

75. G. SCACCIA SCARAFONI, L. TENTORI e G. VIVALDI. — Erogatore di soluzioni a concentrazione variabile per cromatografia.

Riassunto. — Si richiamano alcuni sistemi usati nella tecnica di laboratorio per la separazione cromatografica su colonna da miscele di proteine e di peptidi eluite da soluzioni tampone aventi differenti tipi di gradienti di concentrazione e si descrive un apparecchio, costruito nell'officina dell'Istituto, che consente di erogare per sola gravità soluzioni tampone a concentrazione di pH o molare variabile nel tempo secondo un andamento preordinato qualunque.

Summary. — This paper deals first with some laboratory methods for chromatographic separation on pillar of protein and peptide mixtures eluated from bucer solutions having various type of concentration gradients. Afterwards the authors describe an apparatus, manufactured at the Institute's workshop, which allows to supply by gravity solutions at pH or molar concentration timely variable accordind to a pre-arranged course.

La tecnica della separazione cromatografica su colonna da miscele di proteine o di peptidi richiede la eluzione di queste sostanze dalla colonna mediante l'impiego di tamponi aventi differente pH o differente molarità. Tale condizione veniva nei primi tempi realizzata con una variazione discontinua degli eluenti sostituendo, in altre parole, i vari eluenti al momento ritenuto opportuno.

Tuttavia, in molte miscele le sostanze componenti presentano delle differenze poco accentuate nelle caratteristiche di eluzione; in queste condizioni sarebbero necessari frequenti e numerosi cambiamenti dell'eluente per ottenere un frazionamento accurato.

L'uso di gradienti continui del pH o della molarità del tampone di eluzione ha notevolmente facilitato la tecnica cromatografica, poichè con tale metodo vengono realizzate gradualmente le condizioni necessarie per la separazione dei singoli componenti della miscela. Inoltre nel caso delle sostanze che hanno tendenza ad essere eluite con un solo tampone, in bande larghe seguite da code, il sistema di eluzione con gradienti continui ha il vantaggio di rendere le bande più nette.

Nella figura 4 sono rappresentate schematicamente le possibili tecniche per la realizzazione di differenti tipi di gradienti continui di elu-

zione. Da essa appare evidente che, per ottenere un cambiamento nell'andamento del gradiente, è necessario cambiare completamente l'apparecchiatura con la quale esso è realizzato.

Appare chiara pertanto la convenienza di poter realizzare differenti tipi di gradiente con lo stesso apparecchio, in modo da poter pro-

