

# METODI DI SEPARAZIONE IN CHIMICA-CLINICA

---

# METODI DI SEPARAZIONE

- Sono tecniche che sfruttano le differenti proprietà chimico-fisiche dei componenti di una miscela per separarli
- **rimuovere sostanze interferenti** dal campione
- **trasferire gli analiti in solventi alternativi**
- **aumentarne la concentrazione**
- Il processo di separazione da adottare dipende dal tipo di miscela ed è più semplice nel caso di miscele eterogenee
- **METODI DI DETERMINAZIONE DIRETTA**: analisi in cui non è necessario separare le sostanze.

# METODI DI SEPARAZIONE

Metodi di separazione utili in chimica-clinica:

- Evaporazione (distillazione)
  - Filtrazione e separazione di molecole ad alto PM da molecole a basso PM (dialisi, ultrafiltrazione, gel filtrazione)
  - Estrazione (in fase liquida o in fase solida)
  - Centrifugazione
  - Microdiffusione
- SEPARAZIONE DI DUE FASI
- Cromatografia
  - Elettroforesi

# Evaporazione

L'evaporazione è il passaggio di un corpo dallo stato liquido allo stato di vapore ed è tanto più rapido quanto maggiore è la temperatura.

- Concentrare una sostanza contenuta in una soluzione diluita
- Se i volumi di soluzione sono modesti si preferisce evaporare il solvente sotto cappa. Altrimenti, si usano apparecchi di distillazione collegati ad una sorgente di vuoto (evaporatori rotanti)



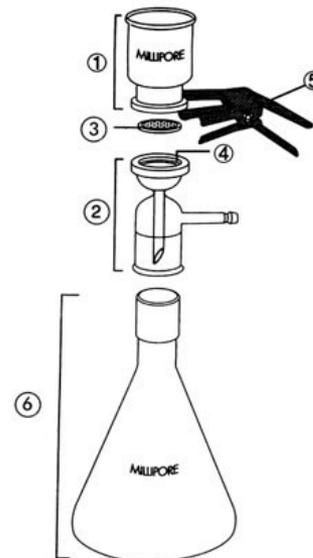
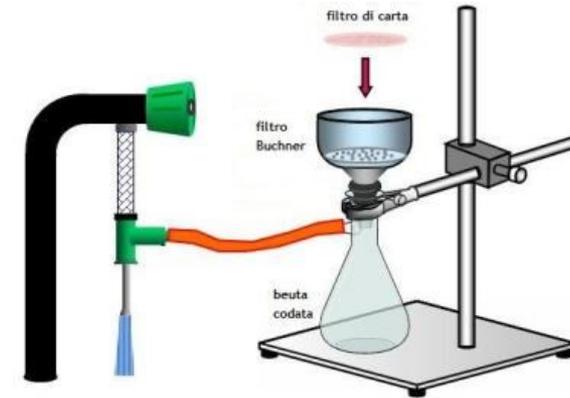
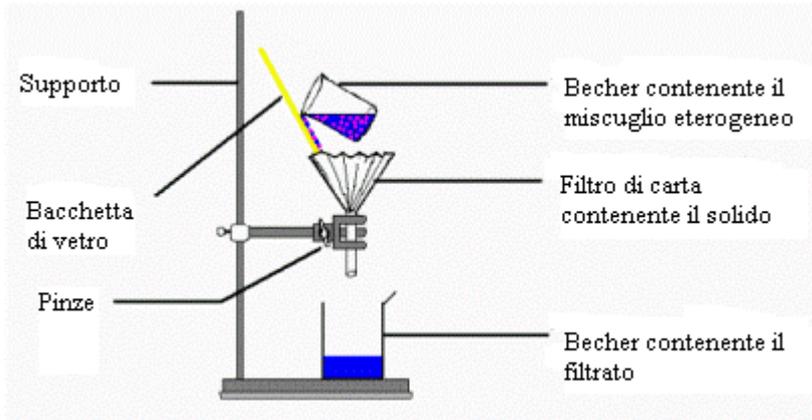
# Filtrazione

Processo utilizzato per separare un solido da un mezzo liquido disperdente.

Si possono recuperare la fase solida, quella liquida o entrambe.

Possono essere utilizzati diversi mezzi porosi e procedimenti:

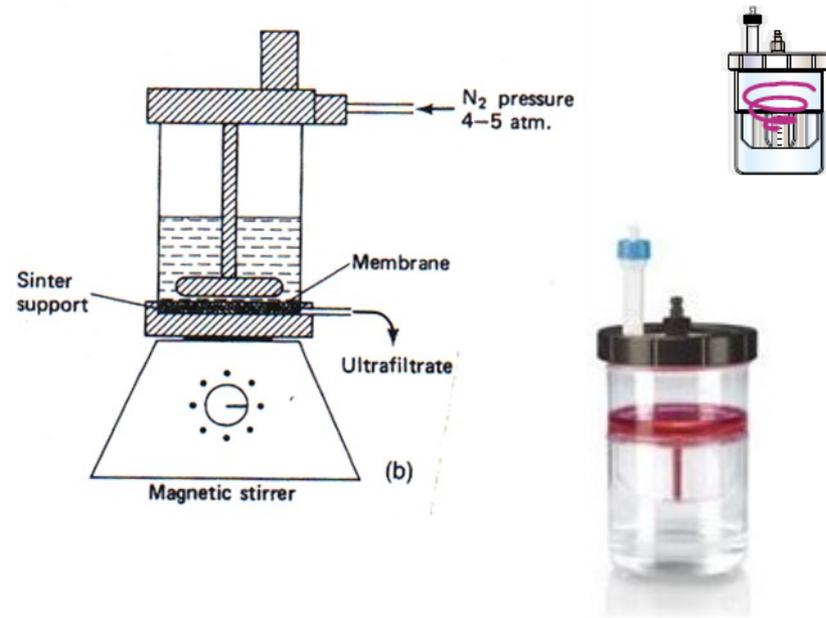
- Filtrazione su carta da filtro
- Filtrazione sotto vuoto con filtro Buchner (macrofiltrazione)
- Filtrazione selettiva mediante membrane filtranti
  - Microfiltrazione
  - Ultrafiltrazione (separazione in base al PM)



## Filtrazione selettiva mediante membrane filtranti

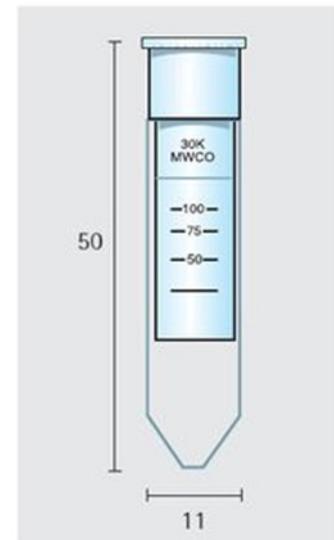
- La soluzione da filtrare viene forzata a passare la membrana
- È un processo di separazione molecolare selettivo: vengono trattenuti i soluti di dimensioni al di sopra di un certo limite (limite di esclusione) dettato dalla porosità della membrana
- Le membrane sono polimeri naturali o sintetici
- A seconda delle dimensioni dei pori della membrana possiamo avere un processo di microfiltrazione o ultrafiltrazione

Processo	Energia	Limite di esclusione	Retentato	Permeato
Microfiltrazione	Pressione	0.1-10 $\mu\text{m}$	Particelle sospese (cellule del sangue, batteri)	Soluti disciolti e acqua
Ultrafiltrazione	Pressione	0.001-0.1 $\mu\text{m}$ (500-100'000 Da)	Molecole grandi (albumina, pepsina, vitamina B12)	Piccole molecole e acqua



## Ultrafiltrazione mediata da gas inerte

## Ultrafiltrazione mediata dalla centrifugazione



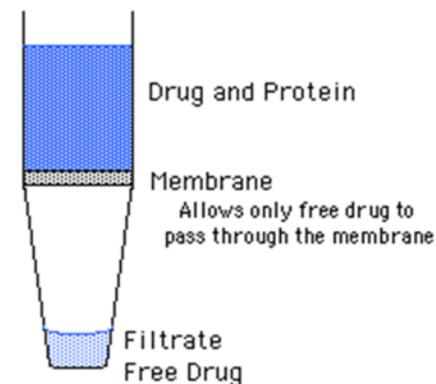
## Applicazioni dell'ultrafiltrazione

- Concentrazione o desalinizzazione di proteine (es. enzimi, anticorpi) o DNA
- Deproteinizzazione dei campioni
- Dosaggi della frazione libera di farmaci o ormoni
- Recupero delle biomolecole da supernatanti di colture cellulari o lisati cellulari

Membrane Selection Guide (Recommended MWCO)

Application	5,000	10,000	30,000	50,000	100,000	>500,000
Bacteria						
DNA fragments						
Enzymes						
Growth Factor						
Immunoglobulins						
Nucleic Acids						
MAB						
Oligonucleotides						
Peptides						
Virus						
Yeast						

For highest recovery, usually select a membrane MWCO which is at least half of the molecular weight of the solute to be retained



# Separazione di sostanze ad alto PM da sostanze a basso PM

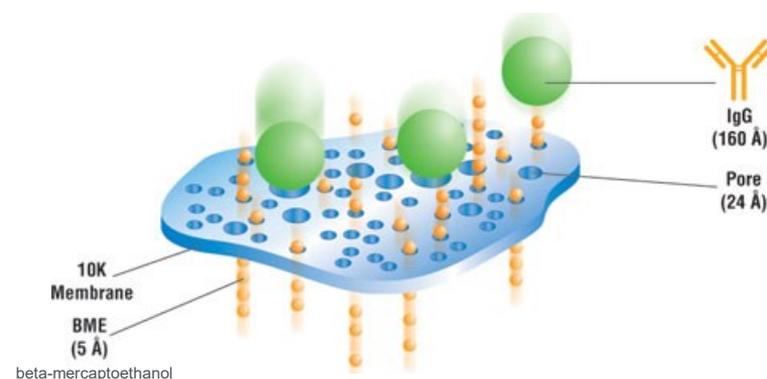
- Dialisi
- Ultrafiltrazione (già trattata)
- Gel filtrazione (tecnica cromatografica)

# Dialisi

Passaggio di molecole di piccole dimensioni attraverso una membrana che sia permeabile a queste sostanze ma non per le macromolecole (membrana semipermeabile)

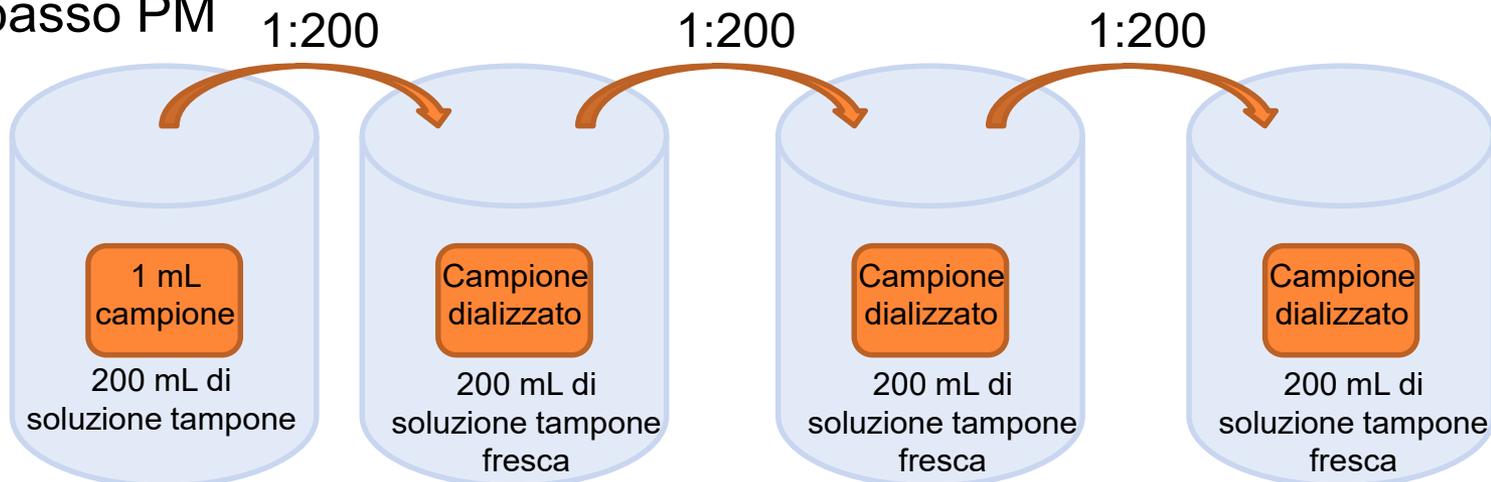
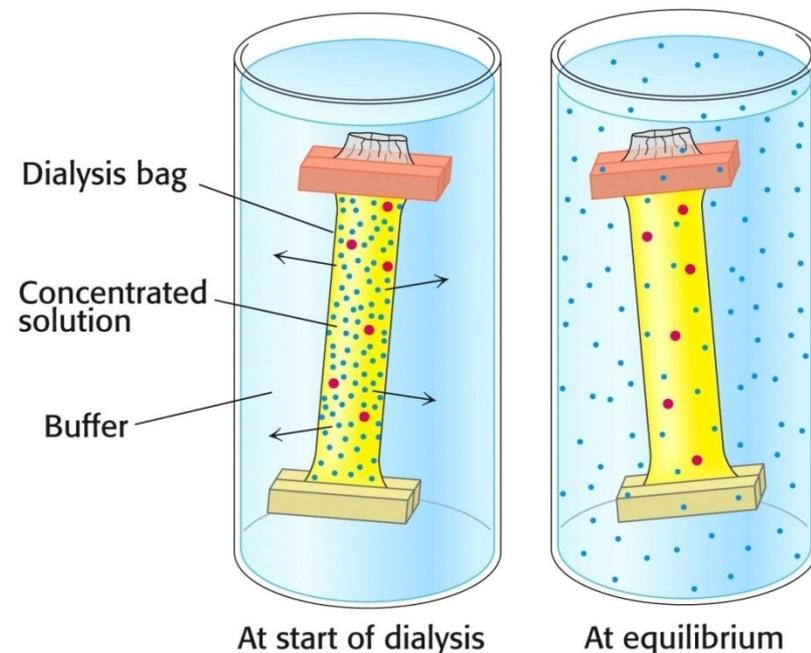
Le membrane da dialisi sono normalmente di cellofan o cellulosa modificata a porosità controllata.

La dialisi si basa sul processo di diffusione, dove il movimento delle molecole segue il gradiente di concentrazione.



T, C, PM, Sup, Sp

1. Si pone la soluzione da cui si vogliono rimuovere le sostanze a basso PM in un sacchettino di cellofan e questo viene chiuso e immerso in un bagno mantenuto in agitazione contenente il solvente (soluzione) della dialisi.
2. Le sostanze a basso PM diffondono attraverso la membrana, quelle ad alto PM rimangono nel sacchetto. Il processo può durare dalle 2 alle 18 ore.
3. Cambiando il solvente all'esterno si possono eliminare tutte le sostanze a basso PM



Dopo 3 cicli avremo che il contaminante è stato diluito di  $200 \times 200 \times 200$  volte cioè  $8 \times 10^6$  volte

## Applicazioni:

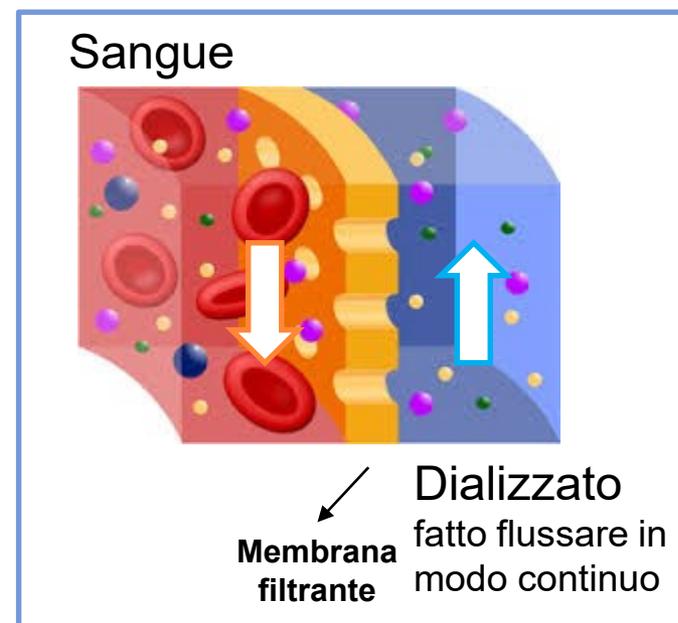
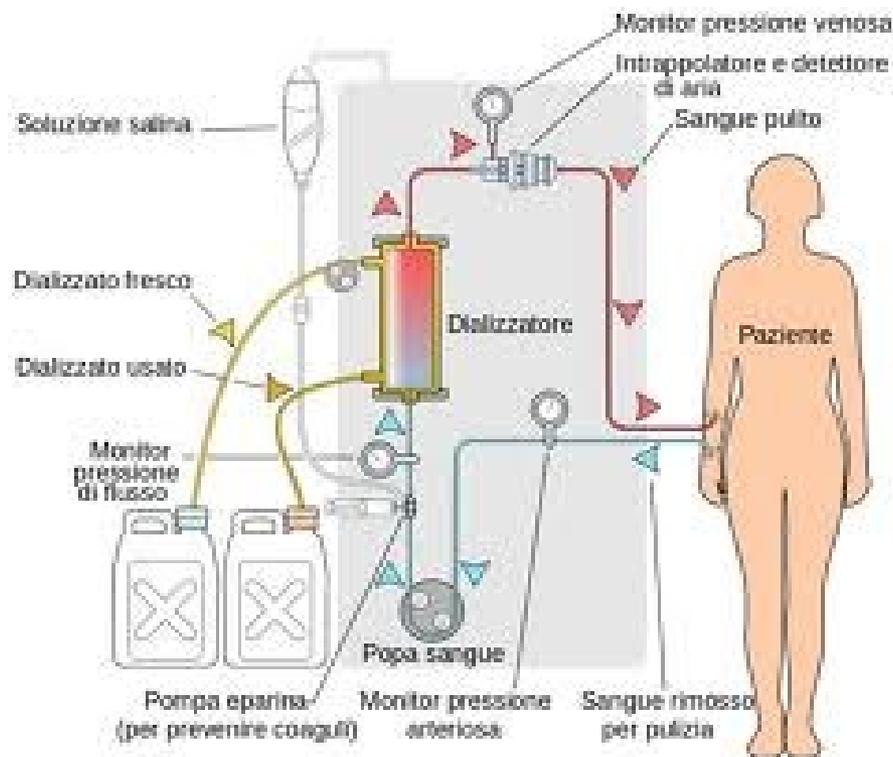
- Allontanare sali dalle soluzioni di proteine ppt tramite salatura
- Equilibrare soluzioni contenenti macromolecole con soluzioni a determinati valori di pH e forza ionica prima di separarle
- Concentrare sostanze ad alto PM: urina in una soluzione di PVP, polietilenglicole o saccarosio (**osmosi**).

# Emodialisi

L'emodialisi è il metodo usato con maggior frequenza per curare l'insufficienza renale grave e definitiva.

Permette di rimuovere le sostanze tossiche, che aumentano nel sangue quando i reni non funzionano.

Nella dialisi/ultrafiltrazione del sangue si utilizza una membrana semipermeabile posta su un rene artificiale.



# Estrazione

Tecnica di separazione che sfrutta la differente capacità dei soluti di distribuirsi tra due fasi reciprocamente insolubili.

Tali fasi insolubili possono essere due liquidi immiscibili, un solido ed un liquido, oppure un gas ed un solido.

Utile per:

- Rimuovere sostanze interferenti
- Trasferire gli analiti in un solvente appropriato all'analisi
- Concentrare gli analiti

TABELLA 20.1 Tipi generali di estrazioni

Tipo di estrazione	Descrizione
Estrazione accelerata con solvente	Impiego di elevate temperature e pressioni per aumentare velocità ed entità di un'estrazione
Adsorbimento gas-solido	Impiego di un materiale solido per adsorbire e separare gas diversi in una miscela di gas
Estrazione liquido-liquido	Estrazione di un campione liquido con una fase liquida
Estrazione assistita da microonde	Utilizzo della radiazione a microonde per aumentare velocità ed entità di un'estrazione
Estrazione in fase solida	Estrazione di un campione liquido o gassoso con un supporto solido dotato di una superficie adsorbente o di un rivestimento chimico in grado di interagire con gli analiti
Microestrazione in fase solida	Utilizzo di una fibra rivestita o non rivestita montata su una siringa per l'estrazione di analiti
Estrazione di Soxhlet	Impiego combinato di distillazione ed estrazione per ottenere analiti a partire da campioni solidi
Estrazione con fluidi supercritici	Utilizzo di un fluido supercritico come fase estraente

# Estrazione liquido-liquido (con solvente)

Le due fasi reciprocamente insolubili sono due liquidi immiscibili

Il processo di estrazione è regolato dalla **legge di ripartizione**:  
quando ad un sistema costituito da due fasi liquide immiscibili si aggiunge una sostanza solubile in entrambe, questa si distribuirà tra le due fasi in modo che il rapporto della sua concentrazione nei due strati sia costante.

A nella fase più polare  $\rightleftharpoons$  A nella fase meno polare

$$\frac{C_{A \text{ nella fase meno polare}}}{C_{A \text{ nella fase più polare}}} = K$$

**Coefficiente di ripartizione**

Tale rapporto è costante se:

- Temperatura costante
- Basse concentrazioni
- La sostanza disciolta deve possedere lo stesso grado di associazione nelle due fasi

- Coefficiente di ripartizione approssimativamente uguale al rapporto delle solubilità della sostanza nei due solventi (per sostanze poco solubili)
- Il processo di distribuzione/ripartizione consente di separare due sostanze con  $K$  differenti → estrazione
- È più efficace ripetere l'estrazione con piccole quantità di solvente piuttosto che effettuare un'unica estrazione con tutto il volume di solvente a disposizione.
- Cruciale la scelta dei solventi, solitamente:
  - Fase più polare formata da acqua (si può anche modificare il pH con per esempio HCl, NaOH,  $\text{NaHCO}_3$ )
  - Fase meno polare (fase organica): etere etilico, diclorometano, cloroformio, etil acetato
- Caratteristiche del solvente organico:
  - Basso punto di ebollizione per facilitarne la rimozione
  - Bassa tossicità
  - Elevata differenza di densità per minimizzare la formazione di emulsioni

## SOLVENT MISCIBILITY TABLE

Solvent	Polarity Index	Refractive Index @20°C	UV(nm) Cutoff @1AU	Boiling Point(°C)	Viscosity (cPoise)	Solubility in water (%w/w)
Acetic Acid	6.2	1.372	230	118	1.26	100
Acetone	5.1	1.359	330	56	0.32	100
Acetonitrile	5.8	1.344	190	82	0.37	100
Benzene	2.7	1.501	280	80	0.65	0.18
n-Butanol	4.0	1.394	254	125	0.73	0.43
Butyl Acetate	3.9	1.399	215	118	2.98	7.81
Carbon Tetrachloride	1.6	1.466	263	77	0.97	0.08
Chloroform	4.1	1.446	245	61	0.57	0.815
Cyclohexane	0.2	1.426	200	81	1.00	0.01
1,2-Dichloroethane <sup>1</sup>	3.5	1.444	225	84	0.79	0.81
Dichloromethane <sup>2</sup>	3.1	1.424	235	41	0.44	1.6
Dimethylformamide	6.4	1.431	268	155	0.92	100
Dimethyl Sulfoxide <sup>3</sup>	7.2	1.478	268	189	2.00	100
Dioxane	4.8	1.422	215	101	1.54	100
Ethanol	5.2	1.360	210	78	1.20	100
Ethyl Acetate	4.4	1.372	260	77	0.45	8.7
Di-Ethyl Ether	2.8	1.353	220	35	0.32	6.89
Heptane	0.0	1.387	200	98	0.39	0.0003
Hexane	0.0	1.375	200	69	0.33	0.001
Methanol	5.1	1.329	205	65	0.60	100
Methyl-t-Butyl Ether <sup>4</sup>	2.5	1.369	210	55	0.27	4.8
Methyl Ethyl Ketone <sup>5</sup>	4.7	1.379	329	80	0.45	24
Pentane	0.0	1.358	200	36	0.23	0.004
n-Propanol	4.0	1.384	210	97	2.27	100
Iso-Propanol <sup>6</sup>	3.9	1.377	210	82	2.30	100
Di-Iso-Propyl Ether	2.2	1.368	220	68	0.37	
Tetrahydrofuran	4.0	1.407	215	65	0.55	100
Toluene	2.4	1.496	285	111	0.59	0.051
Tichloroethylene	1.0	1.477	273	87	0.57	0.11
Water	9.0	1.333	200	100	1.00	100
Xylene	2.5	1.500	290	139	0.61	0.018

<p><b>■ Immiscible</b></p> <p><b>□ Miscible</b></p>	<p>Immiscible means that in some proportions two phases will be produced</p>
---	--

<p><b>Synonym Table</b></p> <p><sup>1</sup> Ethylene Chloride</p> <p><sup>2</sup> Methylene Chloride</p> <p><sup>3</sup> Methyl Sulfoxide</p> <p><sup>4</sup> tert-Butyl Methyl Ether</p> <p><sup>5</sup> 2-Butanone</p> <p><sup>6</sup> 2-Propanol</p>
---

- Imbuto separatore
- In genere bastano 3-4 estrazioni
- Rottura delle emulsioni:
  - Rotazione a vortice
  - Centrifugazione
  - Aggiunta di NaCl
  - Aggiunta di piccoli volumi di etanolo
- Se è presente del solido si può filtrare



Per piccoli volumi di materiale:

- si ricorre a microprovette, provette, provettoni agitando con agitatori elettrici
- si può completare la separazione tramite centrifugazione
- si separa una delle due fasi con un capillare collegato ad una pompa da vuoto

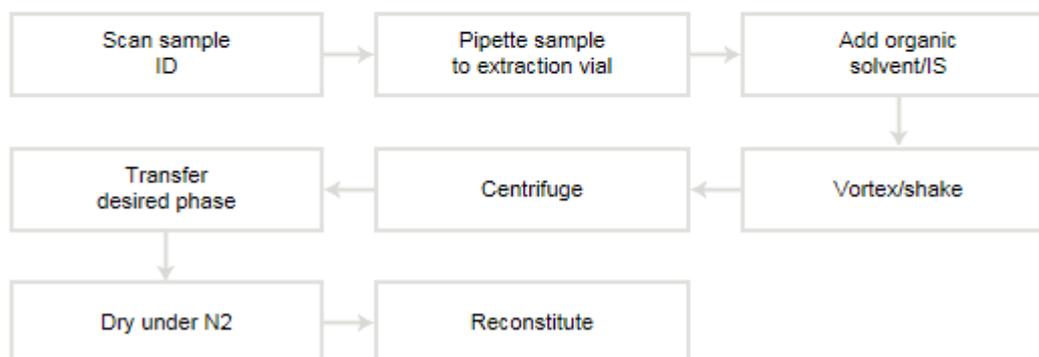




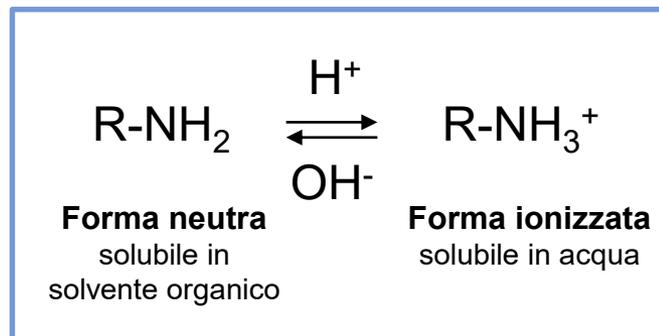
LLE is a sample extraction method where analytes are separated based on their relative solubility in two different immiscible liquids. It is widely employed by clinical, medicinal chemistry and food labs. Despite being widely used, the technique is very labor intensive and poses challenges – variable extraction yield, high consumption of solvents and operator health risk due to exposure to hazardous organic solvents.

## Workflow

An example of a LLE workflow



# Separazione selettiva mediante estrazione



Fase acquosa

Analiti basici in acqua  
+ ALTRE SOSTANZE



Alcalinizzazione

Fase acquosa

Funzione basica neutra

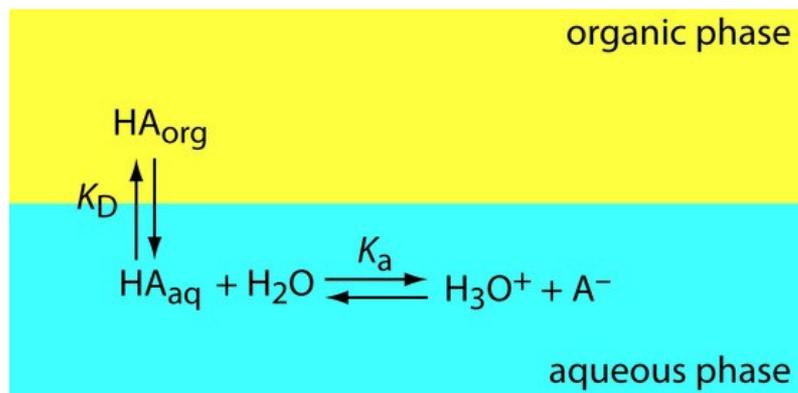
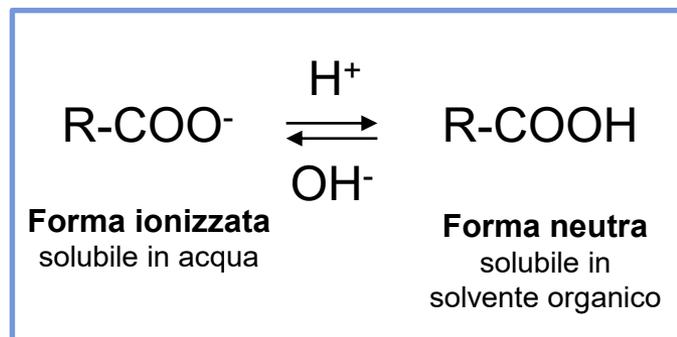


Estrazione con  
solvente organico

Fase organica

ANALITA BASICO

# Separazione selettiva mediante estrazione



Fase acquosa

Analiti acidi in acqua  
+ ALTRE SOSTANZE



Acidificazione

Fase acquosa

Funzione acida neutra



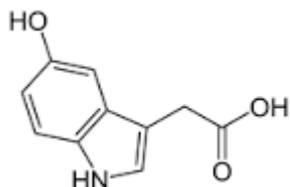
Estrazione con  
solvente organico

Fase organica

ANALITA ACIDO

# Determinazione dell'acido 5-idrossiindoloacetico (5-HIAA) nelle urine

## Raccolta delle urine delle 24 h



pH urine 5.0-7.0



Le urine si alcalinizzano nel tempo



5-HIAA instabile in ambiente alcalino



Fase acquosa

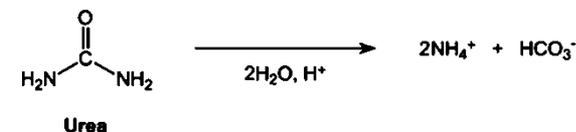
Urine acide



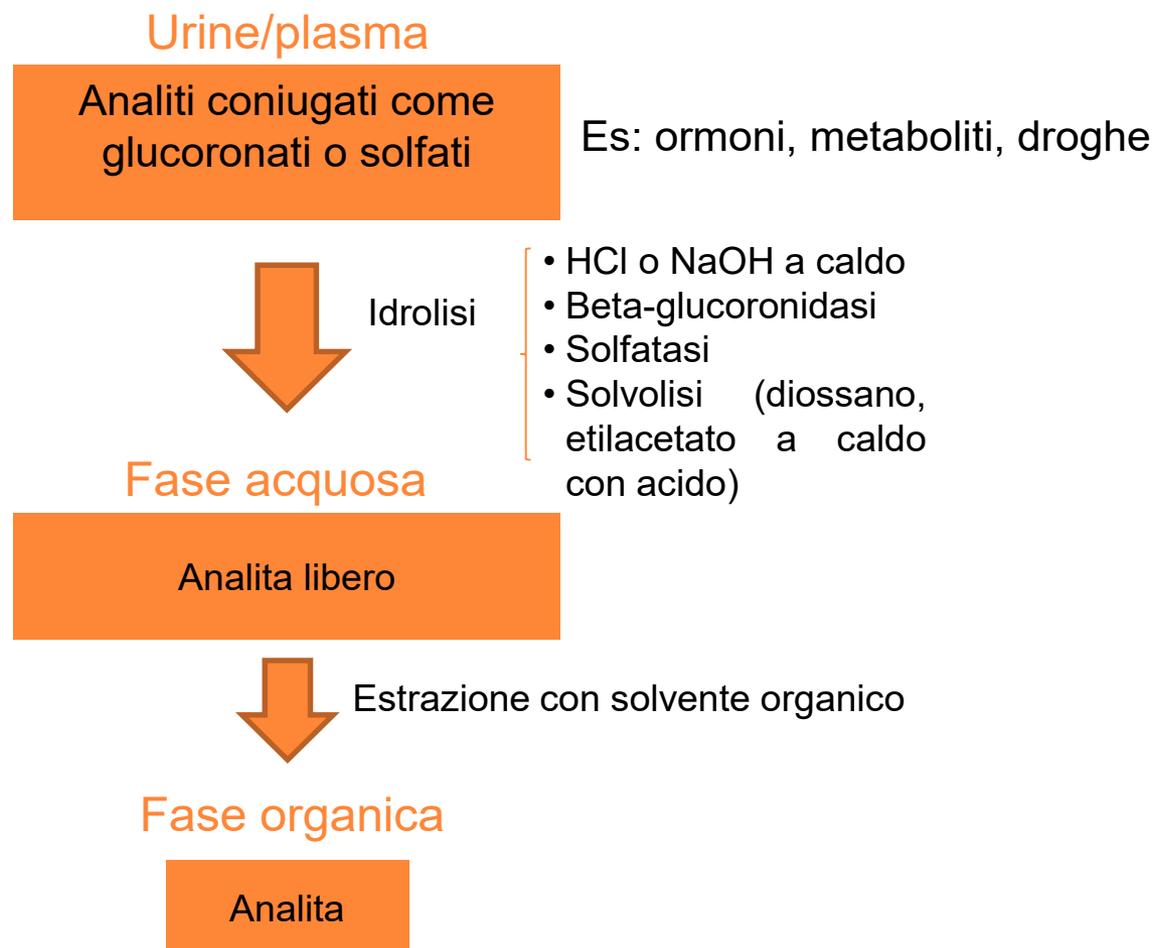
Estrazione con etere etilico

Fase organica

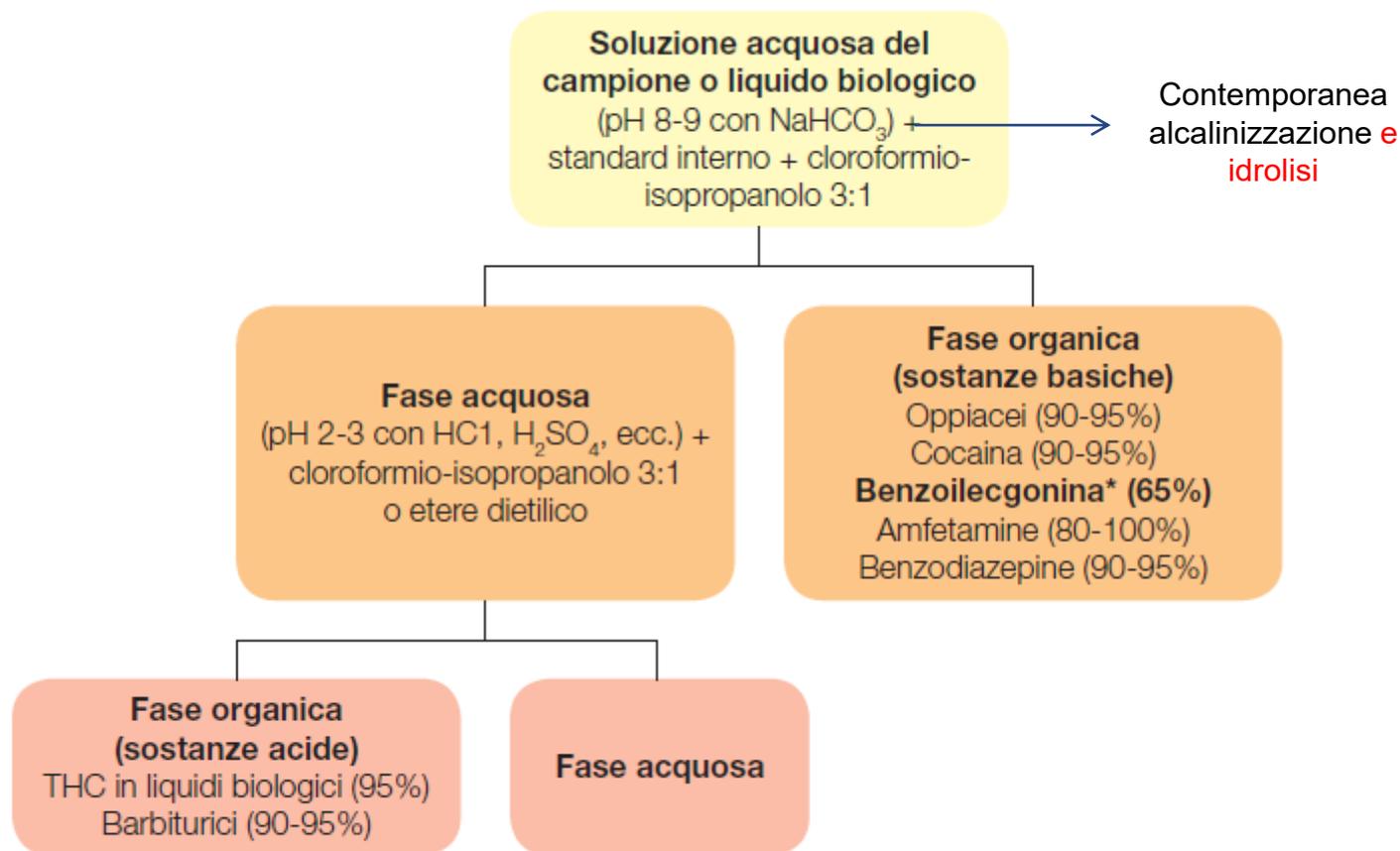
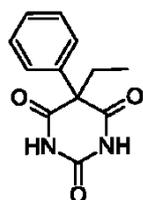
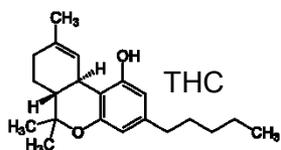
Acido 5-idrossiindoloacetico



# Separazione selettiva mediante idrolisi dei coniugati ed estrazione

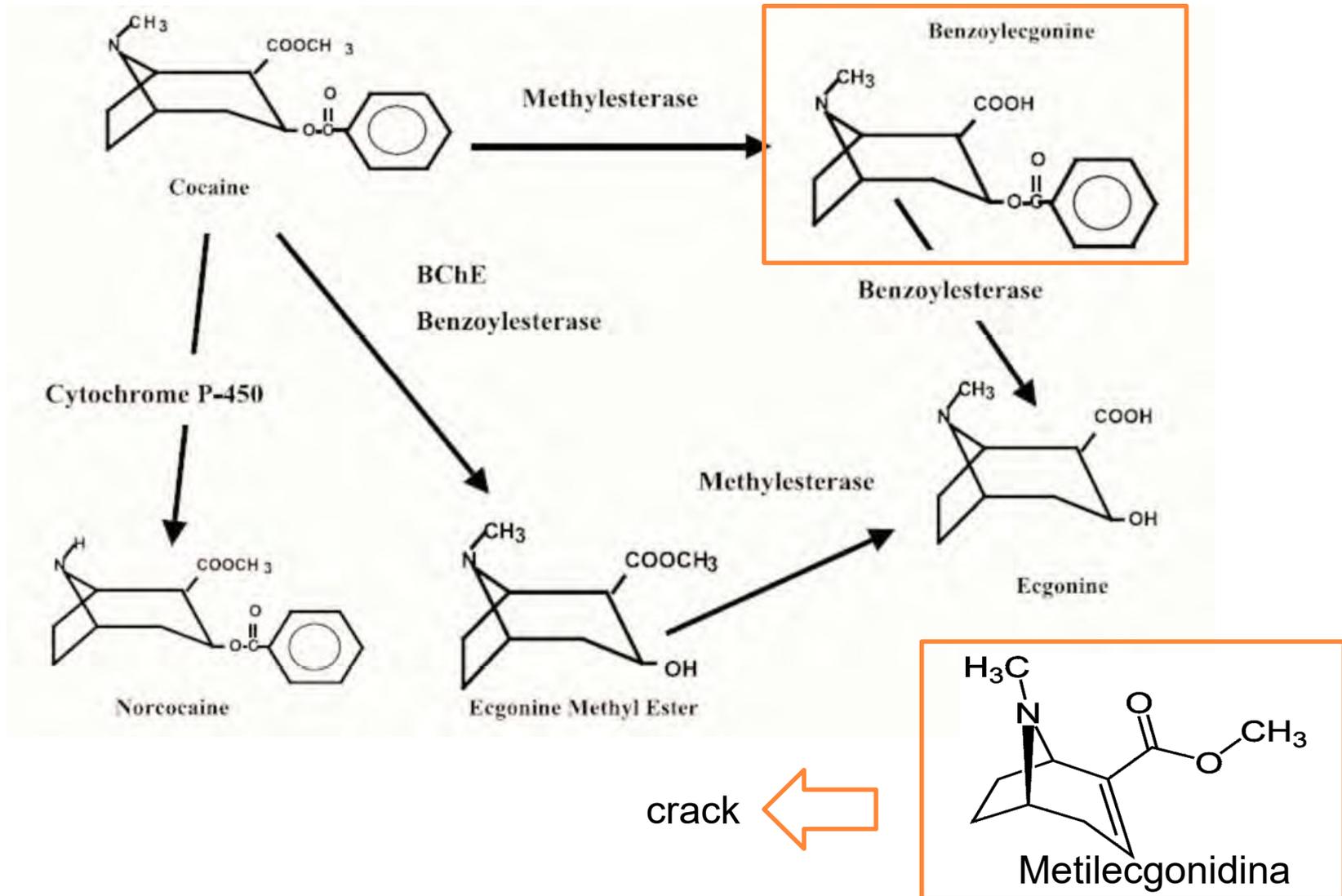


# Analisi delle sostanze d'abuso



\* La Benzoilecgonina per il suo carattere anfotero si estrae con difficoltà in queste condizioni. La sua estrazione è più efficace con sistemi solido/liquido.

