

**Spettrofotometro a doppia lunghezza d'onda basato sull'uso di un amplificatore selettivo sensibile alla fase**

GIOVANNI SERLUPI CRESCENZI e CARLO PAOLINI

*Laboratori di Chimica Biologica,  
Centro Internazionale di Chimica Microbiologica*

**Riassunto.** — Si descrive uno spettrofotometro a due lunghezze d'onda (*double-beam*) basato sull'uso di un amplificatore selettivo sensibile alla fase. Tale apparecchio permette di misurare variazioni di estinzione fino a  $10^{-3}$ , anche in presenza di *blank* 500 volte superiori.

Sono mostrate alcune applicazioni dell'apparecchio descritto alla determinazione del nicotinammide-adenin-dinucleotide, del citocromo C, dell'alcol deidrogenasi e della succinico-deidrogenasi. Con questa tecnica i metodi spettrofotometrici e colorimetrici raggiungono sensibilità dello stesso ordine di grandezza dei metodi fluorimetrici, permettendo di misurare quantità di sostanze dell'ordine di  $10^{-9}$  moli. Sono discussi i vantaggi della tecnica a due lunghezze d'onda che, permettendo di eliminare l'interferenza di *blank* molto alti, può trovare applicazione in molti campi analitici.

**Summary.** (*Double-beam spectrophotometer based on the use of a phase-sensitive, lock-in amplifier*). — A double-beam spectrophotometer based on the use of a phase-sensitive, lock-in amplifier is described. The general scheme and principle of operation are shown in Figs. 1 to 3. The back-ground noise of the instrument corresponds to an extinction of  $5 \cdot 10^{-4}$  (Fig. 4) so that extinction changes as low as  $10^{-3}$  can be measured in the presence of a blank 500-times higher.

The use of the instrument for the determination of cytochrome C (Table 1, Fig. 5), nicotinamide-adenine-dinucleotide (Fig. 6), alcohol dehydrogenase (Fig. 7) and succinic dehydrogenase (Fig. 8), in the presence of different blanks, shows that the high sensitivity allows determinations otherwise impossible with conventional techniques.

By this technique spectrophotometric and colorimetric methods can reach the sensitivity of fluorimetric methods (CHANCE, 1951 *a*; *b*; 1954; 1959) allowing the determination of down to  $10^{-9}$  moles. The advantages of the te-

chnique are discussed, showing that the elimination of the interference of very high blanks can eliminate complex purification procedures in analytical methods, specially in the medical and pharmaceutical field.

La spettrofotometria a due lunghezze d'onda (*double-beam*) fu introdotta da Chance e collaboratori (CHANCE, 1951 *b*; 1954; 1959; CHANCE & WILLIAMS, 1955), per misurare le variazioni di assorbimento prodotte dall'ossidazione e riduzione dei pigmenti respiratori in sospensioni di mitocondri o in tessuti. Questa tecnica permette infatti di misurare piccolissime variazioni di assorbimento anche in soluzioni o sospensioni molto torbide. In questo tipo di soluzioni, con un normale spettrofotometro a raggio singolo, non è possibile distinguere le variazioni di estinzione, prodotte dal cromoforo che si vuole misurare, da quelle non specifiche, prodotte da variazioni della torbidità del mezzo.

Anche con gli apparecchi a doppio raggio in cui una celletta contiene il campione da misurare e l'altra il *blank*, la compensazione è assai difficile quando la torbidità del mezzo è molto alta. In questo caso infatti, differenze anche piccolissime nelle due cellette possono determinare variazioni aspecifiche di assorbimento, dovute a piccole variazioni percentuali della torbidità, maggiori delle variazioni specifiche che si vogliono misurare.

Nella tecnica a doppia lunghezza d'onda, due raggi di luce provenienti da due monocromatori sono inviati, alternativamente, su un'unica celletta contenente il campione e quindi su una fotocellula. I due monocromatori sono regolati uno sulla lunghezza d'onda  $\lambda_1$ , corrispondente al massimo di assorbimento del cromoforo da misurare, l'altro ad una lunghezza d'onda  $\lambda_2$  corrispondente ad un punto isosbestic, cioè dove l'assorbimento del cromoforo non cambia durante la reazione. Si misura la differenza  $E_{\lambda_1} - E_{\lambda_2}$  tra l'estinzione del campione alla lunghezza d'onda  $\lambda_1$  e quella alla lunghezza d'onda  $\lambda_2$ . Supponendo di avere una celletta contenente una sospensione con estinzione  $E_{\lambda_1}$  ed  $E_{\lambda_2}$  alle due lunghezze d'onda, e che una reazione produca una variazione  $\Delta E$ , aspecifica, uguale ad entrambe le lunghezze d'onda, ed una  $\Delta E_{\lambda_1}$  dovuta ad una variazione del cromoforo, dopo la reazione le estinzioni saranno :

$$E'_{\lambda_1} = E_{\lambda_1} + \Delta E + \Delta E_{\lambda_1}; E'_{\lambda_2} = E_{\lambda_2} + \Delta E.$$

In uno spettrofotometro a raggio singolo la differenza misurata sarebbe :

$$E'_{\lambda_1} - E_{\lambda_2} = \Delta E + \Delta E_{\lambda_1}.$$

In uno spettrofotometro a doppio raggio  $\Delta E$  potrebbe essere eliminato mettendo una celletta di riferimento in cui siano contenuti tutti i reagenti tranne il cromoforo da misurare, ma questa procedura è soggetta all'errore descritto sopra.

In uno spettrofotometro a doppia lunghezza d'onda prima della reazione si avrà:  $\Delta E' = E_{\lambda_1} - E_{\lambda_2}$

e dopo la reazione:

$$\Delta E'' = (E_{\lambda_1} + \Delta E + \Delta E_{\lambda_1}) - (E_{\lambda_2} + \Delta E) = E_{\lambda_1} + \Delta E_{\lambda_1} - E_{\lambda_2}$$

La differenza della misura fra prima e dopo la reazione sarà quindi:

$$\Delta E'' - \Delta E' = (E_{\lambda_1} + \Delta E_{\lambda_1} - E_{\lambda_2}) - (E_{\lambda_1} - E_{lambda_2}) = \Delta E_{\lambda_1}$$

Come si vede, mentre con la tecnica convenzionale si poteva difficilmente discriminare tra la variazione di estinzione specifica e quella aspecifica, con la tecnica a doppio raggio tale distinzione è automatica. I vantaggi di questa tecnica sono quindi grandissimi e permettono inoltre di aumentare notevolmente la sensibilità e la specificità del metodo spettrofotometrico (CHANCE, 1959).

Uno spettrofotometro a doppio raggio a doppia lunghezza d'onda è in commercio, prodotto sul disegno originale di B. Chance (American Instrument Co., Silver Spring, Md., U.S.A.)

Nel presente lavoro viene descritto un apparecchio messo a punto allo Istituto Superiore di Sanità, basato su un amplificatore selettivo sensibile alla fase, che può misurare variazioni di estinzione dell'ordine di  $10^{-4}$ . Se ne descrivono le prestazioni ed alcune applicazioni al campo della biochimica analitica.

#### DESCRIZIONE DELL'APPARECCHIO

##### Parte ottica.

La Fig. 1 mostra lo schema ottico dell'apparecchio. La lampada al tungsteno da 25 W è alimentata da uno stabilizzatore transistorizzato che fornisce 6 V stabilizzati all'1‰ con una corrente di 6 A (M. FRANK, comunicazione

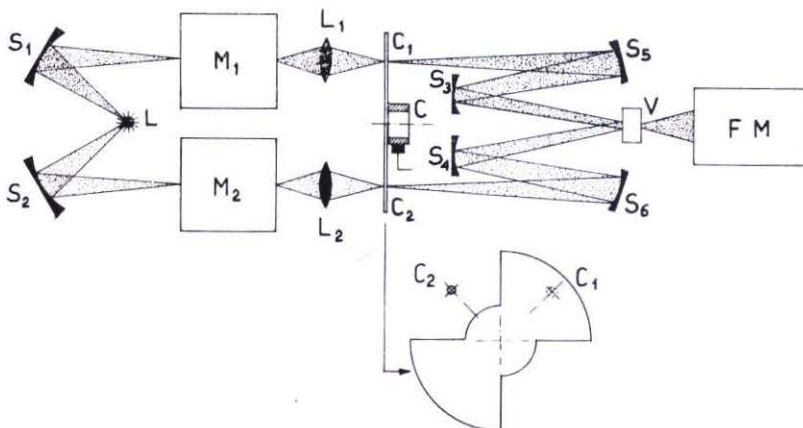


Fig. 1. — Schema ottico dell'apparecchio.



personale). L'immagine del filamento della lampada è messa a fuoco mediante gli specchi convergenti  $S_1$  e  $S_2$  sulla fessura di ingresso dei due monocromatori a reticolo  $M_1$  e  $M_2$  (D292, Hilger e Watts, Londra, Inghilterra). La luce uscente dai due monocromatori è messa a fuoco nei punti  $C_1$  e  $C_2$  dalle lenti  $L_1$  e  $L_2$ . Nel piano  $C_1$ - $C_2$  è posto una diaframma rotante il cui asse di rotazione è spostato verso il basso rispetto ai punti  $C_1$ - $C_2$ , così da trovarsi al vertice di un settore di  $90^\circ$  sui cui lati giacciono  $C_1$  e  $C_2$ . In questo modo il diaframma rotante interrompe alternativamente l'uno o l'altro raggio. Dopo il diaframma il sistema di specchi  $S_3, S_4, S_5, S_6$  fa convergere i due raggi sulla vaschetta V. La luce che ha attraversato la vaschetta cade su un fotomoltiplicatore del tipo « *Head on* » (6542 A RCA).

