

60. Luigi LONGINOTTI. — Separazione cromatografica e dosaggio spettrofotometrico dell'adenosintrifosfato (ATP) e dell'adenosindifosfato (ADP) contenute in tessuti animali.

Riassunto. — E' descritto un metodo per determinare quantitativamente l'ATP e l'ADP presenti in un tessuto animale.

La separazione dell'ATP e dell'ADP è ottenuta mediante due sviluppi cromatografici, sullo stesso foglio, in sensi opposti ed in solventi differenti; il primo di tali sviluppi serve ad allontanare l'ortofosfato.

Il successivo dosaggio è effettuato misurando allo spettrofotometro l'assorbimento degli eluati delle zone del cromatogramma contenenti l'ATP e l'ADP.

Résumé. — On décrit une méthode pour déterminer quantitativement l'ATP et l'ADP présents dans un tissu animal.

La séparation de l'ATP et de l'ADP est obtenue par deux développements chromatographiques sur la même feuille, dans des sens opposés et dans des solvants différents; le premier de ces développements sert à éloigner l'orthophosphate.

Le dosage qui suit est exécuté en mesurant avec le spectrophotomètre, l'absorption des préparés des zones du chromatogramme contenant l'ATP et l'ADP.

Summary. — A method is described for the quantitative determination of the ATP and ADP present in animal tissue.

The separation of the ATP and ADP is performed by means of two chromatographic developments in opposite directions in different solvents on the same sheet of paper. The first of these serves to remove the orthophosphate.

The consequent assay is performed by measuring the absorption in the spectrophotometer of the eluates from the zones of the chromatogram containing the ATP and ADP.

Zusammenfassung. — Eine Methode zur quantitativen Bestimmung des ATP und des ADP in animalen Geweben wird geschildert.

Die Trennung des ATP und des ADP wird durch zwei chromatographische Entwicklungen in entgegengesetztem Sinn und in verschiedenen Lösungsmitteln erhalten; die erste Entwicklung dient zur Entfernung des Orthophosphats.

Die Bestimmung erfolgt durch die spektralfotometrische Messung des Absorptionsvermögens der Eluate aus den ATP und ADP enthaltenden Zonen des Chromatogramms.

Nel corso delle ricerche sul metabolismo dei carboidrati, è sorta la necessità di determinare quantitativamente le variazioni del contenuto in ATP ed in ADP di estratti di tessuto animale incubati in vari mezzi e con diversi substrati.

A questo scopo si è dovuto elaborare un metodo che conservasse, pur nella semplicità di realizzazione necessaria a misure di routine, una notevole selettività anche in presenza dei numerosi composti presenti in un tessuto, ed una notevole precisione anche colle piccole quantità di tessuto animale usate nelle esperienze eseguite con substrati radioattivi.

La determinazione quantitativa dell'ATP e dell'ADP in un tessuto animale è stata eseguita, fino all'avvento dei moderni metodi cromatografici, mediante previa separazione — con metodi di frazionamento chimico basati normalmente sulle differenze di solubilità dei sali dei metalli alcalino-terrosi (¹⁻⁴) o dei sali dei metalli pesanti (⁵⁻⁷) — della miscela di questi due prodotti dagli altri composti fosforici, e successivo dosaggio delle loro quantità relative mediante misure del fosforo acido-labile, del fosforo acido-solubile, dell'azoto e del ribosio.

Questi metodi di frazionamento, oltre ad essere d'impiego poco pratico in quanto richiedono relativamente grandi quantità di sostanza e notevoli volumi di liquido, sono anche poco precisi, poiché con essi si ottengono delle separazioni poco nette a causa di fenomeni di inglobamento e di coprecipitazione ed anche a causa dell'influenza esercitata dagli altri sali presenti nel tessuto, sulle solubilità dell'ATP e dell'ADP; inoltre a causa appunto delle impurezze presenti normalmente nella miscela di ATP e di ADP così frazionata, il dosaggio applicato comunemente a questi metodi, basato sui rapporti tra due o più delle misure sopradette — per esempio il rapporto fosforo acido-labile/fosforo acido-solubile, quello fosforo acido-labile/azoto o pentoso ecc. — è molto approssimato ed impreciso, tanto più che per molto tempo non si è stati perfettamente d'accordo sull'acido da usare e sul tempo di idrolisi.

