

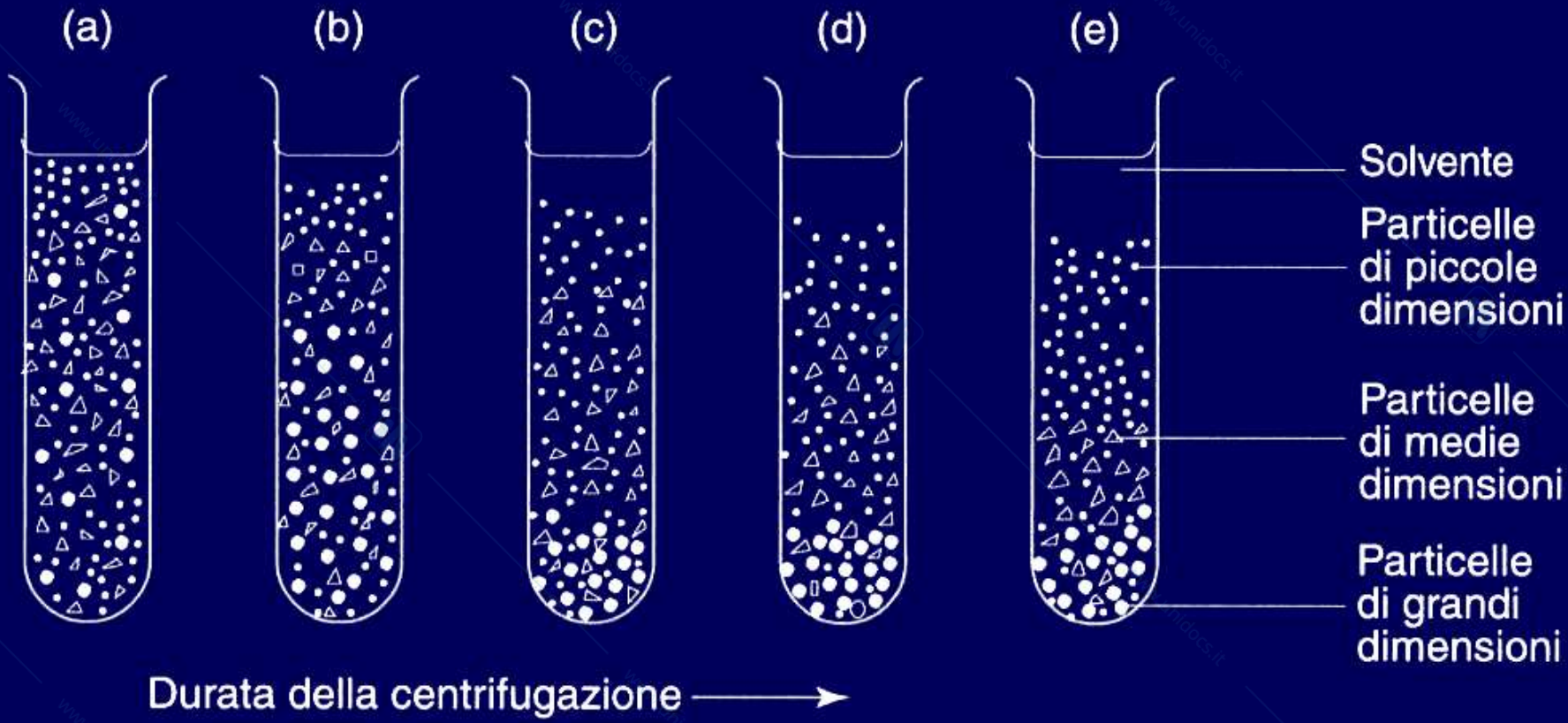
# TECNICHE SEPARATIVE

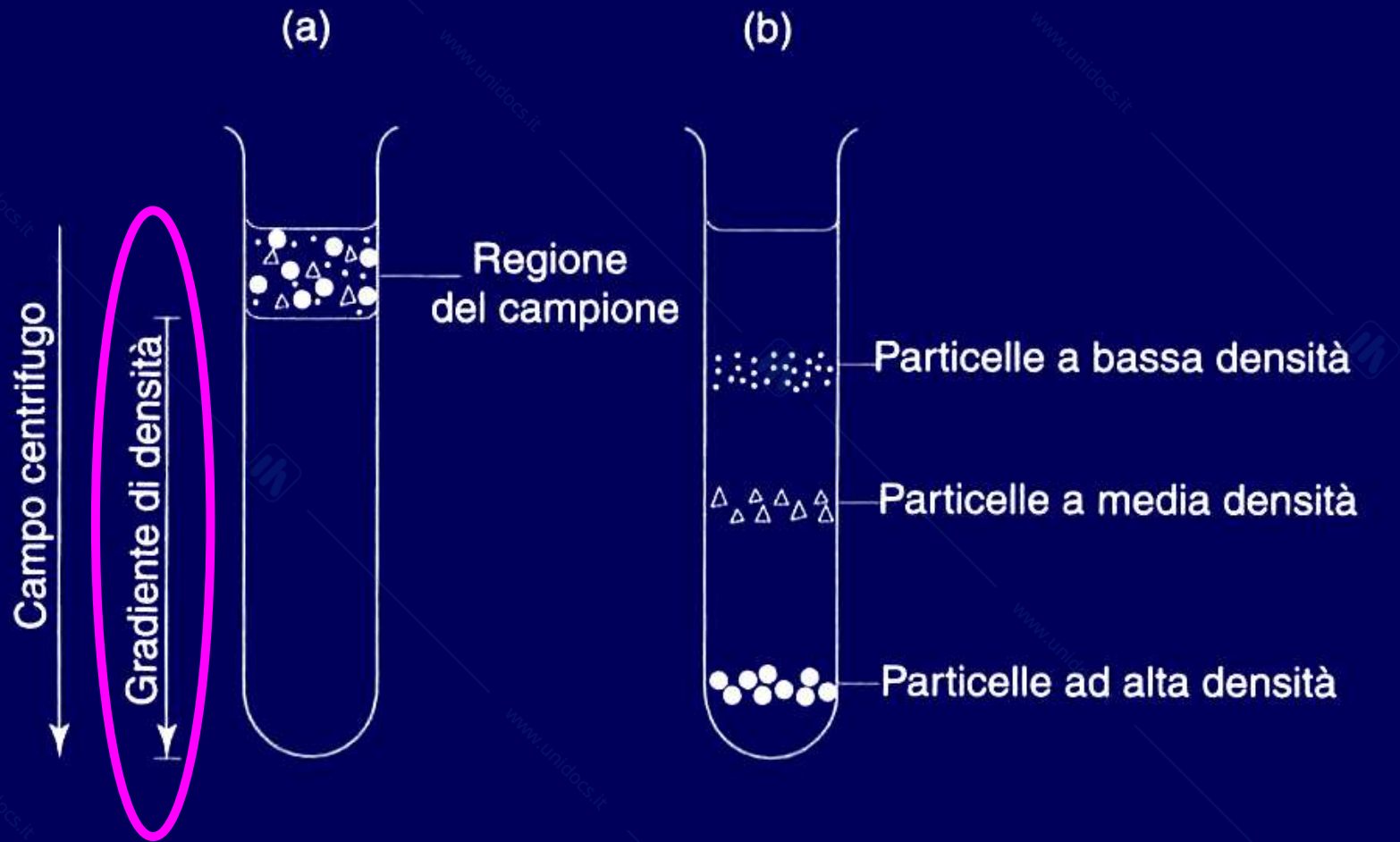
# Centrifugazione

Si basa sul comportamento delle particelle in un campo centrifugo

Le particelle sedimentano con velocità diverse a seconda delle caratteristiche di densità, dimensione e forma

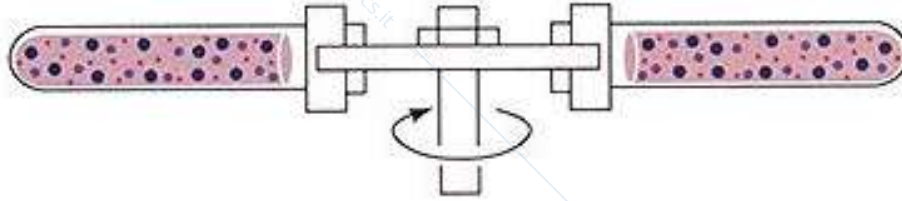
Campo centrifugo  
↓







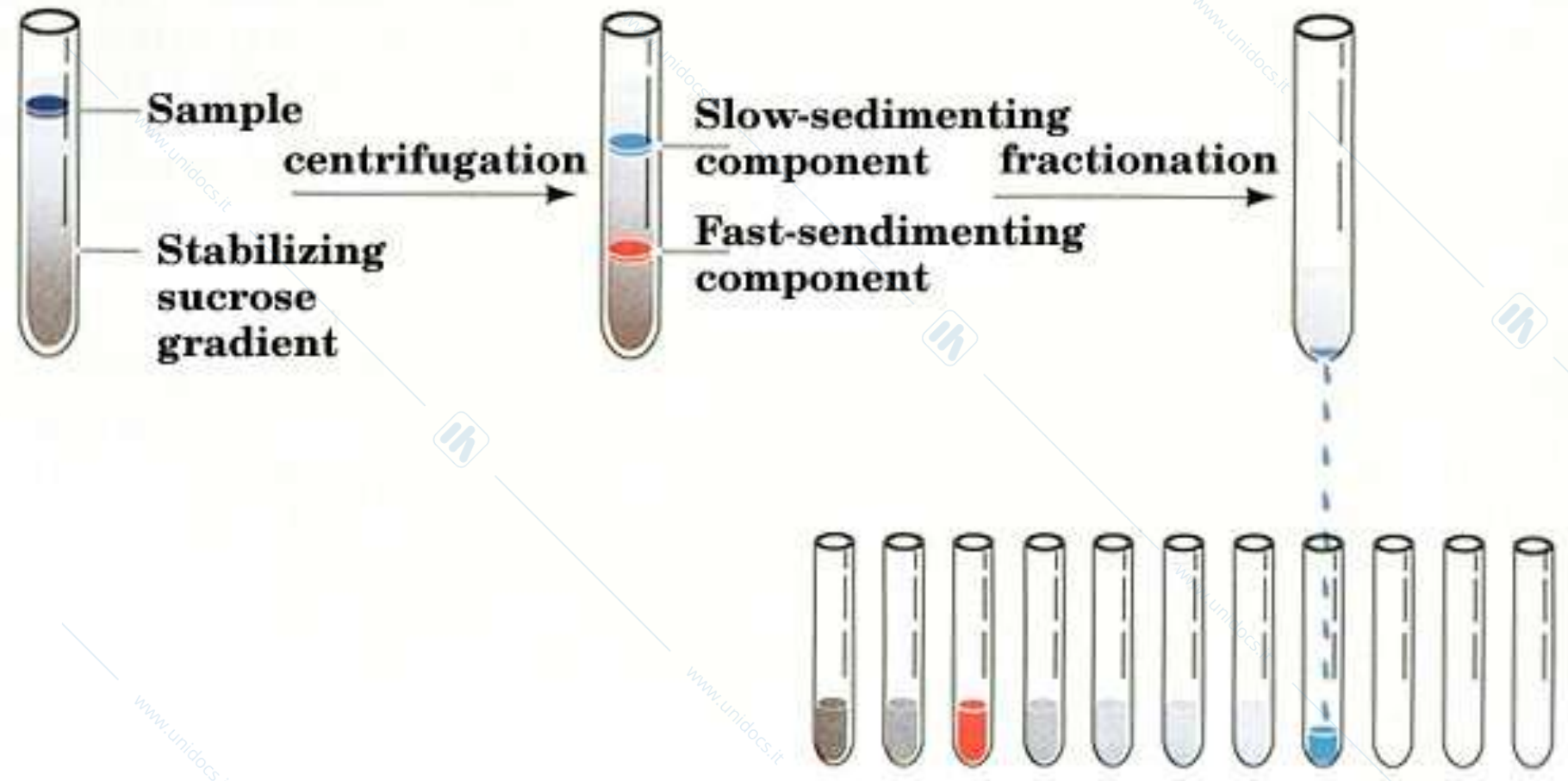
**3. Gradient is formed and samples band at their isopycnic positions**



**2. Centrifugation**



**1. Uniform mixture of sample and gradient-forming substance**

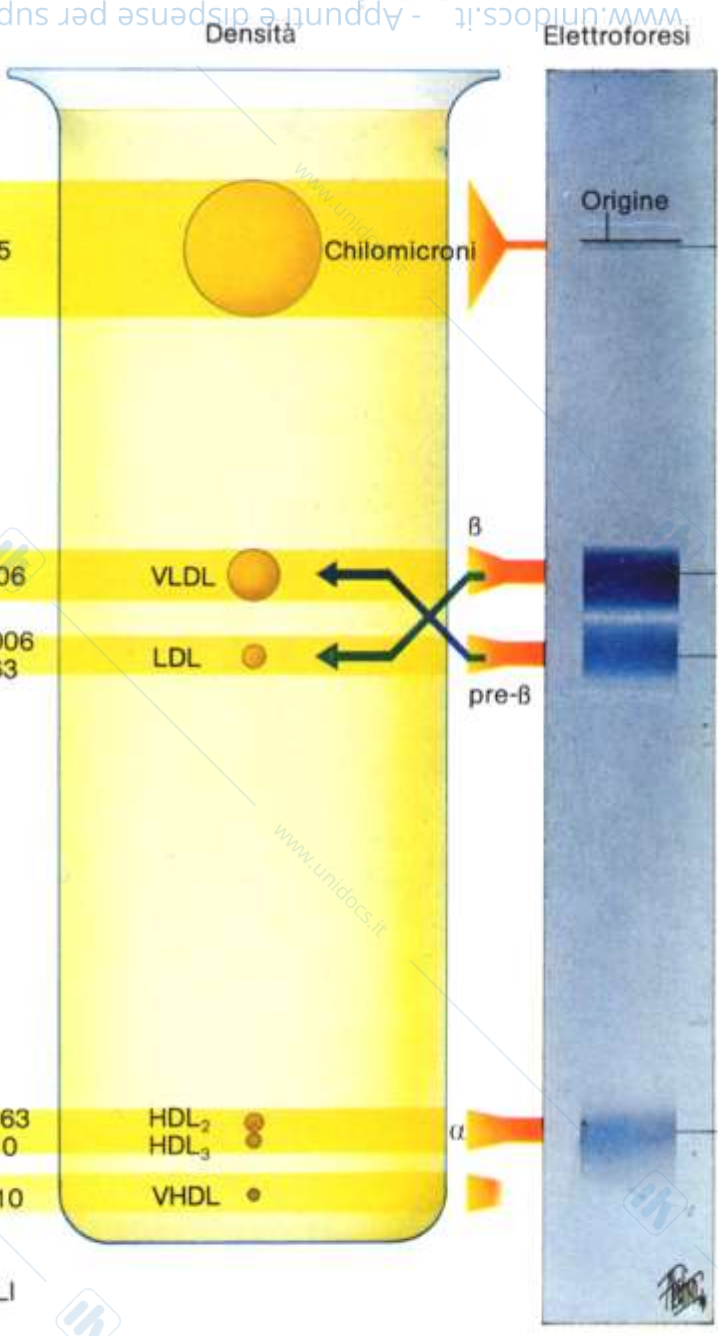
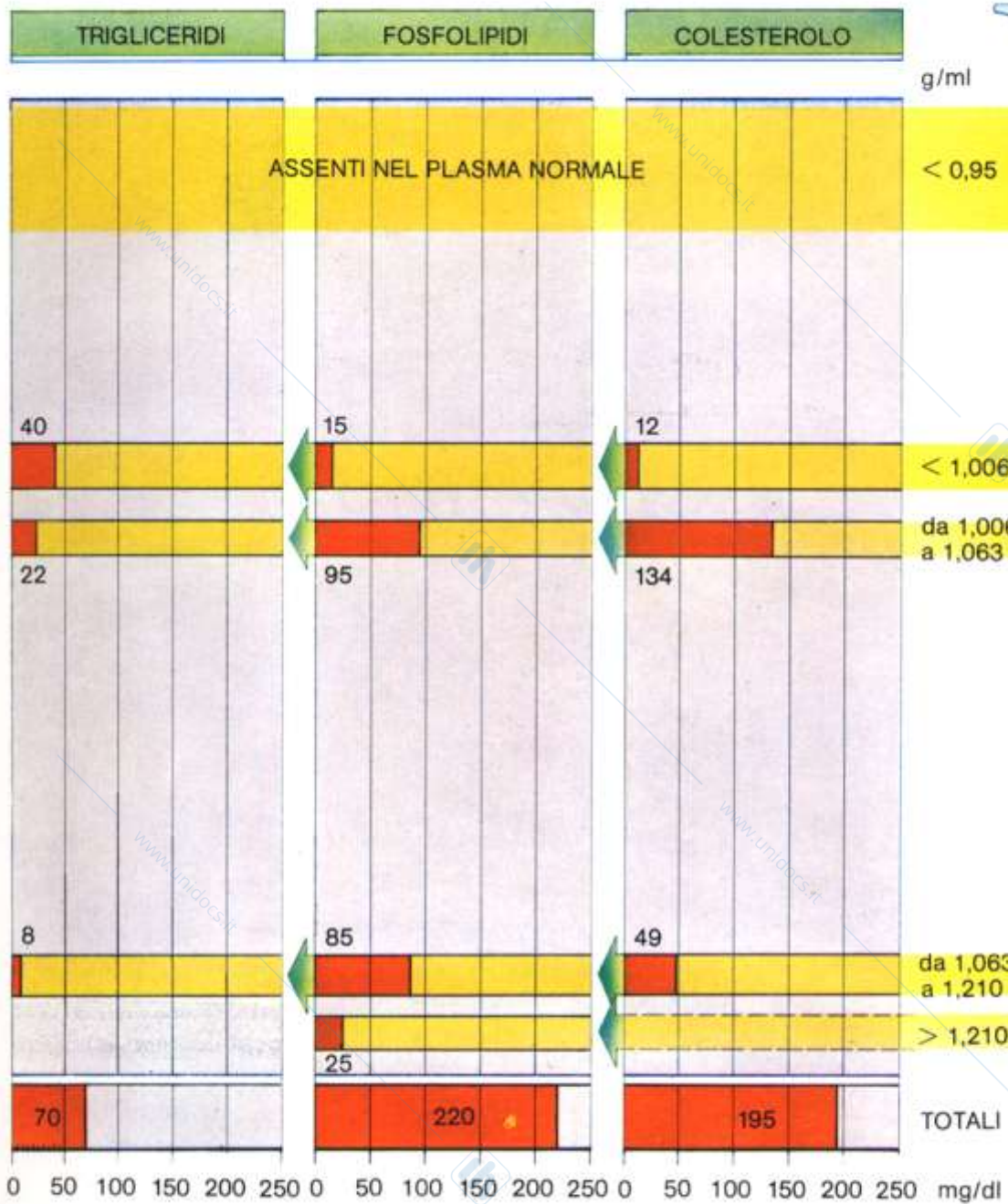