# Metabolismo della cocaina



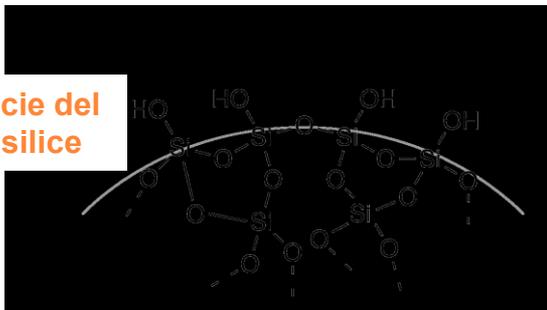
**Tabella I.1. Alcune applicazioni del metodo di estrazione con solventi per la parziale separazione di sostanze di interesse biochimico clinico.**

<b>Componente</b>	<b>Materiale biologico</b>	<b>Solvente per l'estrazione</b>	<b>Tecnica di analisi</b>
Porfirine	urine acidificate	etere etilico	spettrofotometria fluorimetria
Ormoni steroidei	urine idrolizzate	dicloroetilene	spettrofotometria gascromatografia
17-chetosteroidi	urine idrolizzate	dicloroetilene	spettrofotometria
17-idrossicorticosteroidi	urine idrolizzate	cloroformio	spettrofotometria
Pregnandiolo	urine idrolizzate	etere-etanolo	spettrofotometria
Estrogeni	urine idrolizzate	etere etilico	fluorimetria
Estriolo	urine idrolizzate	etere etilico	spettrofotometria fluorimetria
Cortisolo	plasma	cloruro metilene	fluorimetria
Acido 5-idrossi-indolacetico	urine acidificate	etere etilico	spettrofotometria
Acido vanilmandelico	urine acidificate	etile acetato	spettrofotometria
Barbiturici	sangue-urina	cloroformio	TLC o spettrofotometria
Droghe varie (oppiacei ecc.)	sangue-urina	cloroformio	cromatografia in fase gassosa o liquida
NEFA	sangue + Cu <sup>++</sup>	cloroformio	spettrofotometria

# Estrazione in fase solida (SPE)

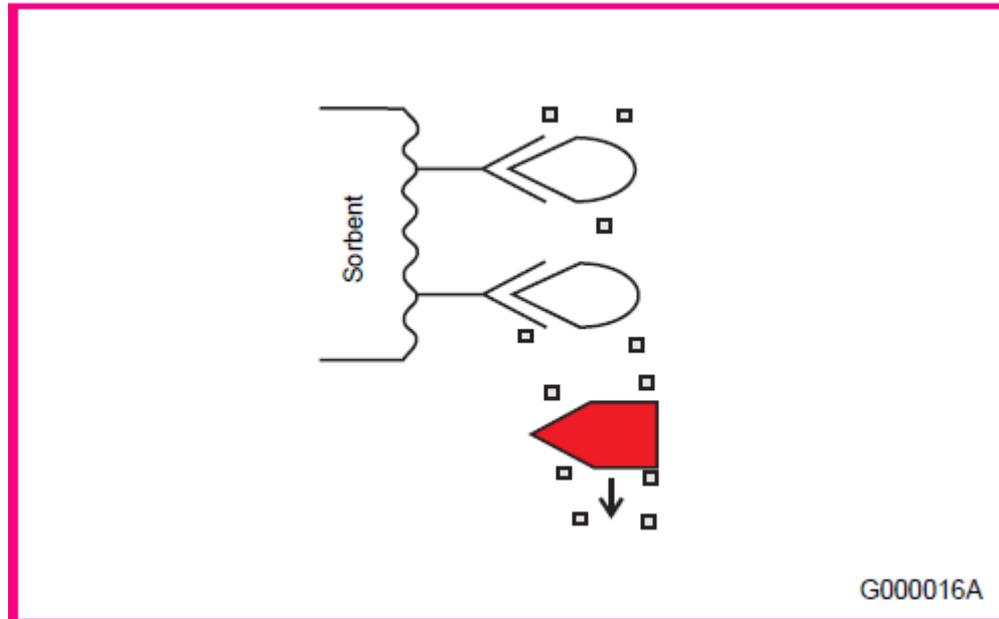
- È un metodo di estrazione solido-liquido, rapido e facile da eseguire
- Vantaggi rispetto all' estrazione liquido-liquido:
  - purificazione del campione in un unico passaggio
  - non necessita di estrazioni a diversi pH
  - utilizza minori quantità di campione e di solventi
- Si evita la formazione di schiume
- Si utilizzano dispositivi monouso che contengono particelle adsorbenti a diversa porosità

Superficie del gel di silice



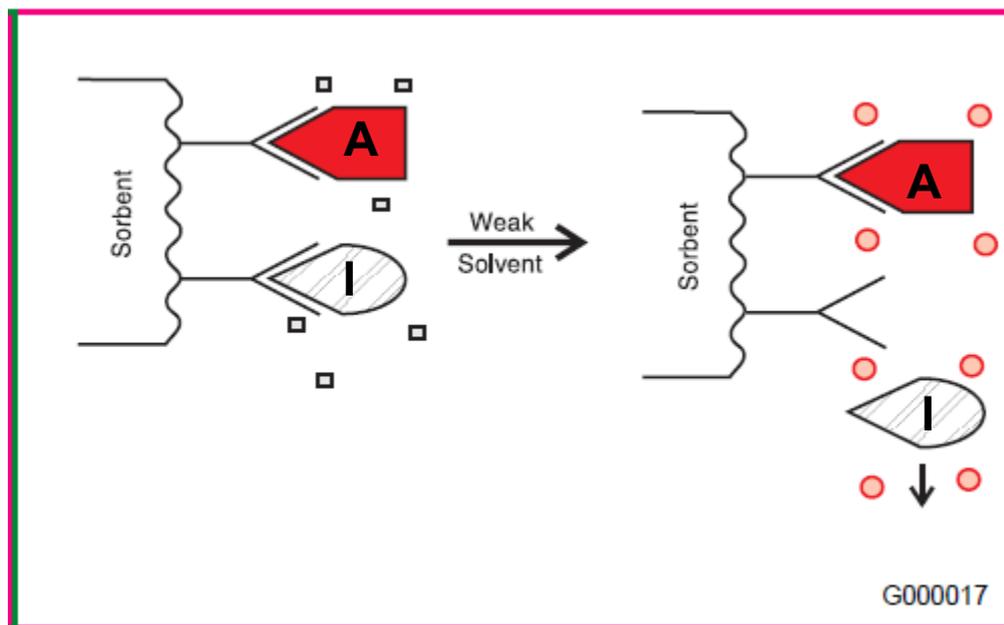
- Estrazione selettiva

la fase solida trattiene i composti di interesse o le impurità.



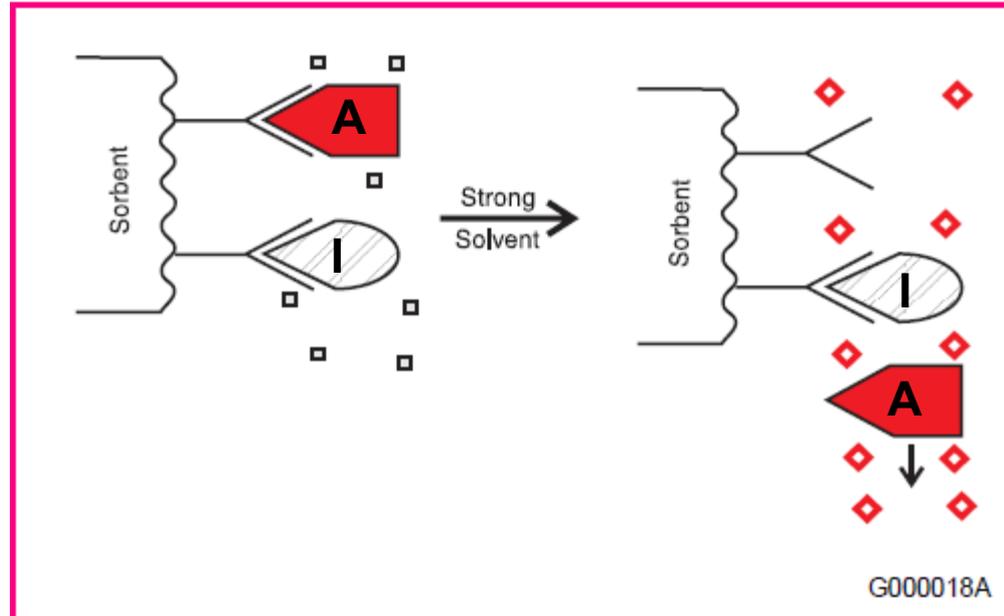
- Lavaggio selettivo

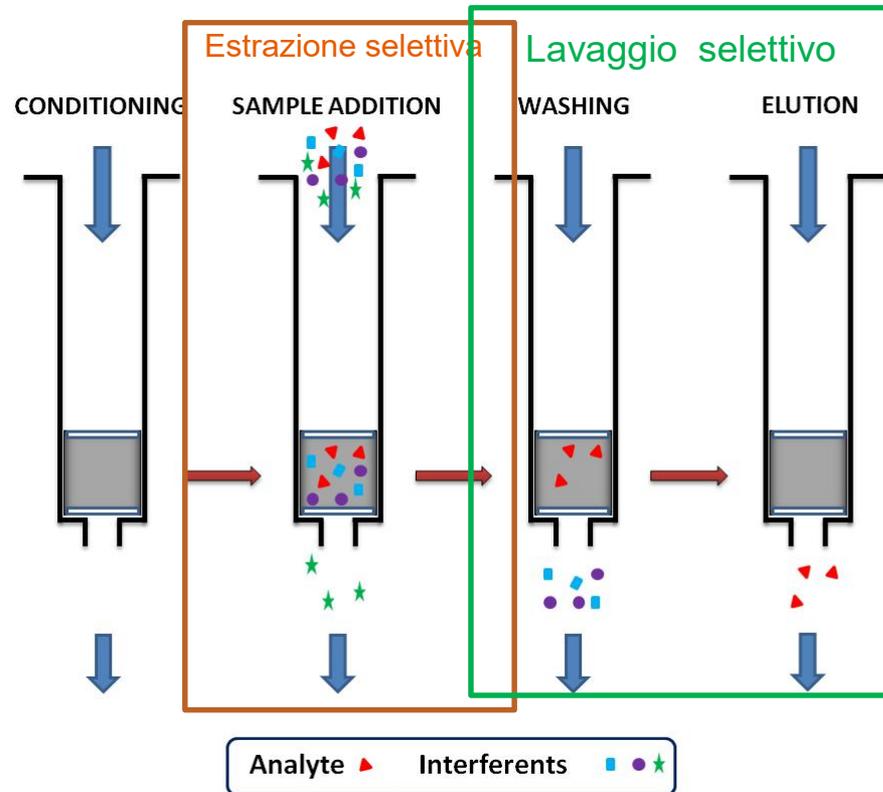
la fase solida trattiene sia composti di interesse che le impurità. Le impurità vengono rimosse con un sistema solvente abbastanza forte da rimuoverle ma debole per rimuovere anche le sostanze di interesse che rimangono indietro.



- Eluizione selettiva

la fase solida trattiene sia composti di interesse che le impurità.  
Le sostanza di interesse vengono rimosse con un sistema solvente abbastanza forte da rimuoverle ma debole per rimuovere anche le impurezze che rimangono indietro.





1. La fase solida deve essere condizionata con l'opportuno solvente.
2. Il campione viene trasferito sulla fase solida
3. La separazione può avvenire secondo i diversi meccanismi
4. Infine facendo percolare una diversa soluzione si fa eluire (si stacca) il composto di interesse

## Utilità della SPE:

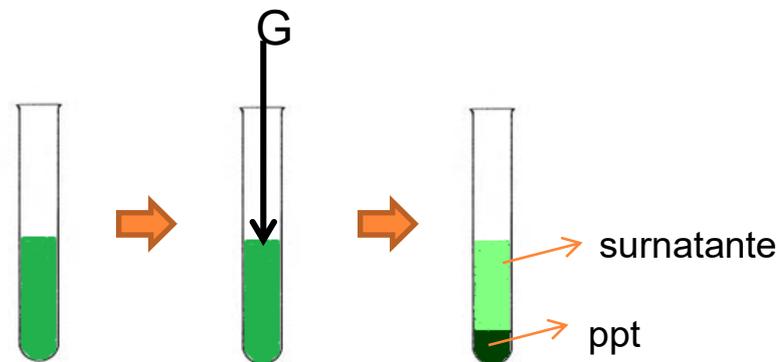
- Purificare
- Concentrare
- Desalinizzare
- Frazionare

# Centrifugazione

La centrifugazione è una tecnica che sfrutta la forza centrifuga per separare i componenti aventi densità diversa di una sospensione.

La centrifugazione sfrutta una forza superiore a quella di gravità, aumentando la velocità di sedimentazione delle particelle e separandole in base a densità, forma e dimensioni.

Particelle in soluzione sedimentano con una velocità proporzionale alla forza applicata.



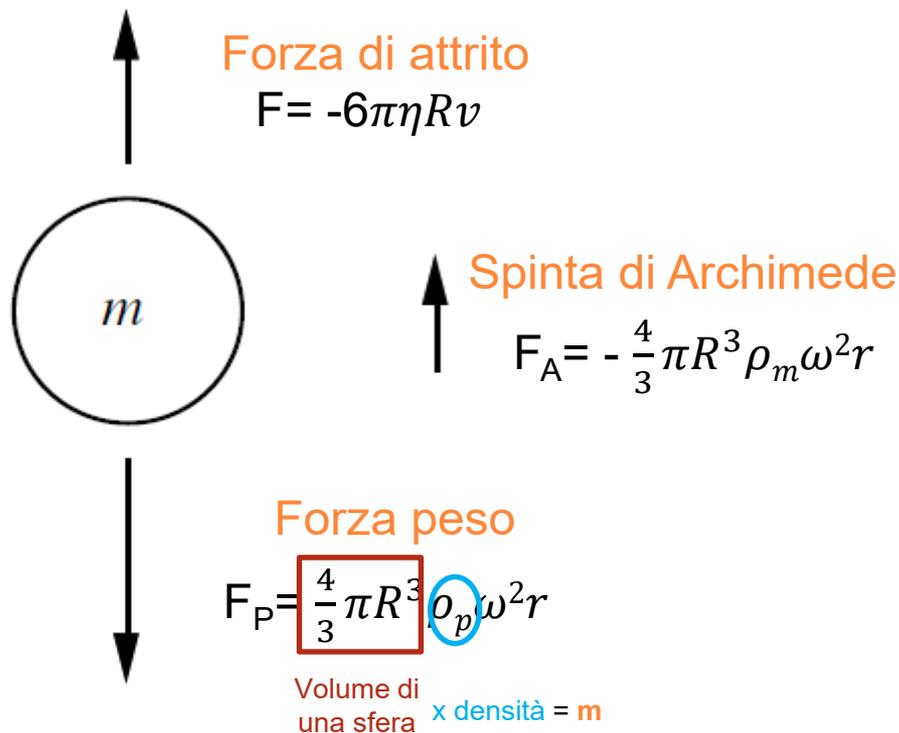
# Tecniche centrifugative

- **Centrifugazione preparativa**, permette di separare isolare e purificare cellule intere, organuli subcellulari, membrane, ribosomi, acidi nucleici, virus, lipoproteine, ecc.
- Centrifugazione analitica, permette di analizzare le caratteristiche di sedimentazione di macromolecole e particelle già purificate (purezza, massa molecolare relativa, forma).

# Forze coinvolte nel processo di sedimentazione

La velocità di sedimentazione è facilmente calcolabile partendo dalla **legge di Stokes**, la quale dice che la forza  $F$  di attrito che un liquido di viscosità  $\eta$  oppone al moto di una sferetta di raggio  $R$  che scorre in esso, è direttamente proporzionale alla velocità della sferetta, al suo raggio e al coefficiente di viscosità  $\eta$  del liquido.

$$F = 6\pi\eta Rv$$



Ma dato che la sfera è immersa in un fluido essa è sottoposta anche alla forza peso ( $F_P$ ) e alla spinta di Archimede ( $F_A$ ).

In condizioni di equilibrio la risultante delle tre forze è nulla.

$$F + F_P + F_A = 0$$

Da questa equazione si ricava la velocità di sedimentazione di una particella,  $v$ .

# La sedimentazione nella centrifugazione

La velocità di sedimentazione ( $v$ ) di una particella dipende da:

- Campo centrifugo applicato
- Massa della particella (volume e densità)
- Densità e viscosità del mezzo
- Quanto la sua forma differisce dalla forma sferica

viscosità è una grandezza fisica che indica la resistenza di un fluido allo scorrimento

$$v = \frac{2(\rho_p - \rho_m)R^2\omega^2r}{9\eta}$$

**Coefficiente di sedimentazione, S (s)**

1 svedberg =  $10^{-13}$ s

Informazioni da trarre:

- Maggiori sono le dimensioni della particella ( $R$ ) maggiore sarà  $v$
- Maggiore è il campo centrifugo applicato ( $\omega^2r$ ) maggiore sarà  $v$
- Maggiore è la differenza tra la densità della particella e del mezzo, maggiore sarà  $v$  (quindi se una particella ha una densità uguale a quella del mezzo non vi è sedimentazione)
- Minore è la viscosità del liquido maggiore sarà  $v$
- Maggiore è  $S$  maggiore è  $v$

La velocità di sedimentazione dipende dal campo centrifugo applicato,  $G$ :

$$G = \omega^2 r = \frac{4\pi^2 \text{RPM}^2 r}{3600}$$

$$1 \text{ rotazione/min (RPM)} = 2\pi \text{ rad/min} = 2\pi/60 \text{ rad/s}$$

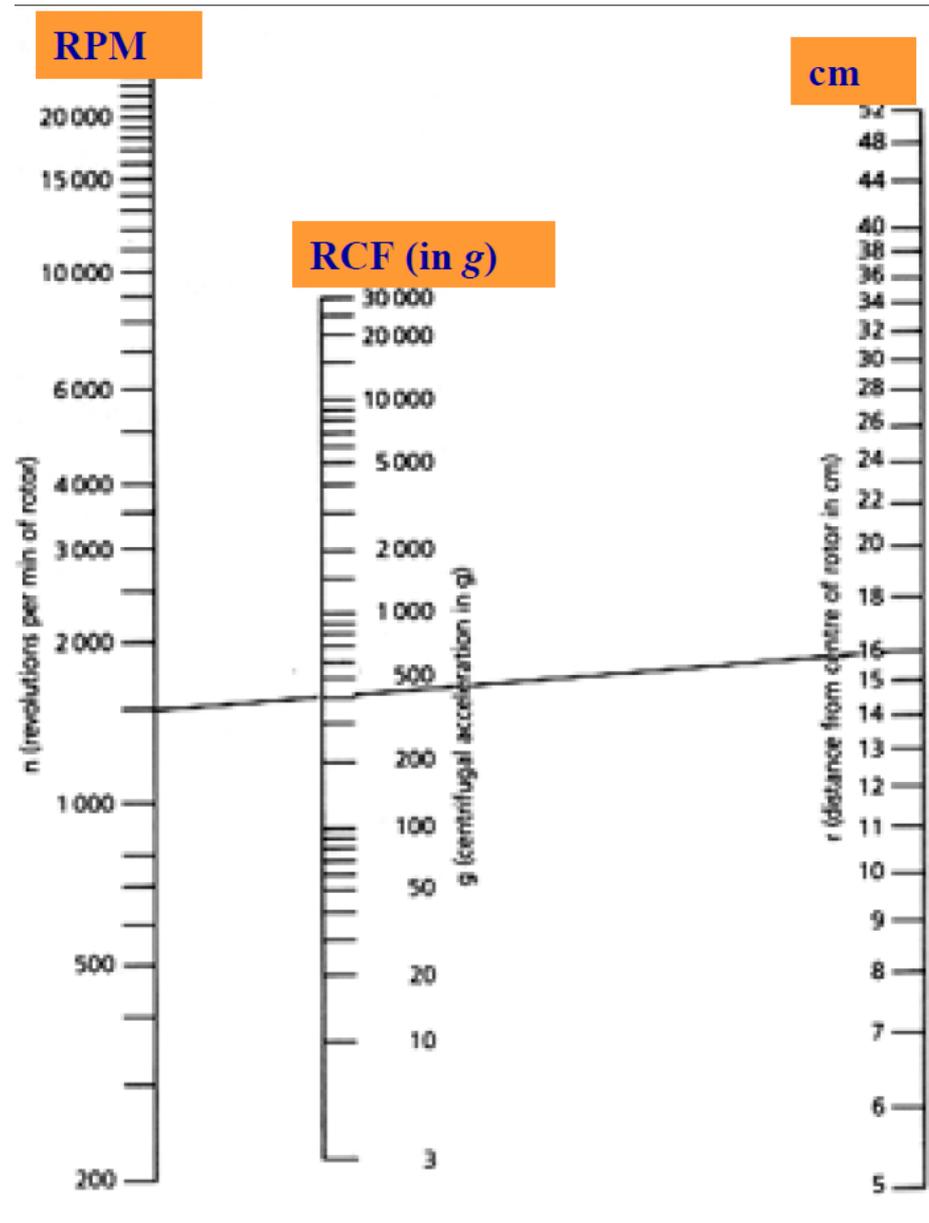
$\omega$ , velocità angolare del rotore (rad/s)

$r$ , distanza radiale dall'asse di rotazione (cm)

Generalmente il campo centrifugo viene espresso come multiplo della forza gravitazionale terrestre ( $g = 980 \text{ cm/s}^2$ ) RCF (campo centrifugo relativo =  $G/g$ ).

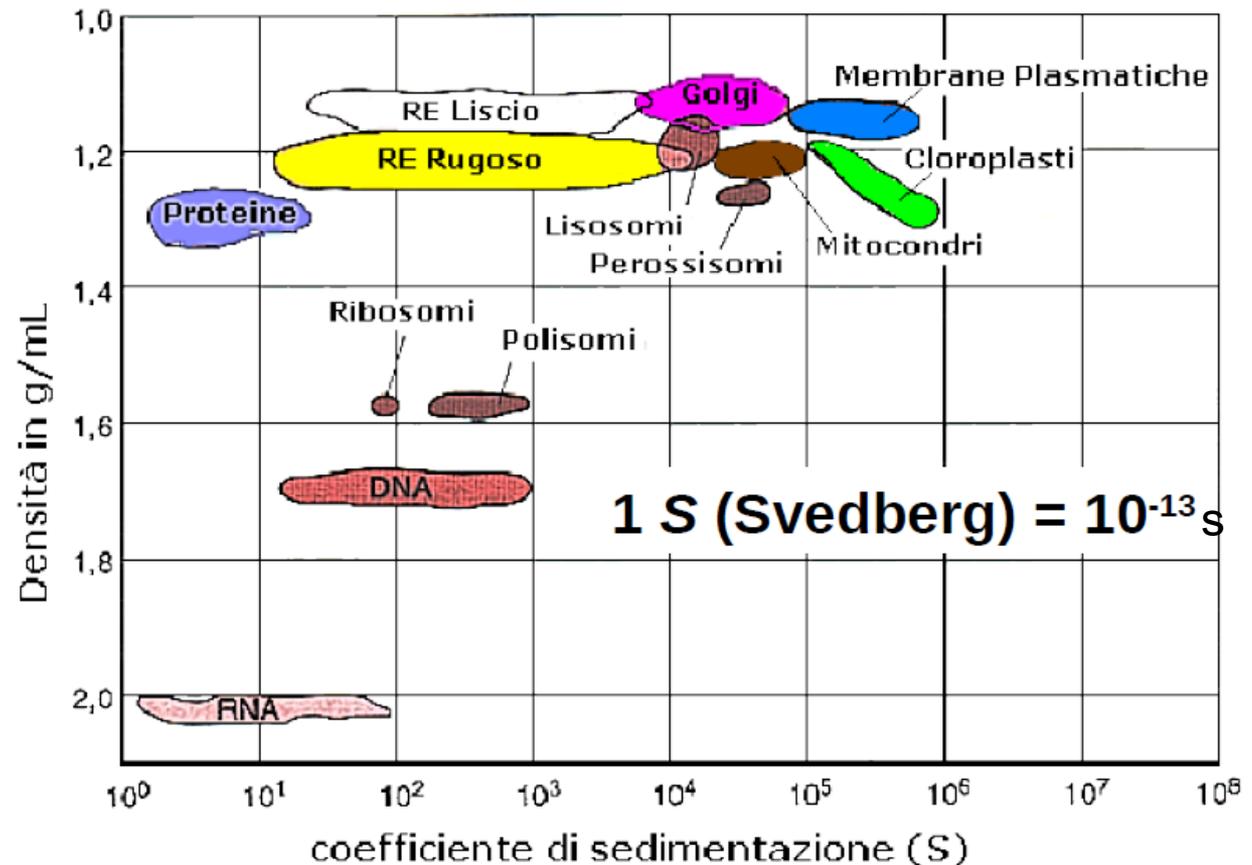
Va da se che quando si riportano le condizioni di separazione delle particelle per sedimentazione devono essere riportati velocità del rotore, raggio e tempo.





- Solitamente i valori di S per le particelle biologiche sono piccoli, cioè servono campi centrifughi elevati per farle sedimentare

Citocromo	1.7 S
Mioglobina	2 S
Ribosomi	70 S
Albumina (siero bovino)	4.4 S



- La durata della centrifugazione sarà funzione del **tempo** di sedimentazione delle particelle da separare

## Applicazioni comuni

È il mezzo universalmente impiegato per separare solidi da liquidi:

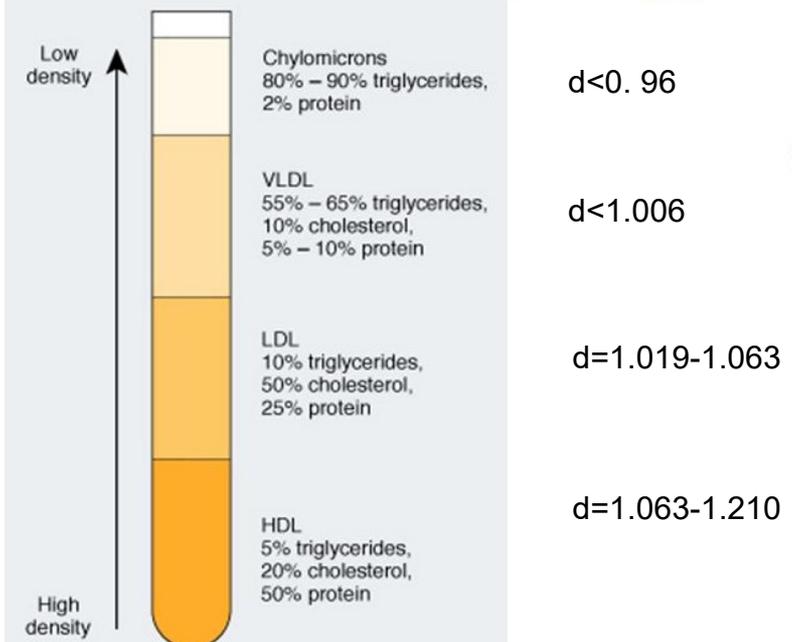
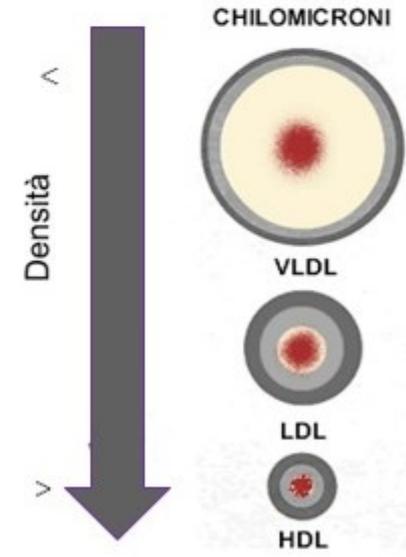
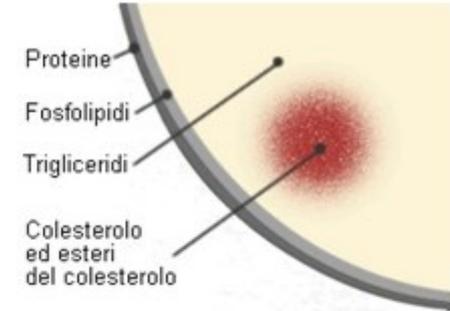
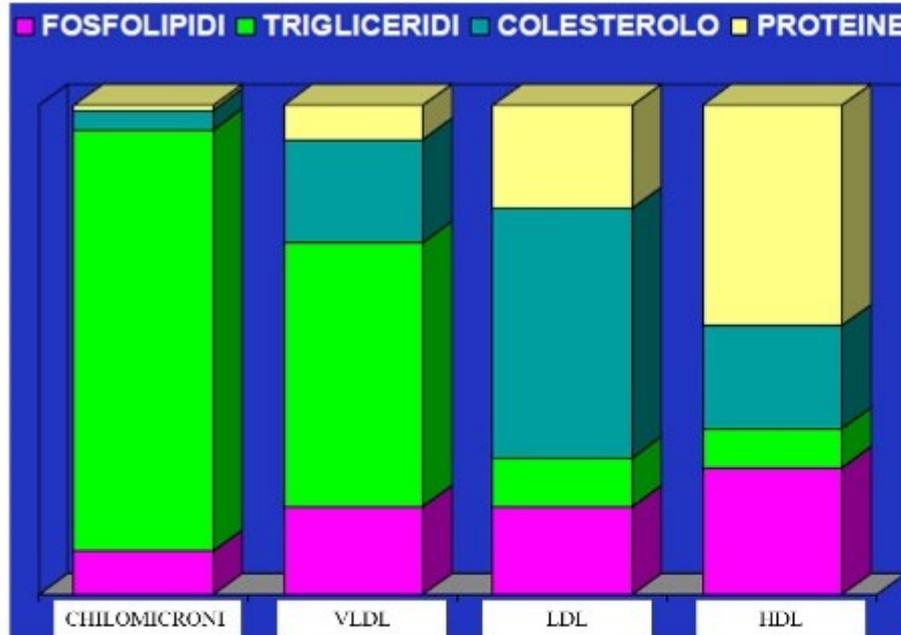
- Elementi figurati del sangue
- Proteine denaturate
- Cellule e microcristalli delle urine

# Ultracentrifugazione

- Ad eccezione delle lipoproteine, tutte le proteine hanno densità maggiore dell'acqua quindi tendono a sedimentare in soluzione acquosa
- Ma con la sola forza di gravità, la separazione per sedimentazione è trascurabile
- Sono necessari campi centrifughi molto intensi, 200,000-500,000 volte la forza di gravità: ultracentrifuga
- Possiedono un'unità motrice, un rotore e un sistema ottico di rivelazione

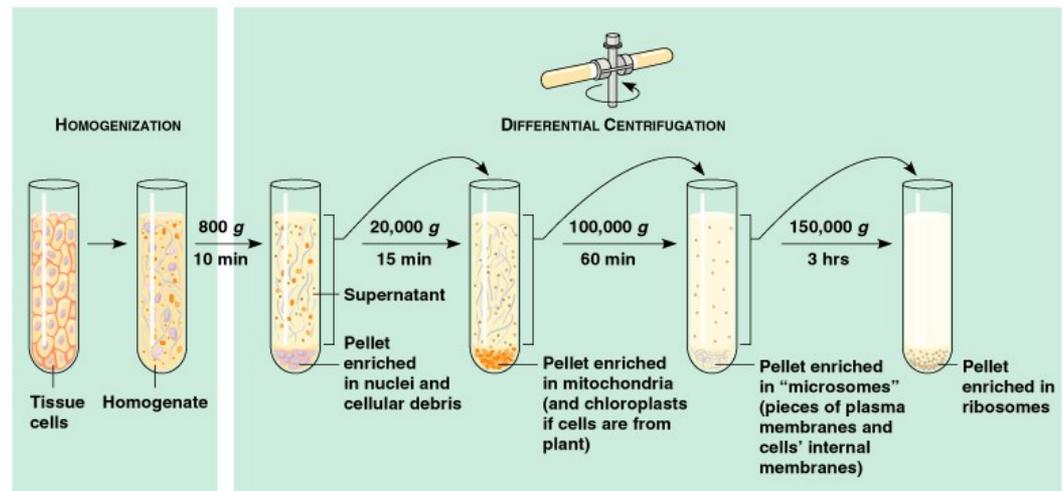
# Applicazioni

- **Biologia:**
  - Separazione di organuli, frazioni subcellulari (nuclei, ribosomi, lisosomi, frazione citoplasmatica, nucleoproteine, acidi nucleici, proteine)
- **Chimica biologica:**
  - Separazione delle sostanze macromolecolari come proteine ed acidi nucleici per lo studio della purezza e la determinazione del PM
- **Chimico-clinico:**
  - Separazione e caratterizzazione proteine plasmatiche (o di altri liquidi biologici) e di proteine coniugate (lipoproteine per flottazione)



# Centrifugazione differenziale

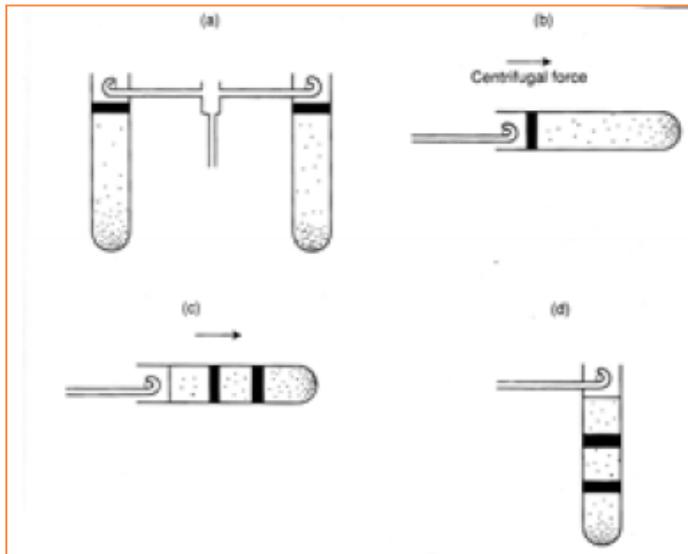
- Si centrifuga una sospensione omogenea mediante tappe successive, aumentando gradualmente il campo centrifugo applicato.
- Ad ogni tappa si ottiene un sedimento contenente uno specifico tipo di particelle
- Si possono separare le varie componenti cellulari