Al fine di ovviare a queste deficienze si sono sviluppati dei metodi enzimatici, basati sulla determinazione mediante metodi chimici (⁸⁻⁹) o spettrofotometrici (¹⁰⁻¹⁵) od anche fluorimetrici (¹⁶), dei differenti composti formati dai prodotti in esame tramite differenti enzimi specifici.

Questi metodi di dosaggio rappresentano indubbiamente un notevole progresso rispetto ai precedenti metodi chimici sia come precisione che come sensibilità (in particolare con il metodo di GREENGARD ⁽¹⁶⁾ mediante fluorescenza si riesce a misurare 2×10^{-10} mole di ATP e con quello di STREHELER e TOTTER ⁽¹³⁾ si arriva a determinare una concentrazione di 0.001 γ /ml di ATP con una accuratezza di circa il 5%).

Tuttavia anche questi metodi enzimatici di dosaggio possono essere applicati per la maggior parte, soltanto dopo una previa separazione dell'ATP e dell'ADP dagli altri composti fosforici presenti nel tessuto; anche se questa separazione non è eseguita mediante il sopraindicato frazionamento chimico — nel qual caso ricadrebbero nelle imprecisioni dovute a coprecipitazione ecc. già menzionate — ma mediante altri metodi di separazione che saranno detti più avanti, tutti questi metodi enzimatici hanno in comune di richiedere lunghe e laboriose manipolazioni principalmente per preparare gli enzimi necessari la cui purezza è condizione essenziale alla buona riuscita dell'analisi.

Con l'avvento della cromatografia è stato finalmente possibile ovviare ai difetti del frazionamento chimico ed inoltre, mediante questo metodo estremamente preciso e selettivo, è stato anche possibile separare l'ATP dall'ADP.

Un tale risultato si è potuto ottenere in particolare mediante numerosi metodi: con metodi di cromatografia a scambio ionico tra i quali assai notevole il metodo di COHN e CARTER ⁽¹⁷⁾; con metodi di ripartizione in controcorrente ⁽¹⁸⁾; con metodi di elettroforesi in fase libera con l'apparecchio di TISELIUS ⁽¹⁹⁾ o di elettroforesi su carta come descritto da TURBA ed EHENKEL ⁽²⁰⁾, da WADE e MORGAN ⁽²¹⁾ da TURBA, PELZER e SCHUSTER ⁽²²⁾ e da LANGE ⁽²³⁾; infine coi numerosi metodi di cromatografia su carta che però solo in pochi casi ⁽²⁴⁻²⁶⁾ sono stati applicati direttamente agli estratti di tessuto, mentre per la quasi totalità ^(7, 27-36) sono stati usati solo su miscele artificiali di prodotti.

Mentre i metodi di cromatografia a scambio ionico sono di difficile applicazione agli estratti di tessuto oltre che per la notevole massa di volumi in gioco anche e soprattutto a causa delle quantità relativamente grandi di sostanza richiesta per l'analisi — un difetto che condividono con i metodi di ripartizione in contro-corrente e con quelli di elettroforesi in fase libera —, quei pochi metodi sia di elettroforesi su carta sia di cromatografia su carta che sono applicabili agli estratti di tessuto, necessitano per una applicazione quantitativa di una grande capacità di risoluzione, di una marcata separazione tra le macchie e di una notevole riproducibilità nelle cromatografie.

I solventi adottati nel presente lavoro, avendo appunto queste ca-

ratteristiche, sono in grado di separare l'ATP e l'ADP anche se in quantità tra di loro molto differenti, sfruttando in tal modo al massimo le capacità selettive proprie della cromatografia su carta; tali capacità unite all'alta precisione, nell'analisi di composti di questo tipo, dell'esame spettrofotometrico all'ultravioletto, sono stati appunto i criteri informativi del presente metodo.

