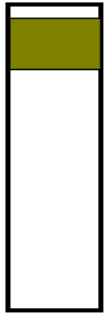


Cromatografia liquida (LC)

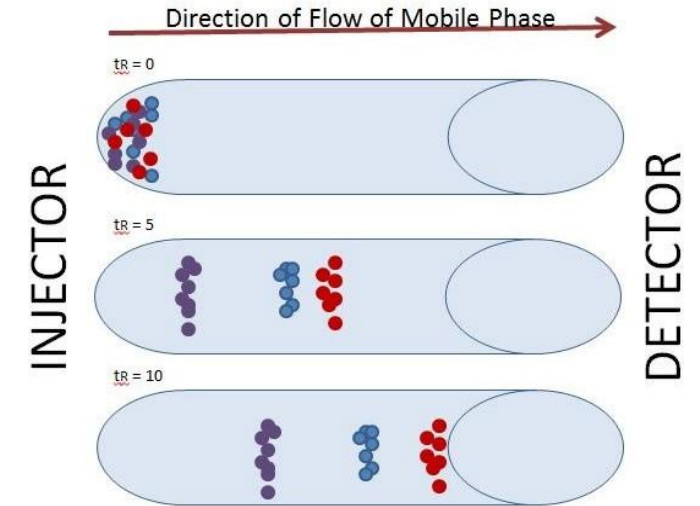
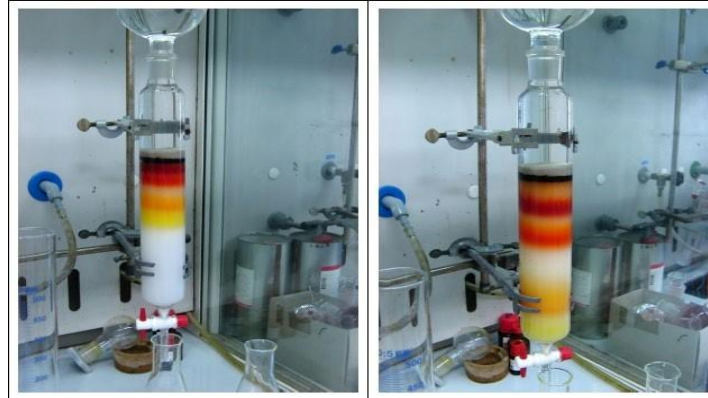
La cromatografia liquida (LC) è una **tecnica di separazione di sostanze presenti in una miscela**, mediante l'uso di due fasi - una fase solida (**Fase stazionaria**) e una fase liquida (**Fase mobile**).



La miscela di pigmenti, prima di aggiungere l'eluente



Dopo aver aggiunto l'eluente, i componenti della miscela si sono separati.



I componenti sono trasportati lungo la fase stazionaria dal flusso della fase mobile (**Eluizione**). La diversa ripartizione tra queste due fasi determina la separazione dei componenti.

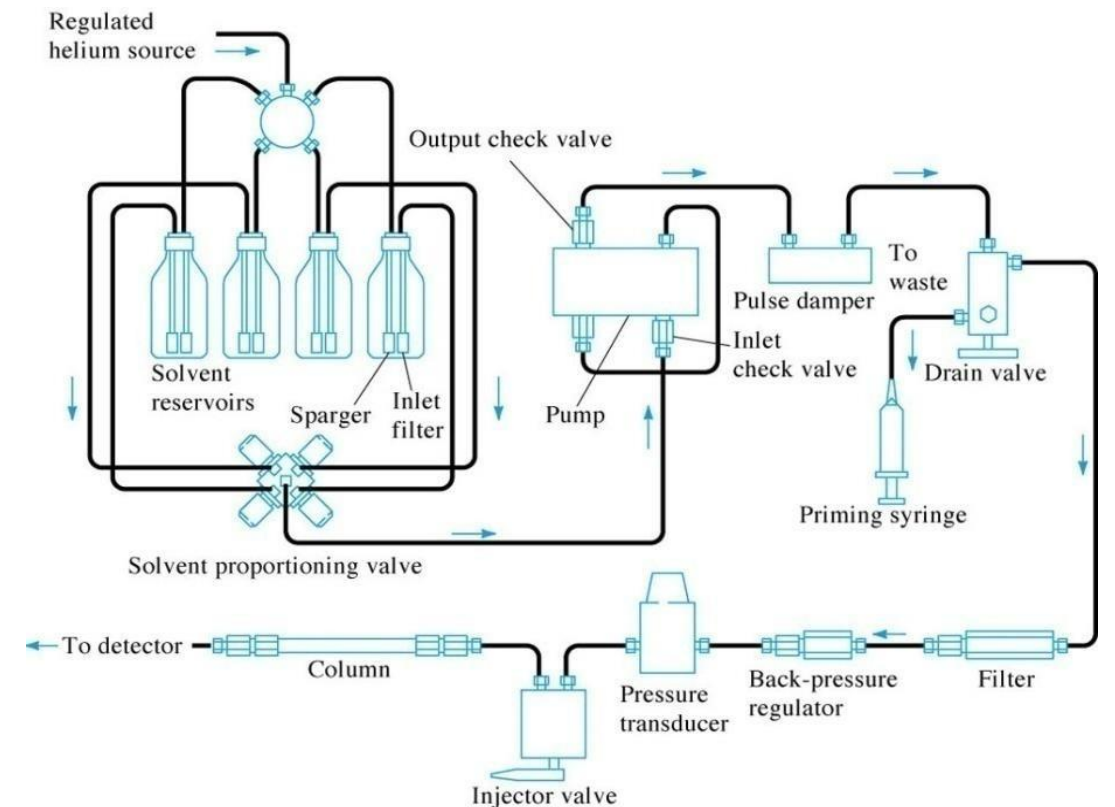
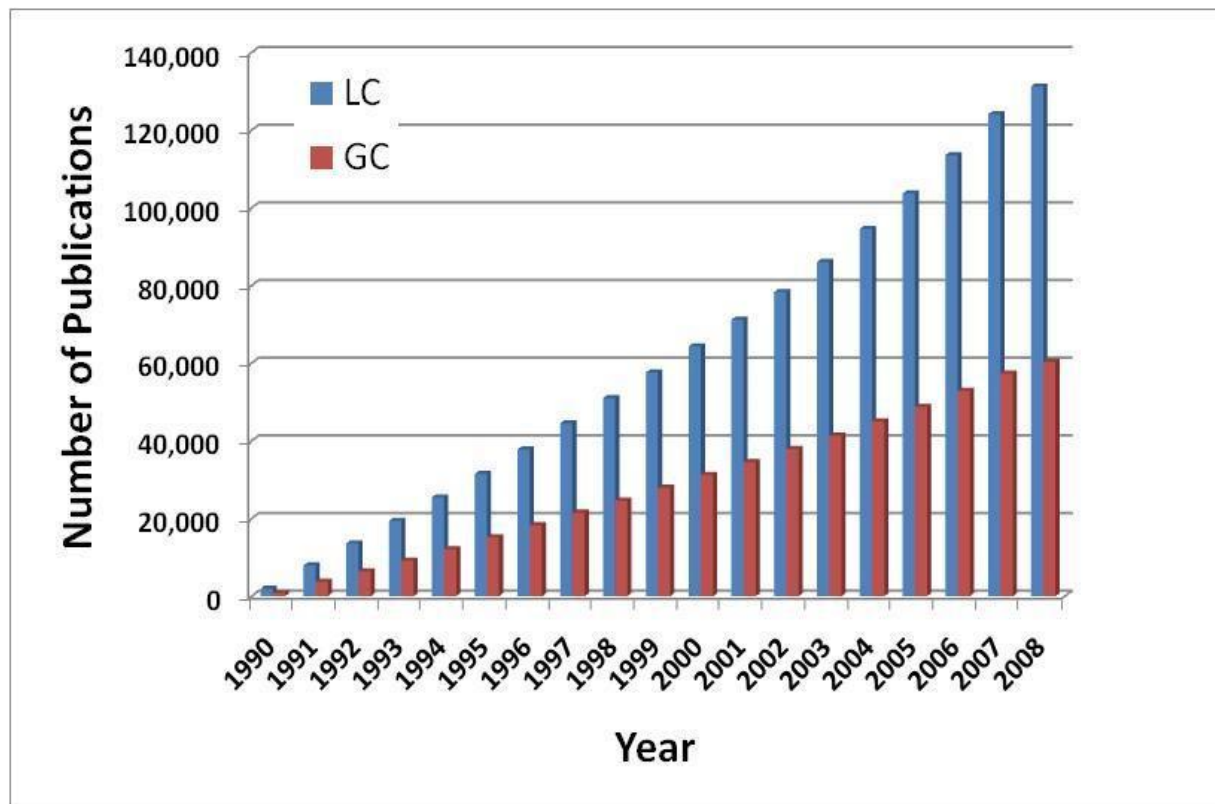
Fase stazionaria: fase fissa in una determinata posizione (o colonna o superficie planare)

Fase mobile: fase che si muove lungo, o attraverso la fase stazionaria, trasportando con sé l'analita

Cromatografia liquida (LC)

La LC è una tecnica molto più antica della Gas Cromatografia (GC), ma fu oscurata dal rapido sviluppo della GC negli anni '50 e '60.

La LC è attualmente il tipo dominante di cromatografia e sta persino sostituendo la GC nelle sue applicazioni più tradizionali.



Vantaggi della LC rispetto alla GC:

1.) LC può essere applicata alla separazione di qualsiasi composto solubile in fase liquida.

LC è più utile nella separazione di composti biologici, polimeri sintetici o naturali e composti inorganici

2.) La fase mobile liquida permette di utilizzare il LC a temperature inferiori a quelle richieste dal GC

LC è più adatta della GC per separare composti che potrebbero essere termicamente labili

3.) La ritenzione dei soluti in LC dipende dalla loro interazione sia con la fase mobile che con quella stazionaria.

Ritenzione della GC basata sulla volatilità e sull'interazione con la fase stazionaria

La LC è più flessibile nell'ottimizzare le separazioni → cambiamento della fase stazionaria o fase mobile

4.) La maggior parte dei rivelatori LC è non distruttiva

La maggior parte dei rivelatori GC è distruttiva

La LC è più adatta per separazioni preparative o su scala di processo

Svantaggi della LC rispetto alla GC:

1.) LC è soggetto a un maggiore allargamento dei picchi o delle bande.

coefficienti di diffusione molto più elevati dei soluti nei gas rispetto ai liquidi

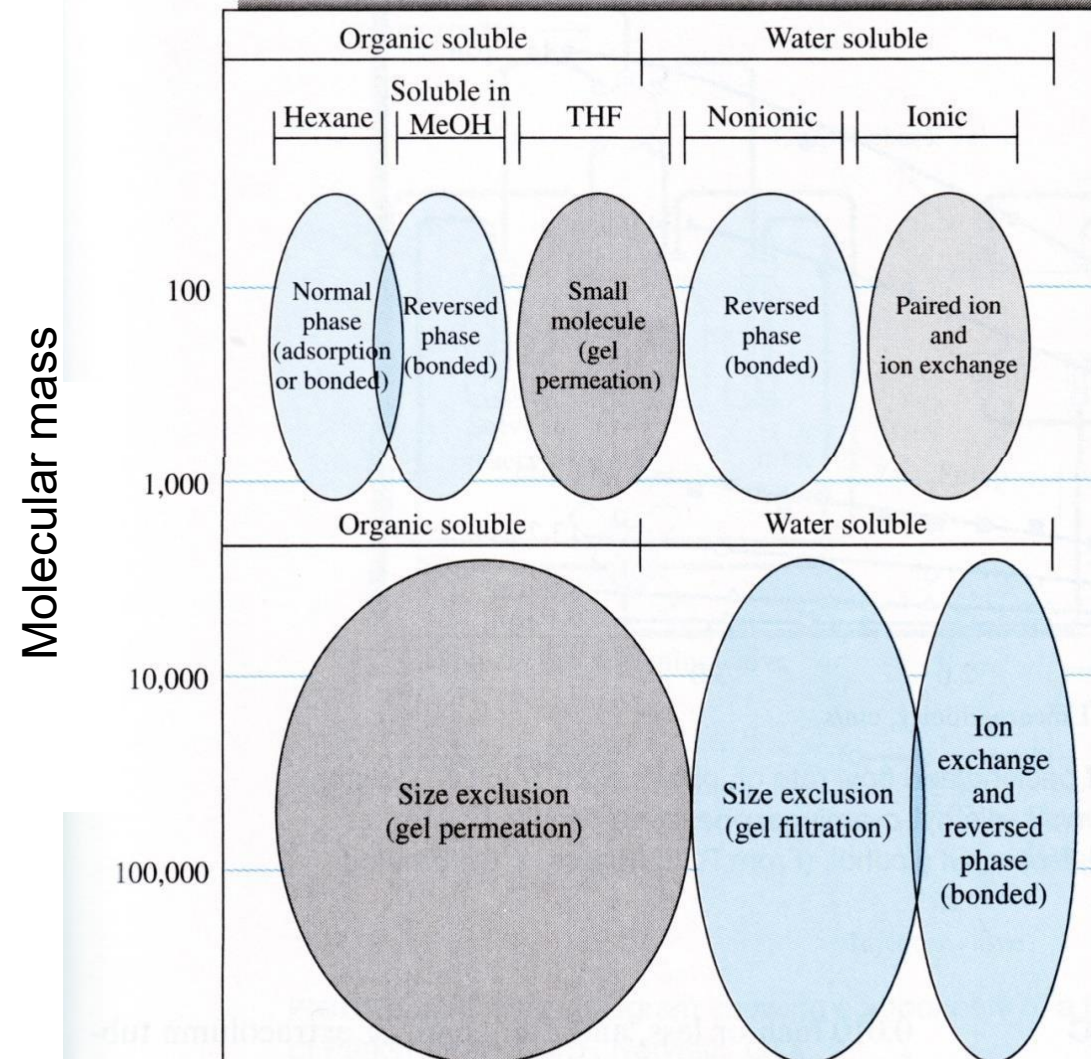
B.) Low- and High-performance Liquid Chromatography:

Sono disponibili molti tipi di cromatografia liquida, basati su diversi materiali di fase stazionaria e diverse combinazioni di fasi mobili.

