

Fluorosi animale e contenuto di fluoro nei mangimi: determinazione analitica e valutazione dei metodi impiegati

ADRIANA PEPE, ROSA GIORDANO e ISALA VERNILLO

Laboratorio di Tossicologia, Istituto Superiore di Sanità

Riassunto. — La tossicosi da fluoro più frequentemente osservata negli animali è quella di tipo cronico. Tale fluorosi può derivare da eccessiva ingestione di composti del fluoro e, per questa ragione, è stato determinato il contenuto in fluoro in diversi tipi di mangimi. Sia col metodo spettrofotometrico che con quello potenziometrico, il campione viene mineralizzato a secco, fuso con NaOH e quindi distillato in corrente di vapore a 140 °C. Sono state determinate e calcolate le percentuali di recupero di fluoro. I risultati ottenuti, confrontabili tra loro, rientrano nei limiti previsti per il fluoro dalla Direttiva CEE. Tutti e due i metodi presentano buona sensibilità e riproducibilità, nondimeno la tecnica potenziometrica è più rapida e di più facile esecuzione, oltre a presentare un coefficiente di variazione leggermente inferiore rispetto alla tecnica spettrofotometrica.

Summary (*Animal fluorosis and fluoride content in feed: analytical determination and evaluation of methods employed*). — Chronic fluoride toxicosis is the type of fluoride poisoning most often observed in livestock. Animal fluorosis can be the result of excessive fluoride ingestion; for this reason fluoride content in several feeds was determined. Using both spectrophotometric and potentiometric method, sample was dry ashed, melted with NaOH and then steam distilled at 140 °C. Recoveries of fluoride were determined and computed. Obtained results were compared between themselves and all are falling within limit values of CEE instructions.

Sensitivity and reproducibility are good for both methods nevertheless potentiometric method is more rapid and simple to carry out and presents a coefficient of variation slightly lower than spectrophotometric method.

La tossicosi da fluoro negli animali sta assumendo, in molte parti del mondo, i caratteri di un vero e proprio problema tossicologico, soprattutto per il moltiplicarsi delle installazioni di complessi industriali che immettono quantità rilevanti di fluoro nell'atmosfera di zone di habitat animale. Con la normale dieta, gli animali assumono bassi livelli di fluoro che risultano utili per il fatto che favoriscono la mineralizzazione di alcuni tessuti organici (ossa, denti) [1-3]. Quantità eccessive di fluoro assunto, invece, inducono stati morbosi dovuti essenzialmente a fenomeni di accumulo in quegli stessi tessuti che beneficiano delle piccole quantità.

La tossicosi cronica da fluoro, denominata in genere fluorosi, è lo stato morboso osservato più frequentemente nel bestiame destinato alla alimentazione umana, piuttosto che la tossicosi acuta. L'inizio e lo sviluppo della condizione cronica è di solito graduale, data la varietà di tempo di intervallo esistente tra l'ingestione di fluoro e la manifestazione dei segni clinici di cronicità. L'eccessivo fluoro assunto dall'animale diviene più o meno nocivo in dipendenza di vari fattori quali la quantità e la durata dell'ingestione, la solubilità del composto del fluoro, la fluttuazione dei livelli assunti, la specie animale, l'età e lo stato nutrizionale, i fattori di stress e la risposta biologica individuale [4].

È per queste ragioni che la tossicosi animale da fluoro deve essere essenzialmente prevenuta e, unitamente al controllo della quantità di fluoro presente nell'atmosfera, anche la dieta deve essere controllata così da contenere tanto fluoro da promuovere gli effetti utili e non quelli nocivi. Uno degli accorgimenti più efficaci è stato quello di porre limiti legislativi per il fluoro nei mangimi e nei loro integratori. Tali limiti, diversi a seconda del tipo di mangime e della specie animale cui è destinato, sono stati stabiliti anche dalla Comunità Economica Europea, oltre che dalla normativa sanitaria nazionale.

Nella Tab. 1 sono riportati i limiti per il fluoro negli alimenti per animali, stabiliti dalla CEE.

La determinazione analitica del fluoro è stata oggetto di molte ricerche in questi ultimi anni, con risultati più o meno soddisfacenti. Il metodo più sperimentato è stato quello spettrofotometrico [5-7]; più recente è il metodo potenziometrico con elettrodo specifico per lo ione fluoruro.

Scopo del presente lavoro è stato quello di conoscere il contenuto di F⁻ nei mangimi del commercio e di mettere a confronto le due metodiche di determinazione tenendo presente che per il fluoro, come per ogni altro elemento contenuto in tracce nei mangimi, tale determinazione è resa difficoltosa dalla costituzione chimica, essenzialmente organica, del mangime stesso. Il primo problema analitico, infatti, è stato il processo di mineralizzazione di mangimi di composizione la più varia, destinati a specie animali diverse (pollame, conigli, suini, bovini).

TABELLA 1

Limiti per il fluoro negli alimenti per animali
(dalla *Gazzetta Ufficiale* delle Comunità Europee N. L 38/34)

ALIMENTI PER GLI ANIMALI	Contenuto massimo in mg/Kg (ppm) di F ⁻
<i>Alimenti semplici</i>	150
ad eccezione di:	
- alimenti di origine animale	500
- fosfati	2.000
<i>Alimenti completi</i>	150
ad eccezione di:	
- alimenti completi per bovini, ovini, caprini:	
- durante l'allattamento	30
- altri	50
- alimenti completi per suini	100
- alimenti completi per pollame	350
- alimenti completi per pulcini	250
<i>Composti minerali per bovini, ovini e caprini</i>	2.000

PARTE SPERIMENTALE

1. Reattivi

- 1.1. Reattivi per la preparazione del campione.
- 1.1.1. Acqua distillata.
- 1.1.2. Idrossido di sodio in pastiglie p. a.
- 1.1.3. H₂SO₄ conc.
- 1.1.4. H₂SO₄ 1 N.
- 1.1.5. H₂SO₄ 24 N.
- 1.1.6. FeSO₄ · 7 H₂O p. a.
- 1.1.7. Ag₂SO₄ p. a.

- 1.1.8. Acido solforico contenente solfato di argento: mettere in capsula di porcellana 10 g di 1.1.6, 1 g di 1.1.5. e 10 ml di 1.1.3. Riscaldare fino a svolgimento di fumi di SO_3 ; riscaldare ancora per 10 min. Lasciar raffreddare, travasare in un becher della capacità di 1000 ml ed aggiungere 500 ml di 1.1.5. Riscaldare agitando con una bacchetta di vetro fino a che la soluzione diventi limpida.
- 1.1.9. Acetato di isoamile p.p.a. (p. e. 140 — 142 °C).
- 1.2. Reattivi per la determinazione spettrofotometrica.
- 1.2.1. Acqua distillata.
- 1.2.2. Acido acetico glaciale.
- 1.2.3. Acetone p. a.
- 1.2.4. Idrossido di ammonio (D : 0,91).
- 1.2.5. Acetato di sodio, $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$.
- 1.2.6. Fluoruro di sodio, NaF, p. a.
- 1.2.7. Nitrato di lantanio, $\text{La}(\text{NO}_3)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ p. a.
- 1.2.8. Acido N alizarin-3-metilammino-N diacetico (biidrato) (alizarina complesso).
- 1.2.9. Reattivo misto alizarina-lantanio: in tre becher, della rispettiva capacità di ml 150, 200 e 100, preparare le seguenti soluzioni: a) pesare 192 mg di alizarina complesso 1.2.8. e sospenderli in circa 100 ml di acqua. Aggiungere 1 ml di NH_4OH 1.2.4 e, a dissoluzione avvenuta, aggiungere 1 ml di acido acetico 1.2.2. b) pesare 34 g di acetato di sodio 1.2.5 e scioglierli in 150 ml di acqua. Aggiungere 15 ml di acido acetico 1.2.2. c) pesare 433 mg di nitrato di lantanio 1.2.7 e scioglierli in 100 ml di acqua.
- In matraccio tarato da 1000 ml, versare nell'ordine le tre soluzioni a), b) e c) lavando con acqua. Aggiungere 250 ml di acetone 1.2.3 e portare a volume con acqua. Il reattivo ha la durata di 14 giorni se mantenuto al buio. Usarlo dopo 24 h dalla sua preparazione.
- 1.2.10. Soluzione standard di fluoro (1000 ppm F^-): pesare g 2,2105 di fluoruro di sodio 1.2.6. collocarli in matraccio tarato della capacità di 1000 ml e portare a volume con acqua.
- 1.2.11. Soluzione standard diluita di fluoro (10 ppm F^-): prelevare 10 ml della soluzione standard 1.2.10 e diluirli a 1000 ml con acqua distillata.
- 1.2.12. Soluzioni per la costruzione della curva di riferimento: in matracci tarati della capacità di 100 ml, collocare ml 0,5 — 1,0 — 2,0 — 3,0 — 4,0 e 5,0 della soluzione standard diluita 1.2.11. Portare a volume con acqua. Queste soluzioni contengono rispettivamente 0,05 — 0,1 — 0,2 — 0,3 — 0,4 e 0,5 ppm F^- .

