Caleidoscopio

Sergio Ferrara

Manuale di Laboratorio (I)

Laboratorio Analisi Cliniche
Sezione Immunometria
Ente Ospedaliero "M. delle Grazie"
Cerreto Sannita (BN)

74

Direttore Responsabile
Sergio Rassu

MEDICAL
SYSTEMS S.P.A.

Via Rio Torbido, 40 - 16165 Genova (Italy) Tel.010 83.401
Stampato a Genova 1992

Editoriale

Questo volume è il primo di due con i quali contiamo di rivisitare assieme a voi alcuni dei temi che avevamo già affrontato con la serie del dottor Kubasik.

Si è trattata di una felice serie più volte ristampata e che ha evidenziato, qualora ne avessimo avuto bisogno, l'interesse per questi aspetti da parte dei lettori che ci seguono ormai fedelmente.

D'altra parte il supporto teorico nelle indagini di laboratorio è fondamentale se non si vuol correre il rischio di pericolose involuzioni culturali e questi due volumi del dottor Sergio Ferrara vogliono proprio aiutare a comprendere i "perché" delle cose.

L'origine di questi testi sono infatti il materiale pazientemente preparato dall'autore per i suoi allievi con la convinzione che poiché in laboratorio spesso si danno per scontate molte cose, e questo sopratutto dopo l'introduzione dell'automazione, esiste il pericolo reale che molti operatori, non solo tecnici, ignorino le basi scientifiche e tecniche su cui si fondano le apparecchiature ed anche le metodiche.

Il dottor Sergio Ferrara ha conseguito la Laurea in Scienze Biologiche all'Università di Napoli. Ha al suo attivo un anno di esperienza presso il laboratorio di microbiologia al Policlinico "A. Gemelli" dell'Università Cattolica di Roma sotto la direzione del prof. A. Sanna, eminente figura di ricercatore oggi purtroppo scomparso; quindi una breve esperienza presso il laboratorio di analisi dell'Ospedale Civile e dell'Ospedale Fatebenefratelli di Benevento.

Dal 1982 lavora presso il Laboratorio di Analisi dell'Ospedale Civile di Cerreto Sannita di cui oggi è Direttore Biologo per la sezione di Immunometria.

Dal 1985 è docente di Chimica e Radioimmunologia presso la Scuola per operatori sanitari-tecnici di laboratorio di Benevento.

Poiché tutto in laboratorio ha un perché, ed un significato, pubblichiamo questi volumi con la convinzione che, come sottolinea l'Autore, un tale atteggiamento porta ad amare ciò che si fa e il dottor Ferrara senza dubbio ama il proprio lavoro da venti anni con lo stesso entusiasmo di sempre.

Sergio Rassu

Dedica

Ai miei quattro figli, Corrado, Stefania, Giuliano, e Graziano ed a mia moglie Laura.

Si ringrazia il Dr. De Paola Salvatore, medico laboratorista, per le illustrazioni dei due volumi.

Fotometria - spettrofotometria

E' indubbio che parlare di fotometria, o meglio in maniera più estensiva di Spettrofotometria, si affrontano argomenti che coinvolgono un'altissima percentuale della diagnostica strumentale; per cui , a mio avviso, è opportuno e necessario approfondire accuratamente i concetti generali che riguardano la spettrofotometria considerando in particolare la sua applicazione ad apparecchiature scientifiche. Per fare ciò è opportuno ricordare alcuni riferimenti su due essenziali componenti della spettrofotometria e cioè l'elettricità e la luce.

Elettricità

Incominciamo a definire cos'è la corrente elettrica. La corrente elettrica è costituita da un insieme di cariche elettriche che abbisognano di un conduttore per spostarsi da un punto ad un altro (da potenziale maggiore a potenziale minore). Per lo studio della corrente elettrica ci si riferisce principalmente alla sua intensità (I). L'intensità della corrente elettrica dipende da due importantissimi fattori:

1) Potenziale (V), (meglio differenza di potenziale) applicato al conduttore;

2) Resistenza (R) che il conduttore oppone al passaggio della corrente.

Rispetto a questi due fattori sono state enunciate due leggi dette di Ohm.

La prima legge di Ohm regola il rapporto intensità di corrente - differenza di potenziale che è direttamente proporzionale ed intensità di corrente e resistenza del conduttore che è inversamente proporzionale e cioè:

l^a legge di Ohm $$I = \frac{V}{R}$$

dove I= Intensità di corrente
V= Differenza di potenziale
R= Resistenza

la seconda legge di Ohm riguarda la resistenza dei conduttori e cioè: La resistenza di un conduttore viene influenzata dalla sezione (s) del conduttore, dalla lunghezza (l) di esso e dalla natura o resistenza specifica del conduttore (Δ) e cioè:

2ª legge di Ohm $R = \Delta \frac{1}{s}$

dove R = Resistenza
l = Lunghezza
s = Sezione
Δ = Resistenza specifica

L'intensità della corrente viene misurata da un apparecchio detto amperometro (Figura 1).

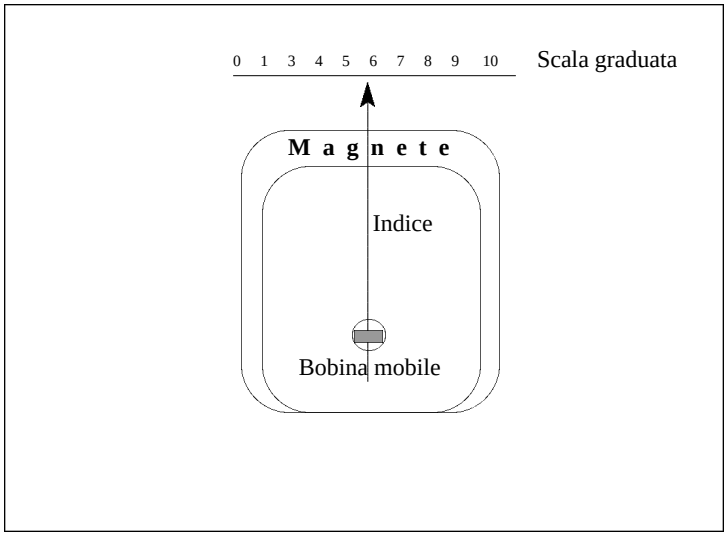


Figura 1. Rappresentazione schematica di un'amperometro.

Quando il filo della bobina viene attraversata dalla corrente elettrica da misurare si crea un campo magnetico che si oppone a quello del magnete, per cui si avrà la rotazione della bobina. la molla antagonista riporta la bobina in posizione di equilibrio e questo spostamento corrisponde all'intensità della corrente che verrà indicata nella scala graduata. Poiché le apparecchiature scientifiche presuppongono misurazione di intensità di corrente molto piccole (dell'ordine di milliampere), l'amperometro descritto è stato modificato in uno strumento adatto allo scopo che si chiama Galvanometro. La differenza del galvanometro dall'amperometro sta in alcuni elementi:

a) la bobina è leggerissima ed è sospesa ad un filo indeformabile che agisce da antagonista al passaggio di corrente nella bobina;

b) l'indice è formato da uno specchietto collegato alla bobina sul quale incide un raggio di luce che riflesso su una scala graduata dà la misurazione ottica dell'intensità di corrente.

Pertanto piccolissimi spostamenti dell'immagine luminosa producono registrazioni della corrente nell'ordine di milliampere.

Per misurare le differenze di potenziale applicate ad un conduttore si usa il voltmetro. il voltmetro è costituito da un amperometro a resistenza R della bobina conosciuta; con l'amperometro è possibile misurare l'intensità di corrente I per cui per la legge di Ohm si risale alla differenza di potenziale V:

$$I = \frac{V}{R} \qquad \text{cioè } V = I \times R$$

In laboratorio esistono circuiti che misurano sia l'amperaggio (la bobina viene messa in serie con una resistenza molto elevata in modo che la bobina venga attraversata da piccole quantità di corrente) che la differenza di potenziale cioè il voltaggio.

Tra intensità di corrente e intensità luminosa esiste un rapporto che può essere sfruttato per misurazioni. Questo rapporto viene realizzato tramite un dispositivo detto *fototubo* (Figura 2); esso trasforma un segnale luminoso in segnale elettrico. Il principio sul quale si fonda il fototubo è quello fotoelettrico secondo il quale quando un fascio di luce colpisce particolari metalli vi è una eccitazione alla quale la superficie metallica risponde in termini "elettrici" con eccitazione di elettroni il cui numero corrisponde all'intensità della radiazione incidente. In pratica il fototubo è costituito da un contenitore cilindrico nel quale viene fatto il vuoto

e che è trasparente, dove vengono inseriti due elettrodi uno positivo (anodo) ed uno negativo (catodo). l'elettrodo negativo ha una superficie estesa adatta a ricevere la radiazione luminosa da misurare; tale superficie produrrà l'effetto fotoelettrico. L'elettrodo positivo è rappresentato da una sbarra metallica.

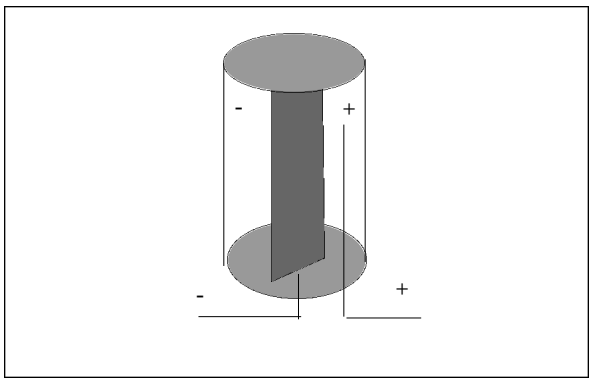


Figura 2. Rappresentazione schematica di un fototubo.

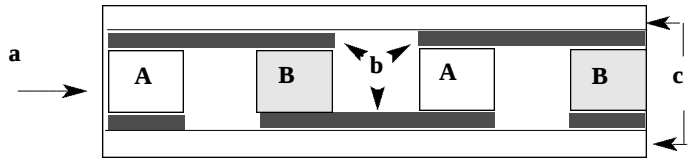
Quando la radiazione luminosa va ad incidere sul catodo si libereranno sulla superficie metallica tanti elettroni quanto intensa è stata la radiazione; questi elettroni si muovono nel vuoto del tubo e vengono attirati dall'anodo; questa attrazione è cioè un flusso di elettroni ovvero una corrente elettrica che verrà pertanto misurata .Poiché l'intensità della corrente rilevata nel fototubo è piuttosto bassa è necessario amplificare tale intensità. il fototubo viene quindi, nelle attrezzature di laboratorio, opportunamente modificato inserendo al catodo una serie di placche metalliche ognuna delle quali avrà un'eccitazione di elettroni che amplificheranno l'eccitazione luminosa. Tale apparecchio viene chiamato *fotomoltiplicatore.*

Perché si abbia l'eccitazione degli elettroni è necessaria una fonte di luce. L'elemento fotosensibile si chiama fotocellula ed è formato da materiale semiconduttore mentre la fonte luminosa è

una lampadina. La lampadina può essere di diversa composizione (Tungsteno, vapori di mercurio ecc.). Per rendere semiconduttore l'elemento fotosensibile si usa un supporto sul quale si stratifica del solfuro di cadmio. Nelle attrezzature scientifiche è spesso necessario mantenere costante la temperatura per cui si approntano opportuni accorgimenti. Il sistema più usato che assicuri costanza di temperatura è il cosiddetto *effetto Peltier*.

L'effetto Peltier si basa sul principio della emissione o assorbimento di calore quando due metalli diversi (es. Antimonio e Bismuto) vengono attraversati da corrente elettrica. L'emissione del calore o al contrario l'assorbimento sono regolati dal verso della corrente. Per cui nell'effetto Peltier è necessario fissare il verso della corrente. Poniamo che A e B sono i due conduttori (metalli Antimonio e Bismuto) e che essi sono collegati tra loro e per coppia da piastre di collegamento; se questo sistema viene isolato da piastre isolanti avremo il cosiddetto modulo Peltier (Figura 3).

In pratica fissato il verso della corrente avremo come detto, assorbimento di calore o emissione. Questo principio viene sfruttato approntando un modulo Peltier per esempio



a Verso della corrente.
b Piastre di collegamento dei metalli.
c Piastra isolante che viene riscaldata o raffreddata a seconda del verso della corrente.

Figura 3. Modulo Peltier.

nell'alloggiamento delle cuvette di uno spettrofotometro. Il modulo è in parallelo con un sensore elettronico di temperatura detto *termistore* che segnala ad un amplificatore le variazioni di temperatura; si provoca così l'inversione del calore. In tal modo si ha un effetto termostatante con approssimazione a + o - 1 grado centigrado. La temperatura desiderata si raggiunge in brevissimo tempo.

La luce

Per quanto detto finora si capisce bene che, determinata precisa corrispondenza tra elettricità e luce, è possibile sfruttare a fini diagnostici il tutto approntando un apparecchio adatto allo scopo. Pertanto si rende necessario soffermarsi sul discorso 'Luce" studiando alcuni principi fisici che la regolano. La luce è costituita da una serie di particelle luminose dette FOTONI che muovendosi in maniera rettilinea battono contro un ostacolo determinando un doppio effetto: riflessione e rifrazione. Dobbiamo però considerare il movimento delle particelle luminose come un moto non rettilineo ma ondulatorio ed in tal senso possiamo spiegare altre due caratteristiche della luce e cioè: Interferenza e diffrazione. Riportando su assi cartesiani le grandezze Ampiezza dell'onda luminosa-percorso o spazio dell'onda stessa. Possiamo visualizzare graficamente un'onda luminosa (Figura 4).

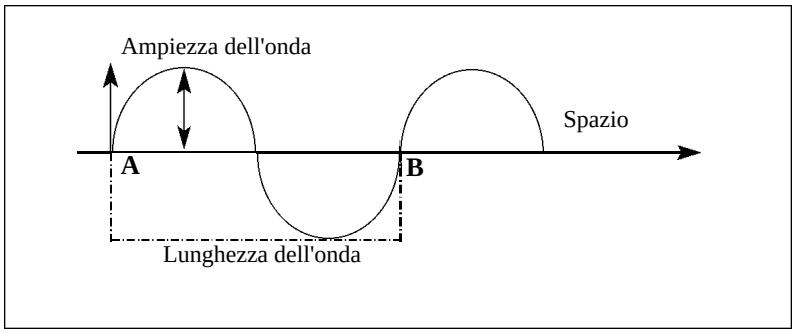


Figura 4. Rappresentazione schematica dell'onda luminosa.

