

Isolamento e determinazione dei corticosteroidi da estratti lipidici totali di surrene

GUIDO CAVINA e GIUSEPPE GIOCOLI

Laboratori di Biologia.

Riassunto. — L'estrazione del tessuto surrenale di bovini e suini con cloroformio-metanolo 2 : 1 secondo FOLCH, LEES & SLOANE-STANLEY (1957), consente di ottenere i corticosteroidi totali del tessuto assieme ai lipidi.

Si descrive un metodo di separazione per i corticosteroidi basato su una cromatografia in colonna di acido silicico con esano-etero etilico 80 : 20 ed acetone come eluenti, seguita da due cromatografie in strato sottile con esano-etero etilico-ac. acetico 50 : 50 : 1 sviluppo continuo per 2 ore, e acetone, in successione.

Tale procedimento è applicabile a piccole quantità di tessuto surrenale (20 g circa, contenenti circa 1 g di lipidi) e consente di ottenere frazioni contenenti i corticosteroidi, che possono essere analizzati in modo qualitativo e quantitativo sia con la metodica già descritta da CAVINA & VICARI (1964) che con tecniche bidimensionali (primo solvente cloroformio-metanolo-acqua 90 : 10 : 0,5; secondo solvente acetone-benzene 50 : 50 o 30 : 70, a sviluppo normale o continuo); per l'aldosterone viene eseguita una doppia cromatografia secondo il procedimento descritto da CAVINA & GIOCOLI (1968).

Gli estratti da surrenali bovine hanno dato un contenuto di 7 μ g di corticosteroidi totali per grammo di tessuto fresco, con corticosterone come costituente principale (28-29% dei corticosteroidi totali); quelli da surrenali suine hanno dato valori rispettivamente di μ g 25-28 di corticosteroidi totali per grammo di tessuto fresco e del 37-39% in idrocortisone come costituente principale.

Summary (*Isolation and determination of corticosteroids in total adrenal lipid extracts*). — Bovine or swine adrenal extracts, obtained with chloroform : methanol 2 : 1, according to FOLCH, LEES & SLOANE-STANLEY (1957), contain corticosteroids together with lipids. A method is described for the separation of corticosteroids by means of a column chromatography on silicic acid (elution with hexane-ethyl ether 80 : 20 and acetone), followed by a succession of two thin-layer chromatographies (the solvent systems were

hexane:ethyl ether:acetic acid 50:50:1 with continuous elution for two hours, followed by acetone).

This technique is suitable for small amounts of adrenal tissue (e. g. 20g containing about 1 g of lipids). The fraction containing corticosteroids may be analyzed in qualitative and quantitative way either with the method described by CAVINA & VICARI (1964) or with a two-dimensional t.l.c. (first solvent chloroform: methanol: water 90:10:0.5; second solvent acetone: benzene 50:50 or 30:70 according to the elution procedure, normal or continuous); the aldosterone is submitted to a double chromatography according to CAVINA & GIOCOLI (1968). The total-steroid content is 7 $\mu\text{g/g}$ for the bovine and 25-28 $\mu\text{g/g}$ for the swine adrenal tissue. The main steroidal component in the bovine extract is corticosterone (28-29 % of total corticosteroids); in the swine extract is hydrocortisone (37-39 % of total corticosteroids).

Il problema della separazione di piccole quantità di corticosteroidi da estratti lipidici totali di surrenali di mammiferi era stato da noi precedentemente affrontato (ANGELICO *et al.*, 1965), nel caso del ratto, ricorrendo alla cromatografia in strato sottile.

Per scopi preparativi in scala di laboratorio, volendo ottenere da modeste quantità di tessuto surrenale bovino o suino estratti che fossero l'espressione dell'effettivo contenuto steroideo del tessuto, non essendo conveniente applicare a piccole quantità di materiale i complessi procedimenti utilizzati a scopo industriale che si basano su ripartizioni multiple (KUIZENGA *et al.*, 1942), abbiamo studiato la messa a punto di una tecnica di isolamento della frazione steroidea dall'estratto lipidico totale del tessuto surrenale mediante cromatografia in colonna.