### Parte elettronica.

La corrente che esce dal fotomoltiplicatore è proporzionale alternativamente all'intensità della luce proveniente dai monocromatori  $M_1$  e  $M_2$ , secondo la posizione del diaframma. Quando le due intensità sono uguali la corrente è continua. Quando le due intensità sono differenti, si ha sovrapposta al segnale continuo una componente alternata, sincrona con la velocità del diaframma, la cui ampiezza è proporzionale alla differenza di intensità dei due raggi (Fig. 2) La fase di tale componente alternata si sposta di  $180^\circ$  quando si passa dallo stato in cui  $I_{\lambda_1} > I_{\lambda_2}$  a quello in cui  $I_{\lambda_2} > I_{\lambda_1}$  (dove  $I_\lambda$  è uguale all'intensità di luce alla lunghezza d'onda  $\lambda$ ). La placca del fotomoltiplicatore è collegata con l'ingresso di un amplificatore selettivo, accordato, sensibile alla fase (*lock-in*

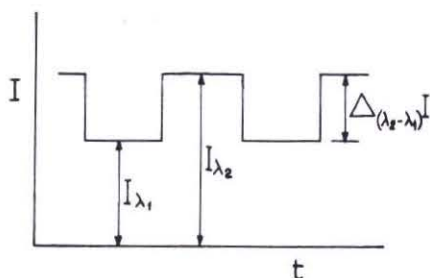


Fig. 2. — Componente alternata della corrente ( $I$ ) all'uscita del fotomoltiplicatore.  $I_{\lambda_1}$  ed  $I_{\lambda_2}$ , intensità di luce alle lunghezze d'onda  $\lambda_1$  e  $\lambda_2$ .

amplifier, modello JB-4, Princeton Applied Research, Princeton, New Jersey, U.S.A.) (MOOR, 1962). Tale amplificatore viene guidato con una corrente alternata di riferimento a frequenza fissa. Applicando all'ingresso dell'amplificatore un segnale, viene amplificata solo quella parte di esso la cui frequenza è uguale a quella della corrente di riferimento. In tale modo viene eliminata gran parte dei disturbi e del rumore di fondo che sono dispersi su una banda

di frequenze molto ampia. Il segnale di riferimento deve perciò avere la stessa frequenza con cui l'informazione è contenuta nel segnale, nel nostro caso quella del diaframma rotante. Esso è stato ottenuto mediante un interruttore rotante montato sull'asse del motore del diaframma C (Figg. 1,3), che interrompe, in sincronismo con le luci dei due monocromatori, la corrente proveniente da una pila, generando una corrente alternata della desiderata frequenza e fase. L'amplificatore fornisce all'uscita una corrente continua positiva o negativa a seconda della fase del segnale di ingresso. Questa corrente guida un registratore Speedomax H (Leeds & Northrup Italiana, Milano, Italia) ai cui capi è posta, in parallelo al segnale, una resistenza di  $10 \Omega$  per il necessario aggiustamento di impedenza. Lo schema generale di tale disposizione è mostrato nella Fig. 3. In questo modo, regolando all'inizio la apertura dei due monocromatori in maniera da non avere componente alternata nel segnale ( $I_{\lambda_1} = I_{\lambda_2}$ ), qualsiasi variazione di estinzione del campione ad una delle due lunghezze d'onda, che non sia compensata da una uguale variazione all'altra lunghezza d'onda, provoca la deflessione dell'indice del registratore. Poichè l'amplificatore è sensibile alle variazioni di fase, un aumento di estinzione alla lunghezza d'onda  $\lambda_1$ , provocherà uno spostamento dell'indice del registratore in direzione opposta a quella provocata da un aumento di estinzione alla lunghezza d'onda  $\lambda_2$ .

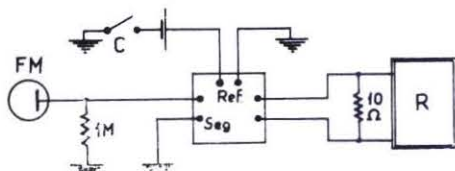


Fig. 3. — Schema generale del sistema di amplificazione. Ref. = canale di riferimento. Seg. = canale del segnale.

### PRESTAZIONI

L'amplificatore sensibile alla fase da noi usato ha un guadagno di circa 10.000. La deflessione a fondo scala del registratore corrisponde ad una intensità della componente alternata della corrente del fotomoltiplicatore di  $1 \cdot 10^{-8}$  A. Questa corrente è prodotta ad esempio da una variazione di estinzione di  $1 \cdot 10^{-2}$  a  $458 \text{ m}\mu$  con una ampiezza di banda di  $2 \text{ m}\mu$  ed un potenziale applicato ai dinodi del fotomoltiplicatore di 1000 V. In queste condizioni, variazioni di estinzione dell'ordine di  $10^{-3}$  sono facilmente misurabili e il limite della sensibilità dell'apparecchio è dato solo dall'ampiezza del rumore.

L'uso della tecnica dell'amplificatore selettivo accordato, con rivelatore sensibile alla fase, permette di migliorare notevolmente il rapporto segnale/ru-

more, in quanto, come già detto, il rumore è disperso su una banda di frequenza molto ampia e pertanto non viene amplificato. Per aumentare la sensibilità dell'apparecchio si può agire aumentando la luce proveniente dai due monocromatori, evidentemente a discapito della monocromaticità, o aumentando il potenziale applicato ai dinodi del fotomoltiplicatore, con conseguente aumento del rumore di fondo. In ambedue i casi si ha che variazioni sempre più piccole di estinzione corrispondono alla stessa intensità della componente alternata, quindi alla stessa deviazione del registratore, mentre aumenta la intensità del rumore di fondo. Nella Fig. 4 è mostrata la registrazione del

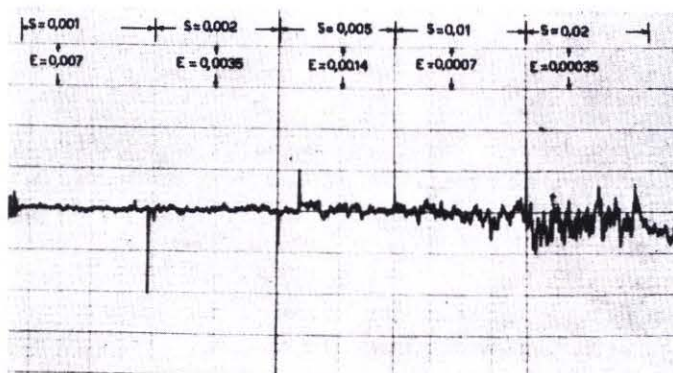


Fig. 4. — Registrazione del rumore dello strumento. La registrazione è stata eseguita con i due monocromatori regolati a  $550 \text{ m}\mu$ , con una ampiezza di banda di  $2 \text{ m}\mu$  ed a varie sensibilità ( $S$ ).

rumore di fondo che si ha a  $550 \text{ m}\mu$  con una ampiezza di banda di  $2 \text{ m}\mu$  a diverse sensibilità. Da tale figura si deduce che in queste condizioni il rumore di fondo corrisponde ad una variazione di estinzione di circa  $4 \cdot 10^{-4}$ . Si possono perciò misurare con una precisione del 10 % variazioni di estinzione di  $10^{-3}$  e con precisione dell'1 % variazioni di estinzione di  $10^{-2}$ . Calcolando ad esempio un coefficiente di estinzione molare  $\epsilon_M$  di  $10.000 \text{ cm}^{-1}/\text{mole}$ , e di eseguire la misura con 1 ml di soluzione, tali variazioni corrispondono rispettivamente a  $10^{-10}$  e  $10^{-9}$  moli di sostanza.

