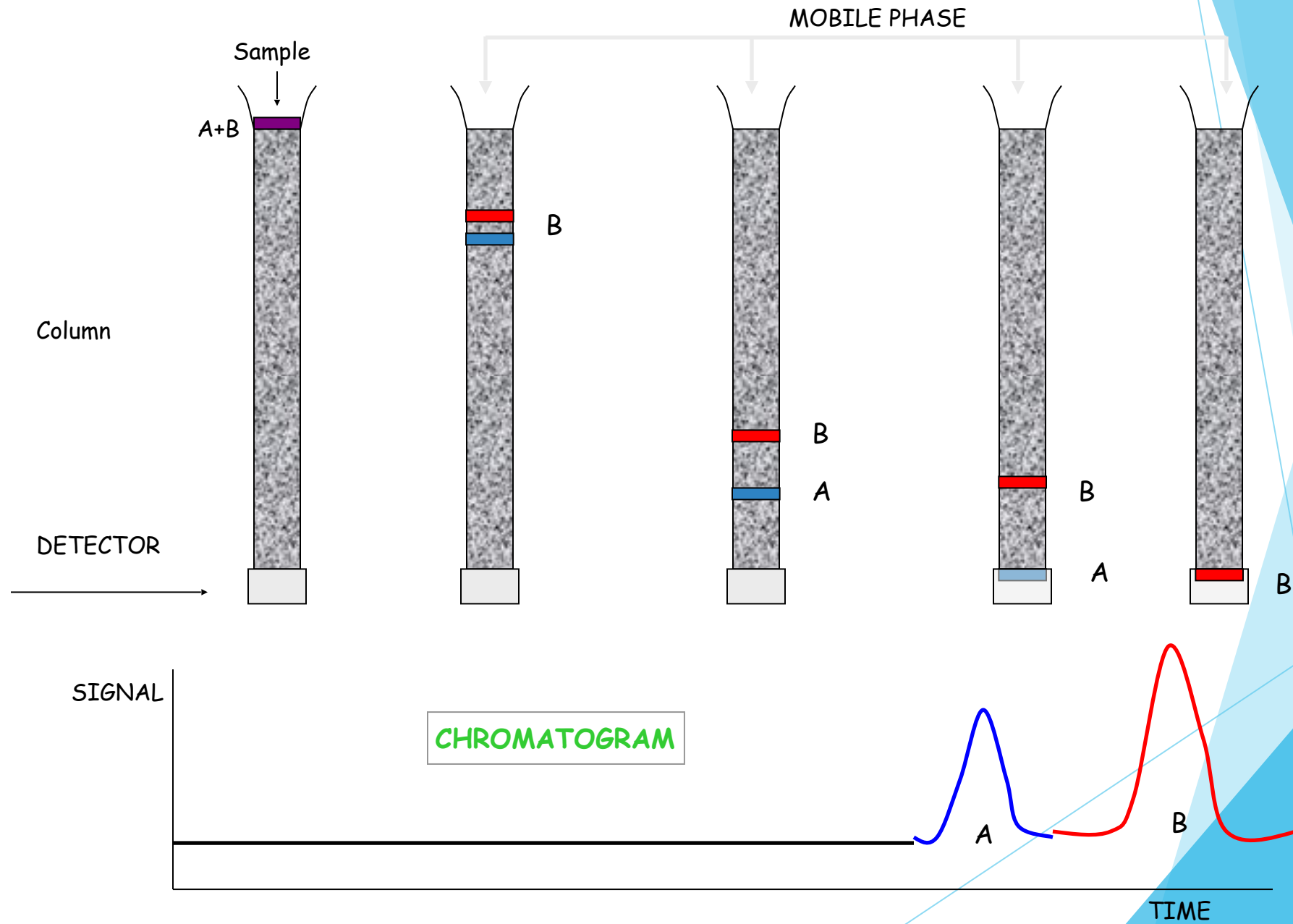


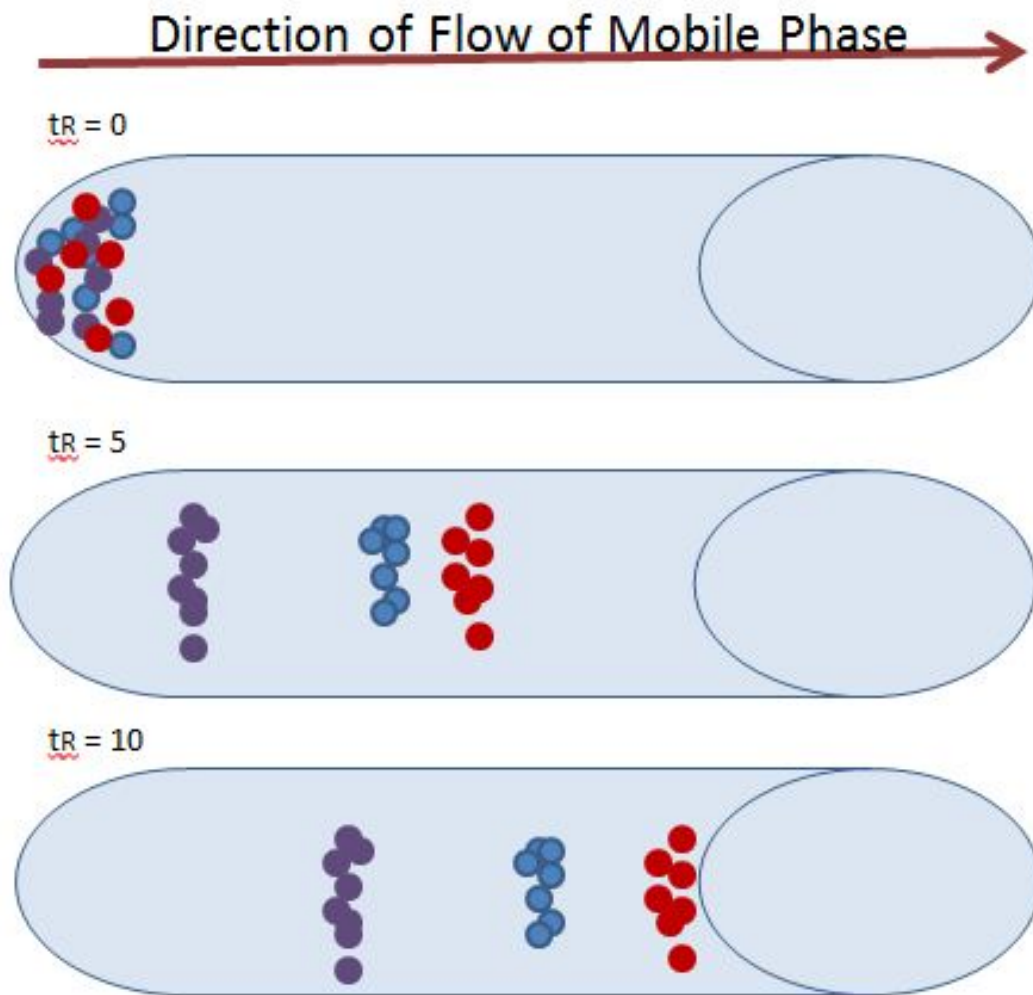
HPLC & UHPLC

Differences, detectors & applications

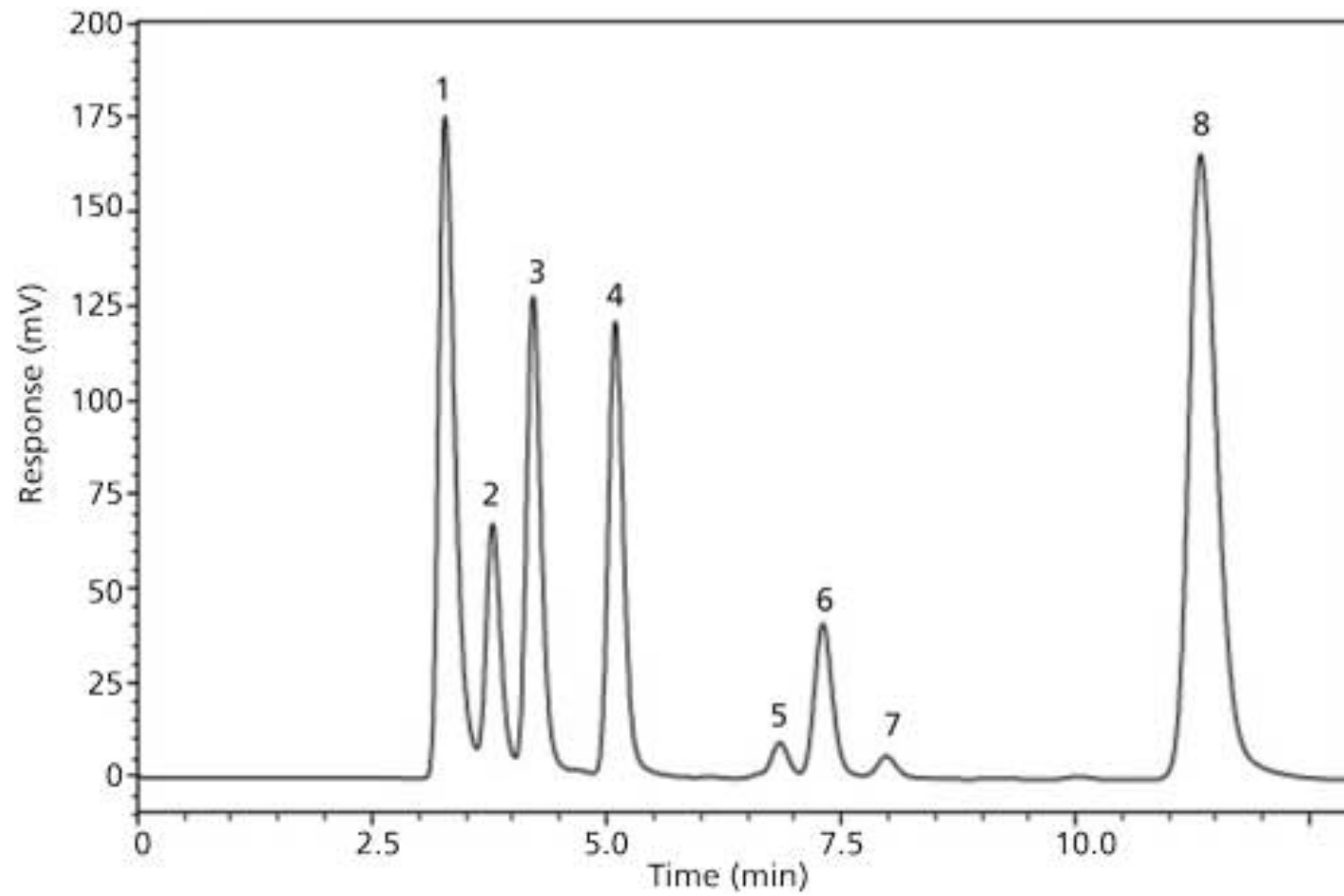
Chromatography



INJECTOR



DETECTOR



TECNICHE DI SEPARAZIONE

Le fasi stazionarie in HPLC sono costituite da particelle di silice (più raramente allumina) che funzionano da ADSORBENTI (cromatografia di adsorbimento = LSC) o da SUPPORTO (cromatografia di partizione = LLC).

La diffusione della silice è giustificata da alcune sue proprietà specifiche:

- è in grado di sopportare pressioni molto elevate (> 1000 atm);
- è chimicamente stabile verso tutti i solventi a pH non superiore a 8;
- è facilmente funzionalizzabile (derivatizzabile);
- è facile ottenerla sottoforma di particelle uniformi;
- è disponibile in varie dimensioni e porosità (60-100 Å).

Nella *Bonded Phase Chromatography* (BPC), che è una cromatografia di partizione, le particelle di supporto sono legate a dei composti organici.

Nella *Size Exclusion Chromatography* (SEC) le particelle di supporto hanno una porosità controllata e separano i soluti in funzione della loro dimensione molecolare (che è cosa diversa dal loro peso molecolare).

Nella *Ion Exchange Chromatography* (IEC) i gruppi ionici (cationici od anionici) sono legati chimicamente alla superficie del supporto.

La complessità della correlazione soluto/fase stazionaria/fase mobile rende conto del perché, in generale, in tutte le tecniche di separazione LC si utilizza una grandissima varietà di solventi; la polarità della fase mobile, anche se non è l'unico, è *il più importante fattore* che produce una migliore solvatazione del soluto e dunque una più veloce eluizione.

Questa necessità di variare la composizione della fase mobile per ottimizzare le separazioni dei soluti è alla base della classificazione delle tipologie di eluizione della LC:

a. ELUIZIONE ISOCRATICA

La composizione della fase mobile rimane costante per tutto il tempo dell'eluizione.

b. ELUIZIONE A GRADIENTE

La composizione della fase mobile viene fatta variare durante l'eluizione (con aumento della percentuale del solvente più polare), allo scopo di separare tutti i soluti, anche quelli che hanno fattori di capacità (k') molto diversi.

CROMATOGRAFIA DI ADSORBIMENTO

(*Liquid Solid Chromatography*)

