

Appunti di Tecniche avanzate per il controllo degli alimenti

Parte 7

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



SPETTROMETRIA DI MASSA IN HPLC

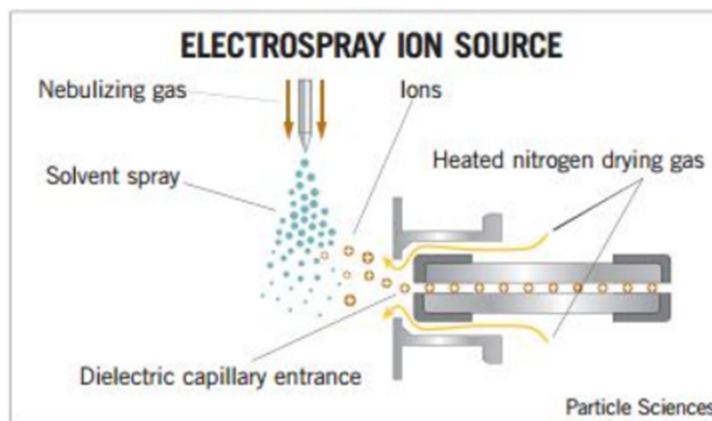
Anche nel caso della LC lo spettrometro di massa può essere usato come rivelatore.
HPLC + MS = tecnica accoppiata (come per GC).

Gli analiti devono essere ionizzati prima di essere rivelati.

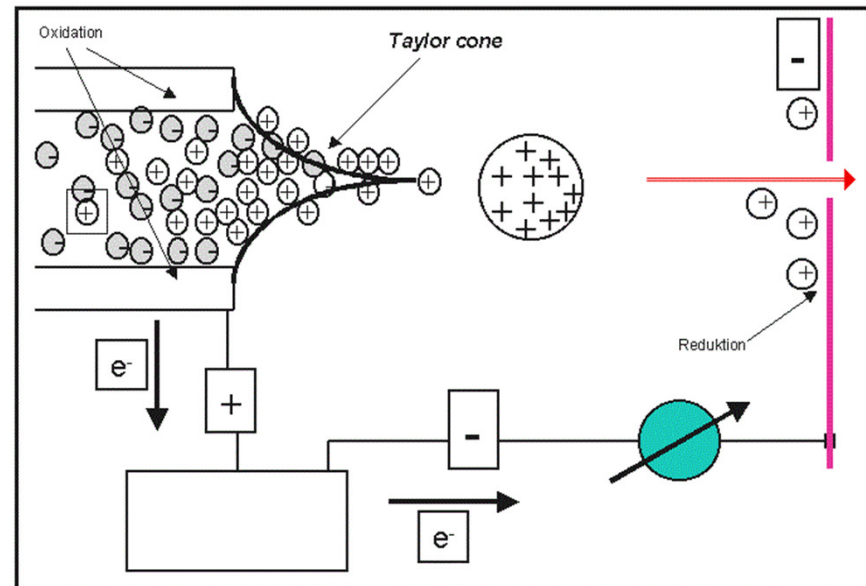
Anche in questo caso i componenti del sistema sono: sorgente, analizzatore e rivelatore.

Sorgente a ionizzazione ELETTROSPRAY (ESI) O IONSPRAY

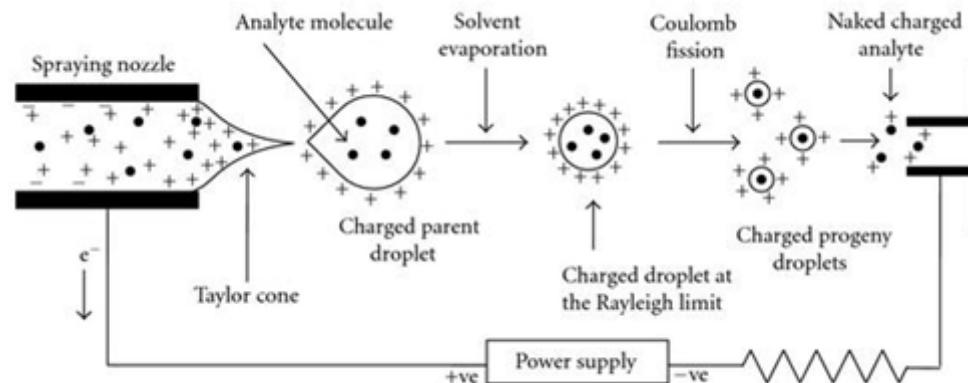
L'ESI è una tecnica di ionizzazione «soft» che consente di analizzare molecole grandi e non volatili generando ioni molecolari $[M+H]^+$ direttamente dalla soluzione del campione



- La soluzione ($<10^{-3}$ M) dell'analita, passando attraverso un capillare di acciaio inossidabile viene nebulizzata
- Si forma un aerosol di piccole goccioline di solvente contenenti il campione. La ionizzazione di solito è spontanea, ma può essere indotta con l'aggiunta di reagenti adatti
- Poiché l'estremità del capillare si trova ad un potenziale elevato (3-6 kV) la nebulizzazione porta alla formazione di goccioline cariche che contengono l'analita ionizzato
- Se il potenziale del capillare è positivo, gli ioni positivi della soluzione elettrolitica si allontanano dal capillare e si accumulano sulla superficie del liquido che si trova sulla punta del capillare. Gli ioni negativi saranno invece trattenuti all'interno del capillare



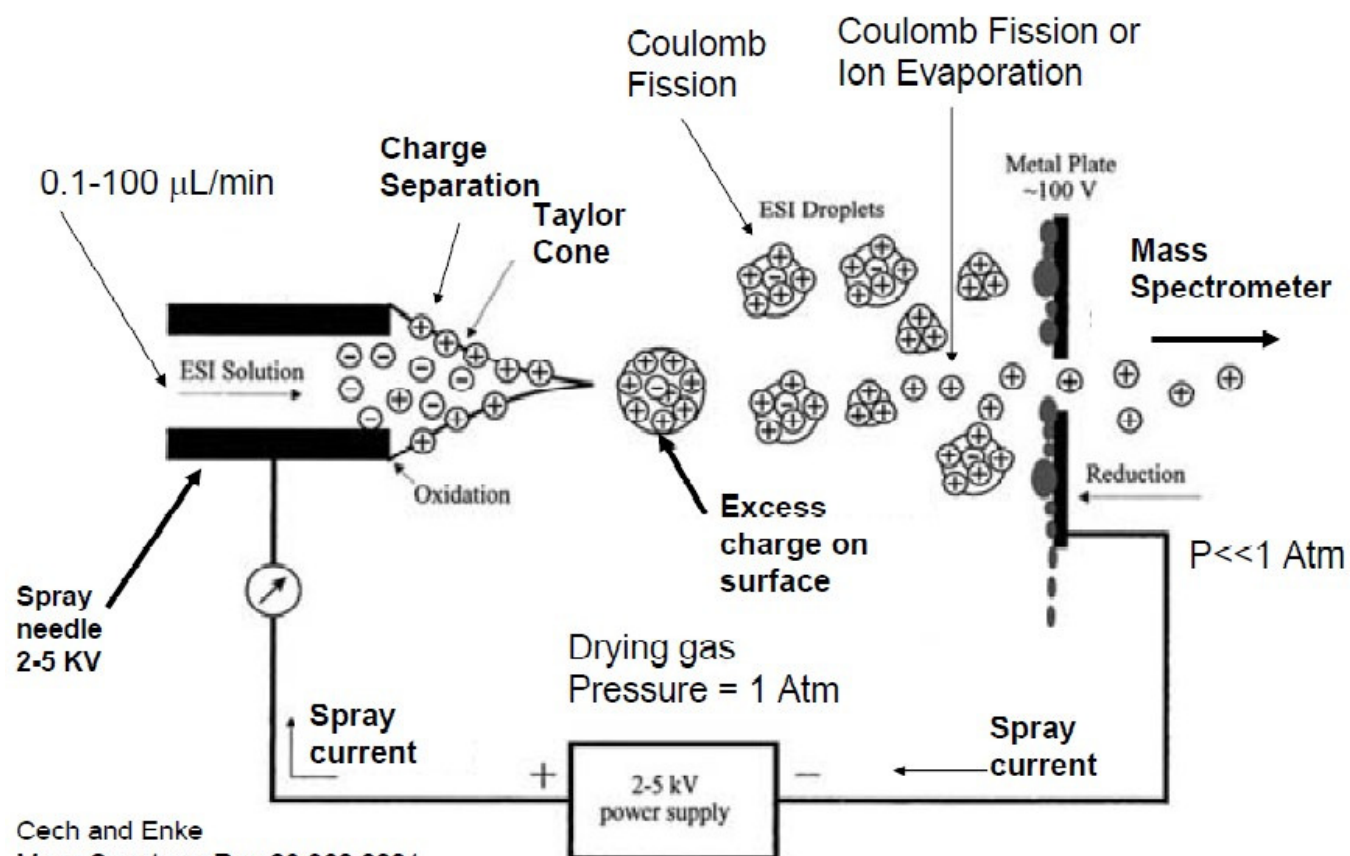
- Quando la repulsione degli ioni positivi presenti sulla superficie assieme alla forza esercitata su di essi dal campo elettrico vincono la tensione superficiale del liquido si ha l'espansione del liquido (che si muove seguendo il campo) in un cono (cono di Taylor)
- Le goccioline cariche positivamente vengono attratte da un controelettrodo che può essere costituito grossolanamente da un capillare mantenuto sotto vuoto e a un potenziale negativo; in tal modo e con l'aiuto di un gas ausiliario inerte (N_2) riscaldato, coassiale rispetto alla direzione del flusso di soluzione il solvente evapora
- Man mano che il solvente contenuto nelle goccioline evapora queste si rimpiccioliscono (il raggio si riduce) mentre aumenta la densità di carica
- In questo modo la forza di repulsione elettrostatica coulombiana aumenta a causa della forte densità elettrica



