

Appunti di Tecniche avanzate per il controllo degli alimenti

Parte 1

ZEPPA G. – BELVISO S.
Università degli Studi di Torino



❖ *Obiettivi formativi*

- ✓ Fornire informazioni sulle tecniche analitiche-strumentali avanzate applicate all'analisi degli alimenti
- ✓ Esercitare lo studente ad orientarsi nella scelta di approcci metodologici idonei alla soluzione di specifici problemi analitici
- ✓ Esercitare lo studente all'elaborazione e all'interpretazione del dato analitico

❖ *Risultati attesi*

- ✓ Conoscenza delle tecniche principali e più avanzate di analisi degli alimenti
- ✓ Capacità di scegliere approcci metodologici adatti alla soluzione di problemi analitici
- ✓ Capacità di elaborare e interpretare in modo critico il dato analitico

❖ *Dove studiare*

- ✓ Appunti
- ✓ Lucidi (www.giuseppezeppa.it)
- ✓ Testi indicati nelle slides

❖ *Il blog*

- ✓ Sul sito www.giuseppezeppa.it è attivo un blog suddiviso in argomenti. E' possibile utilizzarlo per domande, dubbi, chiarimenti. Le risposte verranno fornite direttamente sul blog o in aula se di interesse comune

❖ *Esame*

- ✓ Prova scritta con 5 domande aperte

Testi per lo studio

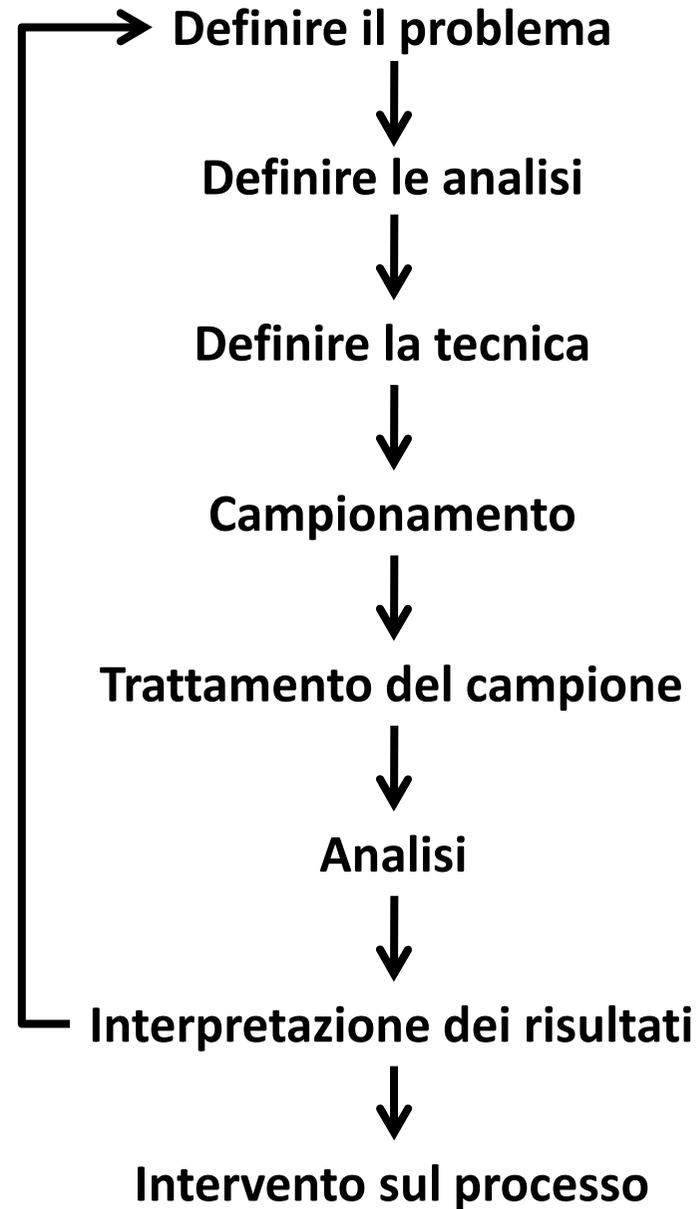
- Cabras P., Tuberoso C.I., *Analisi dei prodotti alimentari*, 2013, Piccin Nuova Libreria.
- Daniel C. Harris, *Chimica Analitica Quantitativa*, Zanichelli, 2005, Seconda Edizione Italiana.
- Andrea Polesello, Stefano Polesello, Silvia Guenzi, *Strumenti per il laboratorio chimico e biologico vol. I - Le tecniche spettrometriche e fisiche*, Morgan Edizioni Tecniche, 2005.
- Stefano Polesello, Andrea Polesello, Silvia Guenzi, Claudio Roscioli, *Strumenti per il laboratorio chimico - biologico vol. II - Le tecniche separative*, Tecniche Nuove, 2007.
- Fernando Tateo, *Lezioni di chimica analitica strumentale*, E. Lubian & S. Martello, vol. 1, Università degli Studi di Milano, 1997.
- D.A. Skoog, F.J. Holler, S.R.Crouch, *Chimica Analitica Strumentale* II ediz. 2009, EdiSES, Napoli.
- S. Suzanne Nielsen (Ed.), *Food Analysis*, Fourth edition, Springer, 2010.

Le analisi

Perché le analisi ?

- Fatte salve alcune situazioni particolari (es. confezionamento) le analisi (chimiche, fisiche, microbiologiche, sensoriali) sono l'UNICO modo che il tecnologo ha per «controllare» il processo produttivo
- Affinchè il «controllo» sia efficace bisogna definire correttamente cosa, quando e come
- Un errore in questa fase determina mancato controllo e dispendio di risorse economiche
- In campo chimico le analisi si possono suddividere in «analisi di base» (pH, acidità totale, grasso etc...) ed «analisi avanzate» (gas-cromatografia, NIR, spettrometria di massa etc...)
 - negli ultimi anni anche quelle di base sono effettuate con tecniche avanzate (es. NIR)

CONTROLLO ANALITICO DI PROCESSO



È piuttosto difficile fare una classificazione delle tecniche analitiche applicate all'analisi degli alimenti → Tipicamente le metodiche di analisi degli alimenti vengono classificati in:

- ✓ tecniche di preparazione del campione (estrazione in fase solida, estrazione con fluidi supercritici, spazio di testa, purge and trap, ecc)
- ✓ tecniche separative (cromatografia liquida ad alte prestazioni, gas cromatografia, elettroforesi capillare, ecc)
- ✓ tecniche spettroscopiche (spettrometria di massa, risonanza magnetica nucleare, infrarossi, spettroscopia atomica, fluorescenza, ecc)
- ✓ tecniche biologiche (reazione a catena della polimerasi, tecniche immunologiche, biosensori, ecc)
- ✓ tecniche accoppiate

Come scelgo la tecnica analitica?

Alcuni criteri per la scelta della tecnica analitica possono essere:

- ✓ In base al tipo di analita, molecola (tralasciando la macro-compositiva)
- ✓ In base alla strumentazione presente in laboratorio
- ✓ In base al tipo di applicazione (metodica convenzionale vs metodica rapida)

Il campionamento

Il campionamento

- Fase **fondamentale** per l'analisi di un materiale/prodotto è il campionamento
- Se il campione non è rappresentativo o corretto tutte le fasi successive sono inutili
- E' buona norma NON delegare il campionamento per poter meglio interpretare i risultati ottenuti dalle analisi
- Importante definire quando – come – dove – quanto campionare
- Esistono indicazioni (ISO 2859-4:2002; Direttiva CE 22/2004) sulla numerosità campionaria → da utilizzarsi per controlli di qualità
- Se necessario utilizzare procedure certificate/standardizzate
- Problemi di conservazione del campione
 - ✓ Riscaldamento
 - ✓ Raffreddamento
 - ✓ Antimicrobici

La **PREPARAZIONE DEL CAMPIONE:**

- ✓ E' un passaggio CRUCIALE di un'analisi (ricerca di analiti in matrici complesse come gli alimenti)
- ✓ Può richiedere sino all'80% del tempo totale di analisi
- ✓ Include varie operazioni: macinazioni, dissoluzioni, diluizioni, precipitazioni, filtrazioni, centrifugazioni, concentrazioni, rimozione o mascheramento di interferenti, trasformazioni quali derivatizzazioni, estrazioni etc..

Alcune tecniche di preparazione del campione basilari

- macinazione



Mortaiò e pestello



Mulino analitico a ROTORE
(denti+setaccio)



Mulino analitico a COLTELLI (lame
con lato smussato e lato tagliente)



Mulino analitico a MORTAIO
(pressione+frizione)



Mulino analitico a SFERE in N₂
liquido (criomacinazione)

● adatto / ◐ adatto con limitazioni / - non adatto

<http://www.retsch.it/it/prodotti>

Pezzatura in ingresso / uscita

			Materiali da costruzione	Suolo, fanghi di depurazione	Prodotti chimici	Rifiuti elettrici	Mangimi	Vetro, ceramiche	Legno, ossa, carta	Carbone, coke	Plastica, cavi, gomma	Alimenti	Pelle, tessuti	Minerali, scorie, rocce	Prodotti farmaceutici	Piante, fieno, paglia	Combustibili secondari
Frantoi a Mascelle																	
BB 50	40 mm	500 µm	●	◐	◐	-	-	●	◐	●	-	-	-	●	-	-	-
BB 100	50 mm	4 mm	●	◐	◐	-	-	●	-	●	-	-	-	●	-	-	-
BB 200	90 mm	2 mm	●	◐	◐	-	-	●	-	●	-	-	-	●	-	-	-
BB 300	130 mm	5 mm	●	◐	◐	-	-	●	-	●	-	-	-	●	-	-	-
Mulini a rotore																	
ZM 200	10 mm	40 µm	◐	◐	●	●	●	-	●	●	●	●	●	◐	●	●	●
SR 300	25 mm	50 µm	◐	◐	●	-	●	-	◐	◐	◐	●	◐	◐	●	◐	-
SK 300	25 mm	100 µm	◐	◐	◐	◐	◐	◐	-	●	-	-	◐	●	◐	-	◐
Twister	10 mm	250 µm	-	-	-	-	●	-	-	-	-	●	-	-	◐	●	-
Mulini a coltelli																	
GM 200	40 mm	300 µm	-	-	◐	-	●	-	-	-	-	●	-	-	●	◐	-
GM 300	130 mm	300 µm	-	-	◐	-	●	-	-	-	-	●	-	-	●	◐	-
Mulini a taglienti																	
SM 100	80x60 mm	250 µm	-	-	◐	◐	●	-	◐	◐	◐	●	●	-	◐	●	◐
SM 200	80x60 mm	250 µm	-	-	◐	●	●	-	●	◐	●	●	●	-	◐	●	●

- agitazione



Agitatore MECCANICO AD ASTA



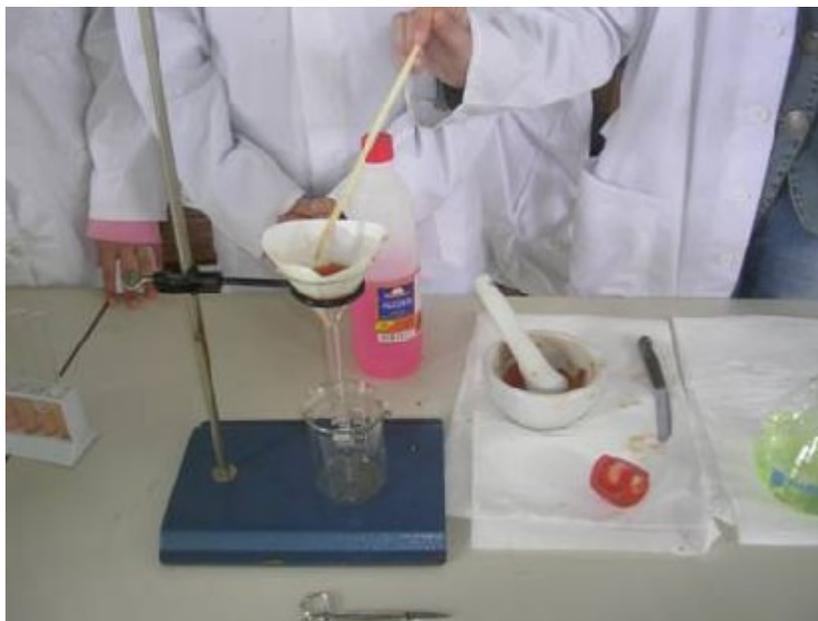
Agitatore MAGNETICO



Agitatore A SCUOTIMENTO

- filtrazione

Filtrazione su carta



Filtrazione
con imbuto Buchner



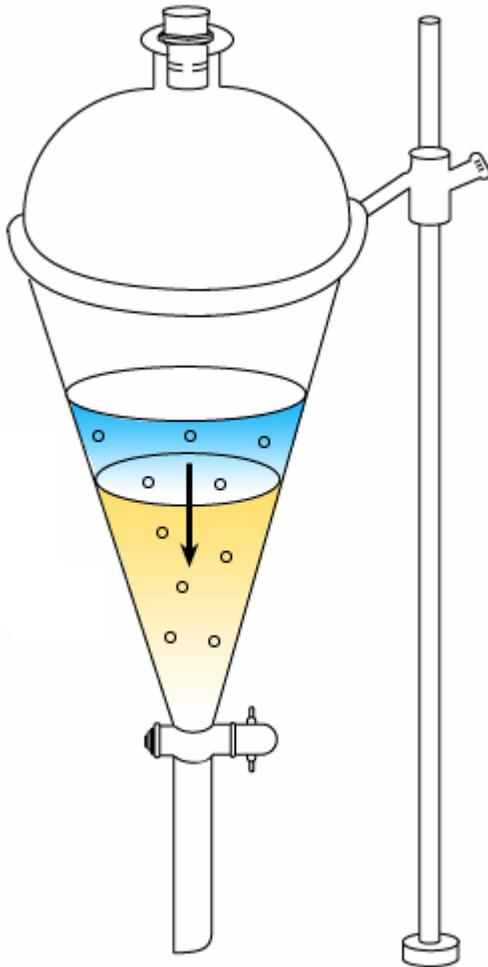
- centrifugazione

L'estrazione

Estrazione

- Trasferimento di analiti da una fase all'altra
- Operazione necessaria per SEPARARE gli ANALITI dagli INTERFERENTI presenti nella MATRICE (in questo caso MATRICE = ALIMENTO) e quindi di CONCENTRARLI
- Si basa sulla legge della ripartizione di Nerst: un composto si distribuisce tra due fasi immiscibili con un rapporto costante tra le concentrazioni nelle due fasi
- Ogni sostanza ha un suo coefficiente di ripartizione per i liquidi polari e quelli apolari

ESTRAZIONE LIQUIDO-LIQUIDO (LLE)



Il composto organico da separare ovviamente dovrà essere molto solubile, per poter essere trasferito quantitativamente, nella fase organica mentre le sostanze inorganiche rimarranno disciolte nella fase acquosa.

Il solvente organico deve soddisfare i seguenti requisiti:

- **Sciogliere facilmente l'analita**
- **Non reagire con l'analita**
- **Non reagire con acqua od essere miscibile in essa**
- **Possedere un punto di ebollizione sufficientemente basso**

**IMBUTO
SEPARATORE**

La scelta del solvente di estrazione per la separazione e la pre-concentrazione di un analita dalla matrice, è dettata da alcune considerazioni:

- ✓ alto coefficiente di distribuzione per l'analita e basso per le impurezze indesiderate
- ✓ viscosità bassa e differenza di densità tali da evitare la formazione di emulsioni
- ✓ bassa tossicità e infiammabilità
- ✓ facilità di recupero del soluto dal solvente per le successive determinazioni analitiche.

- Se il solvente organico deve essere evaporato dopo l'estrazione può essere necessario **allontanare EVENTUALI impurezze d'acqua aggiungendo una sostanza essiccante come Na_2SO_4 o MgSO_4**
- Nella scelta del solvente si devono considerare anche altri aspetti "pratici" quali **costo, tossicità, infiammabilità**
- Anche la **volatilità è un parametro importante da considerare**; infatti solventi con basso punto di ebollizione ($< 35\text{ °C}$) sono spesso scelti perché permettono di isolare ed essiccare facilmente l'analita.

In generale: molte estrazioni con piccoli volumi di fase estraente sono più efficaci (rimane una frazione minore di soluto in fase acquosa) di una sola estrazione con un maggiore volume di estraente.

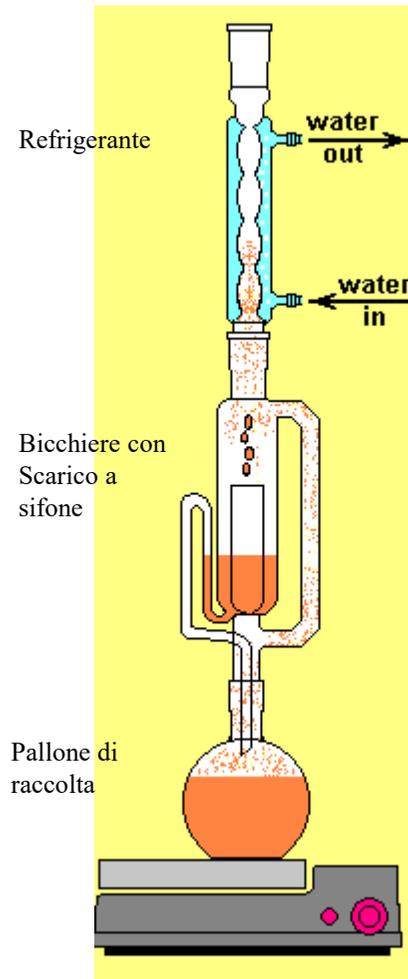
SVANTAGGI

- ✓ Uso di solventi (costi, gestione, stoccaggio)
- ✓ Problemi legati tanto all'esposizione degli operatori, quanto allo smaltimento
- ✓ Tempi d'analisi piuttosto lunghi
- ✓ Solventi a volte incompatibili con gli strumenti necessari alla quantificazione dell'analita

ESTRAZIONE SOLIDO-LIQUIDO

- L'estrazione solido-liquido, detta anche lisciviazione, è l'operazione mediante la quale un soluto disperso matrice solida inerte (cioè senza alcuna affinità per il soluto) viene estratto mediante solvente liquido, anch'esso inerte.
- Mentre esistono diverse possibilità per separare le soluzioni, l'estrazione solido-liquido è in pratica l'unica tecnica per separare un soluto in miscela intima in una matrice solida; nel caso di soluti liquidi, si può procedere con la pressatura, come con alcuni semi oleaginosi o con le olive, ma la resa d'estrazione non può essere elevatissima.

ESTRATTORE SOXHLET



Introdotta da Franz Van Soxhlet nel 1873; riconosciuto come METODO UFFICIALE per le SOSTANZE GRASSE totali degli alimenti.

Si basa sull'estrazione del solido, in ditali filtranti di cellulosa o fibra di vetro, posti in un bicchiere con scarico a sifone, situato sotto un refrigerante a ricadere e collegato al pallone (con il solvente) mediante un giunto. Il vapore del solvente in ebollizione giunge al refrigerante, viene condensato e rifluisce nel ditali, rimanendo a contatto con il campione fino a raggiungere il livello del sifone che scarica l'estratto nel pallone riprendendo il ciclo. Dopo vari cicli di riempimento e autodrenaggio della camera di filtrazione, gli analiti estratti vengono recuperati nel pallone. Gli estratti vengono preconcentrati mediante evaporazione del solvente (come in LLE).

Mediante estrazione con Soxhlet si può utilizzare qualunque solvente volatile. Vengono frequentemente impiegati **ESANO, ETERE DI PETROLIO, ACETONE, DIETILETERE.**

SVANTAGGI:

- ✓ utilizzo di solventi (costo, gestione, stoccaggio)
- ✓ utilizzo di elevate quantità di solventi organici
- ✓ procedimento molto lungo (da 6 ore a 2 giorni)



SISTEMA SOXHLET MODIFICATO RANDALL (ESTRATTORE SELETTIVO SOXHLET E RANDALL)



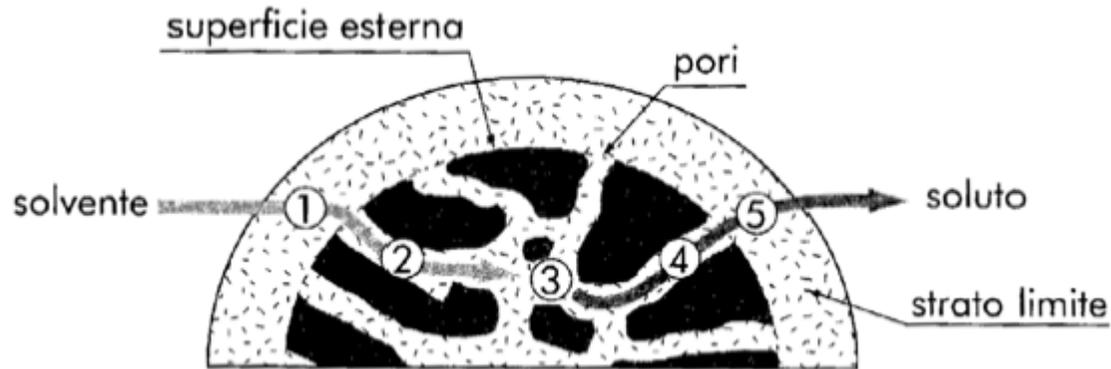
Un secolo dopo Randall combina l'estrazione in fase di vapore a riflusso con l'estrazione in fase liquida Soxhlet riducendo i tempi di estrazione.