Variazioni di estinzione dell'ordine di  $5 \cdot 10^{-4}$  sono ancora apprezzabili quando si voglia una determinazione solo qualitativa.

## APPLICAZIONI

### *Materiali e metodi.*

Il citocromo C e l'alcool deidrogenasi usati in questo lavoro erano della C. F. Boehringer, Mannheim, Germania. Il nicotinammide-adenin-dinucleotide (NAD) era della Pabst Brewing Co., Milwaukee, Wis. U.S.A. L'acido succinico



della B. D. H. Ltd, Londra, Inghilterra. Il ferricianuro era della casa Ciba, S.p.A., Zurigo, Svizzera. L'inchiostro di china era un prodotto commerciale.

Le misure sul citocromo C venivano eseguite mettendo la soluzione da esaminare nella celletta e azzerando lo spettrofotometro. Si aggiungevano quindi alcuni cristalli di idrosolfito di sodio e si misurava la deflessione dello indice del registratore.

La riduzione del NAD con alcool deidrogenasi è stata eseguita con tecnica standard. I dettagli sono in calce alla figura.

La determinazione della succinico-deidrogenasi è stata eseguita con ferricianuro secondo SLATER & BONNER (1952). I dettagli sono mostrati nella figura.

### Risultati

Nella Tabella 1 sono riportate le variazioni della differenza ( $E_{547,5} - E_{530}$ ) lette sul registratore, provocate dalla riduzione con idrosolfito di soluzioni di citocromo C a differenti concentrazioni. Le misure sono state eseguite in presenza di quantità variabili di inchiostro di china. In queste condizioni la variazione dovuta al cromoforo era molto piccola, mentre il *blank* era molto alto. I valori letti per soluzioni di citocromo C fino a  $1,5 \cdot 10^{-7}$  M, non erano influenzati da una concentrazione di inchiostro di china fino ad una estinzione di 1,5 e si può ottenere una lettura ragionevole anche per la soluzione  $6,3 \cdot 10^{-8}$  M

TABELLA 1.

**Influenza della concentrazione di inchiostro di china sulle variazioni di ( $E_{547,5} - E_{530}$ ) provocate dalla riduzione con idrosolfito di soluzioni di citocromo C a varie concentrazioni**

Concentrazione del citocromo C	Variazione di ( $E_{547,5} - E_{530}$ ) espresse in divisioni dell'indice del registratore			
	Senza inchiostro di china	Con inchiostro di china a varie estinzioni		
		E = 0,5	E = 1	E = 1,5
$3,15 \cdot 10^{-6}$ M . . . . .	124	—	—	—
$1,57 \cdot 10^{-6}$ M . . . . .	62	62	62	62
$6,31 \cdot 10^{-7}$ M . . . . .	24	23	26	25
$3,15 \cdot 10^{-7}$ M . . . . .	12	13	12	12
$1,57 \cdot 10^{-7}$ M . . . . .	6	8	6	7
$6,31 \cdot 10^{-8}$ M . . . . .	3	3	3	2

che produce una variazione di estinzione di  $10^{-3}$ , pari a una variazione della trasmittanza di 0,3 %, mentre il *blank* assorbe il 97 % della luce. La Tabella I mostra anche la linearità delle letture in un vasto campo di concentrazioni.

Nella Fig. 5 è mostrato lo spettro costruito per punti di una soluzione di citocromo C  $3,2 \cdot 10^{-6}$  M eseguito con larghezza di banda di 0,5 m $\mu$ . La massima variazione di estinzione prodotta dalla soluzione a 550 m $\mu$  era di  $5 \cdot 10^{-2}$ . Da questa figura si può vedere come, malgrado l'alta sensibilità, la risoluzione dell'apparecchio sia buona.

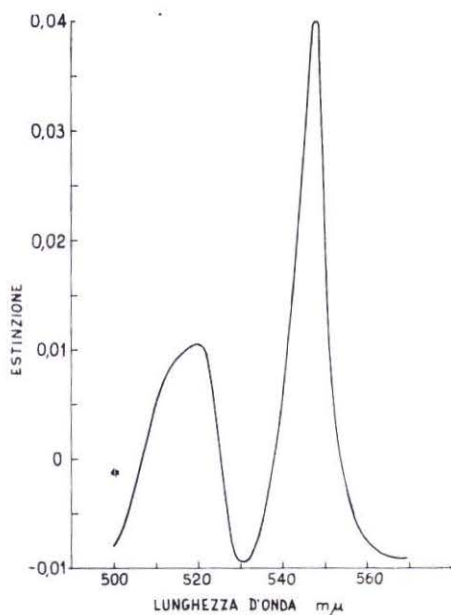


Fig. 5. — Determinazione dello spettro del citocromo C, costruito per punti, di una soluzione  $3,2 \cdot 10^{-6}$  M, con larghezza di banda di 0,5 m $\mu$ .

Nella Fig. 6 è mostrata la variazione di E misurata tra 340 e 400 m $\mu$  provocata da aggiunte successive di  $7,5 \cdot 10^{-9}$  moli di NAD a una soluzione contenente 20  $\mu$ l di alcool etilico e 20  $\mu$ g di alcool deidrogenasi in 2 ml di tampone fosfati 0,1 M, pH 7,4. Ogni aggiunta corrispondeva ad una variazione di estinzione di  $2,2 \cdot 10^{-2}$ . In B la soluzione conteneva inchiostro di china fino ad una estinzione di 0,5.

Nella Fig. 7 lo stesso sistema è stato usato per la determinazione dell'enzima (alcool deidrogenasi) in un estratto di lievito a tre diluizioni diverse. Come si può vedere la pendenza della curva è proporzionale all'inverso della



diluizione. I valori ottenuti corrispondevano ai dati ottenuti con uno spettrofotometro Cary, con un estratto da 10 a 40 volte più concentrato.

Nella Fig. 8 è mostrato un esempio di determinazione della succinico-deidrogenasi in due estratti di lievito. Come si vede, l'aggiunta di succinato al sistema (curva A) provoca una variazione molto netta della pendenza, da cui

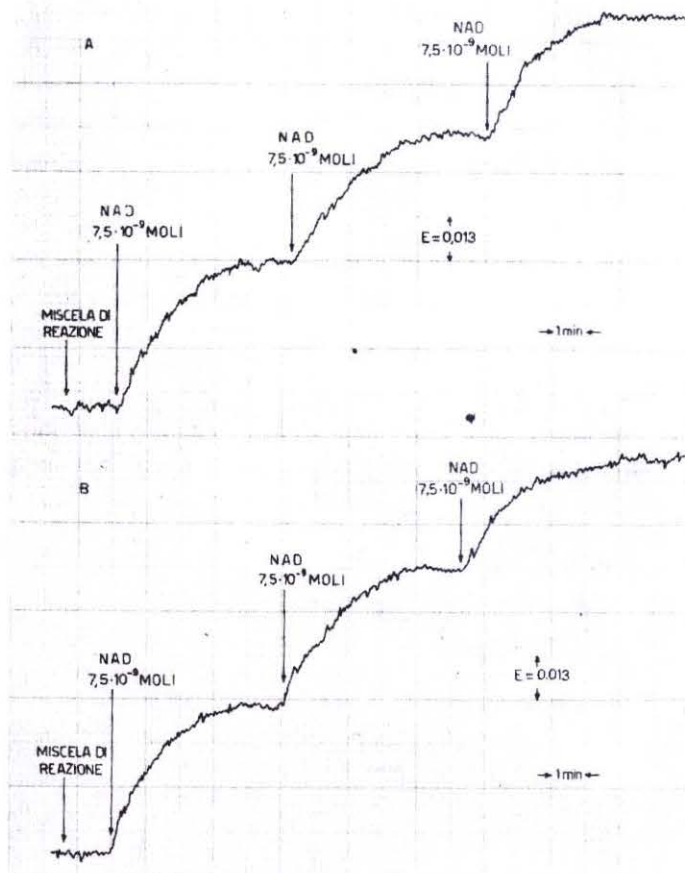


Fig. 6. — Determinazione di nicotinammide-adenin-dinucleotide (NAD) con alcool e alcool deidrogenasi. La miscela di reazione conteneva 20  $\mu$ l di alcool etilico e 20  $\mu$ g di alcool deidrogenasi in 2 ml di tampone fosfati 0,1 M, pH 7,4. Nei punti indicati si aggiungevano 5  $\mu$ l di una soluzione  $1,5 \cdot 10^{-3}$  M di NAD. In B la soluzione conteneva inchiostro di china per dare una estinzione di 0,5. I monocromatori erano regolati a 340 e 400  $m\mu$ .

si può misurare la presenza dell'enzima in pochi minuti. Per controllo la curva B è stata ottenuta con un estratto di lievito cresciuto in anaerobiosi e che perciò non conteneva la succinico-deidrogenasi (SLONIMSKY, 1953).

