Antibiotici in Medicina « Il Pensiero scientifico » Roma (1956).
- (4) SANFILIPPO G. Boll. Soc. ital. Biol. sper., 29: 1339 (1953).
- (5) CHIUINI F. - Boll. Soc. ital. Biol. sper., 28: 1178 (1952).

79. S. ANSELMI, L. BONIFORTI e R. MONACELLI. — **Analisi cromatografica delle sostanze grasse in fase di vapore. - Nota II. Tecnica di esecuzione e cromatogrammi di alcuni olii e grassi vegetali ed animali.** (*)

Riassunto. — Per mezzo della cromatografia in fase di vapore è stata identificata la natura degli acidi grassi che costituiscono diversi olii e grassi vegetali ed animali. Dopo la descrizione della tecnica impiegata, vengono confrontati i grafici ottenuti con olii di oliva di diversa provenienza sia fra di loro che con quelli di altri olii e grassi.

Summary. — The nature of the fatty acids which form different vegetable and animal oils and fats has been identified by means of gas chromatography. After the technique employed has been described, a comparison is made between the graphs obtained from olive oils from different sources and between these and the graphs of other oils and fats.

L'applicazione della cromatografia in fase di vapore all'identificazione ed all'eventuale dosaggio dei componenti di una miscela di acidi grassi o di una sostanza grassa, è stata, in questi ultimi anni, oggetto di studio da parte di molti sperimentatori. Così su tale argomento esiste un gran numero di lavori che R. PECSOK ⁽¹⁾ e E. BAYER ⁽²⁾ hanno raccolto e coordinato in due volumi da loro rispettivamente pubblicati, ed ai quali rimandiamo per ogni ricerca bibliografica.

Tutti gli Autori sono concordi nell'ammettere che il materiale da esaminare venga trasformato, per abbassare il peso molecolare e quindi il punto di ebollizione dei costituenti e per altre ragioni tecniche, nei rispettivi esteri metilici dei componenti acidi contenuti nel prodotto, di usare, come fase stazionaria di ripartizione, « Grassi al silicone » (Apiezon M ed L), per separare e, di conseguenza, identificare gli acidi grassi a seconda del numero di atomi di carbonio posseduto, e di adoperare la fase stazionaria a poliesteri degli acidi adipico o succinico con glicole etilenico, dietilenico e butilenico per mettere in evidenza la presenza di acidi grassi a stesso numero di atomi di carbonio a catena satura ed a catena insatura. In pratica, non conoscendosi la composizione del

(*) Questo lavoro è stato già pubblicato in « Olearia » 14: 47 (1960).

prodotto in esame, viene generalmente usata quest'ultima fase stazionaria, la quale permette di eseguire contemporaneamente ambedue le separazioni e quindi la completa identificazione dei vari componenti.

Della vasta bibliografia esistente sull'argomento, la maggior parte è dedicata alla separazione ed identificazione dei componenti di miscele di acidi grassi, delle quali, molte volte, per stabilire le condizioni di lavoro, si conosceva in precedenza la composizione perchè preparata a tale scopo.

Pochi sono, invece, i lavori dedicati dagli Autori allo studio delle sostanze naturali, benchè, come riporta P. CHOVIN⁽³⁾, A. T. JAMES e A. J. P. MARTIN⁽⁴⁾, che possono essere considerati come i primi sperimentatori che applicarono la cromatografia in fase di vapore allo studio delle sostanze grasse, esponendo esperienze eseguite su sostanze grasse naturali come il grasso del latte di capra e l'olio di oliva.

Recentemente R. N. CRAIG e N. L. MURTY⁽⁵⁾ hanno riferito le esperienze eseguite con questo moderno metodo di indagine per stabilire la composizione dell'olio di arachide, di oliva, di grano, di girasole, di soia e di lino. Poichè alcuni degli olii presi in considerazione contengono acidi a stesso numero di atomi di carbonio, ma a catena sia natura sia insatura, gli AA. hanno usato per separarli fasi stazionarie a base di poliesteri dell'acido succinico e dell'acido adipico confrontandone la efficacia a tale scopo. Essi, così, sono riusciti a separare completamente l'uno dall'altro gli acidi a diciotto atomi di carbonio e cioè lo stearico, l'oleico, il linoleico, il linolenico. Gli stessi Autori hanno messo in evidenza come vi sia corrispondenza fra i dati ottenuti con la cromatografia in fase di vapore e quelli del numero di iodio ottenuti per via umida con il metodo di Vijs, e l'esame spettrofotometrico per quanto riguarda la presenza di dieni e di trieni.

La possibilità di potere conoscere con relativa facilità e con molta precisione la composizione di un prodotto naturale ci ha spinti a sottoporre all'esame cromatografico in fase di vapore parecchi prodotti naturali puri, i cui grafici sono stati raccolti allo scopo di ottenere dei termini di paragone con i quali confrontare i grafici ottenuti dai prodotti commerciali. La presenza nei grafici ottenuti da quest'ultimi di uno o più acidi non inclusi nei rispettivi grafici dei prodotti puri viene a denotare che la sostanza in esame ha subito una aggiunta di altre sostanze. In questo modo si ritiene che venga ad essere soddisfatta la condizione « che la sofisticazione di un olio di oliva (ora si può generalizzare e dire di una sostanza grassa) viene ad essere svelata con l'identificazione di un elemento estraneo alla composizione del prodotto genuino » posta in un precedente studio⁽⁶⁾.

Abbiamo, pertanto, preso in esame i seguenti campioni sulla cui genuinità siamo perfettamente certi in quanto preparati in laboratorio. ad eccezione di quello di semi di the, partendo da olive, semi e da grassi greggi consegnatici direttamente dal mattatoio:

Olio di oliva vergine toscano, ligure, spagnolo e tunisino, olio di oliva rettificato B, olio di lino, olio di the, olio di arachide, olio di colza, olio di soia, olio di vinaccioli, olio di cocco, olio di palmisto, olio di palma e grasso di cavallo.

Per potere, con precisione, individuare i vari acidi abbiamo sottoposto ad esame, nelle stesse condizioni di esperienza, una miscela di esteri metilici ottenuti da acidi grassi puri acquistati dal commercio. Per l'identificazione degli acidi a catena insatura ci siamo serviti degli esteri metilici ottenuti, per interesterificazione, dall'olio di lino.

L'applicazione di questo metodo per svelare le frodi è condivisa da G. e J. WOLFF i quali, in un recentissimo lavoro, di cui abbiamo avuto notizia quando le esperienze che riferiamo erano ultimate, studiano la composizione del burro, dell'olio di cocco e dell'olio di palmisto arrivando a stabilire la presenza, anche in piccole quantità, di questi due ultimi olii nel burro.

Per mettere tutti gli sperimentatori in condizione di potere ripetere le esperienze che riferiamo, descriviamo in ogni particolare, come già fatto nella nota precedente sull'identificazione della presenza di glicole etilenico e di esteri metilici nelle sostanze grasse (⁸), la tecnica seguita e le condizioni di sperimentazione.

