

**Cromatografia su lunga colonna di allumina  
e spettrofotometria di idrocarburi aromatici policiclici**

GIUSEPPINA SCASSELLATI SFORZOLINI (\*), FRANCESCO PASCASIO,  
EUGENIO MARCHESOTTI e MARIA NOVELLA CHIUCCHIÙ

*Istituto di Igiene dell'Università degli Studi di Perugia*

**Riassunto.** — Sono state studiate le interferenze di vari idrocarburi presenti in un miscuglio ed è stato messo a punto un metodo di separazione, che permetta la loro determinazione quantitativa nel miscuglio stesso.

La separazione cromatografica su lunga colonna di allumina, seguita da successive ulteriori cromatografie su colonne più piccole, offre la possibilità di ottenere abbastanza bene separati i vari costituenti in esame, che per la massima parte possono essere identificati e dosati con notevole esattezza.

**Summary.** (*Chromatography on long alumina column and spectrophotometry of polycyclic aromatic hydrocarbons*). — The interferences of various hydrocarbons present in a mixture were studied and a method of separation was developed which permits their measurement within the mixture.

To this end, investigations were carried out in three steps :

1° Spectrophotometric analysis of 15 pure polycyclic aromatic hydrocarbons chosen among those most frequently found in tobacco smoke, dissolved in cyclohexane and examined from 450 m $\mu$  to 215 m $\mu$ . The spectra obtained were utilized for both qualitative detection and quantitative analysis of the hydrocarbons under examination. The characteristic maximum wavelength of each hydrocarbon and its respective standard optical height are given (Tables 1 and 2).

2° Spectrophotometric analysis of several mixtures of the same pure hydrocarbons (in groups of two and four) in order to study the qualitative and quantitative interferences of each upon the others (Figs. 1-3).

3° Chromatographic separation, by means of long alumina column, of the mixture of the 15 pure hydrocarbons, followed by the spectrophotometric measurement of the eluates obtained.

(\*) Già ospite dei Laboratori di Chimica Terapeutica dell'Istituto Superiore di Sanità.

The chromatographic separation through long alumina column, followed by further chromatographies using shorter columns, permits a fairly good separation of the various constituents under examination, most of which can be identified and measured with remarkable accuracy (Fig. 4).

#### PARTE GENERALE

La determinazione degli idrocarburi aromatici policiclici ha assunto grande interesse, da quando questi composti sono stati riconosciuti importanti agenti dell'inquinamento atmosferico sia di origine industriale e domestica, sia derivanti dalla combustione di carburanti per motori a scoppio. Questi stessi composti sono stati inoltre ritrovati nel fumo di tabacco e vengono prodotti anche durante la combustione di altre sostanze organiche, sia vegetali che animali.

Molti idrocarburi aromatici policiclici presentano attività cancerigena, dimostrata sperimentalmente su larga scala, sostenendo così un ruolo molto importante nella etiologia dei tumori maligni.

La loro determinazione, però, risulta assai laboriosa, poichè essi sono numerosissimi [HARTWELL (1951) ne ha descritti 2108] e presentano caratteristiche chimiche molto simili. Inoltre non si ritrovano quasi mai isolati, ma mescolati ad un numero notevolissimo di altri costituenti, che ne ostacolano ancor più la determinazione.

Le metodiche di analisi maggiormente usate sono per lo più basate sulla loro separazione per via cromatografica e sul dosaggio con metodo spettrofotometrico o fluorimetrico.

La *cromatografia su colonna* e la successiva *analisi spettrofotometrica o fluorimetrica* degli eluati nella determinazione degli idrocarburi policiclici è stata seguita da moltissimi Autori, che si sono interessati della ricerca di questi composti nel fumo di tabacco, nell'aria inquinata, negli alimenti ed anche nelle acque e nel suolo. Fra le indagini eseguite nel fumo di tabacco citiamo soltanto quelle più recenti di CANDELI, LINDSEY & PERSAUD (1960), di HOFFMAN & WYNDER (1960 a; b) e di SCASSELLATI SFORZOLINI & MARIANI (1961 a; b).

Per quanto riguarda la determinazione di questi composti nell'aria ricordiamo le ricerche presentate al Simposio sugli Inquinamenti atmosferici tenutosi ad Atlantic City nel New Jersey nel settembre del 1959 (SYMPOSIUM ON POLYCYCLIC HYDROCARBONS, 1960) ed i lavori di STOCKS, COMMINS & AUBREY (1961), di LINDSEY & STANBURY (1962), di VALORI, MELCHIORRI & VESCIA (1963), di GRAHAM (1963) e di HETTCH (1964).

SEPPILLI & SCASSELLATI SFORZOLINI (1963) si sono serviti della cromatografia su colonna e del successivo esame spettrofotometrico per la ricerca degli idrocarburi policiclici nella carne cotta alla graticola e nel fumo da essa prodotto durante l'arrostimento.

BORNEFF & FISCHER (1961; 1962 a; b; c; d; 1963) e BORNEFF & KUNTE (1963; 1964) hanno utilizzato la stessa tecnica per evidenziare questi composti nelle acque e nel suolo.

Fra gli autori che si sono serviti, invece, della *cromatografia su carta* ricordiamo quelli che hanno presentato lavori al Simposio sopra menzionato ed ancora HOFFMANN & WYNDER (1960 a; b), SCASSELLATI SFORZOLINI & MARIANI (1961 a; b) e GALŮSKINOVÁ (1964).

Abbastanza recentemente si è imposta all'interesse dei ricercatori, anche in questo campo di indagine, la *cromatografia su strato sottile*. Con essa hanno sperimentato BADGER, DONNELLY & SPOTSWOOD (1963), KUCHARCZYK, FOHL & VYMETAL (1963), BERG & LAM (1964) e SAWICKI, ELBERT & STANLEY (1965).

Tra le tecniche cromatografiche che hanno offerto i migliori risultati nella determinazione degli idrocarburi aromatici policiclici è importante ricordare la *cromatografia in fase gassosa*, della quale si sono serviti vari autori negli ultimi anni. Ricordiamo LIBERTI, CARTONI & CANTUTI (1964), LIBERTI & CANTUTI (1964) e CANTUTI *et al.* (1965).

Il presente lavoro descrive la messa a punto del dosaggio di 15 fra i più interessanti idrocarburi policiclici presenti nel fumo di tabacco, separati mediante lunga colonna di allumina.

#### PARTE SPERIMENTALE

In lavori precedentemente eseguiti nel nostro Istituto (SCASSELLATI SFORZOLINI & SALUCCI, 1958; SCASSELLATI SFORZOLINI & MARIANI, 1961 a; b; SCASSELLATI SFORZOLINI & SALDI, 1961), si era osservato che la determinazione degli idrocarburi policiclici nel fumo di sigaretta risultava sempre particolarmente laboriosa a causa della composizione complessa e varia del fumo e a causa della interferenza dei diversi componenti nell'esame spettrofotometrico. Infatti usando colonne cromatografiche corte la separazione dei vari composti non è mai completa e spesso gli eluati si presentano colorati in giallo; questo colore non è dovuto a bande specifiche, ma costituisce un fondo continuo, che rende ancor più difficile il dosaggio.

Si è ritenuto perciò interessante mettere a punto un metodo che, innanzi tutto, permettesse di separare il più possibile i costituenti del miscuglio in esame. Per raggiungere lo scopo propostoci abbiamo proceduto per tre gradi di indagini:

Analisi allo spettrofotometro Beckman DK 2 a registrazione automatica di 15 idrocarburi aromatici policiclici puri, scelti tra quelli più frequentemente ritrovati nel fumo di tabacco, disciolti in cicloesano ed esaminati a lunghezze d'onda da 450 a 215 m $\mu$ . I grafici ottenuti sono stati utilizzati sia per il riconoscimento qualitativo, che per l'analisi quantitativa degli idrocarburi in esame.