- 1.3. Reattivi per la determinazione potenziometrica.
- 1.3.1. Acqua distillata.
- 1.3.2. Fluoruro di sodio, NaF p.a.
- 1.3.3. Cloruro di sodio, NaCl p. a.
- 1.3.4. Idrossido di sodio 5 M.
- 1.3.5. Acido tetracetico N,N,N',N'-1,2-diammino-cicloesano (CDTA).
- 1.3.6. Acido acetico glaciale.
- 1.3.7. Soluzione decompressante e regolatrice della forza ionica: a circa 500 ml di acqua, posti in un becher da 1000 ml, aggiungere 57 ml di acido acetico glaciale 1.3.6, 58 g di NaCl 1.3.3 e 4 g di CDTA 1.3.5. Agitare per facilitare la dissoluzione e quindi portare a volume con acqua. Questa soluzione è anche reperibile in commercio.
- 1.3.8. Soluzione standard di fluoro (1000 ppm F^-): pesare g 2,2105 di NFa 1.3.2., collocarli in matraccio tarato da 1000 ml e portare a volume con acqua.
- 1.3.9. Soluzione standard diluita di fluoro (10 ppm F^-): prelevare 10 ml nella soluzione standard di fluoro 1.3.8, collocarli in matraccio tarato da 1000 ml e portare a volume con acqua.
- 1.3.10. Soluzioni per la costruzione della curva di riferimento: prelevare 0,2 - 0,5 - 1,0 - 2,0 - 3,0 - 5,0 - 20,0 e 50,0 ml della soluzione standard diluita 1.3.9 e collocarli in altrettanti matracci tarati della capacità di 100 ml. Portare a volume con acqua. Queste soluzioni contengono rispettivamente 0,02 - 0,05 - 0,1 - 0,2 - 0,3 - 0,5 - 1,0 - 2,0 e 5,0 ppm F^- .

2. Apparecchiatura

2. 1. Capsule di nichel (ϕ cm 8 circa).
2. 2. Forno a muffola riscaldato elettricamente, a temperatura e tempi programmabili.
2. 3. Distillatore per fluoro (Fig. 1): costituito essenzialmente della caldaia 1 per la produzione di vapore acqueo, di un recipiente 2 contenente acetato di isoamile, riscaldato elettricamente come la caldaia 1, nel quale è immerso il recipiente 3 che accoglie il campione versato attraverso l'imbuto 5, di un regolatore del livello dell'acqua di alimentazione 4, delle serpentine di raffreddamento 6 e 7, e del matraccio 8 per raccogliere il distillato.
2. 4. Spettrofotometro UV-VIS a doppio raggio 552 Perkin Elmer, con celle di quarzo di 5 cm di percorso ottico.

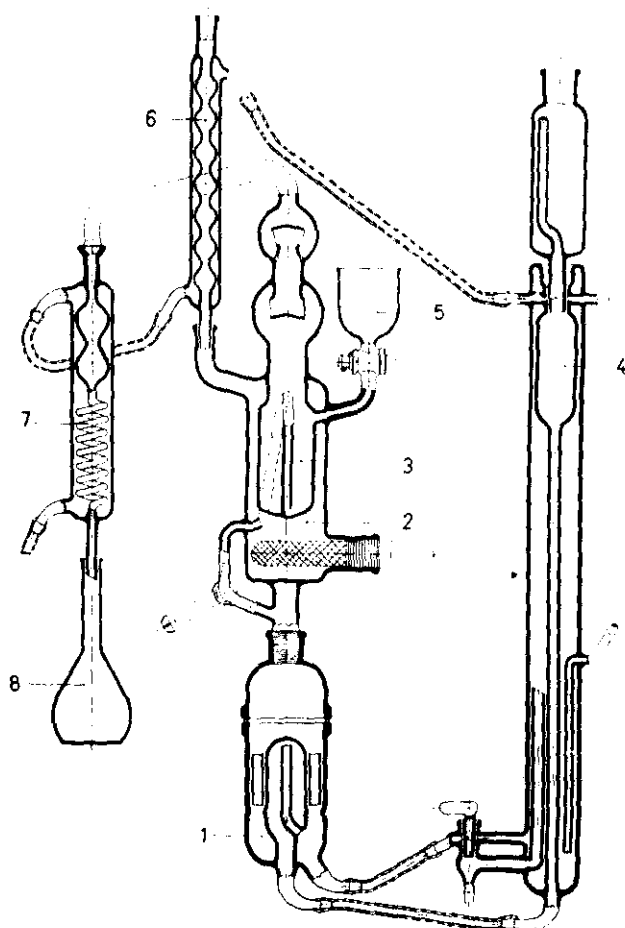


Fig. 1. — Schema dell'apparecchiatura di distillazione:

1) Caldaia per la produzione del vapore acqueo. - 2) Bagno termostatico (acetato di isoamile). - 3) Recipiente per il campione. - 4) Regolatore di livello. 5) Imbuto. - 6 e 7) Refrigeranti. - 8) Matraccio tarato di raccolta.

- 2. 5. Registratore 561 Perkin Elmer.
- 2. 6. Potenzimetro 901 Orion.
- 2. 7. Elettrodo specifico per il fluoro singolo o combinato.
- 2. 8. Elettrodo di riferimento.
- 2. 9. Elettrodo a vetro.
- 2.10. Agitatore magnetico.
- 2.11. Ancorette di teflon.
- 2.12. Vetreria varia.

3. Preparazione del campione

Dopo aver reso omogeneo il campione polverizzato in un mulino a palle, pesarne 10 g e metterli in capsula di nichel 2.1. Incenerire in muffola 2.2 per 24 h a 550 °C. Quando la capsula si sarà raffreddata, fondere le ceneri con 5 g di NaOH 1.1.2 con fiamma ossidante. Lasciar raffreddare e quindi portare in soluzione col minor quantitativo possibile di acqua, aiutandosi con una bacchetta di vetro. Per facilitare la dissoluzione del campione rimasto aderente alla capsula, usare piccoli quantitativi di H_2SO_4 1 N 1.1.4 e lavare subito con acqua. Versare la soluzione nell'apposito recipiente del distillatore 2.3 ed aggiungere 10 ml di una soluzione al 20 % di $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.1.6, preparata al momento e a freddo. Aggiungere con cautela 60 ml di H_2SO_4 contenente Ag_2SO_4 1.1.8. Distillare usando l'accorgimento di portare prima all'ebollizione l'acetato di isoamile del recipiente 2 del distillatore al fine di innalzare la temperatura del campione contenuto nel recipiente 3, e poi immettervi la corrente di vapore acqueo. La temperatura di distillazione di $140\text{ }^\circ\text{C} \pm 2\text{ }^\circ\text{C}$ viene raggiunta mediante ebollizione dell'acetato di isoamile nel quale è immerso il recipiente contenente il campione. In matraccio tarato raccogliere 1000 ml di distillato.

4. Determinazione spettrofotometrica

In matracci tarati da 100 ml, pipettare rispettivamente 50 ml delle soluzioni di riferimento 1.2.12, aggiungere a ciascuno 10 ml di acetone 1.2.3 e 10 ml di reattivo misto 1.2.9. Agitare, lasciare svanire la schiuma eventualmente formatasi e portare al volume con acqua. Queste soluzioni contengono rispettivamente 0,025 - 0,05 - 0,1 - 0,15 - 0,2 e 0,25 ppm F^- . Preparare la soluzione del campione e la soluzione del bianco pipettando, per la prima, 50 ml di distillato e, per la seconda, 50 ml di acqua distillata. Aggiungere ad entrambi l'acetone ed il reattivo misto (10 ml + 10 ml) e portare al volume di 100 ml con acqua.

Azzerare lo spettrofotometro con le due celle contenenti la soluzione del bianco. Eseguire le letture delle soluzioni standard e del campione alla lunghezza d'onda di 617 nm, contro il bianco.

Riportare su grafico le letture eseguite e costruire la curva di riferimento ponendo in ascisse le concentrazioni di F^- espresse in ppm, e in ordinate l'assorbanza.

Calcolare il contenuto in F^- del campione iniziale usando la formula

$$C_x = \frac{c \cdot 2 \cdot V}{P}$$

dove: c = concentrazione in fluoro secondo la lettura spettrofotometrica, ricavata dalla curva di riferimento;

2 = fattore di diluizione;

V = volume del distillato;

p = peso del campione in g.

5. Determinazione potenziometrica

Misura diretta.

Calibrare il potenziometro con due soluzioni standard la cui concentrazione abbracci l'ambito entro cui è compresa la presumibile concentrazione in fluoro del campione. Per la calibrazione dell'apparecchio, si rimanda al manuale di istruzioni.

Eseguiare la misura diretta della concentrazione in fluoro del campione. A questo proposito, prelevare 10 ml del distillato e collocarli in un becher da 50 ml nel quale è stata posta un'ancoretta di teflon 2.11. Aggiungere 1 ml della soluzione 1.3.7., mettere il becher sull'agitatore magnetico 2.10, immergere nella soluzione l'elettrodo combinato o i due elettrodi, singolo e di riferimento, attendere che la lettura si stabilizzi e quindi prendere nota della concentrazione in fluoro del campione.

Misura indiretta (mediante costruzione della curva di riferimento).

In becher da 50 ml, contenenti ciascuno un'ancoretta di teflon, collocare 10 ml delle soluzioni preparate secondo 1.3.10. Ad ogni becher aggiungere 1 ml della soluzione 1.3.7. Allo stesso modo, preparare la soluzione del campione e del bianco.

Predisporre il potenziometro per la lettura in millivolt ed eseguire le misure delle soluzioni standard, del bianco e del campione. Tutte le soluzioni devono avere la stessa temperatura. Mediante l'agitatore magnetico 2.10, mantenere le soluzioni in costante agitazione durante le letture.

Per costruire la curva di riferimento (Fig. 2), riportare su carta semi-logaritmica, in ascisse, le concentrazioni di fluoro espresse in ppm e, in ordinate, i millivolt registrati. Per incrementi di 10 volte della concentrazione di fluoro delle soluzioni standard, si deve ottenere una differenza di potenziale di circa 57 millivolt, operando a temperatura costante.

Calcolare il contenuto in F^- del campione facendo uso della seguente formula:

$$C_x = \frac{c \cdot V}{p}$$

dove: c = concentrazione del fluoro nella soluzione secondo la lettura potenziometrica, ricavata dalla curva di riferimento;

V = volume del distillato;

p = peso del campione in g.