- ogni tipo può essere ulteriormente caratterizzato in base alla sua efficienza complessiva o prestazioni

High Performance Liquid Chromatography (HPLC):

- Cromatografia di ripartizione in **fase diretta** (NPC) – la fase stazionaria è polare mentre quella mobile è apolare.
- Cromatografia di ripartizione in **fase inversa** (RPC) – la fase stazionaria è apolare mentre quella mobile è polare (di solito acqua (fase A) + un solvente come metanolo o acetonitrile (Fase B), con eventuale aggiunta di additivi, es. acido formico o acido acetico).



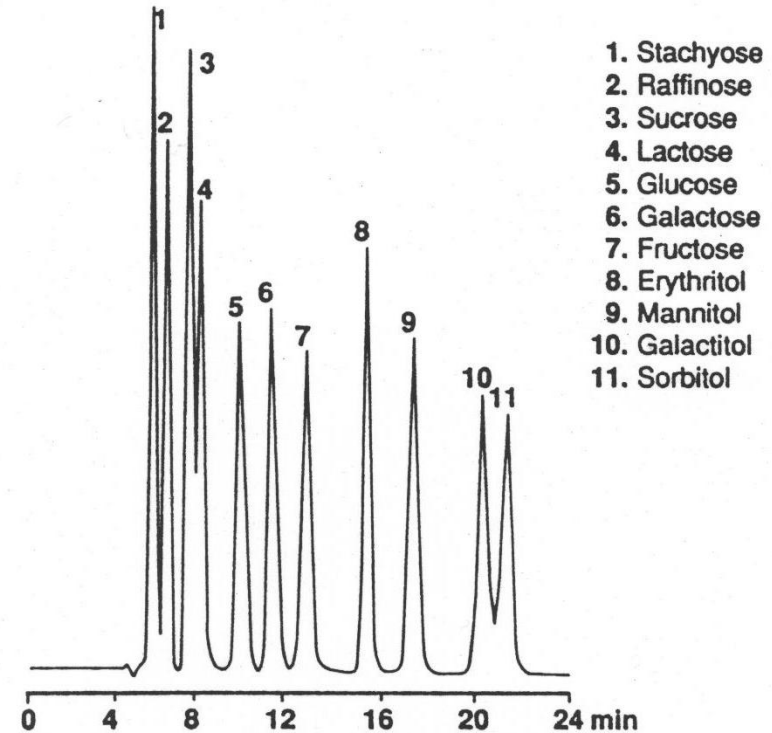
High-performance liquid chromatography (HPLC)

- Metodi LC che utilizzano materiale di supporto piccolo, uniforme e rigido,
- particelle < 40 m di diametro
- ' di solito 3-10 m in allenamento

- buone efficienze di sistema e Piccole altezze dei piatti teorici
- Tali sistemi presentano le seguenti caratteristiche:;

- Picchi stretti
- ' Limiti bassi di rilevamento
- ' tempi di separazione brevi
- le colonne possono tollerare solo le alte Pressioni operative e portate più elevate

Standard Mixture of Sugars and Alcohols



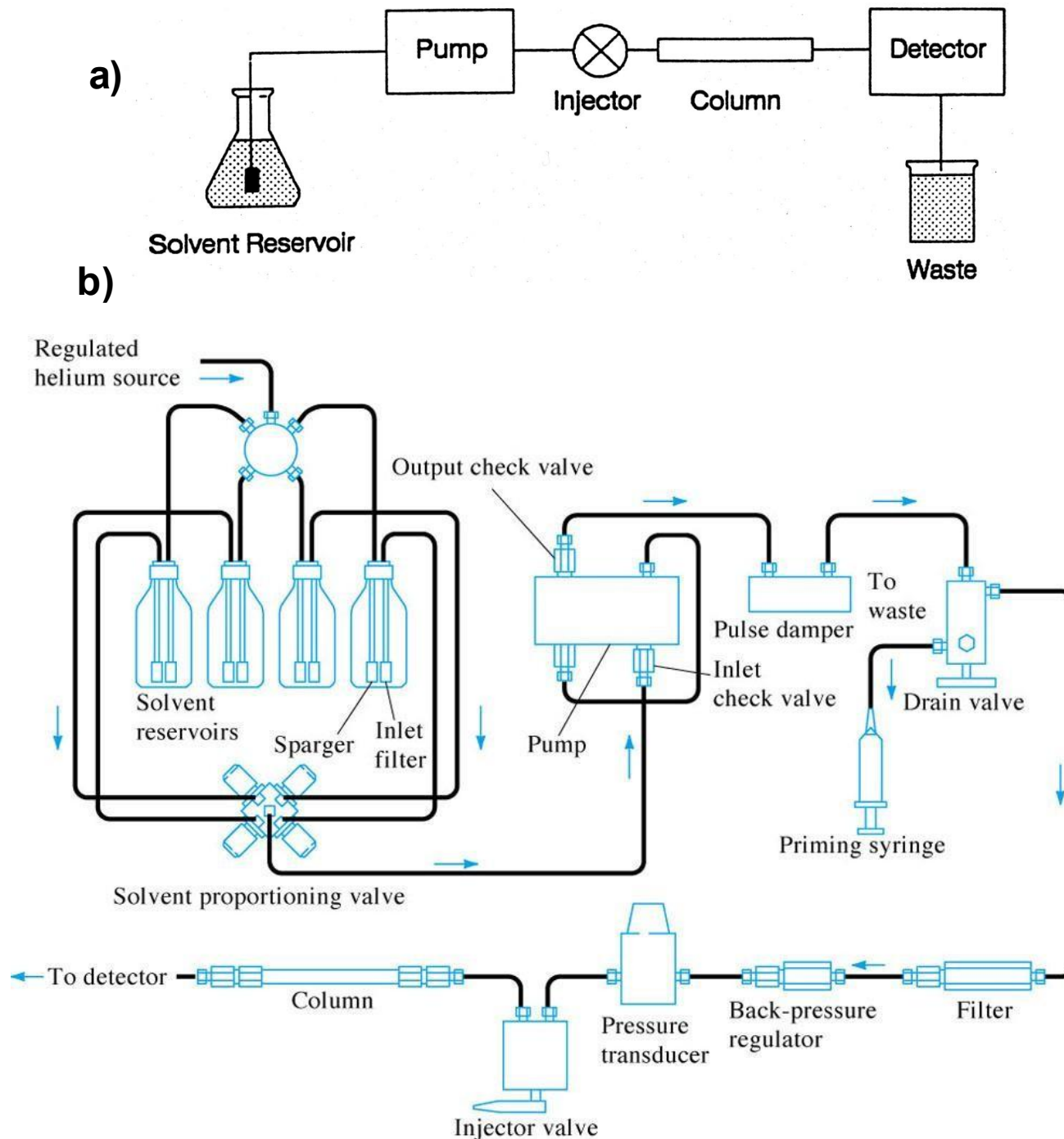
Column: 300mm x 7.8mm
Packing: BC-100
Mobile Phase: H₂O
Flowrate: 0.5mL/min
Temp: 88°C
Detector: RI

Un tipico sistema HPLC:

- Pressioni operative più elevate, necessità di erogazione in fase mobile, che richiedono pompe speciali e altri componenti del sistema

- Campione applicato utilizzando un sistema chiuso (cioè valvola di iniezione)

- Sistema a flusso



High-performance liquid chromatography

Vantaggi:

Tempo di analisi veloce

Facilità di automazione

buoni limiti di rilevamento

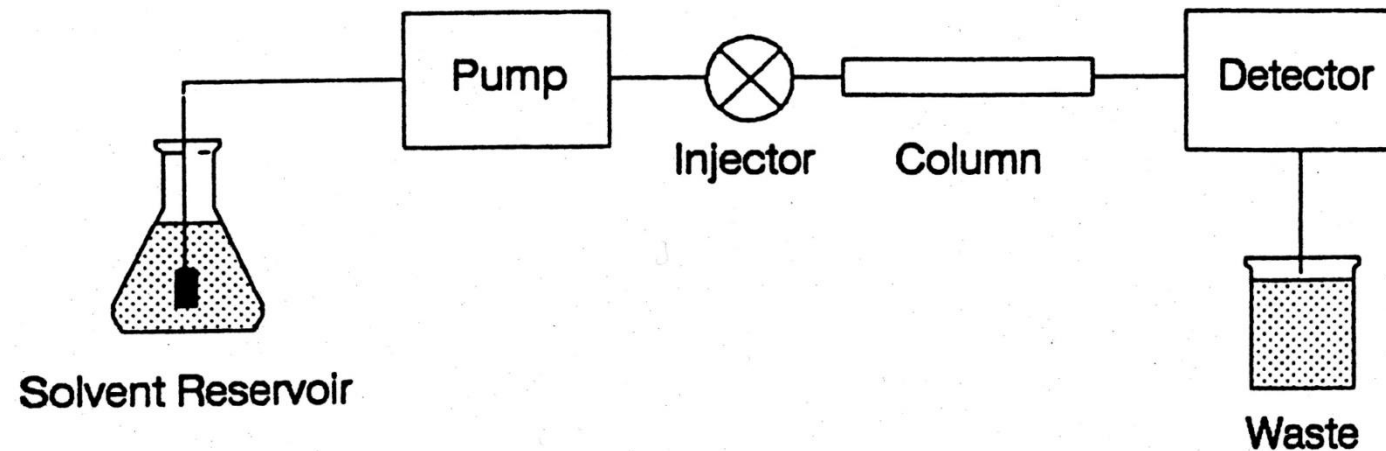
Scelta preferita per applicazioni analitiche

Popolare per il lavoro di purificazione

Svantaggi:

Spese maggiori

Capacità di campione inferiori



Fasi mobili

Le fasi mobili in HPLC sono usualmente una miscela di uno o più solventi con queste caratteristiche:

❖ Proprietà fisiche

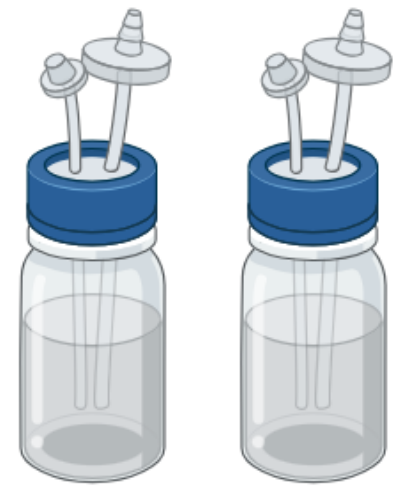
- Elevata purezza, basso costo, trasparenza UV, non corrosive, bassa viscosità, bassa tossicità, non infiammabili, solventi il campione

❖ Forza

- La forza è correlata alla polarità del solvente; l'acqua è un solvente forte in fase normale ma debole in fase inversa

❖ Selettività

- Dipende da interazioni tipo: momento dipolare, dipolo indotto, legame ad H, etc.
- I solventi dovrebbero essere filtrati e degasati prima dell'uso



A

B

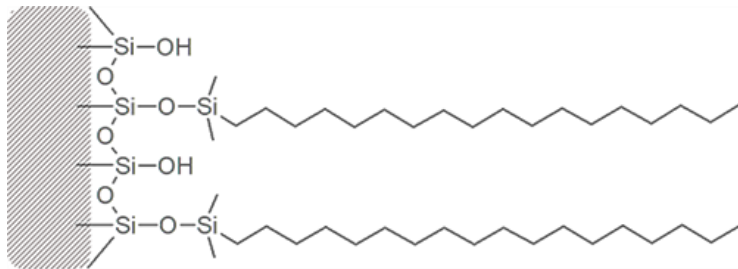
Colonna cromatografica

- È il mezzo in cui gli analiti presenti nel campione vengono separati, ed a seconda dei solventi, gli analiti possono raggiungere diverse velocità di eluizione, in base anche alla loro composizione.
- Il **materiale** più impiegato per la costruzione delle colonne per HPLC è l'acciaio inossidabile levigato.
- La **lunghezza** delle colonne è di solito compresa tra 10 e 30 cm, ma è possibile disporre di colonne più lunghe per particolari esigenze.
- Il **diametro interno** è compreso tra 2 e 4.6 mm e il **diametro delle particelle** del riempimento tra 3.5 e 10 μm .
- Esistono anche modelli di colonne, di recente progettazione, più corte e sottili che permettono tempi di analisi inferiori e minor consumo di solvente.
- **Pre-colonne**: colonne di protezione che funge da filtro (più corte delle colonne analitiche) in cui la fase mobile viene fatta passare prima di accedere alla colonna analitica. Aumentando così la vita media della colonna. Inoltre serve anche per saturare la fase mobile con la fase stazionaria, minimizzando quindi le perdite di fase stazionaria nella colonna analitica.