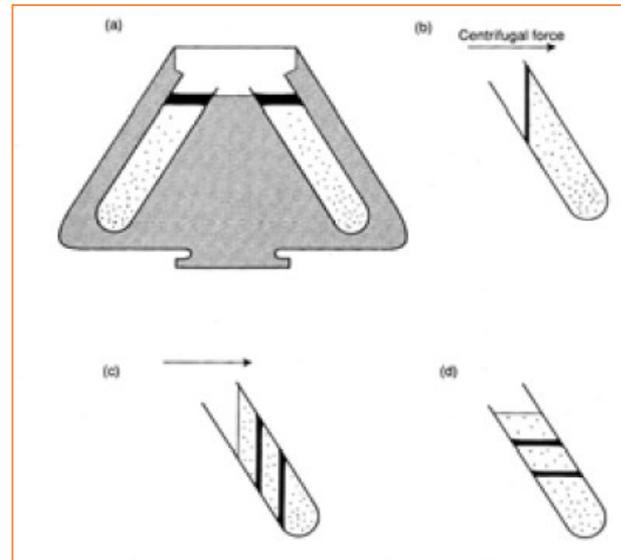
# La centrifuga

## Rotori

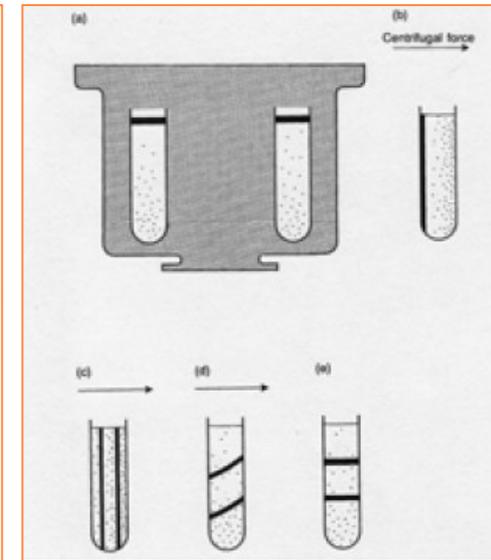
### Rotore a braccio oscillante



### Rotore ad angolo fisso



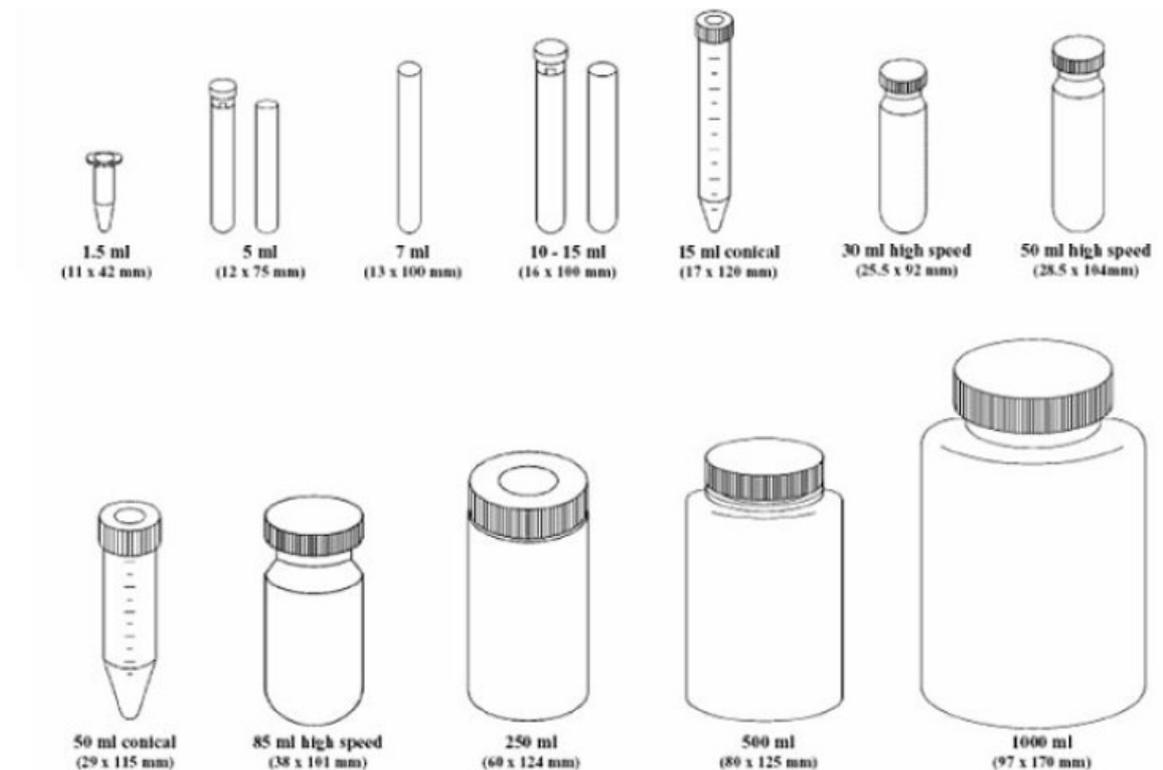
### Rotore verticale



# La centrifuga

## Aspetti pratici

- Uso di provette adeguate
- Bilanciamento
- Uso di tappi

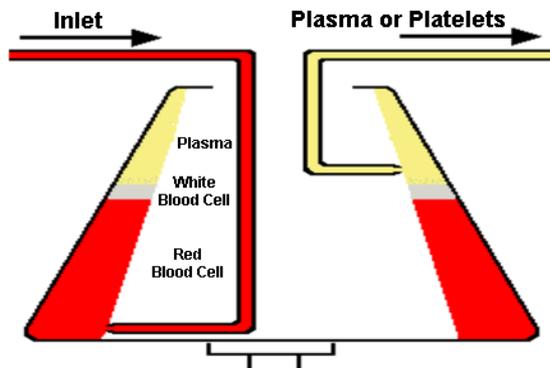


# La centrifuga

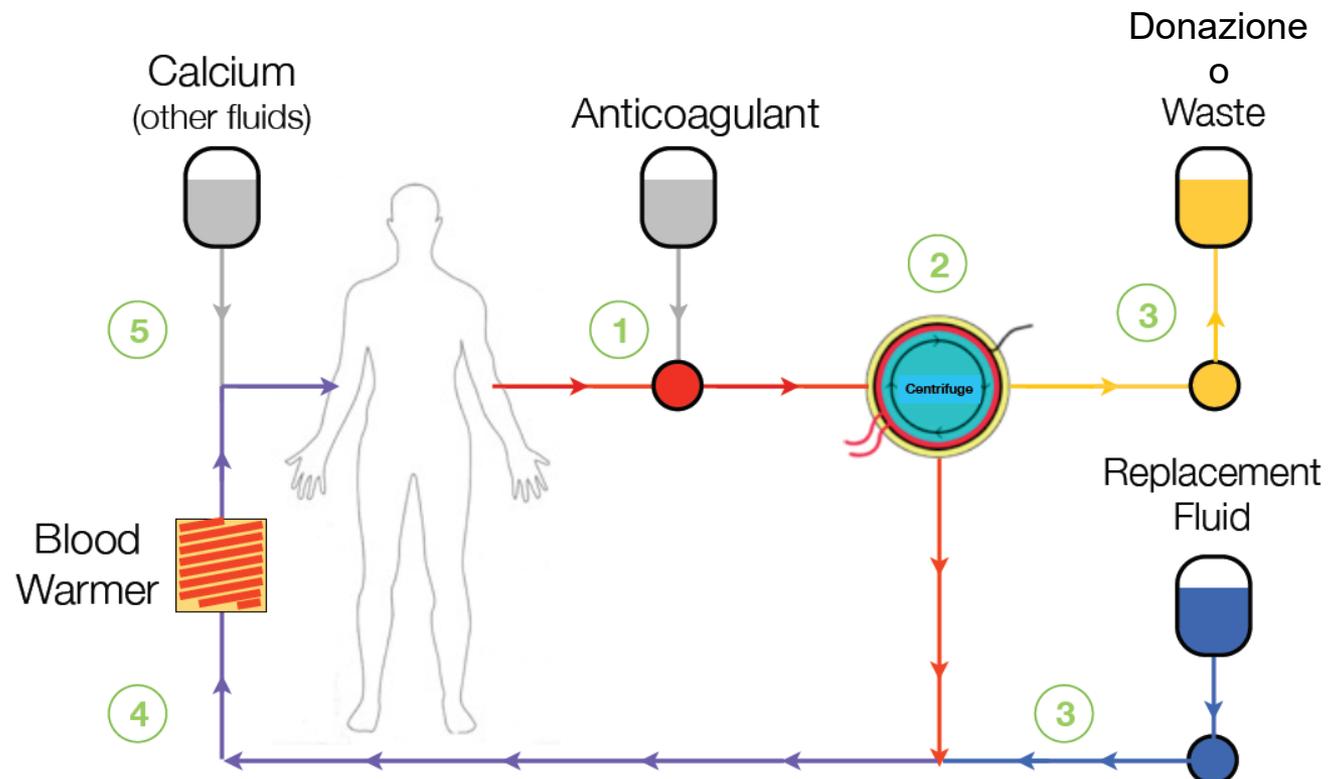
## Tipologie di centrifughe

- Piccole centrifughe da banco
- Centrifughe refrigerate a grande capacità
- Centrifughe refrigerate ad alta velocità
- Ultracentrifughe (preparative e analitiche)

# Separatori cellulari



**Aferesi:** indica un gruppo di tecniche per rimuovere dal sangue una o più delle sue componenti, restituendo al soggetto trattato la quota che non s'intende trattenere e si effettua mediante i separatori cellulari



# METODI DI SEPARAZIONE

Metodi di separazione utili in chimica-clinica:

- Evaporazione (distillazione)
- Filtrazione e separazione di molecole ad alto PM da molecole a basso PM (dialisi, ultrafiltrazione, gel filtrazione)
- Estrazione (in fase liquida o in fase solida)
- Centrifugazione
- Microdiffusione
- Cromatografia
- Elettroforesi

# Cromatografia

Tecnica di separazione nella quale i componenti di un campione vengono separati sulla base della loro capacità di distribuirsi tra due fasi messe a contatto tra loro. Una fase è fissa, immobile e viene detta **fase stazionaria** (o fissa: F.S., F.F.), mentre l'altra è detta *fase mobile* (F.M.) in quanto viene fatta fluire (percolare) attraverso la fase stazionaria.



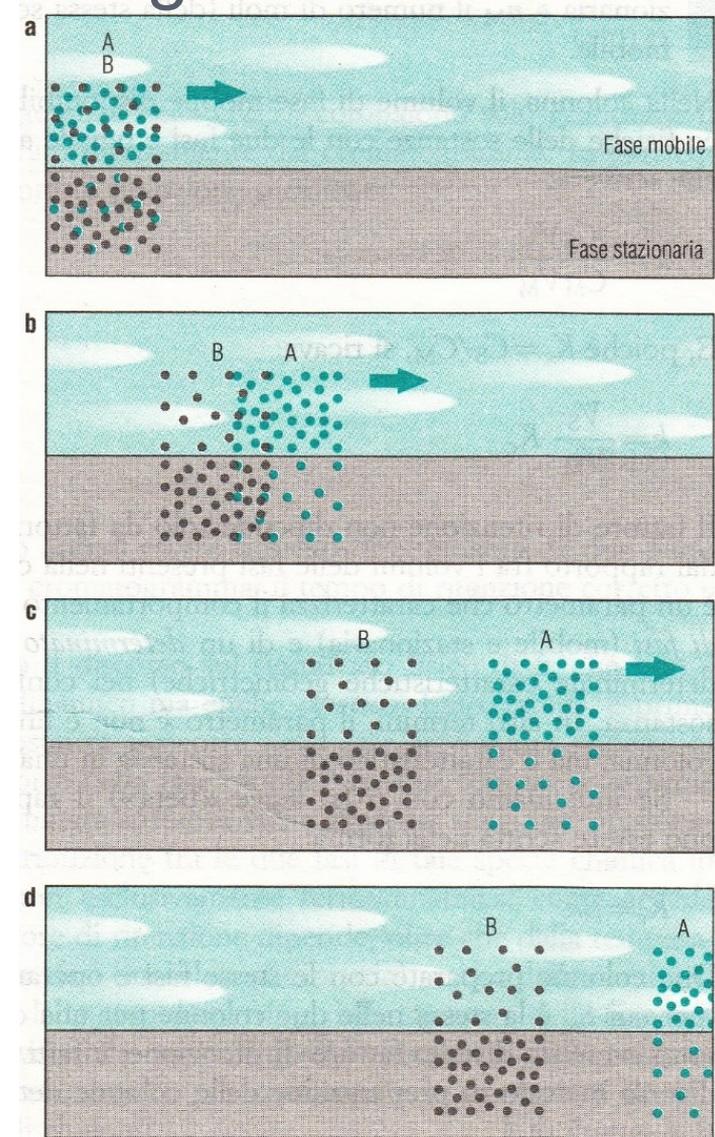
## **SISTEMA CROMATOGRAFICO**

La fase stazionaria può essere un liquido o un solido

La fase mobile invece può essere un gas o un liquido

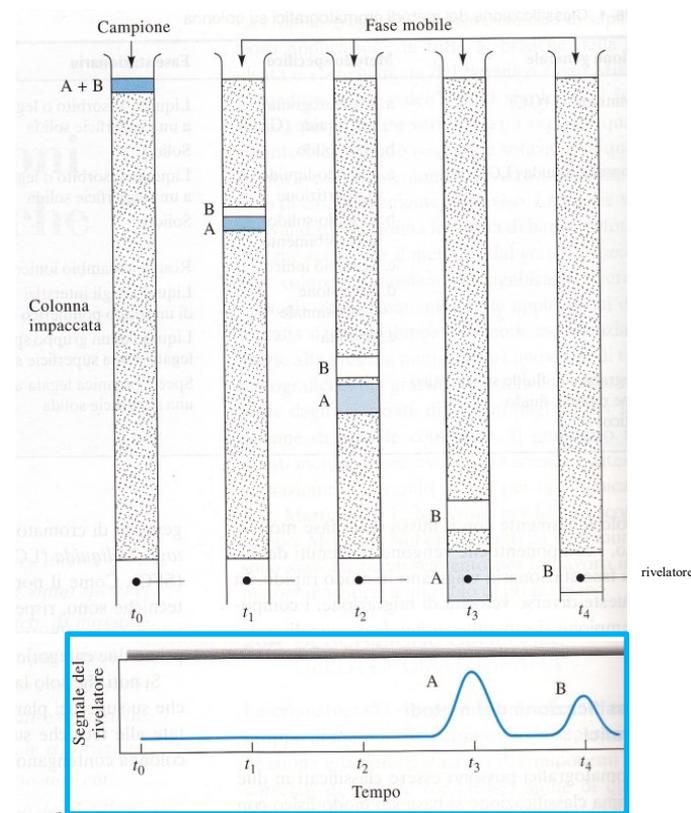
# Descrizione della separazione cromatografica

- Si introduce il campione nella fase stazionaria
- Si fa passare la fase mobile attraverso la fase stazionaria
- Man mano che la fase mobile scorre nella fase stazionaria i componenti della miscela si distribuiscono diversamente tra le due fasi formando delle bande che possono essere analizzate
- Quindi i vari componenti usciranno separatamente (quindi a tempi diversi) dalla fase stazionaria disciolti nella fase mobile
- Se si dispone di un sistema in grado di convertire proporzionalmente la concentrazione della sostanza presente nella banda in un segnale elettrico (rivelatore) si può diagrammare tale segnale in funzione del tempo ottenendo il *cromatogramma*



# Descrizione della separazione cromatografica

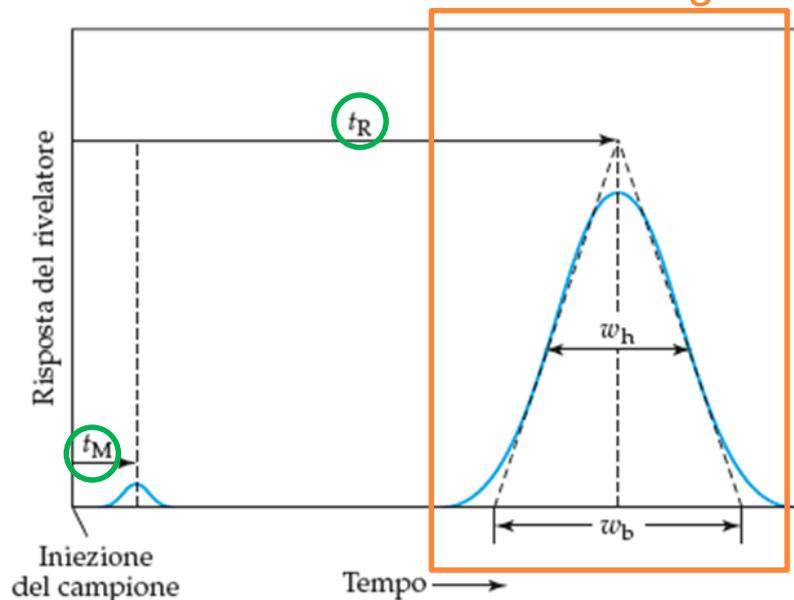
- Si introduce il campione nella fase stazionaria
- Si fa passare la fase mobile attraverso la fase stazionaria
- Man mano che la fase mobile scorre nella fase stazionaria i componenti della miscela si distribuiscono diversamente tra le due fasi formando delle bande che possono essere analizzate
- Quindi i vari componenti usciranno separatamente (quindi a tempi diversi) dalla fase stazionaria disciolti nella fase mobile
- Se si dispone di un sistema in grado di convertire proporzionalmente la concentrazione della sostanza presente nella banda in un segnale elettrico (rivelatore) si può diagrammare tale segnale in funzione del tempo ottenendo il *cromatogramma*



# Cromatogramma

È il grafico che si ottiene da un'analisi cromatografica e descrive l'andamento del segnale del rivelatore in funzione del tempo o del volume di eluizione. È utile sia per l'analisi quantitativa che qualitativa.

## Picco cromatografico



### Tempo morto, $t_M$

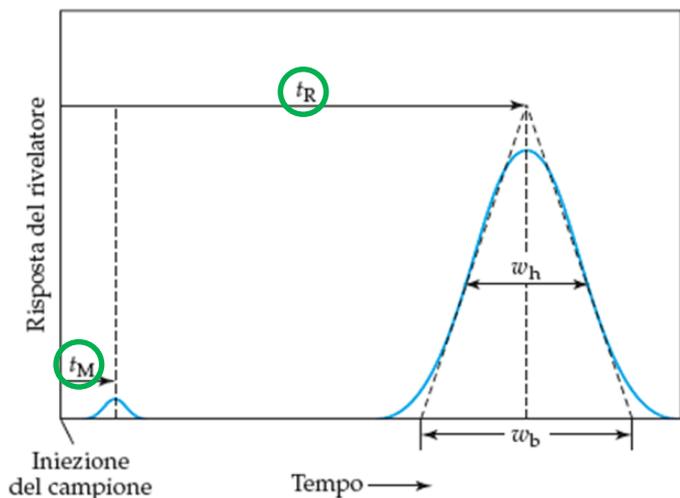
È il tempo che una sostanza non ritenuta dalla fase stazionaria impiega ad attraversare il sistema cromatografico

### Tempo di ritenzione, $t_R$

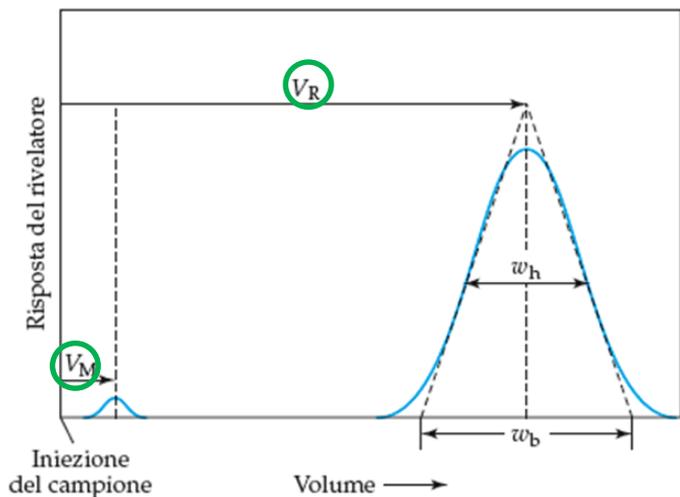
È il tempo che una sostanza ritenuta dalla fase stazionaria impiega ad attraversare il sistema cromatografico

L'entità del  $t_R$  dipende dalla struttura della sostanza e dal tipo di fase stazionaria e mobile impiegate, per cui è un parametro utile per identificare qualitativamente una sostanza.

Un altro parametro utile per descrivere il grado di spostamento di una sostanza nel cromatogramma è il volume di eluizione



I valori di  $t_R$  e  $V_R$  come  $t_M$  e  $V_M$  sono correlati dalla velocità di flusso della f.m. (F):

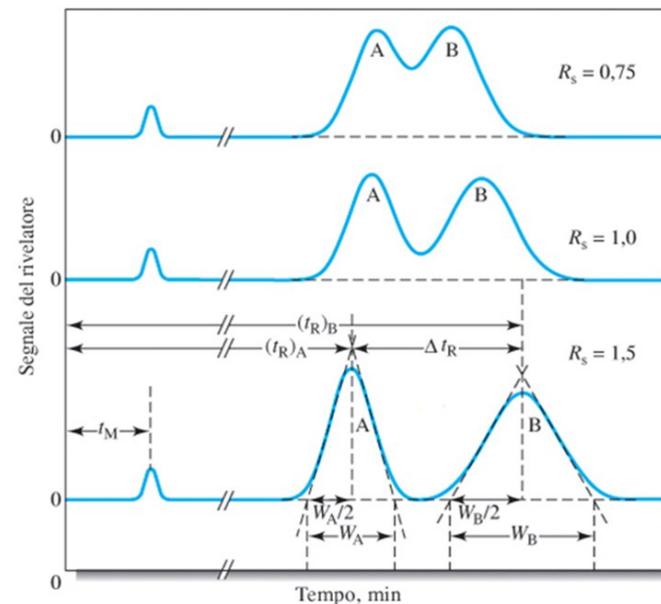
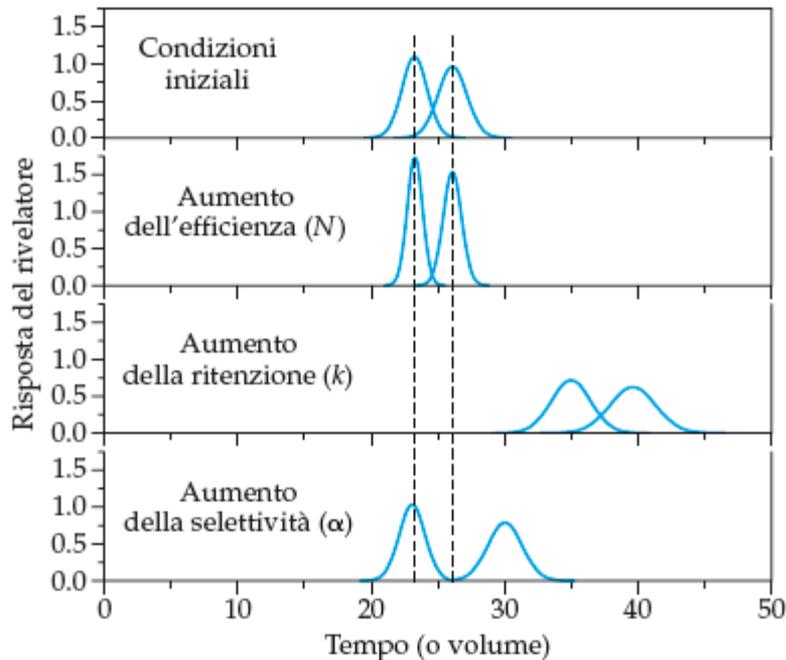


$$V_R = t_R F$$

$$V_M = t_M F$$

# Parametri di una separazione cromatografica

- Selettività
- Efficienza
- Risoluzione



# Ottimizzazione dei parametri

- Fase mobile:
  - Caratteristiche chimico-fisiche
  - Velocità
- Fase stazionaria:
  - Caratteristiche chimico-fisiche
  - Diametro delle particelle della f.s. o del supporto
  - Impaccamento delle particelle
  - Geometria della colonna
- Temperatura della colonna

# Analisi quantitativa in cromatografia

## MISURA DELL'AREA DEI PICCHI (S)

### Metodi di misura della concentrazione

- Normalizzazione interna
- Standardizzazione esterna
- Taratura diretta
- Standardizzazione interna
- Aggiunta multipla

## Normalizzazione interna

- Tutti i componenti di una miscela sono rappresentati nel cromatogramma da picchi distinti e ben separati.
- Se il rivelatore ha la stessa sensibilità per tutti i componenti:

$$\frac{S_1}{C_1} = \frac{S_2}{C_2} = \frac{S_3}{C_3} = \dots$$

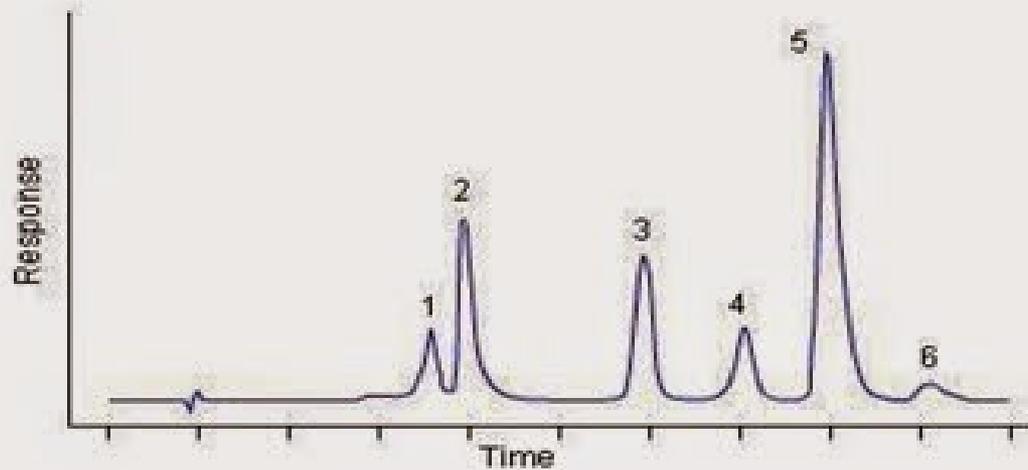
$$C_{x\%}: S_x = 100: S_{tot}$$

$$C_{x\%} = \frac{S_x \times 100}{S_{tot}}$$

- Se non c'è una risposta omogenea del rivelatore bisogna determinare i *fattori di risposta* che permettono di rendere le aree proporzionali alle concentrazioni relative dei composti da analizzare.

$$\frac{S_1 \times f_1}{C_1} = \frac{S_2 \times f_2}{C_2} = \frac{S_3 \times f_3}{C_3}$$

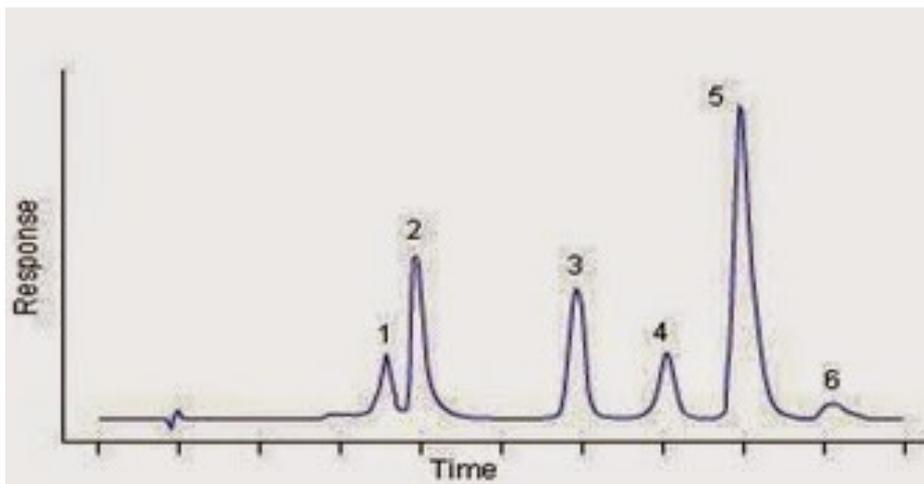
assumendo che per uno dei componenti ci sia proporzionalità tra area del picco e concentrazione avremo che il suo fattore di risposta sarà pari a 1 (es.  $f_3 = 1$ ) e si potranno poi ottenere i fattori di risposta relativi degli altri due componenti (cioè i valori di  $f_1$  e  $f_2$  rispetto a  $f_3$ )



Peak	Area	Area%
1	2245	7.5
2	6488	21.8
3	5144	17.3
4	2767	9.3
5	12147	40.7
6	1023	3.4

$$\text{Area (Peak 3)} = \frac{5144}{(2245 + 6488 + 5144 + 2767 + 12147 + 1023)} \times 100$$
$$= 17.3\%$$

1 Abbiamo preparato una miscela dei composto 1-6 equimolari



Picco	Area	$f$
1	2245	2.29
2	6488	0.79
3	5144	1
4	2767	1.86
5	12147	0.42
6	1023	5.06

2 Arbitrariamente decidiamo che il composto 3 ha fattore di risposta 1 per il rivelatore

3 Dati spettro campione

$$\frac{S_1 \times f_1}{C_1} = \frac{S_2 \times f_2}{C_2} = \frac{S_3 \times f_3}{C_3} = \dots$$

$$f_3 = 1$$

$$\frac{S_1 \times f_1}{C_1} = \frac{S_3}{C_3}$$

$$f_1 = \frac{S_3 \times C_1}{S_1 \times C_3} = \frac{5144}{2245} = 2.29$$

Picco	Area	Area x $f$
1	3675	8416
2	2698	2131
3	1267	1267
4	6395	11895
5	23040	9677
6	571	2889
		<b>36275</b>

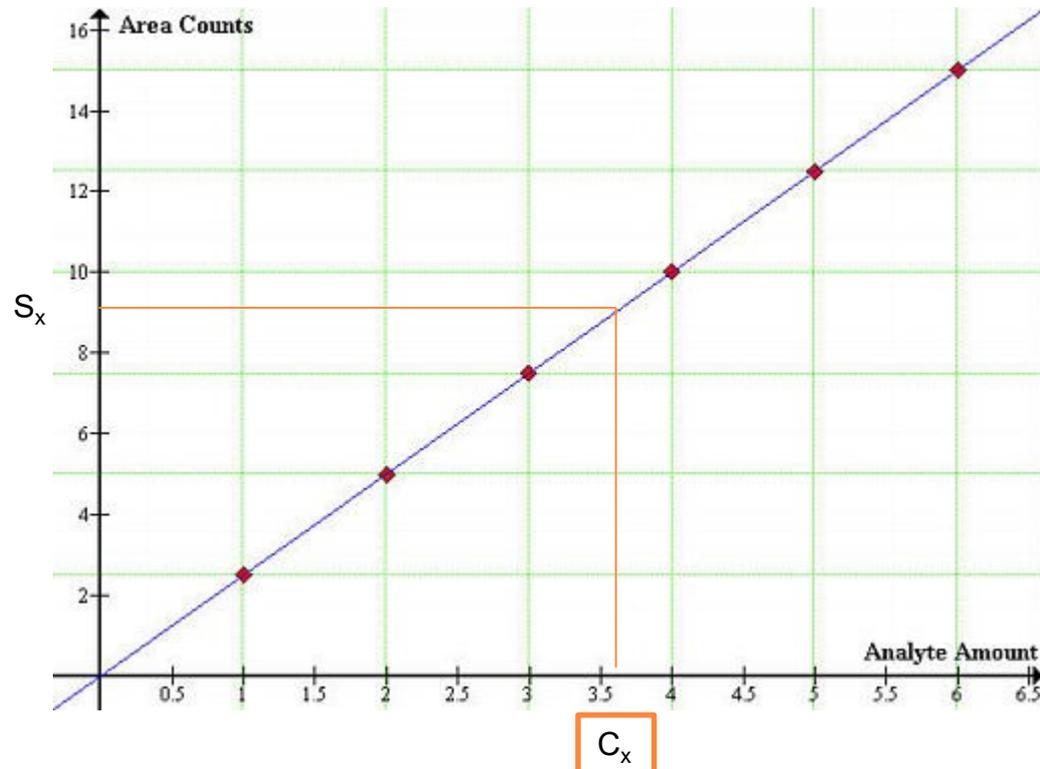
$$C_x\% : (S_x \times f) = 100 : (S_{tot} \times f)$$

$$C_1\% : 8416 = 100 : 36275$$

$$C_1\% = \frac{8416 \times 100}{36275} = 23.2\%$$

## Standardizzazione esterna

- Metodo della retta di taratura
- Bisogna conoscere la sostanza da determinare perché si devono avere a disposizione campioni a concentrazione nota



## Taratura diretta

- Quando è stata verificata la linearità tra area e concentrazione (standardizzazione esterna) si può anche fare un confronto diretto tra l'area del picco della sostanza a conc. incognita con quella del picco della stessa sostanza a concentrazione nota

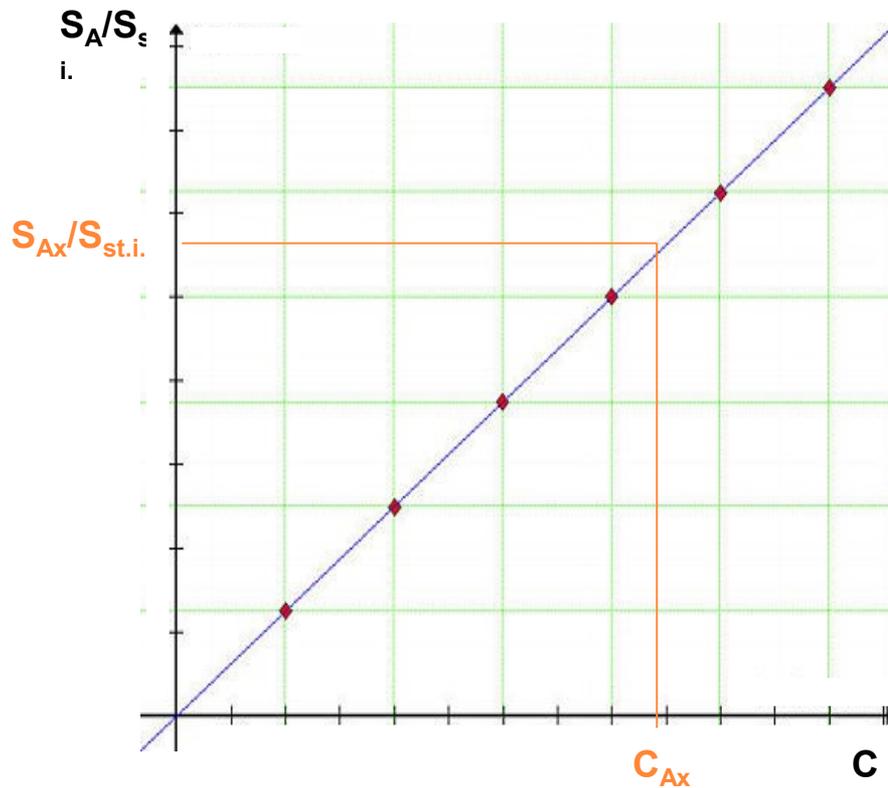
$$C_x : S_x = C_{st.x} : S_{st.x}$$

$$C_x = \frac{S_x \times C_{st.x}}{S_{st.x}}$$

## Standardizzazione interna

- Non si fa riferimento al picco dell'analita, ma al rapporto fra l'area di questo e l'area dello standard interno
- Standard interno, sostanza aggiunta alla miscela in quantità nota:
  - Non presente nella miscela da analizzare
  - Picco ben risolto
  - Tempo di ritenzione simile all'analita
  - Concentrazione simile all'analita
  - Non reagisce col campione
  - Risposta omogenea al rivelatore
- Essendo dentro il campione, lo standard interno subirà le stesse perdite della sostanza in esame
- Utile quando ci sono problemi di riproducibilità (**iniezioni di piccoli campioni, estrazioni**)
- Si preparano le rette di taratura aggiungendo lo standard interno sia al campione incognito che a tutte le soluzioni a concentrazione nota di analita, ovviando ai problemi di riproducibilità

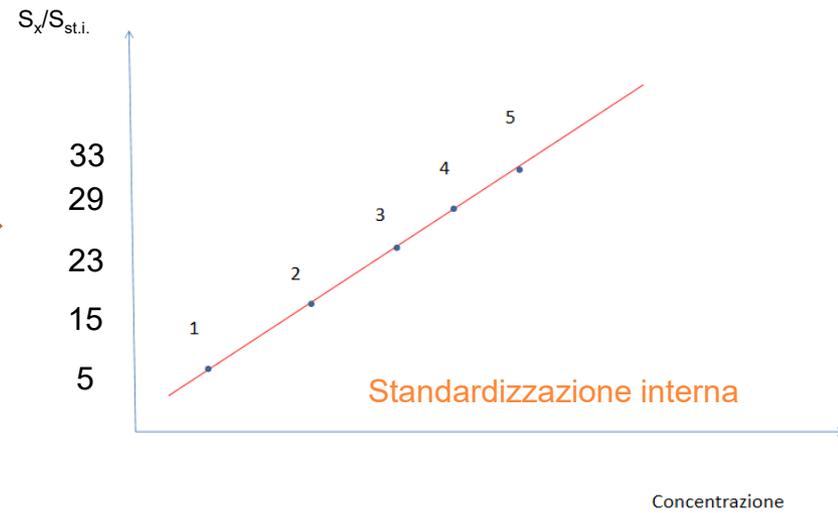
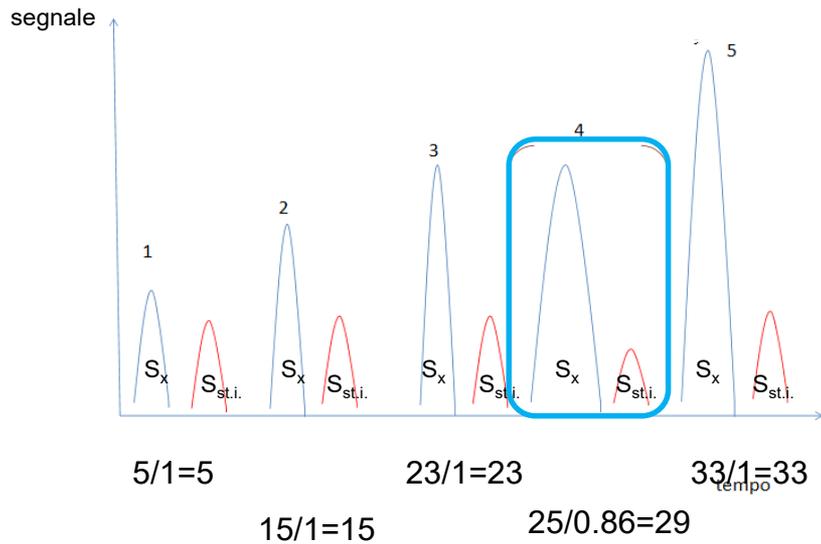
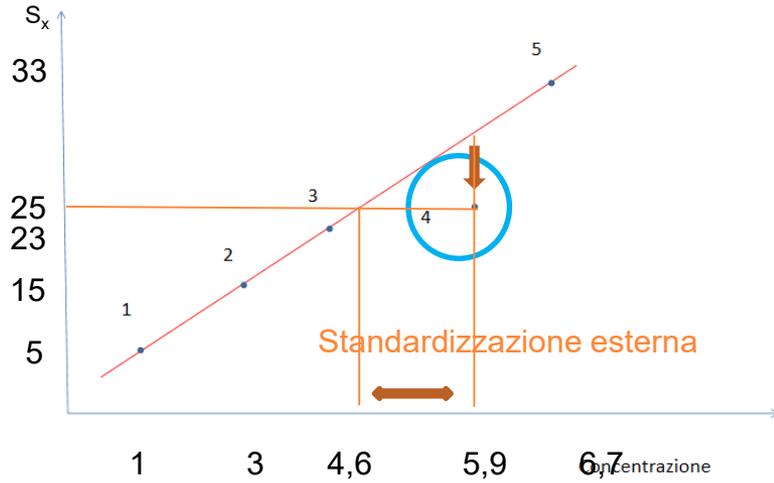
## Standardizzazione interna