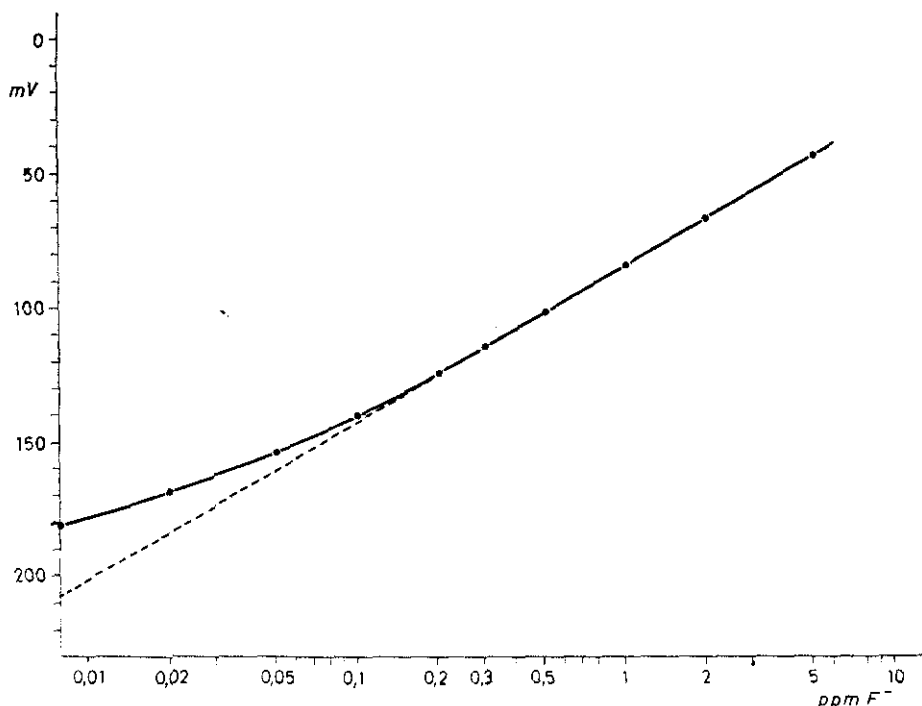


Fig. 2. — Curva di riferimento costruita su carta semilogaritmica. Sull'asse lineare sono riportati i potenziali di soluzioni standard, su quello logaritmico le loro concentrazioni.

RISULTATI E DISCUSSIONE

I campioni di mangimi esaminati relativamente al loro contenuto in fluoro, provengono dal commercio. 7 di essi sono destinati all'alimentazione di pollame, 3 all'alimentazione di conigli, 9 a quella di suini e i rimanenti 7 sono destinati ai bovini. Alcuni sono in polvere, altri in granuli duri. Come riportato dalle rispettive etichette, tutti i mangimi contengono farina di mais e di soja e sono addizionati di NaCl, CaHPO₄, Fe, Cu, Zn, Mn, Co e I. Nei mangimi per pollame sono sempre presenti farina di pesce e farina di carne, in quelli per suini farina di pesce, farina di lino e latte in polvere. Altri componenti presenti in modo vario sono orzo, grano, avena, siero di latte, farina di erba medica, manioca, polvere di vinaccioli, di girasole, sago, melassa. La percentuale di ogni componente differisce da mangime a mangime.

Come risulta dalla Tab. 2, il quantitativo di fluoro nei mangimi esaminati è inferiore ai limiti per il fluoro previsti dalla vigente normativa. La determinazione del F⁻, eseguita con i due metodi, fornisce risultati che, al con-

TABELLA 2

**Contenuto in fluoro in mangimi destinati
all'alimentazione di varie specie di animali**

N. DEL CAMPIONE	Animale cui è destinato il mangime	Metodo spettrofotometrico ppm F ⁻	Metodo potenziometrico ppm F ⁻
1	gallina	48,7	51,5
2	gallina	58,8	56,0
3	pulcino	29,0	30,9
4	pulcino	36,7	33,6
5	pulcino	27,0	27,0
6	pulcino	24,5	24,7
7	coniglio	34,9	33,4
8	coniglio	36,4	34,9
9	coniglio	33,6	34,0
10	suino	24,7	25,9
11	suino	39,9	37,9
12	suino	41,9	42,0
13	suino	35,0	35,0
14	suino	21,0	20,0
15	suino	25,9	26,0
16	suino	26,4	29,7
17	suino	32,9	32,5
18	suino	27,7	29,0
19	suino	32,4	33,6
20	vitello	18,5	18,9
21	vitello	20,9	21,2
22	vitello	26,0	27,5
23	vitello	31,4	30,9
24	vitello	20,4	19,9
25	vitello	18,5	19,1
26	vitello	29,9	30,6
27	vitello	19,2	18,7

fronto tra di loro, si presentano pressoché uguali, indipendentemente dal contenuto in fluoro del mangime e dalla sua composizione totale.

La Tab. 3 riguarda il recupero di fluoro ottenuto distillando soluzioni standard a diversa concentrazione di F⁻ e raccogliendo volumi diversi di distillato. A tale proposito, sono stati distillati 20 ml di ogni soluzione standard che, nel contenitore del distillatore, sono stati addizionati di 60 ml di soluzione 1.1.8 e di 10 ml di soluzione al 20 % di 1.1.6. Il confronto dei risultati ottenuti dimostra che occorre raccogliere 1000 ml di distillato perché il recupero del F⁻ sia totale; raccogliendo 500 ml di distillato, il recupero è del 70 % circa.

TABELLA 3

**Confronto del recupero di F^- - in volumi diversi
di distillato ottenuto da soluzioni standard.**

I	II	III	IV	V
10	0,40	0,28	0,20	0,21
15	0,60	0,42	0,30	0,30
20	0,80	0,64	0,40	0,39

I) Concentrazione di F^- , espresse in ppm, delle soluzioni standard (volume distillato: 20 ml).

II e IV) Concentrazioni teoriche di F^- , espresse in ppm, in 500 e 1000 ml di distillato.

III e V) Concentrazioni di F^- , espresse in ppm, trovate rispettivamente nei 500 e nei 1000 ml distillati.

La Tab. 4 riporta i dati comparativi dei recuperi di fluoro ottenuti aggiungendone quantità differenti (come NaF) a diversi tipi di mangimi in polvere, prima del loro incenerimento in muffola. Tali dati dimostrano che la percentuale di recupero del fluoro è buona sia operando col metodo spettrofotometrico che con quello potenziometrico, a prescindere dalla composizione dell'alimento e dalla quantità di NaF aggiunto.

Prove eseguite variando i quantitativi di acetone e di reattivo misto da aggiungere alle soluzioni standard ed ai campioni per la determinazione spettrofotometrica del fluoro, hanno consentito di migliorarne le prestazioni. Infatti (Fig. 3), quantitativi di acetone e di reattivo misto di 20 ml ciascuno (curva a) o rispettivamente di 10 ml e di 20 ml (curva b), forniscono letture non sufficientemente stabili; le curve che ne derivano appaiono lineari dato che, per la loro costruzione, è stato tenuto conto della media di più letture. Invece, le letture spettrofotometriche eseguite dopo aggiunta alle soluzioni in esame di 10 ml di acetone e di 10 ml di reattivo misto (curva c) sono stabili e permettono di costruire curve di riferimento lineari, passanti per lo zero.

Per quanto riguarda la determinazione del F^- mediante il metodo potenziometrico, l'apparecchiatura 2.6 impiegata ha consentito di eseguire letture di soluzioni standard e di campioni a concentrazione molto bassa di F^- apportando le opportune rettifiche di *slope*. In questo caso la curva di riferimento deve essere costruita con soluzioni standard aventi concentrazioni di F^- molto più ravvicinate tra loro.

È stato anche possibile applicare il metodo delle aggiunte per i campioni a bassa concentrazione di F^- . Per l'esecuzione del metodo delle aggiunte, si rimanda al manuale di istruzioni dell'apparecchiatura 2.6.

TABELLA 4

Confronto delle percentuali di recupero di F^- - determinato con i due metodi

N. CAMPIONE	METODO SPETTROFOTOMETRICO				METODO POTENZIOMETRICO			
	F^- contenuto ppm	F^- aggiunto ppm	F^- trovato ppm	% recupero	F^- contenuto ppm	F^- aggiunto ppm	F^- trovato ppm	% recupero %
1	48,7	50	98,0	99,3	51,5	50	100,0	98,5
5	27,0	25	49,5	95,2	27,0	25	50,6	97,3
10	24,7	20	46,0	102,9	25,9	20	45,7	99,6
14	21,0	10	29,5	95,2	20,0	10	29,0	96,7
24	20,4	10	30,0	98,7	19,9	10	30,0	100,3

CONCLUSIONI

I metodi spettrofotometrico e potenziometrico presentati per la determinazione del fluoro, posseggono le seguenti peculiarità:

1) Poiché per entrambi è necessario che il campione sia sottoposto a distillazione, i due metodi sono esenti da qualsiasi interferenza.

2) La distillazione protratta fino a raccogliere 1000 ml di distillato consente di recuperare un'ottima percentuale del fluoro presente nel campione.

3) L'applicazione del metodo delle aggiunte e la possibilità di rettifica dello *slope* fanno sì che il metodo potenziometrico sia idoneo alla determinazione anche di basse concentrazioni di fluoro.

4) Il metodo potenziometrico è di esecuzione più rapida rispetto a quello spettrofotometrico non solo perché la lettura potenziometrica può essere effettuata non appena terminata la distillazione, ma anche perché può essere eseguita la misura diretta (concentrazione di F^-) senza dover procedere alla costruzione della curva di riferimento. Inoltre, per il fatto che necessita di più scarse manipolazioni, il metodo potenziometrico comporta minore coefficiente di variazione ($\pm 5\%$) rispetto al metodo spettrofotometrico ($\pm 7\%$).

5) Tutti e due i metodi presentano buona sensibilità e riproducibilità. I risultati che si ottengono sono quindi confrontabili tra loro.

