

**La camera a ionizzazione a pareti in grafite  
dell'Istituto Superiore di Sanità**

MARTA CREMONESE, LUCIO PUGLIANI e CARLO RIDOLFI (\*)

*Laboratori di Fisica*

**Riassunto.** — In questo lavoro viene descritta la camera standard a pareti in grafite, disegnata e costruita nei Laboratori di Fisica dell'Istituto Superiore di Sanità. Ne viene descritto il funzionamento e sono riportati i metodi di misura ed i fattori correttivi necessari alla messa a punto della camera rispetto ad una sorgente  $\text{Ra}^{226}$ . Viene quindi calcolato il valore della costante specifica di emissione del radio.

**Summary** (*The graphite-cavity ionization chamber of the Istituto Superiore di Sanità*). — A standard cavity chamber with graphite walls, designed and built at the Physics Laboratory of the Istituto Superiore di Sanità, is described. In this work the procedures adopted to carry out a precise measurement with this instrument are reported, together with all the correcting factors related to its standardization with respect to the  $\text{Ra}^{226}$  source. The specific  $\Gamma$ -ray constant of the  $\text{Ra}^{226}$  has been determined.

INTRODUZIONE

Presso i Laboratori di Fisica dell'Istituto Superiore di Sanità è stata messa in funzione da vari anni una camera standard a ionizzazione ad aria libera (MISSONI & PUGLIANI, 1966) che rappresenta uno standard primario per le radiazioni elettromagnetiche di energia compresa fra 50 e 300 keV. Con il presente lavoro i Laboratori di Fisica hanno voluto ampliare il campo degli standard primari in dotazione dell'Istituto. È stata quindi messa a punto una camera a ionizzazione a pareti di grafite che permette una

---

(\*) Ospite presso i Laboratori di Fisica.

misura della radiazione compresa nell'intervallo di energia 0,3–2 MeV. La messa a punto della camera standard è stata eseguita rispetto ad una sorgente di Ra<sup>226</sup>.

#### DESCRIZIONE DELLA CAMERA E SUE CARATTERISTICHE

La camera a ionizzazione è stata eseguita in grafite, materiale che garantisce un'ottima equivalenza fra le pareti della camera e l'aria contenuta nel suo interno. Infatti per il rapporto di poteri frenanti in una camera di piccole dimensioni  $\varnothing = 4$  cm cui corrispondono i raggi  $\delta$  di energia  $E = 50$  KeV, in base alla teoria di Burlin si ha (BURLIN, 1966):

$$m_s = \frac{\frac{1 \text{ dE}}{\rho \text{ dx}} \text{ aria}}{\frac{1 \text{ dE}}{\rho \text{ dx}} \text{ grafite}} = 0,999 \pm 0,002$$

$$e = \frac{\text{gm}}{\text{cm}^3}$$

$$\frac{\text{dE}}{\text{dx}} = \frac{\text{MeV}}{\text{cm}}$$

mentre per il rapporto dei coefficienti massicci di assorbimento (m. a.) è stata eseguita la media pesata

$$\frac{\text{m. a. (aria)}}{\text{m. a. (grafite)}} = \frac{\sum_{i=1}^n P_i \frac{\text{(m. a.)}_i \text{ (aria)}}{\text{(m. a.)}_i \text{ (grafite)}}}{P_i} = 0,999 \pm 0,002$$

ove i pesi  $P_i$  rappresentano il contributo dato alla ionizzazione dalle righe del radio filtrato (ATTIX *et al.*, 1968, a, b, c). La camera descritta in Fig. 1 è stata costruita al tornio ed ha un volume di raccolta di  $45,61 \pm 0,13$  cm<sup>3</sup> ed è dotata di 7 spessori di grafite (Fig. 2) in modo da poter funzionare con spessori variabili da 2 a 8 mm. Durante le misure la parete esterna della camera viene portata ad alta tensione, mentre l'elettrodo collettore interno è mantenuto a potenziale zero. All'interno della camera si ha un campo elettrico radiale; in queste condizioni l'elettrodo collettore raccoglie tutti gli ioni di uno stesso segno generati nel volume gassoso all'interno della camera dagli elettroni compton prodotti dall'interazione fra i gamma emessi dalla sorgente e le pareti in grafite della camera stessa.

L'apparato di misura utilizzato è il medesimo della camera standard ad aria libera (CHIOZZOTTO, 1962); la misura viene effettuata trasferendo su un condensatore di capacità nota la carica raccolta da un elettrometro a condensatore vibrante (tipo Cary mod. 31). Il trasferimento della carica viene eseguito con un circuito di compensazione. I condensatori usati sono in aria e di capacità rispettivamente:  $C_1 = 109,3 \pm 0,5$  pf.  $C_2 = 446,2 \pm \pm 1,2$  pf.

Tali capacità sono state misurate per confronto utilizzando un circuito di taratura con inserito un condensatore campione.