Il solvente in fase di vapore passa in continuo attraverso il ditale invece di essere sifonato; il processo si svolge in tre fasi:

- 1) Immersione del ditale nel solvente in ebollizione (solubilizzazione rapida dei composti estraibili)
- 2) Lavaggio del ditale con il solvente liquido riflussato dal refrigerante
- 3) Evaporazione del solvente per immissione di gas o a pressione ridotta



Cosa succede durante l'estrazione solido – liquido?

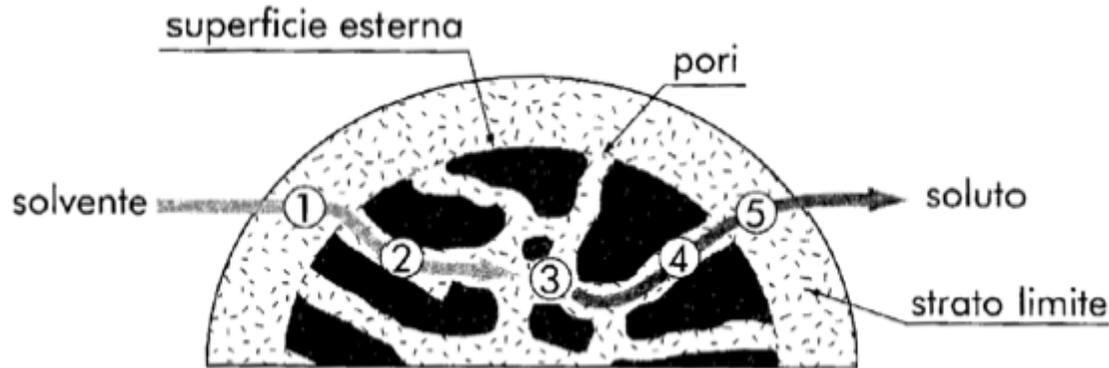


Quando un solvente viene aggiunto ad un solido che contiene un soluto avvengono in sequenza questi fenomeni:

1. diffusione del solvente dalla massa della soluzione alla superficie del solido attraverso lo strato limite;
2. il solvente penetra nel solido bagnandolo e riempiendo tutte le microporosità in esso contenute e finendo per costituire al suo interno una fase imbibente continua;
3. il soluto disperso nel solido si scioglie nel solvente creando così, all'interno del solido una soluzione relativamente concentrata in soluto;
4. la differenza di concentrazione del soluto fra la soluzione relativamente concentrata, che è all'interno del solido, e quella diluita, che è all'esterno, genera una diffusione del soluto verso l'esterno;
5. diffusione del soluto attraverso lo strato limite nella massa della soluzione.

- La diffusione si arresta quando la concentrazione del soluto è la stessa nella soluzione che imbibisce il solido e in quella che bagna esternamente il solido.
- Dopo aver raggiunto tale condizione di equilibrio (che in teoria richiede un tempo infinito, ma in pratica tempi finiti e ragionevoli) si procede alla separazione meccanica della soluzione dai solidi inerti. Questa operazione può essere fatta con sgrondatura, filtrazione, centrifugazione o spremitura. → Se, in questa fase, fosse possibile separare tutta la soluzione dai solidi inerti, tutto il soluto risulterebbe estratto e l'operazione sarebbe così conclusa con una resa di estrazione del 100%
- Invece, per quanto sia efficace la separazione, ci sarà sempre una certa quantità di soluzione che rimane nei solidi (soluzione imbibente) e dunque la resa di estrazione (quantità di soluto estratto rispetto alla quantità di soluto presente inizialmente nei solidi) sarà inferiore al 100%.
- Si può intervenire allora con una seconda operazione consistente nell'aggiungere al solido imbibito una nuova quantità di solvente. Questa nuova aggiunta riproduce una nuova situazione di gradiente fra la soluzione più concentrata all'interno dei solidi e la soluzione più diluita all'esterno. Inizia allora una nuova fase di diffusione fino a che la concentrazione di soluto all'interno e all'esterno dei solidi è uguale.
- Ripetendo l'operazione di separazione meccanica un'ulteriore frazione di soluto viene estratta e il solido risulta imbibito di una soluzione più diluita della precedente.
- Questa sequenza di “aggiunte di solvente-diffusione-separazione” può essere ripetuta finché si considera soddisfacente la resa di estrazione e tollerabile la quantità di soluto che rimane nella soluzione imbibente dei solidi.
- L'estrazione solido-liquido comprende due fasi principali:
 - diffusione del soluto e uguaglianza della concentrazione della soluzione imbibente e della soluzione libera
 - separazione della soluzione dai solidi

Cosa succede durante l'estrazione solido – liquido? Modello fenomenologico



La diffusione è descritta dalla legge di Fick:

$$C = \frac{dm_c}{dt} = \frac{D}{s} \cdot A_i \cdot (x_s - x)$$

dove:

C = è la portata istantanea di soluto che diffonde dal solido nella soluzione (kg/s);

m_c = è la massa di soluto C (kg);

t = è il tempo (s);

D = è il coefficiente di diffusione (kg/s · m);

s = è lo spessore dello strato limite (m);

A = è l'area interfacciale (m²);

x_s = è la concentrazione in frazione del soluto nella soluzione satura sulla superficie del solido;

x = è la concentrazione in frazione del soluto nella massa della soluzione.

Fattori che influenzano il processo:

- Dimensioni delle particelle. Al diminuire delle dimensioni aumenta l'area interfacciale e si accorciano i percorsi diffusivi all'interno dei pori. Aumenta perciò la velocità della diffusione ma aumentano anche le perdite di carico, specie in controcorrente. Se possibile si riducono le dimensioni del solido in modo non uniforme, dandogli forme in cui almeno una dimensione sia molto piccola, così da avere un piccolo spessore almeno in una direzione, mentre nelle altre le dimensioni non piccole evitano un eccessivo impaccamento (bietole tagliate in fettucce, i semi in scaglie, ecc). Al diminuire delle dimensioni delle particelle, aumentano anche le difficoltà della separazione solido-liquido, specie se la differenza di densità è piccola.
- Temperatura. Aumentando la temperatura, aumenta il coefficiente di diffusione (diminuisce la viscosità). Aumenta in genere anche la solubilità delle sostanze da estrarre anche per effetto di rottura delle pareti cellulari. Un eccessivo aumento può provocare reazioni secondarie, perdita di selettività e possibili perdite di solvente per l'aumento della tensione di vapore
- Pressione. Ha soprattutto influenza nell'estrazione con solventi in condizioni gas. Variando la pressione si riesce a modulare la solubilità del soluto, rendendone così agevole il suo recupero.
- Agitazione. Un agitazione della soluzione aumenta la turbolenza, fa diminuire lo spessore dello strato limite, mantiene più uniforme la concentrazione nella massa della soluzione e migliora lo sfruttamento dell'area interfacciale prevenendo la sedimentazione del solido.

→ Tipo di solvente. I criteri di scelta sono molteplici:

- Selettività
- Capacità del solvente. Indica la massima concentrazione che il soluto può raggiungere in quel solvente. Maggiore è la capacità, minore è la quantità di solvente richiesta
- Tossicità, pericolosità e impatto ambientale
- Tensione di vapore. Poiché l'estrazione richiede la susseguente separazione dell'estratto in soluto e solvente, l'efficacia e il costo di questa separazione può dipendere dalla tensione di vapore del solvente in relazione al metodo scelto. Tanto più è elevata la tensione di vapore tanto maggiore può risultare l'impatto ambientale, in relazione alla tossicità del solvente, per la maggiore facilità di un suo rilascio nell'ambiente.
- Stabilità termica
- Viscosità. E' bene che sia la più bassa possibile per favorire il trasporto di massa tra le due fasi, possibilmente inferiore a 10 mPa ·s.
- Costo. E' importante soprattutto in relazione al consumo di solvente.

→ Tempo. All'aumentare del tempo di contatto aumenta la quantità di soluto estratto ma diminuisce la forza spingente ($x_s - x$). Operare con tempi di contatto brevi significa perciò operare con un'elevata forza spingente ma porta ad estratti più diluiti.

→ Rapporto solido/solvente

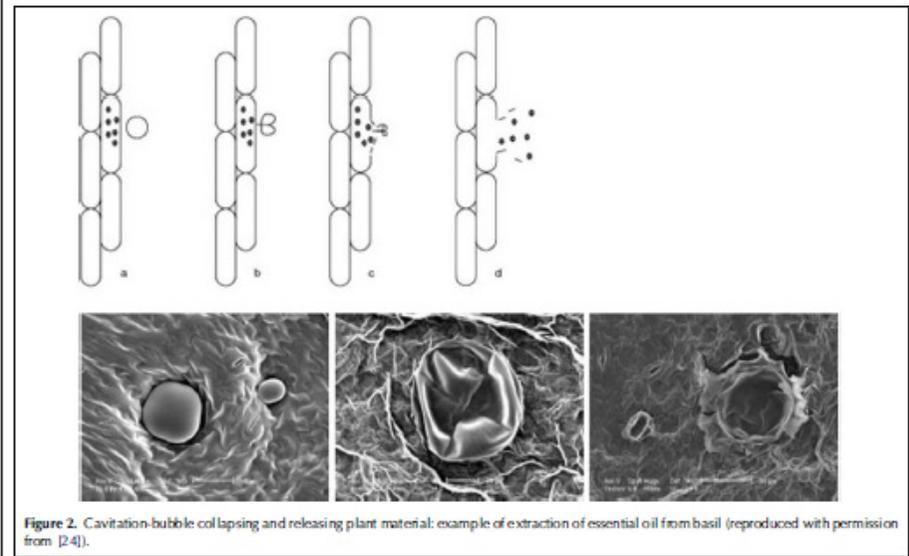
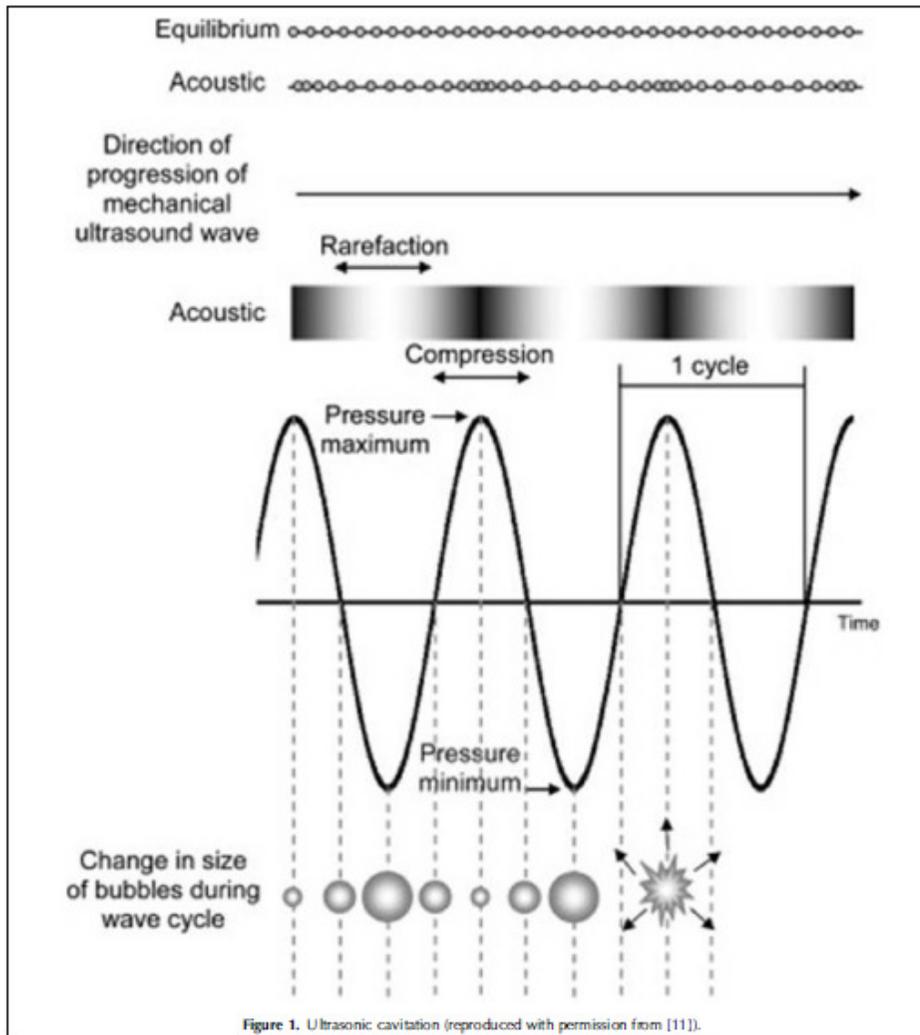
→ Interazione analita/matrice. Possono servire trattamenti preliminari (idrolisi)

ESTRAZIONE ASSISTITA DA ULTRASUONI (UAE)

- ✓ Sta ricevendo grande attenzione come tecnica innovativa di preparazione del campione soprattutto per le fasi di estrazione di vari analiti da varie matrici
- ✓ Sempre più utilizzata anche a livello di analisi di routine
- ✓ Interesse: accelerazione del processo di estrazione con notevole riduzione dei tempi (80% tempo analisi impiegata in preparazione del campione)
- ✓ Gli effetti meccanici degli ultrasuoni consentono una penetrazione maggiore del solvente all'interno del materiale e migliora il trasferimento di massa dovuto all'effetto "microflusso".
- ✓ Gli ultrasuoni sono onde meccaniche che hanno bisogno di un mezzo elastico per propagarsi; hanno frequenze comprese tra 20 kHz e 10 MHz

Effetti degli ultrasuoni

- ✓ cavitazione
- ✓ bolle di gas
- ✓ onde shock
- ✓ regioni ad alta temperatura e pressione (5500 °C e 50 MPa)
- ✓ micro-flusso (aumenta calore e trasferimento di massa) e microgetti (pulizia superfici metalliche o rottura pareti cellulare di materiale vegetale con conseguente migliore penetrazione del solvente)



- ✓ l'energia generata dagli ultrasuoni può essere espressa come potenza del suono (W), intensità del suono (W/m^2) o densità di energia del suono (W/m^3)
- ✓ si può lavorare in due modalità: 1) ultrasuoni a bassa intensità e alta frequenza (100 kHz – 1 MHz; $< 1 W/cm^2$); 2) ultrasuoni ad alta intensità e bassa frequenza (16 kHz – 100 kHz; 10 – 1000 W/cm^2)

La 1) è utilizzata principalmente per ottenere informazioni sulle proprietà fisico-chimiche degli alimenti (durezza, grado di maturazione, contenuto di zuccheri, acidità).

La 2) può alterare le proprietà fisiche o chimiche degli alimenti e pertanto è utilizzata per lo più per accelerare e aumentare l'efficienza dell'estrazione.

- ✓ E' una tecnica molto interessante per l'estrazione di ingredienti da prodotti naturali

Dispositivi commerciali

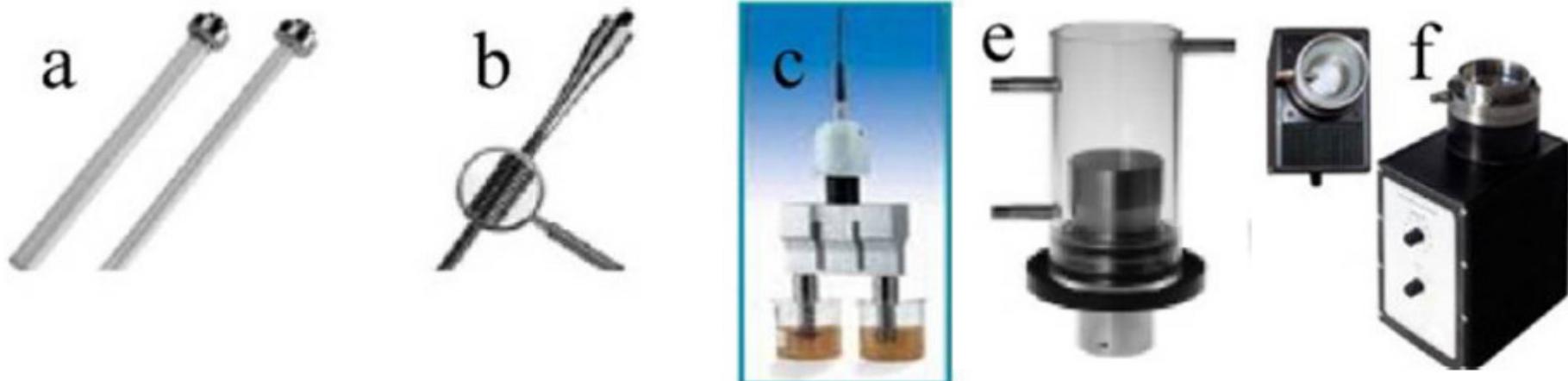
La tecnica richiede un mezzo liquido, un generatore di energia ed un trasduttore che trasformi l'energia elettrica, magnetica o cinetica in energia acustica.

La tecnica può essere applicata *direttamente* al campione o *indirettamente* attraverso le pareti del contenitore del campione immerso in un bagno ad acqua (modalità più diffusa ed economica, ma poco potente; nei dispositivi più moderni c'è la possibilità di avere un controllo automatico della potenza, frequenza e temperatura).



Bagno a ultrasuoni

Le sonde ultrasoniche invece sono immerse direttamente nella soluzione del campione (potenza 100 volte > rispetto al bagno, con tempi di sonicazione molto bassi, 5 min o meno). Risulta quindi molto potente per l'estrazione solido-liquido degli analiti (svantaggi: gli analiti possono essere degradati e il probe può deteriorarsi rapidamente).



a) sonde in silice; b) sonda a spirale; c) doppia sonda; e) tubo di sonicazione; f) sonoreattore



TerraUniversale.com



Image courtesy of Heilscher USA



VANTAGGI

- ✓ minor consumo di solventi, maggiore velocità e maggior recupero degli analiti rispetto alle tecniche tradizionali (agitazione manuale, Soxhlet, distillazione in corrente di vapore).
- ✓ adattabilità dei solventi e alle analisi di routine
- ✓ adatta per l'estrazione degli idrocarburi alifatici saturi
- ✓ per alcune applicazioni ha dato rese simili a quelle evidenziate per MAE, PLE e SFE.
- ✓ possibilità di effettuare estrazioni multiple
- ✓ costi ragionevoli

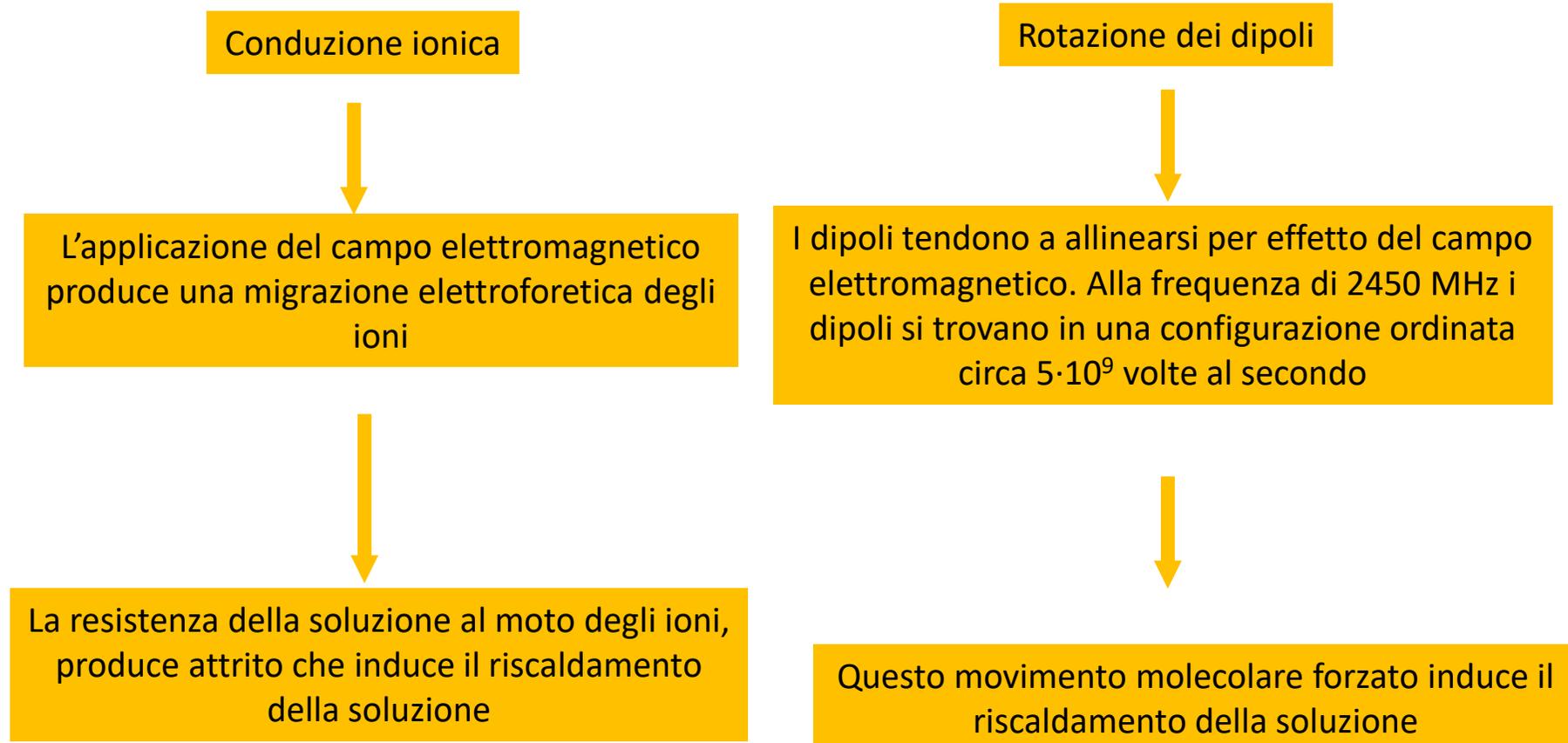
SVANTAGGI

- ✓ no per analiti volatili (per questi meglio la distillazione in corrente di vapore)
- ✓ necessità di affiancare altre tecniche per ulteriori step di purificazione ed estrazione (UAE/SPE/SFE)