I dati disponibili in letteratura su questo problema sono scarsi e le metodiche descritte (SIMPSON *et al.*, 1954; WETTSTEIN, KAHNT & NEHER, 1955; GLENN & NELSON, 1953; HERNANDEZ & AXELROD, 1963; GOLDZIEHR, BAKER & RIHA, 1961) ad eccezione di quella riguardante l'isolamento dell'aldosterone e di altri corticoidi da tessuto surrenale (NEHER & WETTSTEIN, 1955) avrebbero richiesto una accurata messa a punto per essere adattate al problema in esame.

Viene qui descritta una tecnica di separazione in colonna elaborata in base all'esperienza precedentemente da noi acquisita mediante prove con cromatografia in strato sottile. Allo scopo di controllare l'efficienza di questa tecnica sono state eseguite analisi qualitative e quantitative degli estratti ottenuti, impiegando le metodiche di cromatografia in strato sottile monodimensionale descritte da CAVINA & VICARI (1964) e da CAVINA & GIOCOLI (1968) e una di cromatografia bidimensionale qui descritta in dettaglio, per meglio individuare e determinare alcuni componenti minori, quando necessario.

MATERIALI E METODI (*)

Reattivi. — Etere etilico, reso privo di perossidi per lavaggio con FeSO_4 , ed acqua e per passaggio su allumina anidra; cloroformio lavato, disidratato, distillato e stabilizzato su Al_2O_3 (CAVINA, 1956); etanolo trattato con AgNO_3 e KOH per eliminare le aldeidi e distillato; acetone, metanolo, esano (benzina per cromatografia p. e. 65°) puri per analisi e ridistillati.

Acidi ed alcali, blu di tetrazolio e tetrametilammonio idrato al 10 % puri per analisi.

Adsorbenti per cromatografia. — 1) Gel di silice Merck n. 7734 (dimensioni delle particelle 50-200 μ) per cromatografia in colonna, purificato da sali di ferro, altri sali idrosolubili e da sostanze liposolubili come da noi descritto in una precedente nota (CAVINA, GIOCOLI & SARDINI, 1967). 2) Gel di silice GF 254 Merck per cromatografia in strato sottile, lavato per 24 ore con cloroformio p. a. in Soxhlet.

Composti di riferimento. — Aldosterone per biochimica Merck, altri corticosteroidi Fluka, Vister e USP reference standards. Si preparavano soluzioni in etanolo o cloroformio alla concentrazione di 1 mg/ml, inoltre una miscela di corticosteroidi in etanolo della seguente composizione in mg/ml: idrocortisone 0,6; cortisone 0,3; corticosterone 0,4; desossicortisolo 0,25; deidrocorticosterone 0,40; aldosterone 0,04.

Preparazione dell'estratto lipidico. — (Derivata da FOLCH, LEES & SLOANE STANLEY, 1957) Grammi 200 circa di surreni bovini o suini appena prelevati dal mattatoio venivano liberati dai tessuti circostanti e pesati; aliquote di 15-16 grammi venivano omogeneizzate in apparecchio Ato-mix (tipo Blendor) con 300 ml di cloroformio/metanolo 2:1. Si lasciava poi in riposo alcuni minuti e si filtrava su carta, si misurava il volume del filtrato e si lavava questo col 20 % di acqua. Si lasciava in riposo per 8 ore e poi si separavano le fasi: la fase cloroformica umida veniva concentrata sotto vuoto in evaporatore rotante e ripresa con cloroformio-metanolo 2:1. L'insieme degli estratti veniva portato al volume di 100 ml, in maniera che 1 ml corrispondeva a 2 gr. di tessuto fresco (**). L'estratto veniva conservato in frigorifero a disposizione per le successive analisi.

Metodi cromatografici.

Cromatografia in colonna di gel di silice. — Le dimensioni della colonna erano: diametro interno 18 mm, altezza 350 mm; il carico era di 27 g di gel di silice attivato, in sospensione in esano-etero etilico 80:20. L'altezza

(*) Alla parte sperimentale ha collaborato il dr. ALBERTO MOLLIKA.

(**) Il contenuto di lipidi totali del surrene bovino e suino era rispettivamente del 4,3 e 6,0 % sul tessuto fresco.

del materiale era di circa 205-210 mm, per cui il rapporto H/d era di 11 circa; il volume di colonna di 54 ml circa.