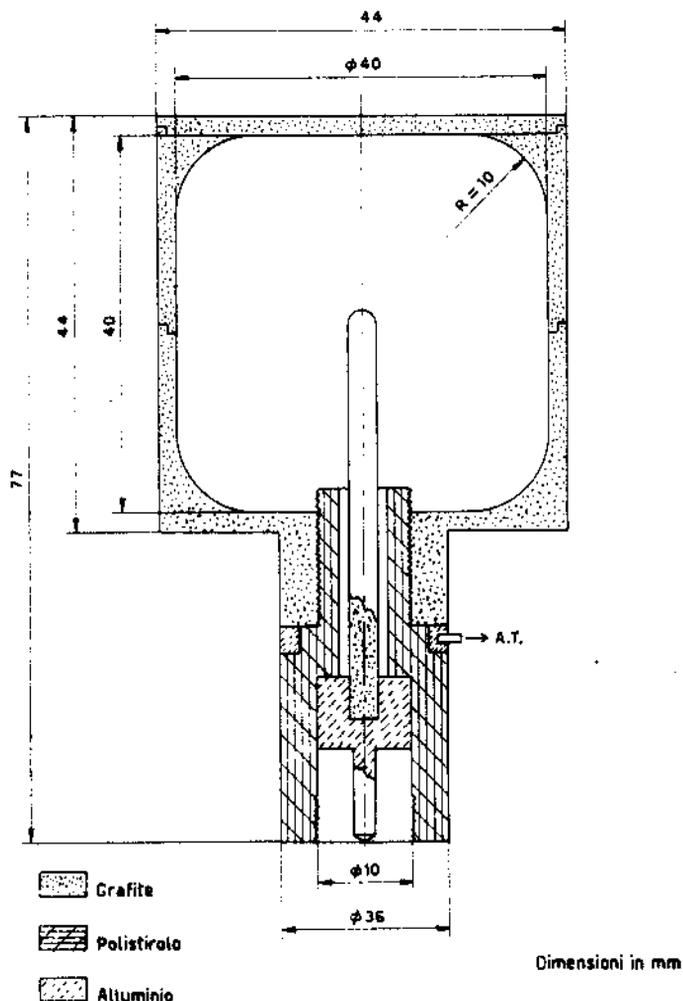


Fig. 1. — Schema e dimensioni della camera a ionizzazione cilindrica

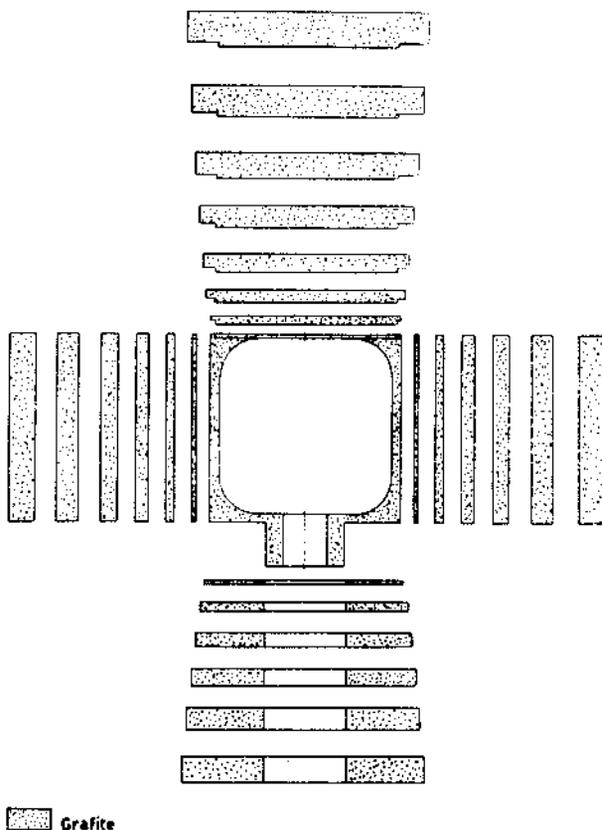


Fig. 2. — Spessori di assorbimento della camera da 2 a 8 mm

#### CALCOLO DEI FATTORI CORRETTIVI

Mettere a punto una camera a ionizzazione rispetto ad una sorgente radioattiva gamma emittente equivale a determinare con la massima precisione la corrente di ionizzazione all'interno della camera dovuta all'irraggiamento stesso. Tale dato sperimentale, tenuto conto di tutte le correzioni relative alle modifiche del campo di radiazione incidente durante il percorso sorgente-camera e di quelle relative alla risposta del rivelatore, costituisce la grandezza caratteristica di una camera standard. Da essa è poi possibile risalire alla costante specifica  $\Gamma$  della sorgente, dato che permette un comodo confronto con gli analoghi dati ottenuti da altri ricercatori con diverse sorgenti di radio e diverse camere standard.

Di particolare importanza per le misure è la determinazione del valore di  $L$ , distanza fra il centro della sorgente e il centro fisico della camera;

quel punto della camera cioè rispetto al quale è verificata la legge dell'inverso del quadrato della distanza. La distanza sorgente-camera viene misurata con un sistema di due cannocchiali che traggurano un regolo semimillimetrato posto lungo l'asse sorgente-camera; l'errore sulla misura  $L$  è contenuto entro 0,5 mm, l'errore relativo sulla grandezza  $L^2$  è dato da  $2 \Delta L/L$ .

I fattori correttivi da considerare sono di due diversi tipi e per omogeneità sono considerati separatamente.

#### A) Fattori correttivi per modifica del campo di radiazione

##### 1) Correzione per l'attenuazione nel platino.

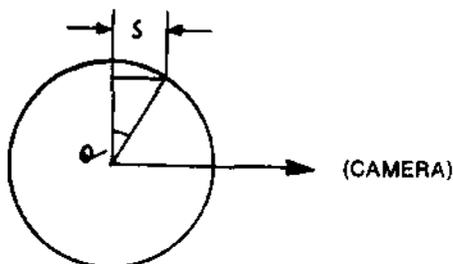
La sorgente radioattiva usata è costituita da 99,78 mg di radio sotto forma di solfato incapsulata in un contenitore (platino 90 %, iridio 10 %) di spessore  $1,00 \pm 0,01$  mm. Poiché la costante specifica del radio è riferita ad uno spessore di 0,5 mm di platino sono stati determinati i fattori di correzione necessari. Occorre tener conto che per la curvatura del contenitore i gamma attraversano uno spessore maggiore di quello nominale (YOUNG & BATHO, 1964) e che il coefficiente di attenuazione dei gamma è una funzione dello spessore del platino, essendo policromatico lo spettro del radio. Lo spessore effettivo per il nostro contenitore è risultato  $S_A = 0,1105 \pm 0,0010$  cm. I coefficienti di attenuazione per gli spessori  $S_B = 0,05$  cm e  $S_A$  sono rispettivamente  $F_B = 1,88 \pm 0,03$  cm<sup>-1</sup> e  $F_A = 1,65 \pm 0,02$  cm<sup>-1</sup> come riportato dal lavoro sperimentale di POLI-CASTELLANI (1964). La correzione da apportare alle misure è quindi data dal rapporto tra i fattori correttivi relativi ai due spessori di platino

$$F_1 = \frac{e^{-S_A \cdot F_A}}{e^{-S_B \cdot F_B}} = 0,9154 \pm 0,0036$$

##### 2) Correzione per autoassorbimento.

I raggi gamma subiscono un'attenuazione nei sali di radio stessi. Per la nostra sorgente il percorso efficace  $\bar{S}$  nel cilindretto di raggio  $R = 0,1$  cm contenente il radio è dato dalla formula

$$\bar{S} = \frac{\int_0^\pi R \sin \vartheta \cdot \sin \vartheta d \vartheta}{\int_0^\pi \sin \vartheta d \vartheta} = \frac{\pi}{4} R = 0,0785 \text{ cm}$$



$$S = R \cdot \sin \vartheta$$

$\sin \vartheta$  = Fattore Peso che tiene conto della distribuzione della polvere. Il coefficiente di attenuazione per fotoni di energia media del radio è compreso fra  $0,070 < \mu/\rho < 0,080 \text{ cm}^2/\text{gm}$  (HUBBELL, 1969), la densità dei sali di radio è  $\rho = 2,33 \text{ gm/cm}^3$ , il coefficiente di attenuazione lineare risulta  $\mu = 0,17 \pm 0,01 \text{ cm}^{-1}$ ; la correzione per l'autoassorbimento è data in definitiva da

