

Sabrina Moret • Giorgia Purcaro
Lanfranco S. Conte

Il campione per l'analisi chimica

Tecniche innovative e applicazioni
nei settori agroalimentare e ambientale



food



 Springer

Il campione per l'analisi chimica

Sabrina Moret Giorgia Purcaro Lanfranco S. Conte

Il campione per l'analisi chimica

**Tecniche innovative e applicazioni
nei settori agroalimentare e ambientale**

Sabrina Moret
Dipartimento di Scienze degli Alimenti
Università degli Studi di Udine
Udine

Lanfranco S. Conte
Dipartimento di Scienze degli Alimenti
Università degli Studi di Udine
Udine

Giorgia Purcaro
Dipartimento di Scienze degli Alimenti
Università degli Studi di Udine
Udine

ISSN 2035-4770
ISBN 978-88-470-5737-1
DOI 10.1007/978-88-470-5738-8

ISBN 978-88-470-5738-8 (eBook)

Quest'opera è protetta dalla legge sul diritto d'autore e la sua riproduzione anche parziale è ammessa esclusivamente nei limiti della stessa. Tutti i diritti, in particolare i diritti di traduzione, ristampa, riutilizzo di illustrazioni, recitazione, trasmissione radiotelevisiva, riproduzione su microfilm o altri supporti, inclusione in database o software, adattamento elettronico, o con altri mezzi oggi conosciuti o sviluppati in futuro, rimangono riservati. Sono esclusi brevi stralci utilizzati a fini didattici e materiale fornito ad uso esclusivo dell'acquirente dell'opera per utilizzazione su computer. I permessi di riproduzione devono essere autorizzati da Springer e possono essere richiesti attraverso RightsLink (Copyright Clearance Center). La violazione delle norme comporta le sanzioni previste dalla legge.

Le fotocopie per uso personale possono essere effettuate nei limiti del 15% di ciascun volume dietro pagamento alla SIAE del compenso previsto dalla legge, mentre quelle per finalità di carattere professionale, economico o commerciale possono essere effettuate a seguito di specifica autorizzazione rilasciata da CLEARedi, Centro Licenze e Autorizzazioni per le Riproduzioni Editoriali, e-mail autorizzazioni@clearedi.org e sito web www.clearedi.org.

L'utilizzo in questa pubblicazione di denominazioni generiche, nomi commerciali, marchi registrati, ecc. anche se non specificatamente identificati, non implica che tali denominazioni o marchi non siano protetti dalle relative leggi e regolamenti.

Le informazioni contenute nel libro sono da ritenersi veritiere ed esatte al momento della pubblicazione; tuttavia, gli autori, i curatori e l'editore declinano ogni responsabilità legale per qualsiasi involontario errore od omissione. L'editore non può quindi fornire alcuna garanzia circa i contenuti dell'opera.

Springer fa parte di Springer Science+Business Media
springer.com

© Springer-Verlag Italia 2014

Realizzazione editoriale: Scienzaperta, Novate Milanese (MI)
Collana progettata e curata da Angela Tedesco
Copertina: Simona Colombo, Milano

Springer-Verlag Italia S.r.l., Via Decembrio 28, I-20137 Milano

Presentazione

La preparazione del campione è parte integrante del processo analitico. L'uso appropriato delle tecniche di preparazione del campione contribuisce infatti al successo dell'analisi, sia in termini di qualità del risultato, sia in termini di ottimizzazione dei tempi e dei costi dell'intero processo.

Oggi per tutti coloro che si occupano di controllo della qualità e di sviluppo di metodi sono disponibili, accanto ai metodi tradizionali, tecnologie innovative che permettono di ridurre i tempi e il consumo di solventi impiegati, e spesso di migliorare le prestazioni in termini di accuratezza e robustezza del metodo. Le opzioni sono numerose e gli approcci sicuramente più semplici sul piano operativo (anche grazie agli automatismi); sono tuttavia abbastanza complessi da ottimizzare ed è indispensabile acquisire conoscenze specifiche sui principi di funzionamento e sugli aspetti fondamentali delle tecniche di estrazione.

Questo libro tratta in maniera sistematica le principali tecniche di preparazione del campione necessarie prima della determinazione analitica finale, generalmente condotta con tecniche cromatografiche. Particolare attenzione viene rivolta alle tecniche innovative e ai sistemi "on-line" che mirano a ridurre i tempi di analisi, la manipolazione del campione (diminuendo il rischio di perdite di analita e di formazione di artefatti) e il consumo di solventi.

Il libro è strutturato in dieci capitoli. Dopo un primo capitolo di carattere generale, il testo approfondisce le diverse tecniche innovative di preparazione del campione: estrazione con fluidi supercritici (SFE); estrazione con fluidi pressurizzati (PLE); estrazione assistita con microonde (MAE); estrazione mediante uso di membrane; estrazione in fase solida (SPE) e microestrazione in fase solida (SPME); tecniche che utilizzano barrette magnetiche (SBSE e HSSE); tecniche di analisi dello spazio di testa; uso dell'HPLC come mezzo di pre-separazione del campione prima dell'analisi gascromatografica. In ciascun capitolo sono descritti approcci per diversi tipi di matrici.

Un importante messaggio trasmesso al lettore è che la preparazione del campione non deve essere considerata un processo isolato, bensì un tutt'uno con la fase di campionamento e con le successive fasi dell'analisi strumentale.

Gli autori sono docenti presso il Dipartimento di Scienze degli Alimenti dell'Università di Udine, dove svolgono attività sia didattica sia di ricerca nel settore della chimica degli alimenti. Da esperti conoscitori delle problematiche relative all'estrazione da matrici complesse, affrontano brillantemente gli argomenti trattati nel libro, completando la parte teorica con numerosi esempi di applicazioni pratiche nei settori agroalimentare e ambientale, con particolare attenzione ai contaminanti.

Il libro si rivolge agli studenti universitari che compiono un percorso pre- o post-laurea in ambito scientifico, ai ricercatori che operano sia in ambiti accademici sia in laboratori pubblici e privati, ai tecnici di laboratorio e ai responsabili del controllo di qualità nei settori alimentare, ambientale e farmaceutico.

Settembre 2014

Paola Dugo
Dipartimento di Scienze del Farmaco
e Prodotti per la Salute
Università degli Studi di Messina

Indice

Segle e abbreviazioni	XV
1 Concetti generali e principali tecniche	1
Giorgia Purcaro, Sabrina Moret, Lanfranco S. Conte	
1.1 Importanza della preparazione del campione e scelta del metodo	1
1.2 Le fasi della preparazione del campione	2
1.2.1 Campionamento	2
1.2.2 Stoccaggio e pre-trattamento del campione	4
1.2.3 Estrazione	5
1.2.3.1 Principi termodinamici e cinetici fondamentali	6
1.2.3.2 Parametri che influenzano l'estrazione	9
1.2.4 Purificazione	10
1.2.4.1 Ripartizione liquido-liquido	10
1.2.4.2 Precipitazione e idrolisi	10
1.2.4.3 Cromatografia di permeazione su gel (GPC)	10
1.2.4.4 Cromatografia su colonna ed estrazione in fase solida (SPE)	10
1.2.5 Arricchimento selettivo, concentrazione/diluizione	11
1.2.6 Derivatizzazione	11
1.2.6.1 Derivatizzazione per analisi GC	12
1.2.6.2 Derivatizzazione per analisi LC	16
1.3 Tecniche tradizionali di preparazione del campione e loro sviluppi	18
1.4 Validazione della procedura analitica	22
Bibliografia	27
2 Estrazione con fluidi supercritici (SFE)	29
Sabrina Moret, Lanfranco S. Conte	
2.1 Introduzione	29
2.1.1 Lo stato supercritico	29
2.1.2 Proprietà dei fluidi supercritici	31
2.2 Principi e vantaggi della tecnica	31
2.3 Scelta del fluido supercritico	32
2.4 Strumentazione	33
2.5 Modalità operativa	34