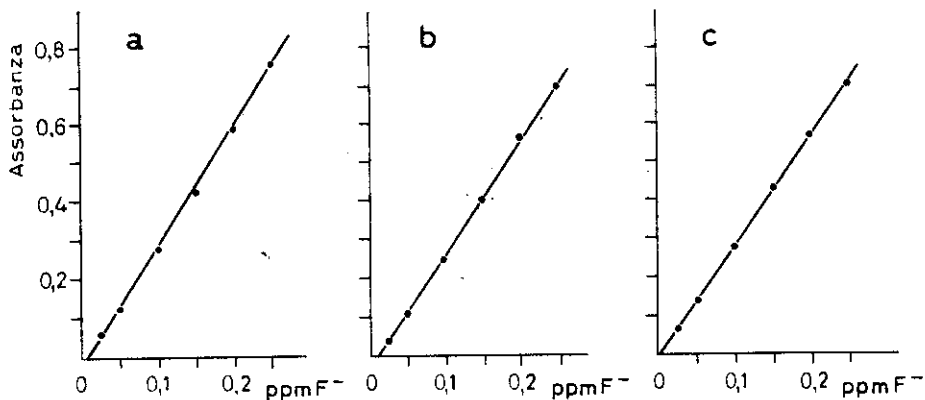


Fig. 3. — a) Curva di riferimento ottenuta aggiungendo alle soluzioni standard 20 ml di acetone e 20 ml di reattivo misto. b) Curva di riferimento ottenuta aggiungendo alle soluzioni standard 10 ml di acetone e 20 ml di reattivo misto. c) Curva di riferimento ottenuta aggiungendo alle soluzioni standard 10 ml di acetone e 10 ml di reattivo misto.

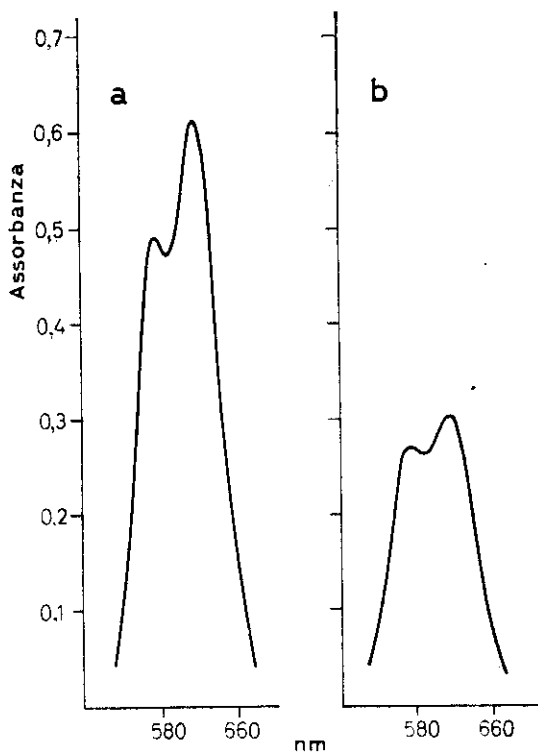


Fig. 4. — Tracciati ottenuti per registrazione dell'assorbanza di soluzioni standard di F^- (curva a: 0,2 ppm F^- ; curva b: 0,1 ppm F^- ; 10 ml di acetone + 10 ml di reattivo misto; velocità di scansione: 120 nm/min).

6) Entrambi i metodi presentati possono essere applicati per la determinazione del fluoro in altre sostanze, diverse dai mangimi. Ciò sarà oggetto di ulteriore studio.

Ricevuto il 10 gennaio 1981.

Accettato il 22 gennaio 1981.

BIBLIOGRAFIA

1. ADLER, P. *et al.* 1970. *Fluorides and human health*. World Health Organization, Geneva.
2. SCHWARZ, K. & MILNE, D. B. 1972. Fluorine requirement for growth in the rat. *Bioinorg. Chem.* **1**: 331-338.
3. SHUPE, J. L., HARRIS, L. E., GREENWOOD, D. A., BUTCHER, J. E. & NIELSEN, H. M. 1963. The effect of fluorine on dairy cattle. V. Fluorine in the urine as an estimator of fluorine intake. *Amer. J. Vet. Res.* **24**: 300-309.
4. BURNS, K. N. & ALLCROFT, R. 1964. *Fluorosis in Cattle: 1. Occurrence and Effects in Industrial Areas of England and Wales, 1954-57*. Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, Animal Disease Surveys Report No. 2. Part. I. Her Majesty's Stationery Office, London.
5. BELCHER, R. & WEST, T. S. 1961. A comparative study of some lanthanon chelates of alizarin complexan as reagents for fluoride. *Talanta*. **8**: 863-870.
6. DEANE, S. F., LEONARD, M. A., MCKEE, V. & SVEHLA, G. 1978. Sulphonated alizarin fluorine blue (AFBS). *Analyst*. **103**: 1134-1147.
7. FRERE, J. F. 1961. Specific microdiffusion method for the determination of fluorine based on the lanthanon-alizarin complexone color system. *Anal. Chem.* **33**: 644-645.

Emoglobina glicosilata: caratterizzazione di un metodo di dosaggio applicabile a screening di medicina preventiva

TEODORA MACCHIA, MARIA LUISA FIANI (*) e GINO MORISI

Laboratorio di Tecnologie Biomediche, Istituto Superiore di Sanità

Riassunto. — Viene descritto un metodo microcromatografico semplice, preciso ed economico per il dosaggio della emoglobina glicosilata (G-Hb). Una aliquota di sangue emolizzato con acqua distillata viene sottoposta a processo cromatografico su una colonna di resina (0,8 + 2,5 cm) Bio-Rex 70, termostata. Il processo analitico viene sottoposto ad un controllo di qualità interno attraverso il dosaggio di campioni di un *pool* di sangue conservato a -80°C .

È stata studiata l'influenza della temperatura di eluizione, la modalità di preparazione della resina, l'affidabilità e la praticabilità del metodo. La precisione del metodo ($SD_{pooled} = 0,09$, $CV = 1,2\%$) è stata saggiata all'interno della corsa su diversi campioni ($SD = 0,13-0,22$; $CV = 1,7-2,6\%$). Si riportano i risultati relativi ad uno studio comparativo tra i dati da noi ottenuti sulla affidabilità e quelli riferiti dalla letteratura a due metodi microcromatografici di uso corrente.

La variabilità fra corse riscontrata è soddisfacente ($SD_{mediana} = 0,13$; $CV_{mediano} = 1,8\%$).

È stato effettuato uno studio in parallelo analizzando 60 campioni, in duplicato, con il metodo da noi proposto e con un altro metodo comunemente usato: il confronto dei risultati ha messo in evidenza una differenza significativa di precisione a vantaggio del metodo proposto.

La valutazione della praticabilità ha portato a definire i seguenti aspetti: velocità di analisi: 30 campioni/h; costo: 250 lire/saggio; estrema facilità di esecuzione essendo state facilitate al massimo le fasi critiche della procedura.

Infine il metodo proposto è risultato proficuamente utilizzabile in programmi di screening di medicina preventiva.

(*) Ospite del Laboratorio di Tecnologie Biomediche.

Summary (*A microchromatographic method for G-Hb determination*). — A simple, precise and not expensive microchromatographic method for G-Hb determination is reported. An aliquot of blood water emolizate was chromatographed on thermostated Bio-Rex 70 resin columns (0.8×2.5 cm). This assay procedure was controlled by means of an internal quality control sample preserved in liquid nitrogen. Elution temperature, resin preparation, affidability and practicability of the method were studied.

Precision of the method (SD pooled = 0.09; CV = 1.2 %) was detected within run on several samples (SD = 0.13–0.22; CV = 1.7–2.6 %). Results of comparative study between literature data – referred to two commonly used procedures – and our own data, are reported. Run-to-run variability of the proposed assay procedure was seen to fall in acceptable values (median SD = 0.13; median CV = 1.8 %).

60 samples were assayed in duplicate by using the proposed procedure (a) as well as a commonly used method (b); results were compared and showed significative precision differences (SD (a) = 0.09; SD (b) = 0.20; $p < 2.1 \times 10^{-9}$). Practicability evaluation of the proposed procedure, according to IFCC recommendations indicated an analysis rate of 30 samples/h and a cost of Lit. 250/analysis. Particularly experienced analyst was not required.

The proposed procedure is useful for G-Hb (HbA_{1c}) assay in screening programs for preventive medicine.

INTRODUZIONE

Recentemente è stata messa in evidenza una relazione tra velocità di sintesi delle frazioni glicosilate dell'emoglobina (G-Hb), in particolare della emoglobina A_{1c} (HbA_{1c}) e i livelli del glucosio nel sangue [1, 2]. Sulla base di tale premessa, è stato proposto di prendere in considerazione la determinazione della HbA_{1c} o, per il più semplice procedimento di dosaggio, della G-Hb per la valutazione del grado di compenso metabolico del diabetico. Questo test permette, attraverso una unica determinazione ripetuta a distanza di mesi, di avere utili informazioni sullo stato di ricambio glicemico del diabete nel corso di un prolungato periodo di tempo antecedente l'esame [3–6].

Tra i metodi proposti per il dosaggio globale della G-Hb [7–11], il più usato è senz'altro quello microcromatografico, derivato da una semplificazione del metodo originale di Trivelli [12]. Alla diffusione di questo tipo di procedimento ha notevolmente contribuito la disponibilità commerciale di materiali pronti per l'uso.

Il nostro lavoro di messa a punto di un metodo (nel corso del testo indicato come « metodo ISS »), basato sulla separazione microcromatografica

della G-Hb, ha teso a migliorare la affidabilità e la praticabilità di un procedimento analitico già da altri e da noi collaudato.

Usando materiali preparati in laboratorio in maniera standardizzata, agevolando la manualità con semplici accorgimenti, controllando il fattore critico temperatura (che molto pesava sulla variabilità dei risultati nell'uso di materiali commerciali), tenendo sotto controllo il metodo e limitando il costo del singolo saggio, abbiamo cercato di meglio adattare il metodo alla routine, alle esigenze del *follow-up* continuo (per la correzione delle alterazioni del metabolismo) ed alle esigenze della medicina preventiva, esigenze queste ultime che, accanto alla numerosità dei campioni da analizzare, richiedono una spesa contenuta ed un dato affidabile.