## Materiali per gradienti maggiormente usati e loro applicazioni

Materiale	Forza ionica della soluzione	Densità massima della soluzione acquosa a 20 °C (g cm <sup>-3</sup> )	Assorbanza nell'ultravioletto	Effetto osmotico	Utilizzo comune
Cloruro di cesio	+++	1.91	+	+++	Separazione di DNA, nucleoproteine, virus e isolamento di plasmidi
Solfato di cesio	+++	2.01	+	+++	Separazione di DNA e RNA, purificazione di proteoglicani
Bromuro di sodio	+++	1.53	+	+++	Frazionamento di lipoproteine
Ioduro di sodio	+++	1.90	+++	+++	Separazione di DNA e RNA
Glicerolo	-	1.26	+	+++	Separazione di frammenti di membrana, separazione di proteine
Saccarosio	-	1.32	+	+++	Separazione di particelle subcellulari, proteine, virus e membrane
Ficoll (Pharmacia)	-	1.17	+	+(.)	Separazione di cellule intere, particelle subcellulari, virus
Destrano	-	1.13	+	+(.)	Separazione di cellule intere, bande di microsomi
Albumina di siero bovino	-	1.35	+++	+	Separazione di cellule intere
Percoll (Pharmacia)	-	1.30	+++	+	Separazione di cellule intere e particelle subcellulari
Metrizamide (Nyegaard)	-	1.46	+++	++(*)	Separazione di cellule intere, particelle subcellulari, nuclei, particelle ribonucleoproteiche, membrane
Nycodenz (Nyegaard)	-	1.42	+++	++(*)	Separazione di cellule intere, particelle subcellulari, nuclei, particelle ribonucleoproteiche, membrane, virus

+++; alta; ++, media; +, bassa; - non-ionica. (\*) L'effetto osmotico aumenta quasi linearmente con la concentrazione. (.) Effetto osmotico molto basso a una concentrazione inferiore del 20% (w/v); aumento quasi esponenzialmente sopra una concentrazione del 30% (w/v).

DISTRIBUZIONE IN 100 ml DI PLASMA



www.unidocs.it - Appunti e dispense per superare i tuoi esami universitari

www.unidocs.it - Appunti e dispense per superare i tuoi esami universitari

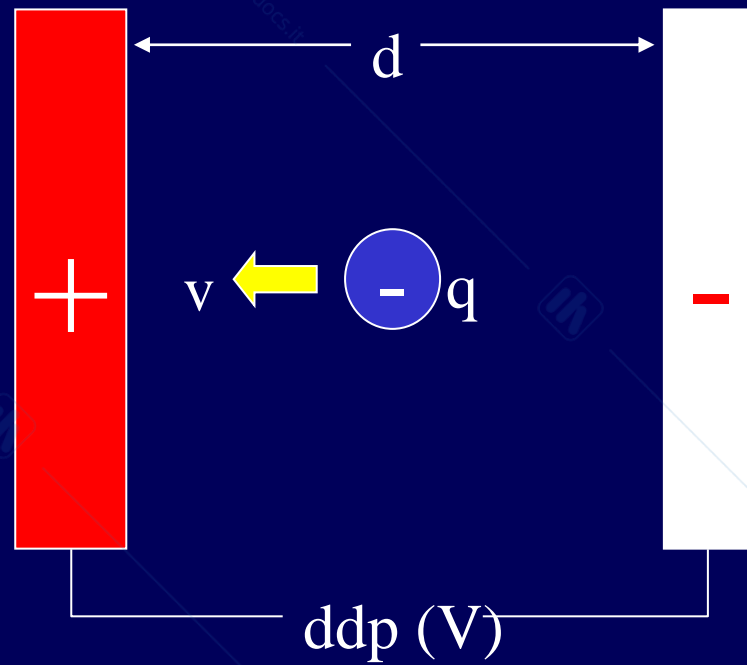
# ELETTROFORESI

Si basa sulla migrazione di particelle cariche  
(amminoacidi -proteine- e nucleotidi -DNA e RNA-)  
sotto l'influenza di un campo elettrico

<http://www.dnalc.org/resources/animations/gelectrophoresis.html>



# ELETTROFORESI



La molecola si muove verso l'elettrodo di segno opposto con una velocità ( $v$ )

$$v = Eq/f$$

$f$  = coefficiente d'attrito

# La velocità di migrazione dipende:

- dal campo elettrico  $E$ ;
- dalla carica  $q$  della particella;
- dalle forze frizionali  $f$  (in pratica, dalle dimensioni della particella):

$$v = E q / f$$

A parità di “viscosità” del mezzo, la velocità di migrazione dipende dalla **differenza di potenziale** e dalla **densità di carica** ( $q/r$ ).

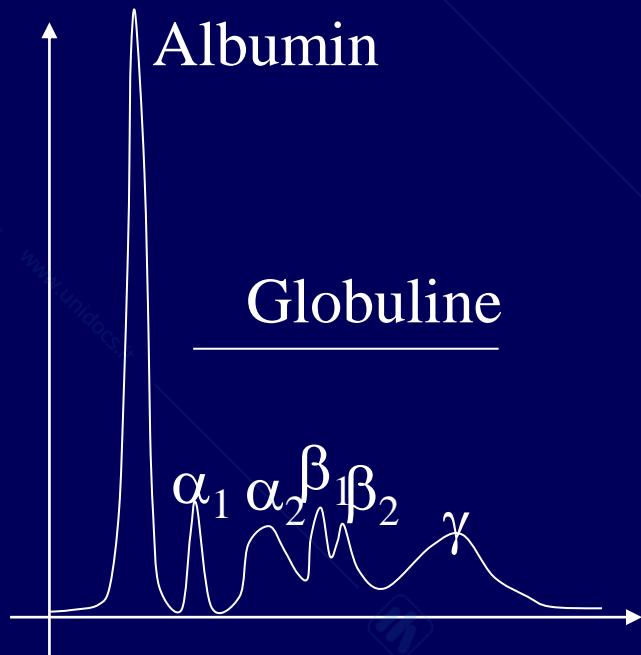
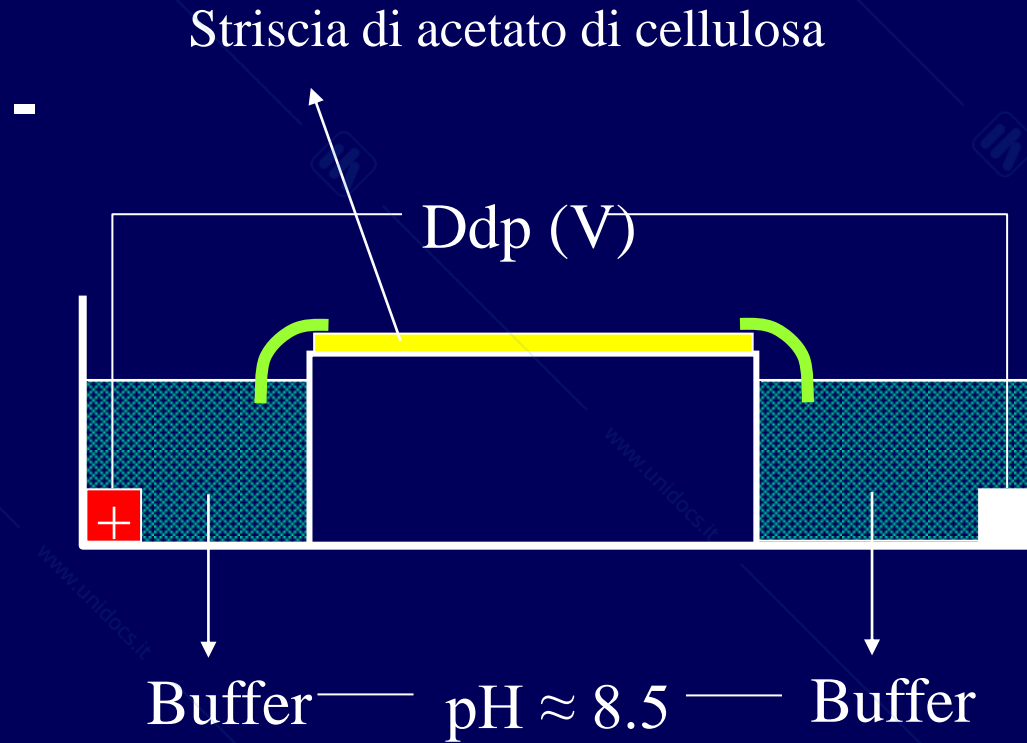
# LE PROTEINE PLASMATICHE

Si dividono in 2 gruppi:

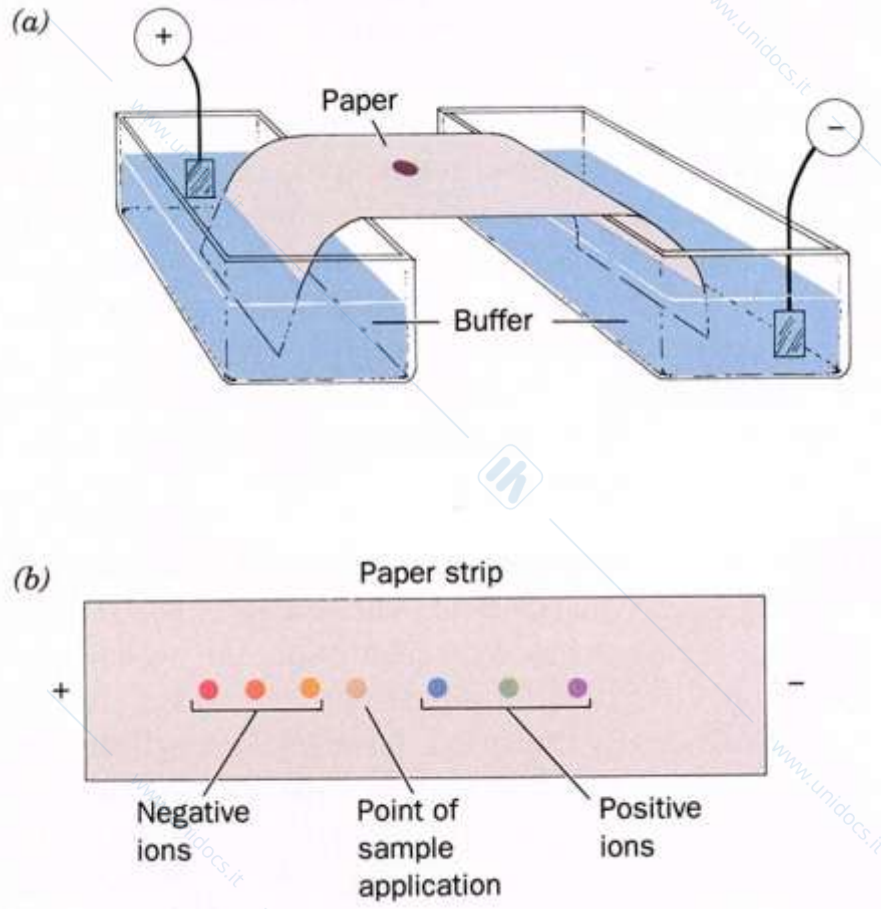
- 1) Albumine
- 2) Globuline (4 tipi principali)

Vengono prodotte principalmente a livello **epatico**

# Elettroforesi su acetato di cellulosa per la separazione delle proteine plasmatiche



# Elettroforesi su acetato di cellulosa



Si immerge la striscia in una soluzione colorante (Rosso Ponceau, Amido black)

Si procede alla lettura densitometrica.

Protidogramma: grafico in cui appaiono in ordinata l'intensità delle frazioni e in ascissa la loro posizione

# GLOBULINE

## $\alpha_1$

$\alpha_1$ -Acid glycoprotein  
 $\alpha_1$ -T Glycoprotein  
 $\alpha_1$ -Antitrypsin  
Transcortin  
 $\alpha_1$ -Antichymotrypsin  
 $\alpha_1$ -B Glycoprotein  
9,5 S- $\alpha_1$ -glycoprotein  
Vitamin D-binding protein  
 $\alpha_1$ -Lipoproteins

## $\beta_1$

Hemopexin  
Steroid-binding  $\beta$ -globulin  
Transferrin  
Pregnancy-specific  $\beta_1$ -glycoprotein  
Cold insoluble globulin  
Factor V (Accelerin)  
Factor VII (Proconvertin)  
Factor IX (Christmas)  
Plasminogen  
C3 Proactivator  
Transcobalamin II  
 $\beta$ -Lipoproteins  
C1r, C2  
C4, C5

## $\alpha_1 / \alpha_2$

Thyroxine-binding globulin  
Zn- $\alpha_2$ -glycoprotein  
Gc globulin  
Ceruloplasmin  
Inter- $\alpha$ -trypsin inhibitor  
Antithrombin III  
Factor X (Stuart-Prower)  
Transcobalamin I  
C9

## $\beta_2$

$\beta_2$ -Microglobulin  
 $\beta_2$ -Glycoprotein III  
 $\beta_2$ -Glycoprotein I  
Fibrinogen  
Factor XI (PTA)  
Factor XII (Hageman)  
Factor XIII (FSF)  
C3, C6, C7  
C3 Activator ( $\beta_2$ II)

## $\alpha_2$

**Retinol-binding protein**  
 **$\alpha_2$  HS glycoprotein**  
**Histidine-rich 3,8 S- $\alpha_2$ -glycoprotein**  
**Haptoglobin**  
**Pregnancy zone protein**  
 **$\alpha_2$ -Macroglobulin**  
**Prothrombin**  
**Antihemophilic factor**  
**C1 inactivator**  
**C1s**

## $\gamma_1$

**IgG**  
**IgA**  
**IgD**  
**IgE**  
**IgM**  
**Amylase**

## $\alpha_2 / \beta_1$

**Serum cholinesterase**  
**8 S- $\alpha_3$ -glycoprotein**  
**4 S- $\alpha_2, \beta_1$ -glycoprotein**  
**Transcobalamin III**

## $\gamma_2$

**IgG**  
**Clq**  
**Properdin**

# ALBUMINE

- Prealbumina (transiretina):  
maggior mobilità elettroforetica dell'albumina. Il termine transtiretina assume invece un significato funzionale, dal momento che la proteina funge da trasportatore plasmatico di **tiroxina** e **retinolo** (che veicola in modo indiretto mediante legame equimolecolare con la RBP: retinol binding protein).  
Ha un'emivita breve (2 g) ed è ricca di Trp.
- Albumina:  
la piu' abbondante proteina nel plasma (50-60% del totale).  
Fegato ne sintetizza 9-12 g/giorno).  
Lega ormoni liposolubili, Fe, acidi grassi, bilirubina, farmaci. Ha 4 siti.  
Ha emivita di 21 g. Principale regolatore della pressione osmotica, regolando scambi idrici tra plasma e tessuti a livello capillare.



## ALBUMINE:

### Sintesi ridotta:

Insufficiente assunzione di aa (malnutrizione) (prealbumina)

Malattie epatiche

### Aumentata escrezione:

Danni renali (escrezione eccessiva per malfunzionamento glomerulo)

# GLOBULINE


## $\alpha$ 1 globuline:

- $\alpha$ 1 antitripsina (90%): il più importante sistema di difesa delle vie respiratorie inferiori contro i danni causati da queste proteasi sulle pareti degli alveoli.

Inibisce l'elastasi che viene rilasciata dai neutrofili per combattere l'infezione. Carenza di questa proteina può distruggere alveoli (enfisema).

Il fumo aumenta la produzione di elastasi da parte delle cellule del sistema immunitario.

In soggetti carenti di antitripsina: Terapia sostitutiva

  $\alpha 1$  globuline  
Stati infiammatori



$\alpha 1$  globuline  
Disfunzioni epatiche  
Carenza congenita

# Globuline

## $\alpha_2$ globuline:

- Aptoglobina: veicola l'Hb, derivante da eventuale emolisi verso il sistema reticolo endoteliale dove viene catabolizzata. L'aptoglobina diminuisce quando vi è eccessiva distruzione di emazie (stati iperemolitici).

Anche questa frazione aumenta nei processi infiammatori

## $\beta$ globuline:

Transferrina: ha 2 siti ad alta affinità per il Ferro che trasporta dai tessuti che lo liberano ai tessuti che ne hanno bisogno (tessuto eritropoietico e placenta).

