

Appunti di Tecniche avanzate per il controllo degli alimenti

Parte 4

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



La cromatografia liquida

High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

- ✓ L'HPLC, oggi, è considerata la tecnica cromatografica più diffusa, efficace e versatile.
- ✓ L'HPLC utilizza pressioni elevate per forzare il solvente (fase mobile) attraverso colonne impaccate con particelle molto piccole 5-10 μm (fase stazionaria).
- ✓ Il principio è principalmente quello della ripartizione.
- ✓ Con l'impiego di pompe particolari, capaci di applicare pressioni di 50-150 atm, diventa possibile ottenere flussi di alcuni ml/min, sufficienti ad ottenere l'eluizione in tempi ragionevolmente brevi.

SCHEMA DI UN SISTEMA HPLC

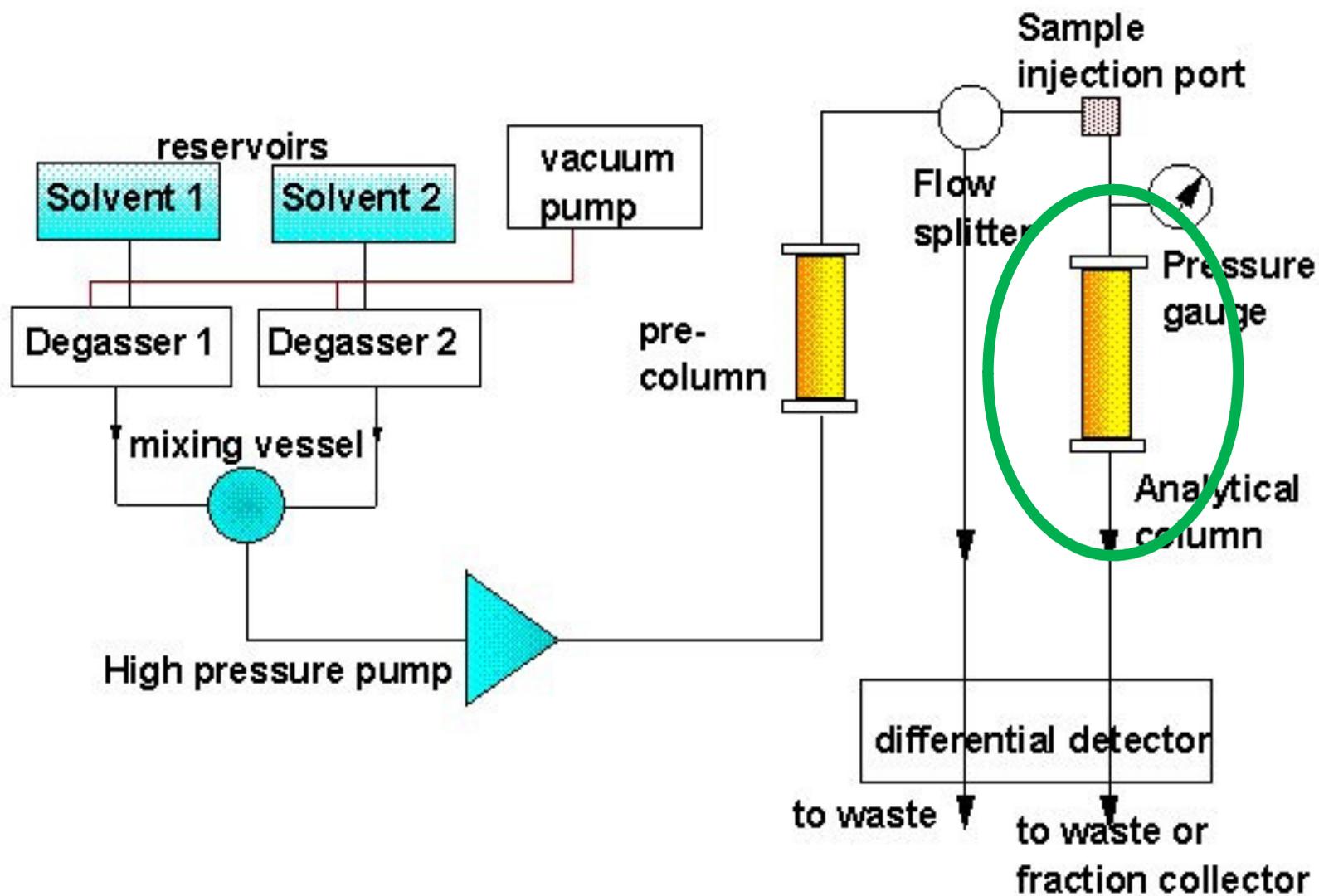


FOTO DI UN SISTEMA HPLC



Recipiente per fase mobile



RECIPIENTE PER FASE MOBILE

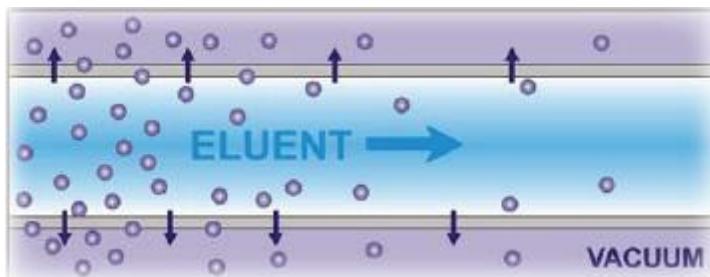
Filtro in ingresso: filtra il particolato in sospensione e funziona da peso.