Il controllo di qualità è stato effettuato con l'ausilio di campioni reali (*pool*) preparati in laboratorio e opportunamente conservati a temperatura molto bassa (-80°C), in mancanza di idonei controlli reperibili in commercio.

Il presente studio metodologico è stato eseguito in previsione di una ricerca sui livelli della G-Hb e delle sue correlazioni con la glicemia di base, da carico e con alcuni fattori di rischio coronarico in un esteso campione di popolazione generale.

PARTE SPERIMENTALE

Materiali

Resina: Bio-Rex 70 analytical grade, 200-400 mesh (Bio-Rad Laboratories, n. cat. 142-5852).

Microcolonne cromatografiche: tips per Macro-set 5 ml, n. cat. 814, Bio-Chemia.

Tampone di lavaggio: $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0,033 M, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ 0,0083 M, KCN 0,01 M; pH = 6,70.

Tampone eluente: $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0,033 M, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ 0,0083 M, KCN 0,01 M; pH = 6,80.

Kit Bio-Rad Hemoglobin A_1 by column test (Bio-Rad Laboratories, n. cat. 191-7001).

Campioni di sangue intero eparinizzato: di soggetti adulti maschi, di età compresa fra 49 e 70 anni, sottoposti ad esame nell'ambito del Progetto Romano di Prevenzione della Cardiopatia Coronarica [13].

Controlli: pool di sangue umano eparinizzato, conservato a -80°C ; *G-Hb Quik Column Control* (Helena Laboratories, n. cat. 5344); *Hemoglobin A₁ Control* (Bio-Rad Laboratories, n. cat. 191-7024).

Apparecchiatura

Termostato: CEAST UT 68 (CEAST - Torino).

Dispositivi per la termostatazione delle microcolonne, rispettivamente per metodo ISS e Bio-Rad, progettati e costruiti nel laboratorio (Figg. 1, 2).

Spettrofotometro: Beckman mod. 25 (Beckman Instruments).

pH-Metro: Mod. PHM62. Radiometer.

Diluitore: Micromedic automatic pipette, Mod. 25002 (Micromedic Systems Inc.),

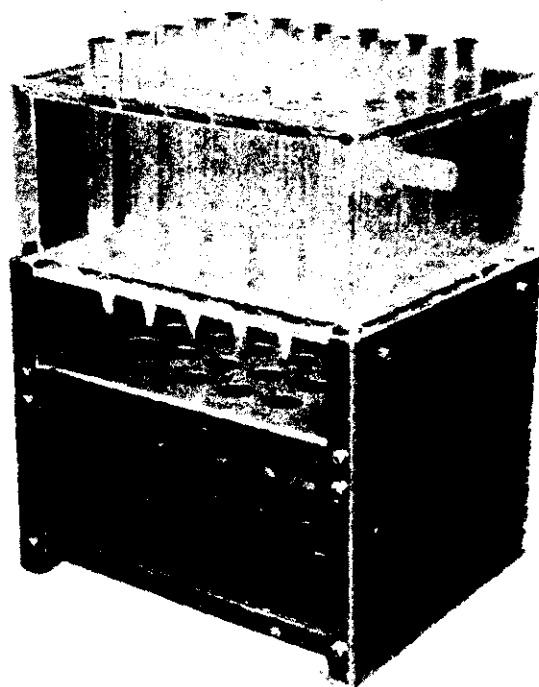


Fig. 1. — Dispositivo per la termostatazione delle microcolonne cromatografiche usate col metodo ISS. È costituito da una camera in plexiglass a forma di parallelepipedo. Sulle due basi maggiori fori concentrici, con sedi per o-rings, assicurano la tenuta quando le microcolonne (30) sono in situ. La camera è collegata alla circolazione esterna dell'acqua del termostato. Il dispositivo è posto su un supporto dotato di apposito alloggiamento per le provette di raccolta dell'eluato.

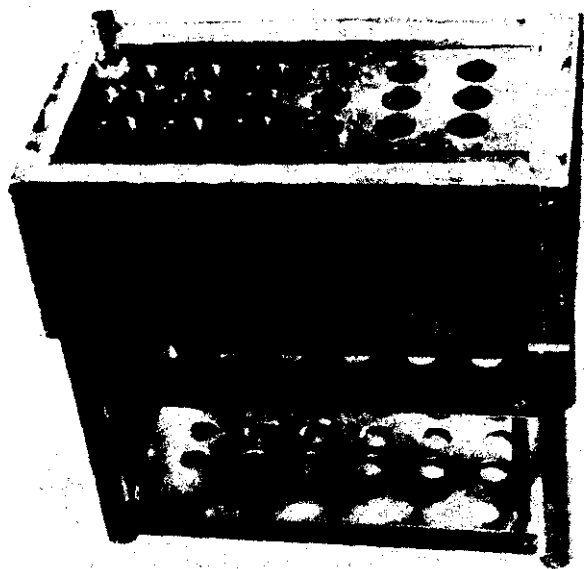


Fig. 2. — Dispositivo per la termostatazione delle microcolonne Bio-Rad. In un blocco di acciaio sono state sagomate le sedi per 18 colonnine cromatografiche. Parallelamente alle basi, negli spazi laterali e fra le file delle sedi, una rete a scacchiera di canali ricavati all'interno del blocco, fra loro opportunamente comunicanti, permette la circolazione forzata dell'acqua di un termostato a cui il blocco è collegato. Il blocco viene tutt'intorno protetto da una camicia di materiale isolante termico. Il dispositivo è posto su un supporto dotato di apposito alloggiamento per le provette di raccolta dell'eluato.

Metodi

Metodo ISS.

Preparazione della resina. — (1) Sospendere il contenuto di una confezione (1 libbra) di resina Bio-Rex 70, in 2,5 l di tampone di lavaggio; (2) aggiungere alla sospensione, mantenuta mediante blanda agitazione magnetica, HCl 1 N fino a raggiungere un pH 6,70; (3) lasciare depositare la resina e togliere il sovrantante. Ripetere le operazioni (1) e (2) diverse volte (circa 5 volte) fino a che il pH della sospensione della resina (senza ulteriori aggiunte di acido) risulti nell'intervallo 6,68–6,72. La quantità di resina così preparata è sufficiente per circa 400 determinazioni.

Preparazione delle colonne microcromatografiche. — Dopo aver inserito e stretto, con l'uso di una bacchetta di vetro, sul fondo del tip un batuffolo di cotone idrofilo, riempire la colonnina con la resina precedentemente termostata e risospesa. A sedimentazione avvenuta (altezza della colonna di resina, circa 2,5 cm), porre sulla sua superficie un dischetto di carta Wathman n. 1 (Fig. 3).

Preparazione del campione. — Il campione di sangue intero, eparinizzato, conservato al massimo per 3 giorni a $+4^{\circ}\text{C}$, viene emolizzato con acqua tridistillata (10 vol. di acqua per 1 vol. di sangue), agitando su vortex per 1 minuto e lasciando a riposo per 10 minuti. Al termine della fase di emolisi gli stromi vengono sedimentati per centrifugazione di 10 minuti a 3000 giri e il sovranatante utilizzato per il saggio.

Come il campione reale, viene trattato il campione di controllo interno (pool), di volta in volta inserito nella serie analitica.

Allestimento del saggio. — 140 μl di emolizzato, prelevati con una pipetta automatica regolabile, vengono introdotti sulla colonnina di resina appena preparata e posta nella camera termostata (Fig. 1). Il dischetto di carta sulla superficie libera della resina facilita questa operazione, favorendo la distribuzione omogenea del campione su tutta la superficie. Dopo circa 5 minuti vengono aggiunti 5 ml di tampone eluente: ora il dischetto di carta impedisce la deformazione della superficie libera della resina e l'operazione può essere eseguita in breve tempo. A percolamento quasi ultimato, vengono aggiunti altri 5 ml di tampone eluente.

Il tempo totale della eluizione è di circa 45 minuti.

Contemporaneamente al processo cromatografico, si diluiscono 20 μl del campione in 10 ml di tampone eluente usando il diluitor: su questo preparato verrà effettuato il dosaggio della emoglobina totale.

La misura della assorbanza dell'eluato che contiene la G-Hb e che viene raccolto nell'apposita provetta sottostante alla colonnina cromatografica

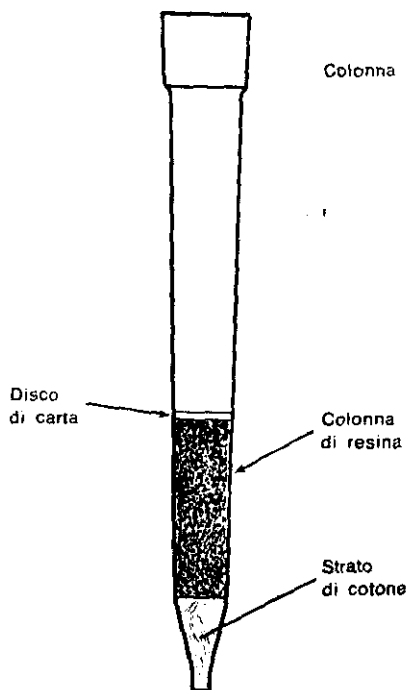


Fig. 3. — Microcolonna usata nel metodo ISS.

(Fig. 1) e della assorbanza del preparato diluito per il dosaggio dell'emoglobina totale, viene effettuata contro tampone, a 415 nm.

Il calcolo della G-Hb in % della Hb totale si effettua dal rapporto:

$$\frac{\text{assorbanza eluato}}{\text{assorbanza preparato diluito} \times 7} \times 100$$

Metodo Bio-Rad.

Il saggio viene effettuato secondo le indicazioni della Ditta produttrice dei materiali occorrenti, contenute in un apposito manuale di istruzione [14], termostatando però le colonnine cromatografiche a 23 °C per mezzo del dispositivo mostrato in Fig. 2.