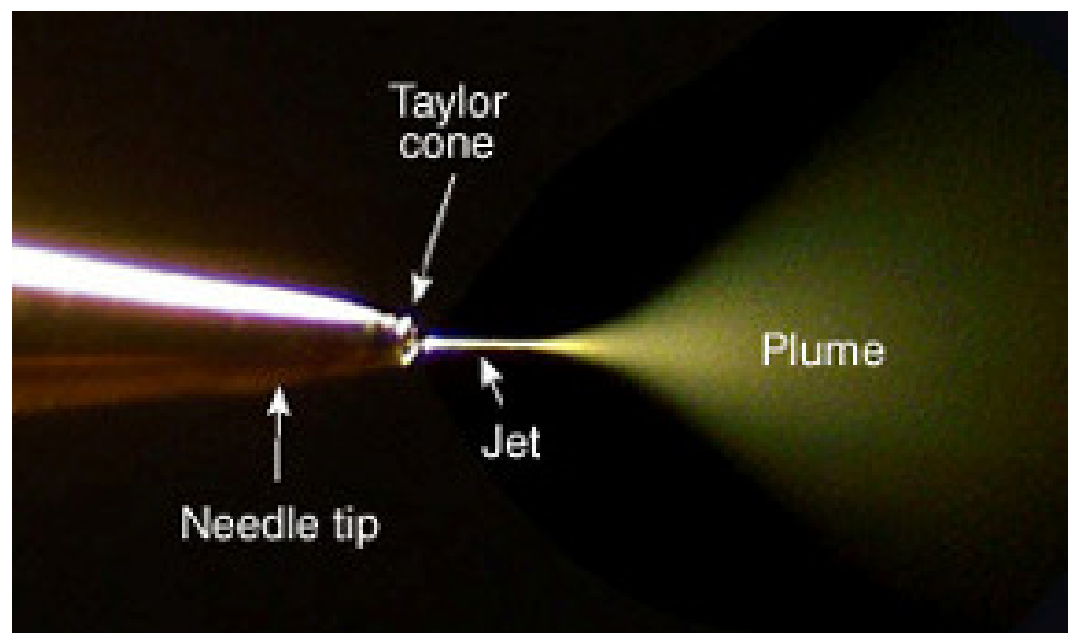
- Ad un certo valore del raggio della gocciolina, quando la repulsione supera l'effetto di coesione esercitato dalla tensione superficiale della goccia (limite di Reyleigh – punto in cui la forza di repulsione di Coulomb delle cariche sulla superficie è uguale alla tensione superficiale della soluzione) si osserva la «esplosione» delle goccioline con formazione di piccolissime goccioline cariche
- La formazione di ioni mono e multi-carica dalla goccioline è un fenomeno che ha luogo in più stadi attraverso meccanismi tuttora oggetto di discussione:
 - Meccanismo del residuo carico (CRM – Charged Residue Model, Dole) : le gocce vanno incontro ad una serie di scissioni che portano alla fine alla produzione di piccole gocce con una o più cariche che trasportano una sola molecola di analita (ioni monocarica o multicarica)
 - Meccanismo di evaporazione ionica (IME – Ion Evaporation Model, Iribarne e Thompson): singole molecole cariche vengono espulse direttamente dalla goccia per ridurre la densità di carica sulla superficie

Gli ioni generati vengono poi indirizzati da un gradiente di campo verso l'analizzatore