FASE MOBILE: liquido

FASE STAZIONARIA: solido adsorbente

La separazione si basa sull'assorbimento dei soluti sulla superficie della fase stazionaria, dotata di siti attivi che danno luogo a interazioni *non specifiche* (forze di dispersione di Van der Waals) e *specifiche* (legami idrogeno, interazioni dipolo-dipolo).

Le fasi stazionarie adsorbenti più utilizzate nella LSC sono la silice (SiO_2) e l'allumina (Al_2O_3), anche se la silice è preferita per la sua maggiore capacità di carica, ma anche perché è attiva sia con i gruppi silanolicci liberi (*fase diretta*) che con i gruppi silanolicci funzionalizzati (*fase inversa*). I siti attivi della fase stazionaria sono sempre ricoperti da molecole del solvente (*solvatazione della fase stazionaria*), così come il solvente circonda le molecole di soluto (*solvatazione del soluto*). Il soluto proveniente dalla fase mobile "sposta", per competizione, dalla superficie della fase stazionaria un certo numero di molecole di solvente

B) CROMATOGRAFIA DI RIPARTIZIONE (*Liquid Liquid Chromatography*)

FASE MOBILE: liquido

FASE STAZIONARIA: liquido (su supporto solido inerte o a fase legata)

La separazione si basa sulla ripartizione del soluto tra la fase mobile liquida e la fase stazionaria (liquido su supporto solido inerte o film di gruppi organici legati chimicamente al supporto solido inerte). Questa distinzione comporta una prima classificazione della LC di partizione:

1. a fase legata (BPC = *Bonded Phase Chromatography*)
2. a fase non legata (LLC = *Liquid Liquid Chromatography*)

CROMATOGRAFIA A FASE LEGATA (BPC)

Ha quasi completamente sostituito la più tradizionale cromatografia liquido-liquido (con la quale si ha perdita di fase stazionaria ed è difficile operare con eluizioni a gradiente). I gruppi organici che si fissano chimicamente sulla superficie del supporto possiedono una certa mobilità conformazionale che conferisce loro un comportamento simile a quello di un liquido (stato pseudo-liquido).

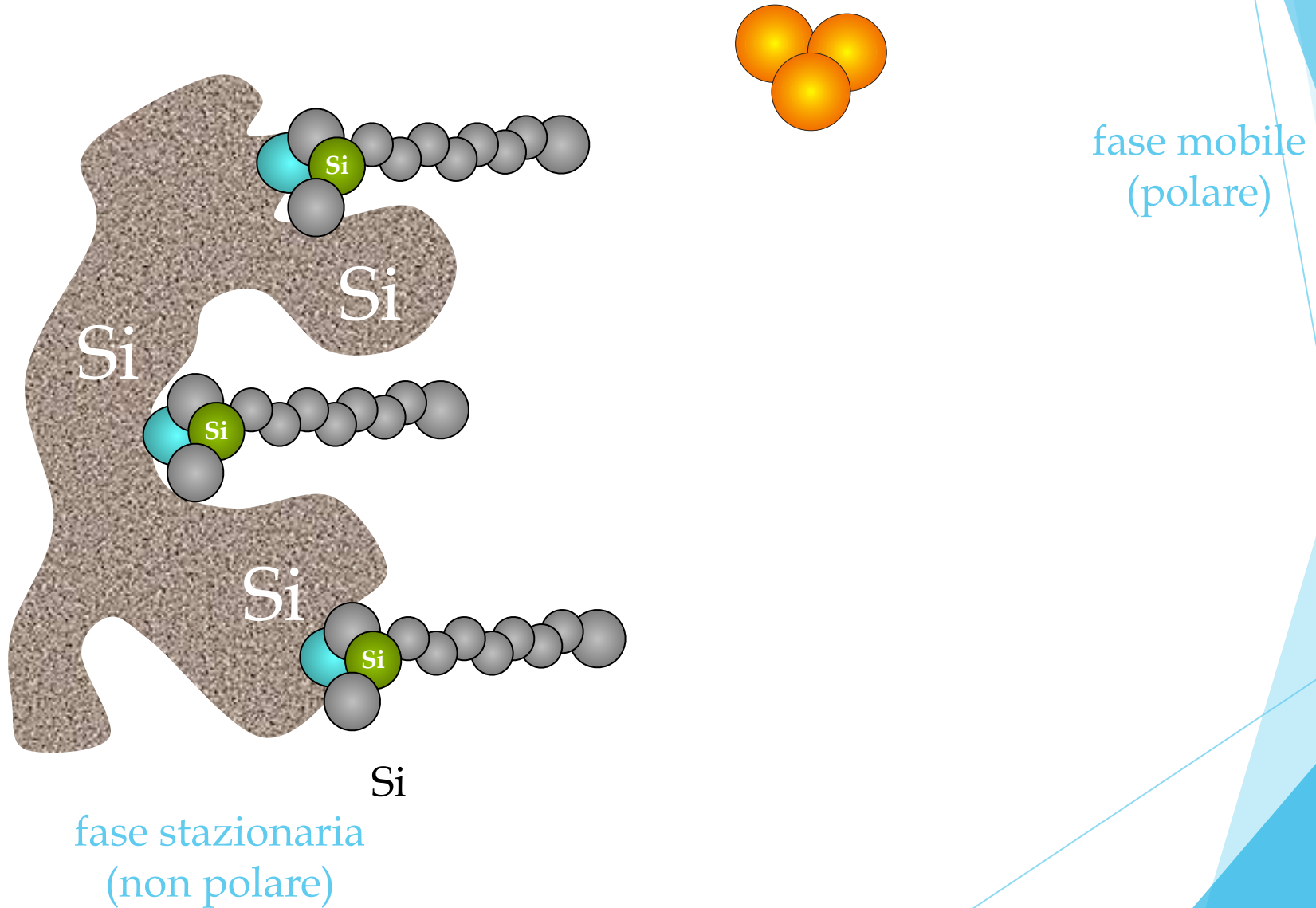
La BPC può essere:

1. IN FASE INVERSA { FASE MOBILE: polare (H_2O , CH_3OH , CH_3CN)
FASE STAZIONARIA: non polare (Si-O-SiR_3)
SOLUTI: non polari

2. IN FASE DIRETTA { FASE MOBILE: non polare (nC_6H_{14} , Et_2O , CHCl_3)
FASE STAZIONARIA: polare (Si-OH)
SOLUTI: polari