PARTE SPERIMENTALE

Materiali e Prodotti. - Le cromatografie sono state eseguite in vasche di vetro (cm $40 \times 30 \times 55$) della ditta Dumas di Zurigo. Le soluzioni sono state poste su fogli di carta — Whatman 1 — mediante una siringa micrometrica Agla della ditta Burroughs Wellcome and Co. Sono state analizzate soluzioni di ATP (Lot 101 A) e di ADP (Lot 603) della ditta Pabst e di ATP dell'Istituto Sieroterapico Italiano.

Preparazione del materiale biologico. - Il tessuto, appena prelevato dall'animale viene immerso nell'alcool a 0°, che sarà poi usato per la sua omogeneizzazione, e quindi sminuzzato mediante forbici. Dopo questo trattamento il tessuto viene omogeneizzato a 0° in ml 1,5 di una soluzione alcolica al 60% fredda in quantità che naturalmente dipende dalla sua concentrazione in nucleotidi ed in ortofosfato: nel caso di diaframma di ratto, per esempio, ne sono stati omogeneizzati circa mg 200.

L'omogenato così ottenuto, viene centrifugato per circa 15 minuti a 0° a circa 20.000 g.p.m.; alla fine della centrifugazione, dal liquido soprastante limpido ne vengono prelevati ml 1 che, in quarantotto ore, vengono portati a secco a 5° in essiccatore su anidride fosforica sotto vuoto; il residuo ripreso con ml 0,1 di acqua distillata fredda, viene poi posto su carta a μ l 1 a volta, distanti cm 0,5, fino ad ottenere, mediante ripetute aggiunte, una banda omogenea la cui lunghezza dipende naturalmente dalla quantità di sostanza da cromatografare.

Cromatografie. - Per una migliore separazione delle macchie i fogli di carta Whatman 1, delle dimensioni di cm 30×57 , sono stati lavati, 30 alla volta, in una apposita vaschetta di Perspex ⁽³⁷⁾ all'uopo costruita, dapprima con litri 5 di una soluzione allo 0,2% di Titriplex III (sale bisodico dell'acido etilendiamminotetracetico) portata a pH 8,5 ⁽²⁴⁾, e quindi con litri 30 di acqua distillata.

La sostanza da analizzare viene posta a cm 14 dall'inizio del foglio di carta, a μ l 3-5 a volta, ripetutamente fino alla quantità desiderata, ef-

fettuandone l'essiccamento mediante aria fredda fornita da un asciugacapelli.

Al fine di eliminare l'ortofosfato, il foglio di carta viene quindi posto a cavallo della vaschetta da cromatografia in modo tale che esso, passando nell'interno, possa riuscire dai due lati di questa (vedi fig. 1). All'inizio ed alla fine del foglio, si fanno le apposite frastagliature onde consentire al solvente di gocciolare in maniera uniforme.