I solventi devono essere degasati: l'O₂ disciolto nell'H₂O e nei solventi organici può generare bolle al momento della miscelazione. Il degasaggio rimuove l'O₂ disciolto eliminando le bolle dalla pompa.

Il degasaggio può essere fatto mediante:

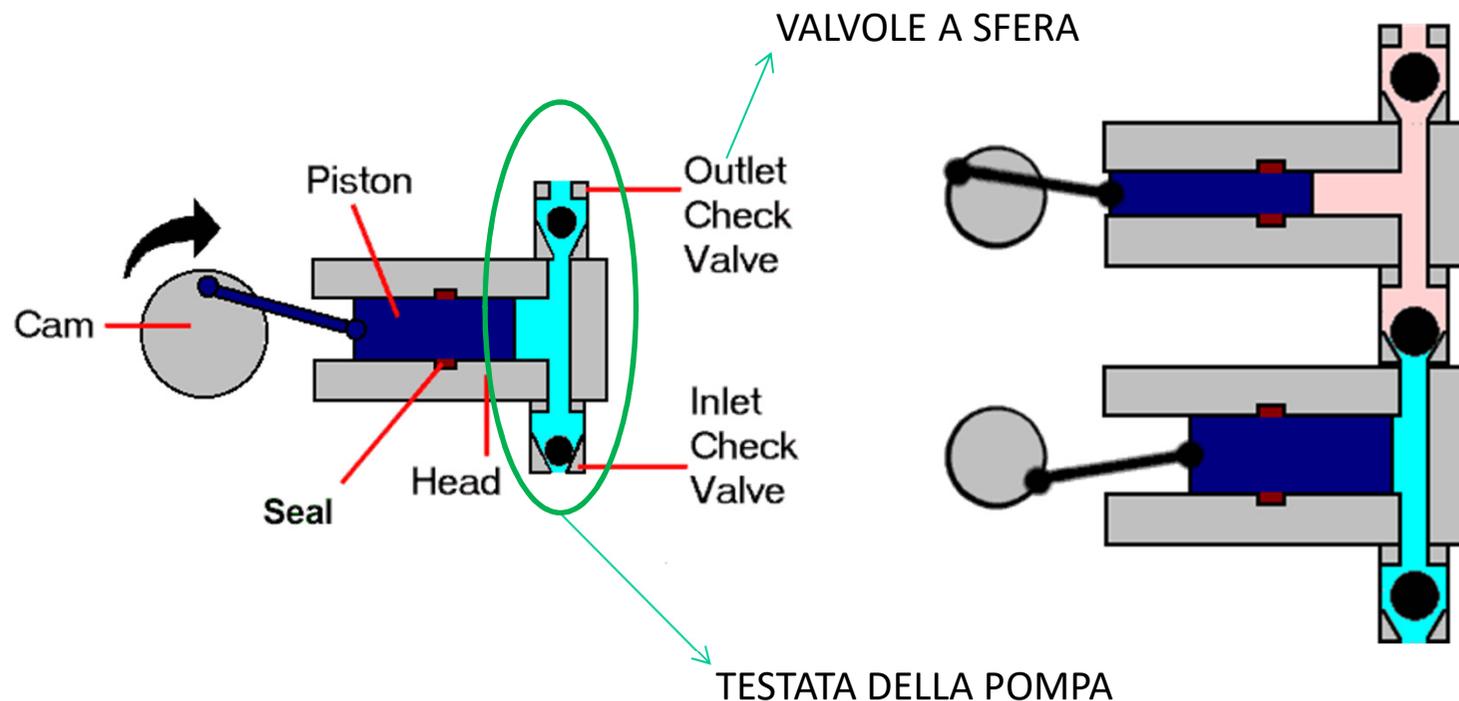
- gorgogliamento
- **vuoto (degasatori on-line)**
- ultrasuoni (meno efficace)

Principio funzionamento degasatore



POMPA

Ad alta pressione: forniscono elevate pressioni in ingresso (fino a 400 bar). Le prime producevano variazioni di pressioni (la pressione crollava durante la fase di riempimento della testata). Quelle moderne invece usano: 2 o 3 testate con flussi reciproci, camme appositamente progettate per ridurre la fase di riempimento, attenuatori di pulsazioni (dumper) e controllo elettronico del pompaggio.



In tal modo il flusso è riproducibile. Per velocità di flusso da 0,1 a 10 ml/min si usano testate analitiche, per flussi > si usano testate preparative.