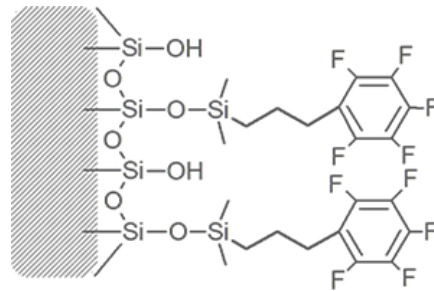
Esempi di colonne per HPLC

- Ciascun analita si ripartisce fra la fase mobile e la fase stazionaria.
- Il tempo di ritenzione degli analiti (t_R) sarà determinato dalla competizione fra le affinità di ciascun analita per la fase mobile (FM) e per la fase stazionaria (FS)

C18



Pentafluorophenyl (PFP)



C18-PFP

C.) Eluizione:

La ritenzione ed eluizione dei soluti in LC dipendono dalle interazioni dei soluti sia con la fase mobile che quella stazionaria.

Per descrivere quanto bene i soluti vengono trattenuti su una colonna con solventi diversi, si usano i termini fase mobile debole e fase mobile forte.

Fase mobile forte: un solvente che eluisce rapidamente soluti dalla colonna (cioè k' piccolo)

Questo avviene se la fase mobile è molto simile alla fase stazionaria nelle sue interazioni intermolecolari con i soluti

Il solvente polare sarebbe una fase forte e mobile per una colonna contenente una fase stazionaria polare

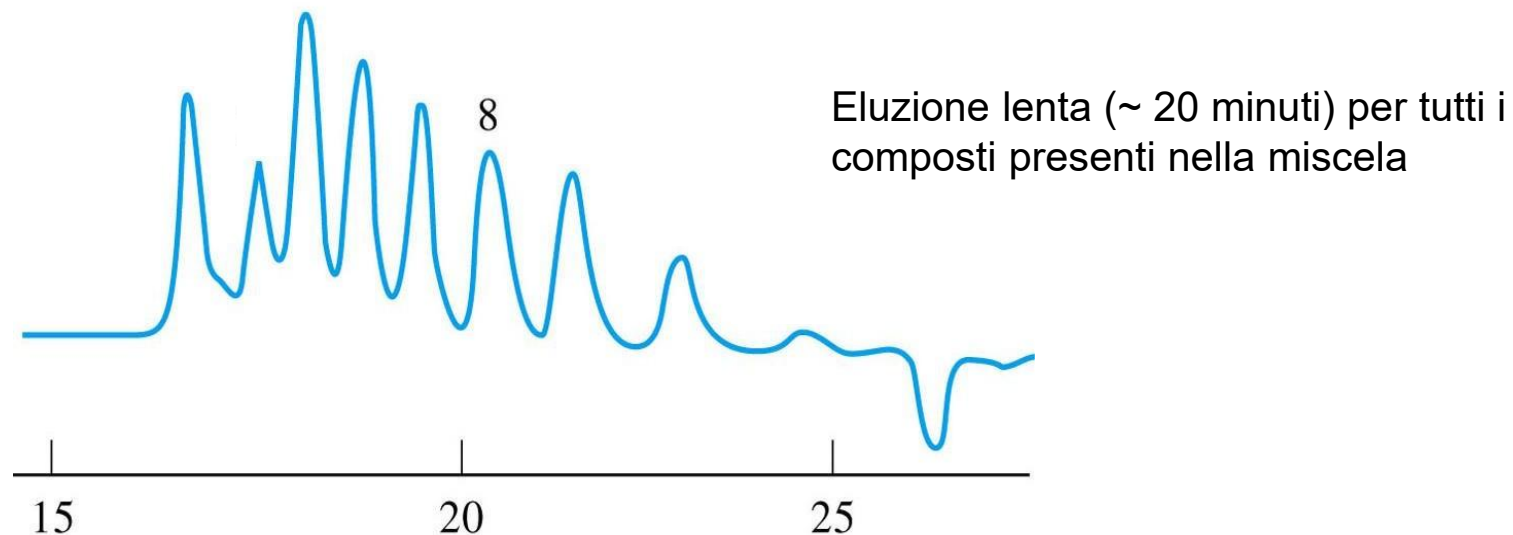


C.) Eluizione:

Fase mobile debole: un solvente che eluisce lentamente soluti dalla colonna (cioè alta ritenzione di soluti o k' di grandi dimensioni)

Questo avviene se la fase mobile è molto diversa dalla fase stazionaria nelle sue interazioni intermolecolari con i soluti

- un solvente non polare sarebbe una fase mobile debole per una colonna contenente una fase polare stazionaria

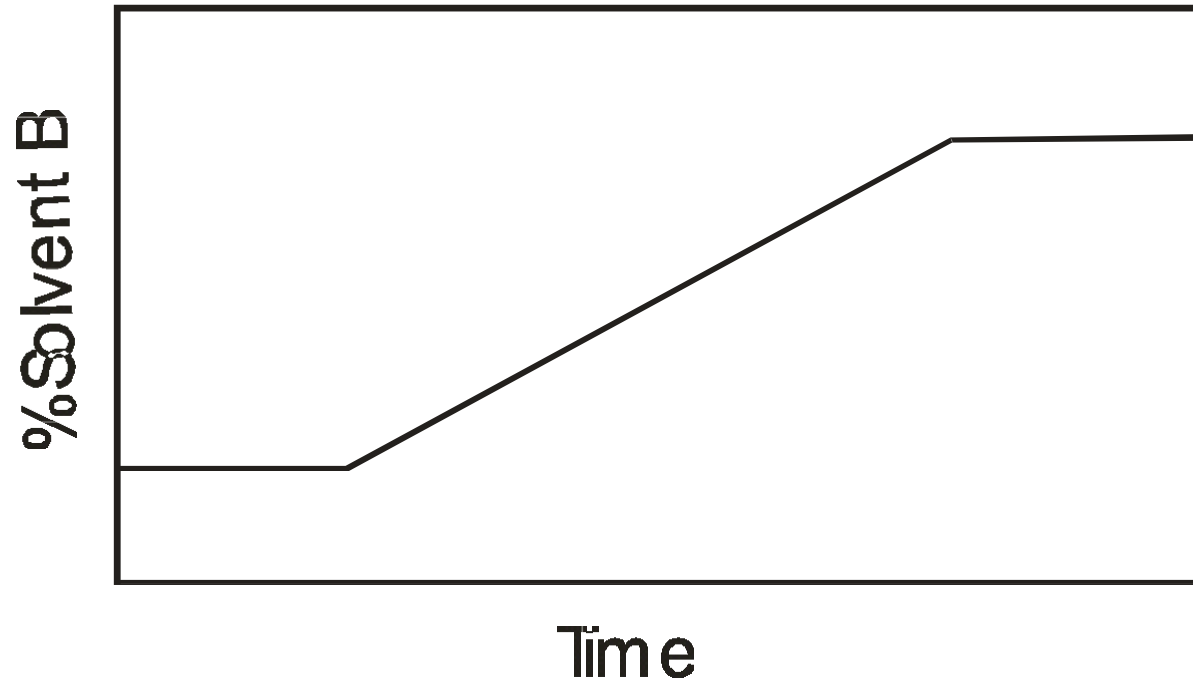


Note: Se un solvente sia una fase mobile debole o forte dipende dalla fase stazionaria utilizzata. L'esano è una fase mobile debole su una fase stazionaria polare, ma una fase mobile forte su una fase stazionaria non polare.

Simile al GC, i soluti possono essere eluiti da una colonna utilizzando condizioni di colonna costanti o eluzione gradiente

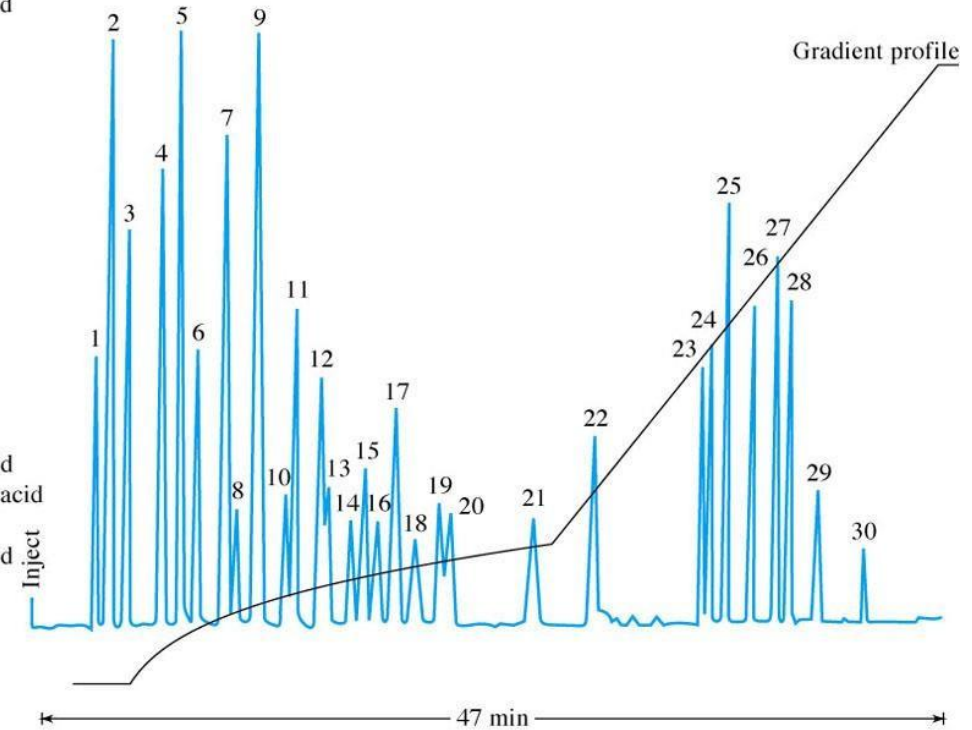
Gradient elution: composizione variabile della fase mobile con la programmazione del solvente temporale, passando da una fase mobile debole a una forte.

- ' solvente in fase mobile debole A
- ' solvente di fase mobile forte B
- ' Il cambiamento del solvente può essere graduale, lineare o non lineare



Eluzione a gradiente di una miscela di 30 aminoacidi

1. Phosphoserine
2. Aspartic acid
3. Glutamic acid
4. α -Amino adipic acid
5. Asparagine
6. Serine
7. Glutamine
8. Histidine
9. Glycine
10. Threonine
11. Citrulline
12. 1-Methylhistidine
13. 3-Methylhistidine
14. Arginine
15. β -Alanine
16. Alanine
17. Taurine
18. Anserine
19. β -Aminobutyric acid
20. β -Aminoisobutyric acid
21. Tyrosine
22. α -Aminobutyric acid
23. Methionine
24. Valine
25. Tryptophan
26. Phenylalanine
27. Isoleucine
28. Leucine
29. δ -Hydroxylysine
30. Lysine

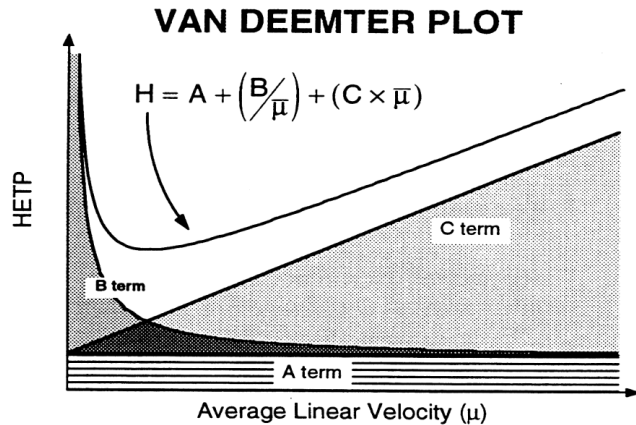


Nella scelta di una fase mobile per la LC, devono essere considerati diversi fattori: Il tipo di fase stazionaria utilizzata determina quale sarà una fase mobile forte o debole

- Solubilità dei soluti
- Viscosità della fase mobile
- Tipo di rivelatore utilizzato e segnale di fondo del solvente
- Purezza dei solventi
- Miscibilità dei solventi (per l'eluzione a gradiente)

Van Deemter equation: relates flow-rate or linear velocity to H:

$$H = A + B/\mu + C\mu \quad \text{where:}$$



μ = linear velocity (flow-rate x V_m/L)
 H = total plate height of the column

A = constant representing eddy diffusion & mobile phase mass transfer

B = constant representing longitudinal diffusion

C = constant representing stagnant mobile phase & stationary phase mass transfer

Plate height (H) may be used to relate these kinetic processes to band broadening to a parameter of the chromatographic system (e.g., flow rate). This relationship is used to predict the resulting effect of varying this parameter on the overall efficiency of the chromatographic system.