RISULTATI

Scelte operative

Prima di intraprendere lo studio della affidabilità del metodo ISS, abbiamo ritenuto necessario affrontare il problema controverso della temperatura di lavoro, adottando il criterio della termostazione dei reagenti e delle colonnine durante tutto il processo cromatografico.

Esperimenti sono stati condotti allo scopo su diversi campioni a temperature rigorosamente controllate e comprese tra 19,5 e 25,5 °C e la Fig. 4 riporta alcuni risultati. Sulla base dei risultati ottenuti abbiamo scelto di operare alla temperatura di 23 °C.

Per valutare la variabilità della resina da lotto a lotto di preparazione, più campioni sono stati processati contemporaneamente, ciascuno in quin-

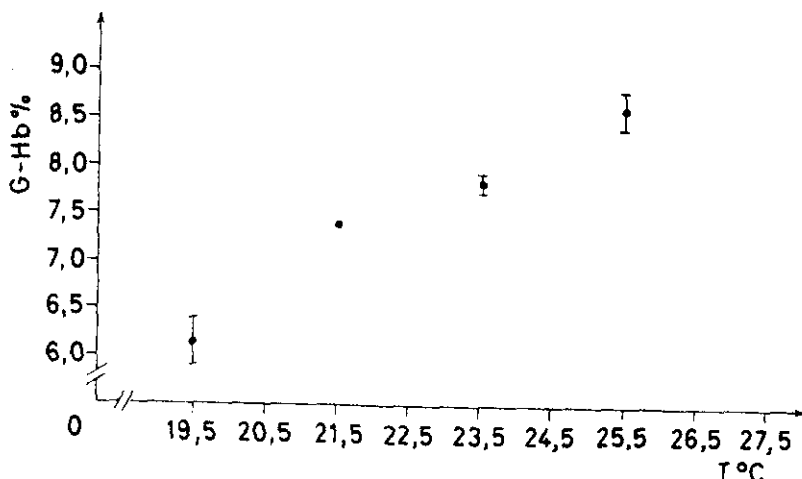


Fig. 4. — Valori di G-Hb % e relative dispersioni, verificati a diverse temperature di eluizione.

tuplo, con resine separatamente preparate secondo la procedura standardizzata descritta. La differenza osservata all'analisi statistica dei dati era inferiore a mezza unità (0,43 unità) pari a 5,7 ‰.

Caratterizzazione e confronto del metodo ISS

Per valutare la precisione del metodo sono state effettuate determinazioni su 60 campioni di sangue intero emolizzato analizzati in doppio. Parallelamente gli stessi campioni sono stati analizzati in doppio con il metodo Bio-Rad. I risultati, elaborati secondo un protocollo assemblato ed usato nel nostro laboratorio [15] sono riportati in Tab. 1.

TABELLA 1

**Caratterizzazione dei due metodi messi a confronto.
Lo stesso campione è stato analizzato in doppio
con ciascun metodo**

	METODO	
	ISS	Bio-Rad
N. campioni	60	60
$\bar{X}G-Hb$ %	7,53	7,17
$SD_{poola}^{(a)}$	0,09	0,20
CV_{medio} %	1,2	2,8

(a) $p < 0,01$ ($p < 2,13 \times 10^{-9}$).

Il test F, per le varianze, indica una differenza significativa di precisione tra le due procedure ($p < 0$, cioè $p < 2,13 \times 10^{-9}$). Dai dati osservati si può stimare un incremento di precisione, nel caso ISS, pari a circa un fattore 2. In ambedue le metodiche, per i campioni e l'intervallo di concentrazioni da noi esaminati, le caratteristiche di precisione non sembrano influenzate dalla quantità di analita presente come dimostra l'analisi dell'andamento delle SD e dei CV dei replicati (Tab. 1) vs. la concentrazione degli stessi.

L'analisi dei parametri della regressione (Fig. 5) effettuata sugli stessi campioni, indica una buona linearità e correlazione ($r = 0,943$), ma non spiega l'11 % della variabilità osservata tra le metodiche.

L'intercetta e la pendenza non risultano significativamente diverse da 0 e da 1. Questo risultato ci ha indotti ad eseguire una regressione forzata da cui risulta una pendenza pari a 1,050 significativamente diversa dall'unità ($p < 0,001$).

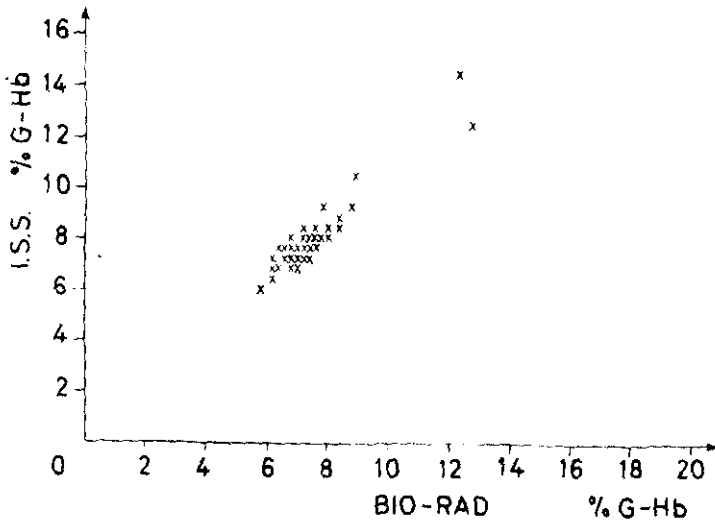


Fig. 5. — Correlazione dei risultati ottenuti con i due metodi messi a confronto.
 $N = 60$; $y = 0,155 + 1,029 x$; $r = 0,943$; $r^2 = 0,890$.

Si può quindi affermare che i valori ISS ed i valori Bio-Rad sono in relazione lineare tra loro con un errore sistematico proporzionale del 5 %. Per quanto riguarda gli errori casuali, la concordanza tra i due metodi è valutabile entro circa 0,8 unità (2 SD).

La buona precisione del metodo ISS emersa da questo confronto è confortata dalla valutazione di tale caratteristica nella corsa e tra corse. Tale misura, all'interno della corsa, è stata effettuata eseguendo 15 replicati su ciascuno dei campioni reali processati (Tab. 2). Dall'analisi dei dati riportati nella tabella possiamo considerare molto buona la coerenza interna dei re-

TABELLA 2

Metodo ISS: precisione nella corsa

	C A M P I O N E						
	1	2	3	4	5	6	7
N. replicati	15	15	15	15	15	15	15
X G-Hb %	8,11	7,53	7,21	10,30	7,14	7,63	8,51
SD	0,19	0,18	0,16	0,22	0,15	0,13	0,17
CV %	2,3	2,6	2,2	2,1	2,2	1,7	2,1

plicati e la loro fluttuazione attorno al valore medio con deviazione standard e coefficienti di variazione oscillanti nell'intervallo di 0,13-0,22 e 1,7-2,6 unità rispettivamente.

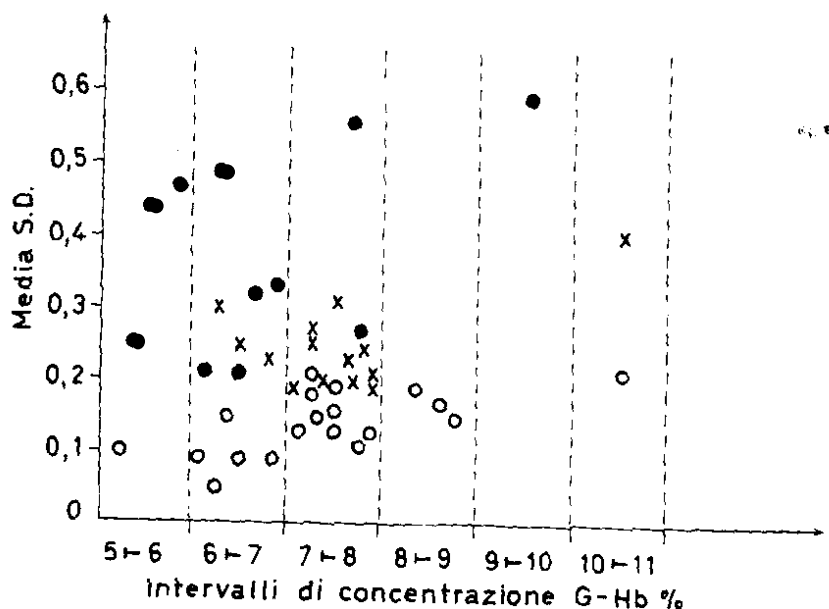


Fig. 6. — Precisione nella corsa. Deviazioni standard medie relative a diversi campioni analizzati con metodo ISS (o), Bio-Rad (x) e C. Erba (Helena) (●) per classi di concentrazione di G-Hb %. I dati relativi agli ultimi 2 metodi sono riferiti dalle rispettive Ditte fornitrici dei materiali.

TABELLA 3

**Numerosità dei campioni utilizzati
per la valutazione della precisione
nella corsa riferita a tre diversi metodi**

INTERVALLO DI % G-Hb	METODO		
	ISS	Bio-Rad	Carlo Erba (Helena)
5,0 - 5,9	1	—	2
6,0 - 6,9	5	3	5
7,0 - 7,9	9	10	2
8,0 - 8,9	2	—	—
9,0 - 9,9	—	—	1
10,0 - 10,9	1	1	—

All'interno dell'intervallo di concentrazione dei campioni utilizzati nelle prove di precisione nella corsa, l'analisi effettuata con il test di Bartlett, sulle varianze dei replicati, non mette in evidenza alcuna eterogeneità ($p < 0,59$).

Questo risultato conferma quanto osservato in precedenza nello studio delle caratteristiche del metodo con l'analisi della regressione (SD e CV vs. concentrazione), e, dato il numero di campioni utilizzati ed il numero di prove effettuate, riteniamo di poter concludere che tale precisione della metodica utilizzata non debba variare sensibilmente nell'intervallo di concentrazione studiato.