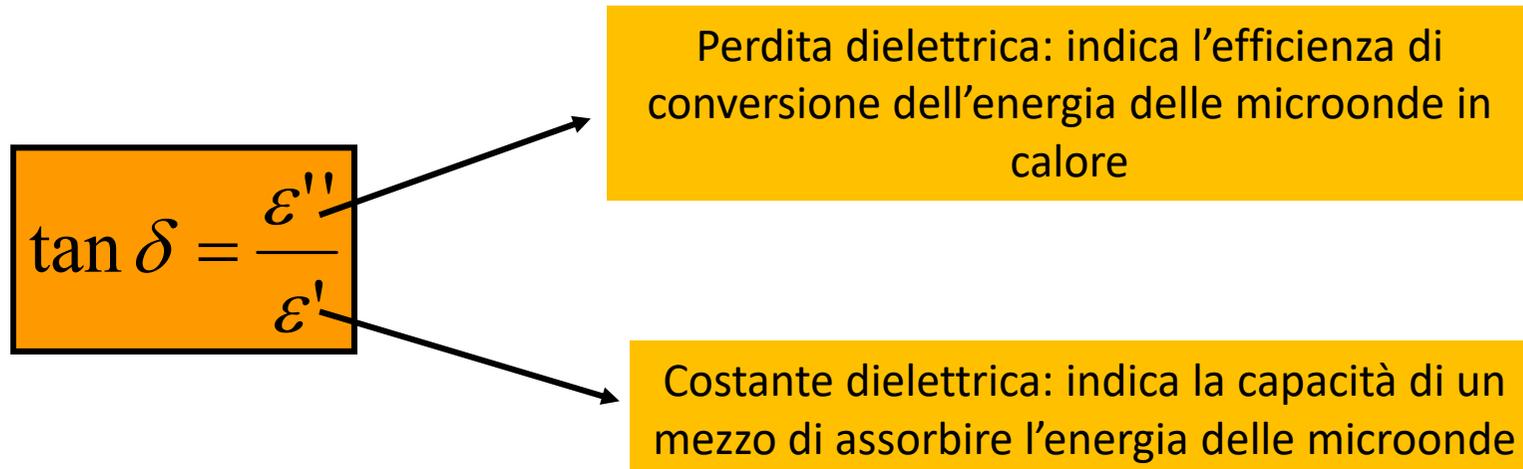
ESTRAZIONE ASSISTITA DA MICROONDE (MAE)

- ✓ Per campioni solidi, semi-solidi o liquidi
- ✓ riscaldamento rapido in seguito all'applicazione delle microonde (viene usata per il modo particolare con cui si produce il calore)
- ✓ per analiti termicamente stabili
- ✓ alta efficienza di estrazione (paragonabile a Soxhlet)
- ✓ minor quantità di solventi, più rapida della Soxhlet
- ✓ può essere accoppiata agli ultrasuoni o all'estrattore Soxhlet
- ✓ può richiedere ulteriori step di concentrazione e/o purificazione

- ✓ si tratta di un'onda elettromagnetica (campo elettrico e magnetico che oscillano perpendicolarmente con frequenze tra 0,3 – 300 GHz) che può penetrare in alcuni materiali e interagire con composti polari per generare calore
- ✓ il riscaldamento si origina per conduzione ionica e rotazione dei dipoli



- ✓ quindi solo alcuni mezzi possono essere riscaldati (dipende dal valore della loro costante dielettrica)
- ✓ l'efficienza di estrazione dipende dal fattore di dissipazione del mezzo, $\tan \delta$, che misura la sua capacità di assorbire l'energia delle microonde e trasferirla come calore alle molecole circostanti



- ✓ la velocità di conversione dell'energia elettrica in energia termica in un mezzo è descritta dall'equazione $P = Kf\epsilon' E^2 \tan \delta$

P =dissipazione della potenza per unità di volume, f frequenza applicata, E forza del campo elettrico

as either traveling or resonant wave modes in cylindrical and rectangular waveguides. In general, heatability was found to be a direct function of the dielectric loss dispersion dependence on temperature and frequency. The dielectric loss factor obtained at low frequency measurements was found to be directly proportional to the heatability of polymers. A WLF plot was used to predict the shift of dielectric loss maxima into or out of the microwave frequency range.

INTRODUCTION

The application of microwave processing to polymers and composites has been pursued in several laboratories throughout the world over the past two decades. Here, significant impact has been made in the rubber and food industries where processing with microwaves yields substantial advantages. In contrast to conventional thermal treatments, these advantages are rapid volumetric heating, no overheating at the surface, addressable heating, energy savings and low operating costs, increased throughput, and reduced degradation.

Microwave heating of materials stems from dielectric power absorption as described by the following equation:

$$P = KfE^2\epsilon' \tan \delta \quad (1)$$

where P is the power dissipation in W/cm^3 , K is a constant equal to 55.61×10^{-14} , f is the applied frequency in Hz, E is the electric field strength in V/cm , ϵ' is the dielectric constant, and $\tan \delta$ is the dielectric loss tangent. Both ϵ' and $\tan \delta$ depend upon both the frequency and the sample temperature. The electromagnetic field energy dissipated as heat per unit volume is proportional to the dielectric loss factor ($\epsilon' \tan \delta$), the square of the field strength

(E^2) and the frequency (f) of the applied field. In this discussion, it is assumed that influences upon heating rate due to heats of reaction are negligible.

The ratio of the dielectric loss factor, ϵ'' , to the dielectric constant, ϵ' , is the loss tangent, $\tan \delta$, for a nonionic material. The dielectric loss factor primarily determines the rate of conversion of electrical energy into thermal energy in the material before phase transition losses. Since the electric field penetrates the material, heat is generated internally. Thus, until convection and conduction losses become important, the dielectric power dissipation is independent of the heat flow through the surface of the material. This is in contrast to conventional thermal heating which is dependent upon the thermal conductivity of the material and, therefore, is much more time consuming.

If convection and conduction losses and heat flux due to chemical reactions are ignored, the heating rate of a material placed in an electromagnetic field depends on several key parameters. These may be described by the relationship:

$$\frac{dT}{dt} = \frac{Kte^2\epsilon'(T)\tan \delta(T)}{\rho C_v} \quad (2)$$

where ρ is the density of the material, C_v is the specific heat, and the other variables are as defined in Eq 1. Again, no chemical reactions are included. The heating rate, as Eq 2 indicates, is directly dependent on the dielectric behavior of a polymer. It must be noted that the dielectric behavior is a function of



You can purchase the full-text article through ReadCube. If you previously purchased this article, please [sign in](#) to regain access. The following formats are available:

\$6 **48-hour Rental**
Printing and saving restrictions apply

\$15 **Buy Cloud Access**
Printing and saving restrictions apply

\$38 **Buy PDF**

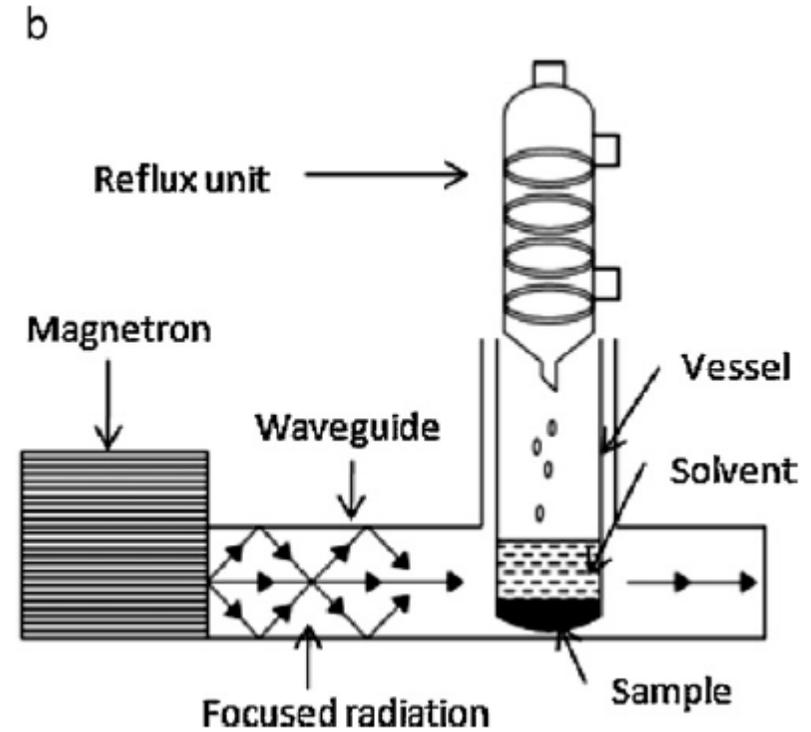
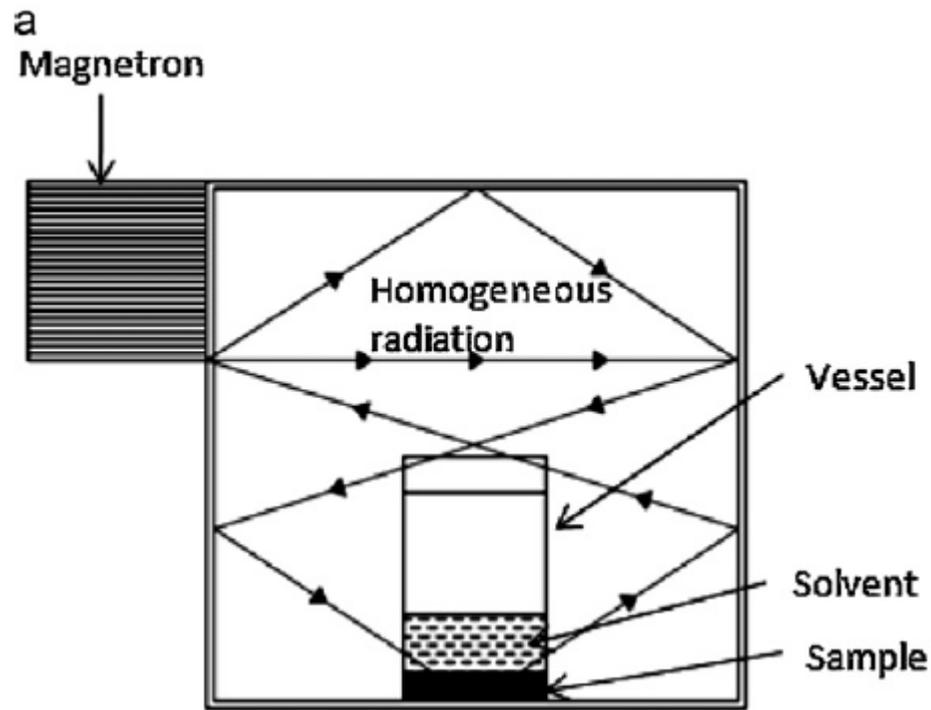
Prices displayed in US Dollars

¹ Current address: National Sun Yat-Sen University, Kaohsiung, Taiwan, R. O. C.

² Current address: NASA-Langley, Hampton, Virginia.

³ Author to whom correspondence should be addressed.

MODALITA' OPERATIVE



a → sistema chiuso (alta pressione)

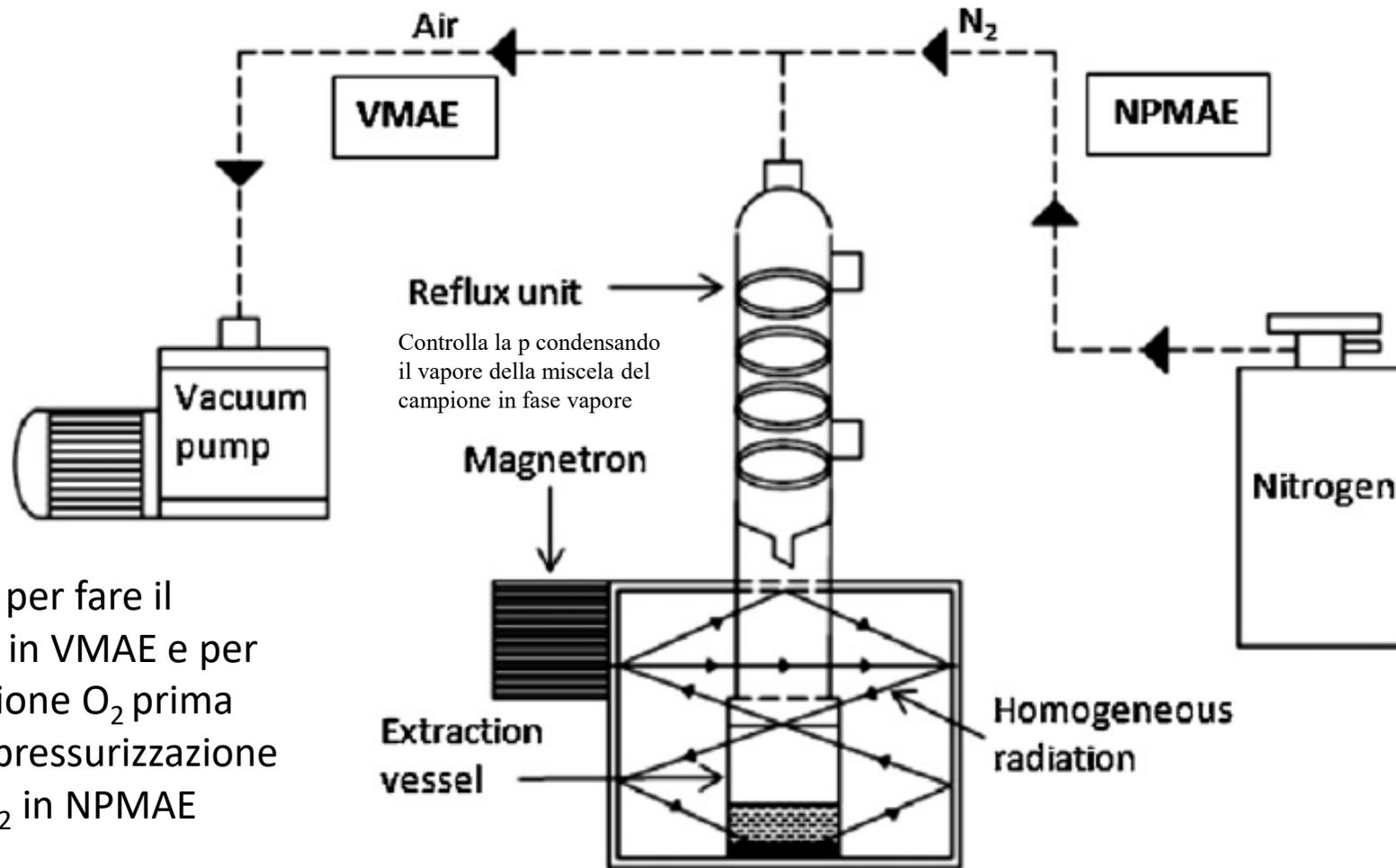
b → sistema aperto (pressione atmosferica)

MAE assistita da azoto (NPMAE, NP nitrogen protected): utilizza l'azoto per pressurizzare la camera di estrazione; previene l'ossidazione dei composti in fase di estrazione

MAE assistita dal vuoto (VMAE, V vuoto): creando il vuoto nella camera di estrazione si abbassa il punto di ebollizione del solvente, minimizzando la perdita di analiti termolabili e facilmente ossidabili

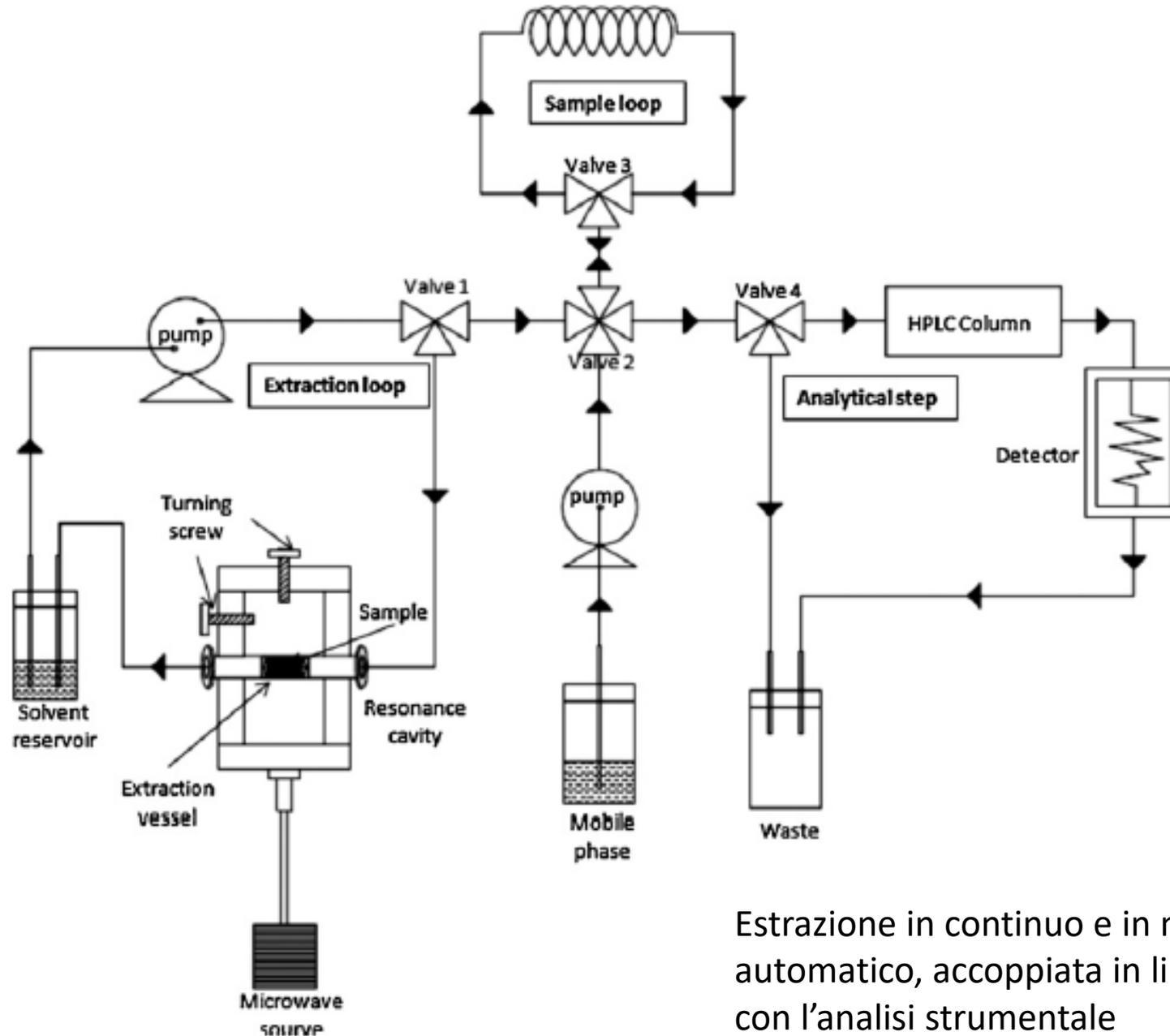
MAE assistita da ultrasuoni (UMAE, U ultrasuoni): si combinano le due tecniche di estrazione (es: installazione di una sonda ad ultrasuoni); diminuiscono il tempo di estrazione e il consumo di solventi

MAE dinamica (DMAE, D dinamica): il processo di estrazione avviene in continuo, in un sistema chiuso automatizzato, accoppiato al sistema analitico vero e proprio.



Usata per fare il vuoto in VMAE e per rimozione O₂ prima della pressurizzazione con N₂ in NPMAE

DMAE



Estrazione in continuo e in modo automatico, accoppiata in linea con l'analisi strumentale

MAE senza solventi (SFMAE, SF solvent free): per l'estrazione di oli essenziali; con aggiunta di acqua al campione da estrarre; < tempo di estrazione, < quantità di acqua, < quantità di composti ossigenati

Dispositivi commerciali

- ✓ La maggior parte dei dispositivi utilizzati in laboratorio si basano su un microonde domestico
- ✓ Esistono dei dispositivi commerciali, alcuni dei quali sono costruiti ad hoc per applicazioni specifiche (estrazione del licopene da pomodori)
- ✓ I dispositivi commerciali sono dotati di sistemi di controllo della temperatura e della pressione (temperatura di lavoro 200 – 300 °C); sono molto costosi; si possono personalizzare forni a microonde, ma potrebbero non essere adatti a studi di ottimizzazione.