Number of theoretical plates (N) $(N) = 5.54 (t_R/W_h)^2$ *peak width (W_h)*

$$H = L/N$$

μ optimum

Optimum linear velocity (μ_{opt}) - where H has a minimum value and the point of maximum column efficiency:

μ_{opt} is easy to achieve for gas chromatography, but is usually too small for liquid chromatography requiring flow-rates higher than optimal to separate compounds

Teoria dell'allargamento della banda: equazione di Van Deemter

Percorsi multipli (eddy diffusion)

- Le molecole eluiscono in t diversi ed è indipendente da u

- Dipende da:

- Granulometria e dall'impaccamento della FS
- Diametro medio delle particelle del riempimento

Diffusione longitudinale:

- Indipendente dalle dimensioni delle particelle

- Dipende da:

- Formazione gradienti di concentrazione nella FM
- L'analita diffonde da zone a concentrazione maggiore (al centro) a zone a concentrazione minore

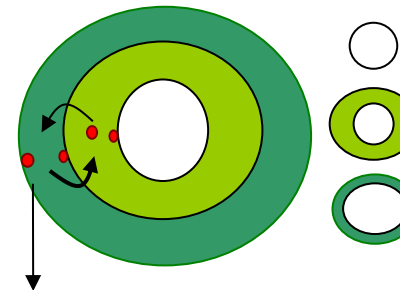
Direttamente proporzionale al coefficiente di diffusione più importante in GC che in LC

$$H = A + B/u + C_S u + C_M u$$

Coefficiente di **trasferimento di massa** nella fase stazionaria (cinetica di adsorbimento/desorbimento):
 Film di liquido su particella solida - direttamente proporzionale a (spessore)², inversamente proporzionale a D_s nel film
 Fase stazionaria solida - direttamente proporzionale al tempo adsorbimento/desorbimento

- Dipende da:

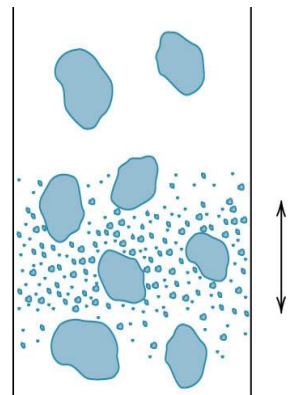
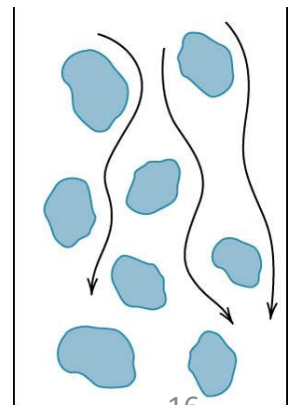
- Tempo di assorbimento e desorbimento dell'analita dalla FS



Coefficiente di **trasferimento di massa** nella fase mobile:
 inv. prop. a D_M , funzione di (diametro particelle)² (diametro colonna)² e u

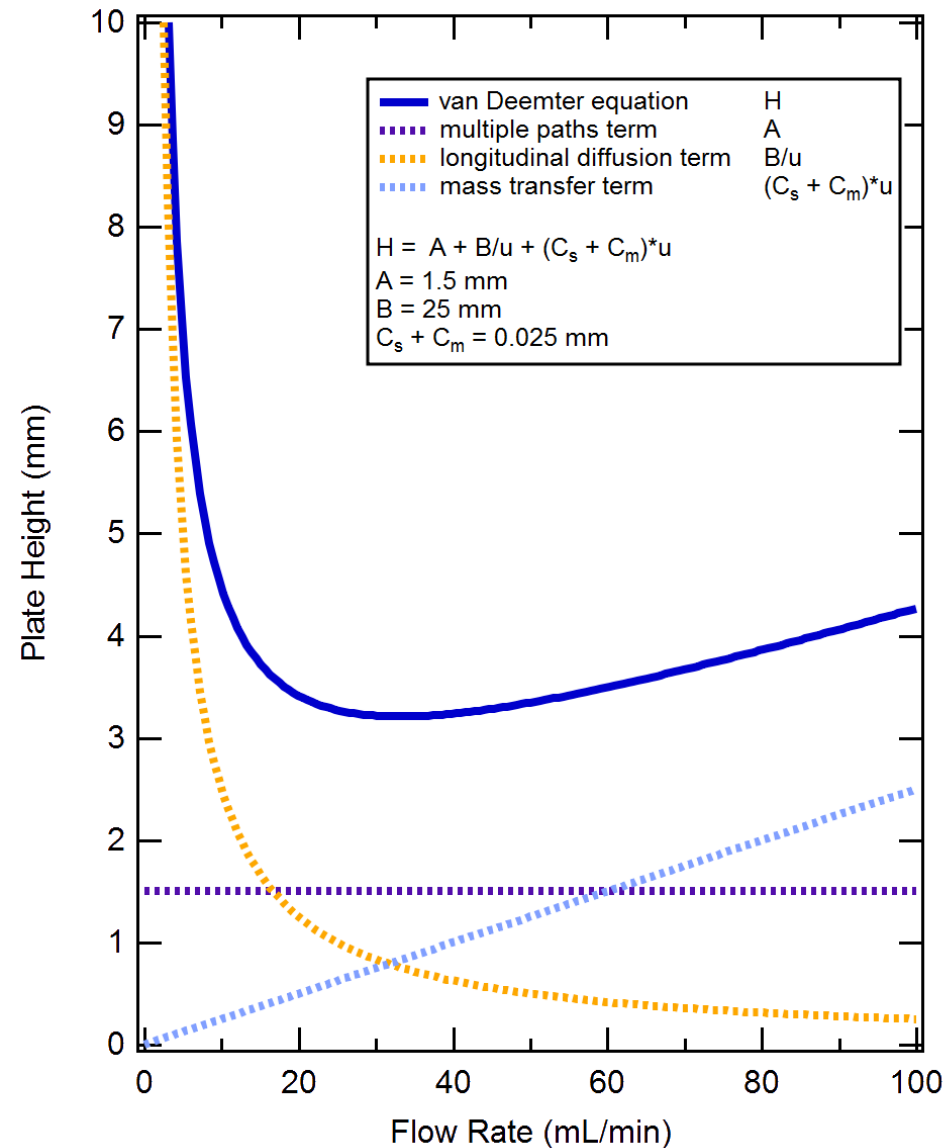
La diffusione turbolenta diminuisce a flussi bassi di fase mobile
 L'allargamento di banda può essere minimizzato dall'utilizzo di particelle piccole e regolari (p.es. sfere)

Diffusione turbolenta

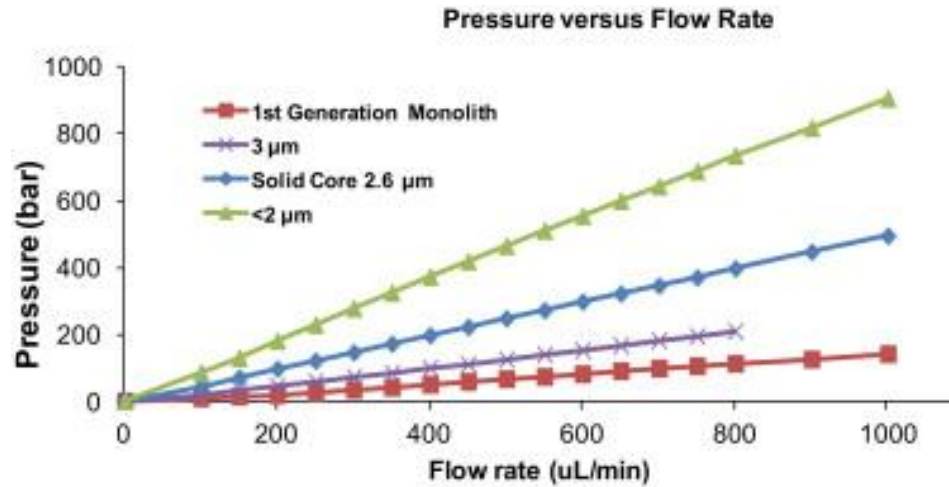


Molecular diffusion

Eddy diffusion



$$H = A + B/u + C_s u + C_M u$$



- Piccole d_p danno HETP più bassi
- Il flusso ottimale è maggiore con d_p più piccolo
- Colonne con particelle piccole hanno minor perdita di efficienza a flussi alti

Quando il flusso dell'eluente è forzato in colonna, esso genera una contropressione.

La relazione tra questa contropressione ΔP e le altre variabili cromatografiche è data da:

$$\Delta P = \frac{\eta L v}{\Theta d_p^2}$$

Dove: η = viscosità della fase mobile
 v = velocità lineare della fase mobile
 L = lunghezza della colonna
 d_p = diametro medio delle particelle
 Θ = costante

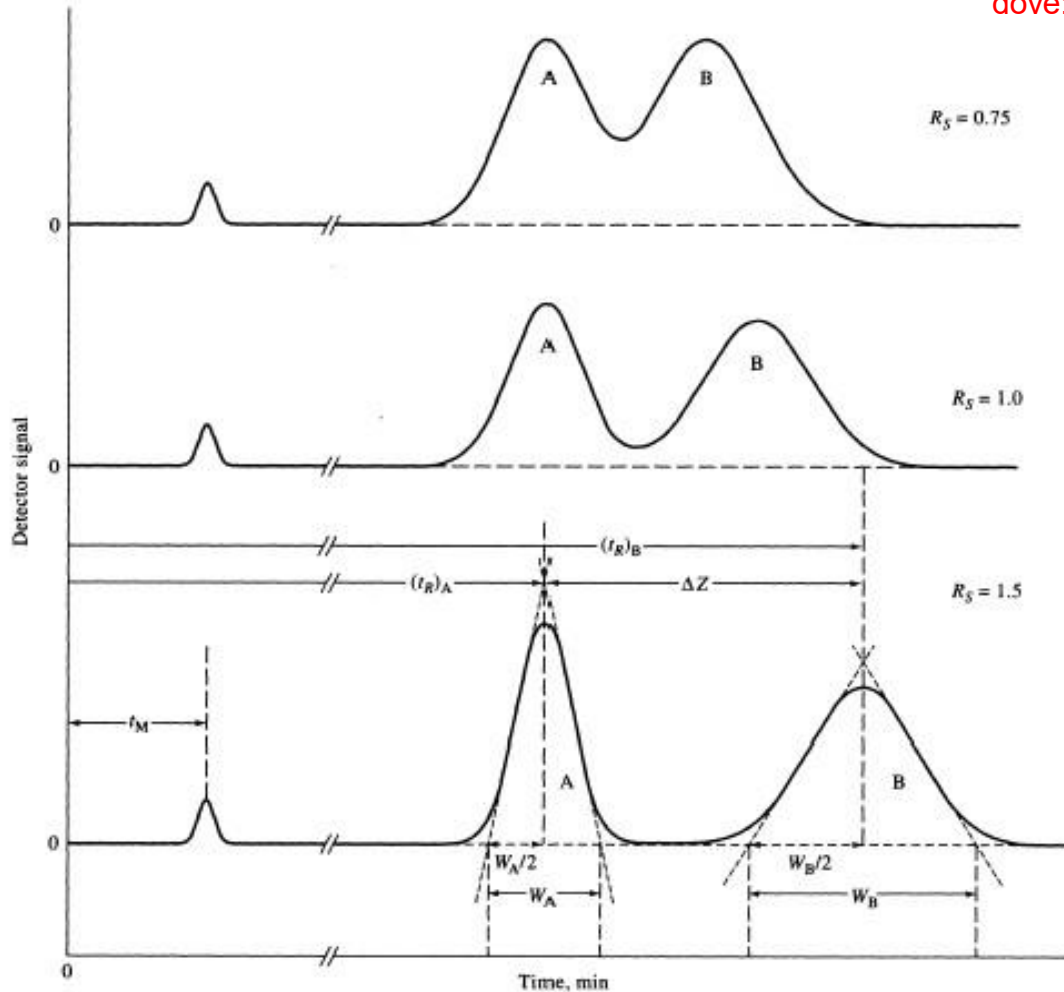
Risoluzione (RS)– La risoluzione tra due picchi è una seconda misura di quanto bene siano separati due picchi:

$$R_S = \frac{t_{r2} - t_{r1}}{(W_{b2} + W_{b1})/2}$$

dove:

t_{r1} , W_{b1} = Tempo di ritenzione e larghezza di base per il primo picco eluente

t_{r2} , W_{b2} = Tempo di ritenzione e larghezza di base per il secondo picco eluente



R_S oltre 1,5 rappresenta la risoluzione di base, ovvero la completa separazione di due soluti vicini al caso ideale.

R_S oltre 1,0 sono considerate sufficienti per la maggior parte delle separazioni.

D.) Tipi di cromatografia liquida:

Le tecniche in LC sono classificate secondo il metodo di separazione dei soluti

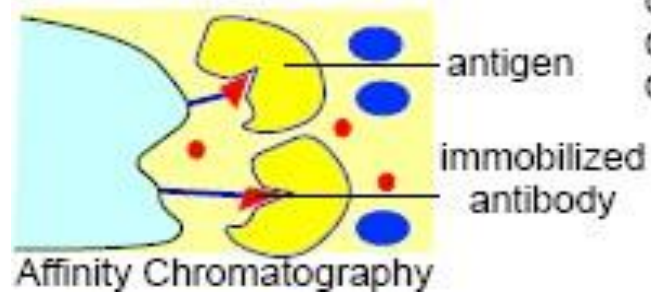
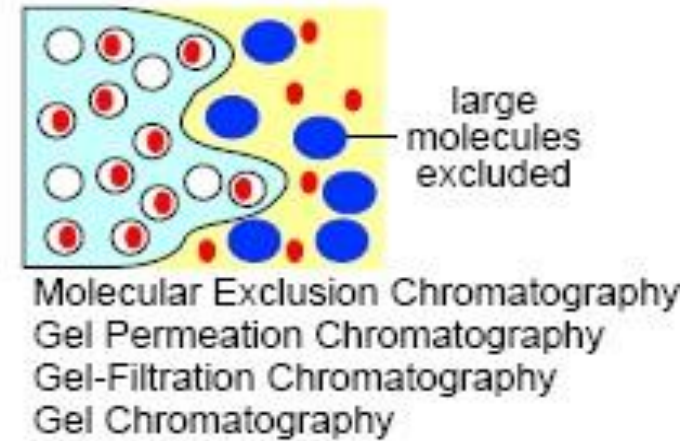
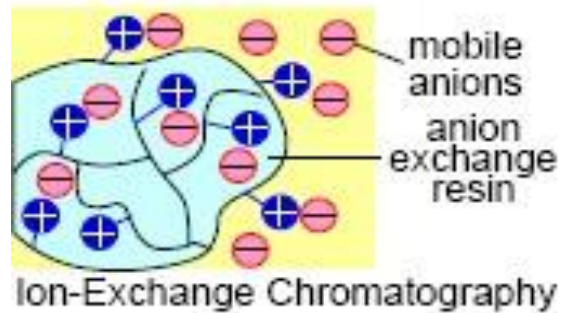
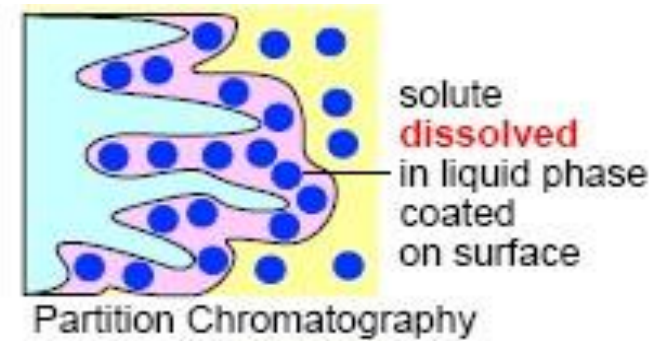
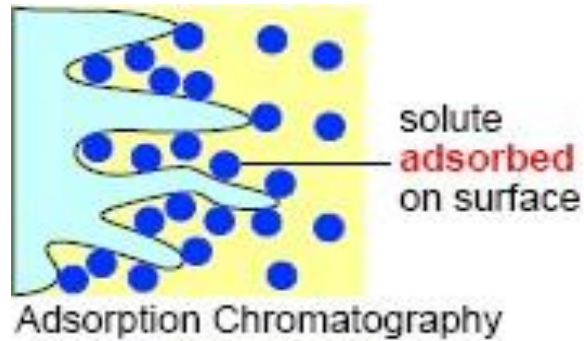
' Cromatografia ad adsorbimento