PREPARAZIONE DEGLI ESTERI METILICI.

1) Per olii e grassi con acidità, espressa in acido oleico, non superiore al 5%.

In questo caso si ricorre all'interesterificazione con alcool metilico (⁹) operando come segue:

In un palloncino della capacità di circa cm^3 100 si pesano g 2 circa dell'olio o del grasso, previamente filtrati, si aggiungono cm^3 35 di alcool metilico e si fa bollire, per alcuni minuti, con refrigerante a ricadere munito all'estremità di un tubicino riempito con calce sodata. Quindi si allontana la fiamma e si versano rapidamente nel palloncino cm^3 3,5 di una soluzione all'1% di metilato sodico in alcool metilico anidro. Questa soluzione si ottiene sciogliendo la quantità stechiometrica di sodio metallico in alcool metilico reso anidro per trattamento con magnesio e iodio e successiva distillazione (¹⁰). Si collega di nuovo il palloncino al

refrigerante a ricadere e si fa bollire, sempre su piccola fiamma, per circa 4 ore. Si noterà che nel corso dei primi 10-15 minuti di ebollizione, dopo l'aggiunta di metilato, l'olio si discioglie nell'alcool e la soluzione diviene omogenea.

Quindi si interrompe il riscaldamento e, dopo raffreddamento, si versa la soluzione metilica in imbuto separatore da cm^3 250 circa, si aggiungono cm^3 35-40 di etere etilico, cm^3 100 di acqua ed alcuni cm^3 di una soluzione acquosa di NaCl satura. Si agita e si lascia quindi in riposo fino a che le due fasi, l'acquosa e l'eterea, si siano perfettamente separate. La fase acquosa si trasferisce in un secondo imbuto separatore e si estrae di nuovo con cm^3 25 di etere etilico. Si elimina la fase acquosa, si riuniscono gli estratti eteri, quindi si aggiungono cm^3 50 di etere di petrolio che provocano la separazione di una discreta quantità di acqua, la quale si elimina. Il liquido etero si lava, quindi, per tre volte con cm^3 10-15 di acqua, si disidrata con alcuni grammi di solfato sodico anidro, si filtra su cotone e si raccoglie in un palloncino. Si distilla il solvente su bagnomaria bollente; le ultime tracce di solvente si eliminano con una leggera corrente di aria. Si deve notare, però, che nel caso del burro, margarina ed altri grassi simili si hanno notevoli perdite degli esteri metilici degli acidi inferiori (butirrico, isovalerianico, capronico) sia a causa della loro elevata volatilità, sia a causa della loro solubilità in acqua e pertanto il metodo descritto non può applicarsi per un dosaggio quantitativo di questi acidi. Su questo argomento abbiamo già raccolto del materiale sperimentale che riferiremo in una prossima nota.

2) Per olii e grassi con acidità, espressa in acido oleico, superiore al 5% e per acidi grassi puri.

In questi casi si preparano gli esteri metilici, direttamente se trattasi di acidi grassi puri, oppure estraendo gli acidi grassi dall'olio o dal grasso in esame con il metodo normale ed esterificandoli quindi con alcool metilico come segue:

g 2 circa degli acidi grassi si pongono in un palloncino da cm^3 100, vi si aggiungono cm^3 25 di alcool metilico contenente il 4% in peso di acido solforico concentrato ($d=1,84$) e si fa bollire a ricadere per circa 8 ore su piccola fiamma.

L'estrazione degli esteri metilici si esegue, quindi, come è già stato descritto nel caso della interesterificazione, avendo cura di lavare la soluzione etera finale ripetutamente con acqua per eliminare completamente ogni traccia di acido solforico.

CONDIZIONI SPERIMENTALI.

Colonna cromatografica di rame, diametro mm 4, lunghezza m 2 riempita con Celite G 22 al 23% di poliestere dell'acido succinico con glicole etilenico da noi preparato secondo CRAIG (5).

Temperatura della colonna: 200°C; temperatura dell'evaporatore: 300°C.

Gas di trasporto: elio, flusso 2,5 l/h.

Quantità di sostanza impiegata: 2-4 µl.

I singoli grafici sono stati ottenuti mantenendo invariata la sensibilità del registratore dall'inizio alla fine, per avere un rapporto reale fra le quantità dei vari acidi presenti.

E' facile ricavare dall'area dei picchi le percentuali dei singoli acidi, percentuali che, come si può facilmente verificare, rientrano nei limiti riportati dai testi classici. Nel calcolo di esse bisogna tener presente che, dato il tipo di rilevatore impiegato, il quale misura la quantità di CO₂ proveniente dalla combustione della sostanza all'uscita della colonna, il valore dell'area deve essere moltiplicato per un fattore di correzione, calcolato in base al numero di atomi di carbonio presente nella molecola dell'estere metilico di ciascun acido grasso e da noi, per comodità, riferito al valore dello stearato di metile posto uguale all'unità.

I fattori di correzione dei vari esteri metilici sono riportati nella Tabella 1. Le differenze fra gli esteri di acidi saturi e non saturi con uguale

TAB. 1. - FATTORI DI CORREZIONE PER I QUALI DEVONO MOLTIPLICARSI I VALORI DELLE AREE DEGLI ESTERI METILICI DEGLI ACIDI GRASSI

Caprilato di metile	f.c.	1,11913
Caprato di metile	»	1,07796
Laurato di metile	»	1,04947
Miristato di metile	»	1,02837
Palmitato di metile	»	1,01262
Stearato di metile	»	1,00000
Arachidato di metile	»	0,98978
Behenato di metile	»	0,98134

numero di atomi di carbonio possono essere trascurate ed, in prima approssimazione, possono essere anche trascurate le differenze fra gli acidi aventi un numero di atomi di C molto vicino.

Per avere un termine di confronto per stabilire di quali acidi sono composti i gliceridi che costituiscono gli olii ed i grassi commestibili, abbiamo ritenuto opportuno riportare per primo il grafico ottenuto dagli esteri metilici derivati dagli acidi grassi saturi che più comunemente entrano nella composizione di tali prodotti. Così, furono mescolate insieme uguali quantità degli acidi laurico, miristico, palmitico, stearico e behenico, acquistati dal commercio e dichiarati chimicamente puri dalle varie case produttrici. Con questa miscela, previa esterificazione, si è ottenuto il grafico riportato nella Fig. 1. Esso ha messo in rilievo piccole quantità degli acidi caprico ed arachico, che non erano stati introdotti nella miscela primitiva, ma, come si è potuto constatare dai grafici, singolarmente ottenuti, dei vari acidi, erano contenuti come impurezze rispettivamente nell'acido laurico e behenico.