2.6	Pre-trattamento della matrice	34
2.7	Ottimizzazione del processo di estrazione	36
2.7.1	Pressione e temperatura	36
2.7.2	Aggiunta di modificanti, co-additivi e modificanti reattivi.....	37
2.7.3	Flusso e tempo di estrazione.....	38
2.7.4	Modalità di raccolta del campione	39
2.7.4.1	Raccolta in fase liquida	40
2.7.4.2	Raccolta in fase solida.....	41
2.7.4.3	Altri sistemi di raccolta	43
2.8	Sistemi on-line	44
2.9	Applicazioni	45
2.9.1	Estrazione del grasso	46
2.9.2	Estrazione di componenti bioattivi.....	47
2.9.3	Estrazione di oli essenziali e sostanze volatili	48
2.9.4	Analisi di contaminanti.....	48
	Bibliografia	50
3	Pressurized liquid extraction (PLE)	53
	Sabrina Moret, Lanfranco S. Conte	
3.1	Introduzione	53
3.2	Principi e vantaggi della tecnica.....	53
3.3	Strumentazione	54
3.3.1	Sistema di estrazione in serie.....	54
3.3.2	Sistema di estrazione in parallelo	57
3.4	Ottimizzazione del processo di estrazione.....	60
3.4.1	Pre-trattamento del campione.....	60
3.4.2	Agenti disperdenti	61
3.4.3	Trattamento di campioni umidi e agenti disidratanti	61
3.4.4	Scelta della cella di estrazione e modalità di riempimento	62
3.4.5	Scelta del solvente di estrazione	63
3.4.6	Effetto della temperatura e del tempo di estrazione	64
3.4.7	Cicli di estrazione.....	66
3.4.8	Effetto della pressione.....	66
3.4.9	Selettività dell'estrazione	66
3.5	Applicazioni	68
3.5.1	Contaminanti organici lipofili	68
3.5.2	Pesticidi	70
3.5.3	Residui di farmaci veterinari, anabolizzanti e altri contaminanti.....	71
3.5.4	Composti bioattivi e nutraceutici.....	71
3.5.5	Estrazione del grasso	72
3.6	Subcritical water extraction (SWE)	73
3.7	Estrazione in modalità dinamica e accoppiamento on-line	74
	Bibliografia	77

4 Estrazione assistita con microonde (MAE)	81
Sabrina Moret	
4.1 Introduzione	81
4.1.1 Le microonde	82
4.1.2 Il generatore di microonde (magnetron)	83
4.2 Principio della tecnica	84
4.3 Ottimizzazione del processo di estrazione	84
4.3.1 Pre-trattamento del campione ed effetto matrice	84
4.3.2 Solvente di estrazione	85
4.3.3 Volume di solvente	86
4.3.4 Temperatura e tempo di estrazione	86
4.4 Pressurized microwave-assisted extraction (PMAE)	87
4.4.1 Strumentazione	87
4.4.2 Contenitori	89
4.4.3 Controllo della temperatura e della pressione	91
4.4.4 Sistemi di sicurezza	92
4.4.5 Procedura standard	93
4.4.6 Applicazioni	93
4.5 Focused microwave-assisted extraction (FMAE)	93
4.5.1 Strumentazione	93
4.5.2 Focused microwave-assisted Soxhlet extraction (FMASE)	95
4.5.3 Applicazioni	97
4.6 Accoppiamento on-line	98
4.7 Altre tecniche di estrazione basate sull'impiego di microonde	98
4.7.1 Microwave-assisted saponification (MAS)	98
4.7.2 Tecniche "solvent-free"	99
Bibliografia	102
5 Tecniche di estrazione on-line basate sull'utilizzo di membrane	105
Sabrina Moret	
5.1 Introduzione	105
5.2 Processi di separazione su membrana	105
5.3 Membrane	107
5.4 Classificazione dei processi di estrazione su membrana	108
5.5 Dispositivi per l'estrazione su membrana	110
5.6 Estrazione con membrane porose	111
5.6.1 Dialisi	112
5.6.2 Elettrodialisi	113
5.6.3 Filtrazione	114
5.7 Estrazione con membrane non porose	114
5.7.1 Microporous membrane liquid-liquid extraction (MMLLE)	115
5.7.2 Supported liquid membrane extraction (SLME)	115
5.7.3 Polymeric membrane extraction (PME)	117

5.7.4	Membrane extraction with sorbent interface (MESI)	118
5.8	Interfacciamento on-line e applicazioni	119
5.8.1	Dialisi e filtrazione	120
5.8.2	Tecniche basate sull'impiego di membrane liquide	121
5.8.3	Tecniche basate sull'impiego di membrane polimeriche	122
	Bibliografia	124
6	Estrazione in fase solida (SPE)	127
	Sabrina Moret, Lanfranco S. Conte	
6.1	Introduzione	127
6.1.1	Principio della SPE	127
6.1.2	Vantaggi della SPE	128
6.2	Formati e attrezzature per SPE	128
6.2.1	Cartucce e colonnine	128
6.2.2	Dischi di estrazione a membrana	130
6.2.3	Puntali di pipetta	130
6.2.4	Sistemi automatizzati	131
6.3	Meccanismi di interazione analita-adsorbente	131
6.3.1	Interazioni non polari	132
6.3.2	Interazioni polari	133
6.3.3	Interazioni ioniche	134
6.3.4	Interazioni di coppia ionica	135
6.4	Adsorbenti	136
6.4.1	Adsorbenti a base di silice	136
6.4.1.1	Produzione e proprietà	137
6.4.1.2	Fasi non polari	139
6.4.1.3	Fasi polari	140
6.4.1.4	Fasi a scambio anionico	140
6.4.1.5	Fasi a scambio cationico	140
6.4.1.6	Interazioni secondarie	141
6.4.2	Adsorbenti a base di copolimeri	143
6.4.3	Adsorbenti a base di carbone	144
6.4.4	Adsorbenti selettivi	145
6.4.4.1	Immunoadsorbenti	145
6.4.4.2	Polimeri a stampo molecolare (MIP)	146
6.5	Fattori importanti nella pratica della SPE e aspetti teorici	149
6.5.1	Ritenzione ed eluizione	149
6.5.2	Capacità e selettività	149
6.5.3	Flusso	150
6.5.4	Aspetti teorici	150
6.6	Pratica della SPE	151
6.6.1	Pre-trattamento del campione	153
6.6.2	Condizionamento e pre-equilibratura dell'adsorbente	154
6.6.3	Applicazione del campione (ritenzione dell'analita)	155
6.6.4	Lavaggio degli interferenti	155
6.6.5	Eluizione	155

6.7	Sviluppo di un metodo SPE	155
6.7.1	Definizione degli obiettivi e dei requisiti del metodo	156
6.7.2	Scelta del meccanismo di interazione e dell'adsorbente	156
6.7.3	Verifiche sull'adsorbente scelto	158
6.7.3.1	Ottimizzazione della ritenzione	158
6.7.3.2	Ottimizzazione del lavaggio	158
6.7.3.3	Ottimizzazione dell'eluizione	158
6.7.3.4	Test su matrici reali	159
6.7.4	Verifiche sul metodo	159
6.8	Sistemi on-line	160
6.9	Applicazioni	162
6.9.1	Analisi di contaminanti in tracce nelle acque	163
6.9.1.1	Evoluzione dei metodi SPE	163
6.9.1.2	Scelta dell'adsorbente e comportamento degli analiti	164
6.9.1.3	Possibilità di stoccaggio del campione	165
6.9.1.4	Alcuni esempi di determinazione	165
6.9.2	Applicazioni su matrici alimentari	167
6.9.2.1	Frazionamento dei componenti del vino	167
6.9.2.2	Determinazione dell'atrazina	168
6.9.2.3	Frazionamento di una matrice lipidica	169
6.9.2.4	Separazione dei lipidi in funzione del grado di insaturazione	171
6.9.2.5	Determinazione degli IPA negli oli vegetali	172
6.10	Matrix solid-phase dispersion (MSPD) e dispersive solid-phase extraction (dSPE)	173
	Bibliografia	174
7	Microestrazione in fase solida (SPME)	177
	Giorgia Purcaro, Sabrina Moret, Lanfranco S. Conte	
7.1	Introduzione	177
7.2	Dispositivi per l'estrazione e modalità operativa	177
7.3	Teoria e principi della tecnica SPME	179
7.3.1	Termodinamica	180
7.3.1.1	Stima della costante di ripartizione	184
7.3.2	Cinetica dell'estrazione	185
7.4	Ottimizzazione dei parametri di estrazione	186
7.4.1	Condizioni di estrazione	186
7.4.1.1	Scelta della fibra	186
7.4.1.2	Scelta della modalità di campionamento	189
7.4.1.3	Ottimizzazione dell'agitazione	190
7.4.1.4	Ottimizzazione del tempo di estrazione	191
7.4.1.5	Ottimizzazione dei volumi del campione e dello spazio di testa	192
7.4.2	Ottimizzazione dei parametri relativi alla matrice	192
7.4.2.1	Temperatura di estrazione	192