$$F_2 = e^{-\mu \cdot \bar{S}} = 0,9867 \pm 0,0008$$

### 3) Attenuazione nel plexiglass.

La sorgente durante le misure è contenuta in un portasorgente di plexiglass di densità  $\rho_1 = 1,19 \text{ gm/cm}^3$ . Lo spessore attraversato dai gamma è, tenendo conto della curvatura del contenitore,  $S_1 = 0,059 \text{ cm}$ . Per calcolare l'attenuazione si è usata l'espressione

$$F_3 = \frac{\sum_{i=1}^n P_i e^{-x_i}}{\sum_{i=1}^n P_i}$$

ove  $P_i$  sono i pesi precedentemente considerati e  $x_i$  è dato dall'espressione  $x_i = \rho_1 \cdot S_1 \cdot (\text{coefficiente attenuazione riga iesima del radio nel plexiglass in } \text{cm}^2/\text{gm})$  (HUBBELL, 1969)

Il valore di correzione ottenuto è  $F_3 = 0,9949 \pm 0,0001$ .

4) *Attenuazione in aria.*

Si è usato il medesimo metodo del caso precedente, quindi

$$F_4 = \frac{\sum_{i=1}^n P_i e^{-x_i}}{\sum_{i=1}^n P_i}$$

ove  $x_i = \rho_2 \cdot S_2 \cdot$  (coefficiente attenuazione riga  $i$ esima in aria)

$\rho_2 = 1,29 \cdot 10^{-3}$  gm/cm<sup>3</sup>

$S_2 =$  spessore di aria (HUBBELL, 1969)

la correzione  $F_4$  risulta essere dell'1 ‰ ogni 11,5 cm di aria (l'errore sulla correzione stessa è trascurabile).

B) *Fattori correttivi relativi alla risposta del rivelatore*1) *Correzioni per temperatura, pressione, umidità.*

L'esposizione viene misurata come la ionizzazione provocata nell'unità di massa di aria secca; poiché sia la massa d'aria racchiusa nella camera che l'umidità variano con le condizioni ambientali, è necessario conoscere le condizioni di temperatura, pressione, umidità dell'ambiente, per determinare il fattore di correzione e riportare le condizioni dell'aria a 0°C, 760 mm Hg, e umidità zero. Il fattore correttivo di divisione per le condizioni ambientali è dato dalla espressione

$$F_5 = \left\{ \left[ \frac{273,15}{273,15 + t^0} \cdot \frac{P}{760} \right] - 0,2103 \cdot \frac{P_0}{760} \cdot \frac{273,15}{273,15 + t^0} \right\}$$

in cui  $P$  è la pressione misurata,  $t^0$  la temperatura in C° e  $P_0$  la pressione parziale del vapor d'acqua in mm di Hg (BARNARD & ASTON, 1960).

## CONTRIBUTI DELLA RADIAZIONE DI FONDO E DI QUELLA DIFFUSA ALLA CORRENTE DI IONIZZAZIONE

Per avere delle misure di esposizione che abbiano una esattezza maggiore dell'1 ‰ occorre valutare con la dovuta precisione il contributo dovuto alla radiazione di fondo e il contributo dovuto alla radiazione diffusa. Le

origini della radiazione di fondo sono diverse; raggi cosmici, radiazione per contaminazione radioattiva nel materiale usato per costruire il contatore (nel nostro caso presenza del carbonio 14) emissione termoionica, rumore elettronico. Le misure eseguite utilizzando uno spessore della camera  $S = 3$  mm di grafite, la capacità  $C = 109,3$  p. F. e una tensione di alimentazione  $V = 450$  Volt hanno dato un valore medio di radiazione di fondo uguale ad una corrente  $I_p = 1,4 \cdot 10^{-15}$  A. Per radiazione diffusa si intende quella frazione di radiazione che raggiunge lo strumento di misura dopo aver interagito con le pareti, il pavimento, i vari oggetti contenuti nella stanza e con l'aria stessa. Per ridurre tale radiazione la sorgente è stata parzialmente collimata rispetto alla camera con un muretto di piombo di spessore 15 cm. Il contributo alla ionizzazione è stato misurato disponendo un parallelepipedo di piombo  $20 \times 5 \times 5$  cm lungo l'asse ottico tra la sorgente e la camera. Le misure preliminari eseguite con il piombo a varie distanze dalla sorgente sono riportate in Tab. 1.

TABELLA 1

## Distanza sorgente-camera 104 cm

Distanza sorgente-piombo cm	Radiazione diffusa millivolt/minuto
2	$3,4 \pm 1$
6	$3,8 \pm 1$
12	$8,9 \pm 1$
22	$10,3 \pm 1$
32	$10,7 \pm 1$
42	$10,5 \pm 1$
52	$9,5 \pm 1$
58	$10,2 \pm 1$
67	$9,2 \pm 1$
81	$8,2 \pm 1$

Come si nota, la radiazione diffusa è indipendente dalla posizione del piombo finché esso si mantiene nella zona centrale fra la camera e la sorgente.

Le condizioni sperimentali durante le misure definitive sono le seguenti:

spessore grafite  $S = 3$  mm;

capacità  $C = 446,2$  pF;

tensione di alimentazione  $V = 600$  volt;

distanza sorgente-camera (45-60-81-100 cm);

distanza sorgente-piombo (18-26-40).

I risultati ottenuti sono riportati in Fig. 3. La corrente dovuta alla radiazione diffusa (che contiene naturalmente anche il contributo dovuto alla radiazione di fondo) risulta essere  $I_{\text{dif.}} = (9,1 \pm 1,5) \cdot 10^{-15}$  A. L'errore è dato dalla semidispersione dei punti sperimentali, e risulta sperimentalmente equivalente al contributo della radiazione di fondo.