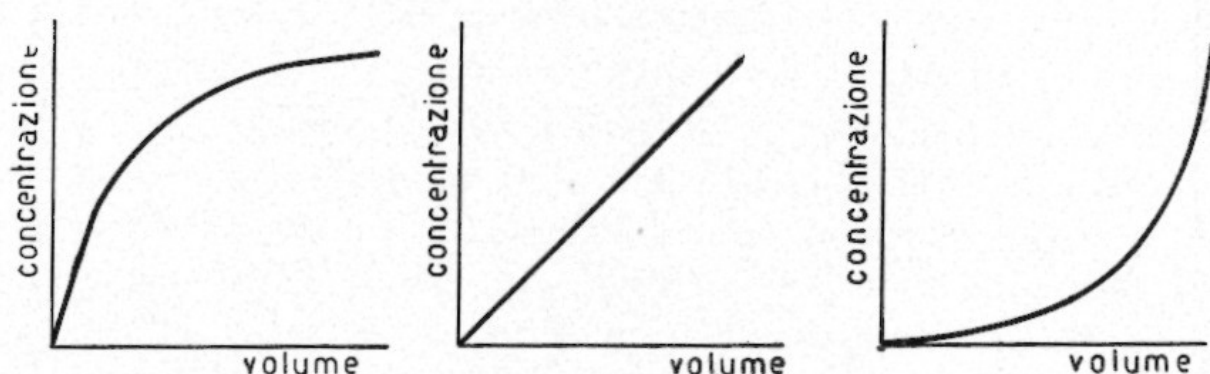
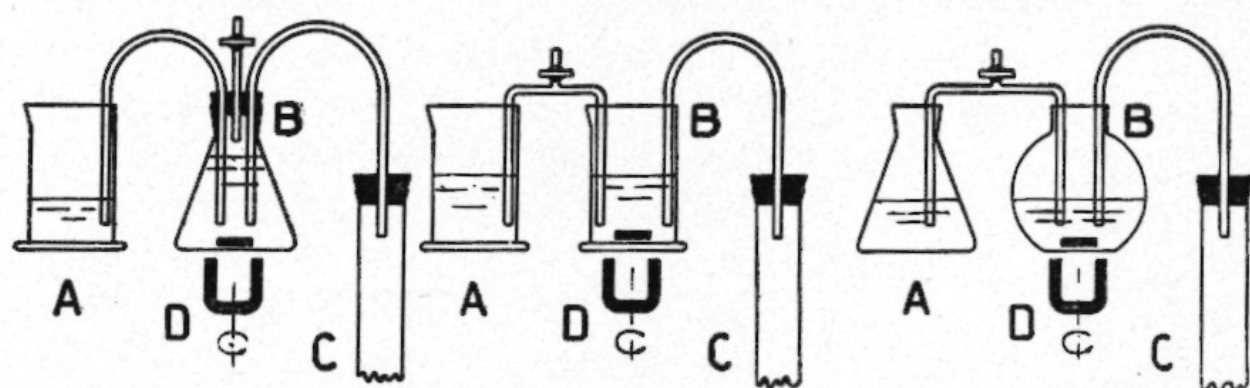


Fig. 4.

- A = Riserva soluzione tampone
- B = Camera di mescolamento
- C = Colonna cromatografica
- D = Agitatore magnetico

gettare l'andamento più utile della concentrazione molare o del pH del tampone in base ai risultati ottenuti in esperienze precedenti. PETERSON e SOBER ⁽¹⁾ hanno ideato un apparecchio per ottenere variazioni prestabilite di gradiente in maniera relativamente semplice con un apparecchio ora in commercio nelle sue versioni « Varigrad » da 3400 ml e « Autograd » da 2500 ml.

Nel corso delle ricerche che alcuni di noi svolgono sulla struttura delle emoglobine di anfibio ⁽²⁾ ci si è trovati di fronte alla necessità di costruire un simile apparecchio con i mezzi disponibili in Istituto.

Il dispositivo ha lo scopo di erogare per sola gravità una soluzione tampone a concentrazione di pH o molare variabile nel tempo (entro certi limiti non troppo estesi) secondo un andamento preordinato qualunque.

Seguendo tale criterio è stata esclusa la costruzione di un apparecchio con camere in perspex ed agitatori mossi dal basso, come nel « Varigrad » originale da 3400 ml di Peterson e Sober, che pure presenta alcune disposizioni operativamente molto comode.

Si è invece preso a modello l'« Autograd » costruito dalla Technicon Chromatography Corp. di New York, molto più semplice del pre-