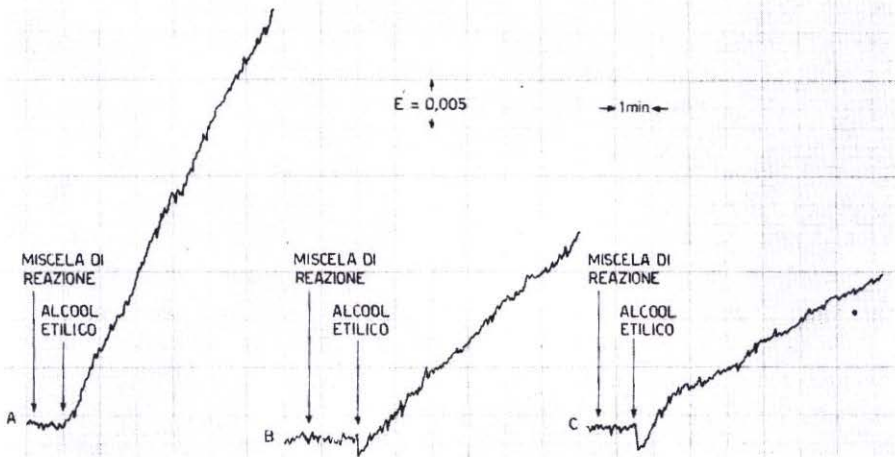


Fig. 7. — Determinazione dell'alcool deidrogenasi in estratto di lievito. La celletta conteneva 50  $\mu$ l di estratto e 1,5  $\mu$ M di nicotinamide-adenin-dinucleotide (NAD) in 1,75 ml di tampone fosfati 0,1 M, pH 7,4. Nei punti indicati si aggiungevano 0,1 ml di alcool etilico. La curva A è stata ottenuta con un estratto diluito 2000 volte, la B con un estratto diluito 4000 volte e la C con un estratto diluito 8000 volte.

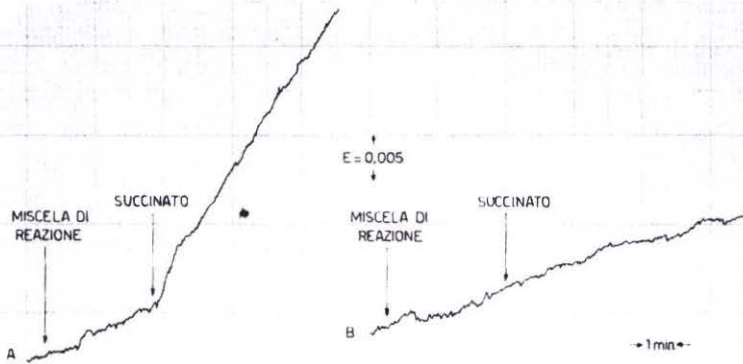


Fig. 8. — Determinazione della succinico-deidrogenasi in estratti di lievito. La miscela di reazione conteneva 0,2 ml di estratto, 50  $\mu$ l di una soluzione 0,05 M di ferricianuro, e 1,65 ml di tampone fosfati 0,1 M, pH 7,4. Nei punti indicati si aggiungevano 0,1 ml di succinato 0,5 M. I monocromatori erano regolati a 420 e 400 m $\mu$ . A) lievito cresciuto in aerobiosi, contenente succinico-deidrogenasi. B) lievito cresciuto in anaerobiosi, non contenente succinico-deidrogenasi.

#### DISCUSSIONE

L'uso della spettrofotometria a due lunghezze d'onda, nello studio della ossido-riduzione dei citocromi, è stato discusso in una serie di lavori da Chance e collaboratori (vedi CHANCE, 1954). Oltre al primo apparecchio descritto da CHANCE (1951 a), la AMINCO di Silver Spring produce un apparecchio sullo stesso disegno. Recentemente RIKMENSPOEL (1965) ha descritto un appa-

recchio che può funzionare sia come spettrofotometro a doppio raggio, che a doppia lunghezza d'onda.

L'apparecchio descritto nel presente lavoro è stato costruito con pezzi acquistati dal commercio e richiede il minimo di montaggio.

La sensibilità massima ottenibile con la tecnica della doppia lunghezza d'onda è limitata praticamente solo dall'ampiezza del rumore di fondo, che in questo apparecchio è molto ridotto dall'uso dell'amplificatore selettivo. Come è stato mostrato infatti, il rumore è ridotto a valori corrispondenti ad una estinzione inferiore a  $5 \cdot 10^{-4}$ , che rappresenta quindi anche il limite di sensibilità dello strumento.

Poichè la misura si esegue con 2 ml di soluzione, una sostanza con un coefficiente di estinzione molare di  $10^4 \text{ cm}^{-1} \text{ mole}^{-1}$ , che è abbastanza comune, si può determinare con meno di  $10^{-9}$  moli.

La sensibilità di questa tecnica si può perciò paragonare favorevolmente con quella dei metodi fluorimetrici.

JACOBSON & ASTRACHAN (1957) ad esempio, usando il metodo fluorimetrico (CIOTTI & KAPLAN, 1957) misuravano fino a  $10^{-9}$  moli di NAD in un volume totale di 8 ml. Negli esempi riportati quantità dell'ordine di  $7,5 \cdot 10^{-9}$  moli di NAD sono state misurate con estrema facilità e precisione, anche in presenza di un *blank* 25 volte superiore. Analogamente per il citocromo C si è potuta misurare una soluzione  $1,5 \cdot 10^{-7} \text{ M}$  in presenza di un *blank* con estinzione di 1,5. Tale soluzione contiene in 2 ml  $3 \cdot 10^{-9}$  moli di citocromo C che per riduzione danno una variazione dell'estinzione di  $3 \cdot 10^{-3}$ . Il *blank* era pertanto in questo caso 500 volte superiore alla quantità da misurare.

Dai dati riportati per il citocromo C si può vedere come la risposta dell'apparecchio, benchè registrata in trasmittenza, sia lineare in un vasto campo di concentrazioni.

Infatti, poichè alle concentrazioni e con la sensibilità usate le variazioni di trasmittenza sono inferiori all'1 %, i termini superiori dello sviluppo in serie della funzione  $\log \frac{I_0}{I}$  che è lineare con la concentrazione possono essere trascurati. Si ha pertanto che  $\log \frac{I_0}{I} = 0,434 \frac{\Delta I}{I_0}$  (CHANCE, 1951 a), per cui il valore della trasmittenza è proporzionale alla concentrazione con una approssimazione dell'1 %.

Anche la misura di attività enzimatiche può essere notevolmente migliorata dall'uso della tecnica a doppio raggio, sia per la possibilità di misurare in liquidi torbidi, sia per la più alta sensibilità raggiungibile. Ciò è mostrato ampiamente dall'esempio della succinico-deidrogenasi. Questo enzima nel lievito reagisce assai lentamente con il ferricianuro, dando una variazione di estinzione di 0,3 per ora, che è dello stesso ordine di grandezza o superiore a quella prodotta dall'azione di altri componenti dell'estratto di lievito sul



ferricianuro. Ciò rendeva impossibile la misura con uno spettrofotometro normale a causa della sensibilità troppo bassa e della imperfetta correzione del *blank*. Con lo strumento descritto invece la misura era eseguita in pochi minuti e permetteva di evidenziare facilmente la differenza tra un lievito aerobico ed uno anaerobico (SLONIMSKY, 1953).