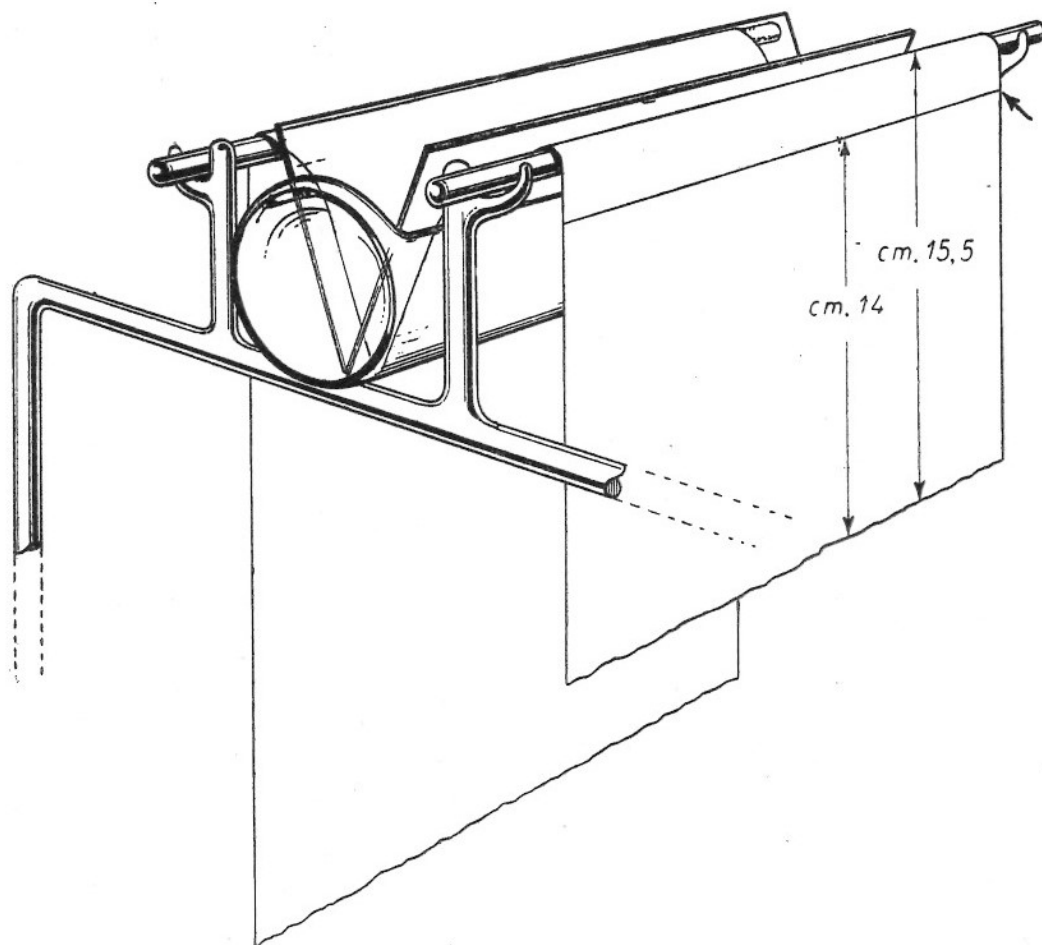


Fig. 1. - Particolare sistemazione del foglio di carta nella vaschetta da cromatografia per l'eliminazione dell'ortofosfato inorganico.

Nella prima cromatografia eseguita ad una temperatura di 5°, il solvente, costituito da una miscela di etere etilico anidro ed acido formico al 99% (75:25 v/v), viene fatto camminare per 5 ore (gocciolamento) in modo che, mentre i nucleotidi in esame non si muovono, l'ortofosfato percorre circa cm 10.

Molto importante in questa prima cromatografia è una completa saturazione dell'ambiente: a tale scopo è stato messo al centro della vasca un foglio di carta che pesca in una vaschetta ripiena di solvente, po-

sta al disotto e, sempre a tale scopo, il solvente è stato immesso 24 ore dopo, da un foro creato nel coperchio della vasca stessa. Alla fine della cromatografia, dal cromatogramma, essiccato a temperatura ambiente, viene tagliata, a cm 7 dall'inizio, una striscia e l'ortofosfato in essa contenuto, viene rivelato con il reagente molibdico di HANES ed ISHERWOOD⁽²⁶⁾.

La parte rimanente del foglio (a cm 7 dal nuovo inizio di questo si trovano l'ATP e l'ADP che non si sono mosse nella prima cromatografia) viene quindi di nuovo cromatografata per 36 ore (gocciolamento) a circa 20° usando come solvente acido isobutirrico e ammoniaca 1 N (100:30 v/v). In questa seconda cromatografia a differenza della prima, non è indispensabile la formazione dell'ambiente.

Alla fine della cromatografia, sul cromatogramma, essiccato in stufa a 60° per circa 30 minuti, l'ATP e l'ADP vengono rivelate mediante luce ultravioletta fornita da una lampada germicida Philips schermata con un filtro Corning 9.863 (230-400 mμ)⁽³⁸⁾.

