

11. Giuseppe PRUNER. — Valutazione dell'attività biologica dell'insulina dal potere riducente rispetto al ferricianuro di potassio. — Nota 1.

Riassunto. — Viene descritto un metodo per determinare, rispetto al ferricianuro di potassio in soluzione alcalina, il potere riducente dell'insulina e per calcolare da questo l'attività biologica.

La riduzione viene eseguita in fiale da 5 cm³, contenenti ciascuna mg 0,5 di insulina in soluzione alcalina di ferricianuro (mg 1,5).

Il riscaldamento delle fiale viene effettuato in ultratermostato a 90°, per 30, 60, 90 e 120 minuti primi.

La determinazione del ferricianuro residuo viene eseguita con lo spettrofotometro di Beckman mod. DU ad una lunghezza d'onda di 420 mμ.

Le quantità di ferricianuro ridotto dai vari campioni d'insulina, nei quattro tempi di riscaldamento, diminuite di una quantità costante per tutti, che si ottiene mediante calcolo oppure sperimentalmente, risultano proporzionali alle attività biologiche.

Prendendo per esempio come riferimento il campione di insulina standard di 22 unità e con potere riducente di mg 7,435 (somma delle quantità di ferricianuro ridotto nei quattro tempi di riscaldamento, riferite ad 1 mg di insulina in 10 cm³ di soluzione), e come quantità costante da sottrarre mg 2,898, l'attività biologica di un campione in esame risulta dalla seguente formula:

$$\text{Un. biol.} = 22 \frac{b - 2,898}{7,435 - 2,898}$$

in cui b è il potere riducente del campione in esame.

Résumé. — On décrit une méthode pour déterminer le pouvoir réducteur de l'insuline par rapport au ferricyanure de potassium en solution alcaline et pour calculer, sur la base de ce pouvoir réducteur, l'activité biologique de l'insuline.

La réduction est effectuée dans des ampoules de 5 cm³, contenant chacune mg 0,5 d'insuline en solution alcaline de ferricyanure (mg 1,5).

Le chauffage des ampoules est effectué dans un ultrathermostat à 90° C, pendant 30, 60, 90 et 120 minutes.

Le dosage du ferricyanure résiduel est effectué par le spectrophotomètre de Beckman mod. DU à une longueur d'onde de 420 mμ.

Les quantités de ferricyanure réduit par les divers échantillons d'insuline, pendant les quatre temps de chauffage ci-dessus indiqués, diminuées d'une quantité constante pour tous, que l'on obtient par le calcul ou expérimentalement, d'après les résultats obtenus sont proportionnelles aux activités biologiques.

Si par exemple on prend comme échantillon de référence l'insuline standard de 22 unités et ayant le pouvoir réducteur de mg 7,435 (somme des quantités de ferricyanure réduit dans les quatre temps de chauffage, référées à 1 mg d'insuline dans 10 cm³ de solution), et comme quantité constante à déduire mg 2,898, l'activité biologique d'un échantillon ainsi examiné résulte de la formule suivante:

$$\text{Unités biologiques} = 22 \frac{b - 2.898}{7,435 - 2,898}$$

où b est le pouvoir réducteur de l'échantillon examiné.

Summary. — A method is described for the determination of insulin, based: on its reducing power of alkaline ferricyanide.

The determinations were carried out with different commercial products of pure insulin with biological activities ranging from 10 to 25 international units.

A relationship between biological activity and reducing power has been established.

The best reproducible conditions for the reactions were obtained when the reduction was carried out in vials of five ml, each containing 0.5 mg of insulin in 3.5 ml of an alkaline solution obtained by mixing 10 ml of a 1 per cent aqueous solution of sodium carbonate and 25 ml of phosphate buffer pH 7.4, and adding 1.5 ml of a solution of potassium ferricyanide containing 1 mg per ml.

The determination of the remaining ferricyanide is made spectrophotometrically by means of a Beckman spectrophotometer at 420 mμ.

$$\text{Biol. units} = 22 \frac{b - 2,898}{7,435 - 2,898}$$

where b is the reducing power of the sample examined.

Zusammenfassung. — Es wird eine Methode beschrieben, um die reduzierende Wirkung des Insulins auf alkalisch gelöstes Ferrocyanid zu bestimmen und um aus dieser die biologische Aktivität zu berechnen.

Die Reduktion wird in Phiolen zu 5 cm³, die je 0,5 mg Insulin in alkalischer Ferricyanidlösung (mg 1,5) enthalten, ausgeführt.

Das Erhitzen der Phiolen wird im Ultrathermostat bei 90°, während 30, 60, 90 und 120 Minuten durchgeführt.

Die Bestimmung des restlichen Ferricyanids wird mit dem Spektrophotometer von Beckman Mod. DU bei einer Wellenlänge von 420 m μ ausgeführt.

Die während der 4 Erhitzungsperioden von den verschiedenen Proben reduzierten Ferricyanidmengen, von denen eine für alle, durch Berechnung oder experimentell erhaltene konstante Grösse, abgezogen wird, sind der biologischen Aktivität proportional.

Wenn man z. B. vergleichsweise die standard Insulinprobe zu 22 Einheiten und Reduktionsfähigkeit 7,435 mg (Summe der während der 4 Erhitzungsperioden reduzierten Ferricyanidmengen, auf 1 mg Insulin in 10 cm³ Lösung bezogen) und als abzuziehende konstante Grösse mg 2,898 nimmt, erhält man die biologische Aktivität einer Probe aus der folgenden Formel:

$$\text{Biol. Einheit} = 22 \frac{b - 2,898}{7,435 - 2,898}$$

wo b die reduzierende Wirkung der zu untersuchenden Probe ist.

Com'è noto, il riconoscimento e la determinazione dell'attività dell'insulina vengono praticati esclusivamente per via biologica. Tentativi di determinazione per via chimica non hanno portato finora a soluzioni pratiche: quelli di FORNET (1), di BRUCH (2) e di BÜRGER (3), tutti basati sul potere riducente dell'insulina rispetto al ferricianuro in soluzione alcalina, derivano dal metodo, che HAGEDORN e JENSEN (4) hanno proposto per la determi-

(1) Verhandlungen der Deutsch - Pharmazeutischen Gesellschaft 1927, 93, (a).

(2) Arch. exper. Path. u. Pharm. 173, 439 (1933).

(3) Verhandlungen der deutschen Gesellschaft für innere Medizin XLIV. Kongress, Wiesbaden 1932, S. 458, (b).

(4) Biochem. Z., 135, 46, (1923); 137, 92 (1923).

(a) Citato: VINCKE « Vitamine und Hormone und ihre technische Darstellung » Hirzel, Leipzig/1938.