Cromatografia a ripartizione

'Cromatografia a scambio ionico

' Cromatografia di affinità

' Cromatografia a esclusione di dimensioni



Cromatogramma

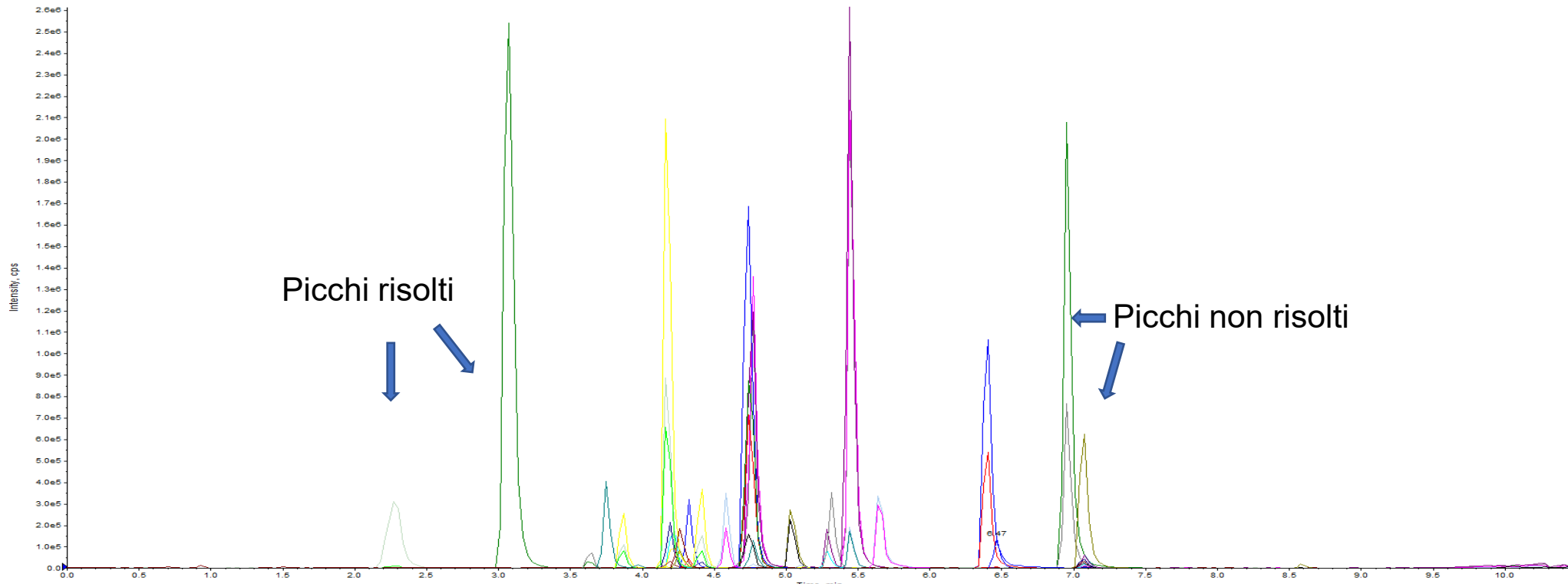
Un cromatogramma è una rappresentazione della separazione che ha avuto luogo a livello chimico

[cromatografico] nel sistema HPLC. Viene tracciata una serie di picchi rispetto a una linea di base su un asse del

tempo. **Come si ottiene il cromatogramma? È necessario un rivelatore (o detector)!**

Ciascun picco rappresenta la risposta del **rivelatore** per ogni composto diverso. Il cromatogramma viene tracciato

dalla workstation del computer



E.) LC Detectors:

Common types of LC Detectors

, Refractive Index Detector, Conductivity Detector

UV/Vis Absorbance Detector, Electrochemical Detector

, Fluorescence Detector

As in GC, the choice of detector will depend on the analyte and how the LC method is being used (*i.e.*, analytical or preparative scale)

Detector	Selectivity	Sensitivity	Notes
Refractive Index	Poor	Poor	Any component that differs in refractive index from the eluate can be detected, despite its low sensitivity. Cannot be used to perform gradient analysis.
UV/Vis	Moderate	Good	A wide variety of substances can be detected that absorb light from 190 to 900 nm. Sensitivity depends strongly on the component.
Fluorescence	Good	Excellent	Components emitting fluorescence can be detected selectively with high sensitivity. This is often used for pre-column and post-column derivatization.
Conductivity	Moderate	Good	Ionized components are detected. This detector is used mainly for ion chromatography.
Electrochemical	Good	Excellent	Electric currents are detected that are generated by electric oxidation-reduction reactions. Electrically active components are detected with high sensitivity.
Mass Spectrometry (MS)	Excellent	Excellent	Detects components based on their mass-to-charge ratio (m/z). It provides structural information (molecular weight and fragments) and high specificity. Requires an interface (like ESI or APCI) to convert liquid eluate into gas-phase ions.

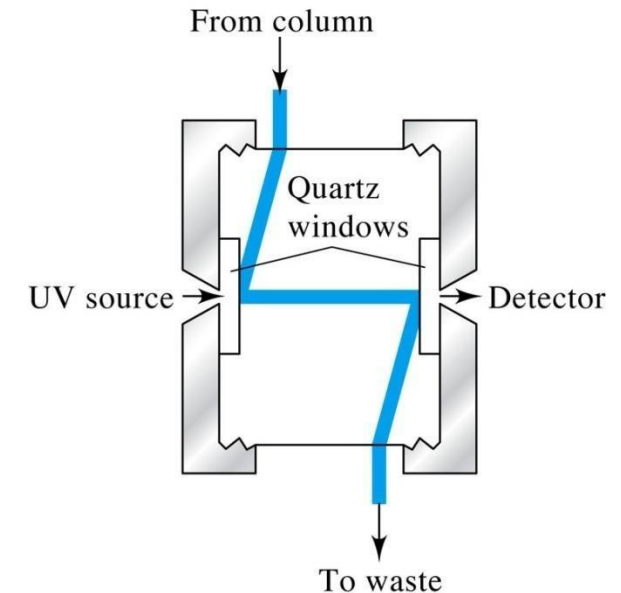
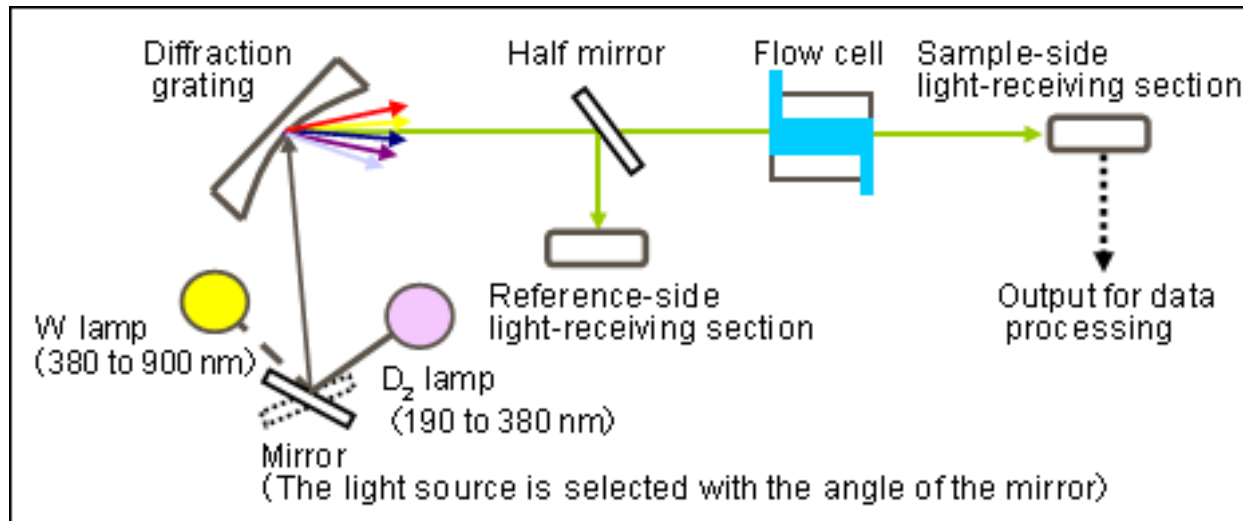
2.) UV/Vis Absorbance Detector

Measures the ability of solutes to absorb light at a particular wavelength(s) in the ultraviolet (UV) or visible (Vis) wavelength range.

, most common type of LC detector

Three Common types of UV/Vis Absorbance Detectors

- , Fixed wavelength detectors
- , Variable wavelength detectors
- , Photodiode array detectors



2.) UV/Vis Absorbance Detector

Fixed Wavelength Detector absorbance of only one given wavelength is monitored by the system at all times (usually 254 nm)

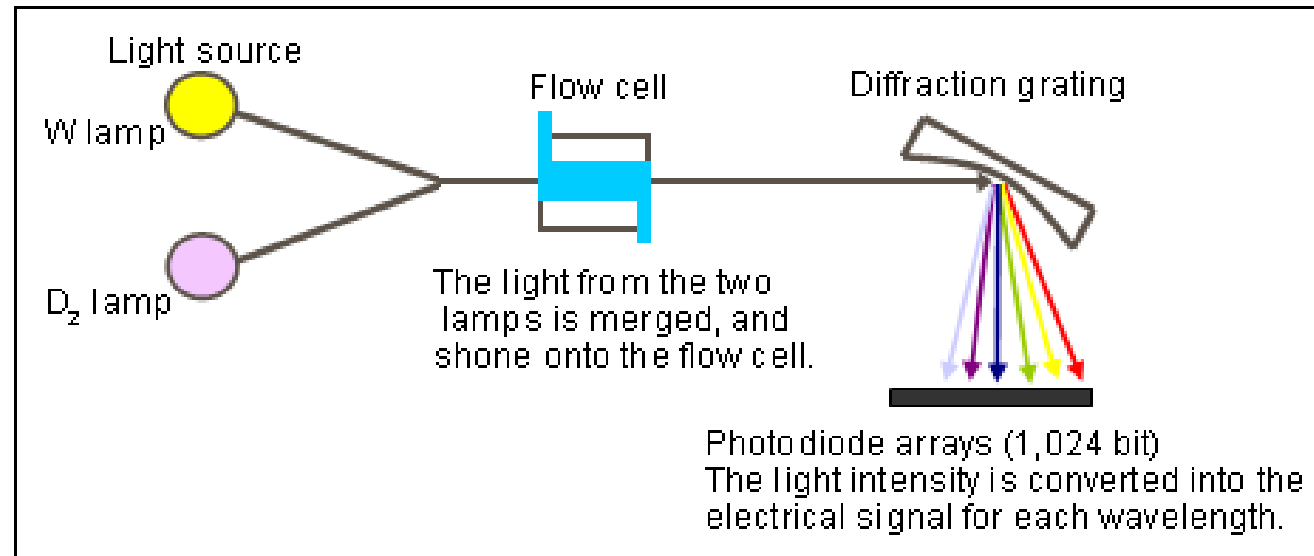
- , simplest and cheapest of the UV/Vis detectors
- , limited in flexibility
- , limited in types of compounds that can be monitored

Variable Wavelength Detector a single wavelength is monitored at any given time, but any wavelength in a wide spectral range can be selected

- , wavelengths vary from 190-900 nm.
- , more expensive, requires more advanced optics
- , more versatile, used for a wider range of compounds

Photo Diode Array Detector operates by *simultaneously* monitoring absorbance of solutes at several different wavelengths.