## Fibrinogeno

Aumenta nelle epatopatie tossiche e infettive

# Globuline

## $\gamma$ Globuline (o immunoglobuline): gli anticorpi

Aumento (policlonale) nelle:

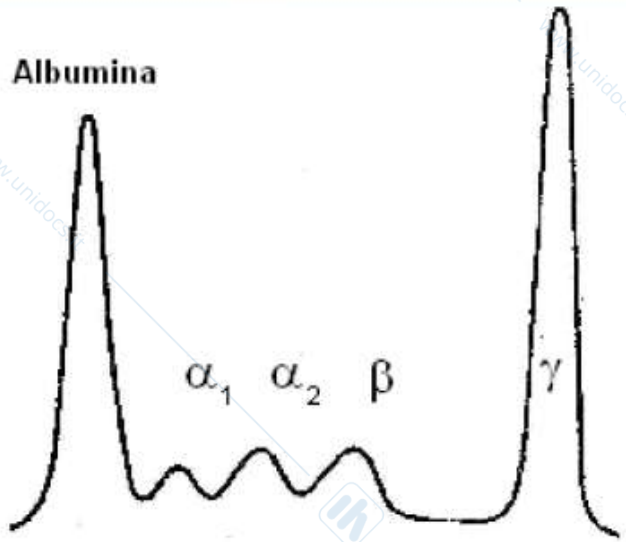
- epatopatie virali (fenomeno tardivo ma persistente)  
Nella fase acuta l'ipergammaglobulinemia è dovuta alla IgM  
Nell'epatite cronica attiva aumentano le IgG  
Nell'epatite cronica da alcol aumentano le IgA
- Malattie autoimmuni

Aumento (monoclonale) nel:

- Mieloma multiplo (iperproliferazione di un clone di plasmacellule)

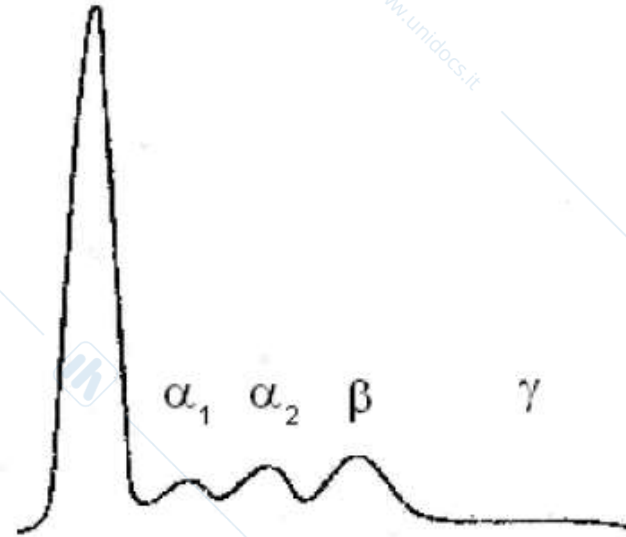
Diminuiscono nelle immunodeficienze acquisite o congenite

**Albumina**



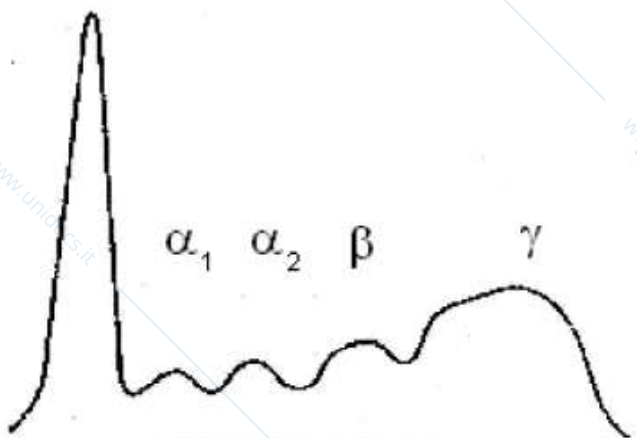
**Gammopatia monoclonale**

**Albumina**

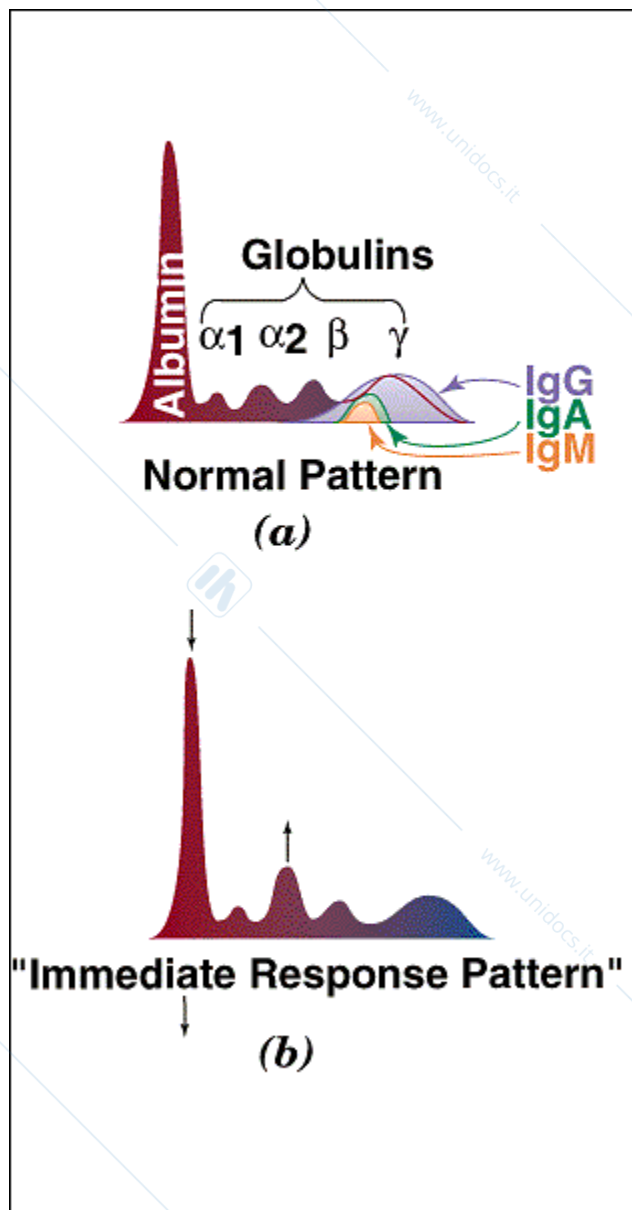


**Ipogammaglobulinemia**

**Albumina**



**Cirrosi epatica**



Nella risposta  
infiammatoria acuta  
aumenta la frazione alfa  
e beta

# Rapporto albumine/globuline A/G

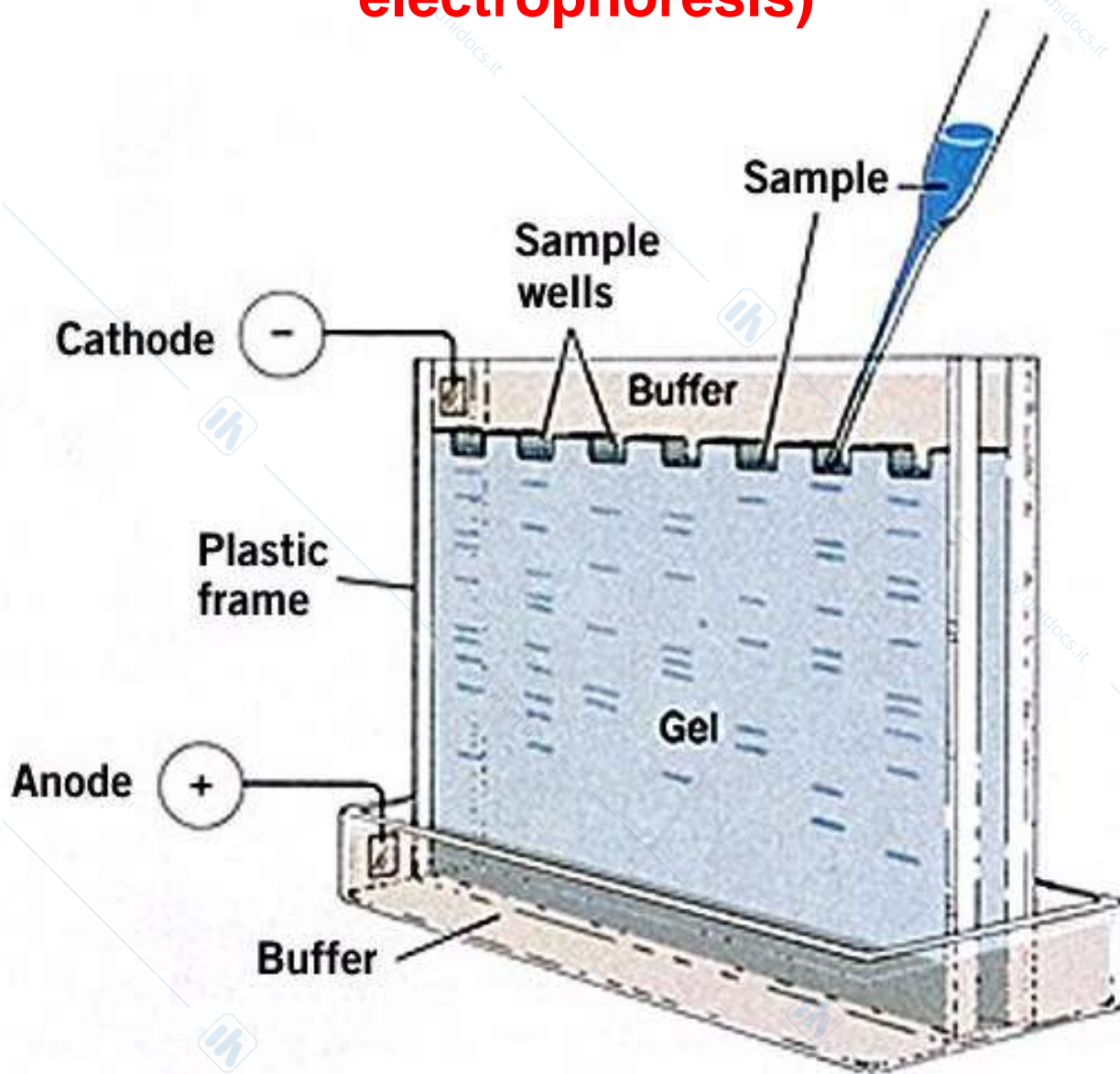
Valori di riferimento 1.2-1.7

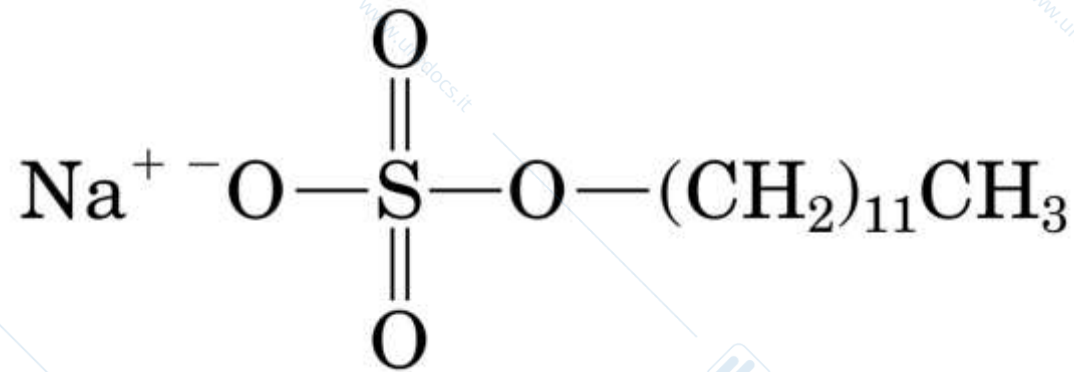
Valori inferiori:

Nelle epatopatie croniche (cirrosi)  $A/G < 1$   
(albumina diminuisce, globuline aumentano)

Valori superiori

# SDS PAGE (sodium dodecyl sulphate polyacrilammide gel electrophoresis)



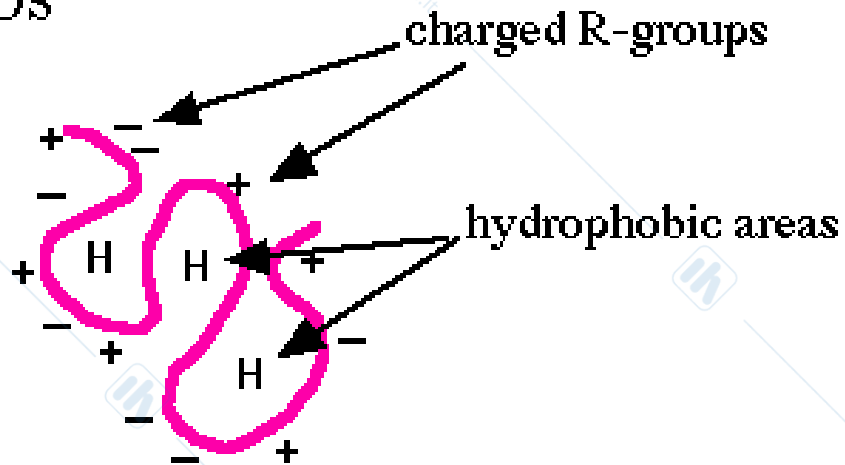


Sodium dodecyl sulfate  
(SDS)

<http://bcs.whfreeman.com/stryer/pages/bcs-main.asp?s=00040&n=99000&i=99040.01&v=category&o=&ns=0&t=&uid=0&rau=0>

# Trattamento con SDS

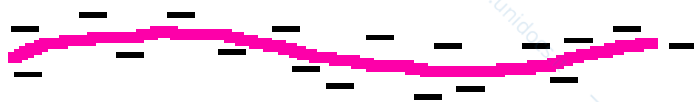
BEFORE SDS



Si aggiunge b-  
mercaptoetanololo

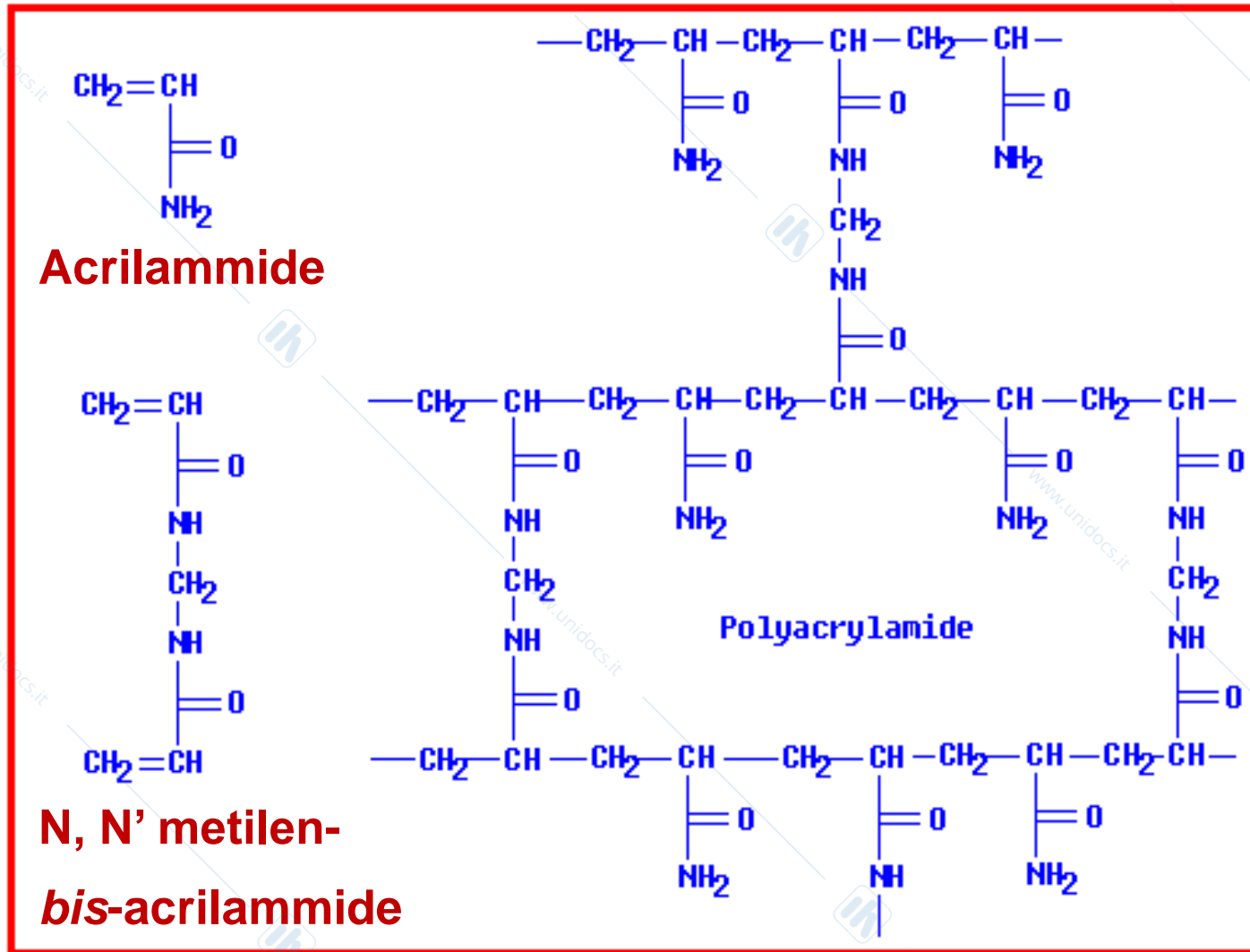
**CONDIZIONI  
DENATURANTI**

AFTER SDS

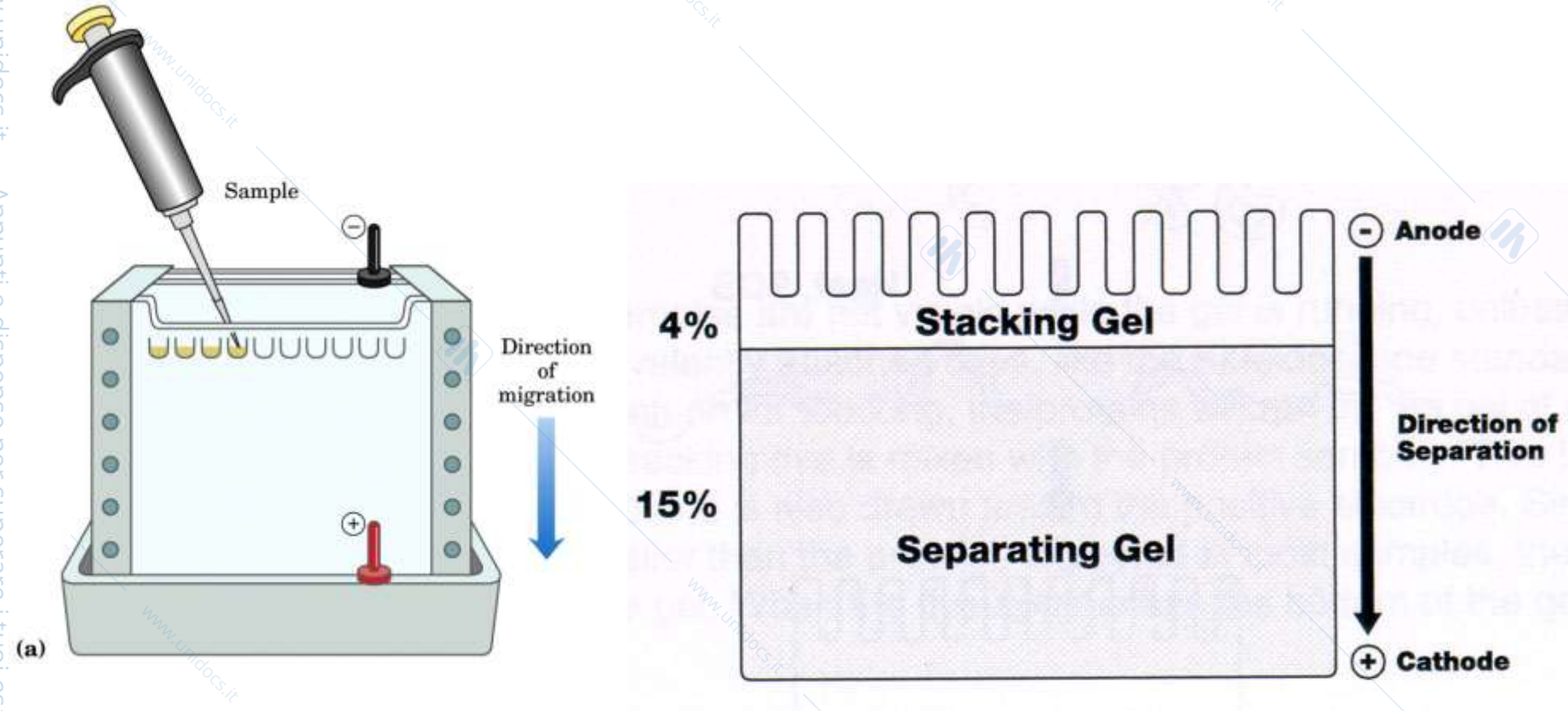


La velocità di migrazione delle proteine trattate con SDS dipende solo dalla loro massa molecolare.