Il grafico di paragone per l'identificazione degli acidi a catena insatura, presenti in un prodotto unitamente a quelli a catena satura con lo

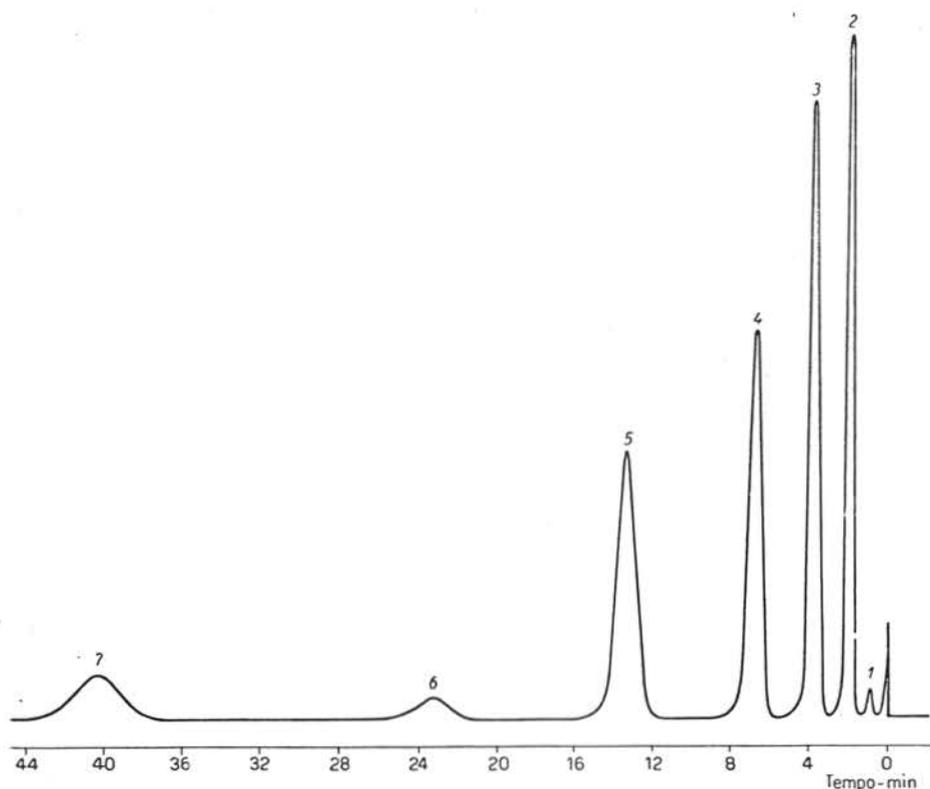


Fig. 1. - Serie di acidi grassi saturi: 1) ac. caprico; 2) ac. laurico; 3) ac. miristico; 4) ac. palmitico; 5) ac. stearico; 6) ac. arachico; 7) ac. behenico.

stesso numero di atomi di carbonio, è stato potuto realizzare, non avendo dal commercio i vari acidi, interesterificando l'olio di lino, che contiene questi acidi in ragguardevole quantità. La loro presenza è confermata dal grafico della Fig. 2, dal quale si rileva la netta separazione fra l'acido palmitico ed il palmitoleico e fra l'acido stearico e gli acidi oleico, linoleico e linolenico.

Dalla terza alla nona figura abbiamo raggruppato i grafici dell'olio di oliva vergine di pressione, quelli di alcuni olii ad esso simili, che ave-

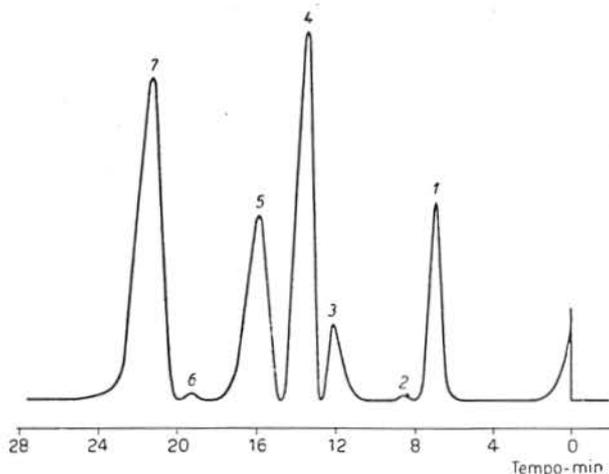


Fig. 2. - Olio di lino: 1) ac. palmitico; 2) ac. palmitoleico; 3) ac. stearico; 4) ac. oleico; 5) ac. linoleico; 6) ac. arachico; 7) ac. linolenico.

vamo a disposizione, e quello di un olio di oliva rettificato « B » del commercio, la cui Ditta produttrice ci assicurò provenire da solo olio estratto con solvente dalla sansa di oliva.

Dal confronto del grafico del campione di olio di oliva vergine di pressione della regione toscana (Fig. 3) con quello del campione corrispondente della regione ligure (Fig. 4) si rileva che quest'ultimo contiene una maggiore quantità di acido linoleico e che una lieve differenza esiste anche per quanto riguarda l'acido linolenico, presente però in ambedue i campioni in minime quantità.

Da queste piccole diversità di composizione che abbiamo rilevato dai grafici di altri numerosi campioni di olio di oliva di pressione di varie regioni italiane, qui non riportati, possono derivare le leggere variazioni che si riscontrano, fra i prodotti di una regione e quelli di un'altra, nel valore dei vari indici analitici.

Il grafico ottenuto da un campione, sicuramente genuino, di olio di oliva vergine proveniente dalla Spagna (Fig. 5) è identico a quello di un campione, anch'esso sicuramente genuino, di olio di oliva di pressione proveniente dalla Tunisia (Fig. 6). Infatti, salvo una leggerissima diffe-

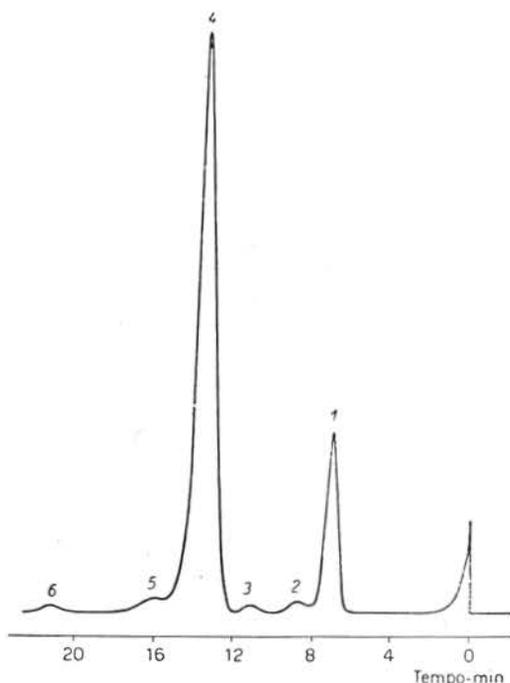


Fig. 3. - Olio di oliva (Regione Toscana): 1) ac. palmitico; 2) ac. palmitoleico; 3) ac. stearico; 4) ac. oleico; 5) ac. linoleico; 6) ac. linolenico.

renza nel contenuto in acido linoleico, ambedue i campioni contengono tracce di acidi inferiori e di un acido che si rivela fra l'acido palmitoleico e l'acido stearico, che, data la trascurabile quantità, non abbiamo creduto opportuno identificare. Inoltre contengono dell'acido arachidonico. Quest'ultimo e le tracce dei ricordati acidi non sono stati riscontrati nei campioni di olio italiano presi in considerazione. Forse da questa differenza deriva il valore maggiore di alcuni indici analitici presentato dagli olii di tale provenienza rispetto a quelli italiani. Altra ipotesi che può essere avanzata è quella che alla presenza di acido arachidonico sia dovuta la precipitazione che spesso si osserva nel saggio di Bellier alla temperatura di 16-19°C con olii di tale provenienza.