- , uses a series or an array of several detector cells within the instrument, with each responding to changes in absorbance at different wavelengths.
- , entire spectrum of a compound can be taken in a minimum amount of time
- , useful in detecting the presence of poorly resolved peaks or peak contaminants

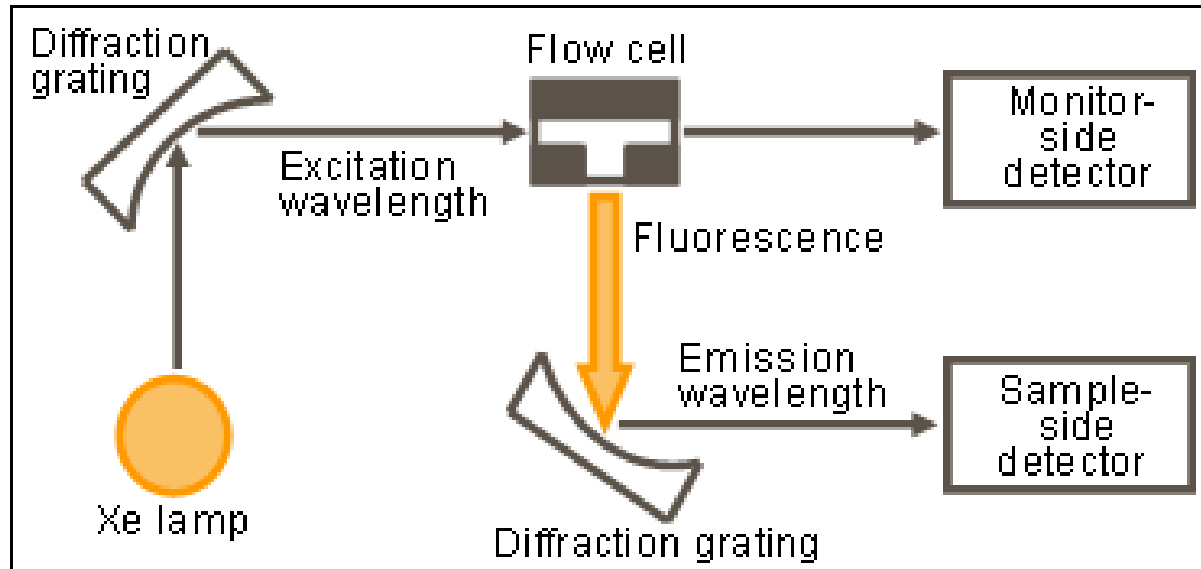


Applications:

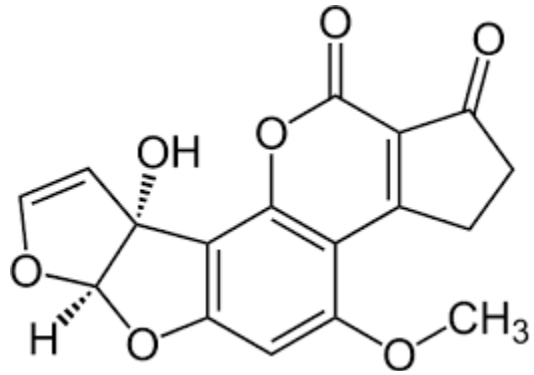
- UV/Vis absorbance detectors can be used to detect any compound that absorbs at the wavelength being monitored
- Common wavelengths:
 - , 254 nm for unsaturated organic compounds
 - , 260 nm for nucleic acids
 - , 280 or 215 nm for proteins or peptides
- Absorbance detectors can be used with gradient elution
 - , wavelength being monitored is above the cutoff range of the solvents being used in the mobile phase
- limits of detection for fixed and variable UV/Vis absorbance detectors are $\sim 10^{-8}$ M
- limits of detection for photodiode array detectors are $\sim 10^{-7}$ M

3.) Fluorescence Detector

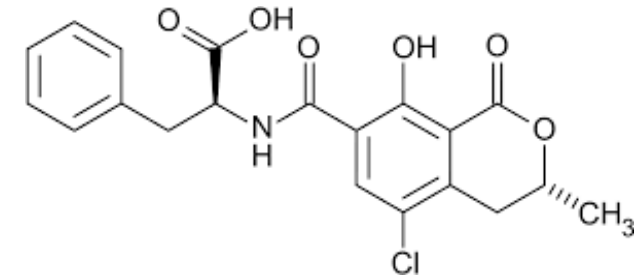
A selective LC detector that measures the ability of eluting solutes to fluoresce at a given set of excitation and emission wavelengths



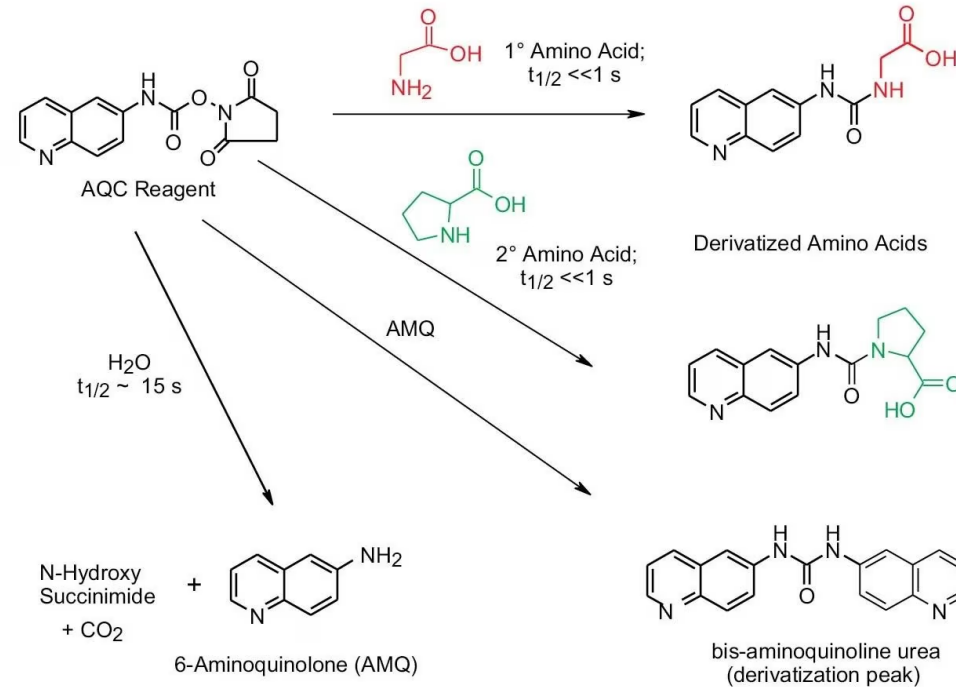
Mycotoxins (aflatoxins, ochratoxin A etc...), derivatised compounds (e.g. aminoacids)



Aflatoxin M1



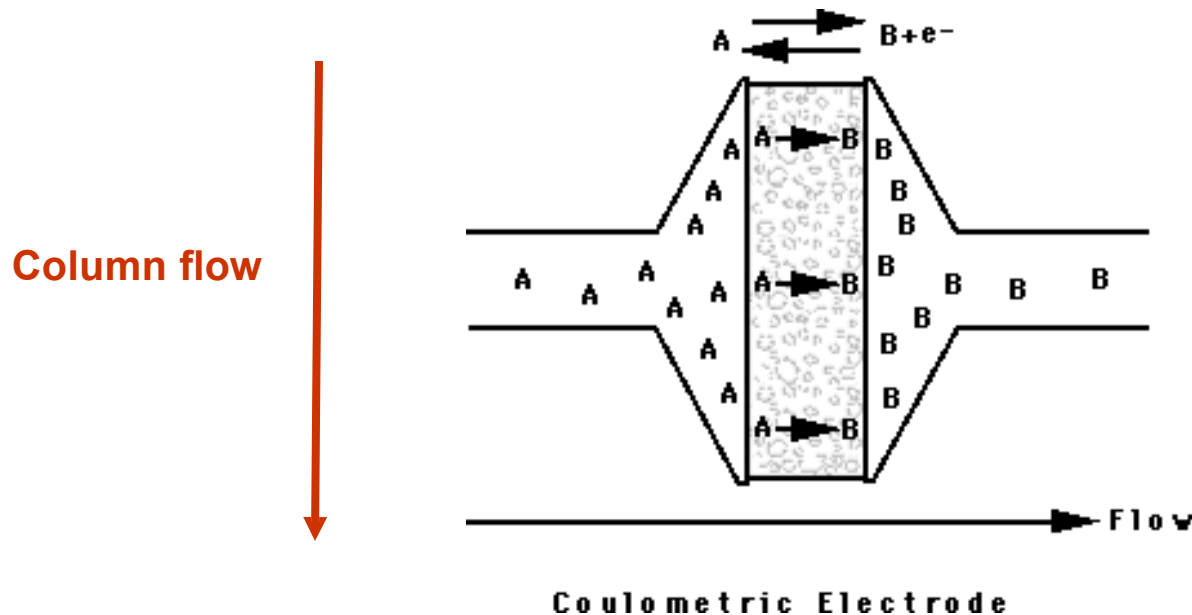
Ochratoxin A



5.) Electrochemical Detector

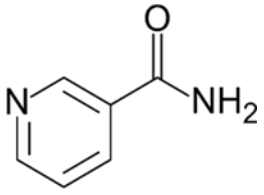
Used to monitor any compound in the mobile phase that can undergo an oxidation or reduction

- , electrochemical detection in liquid chromatography is sometimes referred to as LC/EC
- , generally includes two or more electrodes which monitor the current that is produced by the oxidation or reduction of eluting compounds at a fixed potential
- , generally electrical output is an electron flow generated by a reaction that takes place at the surface of the electrodes.



Application in food; sugars, any compound that can be reduced/oxidised (not polyphenols!)

Vitamin B3 in Chicken



- Niacin, also known as vitamin B3, is one of the essential human nutrients. Vitamin B3 comprises nicotinic acid, nicotinamide, and numerous enzymatic forms.
- Nicotinamide is a precursor of nicotinamide adenine dinucleotide (NAD) and nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADP), two redox coenzymes primarily involved in the production of energy from dietary proteins, carbohydrates, and fats. They play a key role in several biochemical paths like Krebs' cycle or glycolysis.
- In meat the niacin content is mainly present in the form of nicotinamide: while in living tissues nicotinamide is a component of the coenzymes NAD and NADP, in meat it is found also in the free form because of postmortem hydrolysis of NAD.
- Chicken meat is a really good source of vitamin B3. In particular white meat (breast e.g.) contains a higher amount of niacinamide with the respect of dark meat cuts (thigh and drumstick e.g.).

Extraction procedure

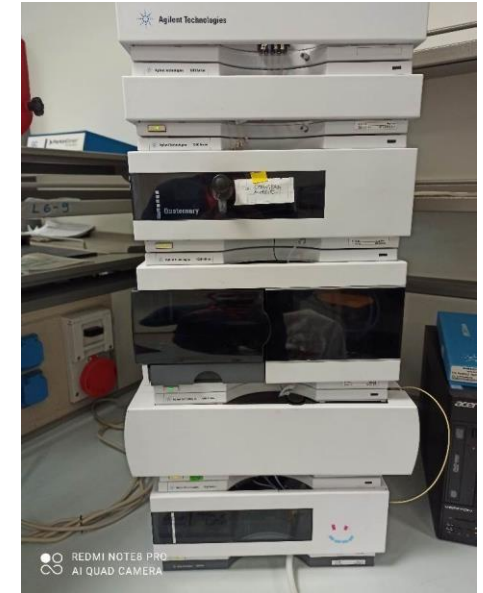
- 0.5 g of samples dissolved in 4.5 mL of HCl 0.1 M
- Homogenization with ultra turrax (1 min)
- Heat treatment (100 °C, 1 h)
- pH correction to 4-4.5, using solution of Sodium Acetate 2.5 M
- Addition of 500 uL of taka-diastrase (hydrolysis of phosphorylated forms) 10 % (w/v) solution
- Incubation at 48 °C, 3 h
- Centrifugation at 10000 g, 10 min, 4°C
- Recovery of the supernatant, taken up to volume to 5 mL
- 500 uL of sample in HPLC vial