Questi risultati paiono incoraggiare la utilizzabilità del metodo ISS, per la precisione, anche alla luce di una valutazione effettuata sui nostri valori e su dati indicati da ditte produttrici di materiali per metodi microcromatografici analoghi (Fig. 6 e Tab. 3) relativi a campioni con simile contenuto in G-Hb.

La Fig. 6 riporta i valori di deviazione standard relativi a campioni analizzati con metodo ISS, Bio-Rad ed Helena riferiti a classi di concentra-

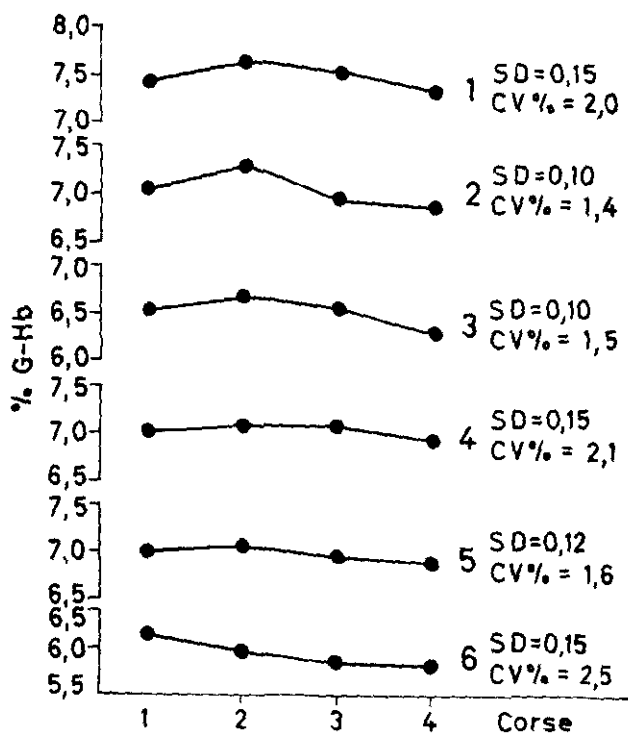


Fig. 7. — Precisione tra serie relative al metodo ISS. Si riporta l'andamento di 6 campioni analizzati in quintuplicato in 4 giorni diversi con SD e CV % medi riscontrati.

zione di G-Hb%. L'esame della figura rivela « ad occhio » una stratificazione in fasce ben distinguibili.

Per la precisione tra corse, sei campioni reali sono stati analizzati in cinque replicati per quattro corse diverse (Tab. 4).

TABELLA 4

Metodo ISS: precisione tra corse. In ogni corsa e per ogni campione sono stati effettuati 5 replicati

C A M P I O N E		C O R S A			
		1 ^a	2 ^a	3 ^a	4 ^a
1	$\bar{X}$	7,44	7,64	7,52	7,32
	SD	0,15	0,21	0,11	0,13
	CV %	2,0	2,7	1,5	1,8
2	$\bar{X}$	—	7,32	6,96	6,86
	SD	—	0,13	0,05	0,11
	CV %	—	1,8	0,8	1,7
3	$\bar{X}$	6,54	6,68	6,56	6,30
	SD	0,15	0,08	0,09	0,07
	CV %	2,3	1,3	1,4	1,1
4	$\bar{X}$	7,02	7,10	7,08	6,92
	SD	0,18	0,07	0,16	0,18
	CV %	2,5	1,0	2,3	2,6
5	$\bar{X}$	7,02	7,06	6,96	6,88
	SD	0,11	0,15	0,09	0,11
	CV %	1,6	2,1	1,3	1,6
6	$\bar{X}$	6,14	5,96	5,84	5,82
	SD	0,15	0,11	0,21	0,13
	CV %	2,5	1,9	3,6	2,2

Analizzando i risultati, abbiamo trovato una variabilità tra giorni non significativamente diversa, dal punto di vista statistico, da quella riscontrata all'interno del saggio (Tab. 2). La Fig. 7 rappresenta l'andamento per ciascun campione nelle diverse corse e riporta, a fianco, le relative SD e CV % medi riscontrati.

Riassumendo: i valori globali riscontrati per le mediane relative a SD e CV % rispettivamente risultano essere pari a 0,13 e 1,8.

Nella caratterizzazione del metodo ISS non si poteva prescindere dal considerare e valutare i parametri cosiddetti di « praticabilità » di cui la Tab. 5 dà un quadro riassuntivo.

TABELLA 5

Parametri di praticabilità del metodo ISS (secondo le indicazioni della IFCC)

Velocità di esecuzione	: 30 campioni/h.
Costo	: 250 lire/analisi.
Abilità tecnica richiesta	: nessuna particolare manualità
Sicurezza	: non si deve pipettare con la bocca; Tutte le operazioni debbono essere effettuate sotto cappa.

Controllo di qualità

La affidabilità in termini di accuratezza è stata valutata con il criterio della media di tutti i campioni reali non patologici [16, 17] che giornalmente pervenivano al nostro laboratorio. Esaminando l'andamento nella carta di controllo allestita (Fig. 8), si nota una soddisfacente stabilità del metodo in questione. Nella stessa figura sono riportati anche i valori medi giornalieri relativi agli stessi campioni analizzati col metodo Bio-Rad.

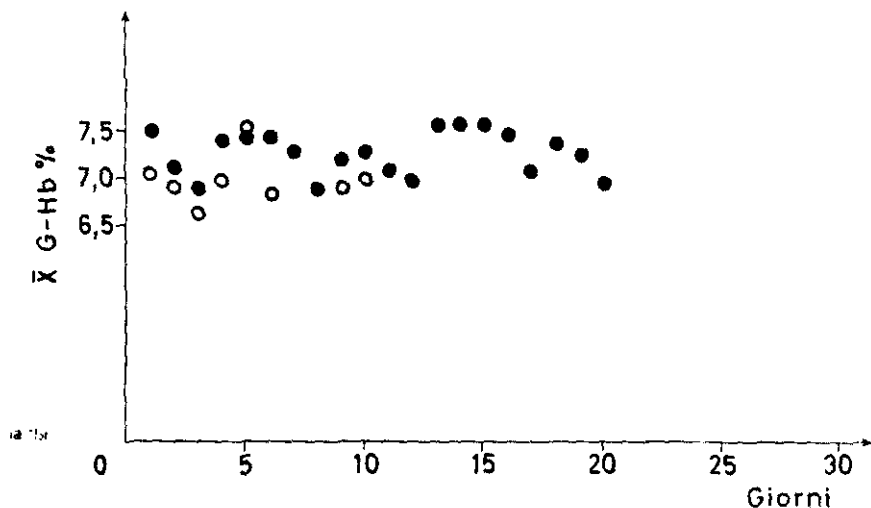


Fig. 8. — Accuratezza. Carta di controllo con la media giornaliera di GHb % di campioni reali non patologici, analizzati contemporaneamente con metodo ISS (●) e Bio-Rad (o).

Durante tutta la durata del lavoro il metodo è stato monitorato inserendo, casualmente, nelle serie analitiche, un controllo preparato in laboratorio e rivelatosi stabile. Tale controllo era costituito da un *pool* di sangue intero di pazienti eparinizzato, frazionato e conservato a -80°C non emolizzato né addizionato di conservanti.

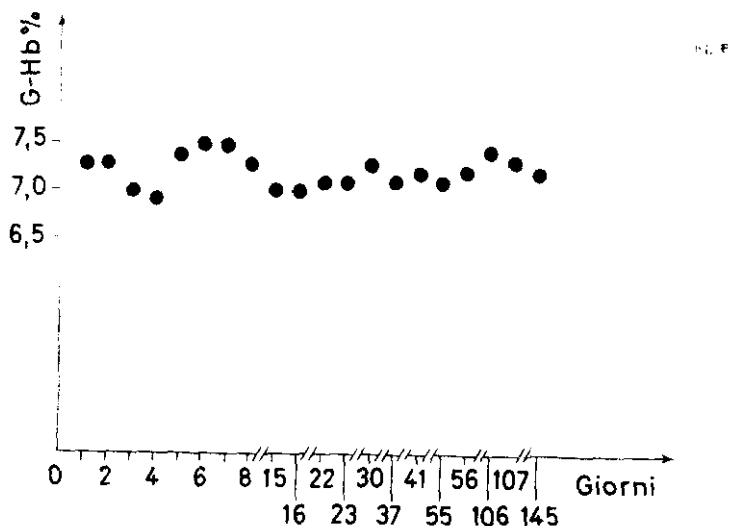


Fig. 9. — Carta di controllo di qualità allestita su un campione reale (*pool* di sangue eparinizzato, frazionato e conservato a -80°C) inserito in ogni serie analitica e analizzato nell'arco di circa 6 mesi.

Esaminando la carta di controllo (Fig. 9) appositamente allestita, questo «campione» mostra una buona stabilità, almeno per il periodo di tempo da noi esaminato, senza particolari andamenti. Questi risultati ci incoraggiano a pensare di poter utilizzare, anche per le G-Hb %, se pur solo come controllo interno, un sistema di questo tipo, già peraltro da noi con buon esito utilizzato per alcuni parametri sierologici [18].

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

I risultati analizzati mettono in luce alcuni aspetti interessanti del metodo proposto. In particolare:

La temperatura di eluizione e sua standardizzazione tramite termostatazione. La scelta di operare a 23°C si basa su risultati di nostre esperienze (Fig. 4) che indicano, come più idonee, temperature comprese tra $22,5^{\circ}\text{C}$ e

23,5 °C. È stato riscontrato un incremento di G-Hb all'aumentare della temperatura in accordo con la letteratura [19], come pure un incremento della imprecisione con la distanza dalla zona ottimale di temperatura.

La variabilità tra lotti di resina, altro aspetto critico del problema [20], stimata, come differenza tra diverse preparazioni, intorno al 5,7 % (0,43 unità) pare essere accettabile dal momento che non sembra avere un grosso peso sulla variabilità del controllo inserito nelle serie analitiche nell'arco di più mesi (utilizzando quindi diverse preparazioni di resina) come risulta all'esame della Fig. 9.

