

## METODO BRADFORD E SUA APPLICAZIONE:

Questa procedura analitica permette di determinare la concentrazione di una generica proteina in soluzione acquosa tramite un'analisi spettrofotometrica. Il reagente impiegato è il blu di Comassio, il quale si lega ad amminoacidi con residui basici (es. lisina, arginina ecc.) solo se presenti in struttura primaria proteica dando alla soluzione una colorazione blu. Se gli amminoacidi sono presenti ma liberi in soluzione non avverrà nessuna reazione. Siccome la quantità di residui basici legati presenti in una proteina cambia è sempre necessario preparare standard esterni della proteina di interesse e costruire una retta di calibrazione dalla quale estrarre la concentrazione del campione ignoto per interpolazione. Una volta preparati almeno cinque standard esterni a concentrazione nota e dopo aver aggiunto il reattivo blu di comassio, sia agli standard che al campione, si procede con la misurazione dell'assorbanza tramite spettrofotometro. I valori di assorbanza ottenuti vengono riportati in un grafico con l'assorbanza in ordinate e concentrazione in ascisse.

## DIVERSE VARIANTI E MECCANISMI IN CROMATOGRAFIA LIQUIDA

In primo luogo, si può distinguere tra cromatografia in fase normale e fase inversa.

La cromatografia a fase normale viene eseguita con una fase stazionaria polare e una fase mobile apolare.

Nella cromatografia a fase inversa la fase stazionaria è apolare mentre la fase mobile polare.

Tra i diversi meccanismi di cromatografia liquida quelli di maggiore importanza sono:

- Cromatografia di adsorbimento: la fase stazionaria consiste in una matrice solida (generalmente silice) nei quali viene adsorbito l'analita e la fase mobile. Il particolato di fase solida è latamente poroso, la maggior parte delle molecole vengono adsorbite negli interstizi. La separazione dipenderà dall'affinità dell'analita con la fase stazionaria solida.
- Cromatografia di ripartizione: si basa sull'equilibrio di ripartizione dell'analita tra due fasi liquide. La fase stazionaria in questo caso consiste in una fase liquida covalentemente legata ad una matrice solida (una delle più usate è la silice). Solitamente la fase liquida stazionaria consiste in idrocarburi con catene di lunghezza variabile; per esempio la fase stazionaria C<sub>18</sub> consiste in catene di 18 atomi di carbonio legate covalentemente al Si a sua volta legato all'ossigeno della silice.
- Cromatografia a scambio ionico: questo tipo di cromatografia è specifico per molecole di tipo ionico o che possono essere ionizzate per esempio acidi-basi che possono generare equilibrio con la fase stazionaria. La fase stazionaria presenta sulla superficie gruppi ionici di carica opposta a quella dell'analita. La fase mobile è particolarmente importante in questo tipo di metodologia poiché è necessario che il pH e la rimanga costante (soluzione tampone).
- Cromatografia ad esclusione dimensionale: in questo caso la fase stazionaria consiste in particelle di volume e dimensioni controllate ed il discriminante è la dimensione delle molecole di analita: le molecole aventi dimensioni molto superiori a quelle delle particelle di fase stazionaria avranno tempi di ritenzione minori rispetto a particelle di dimensioni minori, che rimarranno intrappolate nella fase stazionaria. Questo metodo è utilizzato se si devono separare molecole ad alto peso molecolare (es. macromolecole).

**VALUTAZIONE EFFETTO MATRICE NELLA DETERMINAZIONE DI CA:** per determinare se l'effetto matrice produce un errore significativo nella tecnica analitica sono state eseguite analisi tramite spettroscopia atomica usando sia il metodo degli standard esterni che quello degli standard interni.

Per il primo metodo sono stati preparati cinque soluzioni standard a concentrazione nota ed è stata costruita la retta di calibrazione. La concentrazione del campione incognito è stata estrapolata dalla curva ottenuta.

Per il metodo delle aggiunte standard è stata prima misurata l'assorbanza del Ca<sup>+</sup> tramite spettroscopia atomica di una frazione del campione incognito. Sono state poi effettuate delle aggiunte di diversi volumi di

una soluzione a concentrazione nota di ioni  $\text{Ca}^+$ . Per ogni campione ottenuto tramite l'aggiunta di volume noto di una soluzione standard è stata misurata l'assorbanza. Dai cinque valori di assorbanza così ottenuti è stata ricavata una curva di calibrazione. La concentrazione della soluzione incognita è stata ottenuta calcolando l'intercetta della retta con l'asse delle ascisse.

DERIVAZIONE DI LEGGE DI LAMBERT BEER:

$$dP = -Pc\beta dx$$

$$\frac{dP}{P} = -c\beta dx$$

$$\int_{P_0}^P \frac{dP}{P} = \int_0^b -c\beta dx$$

$$\ln\left(\frac{P}{P_0}\right) = -c\beta b$$

Siccome  $A = -\log(T)$  passo da  $\ln$  a  $\log$  e moltiplico entrambi i membri dell'equazione per  $-1$

$$\log\left(\frac{P_0}{P}\right) = c\epsilon b \rightarrow A = c\epsilon b$$

**ANALIZZATORE A TEMPO DI VOLO:** è una tipologia di separatore di massa impiegato nella spettrometria atomica. Gli ioni, provenienti dallo ionizzatore, vengono accelerati tramite l'applicazione di una differenza di potenziale verso il rivelatore. Gli ioni possiederanno stessa energia cinetica, siccome questa sarà dovuta al valore costante di differenza di potenziale imposta. L'energia cinetica è pari a  $T = \frac{1}{2}mv^2$ , quindi se l'energia degli ioni è la stessa la loro velocità cambierà in base alla loro massa: ioni a massa maggiore avranno velocità minore e quindi impiegheranno più tempo per raggiungere il rivelatore.

Nei separatori di massa a tempo di volo più semplici il percorso degli ioni verso il rivelatore è lineare. Tuttavia, per migliorare il potere risolvete alcuni apparecchi forzano l'arresto degli ioni precedentemente accelerati tramite un reflectron: una serie di anelli consecutivi a differenza di potenziale crescente. Dopo l'arresto gli ioni vengono nuovamente accelerati e direzionati verso il rivelatore posto nella parte opposta. Questo perfezionamento è utile poiché nella pratica il potenziale dipende dalla distanza a cui viene applicato, perciò, durante la fase iniziale della separazione, ioni che si trovano vicino alla sorgente di energia potenziale possiederanno energia superiore rispetto a ioni più distanti. Portando la loro energia cinetica a zero e poi accelerandoli gli ioni aventi stessa massa raggiungeranno il rivelatore nello stesso momento indipendentemente dall'energia cinetica iniziale.