Analisi spettrofotometrica di miscele degli stessi idrocarburi puri (a gruppi di due e di quattro), al fine di studiare le interferenze qualitative e quantitative degli uni sugli altri.

Separazione cromatografica su lunga colonna di allumina della miscela dei 15 idrocarburi puri e successiva determinazione spettrofotometrica degli eluati, ottenuti dalla cromatografia su colonna.

*Determinazione spettrofotometrica degli idrocarburi policiclici puri.*

Gli idrocarburi utilizzati sono elencati nella Tab. 1.

TABELLA 1

**Massimi caratteristici di 15 idrocarburi policiclici.**

Idrocarburi (*)	Lunghezze d'onda dei massimi in m $\mu$						
Acenaftene . . . . .	228,5	278	288,5	300	306	320	
Fluorene . . . . .	221,5	227	254,5	261	265	273	289
	294	300					
Fenantrene . . . . .	220,5	244	251,5	274	280,7	292,5	
Antracene . . . . .	246	252,7	351	356	369	375	
Pirene . . . . .	231,5	238	241	262	272,5	305	318,5
	331	334,2					
Fluorantene . . . . .	229	236	253	262	271	276	281,5
	287	322	341	357,5			
1:2-Benzoantracene . .	221	229	250	257	267,5	277,5	288,2
	298,5	327	341	357	383		
3:4-Benzopirene . . . .	220	227	254,5	265,5	272,5	284	296
	329	345,5	363	379	383	392	402
1:2-Benzopirene . . . .	222,8	237	256,5	266,5	277,5	288,5	302
	316	330,5					
3:4-Benzofluorantene . .	239	246	256,5	276,5	281	289	293
	301	339	349	358	367	377,5	401
1:12-Benzoperilene . . .	222,5	288	299	328	344,5	362	383
1:2-3:4-Dibenzoantracene	218	241	247,5	256	265	275,5	286,3
	308	323	333	350	373		
1:2-5:6-Dibenzoantracene	221,75	232,5	273	278	286	297	320
	332	348	362	373	383	394	
Antantrene . . . . .	232,5	253,5	258	293,5	306	380	399
	404	420	428				
Coronene . . . . .	278,5	289,5	297,5	302	313	316	323
	333	338	343	353	383	408	

(\*) In ordine di sequenza cromatografica con solvente cicloesano.

Per ciascun idrocarburo è stata preparata una soluzione in cicloesano alla concentrazione di  $1\gamma/\text{ml}$ , che è stata esaminata allo spettrofotometro Beckman DK 2 in celle di quarzo dello spessore di 1 cm e del volume di 3 ml. Il cicloesano utilizzato (Carlo Erba RS per spettrofotometria) risultava assolutamente puro all'esame spettrofotometrico.

L'analisi spettrofotometrica dei singoli idrocarburi è stata eseguita da 450 a 340  $m\mu$  usando una lampada a filamento di tungsteno e la *scale expansion* a  $2\times$ ; da 340 a 215  $m\mu$  usando una lampada a idrogeno e la *scale expansion* a  $1\times$ . I valori di fenditura in partenza con la *sensitivity* a 0,12 e il *photomultiplier* a  $1\times$  erano di 0,025 mm alla lunghezza d'onda di 450  $m\mu$  e di 0,22 mm alla lunghezza d'onda di 340  $m\mu$ .

Per tutti gli idrocarburi sono stati determinati i valori di assorbanza e nella Tab. 1 sono trascritte le lunghezze d'onda espresse in  $m\mu$ , alle quali gli idrocarburi analizzati hanno presentato massimi caratteristici.

Per il dosaggio sono stati scelti per ciascun idrocarburo i massimi maggiormente significativi. Per questa determinazione ci siamo serviti della formula descritta da SCASSELLATI SFORZOLINI & MARIANI (1961 a; b) che si basa sulla determinazione per ciascun massimo dell'altezza ottica standard (AOS) di COMMINS & LINDSEY (1956), fondata sul calcolo della linea basale di COOPER (1954), successivamente modificata da COMMINS (1958 b), riferita ad una soluzione contenente  $1\gamma$  di idrocarburo per ml.

La formula applicata a ciascun massimo caratteristico è la seguente:

$$\text{AOS} = a - \frac{(b_1 + b_2)}{2}$$

dove: AOS = altezza ottica standard riferita ad una soluzione contenente  $1\gamma/\text{ml}$  di idrocarburo;

a = densità ottica dell'apice della punta;

$b_1$  = densità ottica di una base;

$b_2$  = densità ottica dell'altra base.

Per questa valutazione abbiamo preso, come linee di base, bande della larghezza di 4-8  $m\mu$ ; le lunghezze d'onda corrispondenti ai punti di base dei massimi più caratteristici di ciascun idrocarburo e le rispettive altezze ottiche standard sono riportate nella Tab. 2. Per l'antracene e per l'1 : 2-3 : 4-dibenzoantracene i valori delle AOS sono riferiti a soluzioni contenenti 0,5  $\gamma/\text{ml}$  di idrocarburo.

TABELLA 2

Altezze ottiche standard corrispondenti ai massimi più caratteristici di 15 idrocarburi

Idrocarburi (*)	Lun- ghezza d'onda (**) (m $\mu$ )	Altezza ottica stan- dard (AOS)						
Acenaftene . . . . .	224,5		318,0					
	228,5	0,374	320,0	0,006				
	232,5		322,0					
Fluorene . . . . .	297,0							
	300,0	0,046						
	303,0							
Fenantrene . . . . .	247,5		290,5					
	251,5	0,131	292,5	0,042				
	255,5		294,5					
Antracene (***) . . . . .	248,7		352,0		371,0			
	252,7	0,395	356,0	0,009	375,0	0,014		
	256,7		360,0		379,0			
Pirene . . . . .	239,0		268,5		314,5		331,2	
	241,0	0,094	272,5	0,116	318,5	0,043	334,2	0,096
	243,0		276,5		322,5		337,2	
Fluorantene . . . . .	285,0							
	287,0	0,102						
	289,0							
1 : 2-Benzotracene . . . . .	273,5		284,2					
	277,5	0,248	288,2	0,433				
	281,5		292,2					
3 : 4-Benzopirene . . . . .	292,0		379,0		399,0			
	296,0	0,186	383,0	0,055	402,0	0,015		
	300,0		387,0		405,0			
1 : 2-Benzopirene . . . . .	273,5		284,5		328,0			
	277,5	0,088	288,5	0,158	330,5	0,089		
	281,5		292,5		333,0			
3 : 4-Benzofluorantene . . . . .	299,0							
	301,0	0,091						
	303,0							

(\*) In ordine di sequenza cromatografica con solvente cicloesano.

(\*\*) In corsivo la lunghezza d'onda del massimo più caratteristico su cui è stato fatto il calcolo dell'AOS, in tondo la lunghezza d'onda delle basi.

(\*\*\*) Per l'antracene e per l'1 : 2-3 : 4-dibenzoantracene i valori delle AOS sono riferiti a soluzioni contenenti 0,5  $\gamma$ /ml di idrocarburo.

Segue TABELLA 2

Idrocarburi (*)	Lun- ghezze d'onda (**) (m $\mu$ )	Altezza ottica stan- dard (AOS)						
1:12-Benzoperilene . . . . .	295,0	0,157	358,0	0,028	380,0	0,038		
	299,0		362,0		383,0			
	303,0		366,0		386,0			
1:2-3:4-Dibenzoantracene (***) . . . . .	272,5	0,116	282,3	0,333				
	275,5		286,3					
	278,5		290,3					
1:2-5:6-Dibenzoantracene .	293,0	0,483	346,0	0,019				
	297,0		348,0					
	301,0		350,0					
Antantrene . . . . .	302,0	0,232	417,0	0,083	426,0	0,138		
	306,0		420,0		428,0			
	310,0		423,0		430,0			
Coronene . . . . .	287,5	0,106	298,0	0,645	336,0	0,120		
	289,5		302,0		338,0			
	291,5		306,0		340,0			

Per le note vedere a pagina precedente.