La poliacrilammide deriva dalla copolimerizzazione radicalica di acrilammide e di un agente reticolante.

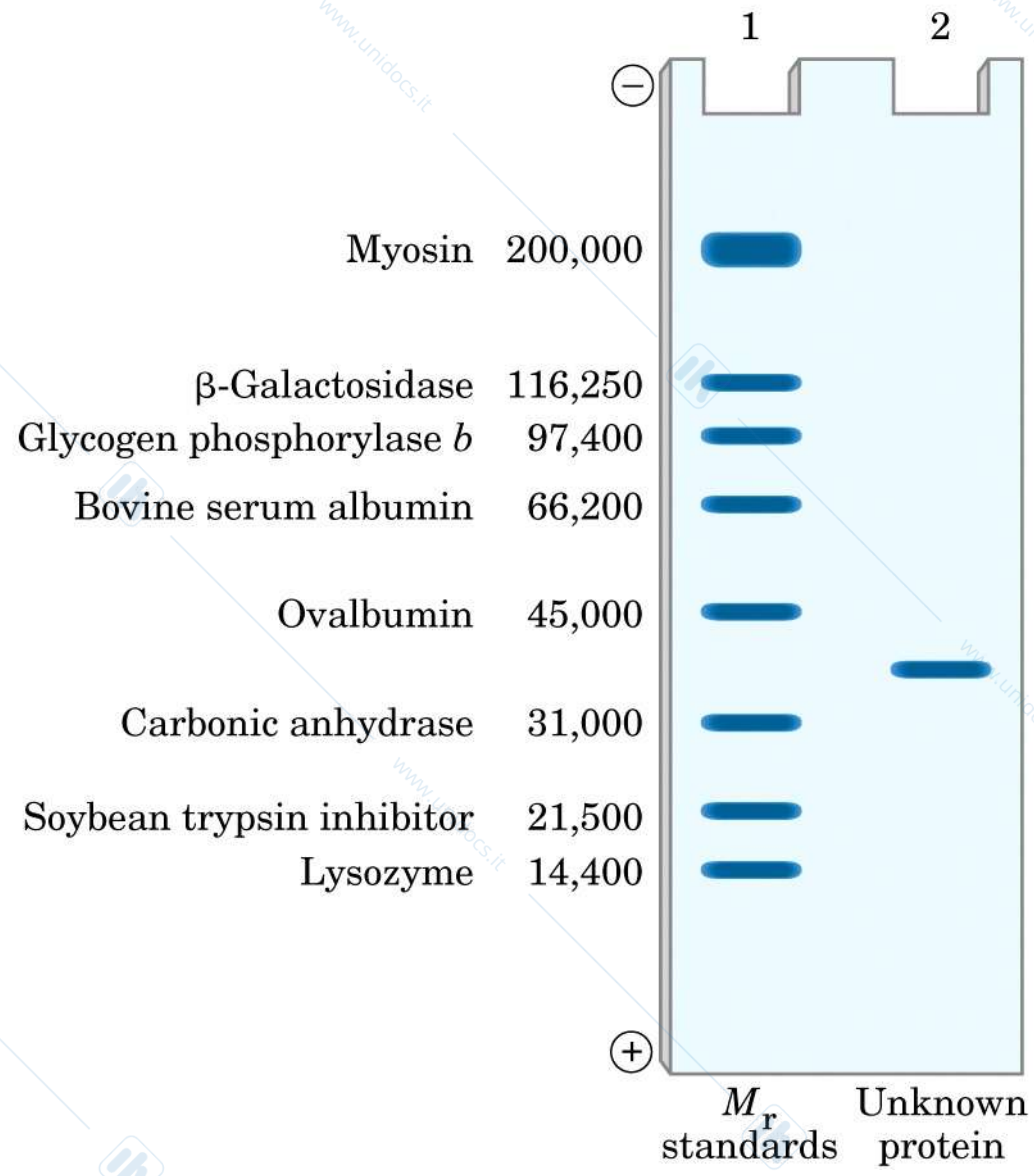


La polimerizzazione ha inizio grazie al TEMED (N,N,N',N'-tetrametilendiammina), che catalizza la decomposizione dell'ammonio persolfato (APS) con formazione di radicali

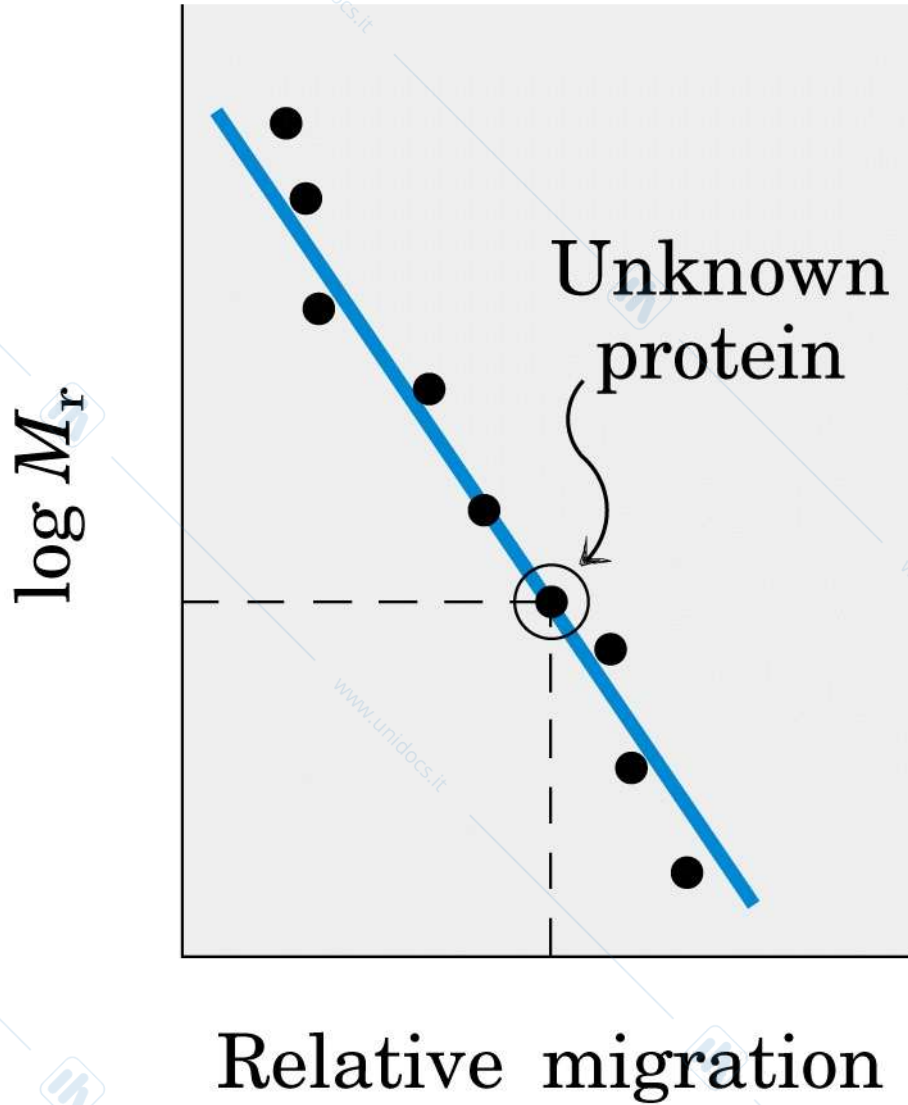


L'acrilammide neurotossica nella forma non polimerizzata.

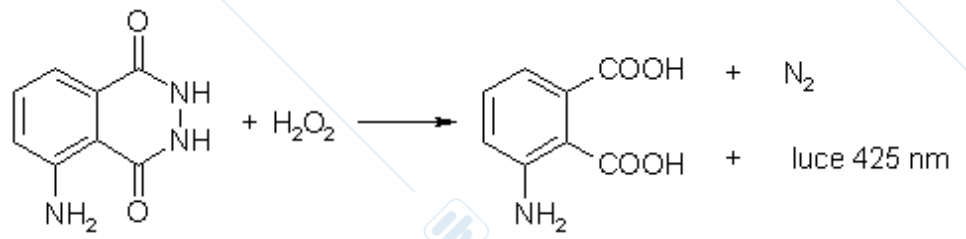
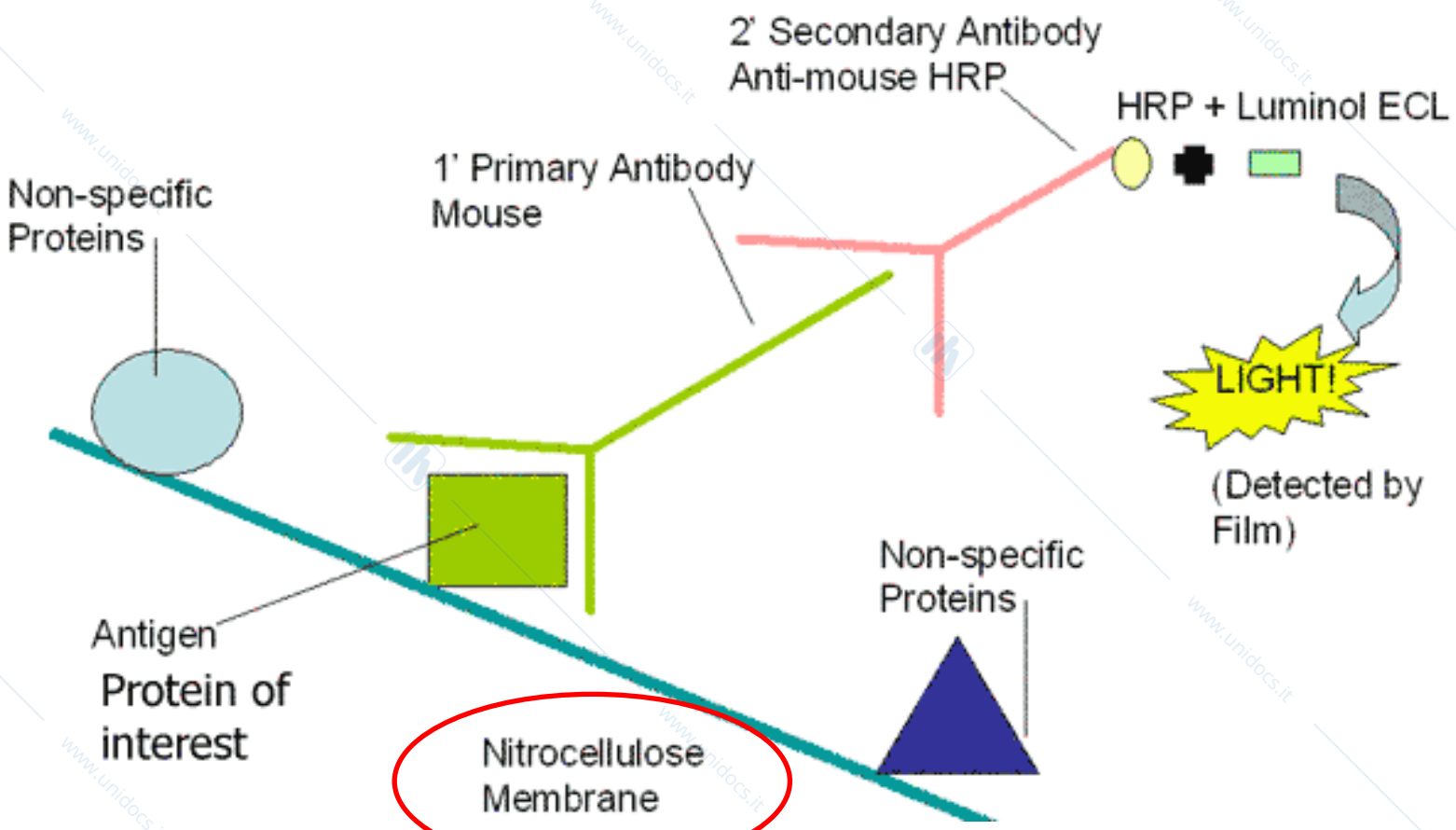
# Determinazione della massa molecolare di una proteina



# Determinazione della massa molecolare di una proteina



# Come si può identificare una proteina?



# BLOTTING

Trasferimento di  
macromolecole su di una  
membrana immobilizzante

# BLOTTING

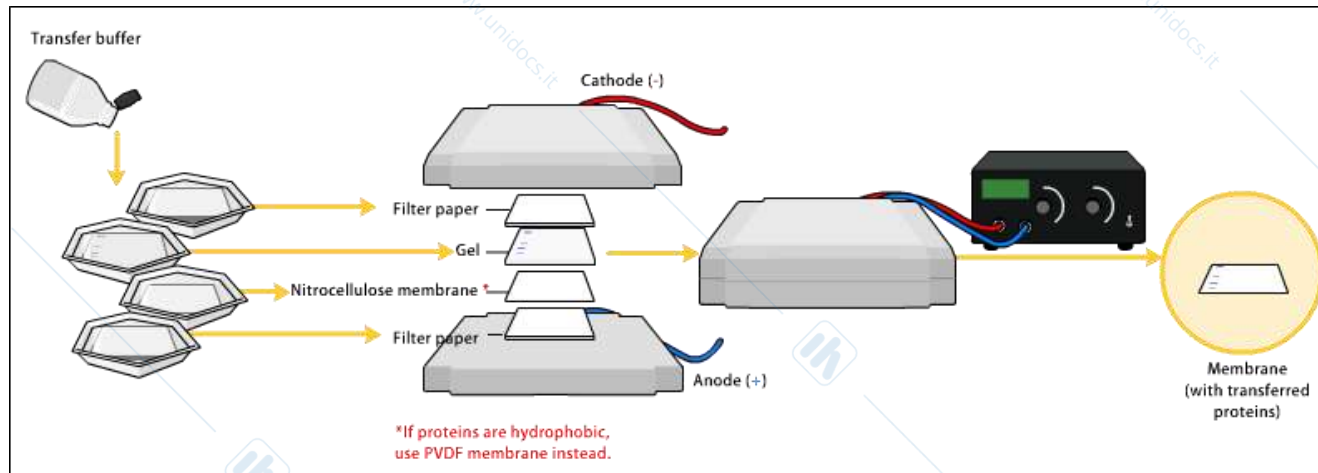
- Southern DNA
- Northern RNA
- Western proteine