Scelta del solvente. I solventi polari hanno un'elevata capacità di assorbimento dell'energia delle microonde

Solvente	Costante dielettrica (ϵ)	Momento di dipolo	Fattore di dissipazione $\tan\delta$ ($\times 10^{-4}$)	Punto di ebollizione	T ^a contenitore chiuso (°C)
Acetone	20.7			56	164
Acetonitrile	37.5			82	194
Etanolo	24.3	1.96	2500	78	164
Esano	1.9			69	-
Metanolo	32.6	2.87	6400	65	151
2-Propanolo	19.9	1.66	6700	82	145
Acqua	78.3	2.3	1570	100	
Esano/Acetone (1:1)				52	156

a) determinato 1207kPa

Etanolo: più utilizzato

Esano: può essere addizionato di piccole quantità di H₂O per aumentare l'efficienza di estrazione

Caratteristiche del campione. Essiccato, reso in polvere e setacciato, a volte pre-trattato con solvente, per migliorare la diffusione ed il trasferimento di massa degli analiti (quindi la resa). Il pre-trattamento con H₂O facilita il riscaldamento localizzato delle microonde, e aumenta il rilascio dei metaboliti (H₂O evapora con il riscaldamento e il cambiamento di pressione interna alla struttura della matrice e favorisce la rottura ed il rilascio; ecco perché per l'estrazione degli oli essenziali con SFMAE la matrice viene pre-trattata con H₂O).

Scelta del rapporto solido/solvente. Parametro che deve essere ottimizzato anche in funzione del volume del recipiente di estrazione in un sistema chiuso (a parità di rapporto in recipienti più piccoli si genera una pressione più elevata che aumenta la capacità di estrazione rispetto a contenitori più grandi, cosa che potrebbe non andare bene nel caso di analiti “fragili”).

Potenza delle microonde. In genere la resa aumenta all'aumentare della potenza, fino al raggiungimento di un limite oltre cui non aumenta più o inizia a diminuire.

Temperatura. In genere la resa aumenta all'aumentare della temperatura, fino al raggiungimento di un limite oltre cui non aumenta più o inizia a diminuire.

Tempo di estrazione. Se prolungato anche a bassa potenza/temperatura provoca diminuzione della resa. Varia da pochi minuti a 30' (anche 1 h in SFMAE)

Cicli di estrazione. Si possono effettuare più cicli di estrazione (nel caso in cui il tempo necessario sia lungo) da pochi minuti ciascuno per ridurre il rischio della degradazione termica.

Agitazione. L'agitazione accelera l'estrazione perché accelera il desorbimento e la dissoluzione degli analiti legati alla matrice. Quindi può aumentare la resa di estrazione.

Condizioni ottimali. Solventi: etanolo (40 – 100%), H₂O (anche come pre-trattamento nella SFMAE); **rapporto solvente – solido:** 10 – 50 ml/g; **tempo di estrazione:** 1' (per composti bioattivi) – 1 h (per oli essenziali); **potenza:** 100 – 1000 W; **temperatura:** 50 – 170 °C

LINEE GUIDA

DMAE: per composti facilmente degradabili che richiedono vari cicli di estrazione e che non necessitano di ulteriori step di purificazione

VMAE: per composti altamente “fragili” grazie alla blande condizioni di estrazione che si vengono a creare

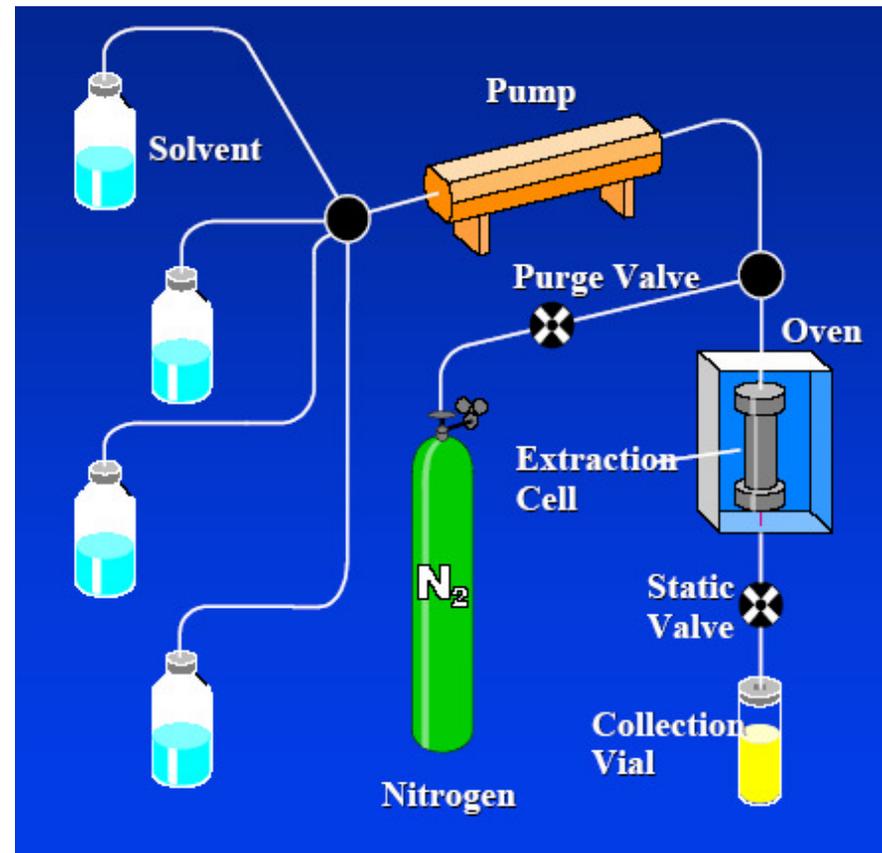
NPMAE: per composti termolabili e facilmente degradabili

SFME: oli essenziali

ESTRAZIONE IN FASE LIQUIDA SOTTO PRESSIONE (PLE o PSE o ASE)
PLE: Pressurized Liquid Extraction/PSE: Pressurized Solvent Extraction
ASE: Accelerated Solvent Extraction

- ✓ Tecnica innovativa per estrazione di analiti da matrici “difficili”
- ✓ estrazione solido-liquido a p e T elevate ($T_{amb} - 200^{\circ}\text{C}$, $35 < p < 200$ bar) – processo automatizzato
- ✓ l’utilizzo di solventi a $T <$ punto di ebollizione aumenta la solubilità e il trasferimento di massa
- ✓ meno solvente rispetto al metodo Soxhlet o sonicazione (più cicli)
- ✓ tempi ridotti
- ✓ l’efficienza aumenta per effetto di cicli ripetuti
- ✓ l’aumento della T aumenta la diffusività del solvente che aumenta la velocità di estrazione, con < quantità di solvente; aumento di p permette di usare solvente a T sotto il p_{eb} quindi allo stato liquido

- ✓ carica la cella
- ✓ riempi con solvente
- ✓ scalda e pressurizza (O_2 , light free)
- ✓ estrazione statica
- ✓ flussa con solvente fresco
- ✓ spurgo con azoto
- ✓ estratto pronto (12-14 min)



Si possono effettuare vari cicli di estrazione.

La presenza di H_2O nella matrice diminuisce l'efficienza di estrazione. Additivi (terra di diatomee inerte) possono essere aggiunti nella cella di estrazione come materiali assorbenti. Possono essere aggiunti anche come agenti disperdenti (terra di diatomee, palline di vetro) e per ridurre il volume di solvente.

SCELTA DEL SOLVENTE

- ✓ solubilità
- ✓ costo, sicurezza e sostenibilità ambientale
- ✓ green solvents: alcoli puri (etanolo, metanolo) o in miscela con H₂O o H₂O pura
- ✓ PHWE: Pressurized Hot Water Extraction; ad alte T la costante dielettrica, la viscosità, la tensione superficiale diminuiscono, mentre aumentano le caratteristiche di diffusività; ciò rende l'H₂O adatta all'estrazione di molecole polari, moderatamente polari e non polari.

Estrattori ASE



ESTRAZIONE CON FLUIDI SUPERCRITICI (SFE)

SFE: Supercritical Fluid Extraction

1879: Hanny e Hogarth osservano la capacità dei fluidi supercritici di essere usati come solventi

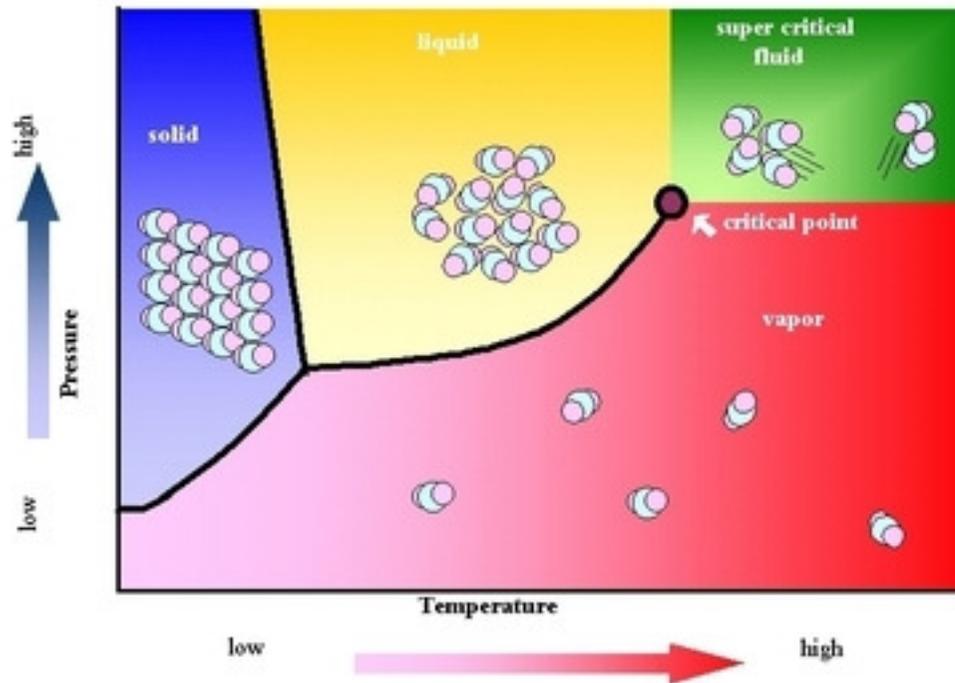
1960: prime applicazioni commerciali

1970: applicazioni nel campo dell'estrazione di sostanze naturali

1990: prime applicazioni industriali

→ Si utilizza, al posto del solvente, un fluido supercritico, cioè una sostanza portata al di sopra della pressione e della temperatura critiche, quindi con un comportamento intermedio tra gas e liquidi: la diffusione nei solidi è paragonabile a quella dei gas, mentre la capacità di solubilizzazione è quella dei liquidi.

Caratteristiche di un FLUIDO SUPERCRITICO



<http://www.galileonet.it/>

Rispetto ad un liquido diminuiscono la densità e la viscosità ed aumenta la diffusività

Aumenta quindi il potere estraente

Queste caratteristiche rendono i fluidi supercritici estremamente efficienti nel processo di estrazione, senza presentare gli inconvenienti dei solventi liquidi dal punto di vista di prezzo e pericolosità

- ✓ Il fluido più utilizzato per l'estrazione è la CO₂ che ha caratteristiche di prezzo e inerzia chimica ottime e valori critici molto bassi: a 40°C e 37,8 atm il suo potere solvente è paragonabile a quello del benzene
- ✓ Definito sicuro dalla FDA e dall'EFSA
- ✓ Possibilità di essere usato a bassa temperatura per l'estrazione di sostanze termolabili e facilmente ossidabili (mezzo non ossidante).
- ✓ Possibilità di aggiungere delle piccole quantità (1 – 10%) di solventi polari come il metanolo per l'estrazione di sostanze polari e per aumentare l'efficienza di estrazione riducendo le interazioni analita-matrice.





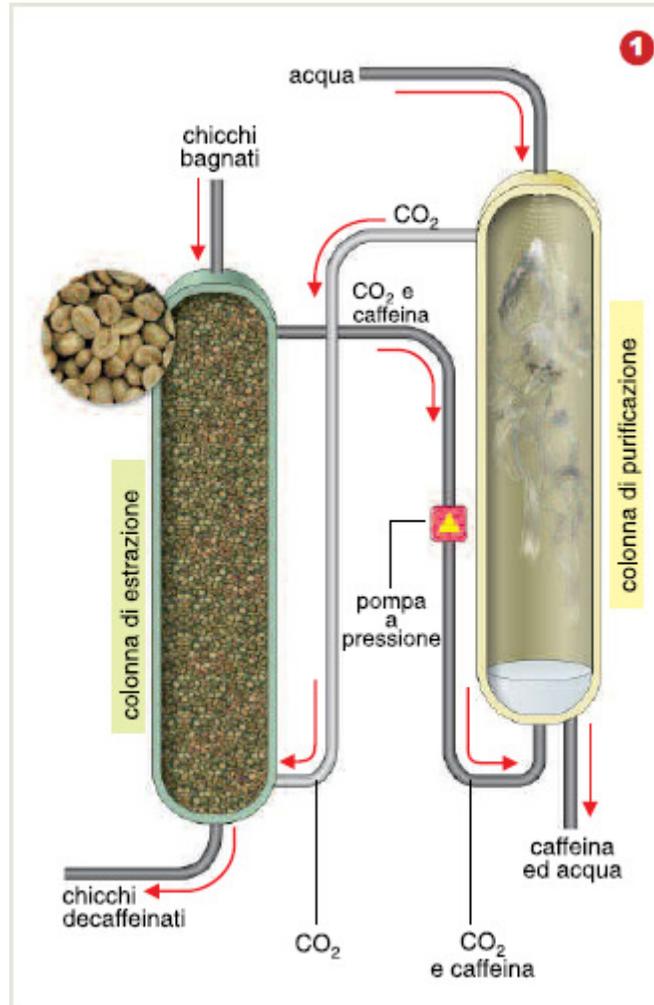
VANTAGGI & SVANTAGGI



- 😊 Potere solvente controllato da p e T ,
- 😊 SFC facilmente separabile dall'estratto grazie alla sua volatilità,
- 😊 Solventi non tossici che non lasciano residui dannosi per l'ambiente,
- 😊 Componenti del campione alto bollenti e/o termolabili possono essere estratti a relativamente basse temperature
- 😊 Si possono effettuare separazioni che non possono essere fatte con le tecniche di estrazione tradizionali.



- 😞 Spesso sono richieste elevate p ,
- 😞 La compressione del SCF richiede tecnologie elaborate per il riciclo al fine di ridurre i costi,
- 😞 Elevato investimento di capitale per le apparecchiature e gli impianti.



La colonna è di circa 21 m di altezza.
Umidità chicchi 25-40% facilita estrazione caffeina.

CO₂ supercritica entra dal basso a circa 93°C e 250 atm.

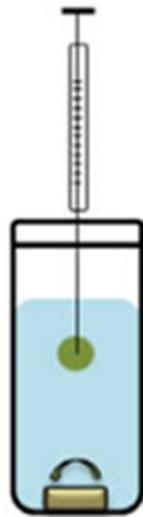
Caffeina estratta viene solubilizzata da H₂O in ingresso dall'alto e la CO₂ rientra in circolo

MICROESTRAZIONE IN FASE LIQUIDA (LPME: liquid phase microextraction)

- ✓ combina estrazione, concentrazione e introduzione del campione in un unico step
- ✓ avviene tra un solvente immiscibile con l'acqua, noto come estraente o accettore (alcuni μl), ed una fase acquosa contenente gli analiti di interesse
- ✓ gli analiti devono essere in fase acquosa, necessità di estrazioni o step di purificazione preliminari e ricostituzione in mezzo acquoso
- ✓ può essere condotta secondo tre diverse modalità:
 - single-drop microextraction (SDME)
 - dispersive liquid-liquid microextraction (DLLME)
 - hollow-fiber LPME (HF-LPME)

Single-drop microextraction - SDME

- ✓ combina estrazione, concentrazione e introduzione del campione in un unico step
- ✓ avviene tra un solvente immiscibile con l'acqua, noto come estraente o accettore (alcuni μl), ed una fase acquosa contenente gli analiti di interesse



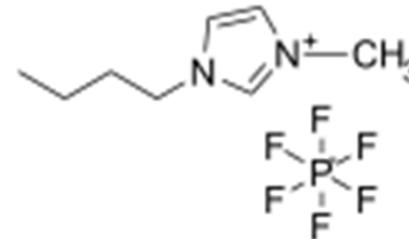
DI-SDME



VANTAGGI

- ✓ basso costo, semplicità di utilizzo, velocità, basso impatto ambientale
- ✓ compatibilità con i sistemi di iniezione GC e HPLC (possibilità di usare un gran numero di solventi, toluene, esano, cicloesano, xilene)
- ✓ liquidi ionici: danno buoni risultati perché producono condizioni di estrazione più riproducibili, gocce più stabili anche con tempi di estrazione prolungati (liquidi ionici (LI): sali fusi a $T < 100^{\circ}\text{C}$; RTLI: sali fusi a T_{amb});

es. esafluorofosfato di 1-butil, 3-metilimidazolo



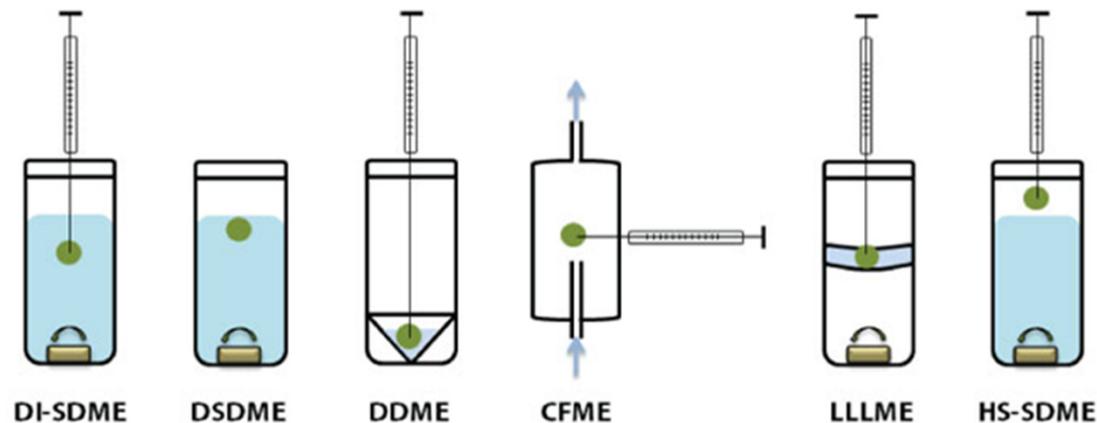
SVANTAGGI

- ✓ variazioni del volume della goccia durante il processo di estrazione (specie in presenza di velocità di agitazione elevate, lunghi tempi di estrazione e alte temperature) che influiscono sulla stabilità della goccia e quindi sulla precisione analitica (si può risolvere mediante l'aggiunta di uno SI)
- ✓ non può essere utilizzata per campioni non purificati (le impurezze possono interferire con la goccia o renderla instabile)

Può essere condotta in sei differenti modalità suddivise in due categorie:

- 1) Doppia fase: a) immersione diretta (DI-SDME); b) flusso continuo (CFME); c) goccia a goccia (DDME); d) goccia sospesa (DSDME)

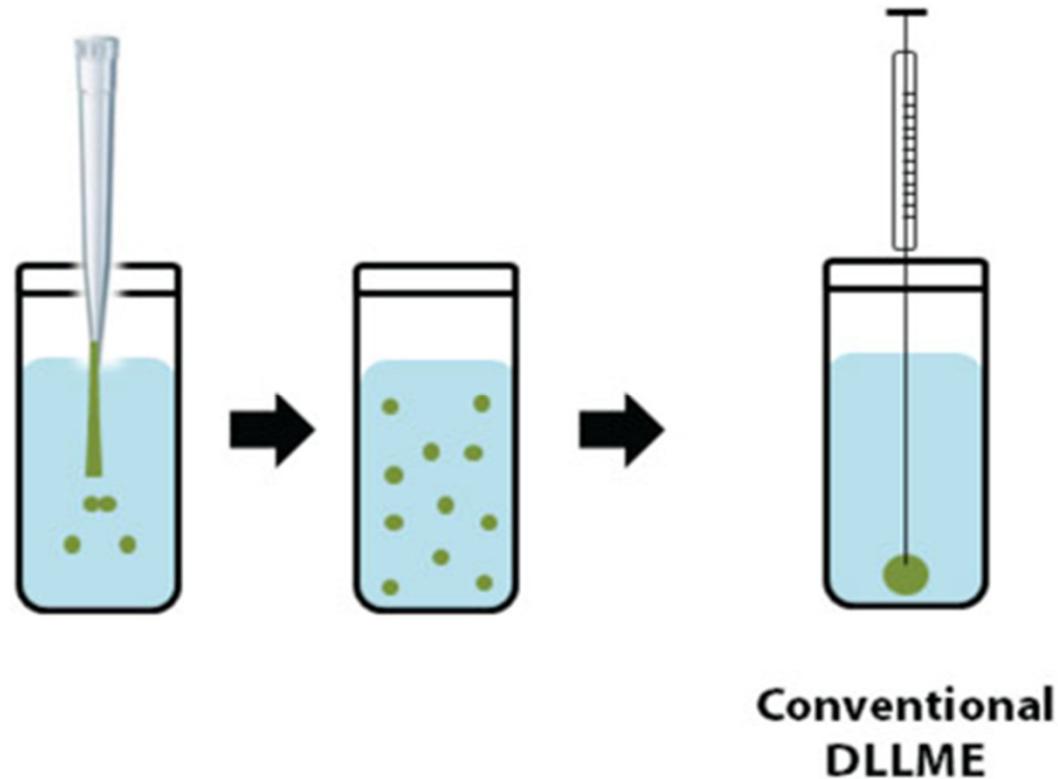
- 2) Tripla fase: a) spazio di testa (HS-SDME); b) liquido-liquido-liquido (LLLME)



