

4. Nicolò GANDOLFO. — Estrazione e determinazione del D.D.T. negli organi animali.

Riassunto. — E' stato elaborato dall'A. un metodo di estrazione del D.D.T. dagli organi animali. Esso è basato sulla scarsa solubilità in alcool diluito 1:1 delle sostanze grasse e di quelle normalmente presenti nel materiale in esame.

Si descrive anche il procedimento di purificazione del D.D.T. estratto ed il metodo di determinazione dell'isomero pp'-D.D.T.

Résumé. — L'Auteur a élaboré une méthode d'extraction du D.D.T. des organes des animaux, se fondant sur la faible solubilité dans l'alcool dilué à 1:1 des substances grasses et de celles normalement présentes dans le matériel à examiner.

On donne aussi la description du procédé de purification du D.D.T. extrait et la méthode de détermination de l'isomère pp'-D.D.T.

Summary. — The Author has worked out a method for extraction of D. D. T. from animal organs. This method is based on the weak solubility of fats and of other substances normally present in the material studied, in alcohol diluted in the proportion of 1:1.

He describes also a procedure for the purification of D.D.T. extracted and a method for the determination of pp'-D.D.T. isomere.

Zusammenfassung. — Verf. hat eine Extraktionsmethode entwickelt die sich für die Herauslösung des D.D.T. aus Tierorganen eignet. Die beruth auf der schwachen Löslichkeit der Fettsubstanzen, und der Substanzen die normalerweise im Prüfmaterial anwesend sind, in Alkohol, Verdünnung 1:1.

Es wird auch das Reinigungsverfahren des extrahierten D.D.T. beschrieben sowie die Bestimmungsmethode des isomeren pp'-D.D.T.

Esperienze in corso, tendenti a studiare il fenomeno di accumulo del D.D.T. negli organi degli animali da esperimento, hanno reso necessario la elaborazione di un metodo di estrazione capace di permettere la successiva determinazione di quelle quantità di D.D.T. eventualmente presenti nell'organo in esame.

Trattandosi del riconoscimento di quantità piccolissime di D.D.T., era logico che si applicasse una delle reazioni colorimetriche fin'ora note in letteratura. Purtroppo, minime quantità di sostanze estranee, non permettono di ottenere risultati soddisfacenti dal punto di vista quantitativo e talvolta inibiscono le reazioni stesse.

Dopo una serie di prove eseguite in laboratorio adoperando solventi diversi, ho riscontrato che l'estrazione a caldo con alcool diluito 1:1, ha dato i risultati migliori. Le impurezze che si trovano nel residuo assieme al D.D.T. si possono infatti considerare di gran lunga inferiori a quelle ottenute negli altri casi e tali da permettere una più facile purificazione. Questa può essere evitata nei casi in cui il materiale dal quale deve estrarsi il D.D.T. non contiene molte sostanze estranee e quando la sua quantità è tale da garantire la buona riuscita della reazione su di una aliquota del residuo. Si tenga infatti presente che la sensibilità del metodo di riconoscimento e determinazione adottata è di mg. 0,2.

Il procedimento è basato sulla poca solubilità in alcool diluito 1:1 sia delle sostanze grasse e di quelle facilmente estraibili con il solvente usato, sia dello stesso D.D.T. Appunto per questo tengo a precisare che il metodo da me elaborato deve essere applicato soprattutto quando si pone il problema di ricercare quantità di D.D.T. non superiori a mg. 5.

Il riconoscimento colorimetrico del D.D.T. nel residuo dell'estrazione, è basato sulla proprietà che ha il 2:2-bis - (p-clorofenil) - 1:1:1 - tricloroetano (pp'-D.D.T.) di produrre una colorazione rosso-vino se trattato a caldo con idrochinone ed acido solforico concentrato. Il metodo è stato elaborato da F. R. BRADBURY, D. J. HIGGONS e J. P. STONEMANN (¹). Naturalmente è necessario aver molta cura nella preparazione dei reattivi affinchè rispondano al grado di purezza richiesto e bisogna seguire scrupolosamente quanto da loro esposto nella descrizione del metodo.

Con tale reazione si riconosce e si determina soltanto l'isomero pp'-del D.D.T. E' noto però che esso, oltre che a costituire la frazione preponderante del prodotto, è anche l'isomero più attivo. In considerazione della facile e rapida esecuzione della reazione essa è stata da me preferita ad altri procedimenti i quali, pur portando alla determinazione del D.D.T. tecnico, si presentano molto più complessi e laboriosi.

Nelle esperienze eseguite, il D.D.T. è stato da me stesso aggiunto all'organo in esame, poichè non mi si è ancora presentata l'occasione di poter disporre di organi di animali appositamente alimentati per il tempo utile alla realizzazione del fenomeno di accumulo.

PARTE SPERIMENTALE

L'organo dell'animale in esame, aggiunto della quantità di D.D.T. che si vuole svelare, viene sminuzzato in mortaio con le punte di un paio di forbici e quindi trattato con sostanze assorbenti e decoloranti, quali il talco ed il carbone, comunemente adoperate a tale scopo ed in particolare nel caso di ricerche tossicologiche. L'animale sacrificato per le mie prove è stato la cavia; tenendo conto che il peso dei rispettivi organi è inferiore a g. 10, la quantità delle due sostanze da aggiungere è di g. 20 di talco e di g. 10 di carbone. Nel caso di organi di peso più elevato la quantità delle due sostanze va aumentata in proporzione.