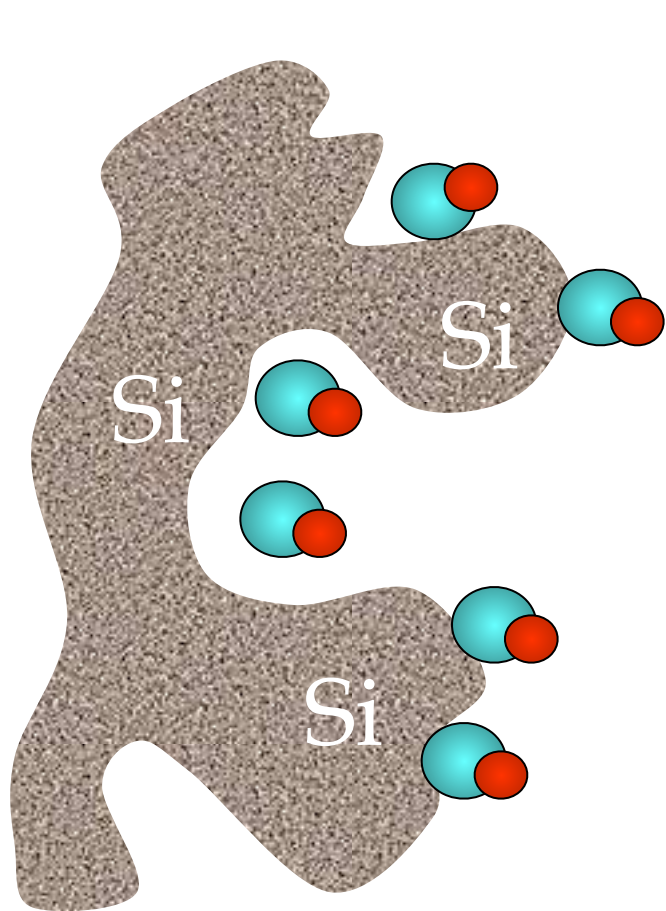
CROMATOGRAFIA IN FASE INVERSA

Reverse Phase Chromatography (RPC)

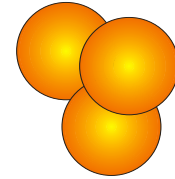


CROMATOGRAFIA IN FASE DIRETTA

Normal Phase Chromatography (NPC)



fase stazionaria
(polare)



fase mobile
(non polare)

1. CROMATOGRAFIA IN FASE INVERSA (*Reverse Phase Chromatography*)

a. FASE STAZIONARIA

Si utilizzano materiali diversi:

- silice
- allumina
- carbone pirolitico
- polimeri (polietilene) e copolimeri (stirene/divinilbenzene)

La silice è il materiale più utilizzato perché la tecnologia attuale consente di ottenere particelle di dimensioni e porosità controllate, oppure particelle con uno strato pellicolare poroso. Inoltre è il materiale che può essere più facilmente funzionalizzato.



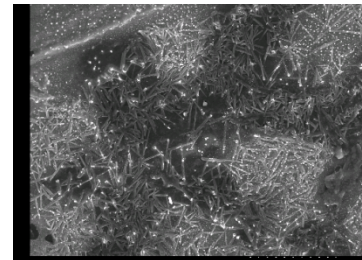
silice



allumina



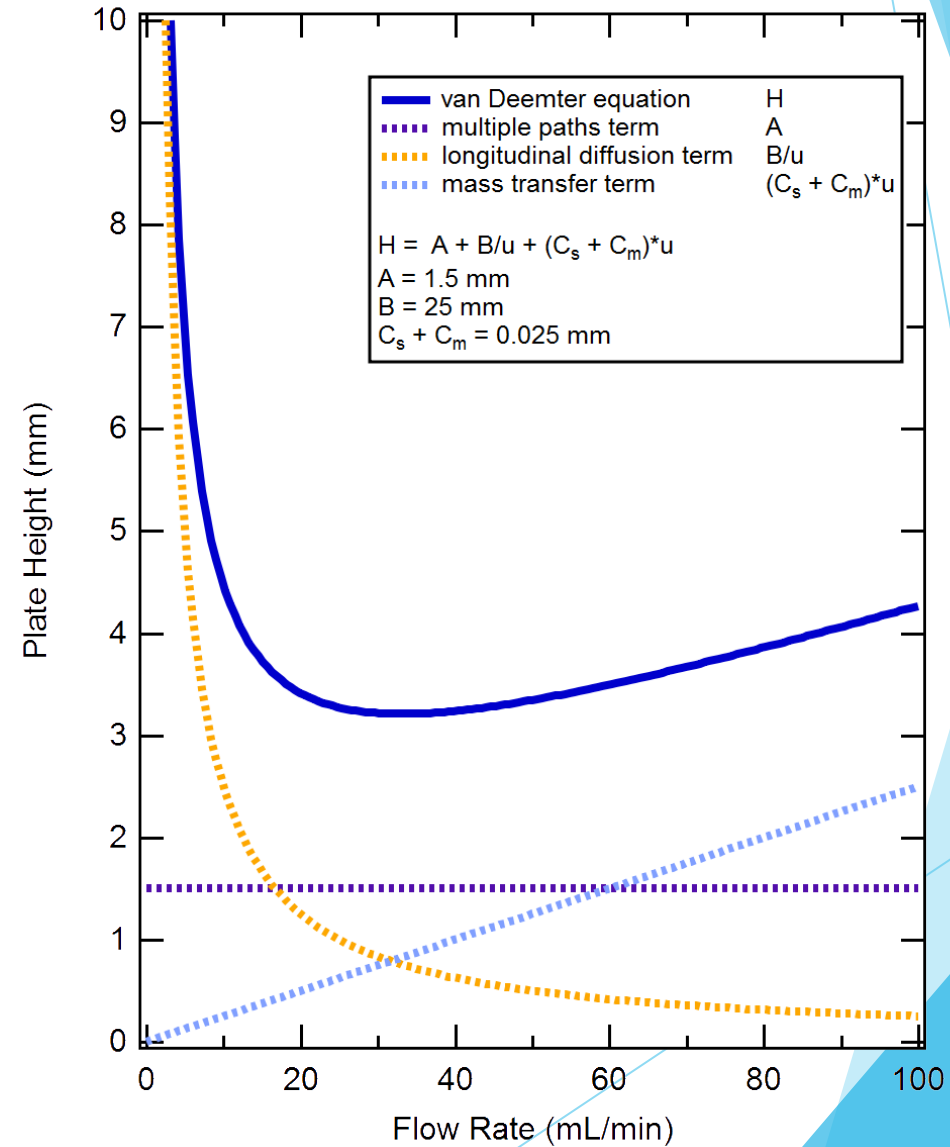
carbone pirolitico



resine

Equazione di Van Deemter

$$H = A + B/u + (C_s + C_m) * u$$



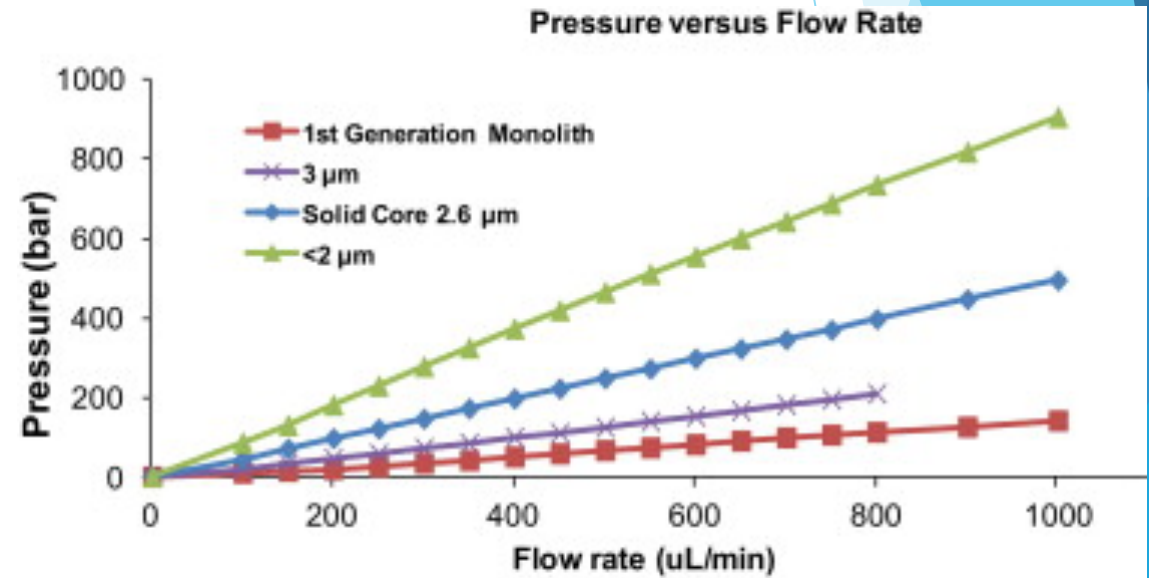
HPLC

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:

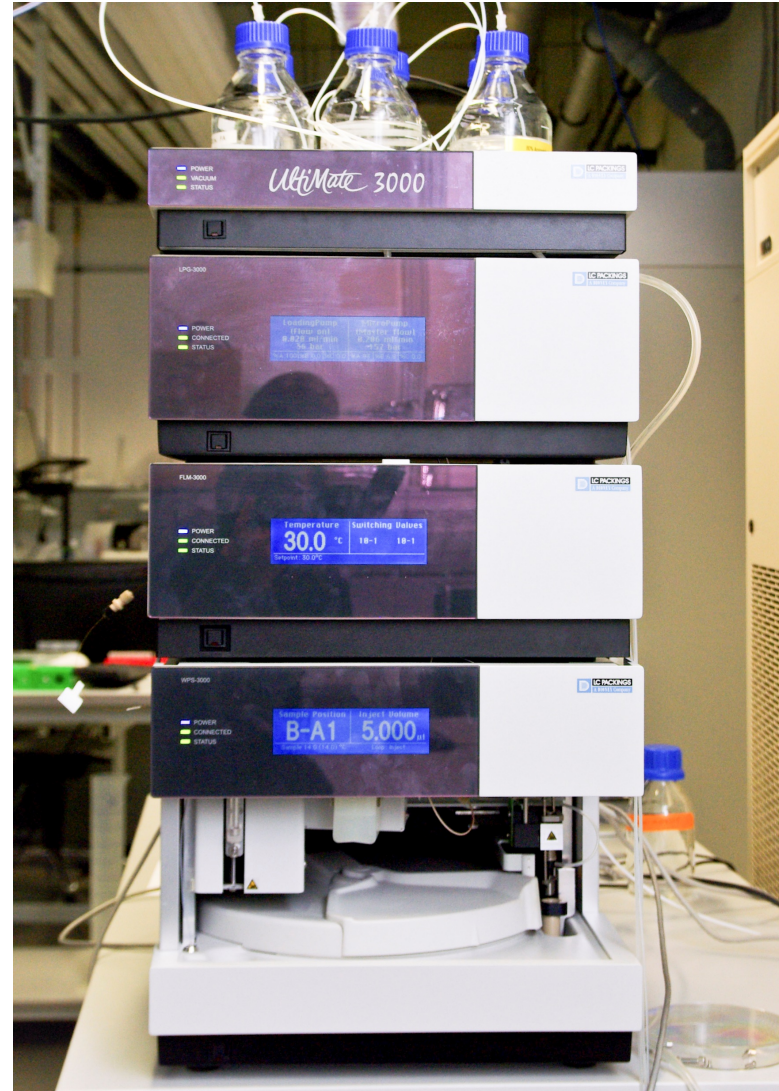
$$\Delta P = \frac{\eta L v}{\Theta d_p^2}$$

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



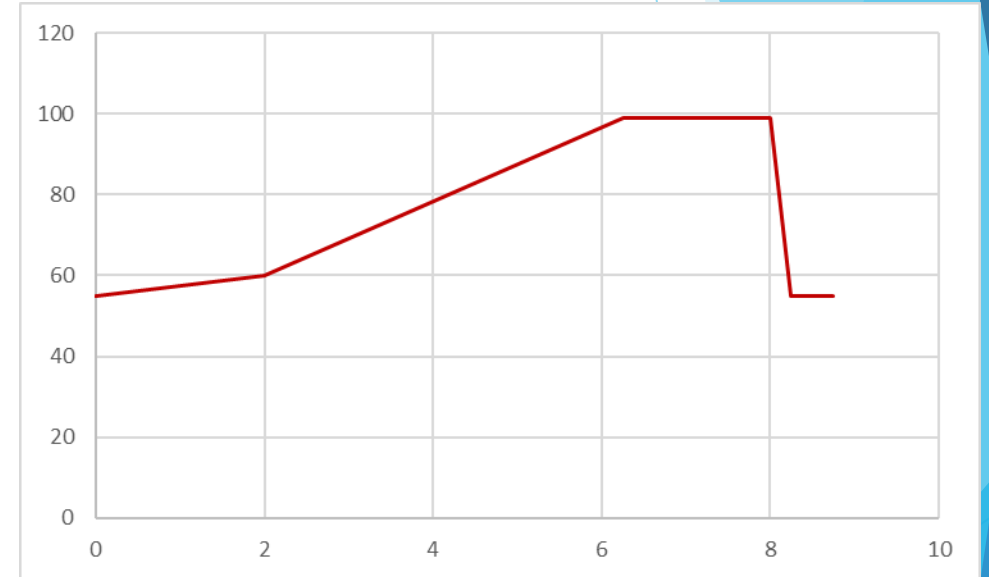
HPLC - High Performance Liquid Chromatography

- Contenitori per la fase mobile
- Pompe
- Sistemi di introduzione del campione
- Colonna
- Riempimento della colonna
- Rivelatori



I moderni strumenti per HPLC sono equipaggiati con diversi contenitori per i solventi che verranno impiegati come fase mobile. I solventi devono necessariamente essere privi di impurità, compresi gas disciolti e particolato, per non inficiare la bontà dell'analisi; per questo motivo i contenitori integrano spesso degasatori, distillatori e sistemi di filtraggio. Nella maggior parte dei casi i solventi vengono lasciati nei contenitori originali, fatti da materiale inerte (vetro o acciaio inox).

Le separazioni con HPLC possono essere eseguite con *eluizione isocratica*, ossia usando un eluente la cui composizione non varia durante l'analisi, oppure con *eluizione a gradiente*, in cui la natura dell'eluente varia durante l'analisi in maniera continua o a gradini.

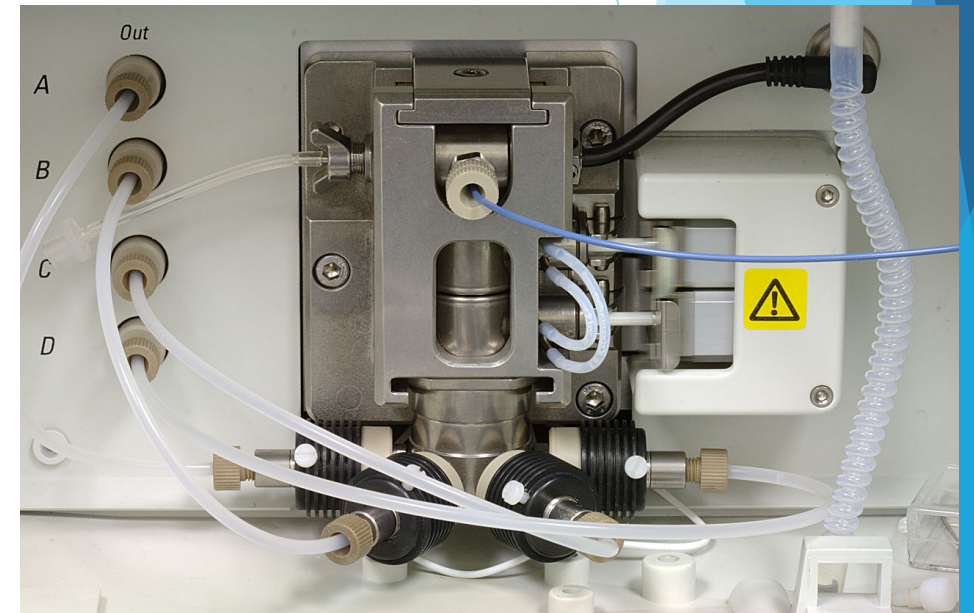


Pompe

Le pompe per HPLC devono soddisfare requisiti molto stringenti, tra i quali i più importanti sono: capacità di sostenere pressioni fino a centinaia di atmosfere stabilità della pressione generata (importante per non creare rumore nel cromatogramma) erogare flussi di fase mobile nell'intervallo comunemente compreso tra 0,1 e 10 ml/min garantire la riproducibilità del flusso relativa migliore dello 0,5% resistenza alla corrosione

I principali tipi di pompe impiegate negli strumenti sono:

- pompe alternative a pistone
- pompe a siringa
- pompe pneumatiche.



Pompe alternative a pistone

Le pompe alternative a pistone si dividono in due tipi: a pistone singolo ed a coppia di pistoni sono le più diffuse negli strumenti commerciali. La pressione viene trasmessa dal pistone, azionato da un motore, a una piccola camera in cui viene fatto fluire il solvente grazie all'apertura e alla chiusura di due valvole sincronizzate con la pulsazione del pistone. Il sistema presenta l'inconveniente di generare una pressione pulsata e di richiedere quindi uno smorzatore di pressione. Le pompe alternative a pistone sono in grado di sostenere stabilmente pressioni oltre le 600 atm, garantendo quindi buone velocità di flusso e in un ampio intervallo, sono inoltre facilmente adattabili alle eluizioni a gradiente.

Pompe a siringa

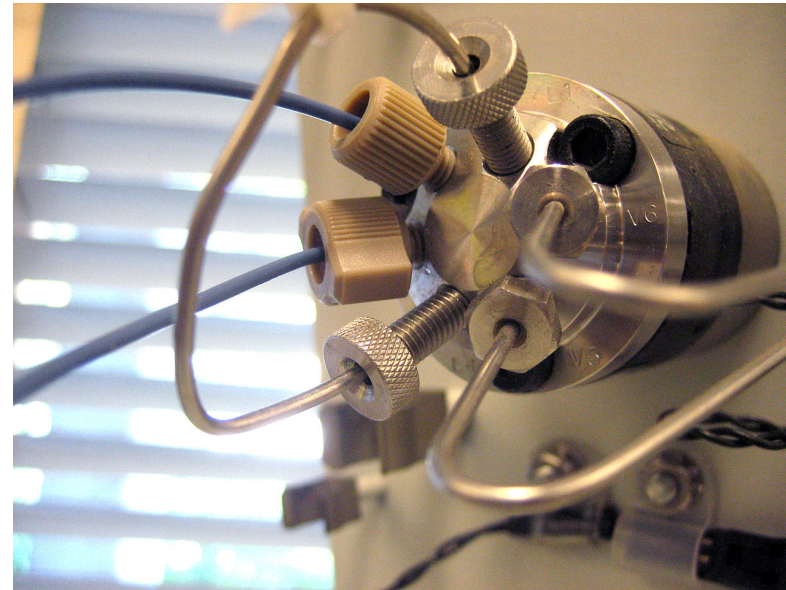
Le pompe a siringa, dette anche pompe a spostamento, sono costituite da un cilindro che contiene il solvente e da un pistone interno. Il pistone viene spinto da un motore applicato a una vite, generando una pressione non pulsata. Tali pompe garantiscono un flusso stabile e sufficientemente potente però hanno di norma una scarsa capacità del serbatoio e presentano inconvenienti quando si cambia il solvente.