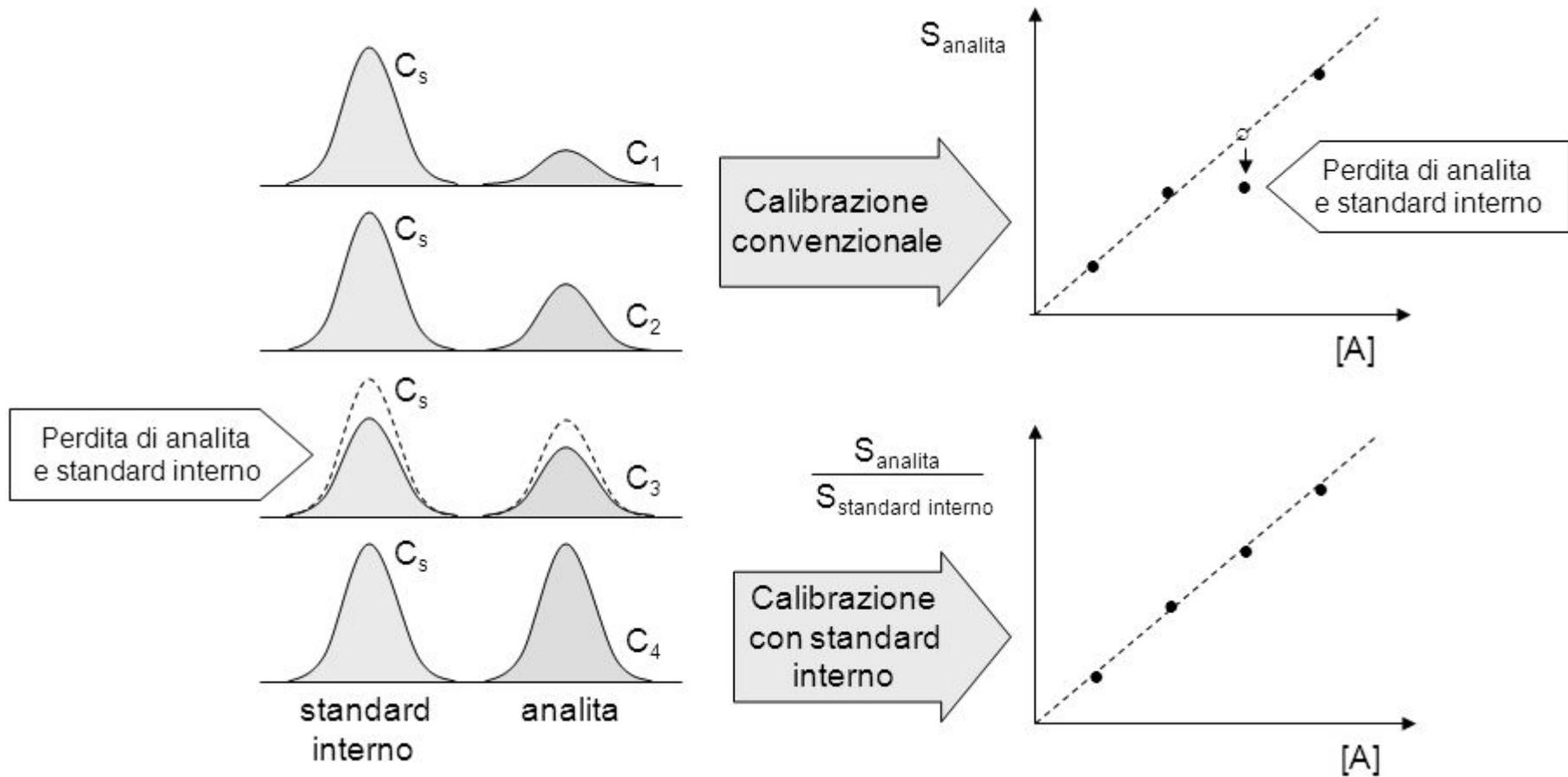


Se invece è già noto il fattore di risposta rispetto allo standard interno si potrà applicare direttamente la formula

$$\frac{S_{Ax} \times f_{Ax}}{C_{Ax}} = \frac{S_{st.i.}}{C_{st.i.}} \quad f_{st.i.} = 1$$

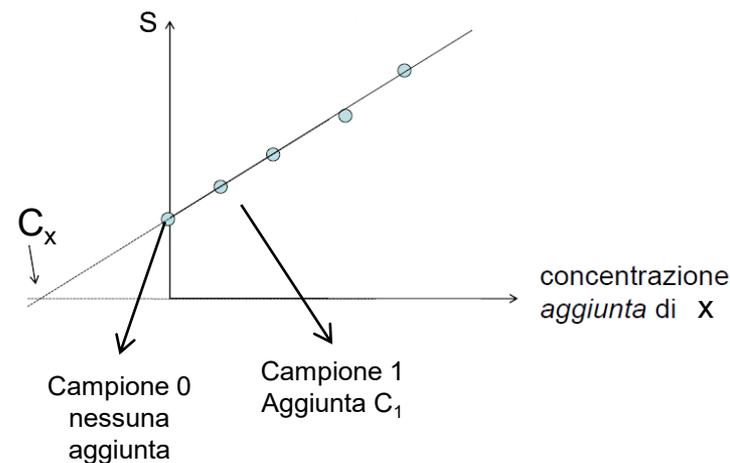
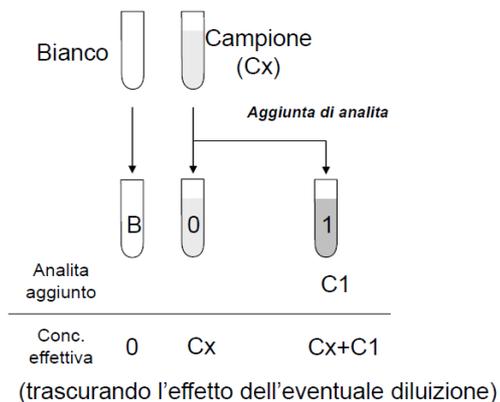
$$C_{Ax} = f_{Ax} C_{st.i.} \frac{S_{Ax}}{S_{st.i.}}$$





## Aggiunta multipla

- L'area del picco dell'analita viene confrontata a quella registrata in seguito ad una aggiunta multipla di quantità nota di analita
- Applicato per matrici complesse



# METODI CROMATOGRAFICI

## GAS CROMATOGRAFIA

## CROMATOGRAFIA LIQUIDA

GSC

GLC

elektroforesi

LSC

LLC

CR. DI  
SCAMBIO  
IONICO

CR. DI  
ESCLUSIONE  
MOLECOLARE

CR. DI  
AFFINITÀ

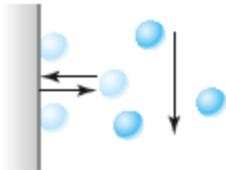
Gel filtrazione

Gel permeazione

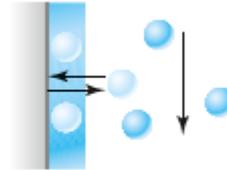
- Cr. planare
- Cr. su colc
- HPLC

# Meccanismi chimico-fisici della separazione cromatografica

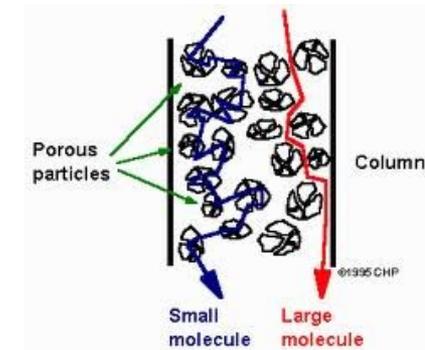
## ADSORBIMENTO



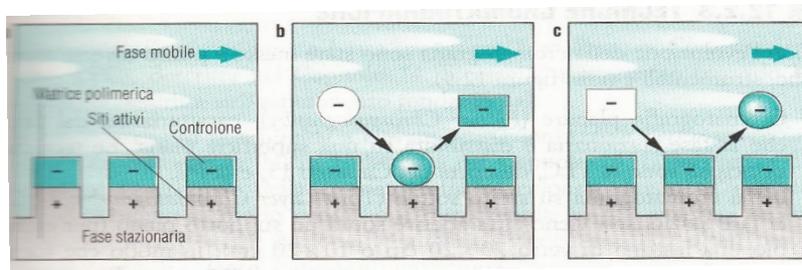
## RIPARTIZIONE



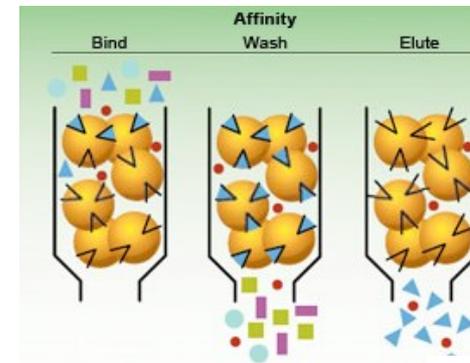
## ESCLUSIONE



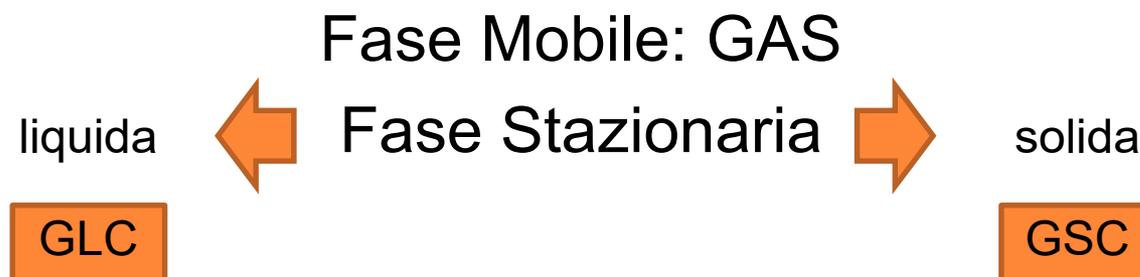
## SCAMBIO IONICO



## AFFINITÀ

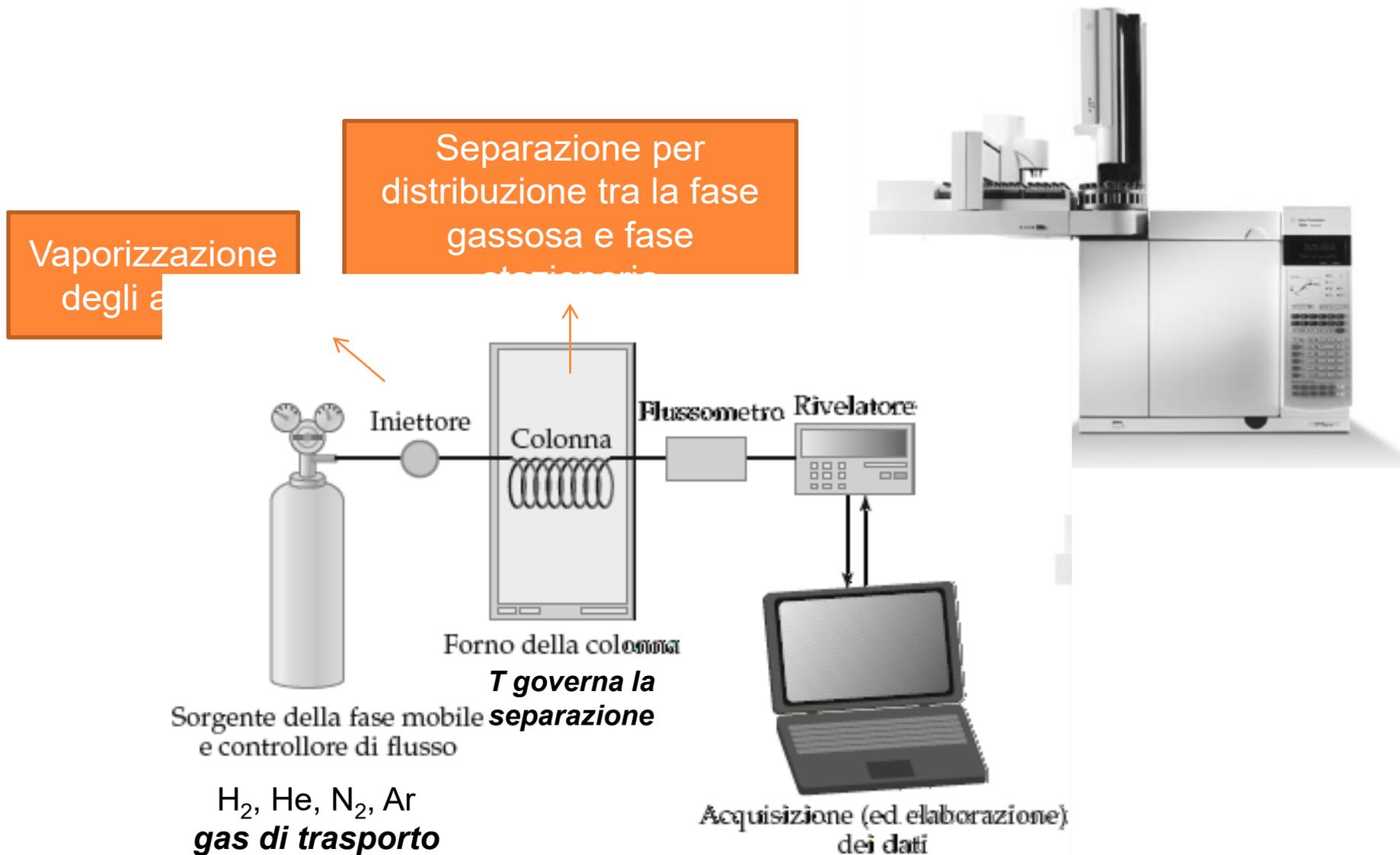


# GAS-CROMATOGRAFIA



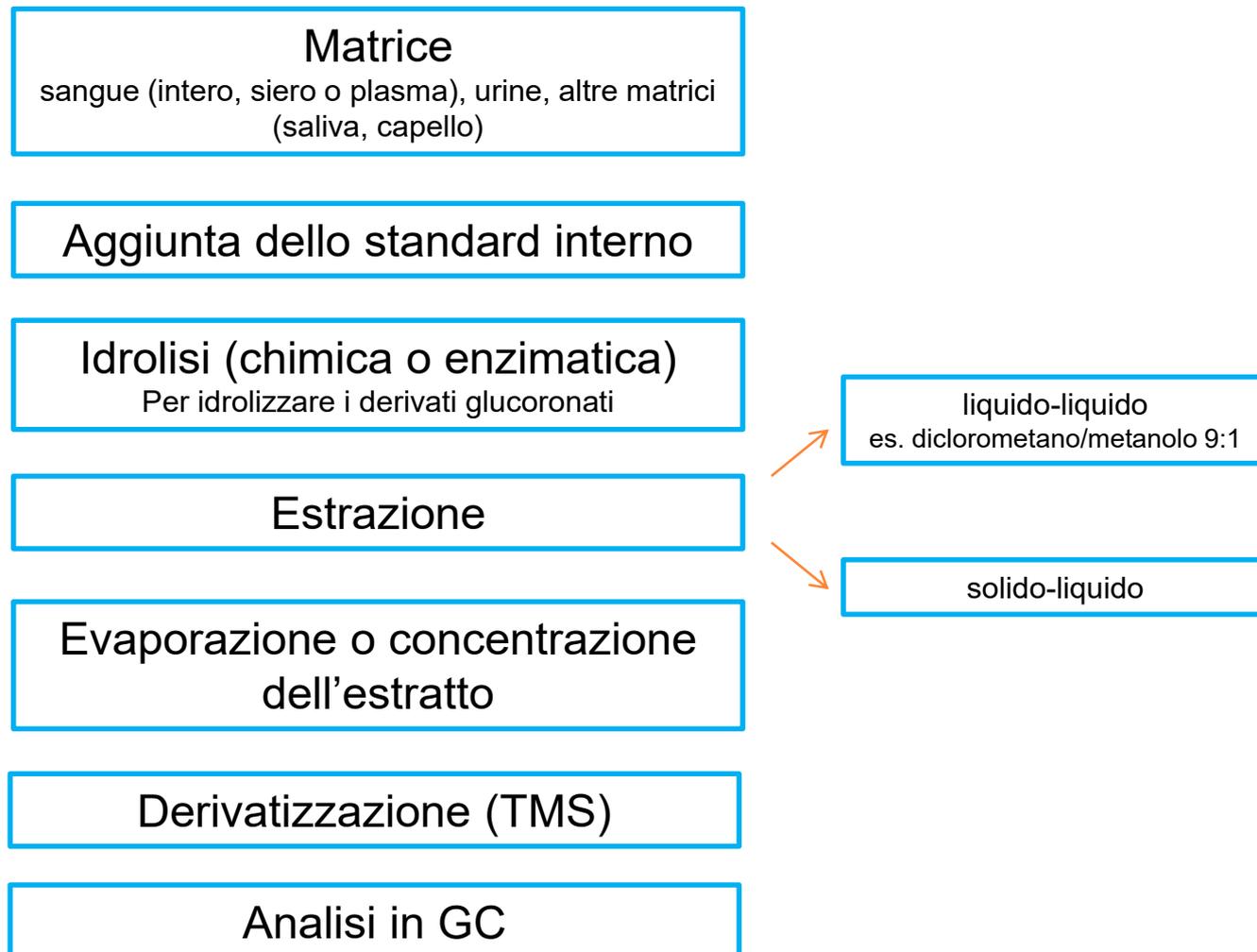
Requisiti degli analiti per poter essere separati in GC:

- Devono poter essere vaporizzati per via termica e a pressione ambiente
- Devono essere stabili termicamente



# Applicazioni della GC

## Ricerca degli oppiacei



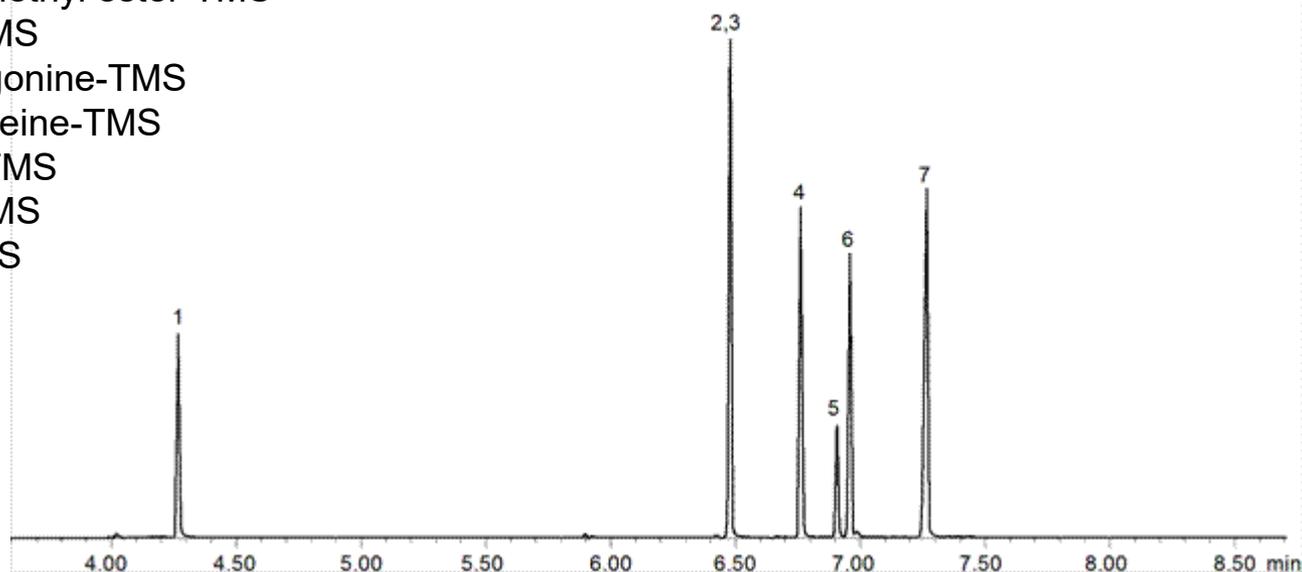
Forno: 50°C per 1 min a 320°C aumentando di 35°C/min

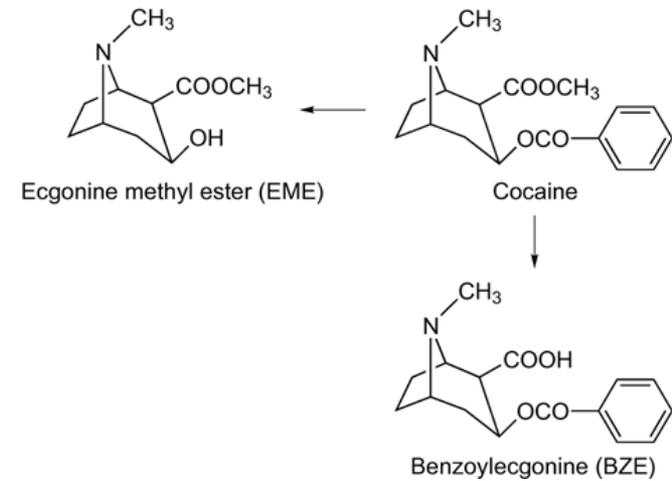
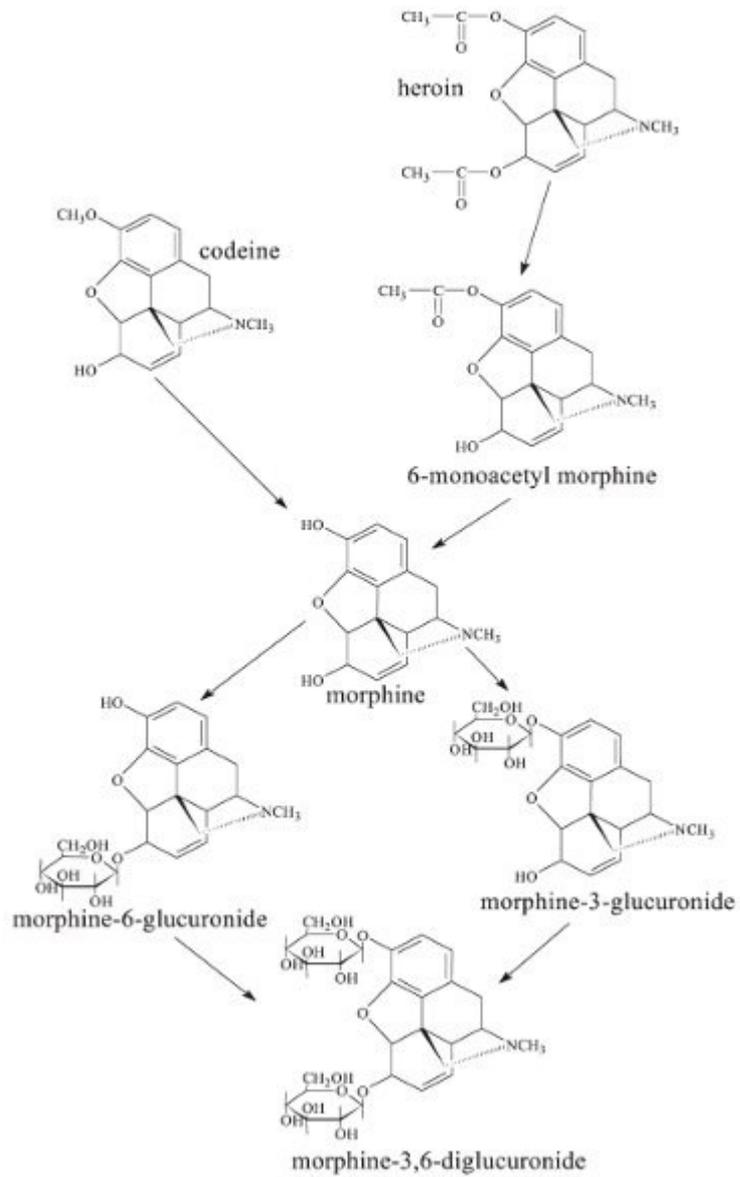
Carrier Gas: Elio, 1.2 mL/min

Iniezione: Splitless :1 1 µL @ 250°C

Detection: Mass Selective (MSD) (320°C) → **Sim mode:** Ecgonine methylester (271), Cocaine (182), Benzoylecgonine (240), Dihydrocodeine (373), Morphine (429), Codeine (371), 6-MAM (299)

- 1 Ecgonine methyl ester-TMS
- 2 Cocaine-TMS
- 3 Benzoylecgonine-TMS
- 4 Dihydrocodeine-TMS
- 5 Morphine-TMS
- 6 Codeine-TMS
- 7 6-MAM-TMS





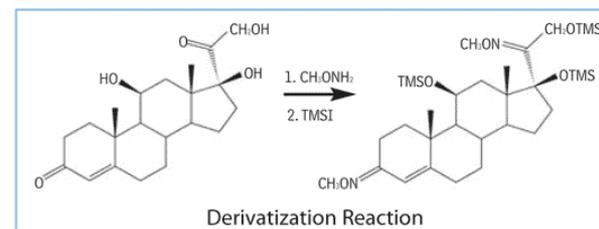
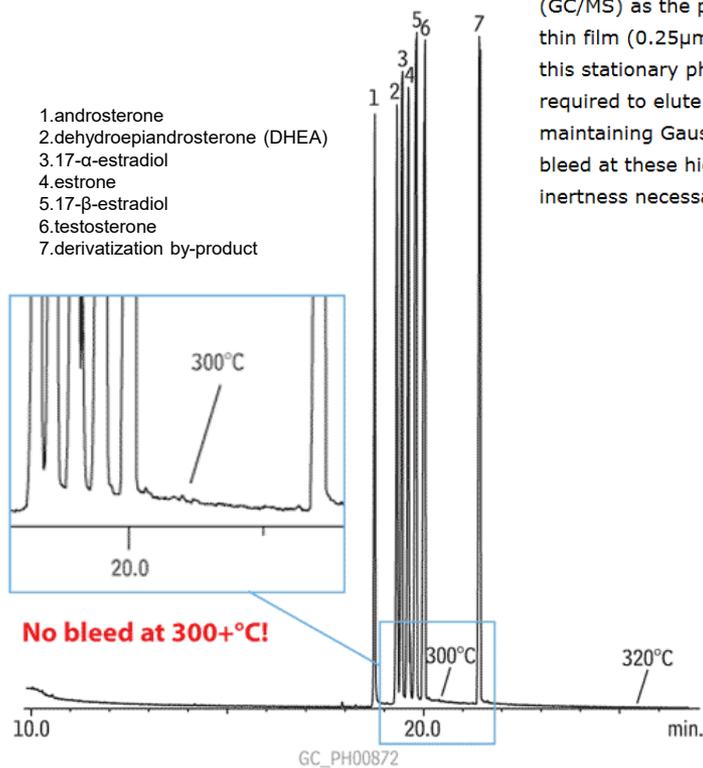
## Rapid Analysis of Steroid Hormones by GC/MS

### Using the New Rxi®-1ms Column

By Kristi Sellers, Clinical/Forensic Innovations Chemist

- Resolve 6 common steroid hormones in less than 25 minutes.
- Ultra-low bleed column greatly reduces background interferences.
- Stable performance at 300°C or above.

Determinations of urinary steroid hormones are widely used for diagnosing and monitoring many health conditions, including bio-identical hormone replacement, menopause, Cushing's syndrome, Addison's disease, adrenal fatigue, and others.<sup>1</sup> Many clinical laboratories use gas chromatography and mass spectrometry (GC/MS) as the primary analytical method for identification and quantification. A capillary GC column with a thin film (0.25µm or less) of 100% dimethylpolysiloxane is the column of choice for many analysts, because this stationary phase has the highest operating temperature available. Temperatures exceeding 300°C are required to elute the high molecular weight (250-400 Dalton) hormones in a reasonable analysis time while maintaining Gaussian peak shape and resolution. A phase film thickness of 0.25µm or less minimizes column bleed at these high temperatures. Also, in order to provide reliable quantification, the column must exhibit the inertness necessary to produce symmetric peaks and reproducible results.



# Cromatografia liquida

## Metodi cromatografici

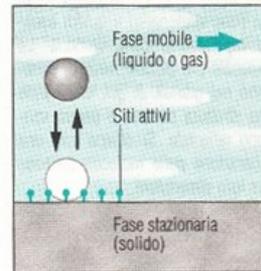
- LSC
- LLC
- Scambio ionico
- Esclusione molecolare
- Affinità

## Tecniche cromatografiche

- TLC
- Cromatografia su colonna
- HPLC

# LSC, *liquid solid chromatography*

Il meccanismo della separazione cromatografica si basa sull'**adsorbimento**.



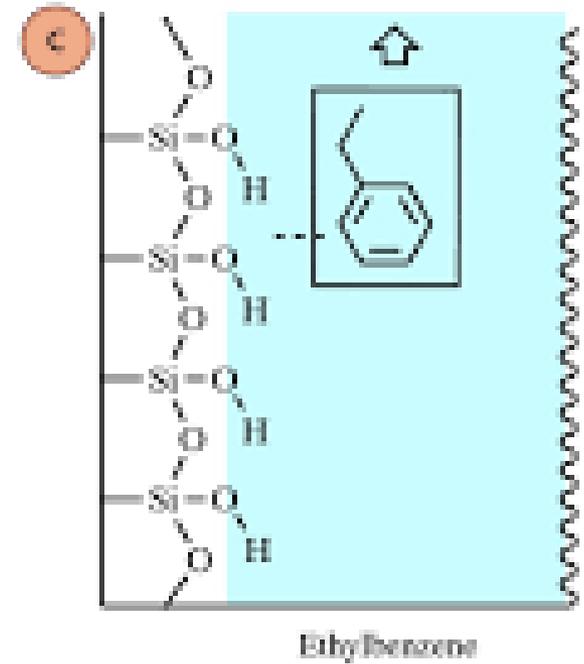
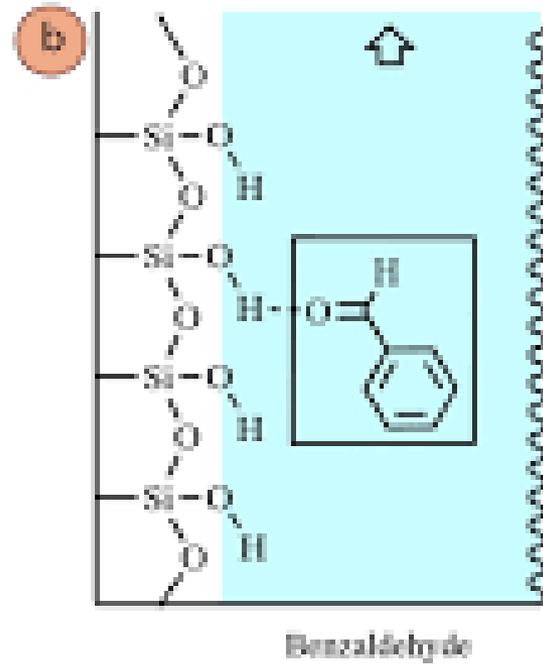
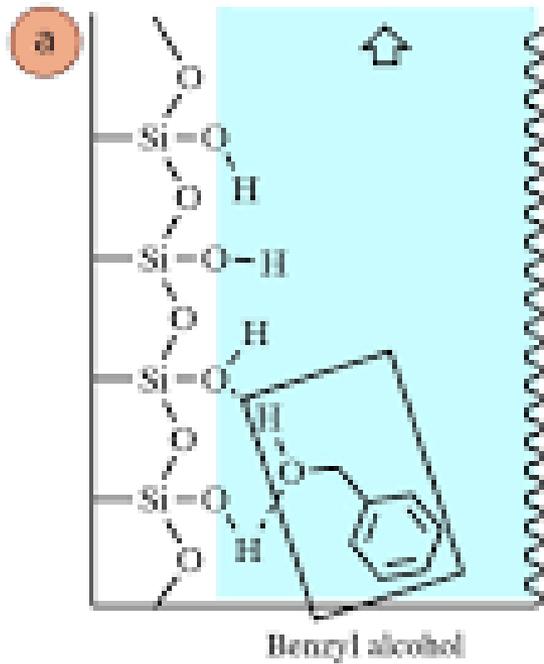
FASE STAZIONARIA: gel di silice, allumina

FASE MOBILE: solitamente un solvente organico, spesso in miscela generalmente formata da un solvente polare e uno apolare.

## SERIE ELUOTROPICA

È una lista di solventi in ordine di **forza eluente** ( $\epsilon$ ) per un dato adsorbente (f.s.). In cromatografia di adsorbimento la forza eluente esprime la capacità di un solvente di spiazzare l'analita dalla fase stazionaria.



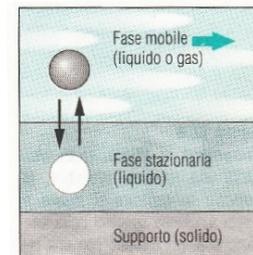


# Metodi di eluizione in cromatografia liquida

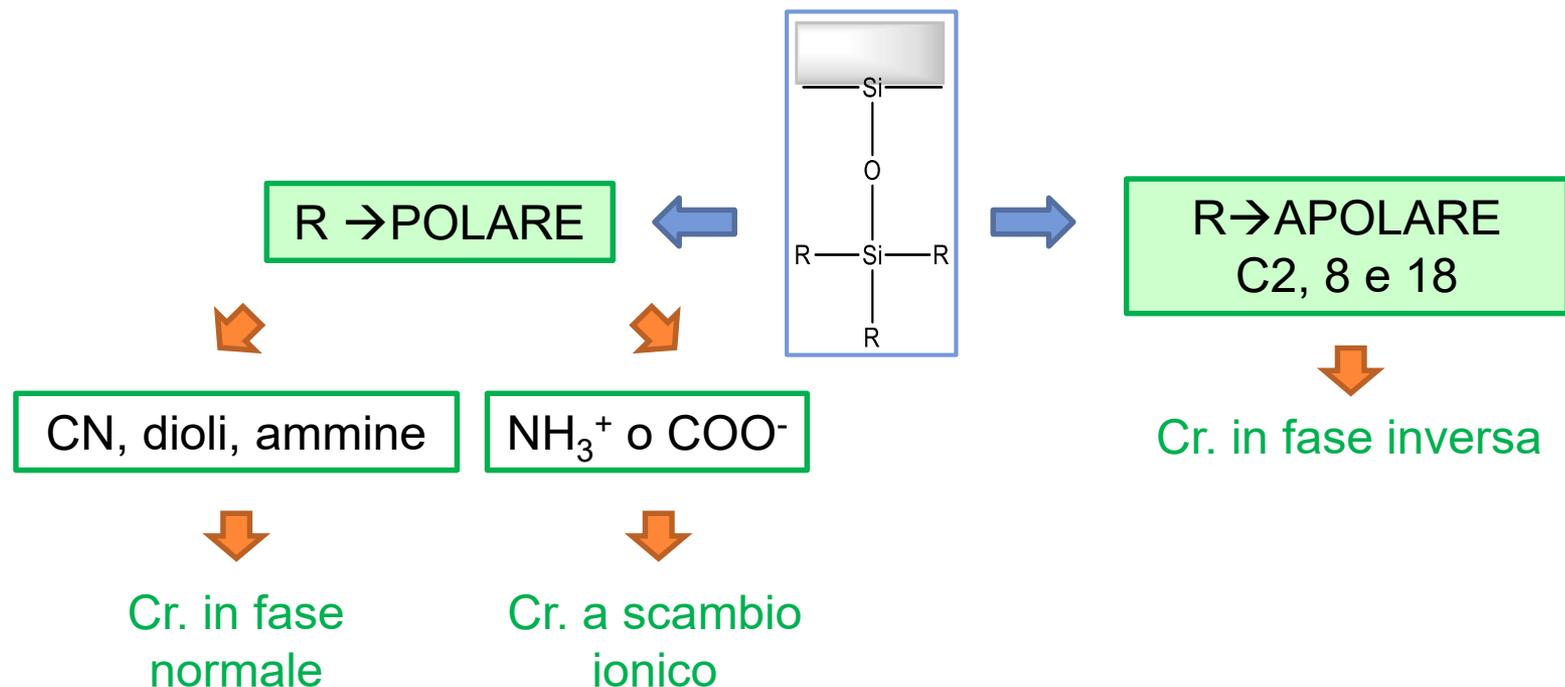
- **Eluizione isocratica**, eluente a composizione costante (solvente puro o miscela di più solventi)
- **Eluizione a gradiente**, si varia in modo continuo la polarità dell'eluente, aumentandone la forza eluotropica

# LLC, *liquid liquid chromatography*

Il meccanismo della separazione cromatografica si basa sulla **ripartizione**: il soluto si distribuisce tra le due fasi (f.s. e f.m.), secondo il coefficiente di ripartizione,  $K_D$ .



**Fase stazionaria:** sono **fasi legate** cioè la f.s. liquida è legata chimicamente al supporto (gel di silice).



Cromatografia in fase normale



FASE STAZIONARIA POLARE

FASE MOBILE APOLARE

Cromatografia in fase inversa



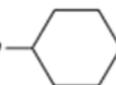
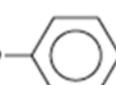
FASE STAZIONARIA APOLARE

FASE MOBILE POLARE

#### Cromatografia liquida In fase normale (NPLC)

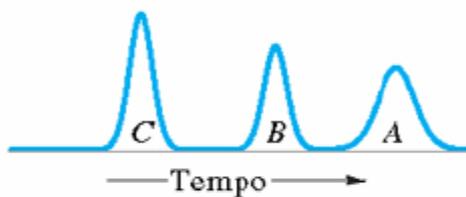
Nome della fase stazionaria	Abbreviazione	Struttura
Fase cianopropilica	CN	Supporto-CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CN
Fase aminopropilica	NH <sub>2</sub>	Supporto-CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> NH <sub>2</sub>
Fase diolica	Diol	Supporto-(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> OCH <sub>2</sub> CH(OH)CH <sub>2</sub> (OH)

#### Cromatografia liquida In fase Inversa (RPLC)

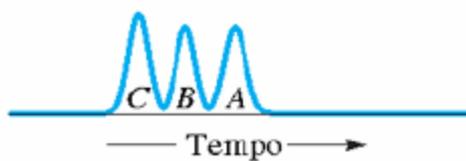
Nome della fase stazionaria	Abbreviazione	Struttura
Fase ottadecilica	C <sub>18</sub>	Supporto-(CH <sub>2</sub> ) <sub>17</sub> CH <sub>3</sub>
Fase ottilica	C <sub>8</sub>	Supporto-(CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> CH <sub>3</sub>
Fase cicloesilica	CH	Supporto- 
Fase fenilica	PH	Supporto- 

## Cromatografia in fase normale (NPC)

Fase mobile a bassa polarità

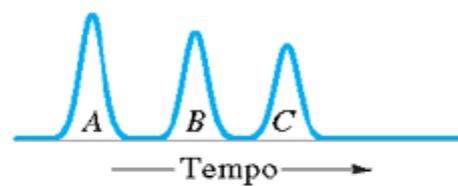


Fase mobile a media polarità

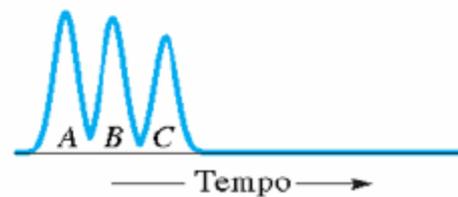


## Cromatografia in fase inversa (RPC)

Fase mobile ad alta polarità



Fase mobile a media polarità



Polarità dei soluti:  $A > B > C$

## Fase mobile

- **Fase normale.** Stesse della LSC
- **Fase inversa.** Polare. Fasi acquose miscelate con quantità variabili di solventi organici miscibili, detti *modificatori organici*.