Gli esempi riportati nella letteratura e nel presente lavoro sono presi prevalentemente da applicazioni a sistemi ossido-riduttivi biologici, ma la tecnica della spettrofotometria a doppio raggio può avere vantaggi notevoli anche in altri campi analitici. Essa può essere usata ogni volta che in una miscela sia presente un componente la cui estinzione varia per aggiunta di uno o più reattivi e permette di estendere i metodi spettrofotometrici a quei casi in cui nella miscela da analizzare siano presenti sostanze che assorbono fortemente la luce, interferendo nella determinazione del componente da misurare, soprattutto quando questo sia presente in piccola quantità e la variazione di estinzione prodotta dalla reazione analitica sia piccola rispetto al *blank*. Con lo aumentare delle applicazioni di metodi biochimici ed enzimatici di analisi, questo caso diventa sempre più frequente, specialmente nel campo biologico, medico e farmaceutico. L'uso della tecnica a due lunghezze d'onda, eliminando l'interferenza del *blank*, può infatti permettere di evitare in molti casi lunghe e complicate operazioni di purificazione.

14 luglio 1965.

#### BIBLIOGRAFIA

- CHANCE, B., 1951 a. Rapid and sensitive spectrophotometry. II. A stopped-flow attachment for a stabilized quartz spectrophotometer. *Rev. Sci. Instr.*, **22**, 627-634.
- CHANCE, B., 1951 b. Rapid and sensitive spectrophotometry. III. A double-beam apparatus. *Rev. Sci. Instr.*, **22**, 634-638.
- CHANCE, B., 1954. Spectrophotometry of intracellular respiratory pigments. *Science*, **120**, 767-775.
- CHANCE, B., 1959. Electron transfer in biological systems. *Proc. Inst. Radio Engrs.*, **47**, 1821-1830.
- CHANCE, B. & G.R. WILLIAMS, 1955. Respiratory enzymes in oxidative phosphorylation. *J. Biol. Chem.*, **217**, 383-465.
- CIOTTI, M.M. & N.O. KAPLAN, 1957. In: *Methods in Enzymology*, Academic Press., New York, Vol. 3, p. 896.
- JACOBSON, K. B. & L. ASTRACHAN, 1957. Specific methods for the microdetermination of pyridine nucleotides enzymes. *Arch. Biochem. Biophys.*, **71**, 69-80.
- MOOR, R. D., 1962. Lock-in amplifiers for signals buried in noise. *Electronics*, **35**, no. 23, 40-43.
- RIKMENSPÖEL, R., 1965. Sensitive absorption spectrophotometer for use as a split-beam or as a dual wavelength instrument. *Rev. Sci. Instr.*, **36**, 497-502.
- SLATER, E. C. & W. D. BONNER JR., 1952. The effect of fluoride on the succinic oxidase system. *Biochem. J.*, **52**, 185-196.
- SLONIMSKY, P., 1953. *La formation des enzymes respiratoires chez la levure*. Masson & Cie, Paris, p. 138.

## Microfluorimetro differenziale a due lunghezze d'onda per la registrazione degli stati ossido-riduttivi dei nucleotidi nicotinici intracellulari

GIOVANNI SERLUPI CRESCENZI e CARLO PAOLINI

Laboratori di Chimica Biologica,  
Centro Internazionale di Chimica Microbiologica

**Riassunto.** — Si descrive un microfluorimetro differenziale a due lunghezze d'onda che permette di studiare le variazioni di fluorescenza dei tessuti viventi.

Lo strumento paragona le variazioni della fluorescenza con quelle della riflessione della luce eccitatrice, nello stesso punto del tessuto.

I circuiti elettronici permettono di registrare sia i due segnali separatamente, sia la loro differenza.

Tale apparecchio può essere usato per lo studio delle variazioni degli stati di ossido-riduzione dei nucleotidi nicotinici in tessuti isolati e *in vivo*.

**Summary.** (*Double wave-length differential microfluorimeter to record the oxidation-reduction states of intracellular nicotinic-nucleotides*). — A double wave-length differential microfluorimeter is described, which records the variations of fluorescence of living tissues. The instrument compares the variations of fluorescence and of reflection or the exciting wave-length in the same point of the tissue.

The electronic circuits (Figs. 1 and 2) based on a selective, phase sensitive, lock-in amplifier permit the recording of both the two signals independently, and of their difference.

By this technique unspecific variations are eliminated and one can study the variations of the oxidation-reduction states of nicotinic-nucleotides *in vivo* or in isolated tissues.

For the last purpose a cell is described (Fig. 4).

Some applications to enzymatic reactions, to yeast and to rat diaphragm are shown (Figs. 5, 6, 7).

A comparison of the differential to the conventional fluorescence methods for the determination of NAD by enzymatic reduction is shown in Table 1.



La misura della fluorescenza dei tessuti è stata usata per lo studio degli stati ossido-riduttivi intracellulari dei piridin-nucleotidi (CHANCE & JOBSIS, 1959), in quanto la maggior parte di tale fluorescenza è dovuta ai piridin-nucleotidi ridotti presenti nei mitocondri e nel citoplasma (CHANCE & BATSCHIEFFSKY, 1958). Lo studio di questi stati è stato posto in primo piano dalla messa in evidenza del ruolo dei piridin-nucleotidi quali intermedi chiave tra il ciclo degli acidi tricarbossilici e la catena respiratoria dei mitocondri (CHANCE & WILLIAMS, 1956). Negli ultimi anni la messa a punto di strumenti di sensibilità e disegno adatti alla misura della fluorescenza nei tessuti ha permesso di affrontare in questo campo nuovi problemi.

Un microfluorimetro per la misura di un'area fino a 3  $\mu\text{m}$  di diametro, che sfruttava l'alimentazione in alternata della lampada in connessione con un amplificatore selettivo sensibile alla fase è stato messo a punto in questo laboratorio (FRANK, GUIDARELLI & SERLUPI-CRESCENZI, 1964); però nelle misure di fluorescenza su tessuti sia *in vivo* che *in vitro*, le misure assolute non sono sempre attendibili poichè si possono avere variazioni di emissione di fluorescenza provocate da sostanze che assorbono la luce eccitatrice o da movimenti del tessuto o dei capillari che influiscono sulla quantità di sangue presente nel campo in osservazione. Onde evitare tali interferenze è consigliabile utilizzare una tecnica differenziale, paragonando due segnali che siano ugualmente influenzati dagli artefatti, e di cui uno dia la misura della fluorescenza mentre l'altro serve solo da riferimento. Registrando la differenza tra i due segnali, si eliminano numerose interferenze. Poichè interessa misurare variazioni molto piccole rispetto alla fluorescenza totale, l'uso della differenza risulta più sensibile del rapporto, che sarebbe la funzione matematica fisicamente corretta. Purchè l'intensità della lampada sia sufficientemente costante, questa misura dà risultati attendibili.

Un microfluorimetro differenziale è stato descritto da CHANCE & LEGALLAIS (1959) ed usato per confrontare parti diverse della stessa cellula (CHANCE & THORELL, 1959). In questo apparecchio un diaframma vibrante posto nel piano della immagine di un microscopio per fluorescenza permetteva di paragonare la fluorescenza di parti molto vicine di una cellula o di un tessuto. Con uno strumento simile (CHANCE & LEGALLAIS, 1963) sono stati studiati gli stati ossido-riduttivi dei piridin-nucleotidi nel fegato, nel rene e nel cervello *in vivo* o *in vitro*, sia facendo misure assolute e correlandole con altri dati biologici (CHANCE & SCHOENER, 1962; CHANCE *et al.*, 1962), sia paragonando *in vitro* due fettine di tessuto sottoposte a trattamenti diversi (CHANCE & SCHOENER, 1963; VAN ROSSUM, 1964) o *in vivo* l'effetto di droghe e dell'anaerobiosi su tessuti diversi (CHANCE, LEGALLAIS & SCHOENER, 1962; CHANCE *et al.*, 1962; CHANCE & LEGALLAIS, 1963; CHANCE & SCHOENER, 1963), sia infine registrando gli spettri di tessuti sottoposti a diversi trattamenti (CHANCE, LEGALLAIS & SCHOENER, 1962).



Nel presente lavoro viene descritto un microfluorimetro a due lunghezze d'onda, che permette di paragonare le variazioni della fluorescenza con quelle della riflessione della luce eccitatrice, nello stesso punto di un tessuto. Le misure possono essere eseguite su di un'area di tessuto di pochi  $\mu\text{m}$  di diametro e l'apparecchio permette di registrare simultaneamente le variazioni della fluorescenza, quelle della riflessione e la loro differenza. In questo modo si possono eliminare molti artefatti e le misure possono essere interpretate e correlate più facilmente con i cambiamenti metabolici cui il tessuto viene sottoposto.