7.4.2.2	Correzione del pH	194
7.4.2.3	Modificazione della forza ionica	194
7.4.2.4	Diluizione del campione	195
7.4.2.5	Contenuto di solventi organici.....	196
7.4.2.6	Derivatizzazione	196
7.5	Condizioni di desorbimento.....	198
7.5.1	SPME-GC	198
7.5.2	SPME-HPLC	198
7.6	Analisi quantitativa in SPME.....	201
7.6.1	Scelta del metodo di calibrazione	201
7.6.2	Metodi di calibrazione tradizionali	201
7.6.2.1	Calibrazione esterna	201
7.6.2.2	Metodo dell'aggiunta tarata.....	202
7.6.2.3	Metodo dello standard interno.....	202
7.6.3	Metodo di calibrazione all'equilibrio	202
7.6.4	Metodo di calibrazione cinetico o di standardizzazione sulla fibra	202
7.7	Applicazioni	204
7.7.1	Analisi ambientali	204
7.7.2	Analisi di matrici alimentari	204
7.7.2.1	Analisi degli aromi	205
7.7.2.2	Analisi di residui di contaminanti	210
7.7.3	Analisi biologiche	210
	Bibliografia	211
8	Stir bar sorptive extraction (SBSE) e head space sorptive extraction (HSSE)	215
	Giorgia Purcaro, Sabrina Moret	
8.1	Introduzione	215
8.2	Teoria e principi della SBSE.....	218
8.3	Estrazione e ottimizzazione	220
8.3.1	SBSE	220
8.3.2	HSSE	223
8.4	Applicazioni	224
8.4.1	Applicazioni ambientali	224
8.4.2	Applicazioni nel settore alimentare	224
8.4.3	Applicazioni biomediche.....	228
	Bibliografia.....	228
9	Tecniche per l'analisi della frazione volatile	231
	Lanfranco S. Conte, Giorgia Purcaro, Sabrina Moret	
9.1	Introduzione	231
9.2	Aromi negli alimenti.....	232
9.2.1	Caratteristiche degli aromi.....	232

9.2.2	Origine degli aromi negli alimenti	233
9.2.2.1	Composti aromatici primari	233
9.2.2.2	Composti aromatici di trasformazione	234
9.2.3	Tecniche di valutazione della frazione aromatica: analisi chimiche e sensoriali	236
9.3	Metodi di analisi chimica degli aromi	236
9.3.1	Tecniche basate sulla distillazione	237
9.3.2	Analisi dello spazio di testa	240
9.3.2.1	Spazio di testa statico	242
9.3.2.2	Spazio di testa dinamico	243
9.3.2.3	Purge and trap	243
9.3.3	Desorbimento termico (TD)	248
	Bibliografia	249
10	HPLC e preparazione del campione	253
	Sabrina Moret, Giorgia Purcaro	
10.1	Introduzione	253
10.2	Sistemi LC-GC on-line	254
10.2.1	Interfacce basate sulla tecnica del retention gap	254
10.2.1.1	On-column con solvent flooding	255
10.2.1.2	On-column con partially concurrent eluent evaporation (PCEE)	257
10.2.1.3	Y-interface	258
10.2.1.4	Loop-type con fully concurrent eluent evaporation (FCEE)	258
10.2.1.5	Loop-type con co-solvent trapping	260
10.2.2	Interfacce basate sull'impiego di una camera di vaporizzazione	261
10.2.2.1	In-line vaporizer overflow	261
10.2.2.2	Programmed temperature vaporizer (PTV)	262
10.2.3	Condizioni LC	266
10.2.3.1	NPLC-GC	267
10.2.3.2	RPLC-GC	268
10.3	Applicazioni	269
10.3.1	Controllo di qualità degli oli vegetali	269
10.3.1.1	Determinazione degli steroli e di altri componenti minori liberi ed esterificati	270
10.3.1.2	Determinazione delle cere	271
10.3.1.3	Determinazione dei prodotti di disidratazione degli steroli e degli isomeri dello squalene	271
10.3.2	Determinazione dei pesticidi	272
10.3.3	Determinazione degli oli minerali	273
	Bibliografia	277

Sigle e abbreviazioni

- AAS Atomic absorption spectroscopy (spettroscopia ad assorbimento atomico)
- APMAE Atmospheric pressure microwave-assisted extraction (estrazione assistita con microonde a pressione atmosferica)
- Aw Attività dell'acqua
- BTEX Benzene, toluene, etilbenzene e xilene
- CE Capillary electrophoresis (elettroforesi capillare)
- CEE Concurrent eluent evaporation
- DMI Difficult matrix introduction
- DSI Difficult sample introduction
- dSPE Dispersive solid-phase extraction
- ECD Electron-capture detector (rivelatore a cattura di elettroni)
- EE Extraction efficiency (efficienza di estrazione)
- EF Enrichment factor (fattore di arricchimento)
- FCEE Fully concurrent eluent evaporation
- FID Flame ionization detector (rivelatore a ionizzazione di fiamma)
- FLD Fluorometric detector (rivelatore spettrofluorimetrico)
- FMAE Focused microwave-assisted extraction
- FMASE Focused microwave-assisted Soxhlet extraction
- GC Gascromatografia
- GPC Gel-permeation chromatography (cromatografia di permeazione su gel)
- HD Idrodistillazione
- HPLC High performance liquid chromatography (cromatografia liquida ad alta prestazione)
- HRGC High resolution gas chromatography (gascromatografia ad alta risoluzione)
- HS Head space (spazio di testa)
- HSSE Head space sorptive extraction
- ICP-MS Spettrometria di massa a plasma accoppiato induttivamente
- IPA Idrocarburi policiclici aromatici
- LC Liquid chromatography (cromatografia liquida)
- LC-MS/MS Cromatografia liquida-spettrometria di massa tandem
- LD Liquid desorption (desorbimento liquido)
- LLE Liquid-liquid extraction (estrazione liquido-liquido)
- LOAV Limit of odor activity value (limite di valore di attività odorosa)

LOD	Limit of detection (limite di determinazione)
LOQ	Limit of quantification (limite di quantificazione)
LPME	Liquid-phase microextraction (microestrazione in fase liquida)
LSE	Liquid-solid extraction (estrazione liquido-solido)
LTPRI	Linear temperature programmed retention index (indici di ritenzione in programma di temperatura lineare)
MAE	Microwave-assisted extraction (estrazione assistita con microonde)
MAS	Microwave-assisted saponification
MESI	Membrane extraction with a sorbent interface
MHG	Microwave hydrodiffusion and gravity
MIP	Molecular imprinted polymers (polimeri a stampo molecolare)
MMLLE	Microporous membrane liquid-liquid extraction
MOAH	Mineral oil aromatic hydrocarbons
MOSH	Mineral oil saturated hydrocarbons
MS	Mass spectrometry (spettrometria di massa)
MSPD	Matrix solid-phase dispersion (estrazione in fase solida dispersa)
NP	Normal-phase
NPD	Nitrogen-phosphorus detector (rivelatore ad azoto-fosforo)
NPLC	Normal phase liquid chromatography
OAV	Odor activity value (attività odorosa)
OT	Odor threshold (soglia olfattiva)
P&T	Purge and trap
PA	Poliacrilato
PA	Poliammide
PC	Policarbonato
PCB	Policlorobifenili
PCDD	Policlorodibenzodiossine
PCDF	Policlorodibenzofurani
PCEE	Partially concurrent eluent evaporation
PDMS	Polidimetilsilossano
PE	Polietilene
PEEK	Polietereterchetone
PEG	Polietilenglicole
PES	Polieteresulfone
PFA	Perfluoroalcoosi
PHWE	Pressurized hot water extraction
PLE	Pressurized liquid extraction (estrazione con solvente ad alta T e P)
PM	Peso molecolare
PMAE	Pressurized microwave-assisted extraction
PME	Polymeric membrane extraction
PP	Polipropilene
PSFME	Pressurized solvent-free microwave extraction
PSU	Polisulfone
PTFE	Politetrafluoroetilene (Teflon)

PTV	Programmed temperature vaporization (iniettore a temperatura programmata)
PVC	Polivinilcloruro
PVDF	Polivinilidenfluoruro
PHWE	Pressurized hot water extraction
QuEChERS	Quick, easy, cheap, effective, rugged, and safe
RAM	Restricted-access media (materiali ad accesso ristretto)
RP	Reversed-phase
RPLC	Reversed-phase liquid chromatography
RSD	Deviazione standard relativa
SBSE	Stir bar sorptive extraction
SD	Steam distillation (distillazione in corrente di vapore)
SDE	Simultaneous distillation-extraction
SEC	Size exclusion chromatography (cromatografia a esclusione molecolare)
SFC	Supercritical fluid chromatography (cromatografia con fluidi supercritici)
SFE	Supercritical fluid extraction (estrazione con fluidi supercritici)
SFME	Solvent-free microwave extraction
SI	Standard interno
SIM	Selected ion monitoring
SLLE	Supported liquid-liquid extraction
SLME	Supported liquid membrane extraction
SPE	Solid-phase extraction (estrazione in fase solida)
SPME	Solid-phase microextraction (microestrazione in fase solida)
SWE	Subcritical water extraction
TD	Thermal desorption (desorbimento termico)
TIC	Total ion current (corrente ionica totale)
TLC	Thin layer chromatography (cromatografia su strato sottile)
TOTAD	Through oven transfer adsorption desorption
TPH	Total petroleum hydrocarbons (idrocarburi di origine petrolifera)
USAS	Ultrasound-assisted Soxhlet
UV	Ultravioletto
VOC	Volatile organic compounds (composti organici volatili)

Gli indirizzi internet citati nel testo e nelle bibliografie dei capitoli sono stati verificati nel mese di settembre 2014.