Il grafico dell'olio di oliva « rettificato B » (Fig. 7) è identico a quello ottenuto dall'olio vergine di pressione tunisino, discostandosi così da quelli dell'olio di oliva di pressione delle regioni italiane prese in considerazione.

Dai grafici ottenuti si deduce che la composizione qualitativa del-

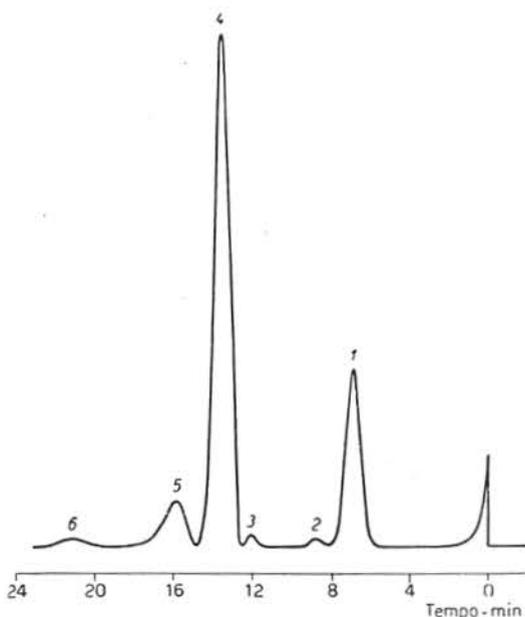


Fig. 4. - Olio di oliva (Regione Liguria): 1) ac. palmitico; 2) ac. palmitoleico; 3) ac. stearico; 4) ac. oleico; 5) ac. linoleico; 6) ac. linolenico.

l'olio di oliva corrisponde a quella che G. e J. P. WOLFF⁽¹¹⁾, T. P. HILDRICH⁽¹²⁾ ed E. W. ECKEY⁽¹⁾ hanno riportato nei loro trattati. Infatti tutti i suddetti Autori ammettono che l'olio di oliva è composto dai gliceridi degli acidi miristico, palmitico, palmitoleico, stearico, oleico, linoleico, arachico.

Il grafico ottenuto dall'olio di the (Fig. 8) si presenta, salvo tracce appena percettibili di acidi grassi inferiori, del tutto simile a quello dell'olio di oliva di pressione della regione ligure. Questa constatazione spiega la quasi identità dei valori delle varie costanti chimiche e fisiche possedute dalle due specie di olio e, di conseguenza, la pratica impossibilità di distinguerli l'uno dall'altro attraverso la loro valutazione. Per-

tanto l'identificazione dell'olio di the nell'olio di oliva vergine di pressione viene affidata alle reazioni cromatiche.

I succitati Autori (¹¹, ¹², ¹³) ammettono per l'olio di the la seguente composizione qualitativa corrispondente a quella che può dedursi dal

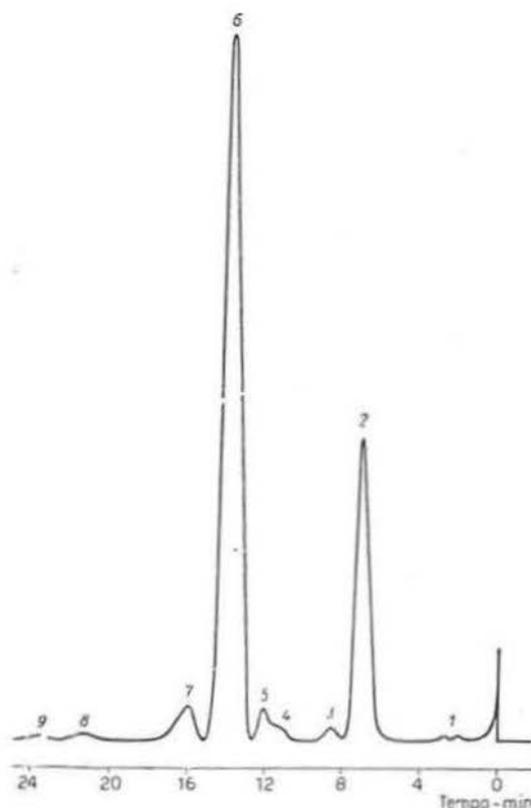


Fig. 5. - Olio di oliva (Spagna): 1) ac. inferiori non identificati; 2) ac. palmitico; 3) ac. palmitoleico; 4) ac. non identificato; 5) ac. stearico; 6) ac. oleico; 7) ac. linoleico; 8) ac. linolenico; 9) ac. arachidonico.

grafico ottenuto: gliceridi degli acidi miristico (occasionalmente), palmitico, stearico, oleico, linoleico, arachico.

Il grafico dell'olio di arachide (Fig. 9) si differenzia da quelli dei campioni di olio di oliva presi in considerazione e da quello dell'olio di the per maggior contenuto di acido stearico e linoleico e per la presenza di sensibili quantità degli acidi arachico, arachidonico e behenico. Si ritiene che, se le condizioni di esperienza lo avessero permesso, il grafico

avrebbe messo in evidenza la presenza di acido lignocerico, il cui gliceride entra, come è stato constatato da parecchi Autori (¹¹, ¹², ¹³), nella composizione dell'olio di arachide. Infatti detti Autori lo riportano nella composizione da loro data dell'olio di arachide: gliceridi degli acidi miristico, palmitoleico, stearico, oleico, linoleico, arachico, behenico e

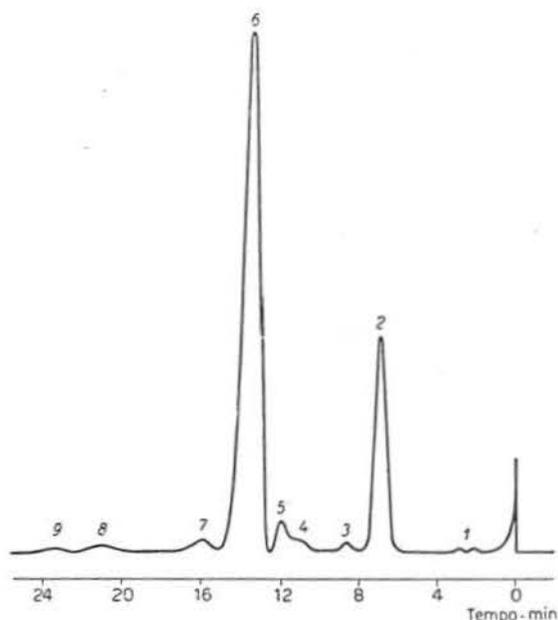


Fig. 6. - Olio di oliva (Tunisi): 1) ac. inferiori non identificati; 2) ac. palmitico; 3) ac. palmitoleico; 4) ac. non identificato; 5) ac. stearico; 6) ac. oleico; 7) ac. linoleico; 8) ac. linolenico; 9) ac. arachidonico.

lignocerico, composizione che coincide, salvo per l'ultimo, con quella indicata dal grafico. Al contenuto di questi acidi grassi si deve la possibilità del riconoscimento dell'olio di arachide quando viene aggiunto, anche in piccole quantità, ad altri olii.