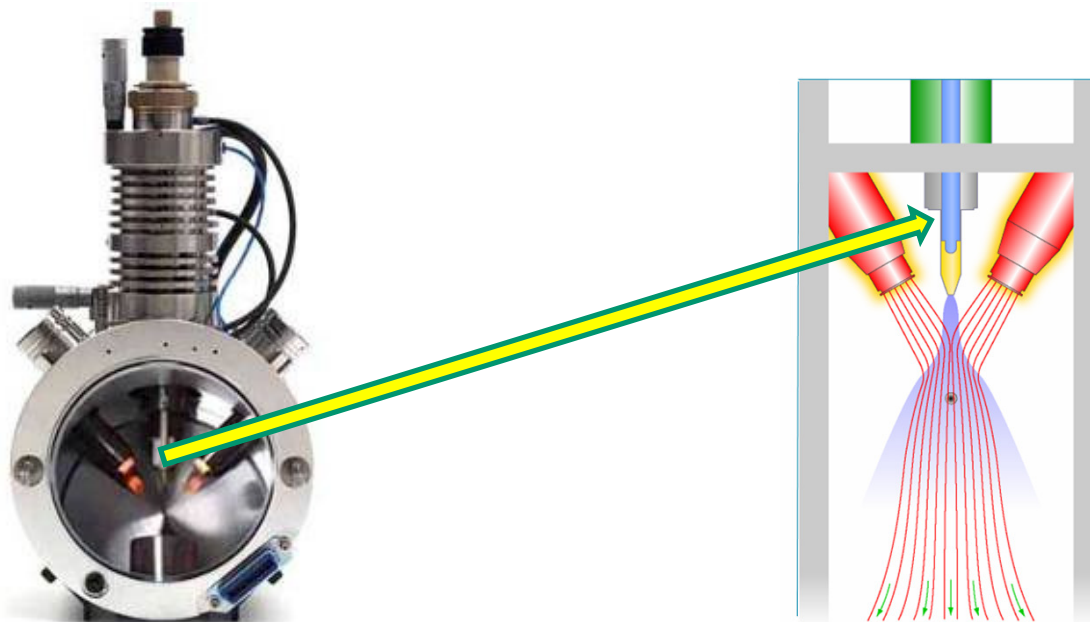
Electrospray Ionization



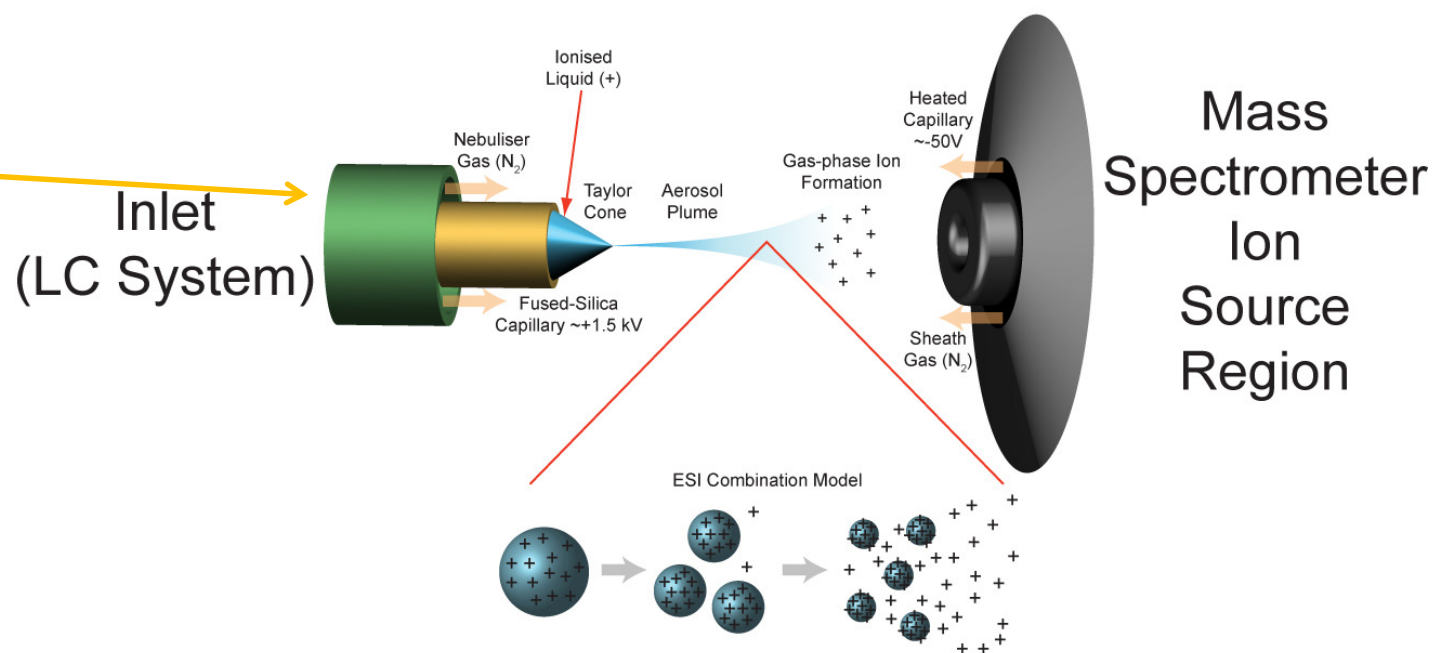
Il processo ELECTROSPRAY visto con un microscopio ad elevata potenza



ESEMPIO DI SORGENTE ESI



Electrospray Ionisation (ESI) and Ion Source Overview



→ L'ESI è un processo a pressione atmosferica. Ciò rende l'ESI un metodo più semplice che può essere accoppiato molto bene con interfacce di tipo HPLC

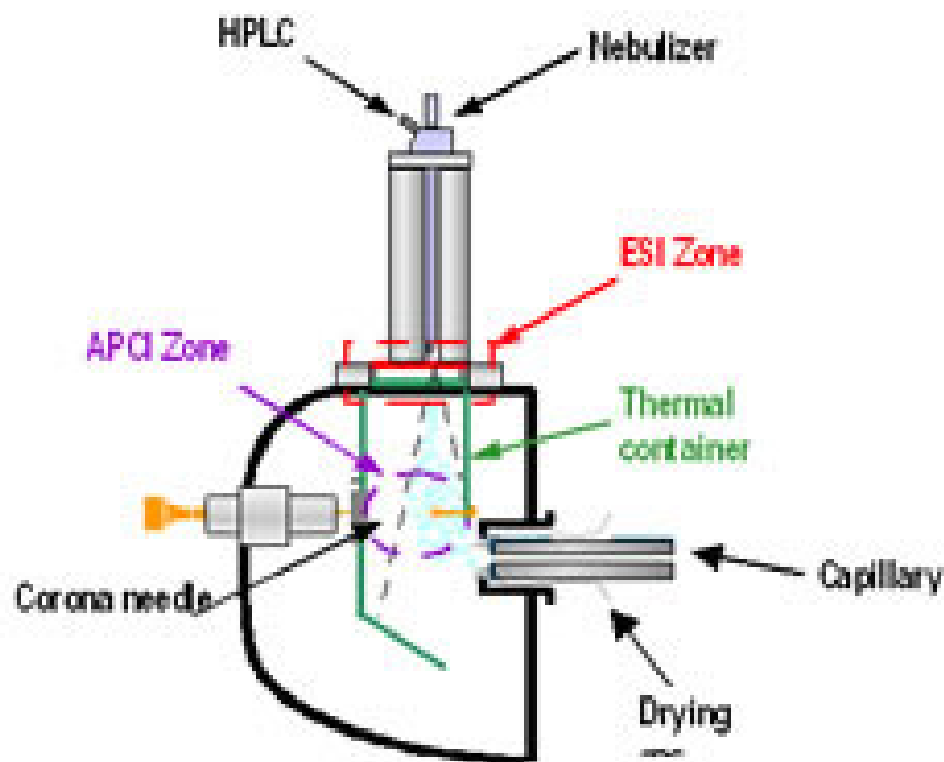
→ E' il metodo di scelta per l'analisi di molecole termolabili. Può essere utilizzato per biopolimeri di piccole e grandi dimensioni e lipidi

→ Il campione deve essere solubile e stabile in soluzione, deve essere polare e relativamente pulito (libero da tamponi non volatili, detergenti, sali etc.)

→ E' un metodo di ionizzazione soft per cui si osserva uno ione molecolare integro. Si può formare