Si introduceva in colonna un quantitativo di estratto lipidico pari a circa 1 g di lipidi totali con circa 50 ml di esano-etero 80 : 20 (v/v), velocità di flusso 1 ml/min, facendo seguire 900 ml dello stesso solvente e 900 ml di acetone, velocità di flusso 2 ml/min. Si scartava la prima frazione, mentre la seconda frazione veniva evaporata a secco sotto vuoto in evaporatore rotante in b.m. a 40°C. Il residuo veniva trasferito quantitativamente con cloroformio-metanolo 2 : 1 in provette t.s. e conservato per ulteriori analisi.

Cromatografia in strato sottile. — Si impiegavano lastre di gel di silice GF 254, spessore 0,5 e 0,25 mm, dimensioni 20 x 20 e 20 x 40 cm, attivate a 110°C per 30 min.

I sistemi impiegati erano :

a) *Esano-etero etilico-acido acetico* 50 : 50 : 1, con lastre di cm 20 × 20, spessore 0,5 mm; tecnica di sviluppo continuo, come descritto da CAVINA & MORETTI (1966), per 2 ore; faceva seguito un ulteriore sviluppo con acetone fino all'altezza di circa 16 cm ($t = 25$ m'n).

Questa separazione veniva riservata per la purificazione degli eluati acetonicici della colonna, deponendo sulla lastra una banda continua di 12 cm, con quantità di sostanza pari a circa 18-20 mg. La deposizione veniva effettuata in modo quantitativo mediante una microsiringa Hamilton da 50 μ l. operando con lavaggi successivi della provetta. A lato della banda veniva deposto un campione di 50 μ g di miscela di steroidi corticali. A corse ultimate si contrassegnava sul cromatogramma una zona parallela a quella dove migrano in gruppo compatto gli steroidi corticali, estesa per circa 14 cm in lunghezza e 4 cm in altezza; tale zona si trasferiva quantitativamente in un imbutino separatore da 100 ml con rubinetto in teflon, sospendendo il gel di silice in 30 ml di acqua ed estraendo poi 4 volte con 15 ml di cloroformio. Gli estratti cloroformici venivano filtrati su Na_2SO_4 anidro, poi si evaporavano a secco in palloncini a fondo conico; i residui contenenti gli *estratti corticali purificati (Ep)* venivano ripresi con un volume noto di cloroformio (25-30 ml) onde procedere su aliquote del totale alle successive analisi.

b) *Cloroformio-metanolo-acqua* 90 : 10 : 0,5 con lastre di cm 20 × 40, spessore 0,5 mm, come descritto da CAVINA & VICARI (1964). Un'aliquota di estratto Ep, corrispondente a circa 150-300 μ g di corticosteroidi totali, veniva deposta su di una lastra di cm 20 × 40 lungo una piccola banda di cm 4,5; al lato si depondeva una eguale banda con eguale quantità di una miscela di corticosteroidi di riferimento. Si lasciava salire il solvente fino a circa 30 cm, dopo essiccamento si rivelavano i corticosteroidi all'U.V. e con il reattivo al blu di tetrazolio (BT) sulla sola parte dello standard.

Si prelevavano poi sul cromatogramma del campione le aree corrispondenti a: THF (tetraidrocortisone) + THE (tetraidrocortisone), idrocortisone, aldosterone, cortisone, corticosterone, 17 idrossi-11-desossicorticosterone, 11 deidrocorticosterone, la zona fino al fronte e inoltre 2 aree vuote per le prove in bianco. Diversamente da quanto descritto da CAVINA & VICARI (1964), per l'estrazione degli steroidi veniva impiegata la ripartizione tra acqua (8 ml) e cloroformio (4 ml per 4 volte); gli estratti cloroformici portati a secco venivano ripresi con etanolo e destinati all'analisi colorimetrica con il BT secondo il metodo di NOWACZYNSKI, GOLDNER & GENEST (1955).

c) *Acetone-benzene-acido acetico* 30 : 70 : 0,5 con lastre di cm 20 × 20, spessore di mm 0,5, sviluppo continuo per 4 h per la determinazione dell'aldosterone nell'eluato della zona aldosterone isolata dalla cromatografia descritta in (b). Lo stesso sistema, senza acido acetico, con sviluppo continuo di 2 ore, veniva impiegato per la seconda dimensione in cromatografia bidimensionale su lastre di cm 20 × 20, spessore 0,25 mm, deponendo il punto a 3 cm dalla base e dal lato destro, sviluppando in prima dimensione con solvente cloroformio-metanolo-acqua 90 : 10 : 0,5.