MANUTENZIONE pompa: i solventi devono essere filtrati prima dell'ingresso; usare solventi freschi e degassarli; pulire la testata della pompa con HNO₃ diluito 0,1 N (settimanalmente); sostituire periodicamente le guarnizioni (3-6 mesi); tenere a portata di mano guarnizioni e valvole a sfera di ricambio.

MESSA IN FUNZIONE: eliminare preliminarmente l'aria presente nel sistema (spurgo).

MODALITA' OPERATIVE

Isocratica

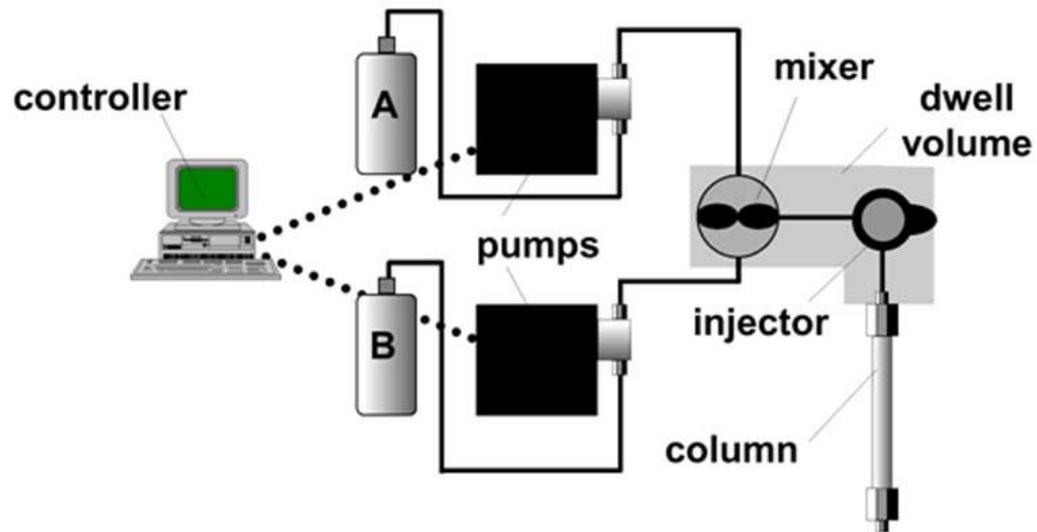
Si mantiene costante la composizione della fase mobile durante l'eluizione

Tempo (min)	A (%)	B (%)	Flusso (ml/min)
0	40	60	1
30	40	60	1

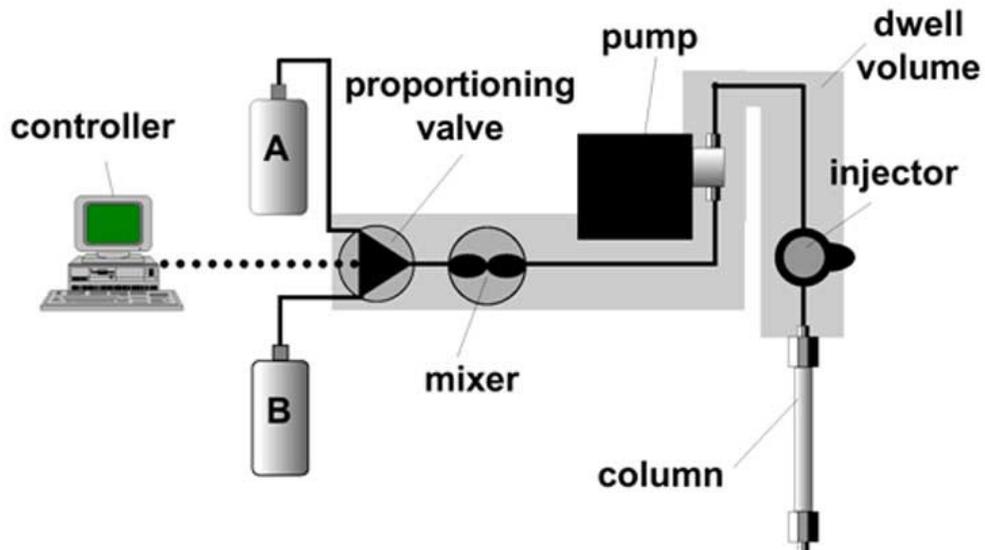
Gradiente

Si varia la composizione della fase mobile durante l'eluizione

Tempo (min)	A (%)	B (%)	Flusso (ml/min)
0	90	10	1
6	90	10	1
20	50	50	1
30	20	80	1
40	90	10	1



GRADIENTE AD ALTA PRESSIONE



GRADIENTE A BASSA PRESSIONE

Gradiente ad alta pressione: prevede l'utilizzo di due pompe, una controlla il flusso di A, l'altra controlla il flusso di B. Il controllo del flusso spesso avviene tramite software. Il gradiente è prodotto variando le velocità di flusso delle due pompe e mantenendo costante la velocità di flusso totale. Il flusso di A (solvente debole) diminuisce mentre il flusso di B (solvente forte) aumenta.