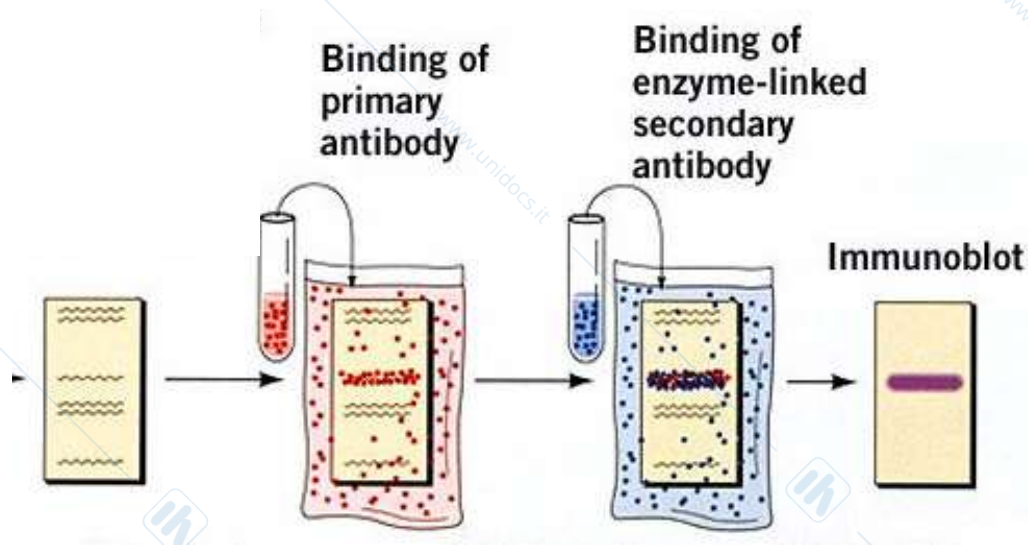
Sir Edwin Mellor Southern

<http://www.youtube.com/watch?v=pRIn3p7x3V8&feature=related>

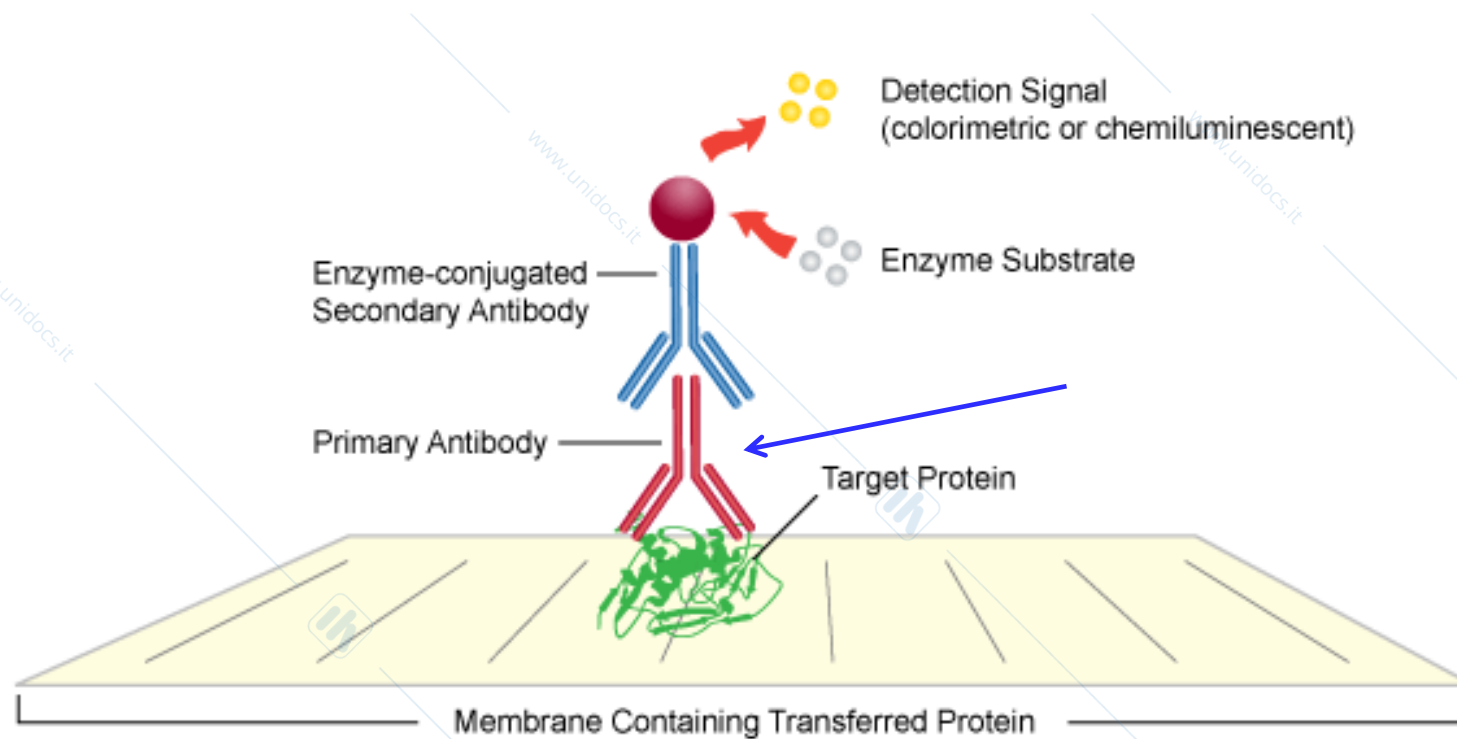
## a) Trasferimento (blotting)



## b) Riconoscimento con anticorpi specifici



## Detection in Western Blots



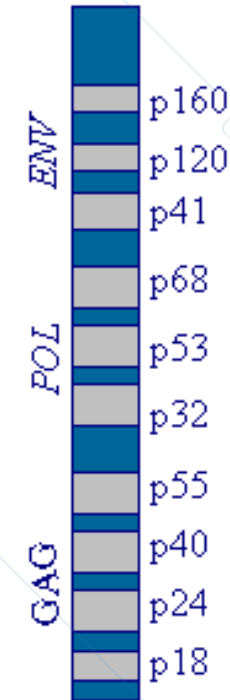
Il western blot o immunoblot è una tecnica biochimica che permette di identificare una determinata proteina in una miscela di proteine, mediante il riconoscimento da parte di anticorpi specifici; in generale, per facilitare il riconoscimento, la miscela di proteine viene prima separata in base alle loro dimensioni (o PM) utilizzando un gel di poliacrilammide; successivamente le proteine vengono trasferite su un supporto (comunemente è una membrana di nitrocellulosa), e quindi si procede al riconoscimento vero e proprio della proteina mediante l'utilizzo di un anticorpo specifico.

# THE HIV WESTERN BLOT TEST



The HIV Western blot consists of a thin nitrocellulose strip in which are embedded proteins claimed to be unique to HIV. Each protein is labelled with a 'p' followed by its molecular weight in thousands. Serum is added to the strip and if there are antibodies to a particular protein this band will 'light up'.

HIV  
WESTERN  
BLOT STRIP



A western blot is also used as the definitive test for Bovine spongiform encephalopathy (BSE, commonly referred to as 'mad cow disease').

Stando ad informazioni pubblicate sull'autorevole rivista medica inglese The Lancet, nel 1990, in Russia vennero fatti 20,2 milioni di test ELISA, di cui 20.000 risultarono positivi, ma solo 112 vennero confermati con il WB; nel 1991, su 30 milioni di test ELISA, ben 30.000 risultarono positivi, ma di questi solo 66 risultarono confermati dal Western Blot, cioè una percentuale minima (0,002%).

“Dunque il test ELISA essendo stato disegnato per ottimizzare la sensibilità a spese della specificità, non dovrebbe essere usato da solo per la diagnosi di infezione da HIV-1 senza un test di conferma”, sebbene in alcune nazioni sia usato da solo.

# ISOELETTROFOCALIZZAZIONE (IEF)

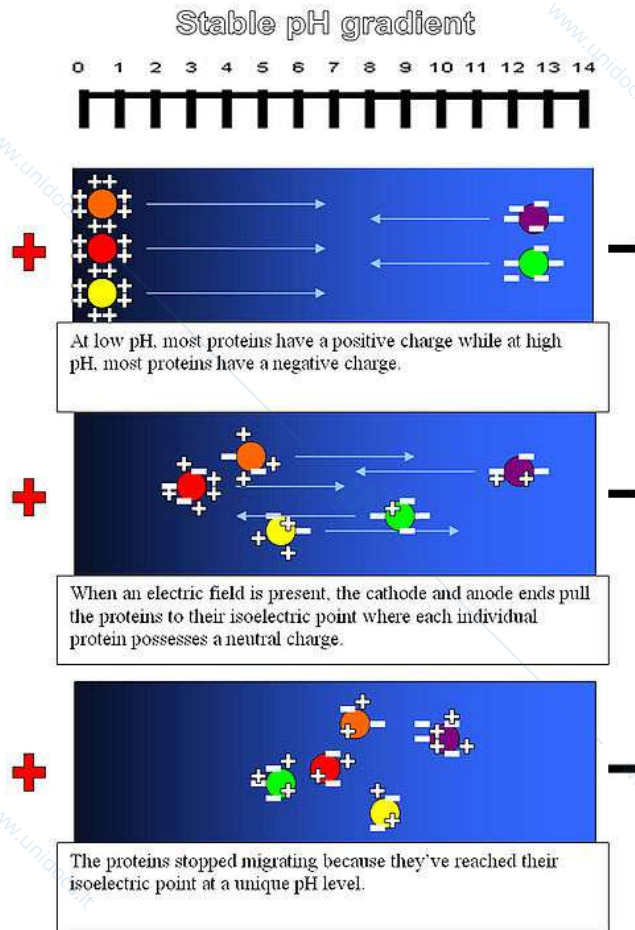
Separa peptidi e proteine in basa al loro punto isoelettrico

**Striscie di gel a gradiente di pH immobilizzato**

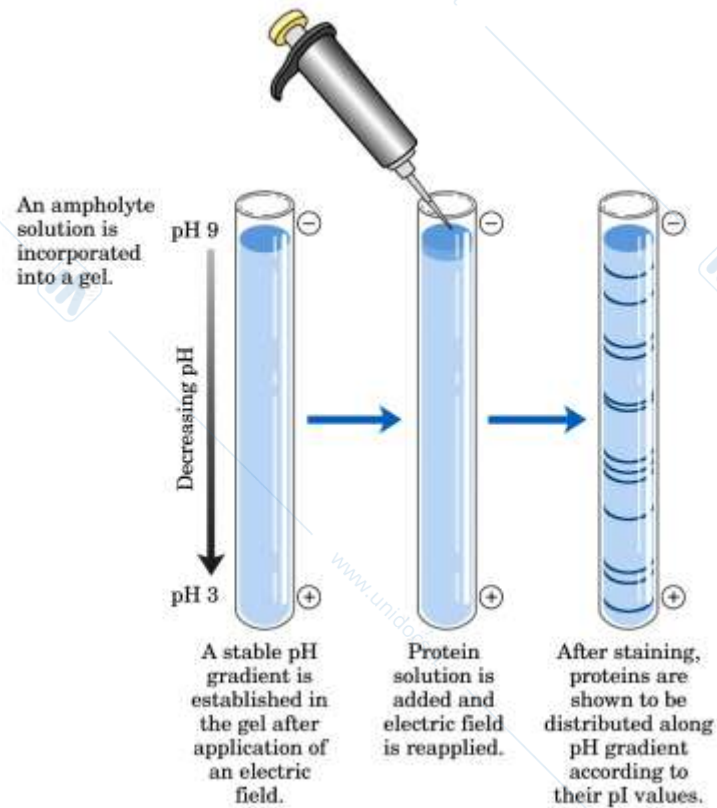
**Formato introducendo nel gel degli anfolti (miscele complesse di acidi poliamminici e policarbossilici).**



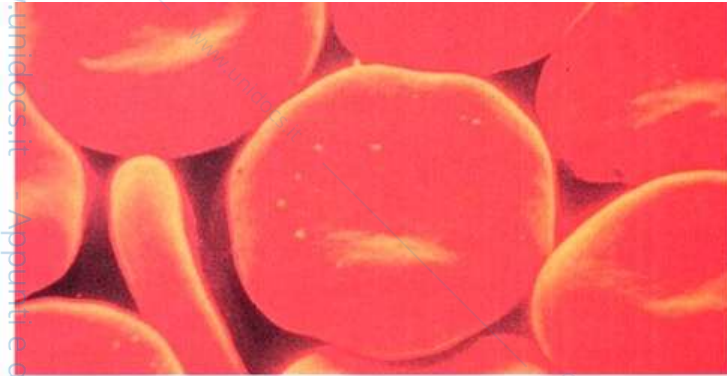
# ISOELETTROFOCALIZZAZIONE (IEF)



- = Isoelectric point at pH 7.5
- = Isoelectric point at pH 6.8
- = Isoelectric point at pH 8.5
- = Isoelectric point at pH 10.1
- = Isoelectric point at pH 5.6

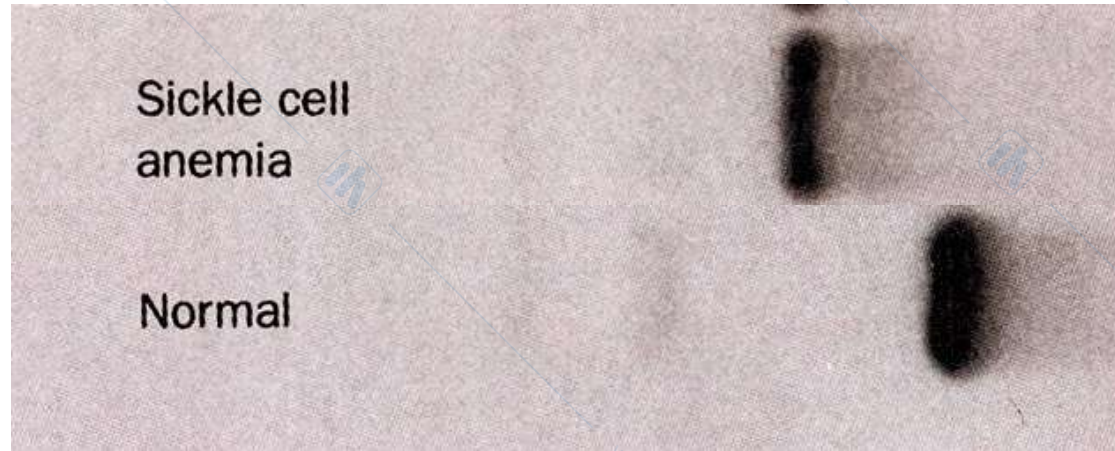


# Diagnosi di anemia falciforme (sickle cell) mediante IEF



Hb S

Glu → Val in posizione 6 nella Hb S



Emoglobina A	Val-His-Leu-Thr-Pro-Glu-Glu-Lys-
Emoglobina S	Val-His-Leu-Thr-Pro-Val-Glu-Lys-
	$\beta$ 1 2 3 4 5 6 7 8

### Background

Sickle cell disease was the first hemoglobinopathy to be linked to an inherited structural defect in the beta globin gene, and the first in which the point mutation resulting in the defect was identified and characterized. The scope of newborn screening for sickle cell disease, which began over 30 years ago, has evolved to include other hemoglobin diseases. Today, evaluation of newborns for hemoglobinopathies encompasses detection of point mutations which lead to structural defects in the alpha or beta globin chains (hemoglobinopathies) such as sickle cell disease, and detection of defects in rate of production of either alpha or beta globin chains (thalassemias). Taken together, the inherited disorders of hemoglobin are some of the most common genetic disorders in the world. Because the different hemoglobin disorders coexist at a high frequency in many populations and because individuals may inherit more than one type, hemoglobin disorders present a complex series of clinical phenotypes.

### Clinical

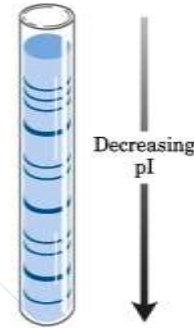
In the newborn period, a transition occurs from primarily fetal hemoglobin (HbF) production to adult hemoglobin (HbA). This transition temporarily masks symptoms of disease. As a result, diseases associated with red blood cell sickling (Hb S, C, S/C,S/O, and S/D diseases) usually present during the first or second year of life, although milder cases may present much later. Usual presenting features are failure to thrive, repeated infection in infancy, painful dactylitis, and pallor. At this stage typical hematologic findings are established. Heterozygotes (e.g., Sickle cell trait ) are carriers with no clinical symptoms.

Thalassemias present with a wide clinical diversity depending upon the degree to which the alpha or beta chains are being synthesized. In beta thalassemia major, or complete absence of beta chain production, newborns are asymptomatic. But as HbF declines, affected infants present with severe anemia (usually within the first two years). Beta thalassemia minor (partial synthesis) has a variable clinical course. In alpha thalassemia, absence of alpha chains is uniformly fatal to the newborn within days of birth, whereas partial production, as in hemoglobin H disease, may produce variable clinical symptoms.

### Testing

**Primary screening for hemoglobinopathies is by isoelectric focusing (IEF) of blood eluted from a dried blood spot.** IEF separates the hemoglobins and identifies most common variants by band mobility. DNA probes which specifically identify HbS, HbC, HbE, HbO Arab and HbD are used to confirm abnormal findings by IEF. Reduced HbA and second tier DNA testing for common beta thalassemia mutations help to identify beta thalassemias. The presence of Hb Barts and/or Hb H in the IEF pattern detects alpha thalassemia.