d) *Acetone-benzene* 50 : 50, con sviluppo normale (circa 45 min.) per la seconda dimensione in cromatografia bidimensionale come sopra descritto.

e) *Esano-sterile etilico-acido acetico* 70 : 30 : 1, con lastre di cm 20 × 20 e spessore 0,5 mm, per l'analisi delle frazioni lipidiche; rivelazione con vapori di iodio.

Metodi colorimetrici.

La reazione al blu di tetrazolio veniva eseguita con il metodo di NOWACZYNSKI, GOLDNER & GENEST (1955) sia sugli estratti corticali *in toto* (estratto Ep) che sulle frazioni eluite dai cromatogrammi, fatta eccezione per le zone dei componenti minori (aldosterone). Con questa reazione i risultati venivano espressi in idrocortisone, misurando quantità di sostanza comprese tra 3 e 15 µg. (limiti della curva di taratura).

Per la determinazione dell'aldosterone veniva impiegata una modifica del metodo su microscala (CAVINA, GIOCOLI & SARDINI, 1967) che consentiva di misurare quantità di aldosterone comprese tra 1 e 3,5 µg in un volume di reazione di 1,2 ml, con impiego di microvaschette per lo spettrofotometro Beckman oppure del microcolorimetro Beckman-Spinco.

RISULTATI

a) Separazione in colonna.

Prove preliminari eseguite con colonne di dimensioni minori rispetto a quelle descritte nei metodi (diam. 11 mm, 4 g di gel di silice, altezza cm 8,5, rapporto H/d circa 7,7, volume delle frazioni circa 6 volte il volume

della colonna e pari a 50 ml) hanno consentito di verificare che eluendo l'estratto lipidico (130 mg circa) con tre frazioni da 50 ml di esano-etero 80 : 20 seguite da 3 frazioni di 50 ml di acetone, si ottiene il passaggio pressochè totale dei lipidi nella prima frazione, mentre restano nella seconda e terza frazione solo tracce di trigliceridi e di esteri di colesterolo : viceversa gli steroidi passano in maniera netta nella frazione quarta (acetone) senza dare code nelle frazioni quinta e sesta. Gli eluati sono stati concentrati a pressione ridotta fino a piccolo volume : aliquote delle soluzioni concentrate sono state analizzate per cromatografia in strato sottile con i sistemi (e) per i lipidi neutri (Fig. 1) e (b) per i corticosteroidi (Fig. 2). Il comportamento degli steroidi puri è stato verificato sottoponendo allo stesso procedi-



FIG. 1.



Fig. 2.

Fig. 1. — Cromatografia in strato sottile, sistema di solventi (e), rivelazione vapori di iodio, eluati da cromatografia in colonna.

Corsia 1 : frazione I ; Corsia 2 : frazione II ; Corsia 3 : frazione III ; Corsia 4 : frazione IV ; Corsia 5 : standard di colesterolo e colesterolo stearato.

Il passaggio dei lipidi nella I frazione è pressochè totale, restano solo tracce di trigliceridi e di esteri di colesterolo nella II e III frazione, mentre nella IV restano alla partenza, oltre ai corticosteroidi, fosfolipidi e altro materiale molto polare.

Fig. 2. — Cromatografia in strato sottile, sistema di solventi (b), rivelazione blu di tetrazolio alcalino, eluati da cromatografia in colonna.

Corsia 1 : frazione IV ; Corsia 2 : frazione V ; Corsia 3 : frazione VI ; Corsia 4 : miscela standard di corticosteroidi.