Le macchie così localizzate, vengono ritagliate dalla carta e quindi eluite in una apposita vaschetta di Perspex⁽³⁹⁾.

Analisi spettrofotometriche e chimiche. - Le misure spettrofotometriche sono state eseguite allo spettrofotometro registratore Carry modello 11 alla lunghezza d'onda di 260 mμ usando delle microcelle di quarzo da cm 1 con una capacità di ml 1,2. L'assorbimento molare calcolato, uguale sia per l'ATP che per l'ADP, è stato di 15×10^3 .

La quantità di nucleotidi calcolata dalle misure di assorbimento, è stata confermata dal rapporto fosforo acido-labile/fosforo acido-solubile, determinata sul medesimo eluato sul quale era stato letto il valore dell'assorbimento allo spettrofotometro; il fosforo acido-solubile è ottenuto per combustione umida con acido perclorico al 60%⁽⁴⁰⁾ e quello acido-labile per idrolisi in HCl 1 N per 10 minuti a 100°⁽⁴¹⁾.

RISULTATI

Nella Tabella 1 sono dati, a titolo esemplificativo delle possibilità del metodo, i risultati di determinazioni su tre campioni: due di ATP, delle quali una molto pura con tracce di ADP (0,8 γ su 13,6 γ) ed una che non essendo purificata contiene notevoli quantità di ADP (29,0 γ su 15,1 γ), ed una di ADP molto pura con tracce di ATP (1,6 γ su 17,8 γ); nei due ultimi campioni sono state calcolate anche le quantità di AMP.

Come limite inferiore di determinazione per il metodo, si deve con-

TABELLA 1

Analisi di campioni di ATP e di ADP

(Medie dei valori $\pm$ Deviazione Standard, espressi in γ di adenina; in parentesi i valori estremi. Il totale ritrovato rappresenta, in percento, l'adenina ritrovata rispetto a quella determinata prima dell'analisi).

Campione	Numero determinazioni	ATP	ADP	AMP	Totale ritrovato %
ATP Pabst Lot 101 A	14	$13,6 \pm 0,3$ (13,0 — 14,2)	$0,8 \pm 0,1$ (0,6 — 1,0)		94
ATP I.S.I.	4	$15,1 \pm 0,6$ (14,4 — 15,6)	$29,0 \pm 2,0$ (26,4 — 31,2)	$13,6 \pm 0,3$ (13,2 — 14,0)	93
ADP Pabst Lot 603	11	$1,6 \pm 0,2$ (1,3 — 1,9)	$17,8 \pm 1,0$ (16,2 — 19,4)	$0,7 \pm 0,2$ (0,4 — 1,0)	96

siderare in pratica la misura di 2-3 γ di ATP o della corrispondente quantità di ADP; al disotto di questi valori l'errore del metodo diventa troppo alto come si vede dalla tabella 1.

Il limite massimo di risoluzione delle cromatografie è invece di circa 200 γ di ATP + ADP e di circa 50 γ di ortofosfato; ovviamente se si adotta la cromatografia a bande, come adottato per le determinazioni in estratti biologici, tale limite superiore si eleva notevolmente.

I valori dati nella tabella 1 sono stati ottenuti detraendo dal valore dell'assorbimento dell'eluato, quello relativo al blank, dovuto principalmente al solvente, in particolare agli ioni OH^- (⁴²), rimasto impregnato sulla carta e successivamente eluito insieme ai nucleotidi in esame.

L'assorbimento del blank è stato determinato eluendo la zona del cromatogramma adiacente a quella contenente il nucleotide in esame, in quanto è noto che tale assorbimento è diverso per le diverse zone del cromatogramma, diminuendo dall'inizio del foglio al fronte del solvente (⁴³). Poiché però non è stata trovata alcuna differenza statisticamente significativa tra le due serie di valori relativi all'assorbimento dei blank della zona adiacente all'ATP e di quello dei blank della zona adiacente all'ADP, molto probabilmente a causa della vicinanza tra le

due zone, il valore di assorbimento di 0,044/cm² di carta eluita (Deviazione Standard $\pm$ 0,0008) è valido sia per il blank dell'eluato dell'ATP come per quello dell'eluato dell'ADP.

