

**Separazione dello stronzio radioattivo dal latte  
mediante resine a scambio ionico**

GIOVANNI PORCELLI (\*)

*Laboratori di Chimica biologica*

**Riassunto** — E' stato sperimentato un nuovo metodo per determinare lo  $Sr^{89}$  e  $Sr^{90}$  nel latte con l'uso delle resine Dowex  $50 \times 8$ . L'interesse fondamentale di questo lavoro è nella rapida separazione dello stronzio radioattivo dagli altri ioni presenti nel latte mediante ammonio-citrato e nella rapida scomplezione dello Sr-citrato ammonico risultante con  $Na_2CO_3$  e NaOH.

E' stato inoltre dimostrata l'utilità di determinare lo ione Sr mediante fotometria a fiamma per il calcolo della resa chimica alla via ponderale, riducendo così la durata e l'errore delle analisi.

**Summary.** — A new method for determining  $Sr^{89}$  and  $Sr^{90}$  in milk by means of Dowex  $50 \times 8$  resins has been tested. The most interesting feature of this experiment consists in the rapid separation, by means of ammonium citrate, of radioactive strontium from other ions present in milk, and in the rapid decomposition of resulting strontium-ammonium citrate with  $Na_2CO_3$  and NaOH.

It was also demonstrated that flame photometry determination of Sr ions is suitable for calculating the chemical yield in comparison with the gravimetric method, considerably reducing test duration as well as error possibilities.

---

L'utilizzazione delle resine a scambio ionico per la determinazione dello  $Sr^{89}$  e  $Sr^{90}$  nel latte ha portato un decisivo miglioramento dei metodi precedentemente impiegati.

MILTON G. M. e GRUMMIT W. E. (1) hanno mostrato che la separazione dello Sr dai cationi del latte fissati su resina può essere fatta con HCl, con lattato ammonico oppure, meglio, con citrato ammonico, il quale

---

(\*) Borsista dei Laboratori di Chimica biologica.

forma un complesso con il Ca ed il Mg stabile a pH 4,25 ed a pH 5,05 con lo Sr rendendo così possibile l'eluizione dei soli Ca e Mg, impiegando un tampone citrato a pH 4,25 e dello Sr con tampone citrato a pH 5,05.

Un inconveniente riscontrato nell'uso del citrato è il fatto che esso forma con lo Sr un complesso molto stabile e che quindi non è agevole scindere il complesso e ottenerlo in forma ionica. JEANMARIE e MICHON G. (2) eluiscono le colonne con citrato ammonico 5% a pH 4,25. In tal modo si complessano le terre rare, i radiocolloidi, il Ca e il Mg. Successivamente si effettua l'eluizione con citrato ammonico 5% a pH 5,05 e si complessa lo Sr, mentre Ba e Ra restano sulla resina. Il complesso Sr-citrato veniva poi decomposto per acidificazione a pH 2-3 e forte diluizione (1:10); la soluzione ottenuta veniva passata su resina acida dalla quale lo Sr veniva infine recuperato per eluizione con HCl.

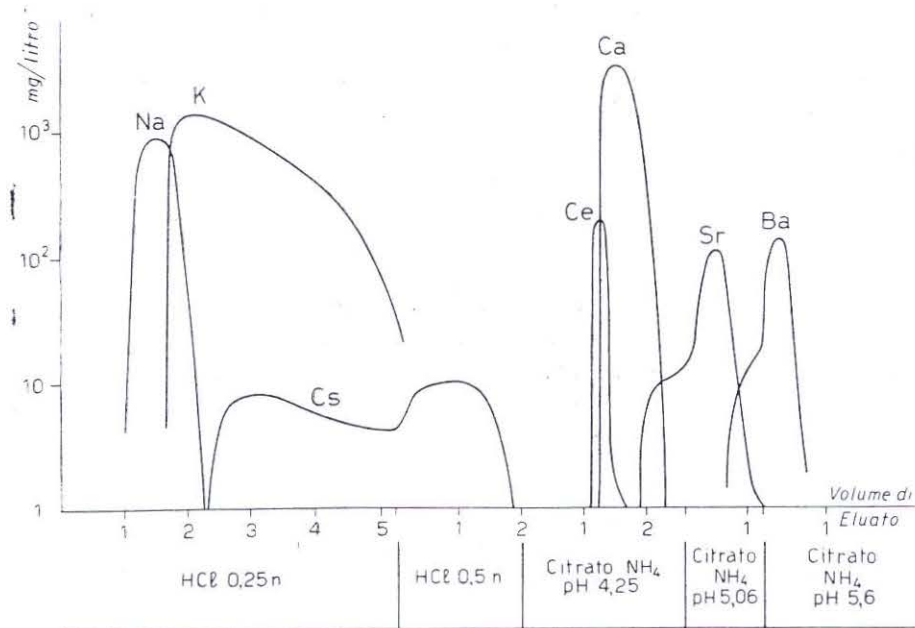


Fig. 1. - Eluizione della colonna di resina Dowex 50 x 8 contenente i cationi di due litri di latte addizionato di Cs, Sr, Ce e Ba carriers (dal metodo di R. Schneider per la determinazione del Cs<sup>137</sup> e Sr<sup>89</sup> - Sr<sup>90</sup> nel latte).

SCHNEIDER R. (3) applicando questa tecnica alla determinazione dello Sr<sup>89</sup> e Sr<sup>90</sup> nel latte intero, ottiene volumi notevoli di soluzione che occorre nuovamente far passare sulla resina. Per scindere con questo sistema il complesso Sr-citrato sono necessarie circa 24 ore. (Fig. 1).

Per cercare di ridurre sia il tempo che evitare la forte diluizione si è cercato di studiare le migliori condizioni per decomporre il complesso Sr-citrato. Si è trovato che, trattando all'ebollizione con NaOH 12N e 100 g circa  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  questo si decompone, ottenendo in pari tempo una completa precipitazione dello Sr come carbonato.

Secondo la classificazione di SCHWARZENBACH <sup>(4)</sup> il complesso Sr-citrato ammonico, dotato di carica elettrica, molto solubile in acqua e insolubile in solventi organici, è formato da un ligando chelato multidentato. La sua natura e la sua stabilità lo rendono un sistema del tipo « sequestrante » <sup>(5)</sup>. Per questo i complessi consentono di mantenere questi metalli alcalino-terrosi in presenza di ioni capaci di precipitarli. Ma la stabilità di un complesso dipende fra l'altro dal pH della soluzione, dalla temperatura, dalla presenza e dalla natura di altri ioni in soluzione. Tutti questi fattori nel complesso da noi considerato vengono notevolmente modificati per aggiunta di NaOH e  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , in concentrazione elevata e mediante ebollizione. L'eccesso degli ioni  $\text{Na}^+$  a caldo sposta dalla soluzione lo ione  $\text{NH}_4^+$ , che è uno dei ligandi presenti nel complesso, e aumenta la dissociazione dello anione citrico, diminuendo la capacità di formare legami covalenti e coordinati. La quantità dello ione  $\text{Sr}^{++}$  in soluzione, quindi, aumenta in quanto, non essendo più presente lo ione  $\text{NH}_4^+$ , si distrugge il complesso chelato non compensato dall'aumento dello ione citrato. Pertanto aumentando la concentrazione dello  $\text{Sr}^{++}$  libero in presenza di una forte concentrazione dello ione  $\text{CO}_3^{--}$  favorita dall'agitazione meccanica e dalla temperatura, si ottiene la precipitazione completa dello Sr come carbonato.

Questo sistema di decomposizione del complesso semplifica molto il procedimento sinora usato ed apporta inoltre un immediato vantaggio alla determinazione dello  $\text{Sr}^{89}$ . Il tempo richiesto dopo l'eluizione con citrato ammonico 5% a pH 4,25 per eluire, precipitare ed isolare lo Sr come carbonato è di circa 5 ore ed in questo periodo di tempo la quantità di  $\text{Y}^{90}$  prodotta dalla trasformazione dello  $\text{Sr}^{90}$  nel carbonato è talmente limitata da non interferire nel successivo conteggio. Per la determinazione dello  $\text{Sr}^{89}$  è quindi sufficiente disporre il campione di  $\text{SrCO}_3$  nel contatore con un assorbitore che elimini l'attività dello  $\text{Sr}^{90}$ . Si ottiene così il valore della sola radioattività dovuta allo  $\text{Sr}^{89}$  con un rendimento (sul teorico) del 90% circa. In precedenza la determinazione dello  $\text{Sr}^{89}$  poteva essere eseguita solo dopo aver allontanato dallo  $\text{SrCO}_3$ , lo  $\text{Y}^{90}$  formatasi, mediante una coprecipitazione con  $\text{Fe}(\text{OH})_3$ . Infatti, senza questa separazione si sarebbero ottenuti risultati maggiorati di oltre il 40% per la maggiore energia delle radiazioni emesse dall' $\text{Y}^{90}$  (2,24 Mev) rispetto a quelle dello  $\text{Sr}^{90}$  (0,61 Mev) e dello  $\text{Sr}^{89}$  (1,46 Mev).



Per concludere si può dire che sullo schema della tecnica di R. Schneider per la determinazione dello  $\text{Sr}^{89}$  e  $\text{Sr}^{90}$  nel latte, sono state apportate le seguenti modifiche: variazione delle condizioni di decomposizione del complesso Sr-citrato con alcali e dosaggio dello Sr e del Ca per fotometria di fiamma più rapida ed esatta dell'analisi ponderale. Quest'ultimo dosaggio permette una standardizzazione di tutto il procedimento dato che si è messo in evidenza che le tracce di Ca non influiscono sulla separazione  $\text{Sr}^{90}$ - $\text{Y}^{90}$  e sulla determinazione dell'attività dello  $\text{Sr}^{89}$ .

#### PARTE SPERIMENTALE

Un litro di latte intero addizionato di una quantità nota di un sale di Sr inerte (50 mg circa) e di 130-140  $\text{cm}^3$  di resina Dowex 50  $\times$  8 in forma acida (100-200 mesh), viene agitato meccanicamente per 50'. La resina separata dal latte e lavata con acqua viene versata in una colonna alta 1 metro,  $\varnothing$  2,5 cm, e contenente  $\text{cm}^3$  della stessa resina in forma acida. Con 3 litri di citrato ammonico al 5% ed a pH 4,25 si eluiscono Ca e Mg, radiocolloidi e terre rare in 12 ore circa. Con 1 litro di citrato ammonico al 5% ed a pH 5,05 si eluisce lo Sr in 4 ore circa.

La soluzione di Sr, con l'aggiunta di 20  $\text{cm}^3$  di NaOH 12N, è tenuta all'ebollizione per 5', quindi si aggiunge poco per volta  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  solido fino a quando termina lo sviluppo di gas. Quindi sotto agitazione meccanica, si continua ad aggiungere  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  fino a formazione del precipitato. L'agitazione della soluzione si continua fino ad eliminare tutta l'ammoniaca. Successivamente mediante centrifugazione o filtrazione su setto poroso No. 5, si raccoglie lo  $\text{SrCO}_3$ . Questo viene disciolto con  $\text{HNO}_3$  6N, precipitato nuovamente con  $\text{NH}_4\text{OH}$  6N e  $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$  e infine raccolto su un apposito filtro tarato di carta disposto su un imbuto di vetro smontabile. Il disco di carta con il  $\text{SrCO}_3$  viene quindi essiccato e portato al contatore, interponendo un assorbitore di 100-130  $\text{mg}/\text{cm}^2$  onde eliminare l'attività dello  $\text{Sr}^{90}$ . Il valore della radioattività dello  $\text{Sr}^{89}$  si calcola dall'efficienza del contatore rispetto a  $\text{K}_2\text{CO}_3$ .