Capitolo 1

Concetti generali e principali tecniche

Giorgia Purcaro, Sabrina Moret, Lanfranco S. Conte

1.1 Importanza della preparazione del campione e scelta del metodo

La preparazione del campione si avvale di diverse tecniche atte a estrarre gli analiti di interesse da matrici più o meno complesse, rimuovere potenziali interferenti, effettuare una concentrazione selettiva dell'analita al fine di ottenere una sensibilità adeguata e una quantificazione affidabile. Gli aspetti che influenzano la scelta della tecnica preparativa più appropriata sono correlati principalmente al composto d'interesse e alla tecnica strumentale impiegata per la determinazione analitica finale. Per esempio, l'utilizzo di una tecnica separativa come la cromatografia aggiunge un ulteriore livello di selettività al sistema analitico, rispetto a una tecnica non separativa, come un'analisi spettrofotometrica. Nel caso di tecniche cromatografiche, oltre all'efficienza separativa, riveste un ruolo importante anche il rivelatore utilizzato per acquisire il segnale, poiché esistono rivelatori più o meno selettivi. Per esempio, l'utilizzo in cromatografia liquida (LC) di un rivelatore UV (ultravioletto), poco sensibile e selettivo, implica un'accurata preparazione del campione (o opportuni passaggi di derivatizzazione), mentre l'utilizzo di tecniche più avanzate, come la spettrometria di massa (MS), e in particolare la tecnologia MS/MS, permette di raggiungere selettività e sensibilità talmente elevate da non richiedere un pre-trattamento spinto del campione. Da qui lo sviluppo di tecniche estrattive rapide come la QuEChERS (*quick, easy, cheap, effective, rugged, and safe*), nata per l'analisi di pesticidi in campioni vegetali e oggi estesa a molte altre determinazioni. Tuttavia, è opinione degli autori che, anche se si utilizzano rivelatori estremamente selettivi, una buona preparazione del campione può migliorare il mantenimento dello strumento ed evitare una serie di problemi correlati (come l'effetto matrice, che può causare soppressione ionica alla MS, e la perdita di prestazioni da parte del rivelatore).

La scelta del metodo di preparazione del campione può essere complessa, poiché spesso richiede di considerare simultaneamente numerosi parametri. Nel presente capitolo viene fornita una visione generale, per poi entrare nel dettaglio delle moderne tecniche preparative nei capitoli successivi.

Quando ci si trova a dover affrontare il problema dell'estrazione e/o della purificazione di un analita (o una classe di analiti) da un campione, prima della determinazione analitica finale, occorre innanzitutto vagliare quanto già riportato in letteratura e verificare se sono disponibili metodi ufficiali. Solitamente questi ultimi sono lunghi e laboriosi, ma rappresentano un buon punto di partenza per comprendere i meccanismi da sfruttare e gli aspetti critici connessi alla specifica analisi. È inoltre importante considerare la pericolosità dei solventi e

dei reagenti impiegati; infatti, metodi molto efficaci sviluppati in passato spesso utilizzano solventi o reagenti tossici, che in molti casi sono stati banditi o che dovrebbero comunque essere evitati. Una buona regola generale per la selezione e/o lo sviluppo di un nuovo metodo di analisi è privilegiare procedure semplici (nel limite del possibile) ed evitare passaggi inutili che riducono l'accuratezza e la precisione complessiva del metodo.

In primo luogo si valutano le proprietà chimiche e fisiche del composto di interesse: volatilità, polarità, solubilità e stabilità (termica, ossidativa, idrolitica ecc.). Occorre considerare anche le caratteristiche della matrice in esame, per comprendere come l'analita interagisce con i componenti presenti nel campione e se in quel particolare contesto può essere soggetto a reazioni di degradazione, per esempio enzimatiche (come nel caso dell'azione delle polifenolossidasi). La natura del campione determina, inoltre, i possibili interferenti: per esempio, per analizzare gli amminoacidi nel miele è necessario rimuovere gli zuccheri, che rappresentano la componente preponderante. La concentrazione dell'analita nel campione può influenzare la scelta del metodo analitico; per esempio l'analisi dei trigliceridi nell'olio, che rappresentano circa il 98% della matrice, si effettua direttamente iniettando il campione diluito in HPLC, mentre l'analisi dei componenti minori o in tracce richiede alcuni passaggi di purificazione, principalmente proprio per eliminare i trigliceridi.

Un metodo di preparazione del campione deve essere efficiente, rapido, affidabile e, se possibile, economico, sicuro e semplice. Non sempre è possibile sviluppare metodi semplici e rapidi, ma il principale criterio da seguire è che sia idoneo all'obiettivo (approccio detto *fit-for-purpose*).

Nei prossimi paragrafi viene presentata una panoramica delle tecniche tradizionali di preparazione del campione, insieme ad aspetti generali relativi alle tecniche di estrazione e alla validazione di un metodo. Le tecniche preparative più moderne e ampiamente utilizzate, sulle quali si focalizza il volume, saranno trattate estesamente nei capitoli successivi. In generale, tali tecniche permettono di ridurre il tempo e la laboriosità della procedura, possono essere automatizzate, riducono l'utilizzo di solventi e facilitano la miniaturizzazione dell'analisi.

1.2 Le fasi della preparazione del campione

La preparazione del campione è uno step importante e imprescindibile dell'intero processo analitico; infatti, come risulta dal diagramma di flusso riportato in Fig. 1.1, ogni metodo analitico prevede una procedura di preparazione del campione (più o meno complessa) prima della determinazione analitica vera e propria. Il processo analitico (specie nel caso di campioni complessi) prevede diversi passaggi, che solitamente comprendono: campionamento, estrazione, purificazione dell'estratto (che talvolta può essere condotta contemporaneamente all'estrazione), eventuale concentrazione o diluizione dell'estratto, determinazione analitica e interpretazione del risultato (quantificazione, analisi statistica).

1.2.1 Campionamento

Il campionamento rappresenta il primo stadio del processo analitico ed è cruciale per la corretta interpretazione dei risultati; inoltre, un errore in questa fase non può essere corretto in alcun modo e si ripercuote sull'intero processo analitico. In sostanza, anche il miglior metodo disponibile condurrà a risultati non corretti e inutili se applicato a un campione non correttamente formato e/o gestito. Il campionamento non può prescindere da una chiara visione dello scopo finale (del fenomeno o analita che si vuole studiare) e da una profonda conoscenza

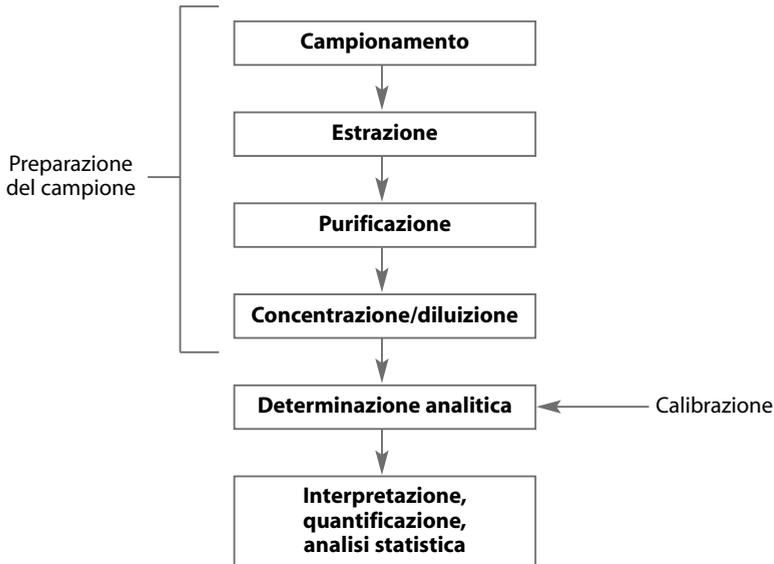


Fig. 1.1 Diagramma di flusso del processo analitico

za della matrice. Il campione deve essere rappresentativo dell'oggetto investigato e omogeneo. È inoltre importante prevenire possibili trasformazioni del campione durante lo stoccaggio che precede l'estrazione. In molti casi la procedura di campionamento è descritta dalle normative riguardanti i parametri da valutare. In questo paragrafo sono trattati in generale i principi alla base della gestione del campionamento.

Le procedure di campionamento dipendono dalla natura fisica del campione (gas, liquido o solido) e dallo scopo dell'analisi richiesta. Si assume, inoltre, che gli analiti (o le proprietà) studiati abbiano una distribuzione normale all'interno della popolazione; pertanto, aumentando il numero di determinazioni analitiche, il valore medio dei risultati si avvicina al valore medio della popolazione.