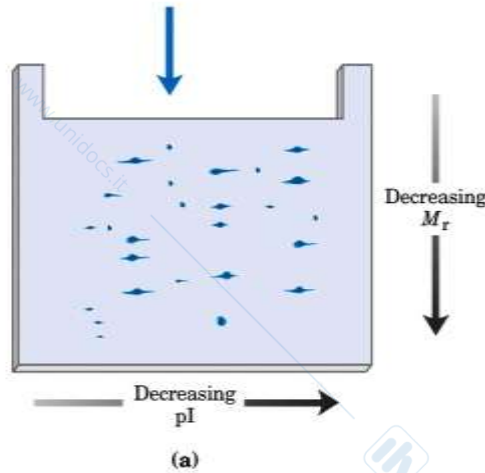
Prima dimensione:  
Separazione per IEF



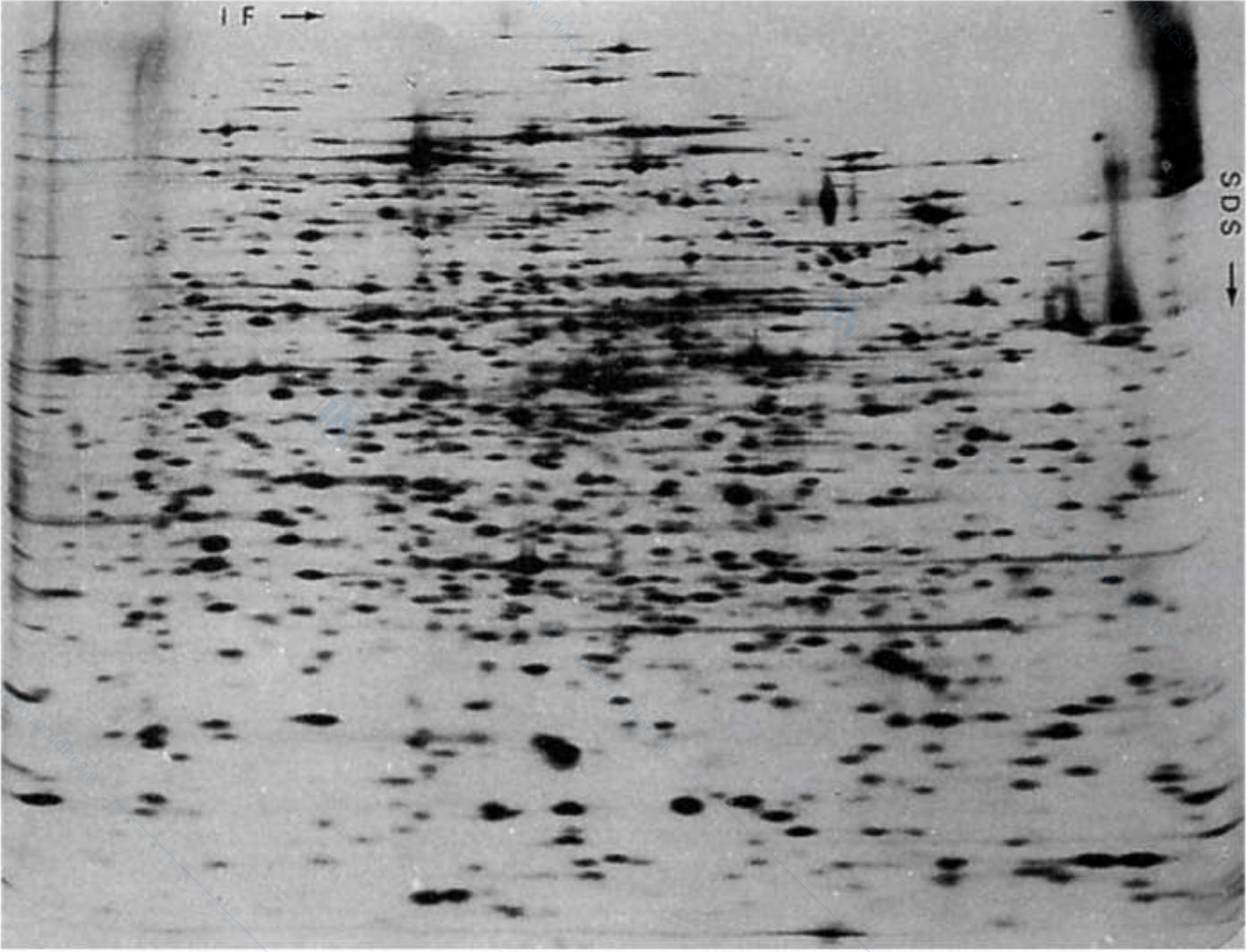
Isoelectric focusing gel is placed on SDS polyacrylamide gel.



Seconda dimensione:  
Separazione per SDS-PAGE



(a)



(b)

3

10

pH

Peso molecolare

## Analisi proteomica

1995: **proteoma** descrive la totalità delle proteine espresse dal genoma in un organismo.

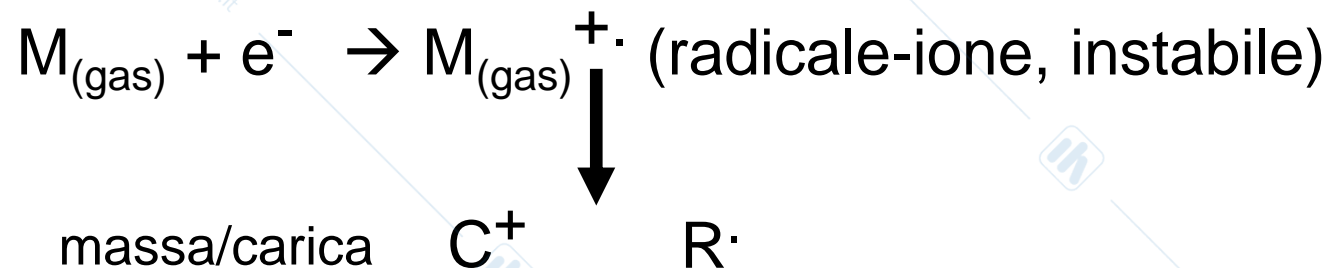
**Genoma** descrive l'intera collezione di geni in un organismo

La **spettrometria di massa** è una tecnica analitica che permette di determinare la massa molecolare di una molecola sconosciuta e quindi di identificarla.

Viene comunemente usata in combinazione con tecniche separative, quali la gascromatografia e la cromatografia in fase liquida (HPLC), o l'elettroforesi bidimensionale.

Una molecola viene ionizzata, principalmente facendo attraversare un fascio di elettroni ad energia nota.

### a) camera di ionizzazione:



Le molecole ionizzate sono instabili e si frammentano in ioni più leggeri secondo schemi tipici in funzione della loro struttura chimica.

### b) Analizzatore

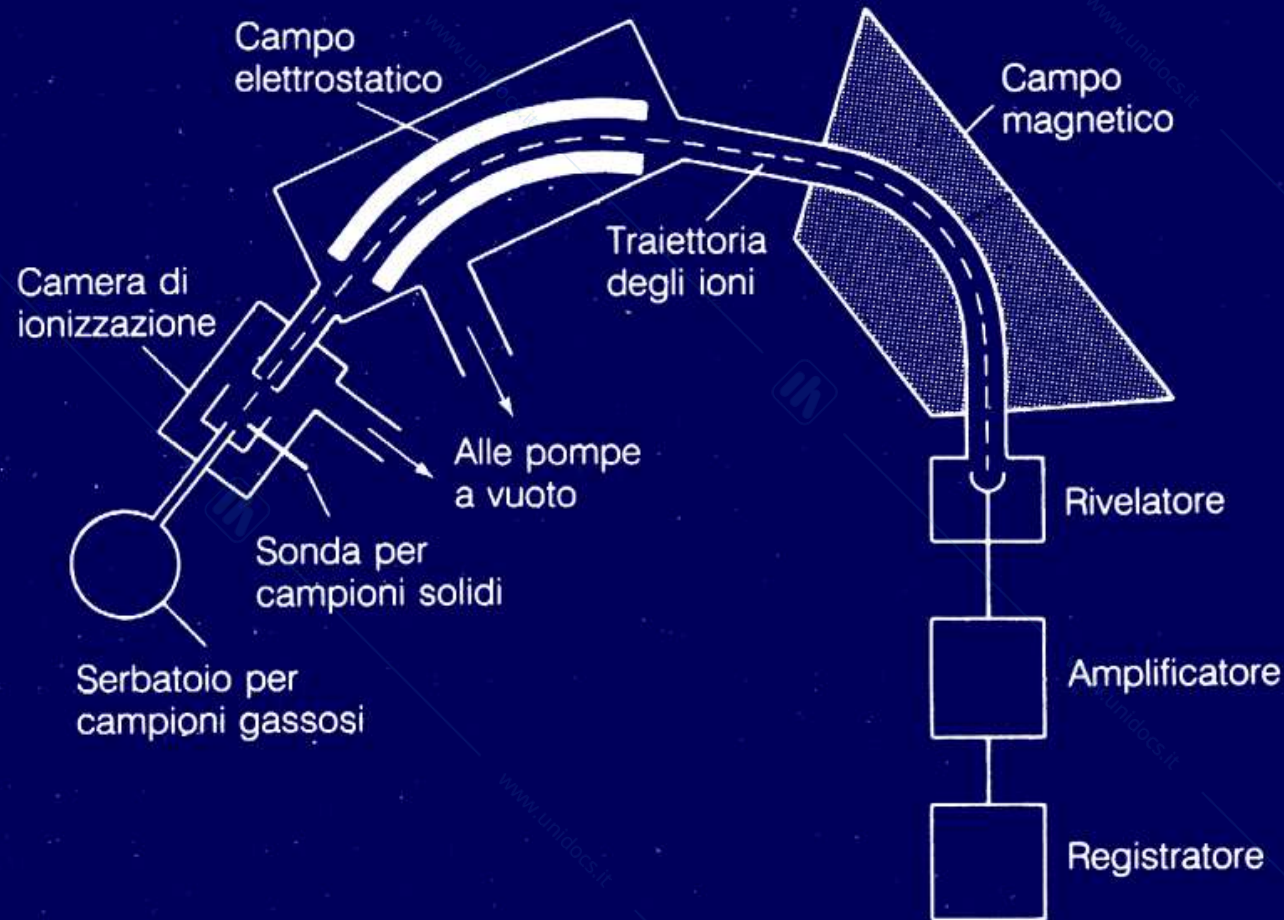
Gli ioni prodotti vengono separati (non i radicali) in funzione del loro rapporto massa/carica ( $m/z$ )

### c) rivelatore:

Gli ioni prodotti raggiungono il rivelatore dove l'energia ricevuta viene convertita in un segnale elettrico che produce lo spettro di massa.

Il principio su cui si basa la spettrometria di massa è la possibilità di separare una miscela di ioni in funzione del loro rapporto massa/carica (generalmente tramite campi magnetici).

# SPETTROMETRO DI MASSA



Si basa sul fatto che ioni con la stessa carica e massa diversa immersi in un campo magnetico percorreranno una traiettoria con raggi di curvatura differenti.

# ELETTROFORESI DI ACIDI NUCLEICI

# Gel Elettroforesi di DNA

- Molecole di DNA esposte ad un campo elettrico migrano verso l'anodo a causa dei fosfati carichi negativamente lungo lo scheletro del DNA
- Poiché il rapporto carica/massa per tutti i DNA è lo stesso, è la dimensione delle molecole di DNA che determina la velocità di migrazione
- I frammenti di DNA vengono separati su su gel di agarosio oppure su gel di poliacrilammide a seconda delle dimensioni

# Visualizzazione del DNA sul gel

- L'etidio bromuro è comunemente usato per visualizzare direttamente il DNA. Si intercala tra le basi degli acidi nucleici.
- Quando è esposto ai raggi ultravioletti, infatti, esso è in grado di emettere fluorescenza (560 nm, rosso-arancio) che si intensifica di quasi 20 volte se intercalato nel DNA.

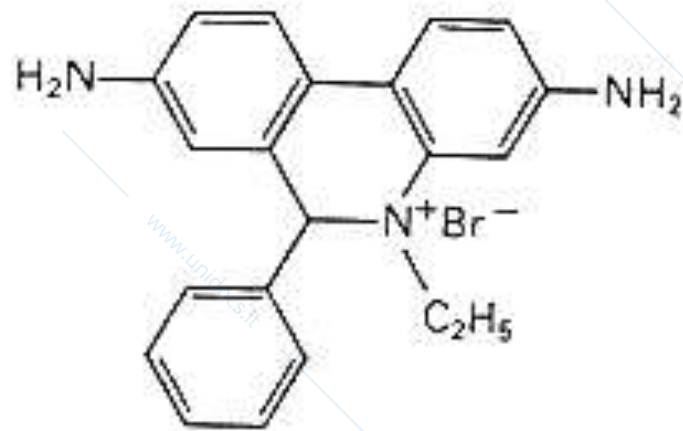
Southern blot

<http://www.youtube.com/watch?feature=endscreen&v=VWAMz6WLwM0&NR=1>

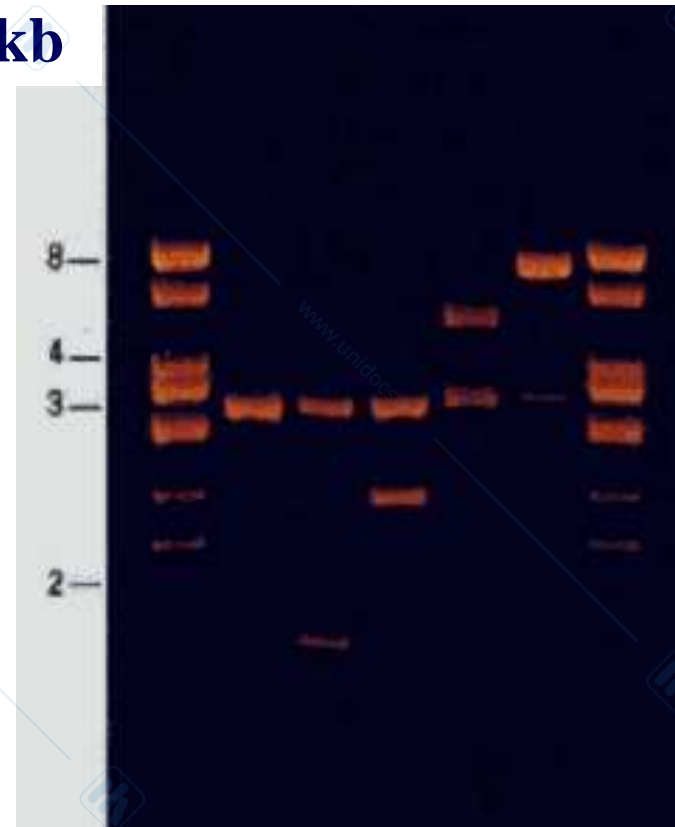
# DNA su gel di agarosio colorato con etidio bromuro

standard di PM  
(kb: 1000 basi)

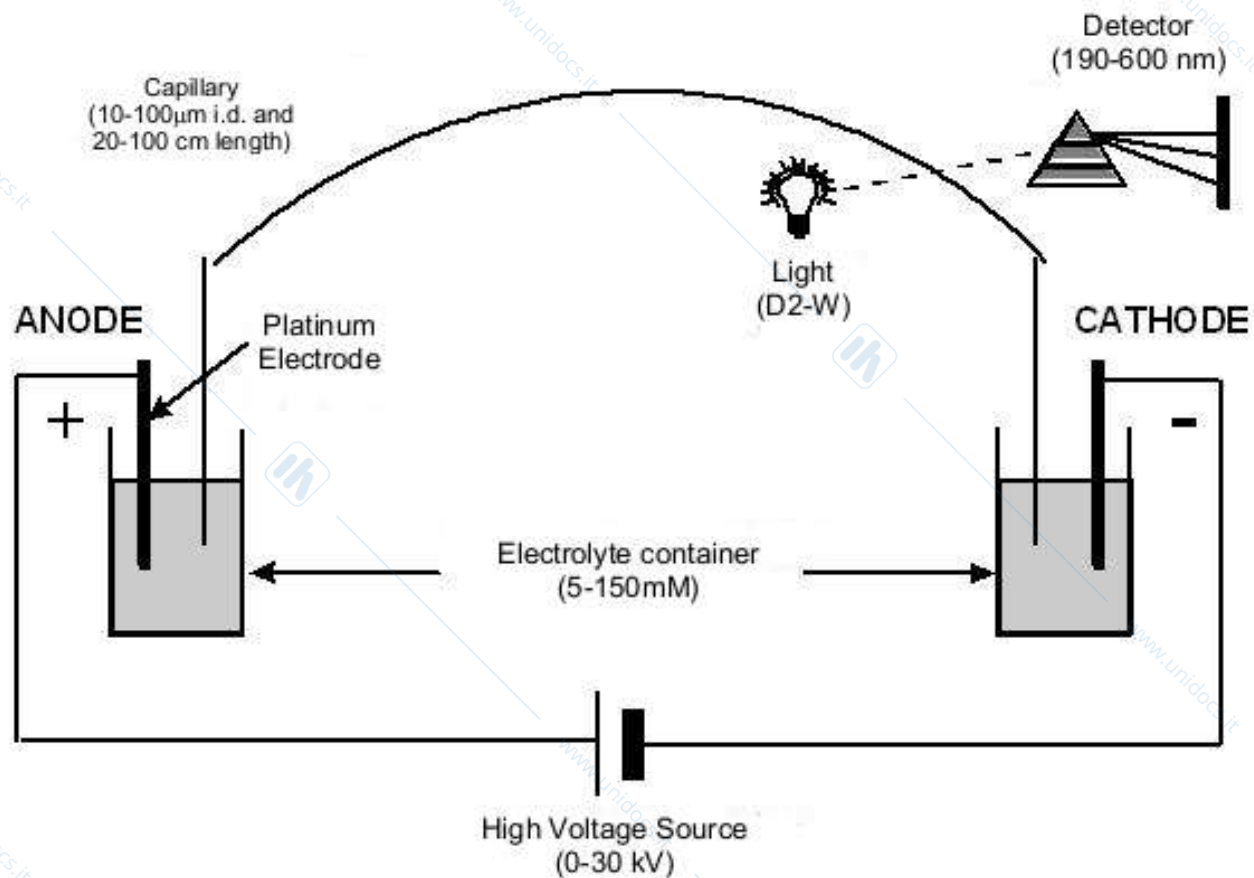
kb



Bromuro d'etidio



# ELETTROFORESI CAPILLARE



The capillaries are typically 30–50 cm long, with an internal diameter between 25 and 100  $\mu\text{m}$ . They are filled with a conducting solution, usually an aqueous buffer.

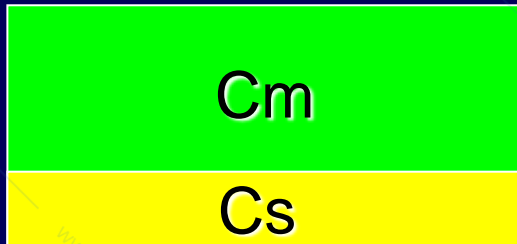
## Vantaggi

Elevata risoluzione  
Alta sensibilità  
Rapidità di analisi  
Versatilità

..Its potential for **rapid, high-efficiency separations** makes it appealing as a replacement for some of the more labor-intensive assays carried out in electrophoretic gels. Among the many attractive characteristics of this technology is its **versatility** for analyses of a diverse spectrum of analytes, ranging from small organic ions to macromolecular protein complexes or DNA.