La presenza di piccole quantità residue di ioni calcio non produce auto-assorbimento tale da influenzare le misure. Infatti da esperienze compiute con campioni di  $\text{K}_2\text{CO}_3$  addizionati di  $\text{CaCO}_3$  per verificare la variazione del rendimento del contatore a basso fondo, si è potuto constatare che condizioni del metodo da noi adottato non si notano variazioni apprezzabili su campioni di 100 mg di  $\text{K}_2\text{CO}_3$  e  $\text{CaCO}_3$  fino a una percentuale calcolata nel  $\text{Ca}^{++}$  di circa il 10%.

Il campione di  $\text{SrCO}_3$  viene quindi disciolto con poco  $\text{HNO}_3$  6N, addizionato di quantità note di Y inattivo e lasciato a riposo per 14 giorni in modo che si stabilisca l'equilibrio radioattivo  $\text{Sr}^{90}$ - $\text{Y}^{90}$ .

La frazione di Y viene estratta come  $Y(OH)_3$  e precipitata sotto forma di ossalato per la misura dello  $Sr^{90}$ , mentre sulla soluzione contenente lo Sr (diluata ad 1 litro) si determina la quantità di Sr (e le tracce di Ca) necessaria per il successivo calcolo della resa chimica.

La dissoluzione e riprecipitazione dello  $SrCO_3$  proveniente dalla decomposizione del complesso Sr-citrato è sufficiente per eliminare ogni traccia di metalli alcalini. E' evidente che la tecnica proposta può essere utilizzata per determinare il solo  $Sr^{90}$  nel latte, nelle ossa, nei vegetali ecc. con l'impiego delle resine e la successiva eluizione con un complessante quale il citrato ammonico. Lo stesso sistema usato per decomporre il complesso Sr-citrato si può applicare anche nel caso del complesso con il lattato ammonico oppure del EDTA.

Per il calcolo dello  $Sr^{90}$  dall'attività dell' $Y^{90}$  si è usata la formula:

$$pC \text{ Sr}^{90}/\text{litro di latte} = \frac{C_{Y^{90}}}{R_{Sr} \cdot R_Y \cdot E \cdot f \cdot 2,22}$$

dove:  $C_Y$  è il numero di c.p.m. ottenuti dal campione di Y-ossalato

$R_{Sr}$  è il rendimento chimico per lo Sr,

$R_Y$  è il rendimento chimico per l'Y

E è l'efficienza del contatore per l' $Y^{90}$  ossalato

f è il fattore di decadimento dell' $Y^{90}$

2,22 è il numero di d.p.m. equivalenti ad 1 pC

## RISULTATI

Si è notato che, facendo passare nella colonna di resina  $3000 \text{ cm}^3$  di citrato ammonico a pH 4,25 negli ultimi 50 ml si ha praticamente scomparsa degli ioni Ca mentre si comincia ad eluire lo Sr, come si può notare dalla Tabella 1.

TABELLA 1

Concentrazione di mg/1 di Ca e Sr negli ultimi 50  $\text{cm}^3$  di eluizione dal citrato a pH 4,25.

Latte		mg Sr	mg Ca
Roma	del 29-10-62	10,3	1,2
(RC) Tripodi	del 8-11-62	5,4	0,45
(RC) Sovereto	del 9-10-62	1,2	0,3

Infatti, dopo questa prima eluizione la curva Ca-Sr riportata in fig. 2 raggiunge quasi sempre il punto di minimo, cioè quando il Ca è sul punto di scomparire e lo Sr invece incomincia ad apparire. E la determinazione

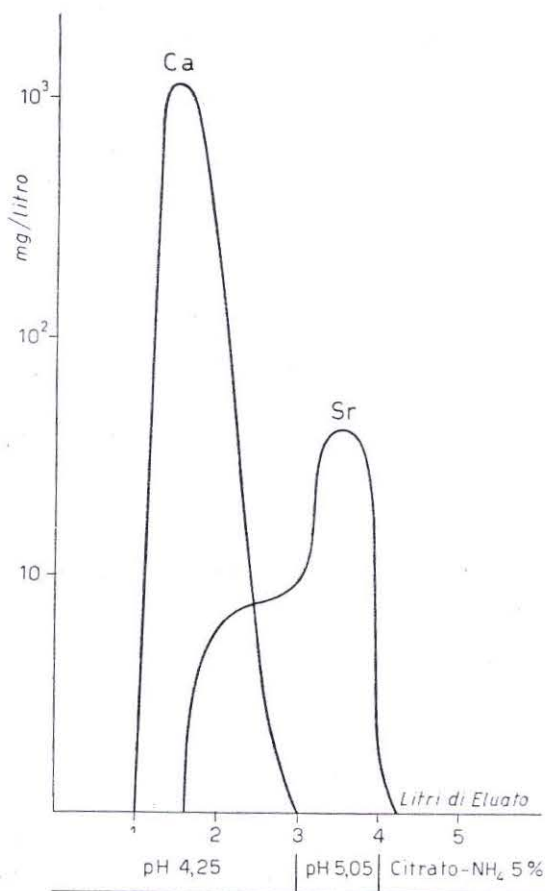


Fig. 2. - Processo di eluizione standard per la determinazione dello Sr<sup>89</sup> e Sr<sup>90</sup> in 1 litro di latte.

finale dello Sr mediante fotometria a fiamma per il calcolo della resa chimica, elimina l'errore che precedentemente si poteva commettere non tenendo conto del Ca presente nel SrCO<sub>3</sub> determinato per via ponderale (Fig. 2).

TABELLA 2

Nella tabella 2 sono riportati per alcuni campioni di latte i valori dello Sr nella soluzione di citrato ammonico a pH 5,05 e quelli nel carbonato dopo la decomposizione del complesso.

Latte		mg Sr nell'eluato di citrato ammonico a pH 5,05	mg Sr recuperato come SrCO <sub>3</sub>
Gambarie (RC)	9-10-62	35	33
Roma	8- 9-62	39	46
S. P. Avellana (CB)	13- 9-62	37	34
Cortina	15-10-62	36	35

L'A. ringrazia il Personale dei Laboratori di Fisica addetto alle misure di radioattività  $\beta$ . Inoltre l'A. ringrazia il Sig. ETTORE MAROCCIA del lavoro svolto durante la standardizzazione del metodo.

2 dicembre 1963.

#### BIBLIOGRAFIA

- (<sup>1</sup>) MILTON G. M. e GRUMMIT W. E. - *Canad. J. Chem.*, 35, 541 (1957).
- (<sup>2</sup>) JEANMARIE L. e MICHON G. - *Lait*, 39, 369 (1959).
- (<sup>3</sup>) SCHNEIDER R. - Conferenza sulla « Determinazione dei radioelementi nella catena alimentare », febbraio 1962, Istituto Superiore di Sanità, Roma.
- (<sup>4</sup>) WILSON C. L. e WILSON D. W. W. - *Comprehensive analytical Chemistry*. Elsevier Publ. Co., Amsterdam (1959).
- (<sup>5</sup>) KOLTHOFF I. P. e ELVIN P. J. - *Treatise on analytical Chemistry*. Intersc. Encycl., New York (1959).



## La gas-cromatografia nella chimica dei cereali

### Nota II. — Variazioni dei lipidi del frumento provocate dal processo di panificazione e dalla conservazione del pane.

FRANCESCO MUNTONI, ENRICO TISCORNIA (\*) e GEROLAMO DE GIULI

*Laboratori di Chimica*

**Riassunto.** — Vengono descritte le trasformazioni, accertate per via gas-cromatografica, che subiscono i lipidi della farina in seguito al processo di panificazione e alla conservazione del pane. Le modifiche principali consistono in un aumento percentuale degli acidi palmitico, stearico e oleico, mentre diminuiscono gli acidi linoleico e linolenico. Le variazioni conseguenti dei rapporti fra i valori degli acidi grassi consentiranno di stabilire quale grasso sia stato adoperato nella confezione di pane condito.

**Summary.** — The AA describe the changes undergone by flour lipids through the baking process and the ageing of bread. The chief modifications are a percentual rise of palmitic, stearic and oleic acids, while linoleic and linolenic acids decrease. Ratio variations between the values of the various fatty acids enable to detect which type of animal or vegetal fat was used in breadmaking.

---

Procedendo nel programma annunciato in occasione della presentazione della I Nota <sup>(1)</sup> alle « Giornate italiane della separazione immediata e della cromatografia — 14-16 giugno 1963 — Milano », allo scopo di stabilire se e quali modificazioni fossero subite dalla parte grassa (estratto etereo) della farina a causa dei processi di lievitazione e cottura ed in conseguenza della conservazione, anche lunga, del pane, abbiamo effettuato prove di panificazione con le farine adoperate per le prove della I Nota.

L'importanza della constatazione di modifiche apportate dalla lunga conservazione consiste nel cercare la possibilità di identificare, anche

---

(\*) Ospite dei Laboratori di Chimica.



in sede di analisi di revisione, che, come è noto, si effettua a distanza di mesi dalla fabbricazione del pane, i grassi adoperati nella confezione del pane condito.

In primo luogo abbiamo quindi ritenuto necessario osservare le modifiche subite dalla parte grassa del pane, in modo di poter utilizzare successivamente i dati ottenuti in un confronto con quelli provenienti da pani conditi con i diversi grassi consentiti (olio, strutto e burro).

A tale scopo abbiamo orientato la ricerca per accertare innanzitutto se modifiche si verificassero e, in tal caso, se esse mostrassero un andamento costante con il passare del tempo. Abbiamo limitato a sei mesi il periodo di osservazione, poichè è difficile che un tempo maggiore possa trascorrere tra un'analisi di controllo e quella di revisione.

Abbiamo anche cercato di accertare se l'aggiunta di lievito introducesse per suo conto modifiche nei cromatogrammi perchè, come diremo più avanti, è risultato necessario stabilire se la comparsa di taluni picchi fosse da attribuire a sostanze introdotte con il lievito o dovesse ascrivere a trasformazioni subite dal grasso della farina.

#### PARTE SPERIMENTALE

Per ottenere i campioni sui quali svolgere le nostre ricerche abbiamo panificato farine tipo O, dal caratteristico cromatogramma perfettamente confrontabile con quello illustrato nella Nota I <sup>(1)</sup> e per le quali, nella Tabella I riportiamo la composizione media.

TABELLA I

Composizione dei lipidi della farina.

Prodotto	C <sub>12</sub>	C <sub>14</sub>	C <sub>15</sub>	C <sub>16</sub>	C <sub>16</sub> ==	C <sub>17</sub>	C <sub>18</sub>	C <sub>18</sub> ==	C <sub>18</sub> ==	C <sub>18</sub> ==	C <sub>20</sub> ==	C <sub>18</sub> == C <sub>16</sub>	C <sub>18</sub> C <sub>18</sub> ==	C <sub>18</sub> == C <sub>18</sub>	C <sub>18</sub> + C <sub>18</sub> ==
Farina 0	tr	tr	tr	19,41	0,24	tr	1,09	14,63	60,45	3,18	0,62	3,11	0,018	13,42	15,72

Le aggiunte alla farina sono consistite nell'1% di sale e nel 2% di lievito.

Gli estratti eteri sono stati analizzati con la tecnica e con l'apparecchio indicati nella Nota I, operando immediatamente dopo la pani-

ficazione e quindi a intervalli di un mese. In questa prima fase abbiamo, come si è detto, operato sul pane senza aggiunta di grassi. In una nota successiva, già in fase di esecuzione, riferiremo sui risultati ottenuti con il pane condito.

Rileviamo a questo punto che è opportuno ottenere gli estratti adoperando etere etilico anidro, poiché con altri solventi, ad esempio etere di petrolio, si ha una estrazione più completa, ed anche allo scopo di standardizzare il metodo.