#### DESCRIZIONE DELL'APPARECCHIO

*Parte ottica.* — Lo schema generale della parte ottica è simile a quello descritto da FRANK, GUIDARELLI & SERLUPPI-CRESCENZI (1964) (Fig. 1). La luce di una lampada a mercurio ad alta pressione da 500 W (A) munita

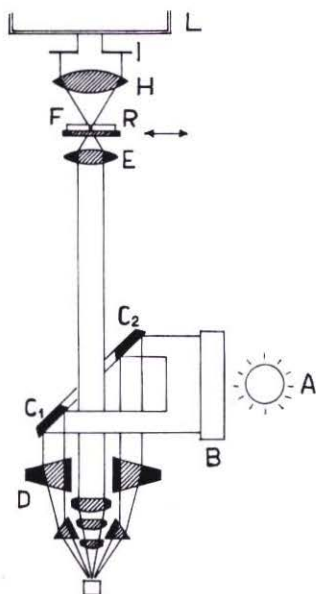


Fig. 1.

Schema generale della parte ottica: A) Lampada; B) Filtro di eccitazione; C<sub>1</sub> - C<sub>2</sub>) Specchio ad anello dell'Ultropak; D) Sistema condensatore ed obiettivo dell'Ultropak; E) Oculare; F e R) Filtro di fluorescenza e di riflessione, H) Lente dell'attacco microfotografico; I) Diaframma; L) Catodo del fotomoltiplicatore.

di un filtro (B) (Corning-5874) che lascia passare solo la riga a 3660 Å, è proiettata sul preparato da esaminare dallo specchio ad anello, (C<sub>1</sub> C<sub>2</sub>) di un illuminatore per luce riflessa « Ultropak » della casa E. Leitz (Westlar, Germania Occ.) applicato ad un microscopio. La luce emessa dal preparato contiene una componente a 3660 Å dovuta alla riflessione della luce eccitatrice ed una componente a 4500 Å dovuta alla fluorescenza dei piridin-nucleotidi ridotti presenti nel preparato. Tale luce viene raccolta dall'obiettivo (D) applicato all'illuminatore « Ultropak ». Il microscopio è corredato da un oculare (E) da 10 ingrandimento che, con l'aggiunta di un attacco per micro-

fotografia Mikas (H) (E. Leitz, Westlar, Germania occ.), proietta un'immagine del preparato su un piano a circa 12 cm dal fuoco dell'oculare. In corrispondenza della pupilla di egreso del microscopio è posto un supporto con due filtri affiancati, uno di vetro Corning-5874 che lascia passare solo la luce a  $3660 \text{ \AA}$  (R) e l'altro composto da due strati sovrapposti di vetro Corning-3389 e 4308 (Corning Glass Works) che arresta la luce a  $3660 \text{ \AA}$  ed ha un massimo di trasmittanza a  $4500 \text{ \AA}$  (F). Il supporto è saldato mediante un'asticcina metallica alla laminetta vibrante di un convertitore Brown a 50 periodi, che interpone alternativamente sul cammino ottico dei raggi l'uno o l'altro dei due filtri, 50 volte al secondo, in fase con la frequenza della rete. Poiché la lampada è alimentata dalla rete e si accende anche durante la semionda negativa, essa emette una luce pulsante a 100 herz che è in fase con il vibratore; lo scambio dei due filtri avviene mentre la lampada è spenta, mentre i massimi degli impulsi di luce corrispondono alternativamente all'uno o all'altro dei due filtri.

In questo modo sul piano (I) viene proiettato dall'attacco microfotografico, una immagine del preparato che è alternativamente formata da luce di lunghezza d'onda di  $3660 \text{ \AA}$  e  $4500 \text{ \AA}$ . Sul piano I un diaframma delimita l'area del preparato che si vuole esaminare e la luce corrispondente cade sul catodo di un fotomoltiplicatore 1 P 28 (RCA).

*Parte elettronica.* — Lo schema generale della parte elettronica è mostrato nella Fig. 2. L'uscita del fotomoltiplicatore è connessa, attraverso il contatto A, all'ingresso di un amplificatore (L), selettivo, sensibile alla fase

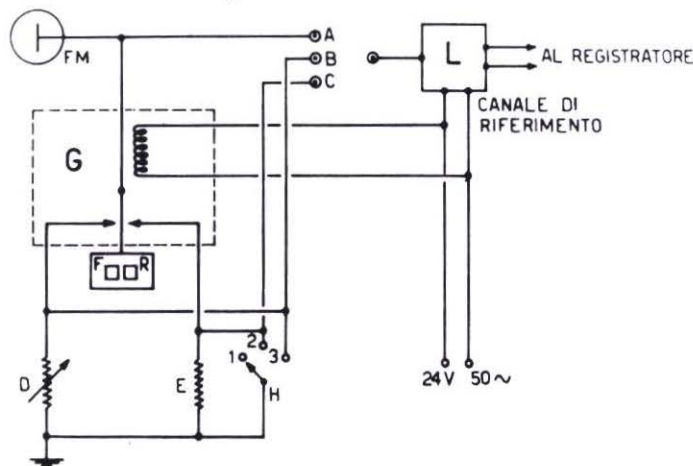


Fig. 2. — Schema generale della parte elettronica: FM) Fotomoltiplicatore; C) Convertitore Brown; F, R) Filtri di fluorescenza e riflessione; D) Attenuatore variabile; E) Attenuatore fisso; H) Interruttore; L) Amplificatore selettivo; A, B, C) Prese per l'amplificatore.

(*Lock-in-amplifier*, Modello JB4, della P.A.R. Corp., Princeton, N. J., U.S.A.), e contemporaneamente alla laminetta vibrante dello stesso convertitore Brown (G) cui sono fissati i filtri F e R. Il convertitore Brown (G), a cui è stato sostituito l'avvolgimento per aumentarne la potenza e renderlo capace di muovere il peso costituito dai due filtri, è alimentato a 24 V e 50 periodi attraverso un trasformatore. La stessa tensione è applicata anche al canale di riferimento dell'amplificatore L (che è regolato sulla frequenza di 50 periodi) così da assicurare la concordanza di fase tra il movimento del vibratore e l'amplificatore stesso (SERLUPÌ CRESCENZI & PAOLINI, 1966). Il convertitore Brown inserisce in parallelo alla resistenza di ingresso dell'amplificatore L una resistenza fissa da 50 K (E) in corrispondenza del semiperiodo in cui agisce il filtro F, o una resistenza variabile da 100 K (Helipot) (D) in corrispondenza del semiperiodo in cui agisce il filtro R. Queste resistenze attenuano il segnale in proporzione inversa al loro valore, per cui, variando la resistenza D, si può ottenere che all'inizio di una esperienza gli impulsi corrispondenti all'uno e all'altro filtro siano eguali. In parallelo alle due resistenze è disposto l'interruttore H, che nella posizione 2 mette a terra il segnale durante il semiperiodo corrispondente al filtro E e nella posizione 3 durante il semiperiodo corrispondente al filtro F, mentre nella posizione 1 è aperto. In tal modo nel punto A con l'interruttore H in posizione 1 si ha l'intero segnale, il cui tracciato oscillografico è mostrato nella Fig. 3 al centro.



Fig. 3.

Tracciato oscillografico dei segnali ottenibili all'ingresso dell'amplificatore selettivo. In alto è mostrato il segnale di fluorescenza, in basso quello di riflessione, al centro quello misto.

Questo è un segnale a 100 periodi, il quale viene bloccato dall'amplificatore L, che ne amplifica e rivela solo l'eventuale componente a 50 periodi, per



cui se gli impulsi corrispondenti ai filtri F ed R sono uguali, all'uscita dell'amplificatore non si ha nessun segnale, mentre se sono diversi si ha un segnale in DC, proporzionale alla loro differenza.

Se si pone l'interruttore H in posizione 2, all'ingresso dell'amplificatore si ha il segnale il cui tracciato oscillografico è mostrato nella Fig. 3 in basso e corrispondente al solo filtro R. Tale segnale essendo a 50 periodi viene completamente amplificato e dà perciò una misura della luce riflessa dal preparato. Lo stesso segnale è presente in C e può essere perciò misurato contemporaneamente alla differenza, lasciando l'interruttore H in posizione 1 ed attaccando in C un altro amplificatore. Analogamente con l'interruttore H in posizione 3 si può misurare in A il solo segnale di fluorescenza (Fig. 3 in alto) Questo è presente anche in B con l'interruttore H in posizione 1, e può pertanto essere misurato con un altro amplificatore contemporaneamente alla riflessione e alla differenza.