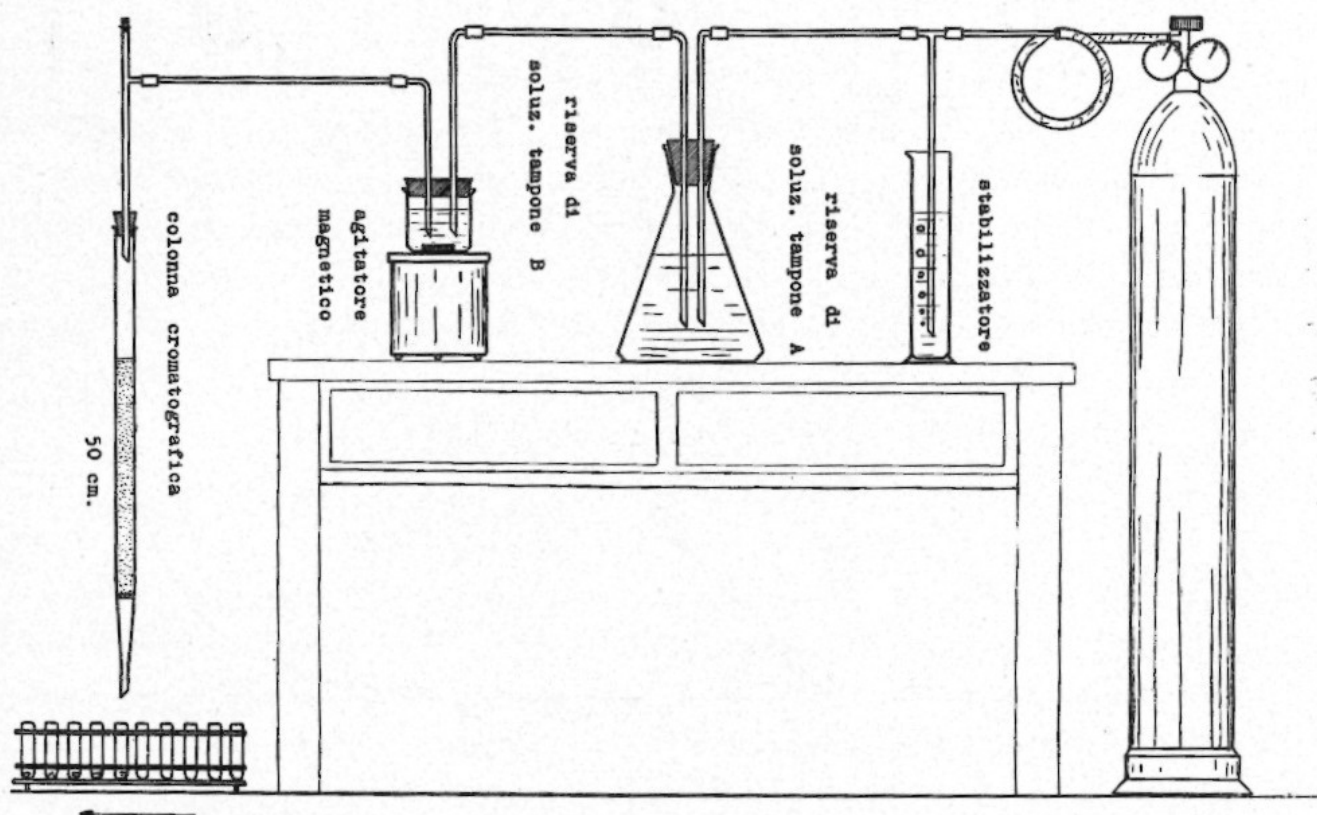


Fig. 2. - Apparecchiatura a due camere per cromatografia con soluzioni tampone a gradiente di pH o di molarità.

cedente. Le modifiche introdotte in esso adottando sistemi e dettagli meccanici di sicura riuscita e di più lunga durata riguardano soltanto quelle parti che non avrebbero influito sull'andamento della concentrazione della soluzione tampone eluente nè sulla predeterminazione del gradiente secondo i dati numerici contenuti nelle tabelle già predisposte.

Le caratteristiche principali delle parti fondamentali dell'apparecchio (fig. 2) sono le seguenti:

- n. camere 9;
- diametro interno mm. 47
- capacità normale compless. 2500 ml circa.

Particolare attenzione è stata riservata alla posizione relativa dei tubicini d'entrata e d'uscita delle soluzioni nonché al loro diametro ed alla lunghezza dei collegamenti. Il disegno di dettaglio riportato in fig. 3 chiarisce le disposizioni, i materiali impiegati e le dimensioni principali.

