

Appunti di Tecniche avanzate per il controllo degli alimenti

Parte 5

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



I RIVELATORI

CARATTERISTICHE GENERALI

- ✓ Sensibilità a basse concentrazioni di tutti gli analiti.
- ✓ Risposta lineare al soluto, possibilmente per parecchi ordini di grandezza.
- ✓ No allargamento dei picchi eluiti (volume del rivelatore < 20% della larghezza della banda cromatografica).
- ✓ Insensibile alle variazioni di temperatura e di composizione del solvente.

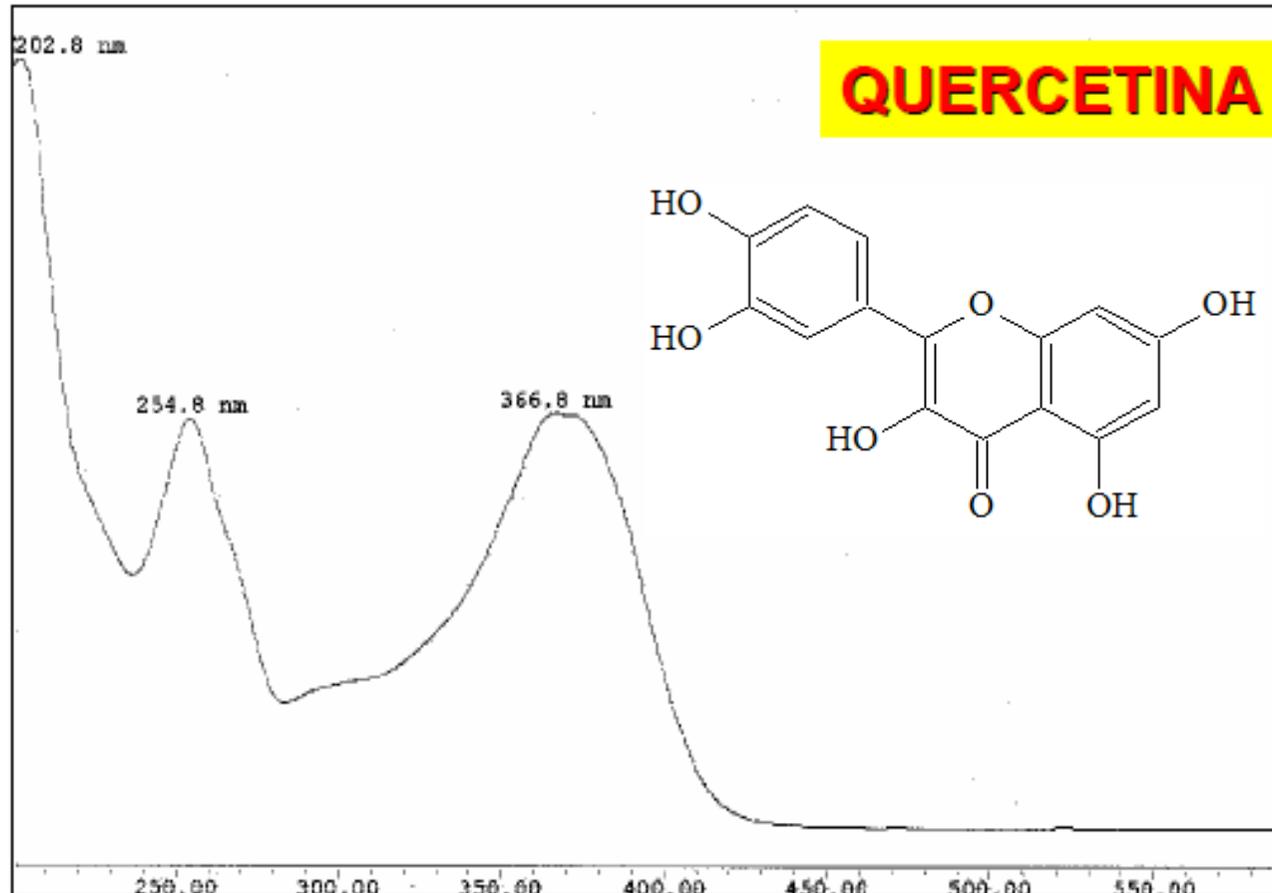
Rivelatori spettrofotometrici

- ✓ **Rivelatore a ultravioletti (UV):** sfrutta la capacità dei soluti di assorbire la radiazione ultravioletta (legge di Beer). Vedere cut off dei solventi (cioè le lunghezze d'onda a cui assorbono).
- ✓ **Rivelatore a fluorescenza:** misura la fluorescenza dell'analita.

Rivelatore a indice di rifrazione

Rivelatore a luce diffusa

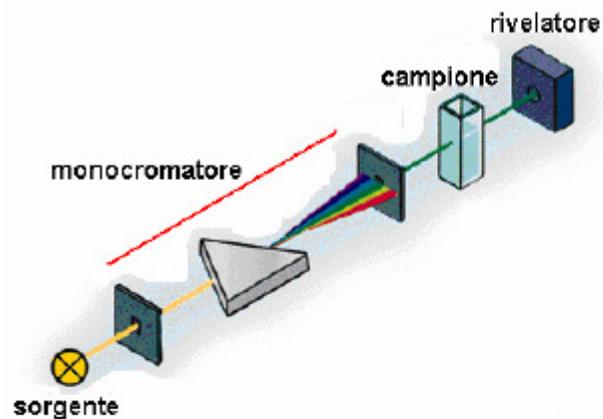
Spettro di assorbimento UV-VISIBILE della quercetina