Dispersive liquid-liquid microextraction - DLLME

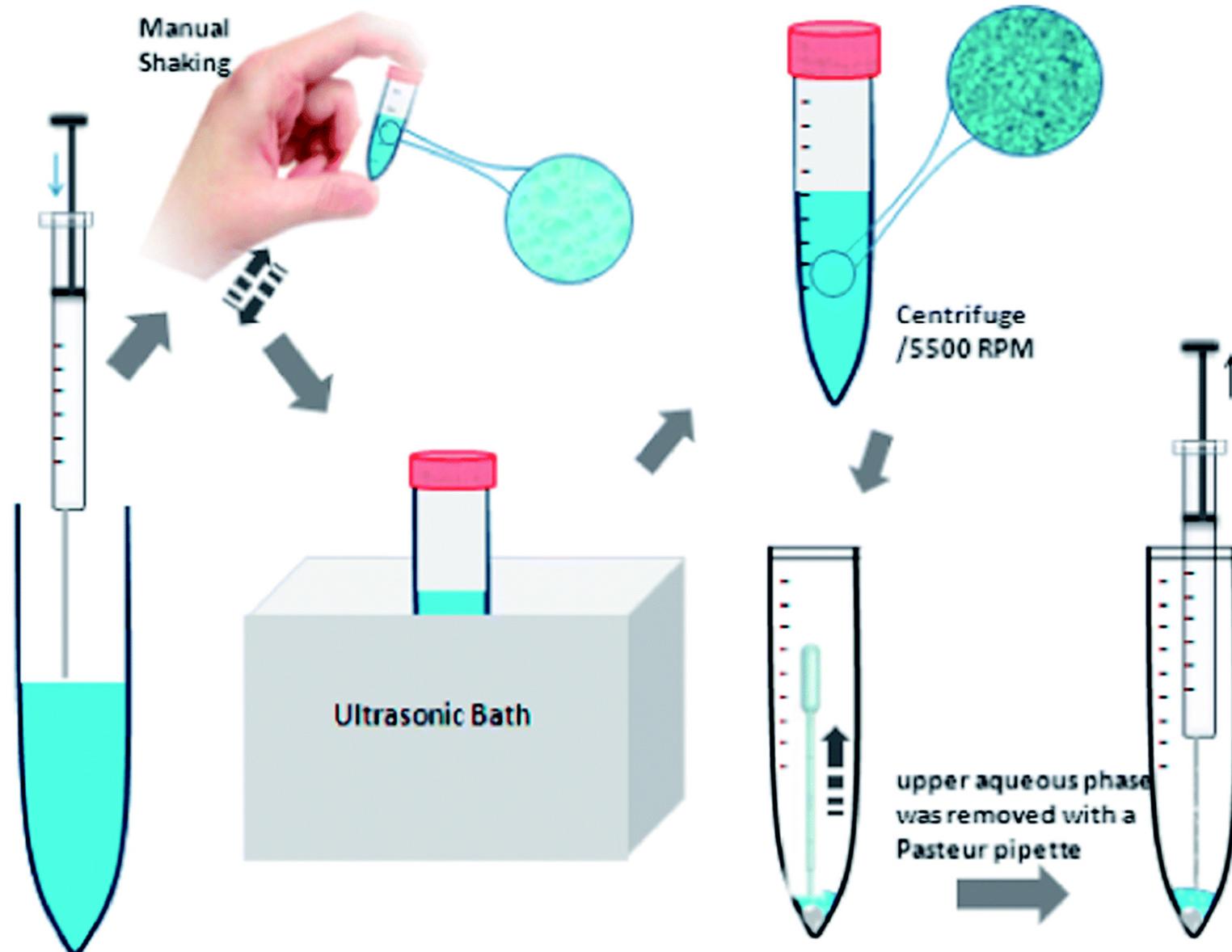
Introdotta nel 2006

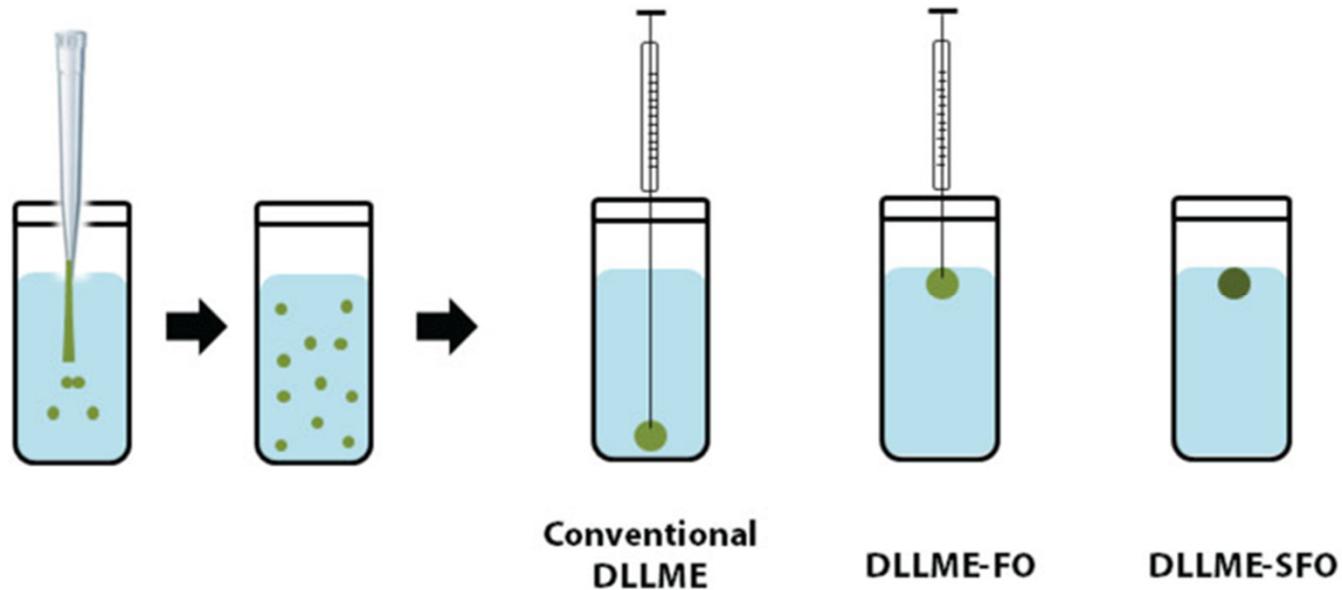
- ✓ sistema di solventi ternario: soluzione acquosa con analiti + solvente di estrazione immiscibile con l'acqua + solvente di dispersione miscibile con l'acqua
- ✓ miscele di estraente e disperdente vengono aggiunte alla soluzione acquosa. Dopo centrifugazione l'estraente si colloca alla base del tubo e viene iniettato nel sistema cromatografico o elettroforetico
- ✓ come estraenti si usano in genere solventi clorurati (pesanti si depositano in fondo al tubo) e come disperdenti MeOH, ACN, EtOH, acetone



Due modalità di APPLICAZIONE:

- ✓ estrazione e pre-concentrazione di pesticidi, ammine, parabeni, anisoli (nella modalità convenzionale)
- ✓ purificazione del campione: gli analiti sono estratti in un I° step con un solvente organico, che agisce come fase disperdente nel II° step



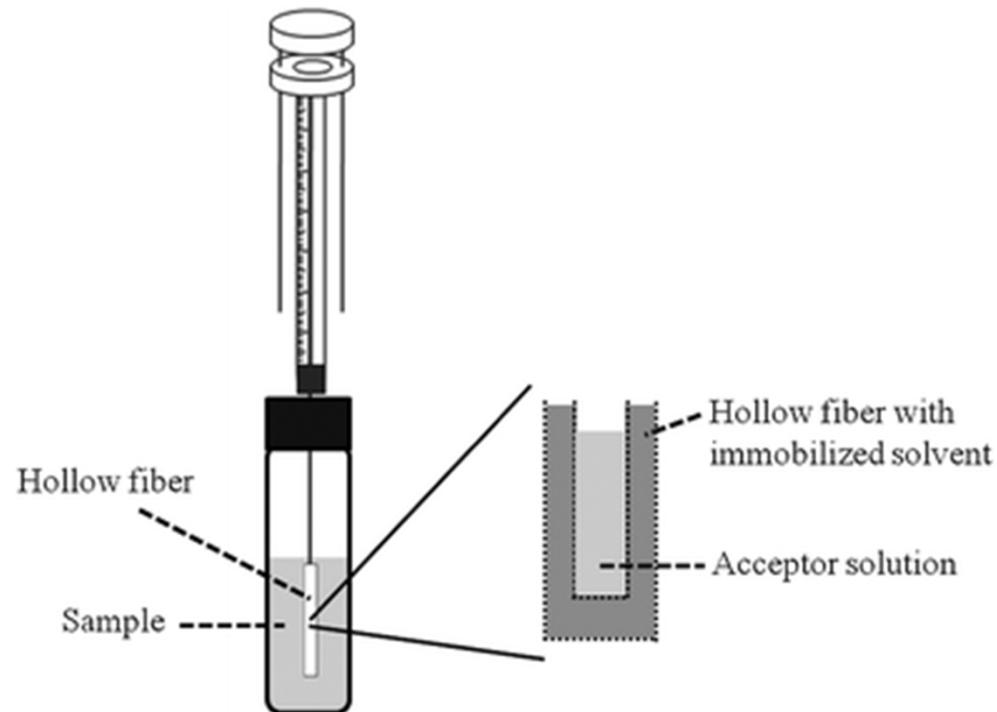


Se come estraente si usa un solvente a bassa densità (esano, alcoli a lunga catena, ecc) dopo la centrifugazione si avrà la formazione di una goccia galleggiante (DLLME-FO); se la soluzione viene raffreddata la goccia solidifica (DLLME-SFO)

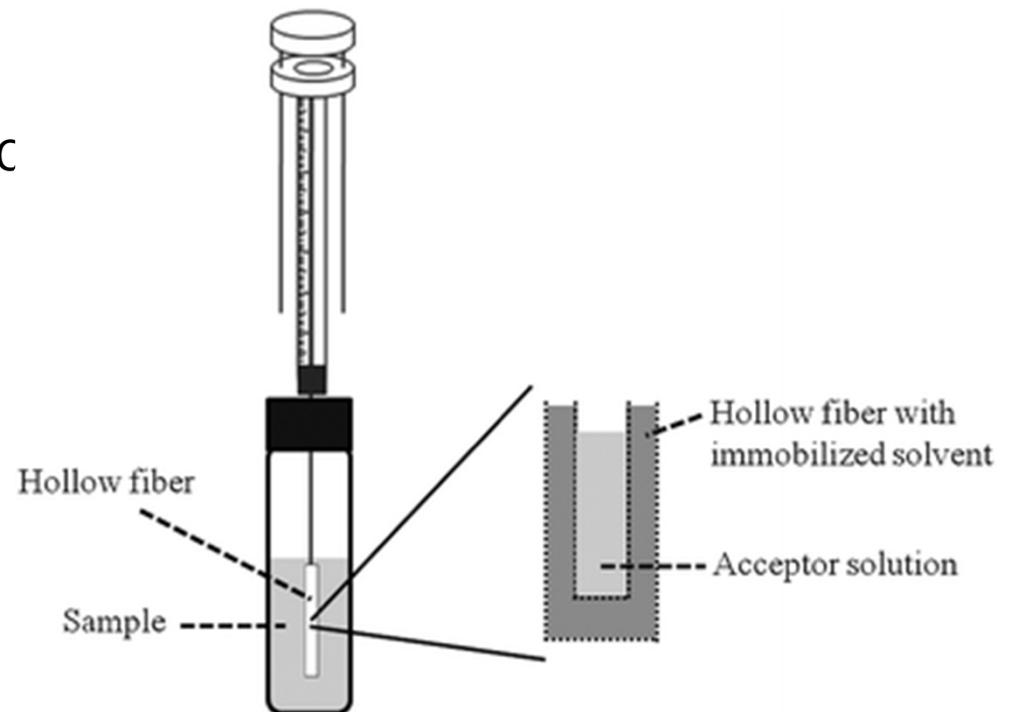
FO=floating organic; SFO=solid floating organic

Hollow-fiber liquid phase microextraction - HF-LPME

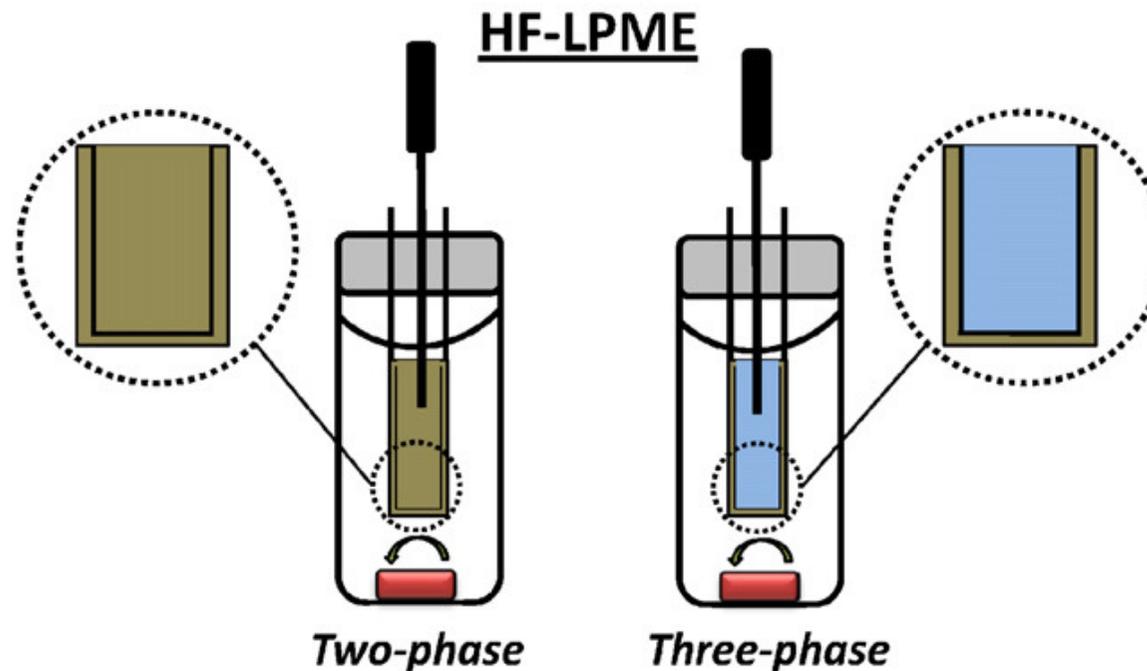
- ✓ Introdotta per evitare l'instabilità della goccia
- ✓ Gli analiti sono prima estratti su un supporto a membrana liquida (SML) collocato nei pori di una fibra cava porosa (polipropilene, PP) e poi in una soluzione posizionata nella cavità centrale della fibra



- ✓ Il supporto a membrana liquida (SML) si forma immergendo la fibra per alcuni secondi in un solvente organico (n-ottanolo, dietilere, toluene, ecc)
- ✓ si può operare in modalità bifasica o trifasica
- ✓ nella bifasica si usa lo stesso solvente anche nel lumen (acceptor solution) e una volta che la fibra è introdotta nella fase acquosa (donor phase), gli analiti sono estratti prima nell'SML e poi nel lumen che può essere introdotto direttamente in un GC



- ✓ nella trifasica invece nel lumen viene introdotta una fase acquosa (acceptor phase), originando una LLLME, in cui è la fase acquosa acceptor ad essere introdotta in HPLC o CE per l'analisi
- ✓ in entrambe le modalità le fasi donator e acceptor sono separate dalla membrana porosa della fibra quindi non sono a contatto



Conclusioni sulla Liquid Phase Micro Extraction - LPME

- ✓ Ideale per l'estrazione di campioni liquidi in quanto richiedono un trattamento minimo (aggiustamento del pH, filtrazione, diluizione)
- ✓ adattabile anche a campioni solidi (preliminare fase di estrazione)
- ✓ il rapporto tra volume campione/estraente determina elevati fattori di arricchimento e quindi un elevato aumento della sensibilità (bassi LODs)
- ✓ le applicazioni riportate in letteratura riguardano soprattutto l'estrazione di analiti organici legati all'ambito della FOOD SAFETY (pesticidi, ecc)
- ✓ tra le varie modalità la DLLME è quella più diffusa, probabilmente perché è più semplice da condurre rispetto alla SDME in cui la stabilità della goccia è un passaggio cruciale, o della HF-LPME, più sofisticata dal punto di vista dell'attrezzatura
- ✓ spazio per miglioramenti futuri vista l'estrema importanza dell'elevata selettività nell'analisi degli alimenti
- ✓ da valutare la possibilità di automazione e la commercializzazione di strumenti per LPME.

ESTRAZIONE IN FASE SOLIDA: SPE

✓ Si basa sulla distribuzione selettiva degli analiti tra la fase solida (materiale da impaccamento) e la fase liquida

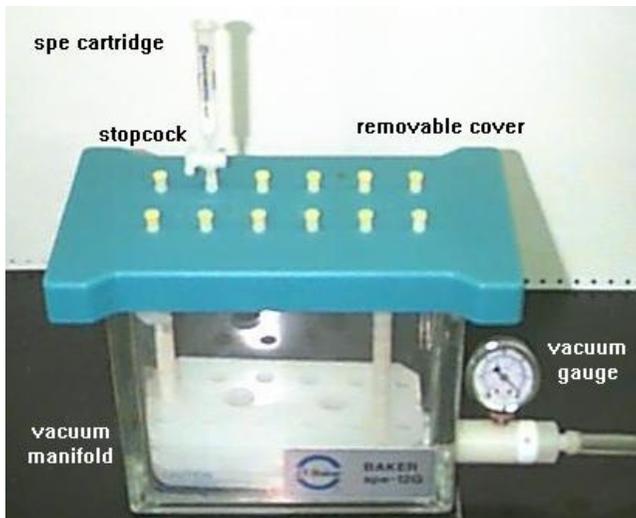
✓ Vale la legge di distribuzione di Nerst:

$$K_D = \frac{C_s}{C_m}$$

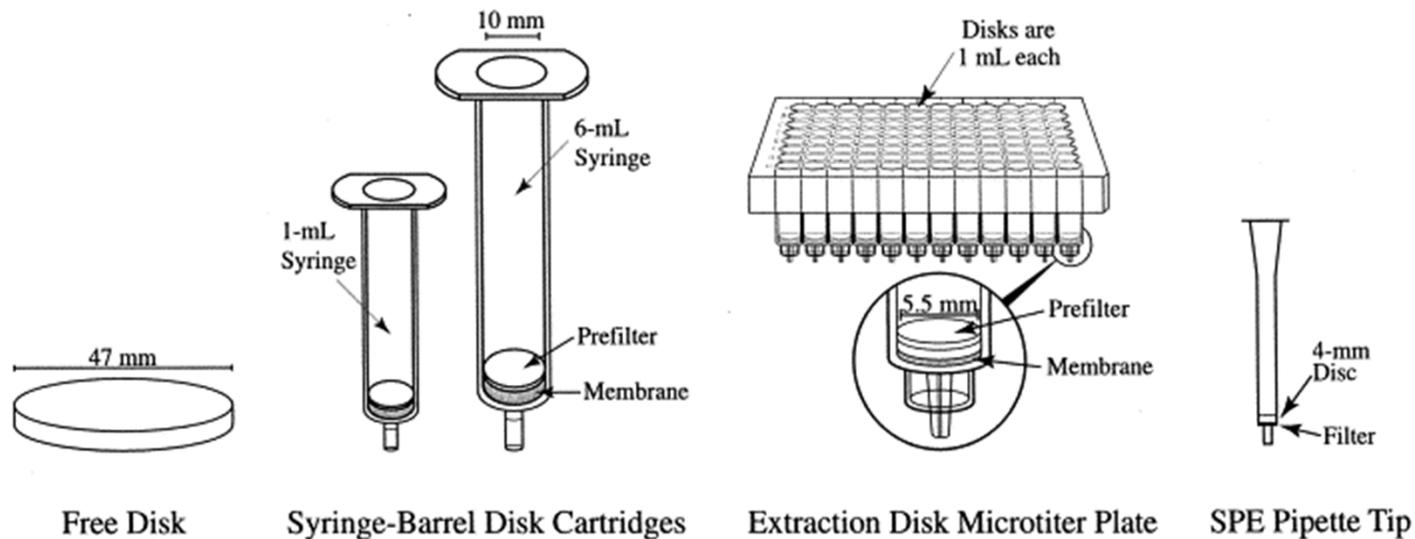
✓ Gli analiti devono avere più affinità per la fase solida che per la fase matrice quindi la scelta della FASE STAZIONARIA è un punto chiave del procedimento, perché controlla parametri quali AFFINITA', SELETTIVITA' E CAPACITA'.