Le piccole differenze che si notano nella estensione dei cromatogrammi son dovute, come era ovvio attendersi, all'impiego di colonne diverse, non potendosi, nel lasso di tempo descritto, adoperare una sola colonna.

Sin dall'osservazione del primo cromatogramma (Fig. 1) abbiamo notato la comparsa di picchi, o un loro aumento, e precisamente i nu-

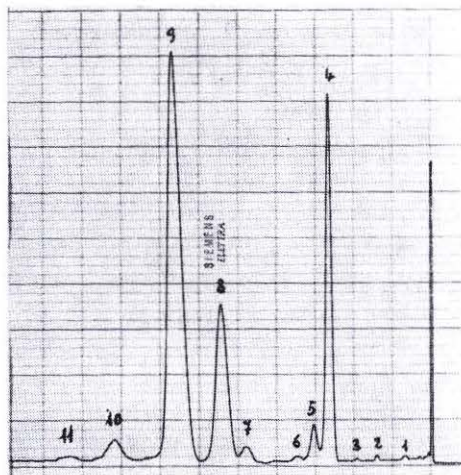


Fig. 1. - Cromatogramma dell'estratto etero del pane confezionato il 19-5-63. Eseguito il 20-5-63.

(1) Acido Laurico; (2) Ac. Miristico; (3) Ac. Pentadecanoico; (4) Ac. Palmitico; (5) Ac. Palmitoleico (?); (6) Ac. Eptadecanoico (?); (7) Ac. Stearico; (8) Ac. Oleico; (9) Ac. Linoleico; (10) Ac. Linolenico; (11) Ac. Gadoleico.

meri 5 e 6, attribuibili, sebbene non con certezza assoluta, agli acidi palmitoleico ed eptadecanoico, che nella farina non erano affatto presenti o lo erano in tracce minime. Abbiamo quindi voluto controllare se la loro presenza fosse da attribuire al lievito.

Cromatogrammi eseguiti su estratti eteri del lievito hanno però permesso di escludere questa possibilità e pertanto si deve pensare che la comparsa dei suddetti acidi grassi debba derivare dalla decomposizione di quelli naturalmente presenti nella farina.

Nello stesso primo cromatogramma si nota inoltre, dal confronto con quelli delle farine, la comparsa, prima dell'acido laurico, di picchi di lievissima entità, denotanti il verificarsi di fenomeni di decomposizione.

Tali fenomeni, come si può agevolmente osservare dalle Fig. 2 e 3, si accentuano in maniera notevole con il passare del tempo.

Le altre differenze che si possono osservare sin dall'inizio consistono in un aumento percentuale dell'acido oleico ed in una diminuzione dell'acido linoleico, fenomeni che vedremo accentuarsi, sino ad assu-

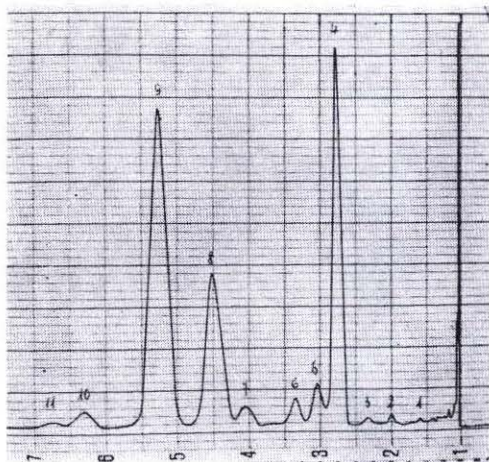


Fig. 2. - Cromatogramma dell'estratto etero del pane confezionato il 19-5-63. Eseguito il 20-7-63.

(1) Acido Laurico; (2) Ac. Miristico; (3) Ac. Pentadecanoico; (4) Ac. Palmitico; (5) Ac. Palmitoleico (?); (6) Ac. Eptadecanoico (?); (7) Ac. Stearico; (8) Ac. Oleico; (9) Ac. Linoleico; (10) Ac. Linolenico; (11) Ac. Gadoleico.

mere una fisionomia caratteristica, man mano che andrà aumentando il tempo di conservazione.

Risultano pertanto significative le Fig. 2 e 3 che mostrano in maniera assai chiara l'evoluzione del fenomeno. Infatti è chiarissima l'inversione quantitativa delle percentuali degli acidi oleico e linoleico. Al-



tro dato significativo è fornito dall'andamento della percentuale di acido palmitico presente negli estratti. Esso tende ad aumentare progressivamente, come del resto sono progressive anche le altre trasformazioni indicate.

La Tabella 2 riporta il quadro completo dell'esperienza. Non abbiamo ritenuto opportuno presentare anche i cromatogrammi in quanto dopo quello riprodotto nella Fig. 3 si ha soltanto un accentuarsi dei fenomeni, sino a raggiungere una certa stabilità, ma non si osservano più variazioni determinanti.

Benchè, come abbiamo detto, non si possa essere assolutamente certi sulla identificazione degli acidi grassi che danno origine ai picchi numero 5 e 6 (Fig. 1 e 2) e numeri 4 e 5 (Fig.3), si deve però osservare che essi

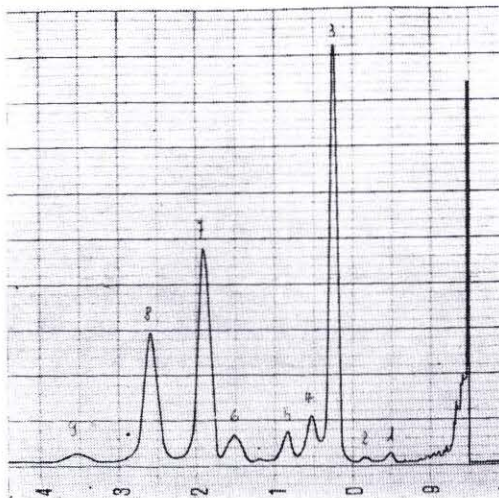


Fig. 3. - Cromatogramma dell'estratto etero del pane confezionato il 19-5-63. Eseguito il 20-8-63.

- (1) Acido Miristico; (2) Ac. Pentadecanoico;  
 (3) Ac. Palmitico; (4) Ac. Palmitoleico (?);  
 (5) Ac. Eptadecanoico (?); (6) Ac. Stearico;  
 (7) Ac. Oleico; (8) Ac. Linoleico; (9) Ac. Linolenico.

configurano un elemento caratteristico dello svolgersi dei fenomeni di trasformazione che hanno luogo con la lunga conservazione del pane. Si nota cioè che le loro percentuali vanno gradualmente aumentando, dato che possiede indubbiamente una sua importanza, anche se dobbiamo obiettivamente riservarci di definire con maggiore precisione la loro origine.

Nella Tabella II abbiamo anche riportato i vari rapporti dei quali fu fatto cenno nella Nota I <sup>(1)</sup> perchè abbiamo osservato innanzitutto



TABELLA 2

Composizione dei lipidi del pane in funzione del tempo di conservazione.

Pane confezionato il 19-5-63	C <sub>12</sub>	C <sub>14</sub>	C <sub>15</sub>	C <sub>16</sub>	C <sub>16</sub> = (f)	C <sub>17</sub> (f)	C <sub>18</sub>	C <sub>18</sub> =	C <sub>18</sub> = = =	C <sub>20</sub> =	$\frac{C_{18} = =}{C_{16}}$	$\frac{C_{18}}{C_{18} = =}$	$\frac{C_{18} =}{C_{18}}$	C <sub>18</sub> + C <sub>18</sub> =	
Analisi estratto effettuata il:															
20-5-63	0,10	0,22	tr	19,35	2,11	0,42	1,69	18,20	53,52	3,28	0,61	2,76	0,031	10,76	19,89
20-6-63	0,12	0,31	0,22	22,27	2,48	1,98	2,66	19,54	45,78	3,35	0,58	2,05	0,058	7,34	22,20
20-7-63	0,10	0,31	0,26	22,98	2,55	2,03	2,15	19,62	46,32	2,45	0,36	2,01	0,046	9,12	21,77
20-8-63	=	0,39	0,30	33,36	3,83	2,36	4,02	33,45	20,72	1,27	=	0,61	0,19	8,32	37,47
20-9-63	=	0,64	0,42	34,10	3,95	2,41	4,45	32,06	20,88	0,76	=	0,61	0,21	7,20	36,51
20-10-63	=	0,96	0,55	36,74	4,14	3,06	4,85	35,07	13,62	0,35	=	0,37	0,37	7,23	39,92
20-11-63	=	0,91	tr	38,07	4,30	2,87	4,30	37,40	11,37	tr	=	0,29	0,37	8,60	41,70

che, se confrontati con quelli della farina, essi possono servire a un giudizio approssimativo sull'invecchiamento del campione e perchè dalle loro variazioni in funzione del tempo ci forniscono dati che saranno assai utili, come possiamo fin d'ora anticipare, per l'identificazione dei grassi aggiunti.

#### CONCLUSIONI

Da quanto esposto risulta che la sostanza grassa dalla farina subisce notevoli trasformazioni nel corso del processo di panificazione, ma, soprattutto in funzione del tempo, a partire dal momento della produzione del pane.

Le trasformazioni più caratteristiche provocano:

1) la comparsa di picchi precedenti all'acido laurico, indubbiamente causati da fenomeni di decomposizione;

2) l'aumento in percentuale dell'acido palmitico, di quello stearico ed oleico;

3) la comparsa di due picchi, attribuibili probabilmente all'acido palmitoleico ed all'eptadecanoico, in misura sempre crescente;

4) la diminuzione percentuale degli acidi linoleico e linolenico;

5) in conseguenza delle variazioni suddette si hanno notevoli modifiche sui valori dei rapporti indicati nella Tabella 2.

Con questa seconda nota riteniamo concluso il lavoro preparatorio per quello che abbiamo sempre considerato l'obiettivo principale del nostro lavoro: pervenire al riconoscimento dei grassi adoperati nella confezione del pane condito, anche a notevole distanza di tempo.

7 gennaio 1964.

#### BIBLIOGRAFIA

- (<sup>1</sup>) MUNTONI F., TISCORNIA E. e DE GIULI G. - « La Gas-cromatografia nella chimica dei cereali » - Nota I; Riv. Ital. Sost. Grasse, 41, 154 (1964).

## Metodo rapido per la fermentazione degli zuccheri da parte dei Corinebatteri

SILVANA ALBERTI, VITTORIO ORTALI e BARTOLO TURLÀ (\*)

*Laboratori di Microbiologia*

**Riassunto.** — Viene descritta una nuova tecnica per evidenziare le capacità fermentative dei Corinebatteri che più interessano la patologia umana.

Tale tecnica, che comporta l'uso di un terreno solido privo di carboidrati fermentabili e quello di dischi di carta bibula imbevuti della soluzione del carboidrato da saggiare, viene eseguita preparando un agar-germi in piastra di Petri. Essa presenta, oltre a una notevole praticità di esecuzione, sicurezza e praticità di lettura rispetto a molti dei metodi proposti finora.

**Summary.** — A new technique is described which shows the fermentation capacities of the *Corynebacteria* that more closely concern human pathology.

This technique is based on the use of a solid medium including no fermentable carbohydrates and of disks of absorbent paper soaked in the solution of the carbohydrate to be tested; it involves the preparation of an agar-bacteria mixture on a Petri dish. In addition to its highly practical execution, this technique offers sure and easy readings as compared with many of the methods hitherto suggested.

---

Da tempo è nota l'importanza delle prove di fermentazione degli zuccheri per la classificazione dei Corinebatteri.

I terreni tradizionali impiegati a questo scopo sono il terreno di Hiss e il brodo con infuso di cervello e cuore (brain heart infusion). In questi terreni la crescita spesso avviene in superficie, a pellicola, di modo che gli enzimi della glicolisi si trovano nelle peggiori condizioni per esprimersi; non è possibile, pertanto, ottenere risposte sicure e costanti.