### *Determinazione spettrofotometrica di miscele di due e quattro idrocarburi policiclici.*

Per mettere in evidenza le eventuali interferenze fra idrocarburi a struttura simile e perciò a comportamento cromatografico e spettrofotometrico assai vicini, abbiamo miscelato tra di loro i 15 idrocarburi a gruppi di 2 e di 4, secondo la sequenza teorica precedentemente riportata.

#### *Miscela di due idrocarburi.*

Nella preparazione delle soluzioni in cicloesano di ciascuna coppia, abbiamo miscelato i due idrocarburi in modo da avere per ciascuno di essi una concentrazione finale di 0,5  $\gamma$ /ml. Le 14 coppie sono state analizzate allo spettrofotometro Beckman DK 2; sui grafici sono stati ricercati e dosati gli idrocarburi presenti.

Dalla lettura dei grafici si possono trarre alcune deduzioni, che riportiamo qui di seguito per ciascuna coppia:

a) *acenaftene + fluorene*: il grafico ha riportato fedelmente i picchi caratteristici dei due idrocarburi, ma non nei suoi valori quantitativi;

b) *fluorene + fenantrene*: il grafico ha riportato fedelmente i picchi caratteristici dei due idrocarburi, ma l'analisi quantitativa è realizzabile solo per il fluorene a 300  $m\mu$  e per il fenantrene a 292,5  $m\mu$ ;

c) *fenantrene + antracene*: il grafico ha riportato fedelmente i picchi caratteristici. A 252,7  $m\mu$  si sommano il picco del fenantrene (251,5  $m\mu$ ) e quello dell'antracene (252,7  $m\mu$ ). Il fenantrene può essere dosato a 292,5  $m\mu$  e l'antracene a 356  $m\mu$  oppure a 375  $m\mu$  (Fig. 1);

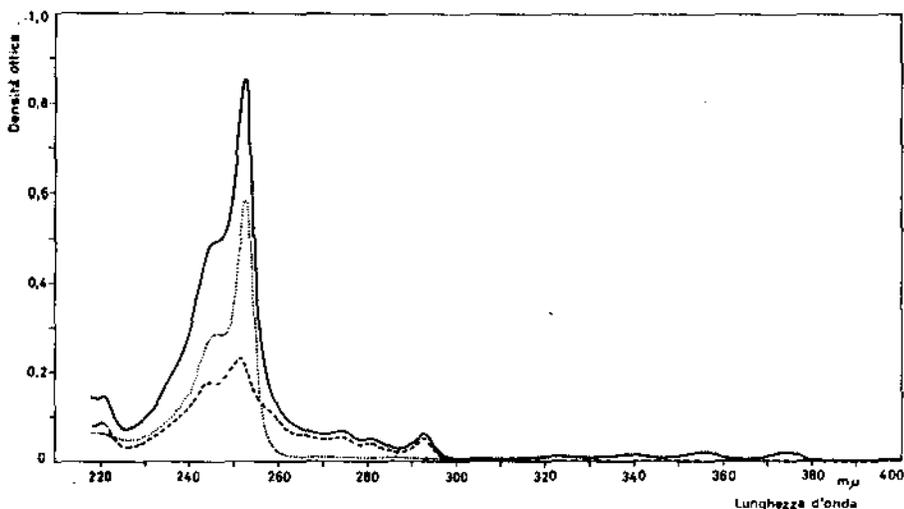


Fig. 1. — Spettri di assorbimento dell'antracene (.....), del fenantrene (---) e della miscela dei due idrocarburi (—), alla concentrazione di 0,5  $\gamma/ml$ .

d) *antracene + pirene*: il grafico ha riportato abbastanza fedelmente i picchi caratteristici dei due idrocarburi, che però non possono essere esattamente dosati alle loro punte più significative;

e) *pirene + fluorantene*: il grafico ha riportato fedelmente i picchi caratteristici, ma la valutazione quantitativa non è effettuabile per interferenza tra i due idrocarburi;

f) *fluorantene + 1:2-benzoantracene*: il grafico ha riportato fedelmente solo alcuni picchi caratteristici, sui quali non è possibile fare la determinazione quantitativa;

g) *1:2-benzoantracene + 3:4-benzopirene*: il grafico ha riportato abbastanza fedelmente i picchi caratteristici, ma il dosaggio di entrambi gli idrocarburi non è realizzabile, in quanto essi interferiscono nei picchi più significativi. Infatti i massimi a 296 e 284  $m\mu$  del 3:4-benzopirene interferiscono con il picco a 288,2  $m\mu$  dell'1:2-benzoantracene. Il 3:4-benzopirene, però, può essere dosato a 383 e 402  $m\mu$ ;

h) *3:4-benzopirene + 1:2-benzopirene*: il grafico ha riportato abbastanza fedelmente i picchi caratteristici, ma il dosaggio non è realizzabile per tutti e due gli idrocarburi, perchè le bande a 288,5 e 277,5  $m\mu$  dell'1:2-benzopirene interferiscono con quelle a 296 e 284  $m\mu$  del 3:4-benzopirene e la banda a 330,5  $m\mu$  dell'1:2-benzopirene con il massimo a 329 del 3:4-benzopirene; quest'ultimo idrocarburo, però, può essere dosato a 383 oppure a 402  $m\mu$  (Fig. 2);

i) *1:2-benzopirene + 3:4-benzofluorantene*: il grafico ha riportato abbastanza fedelmente i picchi caratteristici, ma il dosaggio non è possibile;

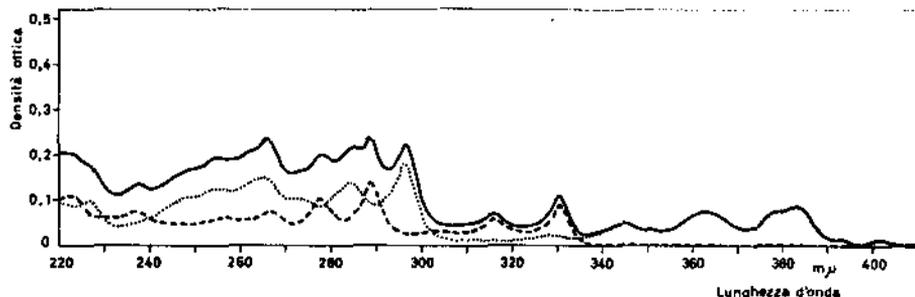


Fig. 2. — Spettri di assorbimento del 3:4-benzopirene (.....), dell'1:2-benzopirene (---) e della miscela dei due idrocarburi (—), alla concentrazione di 0,5  $\gamma$ /ml.