Si osserva un passaggio completo dei corticosteroidi nella IV frazione, senza code nelle frazioni successive.

mento di cromatografia una aliquota di 100 μg di miscela di corticosteroidi da noi preparata (v. materiali e metodi): gli steroidi passano in blocco nella frazione quarta (Fig. 3). È interessante far presente che, se si trascura di

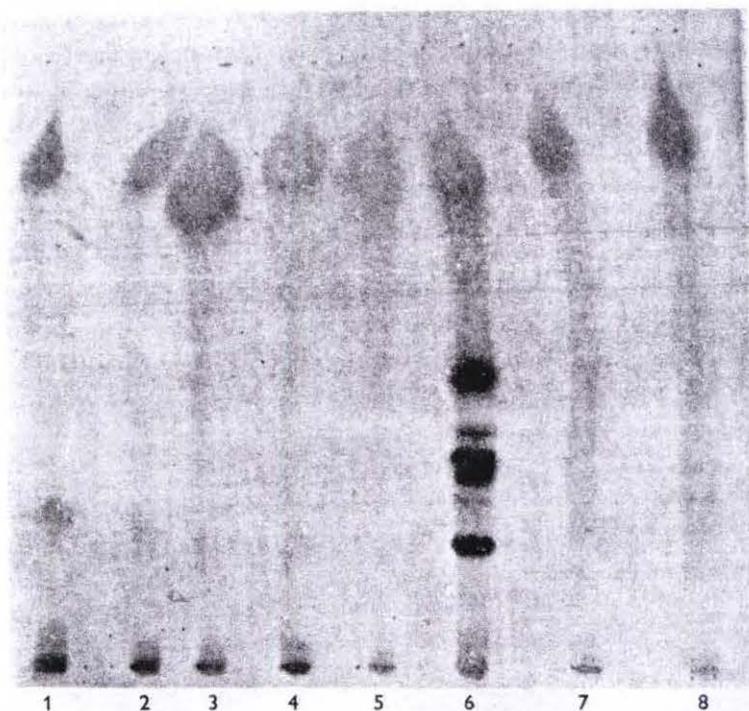


Fig. 3. — Cromatografia in strato sottile, sistema di solventi (b), rivelazione blu di tetrazolio alcalino, eluati da cromatografia in colonna.

Corsie 1 e 2: residui dei solventi impiegati nell'eluazione (acetone e benzina: etere etilico 80:20); Corsie 3-8: frazioni da I a VI di una cromatografia con miscela standard di corticosteroidi.

Non vi è presenza di corticosteroidi nelle prime tre frazioni, né nelle ultime due.

purificare dal ferro il gel di silice come da noi descritto, si ha nell'analisi cromatografica la formazione di code da parte della frazione steroidi, con conseguente passaggio di questi nella frazione quinta (*).

I risultati della separazione in colonna dei lipidi dagli steroidi sono soddisfacenti, in quanto sia in scala ridotta che in scala normale, conducono

(*) Altre esperienze condotte con miscele cloroformio-acetone 99:1 (3 frazioni da 50 ml) seguite da miscele 50:50 (3 frazioni da 50 ml) su gel di silice Davison 922.200 mesh, purificato per lavaggio con solventi, dimostrano che si ottengono analoghe separazioni dei lipidi nelle prime frazioni, però gli steroidi meno polari (Composti A ed S) tendono a passare anche nelle frazioni seconda e terza e le frazioni quarta e quinta contengono impurezze poco polari che disturbano le successive analisi cromatografiche.

all'allontanamento costante del $96,6\% \pm 0,7$ dell'estratto lipidico totale (frazione non steroidea) senza causare perdite di corticosteroidi.

La residua frazione «steroidica» deve essere ulteriormente purificata per consentire l'analisi quantitativa dei corticosteroidi.

A questo scopo abbiamo condotto prove per cromatografia in strato sottile con diversi sistemi di solventi, operando sia con estratto lipidico cromatografato per colonna che con miscela di steroidi: i migliori risultati sono stati conseguiti con la successione di sviluppi con i solventi indicati in (a): con il primo solvente viene allontanata la maggior parte dei lipidi (gli steroidi hanno $R_f \simeq 0$) e con il secondo, dove i corticosteroidi si muovono come una banda unica con $R_f \simeq 0,60-0,65$, si ottiene la separazione da fosfolipidi, colesterolo, digliceridi e altri componenti minori della frazione.