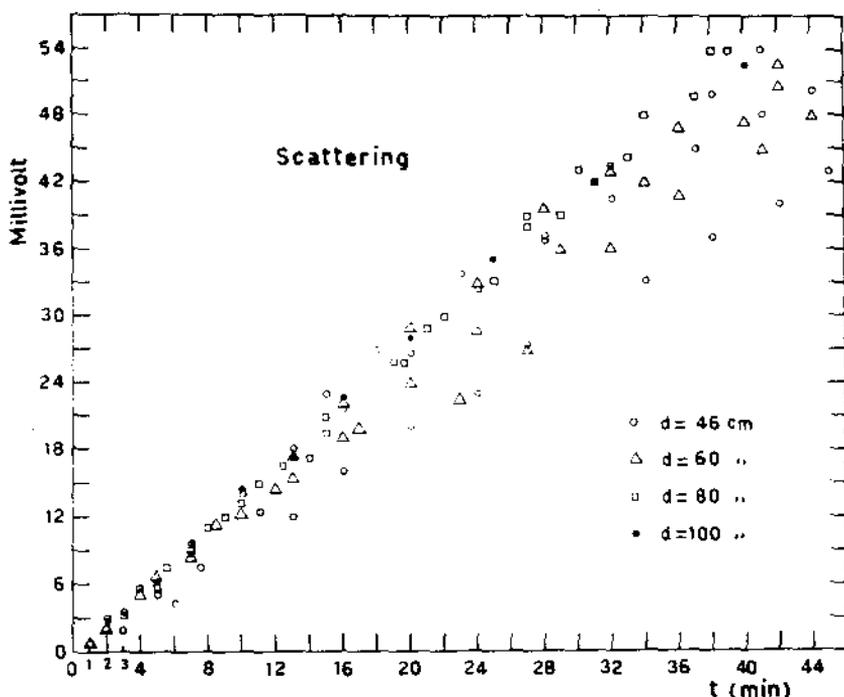


Fig. 3. — Dose raccolta dalla camera nelle misure di radiazione diffusa

#### *Determinazione del centro fisico della camera*

La definizione della costante specifica di emissione di una sorgente radioattiva impone che nella misura della dose sia verificata la legge dell'inverso del quadrato della distanza ( $1/L^2$ ) tra la sorgente e la camera. La radiazione nella propagazione segue sicuramente la legge  $1/L^2$  nello spazio compreso fra la sorgente e le pareti della camera; nelle pareti però inizia l'interazione tra la radiazione e la grafite con produzione di elettroni Compton. Perciò a priori esiste una indeterminazione su quale sia il centro effettivo della camera. Inoltre gli elettroni non sono distribuiti isotropicamente nelle pareti; per camere costituite da materiali di basso numero

atomico il contributo alla ionizzazione totale dato dalla parete frontale (verso la sorgente) è predominante (CORMACK & JOHNS, 1954; HINE, 1952; KONDO & RANDOLPH, 1960; BURLIN, 1964). Nel caso del radio e di camera in grafite il contributo portato alla ionizzazione dalla parete frontale è superiore al 90 %, il centro effettivo della camera dovrebbe quindi trovarsi spostato verso la parete frontale. Sperimentalmente si determina il centro effettivo eseguendo misure a diverse distanze; usando la distanza come parametro si assume come centro effettivo il punto all'interno della camera che rende verificata la legge  $1/L^2$ . In Fig. 4 sono riportati i risultati ottenuti misurando la dose di radiazione al variare della distanza sorgente-camera.

I dati riportati sono stati corretti per tutti i fattori correttivi visti: come si vede i punti risultano allineati e la retta che li congiunge interseca l'asse delle ascisse nel punto  $x = 14$  mm. Il centro fisico si trova quindi spostato di 14 mm verso la sorgente rispetto al centro geometrico della camera.

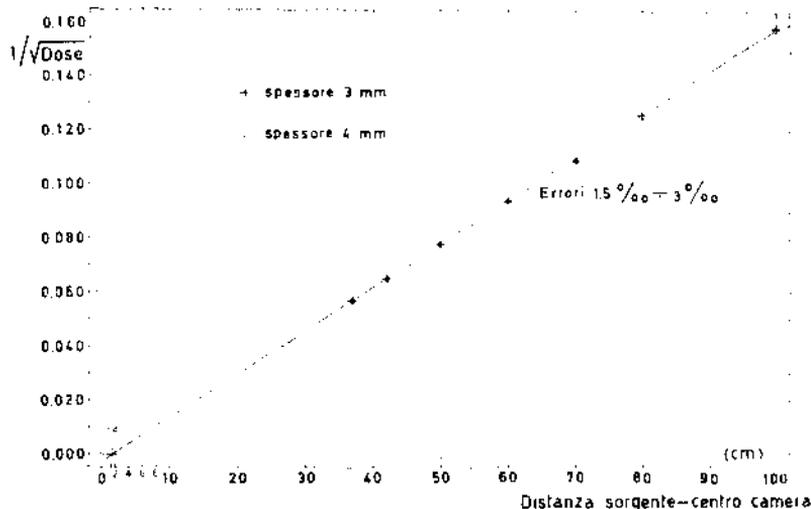


Fig. 4. — Verifica della legge «inverso del quadrato della distanza». Determinazione del centro effettivo della camera

### Curva di transizione

Per eseguire delle misure assolute è necessario estrapolare a spessore zero l'andamento della corrente misurata. Si deve quindi conoscere l'andamento della corrente in funzione dello spessore della camera; sono state fatte tre serie di misure rispettivamente alla distanza 50-65-110 cm fra la

camera e la sorgente. I risultati ottenuti risultano in buon accordo tra loro. La media è riportata in Fig. 5 (in unità arbitrarie corrente (distanza)<sup>2</sup>). La parte discendente della curva è stata estrapolata a spessore nullo con una esponenziale mediante il metodo dei minimi quadrati. Si ottiene un valore della corrente estrapolato pari a  $42,04 \pm 0,15$  in unità arbitrarie.

Per ogni spessore si è quindi valutato il fattore di correzione dato dal rapporto fra la corrente estrapolata a spessore nullo e la corrente misurata con lo spessore in esame. I fattori correttivi trovati sono riportati in Tab. 2.

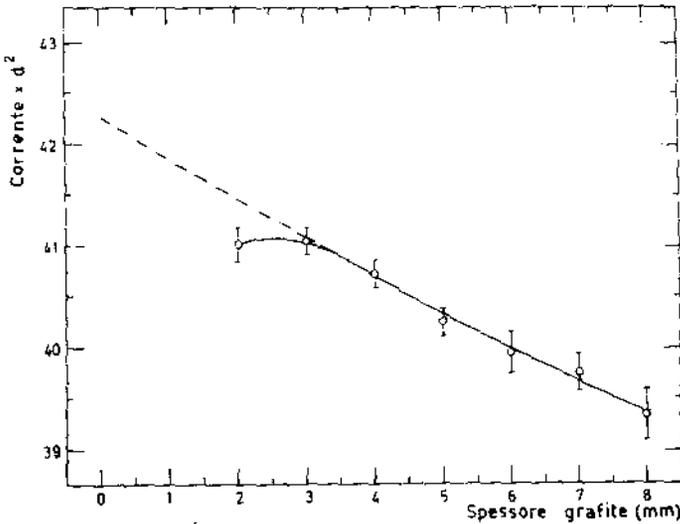


Fig. 5. — Curva di transizione; estrapolazione a spessore nullo

TABELLA 2

**Fattori correttivi per estrapolazione a spessore nullo**

Fattore estrapolazione spessore nullo	Spessori camera mm					
	3	4	5	6	7	8
$F_e$ . . . . .	1,0242	1,0319	1,0443	1,0520	1,0574	1,0684

*Misure della corrente dovuta all'irraggiamento*

La corrente rappresenta la grandezza fondamentale da misurare, il metodo di misura consiste nell'integrare in un condensatore la corrente di ionizzazione e nel misurare la tensione di carica e il tempo di raccolta.