Dopo essiccamento del miscuglio, lo si trasporta in pallone da cm³ 500 a collo smerigliato a cui si aggiungono cm³ 200 di alcool, diluito 1:1 con acqua. Si agita il pallone fino a completo rimescolamento e si innesta al collo di un refrigerante verticale. Si riscalda il liquido idroalcoolico e si mantiene all'ebollizione per $\frac{3}{4}$ d'ora; ancora caldo viene filtrato alla pompa mediante leggera aspirazione. Per ottenere un liquido limpido è conveniente adattare al fondo dell'imbuto un filtro da solfato di bario. Il pallone ed il residuo vengono lavati con complessivi cm³ 100 di alcool caldo della stessa diluizione, mediante ripetute aggiunte di cm³ 10. Il filtrato si versa in pallone da cm³ 500 e si distilla l'alcool in esso contenuto. Per quantità di D.D.T. presumibilmente inferiori a mg. 3 è più conveniente filtrare a freddo; in tal caso infatti le impurezze del residuo si riducono ulteriormente e talvolta sono del tutto trascurabili.

Il liquido acquoso rimasto nel pallone da distillazione viene versato, dopo suo raffreddamento, in un separatore cilindrico ed il pp'- D.D.T. presente estratto con cm³ 50 di cloroformio puro ridistillato; è opportuno ripetere l'estrazione per altre due volte con ugual volume di solvente. Lo si agita infine con poco carbone attivo e si filtra lavando il residuo ed il filtro con lo stesso solvente, precedentemente trattato con carbone.

Nel caso in cui non è necessario procedere alla purificazione del residuo che si ottiene per evaporazione del solvente, si secca in stufa a circa 70° C.; quindi si discioglie in pochi cm³ di etere etilico già trattato con carbone e si trasporta quantitativamente in tubo da saggio ben pulito ed asciugato. Dopo lenta evaporazione del solvente e passaggio di una corrente di aria, si può eseguire sul residuo la reazione colorimetrica.

Nella parte introduttiva di questa nota, ho detto che nel caso in esame, il residuo che si ottiene si può ritenere abbastanza puro se confrontato con quello che si ricava adoperando altri solventi per l'estra-

zione del D.D.T. Per ottenere però colorazioni rispondenti al reale contenuto in D.D.T. nel campione in esame, le minime impurezze ancora presenti non sono da ritenere trascurabili. La purificazione è quindi necessaria soprattutto se si tiene conto della necessità di eseguire la reazione su tutto il residuo a causa delle piccole quantità di D.D.T. che vi si possono eventualmente trovare.

Ho ottenuto buoni risultati applicando il procedimento usato da R. G. TOMKINS-F. A. ISHERWOOD ⁽²⁾, da MILTON S. SCHECHTER-MILTON A. POGORELSKIN-H. L. HALLER ⁽³⁾ e da M. E. ALESSANDRINI ⁽⁴⁾, rispettivamente nel caso dell'allontanamento dell'olio di arance dal difenil e dall'ortofenil-fenolo e della purificazione del D.D.T. estratto dal latte ed altri prodotti grassi e dalla farina. Esso è basato sul principio dell'allontanamento delle sostanze estranee mediante agitazione a freddo con acido solforico concentrato. Consiglio di usare a tal fine lo stesso acido solforico che serve alla preparazione del reattivo idrochinonico.

Il liquido cloroformico contenente il D.D.T. estratto si evapora fino a sensibile riduzione del suo volume (cm³ 30 circa). Si versa quantitativamente in agitatore cilindrico da cm³ 100 e si dibatte energicamente con cm³ 25 di acido solforico; si ripete l'estrazione fino a che l'acido rimane perfettamente incolore. Il cloroformio viene lavato con acqua finchè questa non presenti più reazione acida e dopo agitazione con carbone attivo viene filtrato e lavato con cloroformio trattato nella stessa maniera e quindi evaporato lentamente a b. m. Sul residuo, seccato in stufa, si potrà infine eseguire la reazione di riconoscimento.

Ecco nei suoi punti essenziali il procedimento descritto dagli A.A. citati:

« si discioglie il residuo in cm³ 0,5 di solfato di etile recentemente distillato. Si agita la provetta per agevolare la dissoluzione del residuo stesso e si aggiungono cm³ 5,5 di acido solforico concentrato contenente il ½% di idrochinone ricristallizzato. L'acido solforico va purificato e disidratato riscaldandolo a 150° per quattro ore con carbonato ammonico, nelle proporzioni di g. 2 per litro. Dopo rimescolamento del reattivo con il solfato di etile, si riscalda a b. m. per tre minuti esatti agitando di frequente; si raffredda quindi rapidamene sotto getto di acqua fredda. La valutazione dell'intensità della colorazione ottenuta si può ricavare per confronto usando un comune colorimetro, oppure uno spettrofotometro. In ambedue i casi considerati, la lettura va fatta dopo venti minuti ».

Per meglio conservare il solfato di etile e per rendere più agevole il prelevamento del piccolo volume che serve per ogni saggio, ho trovato

utile mantenerlo in buretta a vetro giallo munita di tubo a cloruro di calcio. Per gli stessi motivi, anche per l'acido solforico occorre adottare alcuni accorgimenti. Il prelevamento viene effettuato da una bottiglia a vetro giallo mediante buretta di Treadwell con rubinetti di sgocciolamento e di caricamento. Una boccia di lavaggio ad acido solforico ed un tubo a cloruro di calcio evitano all'acido di assorbire nuovamente acqua.

Roma - Istituto Superiore di Sanità - Laboratorio di Chimica.

BIBLIOGRAFIA

- (¹) J. Soc. Chem. Ind., 66, 65, 1947.
- (²) Analyst, 70, 373, 1945.
- (³) Anal. Chem., 19, 51, 1947.
- (⁴) Lavori VI Congresso Nazionale di Chimica, 1950.