Dopo questa purificazione la banda corticoidi viene ottenuta in buone condizioni di purezza, come dimostrato dalla Fig. 4 che mostra la separa-

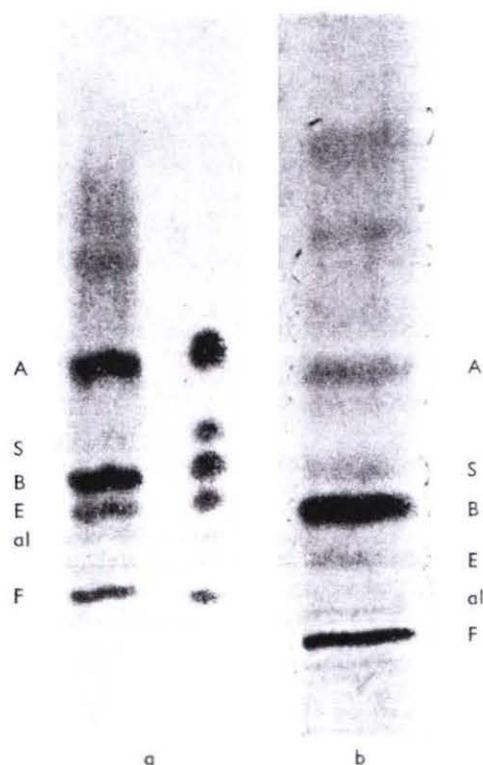


Fig. 4 a e b. — Cromatografie in strato sottile, sistema di solventi (b), rispettivamente di estratto corticale bovino con miscela di corticosteroidi standard e di estratto corticale suino. Rivelazione blu di tetrazolio alcalino. La successione delle macchie nella miscela standard è la seguente (dalla origine al fronte): idrocortisone — aldosterone (debole) — cortisone — corticosterone — composto S — composto A.

zione dei corticosteroidi per gli estratti bovino e suino sottoposti all'insieme dei passaggi sopra elencati.

b) *Analisi degli estratti.*

Le Tab. 1 e 2 riportano i risultati delle analisi eseguite sugli estratti da corteccia surrenale di bovino e suino sottoposti a cromatografia in strato sottile con il sistema di solventi (b) e dosati con metodo colorimetrico (l'aldosterone è stato determinato con il procedimento descritto da CAVINA & GIOCOLI (1968). Risultano evidenti le differenze tra i due estratti, come già noto dal lavoro di KUIZENGA *et al.* (1942), sia dal punto di vista del

TABELLA 1.

Analisi degli estratti corticaii bovino e suino con il metodo colorimetrico al blu di tetrazolio

Valori determinati in doppio campione ed espressi in idrocortisone

FRAZIONE ANALIZZATA	ESTRATTO BOVINO		ESTRATTO SUINO	
	$\mu\text{g/g}$ di tessuto fresco	% dei lipidi totali	$\mu\text{g/g}$ di tessuto fresco	% dei lipidi totali
Eluato da colonna purificato per TLC con il sistema (a)	12,7 ; 14,5	0,029 ; 0,034	36,6 ; 36,9	0,061 ; 0,061
Steroidi eluiti da TLC con sistema (b)	7,0 ; 7,0	0,016 ; 0,016	25,2 ; 28,6	0,042 ; 0,048

TABELLA 2.

Composizione percentuale degli estratti corticaii bovino e suino determinata per analisi con il metodo colorimetrico al blu di tetrazolio (valori espressi in idrocortisone) dopo cromatografia in strato sottile con il sistema (b).

Valori determinati in doppio campione e calcolati sul totale della frazione steroidi eluita dal cromatogramma.

FRAZIONE ANALIZZATA	Estratto bovino	Estratto suino
Tetraidro { idrocortisone	6,3 ; 7,3	3,7 ; 4,1
{ cortisone		
Idrocortisone	20,7 ; 19,8	38,9 ; 36,8
Aldosterone	2,1 ; 1,6	0,9 ; 0,6
Cortisone	18,3 ; 17,5	12,3 ; 10,4
Corticosterone	28,3 ; 29,5	26,5 ; 29,1
Desossicortisolo (Comp. S)	4,7 ; 5,0	6,4 ; 7,2
Deidrocorticosterone (Comp. A)	19,6 ; 19,3	11,3 ; 11,8

contenuto totale che dal punto di vista della composizione percentuale dei vari corticosteroidi. L'estratto corticale da ghiandole di suino è più ricco in corticoidi totali; inoltre il primo estratto è più ricco in idrocortisone, mentre il secondo contiene corticosterone e 11-deidrocorticosterone in maggiore quantità.