Se la popolazione da sottoporre a campionamento è omogenea (come nel caso, in genere ma non sempre, dei gas e dei liquidi), la procedura da seguire è meno complessa e può essere effettuato un numero minore di repliche. In questo caso si può eseguire il campionamento più semplice, quello casuale o random. Questo tipo di campionamento può essere a sua volta classificato in semplice, sistematico e stratificato. Il *campionamento semplice* è completamente random e utilizzabile quando vi sono sufficienti prove sull'omogeneità della popolazione. Il *campionamento sistematico* è condotto secondo una procedura standardizzata basata su criteri precisi, per esempio tempo o massa del campione. Infine, il *campionamento stratificato* suddivide la popolazione in gruppi, o strati (per esempio origine geografica, età), dai quali vengono prelevati i campioni (Lampi, Ollilainem, 2010). Tuttavia, occorre sempre tenere presente che cosa si vuole analizzare e le caratteristiche della popolazione dalla quale si sta prelevando il campione. Per esempio, se si vuole determinare il contenuto di Ca^{2+} nelle acque di un lago, bisogna tener presente che la concentrazione può cambiare a seconda della zona di campionamento, della profondità e del periodo dell'anno (Mitra, Brukh, 2003). Nel campionamento di matrici alimentari fluide occorre accertarsi della loro omogeneità e se possibile

intervenire con modalità fisiche o chimiche non invasive per renderle tali (per esempio, evitare la formazione di precipitati mediante blando riscaldamento del campione).

Nel caso di campioni solidi può risultare più difficile garantire l'omogeneità, specie se non è possibile una macinazione preventiva. Generalmente si procede, quindi, con il prelievo di più campioni elementari, che vengono poi riuniti in un campione globale che viene omogeneizzato (eventualmente macinandolo) e dal quale si prelevano i campioni di laboratorio. Tali operazioni seguono precisi schemi procedurali riportati nelle normative di riferimento per tipologia di alimento e tipo di contaminante (Koziel, 2002).

1.2.2 Stoccaggio e pre-trattamento del campione

Una volta effettuato il campionamento, è importante verificare che lo stoccaggio e il trasporto del campione prima dell'analisi siano condotti in modo da evitare fenomeni fisici, chimico-fisici o biologici in grado di alterarne la rappresentatività.

I processi fisici che possono alterare un campione sono generalmente la volatilizzazione di alcuni componenti, la diffusione e l'adsorbimento sulle superfici con le quali il campione entra a contatto; per prevenirli occorre innanzitutto scegliere opportunamente il contenitore dove riporre il campione. Solitamente si sceglie tra vetro, metallo o plastica, a seconda delle specifiche esigenze e delle possibili interazioni tra analita e superficie del contenitore. Per esempio, se si devono analizzare i contaminanti idrofobici presenti nelle acque, il campione non deve essere conservato in contenitori di plastica, poiché questa può adsorbire i contaminanti. La scelta ottimale è rappresentata dal vetro; inoltre, per evitare problemi di adsorbimento degli analiti sulle pareti del contenitore, spesso si aggiunge al campione una piccola percentuale di solvente organico che migliora la solubilità dell'analita in mezzo acquoso. Si consiglia, inoltre, di minimizzare lo spazio di testa, in modo da evitare la perdita delle sostanze più volatili o l'assorbimento di gas dall'atmosfera (per esempio, la solubilizzazione della CO_2 presente nell'ambiente in campioni di acqua altera la misura del pH alla sorgente).

Tra le modificazioni fisiche alle quali il campione può andare incontro vi è anche la variazione del contenuto di acqua. La concentrazione di acqua nel campione può variare sia per assorbimento dall'ambiente, sia per evaporazione anche all'interno dei recipienti in cui viene posto e conservato il campione. Un aumento della concentrazione dell'acqua può determinare un incremento del valore di A_w (attività dell'acqua), con conseguente possibile azione di enzimi o proliferazione di microrganismi. Per limitare tali inconvenienti, oltre a un'accurata termostatazione del locale nel quale vengono conservati i campioni, si deve prestare attenzione a non lasciare uno spazio di testa eccessivo all'interno dei recipienti contenenti i campioni. Ovviamente i contenitori devono essere impermeabili all'acqua e ai vapori.

Tra i cambiamenti chimici sono comprese le reazioni fotochimiche, le ossido-riduzioni e le precipitazioni. È quindi essenziale, qualora i parametri di interesse siano correlati al livello di ossidazione o, per esempio, alle capacità antiossidanti di un particolare alimento, proteggere il campione dalla luce e dal contatto con l'aria. Per la determinazione del numero di perossidi in olio extra vergine di oliva, il campione deve per esempio essere conservato in contenitori di vetro o metallo (per evitare la diffusione dell'ossigeno), al buio e al fresco.

I processi biologici coinvolgono la biodegradazione (di natura chimica e microbica) e le reazioni enzimatiche (per esempio in vegetali e frutta); in taluni casi può quindi essere necessario l'utilizzo di conservanti.

I campioni vengono generalmente conservati in congelatore ($-18^\circ C$) o in frigorifero, riducendo il più possibile il tempo di stoccaggio. In alcuni casi, tuttavia, l'applicazione delle basse temperature può non essere adeguata, poiché potrebbe provocare l'irreversibile precipitazione di

alcuni componenti, come parte delle sostanze fenoliche nel caso degli oli extra vergini di oliva. Prima della preparazione vera e propria del campione, si effettua solitamente l'omogeneizzazione e la dissoluzione del campione. In genere l'omogeneizzazione riguarda principalmente i campioni solidi, pertanto un'operazione frequente è la macinazione. Occorre però evitare effetti indesiderati e collaterali, quali la perdita di componenti volatili a causa del riscaldamento e l'assorbimento di umidità dovuta all'aumento dell'area superficiale. Tuttavia anche alcuni campioni liquidi, come miele o soluzioni concentrate, possono richiedere un'omogeneizzazione qualora possano formarsi gradienti di concentrazione, particolarmente rilevanti nel caso di grandi masse: tipico esempio è il campionamento da silos di olio, mosto o vino, per il quale si rende necessario il cosiddetto "rimontaggio", che consiste nel far circolare la massa mediante una pompa per un certo numero di volte.

Per le differenti tipologie di campione, o per lo meno per molte di esse, esistono norme armonizzate internazionali (come la International Dairy Federation, IDF, per il settore lattiero-caseario, la Federation of Oils, Seeds and Fats Associations, FOSFA, per le sementi oleose, l'Organizzazione Internazionale della Vigna e del Vino, OIV, per il vino e i prodotti correlati, UE, CEN o ISO, in molti altri casi) che descrivono in dettaglio le modalità e gli strumenti da utilizzare per il campionamento, nonché le condizioni di manipolazione e conservazione del campione, sia esso allo stato sfuso o confezionato.

Per massimizzare l'estrazione del campione possono essere necessarie diverse operazioni preliminari, come la disidratazione o la liofilizzazione per allontanare l'acqua e favorire il contatto con il solvente organico estraente.

1.2.3 Estrazione

L'estrazione è la procedura che permette di isolare l'analita di interesse dalla massa della matrice. Generalmente è seguita da un passaggio di purificazione per allontanare eventuali interferenti co-estratti; tuttavia, nella chimica analitica attuale si tende a velocizzare la preparazione del campione riunendo in un unico passaggio l'estrazione e la purificazione.

Le tecniche di estrazione possono essere classificate sulla base di diversi criteri (stato fisico del campione e della fase estraente, modalità di contatto, quantità o volumi in gioco ecc.). Per esempio, considerando la modalità di contatto, un criterio comune le classifica in statiche, dinamiche e a regime mediato (Fig. 1.2); l'ultimo gruppo comprende solo l'estrazione tramite membrana, che verrà trattata in modo esaustivo nel cap. 5. A loro volta, queste modalità estrattive possono essere suddivise in esaustive e non esaustive.

Le condizioni di estrazione devono essere ottimizzate in modo da massimizzare il recupero dell'analita. A tale proposito vanno sempre eseguite prove di recupero con materiale

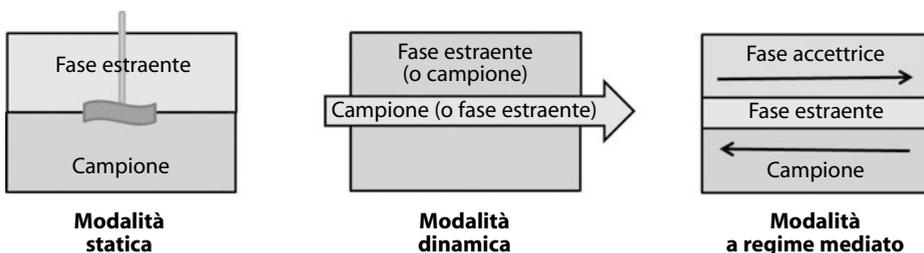


Fig. 1.2 Schema delle diverse modalità di contatto utilizzate per l'estrazione

certificato o con campioni fortificati con un'opportuna concentrazione di miscela standard. Quando necessario, prima della determinazione analitica finale si deve inserire un passaggio di purificazione del campione per eliminare gli interferenti co-estratti insieme agli analiti di interesse.