Anche gli agitatori rispecchano, nella parte sostanzialmente attiva, la disposizione dell'apparecchio originale essendo costituiti da palette di teflon larghe 32 mm e dello spessore di 3 mm.

L'incastellatura metallica che sostiene le nove camere ed il meccanismo agitatore che assicura il mescolamento continuo di ciascuna soluzione con quella che perviene dalla camera precedente, non presentano particolarità di rilievo. La prima è costituita da tre piatti in alluminio sostenuti da una colonnina centrale pure in alluminio ed ha per base un pesante supporto in ferro con viti calanti bloccabili e livella sferica per il controllo della complanarità delle camere. Tutte e tre le zampe della base sono munite di viti calanti a corsa lunga per consentire, con spostamenti verticali fissi, l'aggiustamento della posizione dell'apparecchio rispetto alla colonna cromatografica e per regolare la velocità di efflusso. Spostamenti più importanti e discontinui dell'apparecchio si possono ottenere variando l'altezza della mensola su cui esso appoggia, rispetto alle guide della incastellatura di sostegno.

Per quello che riguarda il sistema di agitazione, la parte in cui ci si è discostati alquanto dalle disposizioni dell'« Autograd » di costruzione Technicon è nella trasmissione di movimento degli agitatori: un motorino da 10 W del tipo SAPMI a velocità fissa e con riduttore incorporato è montato sul coperchio dell'apparecchio in posizione centrale e trasmette il moto a nove pulegge in tela bachelizzata calettata su altrettanti alberini il cui asse coincide con quello delle camere. La trasmissione è assicurata da una cinghietta costituita da una lunga molla elicoidale in acciaio armonico ed il rapporto tra la puleggia motrice e quelle trascinate è tale che queste compiono circa un giro al secondo. Il senso di rotazione delle pulegge mosse risulta destro per quelle di posto pari e sinistro per quelle di posto dispari.

Gli alberini sono in acciaio inossidabile e girano su boccole in ottone molto ben protette dall'umidità del particolare ambiente in cui devono lavorare senza richiedere lubrificazione. Gli stessi alberini portano appese con ganci le palette agitatrici in teflon il cui centramento rispetto alle rispettive camere è assicurato dalla sola gravità: qualunque sforzo anormale è così evitato alle parti mobili del meccanismo. Anche il bloccaggio manuale di una qualsiasi palette trova nel conseguente slittamento delle cinghiette un elemento di protezione per il motore. Il motore e tutto il sistema di trasmissione del moto sono rac-