Sempre a titolo esemplificativo in tabella 2 sono dati i risultati di

TABELLA 2

Determinazioni di ATP nel diaframma di ratto

(Per ognuna delle due serie di determinazioni gli omogenati di diaframma di vari ratti, a digiuno da 24 ore, sono stati riuniti, centrifugati, e su 6 aliquote del soprastante è stata determinata l'ATP; i valori sono dati in γ di ATP — come acido libero/ mg 100 di diaframma, peso umido; medie dei valori $\pm$ Deviazione Standard).

Determinazioni	I serie	II serie
1	183	178
2	171	153
3	177	151
4	180	161
5	179	164
6	175	175
Medie $\pm$ D.S.	178 $\pm$ 5	164 $\pm$ 10

determinazioni sul diaframma di ratto. Come si vede in queste determinazioni non è stata ritrovata ADP: un tale risultato verrà discusso in altra sede.

DISCUSSIONE

Prima di effettuare un qualsiasi tentativo di separazione dell'ATP e dell'ADP direttamente su estratti di tessuto animale mediante cromatografia su carta, bisogna eliminare o per lo meno fortemente ridurre l'ortofosfato, che nelle quantità in cui si ritrova nei tessuti animali, impedisce ogni regolare sviluppo delle cromatografie, specie se quantitative.

Specialmente per questa ragione, i numerosi metodi descritti di separazione degli esteri fosforici mediante cromatografia su carta, non sono applicabili direttamente agli estratti di tessuto; quando questo si è potuto fare, si è dovuto necessariamente, per ottenere dei risultati soddisfacenti, allontanare il fosfato inorganico mediante una preliminare cromatografia (²⁶).

D'altra parte la separazione dell'ortofosfato dal resto dei composti fosforici di un tessuto, eseguita precipitando questo come fosfato ammo-

nico-magnesiaco ⁽²⁾ comporta, specie se eseguita direttamente su un estratto biologico, una notevole coprecipitazione di ATP e di ADP ⁽⁴⁴⁻⁴⁶⁾; d'altro canto ci si può aspettare che il sistema adottato da SACKS ⁽⁴⁾, di disciogliere in acido il precipitato di fosfato ammonico-magnesiaco e quindi di riprecipitare l'ortofosfato come fosfomolibdato, dia risultati erronei a causa dell'idrolisi dell'ATP che a 60° in HNO₃ 2N non è di certo trascurabile.

Sebbene migliore, il procedimento di LEE ed EILER ⁽⁴⁷⁾ mediante un'aggiunta dosata di cloruro di magnesio e ripetute precipitazioni, è lungo e tedioso specie se in presenza di quantità notevoli di ioni Mg⁺⁺.

Anche i metodi che utilizzano l'estrazione dell'ortofosfato a seguito di formazione del complesso fosfomolibdico formato a freddo in una miscela di butanolo e benzene ^(46, 48) non si possono impiegare in questo caso a causa dei grandi volumi di liquido che entrano in gioco nella successiva separazione dei nucleotidi. Sempre per questa ragione non si può utilizzare l'assorbimento selettivo del carbone che mentre assorbe i nucleotidi lascia passare l'ortofosfato; i primi poi si possono eluire o con una soluzione di piridina al 5% secondo CRANE e LIPMANN ⁽⁴⁹⁾ o con una soluzione ammoniacale di alcool metilico secondo DERACHE et al. ⁽⁵⁰⁾.

La separazione dell'ortofosfato mediante preliminare cromatografia su carta effettuata nel presente metodo vuole appunto, ovviando a tutti gli inconvenienti sopradetti, permettere la separazione, dell'ATP e dell'ADP direttamente da un estratto animale, mediante cromatografia su carta. E' anche da notare che la cromatografia, necessaria appunto per separare l'ortofosfato, si effettua rapidamente ed a bassa temperatura, ciò che impedisce all'ATP di idrolizzarsi, come è stato provato determinandola quantitativamente prima e dopo la cromatografia.