(b) Citato: Arch, exper. Path. u. Pharm. 173, 439 (1933).

nazione del glucosio nel sangue. Essi hanno trovato che l'azione riducente dell'insulina nelle condizioni da loro proposte varia nello stesso senso dell'attività biologica del preparato, ma non hanno riscontrato una proporzionalità sufficiente per una valutazione dell'attività in base al saggio chimico. Bürger difatti constatava un potere riducente rispetto al ferricianuro anche dopo inattivazione dell'insulina per trattamento a caldo con soluzione alcalina. Bruch nei suoi esperimenti si limitò a determinare l'azione riducente di insuline di varie provenienze tenendole in soluzione alcalina di ferricianuro a b. m. per 15' e determinando poi il ferricianuro residuo col metodo di Hagedorn e Jensen.

Questo fu il metodo che servì come punto di partenza per le mie ricerche. Molte centinaia di determinazioni occorsero per arrivare a stabilire le condizioni e per ottenere i risultati che vengono riassunti nella presente Nota: nella quale le concentrazioni in ferricianuro vengono determinate per via colorimetrica con lo spettrofotometro di Beckman mod. DU; mentre la determinazione del ferricianuro residuo col metodo iodometrico e l'esecuzione del saggio chimico sui preparati d'insulina del commercio, verranno descritte in una Nota successiva.

Le mie ricerche non pretendono di aver definitivamente risolto il problema della determinazione per via chimica dell'attività biologica dell'insulina: esse hanno permesso però di ordinare i campioni di insulina prodotti dalle varie Case, secondo il loro potere riducente e di stabilire una relazione che in pratica, finora, mi ha sempre permesso di valutare l'attività biologica dal potere riducente.

I metodi biologici sono lunghi e costosi e danno risultati attendibili solo se praticati su numerosi animali: in alcuni casi essi sono insostituibili, ma in altri il metodo chimico, rapido, nient'affatto costoso e di sufficiente approssimazione, potrà essere di grande utilità pratica.

Il procedimento con tutti i particolari verrà descritto nella parte sperimentale: non ritengo inutile però premettere qui uno schematico accenno ai tentativi attraverso i quali sono arrivato al metodo definitivo.

La fig. 1 mostra come viene progressivamente ridotta da 4 campioni di insulina di differente attività una soluzione alcalina di ferricianuro tenuta in termostato a 90° per 75'. Il ferricianuro veniva determinato per via colorimetrica con il fotometro di Pulfrich. Si nota un andamento della riduzione assai irregolare ma già s'intravede che azione riducente ed attività dei campioni si dispongono grosso modo nello stesso ordine.

FIGURA n. 1

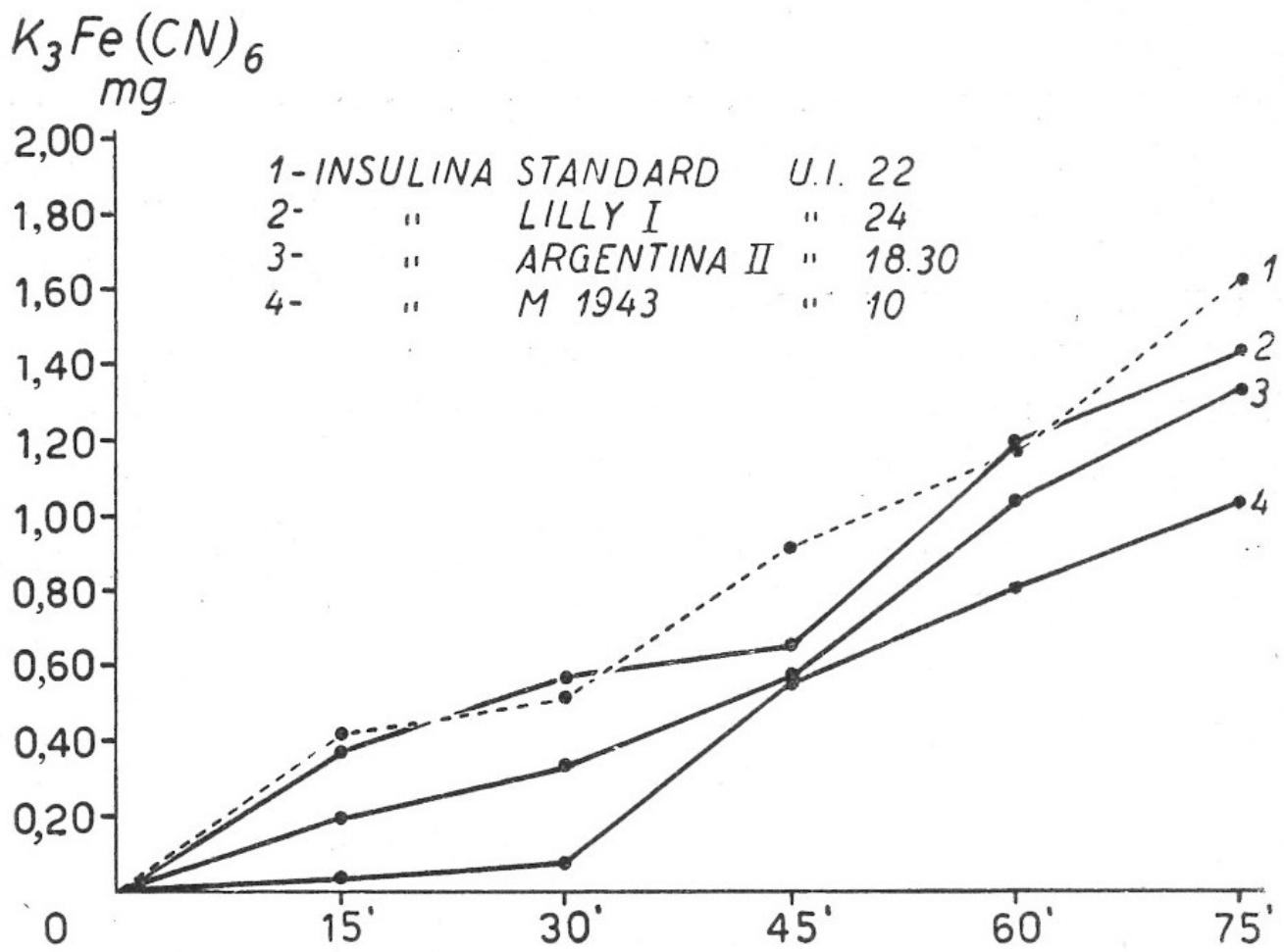
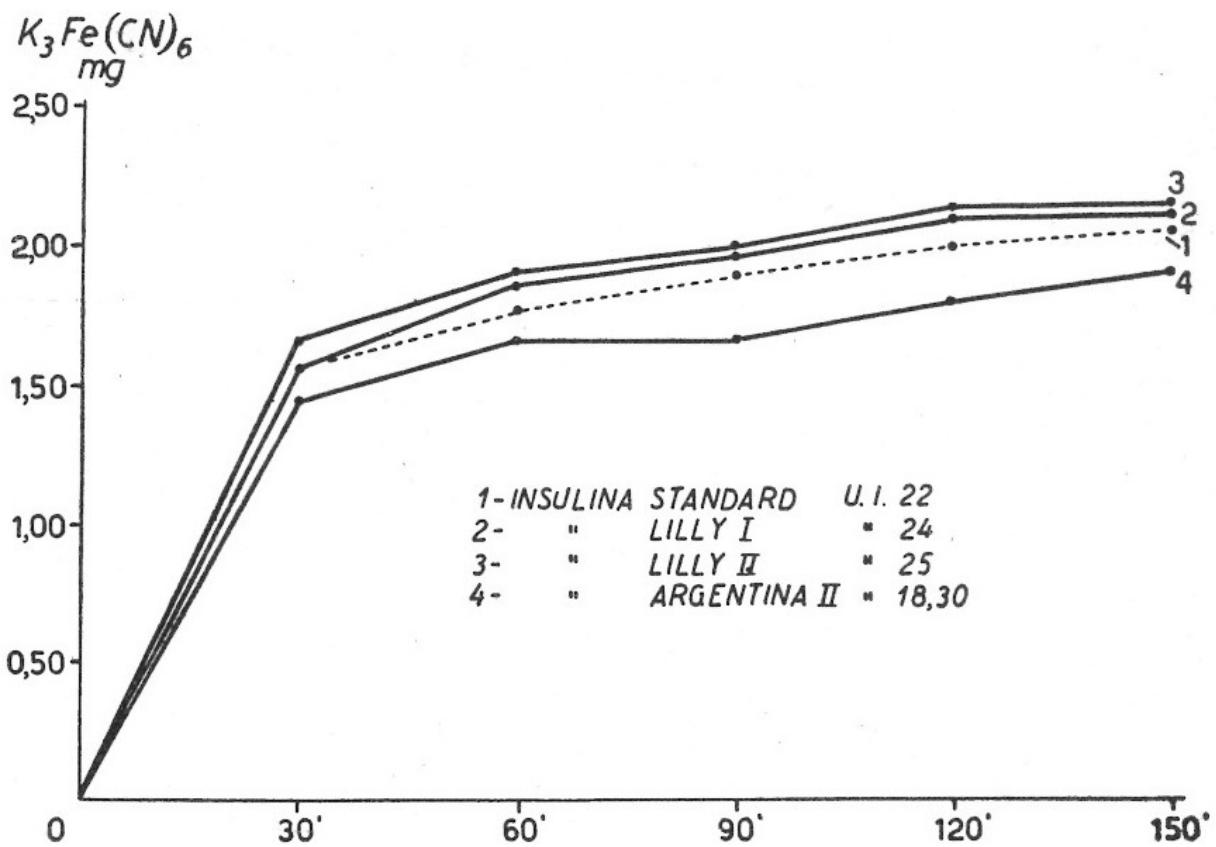