Pompe pneumatiche

Nelle pompe pneumatiche il solvente è contenuto in un recipiente flessibile, compresso dall'esterno con gas sotto pressione. Il flusso che ne risulta non è pulsato ma è di norma poco potente rispetto a quello generato dagli altri tipi di pompe. Ulteriori svantaggi sono dati dalla scarsa capacità del serbatoio e dal fatto che l'entità del flusso dipende sensibilmente dalla viscosità del solvente rendendo dunque non idonee queste pompe per le eluizioni a gradiente.

Sistemi di introduzione del campione

La riproducibilità della quantità di campione introdotto nella colonna rappresenta il punto critico per la precisione di un'analisi con HPLC. I sistemi attualmente in uso riescono a raggiungere precisioni relative dello 0,1% e di variare la quantità di campione introdotto in un intervallo compreso tra 5 e 500 μL , esistono anche valvole di iniezione per microcampioni con volumi compresi tra 0,5 e 5 μL . Sono valvole capaci di alloggiare e trasferire il campione, senza interruzione del flusso dalla fase mobile attraverso la colonna. Sono costruiti in acciaio.



Colonne

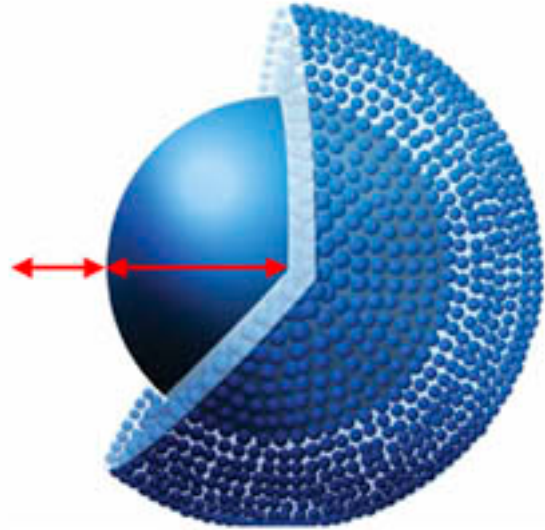
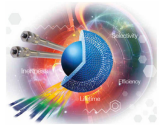
È il mezzo in cui il materiale è separato, ed a seconda dei solventi, gli analiti possono raggiungere diverse velocità di eluizione, in base anche alla loro composizione. Il materiale più impiegato per la costruzione delle colonne per HPLC è l'acciaio inossidabile levigato, se si opera a pressioni inferiori a 10 atm si usano anche colonne in vetro spesso. 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.

Le colonne commerciali sono spesso dotate di fornetti termostatici per tenere sotto controllo la temperatura della colonna fino al decimo di grado centigrado. Il mantenimento di una temperatura costante garantisce di norma cromatogrammi migliori.

Nonostante i solventi impiegati in HPLC siano appositamente purificati, è sempre possibile che contengano contaminanti che potrebbero intaccare la buona funzionalità della colonna. Per ovviare a questo problema e dunque aumentare la vita media delle colonne analitiche si applicano colonne di protezione, più corte delle colonne analitiche, in cui la fase mobile viene fatta passare prima di accedere alla colonna analitica. In sostanza la colonna di protezione funge da filtro. Inoltre serve anche per saturare la fase mobile con la fase stazionaria, minimizzando quindi le perdite di fase stazionaria nella colonna analitica.



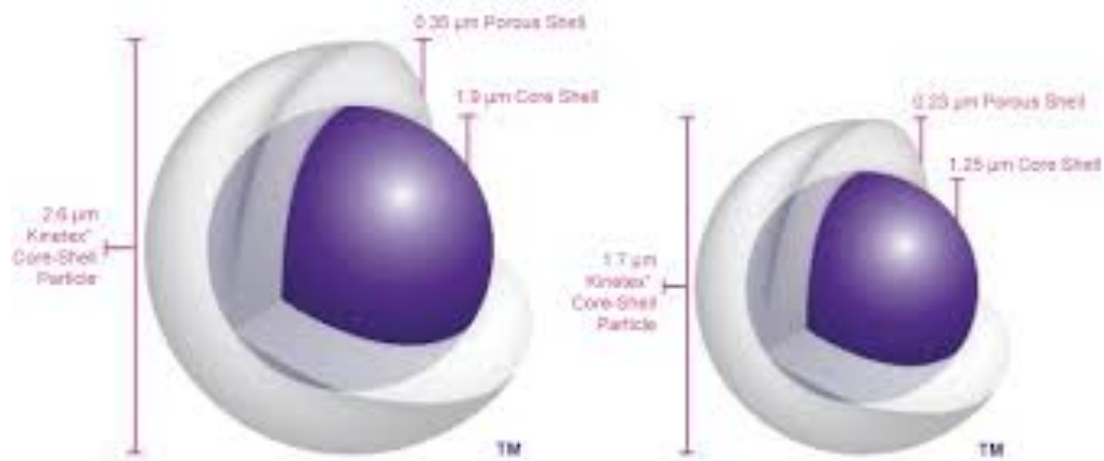
Particelle Core-Shell



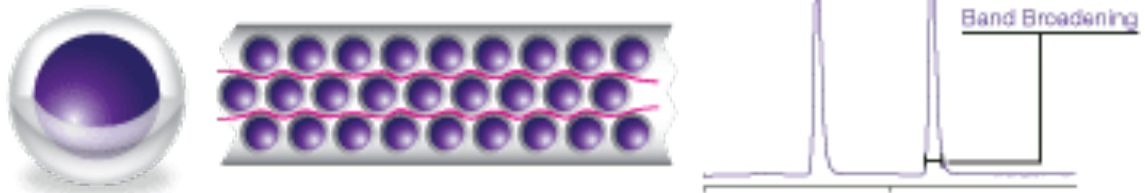
Fully Porous	vs	Kinetex Core-Shell
5 μm		5 μm
3 μm		2.6 μm
1.7 μm		1.7 μm
1.7 μm		1.3 μm

Average Efficiency Gain with Kinetex*
90% Higher
85% Higher
20% Higher
50% Higher

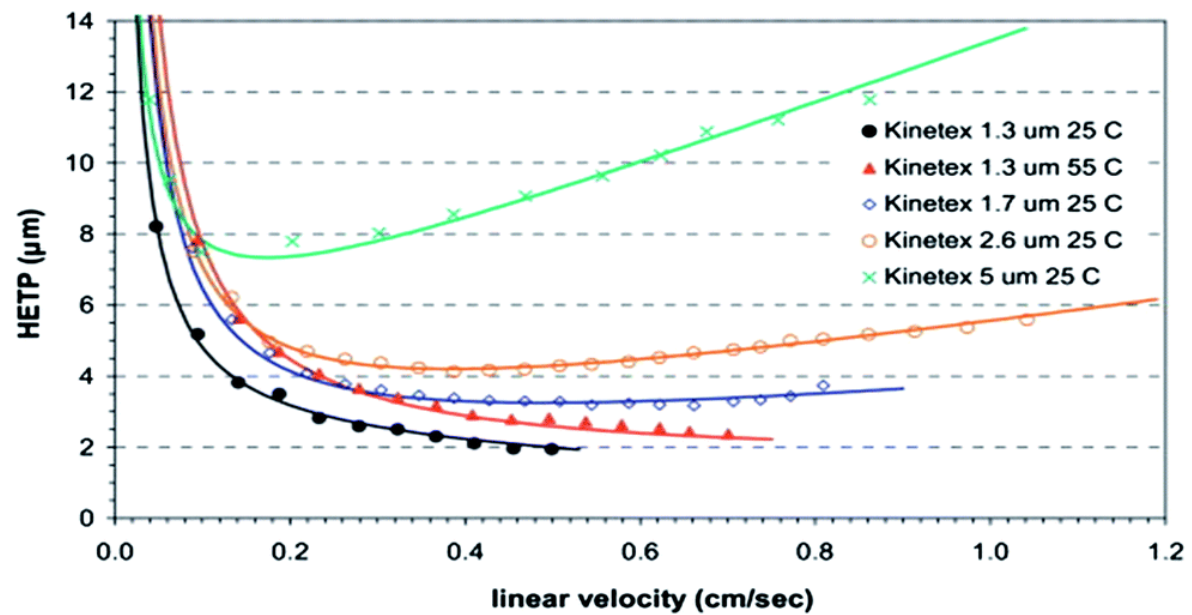
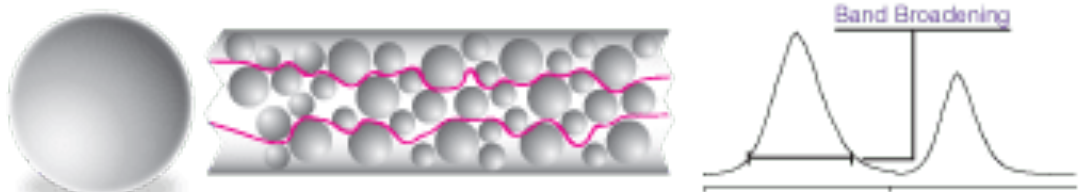
*May not be representative of all separations.



Kinetex Core-Shell



Fully Porous



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.