Le condizioni sperimentali delle misure sono:

alimentazione  $V = 700$  Volt;

capacità  $C = 109,3$  pF;

spessore camera  $S = 4$  e  $5$  mm;

distanza sorgente-camera  $L = 40-50-70-90$  cm;

fondo scala dell'elettrometro  $27$  Volt.

Al valore sperimentale della corrente che così si determina ( $I$  sper.) deve essere sottratto il contributo dovuto alla radiazione diffusa  $I$  dif.  $I$  dif. =  $9,1 \cdot 10^{-16}$  A. Nella Tab. 3 sono riassunti i dati sperimentali relativi alla misura della corrente.

TABELLA 3

Dati sperimentali relativi alla misura della corrente

Distanza $L = \text{sorg-camera}$ mm $\Delta L = \pm 0,5$ mm	Tempi secondi	Tensione V	$I$ sper. $\times 10^{-12}$ A	$I$ corretta = $I$ sper. - $I$ dif. $\times 10^{-12}$ A $I = 1,5 \cdot 10^{-16}$ A
<i>Spessore camera 4 mm</i>				
400,0	1441,8	24,622	1,8663	1,8572
499,75	2358,4	25,481	1,1808	1,1717
700,75	4409,4	23,956	0,5937	0,5846
900,75	7460,0	24,495	0,3588	0,3497
<i>Spessore camera 5 mm</i>				
400,25	1550,0	25,834	1,8215	1,8124
500,0	2595,6	27,677	1,1653	1,1562
700,25	4639,8	24,903	0,5866	0,5776
900,5	8016,0	25,765	0,3513	0,3422

È importante rilevare che mentre alla distanza di 40 cm la correzione percentuale è  $I$  dif./ $I$  sper. = 0,48 %, alla distanza di 90 cm la stessa correzione diviene  $I$  dif./ $I$  sper. = 2,6 %. Inoltre poiché il contributo dovuto alla radiazione diffusa è stato misurato con un errore  $I = \pm 0,15 \cdot 10^{-16}$  A, per l'errore relativo si ha ad una distanza di 40 cm  $I/I$  sper. = 0,08 %, mentre alla distanza di 90 cm l'errore sale  $I/I$  sper. = 0,43 %.

*Misure assolute della costante specifica del radio*

Calcolati tutti i fattori correttivi e discusse le grandezze con i loro errori, si può determinare la costante specifica del radio, data per la nostra camera dall'espressione:

$$\Gamma = \frac{I \cdot t \cdot L^2}{g \cdot v \cdot F_0} \cdot \frac{ma \text{ (aria)}}{ma \text{ (grafite)}} \cdot \frac{ms \text{ (grafite)}}{ms \text{ (aria)}}$$

(in unità Roentgen.  $\text{cm}^2 \cdot \text{h}^{-1} \text{mg}^{-1}$ ) in cui:

I = corrente, unità e. s. u.;

t = numero di secondi per ora; 3600 S/h;

L = distanza sorgente-camera, in cm;

g = milligrammi di radio; 99,78 mg;

v = volume interno della camera; 45,61  $\text{cm}^3$ ;

$\frac{ma \text{ (aria)}}{ma \text{ (grafite)}}$  = rapporto coeff. massicci assorbimento; 0,999;

$\frac{ms \text{ (grafite)}}{ms \text{ (aria)}}$  = rapporto poteri frenanti; 1,001;

$F_0 = F_1 \times F_2 \times F_3 \times F_4 \times F_5 \times F_6$ ;

$F_1$  = correzione attenuazione nel platino; 0,9154;

$F_2$  = correzione autoassorbimento; 0,9867;

$F_3$  = correzione attenuazione nel plexiglass; 0,9949;

$F_4$  = correzione attenuazione aria;

$F_5$  = correzione temperatura, pressione e umidità;

$F_6$  = (correzione estrapolazione spessore nullo) $^{-1}$ ;

Introducendo nell'espressione i valori sperimentali della corrente I corretta e della distanza L riportati in Tab. 3, si ottiene per la costante specifica del radio la serie di valori riportati in Tab. 4.

TABELLA 4

**Costante specifica del Radio 226**

Distanza sorgente-camera in cm	Spessore camera	
	4 mm	5 mm
40 . . . . .	8,220	8,211
50 . . . . .	8,227	8,228
70 . . . . .	8,223	8,219
90 . . . . .	8,239	8,210

Il valore di  $\Gamma$  è stato determinato attraverso una misura indiretta (o assoluta); esso viene espresso attraverso una relazione matematica del tipo  $\Gamma = \Gamma(x_1, x_2, \dots, x_n)$  dove  $x_1, x_2, \dots, x_n$  sono le quantità che effettivamente vengono calcolate o misurate (nel nostro caso rappresentano i termini che appaiono nell'espressione della costante specifica).

Poiché gli errori sulle singole quantità non sono omogenei fra di loro essi sono stati trattati in modo da poter utilizzare, nel calcolo dell'errore totale finale, la legge della propagazione casuale degli errori, data dalle espressioni

$$(\Delta\Gamma)^2 = \sum_{i=1}^n (dx_i)^2 \cdot \left[ \frac{\partial\Gamma(x_i)}{\partial x_i} \right]^2$$

$$\frac{\Delta\Gamma}{\Gamma} = \sqrt{\sum_{i=1}^n \left[ dx_i \cdot \frac{\partial(x\Gamma_i)}{\partial(x_i)} \right]^2}$$

Eseguendo il calcolo si ottiene per tutte le distanze (40-50-70-90 cm) che l'errore relativo è inferiore all'1%. Nel considerare il risultato definitivo occorre tener presente infine che fra la taratura della sorgente e le misure sono trascorsi esattamente 4,2 anni; c'è quindi da apportare una ulteriore correzione per il decadimento della sorgente stessa (tenendo presente che il tempo di dimezzamento del radio è 1600 anni). Si ottiene un fattore correttivo  $F_d = 0,9982$ .