Molto dissimili da quelli fino ad ora descritti appaiono i grafici di campioni di olii ad alto numero di iodio ed a basso numero di iodio. Per il primo gruppo sono stati presi in considerazione l'olio di colza (Fig. 10), l'olio di vinaccioli (Fig. 11) e l'olio di soia (Fig. 12); per il secondo gruppo l'olio di cocco (Fig. 13), l'olio di palmisto (Fig. 14) e l'olio di palma (Fig. 15).

La diversità dei caratteri chimici e fisici esistente fra i due gruppi

di prodotti viene messa in rilievo, in modo molto evidente, dai grafici, i quali si presentano molto differenti da quelli ottenuti con i campioni di olio di oliva e di olii appartenenti alla stessa categoria.

Un'eventuale aggiunta degli olii presi in considerazione a quest'ultimo gruppo di olii può, così, essere facilmente svelato. Infatti si note-

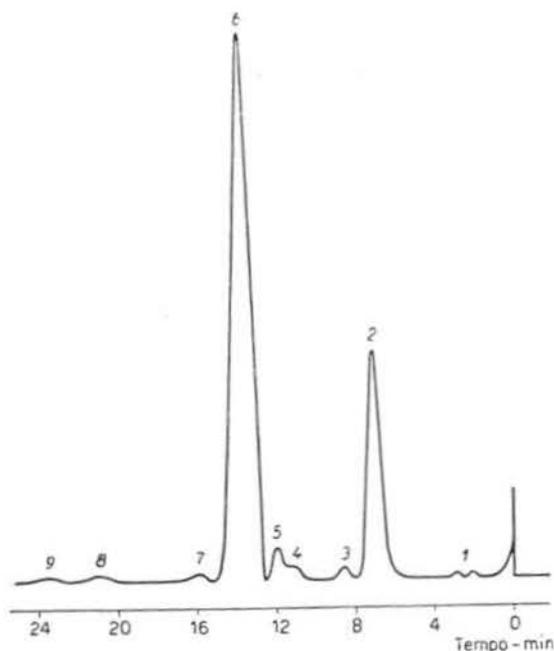


Fig. 7. - Olio di oliva Rettificato B (del commercio): 1) ac. inferiori non identificati; 2) ac. palmitico; 3) ac. palmitoleico; 4) ac. non identificato; 5) ac. stearico; 6) ac. oleico; 7) ac. linoleico; 8) ac. linolenico; 9) ac. arachidonico.

rebbe la presenza di acidi grassi che non entrano nella loro costituzione e l'aumentata quantità di alcuni dei loro componenti. D'altra parte, qualora non si tratti di una aggiunta accuratamente compensata, l'adulterazione può essere anche messa in evidenza dalle alterazioni che subiscono le varie costanti chimiche.

Nel dettaglio l'olio di soia (Fig. 12) e l'olio di vinaccioli (Fig. 11), i quali hanno dimostrato avere una identica composizione qualitativa, apportano un aumento dell'acido linoleico e la presenza di acido linolenico e ciò si verifica anche con l'olio di colza (Fig. 10), il quale, a sua volta, v'introduce anche l'acido erucico che entra nella sua composizio-

ne; gli olii di cocco (Fig. 13) e l'olio di palmisto (Fig. 14), invece, v'introducono acidi grassi a basso numero di atomi di carbonio come l'acido caprilico, l'acido caprico, l'acido laurico che non rientrano nella composizione degli olii appartenenti al gruppo di quelli di oliva. L'olio di

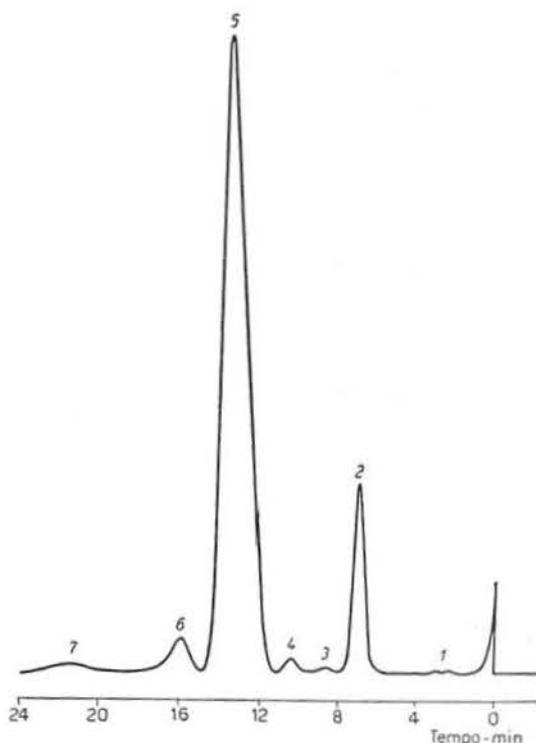


Fig. 8. - Olio di the: 1) ac. inferiori non identificati; 2) ac. palmitico; 3) ac. palmitoleico; 4) ac. stearico; 5) ac. oleico; 6) ac. linoleico; 7) ac. linolenico.

palma, infine (Fig. 15), come prevedibile, aumenta fortemente la quantità di acido palmitico.

Anche per questo gruppo di olii presi in esame, la composizione qualitativa rilevata dai grafici ottenuti risulta concordante con quella riportata dai citati Autori (11, 12, 13).