Costoso perché per usare più di due solventi occorre aggiungere una pompa per solvente.

Gradiente a bassa pressione: c'è una sola pompa ed una valvola proporzionatrice. Il gradiente è prodotto variando le proporzioni relative dei solventi che dalla valvola passano alla camera di miscelazione. Anche in questo caso A (solvente debole) diminuisce e B (solvente forte) aumenta durante l'eluizione. Può essere usato con massimo 4 solventi.

È necessaria una sola pompa ad alta pressione, con costi inferiori rispetto al gradiente in alta pressione. Ottimo per lo sviluppo del metodo per possibilità di usare più solventi.

VOLUME DI DIFFERIMENTO

E' il volume tra il punto di miscelazione dei solventi e l'inizio della colonna. Determina un ritardo nella formazione del gradiente, che è diverso nei due sistemi (gradiente ad alta o bassa pressione).

In alta pressione è di circa 1-2 ml, in bassa pressione 6 ml.

N. B. Nel caso di utilizzo di flussi bassi, 0.3 ml, e un vol di differimento di 6 ml avremmo un tratto di isocratica reale pari a 20 min!!!

SINTESI CARATTERISTICHE POMPA HPLC

- fornire elevate pressioni in uscita (fino a 400 bar)
- velocità di flusso da 0.1 a 10 ml/min
- riproducibilità del flusso
- elevata autonomia
- resistenza alla corrosione
- essere poco rumorosa, poco ingombrante e priva di vibrazioni eccessive
- consentire rapide operazioni di ricambio della fase mobile e di pulizia

INIETTORE

Ingrandimento del particolare della valvola di iniezione con loop



Prevede l'utilizzo di una tipica valvola di iniezione integrata da un capillare (loop) di volume opportuno in cui viene iniettato il campione mediante una normale siringa. È in acciaio per tutte le applicazioni.

I volumi del loop variano da 5 a 500 μl ; i più usati sono quelli da 10-20 μl ; per avere la massima precisione di iniezione, in genere si riempie il loop con almeno il 200-300% del suo volume (INIEZIONE A LOOP COMPLETO).

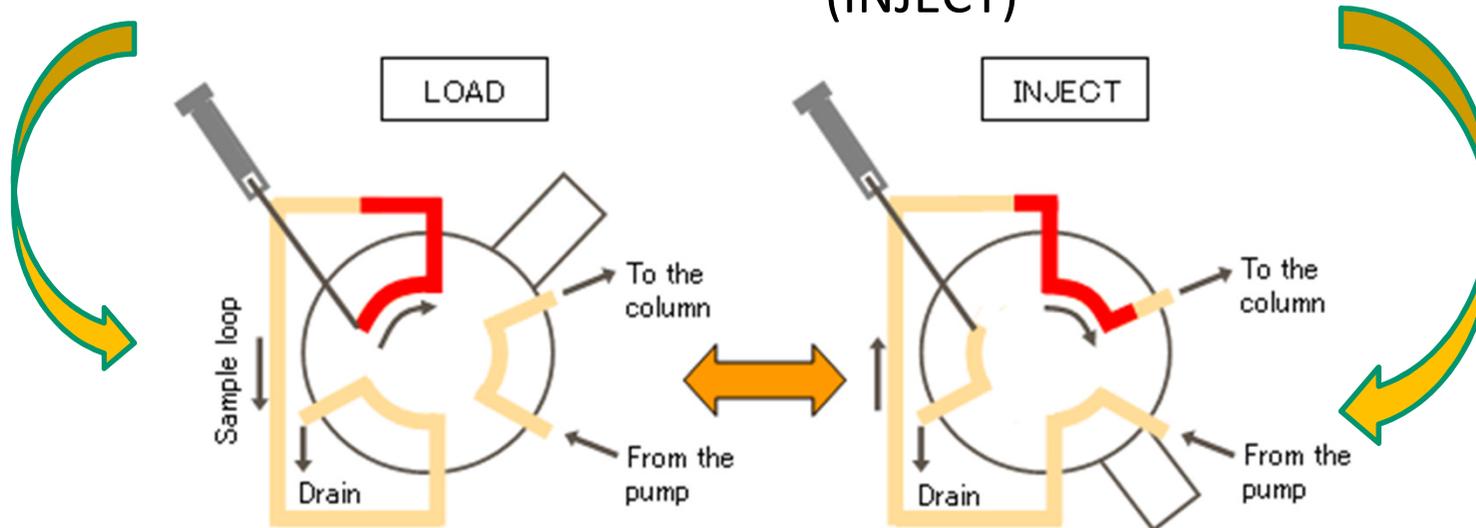
Valvola con loop



INIEZIONE IN MANUALE

In posizione di caricamento (LOAD)

In posizione di iniezione in colonna (INJECT)