I principi fondamentali alla base dei diversi approcci estrattivi sono comunque molto simili (Pawliszyn, 2012). In tutti i casi, la fase estrattiva è a contatto con il campione e l'analita migra tra le fasi (in modo esaustivo o all'equilibrio). Di seguito sono discussi i principi termodinamici e cinetici comuni a tutte le tecniche preparative che verranno trattate nei capitoli successivi.

1.2.3.1 Principi termodinamici e cinetici fondamentali

Il principio termodinamico valido per tutte le tecniche estrattive si basa sulla costante di ripartizione dell'analita tra il campione e la fase estraente. Quando il mezzo estraente è un liquido, la costante di ripartizione è espressa dall'equazione:

$$K_{e/s} = \frac{a_e}{a_s} = \frac{C_e}{C_s} \quad (1.1)$$

dove a_e e a_s rappresentano, rispettivamente, l'attività della fase estraente e quella della matrice e possono essere approssimate alla corrispondente concentrazione (C_e e C_s).

Per fasi estraenti solide, l'equilibrio può essere descritto dall'equazione:

$$K_{e/s}^s = \frac{S_e}{C_s} \quad (1.2)$$

dove S_e è la concentrazione dell'analita adsorbita sulla superficie del solido adsorbente. Da ciò risulta che l'area superficiale della fase solida disponibile per l'adsorbimento è un parametro importante da considerare. Limiti nell'estensione della superficie estraente complicano la calibrazione nelle condizioni di equilibrio a causa dell'effetto di spostamento dell'analita da parte di interferenti presenti nella matrice. L'eq. 1.2 può essere utilizzata per calcolare la quantità di analita estratta all'equilibrio e subisce specifiche modifiche in condizioni particolari, come nella microestrazione in fase solida (SPME) (per i dettagli, vedi cap. 7). La selettività del metodo è determinata dalla costante $K_{e/s}$, mentre la sensibilità è determinata sia dal volume di estraente sia dalla $K_{e/s}$.

Tuttavia nella pratica i parametri cinetici – definiti dalla costante di dissociazione, dal coefficiente di diffusione e dalle condizioni di agitazione – sono in genere più importanti nel determinare l'efficienza di un processo di estrazione da matrici complesse, poiché spesso non si raggiunge l'equilibrio di estrazione. Nelle estrazioni liquido-liquido i profili di concentrazione degli analiti in entrambe le fasi possono essere ottenuti risolvendo l'equazione differenziale della seconda legge di Fick:

$$\frac{\partial C(x,t)}{\partial t} = D \frac{\partial^2 C(x,t)}{\partial x^2} \quad (1.3)$$

Se la costante di ripartizione è definita dall'eq. 1.1 e le due fasi sono messe a contatto al tempo 0 ($t = 0$), l'equazione differenziale può essere risolta mediante trasformazione di Laplace, con $x < 0$ per la fase acquosa (eq. 1.4) e $x > 0$ per la fase organica estraente (eq. 1.5):

$$x < 0 \quad C_s(x, t) = C_0 \frac{\frac{z}{K_{e/s}} + \operatorname{erf}\left(z\sqrt{tD_s}\right)}{1 + \frac{z}{K_{e/s}}} \quad (1.4)$$

$$x > 0 \quad C_s(x, t) = C_0 \frac{z \left[1 - \operatorname{erf}\left(\frac{x}{z\sqrt{tD_e}}\right) \right]}{1 + \frac{z}{K_{e/s}}} \quad (1.5)$$

dove C_0 è la concentrazione iniziale dell'analita nella fase acquosa; D_e e D_s sono i coefficienti di diffusione dell'analita, rispettivamente nella fase di estrazione e nel campione; $z = D_e/D_s$; $K_{e/s}$ è l'appropriata costante di ripartizione calcolata secondo l'eq. 1.1. La soluzione grafica delle equazioni 1.4 e 1.5 è mostrata in Fig. 1.3.

La riduzione dello strato di confine all'interfaccia e la diminuzione dell'estensione della diffusione, tramite agitazione di una o di entrambe le fasi, aumentano enormemente la resa di estrazione. L'effetto dell'agitazione può essere calcolato utilizzando il modello dello strato limite, che può essere definito come uno spessore determinato sia dall'intensità dell'agitazione sia dal coefficiente di diffusione dell'analita. Pertanto, lo spessore di tale strato può essere diverso per analiti diversi durante lo stesso processo di estrazione. Questo strato – noto come *strato limite di Prandtl* – è una regione nella quale il flusso dell'analita è progressivamente più dipendente dalla diffusione dell'analita e meno dalla convezione del fluido, quanto più si è prossimi alla fase di estrazione. Convenzionalmente, si assume che il flusso

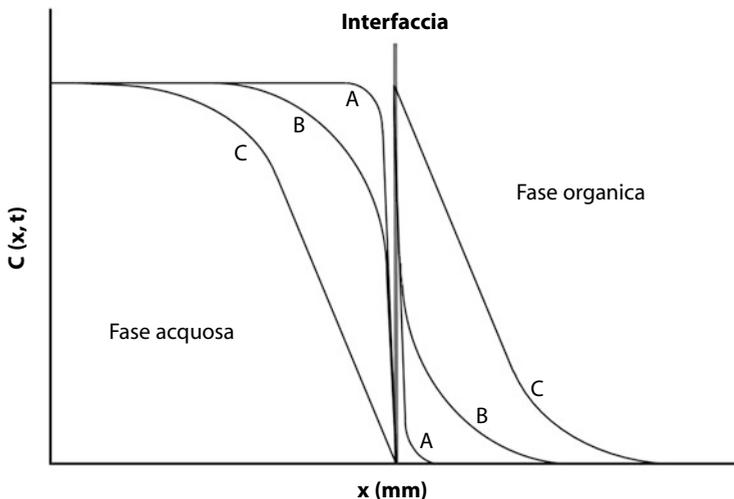


Fig. 1.3 Profilo di concentrazione all'interfaccia tra un volume infinito di campione e la fase estrattante per un analita caratterizzato da un identico coefficiente di diffusione nelle fasi acquosa e organica ($10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$). I profili corrispondono a diversi tempi dal contatto delle due fasi: A: 1 s; B: 10 s; C: 100 s

dell'analita sia governato dalla convezione nel campione, cioè all'esterno dello strato limite, e dalla diffusione all'interno dello strato limite.

In molti casi, quando la fase estraente è ben dispersa, la diffusione dell'analita attraverso lo strato limite controlla la velocità del processo di estrazione. Il tempo per raggiungere l'equilibrio può essere stimato come il tempo richiesto per estrarre il 95% della quantità estratta all'equilibrio. Si può calcolare con l'equazione:

$$t_e = B \frac{\delta b K_{els}}{D_s} \quad (1.6)$$

dove b è lo spessore della fase estraente; D_s è il coefficiente di diffusione dell'analita nella matrice del campione; K_{els} è la costante di ripartizione; B è un fattore correlato alla geometria del materiale di supporto nel quale la fase estraente è dispersa.

Secondo una modellizzazione di questo comportamento (Fig. 1.4), la concentrazione dell'analita di interesse diminuisce gradualmente allontanandosi dal campione da estrarre, per una distanza (corrispondente allo strato limite di Prandtl) determinata dal grado di agitazione del mezzo estraente. Lo spessore di questo strato limite è determinato dalle condizioni di agitazione e dalla viscosità del liquido, che influenza il coefficiente di diffusione dell'analita.

La situazione è molto più complessa quando il campione è un solido, poiché in questo caso molti processi fondamentali avvengono simultaneamente. Assumendo che le particelle della matrice solida possano essere rappresentate come uno strato organico di un supporto impermeabile ma poroso e che gli analiti siano adsorbiti sulla superficie dei pori, il processo di estrazione può essere schematizzato in diversi step basilari (Fig. 1.5).