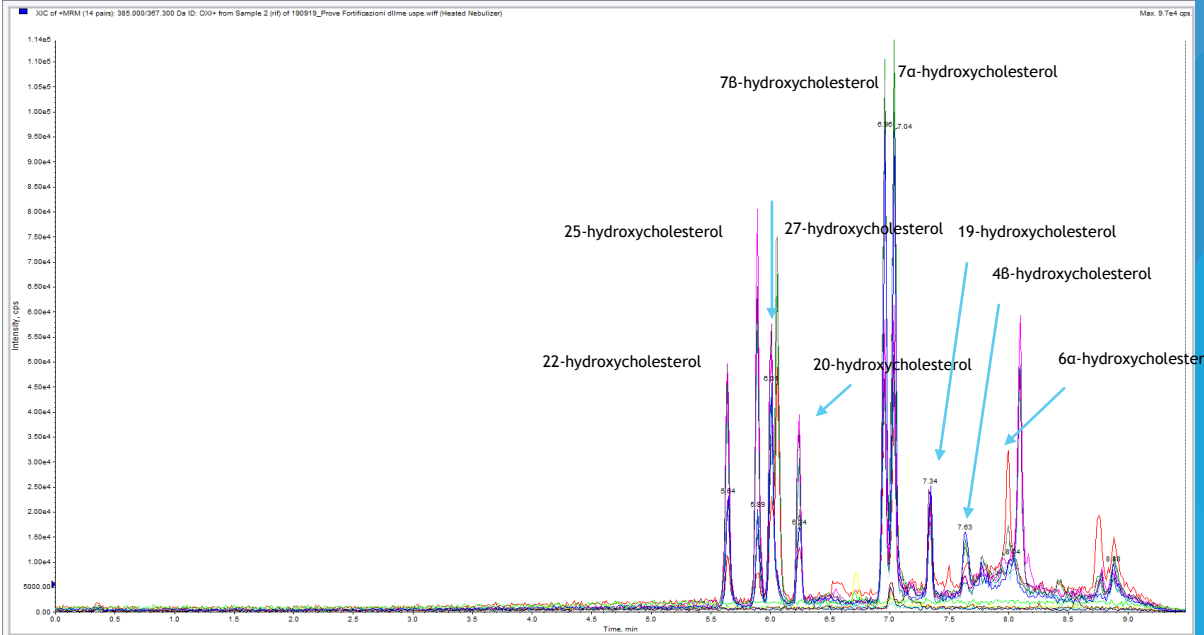
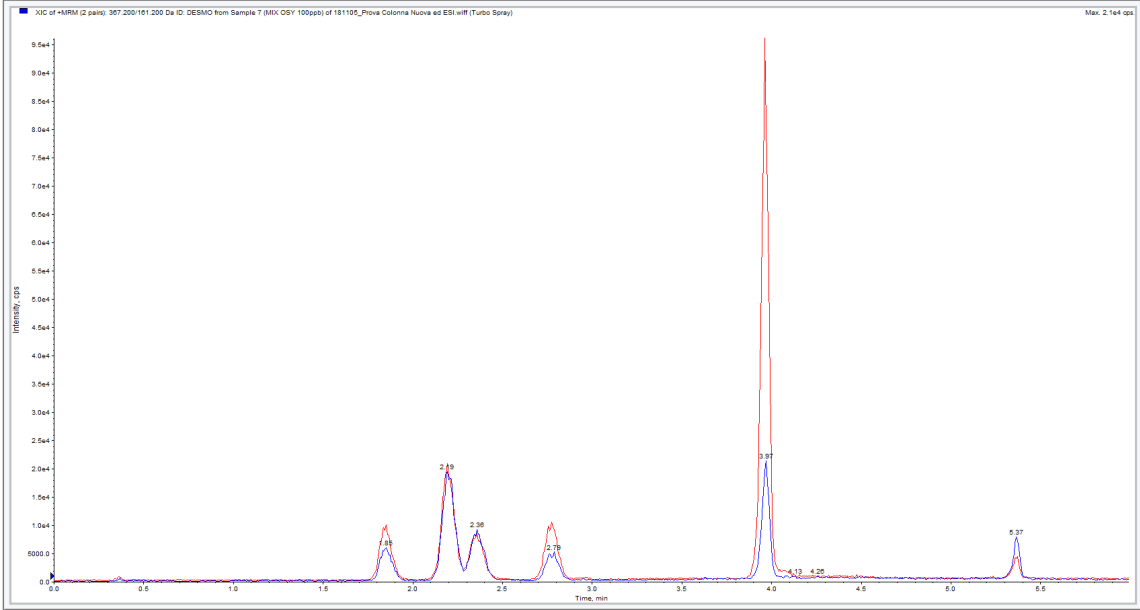
La tecnica UHPLC permette di ottenere una separazione delle sostanze eluite caratterizzata da una maggiore efficienza e in tempi notevolmente ridotti, utilizzando come fase stazionaria particelle dal diametro solitamente inferiore a $3\ \mu\text{m}$ e pressioni che possono superare i 1000 bar. Altra caratteristica corollaria 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.



UHPLC vs HPLC

	Final UHPLC Conditions	HPLC 250x4.6 mm Conditions	HPLC 150x4.6 mm Conditions	HPLC 150x4.6 mm Conditions
Column	50x2.0	250x4.6	150x4.6	150x4.6
Particle size (µm)	1.5	5	4.6	3.0
Flow (mL/min)	0.4	2.12	2.12	0.9
Pressure (bar)	413	185.9 - calculated	309.8 - calculated	309.8 - calculated
Injection volume (µL)	1.0	5.29	5.29	2.25
Gradient	0.0 min – 5%B 2.0 min – 5%B 13.0 min – 95%B 13.8 min – 95%B 14.0 min – 5%B 18.0 min – 5%B	0.0 min – 5%B 10.0 min – 5%B 65.0 min – 95%B 69.0 min – 95%B 70.0 min – 5%B 90.0 min – 5%B	0.0 min – 5%B 6.0 min – 5%B 39.0 min – 95%B 41.4 min – 95%B 42.0 min – 5%B 54.0 min – 5%B	0.0 min – 5%B 6.0 min – 5%B 39.0 min – 95%B 41.4 min – 95%B 42.0 min – 5%B 54.0 min – 5%B

UHPLC vs HPLC



Caratteristiche di un rivelatore ideale:

- Sensibilità adeguata al problema
- Buona stabilità e riproducibilità
- Risposta lineare al soluto, possibilmente per parecchi ordini di grandezza
- Tempi di risposta rapidi
- Risposta verso tutti i soluti, oppure risposta selettiva verso una o più classi di soluti

Un rivelatore universale per HPLC non è stato sviluppato!!!

- Assorbimento UV
- Fluorescenza
- Conduttimetrico
- Spettrometro di massa

- Indice di rifrazione
- Elettrochimico
- Assorbimento IR

Rivelatori HPLC controllano in continuo una caratteristica dell'eluato della colonna in una cella a flusso connessa all'uscita della colonna

Si distinguono in:

❖ Rivelatori 'bulk property' (**rivelatori delle proprietà dell'eluato**)

- sensibili a proprietà specifiche dell'insieme soluto-solvente. Il segnale è proporzionale al prodotto del flusso per la concentrazione del soluto. Sono anche detti "flow sensitive"

❖ Rivelatori 'solute property' (**rivelatori delle proprietà del soluto**)

- sensibili a proprietà specifiche del soluto. Il segnale è proporzionale alla concentrazione del soluto "solute sensitive"

Rivelatore	LOD (ng)	Selettività	Utilizzabile in gradiente?
Assorbimento UV	0.1-1	selettivo	SI
Indice di rifrazione	100-1000	generale	NO
Fluorescenza	0.001-0.01	selettivo	SI
Elettrochimico	0.01-1	selettivo	NO
Conduttimetrico	0.5-1	selettivo	NO
Assorbimento IR	1000	selettivo	SI
Spettrometro di massa	0.0001-1	generale	SI

Rivelatore	Caratteristiche
Assorbanza (UV/Vis)	Il più comune rivelatore per composti che assorbono in UV/Vis. Buona sensibilità (ng)
Diode array	Aiuta identificazione dell'analita attraverso dati spettrali
Fluorescenza (FI)	Rivelatore specifico con grande sensibilità (pg)
Indice rifrazione (RI)	Universale, usato per composti senza cromoforo Polimeri, zuccheri, trigliceridi, acidi organici
Spettr. di massa (MS)	Eccellente sensibilità (fg) e specificità, definitiva identificazione di analiti
Elettrochimico	Per composti elettroattivi
Conducibilità	Per composti ionici
Radioattività	Specifico per composti marcati

Rivelatori fotometrici e spettrofotometrici

- Rivelatori HPLC più comuni
- Rispondono alla presenza di specie assorbenti nell'UV/visibile in un intervallo 190-700nm
- Risposta lineare in accordo con la legge di Lambert-Beer

$$A = \epsilon bc$$

Assorbanza →

← Concentrazione del campione (M)

Cammino ottico (cm)

Assorbività molare o coefficiente di estinzione ($M^{-1} \text{ cm}^{-1}$)

- non sensibili alla temperatura
- non sensibili al flusso
- ampio intervallo di linearità
- buona sensibilità

Gruppi cromofori

Cromoforo	Formula	λ_{max} (nm)	ϵ
aldeide	-CHO	210	1.500
amino	-NH ₂	195	2.800
azo	-N=N-	285-400	3-25
bromuro	-Br	208	300
carbossile	-COOH	200-210	50-70
chetone	-C=O	195	1.000
disolfuro	-S-S-	194	5.500
estere	-COOR	205	50
etere	-O-	185	1.000
etilene	-C=C-	190	6.000
fenile	-C ₆ H ₅	202, 255	
naftile		220, 275	
nitrato	-ONO ₂	270	12
nitrito	-ONO	220-230	1.000-2.000
nitrile	-C=N	160	-
nitro	-NO ₂	210	forte

Scelta della lunghezza d'onda

La λ del rivelatore va scelta in base ad alcune considerazioni:

- ▶ massimizzare sensibilità e specificità
- ▶ il solvente della fase mobile può causare shifts in λ_{\max} (2-5 nm)
 - ▶ controllare l'assorbanza degli analiti nella fase mobile
- ▶ i solventi per fase mobile hanno cutoff nell'UV
- ▶ operando sotto la λ_{cutoff} può:
 - ▶ ridurre la sensibilità
 - ▶ introdurre rumore sulla linea di base