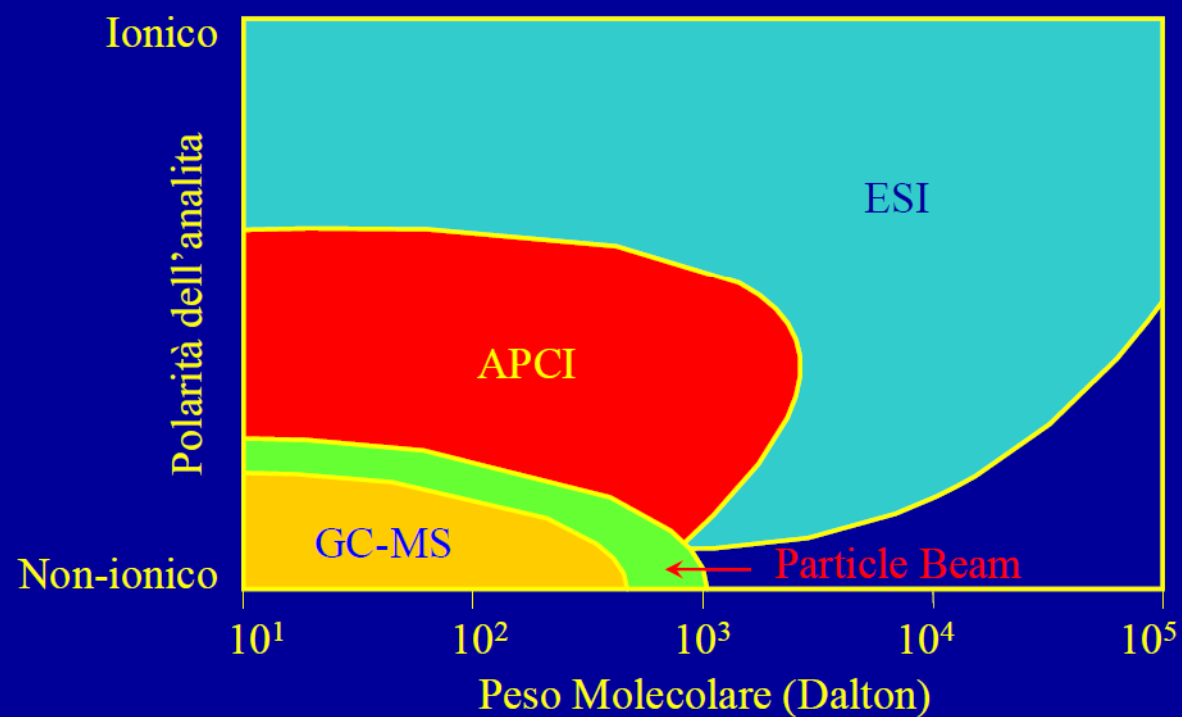
- Uno ione a carica singola $(M+H)^+$
- Si possono formare addotti con il sodio $(M+Na)^+$
- Spesso vengono prodotti ioni multicarica ($z>1$) $(M+nH)^{n+}$. L'ESI infatti può dislocare sulle molecole un numero di cariche (protoni) anche elevato. Siccome ogni misura di massa è una misura del rapporto m/z ne consegue che all'aumentare di z , il rapporto m/z diminuisce e quindi possono essere analizzate anche sostanze con una elevatissima massa molecolare. Ad esempio se una molecola di massa relativa $M=9990$ Dalton da uno ione con 10 cariche positive tale segnale avrà la composizione $(M+10H)^{10+}$ e quindi il picco corrispondente apparirà a $m/z = (9990+10)/10 = 10000/10 = 1000$. Ciò consente di analizzare anche molecole con elevato peso molecolare (ad esempio le proteine) impiegando analizzatori che hanno un range ridotto (limite superiore di PM 1200 Da) quali ad esempio i quadrupoli

Sorgente a ionizzazione chimica a pressione atmosferica (APCI)



La fase mobile da HPLC è trasformata da un nebulizzatore in uno spray che vaporizza passando in una camera riscaldata a 550 °C e si desolvata grazie ad un flusso di azoto. No degradazione termica perché il calore è usato per far evaporare il solvente. L'aerosol formato arriva poi in una zona di scariche elettriche prodotte da un ago a cui sono applicati 3-5 kV. L'azoto reagisce con un e^- formando un catione instabile e attraverso una serie di reazioni a catena si ha la protonazione (trasferimento di un H) degli analiti. Questa tecnica di ionizzazione è soft e serve a ionizzare analiti a bassa o media polarità, volatili o semivolatili.

Composti organici e Tecniche di ionizzazione



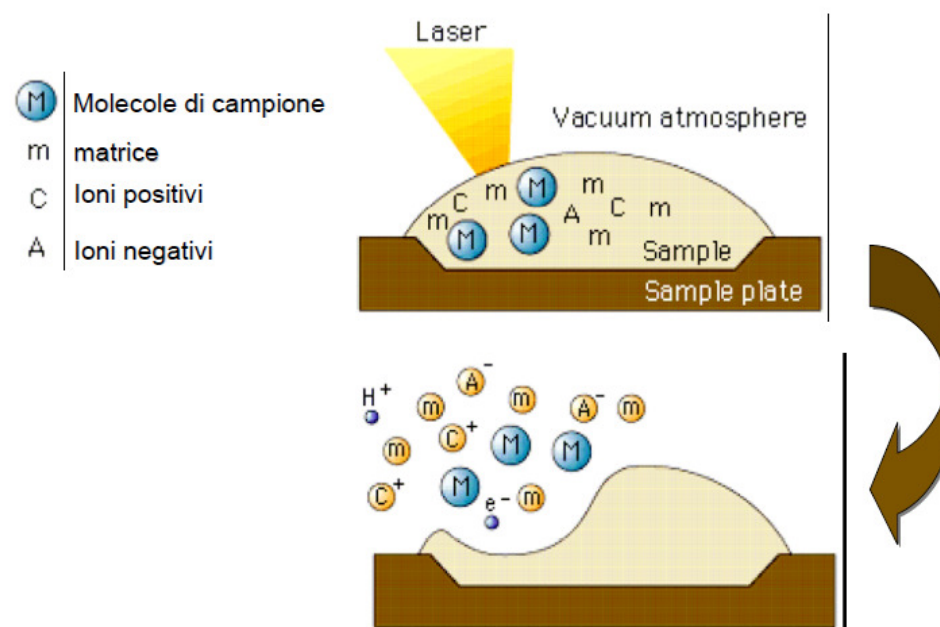
Matrix Assisted Laser Desorption Ionization (MALDI)

→ La tecnica MALDI è stata introdotta da Karas e Hillkamp nel 1988 per la ionizzazione di peptidi e proteine. Successivamente questa tecnica è stata in grado di analizzare altri tipi di biomolecole come oligosaccaridi, glicolipidi, nucleotidi e polimeri sintetici.

→ Il campione è cristallizzato con matrici cristalline capaci di assorbire la radiazione UV del laser (es. acido nicotinico o acido idrossibenzoico)

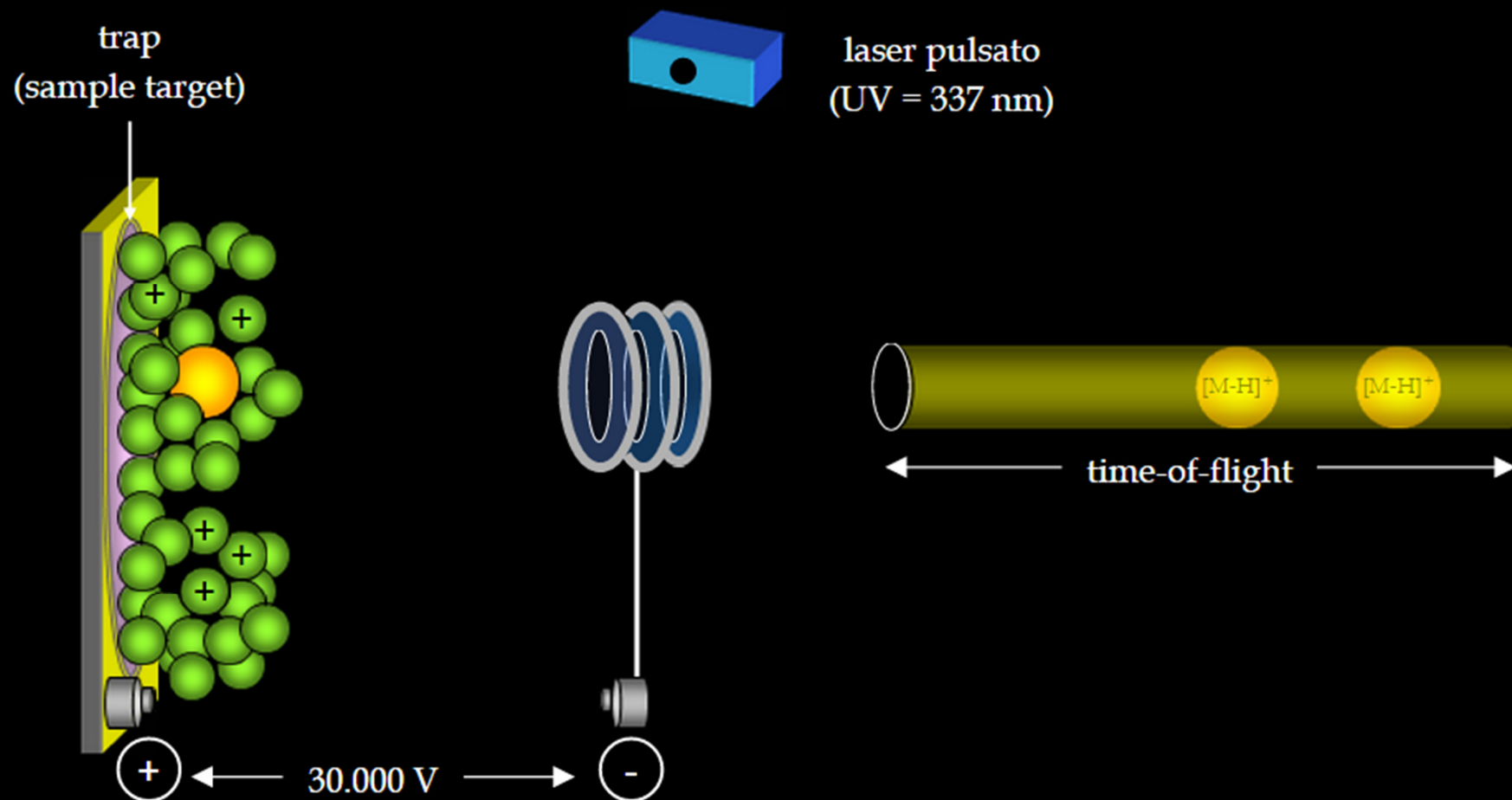
→ Un impulso di raggio laser colpisce la matrice cristallina. Il laser che emette radiazione UV ha la funzione di aiutare a introdurre energia nel sistema molecolare per promuovere la ionizzazione impedendo contemporaneamente una degradazione termica del campione

