

Nuovo metodo di determinazione del fosforo lipidico nel siero

D. VALENTE e M. R. PENATI GLÄSSER

Laboratorio di Biochimica dell'Ospedale Maggiore Ca' Granda di Milano

Il metodo da noi proposto si basa sull'impiego di un reattivo che precipita in modo selettivo le lipoproteine, ed è particolarmente adatto per analisi in grandi serie.

Per la precipitazione delle lipoproteine del siero abbiamo impiegato un agente precipitante simile a quello utilizzato da Jordan ⁽¹⁾ per il dosaggio del colesterolo (solfato di destrano di alto P.M. e ioni calcio); il solfato di destrano impiegato ha peso molecolare 500.000, più basso di quello usato da Jordan (2.000.000). Abbiamo anche modificato il pH della miscela precipitante, portandolo a 4,7, avendo constatato che a pH neutro in presenza di ioni calcio precipita anche una parte del fosfato inorganico.

Per la digestione del materiale lipoproteico abbiamo utilizzato l'acido clorico alla temperatura di 130-140°C, come proposto da Zak ⁽²⁾ per il dosaggio dello iodio proteico.

Per la determinazione finale degli ioni fosfato abbiamo utilizzato la reazione al blu di molibdeno; come riducente abbiamo utilizzato l'acido ascorbico, proposto da Chen ⁽³⁾, in quanto il suo potere cromogeno è 5 volte superiore a quello dell'acido amminonaftolsulfonico.

Si impiegano i seguenti reattivi:

1) Soluzione tampone pH 4,7: sciogliere 136 g di sodio acetato in circa 500 ml di acqua deionizzata, aggiungere 60 ml di acido acetico glaciale e portare al volume di 1 litro con acqua deionizzata; controllare il pH.

2) Reattivo precipitante: mescolare in parti uguali una soluzione di cloruro di calcio 0,1 M e una soluzione di solfato di destrano (ditta Pharmacia) 0,05 g/100 ml.

3) Soluzione madre contenente 100 mg di fosforo inorganico in 100 ml: sciogliere 4,39 g di KH_2PO_4 puro per analisi (Merck) in un litro di acqua deionizzata; conservare in frigorifero con l'aggiunta di qualche goccia di cloroformio.

4) Soluzione standard contenente 10 mg di fosforo inorganico in 100 ml: al momento dell'uso diluire 5 ml della soluzione precedente (N. 3) a 50 ml con acqua deionizzata.

5) Soluzione di acido clorico: in un becher da 1 litro introdurre 450 ml di acqua deionizzata e 250 g di clorato di potassio RP C. Erba; sciogliere a fuoco vivo sotto una cappa con buona aspirazione; spegnere la fiamma e aggiungere cautamente, mescolando, 188 ml di acido perclorico 70% Merck. Raffreddare per almeno 2 ore in frigorifero ed eliminare il precipitato per filtrazione.

6) Bicromato di potassio: 1,3 g/100 ml in acqua deionizzata.

7) Miscela ossidante: mescolare 20 parti di soluzione 5) e 1 parte di soluzione 6); la miscela è stabile e può essere conservata anche a temperatura ambiente.

8) Molibdato di ammonio: 2,5 g/100 ml in acqua deionizzata.

9) Acido solforico: 2 N: diluire l'acido solforico concentrato 1:18 con acqua deionizzata.

10) Acido ascorbico: 10 g/100 ml in acqua deionizzata; conservare in frigorifero.

11) Miscela cromogena: al momento dell'uso mescolare 1 parte di soluzione 8), 3 parti di soluzione 9) e 1 parte di soluzione 10).

Per il bagno di glicerina noi utilizziamo un'apposita vasca di acciaio inossidabile a 120 posti (35 × 15 × 10 cm) termostata e munita di agitatore magnetico e di appositi stativi in acciaio inossidabile a 40 × 10 posti (Ditta LP Italiana, Cinisello Balsamo, Milano).

Tutte le analisi sono eseguite in doppio. In due provette da centrifuga della capacità di 10 ml si pipettano 0,1 ml di siero o di plasma, 0,5 ml di tampone a pH 4,7 e 4 ml di reattivo precipitante; contemporaneamente si analizza un siero di controllo del commercio (ad es. Monitrol II).

Dopo 15 minuti si centrifuga a 4000 giri per 5 minuti e si elimina accuratamente il sopranatante, assorbendo su carta bibula le ultime gocce di soluzione.