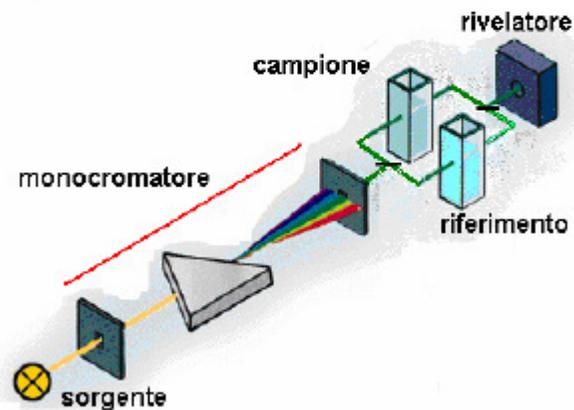
Spettro tipico
di tutti i
flavonoli (max
tra 360 – 370)

TIPI DI SPETTROFOTOMETRI

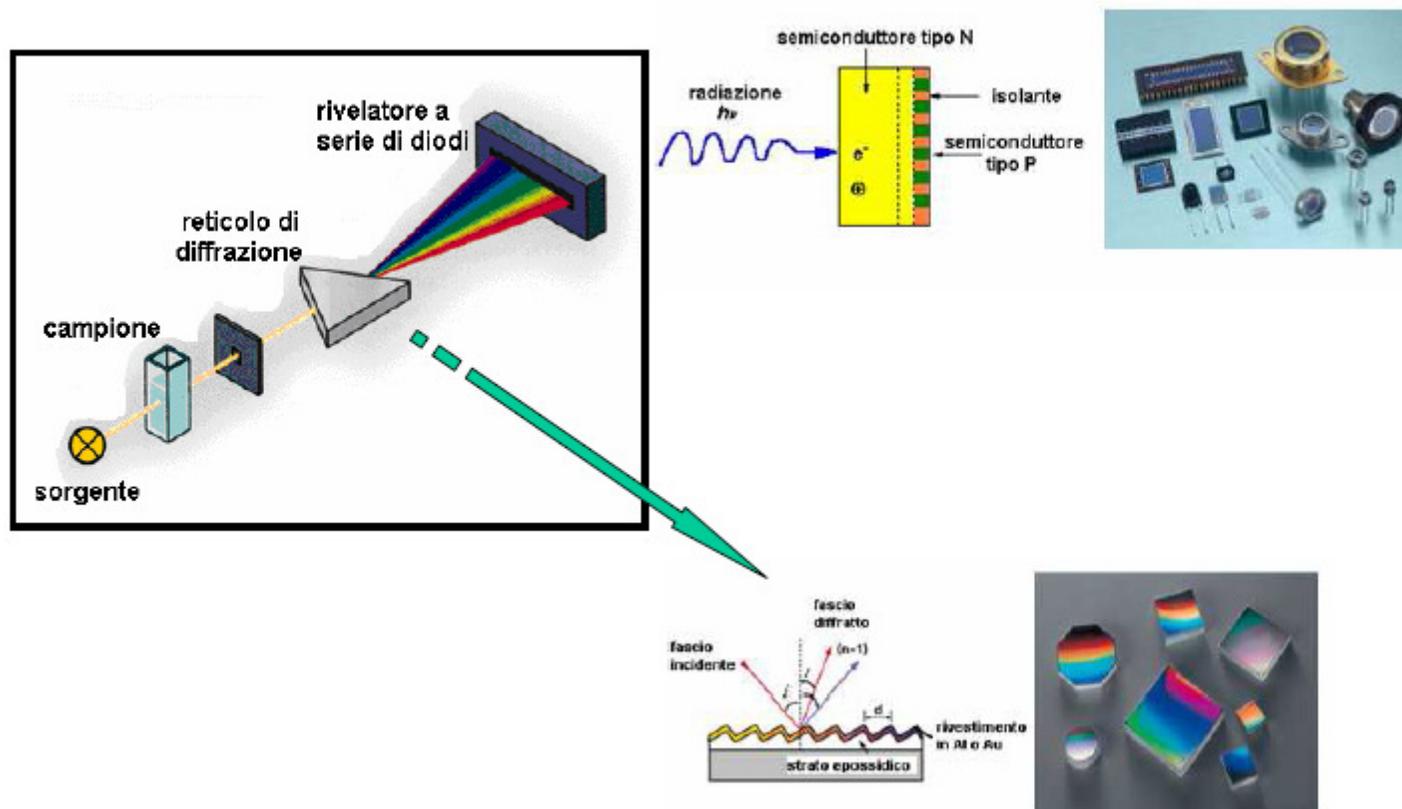
Singolo raggio



Doppio raggio



Spettrofotometro con rivelatore a serie di diodi



Il rivelatore UV a serie di diodi è tra i più utilizzati in HPLC.

La luce proveniente dalle lampade passa attraverso il campione, poi attraverso un monocromatore (la divide in tutte le sue componenti), quindi alla serie di diodi.

Tutte le lunghezze d'onda sono rivelate contemporaneamente. Il segnale è proporzionale alla concentrazione dell'analita.