Il considerare la luce a natura ondulatoria ci porta ad una peculiare caratteristica della luce e cioè la sua possibilità di propagarsi nel vuoto, indipendentemente cioè dalla presenza di particelle di materia come avviene per la propagazione ondulatoria del suono (particelle di gas o altro materiale che permettono la propagazione dell'onda sonora). Questa caratteristica della luce è dovuta alla natura della luce stessa che è elettrica e magnetica per cui si può definire la luce come una radiazione elettromagnetica con andamento ondulatorio.

Dal grafico si capisce tale andamento ondulatorio che si ripete sempre in eguale misura riproducendo sempre il tratto A B che pertanto definisce la lunghezza dell'onda luminosa.

La lunghezza dell'onda luminosa viene indicata con il simbolo (Lambda) e si esprime in metro (generalmente sottomultipli del metro come per esempio nanometro o nm).

Per un punto dello spazio in un determinato secondo passerà un certo numero di onde. Questa è la frequenza della luce in quel punto in un secondo e si esprime con la lettera greca (ν). la velocità di propagazione di un'onda luminosa è direttamente proporzionale sia alla lunghezza sia alla sua frequenza, cioè:

$$1)\ V = \lambda \times \nu$$

Poiché si è calcolato che la velocità di propagazione di un'onda luminosa nel vuoto è uguale a 300.000 km al secondo si può scrivere la relazione uno considerando la velocità costante (c) nel seguente modo:

$$2)\ C = \lambda \times \eta \quad \text{ovvero } \lambda = \frac{C}{\eta}$$

Per cui la lunghezza d'onda può essere calcolata conoscendo la frequenza η. Dalla formula due la lunghezza d'onda è inversamente proporzionale a η cioè più è alta più bassa è la η. Le radiazioni elettromagnetiche che producono fenomeni visivi hanno lunghezza d'onda tra 400 e 800 nanometri.

Le unità di misura della lunghezza d'onda sono:

metro = 1 m

centimetro (cm) = 10^{-2} m

micron (μ) = 10^{-6} m

millimicron o nanometro (mμ) = 10^{-9} m

Amgstroms (Å) = 10^{-10} m

La fonte naturale di onde luminose è il sole. Una riproduzione artificiale di una fonte luminosa è la lampadina. Qualsiasi sia la fonte luminosa non avremo mai una radiazione luminosa ma più radiazioni ciascuna con una propria lunghezza d'onda; se viene variata la lunghezza d'onda (variando ad esempio la frequenza) avremo colori diversi. la combinazione di più colori dà la luce bianca, per esempio:

Rosso = 670 nm
Arancione = 640 nm
Giallo =600 nm
Verde = 560 nm
Azzurro = 500 nm
Indaco = 460 nm
Violetto = 430 nm

Poiché la luce bianca è una combinazione di più colori, se volessimo scindere la luce bianca nei suoi colori (dispersione) possiamo usare un prisma di vetro o di altro materiale trasparente. Quando la luce bianca batte sul prisma viene scomposta nei vari colori e rifratta . Questa rifrazione dipende non solo dal mezzo attraversato ma anche dalla lunghezza d'onda della luce incidente; se al di là del prisma poniamo uno schermo, avremo deviazioni diverse su di esso dovute a diverse l. Per ottenere una migliore dispersione della luce incidente, il prisma di cui si è parlato può essere "lavorato " creando dei solchi in una piccola lastra di materiale trasparente. In tal modo avremo anche una diffrazione "potenziata". Questo è il cosiddetto sistema a reticolo. In ogni caso al di qua del prisma o del reticolo viene posto uno schermo che raccoglie la rifrazione del raggio incidente in radiazioni separate le une dalle altre. Se sullo schermo viene praticata una fessura, attraverso di essa passeranno solo radiazioni di una determinata lunghezza d'onda e sofisticando

ancora di più il sistema, attraverso la fessura passerà solo una "BANDA" di luce costituita solo da una ben determinata lunghezza d'onda. La luce incidente policromatica attraverso rifrazione dispersione e diffrazione (nel reticolo)diventa monocromatica. Quanto più stretta è la fessura tanto più monocromatica è la luce. Questa situazione è descritta dal termine banda passante, caratteristica fondamentale da considerare nella scelta di uno spettrofotometro. Se il prisma o il reticolo è in un sistema di rotazione, si comprende bene che si riesce a spostare il raggio convogliandolo opportunamente sulla fessura; in tal modo passa qualsiasi tipo di luce monocromatica; cioè si riesce a selezionare un raggio di luce monocromatico (Figura 5).

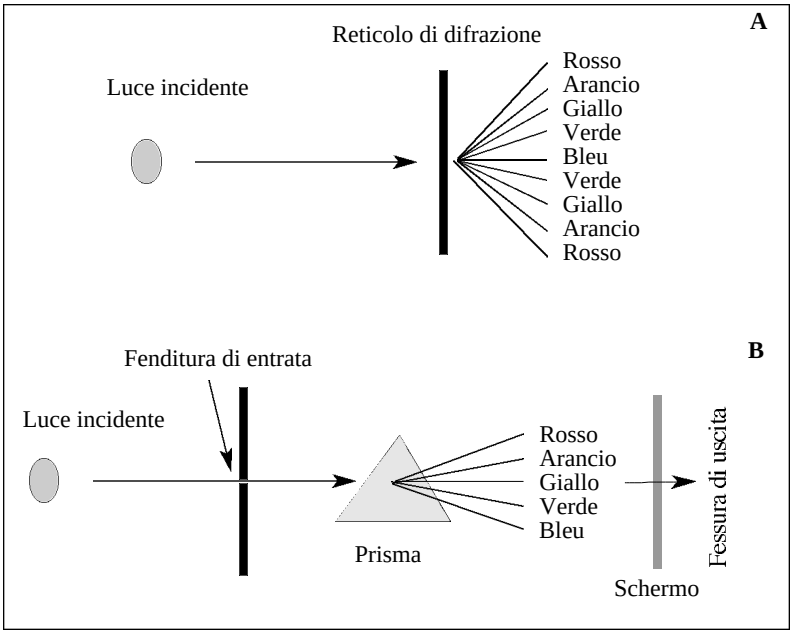


Figura 5. Rappresentazione schematica in A: sistema di difrazione della luce; in B sistema per selezionalre una luce monocromatica.

Nel definire la luce abbiamo evidenziato la sua natura elettromagnetica cioè in pratica, la luce assorbita da un corpo viene trasformata in calore ovvero in energia. E' possibile attraverso la importantissima equazione di *Planck* risalire dalla frequenza di una radiazione luminosa alla quantità di energia

trasportata da ogni singola particella luminosa (Fotone) cioè:

$$E = h \times \nu$$

dove:

E = Quantità di energia di un fotone
h = Costante di Planck
ν = frequenza della radiazione

Più è elevata la frequenza più alta sarà la quantità di energia trasportata da una singola particella luminosa. L'equazione di Planck si giustifica considerando una radiazione luminosa come la somma di più particelle luminose (fotoni) ad andamento *ondulatorio.*

Considerando che in ogni molecola vi è assorbimento di radiazioni luminose, spiegato da uno spostamento di elettroni da un livello a quello superiore e che tale assorbimento si ha per tutte le molecole di una stessa sostanza, si può dire che una sostanza assorbe radiazioni di una sola determinata lunghezza d'onda, per cui ogni singola sostanza assorbe una sola e specifica radiazione luminosa di lunghezza d'onda specifica.

Per esempio lo ione rameico Cu^{++} , quando è in soluzione acquosa, ha la caratteristica di assorbire solo radiazioni gialle.

Se ripartiamo su un grafico l'assorbimento dell'energia luminosa di una sostanza in funzione della lunghezza d'onda della radiazione inviata ,avremo che il massimo di assorbimento si avrà alla lunghezza d'onda caratteristica della sostanza, cioè avremo il massimo si assorbimento quando l'energia radiante provocherà il movimento di elettroni da un livello all'altro. L'assorbimento decresce quanto più ci si allontana dalla l massima, e ovviamente cresce quanto più ci si avvicina alla l massima (Figura 6).

Avremo quindi sugli assi cartesiani una curva a campana (Gaussiana). Tale curva caratterizza ogni sostanza per cui viene chiamata "curva o spettro di assorbimento" di una determinata sostanza. Da quanto detto possiamo spiegare come avviene il fenomeno di colorazione delle sostanze. Se ad una determinata sostanza inviamo una luce bianca (policromatica), si avrà l'assorbimento di una parte della luce che corrisponde solo ad una determinata lunghezza d'onda.

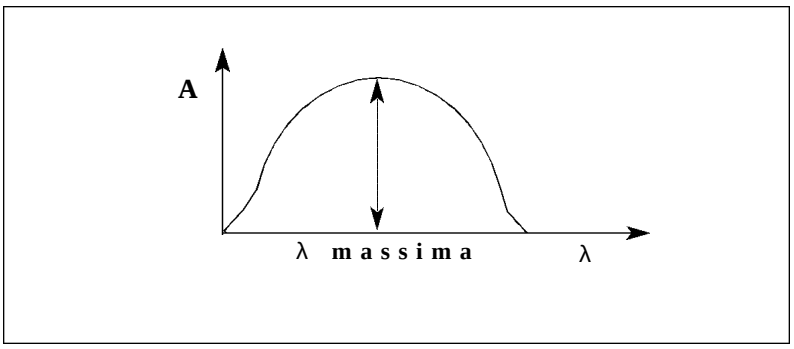


Figura 6. Spettro di assorbimento.

Il resto della luce non assorbito viene rinviato dalla sostanza ed è responsabile del colore della sostanza.

Per esempio se sottoponiamo un cristallo di solfato di Rame ad un fascio di luce policromatica, questo assorbe le radiazioni nella zona del giallo, respingendo le altre. La somma delle radiazioni respinte da una colorazione azzurra al sol fato di rame. Il colore azzurro è allora *complementare* al colore giallo assorbito; cioè unendo il colore azzurro ottenuto con quello giallo avremo nuovamente la luce bianca, Otswald ha predisposto in un cerchio i colori assorbiti e i loro complementari con il corrispondente intervallo di λ (Figua 7).

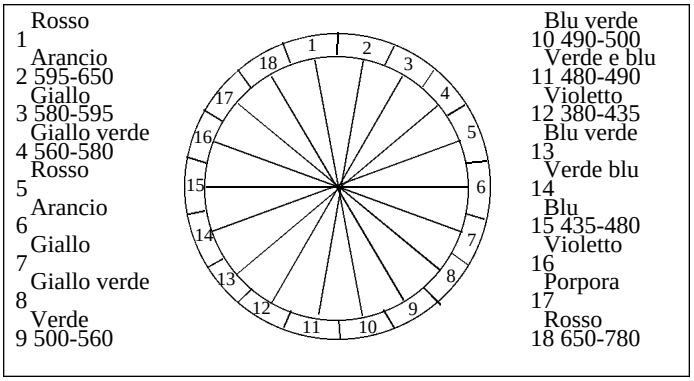


Figura 7. Circolo di Otswald.

L'indicazione in figura dei colori con i numeri indica il colore assorbito con la lunghezza d'onda di assorbimento. L'indicazione del singolo colore è il colore della sostanza cioè il colore *complementare*.

Quanto detto per le sostanze si applica anche alle sostanze in soluzione in quanto il comportamento all'assorbimento della luce delle soluzioni non subisce modifiche ad opera del solvente o perlomeno le modificazioni subite possono considerarsi ininfluenti. Pertanto una soluzione gialla ha assorbito nel blu indipendentemente dal solvente. Se una soluzione viene attraversata da una determinata radiazione monocromatica corrispondente al suo spettro di assorbimento, ogni molecola del soluto assorbe un fotone e passa allo stato eccitato (stato di transizione degli elettroni). Questo stato non è permanente per cui vi è da parte della molecola il tentativo di ritornare al suo stato iniziale. L'energia scaturita dalla eccitazione luminosa, viene perduta in collisioni e dissipata in calore.

L'uso di soluzioni colorate in chimica analitica ci permette di risalire alla concentrazione del soluto. Anche se la soluzione non è colorata, sfruttando l'assorbimento di radiazioni ultraviolette possiamo risalire alla concentrazione delle sostanze disciolte nella soluzione.

Facciamo un esempio:

Su una vaschetta contenente una soluzione colorata che può, ad esempio assorbire nella zona del verde, applichiamo una radiazione di λ nota e di intensità Io (Figura 8).

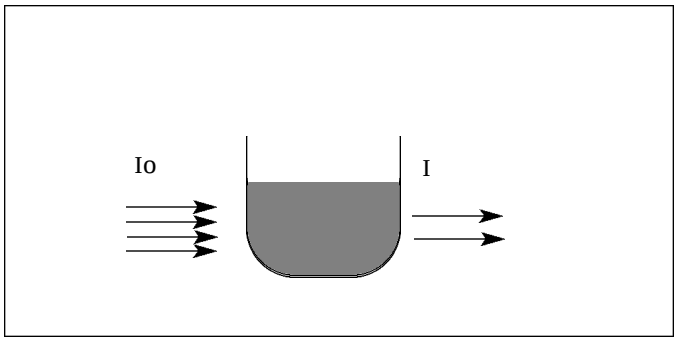


Figura 8. Fenomeno dell'assorbimento della luce che attraversa una soluzione.

La radiazione emergente sarà di intensità I< Io poiché parte della radiazione viene assorbita dalla soluzione. Più piccola è la radiazione di "uscita" tanto più si è avuto assorbimento. L'intensità esprime la capacità di assorbimento della radiazione da parte della soluzione. Per cui l'intensità della luce trasmessa da una soluzione dipende dall'intensità e lunghezza d'onda della luce incidente. Il rapporto tra luce incidente e luce emergente:

$$\frac{Io}{I}$$

rappresenta la frazione di luce trasmessa e viene chiamato trasmittanza (T).

Il logaritmo decimale della trasmittanza :

$$\log \frac{I}{Io}$$

viene definito *assorbanza* (A) oppure Densità ottica (D.O.) oppure *estinzione* (E).