✓ Più rapida, minor quantità di solventi, estratti più concentrati

- ✓ È una tecnica utilizzata per SEPARARE e CONCENTRARE gli analiti (non volatili o semi-volatili) da matrici complesse liquide o solide (previa estrazione).
- ✓ Spesso viene utilizzata per PURIFICARE e CONCENTRARE estratti liquidi
- ✓ Più frequentemente utilizzata dopo un processo di estrazione preliminare
- ✓ Automazione (nelle foto alcuni sistemi automatizzati per estrazioni SPE multiple)



- ✓ Si può condurre in diverse modalità: - cartucce (dischi inseriti in cartucce da 1 mL o siringhe da 6 mL); - dischi (47 mm di diametro); - puntali; - micropiastre a 96 pozzetti
- ✓ La tipologia più utilizzata è la cartuccia



Formati SPE: dischi, siringhe o cartucce (1 mL-6 mL), micropiastre a 96 pozzetti, puntali

Fasi e tecniche:

-SILICE funzionalizzata con gruppi APOLARI (C8, C18); FASE INVERSA

-SILICE funzionalizzata con gruppi POLARI (CN, NH₂); FASE NORMALE

-Resine a BASE AMMINICA (scambio anionico) o CARBOSSILICA (scambio cationico); SCAMBIO

IONICO

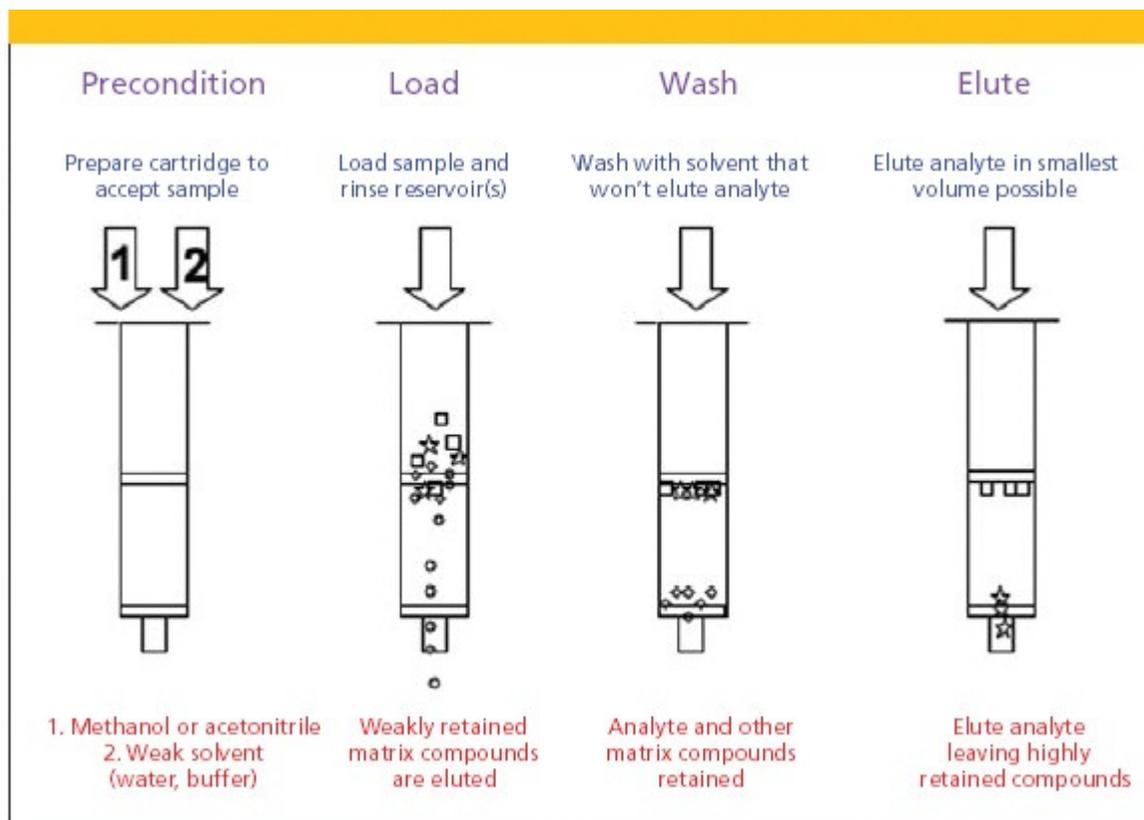


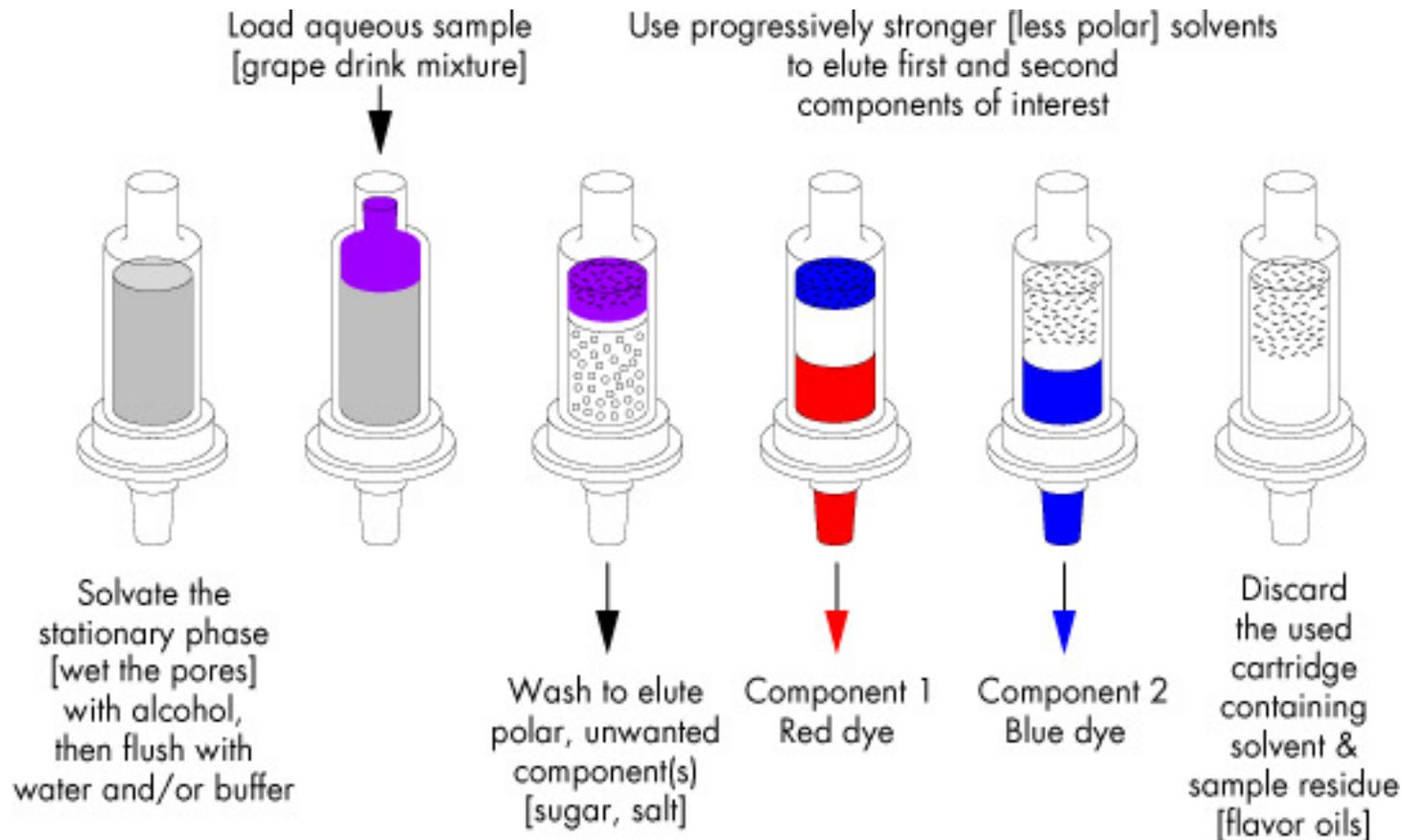
Figure 1: Steps in the SPE process.

In generale l'utilizzo di una cartuccia prevede 4 fasi:

- 1) Condizionamento
- 2) Caricamento
- 3) Lavaggio
- 4) Eluizione

FASE INVERSA

Polarità dei solventi



Fase stazionaria
APOLARE

Fase mobile
POLARE

APPLICAZIONI

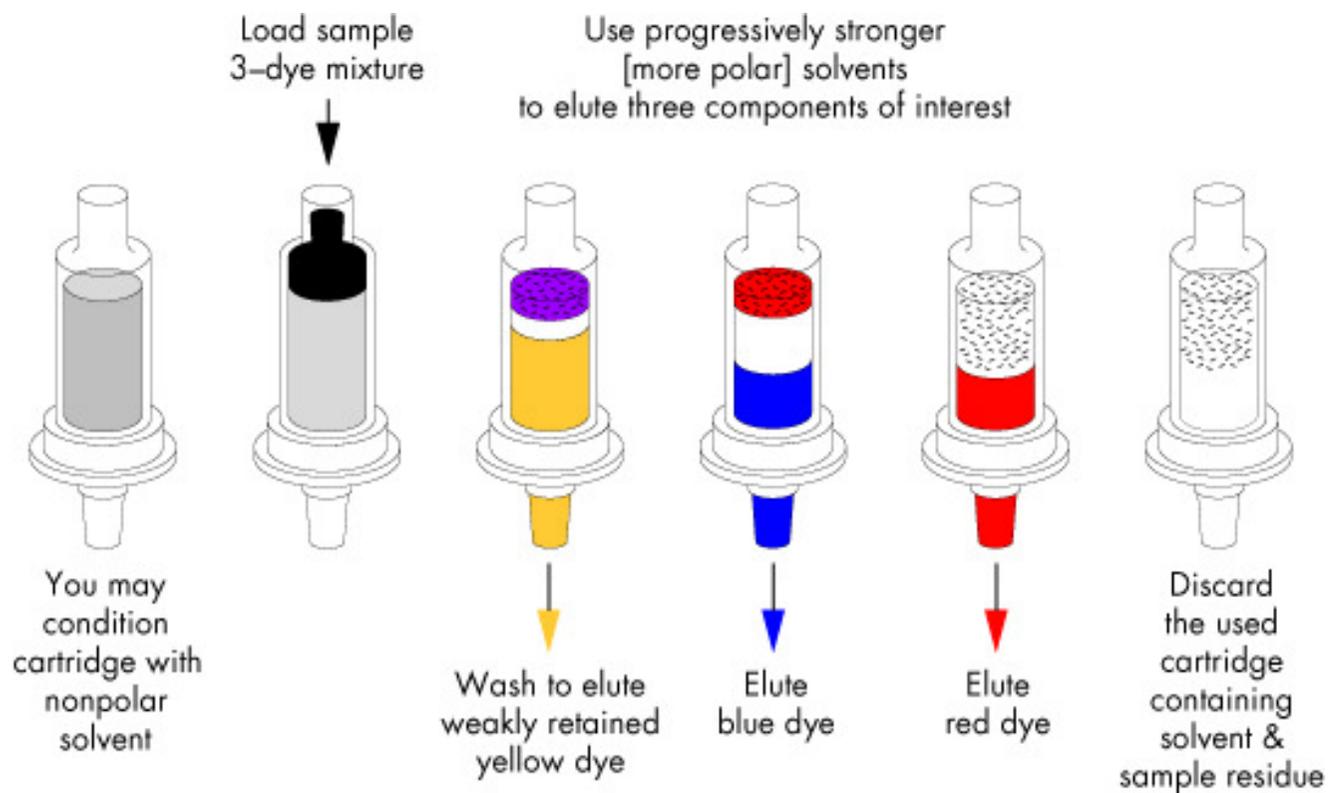
- C18 per molecole non polari o poco polari in soluzione (idrocarburi, PAHs, fenoli, antibiotici)
- C8 per molecole più polari

Solvent Polarity Chart

Phenomenex

Relative Polarity	Compound Formula	Group	Representative Solvent Compounds
Nonpolar  Increasing Polarity Polar	R - H	Alkanes	Petroleum ethers, ligroin, hexanes
	Ar - H	Aromatics	Toluene, benzene
	R - O - R	Ethers	Diethyl ether
	R - X	Alkyl halides	Tetrachloromethane, chloroform
	R - COOR	Esters	Ethyl acetate
	R - CO - R	Aldehydes and ketones	Acetone, methyl ethyl ketone
	R - NH ₂	Amines	Pyridine, triethylamine
	R - OH	Alcohols	Methanol, ethanol, isopropanol, butanol
	R - COHN ₂	Amides	Dimethylformamide
	R - COOH	Carboxylic acids	Ethanoic acid
	H - OH	Water	Water

FASE NORMALE

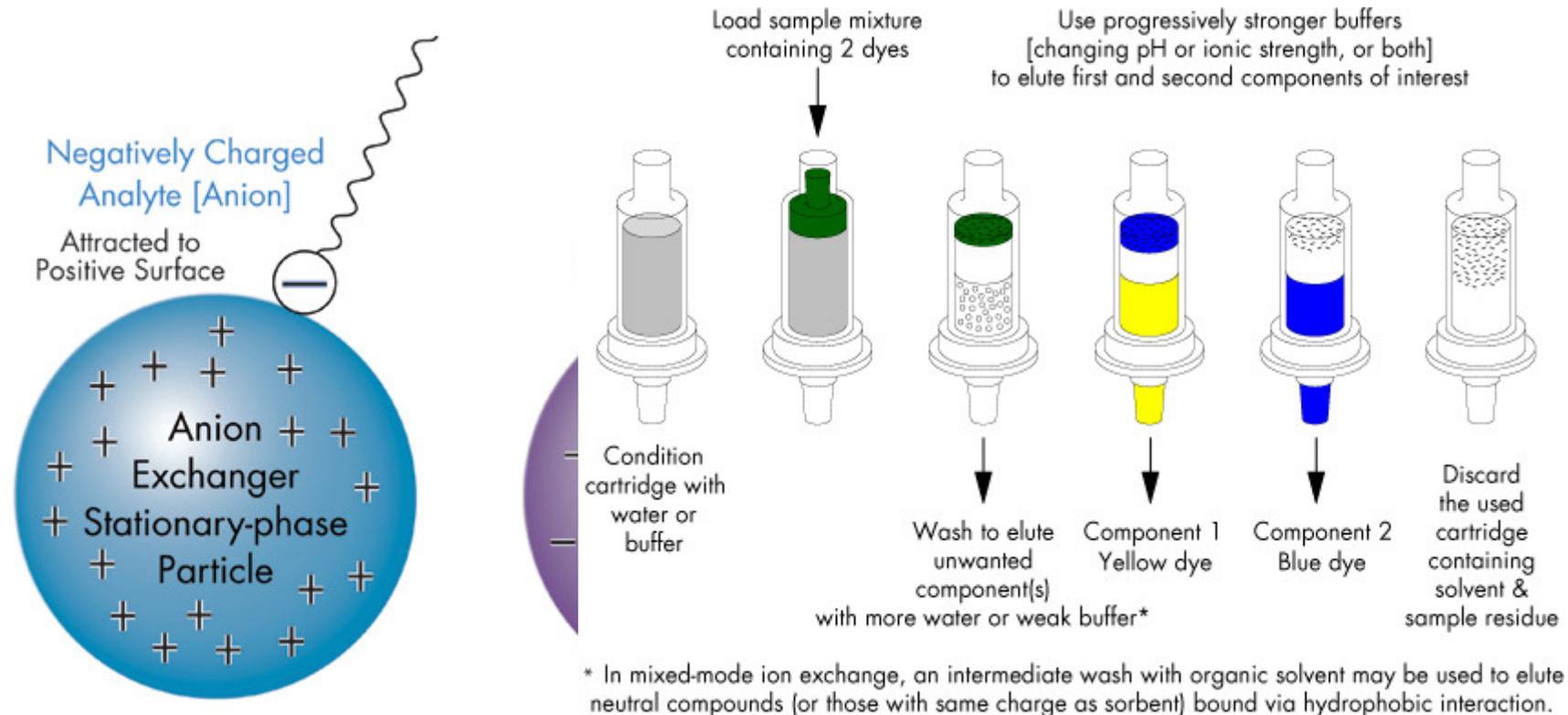


Fase stazionaria
POLARE

Fase mobile
APOLARE

APPLICAZIONI: molecole polari quali ammine e alcoli

SCAMBIO IONICO



N.B. Forza ionica: grandezza chimico-fisica che esprime l'intensità del campo elettrico generato dalle cariche di ioni in soluzione (maggiore è il numero di cariche maggiore è la forza ionica)

MECCANISMO DI INTERAZIONE (FASI INVERSA E NORMALE)

È basato su interazioni (forze di Van der Waals) tra l'analita e la fase stazionaria

SVANTAGGI

- ✓ Basso recupero degli analiti più polari
- ✓ Instabilità a pH estremi e presenza di gruppi silanolici residui.
- ✓ Il materiale da impaccamento deve essere uniforme per evitare bassa efficienza.
- ✓ La capacità del materiale adsorbente è influenzata dalla complessità della matrice (competizione per la ritenzione)

SVILUPPO di NUOVI MATERIALI

- a. fasi stazionarie a base di carbone (grafite) con elevata capacità adsorbente e elevata resistenza termica, meccanica e a reagenti chimici. Tuttavia possono legare eccessivamente o irreversibilmente alcuni analiti
- b. polimeri molecolarmente impressi (Molecularly-Imprinted Polymers; MIP)=rete di polimeri su cui sono stati disegnati siti specifici per una data molecola (funziona come un anticorpo). La polimerizzazione dei monomeri funzionali avviene in presenza della molecola stampo, che successivamente viene lavata via con un apposito solvente
- c. resine polimeriche sono stabili al variare del pH, presentano una struttura idrofobica, danno interazioni di tipo π - π per la presenza di anelli aromatici che ne costituiscono la struttura. Possono essere funzionalizzate per migliorare la ritenzione dei composti più polari mediante l'introduzione di gruppi funzionali idrofilici per aumentare la ritenzione degli analiti più polari

COME SI SCEGLIE LA FASE STAZIONARIA?