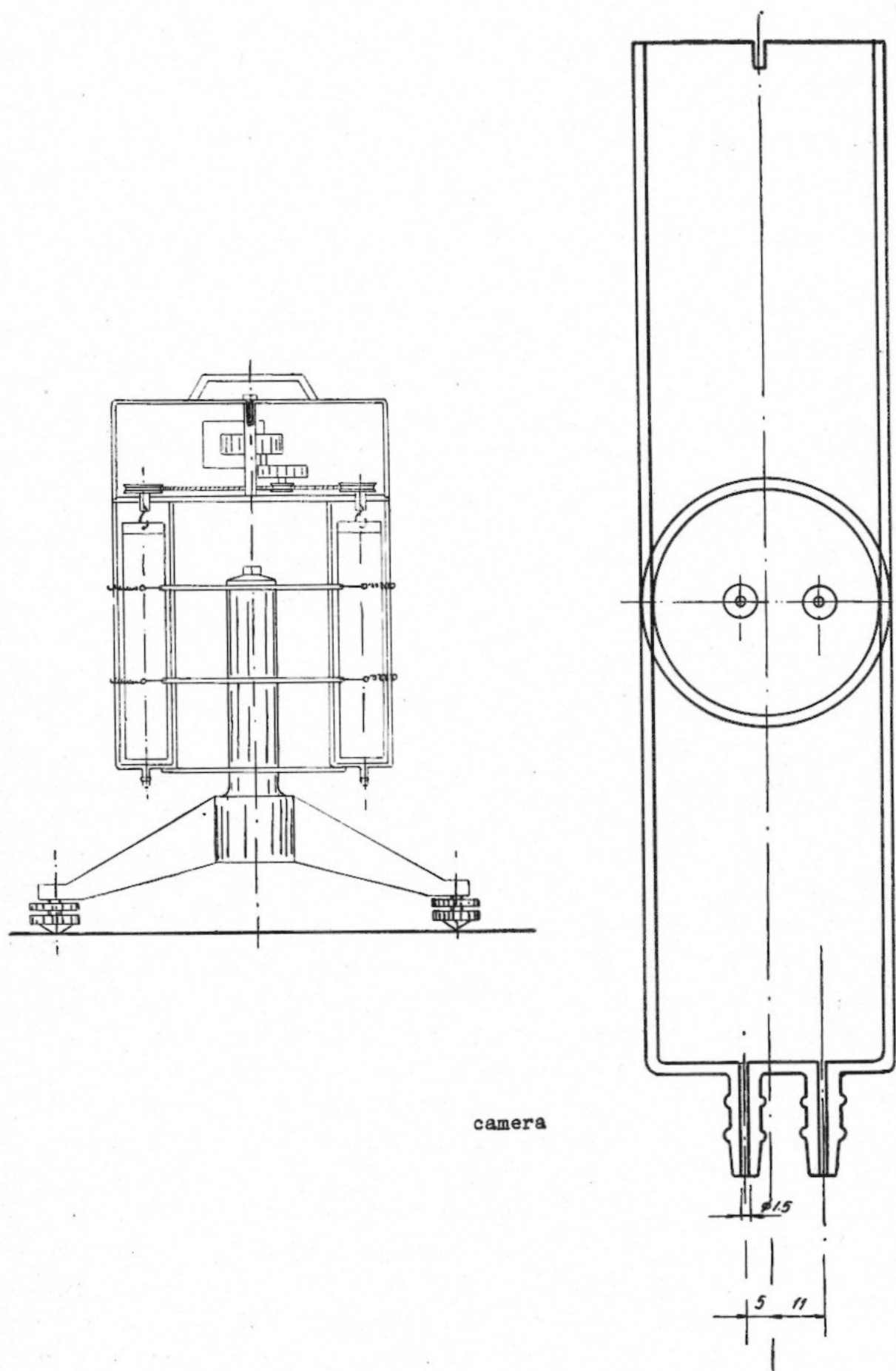


Fig. 3. - Apparecchio tipo « Autograd » costruito nell'Istituto.