Con questi termini si indica la quantità di luce che viene assorbita durante il passaggio del raggio attraverso la soluzione in esame, o meglio, attraverso il soluto. Come già detto l'assorbimento della luce avviene da parte delle molecole disciolte nella soluzione. Per cui più concentrata è la soluzione più si avrà assorbimento di luce. L'assorbimento della luce aumenta aumentando la concentrazione del soluto oppure lo spessore (il percorso ottico) dello strato di soluzione attraversato dalla luce (Figura 9).

Pertanto l'intensità della luce assorbita cresce in modo esponenziale con il numero delle molecole di soluto, quindi sia con la concentrazione (C) della soluzione, sia con lo spessore dello strato del liquido (d) secondo la struttura molecolare del soluto stesso espressa da un fattore (k) che varia da sostanza a sostanza e viene detto coefficiente di estinzione E. Di conseguenza l'intensità del raggio emergente decresce in modo esponenziale. Cioè:

$$I = Io \times 10^{-Kdc} \quad \text{ovvero}$$

$$I / Io = 10^{-Kdc}$$

ma poiché $I / Io = T$

si avrà $T = 10^{-Kdc}$

e in forma logaritmica decimale

$$Kdc = - \log T$$

poiché $- \log T = E$ (estinzione)

$$E = Kdc$$

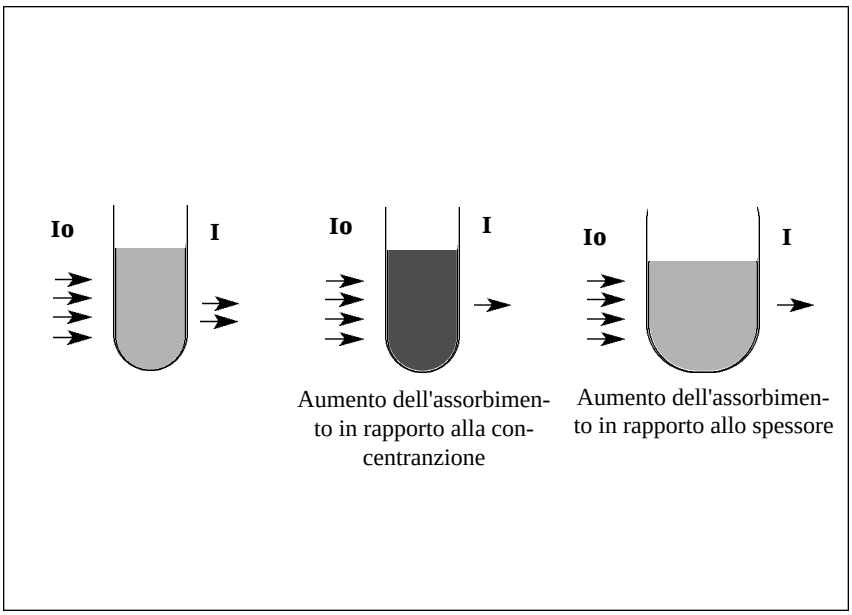


Figura 9. Assorbimento della luce: effetto dello spessore e della concentrazione della soluzione.

Cioè l'estinzione di un raggio monocromatico (non vale per i policromatico) è direttamente proporzionale alla concentrazione del soluto, allo spessore dello strato del liquido e alla natura del soluto stesso. L'estinzione è in rapporto alla trasmittanza. Quanto enunciato è conosciuto con il termine di legge di Lambert e Beer.

Questa legge ci permette di risalire alla concentrazione di una soluzione in grado si assorbire in una certa zona di lunghezza d'onda nel visibile e nell'ultravioletto. Infatti sia :

Ao= assorbanza soluzione nota Co = concentrazione soluzione nota	Per intendersi standard possibilmente accluso alla confezione
Ax = Assorbanza soluzione Cx = Concentrazione incognita	Campione in esame

Conoscendo lo spessore o cammino ottico della cuvetta che è di un centimetro ed il coefficiente molare di estinzione che è uguale per le due soluzioni perché si tratta dello stesso soluto avremo:

$$\frac{Ao}{Co} = \frac{Ax}{Cx} \qquad \text{cioè} \qquad AoCx = AxCo$$

$$\text{cioè} \qquad Cx = \frac{Ax}{Ao} \times Co$$

ovvero la concentrazione di una sostanza è uguale al rapporto dell'estinzione del campione all'estinzione dello standard moltiplicata la concentrazione dell standard

$$\frac{Ec}{Eo} \times Co$$

La relazione Ao / Co = Ax / Cx si ottiene applicando la legge di Lambert e Beer:

$$Ao = a\,Cobo \qquad Ax = aCxBx$$

$$Ao / Co = abo \qquad AxCx = abx$$

a = Coefficiente di estinzione molare ovvero K, uguale per le due soluzioni

bo e bx = Spessore cioè 1 cm di cammino ottico, costante per le due soluzioni

Considerazioni sulla legge di Lambert e Beer sono necessarie, visto che essa ha validità solo per soluzioni diluite e per radiazioni monocromatiche. Iniziamo con il rappresentare graficamente la legge di Lambert e Beer su assi cartesiani ponendo sulle ordinate l'assorbanza e sulle ascisse la concentrazione (Figura 10):

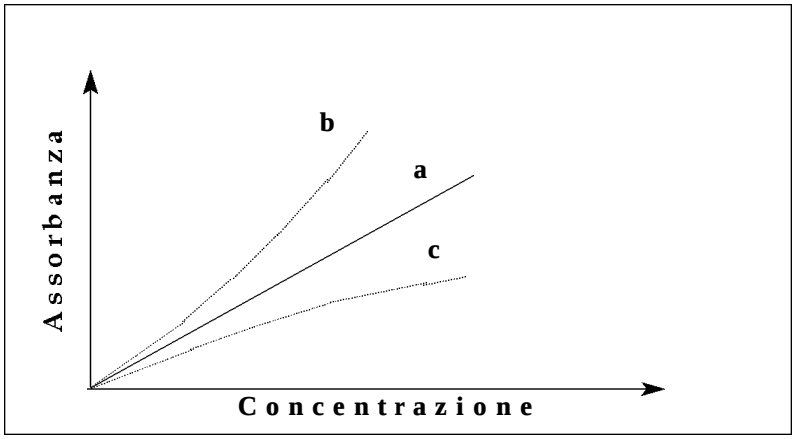


Figura 10. Rappresentazione schematica della legge di Lambert e Beer.

La retta a) ottenuta esprime il comportamento teorico della legge di Lambert e Beer. Possiamo avere deviazioni a questo comportamento sia per cause chimiche (rispetto cioè alla soluzione in esame) sia per cause meccaniche o strumentali (apparecchio di lettura non efficiente). talvolta entrambi le cause entrano in giuoco. Se per esempio una soluzione è troppo concentrata, le varie molecole del soluto sono molto vicine le une alle altre per cui l'assorbimento del raggio monocromatico può essere alterato dalla eccessiva vicinanza delle molecole del soluto; in tale ipotesi anche il solvente fa la sua parte. Si manifesta insomma una situazione in cui le specie assorbenti si associano, si dissociano o reagiscono con il solvente, per cui cambiando la

fisionomia delle specie assorbenti cambia l'assorbimento stesso. In figura le linee tratteggiate manifestano la deviazione in positivo (parte superiore) e in negativo (parte inferiore) della curva teorica. Anche la strumentazione può invalidare la curva teorica descritta dalla legge di Lambert e Beer. Infatti poiché si usa in partenza un fascio di luce policromatico, l'apparecchio usato per la sua percezione può non essere in grado di assorbire perfetti raggi monocromatici; per questo motivo si sceglie per la misura dell'assorbanza un intervallo di lunghezza d'onda nella parte dello spettro di assorbimento dove non si abbiano forti e significative variazioni di assorbanza con il variare della lunghezza d'onda (Figura 11).

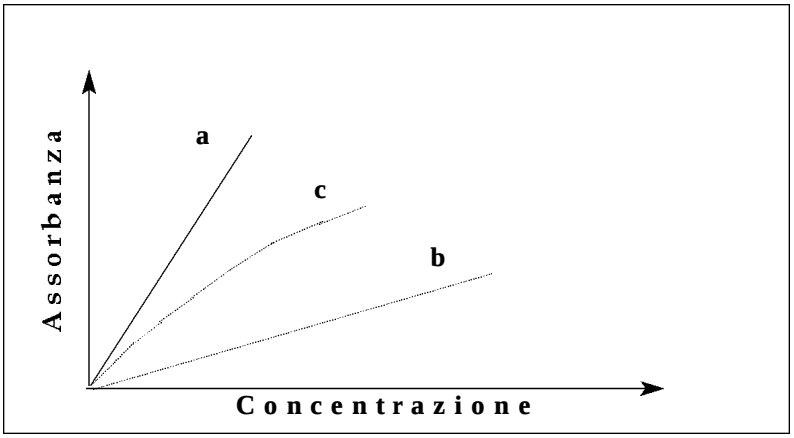


Figura 11. Legge di Lambert e Beer: a) curva teorica, b) luce policromatica con forti variazioni di assorbimento, c) luce policromatica con scarse variazioni di assorbimento..

Per quanto detto è sempre rischioso, per ogni sistema analitico che sfrutti la luce ed il suo assorbimento dare per scontata la legge di Lambert e Beer visto che riguardo alla soluzione sarebbe necessario indagare fino a che punto si può applicare la legge, cioè qual'è la concentrazione massima che determina il pieno rispetto della curva Assorbanza-Concentrazione, anche ammettendo di avere a disposizione un apparecchio che pur leggendo su banda

passante, percepisca raggi perfettamente monocromatici. Per essere sicuri che per una determinata soluzione si rispetta nel limite del possibile la legge di Lambert e Beer si appronta la cosiddetta curva di taratura.

In pratica si operano diluizioni scalari della soluzione in esame della quale si conosce il valore di concentrazione (soluzioni standard). Approntando un bianco reagente ed usando l'opportuna lunghezza d'onda di lettura, si legge sul fotometro l'assorbanza delle varie diluizioni e si riporta su assi cartesiani sia l'assorbanza che la concentrazione . Se la curva ottenuta è lineare, allora la legge di Lambert e Beer viene salvaguardata. Se per valori più alti di concentrazione si ha la flessione della curva, avremo una deviazione della legge di Lambert e Beer per cui dovremo operare delle modifiche nella preparazione delle diluizioni; si potrebbe ad esempio ridurre il volume del campione. Questa operazione fin qui descritta presuppone un apparecchio efficiente.

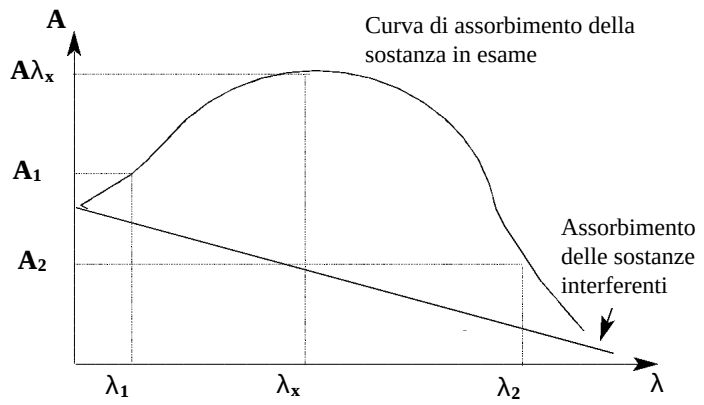
Naturalmente, ed è stato già detto, si consigliano misurazioni dell'assorbanza di una certa sostanza alla lunghezza d'onda corrispondente al punto di massimo assorbimento. Per fare cio bisogna riferirsi alle curve di assorbimento di quella sostanza in esame. Occorre che la temperatura sia costante perché i valori di estinzione variano con la temperatura; la temperatura in una soluzione è responsabile della variazione della densità della soluzione stessa. Oltrettutto certe soluzioni colorate possono perdere colore con il tempo per cui le letture dell'assorbanza devono essere effettuate nel più breve tempo possibile. Se inoltre una soluzione è particolarmente torbida (per siero chiloso, emolizzato) l'assorbimento delle particelle in sospensione altera il reale assorbimento con significative variazioni nella misurazione.

La legge di Lambert e Beer si applica anche a soluzioni composte da più specie assorbenti in quanto l'assorbanza totale è uguale alla somma dell'assorbanza di ciascuna sostanza.

$$\text{Cioè } A_t = A_1 + A_2 + \ldots\ldots A_n$$

C'è da dire infine che in alcuni tipi di analisi oltre all'assorbimento dei reattivi, vi può essere assorbimento aspecifico di sostanze presenti nel campione e che non devono essere dosate, che assorbono nella stessa zona di lunghezza d'onda. In tal caso è opportuno, per evitare errori, effettuare una correzione. Questa

procedura studiata e descritta da Allen si fonda sul principio che la curva di assorbimento delle sostanze interferenti abbia un andamento lineare nella zona di lunghezza d'onda considerata. (Figura 12).



$A\lambda_x$= Assorbanza del campione alla lunghezza d'onda del massimo assorbimento. $A\lambda_1$ e $A\lambda_2$ = Assorbanza del camione a lunghezza d'onda ai limiti dell'assorbimento.

Figura 12. Correlazione di Allen.

L'equazione di Allen può essere espressa così:

$$A_{corretta} = A\lambda_x - \frac{A\lambda_1 + A\lambda_2}{2}$$

Questa correzione non ha comunque valore in assoluto ed offre il fianco a parecchie critiche; infatti non è detto che le interferenze di sostanze da non dosare ma comunque presenti nel campione risultino nel loro spettro di assorbimento ad andamento lineare o siano tutte dello stesso tipo.

La relazione : $\frac{A\lambda_1 + A\lambda_2}{2}$

comporta un errore maggiore tanto più i valori si avvicinano a $A\lambda_x$. In ogni caso pur con alcune limitazioni è opportuno utilizzare nella maniera più appropriata possibile la correzione di Allen.

Oltre alle interferenze delle sostanze da non dosare è importante considerare, come si è ripetuto più volte, la perfetta funzionalità del fotometro e dello spettrofotometro.

Per questo motivo sarebbe opportuno valutare periodicamente l'efficienza e la funzionalità dell'apparecchio specialmente se in laboratorio esiste un solo apparecchio che di conseguenza subisce notevoli carichi di lavoro. Per controllare uno spettrofotometro si usano soluzioni colorate (se ne trovano in commercio per esempio la Spettrometer Sclavo) per le quali si conosce lo spettro di assorbimento ed i valori di assorbanza. Questi valori indicati dalla ditta produttrice sono ottenuti con misurazioni effettuate su uno spettrofotometro di riferimento, perfettamente funzionante ad una temperatura standard di 21 gradi centigradi e con una cuvetta con percorso ottico di 10 mm. Con questa soluzione è possibile controllare:

1) spettro di assorbimento confrontando le lunghezze d'onda di massimo assorbimento con quelle termiche (Figura 13);

2) Linearità della lampada preparando diluizioni scalari e misurando l'assorbanza alla lunghezza d'onda di massimo assorbimento.