Le figure 16, 17, 18 rappresentano i grafici della composizione dell'olio di cavallo. Dato l'interesse suscitato in questi ultimi tempi da questo grasso l'abbiamo voluto esaminare sia così come l'abbiamo ottenuto estraendolo a caldo, in presenza o meno di acido solforico, dai tessuti

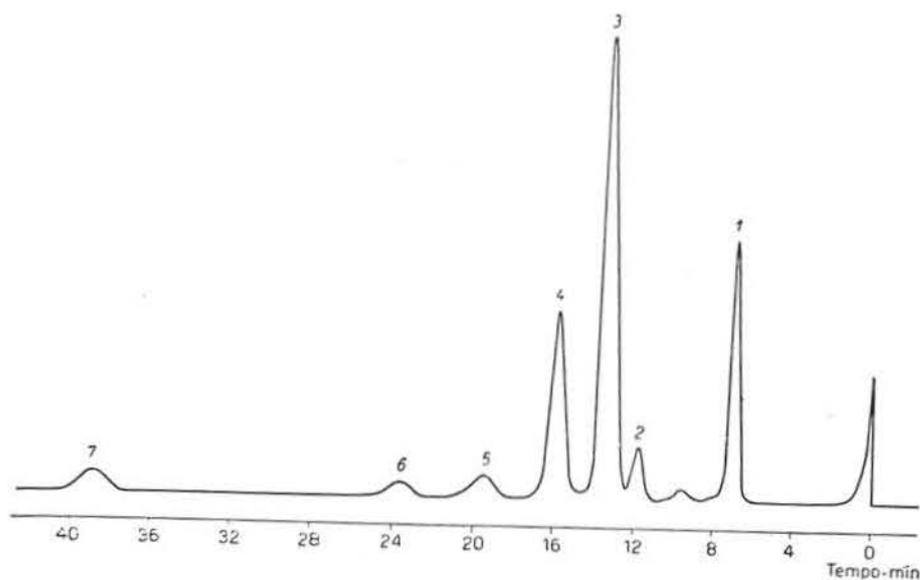


Fig. 9. - Olio di arachide: 1) ac. palmitico; 2) ac. stearico; 3) ac. oleico; 4) ac. linoleico; 5) ac. arachico; 6) ac. arachidonico; 7) ac. behenico.

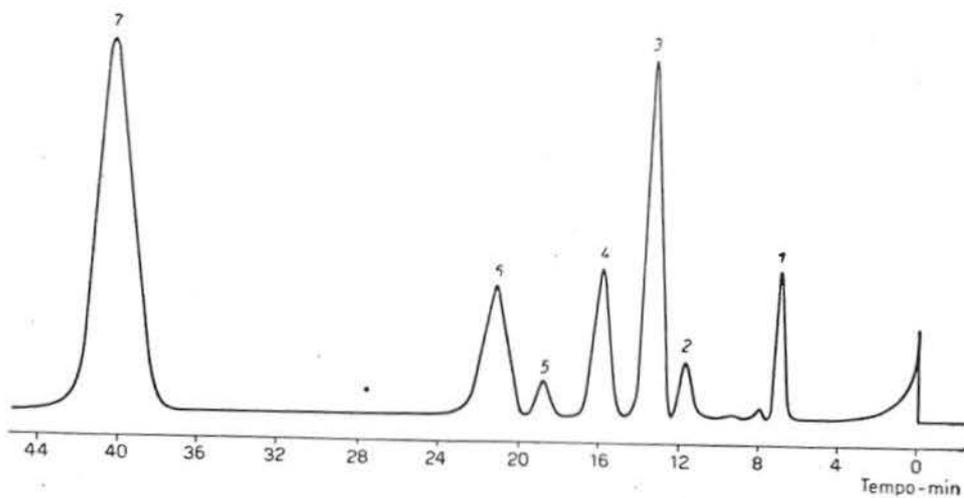


Fig. 10. - Olio di colza: 1) ac. palmitico; 2) ac. stearico; 3) ac. oleico; 4) ac. linoleico; 5) ac. arachico; 6) ac. linolenico; 7) ac. erucico.

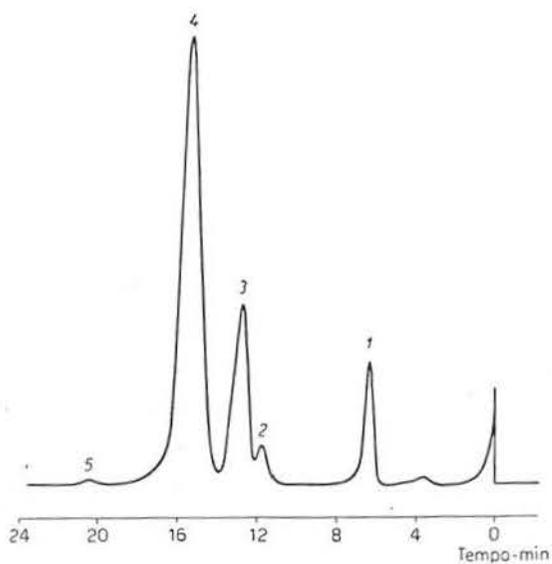


Fig. 11. - Olio di vinaccioli: 1) ac. palmitico; 2) ac. stearico; 3) ac. oleico; 4) ac. linoleico; 5) ac. linolenico.

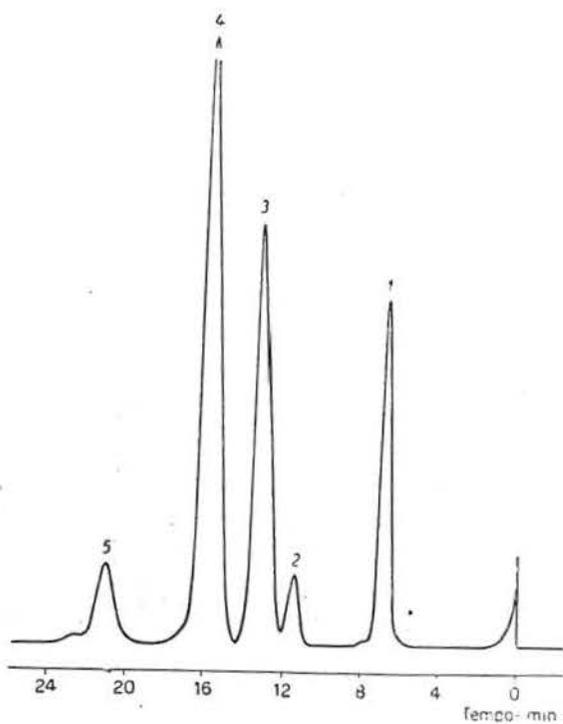


Fig. 12. - Olio di soia: 1) ac. palmitico; 2) ac. stearico; 3) ac. oleico; 4) ac. linoleico; 5) ac. linolenico.

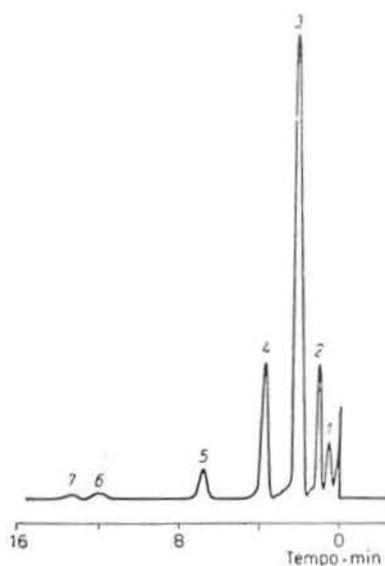


Fig. 13. - Olio di cocco: 1) ac. caprilico; 2) ac. caprico; 3) ac. laurico; 4) ac. miristico; 5) ac. palmitico; 6) ac. stearico; 7) ac. oleico.