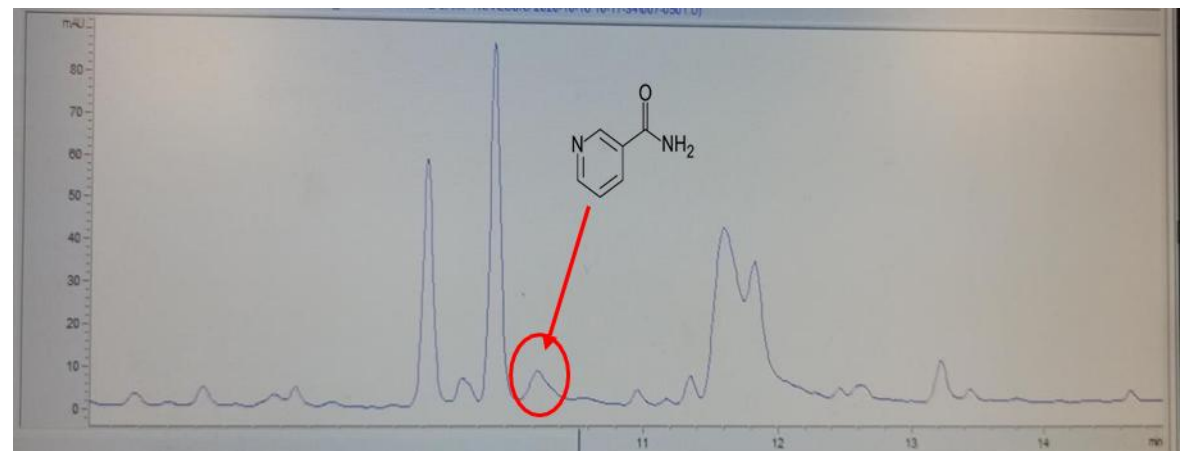
*Ultra turrax
homogenizer*

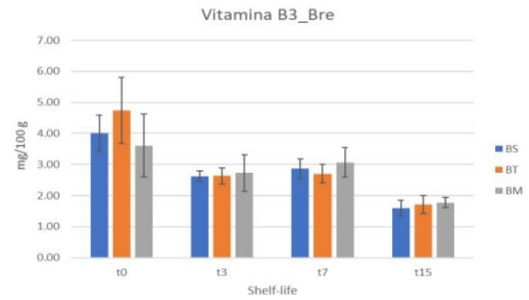
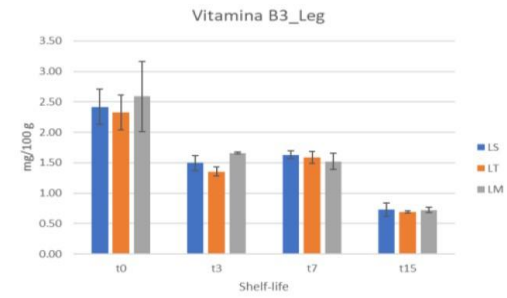
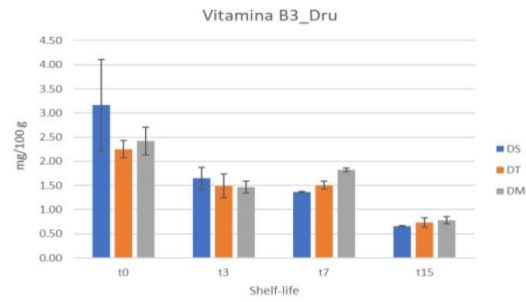
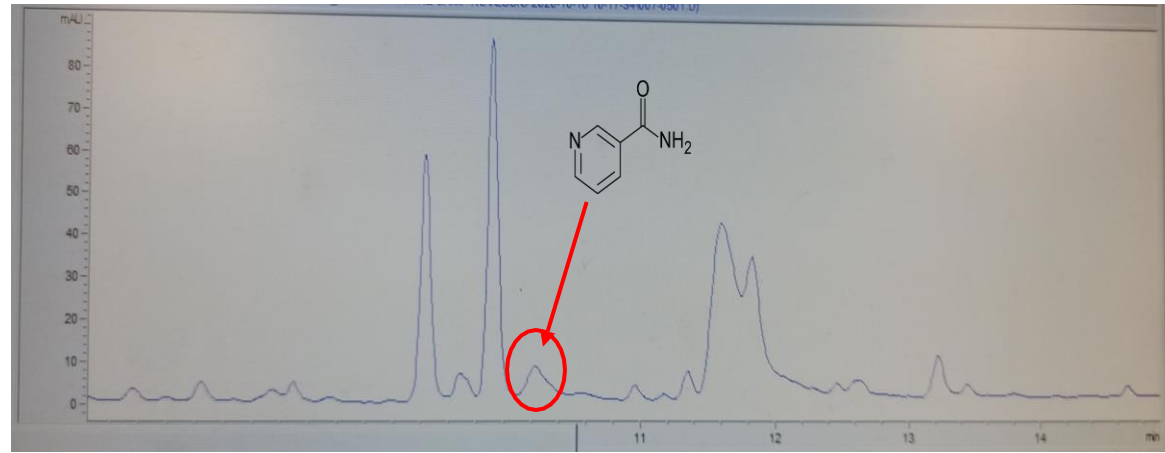
Chromatographic method

- Instrument: HPLC Perkin Elmer series 200 equipped with autosampler, pump and Uv-vis detector.
- Column: C18 Luna Omega Polar 3 μm 4.6x150.
- Mobile Phases
 - A: ammonium acetate 0.01 M; methanol 0.01 %
 - B: methanol
- Gradient: from 100 % to 30 % in 30 min
- Wavelength: 260 nm

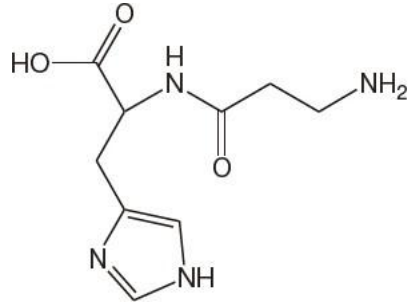


HPLC system

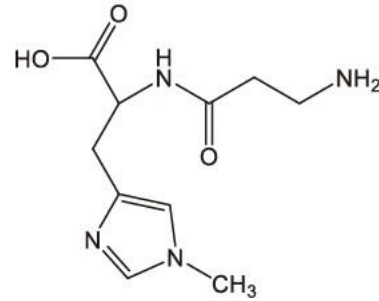




ANSERINE



CARNOSINE



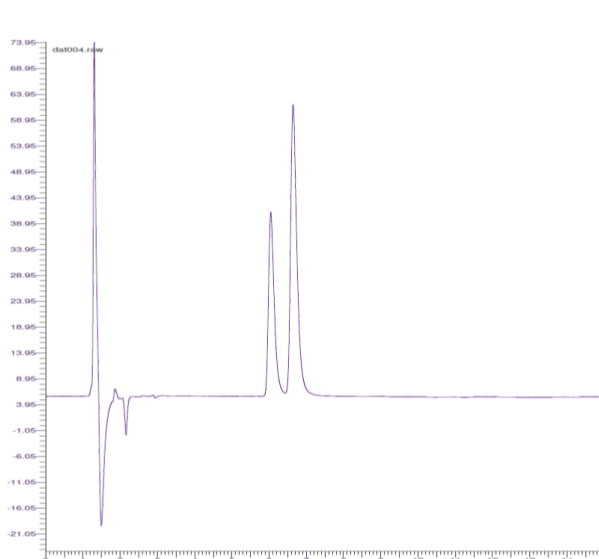
DIPEPTIDES PRESENT IN POULTRY MEAT IMPORTANT FOR

- ANTIOXIDANT ACTIVITY
- ANTI-AGING ACTIVITY
- BUFFER CAPACITY
- ANTI TUMORAL AND ANTIINFLAMMATORY ACTIVITY

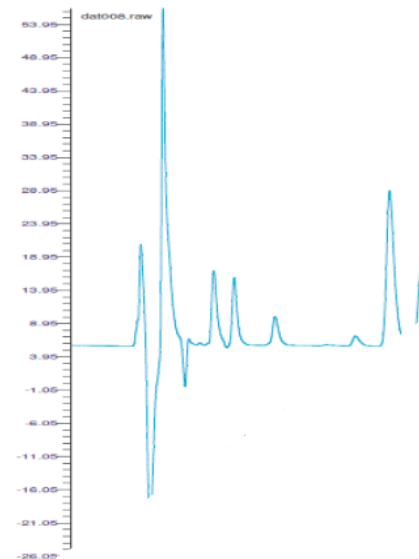
Sample	Anserine mg/100g	Carnosine mg/100g	C/A	Reference
Breast extract		71.8		Intarapichet and Maikhunthod 2005
Thigh extract		10.4		
Chicken- turkey burger 25-75	287.9	66.6	0.23	Gil-Agusti et al., 2008
20 wk breast	336.7	71.2	0.21	
20 wk drumstick	116.5	39.5	0.34	Kim et al., 2012
20 wk wing	259.4	38.4	0.15	
90 wk breast	291.5	55.3	0.19	Peiretti et al., 2011
90 wk drumstick	69.3	14.2	0.20	
90 wk wing	226.4	35.9	0.16	Mori et al., 2015
Breast	1170	700	0.60	
Breast	1670	920	0.55	
Breast	1460	760	0.52	
Breast	710	255	0.36	
Leg	220	106	0.48	
Fillet	608	157	0.26	
Breast (Conv)	92.6	63.16	0.68	Kim et al., 2020
Breast (Welfare)	117.54	65.30	0.56	

After elimination of fat and connective tissue $0.5 \pm 0,05$ g treated with trichloroacetic acid (0.07%) and homogenised. After centrifugation at 4000 rpm (15 min) 2 mL of supernatant then and centrifuged again (10000 rpm 15 min). Dilution 1:20 mobile phase 20 uL injected in HPLC.

Column Agilent Zorbax Bonus RP $3.5\mu\text{m}$, 4.6×150 mm (densely packed diisopropyl-C14 groups). Mobile phase is 10 mM phosphate buffer in 5% acetonitrile and 5 mM octanesulfonic acid (octanesulfonate is an ion pairing reagent that is used in HPLC, notably in the analysis of small organic compounds. The anionic sulfonate counterion permits the separation and resolution of positively charged analytes). 15 min isocratic at 1 mL/min flow rate, UV detector at 224 nm.



Standards



Sample

Chemical characterization of Polyphenols in different extracts of :

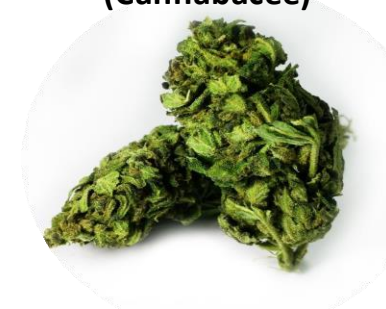
***Coriandrum sativum* L.
(Apiaceae)**



***Thymus vulgaris* L.
(Lamiaceae)**



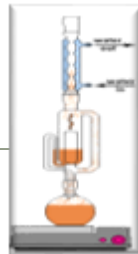
***Cannabis sativa* L.
(Cannabaceae)**



Extraction Techniques



**(UAE)
Ultrasound Assisted Extraction**



Soxhlet



**(RSLDE)
Rapid Solid-Liquid Dynamic Extraction
(Naviglio extractor)**



Maceration

Extraction parameters

Solvent: Ethanol

Extraction Time:

- 30 days for Maceration
- 20 minutes for Ultrasounds
- 2 hours and 6 hours for RSLDE and Soxhlet

The weight of the matrix subjected to extraction was calculated maintaining the same ratio for the different extraction techniques

HPLC-UV Analysis parameters

HPLC Perkin-Elmer series 200

Phase A (Inorganic): 1% acetic acid in water

Phase B (Organic): acetonitrile

Column: Kinetex C18 (dimensions: 250 x 4.6 mm, particle size: 5 µm, pore size: 110 Å)

UV-Vis detector Perkin Elmer LC 240 set at 280 nm

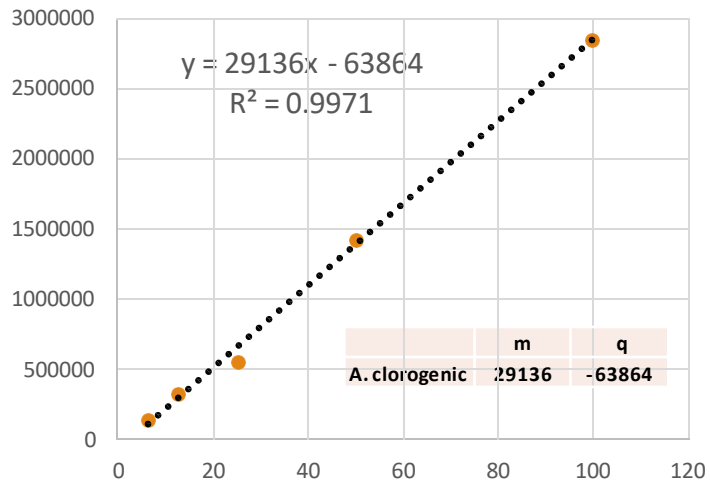
Polyphenols analyzed

The polyphenols chosen for the analysis are: gallic acid, p-OH benzoic acid, apigenin, chlorogenic acid, vanillic acid, caffeic acid, syringic acid, ferulic acid, rosmarinic at start. The working standard mixtures were prepared by appropriate dilution of the standards in methanol at concentration of 100 ppm

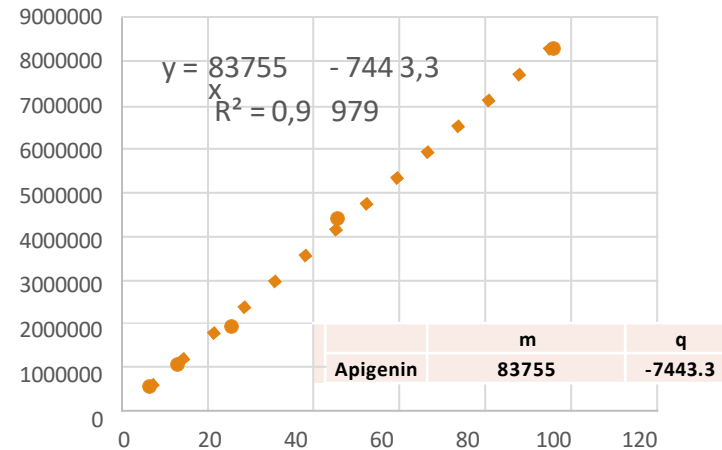
Quantitative Analysis

The quantification for each analyte was performed by means of a calibration line, starting from the mix of polyphenols at 100 ppm, a 6-point line (1-6.25-12.5-25-50-100 ppm)