Sarà necessario usare tamponi a specifici pH se si hanno soluti con caratt. acido-base:

- Acidi, pH fase mobile  $<$  a 2 unità della sua  $pK_a$
- Basi, pH fase mobile  $>$  a 2 unità della sua  $pK_a$

Serie eluotropica per LC in fase inversa

- **Acqua** **›** **Metanolo** **›** **Acetonitrile** **›** **Dietiletere** **›** **Toluene** **›** **Pentano** **+**

*Forza eluente*

## Vantaggi della cromatografia a fase inversa

- Attualmente è la tecnica più utilizzata in HPLC
- La fase mobile è prevalentemente a base di acqua quindi economica
- I campioni acquosi (materiali biologici) possono essere facilmente iniettati direttamente con la fase mobile

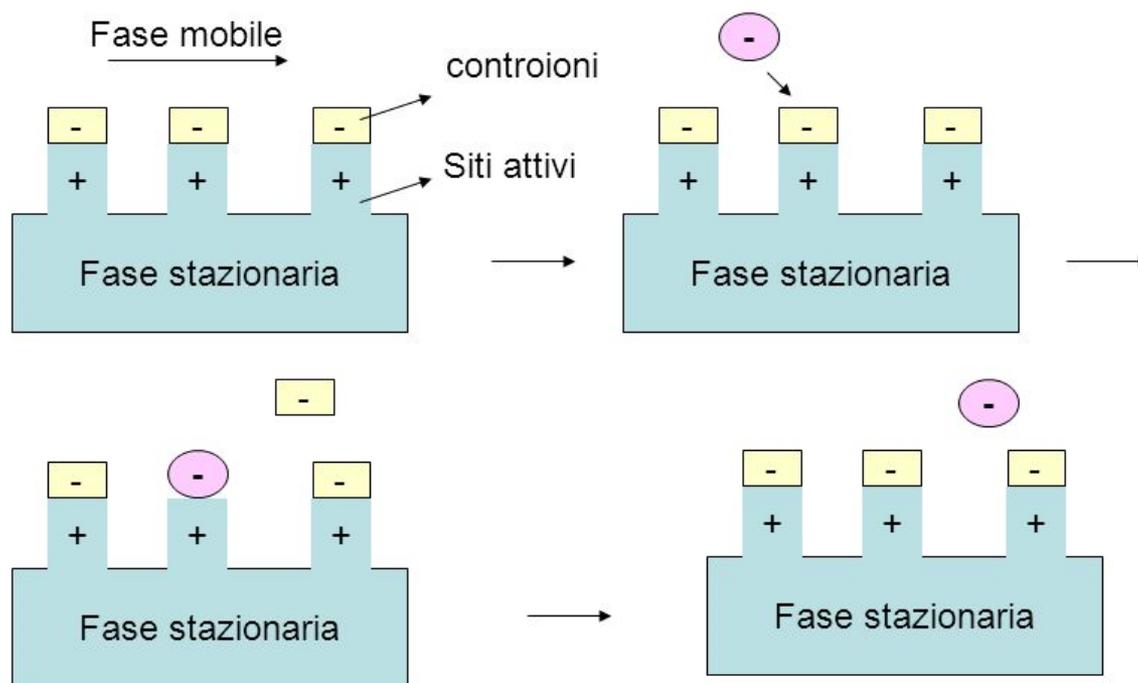
**TABELLA 22.5 Applicazioni comuni della cromatografia  
liquida in fase inversa**

<b>Area</b>	<b>Analiti</b>
Biochimica	Aminoacidi, proteine, carboidrati, lipidi
Chimica clinica	Farmaci, metaboliti dei farmaci, acidi biliari, aminoacidi
Chimica forense	Farmaci, veleni, alcol, narcotici
Chimica farmaceutica	Antibiotici, sedativi, steroidi, analgesici

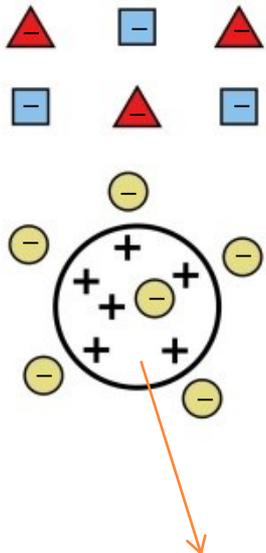
# Cromatografia a scambio ionico

## IEC, *ion exchange chromatography*

- Per separare composti ionici, ionizzabili o che possono interagire con gruppi ionici (chelati)
- Fase stazionaria: *scambiatore ionico*

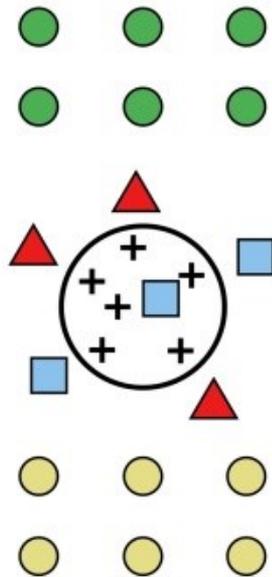
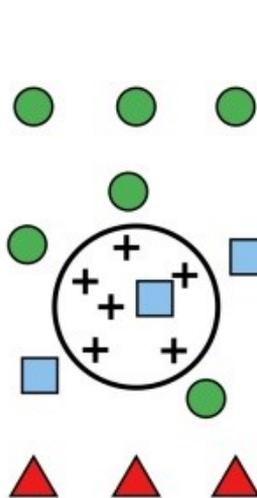
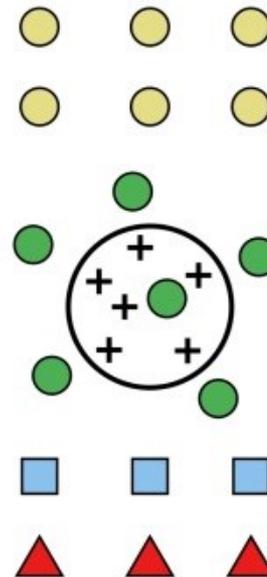


## 1. Initial stage

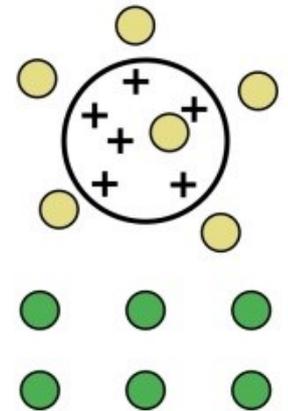


Resina  
cationica

 Counterions in  
the initial buffer

2. Adsorption  
of target3. Starting of  
elution4. End of  
elution

## 5. Regeneration



  Different ions in the sample

 Ions in the  
gradient

# Resine a scambio ionico

## Cromatografia a scambio cationico

Nome	Tipo di scambiatore	Struttura
Acido solfonico	Acido forte	Supporto-SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> H <sup>+</sup>
Solfoetile (SE)	Acido forte	Supporto-O(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> H <sup>+</sup>
Solfopropile (SP)	Acido forte	Supporto-O(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> H <sup>+</sup>
Acido carbossilico	Acido debole	Supporto-COO <sup>-</sup> H <sup>+</sup>
Carbossimetile	Acido debole	Supporto-OCH <sub>2</sub> COO <sup>-</sup> H <sup>+</sup>

## Cromatografia a scambio anionico

Nome	Tipo di scambiatore	Struttura
Ammonio quaternario	Base forte	Supporto-CH <sub>2</sub> N(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> <sup>+</sup> Cl <sup>-</sup>
Trietilaminoetile (TEAE)	Base forte	Supporto—O(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> N <sup>+</sup> (CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> Cl <sup>-</sup>
Dietil(2-idrossipropil)aminoetil (QAE)	Base forte	Supporto—O(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> N <sup>+</sup> (CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CHOHCH <sub>3</sub> Cl <sup>-</sup>
Dietilaminoetil (DEAE)	Base debole	Supporto—O(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> NH <sup>+</sup> (CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> Cl <sup>-</sup>
<i>p</i> -Aminobenzil (PAB)	Base debole	Supporto—OCH <sub>2</sub> —  —NH <sub>3</sub> <sup>+</sup> Cl <sup>-</sup>

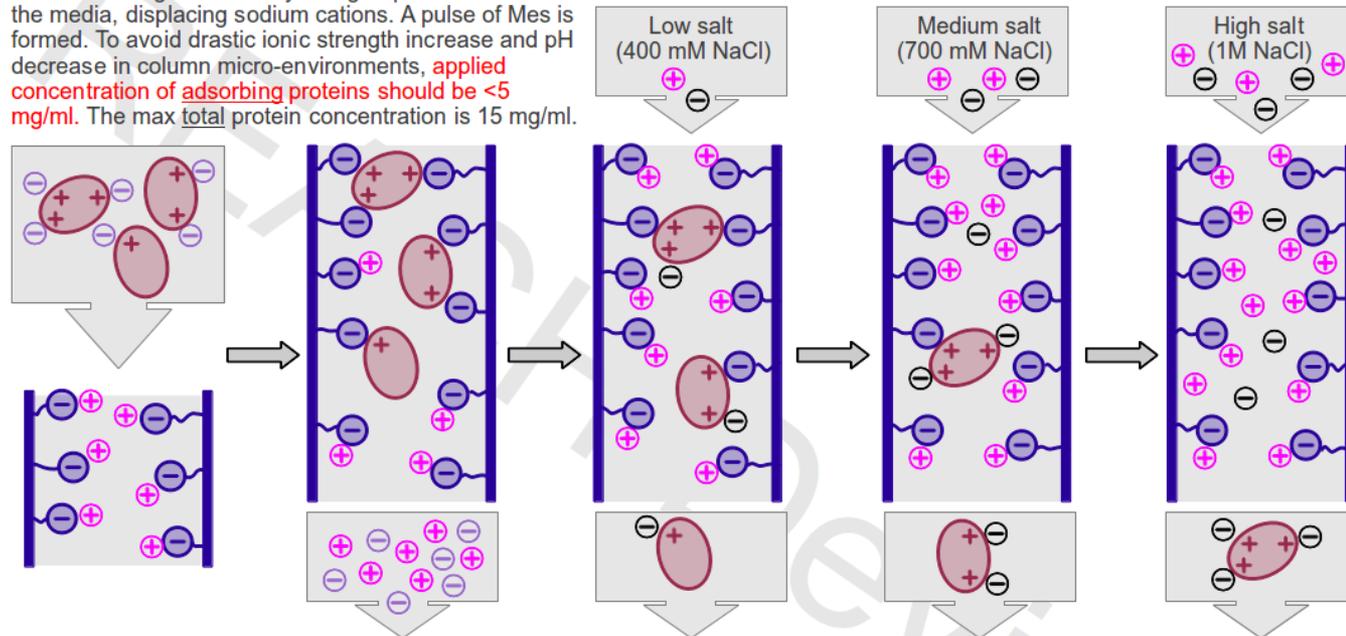
**Fase mobile.** Soluzioni acquose saline oppure solventi organici.

*Eluizione a gradiente salino:* aumentare la concentrazione del tampone salino nel tempo per favorire l'eluizione dell'analita.

# Purificazione delle proteine mediante IEC

A mixture of proteins in Mes buffer is loaded into the cation exchanger. Positively charged proteins adsorb to the media, displacing sodium cations. A pulse of Mes is formed. To avoid drastic ionic strength increase and pH decrease in column micro-environments, **applied concentration of adsorbing proteins should be <5 mg/ml**. The max total protein concentration is 15 mg/ml.

Proteins are eluted with increasing salt (NaCl) gradient

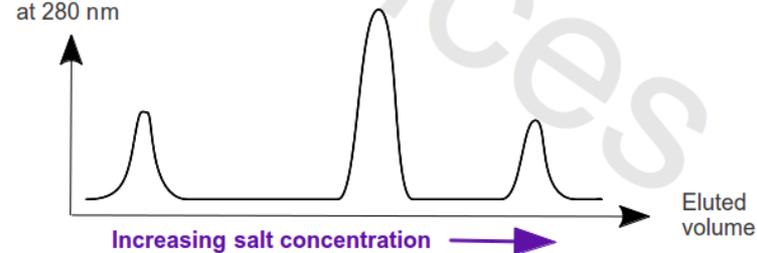


## Legend:

- ⊕ – Sodium cation,  $\text{Na}^+$
- ⊖ – Mes anion, C1CCN(CC1)CC(=O)O
- ⊖ – Chloride anion,  $\text{Cl}^-$
- ⊖ – Carboxymethyl anion (CM),  $\text{R}-\text{C}(\text{H}_2)-\text{C}(=\text{O})\text{O}^-$
- ⊕⊕ – Protein bearing a number of positive charges (as marked)

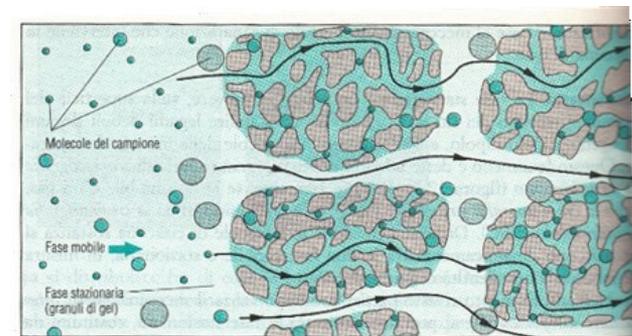
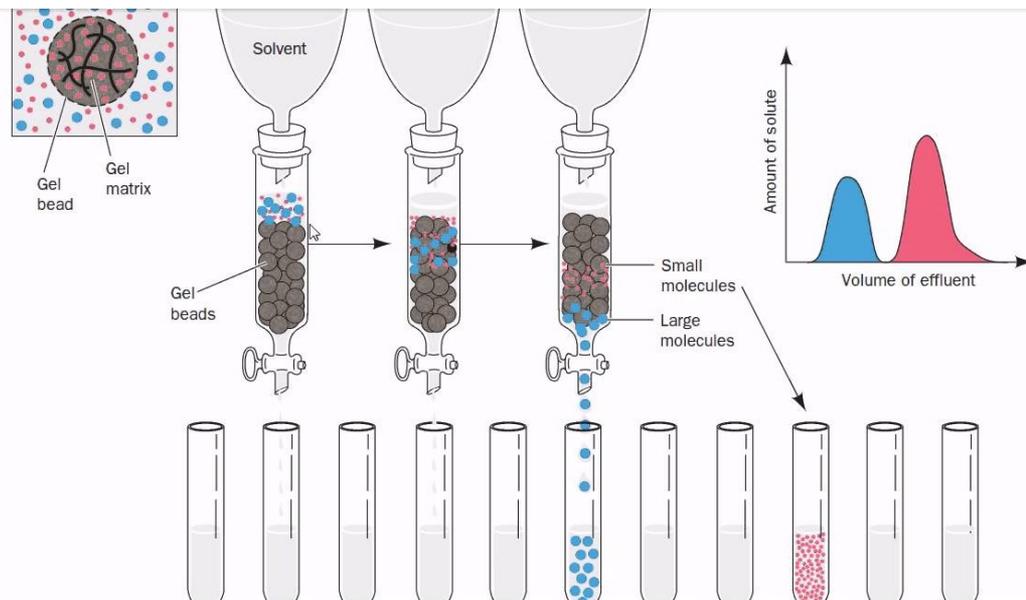
UV  
Absorbance  
at 280 nm

Elution profile:



# Cromatografia ad esclusione molecolare SEC, *size exclusion chromatography*

- Separazione in base alle dimensioni molecolari, che nel caso di serie omologhe si collega al PM.
- Perciò la tecnica si adatta particolarmente allo studio di polimeri sintetici e naturali (proteine, acidi nucleici, carboidrati).



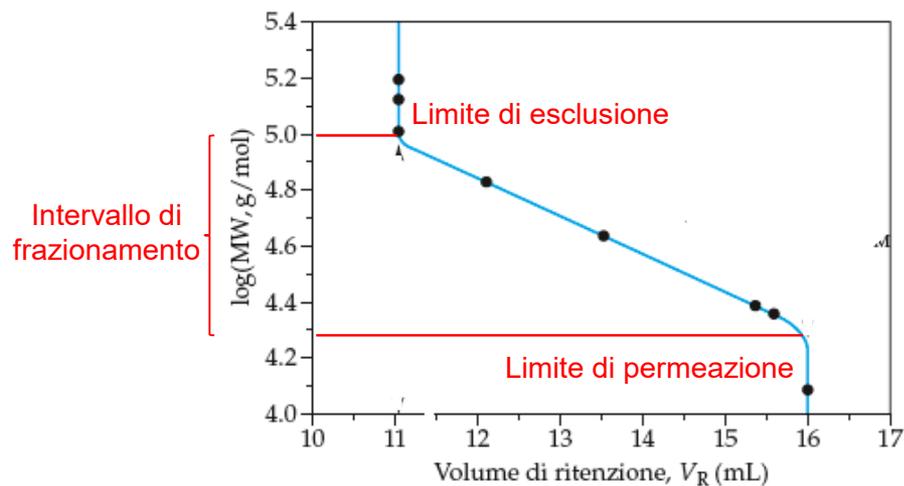
<https://www.youtube.com/watch?v=oV5VB5kO3tQ>

Fase solida fatta da un materiale polimerico altamente poroso (gel) inerte in cui si fa passare il campione in soluzione



## PROPRIETÀ DI UN GEL

- Limite di esclusione
- Limite di permeazione
- Intervallo di frazionamento



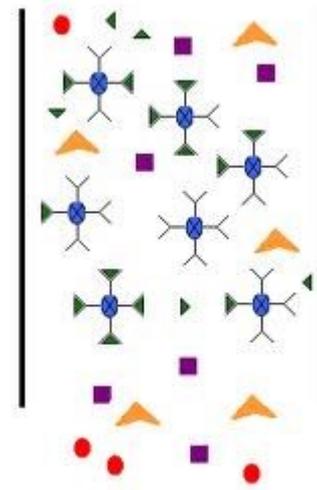
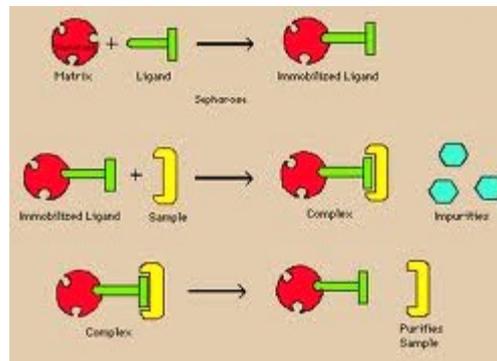
Il diametro dei pori del gel determina l'intervallo di frazionamento

TABELLA 22.7 Relazione tra dimensione dei pori e massa molare delle proteine separate mediante cromatografia di esclusione dimensionale\*

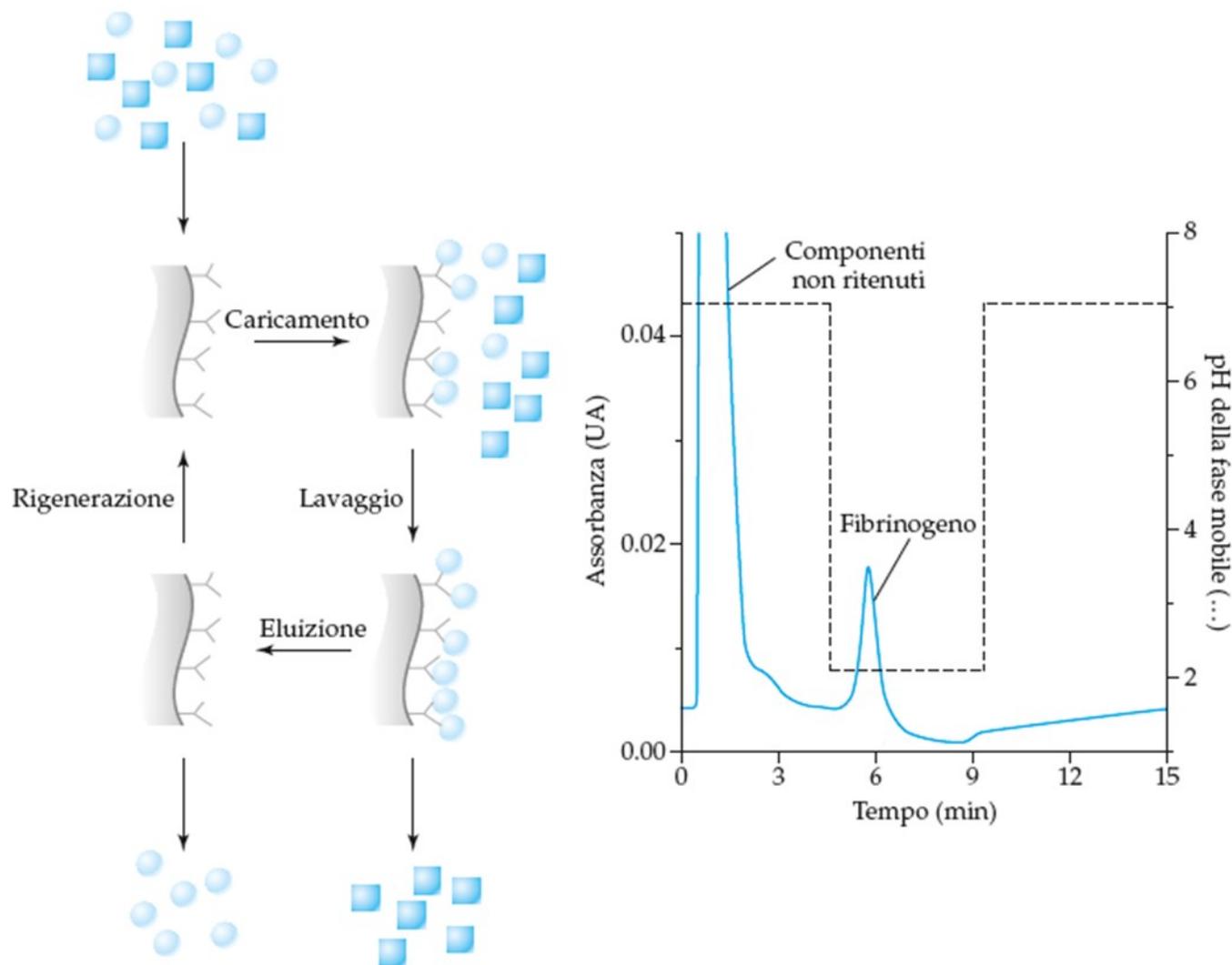
Diametro medio dei pori (nm)	Massa molare della proteina (Da)
5.0	100-10,000
12.5	500-80,000
50	1,000-700,000
100	40,000-5,000,000

# Cromatografia d'affinità

- È una tecnica di filtrazione selettiva. Fondamentale in separazioni biotecnologiche: polisaccaridi, proteine, acidi nucleici, virus e anche cellule.
- La separazione avviene per adsorbimento selettivo, si formano legami specifici e reversibili tra la sostanza da separare e la f.s. mentre il resto della miscela viene eluito.



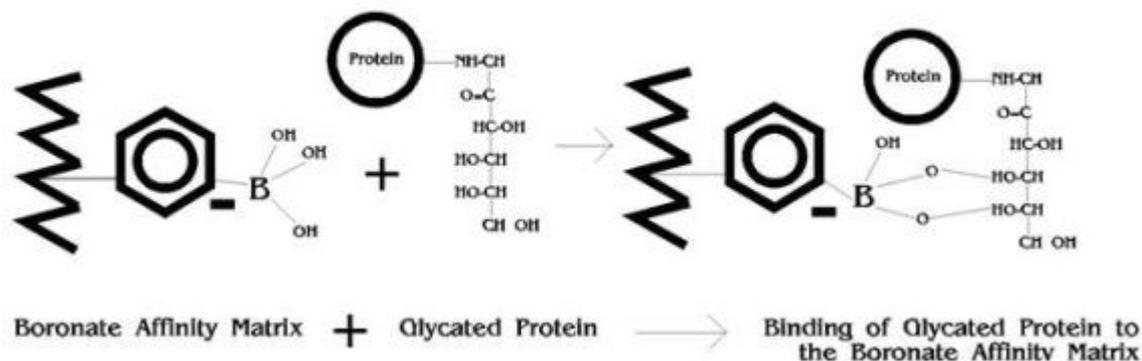
- **Fase stazionaria.** Matrice polimerica reticolata, solitamente un gel, attivata inserendo gruppi con proprietà leganti tramite:
  - legame covalente diretto oppure
  - inserendo uno *spacer* idrocarburico tra f.s. e legante.
- **Fase mobile.** Solventi acquosi tamponati (pH e forza ionica).  
*Eluizione di affinità:* si usa una soluzione molto diluita di una specie che possa competere con la specie da desorbire e si sostituisca ad essa.
- Si possono analizzare quantità discrete di campione.



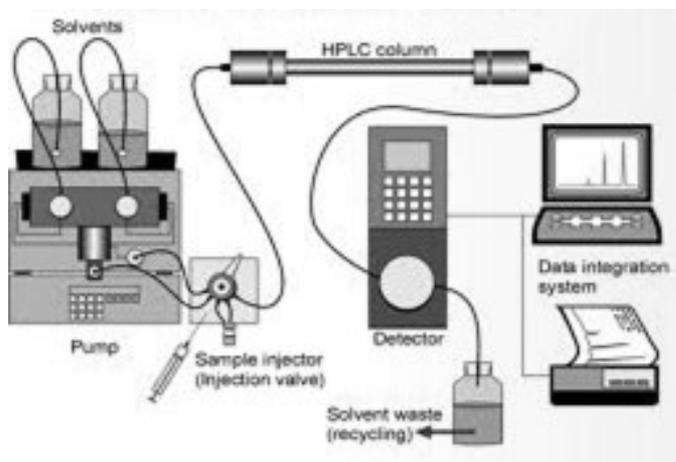
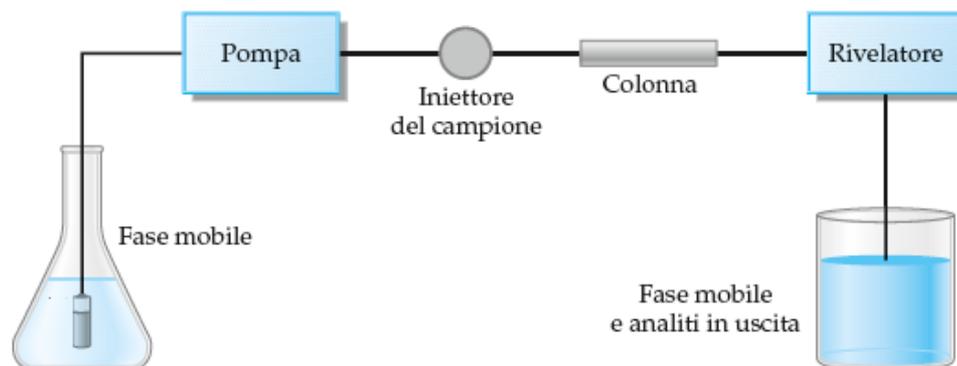
**FIGURA 22.15** La modalità di eluizione "on/off" nella cromatografia di affinità e un tipico esempio di separazione ottenuta con questo metodo. L'esempio illustrato si riferisce all'analisi del fibrinogeno presente nel plasma umano utilizzando anticorpi come ligandi di affinità. La linea tratteggiata descrive il cambiamento di pH della fase mobile che avviene durante questa separazione nel momento in cui si passa dal tampone di applicazione a pH 7 al tampone di eluizione a pH 2. (Adattato su autorizzazione da J. P. McConnell e D. J. Anderson, *Journal of Chromatography*, 615 (1993) 67.)

Ligando di affinità	Sostanze trattenute
<i>Ligandi biologici</i>	
Anticorpi	Antigeni (farmaci, ormoni, peptidi, proteine, virus, componenti cellulari)
Inibitori, substrati, cofattori, coenzimi	Enzimi
Lectine	Zuccheri, glicoproteine, glicolipidi
Acidi nucleici	Acidi nucleici complementari, proteine di legame del DNA/RNA
Proteina A/proteina G	Anticorpi
<i>Ligandi non biologici</i>	
Boronati	Zuccheri, glicoproteine, composti contenenti gruppi diolici
Coloranti triazinici	Proteine ed enzimi che legano nucleotidi
Chelati metallici	Aminoacidi, peptidi e proteine che legano i metalli

#### Affinity Binding of Glycated Protein



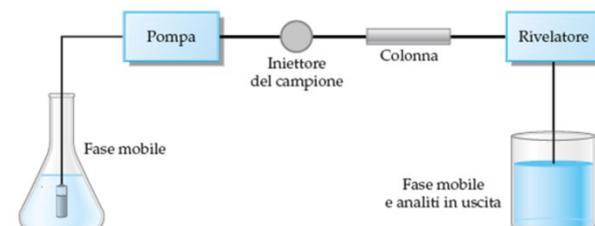
# HPLC *high performance liquid chromatography*



## Cr. in fase liquida ad elevate prestazioni

- Evoluzione della cromatografia su colonna a bassa pressione
- Le alte prestazioni sono garantite da:
  - Velocità:
    - tempi di analisi brevi (possibilità di regolare il flusso della f.m.)
    - possibilità di lavorare in continuo e in maniera automatizzata
  - Alta risoluzione: fase stazionaria con granulometria fine ed omogenea
  - Sensibilità: **rivelatori** ad alta sensibilità (ng)
  - Riproducibilità:
    - **colonne** preimpaccate ad alta P
    - particelle di piccolo diametro ed omogenee
    - **sistemi di iniezione a volume controllato**

Pompe ad elevate P



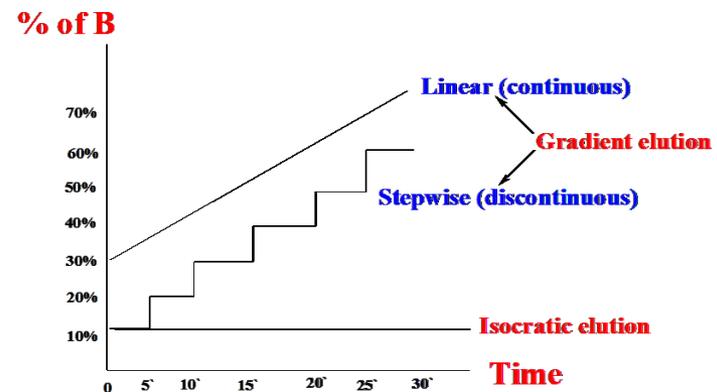
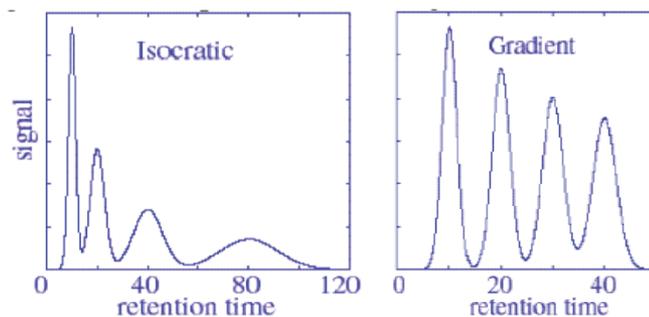
## Fase mobile in HPLC

È la variabile su cui ci si può giostrare maggiormente

- Il campione si deve solubilizzare
- Bassa viscosità
- Permettere in caso il recupero del campione
- Pura
- Non deve modificare la colonna

# Eluizione in gradiente

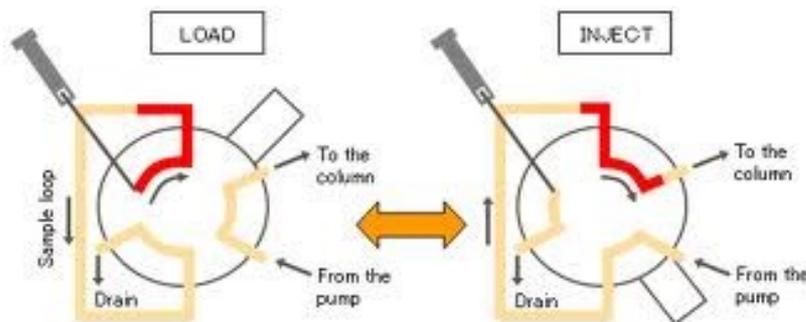
- Quando la separazione viene svolta mantenendo costante la forza eluente, *eluizione isocratica*, i tempi di analisi potrebbero essere molto lunghi per miscele complesse
- *Eluizione in Gradiente*: si cambia la forza eluente della f.m. durante la separazione.



# Iniettori per HPLC

- Sono posti a monte della colonna e permettono di introdurre il campione nella f.m. senza interromperne il flusso.
- *Sample loop*. Valvola di iniezione che possiede un capillare (loop) di volume opportuno in cui viene iniettato il campione mediante siringa.
  - Riproducibilità
  - Cambiando loop si può cambiare il volume di caricamento: da 5  $\mu\text{L}$  a 20 mL.
  - Campioni Liquidi: iniettati direttamente.
  - Campioni Solidi: sciolti nel solvente opportuno.

<https://www.youtube.com/watch?v=7LiS5Va0VwA>



## FILTRI

Per eliminare eventuali particelle solide che potrebbero rovinare la colonna.

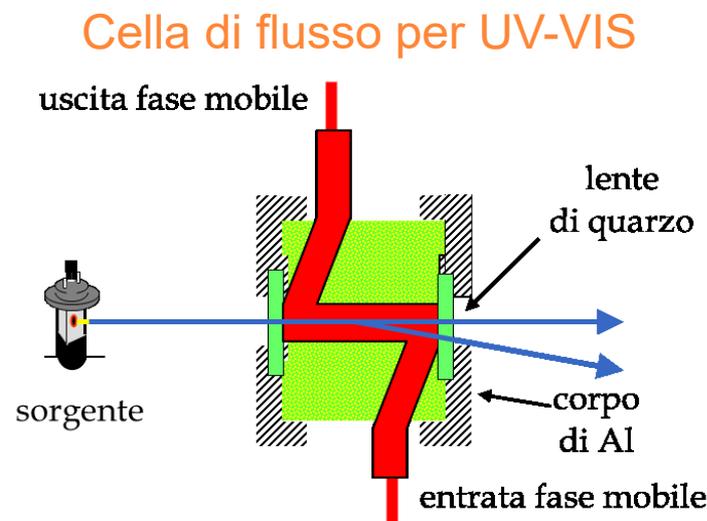


# Rivelatori per HPLC

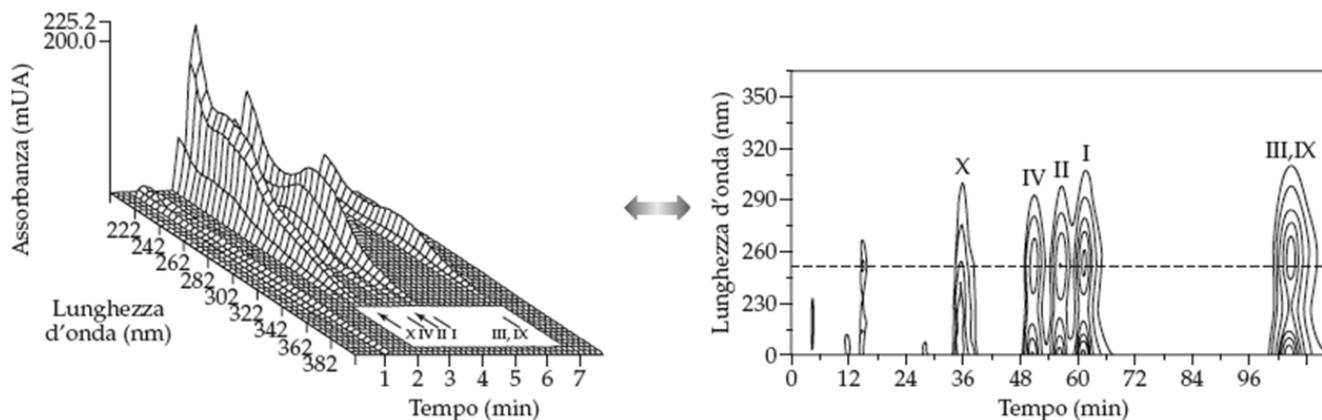
- Selettivi/Universali, sensibilità, intervallo di linearità, ecc.
- Rivelatori delle proprietà di massa o del soluto

## Rivelatori ottici (più utilizzati)

- **Rivelatori UV-VIS.** Per composti contenenti cromofori.
  - Eluizione a gradiente
  - Limite di rivelabilità: 1 pg
  - Scarse informazioni strutturali
  - Ottimi per analisi quantitative



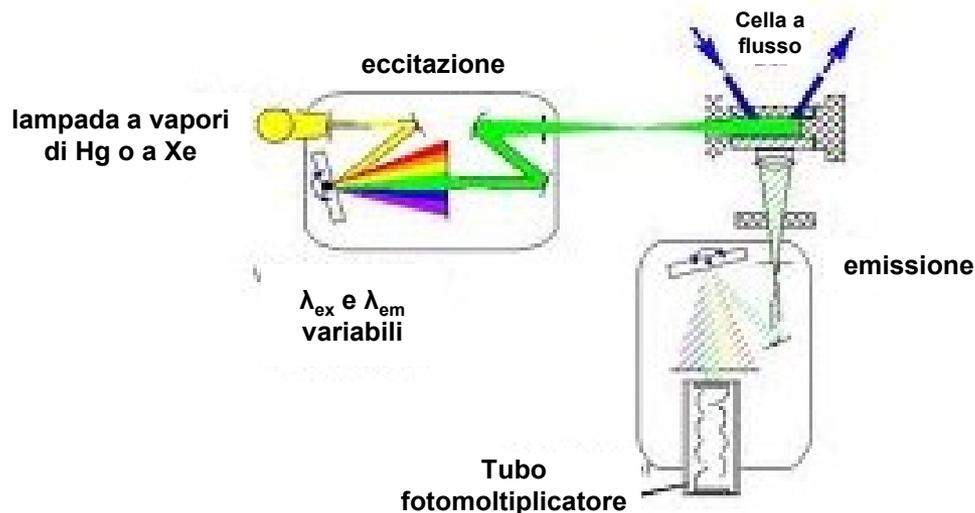
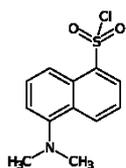
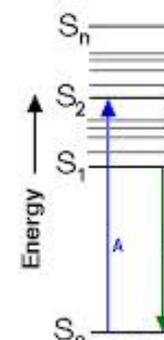
- Rivelatori UV-VIS a lunghezza d'onda fissa
- Rivelatori UV-VIS a lunghezza d'onda variabile
- Rivelatori UV-VIS a serie di diodi



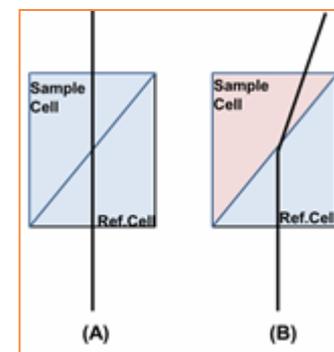
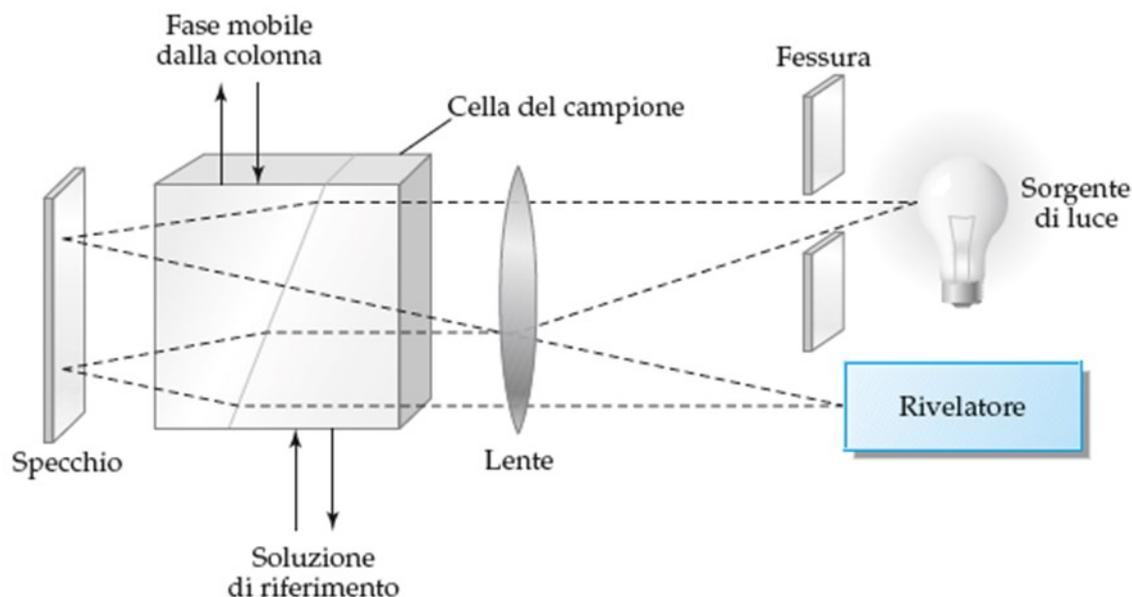
**FIGURA 22.17** Un rivelatore a serie di fotodiodi e un esempio dei dati che possono essere ottenuti con tale rivelatore applicato ad un sistema HPLC. (Lo schema del rivelatore è riprodotto su autorizzazione da S. A. Borman, *Analytical Chemistry*, 55 (1983) 836A–842A; le figure in basso sono riprodotte su autorizzazione da D. G. Jones, *Analytical Chemistry*, 57 (1985) 1057A–1073A.)