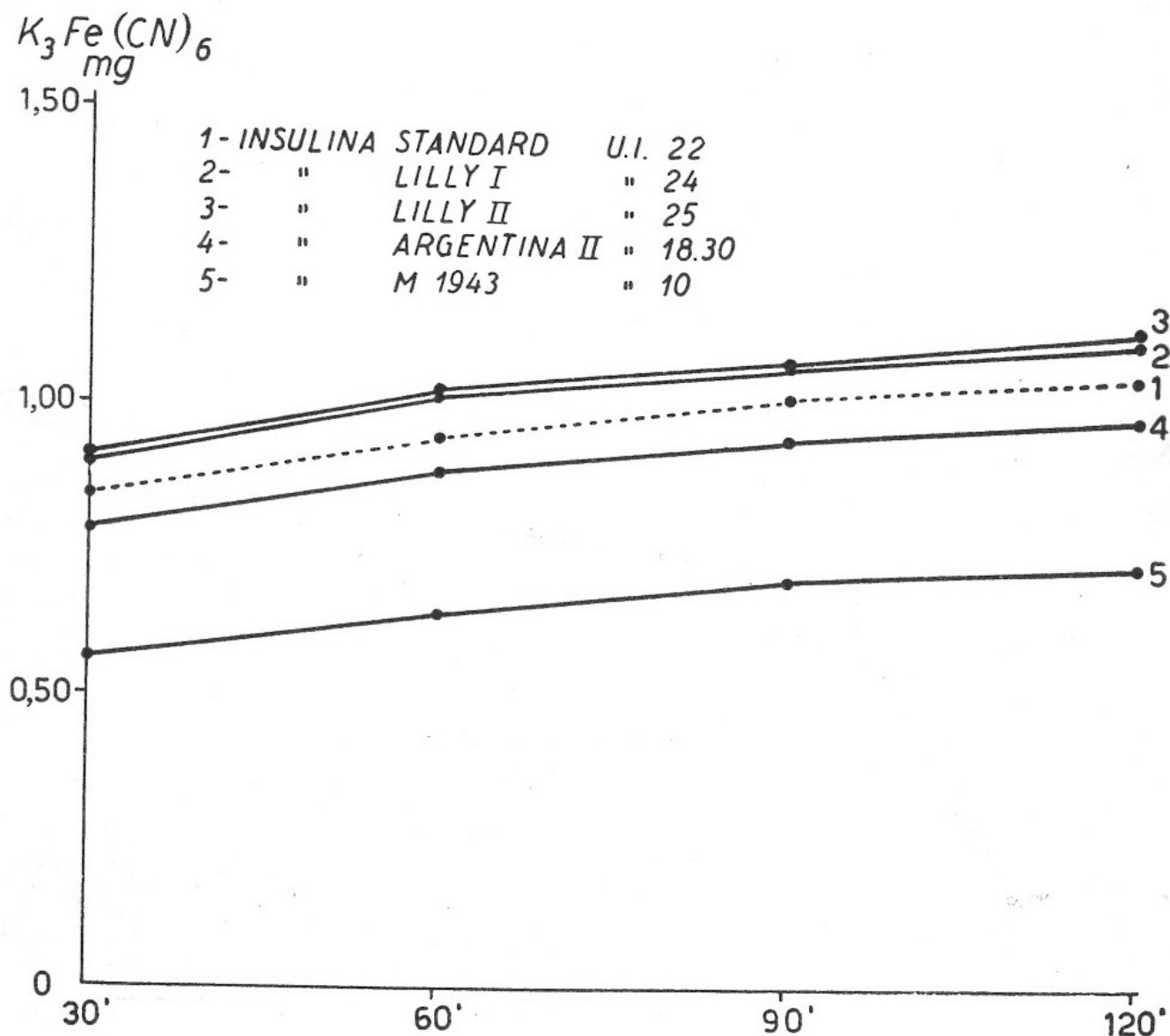
FIGURA n. 2



Migliori risultati si ottennero quando, per tentativi, si riuscì a definire il pH optimum dell'ambiente dove si fa avvenire la ossidazione dell'insulina: esso risultò di 11,3 circa e venne ottenuto con una miscela di fosfati e carbonato alcalini. Nel contempo la determinazione colorimetrica del ferricianuro al Pulfrich venne sostituita con quella iodometrica. Il diagramma della fig. 2 mostra, rispetto al precedente, che la reazione è assai più regolare e che le attività riducenti dei campioni si dispongono esattamente nello stesso ordine come le attività biologiche.