l) 3:4-benzofluorantene + 1:12-benzoperilene: il grafico ha riprodotto fedelmente soltanto alcuni picchi caratteristici dei due idrocarburi. Il dosaggio è realizzabile soltanto per l'1:12-benzoperilene a 383  $m\mu$ ;

m) 1:12-benzoperilene + 1:2-3:4-dibenzoantracene: il grafico non ha riportato fedelmente le curve caratteristiche ed alcuni picchi si presentano a lunghezze d'onda differenti. Infatti la banda a 288  $m\mu$  dell'1:12-benzoperilene interferisce con quella a 286,3  $m\mu$  dell'1:2-3:4-dibenzoantracene. Si può dosare soltanto l'1:12-benzoperilene a 362  $m\mu$ ;

n) 1:2-3:4-dibenzoantracene + 1:2-5:6-dibenzoantracene: il grafico non ha riportato fedelmente le curve caratteristiche ed alcuni picchi si presentano a lunghezze d'onda diverse. La banda a 286,3  $m\mu$  dell'1:2-3:4-dibenzoantracene con la banda a 286  $m\mu$  dell'1:2-5:6-dibenzoantracene appare nella miscela a 285,5  $m\mu$ ; la banda a 275,5  $m\mu$  dell'1:2-3:4-dibenzoantracene appare a 274,5  $m\mu$ . Si può dosare soltanto l'1:2-5:6-dibenzoantracene a 297  $m\mu$ ;

o) 1:2-5:6-dibenzoantracene + antantrene: il grafico ha riportato abbastanza fedelmente le curve caratteristiche, ma quantitativamente può essere determinato soltanto l'1:2-5:6-dibenzoantracene a 348  $m\mu$ . Infatti le bande a 306 e 293,5  $m\mu$  dell'antantrene interferiscono con quelle a 297 e 286  $m\mu$  dell'1:2-5:6-dibenzoantracene, rendendo impossibile il dosaggio dell'antantrene, che non può essere dosato nemmeno alle lunghezze d'onda più alte (Fig. 3);

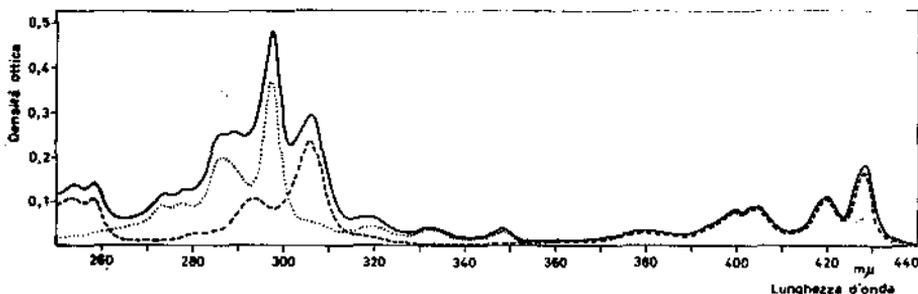


Fig. 3. — Spettri di assorbimento dell'1:2-5:6-dibenzoantracene (.....), dell'antantrene (---) e della miscela dei due idrocarburi (—), alla concentrazione di 0,5  $\gamma$ /ml.

p) *antantrene* + *coronene*: il grafico non ha riportato fedelmente le curve caratteristiche. Infatti i massimi a 306 e 293,5 m $\mu$  dell'*antantrene* interferiscono con quelli a 302 e 289,5 m $\mu$  del *coronene*, dando una deviazione nella branca ascendente. Il *coronene*, però, può essere dosato alla  $\lambda$  di 338 m $\mu$  e l'*antantrene* alla  $\lambda$  di 420 m $\mu$  e alla  $\lambda$  di 428 m $\mu$ .

*Miscele di quattro idrocarburi* (esclusa la miscela g formata da tre idrocarburi).

- a) *acenaftene* + *fluorene* + *fenantrene* + *antracene*;
- b) *fenantrene* + *antracene* + *pirene* + *fluorantene*;
- c) *pirene* + *fluorantene* + 1:2-*benzoantracene* + 3:4-*benzopirene*;
- d) 1:2-*benzoantracene* + 3:4-*benzopirene* + 1:2-*benzoperilene* + 3:4-*benzofluorantene*;
- e) 1:2-*benzopirene* + 3:4-*benzofluorantene* + 1:12-*benzoperilene* + 1:2-3:4-*dibenzoantracene*;
- f) 1:12-*benzoperilene* + 1:2-3:4-*dibenzoantracene* + 1:2-5:6-*dibenzoantracene* + *antantrene*;
- g) 1:2-5:6-*dibenzoantracene* + *antantrene* + *coronene*.

Nella preparazione delle diverse miscele abbiamo unito i singoli idrocarburi in parti in peso eguali tra di loro, in modo da ottenere, per ciascuno di essi, una concentrazione finale di 0,25  $\gamma$ /ml. Anche queste miscele sono state analizzate allo spettrofotometro registratore e sui tracciati ottenuti sono stati ricercati e dosati gli idrocarburi presenti. Dall'esame di questi tracciati spettrofotometrici è risultato che quando più idrocarburi sono presenti contemporaneamente, l'analisi quantitativa degli stessi è assolutamente irrealizzabile ed anche difficile si presenta il riconoscimento qualitativo.

Dalle prove effettuate si rileva, perciò, necessario cercare di separare il più possibile tra di loro gli idrocarburi prima dell'esame spettrofotometrico, per permettere una buona valutazione sia qualitativa che quantitativa degli stessi.

*Separazione cromatografica su colonna di allumina, di una miscela di idrocarburi policiclici puri e loro successiva determinazione spettrofotometrica.*

Le conclusioni sopra riferite ci hanno indotti a mettere a punto un metodo di analisi con il quale si potesse realizzare una separazione il più possibile completa dei singoli idrocarburi policiclici presenti nella miscela. A tale scopo ci siamo serviti della cromatografia su lunga colonna di vetro (GRAHAM, 1963), riempita di allumina con particolare attività ed utilizzando solventi a differente grado eluente.

È stata preparata una miscela dei 15 idrocarburi policiclici puri sciolti in cicloesano (5  $\gamma$  per ciascuno di essi); la miscela, ridotta al volume di circa 3 ml per evaporazione a temperatura ambiente, è stata cromatografata su lunga colonna (60  $\times$  1,3 cm) di allumina così preparata: allumina attiva neutra Merck riscaldata in stufa a secco a 115°C per 3 giorni e tenuta in essiccatore in presenza di H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 50% per 36 ore circa. Con questa allumina sospesa in cicloesano è stata riempita la colonna fino ad una altezza di 58 cm; la miscela degli idrocarburi è stata cromatografata ed eluita con

cicloesano e successivamente con cicloesano più etere. Sono stati raccolti eluati da 3 ml, con il distributore di frazioni automatico RadiRac LKB.

La colonna osservata alla luce di Wood (a  $\lambda = 366 \text{ m}\mu$ ) presentava zone a fluorescenza differente, dal giallo al violetto. Sono state raccolte complessivamente n° 6.200 frazioni: fino alla frazione n° 200 è stato usato come eluente solo cicloesano; dalla n° 200 in poi è stato usato cicloesano mescolato ad etere (Carlo Erba RS puro per spettrofotometria) in quantità crescente, come risulta dalla Fig. 4 in alto. Al termine dell'esperienza la colonna è stata

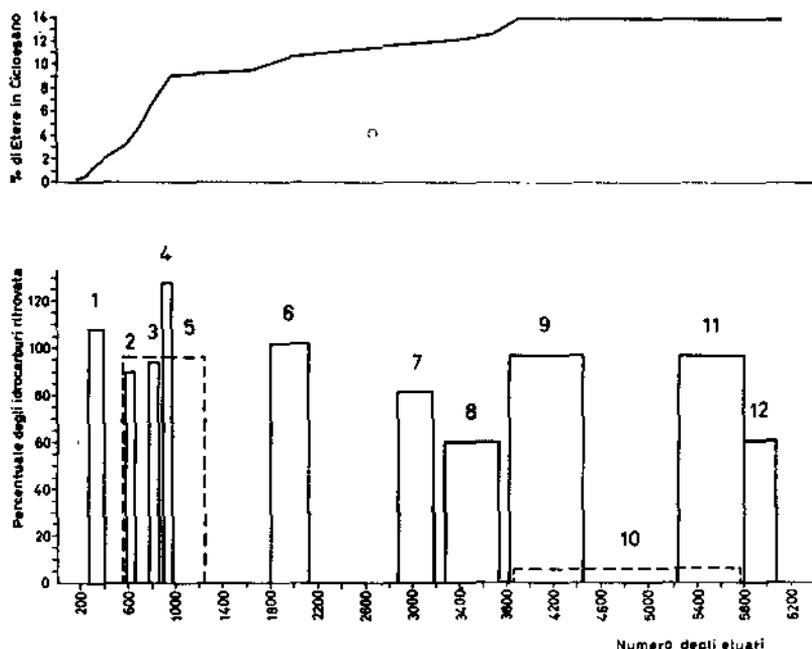


Fig. 4. — Sequenza di eluizione cromatografica della miscela degli idrocarburi in esame e percentuale ritrovata.