- **Fluorimetro.** Misura le radiazioni di fluorescenza emesse da particolari classi di sostanze quando vengono eccitate con radiazioni UV.

- Basso rumore di fondo
  - Specifico per l'analita di interesse
  - Derivatizzazione (Cl di dansile)
  - Ottimo limite di rivelabilità: 1fg
  - Utilizzabile in tutti i solventi dell'UV (no quenching)
  - Compatibile con gradienti di eluizione
  - Indicativo per analisi in campo biologico
- $\lambda_{ex}$  e  $\lambda_{em}$  caratteristiche di una data sostanza



- **Rivelatore ad indice di rifrazione.** Misura la capacità della f.m e degli analiti di rifrangere/deviare la luce. L'indice di rifrazione della f.m cambia al cambiare della sua composizione
  - Universale
  - Segnale risente di variazioni della composizione e della temperatura (millesimi di °C) della fase mobile → non in gradiente di eluizione
  - Limite di rivelabilità: 1 µg



La velocità della luce varia a seconda del mezzo attraversato.

Nei materiali a maggior densità, la velocità della luce, indicata con  $v$ , è inferiore.

Si definisce *indice di rifrazione* il rapporto tra la velocità della luce nel vuoto  $c$  ( $c = 3 \cdot 10^8$  m/s) rispetto a quella nel mezzo  $v$  e si indica con  $n$ :

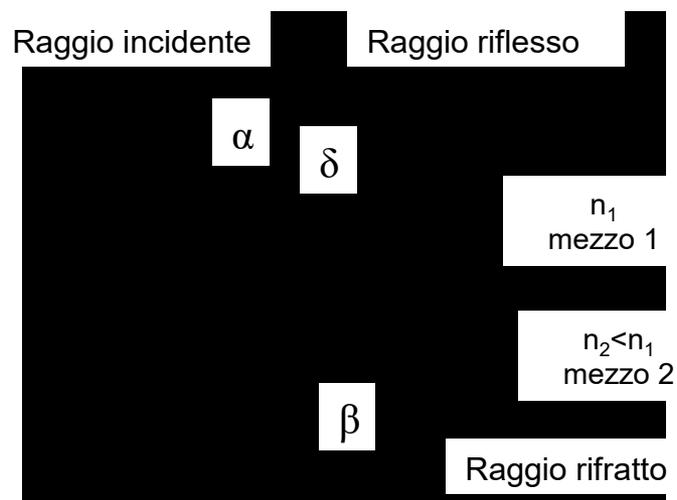
$$n = c / v$$

La diminuzione della velocità di propagazione viene accompagnata dalla variazione della sua direzione, secondo il fenomeno della rifrazione.

La velocità della luce varia anche in funzione della temperatura e della lunghezza d'onda ( $\lambda$ ) della radiazione.

$$n_{\lambda}^t > 1$$

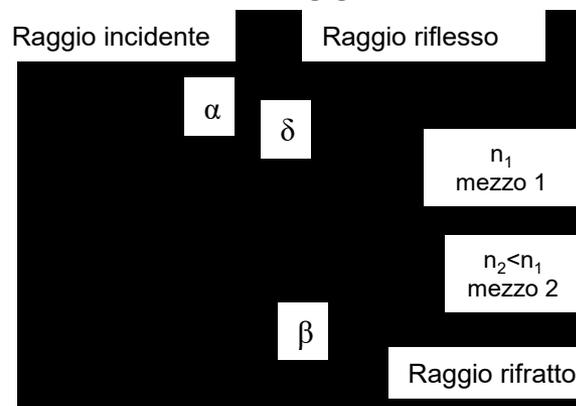
$$n_D^{20^\circ}$$



- *Indice di rifrazione relativo.*

Quando la luce passa da un mezzo 1 a un mezzo 2 (entrambi diversi dal vuoto) il rapporto delle velocità della luce nei due mezzi (e quindi del loro indice di rifrazione) è definito indice di rifrazione relativo.

- Un raggio di luce che viaggia in un mezzo 1 con indice di rifrazione  $n_1$  e che entra in un mezzo 2 con indice di rifrazione  $n_2$  diverso da  $n_1$ , si divide in un raggio riflesso nel mezzo 1 e in un raggio rifratto che si propaga nel mezzo 2.

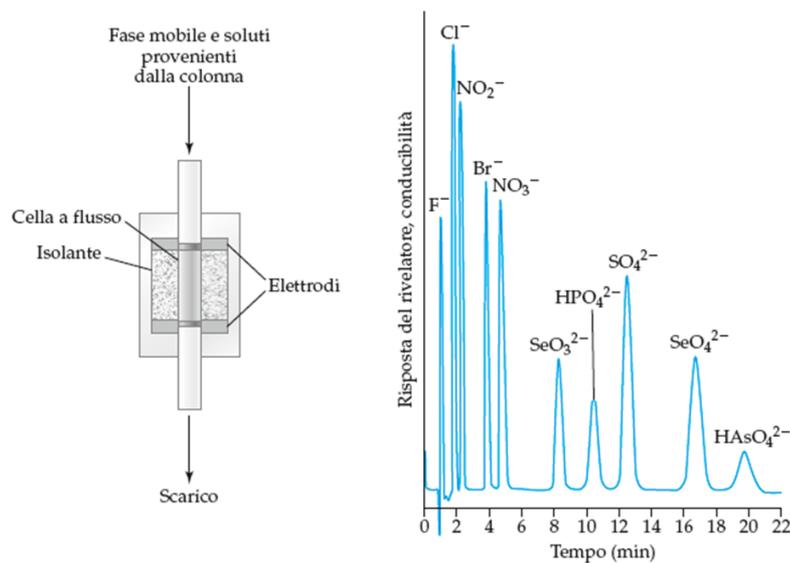


- L'angolo di rifrazione dipende da quello di incidenza e dagli indici di rifrazione dei due mezzi secondo una formula nota come *legge di Snell*:

$$n_1 \cdot \text{sen} \alpha = n_2 \cdot \text{sen} \beta$$

$$n_{\text{mezzo2/mezzo1}} = \text{sen} \alpha / \text{sen} \beta$$

- **Rivelatore a conducibilità.** È un conduttimetro.
  - Selettivo, monitora sostanze ioniche
  - Utile in cromatografia a scambio ionico
  - Sensibile alla T
  - Gradiente di eluizione (f.m. con forza ionica costante)
  - Limite di rivelabilità: ng



**FIGURA 22.20** Schema generale di un rivelatore a conducibilità e un esempio dell'impiego di questo rivelatore nella cromatografia ionica. (Cromatogramma riprodotto su autorizzazione da C. F. Poole e S.K. Poole, *Chromatography Today*, Elsevier, Amsterdam, the Netherlands, 1991.)

- LC/MS

- Universale, alta sensibilità, analisi quali-quantitativa
- Tecnica che ionizza il campione, per cui poi si misura la corrente ionica che sarà proporzionale alla quantità di analita che sta uscendo in quel momento dal rivelatore: **ANALISI QUANTITATIVA**
- Consente di separare gli ioni gassosi in funzione del rapporto massa/carica ( $m/z$ ): **ANALISI QUALITATIVA**
- Sistema molto potente: esistono anche HPLC/DAD/MS

# Rivelatori HPLC

- Spettrofotometro UV-VIS S (pg)
- Fluorimetro S (fg)
- Rivelatore a indice di rifrazione U (µg)  
No gradiente
- Rivelatore a conducibilità S (ng)
- Spettrometria di massa U/S (pg)

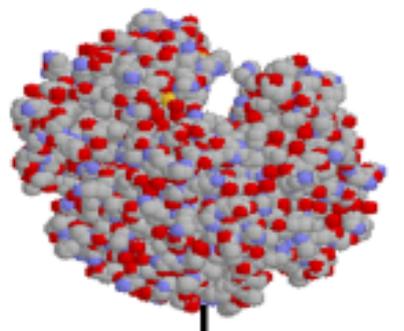
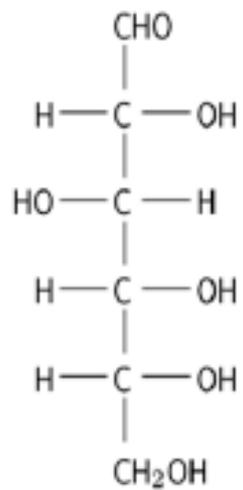
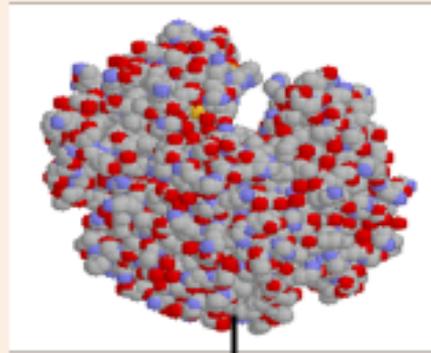
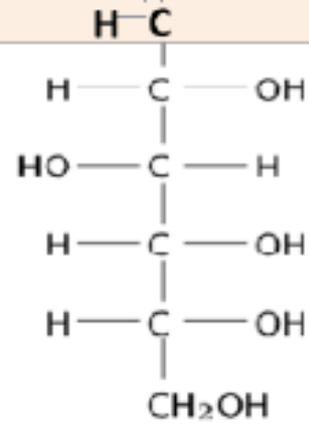
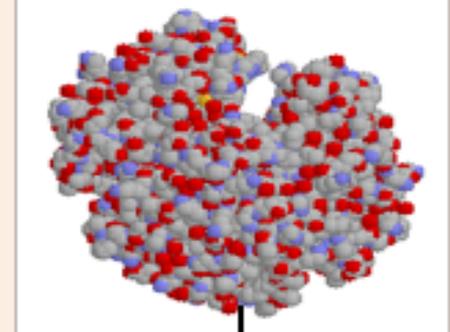
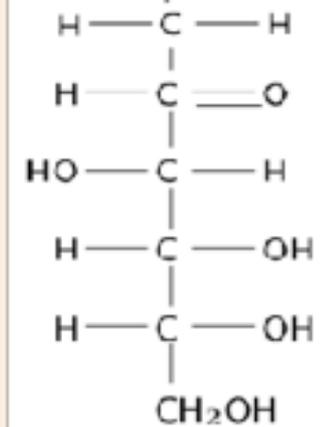
RIVELATORI  
OTTICI

# HPLC nella chimica clinica

Clinical Chemical Analysis	Drug Monitoring	Clinical Chemical Analysis of Poisoning
Proteins	Analgesics	Psychiatric Drugs
Carbohydrates	Anthelmintics	Soporifics
Lipids/Gangliosides	Antidepressants	Nicotine
Amino Acids	Antidiabetics	Carcinogenes
Purines/Pyrimidines	Antiemetics	Alcaloids
Porphyrins	Antiepileptic Drugs	Toadstool Poisons
Vitamins	Anticoagulants	
Hormones	Antibiotics	
Bile Acids	Cardioactive Drugs	
Bile Dyes	Immunosuppressants	
	Antineoplastic Drugs	
	Theophyllines/Xanthines	
	Diuretics	
	Antirheumatic Drugs	

# Emoglobina glicata nel sangue

- La glicazione è il processo biologico non enzimatico per cui gli zuccheri si possono legare covalentemente alle proteine.
- Lo zucchero più abbondante del sangue, il glucosio, può quindi legarsi in modo irreversibile ad una parte specifica dell'emoglobina, formando l'**HbA1c** o emoglobina glicata.
- Tanto più alta è la concentrazione ematica di glucosio e tanto maggiore risulta la percentuale di HbA1c.
- Considerata l'irreversibilità della glicazione, l'emoglobina glicosilata contenuta nei globuli rossi (avidissimi di glucosio) circola nel sangue per tutta la durata della loro vita (in media 90/120 giorni).
- Ciò rende l'emoglobina glicata un parametro molto più utile della comune glicemia nella diagnosi e nel monitoraggio del diabete; l'emoglobina glicata è infatti espressione della glicemia media nel lungo periodo, non di un singolo momento (non è soggetta a variazioni rispetto all'alimentazione del giorno precedente o allo stress da esame) e non necessita quindi di un preventivo digiuno di almeno otto ore.

**Hemoglobin**
 $\text{NH}_2$ 
**Glucose**
 $\text{N}$ 
**(Schiff base)****Hemoglobin A1c**
 $\text{NH}$ 
**Amadori Product**

- HbA1c indica quanto il diabete sia stato compensato fra una misurazione della glicemia e l'altra. Più frequenti e gravi sono stati gli episodi di iperglicemia avvenuti nelle settimane precedenti all'analisi, maggiore sarà HbA1c.
- Tanto più alta è l'HbA1c e tanto maggiore è la probabilità di sviluppare le complicanze del diabete e di aggravare quelle già esistenti (retinopatia, nefropatia, neuropatia, malattia cardiaca e ictus).
- Tutti coloro che hanno il diabete di tipo 2 dovrebbero fare il test almeno due volte all'anno. In particolare, chi ha un diabete mal compensato, ovvero con livelli di glicemia che tendono a rimanere alti, dovrebbe ripetere l'esame almeno ogni 3 mesi.
- Intervalli di riferimento: 4,0 e 6,0% oppure 20 e 42 mmol/mol

HbA <sub>1c</sub> (%)	HbA <sub>1c</sub> (mmol/mol)
4,0	20
5,0	31
6,0	42
6,5	48
7,0	53
7,5	59
8,0	64
9,0	75
10,0	86

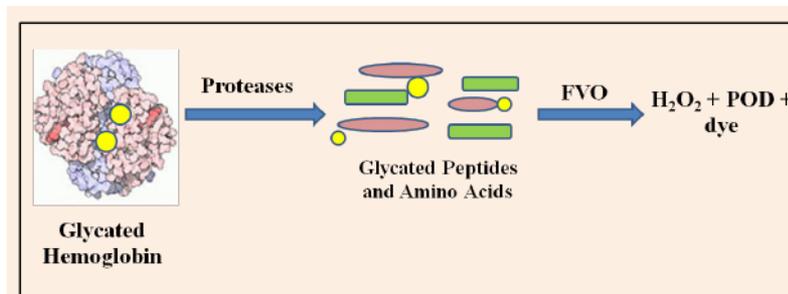
Stima INDICATIVA della glicemia media  
per valore di emoglobina glicata

HbA1c% Glicemia media mg/dl

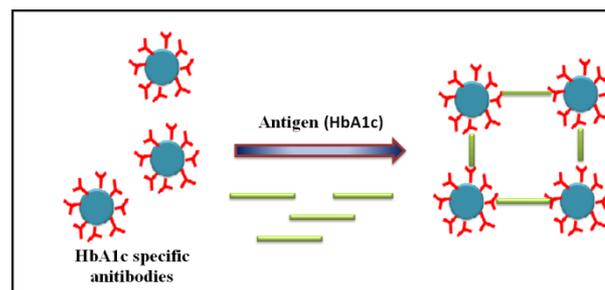
5	97 (76-12)
6	126 (100-152)
7	154 (123-185)
8	183 (147-217)
9	212 (170-249)
10	240 (193-282)
11	269 (217-314)
12	298 (240-347)

## Metodi per determinare l'emoglobina glicata:

- Saggio enzimatico



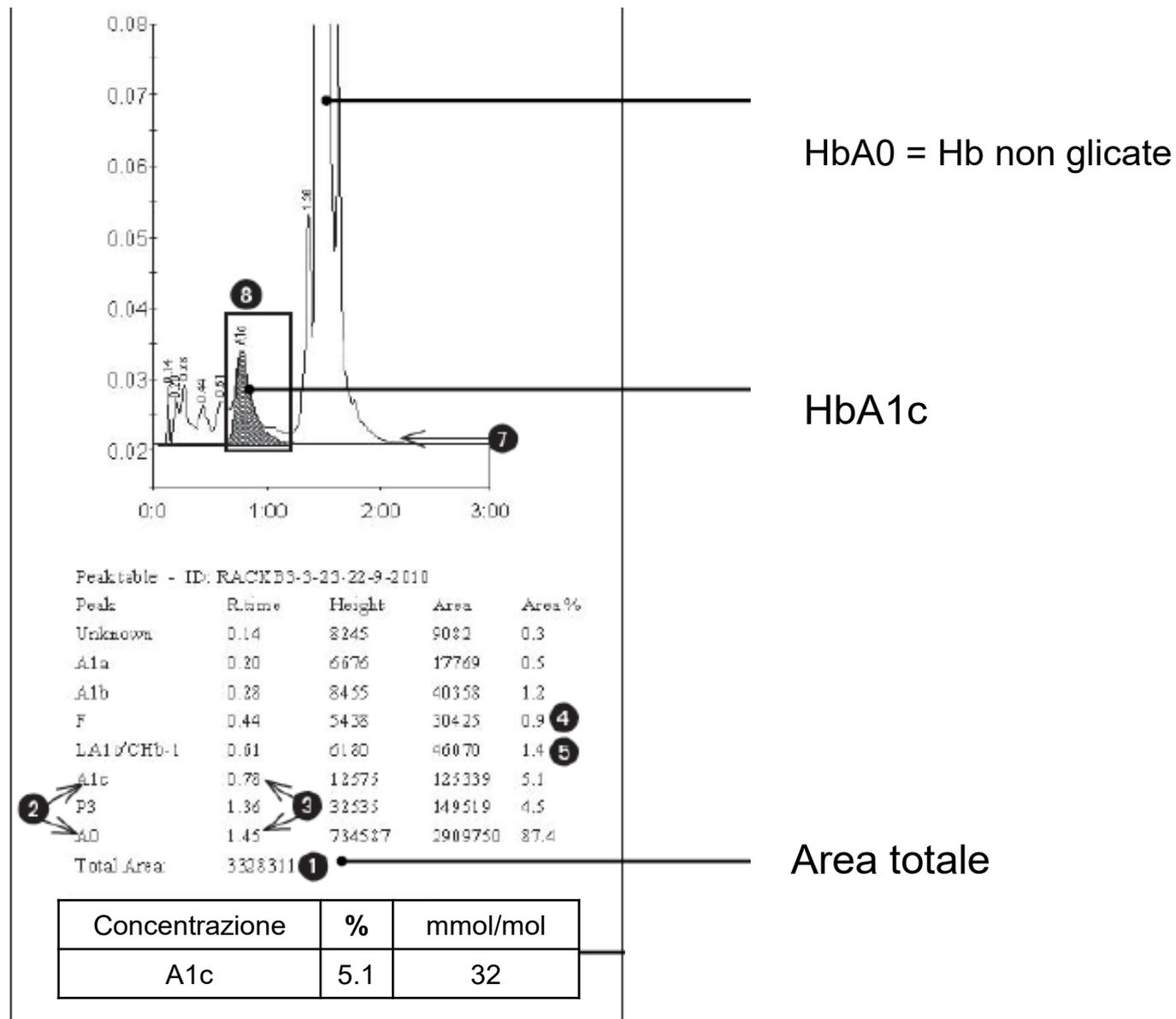
- Saggio immunologico



- Elettroforesi capillare

- HPLC

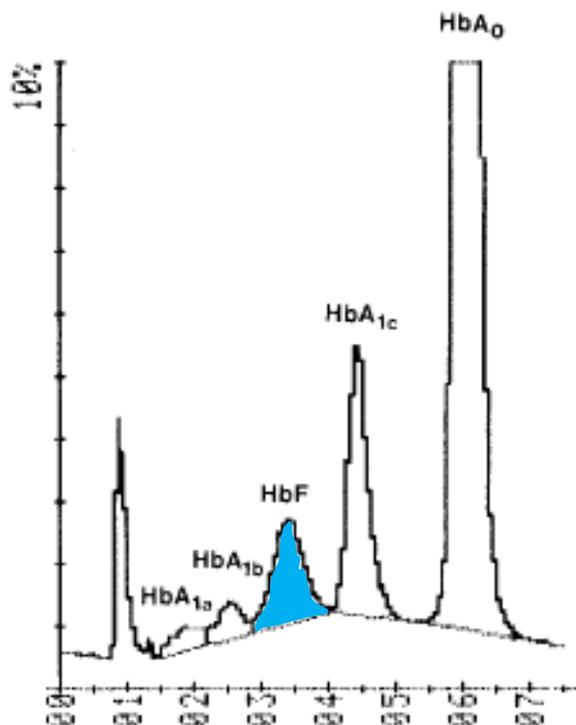
- Ion-exchange (separa le varie Hb e ne permette lo studio)
- Boronate affinity (misura tutte le forme glicate dell'emoglobina)



# Emoglobina fetale nel sangue

- Nei globuli rossi del feto c'è una forma di emoglobina ( $\alpha_2\gamma_2$ ) diversa da quella adulta ( $\alpha_2\beta_2$ ).
- Questa modifica strutturale conferisce all'HbF un'affinità per l'ossigeno superiore, permettendo al feto di estrarre l'ossigeno dal sangue materno

HbF negli adulti  
= 0.3-1.2%



Principali situazioni che possono causare un aumento ematico di HbF

## Disordini ereditari

### Sindromi talassemiche

- $\beta$ -talassemia omo- od eterozigote
- $\delta\beta$ -talassemia omo- od eterozigote
- persistenza ereditaria di emoglobina fetale (HPFH) omo- ed eterozigote

### Altre emoglobinopatie

- anemia falciforme
- HbC, HbE, Hb Lepore, alcune emoglobine instabili (effetto variabile)
- alcune varianti emoglobiniche (Hb Rainier, Hb Bethesda) alcali-resistenti<sup>a</sup>
- varianti emoglobiniche con pI uguale a quello dell'HbF<sup>b</sup>
- varianti emoglobiniche con tempo di ritenzione simile a quello della HbF<sup>b</sup>

### Sferocitosi ereditaria

### Disordini acquisiti

#### Malattie del sangue (non neoplastiche)

- anemia aplastica
- anemia normoblastica (refrattaria e non)
- anemia perniziosa
- anemia sideroblastica
- emoglobinuria parossistica notturna
- eritroblastopenia pura

#### Neoplasie

- epatocarcinoma
- eritroleucemia
- leucemia acuta
- leucemia mieloide cronica giovanile
- neoplasie con metastasi midollari

#### Condizioni associate a specifici trattamenti terapeutici

- chemioterapia per leucemie
- terapia con idrossiurea, 5-aza-2'-deossicitidina, butirrati, eritropoietina

#### Altre condizioni

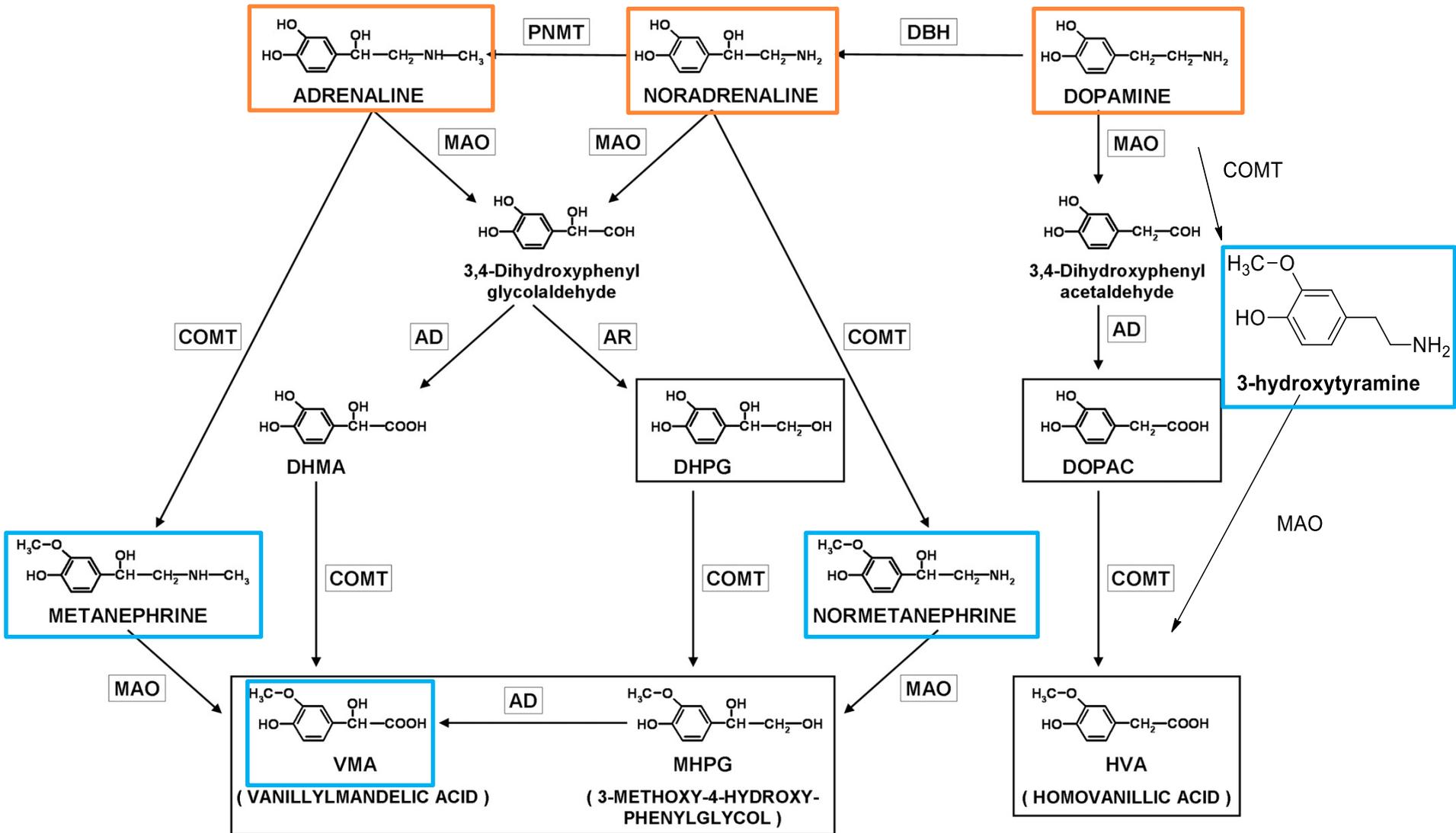
- gammopatia monoclonale benigna
- gravidanza
- insufficienza renale cronica
- ipertiroidismo
- recupero dopo trapianto di midollo osseo o ipoplasia midollare
- trisomia 13 (trisomia D)

<sup>a</sup>Interferenza sul metodo di denaturazione alcalina.

<sup>b</sup>Interferenza sui metodi in HPLC.

# Diagnosi del feocromocitoma

- La midollare del surrene è costituita da cellule neuroendocrine deputate alla sintesi e alla secrezione delle catecolamine (adrenalina e noradrenalina)
- Il feocromocitoma è una neoplasia delle cellule cromaffini catecolamine-secerenti. Generalmente si sviluppa nella midollare del surrene (secerne sia A che NA) ma può essere anche extrasurrenalico (secerenti prevalentemente NA)
- Diagnosi: determinazione sulle urine delle 24h delle catecolamine e dei loro metaboliti (metanefrine e acido vanilmandelico)
- Preparazione del paziente: ansia ed esercizio fisico fanno aumentare le catecolamine. Molti farmaci aumentano/diminuiscono i livelli di catecolamine.
- Le catecolamine aumentano anche in altre malattie tumorali del sistema nervoso



## Valori di riferimento delle catecolamine nelle urine

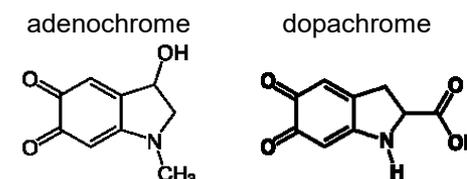
Adrenalina < 20 µg/24h

Noradrenalina < 400 µg/24h

Dopamina < 80 µg/24h

Campione: urine delle 24 h (contenenti 10 ml 25 % HCl)

Stabilità del campione: tra +2 e +8 °C per 5 giorni. Per conservazioni a lungo termine il campione va congelato.



Neutralizzazione pH

SPE

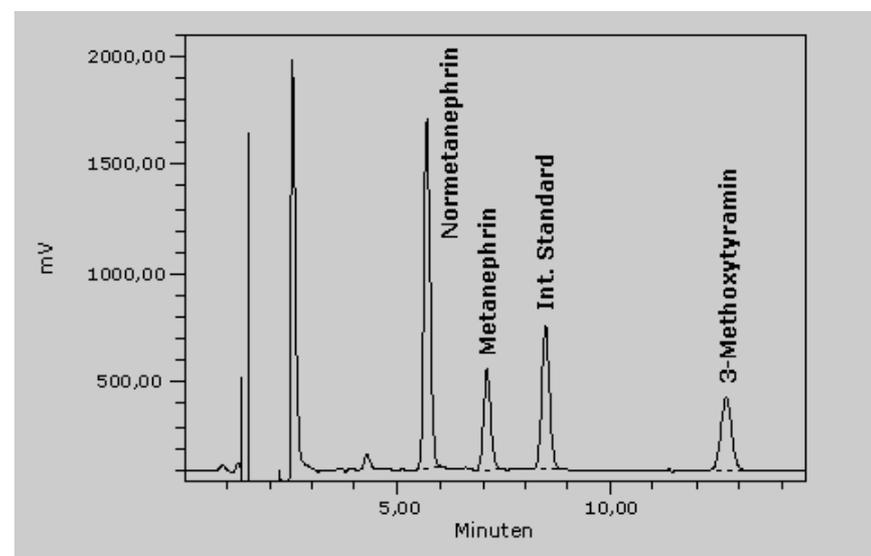
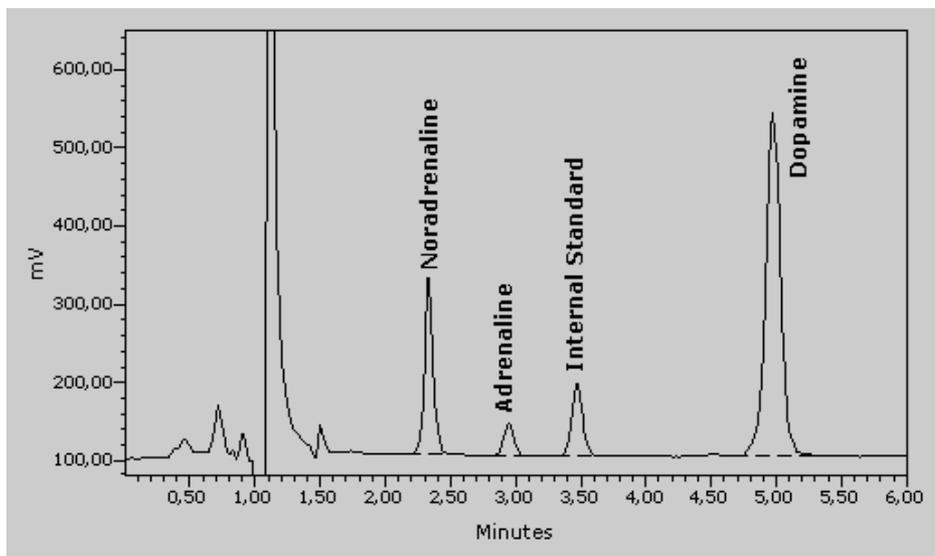
HPLC

Idrolisi acida: pH 0.8–1.0, 30' a 90–100 °C

Neutralizzazione pH

SPE

HPLC



# Monitoraggio terapeutico della ciclosporina A

- I farmaci immunosoppressori sono utilizzati per prevenire il rigetto dell'organo dopo il trapianto.
- L'assunzione scrupolosa della terapia è fondamentale; la mancata assunzione della stessa o l'assunzione in modo scorretto rischia di far fallire il trapianto.
- La dose giornaliera del farmaco viene stabilita in base ai livelli presenti nel sangue che vengono effettuati periodicamente.
- L'assorbimento e il metabolismo dei farmaci è diverso nei vari pazienti pertanto non è possibile stabilire una dose fissa a priori.
- Il monitoraggio del livello ematico è inoltre una condizione essenziale per valutare al contempo la tossicità: intervallo terapeutico stretto.

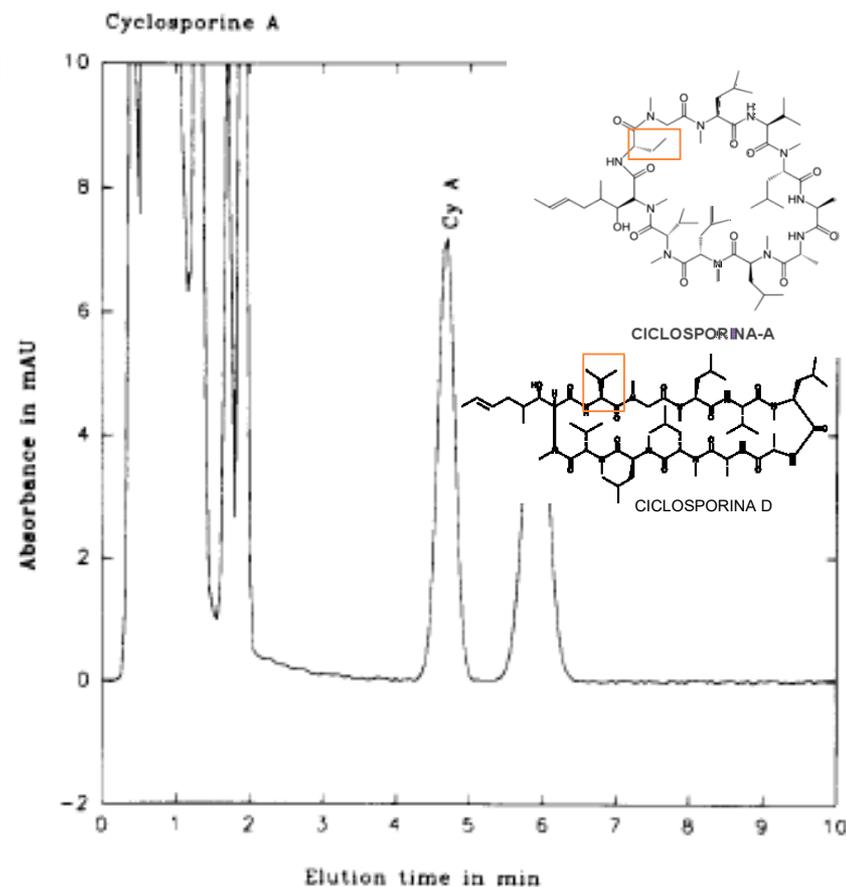
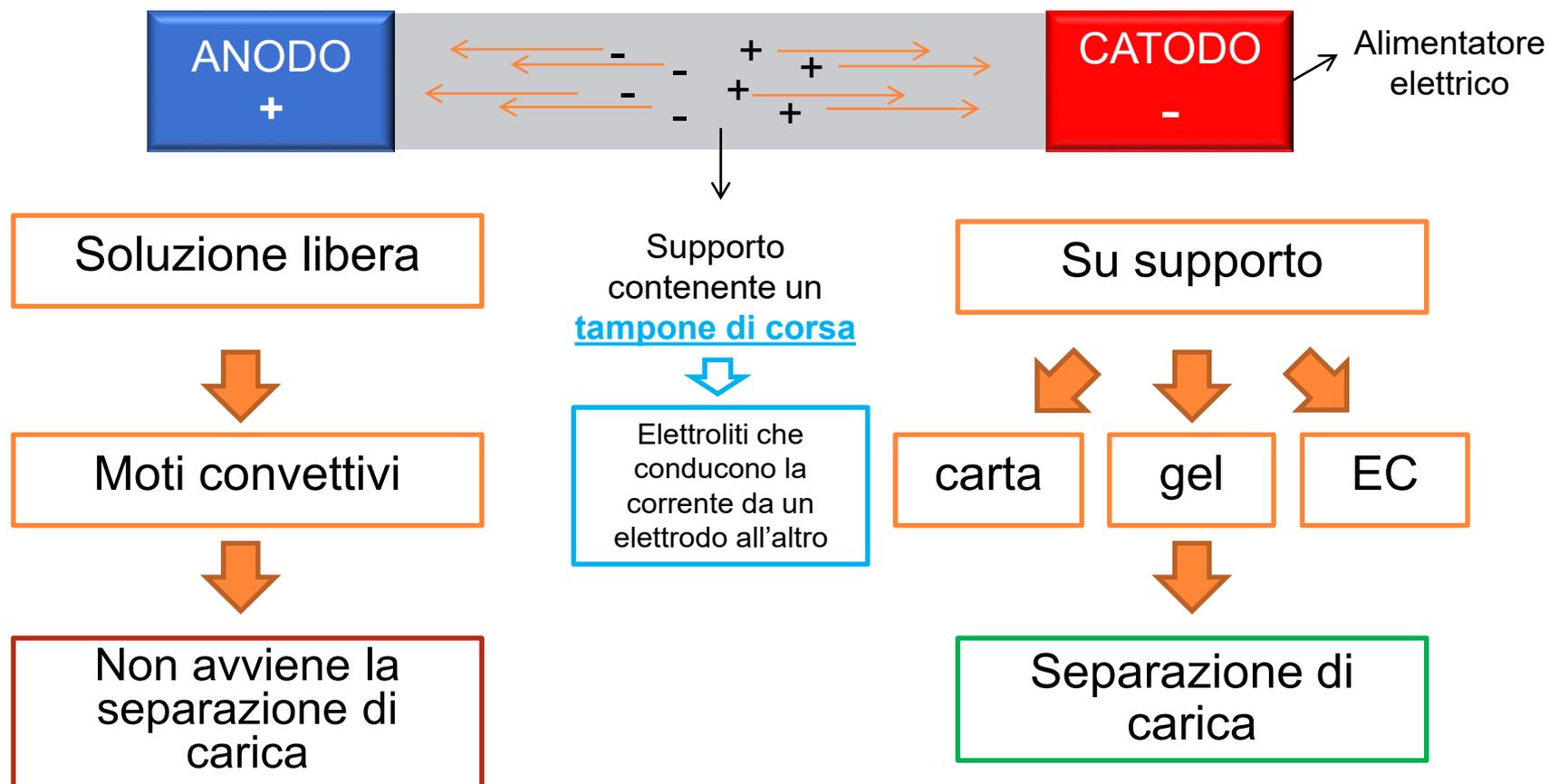


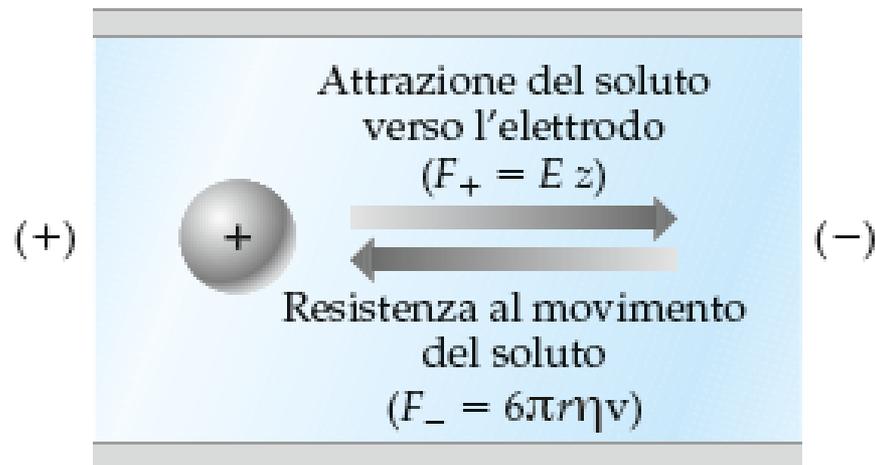
Fig. 9. Separation of cyclosporine A from metabolites in whole blood (

# ELETTROFORESI

Migrazione differenziale di specie cariche in soluzione per effetto dell'applicazione di un campo elettrico.