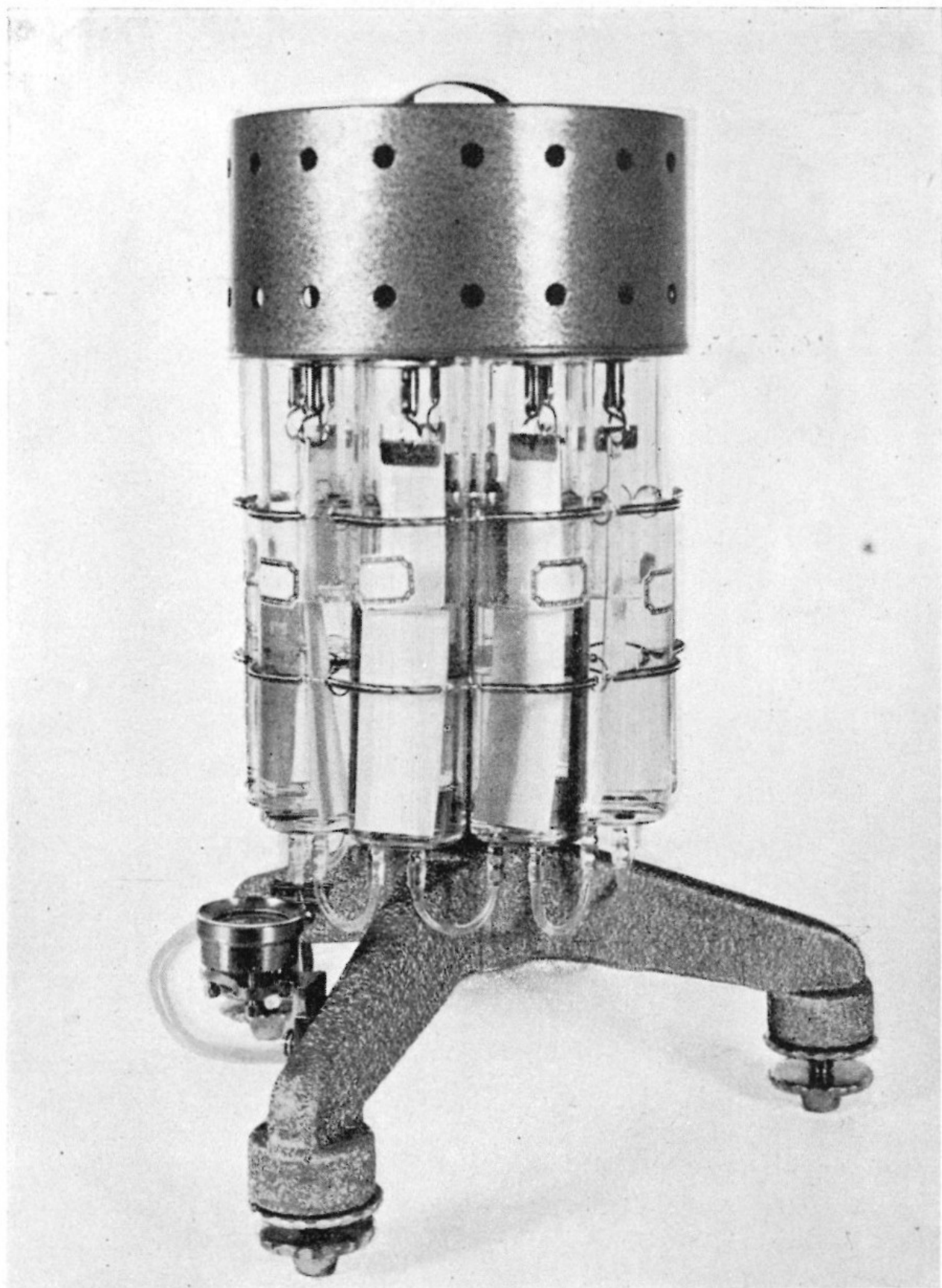


Fig. 4.

chiusi in un coperchio e normalmente non abbisognano di interventi; non vi sono contatti elettrici e si è ommesso anche un interruttore per evitare elementi esposti al lento attacco dell'umidità. L'arresto dello

agitatore è ottenuto semplicemente sfilando la spina del cordone di alimentazione dalla presa.

L'apparecchio ha subito il collaudo di sei mesi di lavoro sperimentale. In ogni occasione la curva del gradiente di eluzione ottenuta ha dimostrato una esatta corrispondenza con quella che era stata di volta in volta progettata e calcolata per realizzare le condizioni sperimentali più opportune.

Gli AA. ringraziano il Sig. V. Tulli che ha collaborato per la realizzazione pratica dell'apparecchio.

Roma — Istituto Superiore di Sanità - Laboratori di Ingegneria e Laboratori di Biologia.

BIBLIOGRAFIA

- (¹) PETERSON E. A. e SOBER H. A. - A Laboratory Manual of Analytical Methods of protein chemistry - vol. I, pag. 88 - Pergamon Press, Oxford, 1960.
- (²) TENTORI L., VIVALDI G., CARTA S. e SALVATI A. M. - Questi Rendiconti (in corso di stampa).