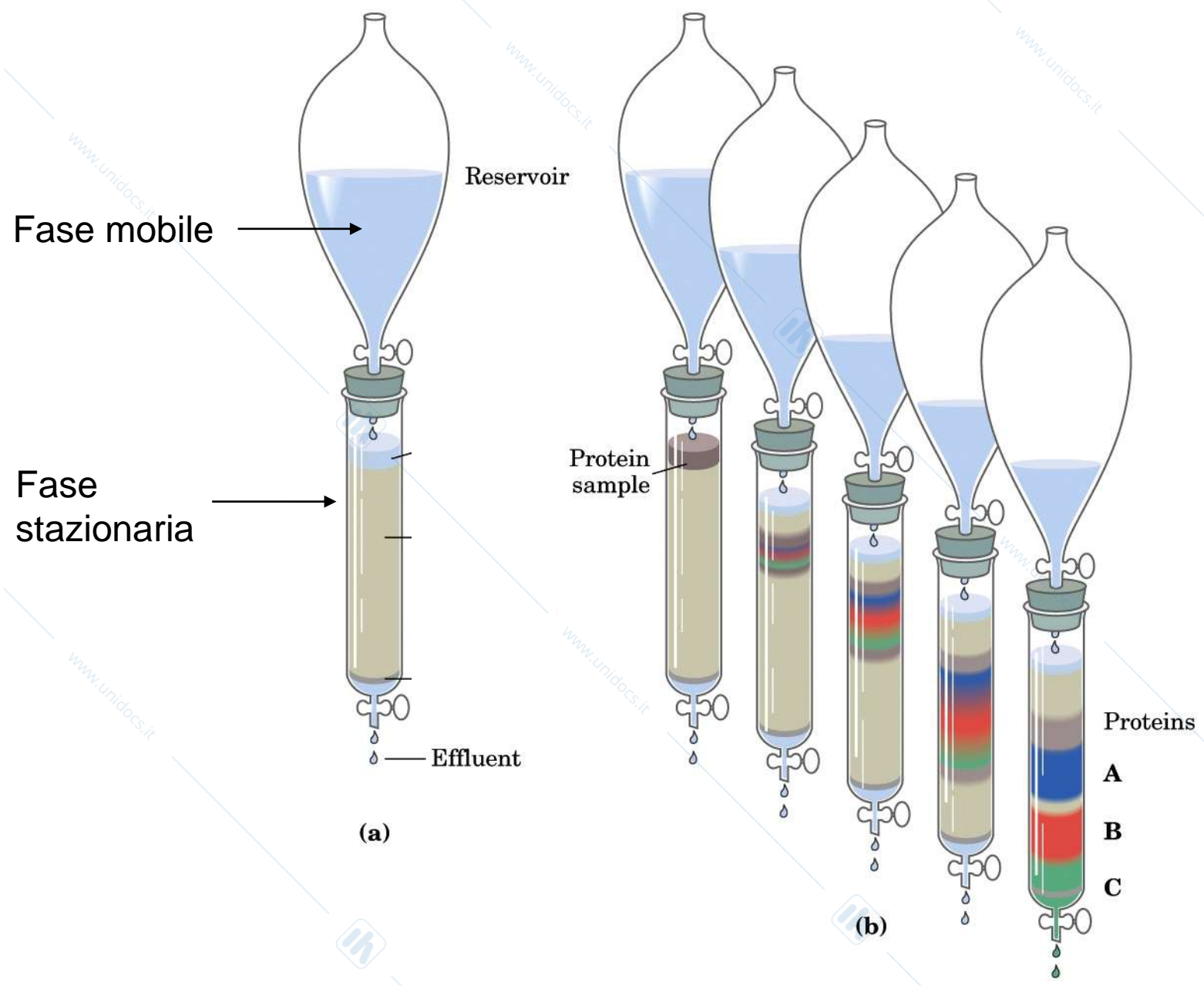
# Tecniche cromatografiche

Ogni molecola si distribuisce in modo diverso tra due fasi a seconda delle sue proprietà



Fase mobile (liquido o gas)

Fase stazionaria (solido, liquido su supporto solido)

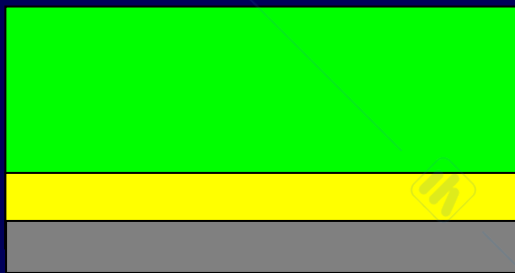


# Tecniche cromatografiche

- Gel filtrazione
- Scambio ionico
- Ripartizione
- Affinità

# CROMATOGRAFIA di RIPARTIZIONE

E' basata sulle caratteristiche di polarità/apolarità del campione, quindi sulla sua **idrofobicità**

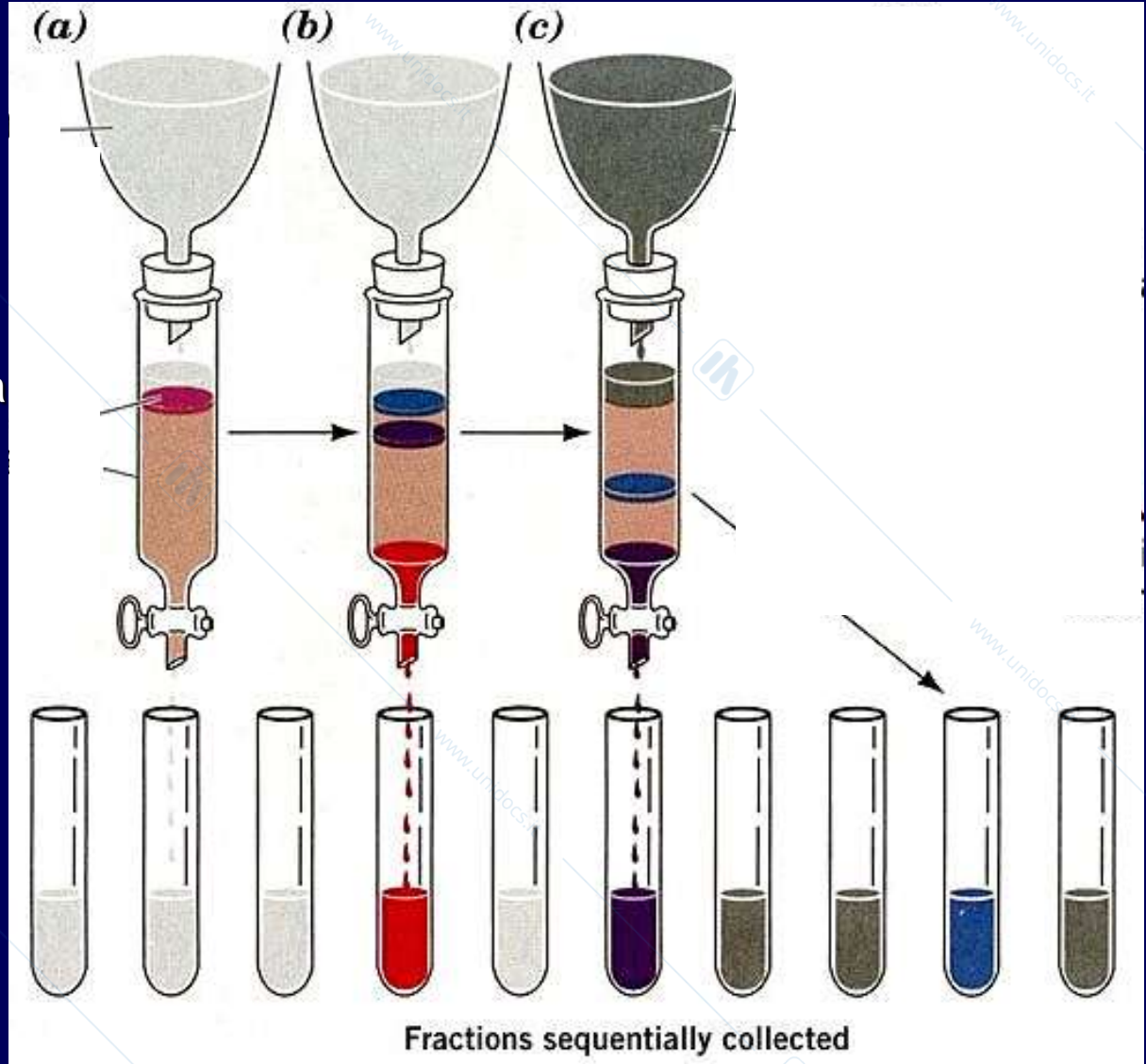


Fase mobile (liquido o gas)

Fase stazionaria liquida su supporto solido

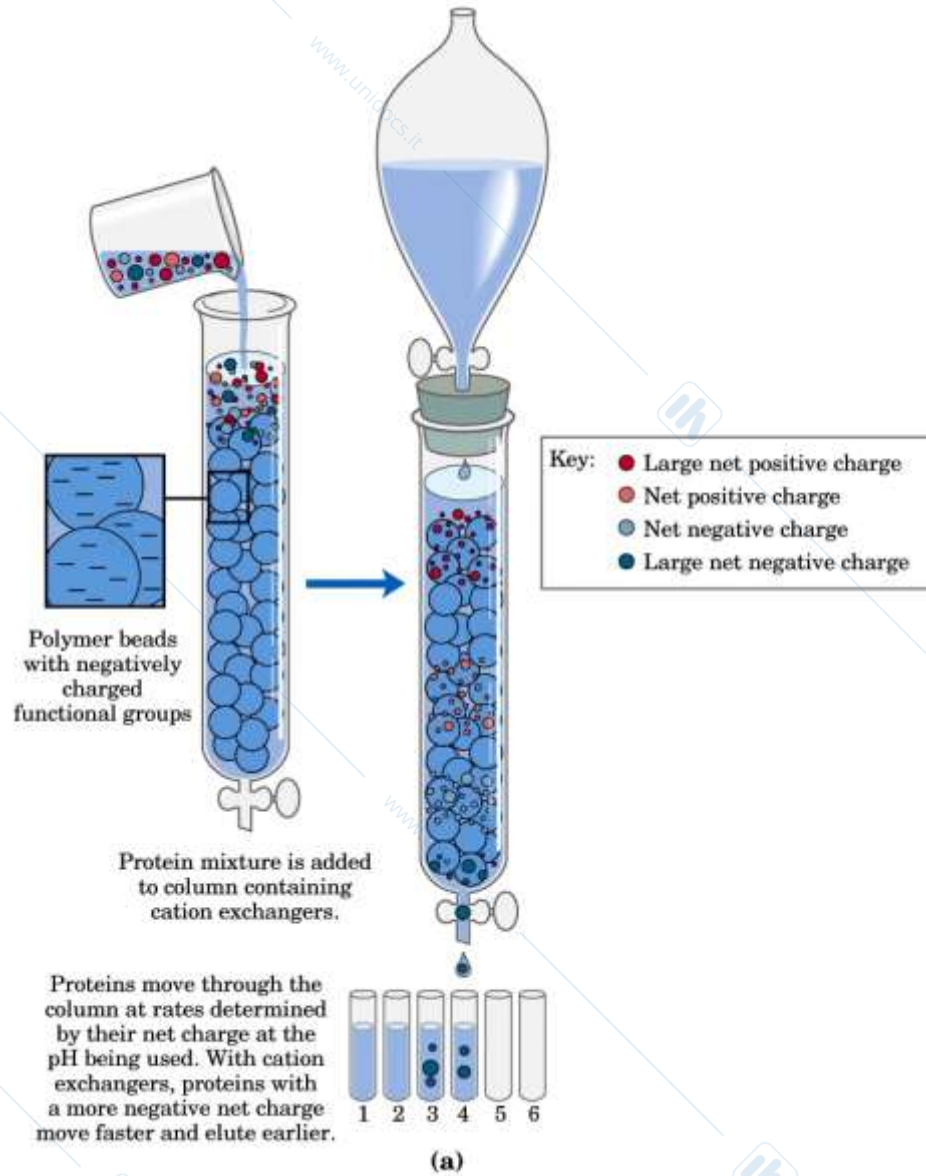
Fase mobile  
idrofilica

Fase stazionaria  
idrofobica

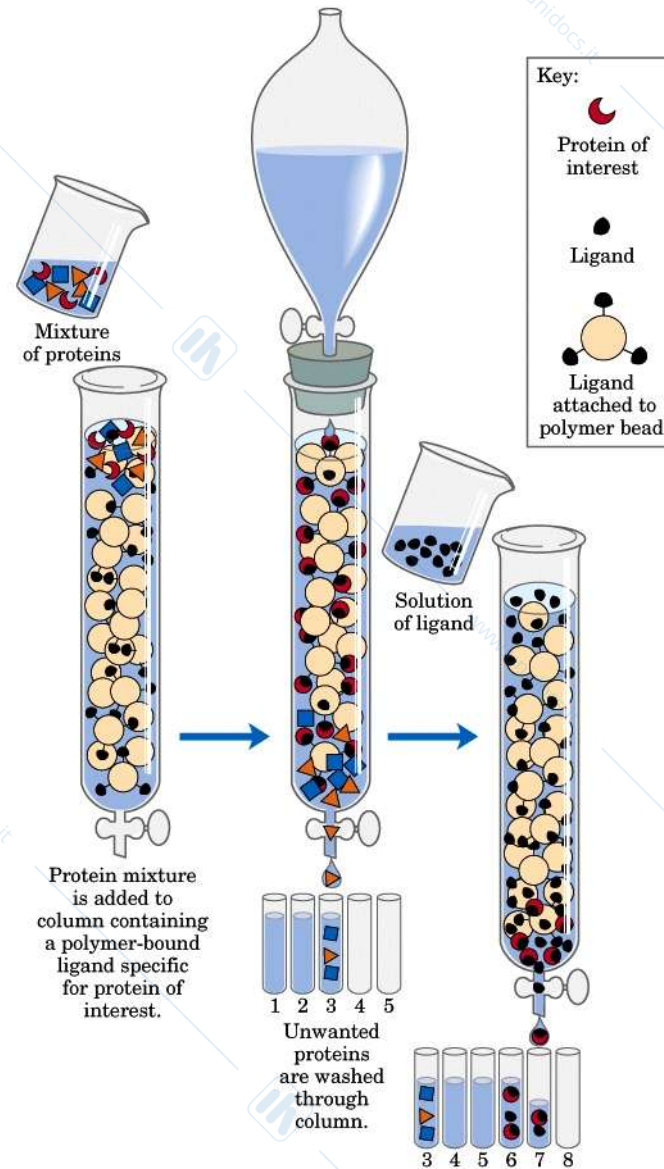
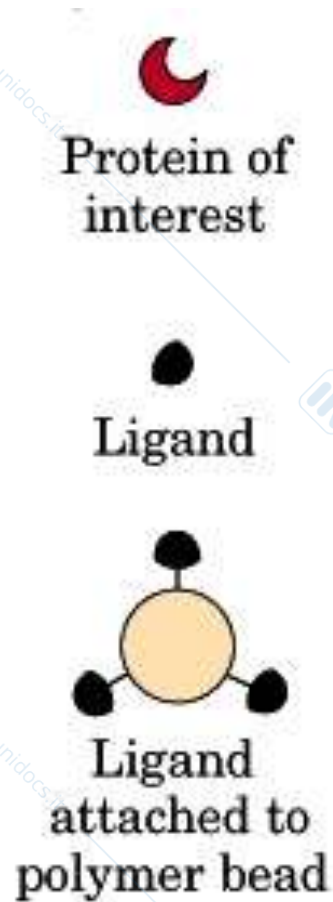


Rivelatore

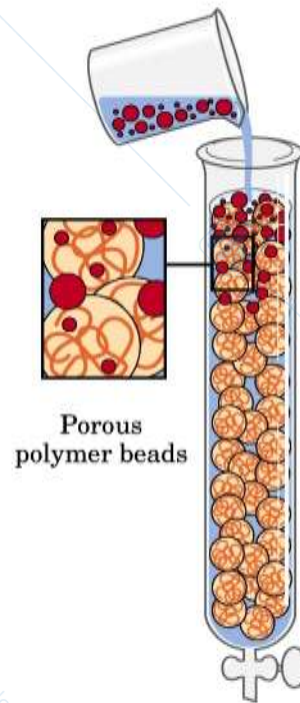
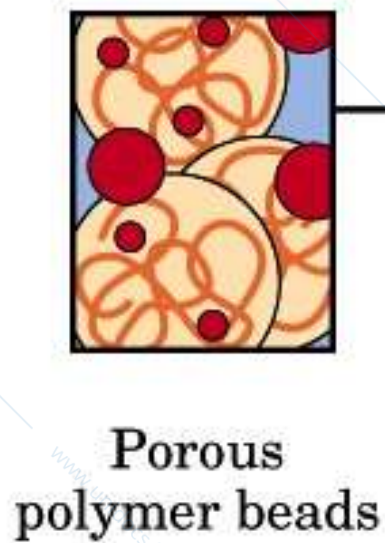
# CROMATOGRAFIA A SCAMBIO IONICO



# CROMATOGRAFIA PER AFFINITÀ



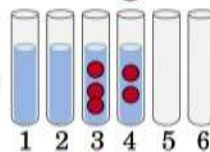
# CROMATOGRAFIA PER GEL FILTRAZIONE ( o “ad esclusione molecolare”)



Protein mixture is added to column containing cross-linked polymer.