# Migrazione elettroforetica



$$6\pi r \eta v = E z$$

$$v = \frac{E z}{6\pi r \eta} = \mu E$$

*$\mu$ , mobilità elettroforetica*

Costante per un analita in determinate condizioni di solvente e T

Migrazione in base al rapporto  $z/r$

# ELETTROFORESI

- Studio delle proteine
- Studio del DNA
- Separazione di piccoli ioni come cloruri o nitrati
- Separazione di grandi particelle cariche come virus o cellule

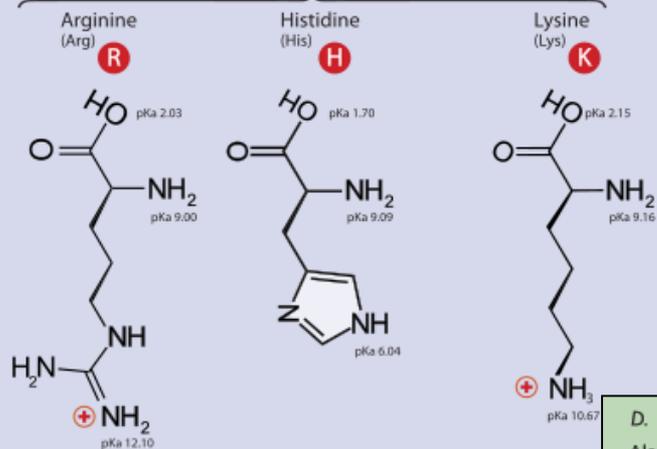
## Tecniche elettroforetiche

- Elettroforesi zonale (su supporto)
- Elettroforesi capillare (strumentale)

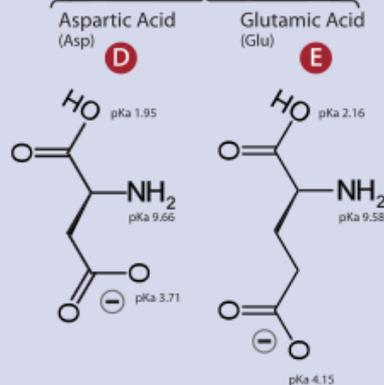
# Effetto del pH sulla migrazione elettroforetica

## A. Amino Acids with Electrically Charged Side Chains

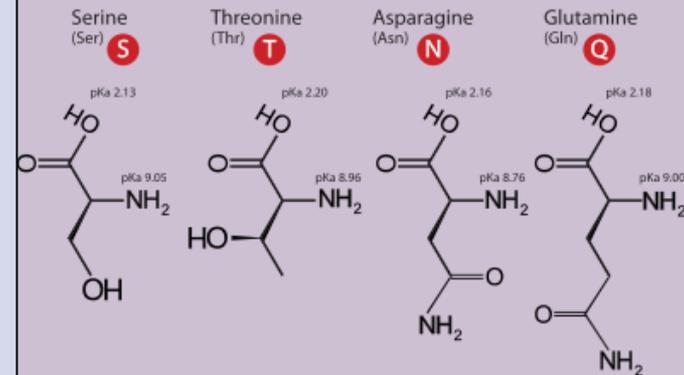
### Positive



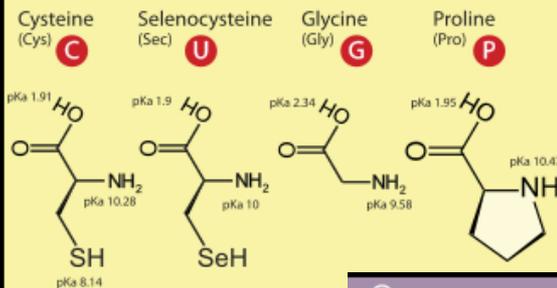
### Negative



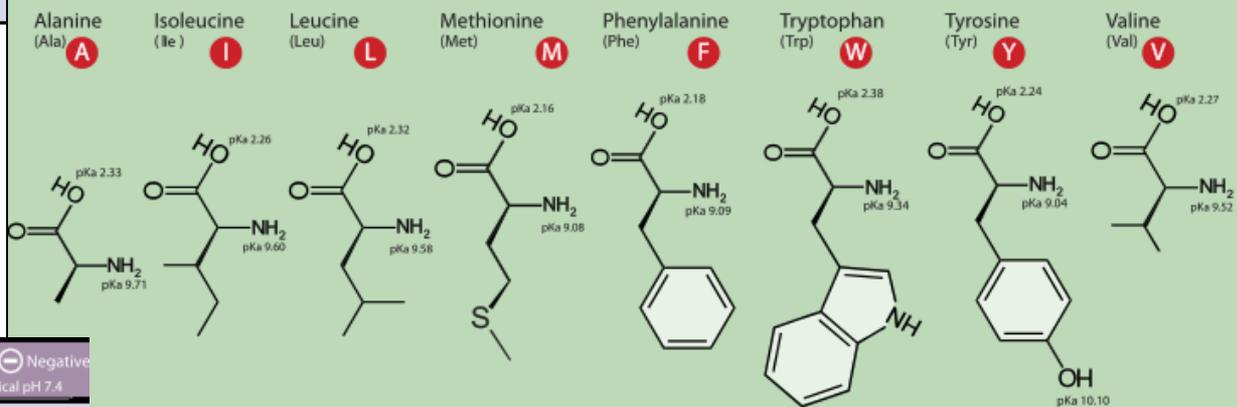
## B. Amino Acids with Polar Uncharged Side Chains



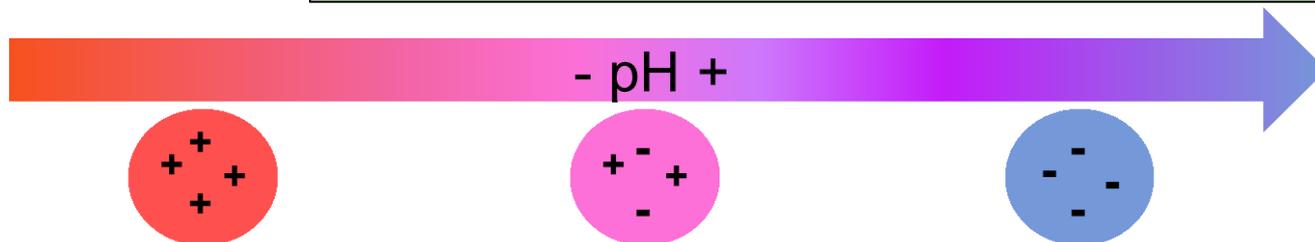
## C. Special Cases



## D. Amino Acids with Hydrophobic Side Chain



⊕ Positive  
⊖ Negative  
+ Side chain charge at physiological pH 7.4



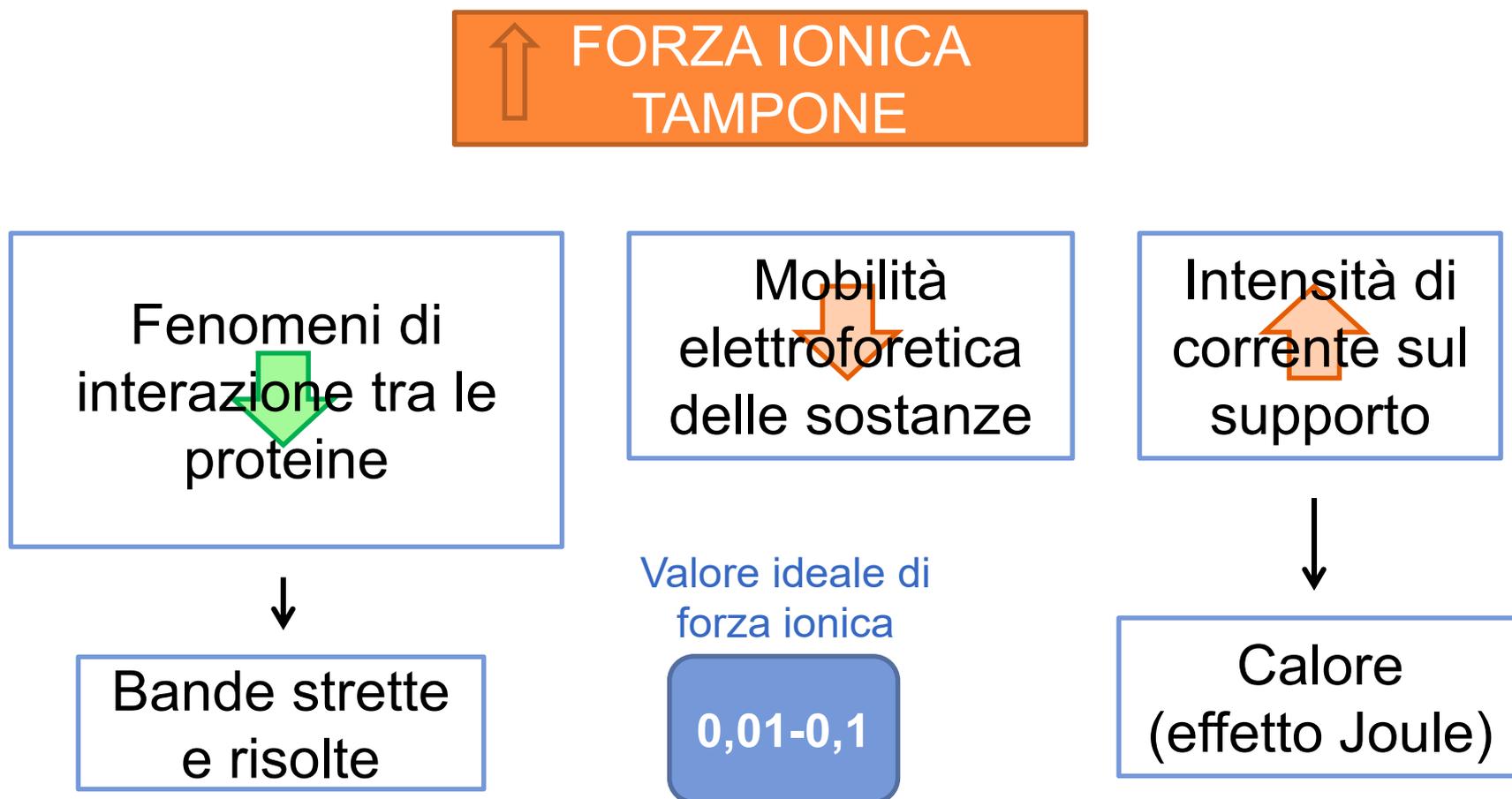
Punto isoelettrico, p.i.

# Elettroforesi zonale

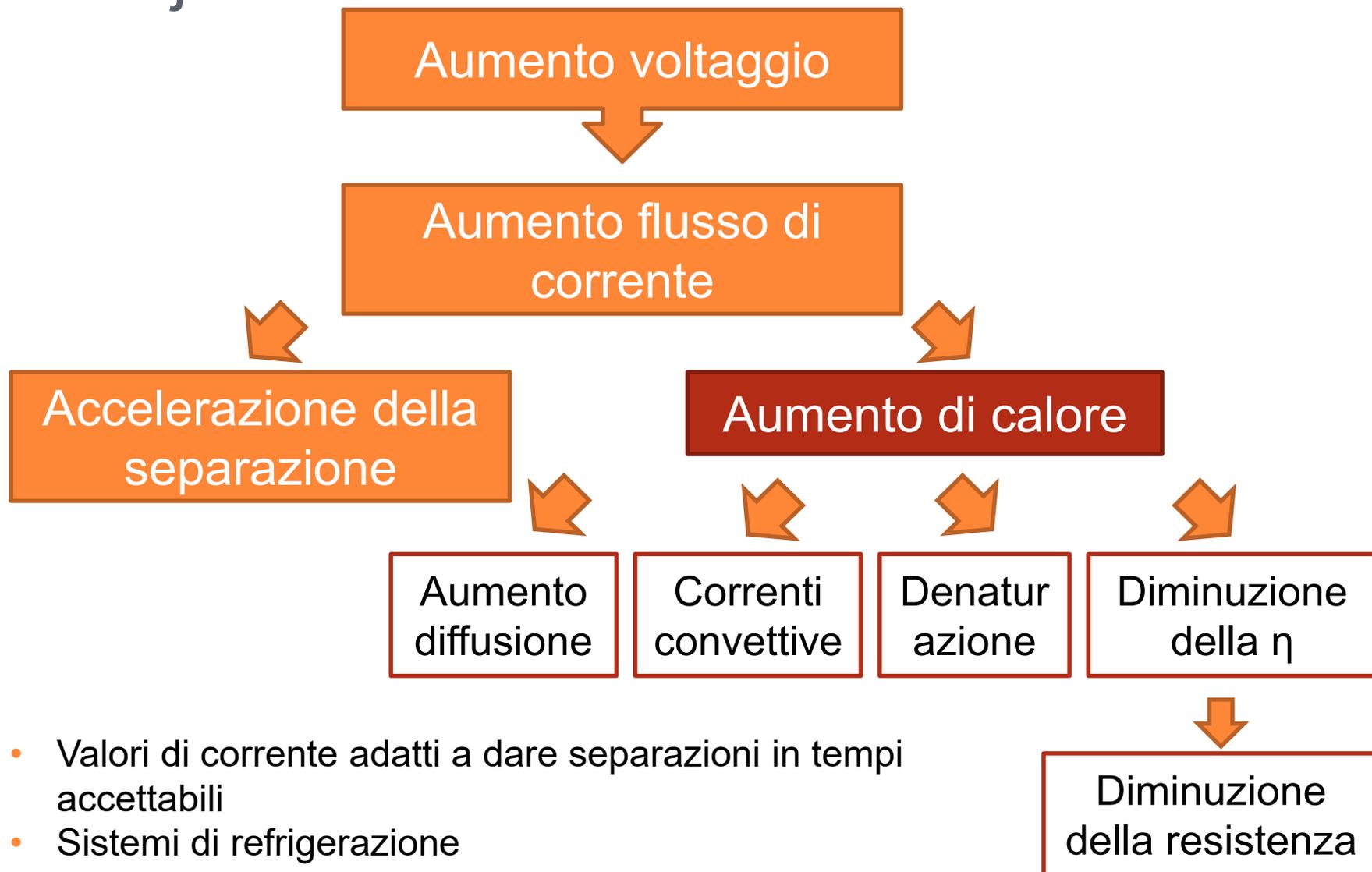
- La migrazione/separazione avviene fra i pori di un supporto solido
- Separazione totale delle specie a diversa mobilità in bande
- Vantaggi:
  - Apparecchiature semplici (vasca, alimentatore)
  - Analisi quali-quantitativa con ridotto volume di campione (2-50  $\mu\text{L}$ )
  - La separazione in bande permette la rivelazione con tecniche analitiche
  - Anche preparativa e abbinabile ad altre tecniche (immunolettroforesi)
- Supporti:
  - Caratteristiche:
    - Inerti
    - Permeabili alle sostanze da separare
    - Non interferire con le reazioni di rivelamento delle sostanze in esame
  - Tipologie:
    - Carta e acetato di cellulosa
    - Gel di agarosio
    - Gel di poliacrilammide

# Tamponi per separazioni di liquidi biologici

Servono a mantenere il pH costante in modo che i componenti da separare presentino una dissociazione e quindi mobilità adatta e costante, e servono poi a condurre la corrente



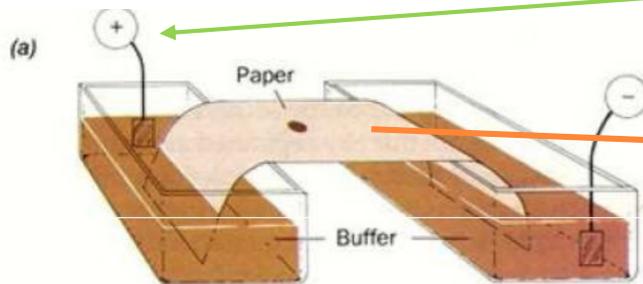
# Effetto joule



# Elettroforesi

Migrazione differenziale di **specie cariche** in soluzione per effetto dell'applicazione di un campo elettrico:

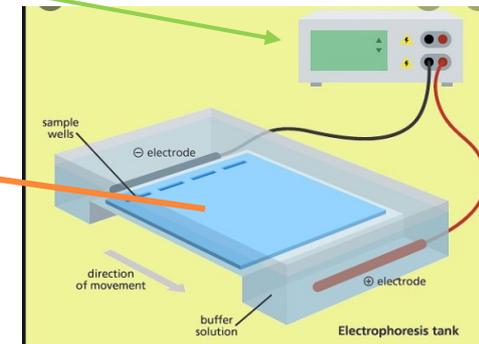
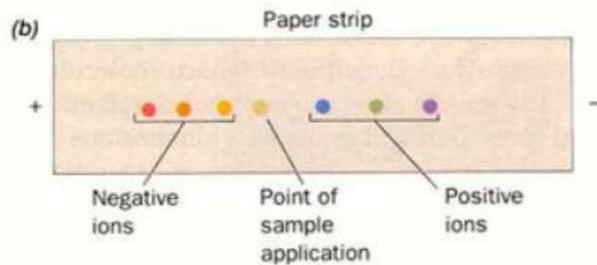
$$v = \frac{Ez}{6\pi r\eta} = \mu E$$



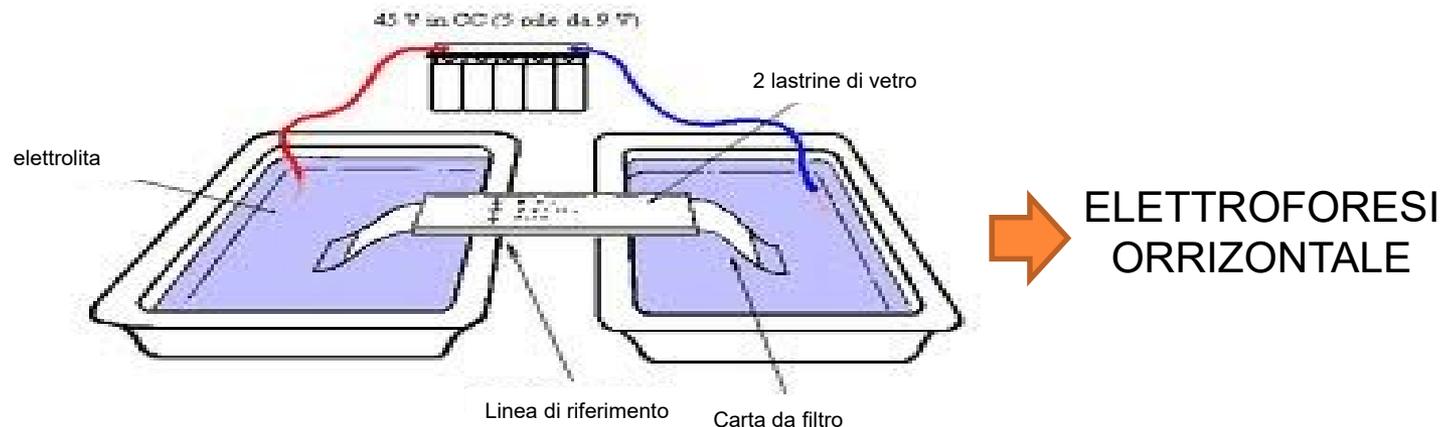
Supporto  
contenente un  
tampone di corsa



Elettroliti che conducono  
la corrente da un  
elettrodo all'altro



# Elettroforesi su carta: acetato di cellulosa

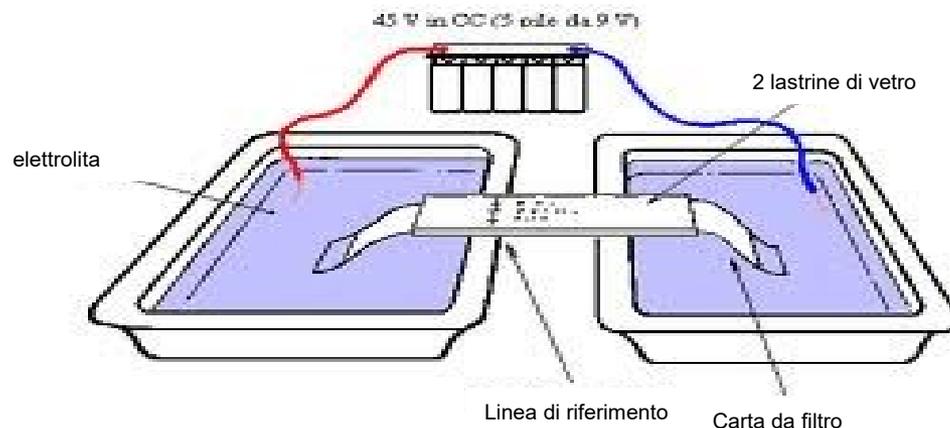


- Si ottiene per acetilazione della cellulosa (carta)
- Rispetto alla cellulosa non dà adsorbimento
- Elevata porosità → assorbimento lento e compatto del campione → bande strette
- *Diafanizzazione*: necessario renderla trasparente in fase di lettura
- *Colorazione*: per rendere rilevabile gli analiti

Proteine plasmatiche: 5 frazioni globuliniche

## Procedimento operativo per l'elettroforesi su acetato di cellulosa

1. Applicazione del supporto nella camera
2. Applicazione del campione
3. Migrazione elettroforetica
4. Evidenziazione/identificazione del campione
  1. Fissazione proteine (termico/solvente)
  2. Colorazione proteine (decolorazione)/immunochimica, ecc.
5. Quantificazione → *elettroferogrammi*
  1. Eluizione dal supporto
  2. Soluzione del supporto
  3. Scansione densitometrica diretta del supporto

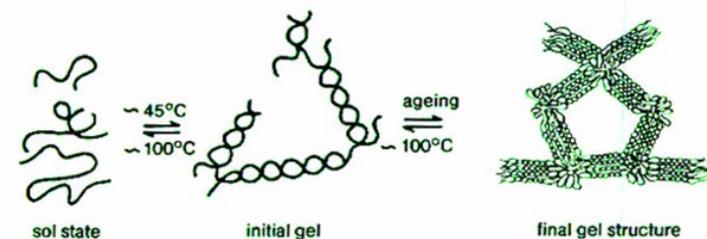
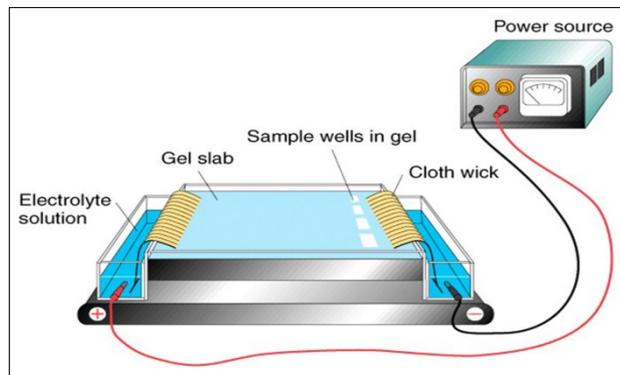


# Elettroforesi su gel

Fungono da setacci molecolari: i pori del gel causano resistenza al movimento delle particelle che aumenta all'aumentare delle dimensioni delle particelle

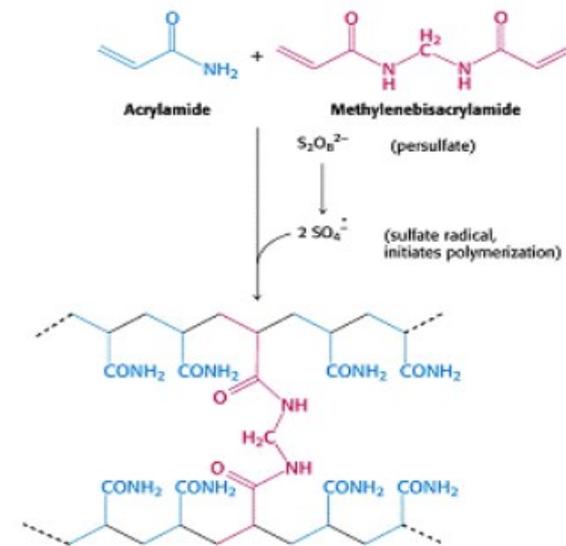
Supporti:

- Gel di agarosio
  - Possiede pori di grandi dimensioni
  - Ottimo per **separare acidi nucleici** (0.1-20 kb) ma anche proteine

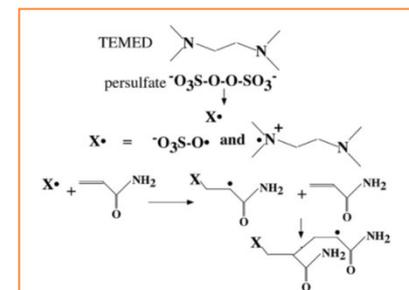


# Elettroforesi su gel

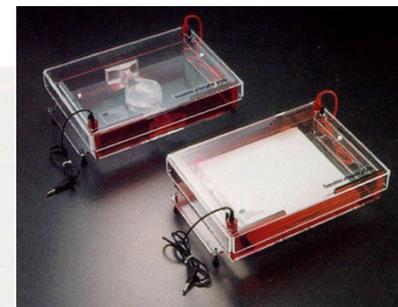
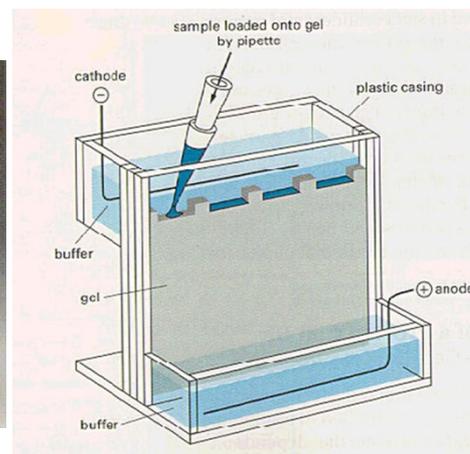
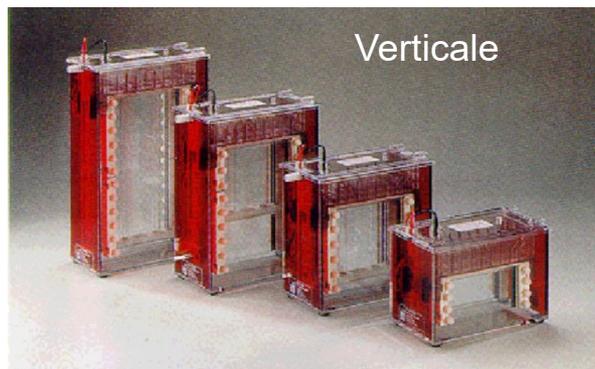
- Gel di poliacrilammide
  - **PAGE** (*polyacrylamide gel electrophoresis*)
  - La % di bisacrilammide indica la dimensione dei pori
    - Pori grandi per separare DNA
    - È utile per separare proteine in base alla MM e alla mobilità elettroforetica. In base alle dimensioni dei pori è possibile separare proteine con MM tra 5'000-200'000 Da
  - Trama più compatta dell'agarosio
  - Resistente
  - Trasparente all'UV/VIS



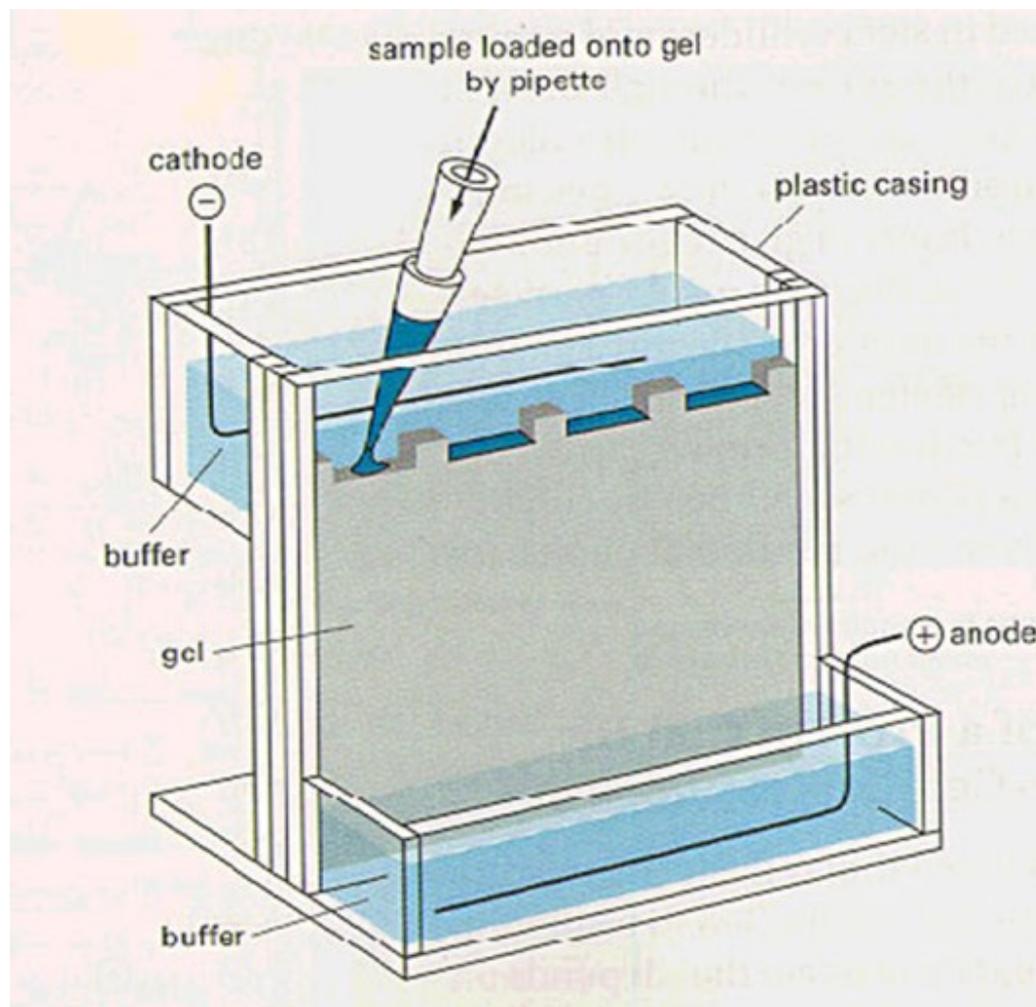
**FIGURA 23.8** Preparazione del gel di poliacrilammide. In questa reazione l'acrilammide rappresenta il monomero mentre la bisacrilammide funziona da agente reticolante. La reazione tra queste due sostanze ha inizio per aggiunta del persolfato di ammonio, con il persolfato ( $S_2O_8^{2-}$ ) che forma radicali solfato ( $SO_4^{\cdot-}$ ) che provocano l'attacco dell'acrilammide alla bisacrilammide. Alla miscela di reazione viene inoltre aggiunta la *N,N,N',N'*-tetrametiletildiammina (TEMED) come stabilizzante dei radicali solfato. La dimensione dei pori nel gel di poliacrilammide finale dipenderà dalla quantità di bisacrilammide aggiunta rispetto all'acrilammide. All'aumentare, infatti, della percentuale di agente reticolante si ottiene un più elevato grado di reticolazione e quindi pori più piccoli. Al contrario, se si utilizza meno bisacrilammide si ottengono pori più larghi e un gel meno rigido.



- I gel in condizioni **native** sulle proteine hanno i seguenti vantaggi:
  - discriminano tra proteine con PM uguale e diversa carica
  - consentono il recupero e la rapida purificazione di proteine nella loro forma nativa, attiva
  - consentono colorazioni molto specifiche
  - si possono studiare proteine polimeriche, senza separare le subunità polipeptidiche
- La maggior parte delle proteine plasmatiche ha un p.i. acido (4,5-6,5) e se si usa un tampone a un pH superiore al punto isoelettrico (8,6), la proteina avrà una carica netta negativa e si muoverà verso l'anodo



## Procedimento operativo per l'elettroforesi su gel

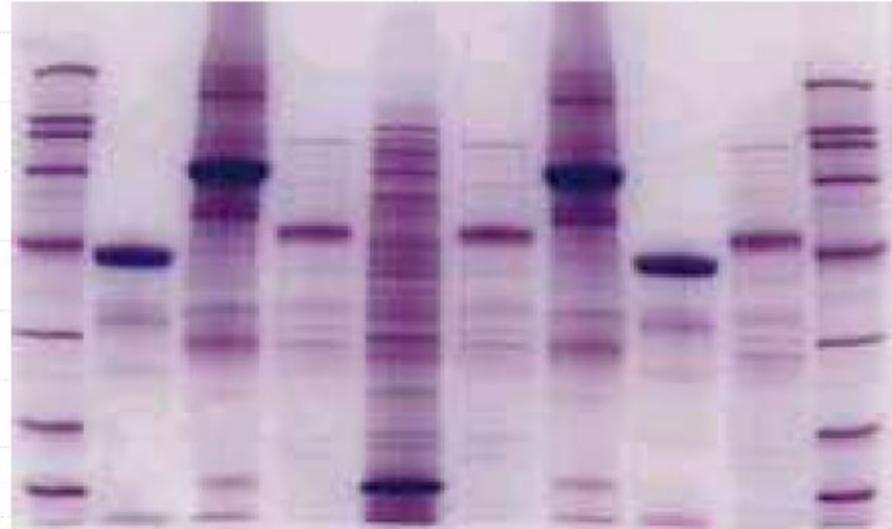


Rilevamento:

- Diretto sul Gel
  - Visivo (proteine colorate)
  - Assorbanza
  - Densitometro
- Trasferimento su un diverso supporto: *blotting*

## Blue Coomassie

Sensibilità 0.1  $\mu\text{g}$  proteina

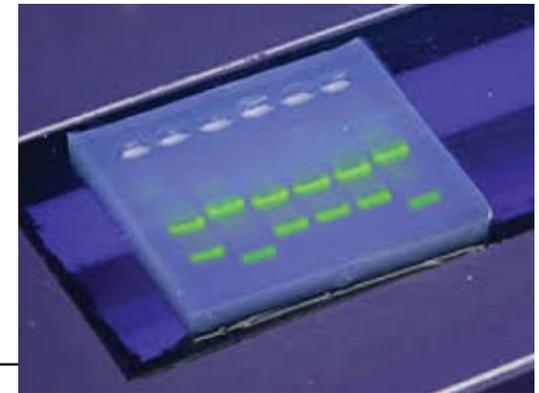
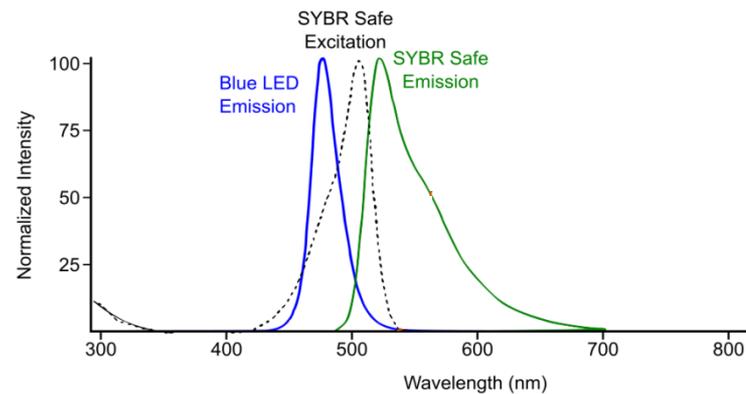
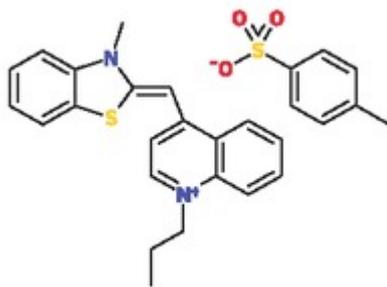
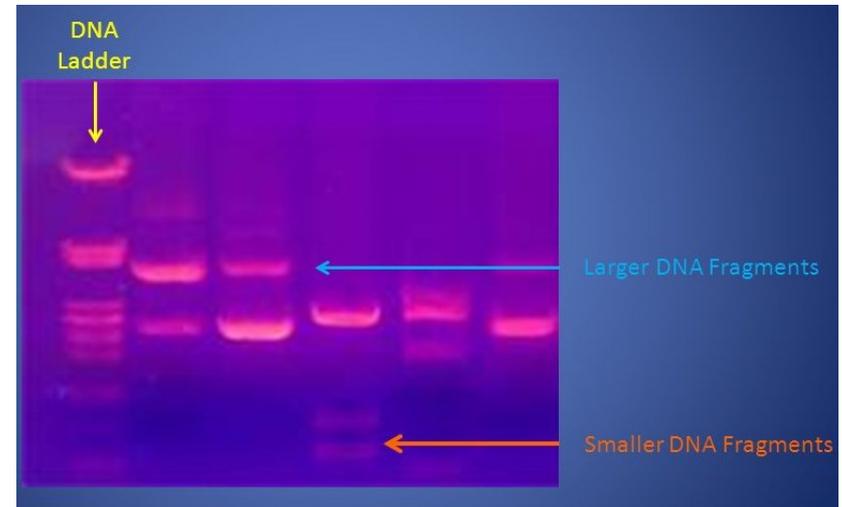
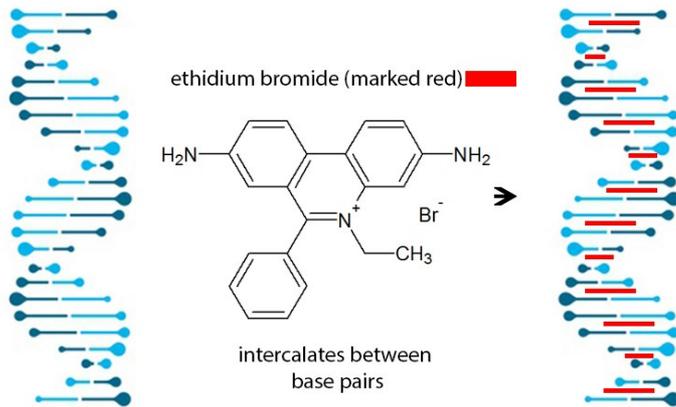