INIEZIONE AUTOMATICA

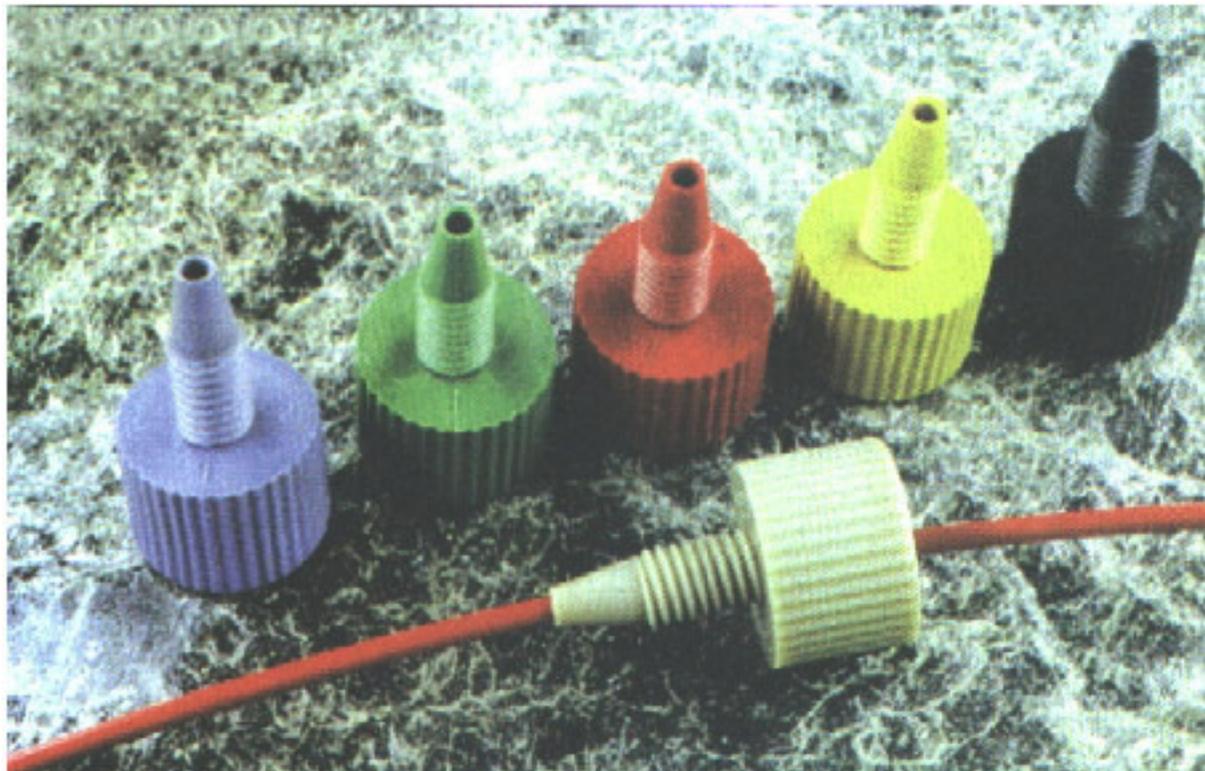
Nel caso in cui ci sia l'AUTOCAMPIONATORE l'iniezione avviene in modo automatico; si imposta sull'autocampionatore il volume di iniezione.

FOTO DI UN SISTEMA HPLC



CONNESSIONI: le connessioni ed i tubi possono essere in acciaio inox o in PEEK (più comodo e facile da tagliare).

Occorre scegliere le connessioni in modo tale da limitare il più possibile la formazione di volumi vuoti.



COLONNA

Analitiche microbore: diametro 1-2 mm; lunghezza 7-30 cm; quantità di campione 0,01 mg; flusso 0,1 ml/min.

Analitiche standard: diametro 3-5 mm; lunghezza 7-30 cm; quantità di campione 0,1 mg; flusso 1 ml/min.

Preparative: diametro 5-20 mm; lunghezza 25-50 cm; quantità di campione 10 mg; flusso 10 ml/min.

Materiale: acciaio perché resistente alle alte pressioni, ai solventi organici e agli acidi diluiti.



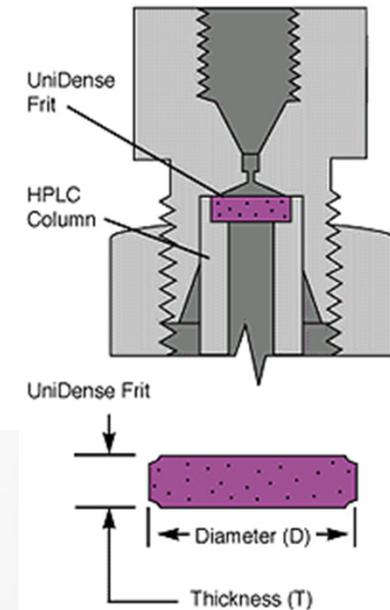
In testa alla colonna c'è un frit che ha il compito di disperdere il campione e la fase mobile in modo uniforme sull'impaccamento. Può intasarsi (per questo è necessario l'utilizzo di una precolonna).