Si allestiscono due standard e due bianchi utilizzando 0,1 ml rispettivamente di soluzione standard di fosfato e di acqua deionizzata. Si aggiungono 0,7 ml di miscela ossidante a tutti i campioni e si pongono le provette in bagno di glicerina a 100°C sotto una cappa con buona aspirazione; dopo 10 minuti si aumenta la temperatura fino a 140°C.

La digestione è di norma completa dopo 15-20 minuti (raffreddando 2-3 provette dei campioni in esame in acqua fredda si deve osservare la comparsa di cristalli rossi, altrimenti si dovrà continuare la digestione per altri 5 minuti). Si pongono le provette in bagno d'acqua fredda, si aggiungono 3 ml di acqua deionizzata e 3 ml di miscela cromogena e dopo 3 minuti si procede alla lettura del colore a 700 nm azzerando con il bianco.

Per il calcolo si impiega la formula :

$$\text{tasso di fosfolipidi in mg/100 ml} = 250 \times \frac{E_c}{E_{st}}$$

in cui E_c = estinzione ottica data dal campione

E_{st} = estinzione ottica data dallo standard

In una serie di analisi effettuate in parallelo abbiamo ottenuto con il nostro metodo uno scarto medio fra i doppi campioni pari a circa un terzo di quello ottenuto con il metodo di riferimento (^{5,6}); le medie dei due gruppi di valori sono invece assai vicine (Tab. 1).

TABELLA 1

Raffronto tra il metodo proposto dagli Autori (A) e il metodo di riferimento (B)

B = Metodo di Zilversmit all'acido perclorico (^{6,7}) praticato sull'estratto cloroformio-metanolico del siero secondo Sperry e Brand (⁵)

Campione n.	METODO A mg/100 ml Valori medi (dosaggio in duplicato)	METODO B mg/100 ml Valori medi (dosaggio in duplicato)
1	114	127
2	140	148
3	160	184
4	166	166
5	172	196
6	184	180
7	197	180
8	204	230
9	206	191
10	206	196
11	250	275
12	250	290
13	255	223
14	259	270
15	292	321
16	330	310
17	349	368
18	594	600
Media	241	247
Deviazione standard	4,35	13,8
Coefficiente variazione	1,8 %	5,6 %

N. B. — Le deviazioni standard sono state calcolate mediante la nota formula: $s = \sqrt{\frac{\sum d_x^2}{2N}}$
in cui $\sum d_x^2$ è la somma delle differenze tra i doppi campioni, e N è il numero totale dei campioni analizzati.

Tenendo conto del fatto che nel siero sono presenti due gruppi di composti fosforati di natura non lipidica, fosfati inorganici e esteri fosforici (in particolare il glicerofosfato, il glucosio-6-fosfato e i nucleotidi, presenti questi ultimi, nelle emazie), abbiamo proceduto alla verifica di possibili interferenze. Abbiamo aggiunto rispettivamente a due diverse serie di 5 campioni di siero una quantità di fosfato inorganico tale da ottenere nei campioni un tasso finale di fosforo pari a 100 mg/100 ml o una quantità di β -glicerofosfato tale da ottenere una concentrazione finale dell'estere pari a 260 mg/100 ml; questi valori sono circa 10 volte superiori a quelli massimi riscontrabili nel siero. I risultati hanno mostrato che dopo i normali passaggi analitici la percentuale residua dei composti esaminati è praticamente trascurabile.

Un vantaggio importante del metodo proposto consiste nella sua rapidità (in circa 2 ore e mezza è possibile analizzare 60 campioni in duplicato), che è preziosa soprattutto per serie analitiche numerose.

Inoltre, data la piccola quantità di proteine precipitate, si possono impiegare per la digestione con l'acido clorico temperature relativamente basse e quindi procedere alla digestione simultanea di un gran numero di campioni in un bagno di glicerina, senza ricorrere alla fiamma.

L'isolamento delle lipoproteine mediante precipitazione costituisce un passaggio analitico assai più semplice della estrazione dei lipidi con solventi organici^(4,5), che richiede per l'estrazione i lavaggi e l'evaporazione del solvente.

La precipitazione delle proteine (e quindi dei complessi lipoproteici) viene anche eseguita mediante acido tungstico o acido tricloroacetico, seguita da centrifugazione, eliminazione del soprannatante e digestione del sedimento⁽²⁾, ma in presenza di emolisi si ottengono valori in eccesso, a causa della coprecipitazione di una parte almeno del fosforo organico proveniente dalle emazie.