c) *Prove di cromatografia bidimensionale.*

Le prove da noi condotte hanno portato a risultati di poco differenti in due diverse condizioni sperimentali. In entrambi i casi il primo sviluppo veniva effettuato con il sistema (b) mentre il secondo sviluppo in un caso veniva effettuato con acetone : benzene 50 : 50 a sviluppo normale e nell'altro con acetone-benzene 30 : 70 a sviluppo continuo per 2 ore. La separazione è migliore quando il secondo sviluppo viene effettuato con solvente meno polare con andamento continuo, come dimostrano le Fig. 5 e 6 [sul-

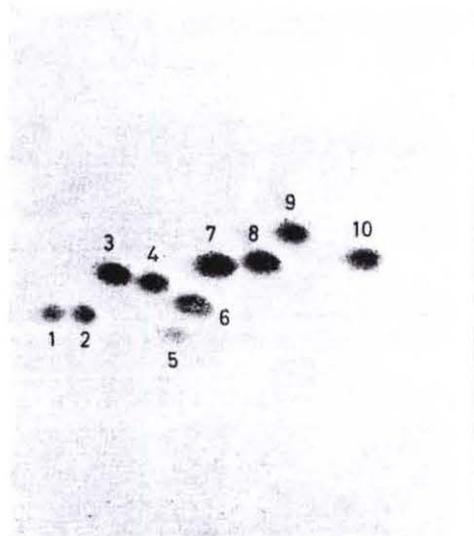


Fig. 5.



Fig. 6.

Fig. 5 e 6. — Cromatografie in strato sottile di una miscela standard di corticosteroidi. Primo sviluppo con sistema di solventi (b). Secondo sviluppo: Fig. 5, acetone : benzene 50 : 50 a sviluppo normale; Fig. 6, acetone : benzene 30 : 70 a sviluppo continuo 2 ore. Rivelazione blu di tetrazolio alcalino.

Nella Fig. 5 i numeri indicano le posizioni dei corticosteroidi, e precisamente:

1) THF : 3α - 11β - 17α - 21 -tetraidrossipregnano 20-one; 2) THE : 3α - 17α - 21 -triidrossipregnano 11,20-dione; 3) Cortisolo : 11β - 17α - 21 -triidrossipregna-4-ene 3,20-dione; 4) THB : 3β - 11β - 21 -triidrossiallopregnano 20-one (iso- α THB); 5) Aldosterone : 11β - 21 -diidrossipregna-4-ene 18-al-3,20-dione; 6) THA : 3α - 21 -diidrossipregnano 11,20-dione; 7) Cortisone : 17α - 21 -diidrossipregna-4-ene 3,11,20-trione; 8) Corticosterone : 11β - 21 -diidrossipregna-4-ene 3,20-dione; 9) Composto S : 17α - 21 -diidrossipregna-4-ene 3,20-dione; 10) Composto A : 21 -idrossipregna-4-ene 3,11,20-trione;

l'utilità dei sistemi a sviluppo continuo nella cromatografia in strato sottile vedi CAVINA & MORETTI (1966) e CAVINA, GIOCOLI & MORETTI (1966)]. La Fig. 7 mostra l'applicazione di questa tecnica all'analisi di un estratto corticale suino.