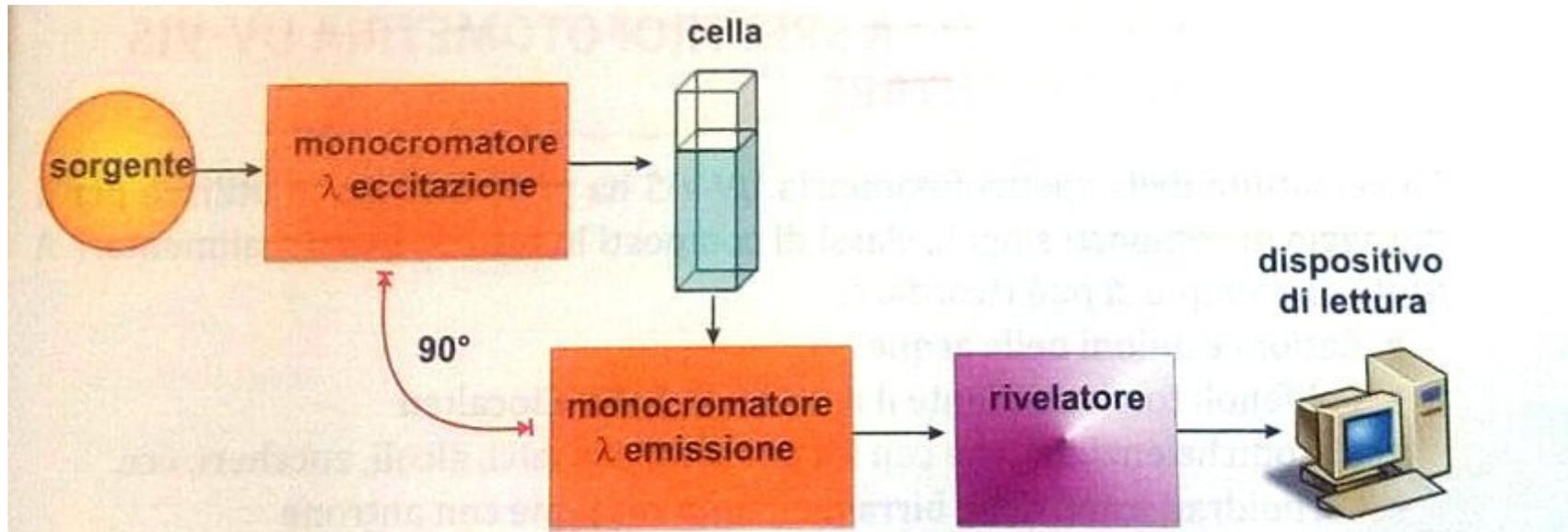
Un PC può processare, registrare e mostrare gli spettri in continuo durante l'analisi.

Inoltre si possono registrare i cromatogrammi a ciascuna λ .

VANTAGGI

- Versatilità: possibilità di selezionare λ da 190 a 800 nm (range dell'UV e del visibile)
- Elevata sensibilità: potendo scegliere la λ ottimale (massima assorbanza) per un analita.
- Selettività: quando si hanno sovrapposizioni di picchi si può variare la λ in modo tale da minimizzare l'assorbimento degli interferenti
- Possibilità di utilizzare gradiente di eluizione, scegliendo una λ alla quale la miscela solvente non assorbe
- Compatibilità con la modalità in gradiente

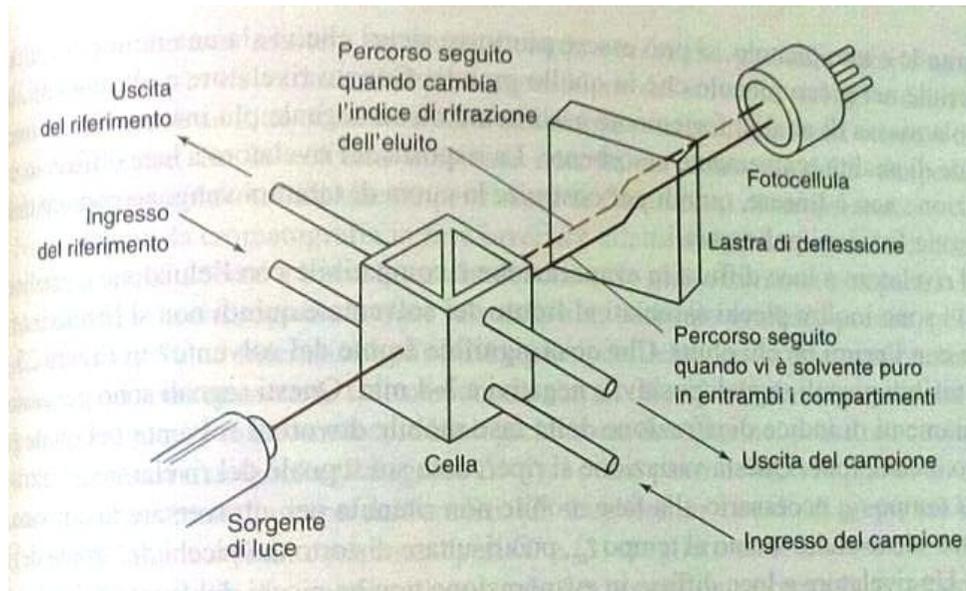
Rivelatore a fluorescenza



È molto sensibile ma risponde solo a pochi analiti naturalmente fluorescenti. Per gli altri analiti si ricorre alla derivatizzazione. Lo strumento ha una sorgente luminosa (xeno) e quando un campione fluorescente passa attraverso la cella assorbe la radiazione di eccitazione specifica ed emette una radiazione di fluorescenza a $\lambda >$. L'intensità della luce emessa è misurata da un fotomoltiplicatore posto a 90° rispetto al fascio incidente.

Si possono analizzare tocoferoli e micotossine. Aminoacidi e ammine biogene devono invece essere derivatizzate con derivatizzanti quali il dansil cloruro.

Rivelatore a Indice di Rifrazione (RI)



Il rivelatore a indice di rifrazione (RI) misura la differenza nell'indice di rifrazione tra la cella del campione e una cella di riferimento che generalmente contiene soltanto l'eluente. Si utilizza un fascio di luce collimato e filtrato per rimuovere la luce infrarossa che riscalderebbe il campione. Quando l'eluente contenente l'analita entra nella cella del campione, il raggio viene deflesso e inviato al fotodiodo producendo un segnale in uscita differente rispetto a quello prodotto dal solo eluente.