COLONNE IMPACCAE

- riproducibilità
- testate singolarmente
- impaccate comunemente con particelle di diametro variabile tra 3 – 5 μm (colonne analitiche), 10 – 15 μm (colonne preparative)

COLONNE A CARTUCCIA

- più economiche
- bassa riproducibilità (bassa efficienza)
- testate a batch
- dedicate per LC/MS



PRECOLONNA: è una colonna messa in testa alla colonna analitica, fatta dello stesso materiale della colonna, con la funzione di impedire il passaggio di eventuali impurezze o contaminanti. Viene sostituita periodicamente. Garantisce la protezione della colonna e ne allunga la vita. Provoca un aumento della contropressione.

Può essere di vari tipi:



Colonna corta: è una precolonna con lunghezza pari al 10% della lunghezza della colonna e avente lo stesso diametro.

Cartuccia: inserita in un holder, con lunghezza fino a 1 cm.

Cartuccia corta: inserita in un holder, con lunghezza fino a 0,4 cm.

Si montano in testa alla colonna. Meglio la cartuccia corta: non influenza la cromatografia.

LE 4 VARIABILI FONDAMENTALI

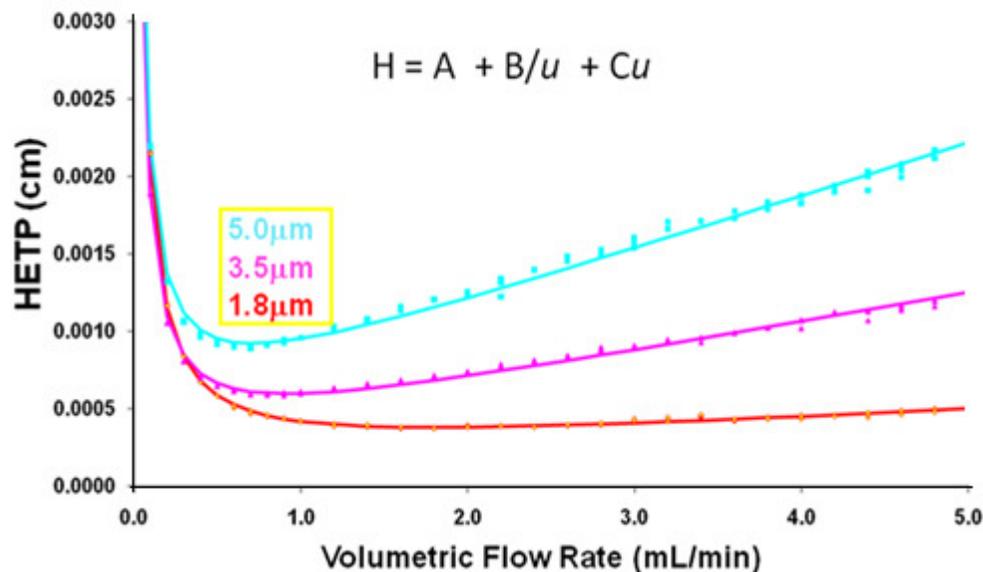
K' – fattore di capacità: per il suo calcolo si inietta un composto non ritenuto

A – selettività

N – efficienza (piatti teorici)

R – risoluzione ($\alpha > 1,2$; $10000 < N < 20000$; $2 < k' < 10$)

N è influenzata dal flusso: il valore massimo di N si ha in corrispondenza del min della curva (H min del piatto). Aumentando il diametro delle particelle il minimo si sposta verso l'alto ($N <$). Diminuendolo, $N >$ anche a flussi elevati.



Curve di Van Deemter per colonne 50x4,6 mm

A – diffusione vorticososa

B – diffusione longitudinale

C – resistenza al trasferimento di massa

u – velocità lineare

Per aumentare N

- aumento lunghezza colonna

- uso particelle più piccole

N – EFFETTO DEL DIAMETRO PARTICELLARE

Flow rate (ml/min)	Particle size (um)	Column lenght (mm)	N	Pressure (atm)	Rt
1	10	250	6250	25	13
1	5	250	12500	100	13
1	3	250	20833	278	13

N – EFFETTO DELLA LUNGHEZZA DELLA COLONNA

Flow rate (ml/min)	Particle size (um)	Column lenght (mm)	N	Pressure (atm)	Rt
1	5	250	12500	100	13
1	5	150	7500	60	8
1	5	100	5000	40	5
1	5	75	3750	30	4
1	5	50	2500	20	3
1	5	30	1500	12	2

MODALITA' SEPARATIVE

Modalità	Requisiti analiti	Fase stazionaria	Fase mobile
Fase diretta acquosa	Gruppi polari	Polare	Non polare
Fase inversa	Struttura idrofobica	Idrofobica	Polare
Scambio ionico	Gruppi carichi	Ionica	Bassa conc sali, pH adatto
Esclusione dimensionale	Dimensioni diverse	Porosità controllata	Molto polare o completamente apolare per annullare le interazioni con Fase Stazionaria

FASE INVERSA (RP)

La fase mobile consta in genere di due solventi, uno forte e uno debole. In RP l'acqua è il solvente debole, mentre l'acetonitrile, il metanolo e il tetraidrofurano (THF) sono i solventi forti. Tra questi solventi non esiste una differenza di selettività notevole, quindi piccole differenze di fase mobile non stravolgono la selettività.