Il grafico in alto mostra la percentuale di etere aggiunta al cicloesano nei successivi momenti dell'eluizione.

Il grafico colonnato in basso mostra la percentuale ritrovata alle lunghezze d'onda segnate tra parentesi, degli idrocarburi messi a cromatografare: la linea continua significa che l'idrocarburo è stato isolato e dosato con la prima cromatografia; la linea tratteggiata significa che l'idrocarburo è stato ritrovato miscelato ad altri nella prima cromatografia ed è stato invece quantificato dopo la seconda cromatografia.

- 1) *Acenafteño* (228,5  $\text{m}\mu$ ) - 2) *Fenantrene* (292,5  $\text{m}\mu$ ) - 3) *Pirene* (334,2  $\text{m}\mu$ ) - 4) *Fluoroantene* (287  $\text{m}\mu$ ) - 5) *Antracene* (252,7  $\text{m}\mu$ ) - 6) 1 : 2-*Benzoantracene* (288,2  $\text{m}\mu$ ) - 7) 3 : 4-*Benzopirene* (383-402  $\text{m}\mu$ ) - 8) 1 : 12-*Benzoperilene* (383  $\text{m}\mu$ ) - 9) 1 : 2-3 : 4-*Dibenzoantracene* (286,3  $\text{m}\mu$ ) - 10) *Antantrene* (428  $\text{m}\mu$ ) - 11) *Coronene* (302  $\text{m}\mu$ ) - 12) 1 : 2-5 : 6-*Dibenzoantracene* (297  $\text{m}\mu$ ).

lavata abbondantemente con etere puro, per assicurarsi che tutti gli idrocarburi fossero stati completamente eluiti.

Le frazioni raccolte sono state esaminate allo spettrofotometro; quelle che presentavano tracciati spettrofotometrici identici sono state riunite insieme e, per evaporazione a bassa temperatura e sotto vuoto, ridotte a piccolo volume. Su questo concentrato è stata eseguita la determinazione quantitativa dell'idrocarburo presente.

Quando un composto si è presentato, dopo la cromatografia, miscelato ad altri (antracene con fenantrene, fluorantene e pirene; antantrene con 1:2-3:4-dibenzoantracene e coronene) si è proceduto ad una ulteriore cromatografia su colonna più piccola (1,1 × 35 cm) riempita con allumina deattivata mediante umidificazione in ambiente di  $H_2SO_4$  al 50%; come eluente è stato usato cicloesano puro. Dopo questa seconda cromatografia si è potuto osservare che i primi quattro idrocarburi suddetti si sono ben separati tra di loro ed è stato perciò possibile il loro dosaggio. Per quanto riguarda il secondo gruppo di idrocarburi miscelati, invece, non è stato possibile separare l'antantrene dagli altri due e perciò questo idrocarburo è risultato difficilmente dosabile.

I risultati ottenuti nel loro insieme sono esposti nella Fig. 4 in basso, dove sulle ascisse è riportato il numero delle frazioni raccolte e sulle ordinate la percentuale, riferita al teorico, dei singoli idrocarburi ritrovati. Il dosaggio di questi è stato eseguito alla lunghezza d'onda di un solo picco significativo, ad eccezione del 3:4-benzopirene che è stato dosato a due picchi significativi.

Come risulta dalla Fig. 4, dei 15 idrocarburi miscelati, dopo separazione cromatografica, ne sono stati determinati quantitativamente 12; gli altri 3 (fluorene, 3:4-benzofluorantene e 1:2-benzopirene) sono stati ritrovati solo in tracce. Gli idrocarburi determinati quantitativamente si sono, per la maggior parte, presentati ben separati gli uni dagli altri e perciò facilmente dosabili. Di essi il massimo numero (acenaftene, fenantrene, pirene, fluorantene, antracene, 1:2-benzoantracene, 1:2-3:4-dibenzoantracene, coronene) è stato ritrovato intorno al 100% della quantità iniziale; del 3:4-benzopirene è stato ritrovato l'83%; dell'1:12-benzoperilene e dell'1:2-5:6-dibenzoantracene circa il 60%; l'antantrene, eluito insieme all'1:2-3:4-dibenzoantracene ed al coronene, si è quasi totalmente perduto, anche dopo la seconda cromatografia su piccola colonna.

Si può inoltre osservare che l'antracene, anche dopo la seconda separazione cromatografica, è eluito dopo il fluorantene, mentre teoricamente si sarebbe dovuto evidenziare tra il fenantrene ed il pirene; le tracce di 3:4-benzofluorantene e di 1:2-benzopirene sono state trovate prima del 3:4-benzopirene; l'1:2-5:6-dibenzoantracene è eluito per ultimo, mentre sarebbe dovuto scendere subito dopo l'1:2-3:4-dibenzoantracene.

## CONCLUSIONI

Da quanto è stato riportato ci sembra si possano trarre le seguenti conclusioni:

a) Quando gli idrocarburi aromatici policiclici si trovano tra loro riuniti in miscele di due o di quattro, presentano tracciati spettrofotometrici, la cui interpretazione appare assai difficile e spesso impossibile risulta la determinazione quantitativa dei diversi componenti.

b) La separazione cromatografica su lunga colonna di allumina, seguita da successive ulteriori cromatografie su colonne più piccole, offre la possibilità di ottenere abbastanza ben separati i vari costituenti, che per la massima parte possono essere identificati e dosati con notevole esattezza. Ciò nonostante, una piccola quota di questi composti viene perduta, forse a causa della lunga durata dell'esperimento e dei vari e ripetuti procedimenti analitici (essiccamento, distillazione), che possono alterare il materiale allo studio.

A tale riguardo basti ricordare le ricerche del RONDIA (1965), che ha dimostrato come tali idrocarburi possono volatilizzare a temperature inferiori al loro punto di ebollizione, quando seccati o adsorbiti su materiale polverulento o anche su semplice carta da filtro.

30 agosto 1966.

## BIBLIOGRAFIA

- BADGER, G. M., J. K. DONNELLY & T. M. SPOTSWOOD, 1963. Thin-layer chromatography using partially acetylated cellulose as adsorbent. *J. Chromatog.*, **10**, 397.
- BERG, A. & J. LAM, 1964. Separation of polycyclic aromatic hydrocarbons by thin-layer chromatography on impregnated layers. *J. Chromatog.*, **16**, 157.
- BORNEFF, J. & R. FISCHER, 1961. Cancerogene Substanzen in Wasser und Boden. VI. Zum Nachweis polycyclischer Kohlenwasserstoffe mittels spektraler Fluoreszenzzerlegung. *Arch. Hyg. Bakteriol.*, **145**, 241.
- BORNEFF, J. & R. FISCHER, 1962 a. Cancerogene Substanzen in Wasser und Boden. VIII. Untersuchungen an Filter-Aktivkohle nach Verwendung im Wasserwerk. *Arch. Hyg. Bakteriol.*, **146**, 1.
- BORNEFF, J. & R. FISCHER, 1962 b. Cancerogene Substanzen in Wasser und Boden. IX. Untersuchungen von Filterschlamm eines Seewasserwerkes auf polyzyklische, aromatische Kohlenwasserstoffe. *Arch. Hyg. Bakteriol.*, **146**, 183.
- BORNEFF, J. & R. FISCHER, 1962 c. Cancerogene Substanzen in Wasser und Boden. X. Untersuchung von Phytoplankton eines Binnensees auf polyzyklische, aromatische Kohlenwasserstoffe. *Arch. Hyg. Bakteriol.*, **146**, 334.
- BORNEFF, J. & R. FISCHER, 1962 d. Cancerogene Substanzen in Wasser und Boden. XI. Polyzyklische, aromatische Kohlenwasserstoffe in Walderde. *Arch. Hyg. Bakteriol.*, **146**, 430.
- BORNEFF, J. & R. FISCHER, 1963. Cancerogene Substanzen in Wasser und Boden. XII. Polyzyklische, aromatische Kohlenwasserstoffe in Oberflächenwasser. *Arch. Hyg. Bakteriol.*, **146**, 572.