In definitiva, mediando sulle diverse distanze i valori ottenuti con i due spessori della camera, otteniamo per la costante specifica del radio i valori:

$$4 \text{ mm} = 8,242 \pm 0,07$$

$$5 \text{ mm} = 8,232 \pm 0,07$$

Nella Tab. 5 è riportato un quadro generale delle determinazioni della costante specifica del radio con camera a ionizzazione ottenute da altri ricercatori.

ATTIX & RITZ (1957) hanno analizzato le varie determinazioni e dedotto per la costante specifica un valore compreso fra 8,2 e 8,3. Successivamente l'I.C.R.U. (National Bureau of Standards - International Commission on

TABELLA 5

**Determinazioni della costante specifica del radio con camera a ionizzazione ottenute da altri ricercatori**

FRIEDRICH & SCHULZE (1935) . . . . .	7,8
MINDER (1937) . . . . .	8,0
MAYNEORD (1937) . . . . .	8,3
GRAY (a, b) (1937) . . . . .	8,4
KAYE & BINKS (1938) . . . . .	7,96
WHITE <i>et al.</i> (1940) . . . . .	8,47
DARDEN (1951) . . . . .	8,38
GHOSH (1953) . . . . .	8,44
SPENCER & ATTIX (1955) . . . . .	8,26
HENRY . . . . .	8,24

Radiological Units and Measurements) ha fissato nel 1959 (I.C.R.U., 1959) per la costante specifica il valore 8,25. Il valore  $x = 8,237 \pm 0,07$  da noi ottenuto come media tra le due determinazioni precedenti risulta in accordo con esso.

Ricevuto il 7 settembre 1974.

Accettato il 2 ottobre 1974.

#### BIBLIOGRAFIA

- ATTIX, F. H. & V. H. RITZ, 1957. *J. Res. Nat. Bur. Stand.*, **59**, 293.
- ATTIX, F. H., E. TOCHILIN & W. C. ROESCH, 1968 a. *Radiation Dosimetry*, vol. III, 624.
- ATTIX, F. H., E. TOCHILIN & W. C. ROESCH, 1968 b. *Radiation Dosimetry*, vol. I, 128.
- ATTIX, F. H., E. TOCHILIN & W. C. ROESCH, 1968 c. *Radiation Dosimetry*, vol. I, 122.
- BARNARD, G. P. & G. H. ASTON, 1960. *Effect of variation in the ambient air on the calculation and use of ionizations dosimeters.*
- BURLIN, T. E., 1964. *Brit. J. Radiol.*, **37**, 693.
- BURLIN, T. E., 1966. *Brit. J. Radiol.*, **39**, 727.
- CHIOZZOTTO, M., 1962. *Rapp. Lab. Fisica Ist. Super. Sanità*, **ISS 62/9-10**.
- CORMACK, D. V. & H. E. JOHNS, 1954. *Radiat. Res.*, **1**, 133.
- DARDEN, F. B. & C. W. SHEPPARD, 1951. *Oak Ridge National Laboratory Rep.* 1002.
- FRIEDIC, W. & R. SCHULZE, 1935. *Strahlentherapie*, **54**, 533.
- GHOSH, A., J. KASTNER & C. N. WHITE, 1953. *Nucleonics*, **11-6-70**.
- GRAY, L. H., 1937, a. *Brit. J. Radiol.*, **10**, 721.

- GRAY, L. H., 1937, b. *Proc. Roy. Soc. (London) (A)*, **159**, 263.
- HENRY, W. H., 1957. *Can. J. Phys.*, **36**, 149.
- HINE, G. J., 1952. *Nucleonics*, **10**, 9.
- HUBBELL, J. H., 1969. N.R.D.S.-N.B.S.-29-1969.
- I.C.R.U., 1959. *Handbook* 78.
- KAYE, G. W. & W. BINKS, 1938. *Amer. J. Roentgenol. Radium Therapy*, **40**, 80.
- KONDO, S. & M. L. RANDOLPH, 1960. *Radiat. Res.*, **13**, 37.
- MAYNEORD, W. V. & J. E. ROBERTS, 1937. *Brit. J. Radiol.*, **10**, 365.
- MINDER, W., 1937. *Acta Radiol.*, **17**, 761.
- MISSONI, G. & L. PUGLIANI, 1966. *Ann. Ist. Super. Sanità*, **2**, 731. 752.
- POLI CASTELLANI, G., 1964. *Rapp. Lab. Fisica Ist. Super. Sanità*, *ISS* 64/2.
- SPENCER, L. V. & F. H. ATTIX, 1955. *Rad. Res.*, **3**, 239.
- WHITE, T. N., L. D. MARINELLI & G. FAILLA, 1940. *Am. J. Roentgenol. Radium Therapy*, **44**, 889.
- YOUNG, M. E. J. & N. F. BATHO, 1964. *Brit. J. Radiol.*, **37**, 38.

**The Uppsala school in separation science  
and the development of bioaffinity chromatography(\*)**

JERKER PORATH

*Institute of Biochemistry, Uppsala, Sweden*

At the turn of this century P. T. Cleve and his students were studying the rare earths and transition elements in Uppsala pursuing traditions from Berzelius, Scheele and Bergman. One of the students, The Svedberg, became fascinated with colloid chemistry and particularly with the new theories put forth by Smoluchowski, Perrin and Einstein describing the kinetic behaviour of molecules and submicroscopical particles. Svedberg decided to make a contribution in proving these theories and, for this purpose, he invented among other kinds of instruments the ultracentrifuge. Robin Faraeus was that time professor in physiology in Uppsala and had just introduced the sedimentation rate method of red blood corpuscles as a diagnostic. Among others he strongly influenced Svedberg to use the ultracentrifuge for the studies of proteins, the molecular size of which was unknown at that time. For the remainder of his active time as a professor in physical chemistry, Svedberg divided his interest between protein and polymer chemistry. One of his many disciples, Arne Tiselius, chose to work in the former field and his major contributions to protein chemistry in late 1920's and 1930's were focused on the development of boundary electrophoretical analysis of proteins. Tiselius later turned to chromatography well realizing that isolation of the majority of proteins present in minute amounts in tissue extracts and serum required supplementary, more selective methods than those based on differential electrophoretic migration. He started with simple model systems such as amino acids, peptides, carbohydrates and aliphatic alcohols using charcoal as an adsorbent. Tiselius laid the foundation of some chromatographic techniques that are still in

---

(\*) Lecture held at the Istitato Superiore di Sanità on October 24th, 1973.

use today, such as frontal and displacement chromatography. Gradient elution which he and his associates introduced in 1950, is in fact more popular than ever.

Thus Svedberg and Tiselius founded a school in Uppsala in separation science. After the retirement and death of these two great pioneers, Stellan Hjertén and I in Uppsala, Harry Svensson-Rilbe in Gothenburg and Per-Ake Albertsson in Umea are following in their footsteps.