3) Costanza di sensibilità ovvero riproducibilità di misurazione di assorbanza; si effettua tale prova misurando a distanza di tempo la stessa soluzione colorata e si devono avere valori di assorbanza sovrapponibili.

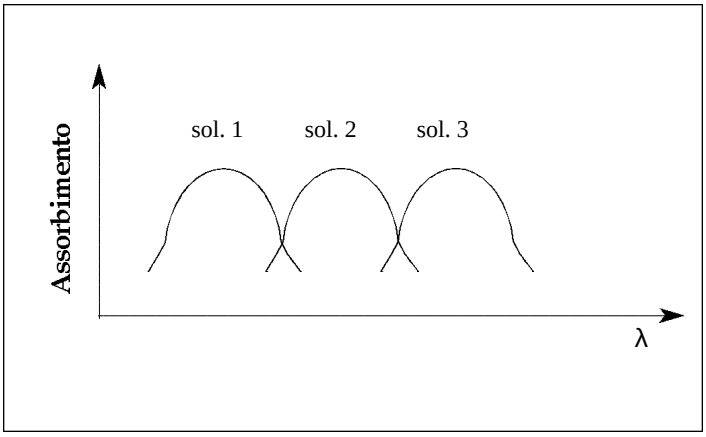


Figura 13. Accuratezza spettrale.

Fluorimetria

Nella fotometria e spettrofotometria di assorbimento si è descritto l'assorbimento del raggio luminoso monocromatico da parte di una molecola e la sua trasformazione in un'eccitazione elettrica misurabile per mezzo di un galvanometro. La fluorimetria non si basa sull'assorbimento della luce ma sulla emissione della luce. In pratica quando una molecola viene sottoposta ad energia radiante di una certa lunghezza d'onda può avvenire che invece di assorbire il raggio luminoso la molecola viene eccitata e riemette il raggio luminoso ad una lunghezza d'onda maggiore di quello iniziale. Nel fenomeno dell'assorbimento della luce gli elettroni di una molecola, che allo stato non eccitato si trovano nel livello a più basso contenuto energetico, passano ad un livello superiore; la molecola eccitata tende a ritornare nel suo equilibrio iniziale perdendo contemporaneamente l'energia assorbita fino a ritornare nel loro stato energetico iniziale. Particolari molecole a struttura grande e rigida, sottoposte ad energia radiante dissipano l'energia nella frazione di centesimi di secondo solo in parte, riportando l'elettrone al più basso livello vibrazionale.

Perché la molecola ritorni al suo stato energetico fondamentale, visto che non avvengono collisioni con altre molecole data la sua particolare struttura, la molecola dissipa il resto di energia a sua disposizione sotto forma di un fotone di luce; la molecola cioè provvede al suo assestamento energetico emettendo l'energia residua assorbita sotto forma di luce. Questa è la fluorescenza e la disciplina che la studia si chiama fluorimetria (Figura 14).

La misura della fluorescenza viene effettuata con un apparecchio specifico che si chiama fluorimetro.

Il fluorimetro è composto da una sorgente di luce costituita da lampade allo xeno o al hg. La lampada allo xeno dà radiazioni luminose in modo continuo sia nel visibile che nell'ultravioletto; l'intensità della radiazione è più o meno costante. la lampada a hg dà radiazioni discontinue ma di elevata intensità. Le radiazioni ultraviolette producono ozono che non solo assorbe nell'U.V., ma è fortemente tossico; per questa ragione sia la lampada allo xeno che quella a hg devono funzionare sotto forte corrente d'aria. La

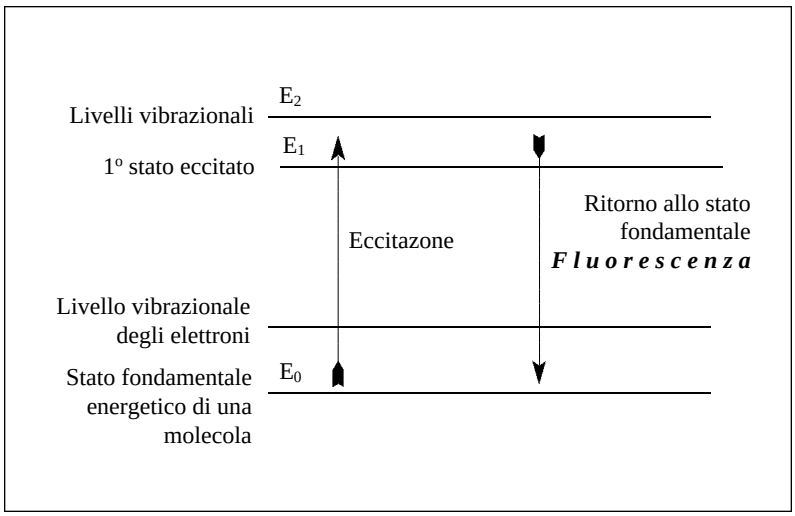


Figura 14. Rappresentazione schematica del fenomeno della fluorescenza.

radiazione luminosa emessa dalla lampada viene resa monocromatica per mezzo di un monocromatore primario che seleziona una radiazione di appropriata λ. Il raggio monocromatico colpisce la cuvetta contenente il campione che "reagisce" al raggio emettendo luce, provocando cioè il fenomeno della fluorescenza.

Vengono in sostanza emesse radiazioni in tutte le direzioni. La misura di tale intensità può essere effettuata pertanto in tutte le direzioni; per tale motivo si standardizza la direzione di misura e si considera il raggio fluorescente che esce dalla cuvetta che forma con essa un angolo retto (90 gradi) . Naturalmente dire che nel fluorimetro viene preso in considerazione solo il raggio "a 90 gradi" con la cuvetta, significa non considerare gli altri raggi luminosi nelle altre direzioni che verranno pertanto dispersi. Sul percorso del raggio considerato viene posto un secondo monocromatore per separare da tutte le radiazioni quella corrispondente alla massima λ. Questa radiazione colpisce il fotomoltiplicatore, passando attraverso il fototubo; si ha la trasformazione in segnale elettrico (Figura 15).

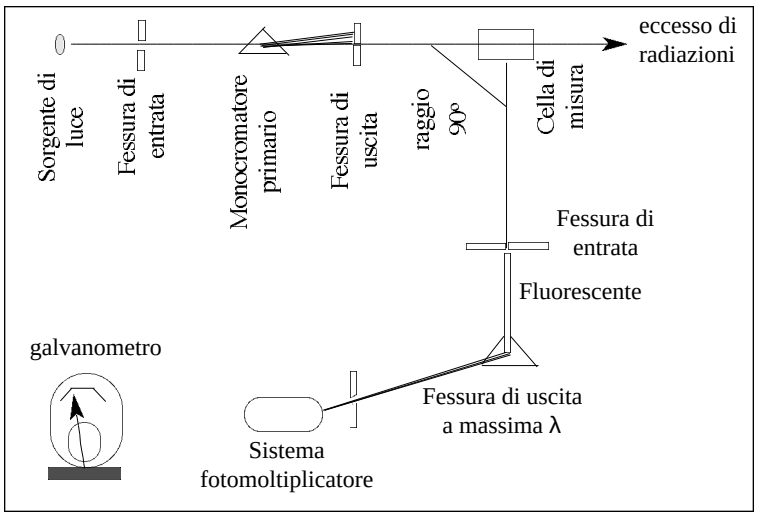


Figura 15. Rappresentazione schematica di uno spettrofotometro.

Le cuvette nello spettrofluorimetro possono essere a varie sezioni (circolare, quadrata, rettangolare) ed a differenza di quelle usate nella fotometria in assorbimento hanno, se non circolari, tutte le facce trasparenti.

L'analisi quantitativa effettuata attraverso lo spettrofluorimetro segue leggi precise, quali ad esempio la diretta proporzionalità tra intensità di fluorescenza e concentrazione della soluzione sottoposta a fluorescenza a meno di una costante che dipende dalla intensità della radiazione incidente, dalla efficienza quantica:

$$\frac{\text{n.ro fotoni emessi}}{\text{n.ro fotoni assorbiti}}$$

Dal coefficiente di estinzione molare e dallo spessore dello strato (cammino ottico). Fino a qualche anno fa le conoscenze sulla fluorimetria trovavano impiego in microscopia. Nella routine di laboratorio il microscopio a fluorescenza e le osservazioni che esso permetteva dava utili informazioni qualitative e semi-quantitative in alcuni campi quali la microbiologia. Oggi studi accurati sulla fluorimetria hanno permesso l'utilizzo di apparecchiature e tecniche fluorimetriche per esami quantitativi.

E' bene pertanto accennare sia alle tecniche fluorimetriche realizzate in microscopia sia a quelle che sfrutano analizzatori fluorimetrici .

Si è detto che particolari molecole, rigide e abbastanza grandi, investite da un raggio di luce monocromatico invece di assorbire la luce hanno la capacità di emettere luce di frequenza diversa e generalmente minore in tutte le direzioni ad una lunghezza d'onda maggiore. Esistono molte sostanze naturali dotate di questa proprietà ed in tal caso il fenomeno viene detto fluorescenza primaria o naturale.

Altre sostanze che non posseggono la fluorescenza primaria, possono con particolari trattamenti presentare il fenomeno della fluorescenza che viene detto secondario o indotto. Queste sostanze in pratica vengono legate a sostanze quali i fluorocromi che hanno la capacità di emettere radiazioni luminose ed il processo di trattamento viene chiamato fluorocromatizzazione.

Uno dei più classici fluorocromi usati è la RODAMINA. Poiché il risultato finale della fluorescenza è una lunghezza d'onda maggiore rispetto a quella della luce incidente, questo aspetto può essere utilizzato nel M. a fluorescenza per selezionare meglio l'immagine e caratterizzare in tal modo un determinato preparato sottoposto all'osservazione. Il M. a fluorescenza nella parte ottica è uguale al M.O. A quest'ultimo si aggiunge in pratica un blocco fluorescenza. Tale modulo aggiuntivo deve ottemperare ad alcune fondamentali condizioni:

1) Dovendo la luce di eccitazione avere una lunghezza d'onda minore di quella di emissione, occorre usare una lampada che emette nell'U.V. pertanto l'ottica di illuminazione deve essere tale da non assorbire troppo nell'U.V. (i vetri normali presentano tali inconvenienti)

2) Se la luce di eccitazione ha lunghezza d'onda nel violetto o nel blu e non nell'U.V. occorre avere a disposizione filtri di diverso tipo:

a) Filtri di eccitazione deputati ad eliminare dalla luce di eccitazione tutta la luce di maggiore (cioè quella parte di spettro a cui invece appartiene la luce di fluorescenza.)

b) Filtri di sbarramento posti dopo il preparato da osservare tendenti ad eliminare tutta la residua lunghezza d'onda bassa di

eccitazione. In tal modo si avrà un preciso contrasto del preparato che risalta su fondo scuro.

3) E' necessario scegliere in maniera oculata i filtri tenendo presente che i filtri a banda stretta sono necessari quando la luce di eccitazione e la luce di fluorescenza hanno lunghezza d'onda molto vicine.

Nella figura si tenta di rappresentare graficamente la parte fluorescenza di un M. La sorgente luminosa è generalmente una lampada a vapori di Hg (potenza 100 o 50 watt) che emette radiazioni violette o U.V. Il campo microscopico viene investito da un fascio di raggi non visibili ad occhio nudo (raggi U.V.) e, nel caso che nel preparato siano contenute particolari sostanze capaci di modificare la lunghezza d'onda del raggio stesso, si ha l'emissione di radiazioni luminose visibili di colore differente da caso a caso a seconda della sostanza "eccitata" (violetta, azzurra, verdastra, giallorossa).

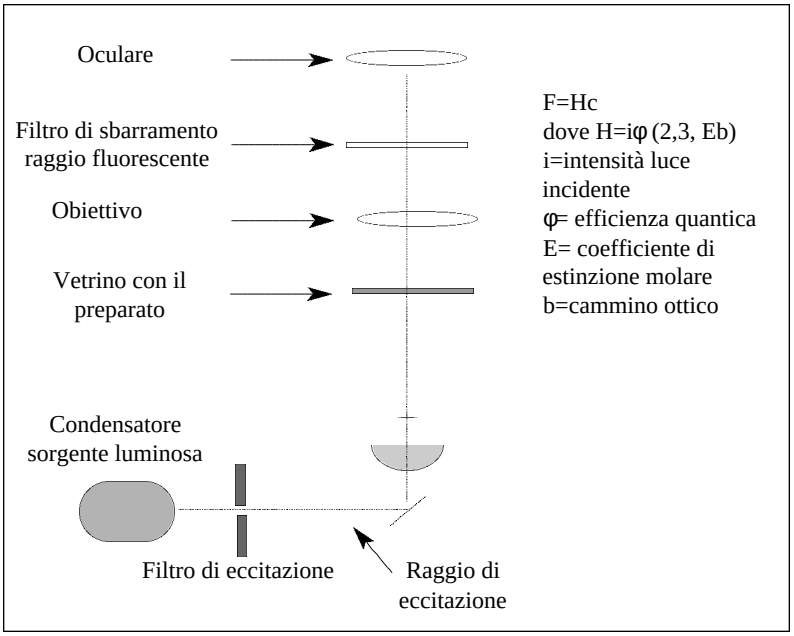


Figura 16. Microscopio a fluorescenza: blocco fluorescenza.