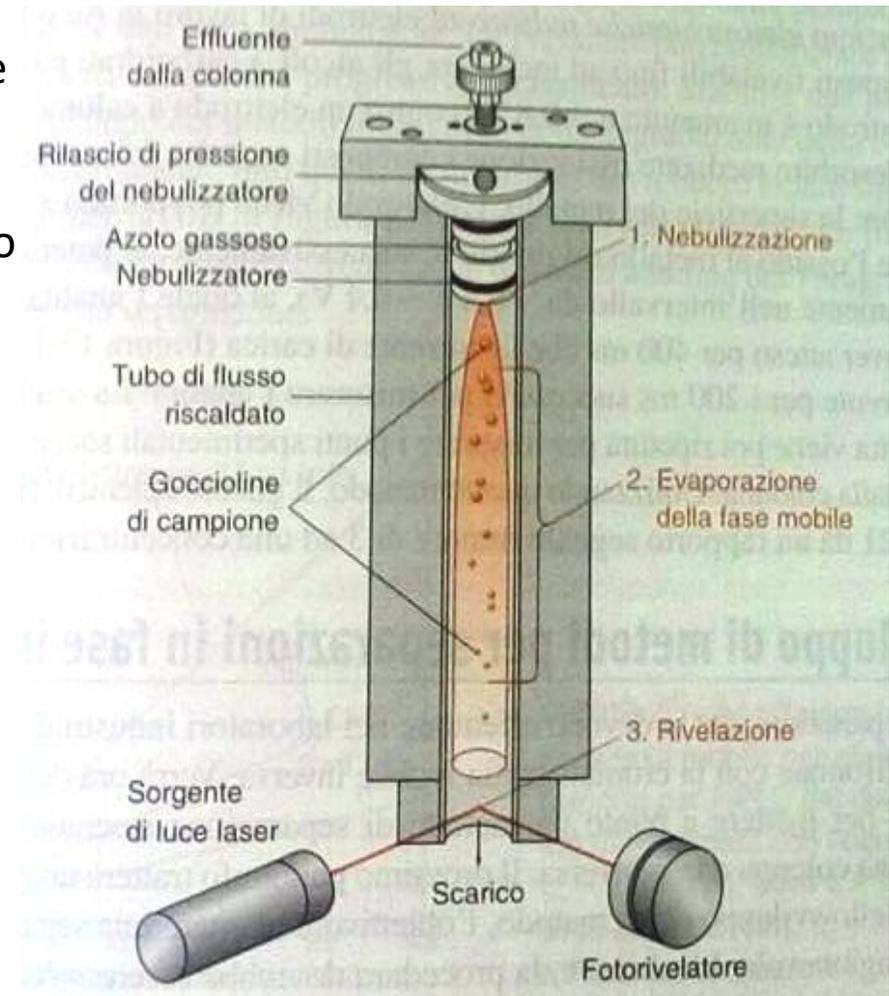
VANTAGGI E SVANTAGGI
È un rivelatore universale, risponde a tutti i composti. Si utilizza per analiti che non assorbono in UV (es. idrocarburi saturi, alcol, eteri).

Svantaggi: è poco sensibile. Non è compatibile con gradienti di eluizione, è sensibile a variazioni di p e T e richiede un certo tempo di stabilizzazione prima di poter procedere alle analisi.

Usato per determinare gli zuccheri e acidi.

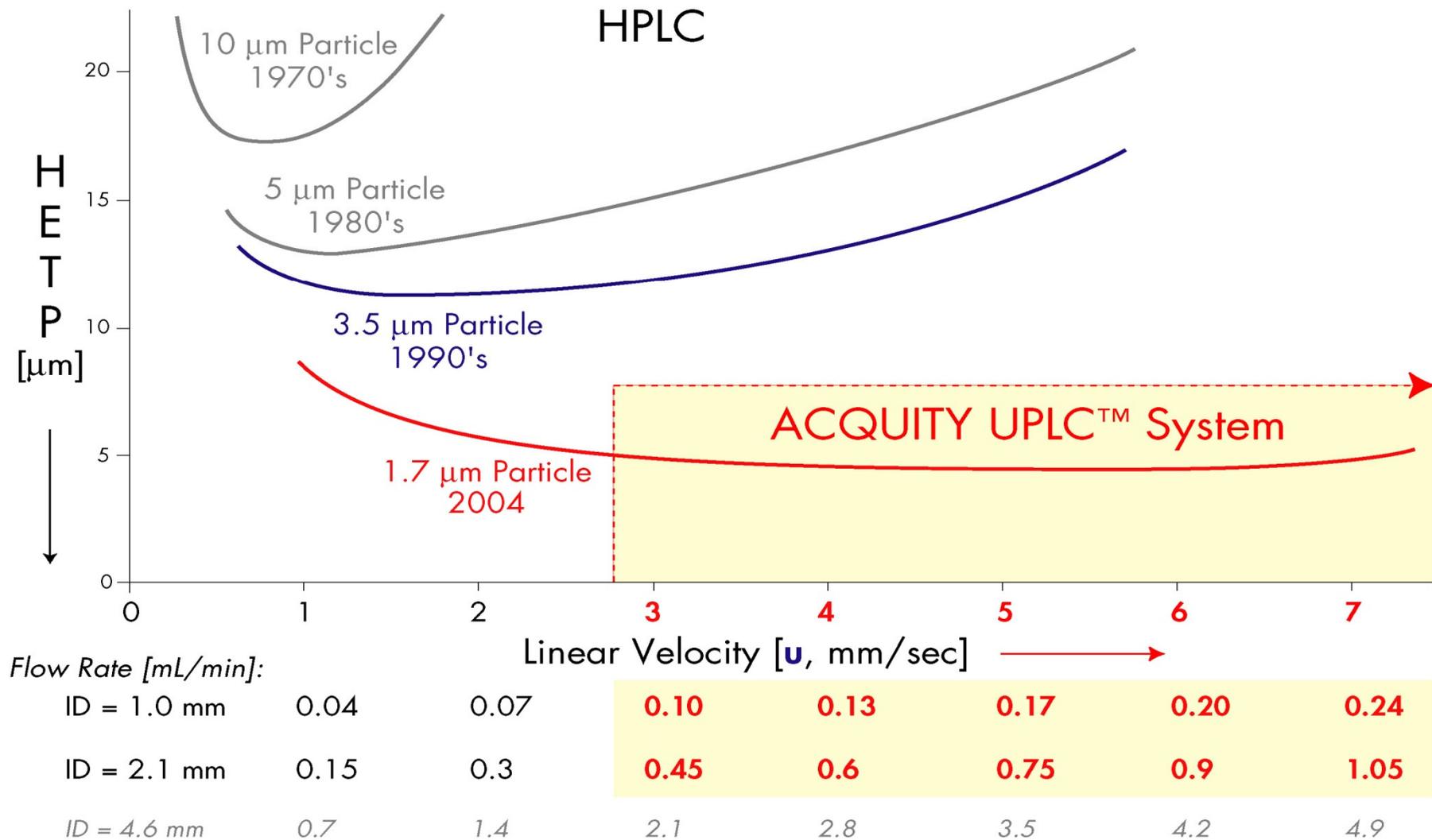
Rivelatore a luce diffusa (light scattering detector)