Together with Per Flodin, I introduced gel filtration or gel permeation chromatography in the 1950's (1). My first experiments were with granular starch in 1953 but the break-through came with the use of cross-linked dextran now called Sephadex. Poulsen, a South-african biochemist, and one of Svedberg's pupils (2) and Hjertén (3) extended the field of molecular size chromatography by introducing agar and agarose respectively as chromatographic media. We became interested in the use of agarose for the synthesis of immobilized enzymes (4) and thus entered a fascinating field in which Dinelli, Marconi and their colleagues here in Rome recently have made very substantial contributions. However, I will confine myself now to the use of an agarose as a base for biospecific adsorbents (4, 5). Before going into details of how we solved some of the technical problems of agarose gel chemistry I would like to remind you of the fractionation problems in immunochemistry.

Elvin Kabat and Michael Heidelberger were visiting research guests in Uppsala in 1930's. Tiselius and Kabat discovered that the  $\gamma$ -boundary proteins were associated with the antibodies which were consequently called  $\gamma$ -globulins. Since it was known that there are thousands of antibodies in serum, it was obvious that more selective methods were necessary for major advancement in the chemistry of these highly important proteins. An attractive solution to the problem is to make use of the specificity characteristic of the antigen-antibody complex formation. This has been known for well over half a century. Efforts were made in 1940's and 1950's to use immunosorption but success was not impressive.

The problems of enzyme isolation may be tackled in an analogous fashion by making use of the high specificity in formation of enzyme-substrate or enzyme-inhibitor complexes (5). In fact whenever a dissociable complex is formed, one of the complex partners may be isolated or at least purified by adsorption and subsequent desorption from a gel to which the complementary partner has been fixed preferably by a covalent bond. In 1959 I started some work along these lines. I realized that much fundamental work was needed before successful applications in general could be expected. As matrix substance cellulose and the newly discovered Sephadex were tried. Among early attempts I may mention that Roberto Strom from Rome tried to prepare an adsorbent for succinic dehydrogenase by

attaching a succinic acid ligand to Sephadex. Somewhat better results were obtained with biotin-Sephadex for isolation of biotin from egg-white (6). Much developmental work was necessary (7).

Let us first consider some of the conditions for chromatography based on specific complex formation. For successful application of bioaffinity chromatography it is necessary to find:

1) a carrier or matrix meeting a number of specified requirements, I will shortly mention;

2) a method for introduction of the ligand or the substance to form the specific adsorption center in the matrix;

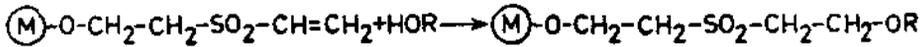
3) chromatographic conditions for efficient adsorption and desorption with regeneration of the adsorbent and high, preferably quantitative recovery of the substance to be purified or isolated.

I consider the introduction of gels for molecular sieving as a stage in the development of bioaffinity chromatography. The ideal molecular sieve is also the ideal matrix for biospecific adsorption. More than a decade of efforts finally resulted in the now available materials and methods which still have to be further developed. The matrix should be insoluble and mechanically rigid and preferably in the form of spherical beads. A prerequisite is of course permeability to make possible not only in and out diffusion of ligand and adsorbate substances but also their interaction to form the required specific complex or complexes. The matrix must be hydrophilic in nature and nonadsorbing. In addition it should be chemically resistant to chromatographic media yet convertible into reactive form(s) that permits ligand attachment.

We have found cross-linked agarose, desulphated in strong alkali, to most closely approach the ideal matrix (8). The gel is practically insoluble even at elevated temperature and can be safely autoclaved without change in the physical appearance. The beads retain their shape. There are reasons to believe that agarose and agar gels are fundamentally different in their tertiary structure from macro-reticular synthetic polymers and that they are better suited for our purpose. The permeability is only moderately affected by cross-linking as shown by the fact that particles such as poliovirus can effectively permeate extensively cross-linked 2% agarose. Since the matrix itself is of natural origin and consists of polygalactane, it is conceivable that substances which form complexes with galactose should be adsorbed to agar gel in the same way substances forming complexes with glucose can be adsorbed to Sephadex. This kind of specific adsorption has been used to isolate glucose-specific lectins from common vetch, *Vicia cracca* (9) and concanavalin from *Concanavalia ensiformis* (10). The lectin forms an adsorption complex with the dextran chains of the matrix. By introducing



Amines and alcohols can thus be coupled to form extremely stable substituted amines or ethers. Of particular importance is the simultaneous introduction of a long hydrophilic spacer. Another method studied is based on the one-sided reaction of divinyl sulfone with the matrix (14, 15, 17):



As for the bisoxirane coupling, cross-linking will simultaneously occur. The coupled product is less stable but the cross-linking results in a very large increase in rigidity of the gel — a considerable advantage in chromatography. The reactions with amines and alcohols take place more readily than with the other methods and we have found the method particularly valuable for coupling carbohydrates to agarose. The two last methods described are based on the formation of intermediates which are stable enough to permit storage for very long periods of time. Another and more important advantage is the fact that no ionic groups are introduced during the activation step. In the literature there is an increasing number of applications of bioaffinity chromatography to be found (18-24). The field is rapidly expanding and I should like only to give a few examples. In our studies on lectins we have found it expedient to use bio-specific adsorbents. I mentioned earlier the *Vicia cracca* lectin as an example. In most cases it is necessary to attach the carbohydrate forming the complex as a separate ligand rather than to have a specifically interacting matrix. For example, *Crotalaria juncea* bean lectin reacts specifically with galactose. One should therefore expect agarose to be an efficient adsorbent in itself. This is not at all the case because terminal galactose residues are necessary for the fit in the combining site of the lectin. A weak adsorbent may be made by limited hydrolysis. A strong adsorbent with high capacity is obtained by attaching galactose or lactose (25) to cross-linked agarose with the bisoxirane or divinyl sulfone method. In fact lactose-agarose has proved to be too strong for good performance, galactose is to be preferred as ligand. On passing *Crotalaria* bean extract through a bed of the adsorbent only lectin will be retained and it is effectively eluted by including lactose in the buffer. More than 200 times increase in activity is obtained in one step which yields the lectin in pure state. The column may be used repeatedly as it seems to have virtually unlimited durability.

Lectins such as concanavalin A and *Crotalaria juncea* lectin may now be attached to cross-linked agarose to give adsorbents specific for poly-

saccharides and glycoproteins. By using two or more adsorbents differing in specificity in sequence rather efficient fractionation of extracts and biological fluids can be achieved in a single stage if the columns are coupled in series. For example, *Crotalaria* lectin gel adsorbs  $\beta_2$ -lipoproteins, some  $\gamma$ -globulins and  $\alpha_2$ -macroglobulin. In addition to these substances, concanavalin lectin agarose adsorbs transferrin and a number of other minor components in the serum. Our goal is to develop a series of biospecific adsorbents for all common monosaccharides and their polysaccharides and protein derivatives.