Per ovviare a questi inconvenienti alcuni autori<sup>(1)</sup> suggerirono l'uso di un terreno solido seminato per infusione. L'impiego di questo terreno permetteva di valutare la regolare crescita del germe lungo il canale di

---

(\*) Borsista dei Laboratori di Microbiologia.

innesto e consentiva, inoltre, per le condizioni di semianaerobiosi che si stabilivano, di ottenere risultati costanti e uniformi per tutti i ceppi di Corinebatteri. Tale tecnica, però, presenta l'inconveniente di dover protrarre l'osservazione per 5 giorni prima di poter dare una risposta definitiva.

Al fine di ottenere risposte quanto più possibile rapide, abbiamo sperimentato per i Corinebatteri una metodica già studiata per altri germi da SOTO (2), LUCE (3), SANDERS (4) e VILLA (5). Tale tecnica mette in evidenza la fermentazione dei carboidrati in piastra mediante l'uso di dischi di carta bibula imbevuti della soluzione del carboidrato da saggiare: i dischi vengono disposti sulla superficie dell'agar. Il terreno impiegato, che deriva da un terreno a base di cistina, idrolisato pancreatico di caseina e agar (CTA medium-BBL) è, naturalmente, privo di carboidrati fermentabili e contiene rosso fenolo quale indicatore. Tale terreno non consente, tuttavia la crescita dei Corinebatteri per le particolari esigenze metaboliche proprie di questi germi; per soddisfare il loro fabbisogno proteico e ottenere, quindi, una crescita regolare, è stato necessario integrare la formula. L'aggiunta di siero di cavallo si è dimostrata la più idonea allo scopo e la più pratica. La percentuale di siero più rispondente è stata quella dell'1%. Si è preferito diluire il siero 1:10 per ottenere una migliore ripartizione di esso nel terreno e una agevole preparazione dell'agar-germi facilitando la lettura dei risultati.

#### TECNICA

I tamponi prelevati dalla gola e dal naso vengono strisciati su terreno di MÜLLER (6): le colonie sospette di *Corynebacterium diphtheriae* vengono coltivate in *brain heart infusion* in termostato a 37°C in agitazione per 4 h circa.

Si prepara un agar-germi, in piastra, con cm<sup>3</sup> 0,2 della coltura in brodo, cm<sup>3</sup> 2 di siero di cavallo diluito 1:10 e cm<sup>3</sup> 18-20 del seguente terreno:

Cistina	g	0,5
idrolisato pancreatico di caseina (trypticase BBL)	»	20,0
agar	»	20,0
sodio cloruro	»	5,0
sodio solfito	»	0,5
rosso fenolo	»	0,017
H <sub>2</sub> O distillata	cm <sup>3</sup>	1000

Portare a pH 7,3

Sterilizzare a 115°C per 15'



Il terreno descritto differisce dal CTA medium per la diversa percentuale di agar.

Sulla superficie di coltura si dispongono i dischetti (\*) di carta bibula, imbevuti con le soluzioni dei differenti carboidrati.

La piastra si pone in termostato a 37°C. La reazione si legge a partire dalla 6<sup>a</sup>-8<sup>a</sup> h di incubazione ed è definitiva alla 24<sup>a</sup> h. La comparsa sulla superficie del terreno, normalmente rosso per la presenza di rosso fenolo, di un alone giallo attorno ad un dischetto, indica l'avvenuta fermentazione del carboidrato corrispondente, con produzione di acido.

I ceppi di *Corynebacterium diphtheriae* fermentano glucosio, maltosio, galattosio, amido, destrina; non fermentano mannitolo, lattosio, saccarosio, trealosio e raffiniosio.

Ai fini della identificazione, la fermentazione di 4 zuccheri (glucosio, saccarosio, lattosio, maltosio) è, a nostro avviso, più che sufficiente per distinguere il difterico dai non difterici. Nella Tabella 1 sono riportati i risultati ottenuti sui ceppi di *Corynebacterium* della nostra collezione.

TABELLA 1

	Gluc.	Sacc.	Latt.	Malt.
<i>Coryn., diphtheriae</i> . . . . .	+	—	—	+
» <i>pseudodiphtheriticum</i> . . . . .	—	—	—	—
» <i>xerose</i> . . . . .	+	+	—	+
» <i>mycetoides</i> . . . . .	+	—	—	—
» <i>haemolyticum</i> . . . . .	+	+	+	+
» <i>pyogenes</i> . . . . .	+	—	+	+
» <i>renale</i> . . . . .	+	±	—	—

#### CONCLUSIONI

Il metodo descritto offre i seguenti vantaggi:

1) rapidità di esecuzione: riduce, infatti, a poche ore il tempo richiesto per saggiare la fermentazione dei carboidrati;

(\*) I dischetti di carta (n. 2247 Schleicher & Schüll) vengono preparati, previa sterilizzazione, immergendoli per 24 h in una soluzione al 30% del carboidrato da saggiare. Si usano asciutti e si conservano a 4°C indefinitivamente. (Si trovano in commercio già pronti per l'uso=Taxos. BBL=).

2) possibilità di saggiare gli zuccheri necessari per l'identificazione in una sola prova;

3) possibilità di conservazione a 4°C degli ingredienti necessari (terreno e dischi) per un tempo sufficientemente lungo;

4) uniformità di risultati: mantenendo costante il rapporto microrganismi carboidrati e consentendo ai germi, in condizioni di semianaerobiosi, di esprimere le loro proprietà metaboliche nel migliore dei modi.

Riteniamo, quindi, che questa tecnica, per la sua *praticità*, possa essere di valido aiuto ai Laboratori, e possa contribuire, per l'*uniformità di risposta* ad una più rapida e sicura diagnosi.

20 gennaio 1964.

#### BIBLIOGRAFIA

- (1) ORTALI A. V., DE CARO M., LILLO L., ALBERTI S. e PICCARDO A. M. - Atti IX Congr. Naz. Microbiol., Palermo 1956.
- (2) SOTO O. B. - Puerto Rico I. Public Health Trop. Med., 25, 96 (1949).
- (3) LUCE J. P. - Ann. Inst. Pasteur, 89, 132 (1955).
- (4) SANDERS A. C., FABER J. E. e COOK T. M. - Appl. Microbiol., 5, 36 (1957).
- (5) VILLA L., CARLBERG G., CASSINGENA R. e CASTAGNETTA E. - Rend. Ist. Super. Sanità, 24, 820 (1961).
- (6) MÜLLER J. H. e MILLER P. A. - J. Bacteriol., 51, 743 (1946).

## Determinazione spettrofotometrica della demetilclorotetraciclina

GIUSEPPE IELA e GIOVANNI PAGNOZZI

*Laboratori di Chimica*

**Riassunto.** — Si descrive un metodo per la determinazione della DMCT in presenza di altre tetracicline, fondato sulla reazione cromatica con HCl 12 N a 100° C.

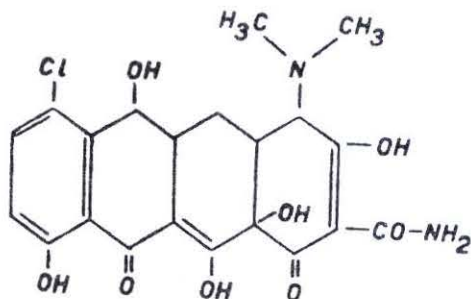
Nell'analisi delle preparazioni farmaceutiche contenenti zuccheri la separazione della DMCT dagli altri costituenti si esegue per cromatografia di adsorbimento su silicato di alluminio.

**Summary.** — A method is reported for the estimation of the DMCT in presence of tetracyclines, based upon a colour reaction with HCl 12 N at 100° C.

The analysis of pharmaceutical preparations containing sugars is based on chromatographic separation of DMCT from interfering substance by adsorption on aluminium silicate.

La 6-demetil-7-cloro tetraciclina (DMCT) è un antibiotico appartenente al gruppo delle tetracicline, prodotto per fermentazione da un ceppo mutante di *Streptomyces aureofaciens* ed introdotto in terapia nel 1957.

La formula di struttura è la seguente: <sup>(1)</sup>



La DMCT ha la stessa struttura fondamentale delle altre tetracicline (tetraciclina, ossitetraciclina, clorotetraciclina) e come queste <sup>(2)</sup> si identi-

fica per via spettrofotometrica a seguito di riscaldamento in ambiente acido in opportune condizioni di concentrazione e di riscaldamento. Il metodo proposto dalla FDA (3) è fondato sulla misura della colorazione gialla che si sviluppa riscaldando l'antibiotico in autoclave con HCl 6 N per 16 minuti;

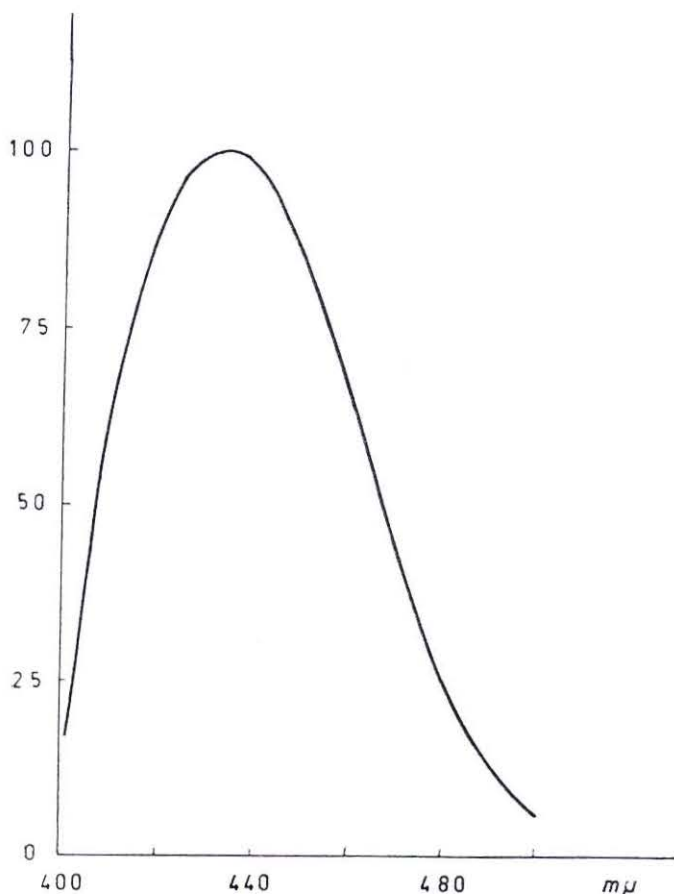


Fig. 1. — Curva di colore della DMCT trattata con HCl 12 N.

la curva di assorbimento della soluzione presenta un massimo di estinzione a 430 mμ.

In questa breve nota si descrive un procedimento fondato sullo stesso principio, soltanto con una tecnica più semplice suggerita dalle necessità di dovere effettuare numerosi controlli e dimostratasi valida anche quando la DMCT è associata ad altre tetraciline.

È stato sperimentalmente osservato che se si riscalda una soluzione di DMCT a 100° C per 5 minuti in presenza di HCl 12 N, si sviluppa una colo-



razione gialla con massimo di estinzione a 435  $m\mu$  (fig. 1). È stata studiata anche la variazione della intensità del colore in funzione del tempo di riscaldamento e della concentrazione dell'acido cloridrico (fig. 2); si è così constatato che il riscaldamento con HCl 2 N non promuove alcuna formazione di colore a differenza di quanto accade con la tetraciclina e con la clorotetraciclina che sia con HCl 2 N che con HCl 12 N danno la medesima colorazione; il riscaldamento con HCl 6 N determina ugualmente lo sviluppo di colore giallo, ma i coefficienti di estinzione specifici hanno valori più bassi.