È lecito in conclusione sottolineare la buona corrispondenza con il metodo di riferimento e l'ottima riproducibilità dei risultati, che va attribuita in gran parte alla riduzione dei passaggi analitici.

BIBLIOGRAFIA

- (1) JORDAN, W. *Clin. Chem.*, **14**, 31 (1968).
- (2) ZAK, B. *Anal. Chem.*, **24**, 1345 (1952).
- (3) CHEN, P. S., T. Y. TORIBARA & H. WARNER. *Anal. Chem.*, **28**, 1756 (1956).
- (4) BOYD, E. M. *J. Biol. Chem.*, **114**, 223 (1936).
- (5) SPERRY, W. M. & F. C. BRAND. *J. Biol. Chem.*, **213**, 69 (1955).
- (6) ZILVERSMIT, D. B. & A. K. DAVIS. *J. Lab. Clin. Med.*, **35**, 155 (1950).
- (7) ZILVERSMIT, D. B. In: *Standard Methods of Clinical Chemistry*, vol. II, Acad. Press Inc., New York, 1958, p. 132.

L'influenza del carico lipidico sulle curve da carico di Lipiodol

E. DENEGRİ e E. GATTI

Laboratorio di Biochimica e Servizio di Dietologia dell'Ospedale Maggiore Ca' Granda di Milano

RIASSUNTO

Nel quadro di uno studio sul comportamento dello iodio plasmatico dopo carico di Lipiodol (*) in differenti stati fisiologici e patologici, abbiamo ritenuto opportuno esaminare l'influenza di un contemporaneo pasto grasso sulla curva da carico di Lipiodol in soggetti normali.

La prova fu eseguita su 15 adulti sani: essa consisteva nella somministrazione contemporanea di 5 μ l di Lipiodol e di 1 g di maionese commerciale (contenente circa il 70 % di grassi) per kg di peso corporeo unitamente a 4 fette biscottate, e nella determinazione delle variazioni del tasso plasmatico di iodio totale, iodio lipidico, lipidi totali, trigliceridi, fosforo lipidico e acidi grassi non esterificati (NEFA) alla 2^a, 3^a, 5^a, 8^a e 24^a ora. Si eseguirono anche le determinazioni delle suddette frazioni lipidiche e dello iodio eliminato con le urine nelle 24 ore della prova. Un gruppo di controllo costituito da 20 adulti sani fu trattato con Lipiodol, ma non ricevette il pasto grasso.

Dopo somministrazione di Lipiodol, con o senza carico lipidico, i singoli profili delle curve dello iodio plasmatico presentavano una variabilità notevole; facendo però riferimento al gruppo esaminato inteso in senso statistico e non al singolo individuo, si riscontrarono differenze altamente significative fra i due tipi di curve ottenute.

Nei risultati si notava una differenza molto grande come valori assoluti: la iodemia lipidica nei controlli raggiungeva infatti in media un valore massimo di 483 μ g/100 ml, mentre quella dei soggetti che avevano ricevuto un pasto grasso si fermava a 148 μ g/100 ml. Inoltre, mentre nei controlli il picco massimo era raggiunto nella quasi totalità dei casi tra la 2^a e la 3^a

(*) Trigliceride iodato contenente iodio in quantità pari al 40 % in peso.

ora, nel test associato al carico grasso si aveva un netto spostamento verso la 5^a-8^a ora: in un solo caso si è riscontrato alla 3^a ora. L'eliminazione urinaria dello iodio non mostrava differenze significative nei due gruppi.

Per quanto riguarda infine il comportamento delle frazioni lipidiche esaminate si osservava un aumento modesto della lipemia totale ed una scarsa variazione del fosforo lipidico e dei NEFA, mentre si notava un sensibile aumento dei trigliceridi, pari in media al 33 % rispetto al valore iniziale.

I livelli massimi iodemici bassi e tardivi da carico di Lipiodol, riscontrati in presenza di carico lipidico simultaneo, non possono essere spiegati sulla base di un assorbimento incompleto; l'eliminazione fecale dello iodio risultava infatti costantemente pari o inferiore al 5 % della dose somministrata, sia nei controlli che nei soggetti sottoposti a contemporanea somministrazione di carico lipidico. È invece probabile che nel caso di somministrazione di un forte carico lipidico, la digestione e il conseguente assorbimento del Lipiodol divengano più lunghi e laboriosi. Si deve inoltre ammettere che la somministrazione simultanea di un forte carico lipidico acceleri il ricambio metabolico dei grassi iodati assorbiti e la loro scomparsa dal circolo: ciò può spiegare le concentrazioni relativamente basse di Lipiodol riscontrate dopo un carico simultaneo di grassi non iodati. Questa interpretazione trova un'analogia con quanto riportato da Van Handel e Zilvermit (*J. Lab. Clin. Med.*, 52, 831, 1958) per alcune esperienze sull'assorbimento di trioleina marcata con I¹³¹ nel cane.