Al fine di raggiungere una perfetta uniformità nelle condizioni di reazione, il liquido anziché in tubetti venne messo in fiale e queste vennero introdotte in ultratermostato. Il diagramma della fig. 3, limitato ai tempi di riscaldamento compresi fra 30' e 120', documenta la raggiunta regolarità della reazione e la sensibilità del metodo che sembra permettere di distinguere due campioni differenti fra loro per una sola unità biologica.

FIGURA n. 3

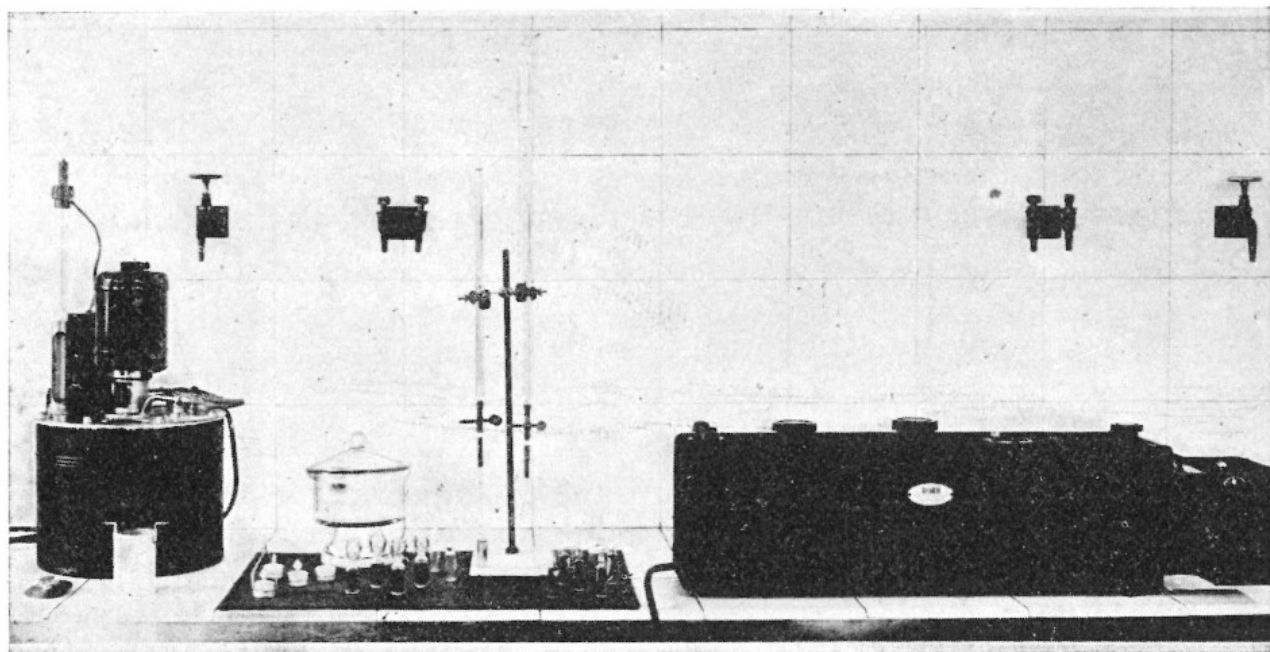


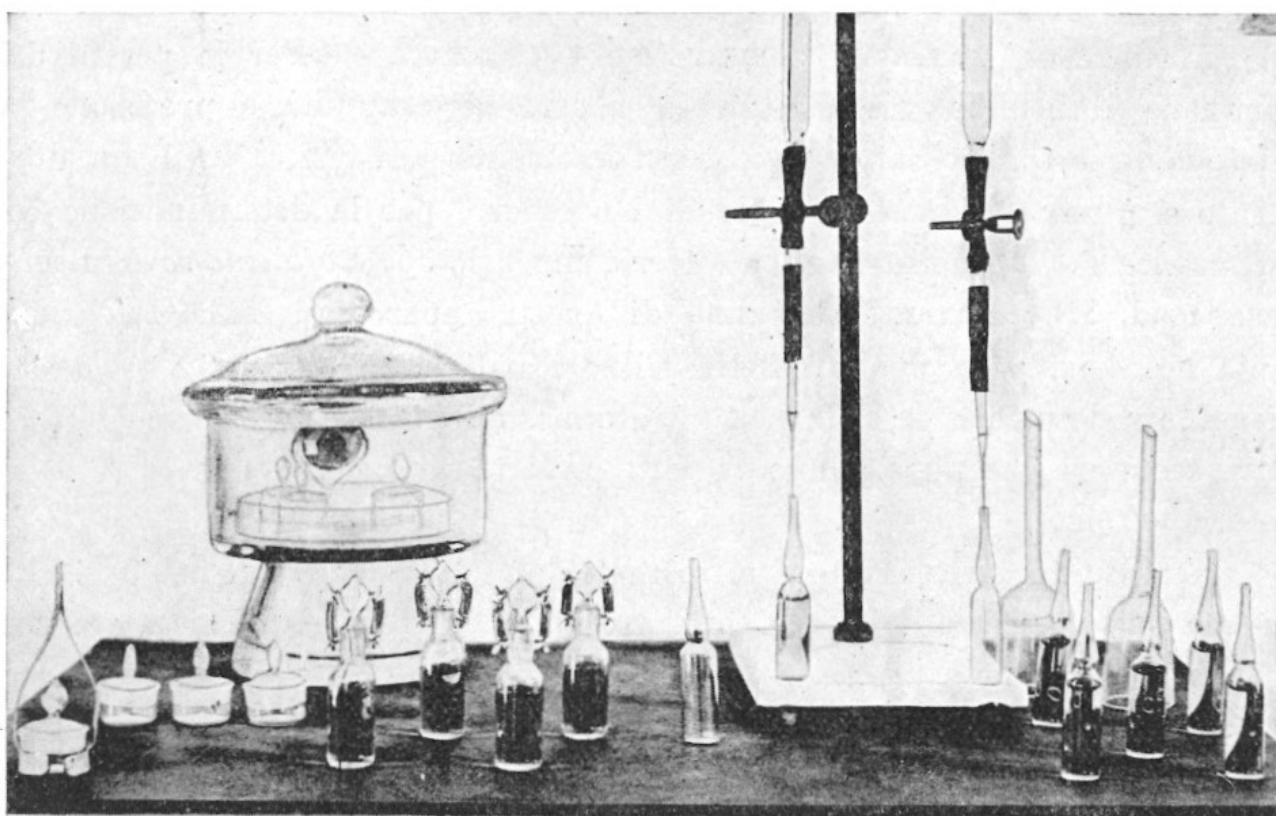
PARTE SPERIMENTALE

APPARECCHI, MATERIALI E SOLUZIONI OCCORRENTI. — Per la pesata del campione d'insulina s'è dimostrata adatta per rapidità e precisione la *microbilancia* Galileo-Sartorius con smorzamento ad aria. Per il riscaldamento si è usato l'*ultratermostato* di Hœppler e per la determinazione colorimetrica delle concentrazioni di ferricianuro lo *spettrofotometro* di Bechman mod. DU. Davanti al primo di questi apparecchi, nella fotografia della fig. 4, si vede una vaschetta cilindrica di zinco di cm $8,3 \times 5,3$ che viene introdotta con le fiale nell'*ultratermostato*. Nella fig. 5 sono visibili altri accessori che pure hanno la loro importanza per il buon esito della determinazione.

Accanto ad un essiccatore si scorgono piccoli *pesafiltri* di cm $2,5 \times 1,5$ ed una *pinza* speciale che serve per trasportare gli stessi dall'essiccatore alla *microbilancia*. Più a destra si vedono dei *flaconcini* di 6 cm³ circa, chiusi con tappo smerigliato tenuto saldamente da due mollette d'acciaio nichelato: sono destinati a sostituire le fiale quando l'esperienza ne avrà confermata la maggior praticità. Si notano poi delle *fiale* da 5 cm³ di vetro neutro e a fondo piano nella fase di riempimento. Più a destra ancora si trovano due *imbutini* a setto poroso di Jena del tipo 3G, porosità 2 che servono per filtrare le soluzioni d'insulina nelle *burette* da 25 cm³. Un'altra *buretta* da 25 cm³ serve per la soluzione alcalina ed una semimicroburetta da 10 cm³ divisa in ventesimi di cm³ serve per la soluzione di ferricianuro.

FIGURA n. 4





Si tengono preparate le seguenti soluzioni:

1) Ferricianuro potassico	g 0,20
Acqua bidistillata q.b. a	cm ³ 200
2) Fosfato monopotassico anidro	g 0,3304
Fosfato bisodico dodecaidrato	g 1,9420
Acqua bidist. q.b. a	cm ³ 250
3) Carbonato sodico secco	g 1
Acqua bidist. q.b. a	cm ³ 100

PROCEDIMENTO

Come esempio si sceglie l'esame di un campione di Insulina Lilly I di confronto con l'insulina standard di 22 U.I./mg del National Institute for Medical Research di Londra.

Per maggior chiarezza di esposizione il procedimento vien diviso in 5 tempi.

I. — PESATE. Si pesano separatamente sulla microbilancia negli appositi pesafiltri 3 mg di insulina standard e 3 mg del campione in esame. Le pesate dell'insulina devono essere fatte in pesafiltri chiusi, avendo riscontrato nell'insulina una igroscopicità non trascurabile, tanto maggiore quanto più attiva, cioè pura, è l'insulina.