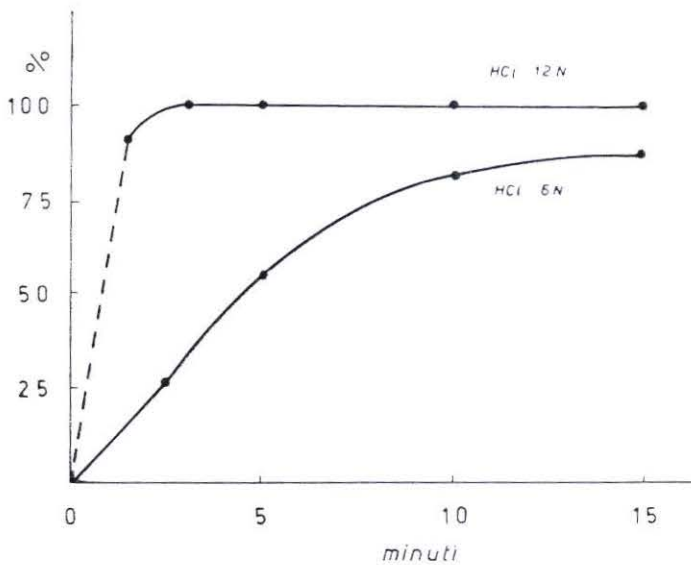


Fig. 2. — Intensità del colore in funzione del tempo di riscaldamento.

La ossitetraciclina dà con HCl 2 N e 12 N una colorazione che scompare rapidamente nel corso del riscaldamento.

La validità della legge di Beer è rispettata per un intervallo di concentrazione di DMCT compreso fra 10 e 60  $\gamma$  per ml.

Sulla base di queste constatazioni sperimentali si è elaborato il seguente procedimento:

25-50 mg del prodotto vengono disciolti in HCl 2 N e si portano a 50 ml. In due palloncini tarati da 50 ml si portano 2 ml della soluzione; si aggiungono in un palloncino 5 ml di HCl 12 N, nell'altro (prova in bianco) 5 ml di HCl 2 N. Si riscaldano i palloncini in bagno-maria bollente per 5 minuti primi; si raffreddano con acqua corrente, si aggiungono alla prova in bianco 5 ml di HCl 12 N e si porta a volume con acqua.

Si determina la differenza di assorbimento delle due soluzioni in celle da 1 cm a 435  $m\mu$ ; l'intensità della colorazione è stabile.

La concentrazione incognita si calcola costruendo preventivamente una curva di taratura con soluzioni di DMCT a concentrazione nota e trattate come avanti descritto.

#### DETERMINAZIONE DELLA DMCT IN PRESENZA DI ECCIPIENTI ZUCCHERINI

Il metodo descritto è stato applicato a preparazioni farmaceutiche costituite da compresse e capsule che non contenevano eccipienti zuccherini.

Nelle preparazioni sciroppose e nelle capsule o compresse contenenti lattosio o amido, occorre separare l'antibiotico da questi eccipienti, che, come è noto, imbruniscono per riscaldamento con HCl conc. Si è constatato che la separazione si può effettuare per cromatografia su colonna di silicato di alluminio: l'antibiotico in soluzione neutra è fortemente adsorbito, mentre gli zuccheri vengono facilmente eliminati con acqua.

La colonna di silicato di alluminio si prepara portando g 1 di alluminio silicato su filtro a setto poroso del diametro interno di 15 mm. Si lava quindi la colonna con acqua ottenendo uno strato uniforme dello spessore di mm 15. Per la determinazione della DMCT si procede nel modo seguente:

Si pesa una quantità di prodotto pari a circa 100 mg di DMCT, si aggiungono 20 ml di  $\text{CH}_3\text{COOH}$  2 N per solubilizzare l'antibiotico, si neutralizza con NaOH 1 N fino a pH 4 - 4,5 e si porta a volume di 100 ml con acqua. Sullo strato di silicato di alluminio precedentemente descritto si portano 2 ml della soluzione, si aspira sotto vuoto e si lava, sempre sotto aspirazione, quattro o cinque volte con 1 ml di acqua fino ad allontanamento dell'eccipiente. Si porta quantitativamente il silicato di alluminio, su cui si è adsorbita la DMCT, in beuta da 150 ml, si aggiungono 5 ml di HCl 12 N e si riscalda a bagno-maria per 5 minuti a 100°. Si filtra quantitativamente su filtro a setto poroso per separare il silicato di alluminio, si lava il filtro con 5 ml di HCl 2 N raccogliendo i filtrati in palloncino tarato da 50 ml e si porta a volume con acqua.

La lettura dell'estinzione si esegue a 435  $m\mu$  rispetto alla prova in bianco preparata come segue: 2 ml della stessa soluzione di DMCT sono fatti passare su strato di alluminio silicato, si lava con acqua e si porta in beuta il silicato come avanti descritto. Il trattamento a caldo si esegue con HCl 2 N.

Il recupero dell'antibiotico dalla colonna cromatografica corrisponde al 92 % del teorico. È pertanto necessario dividere il risultato della determi-

nazione per 0,92 per compensare le perdite dovute alla purificazione su colonna di alluminio silicato.

Si ringrazia il prof. F. COTTA-RAMUSINO per l'interesse con cui ha seguito il lavoro.

13 febbraio 1964.

#### BIBLIOGRAFIA

- (<sup>1</sup>) Mc CORMIK - J. Am. Chem. Soc. 79 III, 4561 (1957).
- (<sup>2</sup>) R. INTONTI, F. COTTA-RAMUSINO - Rend. Ist. Super. Sanità. 18, 649 (1955).
- (<sup>3</sup>) Food and Drug Administration - USA - Compilation of Regulations for Tests and Methods of Antibiotics - Vol. I, part. 141c, pag. C-51.

## Le sofisticazioni delle paste alimentari, per aggiunta di proteine animali, rivelate dalla sieroprecipitazione

VITTORIO MAZZARACCHIO, LEONIDA RAVAIOLI e ERNESTO GIOVENALI

*Laboratori di Veterinaria*

**Riassunto.** — Viene dimostrato dagli AA. come sia possibile, per mezzo della sieroprecipitazione, dimostrare nelle paste alimentari l'uso di « leganti » costituiti da proteine animali.

Tali « leganti », usati per impedire lo spezzettamento delle paste lunghe, permettono di usare grani teneri, di minor valore commerciale, al posto di grani duri.

**Summary.** — The Authors have shown that it is possible by means of seroprecipitation to demonstrate the use of « binding substances » consisting of animal proteins in alimentary pasta.

These « binding substances » which are used to prevent breaking of long pasta permit the use of soft grain, of less commercial value, in place of hard grain.

---

Tra le sofisticazioni degli alimenti, che in questi ultimi tempi hanno coinvolto e messo sotto accusa i più vari ed impensati prodotti, sono comparse anche quelle a carico delle paste alimentari.

Esistono infatti in commercio varie qualità di farina tutte però riconducibili a due tipi di grano: uno tenero ed uno duro.

Il grano tenero, ridotto in finissima farina viene impiegato per fare il pane; quello duro, macinato in piccoli granuli costituisce la cosiddetta semola che si usa per fare la pasta. Fra i due tipi di grano esistono notevoli differenze di carattere merceologico nettamente a favore del grano duro che costa circa un terzo in più rispetto a quello tenero.

Le paste alimentari devono essere fatte con semola, cioè con macinato di grano duro ad evitare che si spezzino, si spappolino o diventino collose durante la cottura. In particolari casi le paste alimentari possono essere fatte con grani teneri, ad esempio la pasta fatta in casa, ma in queste evenienze viene usato l'uovo come « legante » cioè come elemento che tenga insieme la pasta evitandone lo spezzettamento. Le paste non all'uovo, specie se di for-



mato lungo, come « spaghetti », « zitoni », « tagliatelle », « bucatini », « sfoglia » ecc., non dovrebbero essere confezionate che con semola. L'uso fraudolento di farina di grano tenero necessita di un « legante » che impedisca alla pasta di spezzettarsi.

Sul prodotto finito le possibilità di rilevare le mescolanze dei due tipi di farina distinguendo la semola dalla farina di grano tenero è limitata da metodi indaginosi che richiedono attrezzature complesse, come viene indicato dalla necessità di indagini spettrofotometriche nell'infrarosso (1).

La più pratica possibilità di svelare la frode consiste nell'identificare la sostanza « legante ». Tra queste vanno prese in considerazione l'uovo (albume e tuorlo) ed il plasma o il siero animale.

La tecnica di lavorazione delle paste alimentari non comporta un riscaldamento tale da denaturare le proteine ed è quindi possibile cercare di rivelare tali proteine aggiunte come « leganti » per mezzo della sieroprecipitazione con sieri immuni specifici. Dato però che la frode basata sull'impiego dell'uovo è da ritenersi poco probabile in relazione al costo del prodotto la cui aggiunta anzi fa acquistare alla pasta un valore commerciale maggiore, abbiamo diretto la nostra indagine soprattutto alla ricerca delle proteine animali di origine bovina, equina, ovina e suina eventualmente usate come « leganti ».

#### MATERIALI E METODI

##### *Sieri precipitanti monospecifici.*

I sieri sono ottenuti dal coniglio maschio giovane del peso di 2-3 Kg secondo la tecnica descritta da MAZZARACCHIO e RAVAIOLI (2). I sieri sono successivamente saturati verso le precipitine di gruppo ed extra-gruppo fino ad ottenere sieri precipitanti immuni monospecifici, seguendo la tecnica indicata da MAZZARACCHIO (3).

##### *Preparazione dell'antigene dalle paste alimentari.*

Circa 30-40 g di pasta vengono pestati finemente in mortaio, addizionati a 60-80 ml di soluzione fisiologica, posti in agitatore per due ore a temperatura ambiente (20-24°C) e a riposo in ghiacciaia a 4°C per 22 ore. Si centrifuga quindi per 30' a 4000 g e si filtra il supernatante per Seitz fino ad ottenere una soluzione madre perfettamente limpida. Tale soluzione madre andrà successivamente diluita 1:2 o 1:4 in maniera che i sieri precipitanti possano stratificarsi sotto di essa.

##### *La reazione di siero-precipitazione.*

Viene eseguita con il metodo dell'anello zonale, stratificando il siero immune sotto l'antigene. Per una più esatta e dettagliata metodologia si rimanda al lavoro di MAZZARACCHIO e RAVAIOLI (2).

TABELLA I.

CAM- PIONE N.	A N T I G E N E — Tipo di pasta	A N T I C O R P O					Proteina Totale g %
		Siero precipitante anti-					
		Equino	Bovino	Ovino	Suino	Pollo	
	<i>Pasta corta :</i>						
1	rigatoni . . . . .	—	—	—	—	—	—
2	canolicchi . . . . .	—	—	—	—	—	—
3	glutinata . . . . .	—	—	—	—	—	—
4	glutinata al plasmon . . . . .	+	—	—	—	—	—
5	glutinata all'uovo . . . . .	—	—	—	—	+	—
6	canolicchi rigati . . . . .	—	—	—	—	—	0.78
7	penne. . . . .	—	—	—	—	—	1.90
8	avemaria . . . . .	—	—	—	—	—	1.59
9	bombolotti rigati . . . . .	—	—	—	—	—	1.20
10	bombolotti curvi . . . . .	—	—	—	—	—	0.95
11	penne. . . . .	—	—	—	—	—	0.98
12	punte d'ago . . . . .	—	—	—	—	—	1.00
13	peperini . . . . .	—	—	—	—	—	1.45
14	bombolotti ricurvi . . . . .	—	—	—	—	—	1.45
15	bombolotti ricurvi . . . . .	—	—	—	—	—	1.40
16	glutinata . . . . .	—	—	—	—	—	0.98
	<i>Pasta lunga :</i>						
17	spaghetti . . . . .	—	—	—	—	—	—
18	spaghetti . . . . .	—	—	—	—	—	—
19	spaghetti . . . . .	—	—	—	—	—	—
20	spaghetti . . . . .	—	—	—	—	—	—
21	spaghetti . . . . .	—	—	—	—	—	—
22	spaghetti . . . . .	—	—	—	—	—	—
23	spaghetti . . . . .	—	—	—	—	—	—
24	spaghetti . . . . .	—	—	—	—	—	—

Segue : TABELLA 1.