Among other systems we studied in some detail I like to mention pancreatic juice (14, 15). Crude pancreatic extract is allowed to pass a column of agarose to which soy-bean trypsin inhibitor has been coupled. Trypsin, chymotrypsin and some other minor components are adsorbed. Use of low molecular weight inhibitors in large excess of the ligand of higher affinity will elute the enzymes selectively: tryptamine displaces chymotrypsin and benzamidine in turn trypsin. The substance then left on the column can be eluted non-specifically by lowering the pH.

The isolation of human carbonic anhydrase with sulfanilic amide agarose and Sephadex (26) can be mentioned as an example with a low molecular weight ligand forming a strong complex with a protein. There are two clefts in the enzyme molecule that fit the sulfanilamide, one of them forming the active site of the carbonic anhydrase. In human erythrocytes there are two isozymes called B and C of partly different amino acid composition. The bulk of proteins, of course, consists of hemoglobin which passes through the chromatographic bed without being retained. The two isoenzymes are adsorbed and can be subsequently eluted by potassium iodide and isocyanate respectively.

Recently Mosbach and his group in Lund, Sweden (27) and Barry and O'Carra, Galway, Ireland (28) have bound nucleotides to agarose via spacers for the isolation of cofactor dependent enzymes. Mosbach and coworkers were able to separate the five isozymes of lactic dehydrogenase by means of cofactor concentration gradients. We have not yet entered this field in Uppsala.

Many attempts are now being made to utilize bioaffinity chromatography for isolation of hormone receptors. It is likely that this selective kind of chromatography will prove itself extremely valuable but I think that considerable improvements are still needed both with respect to the properties of the adsorbents and particularly the technique of elution until the methods approaches the limits of its potentialities. Recently the interest has been raised for hydrophobic adsorption and its use for chromatographic separation of proteins. Adsorbents with amphiphilic (amphipatic) properties may perhaps be useful adsorbents for membrane bound proteins, lipoproteins,

glycolipids and other substances less easily purified and handled than those hithertofore studied.

Bioaffinity chromatography also provides us with methods for the study of molecular interactions between proteins, nucleic acids and low molecular weight solutes. These studies have hardly begun but they are likely to be rewarding particularly if a satisfactory theory can be worked out.

In conclusion: bioaffinity is likely to be much used in basic biochemistry and related fields for isolation of molecular species of small and large size molecular aggregates, membrane fragments subcellular particles, virus and cells. Chromatography will often be required but when diffusion rates set the limits batch-wise operations may be necessary. For the study of biostructures of higher order with bioaffinity adsorption it will be necessary to improve the methods now available and this can only be done if they are developed in parallel and in close connection with attempts to solve basic problems in biochemistry.

#### REFERENCES

- (1) PORATH, J. & P. FLODIN. *Nature*, **183**, 1657 (1959).
- (2) POLSEN, A. *Biochim. Biophys. Acta*, **50**, 565 (1961).
- (4) PORATH, J., R. AXEN & S. ERNBACK. *Nature*, **215**, 1491 (1967).
- (5) CUATRECASAS, P., M. WILCHEK & C. B. ANFINSEN. *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.*, **61**, 636 (1968).
- (6) PORATH, J. In: *Nobel Symposium 3, Gamma Globulins* p. 287 (1967). J. Killander, Ed. Almqvist et Wiksell, Stockholm and Interscience Publishers, New York, London, Sidney.
- (7) PORATH, J. *Nature*, **218**, 834 (1968).
- (8) PORATH, J., J.-C. JANSON & T. LAAS. *J. Chromatogr.*, **60**, 167 (1971).
- (9) ASPBERG, K., H. HOLMEN & J. PORATH. *Biochim. Biophys. Acta*, **160**, 116 (1969).
- (10) AGRAWAL, B. B. L. & I. J. GOLDSTEIN. *Biochem. J.*, **96**, 23C (1965).
- (11) AXEN, R., J. PORATH & S. ERNBACK. *Nature*, **214**, 1302 (1967).
- (12) AXEN, R., P. VRETBAD & J. PORATH. *Acta Chem. Scand.*, **25**, 1129 (1971).
- (13) AXEN, R. & P. VRETBAD. In: *Protides of the Biological Fluids*, **18**, 383 (1971). H. Peeters, Ed., Pergamon Press, Oxford and New York.
- (14) PORATH, J. & L. SUNDBERG. In: *Protides of the Biological Fluids*, **18**, 401 (1971). H. Peeters, Ed., Pergamon Press, Oxford and New York.
- (15) PORATH, J. & L. SUNDBERG. In: *The Chemistry of Biosurfaces*, **2**, 653 (1972). M. Hair Ed., M. Dekker Inc., New York 1972.
- (16) SUNDBERG, L. & J. PORATH. *J. Chromatogr.*, **90**, 87 (1974).
- (17) PORATH, J. in: *Methods in Enzymology, Enzyme Purification*, Part B, *Affinity Methods*, W. B. Jakoby & M. Wilchek, Eds., Academic Press, in press.
- (18) CUATRECASAS, P. & C. B. ANFINSEN. *Methods Enzymol.*, **22**, 345 (1971).
- (19) FRIEDBERG, F. *Chromatogr. Rev.*, **14**, 121 (1971).
- (20) PORATH, J. *Biochimie*, **55**, No. 8, 943 (1973).

- (21) TURKOVA, J. *J. Chromatogr.*, **91**, 267 (1974).
- (22) PORATH, J. & T. KRISTIANSEN. In: *The Proteins*, 3rd ed., H. Neurath and R. Hill, Eds., Academic Press, New York and London, in press.
- (23) O'CARRA, P. *Industrial Aspects of Biochemistry*, B. Spencer, Ed., FEBS, 107.
- (24) WILLIAMS, K. W. *Lab. Pract.*, **22**, 8, 591 (1973).
- (25) ERSSON, B. & J. PORATH (1974) to be published.
- (26) FALKBRING, S. O., P. O. GOTHE, P. O. NYMAN, L. SUNDBERG & J. PORATH. *FEBS Letters*, **24**, 229 (1972).
- (27) MOSBACH, K., H. GUILFORD, R. OELSSON & M. SCOTT. *Biochem. J.*, **127**, 625 (1972).
- (28) BARRY, S. & P. O'CARRA. *Biochem. J.*, **135**, 595 (1973).