II. — DISSOLUZIONE DELL'INSULINA ED AGGIUNTA DEI REATTIVI. Si uniscono 50 cm³ della soluzione n. 2 e 20 cm³ della soluzione n. 3 accuratamente filtrate; si mette questa miscela in buretta da 25 cm³ e la soluzione di ferricianuro pure accuratamente filtrata in semimicroburetta da 10 cm³. Il seguente esempio mostra come si calcolano i volumi di dette soluzioni nei quali sciogliere le quantità pesate di insulina.

Si supponga di aver pesato mg 3,10 di standard e mg 2,90 del campione in esame (insulina Lilly I): poichè un mg di insulina si dovrà sciogliere in 7 cm³ di soluzione alcalina e 3 cm³ di soluzione di ferricianuro i mg 3,10 dello standard si scioglieranno in 21,70 cm³ della prima e in 9,30 cm³ della seconda soluzione ed i mg 2,90 del prodotto in esame in 20,30 cm³ di soluzione alcalina e 8,70 cm³ di soluzione di ferricianuro.

La dissoluzione viene eseguita direttamente nel pesafiltro con una parte della soluzione alcalina e facilitata dall'agitazione con bacchetta di vetro; si versa la soluzione, attraverso un imbutino in una bevuta da 50 cm³ fornita di tappo a smeriglio; si lava il pesafiltro più volte fino ad esaurire la quantità calcolata di soluzione alcalina e si raccoglie tutto nella stessa bevuta. Si aggiunge quindi nel matraccio il volume calcolato di soluzione di ferricianuro e si mescola; le due soluzioni di insulina così preparate si filtrano direttamente in due burette da 25 cm³, attraverso imbuto con setto di vetro poroso. E' della massima importanza che le due soluzioni siano perfettamente limpide e che tutta la vetreria sia accuratamente lavata: le fiale in particolare dovranno essere ripetutamente lavate prima con acqua acidificata con acido cloridrico e poi con acqua distillata e bidistillata: serve bene allo scopo una campana a vuoto.

Il riempimento definitivo delle fiale avviene per mezzo di dette burette a pinza alle quali è stato applicato un tubetto di vetro affilato, come si vede nella fig. 5. Introdotti esattamente 5 cm³ per fiala, si passa alla chiusura alla soffieria. E' bene che le fiale siano uniformemente tagliate.

III. — RISCALDAMENTO DELLE FIALE NELL'ULTRATERMOSTATO. Poste 4 fiale per ciascun campione d'insulina nella vaschetta di zinco e riempita con acqua distillata, s'immerge la vaschetta nell'ultratermostato non appena esso ha raggiunto i 90°.

Le fiale vengono prelevate ai 30, 60, 90 e 120 minuti dal momento in cui furono immerse e vengono poste in acqua fredda al riparo della luce. La segnalazione dei tempi viene ottenuta con un comune cronometro a soneria da laboratorio. Per poter distinguere all'atto del prelevamento i due tipi di fiale e per facilitarne l'estrazione dalle vaschette, si applicano al collo delle stesse dei fili metallici di colore diverso o di diversa forma.