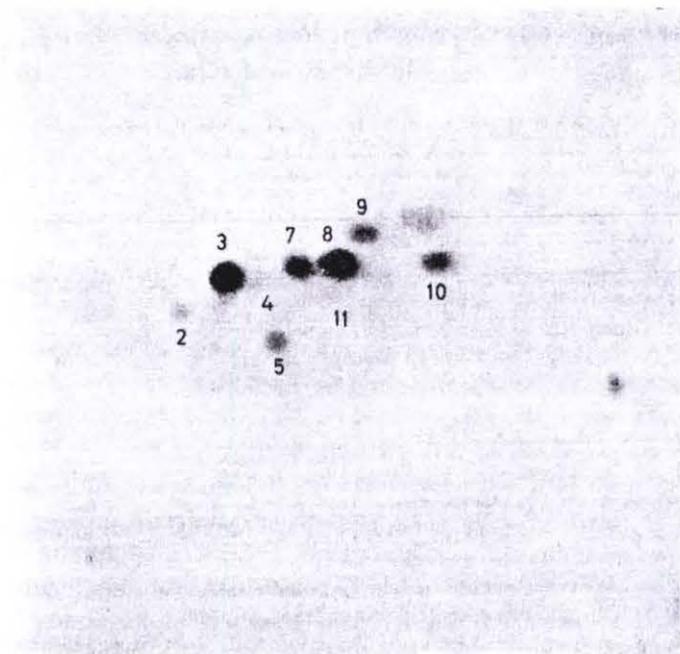


Fig. 7. — Cromatografia in strato sottile di un estratto corticale suino preparato con la metodica qui descritta, eseguita con la tecnica indicata nella Fig. 5 alla quale si rimanda per la numerazione degli steroidi (inoltre, n. 11 = α -THA). Rivelazione blu di tetrazolio alcalino.

Si deve aggiungere che, aumentando il tempo di sviluppo continuo, migliora la separazione dell'aldosterone dagli altri corticoidi, come descritto da CAVINA & GIOCOLI (1968) in un altro lavoro.

CONCLUSIONI

Riteniamo che i risultati da noi ottenuti possano soddisfare le seguenti esigenze: a) purificazione senza apprezzabili perdite di componenti meno polari della frazione corticosteroidi *in toto* dal grosso dei costituenti lipidici presenti nell'estratto delle glandole surrenali con cloroformio metanolo 2 : 1, con eliminazione del 96,6 % dei componenti lipidici; b) successiva analisi cromatografica qualitativa e quantitativa con metodi colorimetrici della frazione corticosteroidica purificata ed isolata come da noi descritto.

Questa metodica potrebbe trovare applicazione sia nello studio dei costituenti steroidei delle glandole surrenali di animali da esperimento in diverse condizioni di trattamento sia in quello di reperti da autopsie o interventi chirurgici, oppure in campo industriale, nello studio di metodi di preparazione di estratti corticali, consentendo di stabilire su una modesta aliquota di materiale di partenza il contenuto steroideo di questo.

30 ottobre 1967.

BIBLIOGRAFIA

- ANGELICO, R., G. CAVINA, A. D'ANTONA & G. GIOCOLI, 1965. *J. Chromatog.*, **18**, 57.
CAVINA, G., 1956. *Ann. Chimica*, **46**, 43.
CAVINA, G. & G. GIOCOLI, 1968. *Ann. Ist. Super. Sanità*, **4**, 101.
CAVINA, G., G. GIOCOLI & G. MORETTI, 1966. *Boll. Soc. Ital. Biol. Sper.*, **42**, 116.
CAVINA, G., G. GIOCOLI & D. SARDINI, 1967. *Ann. Ist. Super. Sanità*, **3**, 579.
CAVINA, G. & G. MORETTI, 1966. *J. Chromatog.*, **22**, 41.
CAVINA, G. & C. VICARI, 1964. *Farmaco, Ed. Prat.*, **19**, 338.
FOLCH, J., M. LEES & G. H. SLOANE STANLEY, 1957. *J. Biol. Chem.*, **226**, 497.
GLENN, E. M. & D. H. NELSON, 1953. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **13**, 911.
GOLDZIEHR, J., R. A. BAKER & E. C. RIHA, 1961. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **21**, 62.
HERNANDEZ, R. & L. R. AXELROD, 1963. *Anal. Chem.*, **35**, 80.
KUIZENGA, M. A., A. N. NICK, D. J. INGLE & J. W. NELSON, 1942. *J. Biol. Chem.*, **147**, 561.
NEHER, R. & A. WETTSTEIN, 1955. *Acta Endocrinol.*, **18**, 386.
NOWACZYNSKI, W., M. GOLDNER & J. GENEST, 1955. *J. Lab. Clin. Med.*, **45**, 818.
SIMPSON, S. A., J. F. TAIT, A. WETTSTEIN, R. NEHER, J. VON EUW, O. SCHINDLER & T. REICHSTEIN, 1954. *Helv. Chim. Acta*, **37**, 1163.
WETTSTEIN, A., F. W. KAHNT & R. NEHER, 1955. *Ciba Found. Colloq. Endocrinol.*, **7**, 170.