- BORNEFF, J. & H. KUNTE, 1963. Cancerogene Substanzen in Wasser und Boden. XIV. Weitere Untersuchungen über polyzyklische, aromatische Kohlenwasserstoffe in Erdproben. *Arch. Hyg. Bakteriol.*, **147**, 401.
- BORNEFF, J. & H. KUNTE, 1964. Cancerogene Substanzen in Wasser und Boden. XVI. Nachweis von polyzyklischen Aromaten in Wasserproben durch direkte Extraktion. *Arch. Hyg. Bakteriol.*, **148**, 585.
- CANDELL, A., A. J. LINDSEY & K. PERSAUD, 1960. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in tobacco smoke. *Anal. Chem. Acta*, **22**, 458.
- CANTUTI, V., G. P. CARTONI, A. LIBERTI & A. G. TORRI, 1965. Improved evaluation of polynuclear hydrocarbons in atmospheric dust by gas chromatography. *J. Chromatog.*, **17**, 60.
- COMMINS, B. T., 1958 a. Polycyclic hydrocarbons in rural and urban air. *Intern. J. Air Pollution*, **1**, 14.
- COMMINS, B. T., 1958 b. A modified method for the determination of polycyclic hydrocarbons. *Analyst*, **83**, 386.
- COMMINS, B. T. & A. J. LINDSEY, 1956. The determination of phenols by chromatography and spectrophotometry of their methyl ethers. II. The separation and quantitative determination of methyl aryl ethers. *Anal. Chim. Acta*, **15**, 551.
- COOPER, R. L., 1954. The determination of polycyclic hydrocarbons in town air. *Analyst*, **79**, 573.
- GALŮSKINOVÁ, V., 1964. 3 : 4-benzopyrene determination in the smoky atmosphere of social meeting rooms and restaurants. A contribution to the problem of the noxiousness of so-called passive smoking. *Neoplasma*, **11**, 465.
- GRAHAM, J. C., 1963. Measurement of polycyclic hydrocarbons in the air of Sydney using very long alumina columns for separation. *Intern. J. Air Water Pollution*, **7**, 753.
- HARTWELL, J. L., 1951. Survey of compounds which have been tested for carcinogenic activity. *Federal Security Agency, Public Health Service*, n. 149.
- HETICH, H. O., 1964. Benzopyrene und Spurenelemente in Grosstadtluft. *Intern. J. Air Water Pollution*, **8**, 185.
- HOFFMAN, D. & E. L. WYNDER, 1960 a. On the isolation and identification of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Cancer*, **13**, 1062.
- HOFFMANN, D. & E. L. WYNDER, 1960 b. Short-term determination of carcinogenic aromatic hydrocarbons. *Anal. Chem.*, **32**, 295.
- KUCHARCZYK, N., J. FOHL & J. VYMETAL, 1963. Dünnschichtchromatographie von Aromatische Kohlenwasserstoffen und Einigen Heterocyclischen Verbindungen. *J. Chromatog.*, **11**, 55.
- LIBERTI, A. & V. CANTUTI, 1964. Determinazione degli idrocarburi policiclici nel pulviscolo urbano mediante cromatografia in fase gassosa. *Nuovi Ann. Ig. Microbiol.*, **15**, 502.
- LIBERTI, A., G. P. CARTONI & V. CANTUTI, 1964. Gas chromatography determination of polynuclear hydrocarbons in dust. *J. Chromatog.*, **15**, 141.
- LINDSEY, A. J. & J. R. STANBURY, 1962. A study of air pollution by analysis of particulate material collected from air filtration plants. Part II. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in total air solids. *Intern. J. Air Water Pollution*, **6**, 387.
- RONDIA, D., 1965. Sur la volatilité des hydrocarbures polycycliques. *Intern. J. Air Water Pollution*, **9**, 113.
- SAWICKI, E., W. C. ELBERT & T. W. STANLEY, 1965. The fluorescence-quenching effect in thin-layer chromatography of polynuclear aromatic hydrocarbons and their aza analogs. *J. Chromatog.*, **17**, 120.
- SCASSELLATI SPORZOLINI, G. & A. MARIANI, 1961 a. 3 : 4-benzopirene ed altri idrocarburi policiclici nel fumo di sigarette « Nazionali Esportazione ». *Boll. Soc. Ital. Biol. Sper.*, **37**, 766.

- SCASSELLATI SFORZOLINI, G. & A. MARIANI, 1961 b. Ricerca del 3 : 4-benzopirene e di altri idrocarburi policiclici nel fumo di sigarette italiane (Contributo allo studio dell'azione cancerigena del fumo di tabacco). *Ric. Sci. Rendiconti - Sez. B*, 1, 98.
- SCASSELLATI SFORZOLINI, G. & G. SALDI, 1961. Ulteriori ricerche sugli idrocarburi policiclici del fumo di sigaretta (Confronto tra il fumo aspirato e quello raccolto nell'aria ambiente). *Boll. Soc. Ital. Biol. Sper.*, 37, 769.
- SCASSELLATI SFORZOLINI, G. & G. SALUCCI, 1958. Prime ricerche sulla presenza di idrocarburi cancerigeni nel fumo delle sigarette italiane. *Boll. Soc. Ital. Biol. Sper.*, 34, 424.
- SEPPILLI, A. & G. SCASSELLATI SFORZOLINI, 1963. Sulla presenza di idrocarburi policiclici cancerigeni nelle carni cotte alla graticola. *Boll. Soc. Ital. Biol. Sper.*, 39, 110.
- SYMPOSIUM ON POLYCYCLIC HYDROCARBONS, 1960. *Intern. J. Air Water Pollution*, 2, 201.
- STOCKS, P., B. T. COMMINS & K. V. AUBREY, 1961. A study of polycyclic hydrocarbons and trace elements in smoke in Merseyside and other northern localities. *Intern. J. Air Water Pollution*, 4, 141.
- VALORI, P., C. MELCHIORRI & N. VESCIA, 1963. Ricerca e determinazione degli idrocarburi policiclici nel pulviscolo atmosferico della città di Roma. Nota I : determinazione del 3 : 4-benzopirene. *Nuovi Ann. Ig. Microbiol.*, 14, 434.

## Su alcune metodiche per evidenziare la fibrinolisi stafilococcica

LIVIO CAPOCACCIA (\*) e COSIMO PRANTERA

*Clinica delle Malattie Tropicali e Infettive, Centro di Gastroenterologia, Università di Roma*

**Riassunto.** — Gli AA. hanno ricercato la fibrinolisi stafilococcica su 44 ceppi usando il metodo di CHRISTIE & WILSON (1941) che non contempla l'allontanamento degli inibitori della plasmina, il metodo di LACK (1957) che rimuove questi inibitori mediante cloroformio, e un metodo da loro approntato, basato sull'allontanamento di detti inibitori mediante acido acetico. I migliori risultati sono stati ottenuti con il metodo dell'acido acetico, che ha evidenziato la presenza di attività fibrinolitica in 33 ceppi, mentre il metodo di Lack l'ha evidenziata in 28 e il metodo di Christie e Wilson in 26.