CAM- PIONE N.	A N T I G E N E — Tipo di pasta	A N T I C O R P O					Proteina Totale g %
		Siero precipitante anti-					
		Equino	Bovino	Ovino	Suino	Pollo	
Segue : <i>Pasta lunga</i> :							
25	spaghetti . . . . .	—	—	—	—	—	—
26	spaghetti . . . . .	—	—	—	—	—	—
27	zitoni . . . . .	+	+	—	—	—	—
28	spaghetti . . . . .	+	+	—	—	—	—
29	spaghetti fini . . . . .	—	—	—	—	—	1.41
30	spaghetti . . . . .	—	—	—	—	—	1.50
31	spaghetti . . . . .	—	—	—	—	—	1.20
32	spaghetti . . . . .	—	—	—	—	—	1.15
33	spaghetti . . . . .	—	—	—	—	—	1.00
34	spaghetti . . . . .	—	—	—	—	—	1.30
35	spaghetti . . . . .	—	—	—	—	—	1.48
36	bucatini . . . . .	—	—	—	—	—	1.20
37	spaghetti . . . . .	—	—	—	—	—	0.85
38	bucatini . . . . .	—	—	—	—	—	1.30
39	spaghetti . . . . .	—	—	—	—	—	0.95
40	spaghetti . . . . .	—	—	—	—	—	0.98
41	sfoglia per lasagne all'uovo . .	—	—	—	—	+	1.30
42	spaghetti . . . . .	—	—	—	—	—	1.10
43	tagliatelle all'uovo . . . . .	—	—	—	—	+	1.30
44	spaghetti . . . . .	—	—	—	—	—	1.00
45	zitoni . . . . .	—	—	—	—	—	0.98
46	zitoni . . . . .	—	—	—	—	—	0.98
47	lingue di passero . . . . .	—	—	—	—	—	0.90
48	spaghetti fini . . . . .	—	—	—	—	—	1.10
49	spaghetti . . . . .	+	+	—	—	—	1.10
50	bucatini . . . . .	—	—	—	—	—	1.26

*La proteina totale* è stata titolata, sulla soluzione madre dopo filtrazione su Seitz, con il biureto e lettura al colorimetro con lunghezza d'onda di 540 m $\mu$ .

#### RISULTATI E CONSIDERAZIONI

Con la metodica sopra riportata sono state analizzate 50 paste alimentari gentilmente forniteci dal Prof. MUNTONI di questo Istituto che sentitamente ringraziamo.

Le paste, ad esclusione di quattro preparate dall'Istituto Nazionale della Nutrizione - Roma, con pura semola ed acqua e che ci sono servite come controlli del metodo, provenivano tutte dal commercio ed erano giunte in Istituto per analisi di revisione.

La maggioranza delle paste esaminate erano lunghe (34 su 50) poichè era logico sospettare soprattutto di tali paste.

I nostri sospetti hanno avuto conferma dai risultati come in sintesi viene riportato nella tabella 1.

Da essa si rileva che:

- 1) il 10 % delle paste esaminate è risultata addizionata ad un « legante » costituito da una proteina animale;
- 2) nessuna delle paste corte è risultata sofisticata;
- 3) le paste all'uovo reagiscono perfettamente con il siero immune antipollo;
- 4) viene quindi confermata la possibilità di sofisticazioni nei riguardi delle paste alimentari lunghe, costituite dall'aggiunta di sostanze proteiche animali usate come « leganti »;
- 5) il metodo da noi proposto si è quindi rivelato di sicura e pratica applicazione per svelare l'uso a scopo fraudolento di farine di grano tenero al posto di farine di grano duro e permette anche di identificare la specie zoologica delle proteine animali, usate come « leganti », anche in piccoli quantitativi.

5 marzo 1964

#### BIBLIOGRAFIA

- (<sup>1</sup>) BROGIONI M. e FRANCONI U. - *Molini Italia*, 3, 91 (1963).
- (<sup>2</sup>) MAZZARACCHIO V. e RAVAIOLI L. - La determinazione di specie zoologica delle carni insaccate, del latte e dei formaggi - *Istisan/Vet.* 1, 1963.
- (<sup>3</sup>) MAZZARACCHIO V. - *Rend. Ist. Super. Sanità*, 16, 540 (1938).



## Ricerche sull'olio di *Jessenia polycarpa* (\*)

LUIGI BONIFORTI e MARIA L. SALVI (\*\*)

*Laboratori di Chimica*

**Riassunto.** — È stata effettuata l'analisi gas-cromatografica dell'olio della palma *Jessenia polycarpa* Mart. e la determinazione degli altri indici.

La composizione di questo olio è qualitativamente eguale a quella dell'olio di oliva, e quantitativamente leggermente diversa, per le percentuali di acido linoleico molto basse nell'olio di seje.

È stato inoltre effettuato lo spettro di RMN su campioni dell'olio; mezzo questo che può risultare molto efficace per la caratterizzazione degli oli.

**Summary.** — Gas chromatographic analysis of oil derived from *Jessenia polycarpa* Mart. palm has been effected and other indexes determined.

From a qualitative point of view said oil is the same as olive-oil, but from a quantitative point of view it is slightly different, on account of a very low percentage of linoleic acid in seje oil.

Furthermore the RMN spectrum has been performed on oil samples. This method may prove very effective for the determination of oil characteristics.

---

Nel bacino dell'alta Amazonia e in quello dell'Orinoco, nelle regioni corrispondenti alla Colombia, Venezuela e Brasile, vegeta spontaneamente una palma nota con il nome locale di Seje, o Milpeso, che corrisponde alla *Jessenia pataua* Mart. o alla *Jessenia polycarpa*, già nota come *Oenocarpus pataua* Mart. (1).

Dai frutti di questa palma si ricava un olio, conosciuto come olio di pataua od olio di seje, già impiegato nell'alimentazione in talune zone della Amazonia e della Colombia.

Malgrado il vastissimo habitat della *Jessenia*, non vi è oggi che una produzione piuttosto modesta dell'olio, limitata al Brasile, probabilmente per

---

(\*) Questo lavoro è apparso in *Ann. Chim.*, 53, 1399 (1963).

(\*\*) Istituto di Chimica della Facoltà di Medicina dell'Università Cattolica del S. Cuore - Gruppo di ricerca del CNR. - Ospite dei Laboratori di Chimica biologica dell'Istituto Superiore di Sanità.

le difficoltà di raccolta del frutto, data la grande dispersione delle palme di questa specie. Inoltre non esistono finora le culture industriali di tali palme.

I primi studi sull'olio di seje sono stati effettuati nel 1951, da G. PEREIRA PINTO (2) in Brasile, il quale ne ha stabilito, la seguente composizione: acido palmitico (7,1 %), acido stearico (8,8 %), acido linoleico (5,2 %), acido oleico (72,9 %), glicerina (4,9 %), insaponificabile (1,3 %).

Potendo attualmente disporre di alcuni campioni di olio di seje, proveniente dalla zona di Puerto Ayacucho, nella zona Amazonica del Venezuela, dato l'interesse che vi è per i paesi sud americani di disporre di oli commestibili, siamo stati indotti ad eseguire una serie di ricerche su quest'olio con l'analisi gas-cromatografica al fine di avere nuovi elementi per giudicare la composizione che potrà dare indicazioni sulla sua commestibilità.

Su un campione medio dell'olio è stata eseguita la normale analisi dalla quale sono stati dedotti gli indici riportati nella tabella 1.

TABELLA 1

Acidità totale espressa in acido oleico per cento grammi . . . . .	g 1,4
Grado rifrattometrico (Zeiss) a 25°C . . . . .	62°,1
Indice di rifrazione a 25°C . . . . .	1,4430
Grado termosolforico (Tortelli) . . . . .	48°,0
Numero di iodio (metodo Hanus) . . . . .	76,0
Numero di saponificazione . . . . .	194,0
Numero degli esteri . . . . .	192,6
Reazione di Blarez . . . . .	Negativa
Saggio di Bellier . . . . .	Negativo

Sullo stesso campione è stata effettuata la transesterificazione con metanolo secondo S. ANSELMI; L. BONIFORTI e R. MONACELLI (3), e gli esteri metilici degli acidi grassi sottoposti a cromatografia in fase vapore.

Nella tabella 2 sono riportati i dati trovati, in confronto con quelli di un olio di oliva e della trioleina.

Dall'esame dei dati riportati nella tabella 1, si rileva che gli indici trovati sono molto simili a quelli che si riscontrano nell'analisi di un olio di oliva.

Dal confronto dei dati riportati nella tabella 2 si nota che la composizione qualitativa dell'olio è sostanzialmente eguale a quella dell'olio di oliva. Dal punto di vista quantitativo, la percentuale di acido oleico, dell'81,8 %, rientra nei limiti dell'olio di oliva, mentre è inferiore la percentuale di acido linoleico, che scende al 1,9 % rispetto al 4-12 % dell'olio di oliva. Minori differenze si hanno nel contenuto di acido palmitoleico, stearico e linoleico.

TABELLA 2

## Composizione in acidi grassi (determinata per via gascromatografica)

	Olio di semi di seje (*)	Olio di oliva (*)	Trioleina (Kahlbaum) (*)
Acido palmitico . . . . .	12,7%	11,2%	4,5%
Acido palmitoleico . . . . .	0,8%	1,5%	0,4%
Acido stearico . . . . .	2,6%	2,0%	1,8%
Acido oleico . . . . .	81,8%	76,0%	88,4%
Acido linoleico . . . . .	1,9%	8,5%	4,8%
Acido linolenico . . . . .	0,4%	0,5%	tracce
Acido arachico . . . . .	tracce	0,3%	tracce

(\*) Campioni sui quali è stato eseguito lo spettro di risonanza magnetica nucleare.

Questo conferma il basso valore del numero di iodio dell'olio di seje, e sta a dimostrare che esso contiene una quantità minore di acidi a due o tre doppi legami rispetto all'olio di oliva.

A questo punto abbiamo desiderato, per meglio caratterizzare l'olio in esame, eseguire lo spettro di RMN sull'olio stesso e confrontarlo con gli spettri di campioni di trioleina e di olio di oliva, in base a quanto proposto da L. F. JOHNSON e J. N. SHOOLERY (4).

È interessante a questo proposito poter stabilire se tale metodo consenta fornire elementi per lo studio di trigliceridi, dato che la letteratura su questo argomento è ancora agli inizi.

Effettuando lo spettro RMN in tetracloruro di carbonio si osserva che si ha nei tre casi una sostanziale similitudine (fig. 3). In particolare:

Il tripletto a  $\delta = 5,30$  ppm, circa, va attribuito ai protoni olefinici (del doppio legame dell'acido oleico), come pure al gruppo CH del gruppo CHOCO del gliceride.

Il tripletto a  $\delta = 4,20$  ppm va attribuito ai protoni  $\text{CH}_2$  del gruppo  $\text{CH}_2\text{OCO}$ .