IV. — APERTURA DELLE FIALE E MISURA AL BECKMAN. Tolte le 8 fiale dal bagno di acqua fredda, si aprono, servendosi se occorre di una pinza a punte per allargare il foro d'uscita del liquido e si versa il contenuto di ciascuna in altrettanti tubetti forniti preferibilmente di tappo smerigliato.

Preparato il portavaschette del Beckman con 3 vaschette del tipo Corex da 10 mm di spessore, si versa nella prima vaschetta di compensazione della semplice soluzione alcalina senza il ferricianuro, nella seconda e nella terza rispettivamente la soluzione d'insulina standard e quella d'insulina Lilly I che hanno subito 30' di riscaldamento. Le misure di assorbimento vengono eseguite usando come sorgente luminosa la lampada a filamento di tungsteno, ad una lunghezza d'onda di 420 m μ . Lette le estinzioni corrispondenti ai due campioni, si passa all'esame della seconda coppia di fiale, quelle che hanno subito 60' di riscaldamento e così di seguito fino alla quarta coppia che ha subito due ore di riscaldamento.

I risultati ottenuti sono riassunti nella tabella I. dove per ciascuno dei due campioni e per i quattro tempi scelti figurano le estinzioni lette all'apparecchio, i mg di ferricianuro ritrovati in 10 cm³ della soluzione esaminata (nel volume cioè corrispondente ad 1 mg. di insulina) ed infine, per differenza, i mg di ferricianuro ridotto, sempre riferiti ad un mg di insulina.

TABELLA I.

Insulina Standard				Insulina Lilly I			
Riscald.	E	K ₃ Fe(CN) ₆ residuo mg	K ₃ Fe(CN) ₆ ridotto mg	Riscald.	E	K ₃ Fe(CN) ₆ residuo mg	K ₃ Fe(CN) ₆ ridotto mg
30'	0,440	1,385	1,615	30'	0,424	1,340	1,660
60'	0,370	1,170	1,830	60'	0,360	1,140	1,860
90'	0,332	1,050	1,950	90'	0,324	1,020	1,980
1:0'	0,304	0,960	2,040	120'	0,296	0,940	2,060

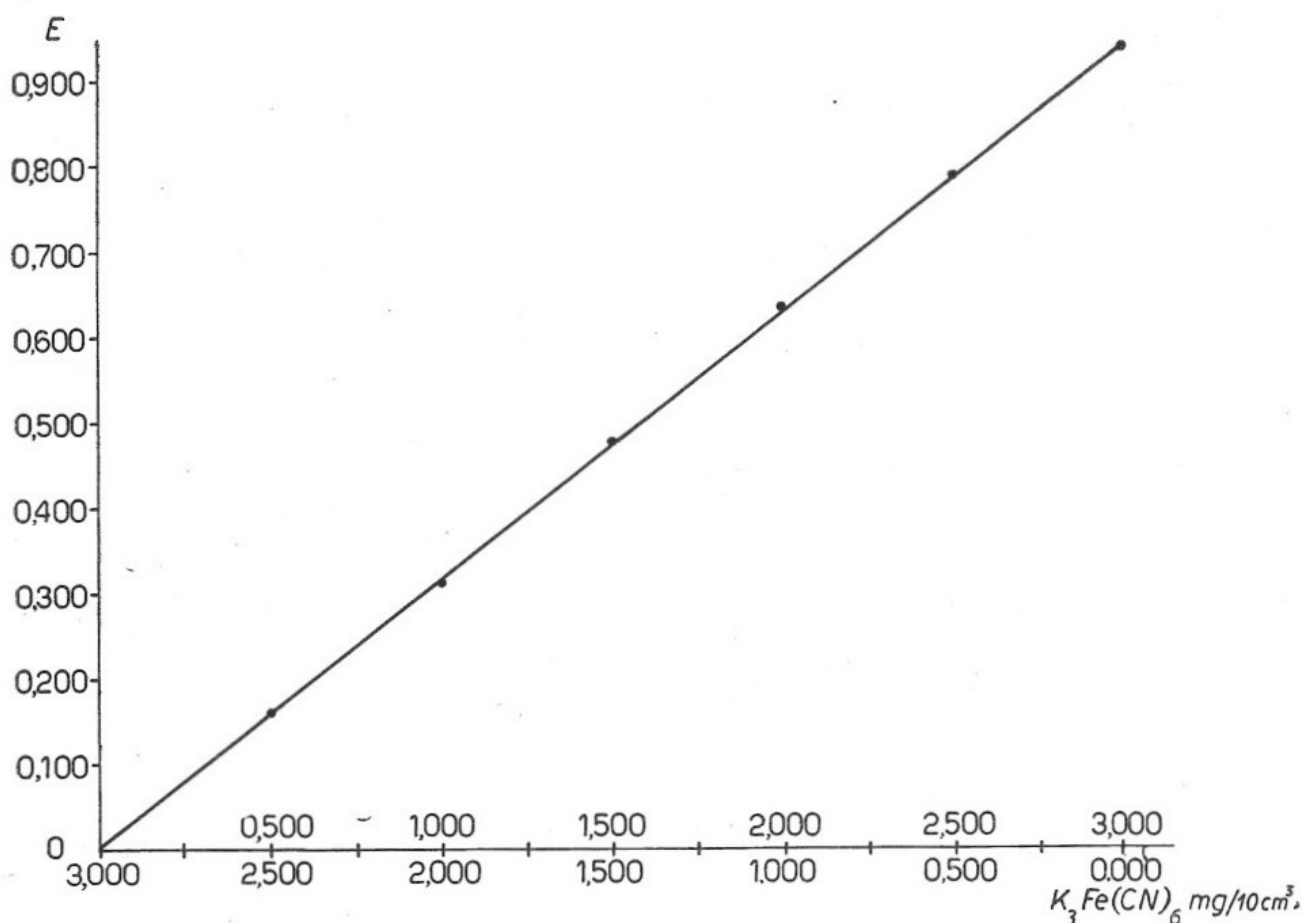
I mg *m* di ferrocianuro residuo per 10 cm³ di soluzione e quelli *n* ridotti dall'insulina vengono dedotti dall'estinzione letta E $\frac{1 \text{ cm.}}{420 \text{ m}\mu}$ usando il diagramma della fig. 6 oppure le seguenti formule:

$$m = 3,159 \times E$$

$$n = 3 - 3,159 E$$

V. — CALCOLO DELL'ATTIVITA'. Si definisce come *potere riducente* dei vari campioni di insulina la somma delle quantità progressive di ferricianuro ridotte nei quattro tempi, tali somme (che hanno significato di

FIGURA n. 6



media) si lasciano ordinare in una serie decrescente proprio come i valori delle attività biologiche e cioè nel seguente modo: n. 6, 3, 2, 7, 1, 4, 5, 8 (tabella II.).

TABELLA II.