## Argento

$\text{Ag}^+ \rightarrow \text{Ag}^0$   
Sensibilità 1 ng



# Colorazione gel (per DNA)



# Blotting

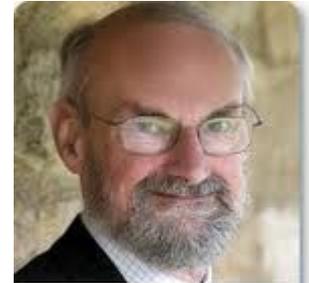
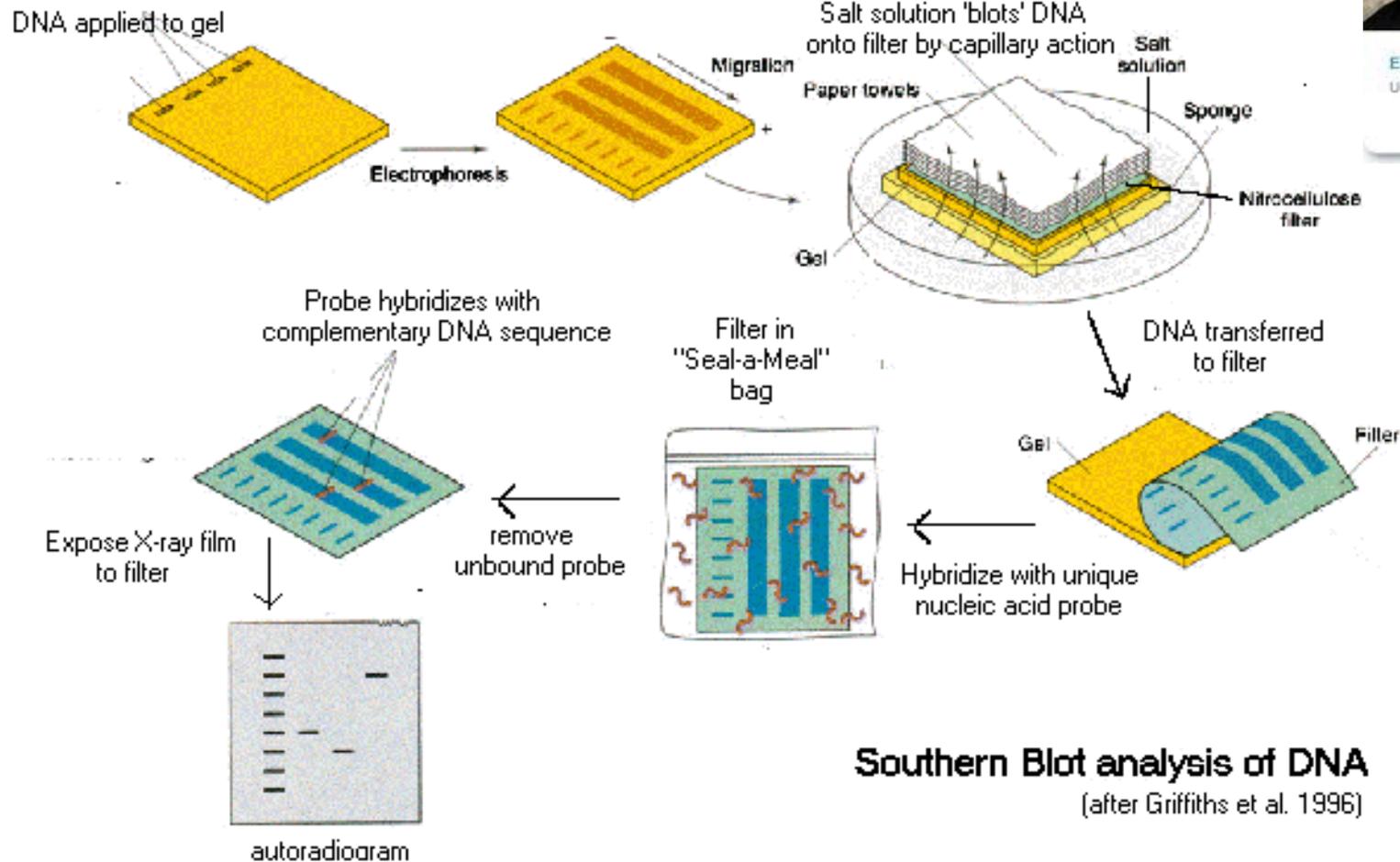
È il trasferimento di un campione biologico (proteine, DNA, RNA) da un gel ad una membrana (nitrocellulosa o nylon) e la sua conseguente rivelazione sulla superficie della membrana

**Southern blotting  
(DNA)**

**Northern blotting  
(RNA)**

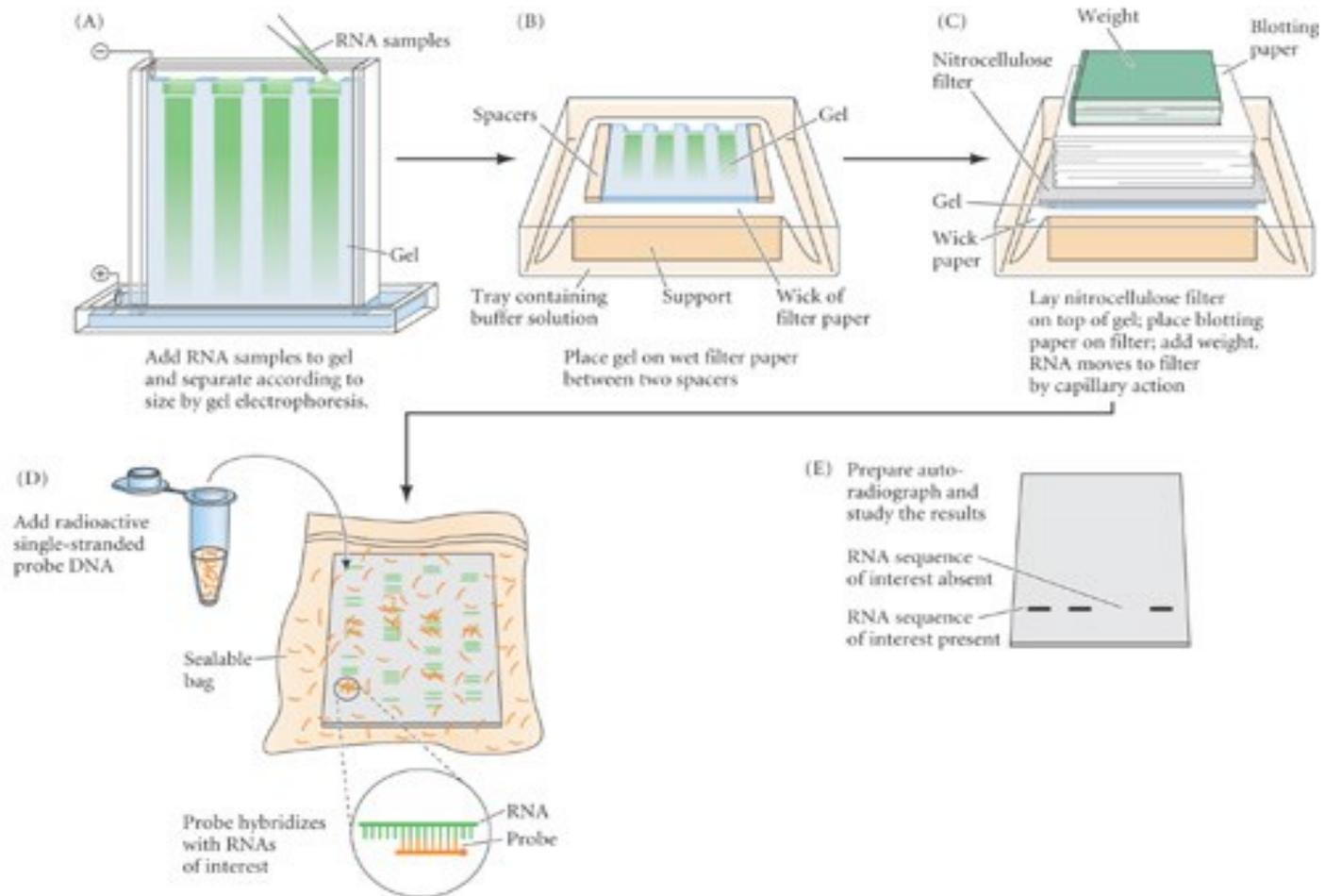
**Western blotting  
(proteine)**

# Southern blot



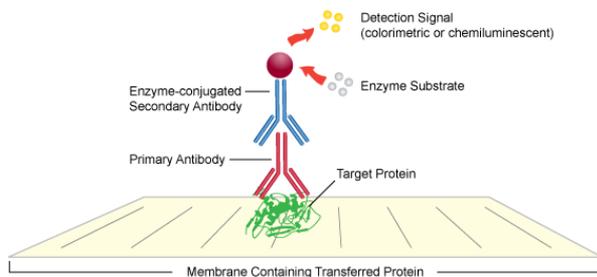
Edwin Southern  
University of Oxford (UK)

# Northern blot

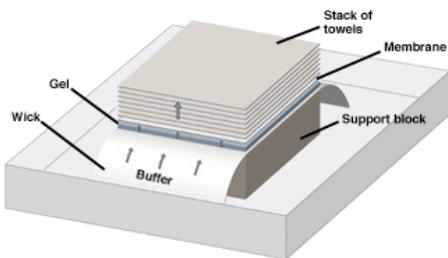


# Western blot

## Detection in Western Blots

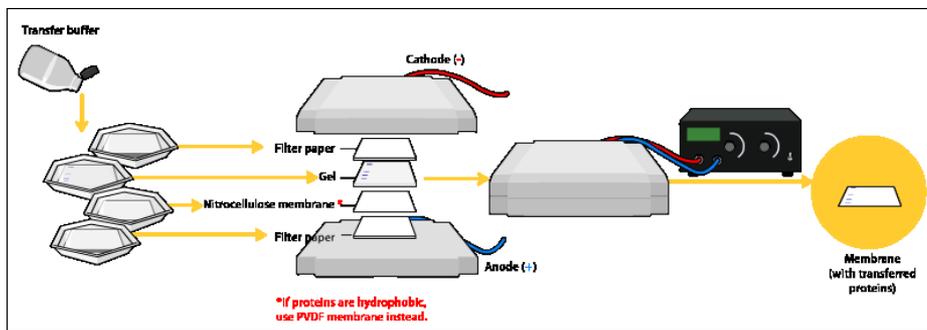


## Capillary blotting



→ 10-20% trasferimento

## Elettroblotting



## Sample preparation

Lysis of sample in appropriate lysis buffer



Protein assay to determine protein concentration  
Add loading buffer, heat at 100°C 10min.

## Loading the gel

Optimize loading amount according to the expression level of the protein

Prepare running buffer; Assemble the gel in the tank

## Running the gel

Successful separation of proteins through the gel due to different molecular sizes; the smaller the protein is, the faster it moves towards the anode.



## Transfer proteins from the gel to the membrane

Prepare transfer buffer; assemble transfer stack

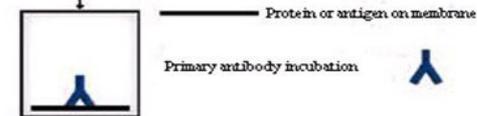


Check the transfer by ponceau red staining or coomassie staining of the gel

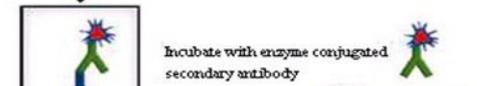
## Blocking

Incubate membrane in 5% non-fat milk or BSA; for phosphoproteins, BSA can only be used.

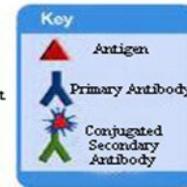
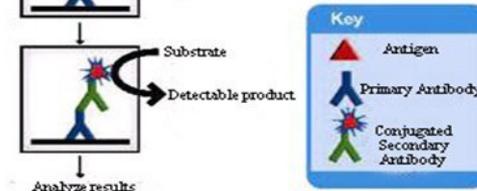
## Primary Antibody Incubation



## Secondary Antibody Incubation



## Detection



# Rilevazione enzimatica nel western blotting

Fosfatasi  
alcalina

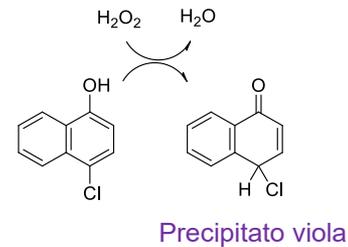
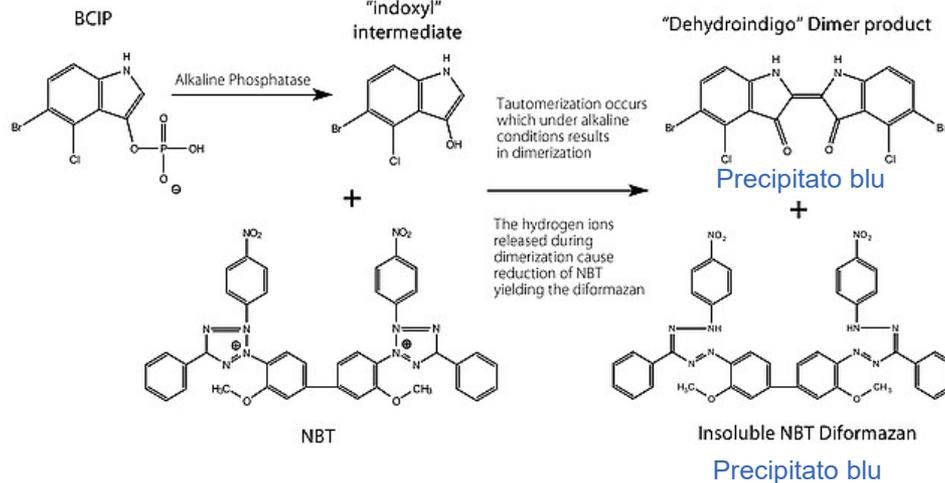
Perossidasi

5-bromo-4-cloro-  
indolofosfato (BCIP)  
+  
Nitro blue  
tetrazolium (NBT)

Precipitato blu

4-cloro-1-naftolo

Precipitato viola



## Rilevazione enzimatica nel western blotting



Perossidasi

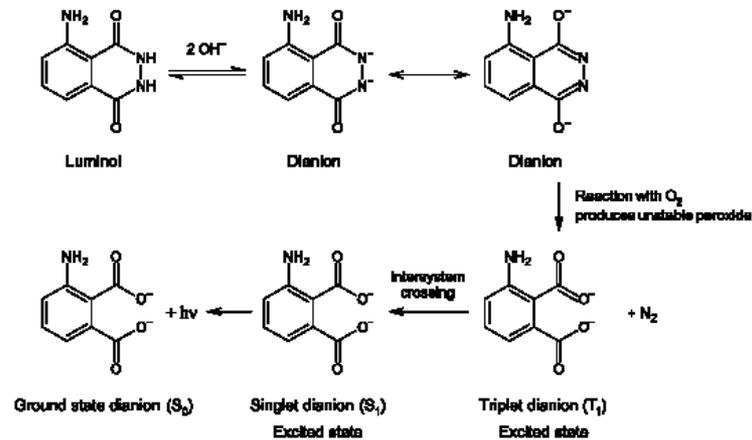
$H_2O_2$

Enhanced  
chemiluminescence

luminol

luce

5-ammino-2,3-diidro-1,4-ftalazindione



Intensificatore chimico > 1000 volte l'intensità della luce

# Applicazioni elettroforesi in chimica clinica

- **Proteine del siero**
- Proteine delle urine
- Proteine altri liquidi
- Lipoproteine
- Glicoproteine
- Aptoglobuline
- Emoglobine
- Amminoacidi-peptidi
- **Isoenzimi**
- DNA-RNA

# Elettroforesi isoenzimi

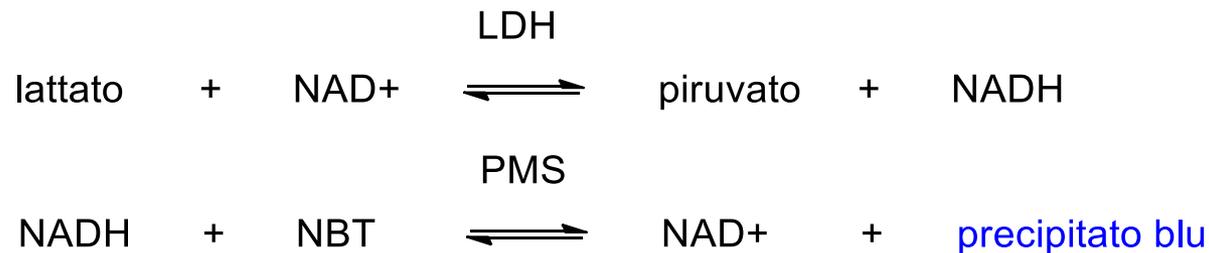
## LDH, lattato deidrogenasi

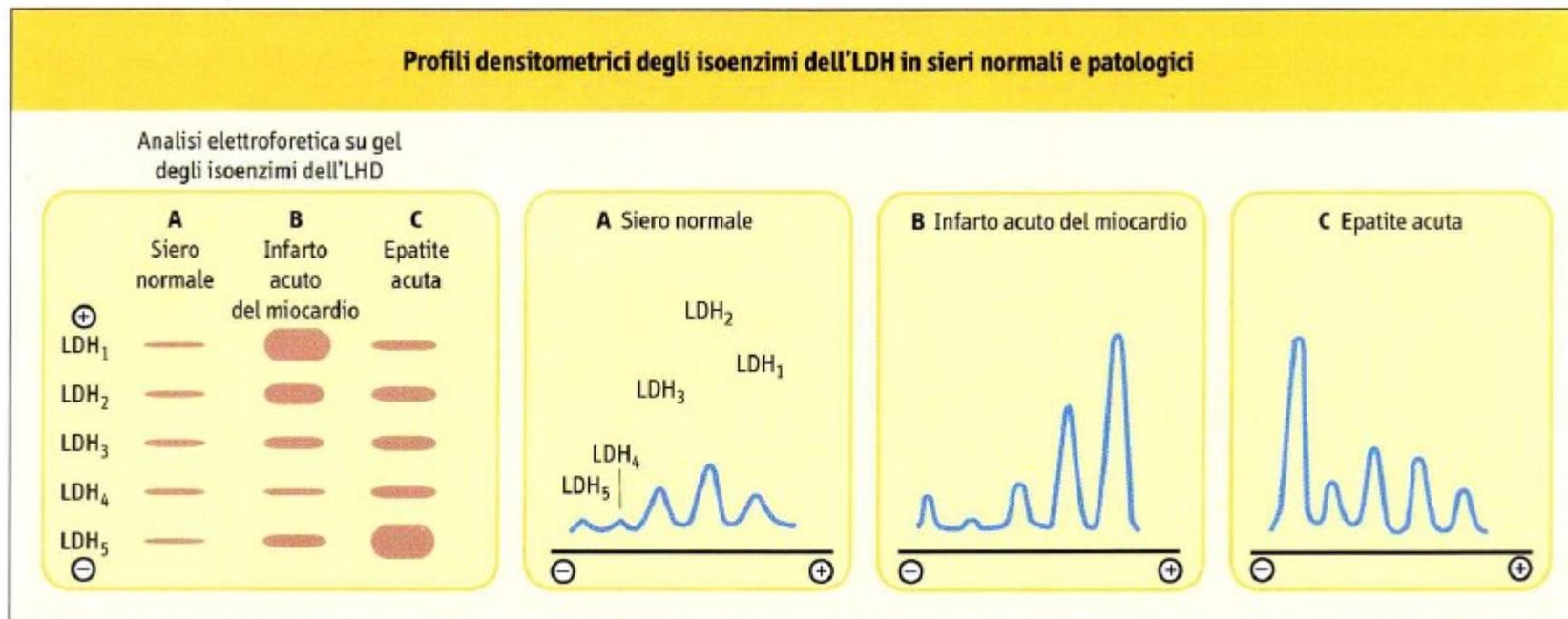
tetramero 144'000 Da (subunità 36'000 Da: H e/o M)

Esistono 5 isoenzimi:

- LDH1 (4M): presente nel muscolo cardiaco e negli eritrociti
- LDH2 (3H1M): presente nel sistema reticolo-endoteliale (si trova normalmente nel siero)
- LDH3 (2H2M): presente a livello dei polmoni
- LDH4 (1H3M): presente a livello di reni, pancreas e placenta
- LDH5 (4M): si ritrova nel fegato e nelle cellule del muscolo scheletrico

- I 5 isoenzimi hanno lo stesso peso molecolare ma essendo formati da subunità diverse la carica elettrica è diversa
- Si evidenziano poi tramite:





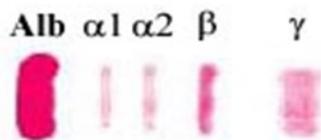
*Fig. 5.3* Quadri densitometrici degli isoenzimi dell'LDH nel siero di pazienti affetti da infarto del miocardio o epatite acuta. Gli isoenzimi che differiscono leggermente per la carica vengono separati mediante elettroforesi su acetato di cellulosa, identificati usando un substrato cromogeno e quantificati con metodo densitometrico. Anche l'LDH totale è aumentata nel siero di questi pazienti. Poiché l'emolisi determina il rilascio di LDH dai globuli rossi e influenza la diagnosi, i campioni di sangue devono essere trattati con cura. L'analisi dei livelli di LDH per la diagnosi dell'infarto del miocardio è oggi superata dall'analisi dei livelli di troponina plasmatici.

# Protidogramma

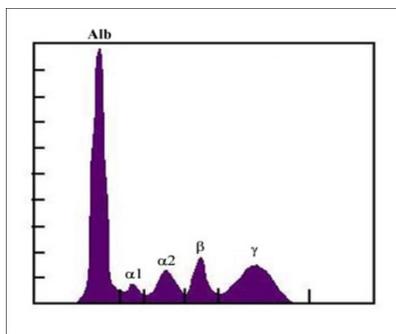
- L'elettroforesi del siero è utile per valutare la corretta funzionalità del fegato, la presenza di infiammazioni o infezioni nell'organismo e per la diagnosi di malattie che richiedono ulteriori approfondimenti come il mieloma multiplo
- Le proteine del siero sono sintetizzate in massima parte dal fegato e in quota minore da:
  - plasmacellule (le immunoglobuline o gli anticorpi),
  - sistema monocito/macrofagico (alcuni fattori del complemento)
  - dalle cellule della parete intestinale (alcune apo-lipoproteine).

# Proteine del siero

Tampone a pH 8.6  
le proteine sono negative  
e migrano verso l'anodo



5 frazioni



Sieroproteine caricate su un  
supporto di acetato di cellulosa

Elettroforesi zonale

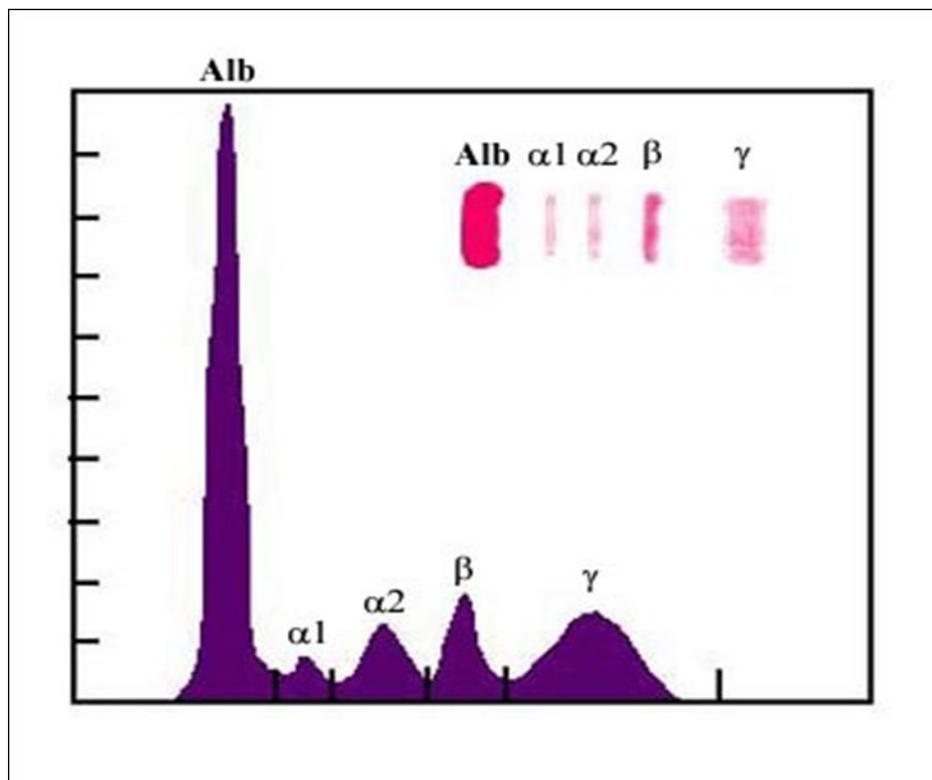
Colorazione  
(Rosso ponceau S)

Analisi densitometrica

Migrazione elettroforetica	Proteine	Funzione
Albumina	Albumina	Maggiore contributo alla pressione oncotica Trasporta bilirubina, steroidi, ac.grassi
$\alpha_1$ -globuline	$\alpha_1$ -antitripsina (90% del totale)	Inibitore proteasi. <b>Aumenta nell'infiammaz.</b> ; deficit congenito causa cirrosi e enfisema giovanili
	$\alpha_1$ -lipoproteine (HDL)	Trasporto lipidi (colesterolo)
	$\alpha_1$ -antichimotripsina	Inibisce serin-proteasi. <b>Aumenta nell'infiammaz.</b>
	$\alpha_1$ -glicoproteina acida	<b>Fase acuta infiammaz.</b>
$\alpha_2$ -globuline	Aptoglobine	Legano emoglobina. <b>Aumentano nell'infiammaz.</b>
	Ceruloplasmina	Inibitore perossidasi
	$\alpha_2$ -macroglobulina	Inibitore trombina, pepsina, tripsina. <b>Aumenta nella nefrosi.</b>

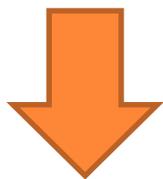
β-globuline	Pre-β lipoproteine (VLDL)	Trasporto lipidi (trigliceridi)
	Transferrina	Trasporto ferro. Aumenta nell'anemia sideropenica.
	Emopexina	Lega l'eme. Diminuisce nelle anemie emolitiche.
	β-lipoproteine (LDL)	Trasporto lipidi (colesterolo)
	β <sub>2</sub> -microglobulina	Componente antigene HLA I. Aumenta nell'infiammaz. e diminuita clearance renale
	fibrinogeno	Precursore fibrina
	Complemento (C1,3,4)	Risposta immune. <b>Aumenta nell'infiammaz.</b>
	Proteina C reattiva (CRP)	Norm. assente, compare in fase <b>acuta infiammaz.</b> Opsonizza batteri e funghi, chemoattrattore.
γ-globuline	Ig G-A-M-D-E	Anticorpi. <b>Picco monoclonale nel mieloma. Aumento policlonale nelle infezioni/infiammaz. Croniche</b>

# Proteine del siero



## Valori di riferimento

Proteine totali	6.0 – 8.0 g/dL
Albumina	3.5 – 5.0 g/dL
α1-globuline	0.1 – 0.4 g/dL
α2-globuline	0.4 – 1.3 g/dL
β-globuline	0.6 – 1.3 g/dL
γ-globuline	0.6 – 1.5 g/dL

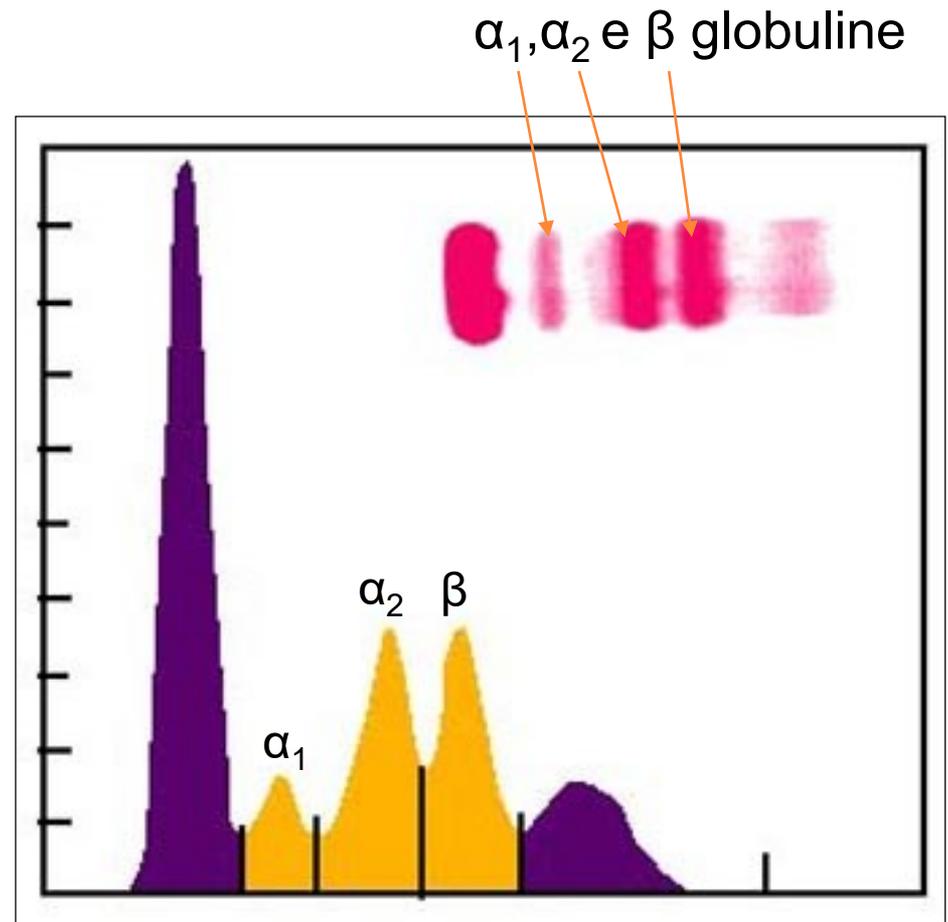


Le proteine totali  
diminuiscono se:

- insufficienza epatica,
- nefrosi con permeabilizzazione dei capillari,
- malattie da malassorbimento
- ridotto apporto dietetico.

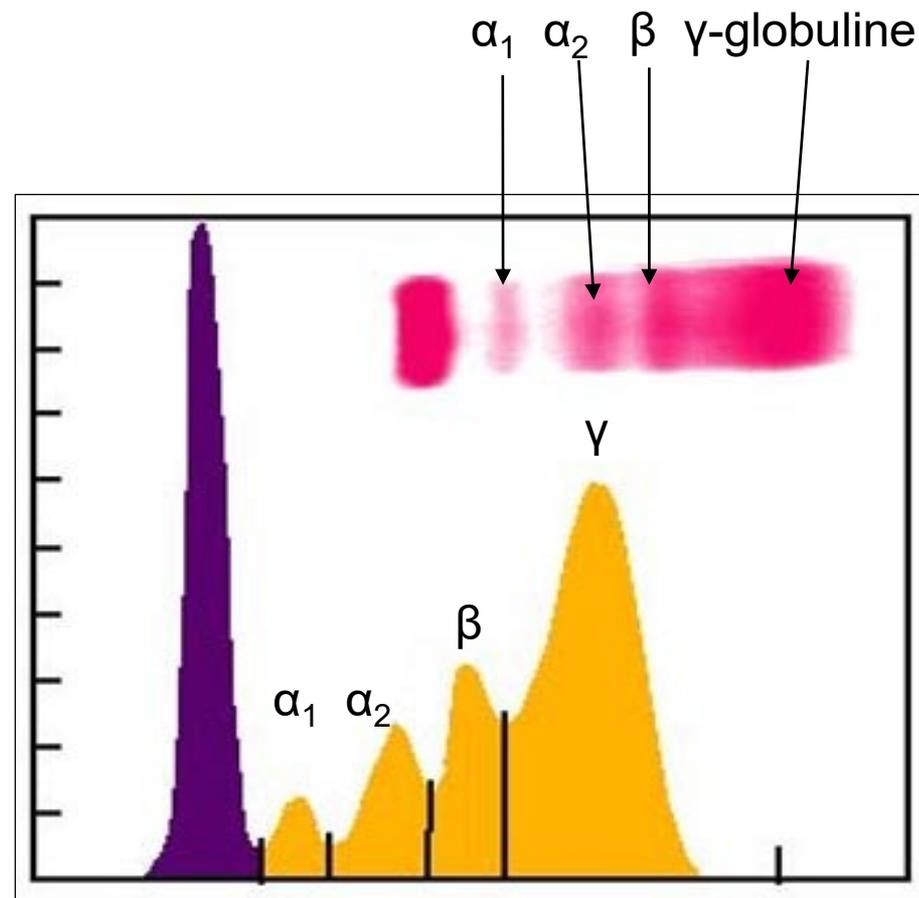
# Inflammatione acuta

- La risposta immediata avviene in caso di stress o infiammazione causati da infezione, ustioni, traumi, neoplasie, infarti
- Albumina normale o diminuita
- Aumento delle  $\alpha_1, \alpha_2$  e  $\beta$  globuline



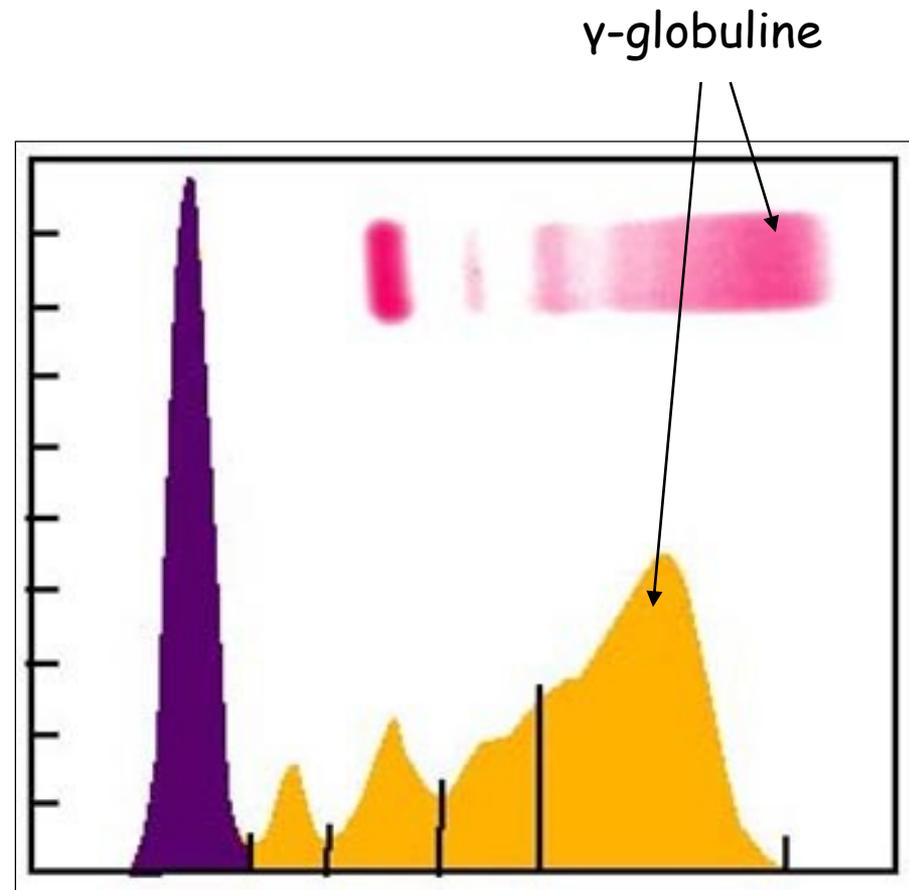
# Inflammatione cronica

- La risposta è correlabile ad una infezione cronica (malattie autoimmuni, malattia cronica del fegato, infezione cronica, cancro)
- Albumina normale o diminuita
- Aumento delle  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  o  $\beta$  globuline
- Notevole aumento delle  $\gamma$  globuline



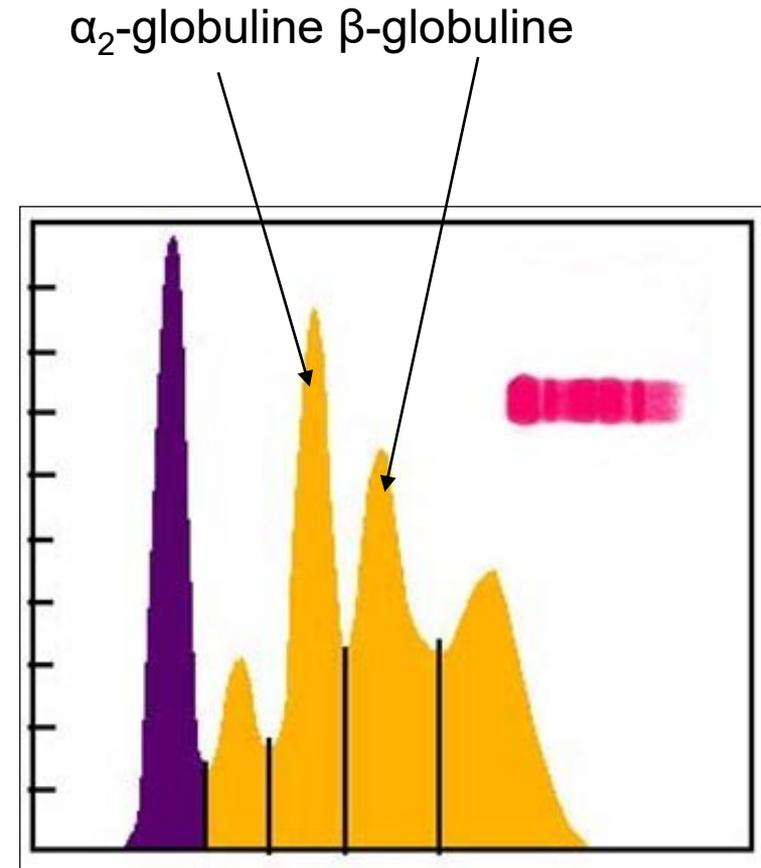
# Danno epatico - Cirrosi

- La cirrosi può essere data dall'abuso cronico di alcool o da epatiti virali
- Diminuzione dell'albumina
- Diminuzione delle  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  e  $\beta$  globuline
- Aumento delle Ig A nella frazione  $\gamma$



# Sindrome nefrosica

- Il danno renale comporta una perdita a lungo termine di proteine a basso peso molecolare (diminuiscono l'albumina e le IgG che vengono filtrate dai reni)
- La ritenzione delle proteine a più alto peso molecolare fa aumentare notevolmente i livelli delle macroglobuline  $\alpha_2$  e aumentare i livelli delle  $\beta$ -globuline



# Gammapatie monoclonali

- Le gammapatie monoclonali sono causate dalla proliferazione monoclonale di cloni di linfociti B che producono in modo anormale una specifica Ig, detta paraproteina, che essendo formata da un'unica tipologia di catena pesante e leggera dà un picco a base stretta nella zona delle gammaglobuline detta **banda M**.
- Spesso le paraproteine hanno una carica superficiale alterata rispetto alle Ig classiche per cui il picco potrebbe cadere al di fuori della zona delle  $\gamma$ -globuline, tra le frazioni  $\alpha_2$  e  $\gamma$ .
- La produzione di paraproteina può essere associata a gammapatie monoclonali benigne (in soggetti sani o concomitante a malattie infiammatorie, autoimmuni o epatopatie e sono transitorie) oppure sono associate a forme maligne come il mieloma multiplo.

Una banda stretta di globuline  $\gamma$