→ Si opera quindi su una matrice cristallina anziché liquida con un fascio di fotoni anziché di atomi

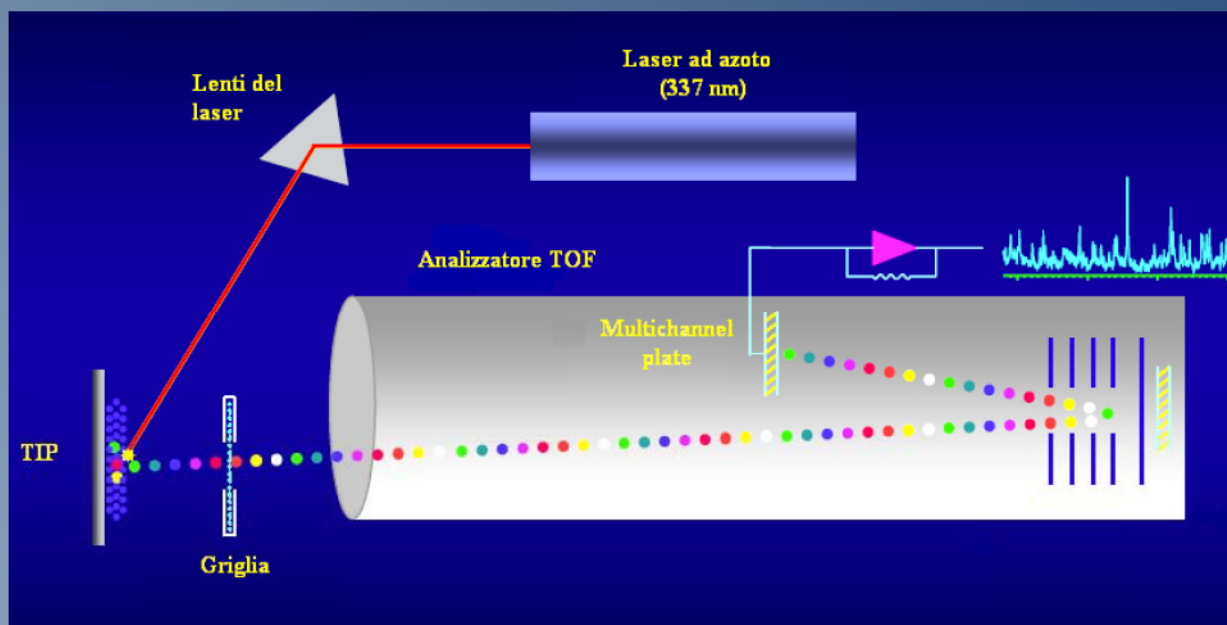


MALDI

Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization MALDI

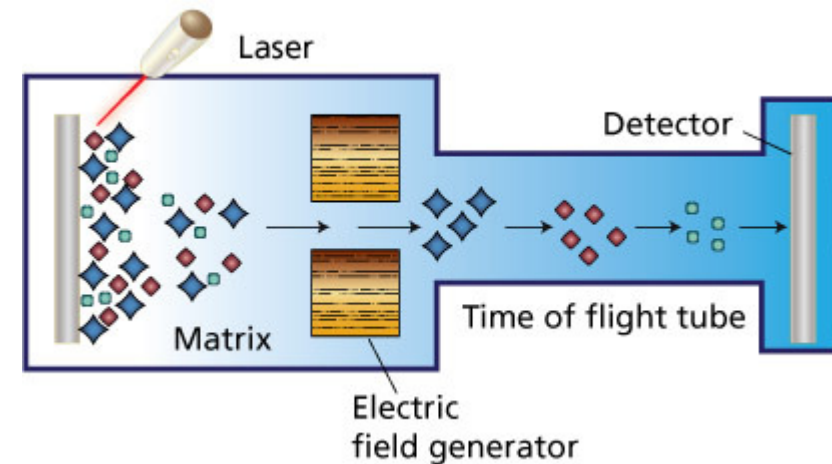
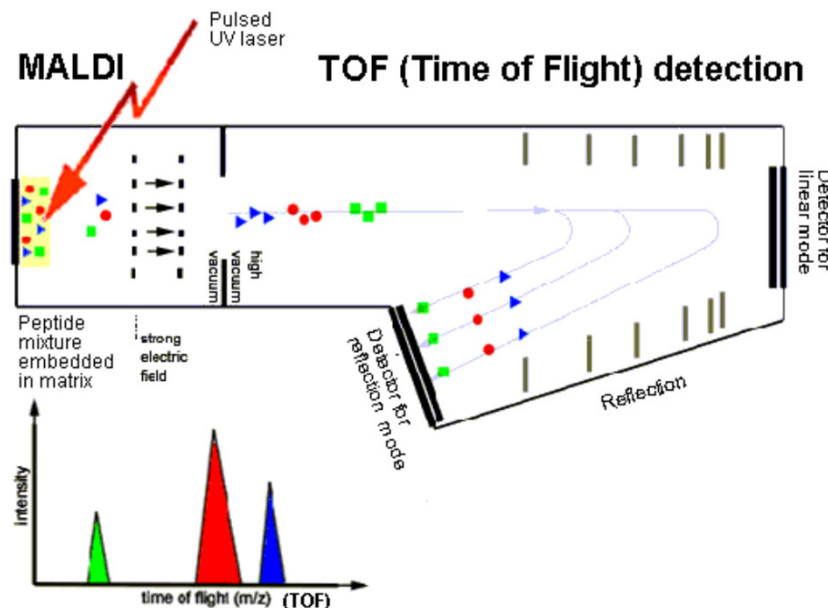


Strumentazione MALDI-TOF



ANALIZZATORE A TEMPO DI VOLO

- Separa gli ioni in funzione del tempo da essi impiegato nel percorrere un certa distanza nota.
- Si basa sul fatto che ioni con diverso valore m/z e uguale energia cinetica impiegano tempi differenti a percorrere una certa distanza.
- Gli ioni più pesanti raggiungono il rivelatore dopo quelli più piccoli