La fluorescenza applicata al microscopio permette di studiare morfologicamente, qualitativamente e semi-quantitativamente molte sostanze. La larga applicazione del M. a fluorescenza ha permesso di approfondire campi del laboratorio come la citologia e l'immunologia. Con l'impiego di Ab coniugati con sostanze fluorescenti, quali ad esempio l'isotiocianato di fluoresceina o la rodamina, è possibile evidenziare i corrispondenti Ag presenti nelle cellule e nei tessuti. Le indagini immunologiche che sfruttano il fenomeno della fluorescenza vengono comunemente indicati come test in immunofluorescenza. Nei test in immunofluorescenza diretta l'Ag da identificare è contenuto o in sospensione in un flaconcino o adsorbito in un pozzetto di un vetrino. Attualmente i kit in commercio presentano questa seconda condizione. All'Ag viene aggiunto un Ab specifico coniugato con isotiocianato e si effettua al M. a fluorescenza la lettura nel più breve tempo possibile. Nell'immunofluorescenza indiretta al pozzetto contenente l'Ag adsorbito si aggiunge il siero che dovrebbe contenere l'Ab specifico. Dopo opportuna incubazione e lavaggio con sostanze a particolare pH (pbs), si aggiunge un Ab coniugato con isotiocianato di fluorescenza. Il coniugato FITC anti IgG contiene Blu Evans che dà una colorazione rossa di contrasto (che indicherà la negatività) al colore verde-mela che è il colore fluorescente. Il pH costante è importante in relazione all'efficienza quantica ovvero il rapporto tra numero di fotoni emessi e numero di fotoni assorbiti è costante solo a determinato pH e Temperature. C'è da notare inoltre che nelle reazioni dove si sfrutta la fluorescenza occorre lavorare a T prefissate in quanto l'intensità di fluorescenza è tanto maggiore a quanto minore è la T della soluzione.

La determinazione quantitativa, mediante apparecchiature predisposte allo scopo, di reazioni immunologiche che hanno come evidenziatore o segnale un FLUOROFORO (Per esempio il 4 Metil Umbellil Feril Fosfato) avviene sfruttando il principio della fluorescenza a luce polarizzata. In pratica il fluoroforo verrà illuminato da luce polarizzata lineare, per cui le molecole che lo legano assorbiranno la luce nei loro punti di eccitamento. Alla fine della sollecitazione luminosa, il ritorno allo stato "energetico" stabile corrisponderà ad una emissione lineare di luce polarizzata. Se durante l'eccitazione luminosa le molecole non hanno mutato posizione rimanendo "immobili" il fenomeno della fluorescenza avverrà con una polarizzazione completa.

Una riduzione della polarizzazione sia avrà nel caso in cui le molecole, durante lo "stato eccitato" si muovono. Quanto più veloce è il movimento della molecola, tanto più ridotta è la polarizzazione. Questa proporzionalità può essere sfruttata per misurazioni quantitative; Cioè la grandezza di una molecola può essere rilevata dalla sua velocità di rotazione, considerando che le molecole più piccole ovviamente ruotano più velocemente di quelle più grandi.

I fluorimetri sfruttano pertanto questi concetti.

Una tecnica quantizzata al fluorimetro si basa su:

1) Reazione immunologica per "COMPETIZIONE" (antigene da quantizzare ed antigene marcato con fluoroforo competono tra loro per legami localizzati su un anticorpo).

2) Il legame con l'anticorpo determinino con competizione favorevole la formazione di grosse molecole che hanno una velocità di rotazione rallentata.

3) Il valore di polarizzazione è elevato il che corrisponde ad una quantità bassa di analita da quantizzare. Se l'analita è quantitativamente elevato, la competizione gli sarà favorevole, per cui, anche se l'anticorpo perderà piccole quote di fluorescenza si avranno molecole di piccole dimenzione; la velocità di rotazione è elevata ed il valore di polarizzazione sarà basso.

L'uso di calibratori a diversa concentrazione nota permette di avere sicuri riferimenti in termini di polarizzazione. Si avrà una curva intensità di polarizzazione - concentrazione dalla quale si estrapoleranno i valori dell'analita da misurare. Si comprende che sfruttando il concetto della polarizzazione in funzione del movimento delle molecole eccitate, tale metodo di indagine risulta valido ed attendibile solo per dosaggi di piccole molecole, considerando che il successivo legame con l'anticorpo modifica la grandezza della molecola e la sua velocità di rotazione. Nel caso di quantizzazione di grosse molecole alcune ditte hanno messo a punto sistemi alternativi quali soluzioni di microparticelle (sistema a cattura) sfruttando nella reazione immunologica la tecnica a "Sandwich" o anche quelle per competizione.

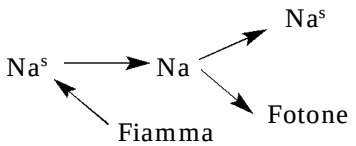
Fotometria a fiamma

Sia nella fotometria in assorbimento che in fluorimetria è stata rivolta particolare attenzione a quanto succede nel momento in cui viene eccitata una molecola con energia radiante luminosa. Mentre per la fotometria in assorbimento e la fluorimetria si sono studiate le correlazioni tra molecole ed energia, nella fotometria a fiamma si studiano le relazioni tra atomo ed energia. Nel ricordare che un atomo è costituito da un nucleo centrale (Protoni+Neutrone) e da un certo numero di elettroni disposti intorno al nucleo secondo determinati orbitali o livelli energetici; quando un atomo è sottoposto ad una certa sollecitazione energetica vi è il salto di un suo elettrone da un livello inferiore a quello superiore; si ha una transazione elettronica con passaggio da uno stato dell'atomo fondamentale stabile ad uno stato eccitato instabile.

Dal momento che l'elettrone tende a ritornare nel suo livello originario, per riportare l'atomo nel suo stato stabile, si avrà una emissione da parte dell'elettrone di un quanto di energia radiale (fotone) con una frequenza definita dall'intervallo energetico tra il livello iniziale e quello raggiunto per cui avremo secondo la legge di Planck:

$\Delta E = h f$ dove ΔE = energia finale

La relazione espressa viene sfruttata nella fotometria a fiamma in emissione. Perché si possano verificare i fenomeni di emissione è necessario che gli atomi da dosare siano in forma gassosa in quanto in questo stato fisico l'atomo tende a conservare il suo stato senza combinarsi con altre specie presenti. Per esempio per l'atomo di sodio noi avremo una partenza di stato stabile Na^s; con l'eccitazione passeremo ad uno stato instabile Na^i e per emissione di fotone ritroveremo lo stato stabile.



L'emissione di un fotone avverrà sempre ad una caratteristica lunghezza d'onda; Per esempio il sodio emette a 589 nm una luce gialla (Figura 17). A 589 nm il sodio ha il massimo di emissione che si evince da suo spettro di assorbimento:

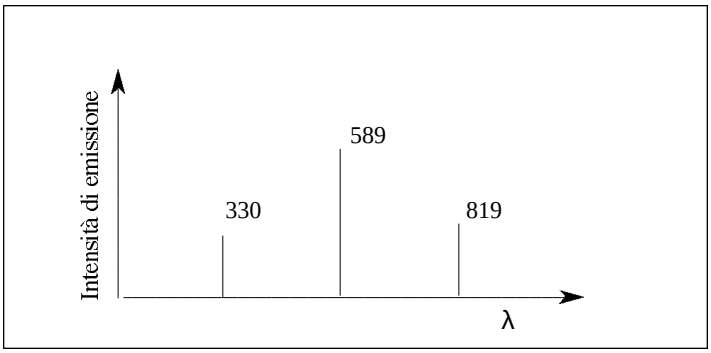


Figura 17. Rappresentazione schematica dello spettro del sodio.

Nel grafico non vi sono rappresentazioni sotto forma di curve in quanto si tratta di atomi che non hanno come per le molecole livelli vibrazionali intermedi.

La fotometria a fiamma in emissione rappresenta un valido metodo ottico di analisi per la determinazione di elementi che posseggono bassi livelli di eccitazione come ad esempio i metalli alcalini (Figura 18). In pratica sfruttando l'eccitazione di un atomo allo stato gassoso ottenuta mediante fiamma possiamo avere liberazione di fotoni che possono essere quantizzati sempre con il solito sistema Fototubo-Galvanometro.

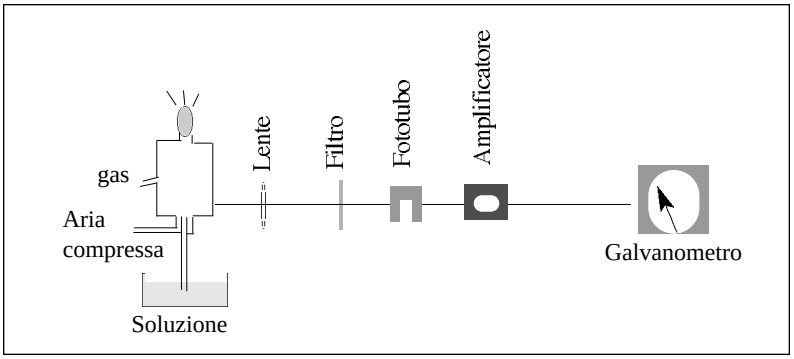


Figura 18. Rappresentazione schematica di un fotometro a fiamma.

Nella fotometria a fiamma si porta al cospetto di una fiamma non luminosa ad elevata energia la sostanza da analizzare disciolta in un solvente e nebulizzata (stato gassoso). La fiamma usata deve avere un alto contenuto energetico visto che si analizzano sostanze che posseggono bassi livelli di eccitazione. I principali tipi di fiamma sono miscele di acetilene-aria compressa (200 gradi), idrogeno-ossigeno (temperatura di combustione 3000 gradi) o acetilene-ossigeno (4000 gradi), propano e butano. Più alta è la temperatura di combustione più si ha la possibilità di eccitare un gran numero di elementi. Un fotometro è costituito da:

1) Vano della soluzione che passa attraverso un tubo capillare nel quale viene immessa aria compressa; in tal modo si provoca l'aspirazione della soluzione e la sua nebulizzazione.

2) Bruciatore dove viene convogliata la parte più fine ed omogenea dell'aereosol e nel quale vi è la fiamma sufficientemente energetica e costante. Generalmente il tipo di fiamma usato è il gas propano o butano.

3) Selettore di lunghezza d'onda che può essere un filtro semplice o un monocromatore a seconda se si ha un fotometro a fiamma o uno spettrofotometro

Perché una misurazione sia attendibile è necessario salvaguardare alcune condizioni:

1) La fiamma deve essere costante e non fluttuante perché una variabilità della fiamma può determinare eccitazioni diverse.

2) La variabilità della temperatura è fonte di errore in quanto il fenomeno dell'emissione di fotoni dipende non solo dal numero di atomi eccitati, ma anche dalla temperatura. E' buona regola dunque che il fotometro a fiamma venga acceso con un congruo anticipo prima dell'esecuzione del dosaggio.

3) E' importante non effettuare il dosaggio per basse concentrazioni e per elevate concentrazioni. Nel primo caso si avrebbero misurazioni alterate in quanto vengono favoriti processi di ionizzazione; nel secondo caso si possono avere fenomeni di autoassorbimento delle radiazioni emesse. Pertanto si deve considerare sempre la curva di linearità per la sostanza in esame (Figura 19).

Quanto detto a proposito della stabilità della fiamma ha portato negli ultimi tempi a mettere a punto fotometri dove si tende ad eliminare le fluttuazioni di fiamma (che sempre sono presenti) e di conseguenza le oscillazioni di misurazione. L'accorgimento usato

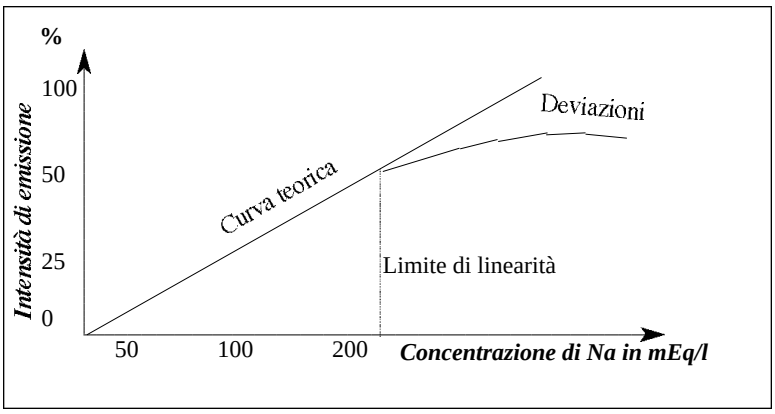


Figura 19. Rappresentazione schematica della curva di taratura per il sodio.

è quello di porre un elemento di comparazione e di addizione della emissione. E' questo lo standard interno di litio.

Nel fotometro a fiamma con standard interno di litio avremo la diluizione del campione con una soluzione standard di litio. Avremo allora non più due fototubi (uno per il potassio ed uno per il sodio) ma un altro fototubo aggiuntivo per il litio. Ogni volta che vi è una variazione della fiamma sia come flusso che come intensità, vi sarà una corrispondente variazione di intensità di emissione per i tre elementi sodio, potassio e litio. Poiché la concentrazione della soluzione di litio è nota, a livello di misurazione rimarrà costante il rapporto tra le rispettive intensità di emissione. I fotometri a fiamma vengono usati per determinare la concentrazione del sodio e del potassio, oppure, escludendo lo standard interno litio, per determinare il litio.

Il sodio sotto forma ionica (Na+) è un metallo alcalino che ha la caratteristica di perdere facilmente l'elettrone esterno. Il sodio sotto forma ionica è capace di fissare 10 molecole di acqua mentre il potassio ne fissa solo 4; questo è importante in quanto sembra che la idratazione degli ioni riveste particolare importanza biologica; in conseguenza di ciò lo ione più idratato passa attraverso le membrane meno facilmente de quello meno idratato. Il sodio è il principale catione extracellulare. La parete delle cellule è scarsamente permeabile al sodio per cui esso rappresenta il principale fattore della pressione osmotica dei liquidi

extracellulari; la concentrazione sierica del sodio è largamente indicativa della osmolalità plasmatica.

Appare chiara quindi l'importanza che riveste il sodio. Il sodio viene ingerito sotto forma di sale (NaCl) ed eliminato con l'acqua, per il 25% dal rene perché il 75% viene riassorbito a livello del tubulo prossimale. Il riassorbimento avviene anche in minima parte a livello dell'ansa di Henle e a livello del tubulo distale dove si ha scambio di sodio riutilizzato e K+ e H+. Questo riassorbimento del sodio a livello distale è mediato dall'aldosterone. La concentrazione del sodio si misura in Mg/dl o in mEq/l.

$$1\text{mg/dl} = \frac{\text{mEq.l x peso atomico}}{10}$$

I valori di riferimento alla normalità del sodio variano da 130 a 145 mE/l. Il POTASSIO costituisce nella forma ionizzata (K+) il più importante catione intracellulare e pertanto riveste un importante ruolo nell'equilibrio idro-elettrico. Inoltre il potassio è un necessario cofattore in molte reazioni enzimatiche. Il 98% del potassio presente nell'organismo è intracellulare mentre soltanto il 2% è extracellulare. Il potassio viene introdotto nell'organismo con la dieta; frutta e verdure ne sono i principali fornitori; l'eliminazione del potassio avviene per il 90% per via renale; la restante parte viene eliminata con le feci ed in minima parte con il sudore.