Nello step iniziale l'analita deve prima essere desorbito dalla superficie (1) e poi diffondere attraverso la parte organica della matrice (2) per raggiungere l'interfaccia matrice/liquido (3). A questo punto il composto deve essere solvatato dalla fase estraente (4) e poi diffondere attraverso lo strato limite statico presente all'interno del poro per raggiungere il punto della fase estraente influenzata dai moti convettivi ed essere quindi trasportato nel centro della fase estraente (5). Il modo più semplice per descrivere tale modello cinetico è adottare

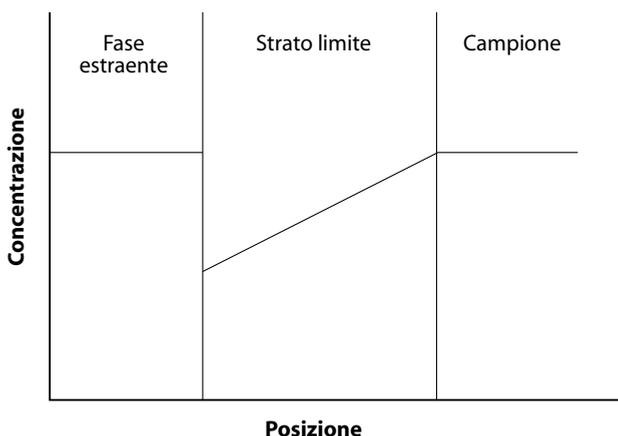


Fig. 1.4 Modello dello strato limite

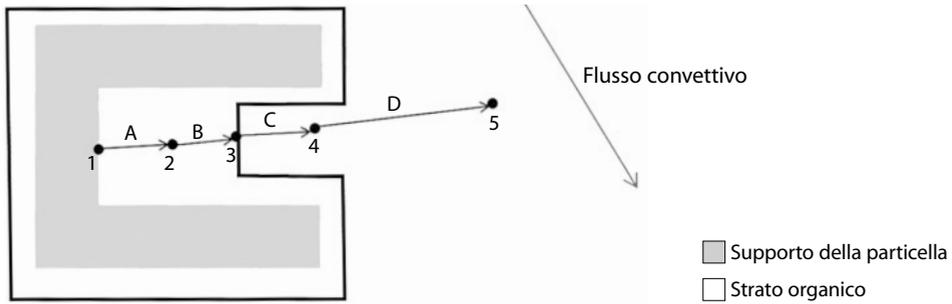


Fig. 1.5 Schema del processo di estrazione in un campione eterogeneo contenente particelle solide porose: 1, superficie della matrice; 2, parte organica della matrice; 3, interfaccia matrice/fase estraente; 4, strato limite statico all'interno del poro della matrice; 5, fase estraente; A, coefficiente di desorbimento; B, coefficiente di diffusione; C, solvatazione; D, coefficiente di diffusione nella fase estraente

le equazioni messe a punto dall'ingegneria per descrivere il trasporto di massa attraverso un materiale poroso (Dullien, 1992; Horvath, Lin, 1978). Poiché la trattazione esaustiva di tali processi esula dallo scopo di questo libro, si rimanda il lettore interessato alla bibliografia specifica (Crank, 1989; Adams et al, 1995; Gorecki et al, 1999; Pawliszyn, 2012).

1.2.3.2 Parametri che influenzano l'estrazione

La costante di ripartizione può essere influenzata da diversi parametri, i più importanti dei quali sono la temperatura (T), la pressione (P) e le caratteristiche della matrice (pH, contenuto di sali e componenti organici). L'ottimizzazione dei diversi parametri è discussa in dettaglio nei vari capitoli dedicati alle specifiche tecniche preparative. In particolare, temperatura e pressione sono i parametri sfruttati da alcune tecniche innovative, quali l'estrazione con solvente ad alta T e P (PLE), l'estrazione con microonde (MAE) e con fluidi supercritici (SFE). La Tabella 1.1 riporta le principali problematiche riscontrabili durante l'estrazione e i parametri sui quali si può agire per ovviarvi.

Tabella 1.1 Principali problematiche riscontrabili durante l'estrazione

Problemi riscontrati	Possibili soluzioni
Forti interazioni analita-matrice	Aumento della temperatura, polarità del solvente, saponificazione
Limitata velocità nel trasferimento di massa	Agitazione del campione, aumento del tempo di estrazione
Estrazione poco selettiva	Polarità del solvente, derivatizzazione
Trasformazione chimica, degradazione dell'analita, formazione di artefatti	Protezione dell'analita da fonti di degradazione (temperature elevate, luce, presenza di ossigeno), aggiunta di antiossidanti
Introduzione di contaminanti con i solventi	Riduzione dei volumi di solventi e della manipolazione del campione

1.2.4 Purificazione

L'estratto ottenuto dal campione richiede spesso una purificazione prima dell'analisi finale. Questo stadio può essere considerato come una seconda estrazione più selettiva. Spesso le fasi di estrazione e purificazione vengono combinate in un unico passaggio (per esempio l'applicazione della tecnica di estrazione in fase solida su campioni di acqua o oli). Per ridurre la presenza nell'estratto di composti indesiderati, si possono utilizzare diversi approcci. Di seguito sono sinteticamente illustrati i principali metodi tradizionali impiegati per la purificazione del campione, mentre quelli più innovativi sono trattati nei capitoli successivi.

1.2.4.1 Ripartizione liquido-liquido

La ripartizione liquido-liquido è un metodo tradizionale per rimuovere composti co-estratti, ottenere un arricchimento selettivo dell'analita e trasferire il composto di interesse in un solvente idoneo all'analisi strumentale finale. Spesso viene utilizzata per effettuare contemporaneamente l'estrazione e la purificazione del campione (per esempio nell'estrazione di contaminanti dalle acque). Questa tecnica è economica, ma richiede tempi lunghi di estrazione, utilizza elevati volumi di solventi ed è poco selettiva. Per una trattazione più completa, si rimanda al par. 1.3.

1.2.4.2 Precipitazione e idrolisi

L'idrolisi può essere impiegata sia in fase di estrazione sia in quella di purificazione. L'idrolisi acida viene utilizzata, per esempio, per rimuovere residui zuccherini da estratti di flavonoidi, acidi fenolici o glicosidi di fitosteroli. L'idrolisi basica può essere utilizzata per rimuovere i trigliceridi da un estratto lipidico.

La precipitazione viene spesso sfruttata per eliminare estratti proteici, denaturando le proteine con solventi organici come metanolo o acetonitrile. L'aggiunta di solventi organici agli estratti acquosi può invece favorire la precipitazione della fibra in campioni di cereali.

1.2.4.3 Cromatografia di permeazione su gel (GPC)

La GPC (*gel-permeation chromatography*) è una tecnica basata sull'esclusione molecolare (*size-exclusion*) che utilizza solventi organici o tamponi e un gel poroso per la separazione di macromolecole. Il gel poroso è caratterizzato da particolari diametri che escludono le molecole di diametro superiore a quello di interesse. È particolarmente raccomandata per eliminare lipidi, proteine, polimeri, copolimeri, resine naturali, componenti cellulari, virus, steroidi e altre macromolecole presenti nell'estratto.

1.2.4.4 Cromatografia su colonna ed estrazione in fase solida (SPE)

L'estratto può essere purificato utilizzando colonne cromatografiche impaccate o cartucce di estrazione in fase solida (SPE, *solid-phase extraction*), che rappresentano una miniaturizzazione delle classiche colonne cromatografiche. Questo tipo di purificazione (spesso impiegato anche in fase di estrazione) è forse il più diffuso nella preparazione di campioni biologici, ambientali, alimentari e clinici. La colonna o la cartuccia SPE vengono impaccate con la quantità necessaria di un opportuno adsorbente, quindi si carica il campione e poi si eluisce l'analita di interesse trattenendo gli interferenti, o viceversa. L'estrazione/purificazione

tramite SPE è ampiamente discussa nel cap. 6, insieme a una variante, la *matrix solid-phase dispersion*. In quest'ultima tecnica la fase adsorbente viene omogeneizzata con la matrice, il materiale risultante può poi essere eventualmente utilizzato per impaccare una colonna ed effettuare, quindi, l'eluizione selettiva dei composti di interesse.

In molti casi la tecnica più selettiva è rappresentata dalla separazione in cromatografia liquida (LC), trattata estesamente nel cap. 10.

1.2.5 Arricchimento selettivo, concentrazione/diluizione

Solitamente gli analiti di interesse presenti nell'estratto finale, dopo il passaggio di purificazione, sono presenti in concentrazione troppo bassa per essere analizzati direttamente; talora, ma assai raramente, devono essere diluiti (per esempio analisi degli zuccheri o degli acidi organici nei vegetali).

L'arricchimento degli analiti nell'estratto si ottiene in genere per evaporazione del solvente in un evaporatore rotante o sotto leggero flusso di azoto. A seconda della termostabilità e della volatilità degli analiti, si può favorire l'evaporazione riscaldando l'estratto in un bagno d'acqua. Per ridurre le perdite degli analiti di interesse in fase di evaporazione, può essere opportuno aggiungere piccole quantità di un solvente più altobollente (*keeper*) del solvente in cui sono disciolti gli analiti. Per analiti molto polari si raccomanda di silanizzare la vetreria, per evitare che i composti restino adesi alle superfici di contatto.