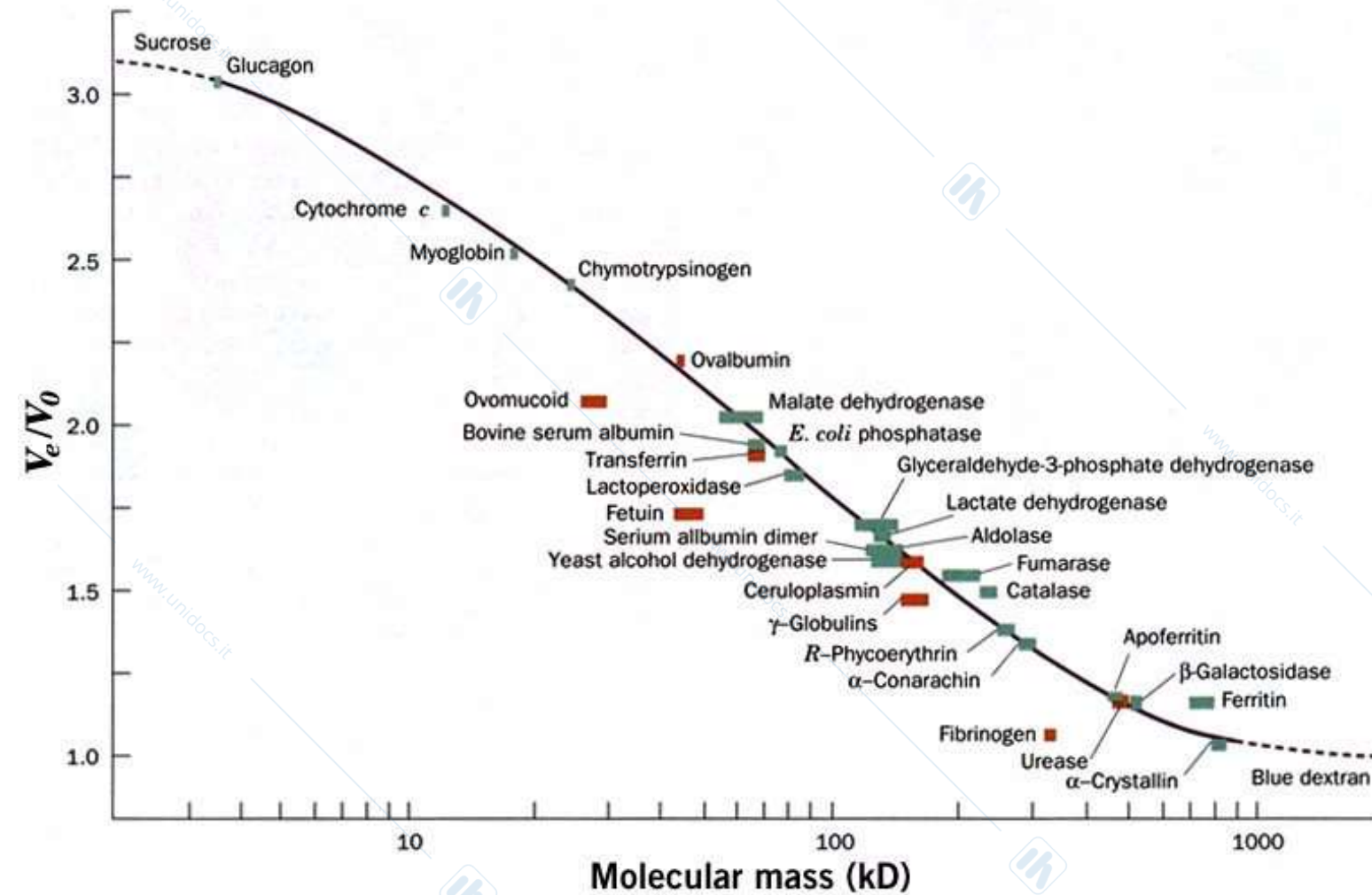


Protein molecules separate by size; larger molecules pass more freely, appearing in the earlier fractions.



# CROMATOGRAFIA PER GEL FILTRAZIONE

## separa in base al Peso Molecolare



**table 5–5****A Purification Table for a Hypothetical Enzyme\***

<b>Procedure or step</b>	<b>Fraction volume (ml)</b>	<b>Total protein (mg)</b>	<b>Activity (units)</b>	<b>Specific activity (units/mg)</b>
1. Crude cellular extract	1,400	10,000	100,000	10
2. Precipitation with ammonium sulfate	280	3,000	96,000	32
3. Ion-exchange chromatography	90	400	80,000	200
4. Size-exclusion chromatography	80	100	60,000	600
5. Affinity chromatography	6	3	45,000	15,000

\*All data represent the status of the sample *after* the designated procedure has been carried out. Activity and specific activity are defined on page 137.

# H.P.L.C.

## Cromatografia ad alta pressione

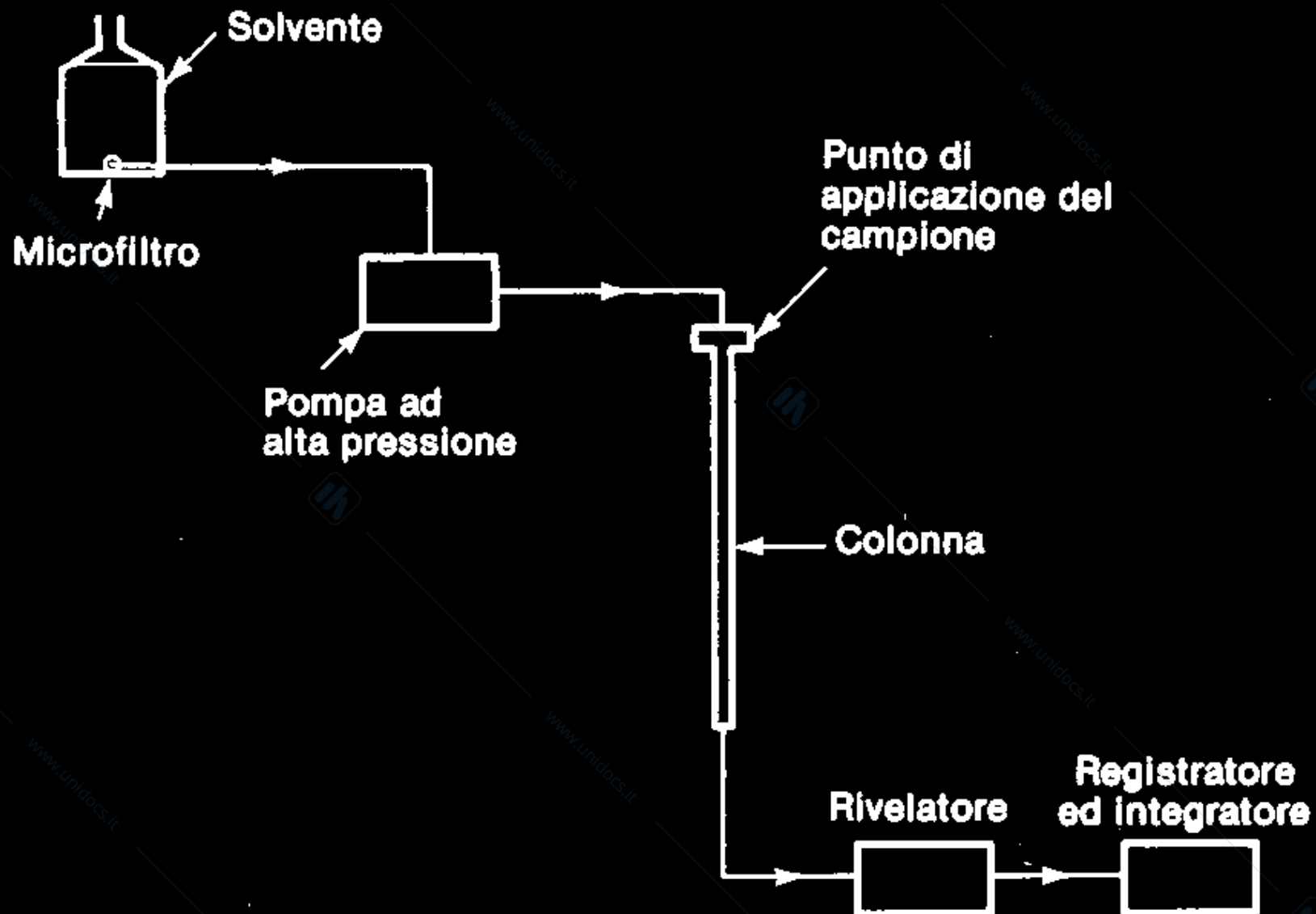
## TABLE 13-11 METHODS OF GLYCATED HEMOGLOBIN MEASUREMENT

### METHODS BASED ON STRUCTURAL DIFFERENCES

Immunoassays	Polyclonal or monoclonal antibodies toward the glycated N-terminal group of the $\beta$ chain of hemoglobin	
Affinity chromatography	Separates based on chemical structure using borate to bind glycosylated proteins	Not temperature dependent Not affected by other hemoglobins

### METHODS BASED ON CHARGE DIFFERENCES

Ion-exchange chromatography	Positive-charge resin bed	Highly temperature dependent Affected by hemoglobinopathies
Electrophoresis	Separation is based on differences in charge	Hemoglobin F values $>7\%$ interferes
Isoelectric focusing	Type of electrophoresis using isoelectric point to separate	Pre-HbA <sub>1c</sub> interferes
High-pressure liquid chromatography (HPLC)	A form of ion-exchange chromatography	Separates of all forms of glycosylated hemoglobin: A <sub>1a</sub> , A <sub>1b</sub> , A <sub>1c</sub>



# HPLC nella diagnostica: determinazione delle catecolammine

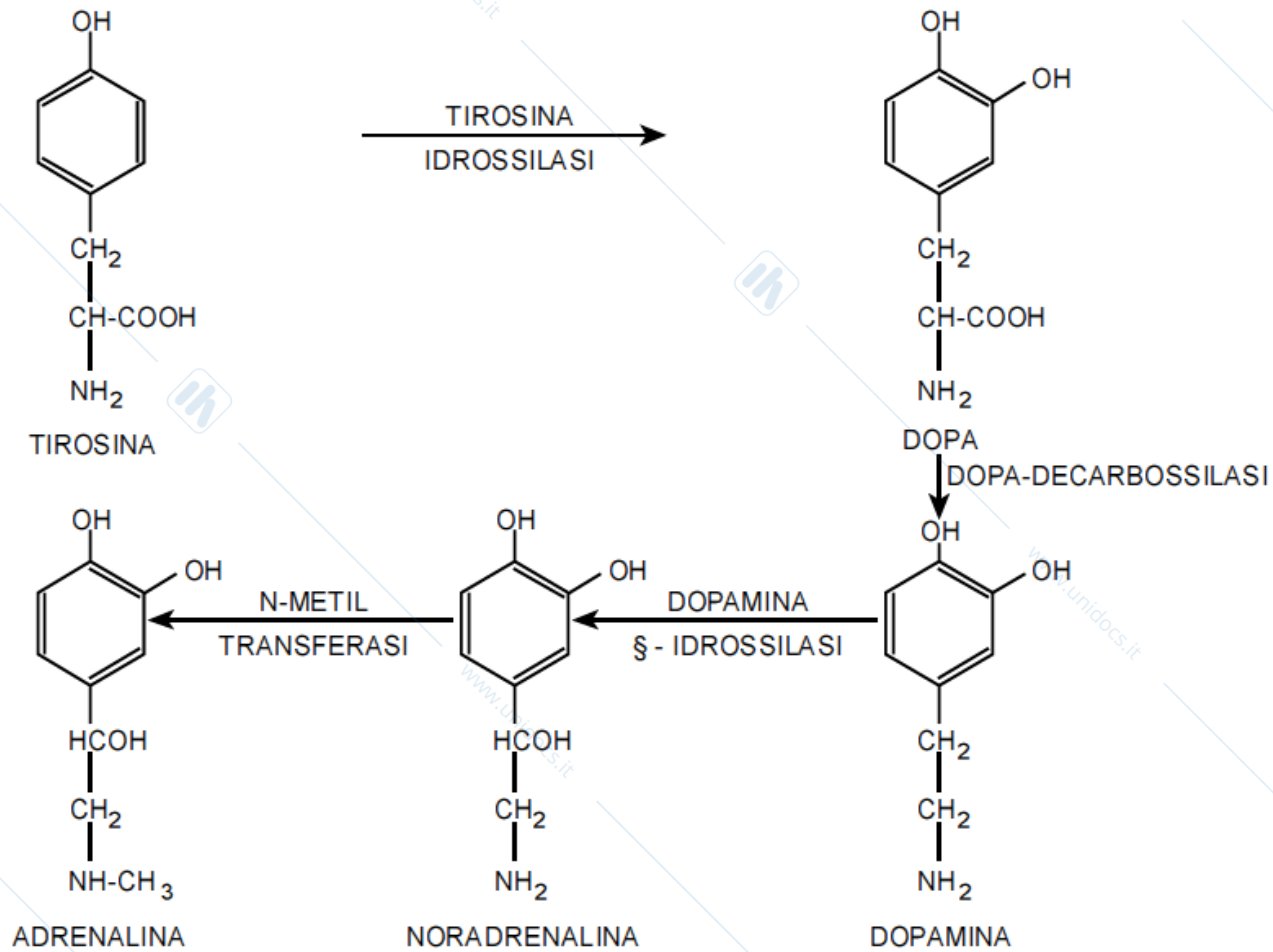
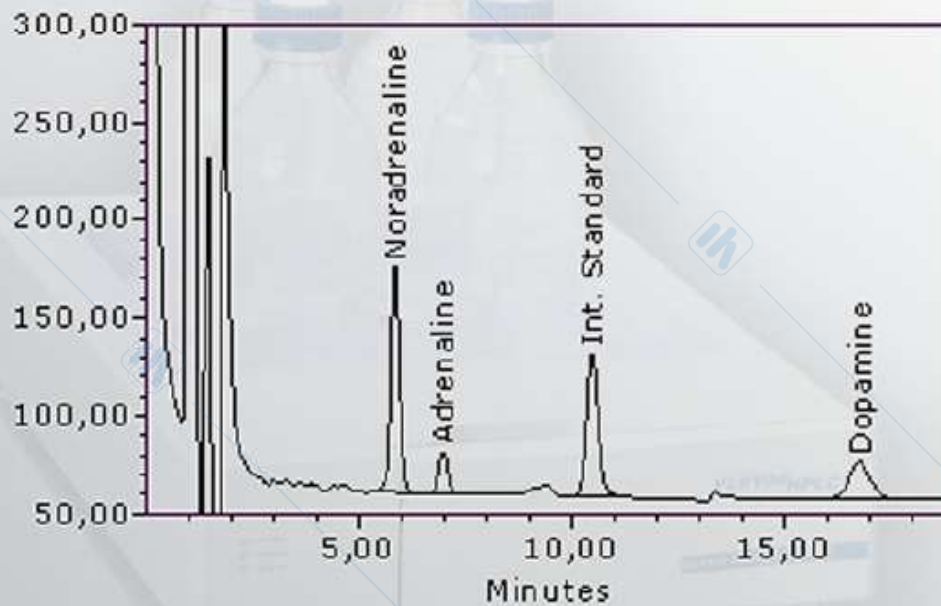


Figura 1: Biosintesi delle catecolammine

## DETERMINAZIONE CATECOLAMINE IN PLASMA



### PARAMETRI HPLC

Per l'analisi di CATECOLAMINE è necessario un sistema HPLC isocratico con rivelatore Electrochimico

**VOLUME INIEZIONE: 50  $\mu$ l**

**FLUSSO: 1 ml/min**

## La determinazione delle catecolammine

Viene utilizzata per diagnosticare o escludere il feocromocitoma.

E' molto utile quando una persona manifesta una ipertensione persistente.

Le catecolammine vengono determinate anche nelle urine (raccolte nelle 24 ore).

I livelli ormonali infatti variano significativamente durante la giornata, quindi l'analisi sulle urine potrebbe rivelare una produzione eccessiva di catecolammine non rilevabile nel sangue.

L'analisi delle catecolammine è critica perchè questi analiti sono:

- Presenti a basse concentrazioni,
- suscettibili ad ossidazioni,
- instabili al pH

HPLC presenta numerosi vantaggi per l'alta risoluzione, la velocità di analisi.

L'analisi senza derivatizzazione sta diventando il metodo di scelta

La **Transferrina carboidrato carente** o CDT (Carbohydrate-Deficient Transferrin) è un test di laboratorio e rappresenta il parametro più idoneo per la valutazione di un abuso cronico di alcol.

La transferrina è costituita da una catena di 679 aminoacidi e contiene due identiche catene carboidratiche che terminano con ramificazioni contenenti all'estremità acido sialico.

La transferrina più rappresentata nel plasma contiene 4 residui di acido sialico. Vi sono inoltre le isoforme disialo, monosialo e asialotransferrina, denominate **transferrina carboidrato carente (desializzata)**.

Il siero di alcolisti rivela un caratteristico andamento con un picco più piccolo catodico rispetto al picco principale della transferrina dovuto alla presenza di transferrina desializzata.

Probabilmente l'alterazione della glicosilazione risiede nella tossicità della acetaldeide che accompagna la malattia alcolica.

### Esempi di fasi stazionarie per h.p.l.c. e loro applicazioni.

Principio di separazione cromatografica	Nome commerciale	Natura della fase stazionaria	Tipo di supporto	Applicazioni
Adsorbimento	Corasil	Silice	Pellicolare	Steroidi, vitamine, pesticidi clorurati, erbicidi polari, pigmenti vegetali, trigliceridi, alcaloidi
	Pellumina	Allumina	Pellicolare	
	Partisil	Silice	Microporoso	
	Micropak A1	Allumina	Microporoso	
Ripartizione	Bondapak-C <sub>18</sub> / Corasil	Octadecilsilano	Pellicolare	Aminoacidi dan- silati, farmaci, pesticidi, aflatossine, saccardi, acidi grassi
	μ Bondapak-C <sub>18</sub>	Octadecilsilano	Poroso	
	μ Bondapak-NH <sub>2</sub>	Alchilamina	Poroso	
Scambio ionico	Partisil-SAX	Basico forte	Poroso	Aminoacidi, peptidi, acidi nucleici, nucleotidi, adrenalina, farmaci e loro metaboliti polari
	Micropak-NH <sub>2</sub>	Basico debole	Poroso	
	Partisil-SCX	Acido forte	Poroso	
	AS Pellionex-SAX	Basico forte	Pellicolare	
	Zipak-WAX	Basico debole	Pellicolare	
Perisorb-KAT	Acido forte	Pellicolare		
Esclusione	Bio-Glas	Vetro	Solido rigido	Proteine, peptidi, acidi nucleici, nucleotidi, polisaccaridi, oligosaccaridi
	Styragel	Polistirene- divinilbenzene	Gel semirigido	
	Sephadex	Destrano	Gel morbido	

# GC- MS

**Principio:** Il riconoscimento di un particolare sterioide avviene in base al tempo di ritenzione cromatografico e dallo spettro di massa caratteristico