#### APPLICAZIONI

*Materiali e metodi.* — L'alcool deidrogenasi di lievito e il NAD erano prodotti commerciali della Boehringer e S. GMBH, Mannheim, Germania. La riduzione del NAD veniva eseguita in una vaschetta contenente 2 cm<sup>3</sup> di tampone Tris 0,2 M pH 8,2 contenente 300 µg di alcool deidrogenasi e la quantità necessaria di NAD. La reazione veniva iniziata aggiungendo nella vaschetta 20 mm<sup>3</sup> di etanolo. La fluorescenza veniva misurata verticalmente sulla superficie libera. Lo spessore della soluzione era di 20 mm.

Il lievito era fornito dalle Distillerie Italiane, Roma. Prima dell'uso veniva privato dei substrati interni, areando per 24 ore una sospensione di cellule al 10 % p.s. in una soluzione di KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,05 M. 0,3 cm<sup>3</sup> di questa sospensione erano pipettati in una vaschetta contenente 1,7 cm<sup>3</sup> di soluzione di HK<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,05 M. La reazione veniva iniziata aggiungendo 20 mm<sup>3</sup> di etanolo.

Il diaframma veniva prelevato da un ratto ucciso per decapitazione ed immerso immediatamente in soluzione di Krebs-Ringerfosfato a pH 7,4 raffreddato a 0° C. Esso veniva usato entro 1 ora dal prelievo. La misura veniva eseguita a 37° C nella celletta mostrata nella Fig. 4. Il diaframma era posto sulla piastrina di neoprene D e tenuto fermo da una rete di Nylon inserita nella guarnizione di Neoprene C. Quest'ultima formava un compartimento chiuso dalla lastrina B di perspex. Il liquido, proveniente dalle bottiglie I o L, secondo la posizione del rubinetto a 3 vie M, entrava nella celletta attraverso l'ago da siringa G. Il tutto era posto nel supporto in ottone A e fissato all'anello filettato E. La guarnizione F impediva al complesso di muoversi durante l'avvitatura dell'anello E. Il complesso era sistemato con

la faccia trasparente B verso l'alto, ed attraverso questa veniva misurata la fluorescenza. Le bottiglie I ed L erano riempite con soluzioni di Krebs-Ringer-fosfato a pH 7,4 le quali o venivano gassate con  $O_2$  od  $N_2$  per ottenere

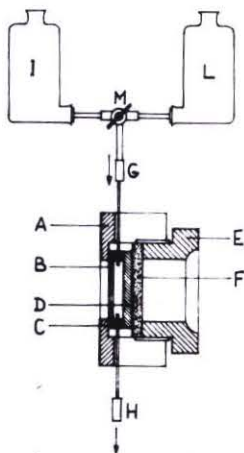


Fig. 4.

Celleta per la misura dei cambiamenti della fluorescenza di tessuti provocati dal trattamento con soluzioni diverse. A) Supporto in ottone; B) Finestra in perspex; C) Guarnizione in neoprene; D) Piastrina di neoprene; E) Anello filettato; F) Guarnizione reggispinga; G, H) Aghi da siringa; I, L) Bottiglie contenenti le soluzioni; M) Rubinetto a 3 vie.

l'aerobiosi e l'anaerobiosi, oppure contenevano disciolti i substrati da provare. Le soluzioni fluivano sul tessuto alla velocità di  $1 \text{ cm}^3/\text{min}$ .

## RISULTATI

Nella Fig. 5 è mostrata la riduzione enzimatica del nicotinammide-adenin-dinucleotide (NAD) ( $0,1 \mu\text{M}/\text{cm}^3$ ) con alcool deidrogenasi ed alcool eti-

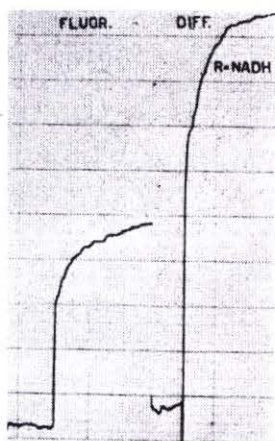


Fig. 5.

Riduzione enzimatica del nicotinammide-adenin-dinucleotide (NAD). La celleta conteneva  $0,2 \mu\text{M}$  di NAD e  $300 \mu\text{g}$  di alcool deidrogenasi di lievito in  $2 \text{ cm}^3$  di tampone Tris HCl  $0,2\text{M}$ , pH 8. Per iniziare la reazione venivano aggiunti  $20 \text{ mm}^3$  di etanolo. A sinistra è registrata la variazione della fluorescenza assoluta, a destra quella misurata col metodo differenziale.

lico, e viene paragonata la variazione della fluorescenza assoluta con quella misurata con la tecnica differenziale. Inoltre nella Tabella 1 sono riportati i

TABELLA 1.

Proporzionalità rispetto alla concentrazione di nicotnamide-adenin-dinucleotide (NAD) della fluorescenza misurata col metodo usuale e col metodo differenziale

N A D $\mu\text{M}/\text{cm}^3$	Variazione della fluorescenza in divisioni	
	solo Fluorescenza	metodo Differenziale
0,100	49	100
6,075	36	71
0,050	26	52
0,010	4	7

Le condizioni sperimentali sono analoghe a quelle della Fig. 5.

valori ottenuti con varie concentrazioni di NAD. La Fig. 6 mostra la variazione di fluorescenza provocata dall'aggiunta di un substrato NAD dipendente, l'alcool etilico, ad una sospensione di lievito areato per 24 ore, misurata con le due tecniche.

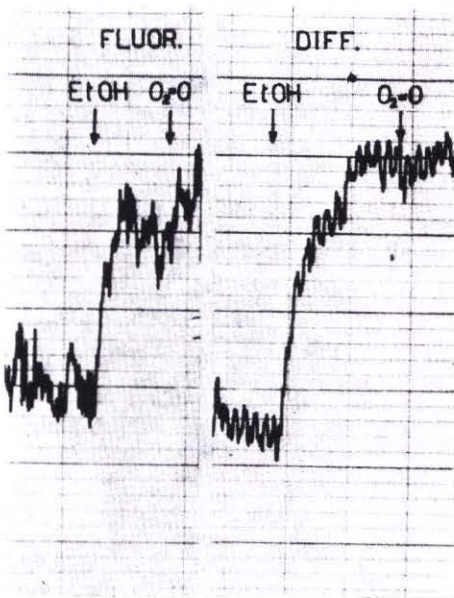


Fig. 6.

Riduzione del nicotinamide-adenin-dinucleotide (NAD) endogeno in una sospensione di lievito. 2  $\text{cm}^3$  di una sospensione all'1,5 % di lievito areato venivano posti in una celletta. Nel punto indicato venivano aggiunti 20  $\text{mm}^3$  di etanolo. A sinistra è registrata la variazione della fluorescenza assoluta, a destra quella misurata col metodo differenziale.

Nella Fig. 7 infine, sono paragonate le variazioni della fluorescenza assoluta di una fettina di diaframma di ratto provocata dall'anossia e dall'aero-



biosi, e dal trattamento con piruvato e lattato, con quelle misurate con la tecnica differenziale.

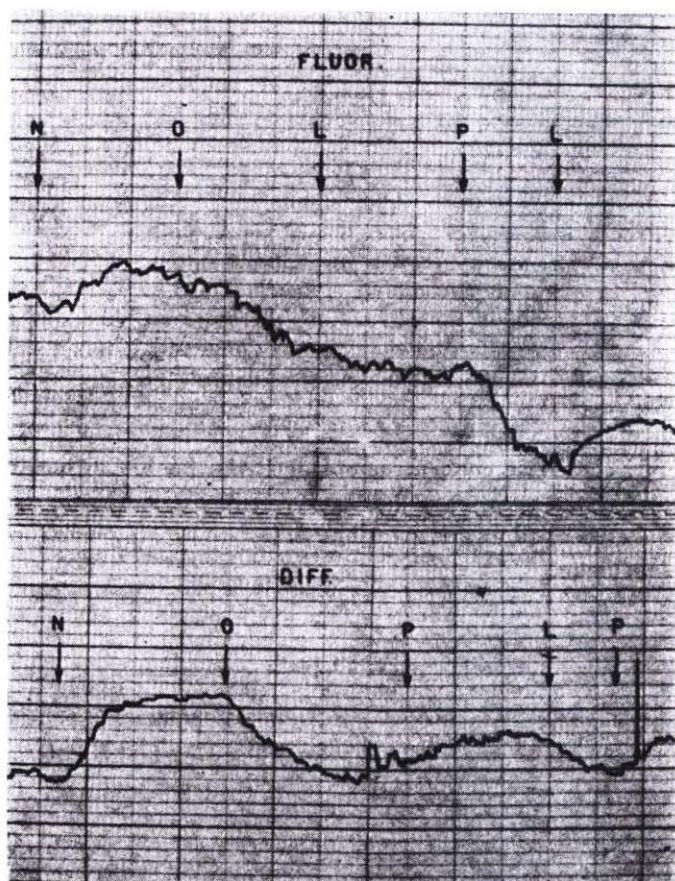


Fig. 7. — Variazioni di fluorescenza in una fettina di diaframma di ratto. La fettina era posta nella cassetta descritta e bagnata con tampone di Krebs-Ringer fosfato a pH 7,4 a 37° C. In N la soluzione era sostituita con lo stesso tampone privo di ossigeno; in O si passava di nuovo il tampone ossigenato; in L il tampone era sostituito con un altro che conteneva anche lattato 0,05M ed in P con uno contenente piruvato 0,05M. In alto sono registrate le variazioni di fluorescenza assoluta, in basso quelle misurate con la tecnica differenziale.