Anche la deproteinizzazione con alcool al 60%, eseguita sul materiale biologico, è stata preferita a quella normalmente usata con acido tricloroacetico, al fine appunto di evitare il più possibile il pericolo di idrolisi dell'ATP; oltre a ciò l'acido tricloroacetico non solo disturba l'andamento delle cromatografie, ma anche, assorbendo fortemente nella regione dell'ultravioletto ⁽⁵¹⁾, impedisce una netta identificazione delle macchie e, se passa nell'eluato insieme con le sostanze in esame, anche una quantitativa determinazione di queste ultime.

Per provare che la soluzione alcolica al 60%, nella quantità usata, estrae quantitativamente l'ATP presente nel diaframma, il muscolo è stato estratto oltre che con la quantità di alcool normalmente usata (ml 1,5/mg 200 di diaframma) anche con quantità maggiori di alcool; come appare dalla tabella 3 l'aumento nella quantità di alcool non determina alcuna significativa variazione nella quantità di ATP estratta.

TABELLA 3

Estrazione dell'ATP in quantità variabili di alcool al 60%

(Da vari diaframma sminuzzati con forbici e riuniti insieme sono state fatte 2 parti che poi sono state omogeneizzate separatamente con differenti quantità di alcool. Dopo centrifugazione su due campioni di ogni sopostante è stata determinata l'ATP; valori di ATP_H in γ di ATP - come acido libero/mg 100 di diaframma, peso umido).

Alcool dell'omogeneizzazione ml mg 100 diaframma	ATP _H
1.5	187 183
2.0	188 171

Lo sminuzzamento del tessuto prima dell'omogeneizzazione merita particolare cura; se lo sminuzzamento è eseguito all'aria e non con il tessuto immerso nell'alcool, la quantità di ATP ritrovata diminuisce mentre si ritrova dell'ADP che, come si è visto, in condizioni normali non è presente.

Roma — Istituto Superiore di Sanità - Laboratorio di Chimica Biologica.

BIBLIOGRAFIA

- (¹) STONE W. E. - J. biol. Chem., 149: 29 (1943).
- (²) KAPLAN N. O. e GREENBERG D. M. - J. biol. Chem., 156: 341 (1944).
- (³) LE PAGE G. A. e UMBREIT W. W. - Umbreit, Burris e Stauffer, Manometric Techniques and Related Methods for the Study of Tissue Metabolism, Burgess Publ., Minneapolis, pag. 159 (1947).
- (⁴) SACKS J. - J. biol. Chem., 181: 635 (1949).
- (⁵) RAPOPORT S. e NELSON N. - J. biol. Chem., 161: 421 (1945).
- (⁶) ALBAUM H. - Arch. Biochem., 24: 375 (1949).
- (⁷) ZETTERSTRÖM R. e LJUNGGREN M. - Acta chem. scand., 5: 291 (1951).
- (⁸) MACKLER B., FORIS P. e GUEST G. M. - J. biol. Chem., 206: 77 (1954).
- (⁹) BOWEN W. J. e KERWIN T. D. - J. biol. Chem., 220: 9 (1956).
- (¹⁰) KALCKAR H. M. - J. biol. Chem., 167: 443 (1947).
- (¹¹) ALBAUM H. G. e LIPSHITZ R. - Arch. Biochem., 27: 102 (1950).
- (¹²) KORNBERG A. e PRICER W. E. Jr. - J. biol. Chem., 193: 481 (1951).
- (¹³) STREHLER B. L. e TOTTER J. R. - Arch. Biochem. and Biophys. 40: 28 (1952).
- (¹⁴) SLATER E. C. - Biochem. J., 53: 157 (1953).
- (¹⁵) KRATZING C. C. e NARAYANASWAMI A. - Biochem. J., 54: 317 (1953).
- (¹⁶) GREENGARD P. - Nature, 178: 632 (1956).
- (¹⁷) COHN W. E. e CARTER C. E. - J. am. chem. Soc., 72: 4273 (1950).
- (¹⁸) PLAUT G. W. E., KUBY S. A. e LARDY H. A. - J. biol. Chem., 184: 243 (1950).
- (¹⁹) BOCK R. M. e ALBERTY R. A. - J. biol. Chem., 193: 435 (1951).
- (²⁰) TURBA F. e ENENKEL H. J. - Naturwissenschaften, 38: 189 (1951).
- (²¹) WADE H. E. e MORGAN D. M. - Biochem. J., 56: 41 (1954).
- (²²) TURBA F., PELZER H. e SCHUSTER H. - Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem., 296: 97 (1954).
- (²³) LANGE G. - Experientia, 10: 268 (1954).