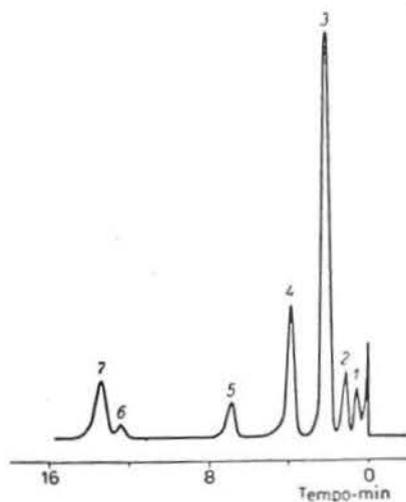


Fig. 14. - Olio di palmisto: 1) ac. caprilico; 2) ac. caprico; 3) ac. laurico; 4) ac. miristico; 5) ac. palmitico; 6) ac. stearico; 7) ac. oleico.

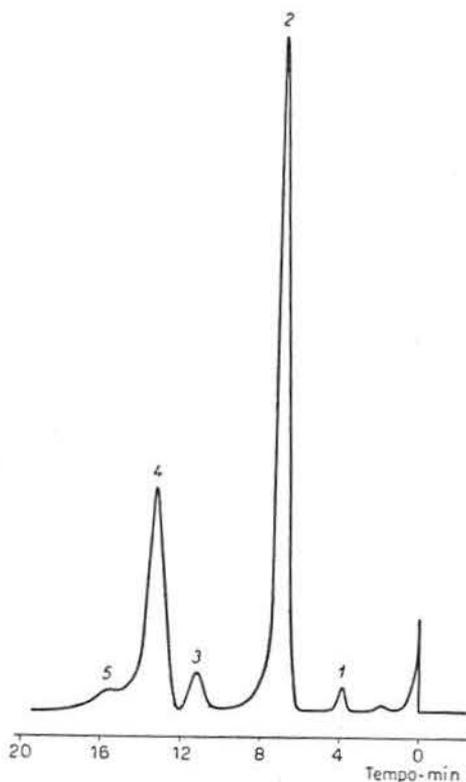


Fig. 15. - Olio di palma: 1) ac. miristico; 2) ac. palmitico; 3) ac. stearico; 4) ac. oleico; 5) ac. linoleico.

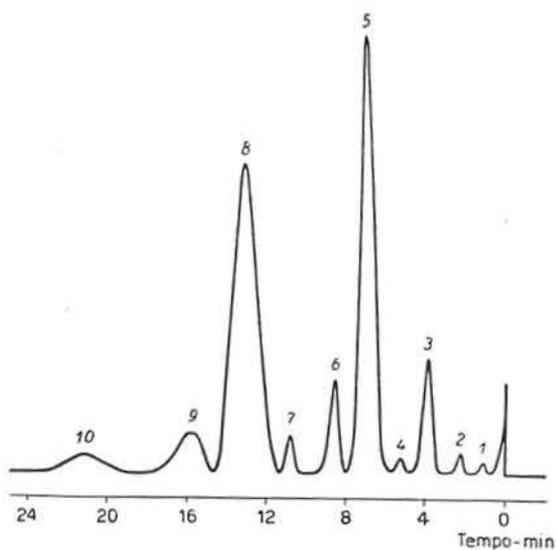


Fig. 16. - Olio di cavallo (non filtrato): 1) ac. caprico; 2) ac. laurico; 3) ac. miristico; 4) ac. miristoleico; 5) ac. palmitico; 6) ac. palmitoleico; 7) ac. stearico; 8) ac. oleico; 9) ac. linoleico; 10) ac. linolenico.

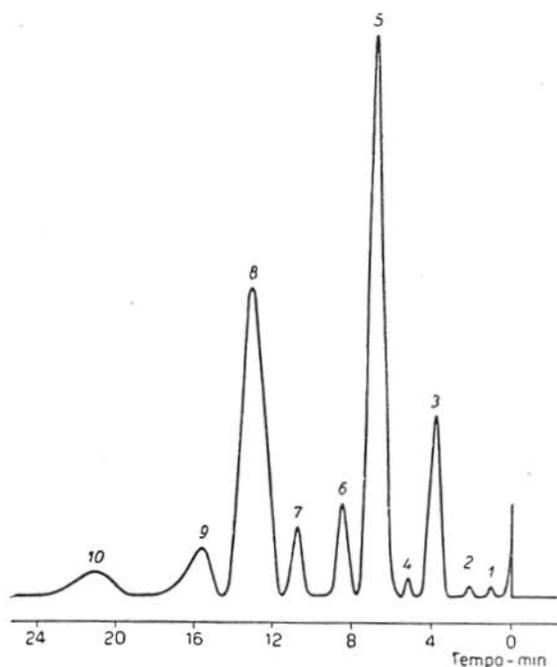


Fig. 17. - Olio di cavallo, filtrato a 22 C., frazione solida: 1) ac. caprico; 2) ac. laurico; 3) ac. miristico; 4) ac. miristoleico; 5) ac. palmitico; 6) ac. palmitoleico; 7) ac. stearico; 8) ac. oleico; 9) ac. linoleico; 10) ac. linolenico.

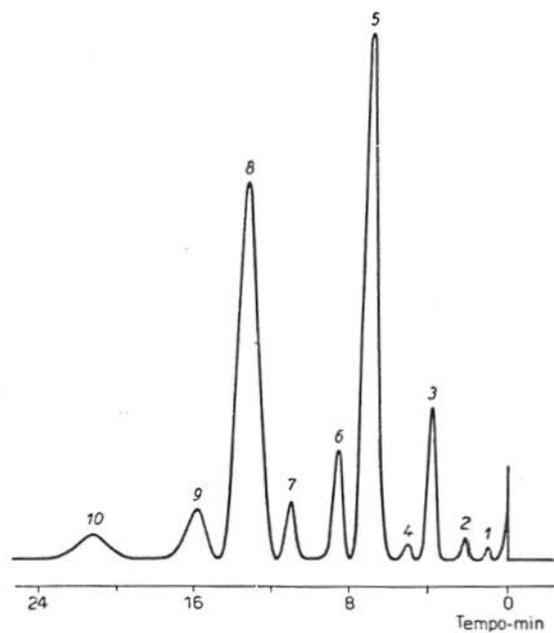


Fig. 18. - Olio di cavallo, filtrato a 22 C., frazione liquida: 1) ac. caprico; 2) ac. laurico; 3) ac. miristico; 4) ac. miristoleico; 5) ac. palmitico; 6) ac. palmitoleico; 7) ac. stearico; 8) ac. oleico; 9) ac. linoleico; 10) ac. linolenico.