**Summary.** (*Some methods for the evidention of staphylococcal fibrinolysis*). — This investigation on the staphylococcal fibrinolysis was carried out on 44 strains of staphylococci, comparing the method of CHRISTIE & WILSON (1941), the method of LACK (1957) and a personal technique based on the removal of the plasmin inhibitors through the use of acetic acid. As it is known, the method of Christie and Wilson does not take into due consideration the removal of the plasmin inhibitors, which can negativize the reaction. In the method proposed by Lack, the removal of the inhibitors is obtained through the use of chloroform, but this substance can interfere with the reaction of fibrinolysis, as it is capable of destroying small amounts of plasmin and of activating spontaneously the plasminogen. Furthermore, chloroform is said to remove only the labile inhibitor of plasmin. The Authors have used acetic acid as removing agent of the inhibitors, as it does not seem to interfere in any way with the mechanism of the fibrinolytic reaction.

The best results were obtained with the method proposed by the Authors, which evidentionated fibrinolytic activity in 33 strains out of the 44 investigated. The method of Lack resulted positive in 28 strains and the method of Christie and Wilson in 26.

(\*) Già ospite dei Laboratori di Microbiologia dell'Istituto Superiore di Sanità.

Nei nostri laboratori il test della fibrinolisi stafilococcica è stato eseguito per molti anni con il metodo di CHRISTIE & WILSON (1941), che però ha dato spesso luogo ad inconvenienti, risultando negativo laddove tutte le altre prove cosiddette di patogenicità erano al contrario positive.

LACK (1957), criticando questo metodo, ne ha proposto in sua vece un altro basato sull'allontanamento degli inibitori della plasmina (fibrinolisin) mediante l'aggiunta di cloroformio al plasma usato nel test.

Oggetto della presente ricerca è il paragone tra questi due metodi ed un altro metodo da noi messo a punto, basato sull'allontanamento degli inibitori della fibrinolisi mediante aggiunta di acido acetico.

#### MATERIALI E METODI

*Metodo di Christie e Wilson* : all'agar semplice sciolto e raffreddato a 50° C si aggiunge il 12 % di plasma umano ossalatato. La miscela viene tenuta a 56° C per 15 minuti per far flocculare il fibrinogeno in fibrina. Si versa in piastra e si fa solidificare. Si seminano gli stafilococchi e si tiene a 37° C per 48 ore. Il terreno è opaco e, in presenza di azione fibrinolitica, attorno alle colonie degli stafilococchi si forma un alone chiaro.

*Metodo di Lack* : per rimuovere l'inibitore della plasmina si mescolano ml 1 di cloroformio con ml 10 di plasma umano ossalatato e si lascia riposare per 20 minuti. L'inibitore si trova nel precipitato. Per il test si usa il sovrinatante dopo la centrifugazione. Si mescolano ml 1 di questo sovrinatante con ml 10 di agar semplice sciolto e raffreddato a 50° C e ml 1 di fibrinogeno bovino Armour frazione I al 2,5 % in acqua distillata, sterilizzato per Seitz. La miscela delle tre soluzioni viene tenuta a 56° C per 20 minuti e poi versata in piastra. Dopo raffreddamento si seminano gli stafilococchi. Si procede come sopra.

*Metodo con acido acetico* : a ml 1,5 di plasma umano ossalatato si aggiungono ml 28,5 di acqua distillata e acido acetico 0,1 M fino a pH 5,2-5,3 (il pH è stato misurato con potenziometro Beckmann su un campione del pool di plasma. Il quantitativo approssimativo di acido acetico 0,1 M necessario per ottenere i valori ottimali di pH si aggira sui ml 0,9-1,05 per ml 1,5 di plasma). Questa soluzione viene centrifugata, ottenendosi la sedimentazione del precipitato formatosi dopo l'aggiunta dell'acido acetico. Si allontana il sovrinatante e si ridiscioglie il precipitato in ml 1,5 di tampone Veronal a pH 7,8 (ml 990 di una soluzione Veronal sodico 0,1 M, ml 510 di acido cloridrico 0,1 N, gr 8 di NaCl e ml 450 di acqua distillata). Si aspetta qualche minuto per ottenere il completo ridiscioglimento del precipitato ripetutamente pipettando. Al plasma così trattato si aggiungono ml 1,5 di fibrinogeno bovino frazione I (Armour) al 2,5 % in acqua distillata (il fibrinogeno

va sciolto mettendolo su una ampia superficie, permettendone così un rapido e omogeneo assorbimento). La miscela plasma trattato + fibrinogeno viene versata in ml 15 di agar semplice sciolto e raffreddato a 50° C e il tutto viene posto in bagnomaria a 56° C per 20 minuti, per permettere la trasformazione del fibrinogeno in fibrina. Si versa in piastra e si procede come per i metodi precedenti.

*Cepi.* — Sono stati studiati 44 ceppi appartenenti al genere *Staphylococcus* isolato da feci di adulti affetti da disordini enterocolitici di vario genere e intensità. A parte due ceppi che all'atto dell'isolamento fermentavano anaerobicamente glucosio e mannite e che si erano in seguito dimostrati incapaci a fermentare anaerobicamente la mannite, tutti gli altri ceppi presentavano ancora all'atto della presente ricerca ambedue le proprietà, unite variabilmente anche con le proprietà fosfatasi e coagulasi.

#### RISULTATI

I migliori risultati, come risulta dalla Tab. 1, sono stati ottenuti con il metodo da noi messo a punto, basato sull'allontanamento degli inibitori della plasmina mediante acido acetico. Con questo metodo, non solo sono risultati positivi tutti i ceppi positivi con gli altri metodi, ma a volte si è avuta una positività laddove gli altri metodi avevano dato risposte negative. Le zone di lisi, inoltre, sono state in genere più grandi e più nette che con gli altri due metodi. Da notare infine che, mentre — come si è detto — tutti i ceppi risultati positivi con il metodo di Lack e/o con il metodo di Christie e Wilson sono stati positivi anche con il nostro metodo, tra questi due primi metodi c'è stata qualche discordanza, apparendo alcuni ceppi positivi con un metodo e negativi con l'altro e viceversa.

Schematicamente si potrebbe concludere come segue :

1) Con il metodo di Lack su 44 ceppi esaminati 28 sono risultati positivi.

2) Con il metodo di Christie e Wilson su 44 ceppi esaminati 26 sono risultati positivi. Cinque ceppi sono risultati positivi con il metodo di Lack e negativi con il metodo di Christie e Wilson, mentre in 3 ceppi è avvenuto il contrario.

3) Con il metodo dell'acido acetico su 44 ceppi esaminati 33 sono risultati positivi, inclusi tutti i ceppi risultati positivi sia con il metodo di Lack che con il metodo di Christie e Wilson.

TABELLA I.

Risposte alla fibrinolisi secondo i tre metodi da noi confrontati.

No. dei ceppi di <i>Staphylococcus</i> distinti secondo le risposte ai test	Metodo per il test della fibrinolisi (*)		
	CHRISTIE & WILSON (1941)	LACK (1957)	Metodo con acido acetico
24	+	+	+
11	—	—	—
4	—	+	+
2	+	—	+
3	—	—	+
Totale 44			
Totale positivi	26	28	33

(\*) + positivo, — negativo.

## DISCUSSIONE

La fibrinolisi da parte degli stafilococchi viene operata per mezzo delle stafilocinasi, la cui azione non si discosta da alcuni noti processi della fibrinolisi.