Utilizza uno spray prodotto da aria o altro gas inerte che atomizza l'eluente in uscita dalla colonna, lasciando i soluti come particolato sospeso nel gas atomizzato. Le particelle sospese passano attraverso un raggio di luce e la luce diffusa viene rivelata da un fotodiode messo a 90° rispetto al laser. Il rivelatore risponde a tutti i soluti non volatili, secondo la legge di diffusione di Rayleigh: la quantità di luce dipende dalle dimensioni delle particelle e dalla λ della luce. Per avere risposte lineari bisogna controllare la dimensione delle gocce.

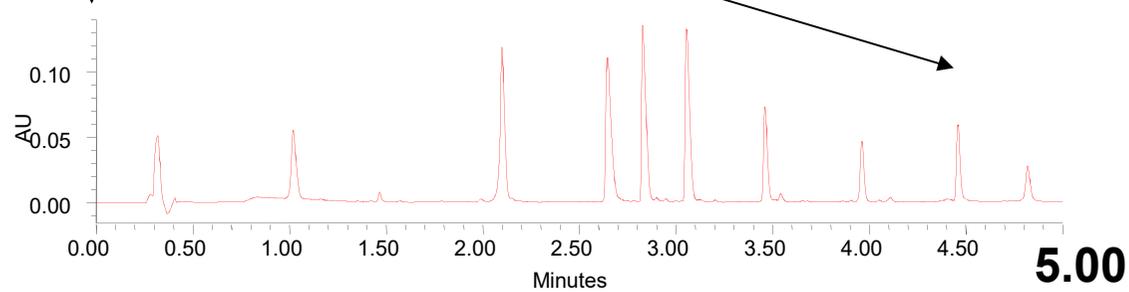
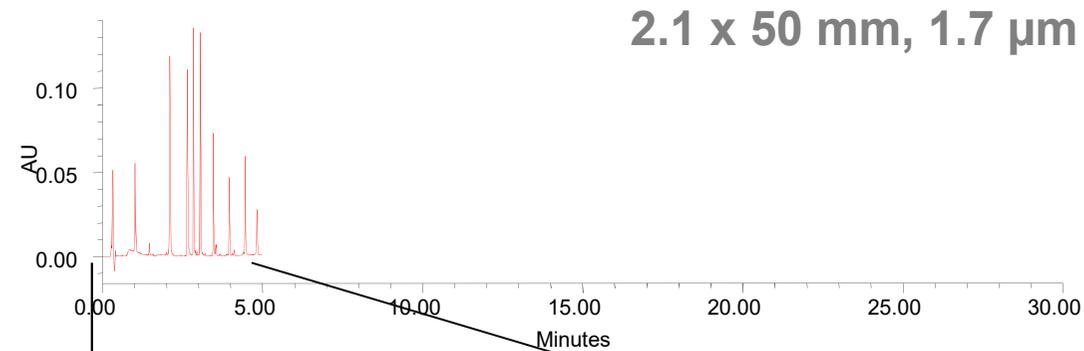
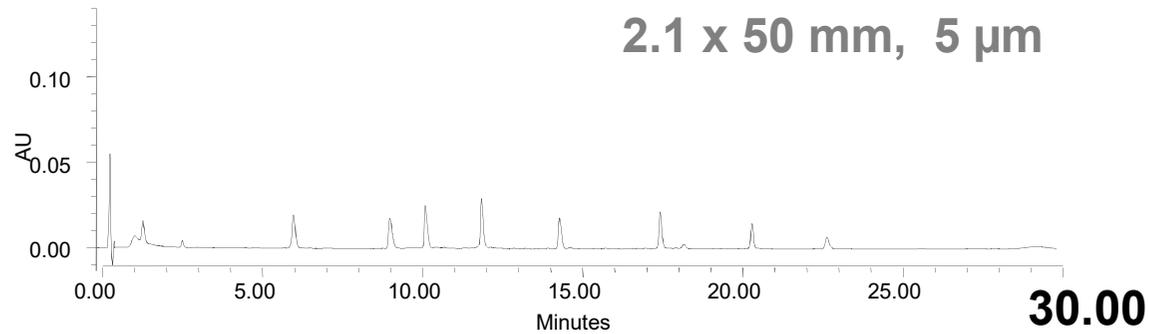


Si possono analizzare zuccheri e acidi organici. In pratica sta sostituendo il rivelatore a indice di rifrazione.