La scelta della FASE STAZIONARIA è un punto chiave del procedimento, perché controlla parametri quali AFFINITA', SELETTIVITA' E CAPACITA'

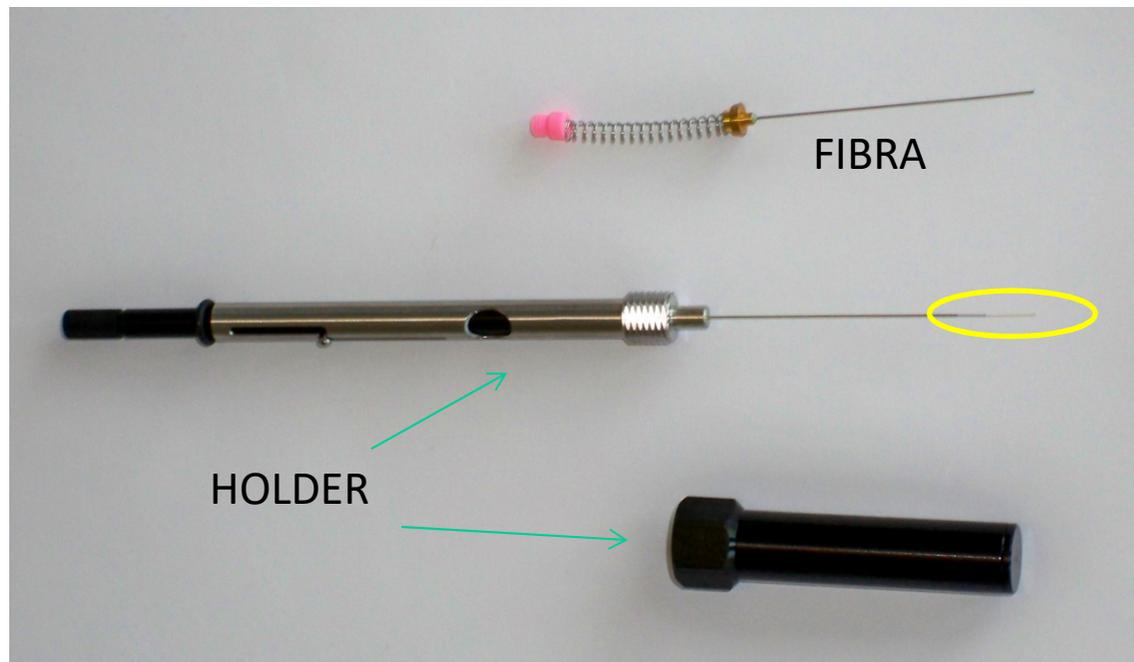
- ✓ Dipende fortemente dalla tipologia di analita e dalla sua interazione con la fase stazionaria attraverso i suoi gruppi funzionali.
- ✓ Dipende anche dalla matrice e dalla sua interazione sia con la fase stazionaria sia con l'analita

PROPRIETA' DI SOLVENTI USATI PER ESTRAZIONE

Solvente	Indice rifrazione	Viscosità	Teb	Indice polarità	Forza eluente
Fluoroalcani	1,27-1,29	0,4-2,6	50-174	-2	-0,25
<i>n</i> -Esano	1,372	0,3	69	0,1	0,01
Toluene	1,494	0,55	110	2,4	0,29
Dietil etere	1,350	0,24	35	2,8	0,38
Cloroformio	1,443	0,53	61	4,1	0,40
Etanolo	1,359	1,08	78	4,3	0,88
Acetato di etile	1,370	0,43	77	4,4	0,58
Metanolo	1,326	0,54	65	5,1	0,95
Acetonitrile	1,341	0,34	82	5,8	0,65
Acqua	1,333	0,89	100	10,2	grande

MICROESTRAZIONE IN FASE SOLIDA: SPME

- ✓ Tecnica sviluppata nel 1990 da Arthur and Pawliszyn
- ✓ Si basa sull'equilibrio di ripartizione degli analiti tra il campione, lo spazio di testa sopra il campione e una FIBRA di silice fusa rivestita da un'opportuna fase stazionaria

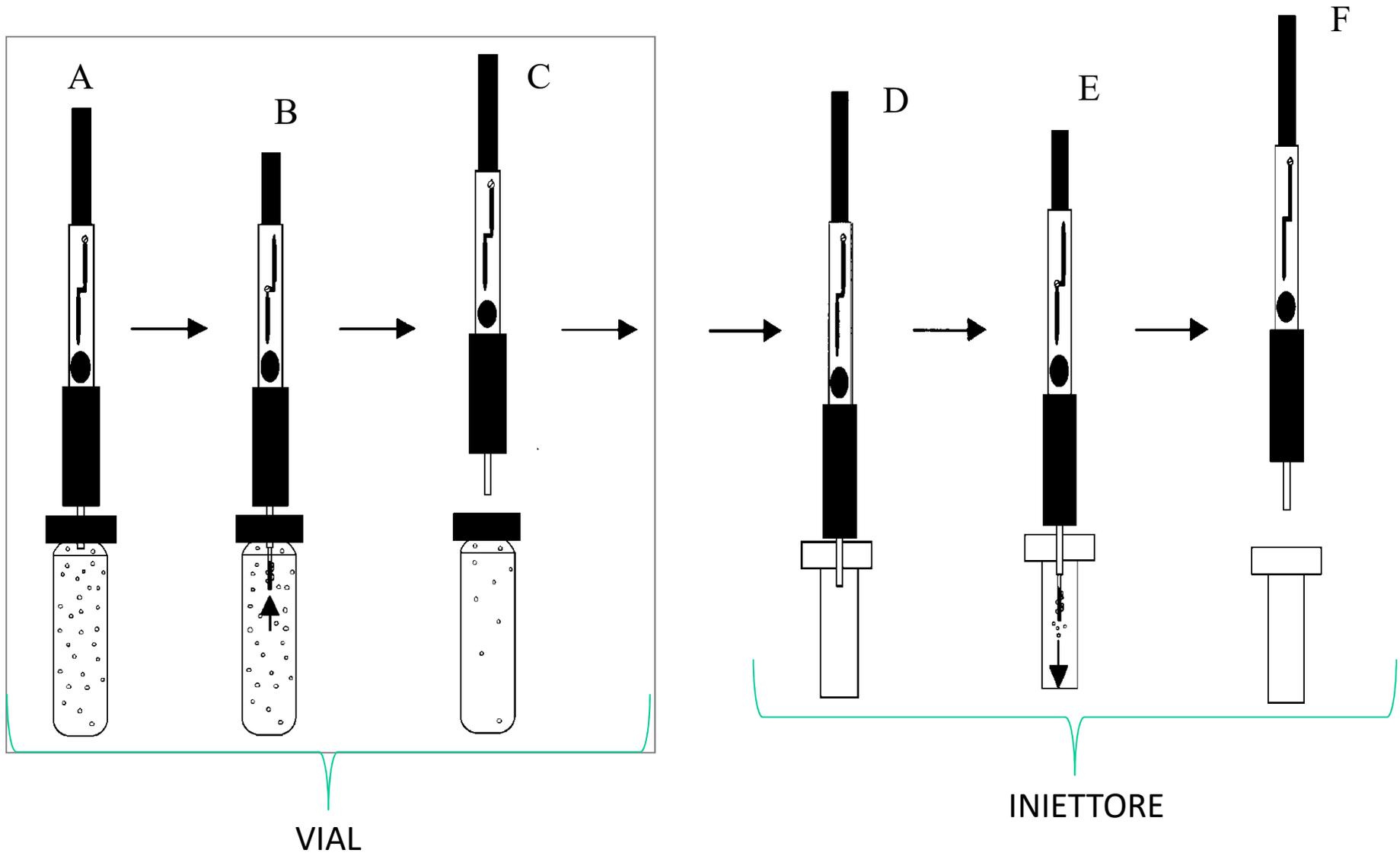


FIBRA SPME





VIALS CON SETTI A TENUTA



COME SI PUO' PROCEDERE? (MODALITA' OPERATIVE)

✓ *PER SPAZIO DI TESTA (HS-SPME)*

si introduce la fibra nello spazio di testa = fase vapore sovrastante il campione. Nel caso dello spazio di testa STATICO (tra i più utilizzati) il campione è contenuto in un vial dotato di setto a tenuta. Per campioni liquidi e solidi. Equilibrio raggiunto in tempi relativamente rapidi. Estrazione di analiti dai più volatili a quelli a più alta MM (30-600 Da)

✓ *PER IMMERSIONE (DI-SPME)*

la fibra è direttamente immersa nella matrice liquida; tempi più lunghi per l'adsorbimento, utilizzabile per un numero inferiore di campioni

COME AVVIENE il PROCESSO di ESTRAZIONE nello SPAZIO DI TESTA STATICO?

- FASE DI EQUILIBRIO
- FASE DI ESTRAZIONE
- FASE DI DESORBIMENTO

In un'analisi SPME in spazio di testa statico, gli analiti vengono estratti da un campione che si trova in un sistema chiuso (vial chiuso) dopo che si è instaurato un **equilibrio termodinamico** (partizione) tra matrice, spazio di testa e fibra (il raggiungimento dell'equilibrio può essere favorito dall'agitazione).

La quantità di analita estratto dalla fibra (n) dipende da: tempo di equilibrio, condizioni di agitazione, temperatura di estrazione, presenza di sali (aumento della forza ionica), volume del vial, volume del campione, tipologia della fibra (spessore e fase stazionaria del polimero).

DEVO QUINDI CONTROLLARE MOLTI PARAMETRI:

- Tipo di fibra
- Volume vial
- Quantità campione (v, w)
- Equilibrio (o non-equilibrio)
- Temperatura di estrazione (25 – 100°C)
- Tempi di estrazione
- Agitazione della matrice
- Aggiustamento forza ionica e/o pH

- ✓ È una tecnica rapida (combina in un unico step le fasi di campionamento, concentrazione dell'analita, separazione dalla matrice e introduzione del campione) e solvent-free
- ✓ Viene utilizzata ampiamente come tecnica innovativa nell'analisi degli alimenti
- ✓ Gli analiti target possono essere volatili (flavors e off-flavors) e non volatili (pesticidi)
- ✓ FASI STAZIONARIE: PDMS (polidimetilsilossano), CAR (carboxen), DVB (divinilbenzene), CW (carbowax), anche combinate tra loro (fibre bifasiche e trifasiche)

H. Kataoka et al. / J. Chromatogr. A 880 (2000) 35–62

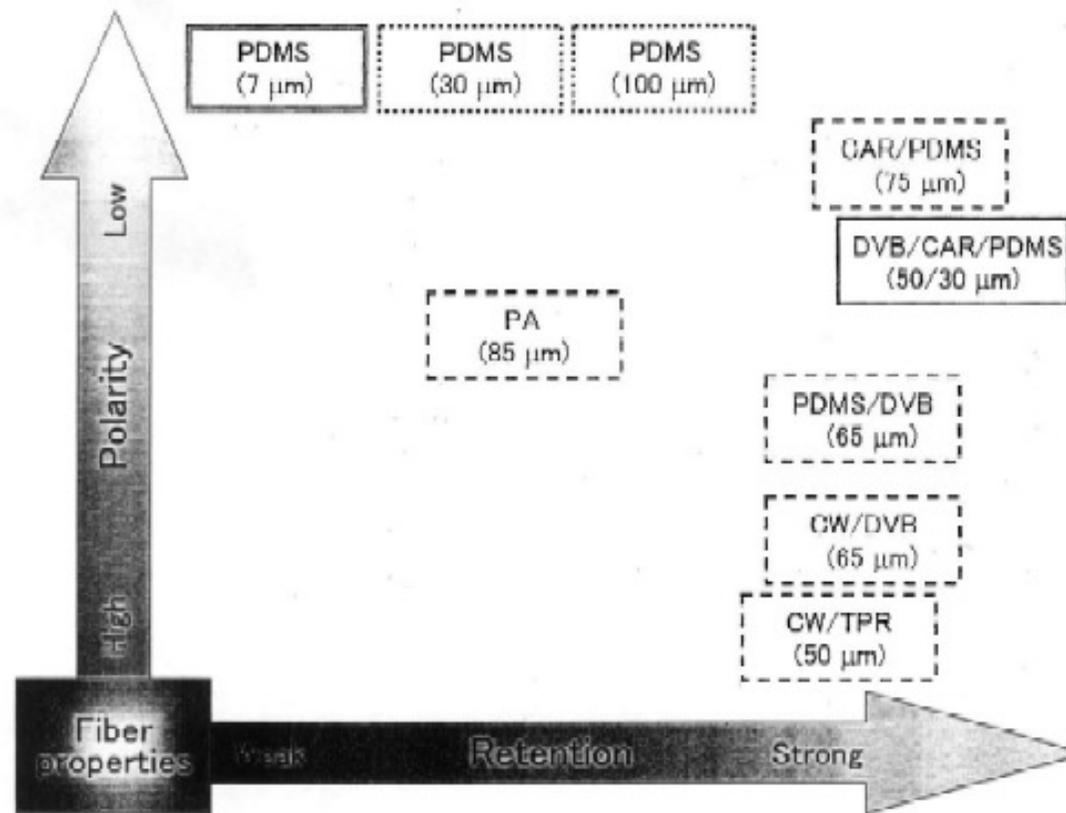


Fig. 2. Properties of commercially available SPME fibers. Bonded, non-bonded, partially crosslinked, highly crosslinked.

Table 1
 SPME methods for the analysis of flavor compounds in food samples

Analyte	Food sample	SPME conditions					Desorption temp. (°C)	Detection ^c	Ref.
		Fiber ^a	Extraction ^b	Temp. (°C)	Time (min)	Salt			
<i>Vegetables and fruits</i>									
Sulphur aroma	Truffle	95 µm PDMS	HS	80	30		200	GC-IT-MS	[37]
Sulphur volatiles	Onion	100 µm PDMS	HS		1		35	GC-MS	[38]
Menthol	Plant	65 µm CAR-PDMS	HS	50	10		250	GC-MS	[39]
Semi-volatiles	Cinnamon	100 µm PDMS	HS	70	5		275	GC-FID	[40]
Volatiles	Apple	100 µm PDMS	HS		5–90		200	GC-FID	[41]
Volatiles	Strawberry	85 µm PA	DI		0.5		250	GC-MS	[42]
Volatiles	Apple	100 µm PDMS	HS		2–30		250	GC-TOF-MS	[43]
Volatiles	Apple	100 µm PDMS	HS		20		275	GC-MS	[44]
Volatiles	Tomato	65 µm PDMS-DVB	HS	23	12		200	GC-TOF-MS	[45]
Volatiles	Strawberry								
Volatiles	Fruits	100 µm PDMS	HS	60	30		200	GC-FID	[46]
<i>Juices and other soft drinks</i>									
Volatiles	Fruit juice	85 µm PA	HS		40–60	NaCl	250	GC-FID	[47]
Volatiles	Beverages	100 µm PDMS	DI, HS		2, 60		200	GC-MS	[48]
Aroma volatiles	Cola	100 µm PDMS	HS	60	30		250	GC-MS	[49]
		85 µm PA							
Volatiles	Coffee	7, 100 µm PDMS	HS, DI	60, 40	120, 30		250	GC-FID	[50]
Orange flavor	Orange juice	100 µm PDMS	HS	40, 60	30, 20		220	GC-MS	[51]
Volatiles	Strawberry juice	100 µm PDMS	HS	50	5		250	GC-FID	[52]
Volatiles	Tomato juice	65 µm CW-DVB	HS	35	30	CaCl ₂	260	GC-MS	[53]
Volatiles	Beverages	100 µm PDMS	HS	49	30	NaCl	220	GC-IT-MS	[54]
		65 µm PDMS-DVB							
Caffeine, etc.	Beverages	Uncoated	DI		5		300	GC-MS	[55]
Caffeine	Beverages	100 µm PDMS	DI		5		250	GC-MS	[56]

Table 1
SPME methods for the analysis of flavor compounds in food samples

Analyte	Food sample	SPME conditions					Desorption temp. (°C)	Detection ^a	Ref.
		Fiber ^a	Extraction ^b	Temp. (°C)	Time (min)	Salt			
<i>Alcohol beverages</i>									
Alcohols, esters	Beer	85 μm PA	HS	50	60		240	GC-FID	[57]
Volatiles	Malt beverage	100 μm PDMS	HS	45	45–60		200	GC-FID	[58]
Bouquet	Wine	85 μm PA	HS, DI	60	15	NaCl	220	GC-FID	[59–61]
Sulphur aroma	Wine	100 μm PDMS	HS	30	15		250	GC-FPD	[62]
		85 μm PA					275		
Sulphur aroma	Wine	75 μm CAR-PDMS	HS	25	30		300	GC-FPD	[63,64]
Aroma volatiles	Wine	100 μm PDMS	HS	22	10		250	GC-MS	[65,66]
		85 μm PA	DI		60				
Diacetyl	Wine	60 μm CW-DVB	HS	40	10	NaCl	200	GC-MS	[67]
Aroma volatiles	Wine	100 μm PDMS	HS	20	15	NaCl	250	GC-O	[68]
Esters	Vodka, rum	100 μm PDMS	DI	Room temp.	30		250	GC-MS	[69]
<i>Dairy products</i>									
Volatiles	Cheese	100 μm PDMS	HS	60	20		220	GC-FID	[70]
		85 μm PA							
Aroma	Cheese	85 μm PA	HS	40	30		2	GC-MS	[71]
Aroma	Cheese	100 μm PDMS	HS, DI		4		200	GC-FID	[72]
		85 μm PA							
Fatty acids, lactones	Cheese	85 μm PA	HS	60	30		250	GC-FID	[73]
Volatiles	Cheese	65 μm PDMS-DVB	HS		40		220	GC-FID	[74]

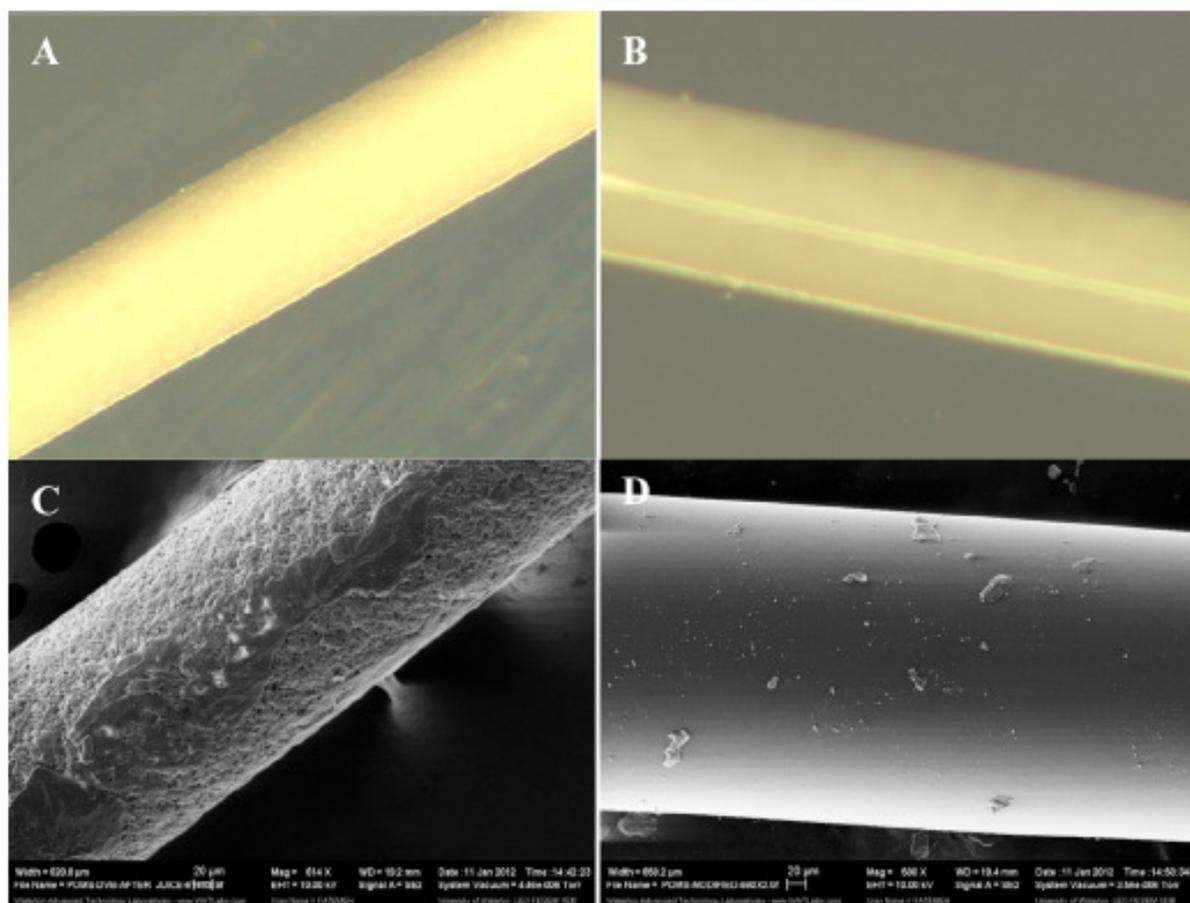


Fig. 1. (A) Micrograph of the commercial PDMS/DVB coating before extractions. (B) Micrograph of the PDMS/DVB/PDMS coating before extractions. (C) SEM images of the PDMS/DVB coating after 20 extractions cycles in grape. (D) PDMS/DVB/PDMS coating after over 130 extractions cycles in grape. (SEM surface morphology using 580 \times magnification). Reprinted with permission from ref [13]. Copyright 2010 American Chemical Society.