#### DISCUSSIONE

Nell'usare le misure di fluorescenza per la determinazione degli stati ossido-riduttivi del NAD e del NADP sia *in vivo* che *in vitro*, è talvolta difficile distinguere le variazioni provocate da effettivi cambiamenti dello stato

ossido-riduttivo, da quelle dovute a fenomeni diversi, ad esempio movimenti o rigonfiamenti dei tessuti, variazioni del flusso sanguigno *in vivo*, variazioni di trasparenza dei fluidi con i quali si incubano i tessuti *in vitro*, ecc.

Allo scopo di eliminare tali interferenze, nello strumento descritto nel presente lavoro, le variazioni della fluorescenza vengono confrontate con le variazioni provocate nello stesso punto del tessuto dagli stessi trattamenti, sulla riflessione della luce, misurata alla lunghezza d'onda della luce eccitatrice. Lo strumento permette di uguagliare le due misure all'inizio di un'esperimento, e registra poi le differenze che compaiono in seguito ai trattamenti del preparato. Con tale disposizione, i movimenti o i rigonfiamenti dei tessuti, che provocano una diminuzione o un aumento della fluorescenza, provocano anche una eguale variazione della luce riflessa, per cui la differenza tra le due misure non subisce variazioni. Lo stesso avviene se il flusso sanguigno *in vivo* o il liquido di incubazione *in vitro* provocano una variazione della fluorescenza dovuta ad una variazione di assorbimento della luce alla lunghezza d'onda della luce eccitatrice. Lo strumento misura solo le variazioni che avvengono a 4500 Å, lunghezza d'onda del massimo della fluorescenza emessa dal NAD ridotto. Variazioni di assorbimento a questa lunghezza d'onda, come potrebbero essere provocate da variazioni dello stato ossido-riduttivo dell'emoglobina, possono provocare interferenze, ma come dimostrato da CHANCE *et al.*, (1962) queste possono interferire solo nello studio *in vivo* di tessuti altamente vascolarizzati, nei quali la quantità di emoglobina presente negli strati interessati alla misura sia molto alta. L'applicazione della tecnica descritta per la misura della variazione di fluorescenza provocata dall'aggiunta di un substrato (l'etanolo) ad una sospensione di lievito, mostra come tale aggiunta provochi una riduzione del NAD, che si riflette in un aumento della fluorescenza. Tale variazione, oltre a dare un segnale più pulito con la tecnica differenziale, produce anche un aumento di sensibilità rispetto a quella ottenuta con la misura assoluta. Ciò avviene anche nelle misure della riduzione del NAD con alcool deidrogenasi di lievito ed etanolo in soluzione. Tale aumento di sensibilità è dovuto al fatto che la riduzione di questo composto oltre a provocare l'aumento della fluorescenza, provoca un aumento dell'assorbimento alla lunghezza d'onda della luce eccitatrice. Questo produce una diminuzione del segnale di riflessione, che sottraendosi algebricamente al segnale di fluorescenza dà origine ad un ulteriore aumento della differenza registrata dall'apparecchio. Ciò costituisce peraltro un vantaggio, in quanto esalta la variazione che si vuol misurare aumentando la sensibilità ed il rapporto tra il segnale ed il disturbo.

Nell'applicazione ai tessuti, come il diaframma di ratto, le variazioni prodotte dall'aerobiosi e dall'anossia sono effettivamente aumentate e rese più evidenti quando misurate con la tecnica differenziale, che non quando si misuri la sola fluorescenza assoluta, come ci si aspetta per variazioni dovute



alla effettiva ossidazione e riduzione del NAD. Questo non avviene ad esempio per le variazioni provocate dal trattamento del tessuto con lattato e piruvato. In questo caso la misura differenziale dà un risultato opposto a quello della misura di fluorescenza assoluta. Ciò sta a dimostrare che in questo caso le variazioni non sono provocate dalla sola riduzione ed ossidazione del NAD, ma sono per lo meno la somma di due effetti opposti, uno dei quali dovuto all'assorbimento del piruvato a 3660 Å che ha un coefficiente di assorbimento molare  $a_m = 3,6 \text{ cm}^{-1}$ . Tale assorbimento alle concentrazioni usate (0,05 M) provoca infatti una variazione del 18 % della luce da misurare. L'esperimento mostrato non permette di decidere se una reazione ossido-riduttiva avvenga effettivamente in questo caso.

Tali esempi sono sufficienti ad illustrare le cautele che sono necessarie nell'interpretazione di risultati delle misure di fluorescenza, e l'utilità che a tale scopo può dare la tecnica differenziale a due lunghezze d'onda.

Una serie di esperimenti è in corso in questo laboratorio per studiare, in vari tessuti, l'effetto sulla fluorescenza dei substrati del ciclo di Krebs la cui ossido-riduzione è legata alla ossido-riduzione del NAD o del NADP.

28 maggio 1966.

#### BIBLIOGRAFIA

- CHANCE, B. & H. BATSCHIEFFSKY, 1958. Respiratory enzymes in oxidative phosphorylation. VIII. Binding of intramitochondrial pyridine nucleotides. *J. Biol. Chem.*, **233**, 736.
- CHANCE, B., P. COHEN, F. F. JOBSIS & B. SCHOENER, 1962. Intracellular oxidation-reduction states *in vivo*. *Science*, **137**, 499.
- CHANCE, B. & F. F. JOBSIS, 1959. Change in fluorescence in a frog Sartorius muscle following a twitch. *Nature*, **184**, 195.
- CHANCE, B. & V. LEGALLAIS, 1959. Differential microfluorimeter for the localization of reduced pyridine nucleotides in living cells. *Rev. Sci. Instr.*, **30**, 732.
- CHANCE, B. & V. LEGALLAIS, 1963. A spectrofluorometer for recording of intracellular oxidation-reduction states. *IEEE Trans. Bio-Med. Electronics*, **10**, 40.
- CHANCE, B., V. LEGALLAIS & B. SCHOENER, 1962. Metabolically linked changes in fluorescence emission spectra of cortex of rat brain, kidney and adrenal gland. *Nature*, **195**, 1073.
- CHANCE, B. & B. SCHOENER, 1962. Correlation of oxidation-reduction changes of reduced pyridine nucleotide and changes in electroencephalogram of the rat in anoxia. *Nature*, **195**, 956.
- CHANCE, B. & B. SCHOENER, 1963. Control of oxidation-reduction state of NADH in the liver of anesthetized rats. In: *Advances in Enzyme Regulation*, G. Weber, Ed., Pergamon Press, Vol. 1, p. 169.
- CHANCE, B. & B. THORELL, 1959. Localization and kinetics of reduced pyridine nucleotide in living cells by microfluorimetry. *J. Biol. Chem.*, **234**, 3044.



- CHANCE, B. & G. R. WILLIAMS, 1956. Respiratory chain and phosphorylation, *Adv. Enzymol.*, **17**, 65.
- FRANK, M., G. GUIDARELLI & G. SERLUPÌ-CRESCENZI, 1964. Microfluorimetro registratore ad alta sensibilità e basso rumore per misure in tessuti viventi. *Ann. Chim.*, **54**, 788.
- SERLUPÌ-CRESCENZI, G. & C. PAOLINI, 1966. Spettrofotometro a doppia lunghezza d'onda basato sull'uso di un amplificatore selettivo sensibile alla fase. *Ann. Ist. Super. Sanità*, **2**, 434.
- VAN ROSSUM, H. G. V. D., 1964. Observations on the fluorescence emitted by slices of rat liver and avian salt gland. *Biochim. Biophys. Acta*, **88**, 507.