ULTRA PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY (UHPLC O UPLC)



Più veloce, mantenendo la risoluzione



6x veloce
3x sensibile

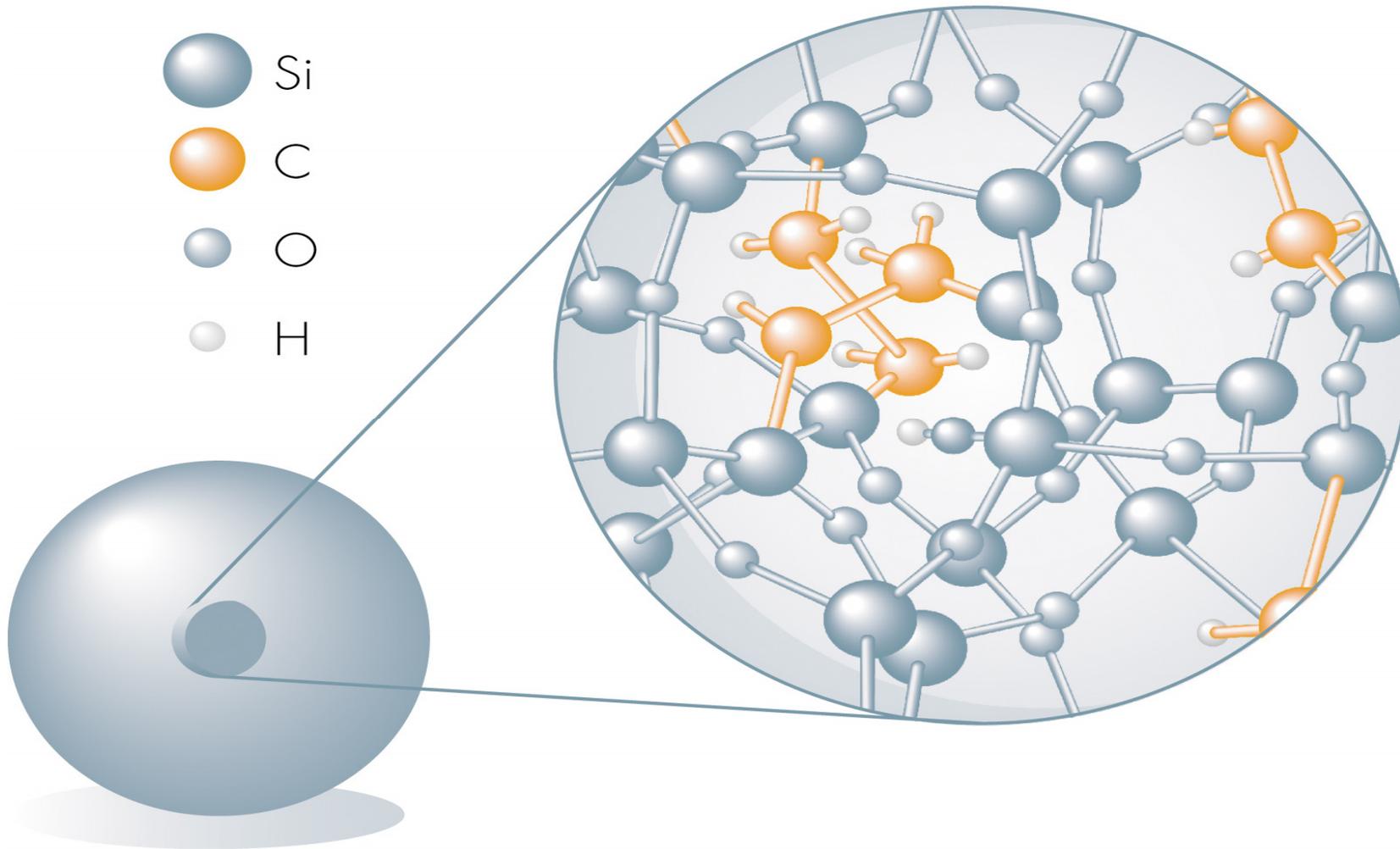
Requisiti tecnologici

- Colonna:
 - Particelle di diametro $< 2 \mu\text{m}$
 - Porose per ottimizzare il trasferimento di massa
 - Particelle resistenti a pressioni $>$ di 15000 psi (1000 bar)
 - Frit e connessioni adatte a tali condizioni operative
 - Nuove tecnologie di impaccamento

Silice \rightarrow resistenza meccanica; alta efficienza; ritenzione nota

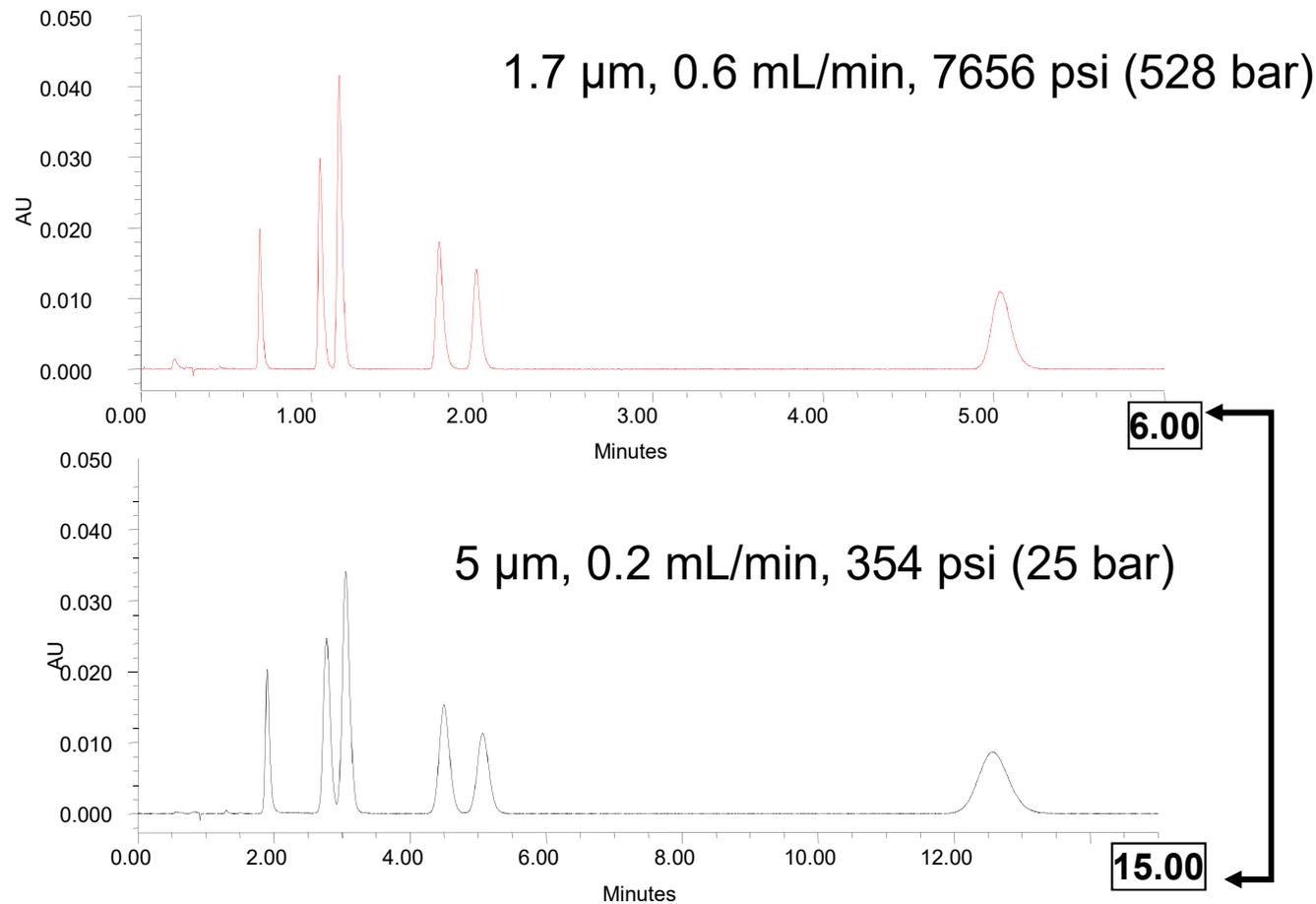
Polimero (carbone) \rightarrow ampio range di pH; nessuna interazione ionica; stabilità chimica