N°	Insulina	K ₃ Fe (CN) ₆ ridotto in mg					Attività	
		30'	60'	90'	120'	Totale	Calcol. U. I.	Dichiar. U. I.
1	Standard	1,615	1,830	1,950	2,040	7,435	—	22
2	Lilly I	1,660	1,860	1,980	2,060	7,560	22,63	24
3	Lilly II	1,705	1,900	2,010	2,100	7,715	23,38	25
4	Argentina I	1,520	1,750	1,860	1,930	7,060	20,20	22
5	Argentina II	1,410	1,585	1,700	1,780	6,475	17,30	18,30
6	Squibb I	1,760	1,975	2,130	2,180	8,045	24,98	25,40
7	Squibb II	1,640	1,825	1,980	2,035	7,480	22,24	22,80
8	M 1943	1,100	1,200	1,295	1,370	4,965	10,03	10,03

Ma tale corrispondenza non è affatto proporzionalità aritmetica: una approssimativa proporzionalità con le attività biologiche si ritrova invece nei poteri riducenti diminuiti di una quantità fissa y (espressa in mg di ferricianuro per 4 mg di insulina) che si può avere confrontando, ad es., lo standard con uno degli altri campioni (conviene nel caso presente usare

il n. 8 perchè di attività molto lontana da quello standard) nel seguente modo:

$$(7,435 - y) : 22 = (4,965 - y) : 10,03 \text{ da cui } y = 2,898$$

Per calcolare l'attività biologica di un insulina dal ferricianuro ridotto, si applica infine la seguente formula:

$$\text{Un. biol.} = U. \frac{b - y}{a - y}$$

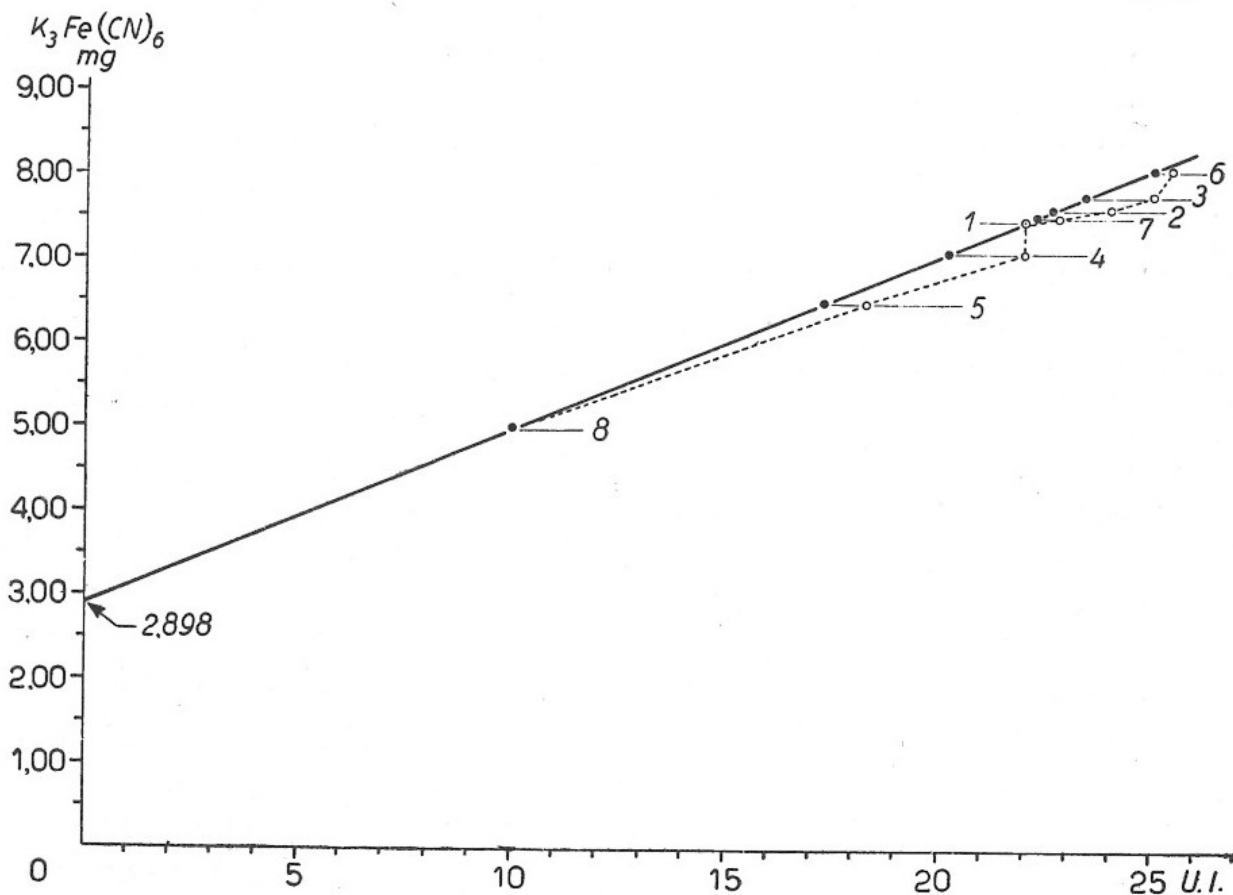
dove a e b sono rispettivamente i poteri riducenti del campione d'insulina preso come riferimento e del campione in esame, ed U è l'azione ipoglicemizzante nota, del primo di tali campioni, espressa in unità biologiche.

Prendendo come riferimento il campione di insulina standard di 22 unità e come valore di y quello sopra di 2,898, le attività biologiche dedotte dal saggio chimico al ferricianuro risultano dalla seguente formula:

$$\text{Un. biol.} = 22. \frac{b - 2,898}{7,435 - 2,898}$$

e sono riunite nella tabella II^a (finca 8) e nella figura 7 (cerchietti pieni), messe a confronto con quelle fornite dal saggio biologico (finca 9 e cerchiet-