Vantaggi

- ✓ TECNICA relativamente veloce
- ✓ SOLVENT-FREE
- ✓ Elevata sensibilità per analiti polari e non-polari in un ampio range di matrici quando accoppiata a GC o LC

Svantaggi

- ✓ Bassa stabilità di mantenimento del campione (assorbimento sulle pareti del vial, evaporazione dalla fibra)

Campionamento in vivo su foglie di senape (*Brassica juncea*), di contaminanti

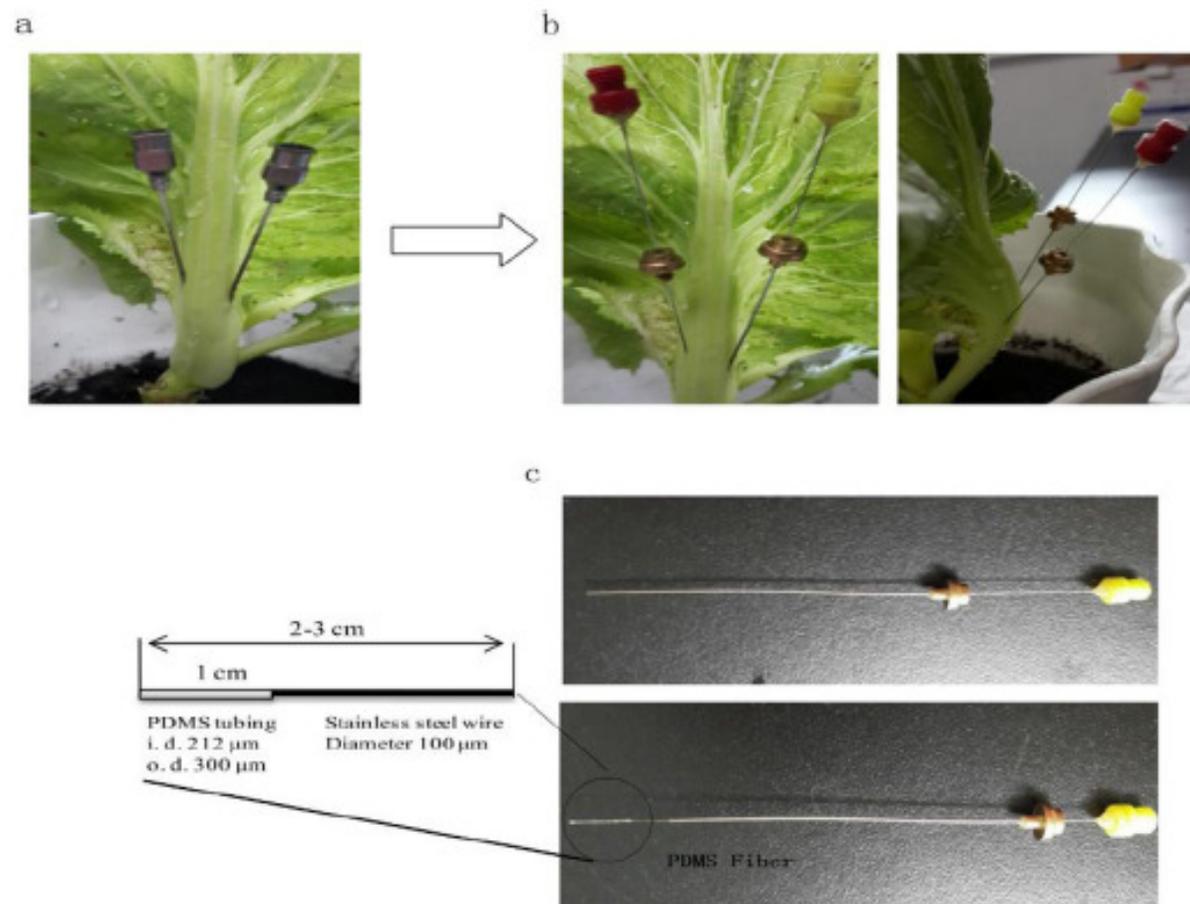
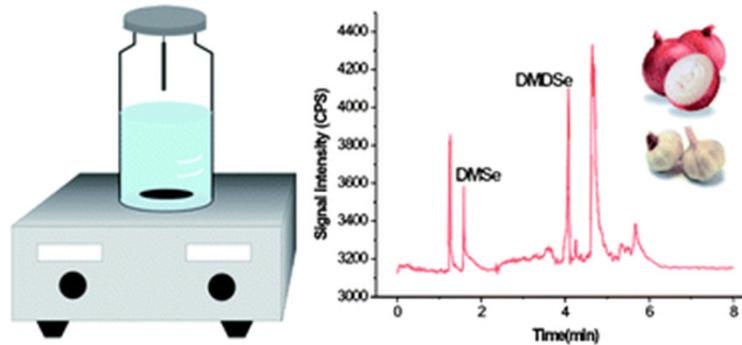


Fig. 2. The schematic diagram of *in vivo* SPME in mustard plant leaf. a) The petiole of mustard plants was pierced with a 26 gauge hypodermic needle to a depth of approximately 1.4 cm, b) two parallel samplings in both sides of the petiole were conducted at each sampling point, c) the custom-made 44 μm PDMS fiber. Reprinted with permission from ref [183]. Copyright 2015 Nature Publish Group.

Se uso un'ancoretta magnetica al posto della fibra

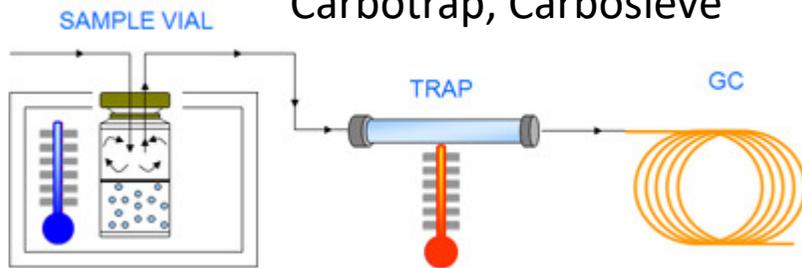


Estrazione per assorbimento su ancoretta (SBSE)

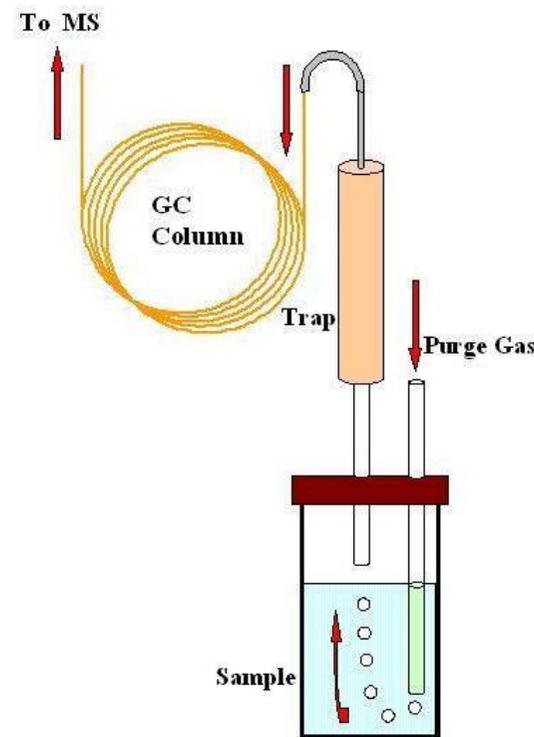


DYNAMIC HEADSPACE EXTRACTION AND PURGE AND TRAP

TRAP: Trappola con materiale adsorbente tipo Tenax TA[®], Carbotrap, Carbosieve



DYNAMIC HEADSPACE EXTRACTION



PURGE AND TRAP

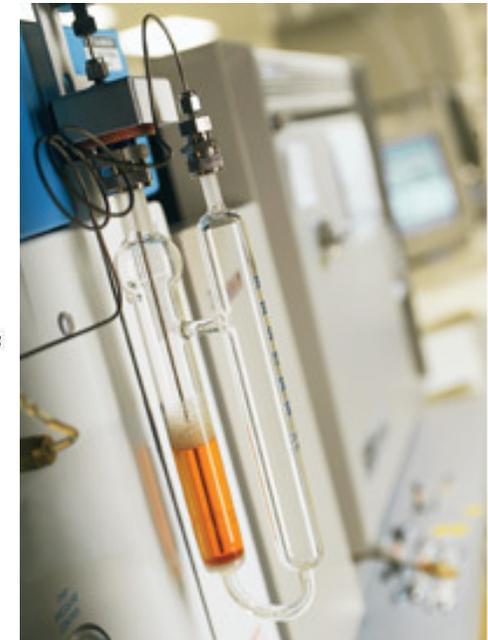


Table 1. Comparative chemical analysis among sage (*Salvia officinalis* L.) tea HS analyses by using HSSE, Tenax-TA® purge and trap extraction, HS-SPME, and terpene sorption by SBSE

Compound	LRI	HSSE	Tenax-TA	SPME	SBSE
1,8-Cineole	1031	18.60 (1.65) ^b	1.65 (0.30) ^c	10.45 (2.30) ^a	9.25 (3.45) ^a
Linalool	1097	3.30 (0.01) ^b	tr	7.92 (0.90) ^c	tr
α-Thujone	1103	18.45 (8.75) ^a	12.65 (3.01) ^a	26.95 (9.70) ^a	17.90 (3.65) ^a
β-Thujone	1114	29.50 (3.41) ^c	9.20 (2.70) ^b	10.75 (3.15) ^b	11.65 (1.10) ^b
Camphor	1146	22.40 (3.65) ^a	15.40 (1.60) ^a	21.50 (5.70) ^a	25.05 (2.02) ^a
Pinocamphone	1163	3.00 (0.95) ^a	0.30 (0.05) ^b	2.65 (0.90) ^a	1.80 (0.80) ^a
Isomenthone	1163	tr	0.15 (0.09) ^a	1.35 (0.50) ^a	0.85 (0.20) ^a
Borneol	1169	22.60 (1.52) ^a	4.60 (1.00) ^c	15.40 (0.80) ^b	34.15 (1.65) ^c
Terpinen-4-ol	1177	tr	0.40 (0.10) ^a	7.20 (1.60) ^c	3.00 (0.40) ^b
α-Terpineol	1189	tr	0.70 (0.35) ^a	tr	4.30 (0.75) ^b
Carvone	1243	tr	0.15 (0.05) ^b	2.00 (0.35) ^a	1.65 (0.10) ^a
Bornyl acetate	1289	25.90 (2.95) ^c	2.10 (0.80) ^b	21.05 (2.20) ^c	8.45 (1.04) ^a
Thymol	1290	tr	tr	1.10 (0.25) ^a	0.93 (0.42) ^a
Carvacrol	1299	tr	tr	1.35 (0.20) ^a	1.30 (0.13) ^a
Caryophyllene oxide	1583	tr	tr	4.75 (0.15) ^b	1.80 (0.35) ^a
Viridiflorol	1593	2.75 (0.35) ^b	tr	11.55 (3.65) ^a	13.20 (0.15) ^a
Humulene epoxide I	1604	tr	tr	5.25 (1.11) ^a	2.20 (0.01) ^b
Humulene epoxide II	1608	tr	tr	10.53 (1.25) ^a	4.35 (0.10) ^b
Humulene epoxide III	1615	tr	tr	tr	0.65 (0.04) ^a
Unknown sesquiterpene alcohol	1648	tr	tr	6.85 (2.95) ^a	5.74 (1.74) ^a
Total		146.50 (8.17) ^a	47.30 (2.58) ^b	168.60 (7.96) ^a	148.22 (7.77) ^a

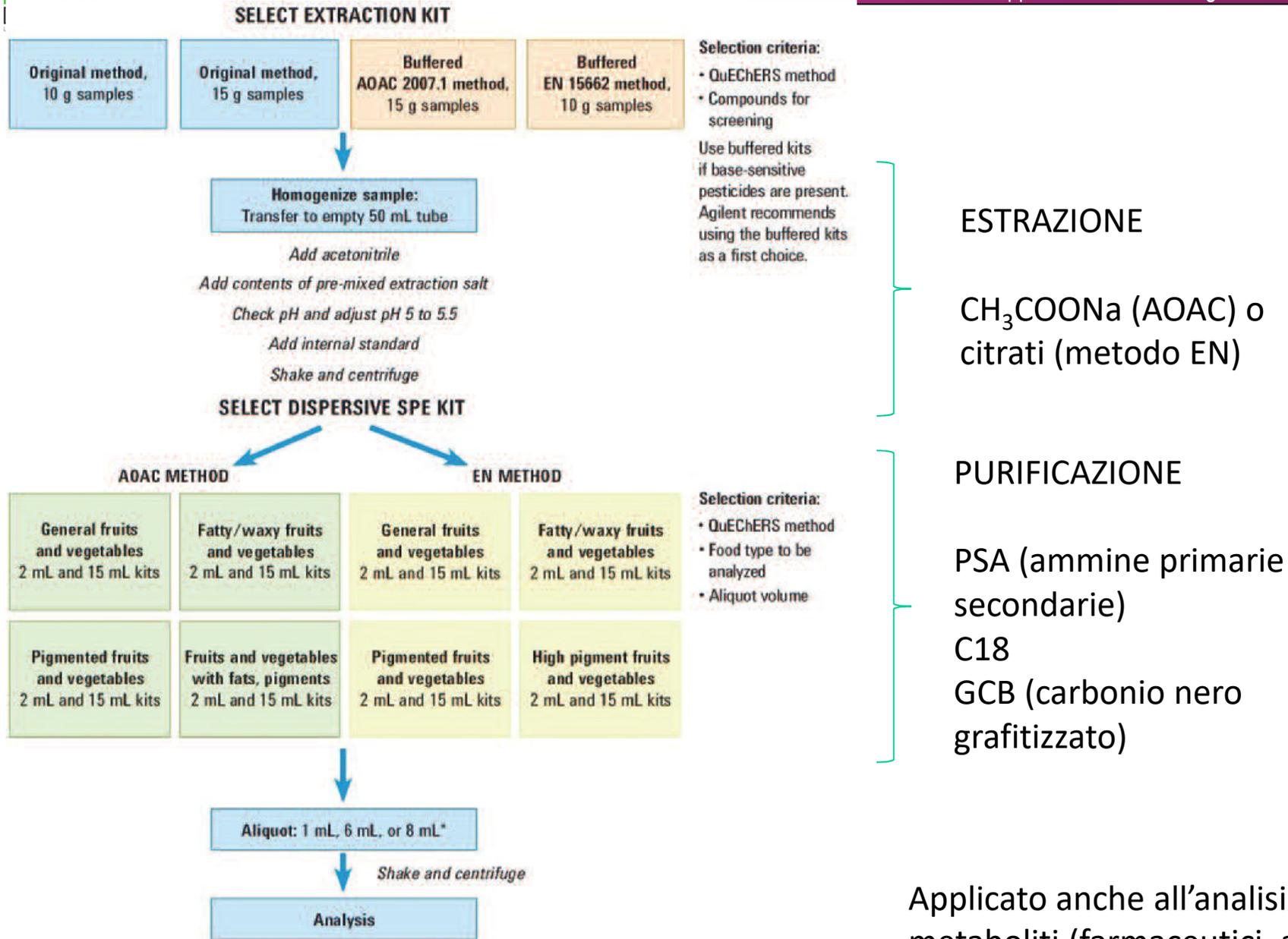
Values are expressed as milligram per kilograms dry weight. SD is shown in parentheses. In the same row, different letters indicate significant ($P < 0.05$) differences. LRI, linear retention index calculated against a C₈-C₂₀ *n*-alkanes mixture; tr, traces (<0.1 mg/kg dry weight).

QuEChERS

Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe (veloce, semplice, economico, efficace, robusto e sicuro)

- ✓ sviluppato nel 2003 da Steven Lehotay e Michelangelo Anastassiades per l'analisi dei residui di pesticidi in frutta e verdura
- ✓ si basa sulla rimozione della matrice invece che sull'estrazione selettiva degli analiti dalla matrice
- ✓ Il metodo è stato adottato come metodo ufficiale (AOAC e European Standard EN) per l'analisi dei residui di pesticidi

AOAC: Official Association of Analytical Communities



*Aliquot size is specified by the method, and kits are created for these specific amounts. For pesticides with acidic groups (phenoxycarboxylic acids), analyze directly by LC/MS/MS at this point (skip the dispersive SPE stage). These acidic groups interact with the PSA that is part of the dispersive SPE step.

Applicato anche all'analisi di altri metaboliti (farmaceutici, additivi alimentari, composti fenolici)

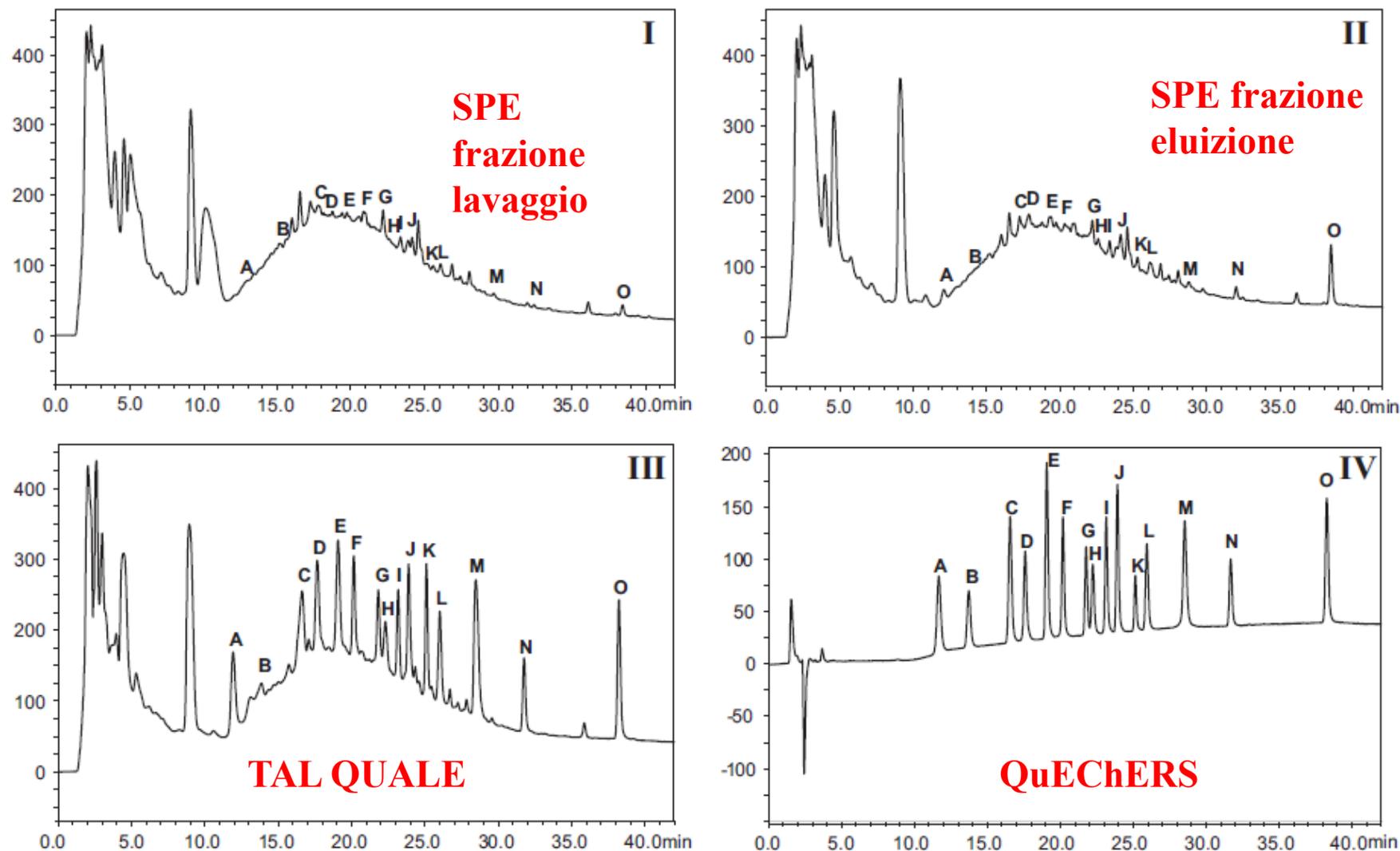
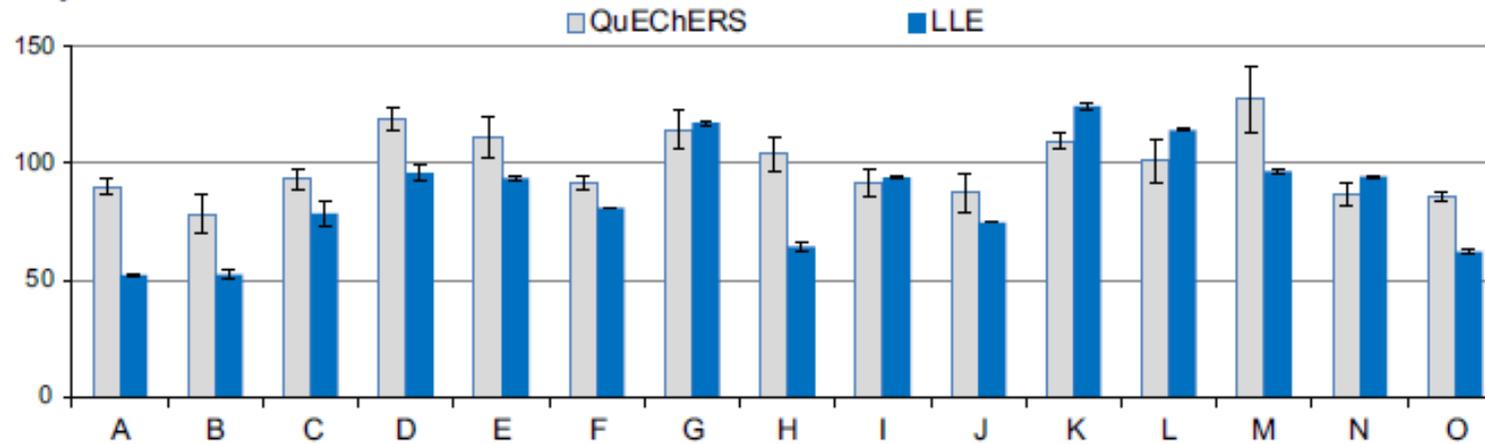


Fig. 2. Chromatographic separation of a standard mix (30 $\mu\text{g/mL}$; 10 μL injection) of previously reported antifungal compounds from LAB extracted/prepared using (I) SPE wash fraction [20] and (II) SPE elution fraction [20]. (III) Control MRS broth (direct injection, no sample preparation) and (IV) $\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}$ (90/10). Compounds listed in Table 1 and Fig. 1.

II)



Alti recuperi con

- costi bassi
- tempi ridotti di analisi di un gran numero di campioni
- manipolazione minima
- pochi rifiuti
- strumentazione base
- alti recuperi
- facilità di utilizzo
- applicabilità a numerose matrici