- Gli ioni prodotti dalla sorgente vengono accelerati da un potenziale di accelerazione che conferisce a tutti la stessa energia cinetica
- Gli ioni vengono focalizzati verso un tubo di volo (fly tube o drift tube)
- L'energia cinetica E_c di uno ione di carica z accelerato nel campo elettrico generato dalla differenza di potenziale applicata V è:

$$E_c = z * V = \frac{m * v^2}{2}$$

- La velocità v con cui si muove lo ione è data dal rapporto fra la lunghezza del volo L ed il tempo impiegato t quindi $v=L/t$
- Ne deriva che

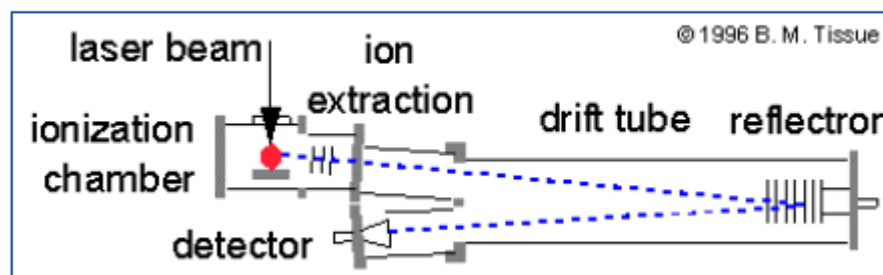
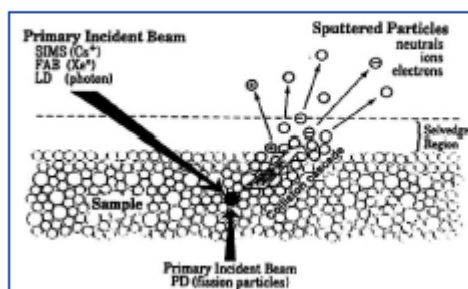
$$\frac{m}{z} = \frac{2V * t^2}{L^2}$$

da cui

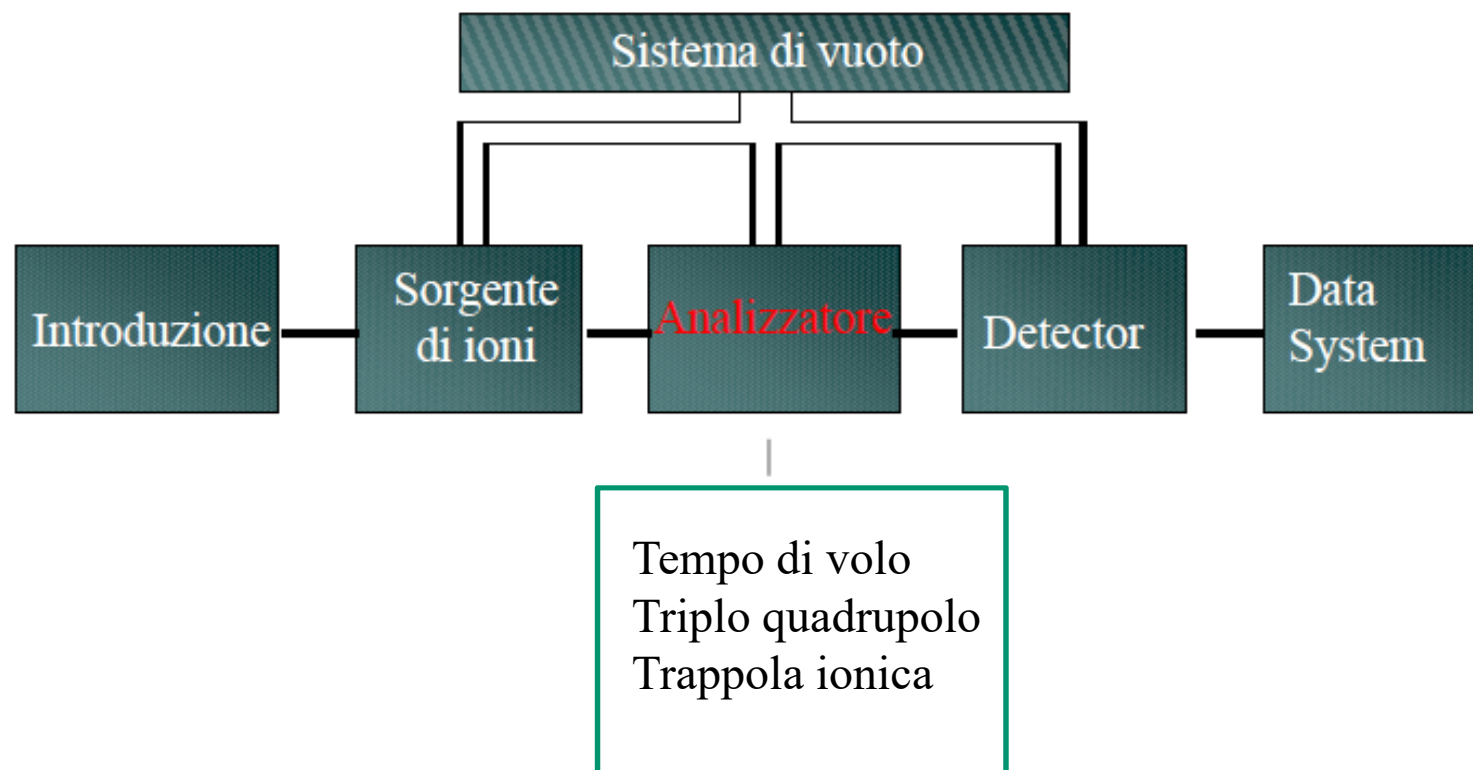
$$t = L * \sqrt[2]{\frac{1}{2V}} \sqrt[2]{\frac{m}{z}}$$

- L'analizzatore TOF deve lavorare ad impulsi perché tutti gli ioni devono essere espulsi dalla sorgente nello stesso tempo
- Se così non fosse gli ioni verrebbero prodotti in continuo e al rivelatore arriverebbe un flusso continuo di ioni che non sarebbero più separabili in funzione del tempo di arrivo
- L'analizzatore TOF deve perciò utilizzare tecniche di ionizzazione pulsata (MALDI)

MALDI - TOF



ANALIZZATORI

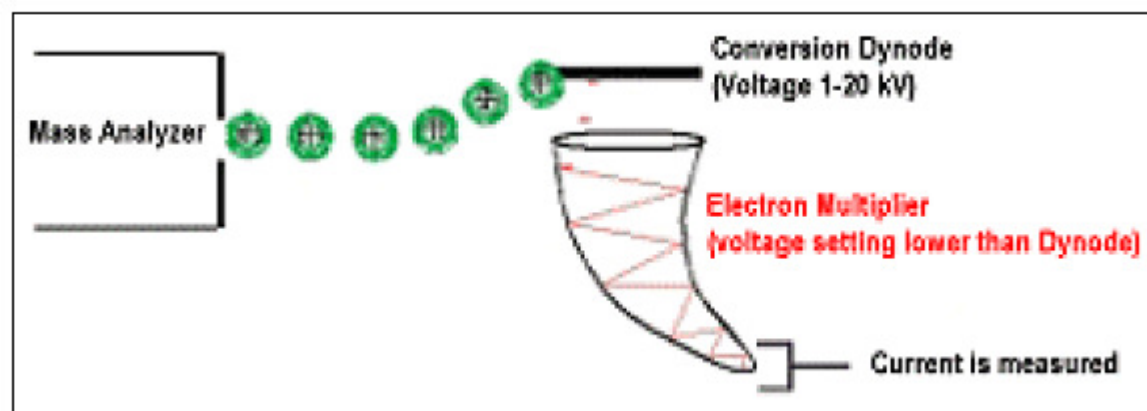


RIVELATORI

→ Sono dispositivi che all'arrivo di un fascio di ioni danno un segnale elettrico proporzionale alla quantità degli ioni segnale che viene amplificato e registrato

→ E' costituito da:

- Un dinodo di conversione
- Un moltiplicatore di elettroni a dinodo continuo («Channeltron»)

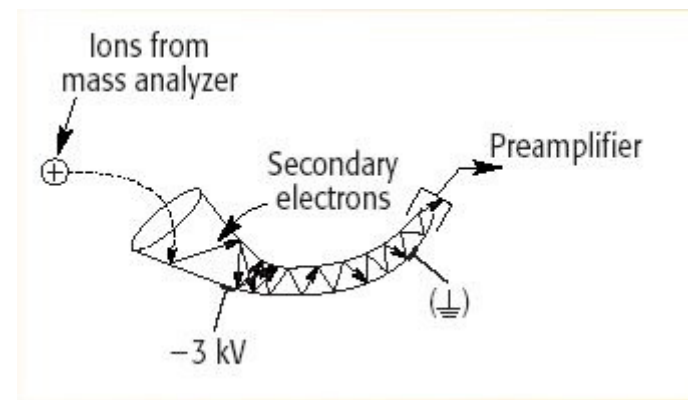


Il **dinodo di conversione** è una superficie metallica concava localizzata ad angolo retto rispetto al fascio di ioni che giungono dall'analizzatore ed è posta ad un potenziale negativo.

Quando uno ione positivo colpisce un dinodo di conversione si osserva l'emissione di particelle secondarie (ioni negativi ed elettroni) che vengono focalizzati dalla superficie curva del dinodo e accelerati verso il moltiplicatore di elettroni

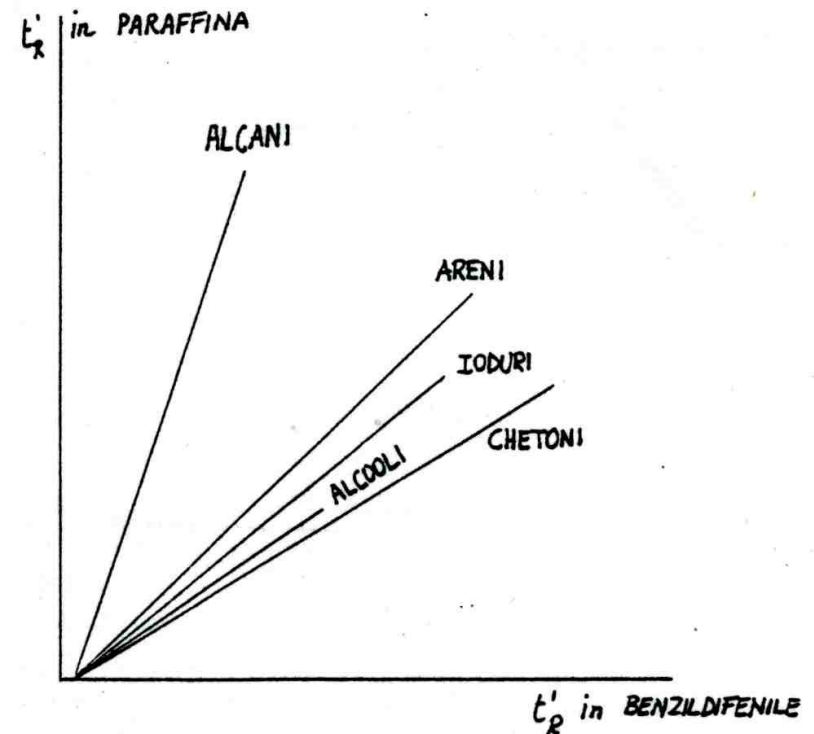
Gli ioni positivi (o negativi) trasformati in elettroni dal dinodo di conversione vengono amplificati attraverso un effetto a cascata in un **moltiplicatore di elettroni** a forma di corno ricurvo per produrre un segnale elettrico. Questo dispositivo chiamato anche channeltron è largamente impiegato in strumenti a quadrupolo e a ion trap.

Grazie alla forma ad imbuto gli elettroni emessi non percorrono molto spazio prima di colpire nuovamente la superficie interna del moltiplicatore causando così l'emissione di nuovi elettroni. Alla fine si forma una cascata di elettroni che si traduce in una corrente misurabile



ANALISI QUALITATIVA in cromatografia

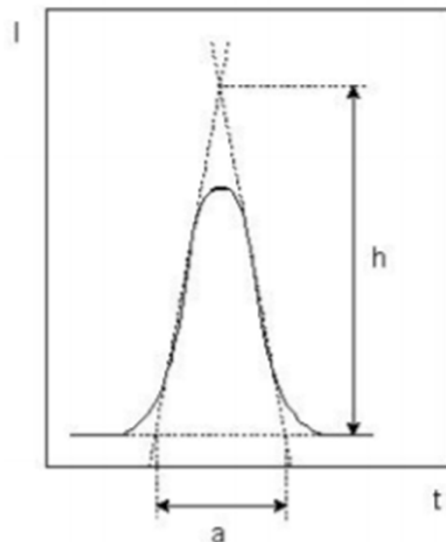
- Il t_R' può dare delle indicazioni significative ma non probanti.
- Mediante l'impiego di due diverse colonne, l'una con una fase stazionaria polare, l'altra con una fase stazionaria apolare, e mettendo in ascissa i t_R' ottenuti nel primo caso e in ordinata i t_R' ricavati nel secondo caso, si perviene a una retta per ogni serie omologa.



- ✓ Provando la sostanza incognita nelle due colonne di riferimento e misurandone i t_R' , si può avere un'idea di che composto si ha.
- ✓ Il modo migliore di procedere, poi, è di iniettare una certa quantità, il 10-20%, della sostanza pura nella miscela: se il picco in esame risulta aumentato vi è una buona probabilità di aver individuato la sostanza.
- ✓ Il procedimento si ripete con una colonna di diversa natura. Se anche in questo caso l'arricchimento fa aumentare il picco in esame, si è quasi certi di aver trovato di che sostanza si tratta.
- ✓ Il metodo è molto lungo e complesso e non sempre si riesce a identificare ogni sostanza. Ogni frazione dovrebbe essere analizzata separatamente.
- ✓ Alcune tecniche di rivelazione, come quelle spettrofotometriche, offrono un ulteriore parametro utile per l'analisi qualitativa (es. $\lambda_{\max}$)
- ✓ Se si ha a disposizione una massa come rivelatore la certezza dell'identità aumenta.

ANALISI QUANTITATIVA in cromatografia

- ✓ L'analisi quantitativa cromatografica è basata sulla misura delle aree dei picchi, dalle quali, dopo opportuna elaborazione, si risale alle concentrazioni e quindi alle quantità dei componenti.
- ✓ Il calcolo dell'area del picco viene fatto automaticamente dal software integrato nello strumento
- ✓ Si possono utilizzare metodi grafici → metodo della triangolazione → valido solo con picchi perfettamente simmetrici



$$A = \frac{a * h}{2}$$

E' tuttavia molto frequente il caso di picchi non separati.