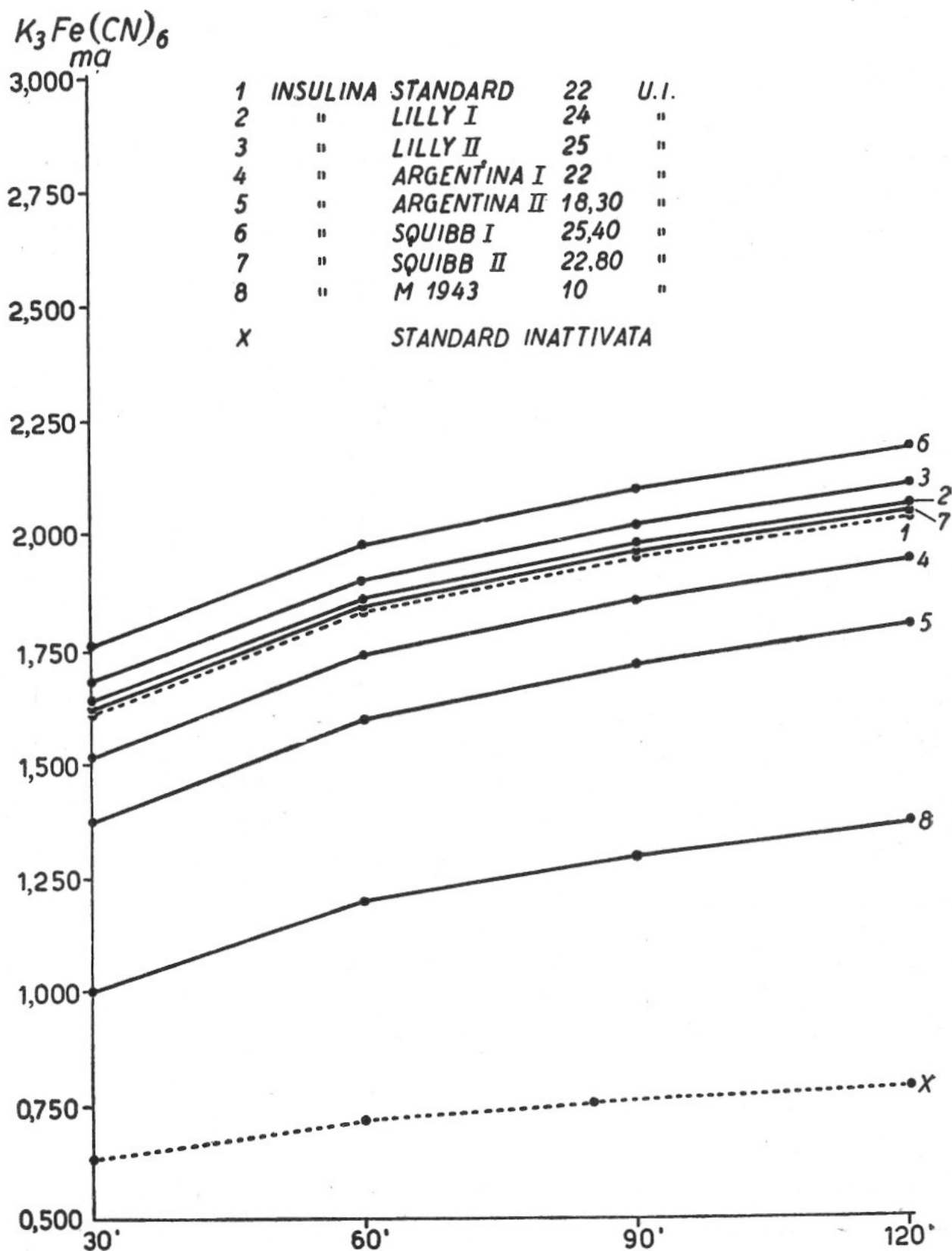
FIGURA n. 7



ti vuoti). In merito ai dati biologici, è da notare che i campioni della Squibb sono i più recenti, mentre quelli delle altre case sono di data antecedente al 1948.

Il diagramma della fig. 8 esprime in modo euristico i risultati già riuniti nella tabella II.

FIGURA n. 8



La linea tratteggiata n. 1 rappresenta le quantità progressive di ferricianuro ridotto dal campione standard nei quattro tempi di riscaldamento, mentre le linee piene, da 2 a 8 sono state ottenute apportando ai valori sperimentali una piccola correzione nel modo illustrato dal seguente esempio riferito al campione M 1943.

La differenza $7,435 - 4,965 = 2,470$ fra il potere riducente dello standard e quello del campione considerato, viene divisa per 4 ed il quoziente 0,617 viene sottratto dai valori di riduzione (tab. II riga 1^a) ottenuti con lo standard nei 4 tempi di riscaldamento.

La linea contrassegnata con X, indica infine, il potere riducente aspecifico dell'insulina, cioè il valore di y ripartito col calcolo nei quattro tempi di riscaldamento in proporzione ai valori di riduzione progressivi dello standard.

Per raggiungere lo stesso scopo di dedurre l'attività biologica dal ferricianuro ridotto, si sono eseguite alcune esperienze per conoscere se fosse possibile suddividere il potere riducente totale in due frazioni: una specifica che l'insulina perde per inattivazione con alcali e che potrebbe essere proporzionale all'attività ed una aspecifica che conserva dopo l'inattivazione. Secondo Bomskov l'attività ipoglicemizzante dell'insulina crist. viene distrutta per trattamento con soluzione N/10 di carbonato di sodio a 100° per un'ora.

A tale scopo i vari campioni sono stati trattati con soluzione alcalina a varie temperature, da 100° a 127°,8 per tempi variabili. E' risultato che la quantità di ferricianuro che viene ridotto dalla soluzione d'insulina precedentemente inattivata diminuisce con l'aumentare della temperatura e della durata di inattivazione.

Un trattamento di 24 ore a 90° lascia un potere riducente residuo di 2,940 (tab. III, finca IV) quasi identico a quello (y) calcolato: tali valori potrebbero rappresentare la frazione aspecifica del potere riducente totale.

Si ritiene non privo di interesse, di accennare alla tecnica seguita negli esperimenti di inattivazione.

Per ogni campione sono state preparate 8 fiale: le quattro sottoposte alla prova di inattivazione vengono confezionate senza ferricianuro, contengono cioè mg 0,5 di insulina in cm³ 3,50 di soluzione alcalina. Subito il trattamento termico di inattivazione, esse vengono riaperte, dopo aggiunta di cm³ 1,50 di ferricianuro, richiuse e, assieme alle altre quattro fiale, sottoposte al normale trattamento già descritto. Nella tabella III sono riportati, come esempio, i risultati ottenuti con l'insulina Lilly II.

Nella prima finca sono segnati i tempi di riscaldamento; nella II i mg di ferricianuro ridotti nei quattro tempi nelle fiale che non hanno subito il preventivo trattamento di inattivazione; nella III, IV e V finca i quantitativi di ferricianuro ridotti (sempre riferiti ad 1 mg di insulina)

nei gruppi di fiale che hanno subito rispettivamente i seguenti trattamenti termici: a b. m. 1 ora e 1/2, in termostato a 90° per 24 ore e in autoclave a 127°,8 per 1 ora e 1/2.

I	II	III	IV	V
30'	1,688	0,615	0,510	0,330
60'	1,923	0,815	0,710	0,515
90'	2,023	0,950	0,820	0,615
120'	2,108	0,980	0,900	0,790
			2,940	

Roma - Istituto Superiore di Sanità - Laboratorio di Biologia, 15 luglio 1948.