Buona è risultata la precisione del metodo ISS ($SD_{pooled} = 0,09$) che non pare influenzata dalla quantità di analita presente anche in rapporto al metodo di confronto avendo l'analisi delle varianze evidenziato un incremento di precisione per il metodo ISS di un fattore 2. I valori ottenuti con i due metodi messi a confronto sono comunque in relazione lineare tra loro con un errore sistematico proporzionale del 5 % e concordanti entro circa 0,8 unità (2 SD).

Buona è risultata anche la precisione nella corsa e tra corse: la differenza tra queste precisioni non è risultata significativa.

Recenti lavori [19] e l'esperienza acquisita nel nostro laboratorio (Fig. 10) hanno mostrato che l'uso di campioni di controllo commerciali può presentare diversi problemi in termini di accuratezza.

Per questa ragione abbiamo ritenuto opportuno valutare l'accuratezza (relativa) del nostro metodo sia utilizzando la media giornaliera dei normali [12, 13] sia costruendo un *pool* di sangue intero eparinizzato che, opportunamente frazionato, e conservato a -80 °C, era introdotto in ogni serie analitica.

I risultati relativi alla media giornaliera non mostrano presenza di *trend* (la pendenza non è statisticamente diversa da 0 al test *t* di Student: ($\beta = 0$; $t = 0,513$; $p < 0,25$).

Eguale mente i valori ottenuti per il *pool* non mostrano una dipendenza della concentrazione dal tempo ($\beta = 0$; $t = 0,296$; $p < 0,356$). Tutto questo ci permette di valutare, apparendo stabile la concentrazione del *pool* nel tempo, la precisione del metodo tra giorni in termini di deviazione standard delle misure ottenute in ogni giornata sulla media delle due frazioni di *pool* introdotte.

Lo studio dei risultati di cui sopra fornisce per il *pool* in questione un coefficiente di variazione pari a 2,4 %, che rappresenta dunque una stima della variabilità tra giorni del metodo proposto.

Infine è opportuno fare alcune considerazioni sulla praticabilità del metodo. È vero che la procedura di preparazione in laboratorio della resina non sembra incoraggiare a prima vista la adozione del metodo nella routine, ma è necessario inquadrare il tutto alla luce della non trascurabile agevola-

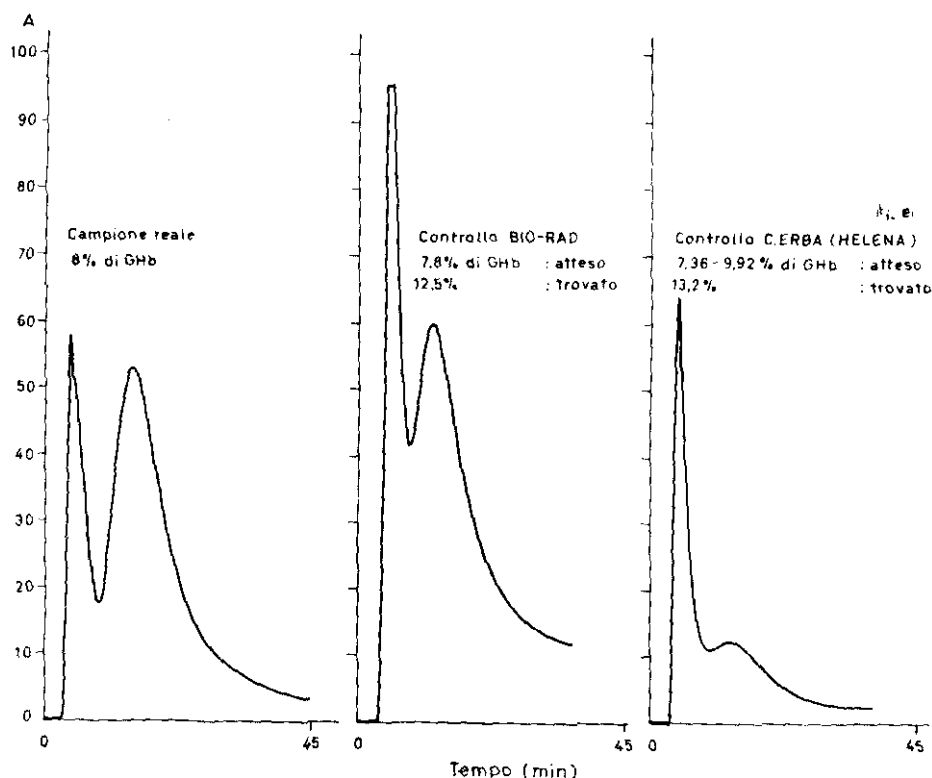


Fig. 10. — Campioni di controllo per G-Hb: profili cromatografici relativi ad un pool di campioni reali e a 2 campioni commerciali.

zione dal punto di vista della manualità, costo, affidabilità, riproducibilità e quindi utilizzabilità del dato a medio e lungo termine.

Alla luce di questa analisi ci sembra di poter concludere che la procedura analitica, proposta come « metodo ISS », possiede buone caratteristiche di affidabilità e praticabilità rispetto ad altre attualmente in uso, e che sia di interesse una sua applicazione nella routine e in programmi di *screening* per la medicina preventiva.

In una prossima nota verranno esposti i risultati relativi alla determinazione delle G-Hb in un esteso campione di soggetti esaminato nell'ambito di un progetto di prevenzione della cardiopatia coronarica.

Ricevuto il 20 gennaio 1981.

Accettato il 31 gennaio 1981.

BIBLIOGRAFIA

1. BUNN, H. F., GABBAY, H. & GALLOP, P. M. 1978. The glycosylation of hemoglobin: relevance to diabetes mellitus. *Science*. **200**: 21-27.
2. KOENING, R. J., PETERSON, C. M., JONES, R. L., SAUDEK, C., LEHRMAN, M. & CERAMI, A. 1976. The correlation of glucose regulation and hemoglobin A_{1c} in diabetes mellitus. *New Engl. J. Med.* **295**: 417-420.
3. GABBAY, K. H., HASTY, K., BRESLOW, J. L., ELLISON, L. C., BUNN, H. F. & GALLOP, P. M. 1977. Glycosylated hemoglobins and long-term blood glucose control in diabetes mellitus. *J. Clin. Endocrinol. Metabol.* **44**: 859-864.
4. PETERSON, C. M., KOENING, R. J., JONES, R. L., SAUDEK, C. D. & CERAMI, A. 1977. Correlation of serum triglyceride levels and hemoglobin A_{1c} concentrations in diabetes mellitus. *Diabetes*. **26**: 507.
5. ANGELICO, F. 1979. Determinazione dell'emoglobina A_{1c}: prospettive di impiego nella diagnostica e terapia del diabete. *Clin. Terap.* **89**: 429-434.
6. KOENING, R. J., PETERSON, C. M., KILO, C., CERAMI, A. & WILLIAMSON, J. K. 1976. Hemoglobin A_{1c} as an indicator of the degree of glucose intolerance in diabetes. *Diabetes*. **25**: 230-232.
7. ALLEN, D. W., SCHROEDER, V. A. & BALOG, J. 1958. Observation of the chromatographic heterogeneity of normal adult and fetal hemoglobin. A study of the effect crystallization and chromatography on the heterogeneity and isoleucine content. *J. Am. Chem. Soc.* **80**: 1628-1634.
8. COLE, R. A., SOELDNER, J. S., DUNN, P. S. & BUNN, H. F. 1978. A rapid method for the determination of glycosylated hemoglobin using high pressure liquid chromatography. *Metabolism*. **27**: 289-301.
9. WELCH, S. C., BOUCHER, B. J. 1978. A rapid micro-scale method for measurement of hemoglobin A_{1(a+b+c)}. *Diabetologia*. **14**: 209.
10. FLUCKIGHER, R. & WINTERHALTER, K. H. 1976. In vitro synthesis of hemoglobin A₁. *FEBS Lett.* **71**: 356-360.
11. KRISHNAMOORTHY, R., WAJCMAN, H. & LABIE, D. 1976. Isoelectrofocusing: a method of multiple applications for hemoglobin studies. *Clin. Chim. Acta*. **9**: 203.
12. TRIVELLI, L. A., RANNEY, H. M. & LAY, H. T. 1971. Hemoglobin components in patients with diabetes mellitus. *N. Engl. J. Med.* **824**: 353-357.
13. Presentazione del Progetto di Prevenzione della Cardiopatia Coronarica. 1976. *Ann. Ist. Super. Sanità*. **12**: 303-315.
14. Bio Rad Laboratories. Bio-Rad hemoglobin A₁ by Column Test, Instruction manual. *Bulletin* 4224, January 1979.
15. MACCHIA, T. & MORISI, G. 1979. Alcune considerazioni sulla caratterizzazione di un metodo di analisi e sul confronto tra metodiche per la messa a punto di una procedura per l'elaborazione elettronica dei dati. *Ann. Ist. Super. Sanità*. **15**: 219-238.
16. HOFFMANN, R. G. & WAID, M. 1965. The average of normal methods of quality control. *Am. J. Clin. Pathol.* **43**: 134-141.

17. A. MADOR, E., HSI, B. P. & MASSON, M. F. 1968. An evaluation of the average of normals and related methods of quality control. *Am. J. Clin. Pathol.* **50**: 369-378.
18. MORISI, G., MACCHIA, T., ANGELICO, F., PACIONI, F. & ZUCCA, A. 1979. Determinazione automatica di trigliceridi, colesterolo, glucosio, acido urico: prospettive d'impiego in screening di medicina preventiva. *Ann. Ist. Super. Sanità.* **15**: 239-262.
19. DIX, D., COHEN, P., KINGSLEY, S., SENKBEIL, J. & SEXTON, K. 1978. Evaluation of a glycohemoglobin kit. To the editor, *Clin. Chem.* **24**: (n. 11), 2073.
20. RYALL, R. G. & GRAHAM, J. J. 1978. Routine measurement of glycosylated hemoglobin. *Lancet*, 30 sept., 739-740.