Rivelatori fotometrici e spettrofotometrici

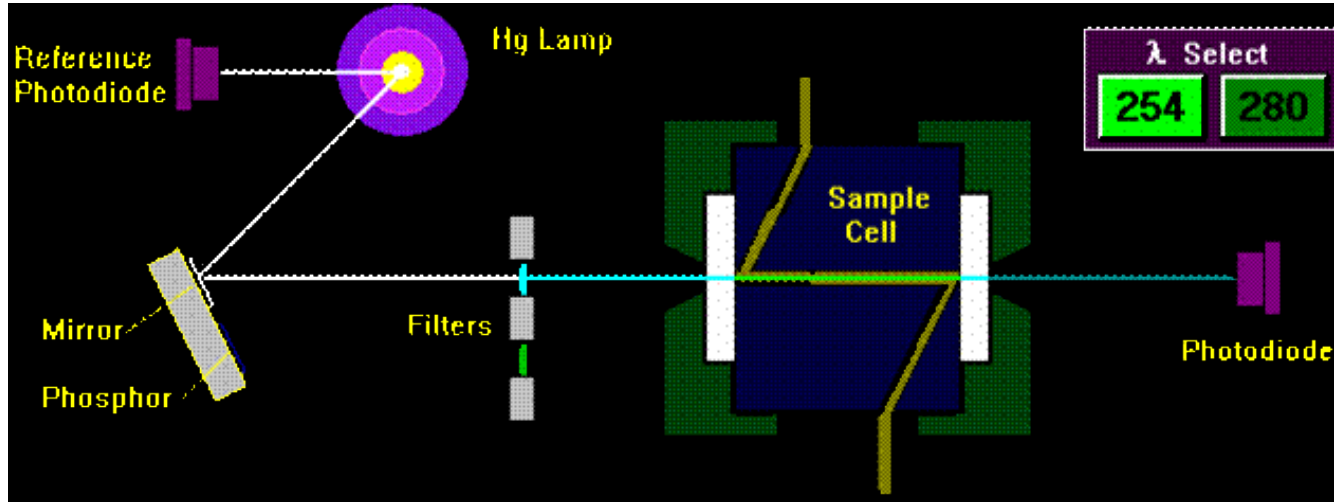
Fotometri: progettati per operare solo ad una o più lunghezze d'onda fisse (220, 254, 436 e 546nm)

Spettrofotometri: permettono letture ad ogni lunghezza d'onda nell'intervallo operativo dello strumento

Celle a flusso di piccolo volume (10 μ L o meno) dotate di finestre di quarzo per:

- Evitare fenomeni di rifrazione
- Per ridurre l'entità dei fenomeni di allargamento di banda e massimo cammino ottico
- Per ottenere elevate sensibilità

Rivelatori fotometrici



La radiazione proveniente da una lampada a vapori di Hg passa attraverso la cella del campione e arriva al fotodiode. L'intensità della luce assorbita è proporzionale alla concentrazione dell'analita.

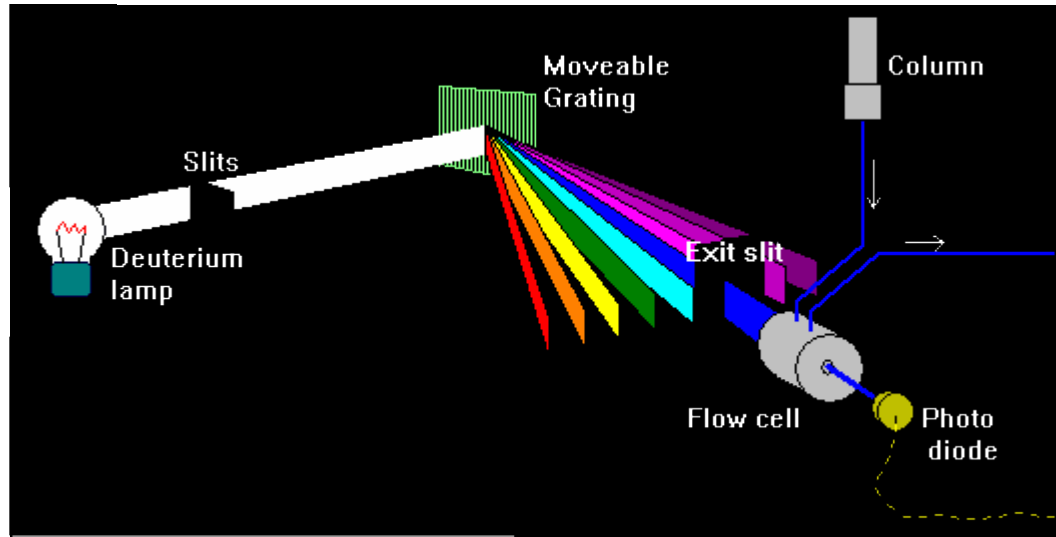
Vantaggi:

- Basso costo
- l'elevata intensità della radiazione della lampada a Hg permette di ottenere elevata sensibilità per composti che assorbono a 254 nm.

Svantaggi:

scarsa selettività dovuta alla necessità di lavorare a lunghezza d'onda fissa.

Rivelatori spettrofotometrici



Il rivelatore UV a lunghezza d'onda variabile è sicuramente quello maggiormente utilizzato in HPLC.

La luce UV proveniente dalla lampada a D_2 è scissa nelle sue componenti attraverso un monocromatore a gradini. L'intensità della luce trasmessa è misurata attraverso un fotodiode ed è proporzionale alla concentrazione dell'analita

Rivelatori spettrofotometrici

Caratteristiche:

- Monocromatore a reticolo
- Sorgente continua: lampada a deuterio per la regione UV e lampada al tungsteno-alogeno per la regione del visibile
- Ottiche a doppio raggio
- Elettroniche stabili con bassi livelli di rumore
- Possono essere programmati per selezionare una serie di lunghezze d'onda ottimali per la rivelazione
- Possibilità di registrare uno spettro UV completo relativo ad un picco di soluto a flusso fermo
- Capacità rapida di scansione delle λ per permettere la registrazione di uno spettro completo in una frazione di secondo senza fermare il flusso

Vantaggi:

- Versatilità: possibilità di selezionare lunghezze d'onda da 190 a 800 nm.
- Elevata sensibilità: potendo scegliere la lunghezza d'onda ottimale (max assorbanza) per un analita.
- Selettività: quando si hanno sovrapposizioni di picchi si può variare la λ in modo tale da minimizzare l'assorbimento degli interferenti.
- Possibilità di utilizzare gradiente di eluizione, scegliendo una λ alla quale la miscela solvente non assorbe.

Rivelatori fotometrici e spettrofotometrici

Fotometri

Più sensibili, più economici e più robusti degli spettrofotometri

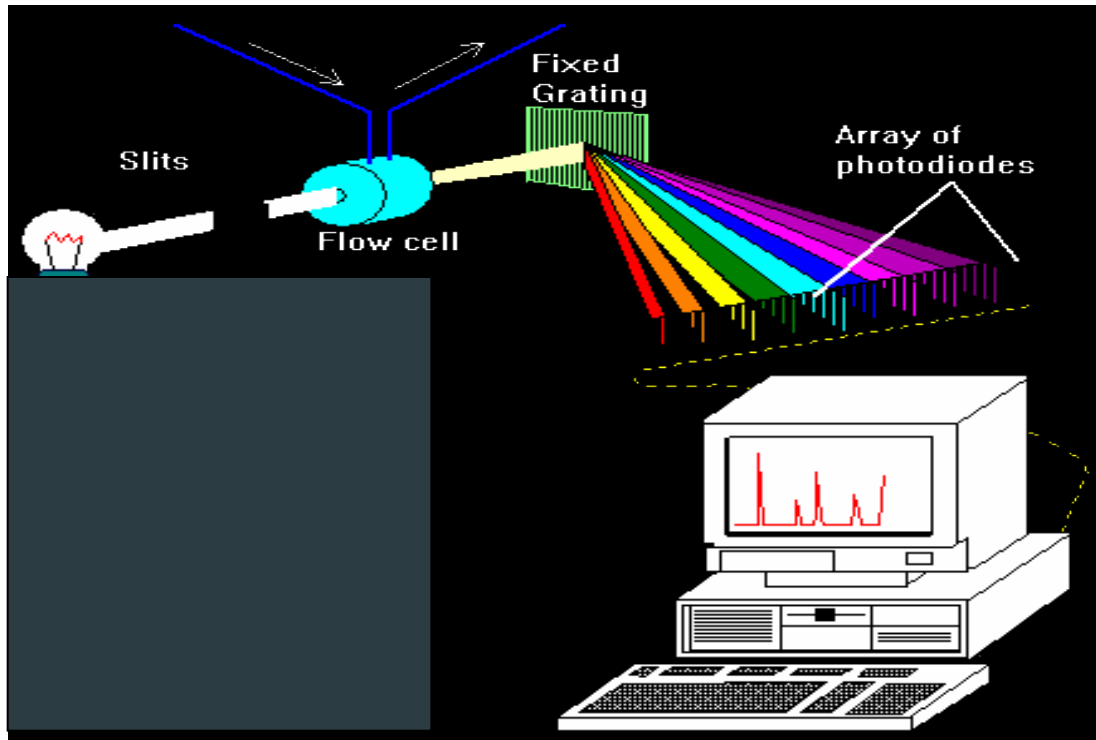
Risultano adatti a lavori di routine qualora sia sufficiente la rivelazione a 254nm o ad altre lunghezze d'onda fisse

Spettrofotometri

Permettono di “accordarsi” rispetto alle lunghezze d'onda più adatte a cui lavorare sia per massimizzare la sensibilità rispetto ad un particolare soluto sia per evitare la risposta di rispetto ad altri.

Con tali strumenti è possibile effettuare misurazioni fino a 190nm, pertanto si possono rivelare composti poco assorbenti o specie sature.