I due doppietti a  $\delta = 2,0$ , circa, si possono attribuire rispettivamente ai gruppi  $\text{CH}_2$  in  $\alpha$  al carbonile e ai  $\text{CH}_2$  con doppio legame, cioè  $-\text{CH}_2-\text{C}=\text{}$ .

Il massimo a  $\delta = 1,4$  ppm va attribuito ai gruppi  $\text{CH}_2$  della catena alifatica e quello a 0,9 ppm, ai 3 gruppi metilici terminali.

Non si osserva, nello spettro dell'oleina, la presenza di gruppi  $=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{C}=\text{}$  attribuibili ad acido linoleico o linolenico, come si riscontrano nell'olio di lino e in minore misura nell'olio girasole (4).



La stessa assenza si nota nell'olio di seje, mentre nell'olio di oliva si ha una leggerissima incurvatura, in corrispondenza di  $\delta = 3,3$  ppm, corrispondente ad un più elevato contenuto di tali acidi con due doppi legami.

C'è da tenere presente, come abbiamo osservato in ricerche in corso, che con la RMN, in queste condizioni, è possibile con sufficiente approssimazione stabilire la presenza di alcuni gruppi, in particolare ossidrili, negli oli, solo quando questi superino il 10 % degli altri gruppi presenti. Pertanto tali differenze potrebbero essere messe in evidenza meglio con altre tecniche. Infatti, nell'intento di studiare gliceridi misti, con la spettrografia di RMN, abbiamo potuto osservare che l'aggiunta ai trigliceridi, di piccole percentuali di un monogliceride o di un digliceride, non si riesce a mettere in evidenza, mentre ciò è possibile quando le percentuali sono più alte, come è stato messo in evidenza da D. CHAPMAN (5).

#### PARTE SPERIMENTALE

L'olio, ottenuto dai semi di seje, si presenta di fluidità normale, di colore giallo chiaro e di sapore non sgradevole.

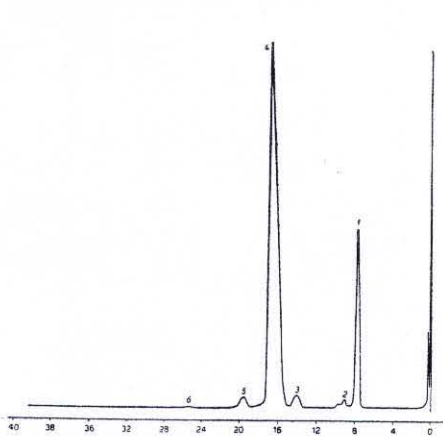


Fig. 1. — Cromatografia in fase di vapore degli esteri metilici degli acidi grassi dell'olio di seje: 1) ac. palmitico; 2) ac. palmitoleico; 3) ac. stearico; 4) ac. oleico; 5) ac. linoleico; 6) ac. linolenico.

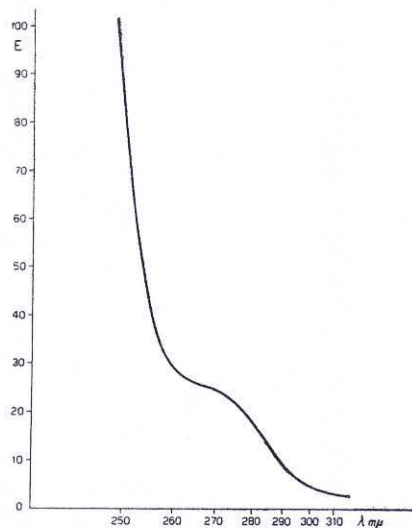


Fig. 2. — Curva di assorbimento dell'olio di seje nel U. V.: conc. 0,5 % in isoottano.

Gli indici analitici, riscontrati nei campioni in nostro possesso, sono riuniti nella tabella 1, e come si vede sono del tutto analoghi a quelli medi presentati dall'olio di oliva.



Abbiamo quindi esaminato la miscela degli acidi grassi, sottoponendo a cromatografia in fase di vapore gli esteri metilici degli acidi grassi ottenuti dall'olio di seje mediante interesterificazione con alcool metilico. A questo scopo si è proceduto come segue <sup>(3)</sup>:

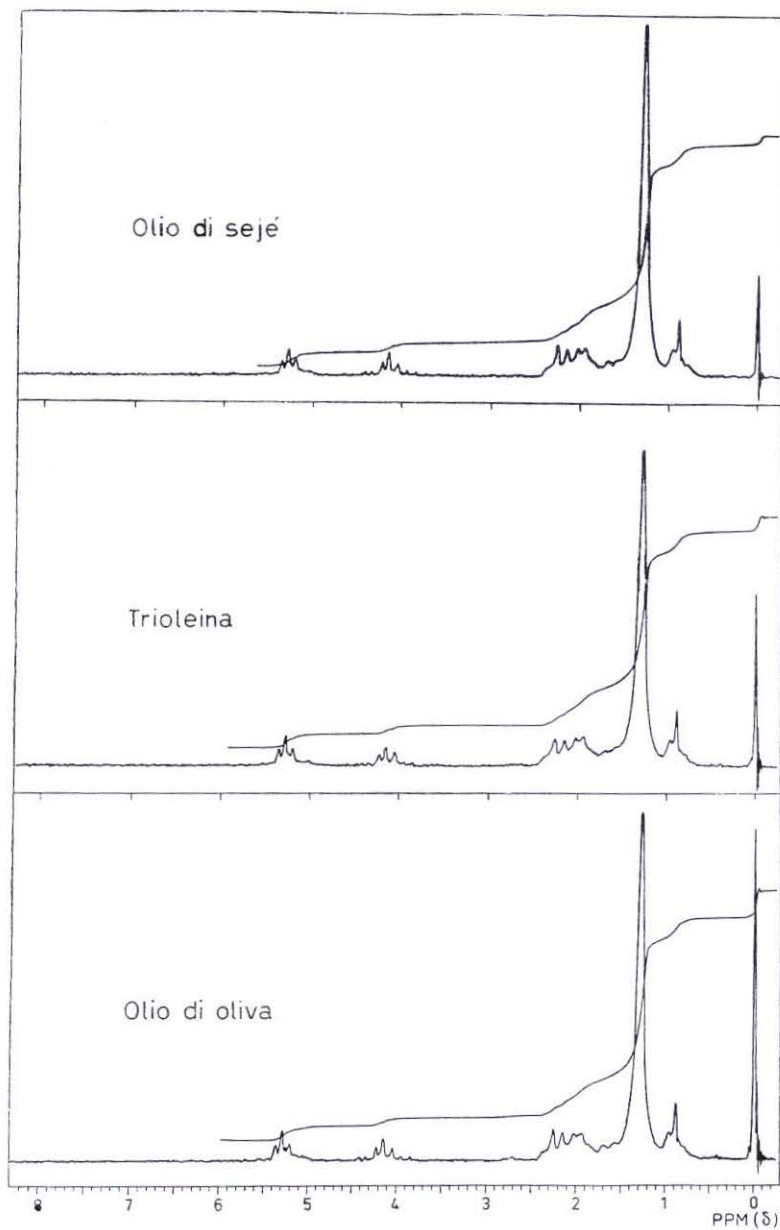


Fig. 3. — Spettri di RMN dell'olio di seje, dell'olio di oliva e della trioleina.

Grammi 2 di olio, posti in un palloncino da 50 cm<sup>3</sup> e addizionati di 35 cm<sup>3</sup> di alcool metilico anidro e di 3,5 cm<sup>3</sup> di soluzione all'1 % di metilato sodico in alcool metilico, sono stati fatti bollire a ricadere per 3 ore, con refrigerante munito all'estremità di un tubicino a calce sodata.

La soluzione metanolica è stata quindi trasferita in imbuto separatore da 150 cm<sup>3</sup>, addizionata di 100 cm<sup>3</sup> di acqua e la soluzione idroalcolica torbida è stata successivamente estratta per due volte con 50 cm<sup>3</sup>, per volta, di etere etilico. Gli estratti eterici riuniti sono stati lavati per due volte con 20 cm<sup>3</sup> di acqua, essiccati poi per aggiunta di qualche grammo di solfato di sodio anidro ed infine trasferiti in un palloncino da 150 cm<sup>3</sup>. L'etere è stato quindi allontanato per distillazione, ottenendosi un residuo costituito dagli esteri metilici degli acidi grassi.

Questi sono stati sottoposti a cromatografia in fase di vapore, usando un apparecchio Perkin Elmer 116 E.

Le condizioni gascromatografiche erano le seguenti: colonna in acciaio inox, diam. mm 4/6, lungh. m 3, riempita con Cromosorb W silanizzato, imbibito col 20 % di poliestere dell'acido succinico con glicole etilenico, preparato secondo Craig (3).

Temp. della colonna 210°C.

Gas di trasporto: elio, 7 l/h.

Il cromatogramma ottenuto è riportato in fig. 1 e nella tabella 2 sono riportate le percentuali degli acidi grassi ricavate dal cromatogramma. L'analogia con la composizione dell'olio di oliva risulta in maniera evidente dal confronto con la colonna 2 della tabella in cui sono stati riportati i valori medi delle percentuali degli acidi grassi presenti nell'olio di oliva.

In fig. 2 viene riportata la curva dell'ass. in U.V., ottenuta con spettrofotometro Beckmann DK 1 a doppio raggio.

Gli spettri di RMN sono stati eseguiti con apparecchio Varian A 60, sul campione disciolto in tetracloruro di carbonio.

#### BIBLIOGRAFIA

- (1) PEREZ ARBELAEZ E. - Plantas utiles de Colombia, Rolfan (Bogotà), pag. 575 (1956).
- (2) PEREIRA PINTO G. - O oleo de patana, seu estudio quimico, Boletin do Instituto Agronomico do Norte, 23 (1951).
- (3) ANSELMI S., BONIFORTI L. e MONACELLI R. - Olearia, 14, 47 (1960).
- (4) JOHNSON L. F. e SHOOLERY J. N. - Anal. Chem., 34, 1136 (1962).
- (5) CHAPMAN D. - J. Chem. Soc., 131 (1963).

## Preparazione di glucosio-6-fosfato uniformemente marcato con $^{14}\text{C}$ (\*)

PEPPINO BETTO e LUIGI LONGINOTTI

*Centro Internazionale di Chimica Microbiologica*

**Riassunto.** — È descritto un metodo di preparazione enzimatica di glucosio-6-fosfato uniformemente marcato con  $^{14}\text{C}$ .

Nell'incubazione del  $^{14}\text{C}$ -glucosio con esochinasi da lievito, oltre al  $^{14}\text{C}$ -glucosio-6-fosfato si formano anche altri prodotti radioattivi tra i quali, in maggior quantità, il  $^{14}\text{C}$ -fruttosio-6-fosfato.

Il  $^{14}\text{C}$ -glucosio-6-fosfato ed eventualmente il  $^{14}\text{C}$ -fruttosio-6-fosfato così formati, vengono purificati mediante cromatografie su colonne di resina a scambio ionico.

**Summary.** — A method of enzymatic preparation of uniformly  $^{14}\text{C}$ -labeled glucose-6-phosphate is described.

By incubation of  $^{14}\text{C}$ -glucose with yeast hexokinase, radioactive compounds in addition to  $^{14}\text{C}$ -glucose-6-phosphate were produced, among which  $^{14}\text{C}$ -fructose-6-phosphate was present in the largest quantity.

The  $^{14}\text{C}$ -glucose-6-phosphate and  $^{14}\text{C}$ -fructose-6-phosphate were purified by means of chromatography on ion exchange resin columns.

---

Proseguendo gli studi sul metabolismo intermedio dei carboidrati, abbiamo dovuto preparare una certa quantità di glucosio-6-fosfato (\*\*) uniformemente marcato con  $^{14}\text{C}$ .