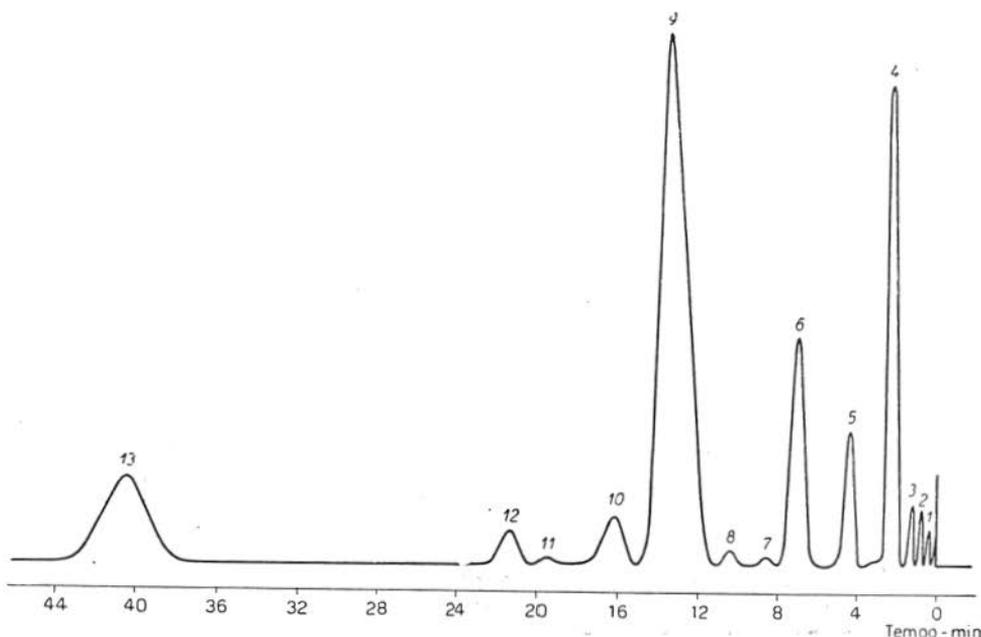


Fig. 19. - Miscela di olio di oliva, cocco, colza (Indici analitici normali): 1) ac. capronico; 2) ac. caprilico; 3) ac. caprico; 4) ac. laurico; 5) ac. miristico; 6) ac. palmitico; 7) ac. palmitoleico; 8) ac. stearico; 9) ac. oleico; 10) ac. linoleico; 11) ac. arachico; 12) ac. linolenico; 13) ac. erucico.

adiposi, sia separandolo, alla temperatura ambiente (22°C), in parte solida ed in parte liquida.

Dall'esame dei tre grafici ottenuti si rileva che il grasso intero e le due parti componenti presentano la stessa composizione qualitativa, mentre dal punto di vista quantitativo la parte solida si differenzia da quella liquida per un maggior contenuto di acidi palmitico e stearico. Tutto questo è stato confermato dai risultati ottenuti dalla determinazione di alcuni indici analitici. I valori ottenuti furono rispettivamente i seguenti:

	TALE (1)	QUALE (2)	Parte fluida	Parte solida
Grado rifr. 33°C	54°,7	55°,2	57°,5	
Grado rifr. 40°C				52°
Numero iodio	72,5	72,7	78,4	64,3
Numero sapon.	201,9	202,4	201,9	197,1
Grado termosol.	44°,2	48°	47°	41°

(1) Estratto direttamente a caldo.

(2) Estratto a caldo con acido solforico diluito.

Molto probabilmente l'identità di composizione qualitativa è dovuta all'aver eseguito la separazione ad una temperatura piuttosto alta. L'esame dei grafici, però, ha messo in evidenza che nella composizione entrano degli acidi che non abbiamo riscontrato negli olii vegetali a basso numero di iodio che abbiamo preso in esame e cioè acido miristoleico, palmitoleico e linolenico, alla cui presenza si ritiene debba essere attribuito il maggior valore del numero di iodio.

Per ultimo (Fig. 19) abbiamo riportato il grafico di un olio da noi preparato e risultante da una miscela compensata di olio di oliva, di colza e di cocco. I dati analitici rientrano in quelli medi che normalmente si riscontrano nei campioni di olio di oliva che si possono avere dal commercio.

Grado rifrattometrico a 25°C	64°
Indice termosolforico	48°
Numero di iodio (Hanus)	82,15
Numero di saponificazione	193,2

L'esame cromatografico in fase di vapore ha messo in evidenza la composizione del prodotto che per la presenza degli acidi caprilico, laurico, miristico, arachico, linolenico, erucico, si discosta molto da quella presentata da un olio di oliva anche se si tratta di olio estratto dalle sanse di oliva con solventi e quindi raffinato.

* * *

In questa memoria abbiamo ritenuto opportuno riportare la composizione qualitativa di alcuni olii di oliva di varie provenienze e di un gruppo di olii che ci sono sembrati interessanti perchè comunemente usati per sofisticare l'olio di oliva.

E' nostra intenzione di riportare in una prossima nota i grafici di altri campioni di olio di oliva di provenienza italiana ed estera, grafici che abbiamo già eseguito. Inoltre utilizzando sia i grafici di questa nota sia quelli che saranno raccolti, ricostruiremo la composizione quantitativa di ciascun prodotto con lo scopo di indagare se è possibile stabilire un eventuale costante rapporto fra i vari componenti.

BIBLIOGRAFIA

- (1) PECSOK R. - Principles and practice of gas chromatography, J. Wiley & Sons, New York (1939).
 - (2) BAYER E. - Gaschromatographie, Springer-Verlag, Berlin (1959) pag. 71 e segg.
 - (3) CHOVIN P. - Ann. Fals. Fraud., 51: 233 (1958).
 - (4) JAMES A. T., MARTIN A. J. P. - Analyst, 77: 915 (1952).
 - (5) CRAIG B. M., MURTY N. L. - J. am. Oil chem. Soc., 36: 349 (1959).
 - (6) ANSEMI S. - Olii min., Grassi e sap., Colori e vern., 36: 212 (1959).
 - (7) WOLFF G., WOLFF J. P. - Rev. franç. Corps gras, 7: 73 (1960).
 - (8) ANSEMI S., BONIFORTI L., MONACELLI R. - Boll. Lab. chim. prov., 40: 335 (1959).
 - (9) SÖRENSEN I. - Acta chem. Scand., 12: 814 (1958).
 - (10) LUND H., BJERRUM J. - Ber., 64: 210 (1931).
 - (11) WOLFF G., WOLFF J. P. - Méthodes d'analyse et de contrôle industriel des matières grasses, Dunod, Paris (1953).
 - (12) HILDITCH T. P. - The chemical Constitution of natural Fats, Chapman & Hall, London (1947).
 - (13) ECKEY E. W. - Vegetable Fats and Oils, Reinhold Pub. Co., New York (1954).
-