Il potassio a livello renale viene riassorbito totalmente a livello del tubulo prossimale e secreto in piccola parte dal tubulo distale contro scambio con Na^+ (riassorbimento del sodio) e in competizione con H^+ (eliminazione di ioni idrogeno da parte delle cellule del tubulo renale distale).

In ogni caso la prevalente funzione del potassio è in "accoppiata" con la funzione del sodio nella pompa sodio-potassio che tanta importanza riveste nell'equilibrio idro-elettrolitico.

Cromatografia

Quando in una miscela omogenea si separano i componenti della miscela senza che varino nel loro stato fisico, diciamo che si è avuta una separazione. Se per esempio abbiamo una soluzione di NaCl in acqua e separiamo l'NaCl che nella soluzione è allo stato solido abbiamo operato un processo di separazione. Per ottenere la separazione delle sostanze, conservando il loro stato fisico iniziale, si adoperano varie tecniche che vanno sotto il nome di cromatografia. Le tecniche cromatografiche si effettuano sfruttando due principi fondamentali: *ripartizione* ed *adsorbimento*.

1) RIPARTIZIONE o ESTRAZIONE

La ripartizione si ha quando una sostanza viene separata sfruttando due solventi tra loro immiscibili. Questa tecnica va sotto il nome di estrazione. Ad esempio da una soluzione di iodio vogliamo estrarre lo iodio. Prendiamo due solventi specifici per lo iodio e tra loro non mescolabili, cioè l'acqua e il tetracloruro di carbonio. Sottoponiamo a questi due solventi lo iodio. Una parte si scioglierà nell'acqua ed avremo una concentrazione dello iodio C1 ed un'altra si scioglierà nel tetracloruro di carbonio ed avremo una concentrazione dello iodio C2. Esiste una relazione tra il grado di solubilità dello iodio rispetto ai due solventi che espressa in termini matematici dà l'equazione di Nernst:

$$\frac{C1}{C2} = K \text{ (costante di Nernst)}$$

La costante di Nernst viene chiamata costante di ripartizione e permette di valutare il grado di solubilità di una sostanza rispetto a un solvente. Rispetto all'acqua ed al tetracloruro di carbonio lo iodio ha costante di ripartizione 85; ciò significa che la concentrazione dello iodio nel tetracloruro di carbonio è 85 volte maggiore della concentrazione dello iodio nell'acqua. Conoscendo la costante di ripartizione è possibile, pertanto, separare due sostanze mediante una coppia di solventi. Se vogliamo separare due sostanze A e B mediante due solventi Sa e Sb dei quali Sa ha costante di ripartizione elevata per la sostanza A e Sb costante di Nernst elevata per la sostanza B, l'operazione è possibile perché

facendo passare le due soluzioni in un imbuto dove vi è la miscela A e B e raccogliendo in due contenitori separati il solvente Sa ed il solvente Sb, otterremo alla fine gran parte di A sciolta in Sa e gran parte di B sciolta in Sb. Naturalmente in Sa avremo una percentuale di B ed in Sb avremo una percentuale di A. Per successive estrazioni elimineremo A o B ed avremo estratto ciò che ci serve. Esempio:

A e B = Sostanze S1 e S2 = Solventi
Costante di ripartizione di A = Ka Ca = concentrazione A
Costante di ripartizione di B = Kb Cb = concentrazione B

$$Ka = \frac{Ca \text{ in } S1}{Ca \text{ in } S2} = \frac{80}{20} = 4$$

$$Kb = \frac{Cb \text{ in } S1}{Cb \text{ in } S2} = \frac{30}{70} = 0{,}42$$

Cioè con una prima estrazione di solventi S1 e S2, A si è ripartito in S1 per 80 parti ed in S2 per 20 parti, mentre B si è ripartito in S1 per 30 parti ed in S2 per 70 parti. Se vogliamo estrarre A consideriamo come solvente migliore S1 tenendo presente che avremo 30 parti di B in S1 da allontanare. Si prende un altro solvente e si continua fino a che B non sia stato completamente allontanato. Abbiamo in tal modo estratto A perdendone naturalmente per le successive estrazioni, una certa quota.

2) ADSORBIMENTO

L'adsorbimento è quella tecnica che permette di far trattenere sulla superficie di un solido molecole di un soluto o di un gas. Questo è possibile perché sia le molecole che contengono il soluto o il gas sia quelle che compongono il supporto solido hanno affinità elettrostatica tra molecole del supporto e molecole del soluto. per cui si instaurano legami elettrostatici.

Perché si abbiano fenomeni elettrostatici è opportuno che il solido (cioè l'adsorbanza) abbia 1) una superficie di contatto estesa; 2) sia con angoli, porosità e rotture in quanto in queste zone vi è un maggiore addensamento di cariche negative e positive. Naturalmente la sostanza da adsorbire deve essere

costituita da molecole polari o polarizzabili. Se si mantiene costante la temperatura di lavoro (come nel processo di ripartizione), la entità dell'adsorbimento dipende dalla concentrazione dell'adsorbente:

$$K = \frac{\text{C adsorbito}}{\text{C soluto}} \qquad K = \text{Costante di adsorbimento}$$

Questa relazione è valida per soluzioni sufficientemente diluite. Le tecniche cromatografiche si realizzano mediante delle colonne dette colonnine cromatografiche. La prima esperienza venne fatta da Tswett che disciolse delle foglie verdi in etere di petrolio e le versò in una colonna dove vi era polvere di carbonato di calcio. Versando sopra la soluzione etere di petrolio si osservava lungo la colonna una macchia colorata che assumeva man mano sfumature di colore diverso. Nella colonnina cromatografica le sostanze da separare hanno sia diversa solubilità nel solvente sia diversa adsorbibilità. Figura 20.

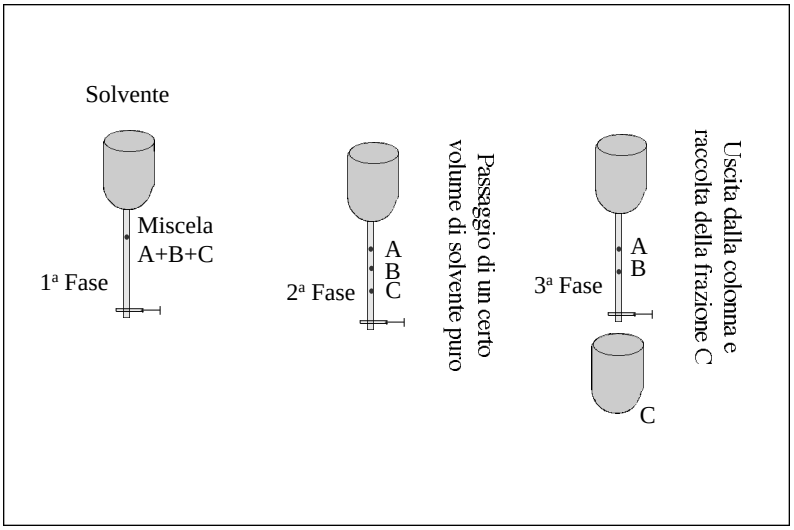


Figura 20. Rappresentazione schematica della separazione cromatografica.

Con la tecnica espressa in figura è possibile separare varie sostanze. Molti sono i parametri di laboratorio che possono essere valutati e quantizzati con le metodiche cromatografie. E' possibile ad esempio sfruttando opportuni solventi separare l'emoglobina A2 dalla A1 ecc..

Elettroforesi

Particelle cariche elettricamente si muovono in una soluzione con diversa velocità quando viene applicato un opportuno campo elettrico. Questa definizione è l'elettroforesi, tecnica che permette di valutare sia qualitativamente sia quantitativamente numerose sostanze che posseggono cariche elettriche, come ad esempio le PROTEINE. Il primo ricercatore che applicò per la prima volta un campo elettrico ad una soluzione dove vi erano particelle cariche elettricamente, fu TISELIUS. Questi mise una soluzione in un tubo ad U alla cui estremità veniva applicata una opportuna differenza di potenziale. Nella soluzione vi erano delle proteine che al momento della applicazione della differenza di potenziale si "STRATIFICAVANO" lungo il tubo a seconda dell'attrazione che subivano le loro cariche da parte degli elettrodi. Questo tipo di esperienza fu definito ELETTROFORESI IN FASE LIBERA. Per molti anni l'elettroforesi in fase libera fu utilizzata come riferimento per classificare la mobilità elettroforetica delle proteine. Questa tecnica di separazione si rivelò purtroppo molto approssimata visto che era impossibile sia misurare le varie frazioni (si misurava l'indice di rifrazione della soluzione in corrispondenza delle zone di localizzazione delle varie frazioni) sia evitare fenomeni di diffusione delle proteine per cui non si riusciva ad avere una netta separazione tra le varie frazioni penalizzando in tal modo la loro misurazione .

Si ricercò pertanto un metodo che permettesse una buona e semplice misurazione delle frazioni e contemporaneamente una buona separazione tra di esse. Si mise a punto un sistema di elettroforesi che sfruttava, per la migrazione delle particelle, un supporto solido poroso imbevuto di una soluzione elettrolitica

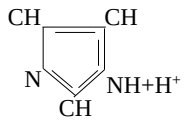
(tampone) tale da avere il passaggio di corrente. In tal modo si ottengono separazioni delle frazioni a zona e l'elettroforesi così realizzata è detta "ELETTROFORESI ZONALE". Poiché l'elettroforesi zonale si applica alle proteine, incominciamo a vedere da cosa dipende la carica elettrica delle proteine. Le proteine hanno natura anfotera, possono cioè agire da acidi o da basi. Questo è possibile perché la molecola proteica, costituita da catene di aminoacidi, è dotata di gruppi polari che assumono una diversa carica elettrica in rapporto al pH della soluzione. Quando la molecola proteica viene posta in soluzione in mezzo di pH uguale al suo punto isoelettrico, i gruppi polari di carica positiva e negativa si equivalgono e la molecola non viene influenzata da attrazioni quando è in campo elettrico. Se la proteina viene posta in soluzione in un mezzo più acido, gli idrogenioni del solvente inducono una carica positiva sugli aminogruppi e la proteina acquisisce la proprietà di migrare verso il catodo (polo negativo).

$$NH_2 + H^+ = NH_3^+$$

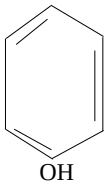
Se invece la proteina viene posta in soluzione in mezzo più alcalino del suo punto isoelettrico, gli idrossili del solvente inducono una carica negativa sui gruppi carbossilici e la proteina acquisisce la proprietà di migrare verso l'anodo (polo positivo):

$$COOH + OH^- = H_2O + COO^-$$

Le cariche positive delle proteine sono dovute ai gruppi aminici di lisina, arginina e imidazolo.



Le caratteristiche negative sono dovute ai gruppi carbossilici (-COO) degli aminoacidi bicarbossilici acido aspartico e acido glutammico e alla tirosina e cisteina.



In ogni caso le proteine negli aminoacidi terminali presentano sempre e comunque gruppi aminici e carbossilici liberi. Il numero dei gruppi basici o acidi effettivamente dissociati è fortemente influenzato dal pH del mezzo. Quando il pH del mezzo è alcalino, come nelle rutinarie metodiche di elettroforesi zonale, si favorisce la dissociazione dei gruppi acidi facendo retrocedere quella dei gruppi basici. La somma algebrica fra le cariche negative e positive presenti nella molecola costituisce la carica "netta" della proteina. Nella routine elettroforetica, la migrazione delle proteine viene eseguita in tampone alcalino di pH superiore al punto isoelettrico delle proteine presenti nel siero, urine o liquor per cui i numerosi tipi di molecole proteiche migrano verso l'anodo (polo positivo) dando luogo a gruppi separati di sostanze che costituiscono le cosiddette frazioni elettroforetiche (Figura 21).

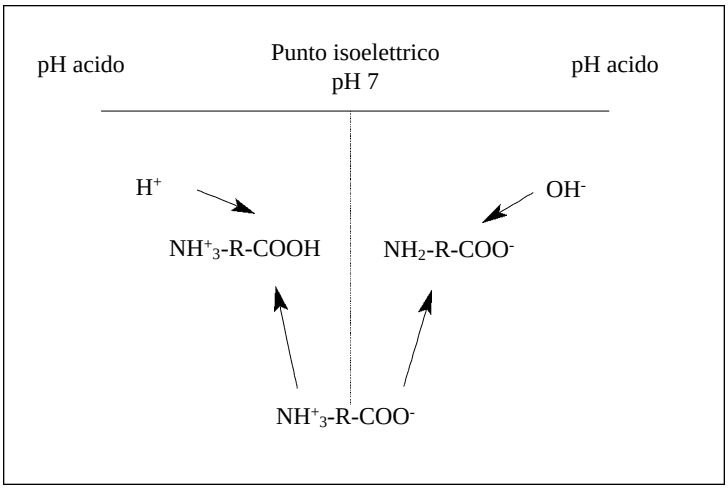


Figura 21. Effetto sulle proteine delle caratteristiche del tampone (acido o alcalino).

La migrazione elettroforetica ha quindi le sue basi nelle cariche elettriche delle proteine, del tampone e del supporto. Naturalmente esistono interazioni tra questi elementi nel corso dell'elettroforesi. Inoltre vi è una dipendenza rispetto al campo elettrico applicato, cioè alla differenza di potenziale.