A. chlorogenic



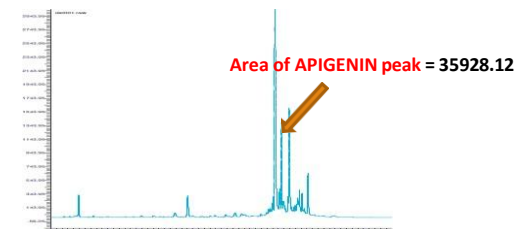
Apigenin



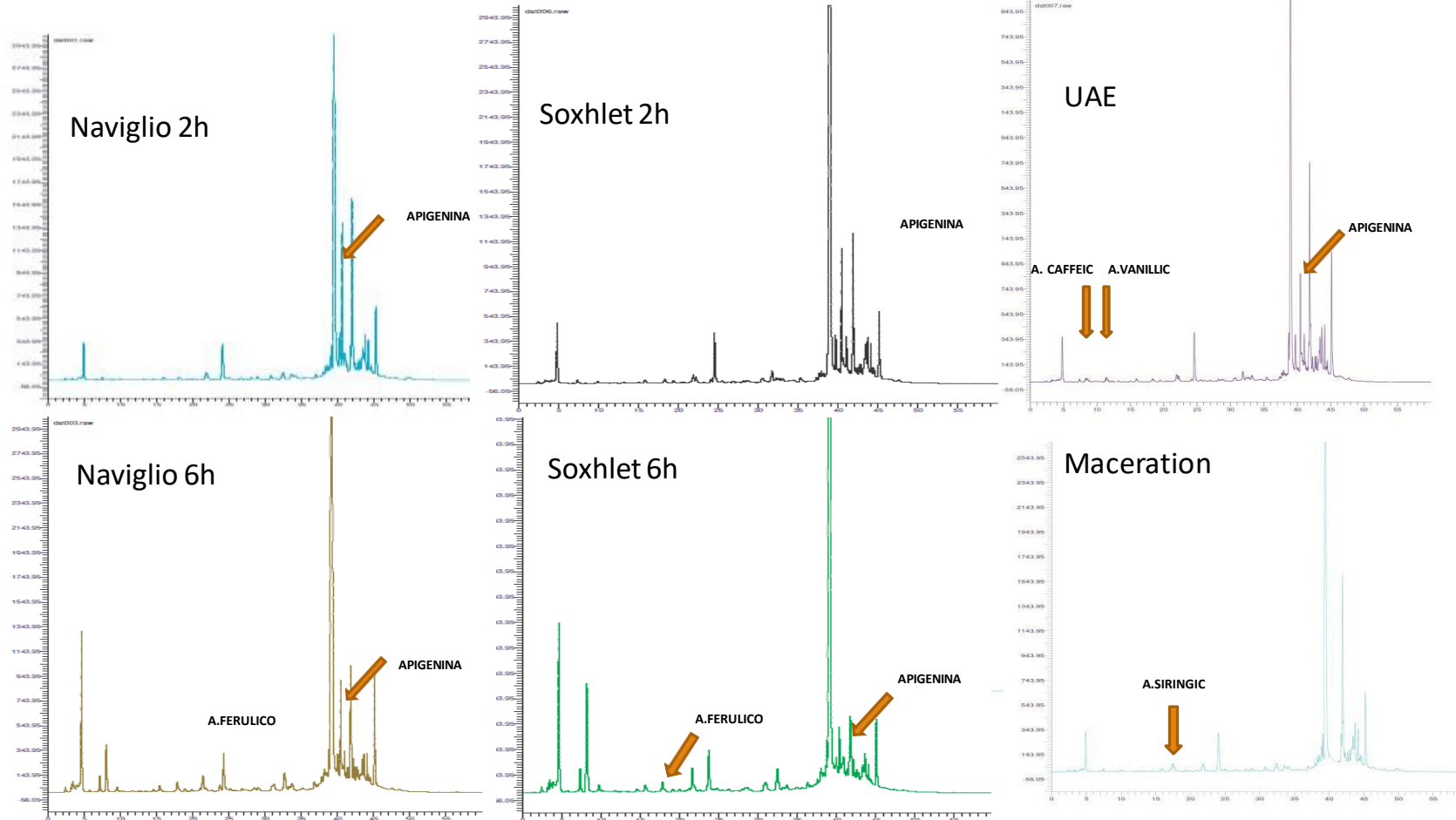
The concentration of the analyte present in the sample is calculated through the calibration line:

$$\text{Concentration} = \frac{\text{Area of my peak} - q}{m}$$

The result are expressed in ppm .



Chromatograms of Thymus extracts:



UHPLC – Ultra High Performance Liquid Chromatography

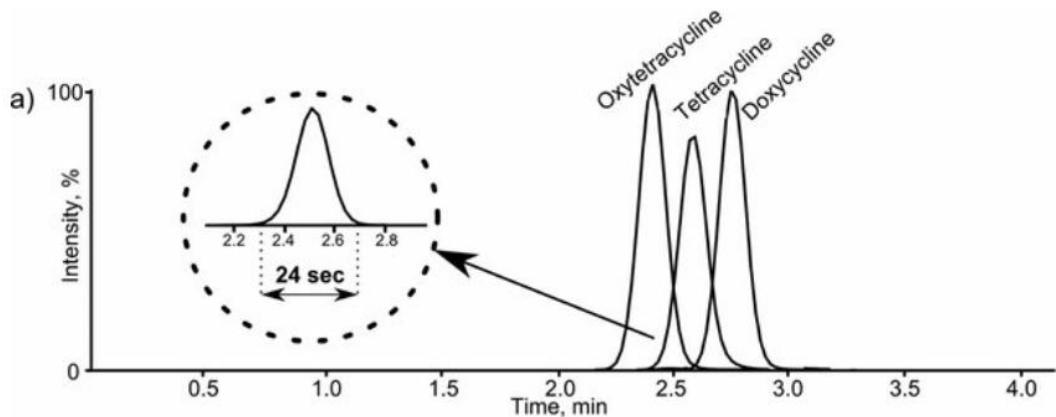
La **cromatografia liquida a ultra alta prestazione** (UHPLC, Ultra High Performance Liquid Chromatography) è una recente implementazione che sfrutta l'avanzamento tecnologico nella costruzione dei componenti strumentali tipici della classica HPLC, come la possibilità di produrre colonne contenenti una fase stazionaria con diametro delle particelle molto minore oltre a pompe e parti meccaniche in grado di operare a pressioni di esercizio ancora più elevate.

La tecnica UHPLC permette di ottenere una separazione delle sostanze eluite caratterizzata da una maggiore efficienza e in tempi notevolmente ridotti, utilizzando come fase stazionaria particelle dal diametro solitamente **<3 µm** e pressioni che possono superare i **1000 bar (o 14000 psi)**. Altra caratteristica di non secondaria importanza è il ridotto volume di campione iniettato (la sensibilità è nettamente maggiore) e il risparmio di eluente che si ottiene con questa tecnica. L'unico difetto è che la vita delle colonne si abbassa nettamente.



HPLC

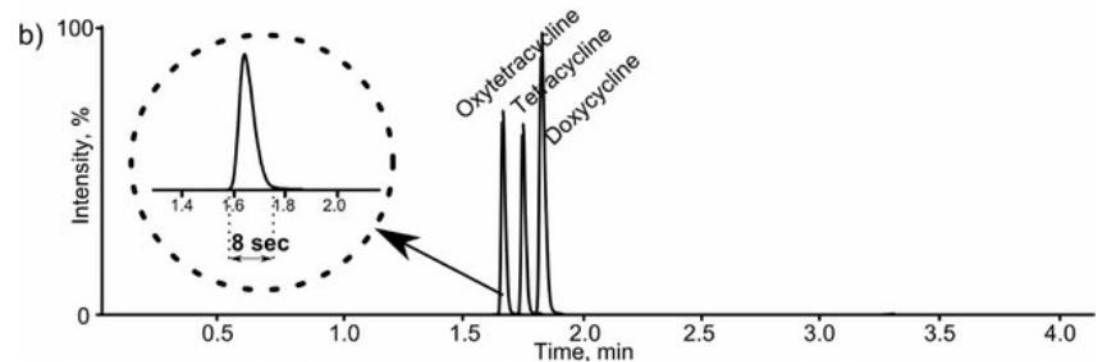
- Impiego di colonne con fase stazionaria con diametro delle particelle tra i 3 e i 10 μm
- Massima pressione di esercizio 300-400 bar
- Contropressione: pressioni massime di 400-600 bar (HPLC)
- Maggiore volume di campione iniettato (sensibilità minore) e aumento eluente necessario.
- Portata di flusso: 0.01- 0.4 mL/min
- Volume di iniezione: 5 μL
- Minor efficienza
- Tempo di analisi maggiore



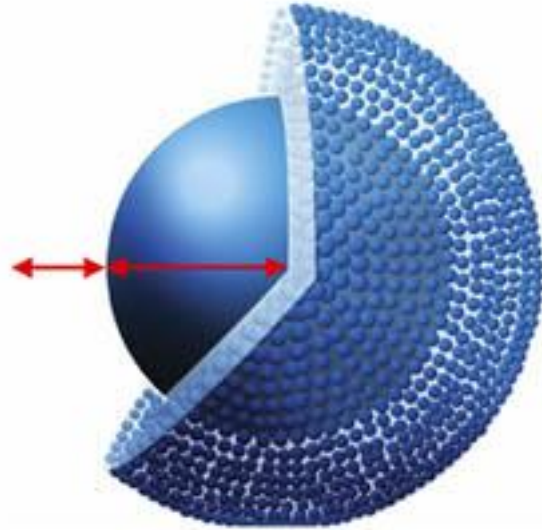
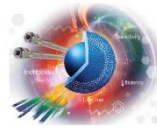
HPLC vs UHPLC

UHPLC

- Impiego di colonne con fase stazionaria con diametro delle particelle $<3 \mu\text{m}$
- Massima pressione di esercizio >1000 bar
- Contropressione: pressioni massime fino a 1500 bar (UHPLC)
- Ridotto volume di campione iniettato (maggiore sensibilità) e il risparmio di eluente necessario.
- Portata di flusso maggiore
- Volume di iniezione: 2 μL
- Elevata efficienza
- Tempo di analisi ridotto

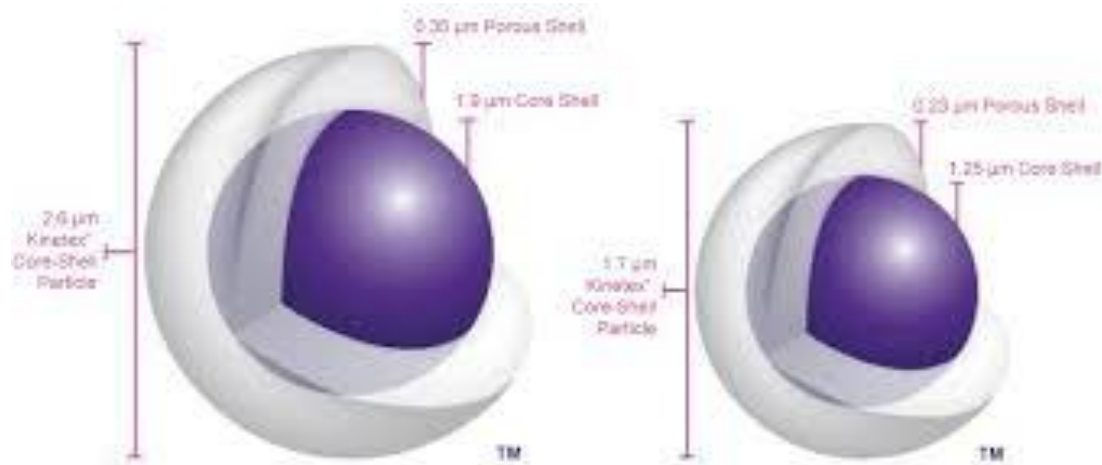


Particelle Core-Shell



Fully Porous	vs	Kinetex Core-Shell	Average Efficiency Gain with Kinetex*
5 μm		5 μm	90% Higher
3 μm		2.6 μm	85% Higher
1.7 μm		1.7 μm	20% Higher
1.7 μm		1.3 μm	50% Higher

* May not be representative of all separations.

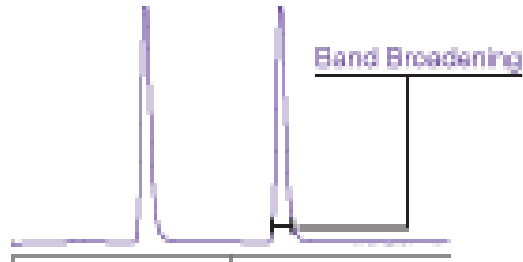
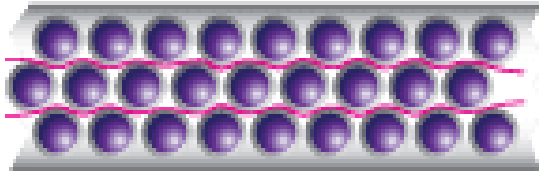


Le particelle core-shell hanno un nucleo di silice non porosa circondato da un sottile strato di silice porosa.

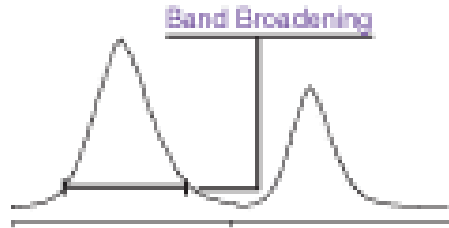
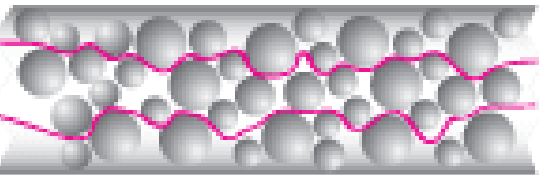
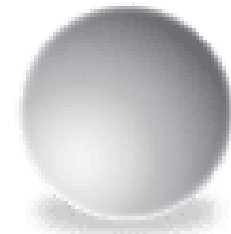
La diminuzione della superficie interfacciale fra fase stazionaria e mobile, rispetto alle particelle porose, è compensata dalla diminuzione del contributo del termine CM nell'equazione di Van Deemter, con conseguente incremento dell'efficienza.

HIGH EFFICIENCY HPLC

Kinetex Core-Shell



Fully Porous



- Il core solido riduce tutti i contributi all'allargamento di banda in cromatografia liquida a fase inversa (diffusione molecolare longitudinale, resistenza al trasferimento di massa e percorsi multipli)
- Maggiore efficienza
- Per **UHPLC**

- Particelle di silice totalmente porose
- Basse contropressioni
- Favorisce allargamento della banda in cromatografia liquida a fase inversa
- Minore efficienza
- Per **HPLC**