\rightarrow Particelle Ibrido silice-carbonio



I ponti etano nella matrice ibrida conferiscono resistenza, adeguata forma al picco e resistenza ad ampio range di pH

Lunghezza fissa della colonna: il flusso è proporzionale al diametro delle particelle



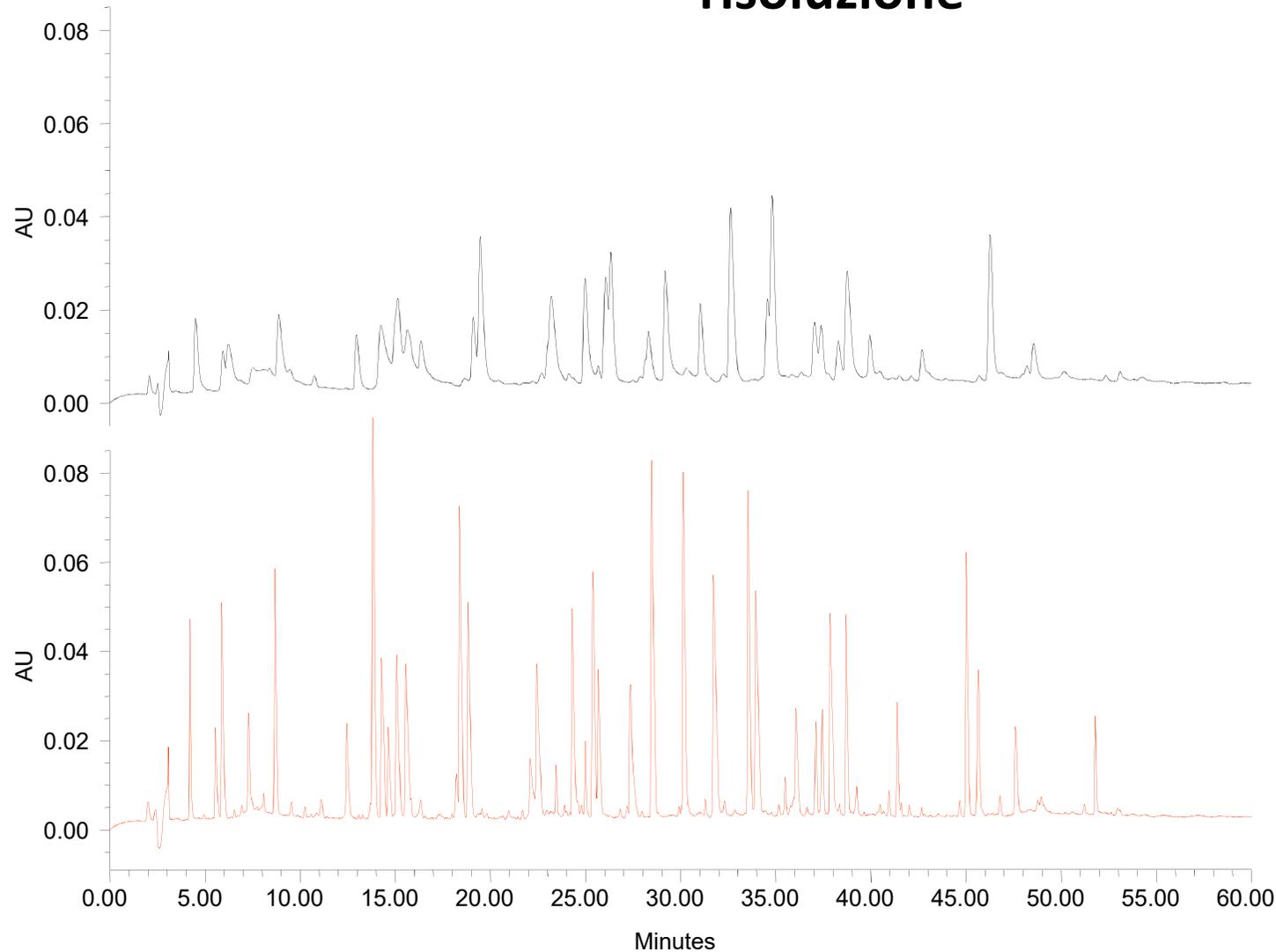
2.1 x 50 mm columns

Incremento di produttività

- UPLC fornisce il 70% di risoluzione in più in 1/3 del tempo
- La risoluzione impostata è ottenuta più velocemente
- Lo sviluppo metodo è 5 volte più veloce
- Assumendo che un HPLC venga utilizzato per il 67% del tempo annuo o 4.000 ore:

	HPLC	UPLC
Tempo di un ciclo (min)	27	3
Numero di corse annue	10.000	90.000

Nuove applicazioni UHPLC: mappatura dei peptidi ad alta risoluzione



HPLC
5 µm
Picchi = 70

UPLC™
1.7 µm
Picchi = 168

aumento di 2.5X

HPLC BIDIMENSIONALE ESTESA (COMPREHENSIVE 2D LCXLC)

LC si presta bene all'analisi multidimensionale perchè presenta numerosi meccanismi di separazione (molte selettività) che possono essere combinati tra loro.

LC multidimensionale: il campione passa nella prima colonna poi nella seconda.

Comprensiva: tutto il campione è sottoposto alla separazione su entrambe le dimensioni.

Richiede uno o due HPLC con due colonne collegate tra loro tramite un modulatore.

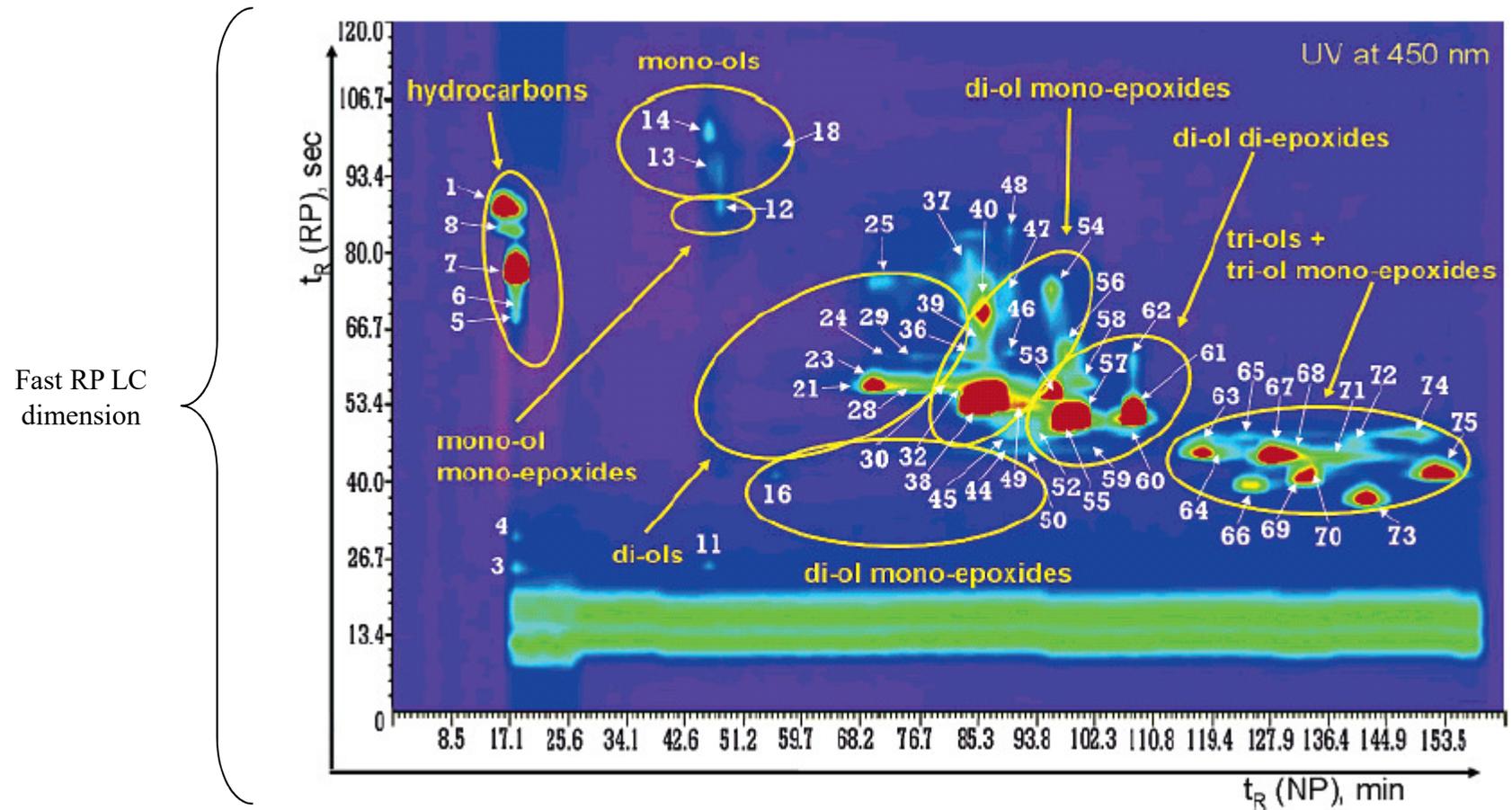
L'interfaccia prende le frazioni che eluiscono dalla prima colonna e le inietta nella seconda. La frazione iniettata nella seconda colonna deve essere completamente analizzata prima che ne venga iniettata un'altra.

VANTAGGI: migliore risoluzione e più potere di identificazione

I migliori risultati si ottengono con sistemi ORTOGONALI (colonne con diverse selettività).

Devono essere ottimizzati molti parametri: scelta della fase mobile, temperatura, gradiente, flusso.

Two-Dimensional Liquid Chromatography (2D-LC)



Slower NP LC dimension