- (24) EGGLESTON L. V. e HEMS R. - *Biochem. J.*, 52: 136 (1952).
 - (25) CALDWELL P. C. - *Biochem. J.*, 53: 438 (1953).
 - (26) KREBS H. A. e HEMS R. - *Biochim. et Biophys. Acta*, 12: 172 (1953).
 - (27) HANES C. S. e ISHERWOOD F. A. - *Nature*, 164: 1107 (1949).
 - (28) SNELLMAN O. e GELOTTE B. - *Nature*, 168: 461 (1951).
 - (29) TURBA F. e TURBA M. - *Naturwissenschaften*, 38: 188 (1951).
 - (30) BANDURSKI R. S. e AXELROD B. - *J. biol. Chem.*, 193: 403 (1951).
 - (31) BURROWS S., GRYLLS F. S. M. e HARRISON J. S., *Nature*, 170: 800 (1952).
 - (32) CARPENTIER D. C. - *Anal. Chem.*, 24: 1203 (1952).
 - (33) DEUTSCH A. e NILSSON R. - *Acta chem. scand.*, 7: 838 (1953).
 - (34) GUÉRIN J. - *Bull. soc. chim. biol.*, 36: 1433 (1954).
 - (35) CERLETTI P. e SILIPRANDI N. - *Ricerca Sci.*, 25: 2084 (1955).
 - (36) HOCK A. e HUBER G. - *Biochem. Z.*, 328: 44 (1956).
 - (37) BRIMLEY R. C. e BARRETT F. C. - *Practical Chromatography*, Chapman & Hall, London, pag. 31 (1953).
 - (38) HOLIDAY E. R. e JOHNSON E. A. - *Nature*, 163: 216 (1949).
 - (39) LONGINOTTI L. - *Farmacol. Ediz. Pratica*, XIII: 426 (1958).
 - (40) BERENBLUM J. e CHAIN E. - *Biochem. J.*, 32: 295 (1938).
 - (41) BAILEY K. - *Biochem. J.*, 45: 479 (1949).
 - (42) VOLKIN E. e COHN W. E. - *Methods of Biochemical Analysis*, Vol. I, Glick Edit., Interscience Publ., New York, pag. 287 (1954).
 - (43) MARKHAM R. e SMITH J. D. - *Biochem. J.*, 49: 401 (1951).
 - (44) LEHNINGER A. L. - *J. biol. Chem.*, 178: 623 (1949).
 - (45) SACKS J. - *Archiv. Biochem.*, 30: 423 (1951).
 - (46) ENNOR A. H. e ROSENBERG H. - *Biochem. J.*, 50: 524 (1952).
 - (47) LEE K. H. e EILER J. J. - *J. biol. Chem.*, 203: 703 (1953).
 - (48) ERNSTER L., ZETTERSTRÖM R. e LINDBERG O. - *Acta chem. scand.*, 4: 942 (1950).
 - (49) CRANE R. K. e LIPMANN F. - *J. biol. Chem.*, 201: 235 (1953).
 - (50) DERACHE R., TREMOLIERES J., GRIFFATON G. e LOWY R. - *Bull. soc. chim. biol.*, 38: 717 (1956).
 - (51) LOGAN J. E., MANNELL W. A. e ROSSITER R. J. - *Biochem. J.*, 51: 470 (1952).
-