Come è noto, l'ultimo atto del processo coagulativo è la fibrinolisi. L'enzima preposto alla idrolisi della fibrina, il *plasminogeno* (euglobulina inattiva presente nel siero e nel plasma), viene trasformato nell'enzima attivo *plasmina* (*fibrinolisisina*) da due sistemi di attivatori: gli attivatori diretti (*plasminogenasi*) e i proattivatori.

Gli attivatori diretti, che sono presenti nei tessuti, nel sangue, nel latte, nelle urine e in altri umori, agiscono direttamente sull'euglobulina (*plasminogeno*) trasformandola nella sua forma attiva.

I proattivatori, invece, presenti in grande quantità nel sangue e, in minore quantità, nella saliva, nel latte e nelle lacrime, sono incapaci di per se stessi di agire sul *plasminogeno* e necessitano, a loro volta, di un altro gruppo di enzimi, le *lisochinasi*. Similmente a questo agisce la *streptochinasi*, proteina batterica extracellulare ottenuta da colture di streptococco emolitico di gruppo A. Al contrario della *streptochinasi*, la *stafilocinasi* agisce come una *plasminogenasi*, cioè attivando direttamente il *plasminogeno* (ASTRUP, 1956; DAVIDSON, 1960).

A regolare il complesso sistema della fibrinolisi sono preposti gli inibitori della *plasmina* (*antiplasmine*) e gli inibitori dell'attivazione del plasminogeno. Di questo secondo gruppo fanno parte le antistreptochinasi, le antiurochinasi, l'acido  $\epsilon$ -aminocapronico ed altri inibitori.

Per una buona esecuzione del test non debbono essere sottovalutati questi inibitori, che possono ritardare ed anche impedire la comparsa della fibrinolisi attorno a colonie di stafilococchi in realtà produttori di enzimi litici. Ciò sarà ancora più facile quando scarsa sia la produzione di tali enzimi oppure quando il plasma usato sia particolarmente ricco in inibitori. La possibilità di reazioni fibrinolitiche falsamente negative è stata sottolineata da LACK (1957) nella sua critica al metodo di CHRISTIE & WILSON (1941).

Altro elemento importante per una buona lettura della fibrinolisi è una quantità sufficiente di fibrinogeno, la cui aggiunta da Lack stesso è stata consigliata sotto forma di fibrinogeno bovino. A questo proposito va notato che la stafilo-chinasi agisce soltanto sul plasminogeno umano e sotto questo aspetto la porzione di plasminogeno, sempre presente nel fibrinogeno bovino in commercio, non interferisce nella reazione.

Risulta, quindi, assolutamente necessario l'allontanamento degli inibitori, così come proposto da LACK (1957). Per raggiungere tale scopo, questo Autore ha consigliato un metodo che prevede l'allontanamento degli inibitori mediante cloroformio, sostanza che rimuove un inibitore della plasmina (DE NICOLA & SOARDI, 1960). Secondo ASTRUP (1956), con conferma più recente di DE BARBIERI (1965), esistono due tipi di antiplasmine. Una di esse, detta inibitore labile, può essere rimossa mediante trattamento con cloroformio. L'antiplasmina stabile, al contrario, non ne è rimossa.

Inoltre, numerosi sono gli effetti del cloroformio sulla fibrinolisi. Nel plasma trattato con cloroformio vi è una diminuzione del livello plasminico, perchè questa sostanza, in parte, distrugge la plasmina (ASTRUP, 1956). Il cloroformio sembra anche causare una spontanea attivazione del plasminogeno di tipo autocatalitico (ASTRUP, 1956).

È chiaro, allora, come il cloroformio non possa dare una risposta soddisfacente alla necessità di allontanare quelle sostanze che possono impedire, ridurre o ritardare l'evidenziazione della fibrinolisi stafilococcica. Certamente l'uso del cloroformio non è tale da alterare completamente le risposte fibrinolitiche (vi è infatti una certa identità di risultati tra i vari metodi), ma è senza dubbio inadatto a svelare pienamente l'attività fibrinolitica degli stafilococchi.

Ci è parso quindi opportuno usare un'altra tecnica che non solo fosse in grado di allontanare tutti gli inibitori, ma che per se stessa non interferisse nel complesso meccanismo fibrinolitico. Un pH acido (tra 5,5 - 5,2), come noto (DE NICOLA & SOARDI, 1960; DE BARBIERI, 1965), determina una precipi-

tazione della frazione euglobulinica del plasma e con essa del plasminogeno e del proattivatore. Sono invece allontanati con il supernatante gli inibitori. Quale acidificante abbiamo usato l'acido acetico.

Probabilmente la mancata evidenziazione di un'attività fibrinolitica da parte di alcuni ceppi di stafilococchi con il metodo di CHRISTIE & WILSON (1941) e con il metodo di LACK (1957) trova la sua spiegazione nella scarsa attività di tali ceppi, scarsa attività negativizzata dalle ragioni precedentemente esposte.

#### CONCLUSIONI

Il test della fibrinolisi è un test ritenuto ancora valido ai fini di giudicare la patogenicità di un ceppo, con le limitazioni note a questi test. Ancor oggi sulla fibrinolitisi è stata richiamata l'attenzione da MC CABE (1966). Una corretta tecnica di esecuzione appare quindi fondamentale.

Il metodo usualmente impiegato è quello di CHRISTIE & WILSON (1941) che, però, non contempla l'allontanamento dal plasma degli inibitori della plasmina, la presenza dei quali può evidentemente interferire nell'andamento della reazione.

Sotto questo profilo, appare giustificato il metodo di LACK (1957) che per primo ha puntualizzato la necessità di allontanare gli inibitori della plasmina, rimozione da lui ottenuta mediante l'aggiunta del cloroformio. Questa sostanza interferisce però nell'attività fibrinolitica con il triplice meccanismo di rimuovere solo l'inibitore labile della plasmina, di distruggere piccole quantità di plasmina stessa e di attivare autocataliticamente il plasminogeno.

Per tali motivi, abbiamo impiegato l'acido acetico quale fattore di rimozione degli inibitori della plasmina.

Su 44 ceppi di stafilococchi abbiamo paragonato il metodo di Christie e Wilson, il metodo di Lack e il metodo da noi approntato con acido acetico.

Dai nostri dati risulta che il metodo con l'acido acetico è superiore a quello con il cloroformio (a sua volta superiore al metodo di Christie e Wilson) sia perchè capace di evidenziare una netta fibrinolisi laddove ciò non è possibile con gli altri metodi, sia perchè capace di provocare, in confronto alle altre metodiche, più ampie zone di lisi attorno a colonie di stafilococchi.

5 settembre 1966.

#### BIBLIOGRAFIA

- ASTRUP, T., 1956. Fibrinolysis in the Organism. *Blood*, **11**, 781.  
CHRISTIE, R. & H. WILSON, 1941. A Test of Staphylococcal Fibrinolysis. *Australian J. Exptl. Biol. Med. Sci.*, **19**, 329.

- DAVIDSON, F. M., 1960. The Activation of Plasminogen by Staphylokinase : Comparison with Streptokinase. *Biochem. J.*, **76**, 56.
- DE BARBIERI, A., 1965. Enzymology of the Fibrinolytic System and Its Clinical Significance. *Enzymes in Clinical Chemistry*. Elsevier Publishing Company, Amsterdam.
- DE NICOLA, P. & F. SOARDI, 1960. Studio Fisiopatologico e Clinico della Fibrinolisi. *Quaderni Coagulaz. Argomenti Connessi*, n. 7.
- LACK, C. H., 1957. Plate Coagulase and Fibrinolysin Tests for Staphylococci. *J. Clin. Pathol.*, **10**, 208.
- MCCABE, W. R., 1966. Studies on Staphylococcal Infections. *Yale J. Biol. Med.*, **38**, 323.