Vediamo di fare una breve analisi di queste dipendenze. Le molecole proteiche in un campo elettrico applicato ad una soluzione, nella quale pesca un supporto rigido, che può essere acetato di cellulosa, gel di agarosio ecc. migrano verso il polo opposto, effettuando sul supporto un percorso che dipende dalla lunghezza del supporto e dalla differenza di potenziale applicata. Se ad esempio il supporto è lungo 10 cm e la differenza di potenziale è 130 volts, per ogni centimentro avremo:

$$\frac{130}{10\ \text{cm}}\ \text{Volts} = 13\ \text{volts x cm}$$

Una elettroforesi che si sviluppa a meno di 20 volts/cm viene definita a basso potenziale, quella che si sviluppa a più di 20 volts/cm viene definita ad alto potenziale. La separazione elettroforetica è tanto maggiore quanto più alto è il voltaggio. La separazione elettroforetica è tanto maggiore quanto più corto è il supporto. Pertanto l'intensità di separazione elettroforetica è direttamente proporzionale al voltaggio ed inversamente proporzionale alla lunghezza del supporto. Inoltre la separazione durerà di più allungando il tempo di applicazione del campo elettrico. Allora volendo scrivere queste relazioni in termini matematici si ha:

$$d = \frac{Vt\mu}{l}$$

Dove:

d = Ampiezza di migrazione di una particolare proteina, ovvero separazione della particolare proteina;

V = Voltaggio ovvero campo elettrico;

t = Tempo di migrazione;

μ = Distanza percorsa dalla proteina in un dato tempo;

l = Lunghezza del supporto;

d e l sono espresse in cm, v in volts e t in secondi.

Per cui:

$$d = \frac{Vt\mu}{l} \quad \text{cioè} \quad ld = vtu \text{ ovvero}$$

$$\mu = \frac{ld}{Vt} \quad \text{e volendo esprimere in grandezze:}$$

$$\mu = \frac{cm \times cm}{volts/sec} = \frac{cm^2}{volts/sec}$$

cioè la mobilità è espressa in cm^2 per volts al secondo. In pratica per ottenere una netta definizione delle bande proteiche è opportuno realizzare una separazione elettroforetica piuttosto veloce . Più lungo è il tempo di elettroforesi, maggiore è la diffusione radiale delle proteine e di conseguenza minore la definizione delle bande proteiche. Per questo è opportuno abbreviare il tempo di elettroforesi il più possibile. Vediamo come è possibile abbreviare il tempo di migrazione. Se vogliamo che la distanza di migrazione proteica sia per esempio di 4 cm, volendo abbreviare il tempo t mentre u rimane costante per ogni gruppo proteico, allora dobbiamo o diminuire la lunghezza o aumentare il voltaggio:

$$t = \frac{4l}{V\mu}$$

Se aumentiamo la lunghezza del gel di agar si dovrà aumentare il voltaggio per centimentro. Nello stesso modo se la lunghezza del supporto rimane costante ma il voltaggio aumenta, aumentando i volts x cm.. Così, sia che si cambi la lunghezza l o che si cambi il voltaggio V, ne consegue una modificazione del rapporto volts x cm; cioè per diminuire il tempo richiesto e nello stesso tempo aumentare la chiarezza di definizione delle bande proteiche, è necessario aumentare il volts x cm. Tuttavia aumentando il voltaggio aumenta anche la corrente e ciò produce più calore, che rappresenta un fattore limitante. Tale effetto può essere parzialmente controllato abbassando la concentrazione ionica del tampone o abbassando la superficie del supporto. Oltre che dal voltaggio e dal tempo nonché dalla lunghezza del supporto, la mobilità elettroferetica è influenzata da diversi fattori. Ne prenderemo in considerazione alcuni determinanti.

Il tampone

Se il tampone a nostra disposizione ha un pH alcalino, come già detto, le molecole proteiche dovrebbero prendere carica negativa e dovrebbero migrare verso l'anodo separandosi in base alla carica elettrica. Il tampone quindi è estremamente importante per la mobilità elettroforetica in quanto fa da fornitore di corrente elettrica rendendone possibile il passaggio. Un'altra funzione del tampone è quella di mantenere costante il pH. Infatti se variasse anche leggermente il pH avremo una sicura interferenza sulla carica elettrica delle proteine con una alterazione della stessa elettroforesi. Importante nel tampone in soluzione è la concentrazione di esso; infatti il tampone deve avere una concentrazione sufficiente a mantenere un pH adeguato e costante e nello stesso tempo impedire la liberazione eccessiva di calore che altererebbe molte proteine. Oltre al ph ed alla molarità (concentrazione) del tampone, occorre tenere presente la sua FORZA IONICA cioè la capacità del tampone di rendere ionizzabili tanti più ioni presenti in esso. Nella situazione ideale con una ionizzazione completa, la forza ionica e la conducibilità si equivalgono. Questo naturalmente non è possibile. Per capire l'importanza della forza ionica di un tampone occorre pensare che una particella elettricamente carica interagisce elettricamente con vari ioni presenti in soluzione per cui vi sarà un rallentamento nel movimento delle particelle al polo opposto. Per cui per tamponi ad elevata forza ionica avremo la neccessità di lunghi tempi di migrazione ed elevata differenza di potenziale. Ecco perché si usano tamponi a bassa forza ionica.

Il supporto rigido e i suoi pori

Uno dei supporti per elettroforesi abbondantemente usato in laboratorio è l'acetato di cellulosa. Questo supporto poroso viene immerso nel tampone affinché vengano riempiti i canalicoli dei pori e quindi avvenga la migrazione. I pori hanno una determinata grandezza (circa 60 Amgstroms). Solo l'albumina passa attraverso i pori in quanto ha un diametro di circa 30 Amstroms per cui si può dire che l'albumina ha una mobilità

elettroforetica quasi identica a quella della elettroforesi in fase libera. Non è così per le altre molecole proteiche del siero anche se esse riescono a passare. Occorre d'altra parte considerare che la superficie dei pori, per la sua struttura molecolare, può assumere cariche elettriche a causa, per esempio, di gruppi sulfonici e carbossilici e questo succede indipendentemente dall'applicazione di differenza di potenziale. Normalmente sul supporto si sviluppano cariche negative che attraggono ioni di carica opposta dalla soluzione. Per cui si avrà nella soluzione un eccesso di anioni che migrerà verso l'anodo. Si ha un vero e proprio movimento detto endoosmotico tendente a mantenere inalterata la concentrazione del tampone. Per questo motivo è importante all'atto della deposizione evitare di immergere la striscia nel tampone.

Da quanto detto i pori di una striscia servono a rallentare o addirittura frenare la corsa elettroforetica delle molecole proteiche. Un pericolo che si può correre in una elettroforesi delle sieroproteine è quello di usare un supporto dove potrebbe verificarsi un adsorbimento (tipo quello della cromatografia). Per quanto riguarda l'acetato di cellulosa l'adsorbimento è realmente minimo e quindi si presta molto bene all'elettroforesi delle siero lipoproteine e emoglobine. Lo svantaggio dell'adsorbimento può essere sfruttato quando occorre un'alta risoluzione proteica come per esempio per separare amminoacidi e peptidi. In tal caso il supporto usato è gel di silice o allumina e si effettua la cosiddetta elettroforesi su strato sottile cioè si realizza prima una separazione elettroforetica e poi una cromatografia in direzione perpendicolare alla prima separazione. Come ben si capisce la scelta del supporto è determinata da numerose variabili che devono essere considerate, quali prima tra tutte la risoluzione eletroforetica (il gel d'amido sul quale possono essere deposte quantità abbondanti di materiale ed il gel di poliacrilammide con una struttura porosa variabile, pori grandi e piccoli, sono quelli a maggiore risoluzione elettroforetica); la possibilità di manomettere il supporto tranquillamente anche nelle successive fasi della elettroforesi tipo la colorazione ecc.

Potenziale elettroforetico

La forza elettrica che determina la migrazione delle particelle deriva, di regola, da corrente continua, sebbene possa essere anche usata corrente discontinua rischiando però di modificare il voltaggio.

Il campione

Al fine di aumentare la separazione elettroforetica, per metodiche sofisticate si può manipolare il campione rendendolo più differenziabile all'elettroforesi.

Occorre tener presente però che ad avere dei derivati del campione si rischia di ridurre la sua mobilità elettroforetica o perché si avevano derivati con cariche elettriche minori o per inattivazione delle stesse proteine. Si possono comunque operare delle manipolazioni di campione senza incorrere nei problemi espressi usando ad esempio anticorpi marcati con fluoresceina, ferritina ed enzimi.

Diffusione delle proteine

Durante l'elettroforesi si assiste spesso a fenomeni di diffusione anche se, usando supporti solidi, non vi è una forte interferenza sulla mobilità elettroforetica. L'unica interferenza osservata macroscopicamente è sulla larghezza delle bande per cui possiamo avere sovrapposizione di bande. La diffusione delle proteine durante l'elettroforesi può essere evitata ponendo particolare attenzione nella concentrazione del tampone e nella temperatura raggiunta. La diffusione delle proteine può essere sfruttata in laboratorio a fini diagnostici.

La diffusione delle proteine avviene in tutte le direzioni. Si disponga per esempio uno strato di gel-agar all'11% sul fondo di una piastra di Petri e si buchi l'agar tanto da aver un pozzetto vicino al margine della piastra. Se si mette nel pozzetto un antigene, per esempio l'albumina umana, la proteina diffonde in cerchi concentrici come le onde che si formano quando si getta un

sasso nell'acqua. Se invece di un pozzetto circolare si incide l'agar con un solco la diffusione non sarà più circolare ma ellitica (Figura 22).

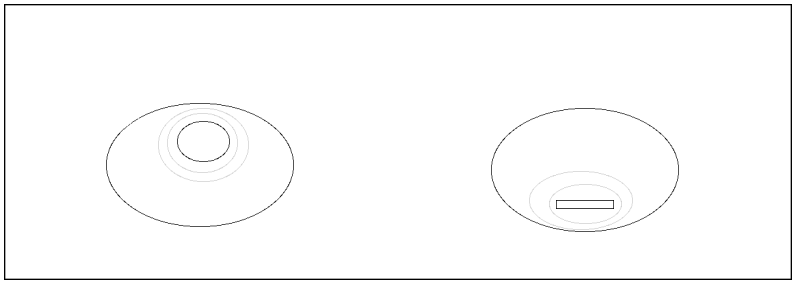


Figura 22. Diffusione di un antigene nel gel-agar: a) nel pozzetto circolare; b) dopo incisione.

Dunque, come rappresentato in figura, la modalità di diffusione dipende dalla forma geometrica o del pozzetto o del solco. Le proteine hanno differenti modi di diffusione per cui i caratteri di diffusione sono differenti. Facendo sia un pozzetto che un solco i due "patterns" di diffusione potranno eventualmente incontrarsi. Cosicché se si pone un antigene nel pozzetto ed un anticorpo nel solco, quando i due "patterns" si incontrano si forma un precipitato dovuto all'interazione tra antigene e anticorpo (Figura 23).

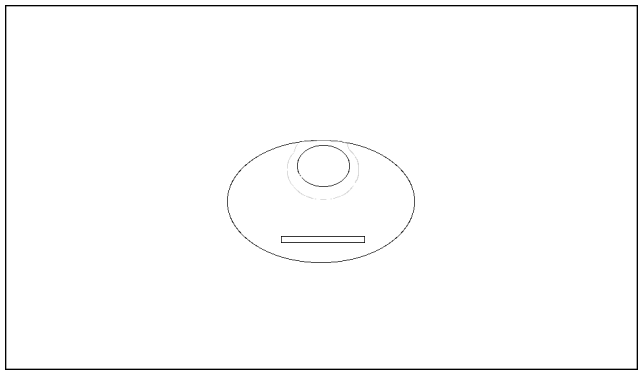


Figura 23. Interazione tra antigene ed anticorpo posti in uno strato di gel-agar. La curva indica la banda di precipitazione.

Si ha in sostanza una zona di precipitazione che in figura è tratteggiata. La posizione della zona di precipitazione che si forma dove i due "patterns" di diffusione si incontrano, dipende dalle dimensioni delle molecole e dalla concentrazione dei reattivi.

Se un anticorpo è relativamente grande, potrà diffondere più lentamente perché i pori dell'agar in un certo modo lo ostacolano. In questo caso la zona di precipitazione si ferma più vicino all'anticorpo.

Immunodiffusione ed elettroforesi (immunoelettroforesi)

La formazione di una zona di precipitazione o di una zona di immunoprecipitazione dipende dall'interazione tra l'antigene ed il suo anticorpo. Se l'antigene contiene Gamma-globuline e l'anticorpo antigammaglobuline, la reazione formerà una banda di immunoprecipitazione:d'altra parte se l'antigene contiene gammaglobuline e l'anticorpo solo antibetaglobuline, la banda di precipitazione non si verificherà. Combinando la tecnica della diffusione su agar e quella dell'elettroforesi, si realizza una tecnica della Immunoelettroforesi.

In pratica con questa tecnica si realizza una immunodiffusione in cui gli antigeni precedentemente separati attraverso un processo di elettroforesi, vengono riconosciuti.

Cioè l'antigene da riconoscere viene sottoposto ad elettroforesi per cui si ha una separazione proteica. Successivamente nel pozzetto si pone un antisiero specifico e si lascia diffondere in camera umida e a temperatura ambiente per un certo numero di ore. Per ogni antigene si avrà, con il corrispondente anticorpo, un arco di precipitazione caratteristico per vari aspetti.

Successivamente per ben visualizzare i solchi si può colorarli con coloranti specifici tipo blue di Komassie e Sudan nero.

Elettrosineresi (Cross-over elettroforesis)

L'elettrosineresi è una tecnica di determinazione immunologica eseguita facendo migrare in un campo elettrico antigene e anticorpo formando un archetto di precipitazione. Si esegue su piastre di agarosio o agar su cui sono praticati a coppie i pozzetti disemina per l'antigene e l'anticorpo.

Gli apparecchi sono analoghi a quelli usati per la elettroimmunodiffusione.

Bibliografia

Alfonso E.: Quantitation Immunoelectrophoresis of serum proteins. Clin. Chem. Acta 10, 114-122, 1964.

Andreani D., Menzinger G.: Trattato di diagnostica funzionale endocrinologica. Piccin, Padova, 1984.

Bohn H., Becker W.: Proteine Associate alla gravidanza e loro significato diagnostico. La ricerca, Vol. VI, Suppl. 2, 1976.

Bonardi R., Deambrogio V., Oliaro A.: Interpretazione dei dati di laboratorio. Minerva Medica, Torino, 1987.

Bozzetti E., Migliorati T.: Semiotica e Diagnostica di Laboratorio. Piccin Editore, Padova, 1980.

Caenaro G.F., Chirillo R., Carmiato A.: Determinazione quantitativa immunoelettroforetica dell'HP.

Caldini M., Valenza T.: Pasquinelli: Diagnostica e teorica di laboratorio. Vol. 1, 142-147, 155, 166, 167, 206, 233, 246. Rosini Editrice Firenze, 1985.