Questa è invece influenzata dalle le interazioni tra analita e fase stazionaria. In RP le interazioni di tipo idrofobico (la ritenzione è proporzionale alla idrofobicità della molecola e proprio sulle differenze di idrofobicità si basa la selettività) rappresentano il meccanismo prevalente di ritenzione ma non l'unico. Vi sono infatti interazioni polari (legami H) che sono il più importante meccanismo di ritenzione secondario. Vi possono essere anche interazioni ioniche indesiderate tra i silanoli ionizzati e le basi cariche positivamente.

Ritenzione = interazioni idrofobiche + polari + scambio ionico

Meccanismo	RP	Separa analiti con differenza struttura	Solvente
Dispersivo (o idrofobico)	Principale (poco selettivo)	-CH ₂	Metanolo, acetonitrile, THF
Orientazione dipolo	Secondario	=O, -CN	acetonitrile
Ponte idrogeno	Secondario	-OH, -XH	Accettore (acqua, metanolo, acetonitrile, THF); donatore (acqua, metanolo)
Ioniche	A volte presente ma indesiderato	R ₄ N ⁺ , RO ⁻	-

TIPI DI FASE STAZIONARIA (RP)

1) *MATRICE* + 2) *DERIVATIZZANTE* (fase legata, per cromatografia di ripartizione)

1) *MATRICE*

A) Silice

B) Polimeri

C) Ibridi silice-polimero

A) SILICE

La silice è tra i materiali più diffusi.

VANTAGGI: robustezza, resistenza a p alte (migliaia di psi), derivatizzabile per formare fasi stazionarie a diversa selettività, disponibile in particelle di varie dimensioni, con porosità da 60 angstrom a oltre 300 angstrom, conferisce alto N

SVANTAGGI: stabile a pH acidi (si scioglie da pH 7), presenta attività dei silanoli anche dopo derivatizzazione con la fase legata

Evoluzione della silice:

primi anni '70: silice irregolare

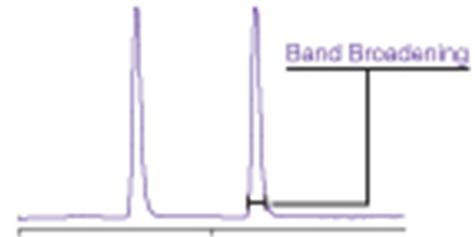
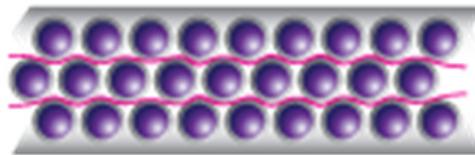
metà anni '70: silice sferica

metà anni '90: silice sferica ad alta purezza: forma più regolare (> N, migliore riproducibilità dell'impaccamento)

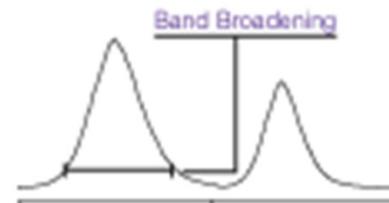
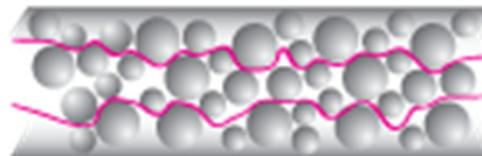
primi anni 2000: silice/polimero sferico

2008: core shell: nucleo solido rivestito da strati multipli di silice porosa, le particelle sono sferiche e tutte uguali

Kinetex Core-Shell



Fully Porous



L'area superficiale delle particelle di silice è inversamente proporzionale al diametro dei pori. Silici con pori piccoli (60-120 angstrom) hanno superfici di 200 – 400 m²/g (elevate aree superficiali).

La capacità di ritenzione è direttamente proporzionale all'area superficiale.

B) POLIMERI

Polimero polistirene + divinilbenzene (PS-DVB)

VANTAGGI: ampio intervallo di pH, facilmente derivatizzabile per formare fasi stazionarie a diversa selettività.

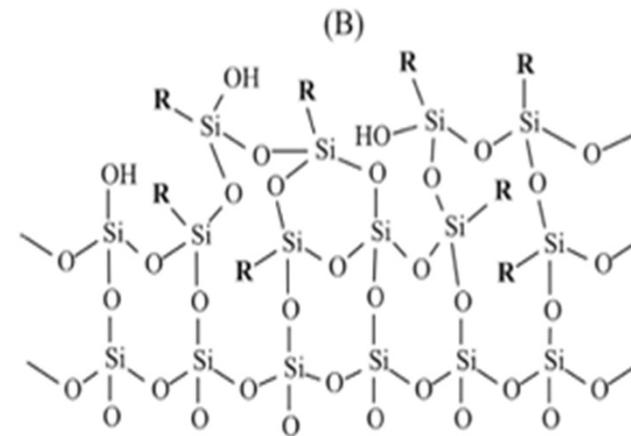
SVANTAGGI: non può essere impaccato ad alte pressioni, efficienza bassa, soggetto a rigonfiamento/restringimento.