Picchi leggermente sovrapposti

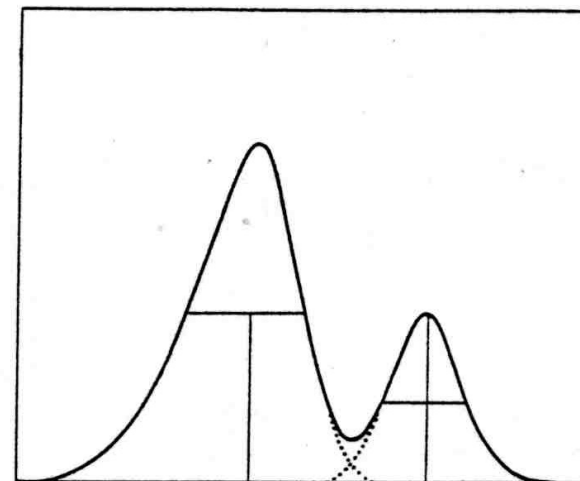
Li si considera separati. E' agevole trovare l'ampiezza a metà altezza e l'altezza. Si applica poi il metodo della gaussiana

$$A = 1.066 * a * h$$

...dove

$h \rightarrow$ altezza del picco

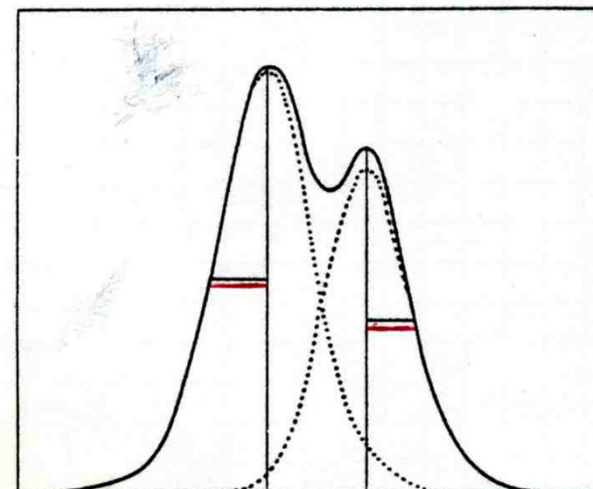
$a \rightarrow$ larghezza a metà altezza



Esempio di due picchi leggermente sovrapposti.

Picchi molto sovrapposti ma ancora risolti

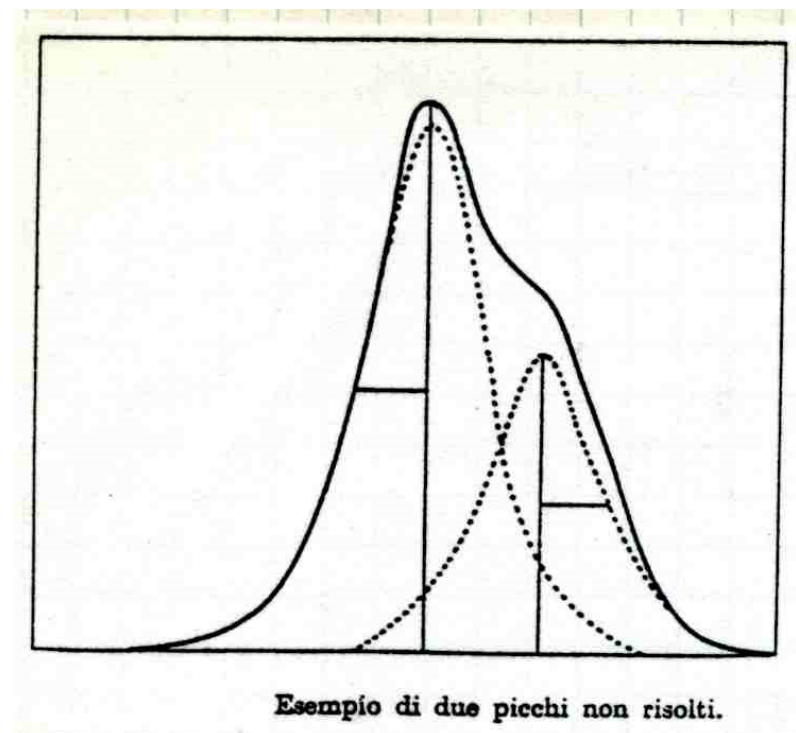
In questo caso l'ampiezza a metà altezza è facilmente ricavabile dalla semiampiezza. L'altezza deve però essere stimata da un operatore con molta esperienza. L'integrazione elettronica ricostruisce la funzione matematica del picco più grande, ne calcola l'area e la sottrae all'area totale.



Esempio di due picchi molto sovrapposti, ma ancora risolti.

Picchi non risolti

Non è possibile a occhio ottenere dei valori sensati. Il computer dà in genere il valore totale e solo con programmi molto sofisticati si riesce a operare la separazione



MISURA DELLA CONCENTRAZIONE

La scelta del metodo di calcolo e della procedura operativa sono diversi a seconda che si debbano determinare quantitativamente tutti i componenti della miscela oppure uno solo.

Nel primo caso, infatti, è fondamentale essere certi che tutti i componenti della miscela siano separati e rivelati, mentre nel secondo caso è sufficiente che il componente che interessa fornisca un picco ben definito.

Normalizzazione interna (o Metodo delle Percentuali)

E' il metodo usato quando il cromatogramma è completamente sviluppato (sono usciti tutti i componenti della miscela) e ogni sostanza è rappresentata da un picco ben distinto e separato

Il principio sfruttato è la proporzionalità delle aree e delle concentrazioni: rapportando l'area di ogni picco A_i alla somma di tutte le aree si ottiene la % di ogni componente

$$p_i = \frac{A_i}{\sum_1^n A_i}$$

Esempio

Picco 1 = Area 1142

Picco 2 = Area 1003

Picco 3 = Area 547

Area totale = 1142+1003+547 = 2692

%Picco 1 = 1142/2692*100=42.4%

%Picco 2 = 1003/2692*100=37.3%

%Picco 3 = 547/2692*100=20.3%

Questa proporzionalità è rigorosamente vera solo se il rivelatore è totalmente aspecifico, cioè con la stessa sensibilità verso tutti i componenti.

Di solito questo non è del tutto vero e quindi si introduce il fattore di correzione F_i , che esprime la non totale aspecificità del rivelatore. La determinazione di F_i richiede una calibrazione preliminare dello strumento.

Si registra il cromatogramma di una miscela standard in cui sono presenti, in % nota, tutte le sostanze della miscela analitica.

Si sceglie arbitrariamente un composto come riferimento r a cui si attribuisce $F_r = 1$ da cui

$$F_i = \frac{p_i}{p_r} \times \frac{A_r}{A_i}$$

Da questa si ha

$$p_i = \frac{A_i \times F_i}{\sum_1^n (A_i \times F_i)}$$

Standardizzazione interna

Consente di ottenere risultati più accurati ed affidabili

Non fa riferimento al picco dell'analita ma al rapporto tra l'area di questo e l'area di un componente aggiunto alla miscela analitica in quantità nota (lo standard interno S_i)

Si preparano in tal modo delle rette di taratura, ovviando ai problemi tecnici dovuti alla riproducibilità del sistema di iniezione ed alla sensibilità del rivelatore.

Questo metodo è indispensabile quando non è possibile giungere allo sviluppo completo del cromatogramma o non è possibile calcolare i coefficienti F di correzione per tutti i componenti analizzati.

Lo S_i , aggiunto in quantità nota alla miscela analitica, deve soddisfare diversi requisiti:

- deve essere assente dalla miscela analitica
- deve dare un picco ben risolto rispetto agli altri componenti
- deve avere un tempo di ritenzione simile alle diverse sostanze presenti nel campione
- deve essere presente in concentrazione simile ai diversi componenti del campione
- deve essere strutturalmente simile ad essi, in modo che il rivelatore manifesti la stessa sensibilità nei suoi confronti
- non deve contenere impurezze
- non deve reagire con il campione

Ipotizzando che il rivelatore abbia la stessa sensibilità verso tutti i componenti ne deriva che

$$C_i : A_i = C_{si} : A_{si}$$

Da cui

$$C_i = \frac{C_{si} \times A_i}{A_{si}}$$

Standardizzazione esterna

E' analogo al metodo precedente ma qui lo standard e l'analita sono presenti in due soluzioni diverse.

Inoltre lo standard esterno S_e deve essere la stessa sostanza presente nella miscela analitica.

Si analizzano due volumi rigorosamente identici della soluzione di standard e del campione con l'analita e si misurano le aree

$$C_i : A_i = C_{se} : A_{se}$$

Da cui

$$C_i = \frac{C_{se} \times A_i}{A_{se}}$$