Il  $^{14}\text{C}$ -glucosio-6-fosfato era finora preparato in questo laboratorio secondo L. LONGINOTTI e F. POCCHIARI (1). Con questo metodo la purificazione del prodotto era ottenuta mediante successive cromatografie su carta; ciò necessariamente limitava il metodo, alla preparazione di piccole quantità di prodotto.

---

(\*) Questo lavoro è apparso in *Gazz. Chim. Ital.*, 93, 1191 (1963).

(\*\*) In seguito verranno usate le seguenti abbreviazioni: G-6-P = Glucosio-6-fosfato; F-6-P = Fruttosio-6-fosfato; ATP = Adenosintrifosfato; ADP = Adenosindifosfato.



Abbiamo quindi messo a punto un metodo di preparazione nel quale l'isolamento del G-6-P è ottenuto mediante cromatografie su colonna a scambio ionico. Come si vedrà in seguito, nella miscela incubata si formano, a causa dei già notati enzimi contenuti come impurezze nell'esochinasi da lievito (1), insieme al G-6-P anche altri prodotti marcati fra i quali in maggior quantità il F-6-P; quest'ultimo prodotto è stato anche esso isolato in forma pura e raccolto allo stato secco.

## PARTE SPERIMENTALE

### *Prodotti e metodi analitici.*

*D-glucosio* uniformemente marcato  $^{14}\text{C}$  è stato fornito da « The Radiochemical Centre » di AMERSHAM, con un'attività specifica di circa  $20 \mu\text{C}/\text{mg}$ .

*Esochinasi* da lievito (tipo II) è stata fornita dalla Ditta Sigma.

*Resina a scambio ionico.* — È stata usata la resina anionica forte DOWEX 1-X8,  $\text{Cl}^-$ , 200/400 mesh. Prima dell'uso la resina è stata posta in acqua e riscaldata per 5 minuti a  $100^\circ\text{C}$ ; dopo questo trattamento, dalla resina sono state eliminate le particelle più fini mediante successive decantazioni. La resina è stata posta in colonna e trattata prima con  $\text{NaOH}$  2 N e poi con  $\text{HCl}$  2 N; dopo ogni trattamento la resina è stata lavata con  $\text{H}_2\text{O}$  fino alla neutralità.

Quando la resina è stata usata in forma di formiato, nella colonna di resina, dopo i trattamenti suddetti, è stata fatta passare una soluzione di formiato di sodio 2 M fino a scomparsa di  $\text{Cl}^-$  nel percolato; l'eccesso di formiato è stato poi eliminato mediante ripetuti lavaggi con  $\text{H}_2\text{O}$ .

*Metodi analitici.* — La determinazione del glucosio è stata eseguita mediante il metodo colorimetrico dell'antrone (2).

Il G-6-P è stato determinato enzimaticamente con glucosio-6-fosfato-deidrogenasi (3) ed il F-6-P, sempre enzimaticamente, con una miscela di glucosio-6-fosfato-deidrogenasi e di fosfo-esoso-isomerasi (4).

L'acido formico è stato determinato mediante riduzione a formaldeide e reazione con acido cromotropico (5).

L'acido borico è stato determinato titolandolo come complesso mannitolo-acido borico (6).

*Misure della radioattività.* — Tutte le misure radioattive sono state eseguite su scodellino mediante un contatore Geiger a finestra di mica. Gli eluati sono stati raccolti in frazioni di circa ml 15 su un collettore automatico di frazioni ed è stata misurata la radioattività di un'aliquota di ciascuna frazione dopo evaporazione della stessa su scodellino sotto una lampada a raggi infra-rossi.



*Controllo della purezza delle sostanze mediante cromatografia su carta.* — Sia il G-6-P che il F-6-P ottenuti, sono stati cromatografati su carta Whatman 1 accanto ai prodotti puri, usando le seguenti due miscele di solventi: alcool butilico terziario: acido picrico: H<sub>2</sub>O (80: 4: 20) e alcool iso-propilico: ammoniaca (d 0,900): H<sub>2</sub>O (45: 35: 15) (?).

Gli Rf delle sostanze sono stati identici a quelli delle sostanze pure ed inoltre sia il G-6-P che il F-6-P hanno dato una singola macchia radioattiva.

#### PREPARAZIONE

Sono stati incubati per 2 ore a 37°C ml 31 di una soluzione a pH 8,2 contenente mg 25,2 di glucosio uniformemente marcato <sup>14</sup>C (0,5 mC), mg 125 di ATP sale sodico, circa mg 2 di esochinasi e MgCl<sub>2</sub> ad una concentrazione finale 0,01 M.

Dopo incubazione la soluzione è portata a ml 250 con H<sub>2</sub>O e quindi è fatta passare in una colonna di circa ml 20 (∅: cm 1,3; h: cm 15) di DOWEX 1-X8, Cl<sup>-</sup>, 200/400 mesh alla velocità di ml 0,5/min. Dopo l'adsorbimento la resina è lavata con circa ml 20 di H<sub>2</sub>O.

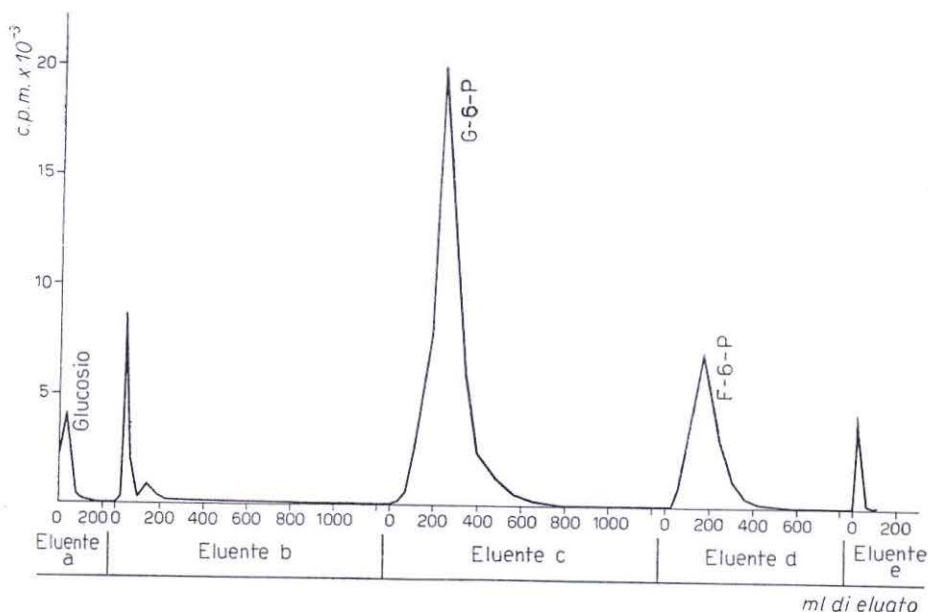


Fig. 1. — Cromatografia su Dowex 1-X8, Cl<sup>-</sup>, 200/400 mesh, delle sostanze radioattive presenti dopo incubazione con esochinasi e <sup>14</sup>C-glucosio. Eluente a: NH<sub>4</sub>OH 0,001 M; eluente b: NH<sub>4</sub>Cl 0,025 M + K<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub> 0,01 M; eluente c: NH<sub>4</sub>Cl 0,035 M + K<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub> 0,001 M + NH<sub>4</sub>OH 0,0025 M; eluente d: NH<sub>4</sub>Cl 0,04 M + K<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub> 0,00001 M + NH<sub>4</sub>OH 0,0025 M; eluente e: HCl N.

L'eluizione della resina è effettuata a temperatura ambiente, ad una velocità di ml 1-2/min., con i tamponi (a), (b), (c), (d) già descritti (8); dopo il tampone (d) però, nella colonna sono fatti passare circa ml. 100 di HCl N al fine di eliminare ogni impurezza formatasi e non eluita con l'eluente (b).

La separazione cromatografica completa delle sostanze radioattive presenti dopo incubazione è mostrata in fig. 1; come si vede oltre al picco del G-6-P ed a quello del glucosio che non ha reagito, sono presenti altri picchi — tra i quali il maggiore è quello del F-6-P — dovuti ad impurezze che si sono formate durante l'incubazione.

Le frazioni radioattive costituenti il picco del G-6-P, ed eventualmente se lo si desidera anche quelle del picco del F-6-P (notandosi in quest'ultimo caso che i successivi trattamenti sono identici sia per il G-6-P che per il F-6-P), vengono riunite, la soluzione è diluita 1:1 con H<sub>2</sub>O ed, al fine di eliminare il tampone, fatta passare in una colonna di circa ml 55 (Ø: cm 1,7; h: cm 25) di DOWEX 1-X8, HCOO<sup>-</sup>, 200/400 mesh ad una velocità di ml 0,5-1/min. Dopo aver lavato la resina con circa ml 100 di HCOOH 0,0001 N, che elimina le ultime tracce di H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> non passate nel percolato, il G-6-P viene eluito con circa 12 di HCOOH 0,7 N ad una velocità di circa ml 1/min.

Dopo aver individuato il picco radioattivo, le frazioni che lo costituiscono vengono riunite e concentrate sotto vuoto fino a piccolo volume ad una temperatura di 30°-35°C, mediante un evaporatore rotante.

Al fine di eliminare la maggior parte dell'HCOOH, il concentrato viene ripreso con ml 50 di H<sub>2</sub>O e di nuovo concentrato per tre volte; alla fine si porta a secco in essiccatore sotto vuoto su P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> e KOH ed il residuo è estratto per 3 volte, ciascuna volta con ml 20 di etere etilico; in questa maniera anche

TABELLA I

## Distribuzione della radioattività nelle varie frazioni

(I risultati sono espressi in c. p. m. × 10<sup>-3</sup>)

Frazioni	Prima della incubazione	I colonna	II colonna	Finale
Glucosio . . . . .	4200	296		
Impurezze . . . . .		650	104	
G-6-P . . . . .		2.680	2.480	2.405
F-6-P . . . . .		470	440	425
	4200	4.096		

le ultime tracce di HCOOH eventualmente rimaste, vengono eliminate. L'etere è infine eliminato per evaporazione alla pompa. Il G-6-P ed eventualmente il F-6-P così ottenuti, risultano esenti da HCOOH, e cromatograficamente puri.

Come si vede nella tabella, la resa finale in glucosio trasformato è del 57 % per il G-6-P e del 10 % per il F-6-P. Dalla tabella si vede inoltre che le maggiori perdite sono dovute a prodotti radioattivi che si formano nella incubazione a causa di impurezze enzimatiche — principalmente fosfo-esosomerasi — presenti nell'esochinasi da lievito (9).

#### BIBLIOGRAFIA

- (1) LONGINOTTI L. e POCCHIARI F. - Rend. Ist. Super. Sanità, 19, 791 (1956).
- (2) DREYWOOD R. - Ind. Eng. Chem., anal. Ed., 18, 499 (1946).
- (3) KORNBERG A. - J. Biol. Chem., 136, 805 (1950).
- (4) SLEIN M. W. - J. Biol. Chem., 186, 753 (1950).
- (5) KOLTHOFF I. M. e SANDELL E. B. - Textbook of Quantitative Inorganic Analysis rev. ed., Macmillan, New York, 1946, pag. 560.
- (6) GRANT W. M. - Anal. Chem., 20, 267 (1948).
- (7) HANES C. S. e ISHERWOOD F. A. - Nature, 164, 1107 (1949).
- (8) LONGINOTTI L., BELOFF-CHAIN A., BETTO P., CATANZARO R., CHAIN E. B., MASI I. e POCCHIARI F. - Gen. Comp. Endocrinol., 1, 541 (1961).
- (9) DIPIETRO D. L., SHARMA G. e WEIJNHOUSE S. - Biochemistry, 1, 455 (1962).