Curve da carico di Lipiodol in soggetti obesi

E. GATTI e E. DENEGRI

Laboratorio di Biochimica e Servizio di Dietologia dell'Ospedale Maggiore Ca' Granda di Milano

RIASSUNTO

Nell'ambito di una serie di ricerche sul comportamento dello iodio plasmatico dopo carico di Lipiodol, in differenti stati fisiologici e patologici abbiamo eseguito il test del Lipiodol in 15 soggetti obesi, di sesso femminile, di età variabile da 37 a 69 anni, non sottoposti a trattamento alcuno e, per confronto, in un gruppo di 20 adulti normali, di età compresa tra 21 e 48 anni.

La prova consisteva nella somministrazione di 5 μ l di Lipiodol per kg di peso corporeo e nella determinazione del tasso plasmatico dello iodio totale e dello iodio lipoproteico alla 2^a, 3^a, 5^a, 8^a e 24^a ora; si eseguivano inoltre la iodemia basale e la ricerca dell'eliminazione dello iodio con le urine nelle 24 ore della prova. Sono stati utilizzati i metodi da noi indicati nella relazione al XII Congresso Nazionale della Società Italiana di Gerontologia e Geriatria, Firenze 19-23 aprile 1970.

Il comportamento dello iodio totale dopo carico di Lipiodol presentava nei due gruppi differenze spiccate. Negli obesi il livello massimo veniva raggiunto nel 53 % dei casi alla 3^a ora e nel 40 % dei casi alla 5^a ora ed in media era 1110 μ g/100 ml; all' 8^a ora era 680 μ g/100 ml ed alla 24^a ora 348 μ g/100 ml. Nel gruppo di adulti normali tali livelli erano rispettivamente 534, 211 e 92 μ g/100 ml, cioè ben due o tre volte inferiori; il livello massimo si aveva nel 75 % dei casi alla 3^a ora e soltanto nel 10 % dei casi alla 5^a ora. La percentuale dello iodio lipidico rispetto allo iodio totale plasmatico negli obesi raggiungeva in media il 78 %, sia al momento della massima concentrazione che alla 24^a ora, mentre nei soggetti normali in media era il 64 % ed il 57 % rispettivamente.

L'eliminazione urinaria media del Lipiodol negli obesi (56% della dose somministrata) è risultata infine nettamente superiore a quella degli adulti normali (37 %).

Le differenze riscontrate fra il gruppo dei normali e il gruppo degli obesi per quanto riguarda i livelli iodiolipidemicici medi e i valori medi della eliminazione dello iodio con le urine non possono essere attribuite a un diverso assorbimento dei trigliceridi iodati; la percentuale di iodio non assorbita ed eliminata con le feci risultava infatti circa uguale nei due gruppi, e comunque assai bassa ($< 5\%$).

La maggior percentuale di iodio eliminata dagli obesi con le urine potrebbe essere attribuita ad un accentuato catabolismo dei trigliceridi iodati — che negli obesi sono per lo più presenti in circolo a concentrazioni più alte nei confronti dei soggetti normali — piuttosto che ad una maggiore attività deiodificante della parete intestinale.

Le differenze riscontrate nelle curve della iodemia da carico dipendono assai verosimilmente da un diverso comportamento metabolico dei trigliceridi iodati. I livelli più elevati di iodio libero e di iodio lipidico riscontrati mediamente in circolo negli obesi rispetto ai soggetti normali fanno infatti pensare ad un rallentamento del ricambio dei trigliceridi iodati anche se ciò è in contrasto con la «vività» ormai ampiamente dimostrata dell'attività metabolica del tessuto adiposo.

Il rallentato ricambio dei trigliceridi iodati circolanti potrebbe trovare una spiegazione nelle note connessioni metaboliche esistenti tra NEFA e trigliceridi e nell'alto livello dei NEFA circolanti nell'obeso, la cui concentrazione esercita un controllo a livello tissutale sulla lipasi lipoproteica non ormono-dipendente.