C) IBRIDI SILICE-POLIMERO

Struttura interna in silice e struttura esterna polimerica

VANTAGGI: ampio intervallo di pH, stessa resistenza meccanica della silice

SVANTAGGI: Efficienza inferiore della silice



2) **DERIVATIZZANTE**: la silice viene derivatizzata con una **fase funzionalizzante**.

Molti silanoli in superficie non reagiscono a causa dell'ingombro sterico, e vanno a costituire i cosiddetti "silanoli liberi".

Fasi funzionalizzanti: alchiliche (C_1 - C_{30}), feniliche C_2 -Ph, C_6 -Ph), fluorurate (perfluorofenile, PFP).

Fasi alchiliche

✓ Le fasi alchiliche interagiscono con la parte idrofobica della molecola da separare attraverso forze deboli (Van der Waals). Le catene più lunghe sono più idrofobiche perché danno un numero > di interazioni di questo tipo.

✓ Le più utilizzate sono le C_8 (octil), le C_{12} o C_{16} (alchil) e le C_{18} (octadecil).

✓ Catene più corte permettono di avere un grado di copertura della silice più elevato, quindi più resistenti e inerti (< concentrazione di silanoli liberi)

✓ I silanoli liberi possono dare interazioni indesiderate e causano picchi scodati. Per disattivarli si fanno reagire i materiali per RP con il trimetilsililcloruro (TMS) tramite un processo detto "endcapping" che dà origine a colonne "endcapped".

- ✓ le fasi idrofobiche utilizzate con H₂O possono collassare (non ritengono più e i composti eluiscono prima). Per il ripristino si fa passare del solvente organico.
- ✓ Per prevenire il collassamento della fase idrofobica si possono incorporare gruppi polari come eteri, ossidrili, carbammati o ammidi alla base della catena idrofobica, vicino alla superficie della silice oppure si utilizza un endcapping polare, con un gruppo polare al posto del TMS .

Fasi feniliche

- ✓ la selettività di queste fasi si basa sulle interazioni che si instaurano tra le nuvole elettroniche delocalizzate degli anelli benzenici.
- ✓ La lunghezza della catena alchilica che lega il fenile determina l'idrofobicità complessiva della fase stazionaria.
- ✓ Ha le stesse caratteristiche di selettività ma idrofobicità < rispetto ad una alchilica con lo stesso numero di C.

Fasi fluorurate

- ✓ hanno selettività particolare verso molecole contenenti gruppi alogenati o fortemente elettronegativi (-OH, -COOH, -NO₂). Elevate polarità in grado di interagire fortemente con molecole contenenti gruppi polari.
- ✓ Usate per separare molecole alogenate o polari con strutture simili che non vengono differenziate su fasi alchiliche tradizionali.

SCELTA DEI PARAMETRI GEOMETRICI

Il diametro maggiormente diffuso è il 4.6 mm. Il diametro delle particelle più diffuso è 5 μm . Per diametri < si consigliano colonne più lunghe di 15 cm. Per ottenere picchi più stretti e minor consumo di fase mobile si usano anche diametri di 3 mm.

FASE MOBILE

- ✓ Le fasi mobili utilizzate in HPLC sono liquide.
- ✓ I requisiti generali cui deve rispondere un eluente sono:
 - Bassa viscosità
 - Immiscibilità con la fase stazionaria
 - Basso costo e facile reperibilità
 - Capacità di solubilizzare il campione
 - Bassa volatilità
 - Compatibilità con il rivelatore
 - Minima tossicità possibile
 - Bassa corrosività
 - Elevata purezza (HPLC grade)
- ✓ La scelta della fase mobile dipende dalla fase stazionaria utilizzata
- ✓ Selettività

La forza eluente si regola attraverso la % di solvente forte. In RP si indica con A il solvente debole e con B il solvente forte.

Durante l'eluizione in isocratica la forza solvente rimane costante durante tutta la corsa cromatografica, mentre nell'eluizione a gradiente il rapporto solvente forte – solvente debole cambia. Si inizia con una bassa % di B e si termina con un'alta % di B. La velocità di incremento di B viene detta PENDENZA DEL GRADIENTE ed è espressa in % B/min.

Risulta fondamentale controllare

✓ il tempo di riequilibrio, cioè il tempo che occorre per riequilibrare la colonna alla % iniziale di B al termine del gradiente (in genere 15-20 min, in dipendenza dal formato della colonna e dalla differenza tra la % iniziale e finale di B).

✓ Il volume di differimento che è il ritardo con cui il gradiente appena formato arriva alla colonna e che produce un tratto di isocratica nel profilo del gradiente. È una caratteristica del sistema e deve essere calcolato e tenuto in considerazione nel momento in cui si trasferisce il gradiente ad un altro sistema HPLC.