L'arricchimento può essere ottenuto anche con tecniche di precipitazione, come la precipitazione di fosfolipidi con acetone a 0-4 °C. Nelle estrazioni condotte sullo spazio di testa l'arricchimento viene effettuato intrappolando gli analiti in sostanze adsorbenti, come il Tenax, o tramite intrappolamento criogenico.

L'arricchimento dell'analita può essere ottenuto anche tramite iniezione *large volume* direttamente in un iniettore a temperatura programmata (PTV) o in una colonna GC. Ottimizzando le condizioni cromatografiche, il solvente evapora concentrando gli analiti di interesse in testa alla colonna cromatografica.

1.2.6 Derivatizzazione

La fase di derivatizzazione può essere introdotta nel processo analitico allo scopo di: migliorare la separazione, modificare la solubilità di un analita, aumentare la selettività per uno specifico analita, aumentare la termostabilità, fissare lo stato di ossidazione di un metallo, attaccare uno specifico gruppo funzionale alla molecola dell'analita per poter utilizzare specifici rivelatori. Il criterio fondamentale è modificare la struttura chimica o fisica dell'analita attraverso un'opportuna reazione. Per esempio, in GC gli acidi grassi vengono analizzati previa derivatizzazione per bloccare il gruppo carbossilico e migliorare la separazione cromatografica. Il tipo di reazione di derivatizzazione dipende strettamente dal metodo analitico e dal composto da analizzare. Lo step di derivatizzazione dovrebbe essere semplice, rapido (generalmente dovrebbe richiedere meno di 15 minuti), selettivo, quantitativo e dare un unico prodotto finale.

La derivatizzazione può essere condotta a diversi stadi del processo analitico:

- prima del trattamento del campione;
- prima dell'analisi finale;
- durante il processo di estrazione e purificazione;
- in fase di iniezione;
- dopo la separazione cromatografica (post-colonna).

Poiché lo scopo della derivatizzazione varia in funzione della determinazione finale, sono di seguito brevemente illustrati gli approcci utilizzati suddividendoli a seconda dell'analisi finale. Infatti, quando la determinazione finale è effettuata in GC, lo scopo della derivatizzazione è generalmente aumentare la volatilità e la termostabilità dell'analita e ridurre la polarità; mentre in LC ed elettroforesi lo scopo è aumentare la solubilità dell'analita in solventi polari e rendere l'analita rilevabile da detector selettivi (come lo spettrofluorimetro). Per una trattazione completa del processo di derivatizzazione, si rimanda a rassegne e testi più esaurienti (Rosenfeld, 2010; Knapp, 1979; Zaikin, Halket, 2009; Blau, Halket, 1993; Fitton, Hill, 1970; Parkinson, 2012; Sigma-Aldrich, 2010).

1.2.6.1 Derivatizzazione per analisi GC

Come già accennato, la derivatizzazione che si utilizza nel caso di un'analisi GC serve principalmente ad aumentare la volatilità e la termostabilità dell'analita e a migliorarne le proprietà cromatografiche, generalmente riducendo la polarità del composto. I tipi più comuni di derivatizzazione sono la silanizzazione, l'acilazione, la metilazione o alchilazione e l'esterificazione.

La *silanizzazione*, o *sililazione*, è la procedura di derivatizzazione più versatile e consiste nella sostituzione di un idrogeno acido o attivo con un gruppo alchil-silil, come il trimetilsilil (TMS) e il *tert*-butildimetilsilil (*t*-BDMS). Solitamente vengono silanizzati composti che presentano gruppi idrossilici, acidi carbossilici, ammine, tioli, fosfati e amminoacidi.

Di seguito viene illustrata la reazione che utilizza come reagente derivatizzante il trimetilclorosilano (TMCS). La reazione prevede un attacco nucleofilo sul silicone e viene solitamente condotta in un solvente aprotico, come tetraidrofurano (THF), dimetilsolfossido (DMSO) e piridina, che fungono anche da catalizzatori della reazione:



Tra i numerosi reagenti silanizzanti disponibili (Tabella 1.2), il TMCS e l'esametildisilano (HMDS) sono tra i più utilizzati. Bisogna prestare attenzione, poiché alcuni derivatizzanti, come il N,O-bis(trimetilsilil)-acetammide (BSA), possono andare incontro a ossidazione nell'iniettore GC, formando biossido di silicio (SiO₂) che può contaminare il rivelatore. Anche la scelta della fase stazionaria immobilizzata nella colonna GC è molto importante, in quanto fasi stazionarie contenenti idrogeni attivi, come le colonne polari e quelle a base di polietilenglicole (PEG), non sono adatte in presenza di questi reagenti. Inoltre, poiché i derivati TMS sono sensibili all'umidità, occorre procedere con attenzione per evitare che si degradino.

L'impiego dei silil-derivati può risultare molto vantaggioso anche quando si utilizza come detector uno spettrometro di massa; infatti spesso si genera un profilo di frammentazione caratteristico e una maggior abbondanza ionica di alcuni frammenti, rendendo più facile l'identificazione e aumentando la sensibilità.

L'*acilazione* è una valida alternativa alla silanizzazione, ma non agisce su gruppi carbossilici e gruppi funzionali simili. L'acilazione è più specifica per composti multifunzionali, come zuccheri e amminoacidi, e permette di convertire i composti con un idrogeno attivo,

Tabella 1.2 Principali derivatizzanti per GC

Gruppo funzionale/ Tipo di composto	Procedura	Reagente	Derivato	Osservazioni	
AMMIDI primarie, secondarie, benzodiazepine barbiturici, immidi, proteine	<i>Acilazione</i>	TFAA	Trifluoroacetammide	La più reattiva e volatile delle anidridi fluorinate; ideale da utilizzare con FID, ECD e TCD	
	<i>Alchilazione</i>	PFPA	Pentafluoropropionammide	Richiede basse temperature di analisi; ideale con FID, ECD, TCD	
		HFBA	Eptafluorobutilammide	Anidride più delicata	
		TMAH	Metilammide	Reazione molto veloce; molto utilizzato per derivatizzare barbiturici	
	<i>Silanizzazione</i>	DMF-dialchilacetale	N-(N,N-dimetil)amminometileni	Ideale con campioni umidi	
		BSA	Trimetilsilili (TMS)-ammide	Altamente reattivo e universale; vedi osservazioni per carbonili	
		BSTFA	Trimetilsilili (TMS)-ammide	Altamente reattivo e universale; più volatile di BSA; vedi osservazioni per carbonili	
		BSTFA+TMCS	Trimetilsilili (TMS)-ammide	TMCS funge da catalizzatore nella derivatizzazione di ammine	
	AMMINE primarie, secondarie, alcaloidi, aminoacidi, amminozuccheri, anfetamine, catecolamine biogene carbammati, idrossilammine, nitrosammine, nucleotidi, nucleosidi, urea	<i>Acilazione</i>	Anidride acetica	Acetati	Utilizzata con ammine primarie e secondarie
			MBTFA	Trifluoroacetammide	Utilizzata con ammine primarie e secondarie; ideale con FID, ECD, TDC
TFAA			Trifluoroacetammide	L'anidride fluorinata più reattiva e volatile; ideale con FID, ECD e TCD	
TFAI			Trifluoroacetammide	Adatta per analisi in tracce con ECD; prodotto secondario imidazolo, comunque inerte	
<i>Alchilazione</i>		PFPA	Pentafluoropropionammide	Richiede basse temperature di analisi; ideale con FID, ECD, TCD; utile per identificare catecolamine	
		HFBA	Eptafluorobutilammide	Ideale con FID, ECD, TCD; utilizzato per identificare anfetamine, fencididine, catecolamine	
		PFBBr	Pentafluorobenziletere	Ideale con ECD	
		DMF-dialchilacetale	N-(N,N-dimetil)amminometileni	Reazione rapida; utile con ammine stericamente impedito	
		NBB	Boronati	Converte alfa-amminoacidi, idrossilammine, chetoacidi, dioli in derivati più facilmente cromatografabili	
		TMAH	Metilammide	Reazione molto veloce; molto utilizzato per derivatizzare barbiturici	
<i>Silanizzazione</i>	BSA	Trimetilsilili (TMS)-eteri	Utile per la simultanea silanizzazione di aminoacidi e gruppi idrossilici; efficace sia senza solvente sia con solventi come la piridina		
	BSTFA	Trimetilsilili (TMS)-eteri	Reagente e prodotti volatili; funge da solvente; può causare problemi al detector		
	BSTFA+TMCS	Trimetilsilili (TMS)-eteri	TMCS funge da catalizzatore aumentando la reattività del BSTFA		
		HMDS	Trimetilsilili (TMS)-eteri	Usato con TMCS per estendere i prodotti analizzabili per GC	

segue