Determann H., Lepuoch F.: Il microscopio e le sue applicazioni. Leitz, 1962.

Gaál Ö., Medgues G.A., Vereczkey L.: Electrophoresis in TL separation of biologic macromolecules. Wiley Interscience Publication 1980.

Hammes H.P., Laube H., Federlin I.L.: Controllo a lungo termine della malattia diabetica: glicosilazione non-enzimatica delle proteine. Diagnosi e Laboratorio, Behring 1991.

Kouriloky O.: Il complemento. Ricerca in Clin. e Lab.; Vol. VII, 1977.

Laurell A.B.: I fattori del complemento nel laboratorio di analisi mediche. Ricerca, Vol. VIII, 1978.

Laurell C.B.: Quantitative Estimation of proteins by electrophoresis in agarose gel containing antibodies. Anal. Bischem. IS, HS, 1966.

Lewi Paul J.: Quality Control Program. ORTWO Dia.

Marchi S., Tarantino M., Spandrio L.: Metodi di dosaggio delle proteine. 1987.

Mazzarella C., Baldi A.: Schemi di laboratorio. Tecniche e diagnostica. Ed. Medica Salernitana. III Ediz.

Olli H. Herman: Diagnostica delle malattie virali. La ricerca, 69, 1981.

Polacco F., Casparoni G.: Tecniche per lo studio delle Clearance Sieroproteiche. La ricerca, Vol. III; N.1, 1973.

Righetti P.G.: Dalla Moving Boundary alla Capillary Elettrophoresis: 50 anni di cronistoria, 1987.

Schreiber W.E.: More on quantifyng protein fractions after electrophoresis. Clin. Chem., 32: 1432, 1986.

Sieber A.: Determinazione delle proteine plasmatiche con nefelometria a laser nella pratica di laboratorio. Ricerca in Cl. e Lab., Vol. VII, 1977.

Sieber A., Gross J.: Determinazione delle proteine per mezzo di Nefelometria a laser. Ricerca in cl. e Lab., Vol VII, Suppl. 2, 1977.

Spandrio L., Fenili D.: Proteine del Plasma in Manuale di Laboratorio di Spandrio L., Piccin Editor. Padova, 1985.

Thomas Woamacott H., Woamacott R.J.: Introduzione alla statistica. F. Angeli Edit. 1980.

Todd-Sanford a cura di Davidson I., Henry J.B.: Diagnosi clinica di Laboratorio. Piccin Editore, Padova. Traduzione italiana sulla XV. Edizione inglese.

Williams D.E., Num R.F., Mrks V.: Fondamenti dell'analisi biochimica-clinica. Editore Piccin, Padova, 198..

Williams R.H.: Trattato di endocrinologia. Vol. II, Piccin Edit., Padova, 1979.

Indice

Editoriale..... pag. 3
Fotometria - spettrofotometria..... » 5
Elettricità ..... » 5
La luce..... » 10
Fluorimetria..... » 25
Fotometria a fiamma..... » 32
Cromatografia ..... » 37
Elettroforesi..... » 40
Il tampone ..... » 45
Il supporto rigido e i suoi pori..... » 45
Potenziale elettroforetico..... » 47
Il campione..... » 47
Diffusione delle proteine ..... » 47
Immunodiffusione ed elettroforesi (immunoelettroforesi). » 49
Elettrosineresi (Cross-over elettroforesis)..... » 50
Bibliografia..... » 51
Indice..... » 54

MEDICAL SYSTEMS SPA
TECNOLOGIA con amore

1. **Rassu S.:** ***Principi generali di endocrinologia.*** **Gennaio '83**
2. **Rassu S.:** ***L'ipotalamo endocrino.*** **Giugno '83**
3. **Rassu S.:** ***L'ipofisi.*** **Dicembre '83**
4. **Alagna., Masala A.:** ***La prolattina.*** **Aprile '84**
5. **Rassu S.:** ***Il pancreas endocrino.*** **Giugno '84**
6. **Fiorini I., Nardini A.:** ***Citomegalovirus, Herpes virus, Rubella virus (in gravidanza).*** **Luglio '84.**
7. **Rassu S.:** ***L'obesita'.*** **Settembre '84**
8. **Franceschetti F., Ferraretti A.P, Bolelli G.F., Bulletti C.:*****Aspetti morfofunzionali dell'ovaio.*** **Novembre '84.**
9. **Kubasik N.P.:** ***Il dosaggio radioimmunologico (1).*** **Dicembre '84.**
10. **Kubasik N.P.:** ***Il dosaggio radioimmunologico (2) parte prima.*** **Gennaio'85.**
11. **Kubasik N.P.:** ***Il dosaggio radioimmunologico (2) parte seconda.*** **Febbraio '85.**
12. **Kubasik N.P.:** ***Il dosaggio radioimmunologico (3) parte prima.*** **Aprile '85.**
13. **Nacamulli D, Girelli M.E, Zanatta G.P, Busnardo B.:** ***Il TSH.*** **Giugno '85.**
14. **Facchinetti F. e Petraglia F.:** ***La β-endorfina plasmatica e liquorale.*** **Agosto '85.**
15. **Baccini C.:** ***Le droghe d'abuso (1).*** **Ottobre '85.**
16. **Kubasik N.P.:** ***Il dosaggio radioimmunologico (3) parte seconda.*** **Dicembre '85.**
17. **Nuti R.:** ***Fisiologia della vitamina D: Trattamento dell'osteoporosi post-menopausale.*** **Febbraio '86**
18. **Cavallaro E.:** ***Ipnosi: una introduzione psicofisiologica.*** **Marzo '86.**
19. **Fanetti G.:** ***AIDS: trasfusione di sangue emoderivati ed emocomponenti.*** **Maggio '86.**
20. **Fiorini I., Nardini A.:** ***Toxoplasmosi, immunologia e clinica.*** **Luglio '86.**
21. **Limone P.:** ***Il feocromocitoma.*** **Settembre '86.**
22. **Bulletti C., Filicori M., Bolelli G.F., Flamigni C.:** ***Il Testicolo. Aspetti morfo-funzionali e clinici.*** **Novembre '86.**
23. **Bolcato A.:** ***Allergia.*** **Gennaio '87.**
24. **Kubasik N.P.:** ***Il dosaggio enzimoimmunologico ed fluoroimmunologico.*** **Febbraio '87.**
25. **Carani C.:** ***Patologie sessuali endocrino-metaboliche.*** **Marzo '87.**
26. **Sanna M., Carcassi R., Rassu S.:** ***Le banche dati in medicina.*** **Maggio '87.**
27. **Bulletti C., Filicori M., Bolelli G.F., Jasonni V.M., Flamigni C.:** ***L'amenorrea.*** **Giugno '87.**
28. **Zilli A., Pagni E., Piazza M.:** ***Il paziente terminale.*** **Luglio '87.**
29. **Pisani E., Montanari E., Patelli E., Trinchieri A., Mandressi A.:** ***Patologie prostatiche.*** **Settembre '87.**

30. Cingolani M.: ***Manuale di ematologia e citologia ematologica.*** **Novembre ’87.**
31. Kubasik N.P.: ***Ibridomi ed anticorpi monoclonali.*** **Gennaio ’88.**
32. Andreoli C., Costa A., Di Maggio C.: ***Diagnostica del carcinoma mammario.*** **Febbraio ’88.**
33. Jannini E.A., Moretti C., Fabbri A., Gnessi L., Isidori A.:***Neuroendocrinologia dello stress.*** **Marzo ’88.**
34. Guastella G., Cefalù E., Carmina M.: ***La fecondazione in vitro.*** **Maggio '88.**
35. Runello F., Garofalo M.R., Sicurella C., Filetti S., Vigneri R.: ***Il gozzo nodulare.*** **Giugno ’88.**
36. Baccini C.: ***Le droghe d’abuso (2).*** **Luglio ’88.**
37. Piantino P., Pecchio F.: ***Markers tumorali in gastroenterologia.*** **Novembre ’88.**
38. Biddau P.F., Fiori G.M., Murgia G.: ***Le leucemie acute infantili.*** **Gennaio ’89.**
39. Sommariva D., Branchi A.: ***Le dislipidemie.*** **Febbraio '89.**
40. Butturini U., Butturini A.: ***Aspetti medici delle radiazioni.*** **Marzo '89.**
41. Cafiero F., Gipponi M., Paganuzzi M.: ***Diagnostica delle neoplasie colo-rettali.*** **Aprile '89.**
42. Palleschi G.: ***Biosensori in Medicina.*** **Maggio '89.**
43. Franciotta D.M., Melzi D'Eril G.V. e Martino G.V.: ***HTLV-I.*** **Giugno '89.**
44. Fanetti G.: ***Emostasi: fisiopatologia e diagnostica.*** **Luglio '89.**
45. Contu L., Arras M..: ***Le popolazioni e le sottopopolazioni linfocitarie.*** **Settembre '89.**
46. Santini G.F., De Paoli P., Basaglia G.: ***Immunologia dell'occhio.*** **Ottobre '89.**
47. Gargani G., Signorini L.F., Mandler F., Genchi C., Rigoli E., Faggi E. : ***Infezioni opportunistiche in corso di AIDS.*** **Gennaio '90.**
48. Banfi G., Casari E., Murone M., Bonini P. : ***La coriogonadotropina umana.*** **Febbraio '90.**
49. Pozzilli P., Buzzetti R., Procaccini E., Signore E.: ***L'immunologia del diabete mellito.*** **Marzo '90.**
50. Cappi F.: ***La trasfusione di sangue: terapia a rischio.*** **Aprile '90.**
51. Tortoli E., Simonetti M.T.: ***I micobatteri.*** **Maggio '90.**
52. Montecucco C.M., Caporali R., De Gennaro F.: ***Anticorpi antinucleo.*** **Giugno '90.**
53. Manni C., Magalini S.I. e Proietti R.: ***Le macchine in terapia intensiva.*** **Luglio '90.**
54. Goracci E., Goracci G.: ***Gli allergo-acari.*** **Agosto '90.**
55. Rizzetto M.: ***L'epatite non A non B (tipo C).*** **Settembre '90.**
56. Filice G., Orsolini P., Soldini L., Razzini E. e Gulminetti R.: ***Infezione da HIV-1:patogenesi ed allestimento di modelli animali.*** **Ottobre '90.**
57. La Vecchia C. ***Epidemiologia e prevenzione del cancro (I).*** **Gennaio '91.**
58. La Vecchia C. ***Epidemiologia e prevenzione del cancro (II).*** **Febbraio '91.**
59. Santini G.F., De Paoli P., Mucignat G., e Basaglia G., Gennari D.: ***Le molecole dell'adesività nelle cellule immunocompetenti.*** **Marzo '91.**
60. Bedarida G., Lizioli A.: ***La neopterina nella pratica clinica.*** **Aprile '91.**
61. Romano L.: ***Valutazione dei kit immunochimici.*** **Maggio '91.**
62. Dondero F. e Lenzi A.: ***L'infertilità immunologica.*** **Giugno '91.**
63. Bologna M. Biordi L. Martinotti S.: ***Gli Oncogèni.*** **Luglio '91.**
64. Filice G., Orsolini P., Soldini L., Gulminetti R., Razzini E., Zambelli A. e Scevola D.: ***Infezione-malattia da HIV in Africa.*** **Agosto '91.**

65. Signore A., Chianelli M., Fiore V., Pozzilli P., Andreani D. *L'immunoscintigrafia nella diagnosi delle endocrinopatie autoimmuni.* Settembre '91.
66. Gentilomi G.A.: *Sonde genetiche in microbiologia.* Ottobre '91.
67. Santini G.F. , Fornasiero S., Mucignat G., Besaglia G., Tarabini-Castellani G. L., Pascoli L.: *Le sonde di DNA e la virulenza batterica.* Gennaio '92.
68. Zilli A., Biondi T. *Il piede diabetico.* Febbraio '92.
69. Rizzetto M. *L'epatite Delta.* Marzo '92.
70. Bracco G., Dotti G., Pagliardini S., Fiorucci G.C.: *Gli screening neonatali.* Aprile '92.
71. Tavani A., La Vecchia C.: *Epidemiologia delle patologie cardio e cerebrovascolari.* Luglio '92.
72. Cordido F., Peñalva A., De la Cruz L. F., Casanueva F. F., Dieguez C.: *L'ormone della crescita.* Agosto '92.
73. Contu L., Arras M.: *Molecole di membrana e funzione immunologica (I)*. Settembre '92.
74. Ferrara S.: *Manuale di Laboratorio (I)*. Novembre '92.

Caleidoscopio
Rivista mensile di Medicina
anno 10, numero 74

Direttore Responsabile
Sergio Rassu
Via Pietro Nenni, 6
07100 Sassari
Tel.-Fax 079 270464

Responsabile Commerciale
Alessandra Pater

Consulenti di Redazione
Giancarlo Mazzocchi ed Angelo Maggio

Segretaria di Direzione
Giovanna Nieddu

Servizio Abbonamenti
Fina Grandeppieno
Giuseppe Gambetta

MEDICAL SYSTEMS SPA
TECNOLOGIA con amore

Via Rio Torbido, 40
16165 Genova (Italy)
Tel. (010) 83401 (7 linee r.a.) Numero Verde 1678 01005 (senza prefisso);
Telex 270310 Ideal I.
Telefax (010) 809737- 802257.
La Medical Systems pubblica anche le seguenti riviste: Caleidoscopio -Ed. SpagnolaCaleidoscopio letterario, Kaleidoscope - Engl. Ed.,- Pandora, Tribuna Biologica e Medica, The Medical Systems Voice, Journal of Preventive Medicine and Hygiene.

Stampa
ATA-Azienda Tipografi Associati
Via G. Torti, 32 C Rosso
16143 Genova - Tel. 010 503320

Registrazione Tribunale di Sassari n. 189 del 6/11/84
Iscrizione al Registro Nazionale della Stampa no 2661 del 2 Settembre 1989

Finito di stampare: Novembre 1992
Sped. in Abb. Post. gr. III/70%

Associata all'USPI
Unione Stampa Periodica Italiana

Caleidoscopio viene anche letto e rilanciato da:
"L'ECO DELLA STAMPA"
Via Compagnoni, 28 - Milano

Pubblicazione protetta a norma di legge dall'Ufficio proprietà letteraria, artistica e scientifica della Presidenza del Consiglio dei Ministri, dedicata all'aggiornamento professionale continuo e riservata ai medici.