Rivelatori a serie di diodi



Il rivelatore UV a λ diode array è quello che attualmente viene sempre più utilizzato in HPLC.

La luce UV proveniente dalla lampada a D_2 passa attraverso una cella a flusso prima che venga scissa nelle sue componenti attraverso un monocromatore a gradini. L'intensità della luce trasmessa ad ogni λ è misurata simultaneamente attraverso un array di alcune centinaia di fotodiodi. Un pc può processare, registrare e mostrare gli spettri in continuo durante l'analisi. Inoltre si possono registrare i cromatogrammi a ciascuna λ .

Vantaggi e svantaggi

Permette la registrazione in tempo reale di spettri UV o UV/visibile completi per tutti i componenti al momento dell'eluizione dalla colonna

Presenta gli stessi vantaggi in termini di versatilità, sensibilità e selettività del rivelatore a λ variabile.

Fornendo anche gli spettri degli analiti, permette di effettuare anche il riconoscimento dei composti analizzati.

Svantaggio: è più costoso rispetto al rivelatore a λ variabile.

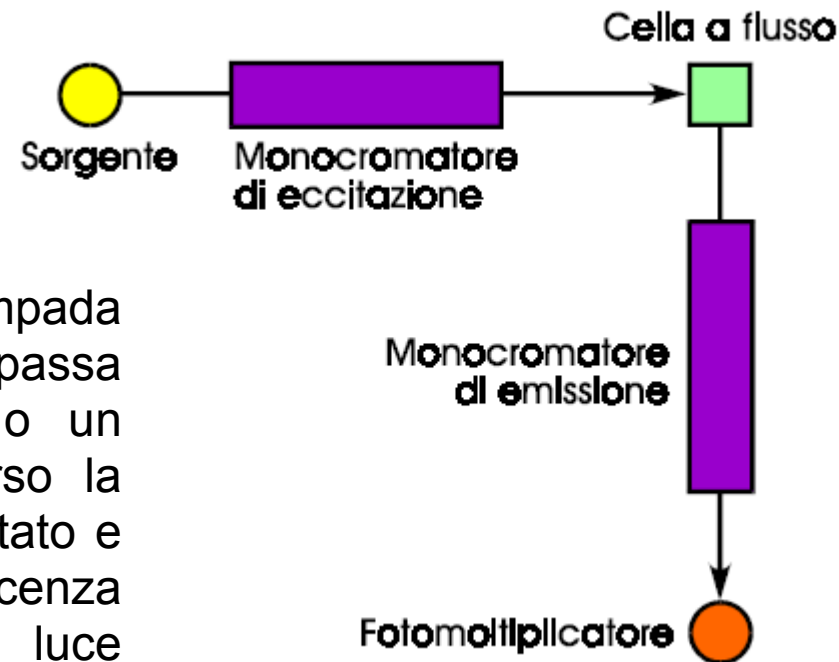
Rivelatore spettrofotometrico IR

- sensibilità tipica: 1 ppm
- applicabilità limitata dall'assorbanza della fase mobile nel range spettrale infrarosso

Rivelatore a fluorescenza

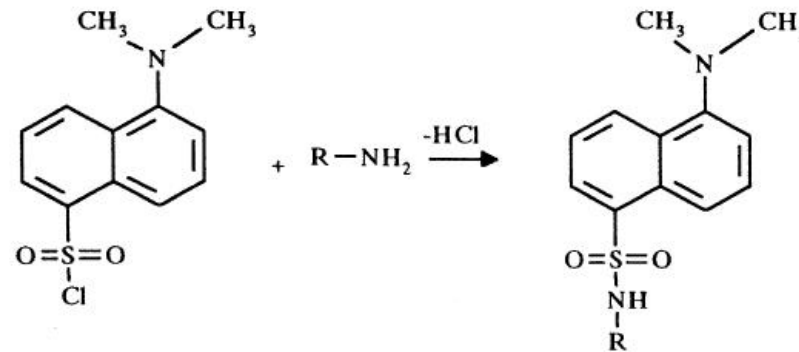
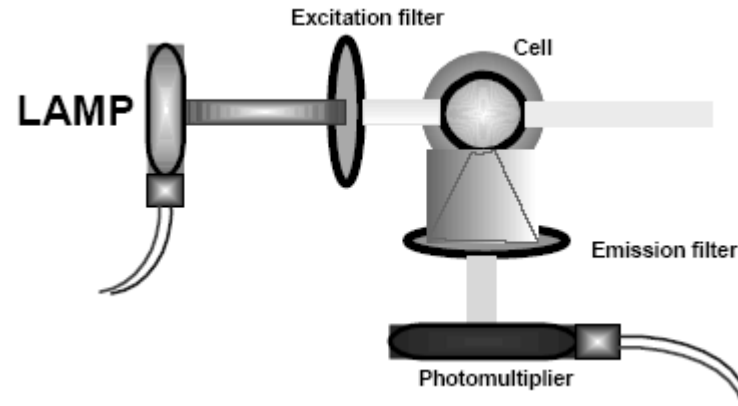
Un composto fluorescente assorbe un fotone (es., transizione elettronica $\pi - \pi^*$) ed emette un altro fotone a lunghezza d'onda maggiore

La luce UV proveniente da una lampada (filtrata alla opportuna λ) o da un laser, passa attraverso la cella a flusso. Quando un campione fluorescente passa attraverso la cella, assorbe la radiazione, viene eccitato e quindi emetterà la radiazione di fluorescenza ad una maggiore λ . L'intensità della luce emessa viene misurata attraverso un fotomoltiplicatore posto a 90° rispetto al fascio incidente.

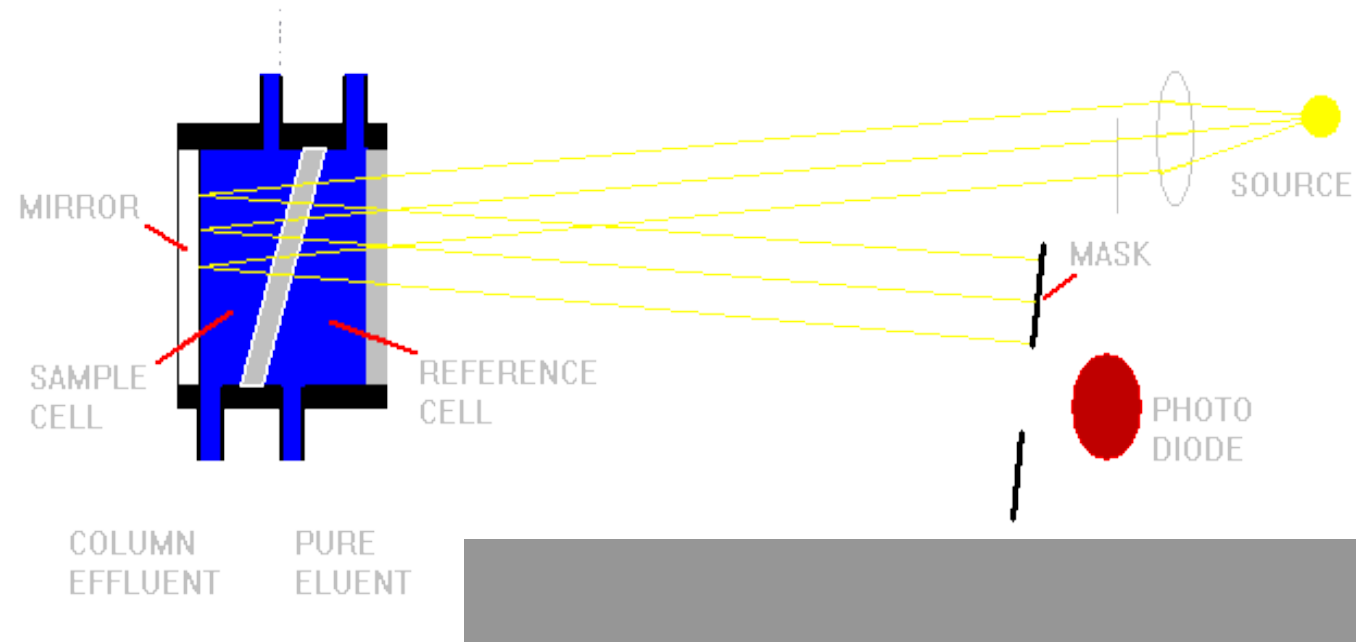


Rivelatore a fluorescenza

- sensibilità 1000 volte superiore rispetto all'assorbimento UV-visibile
- sensibilità tipica: 0.01 ppb
- limitato alla rivelazione di composti fluorescenti, ma è possibile la derivatizzazione
- è un sistema non distruttivo (tranne che con derivatizzazione)

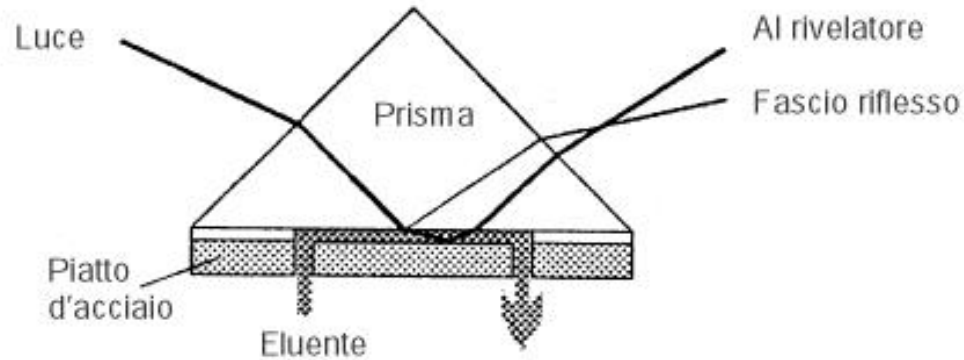


Rivelatore a indice di rifrazione



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

Rivelatore a indice di rifrazione

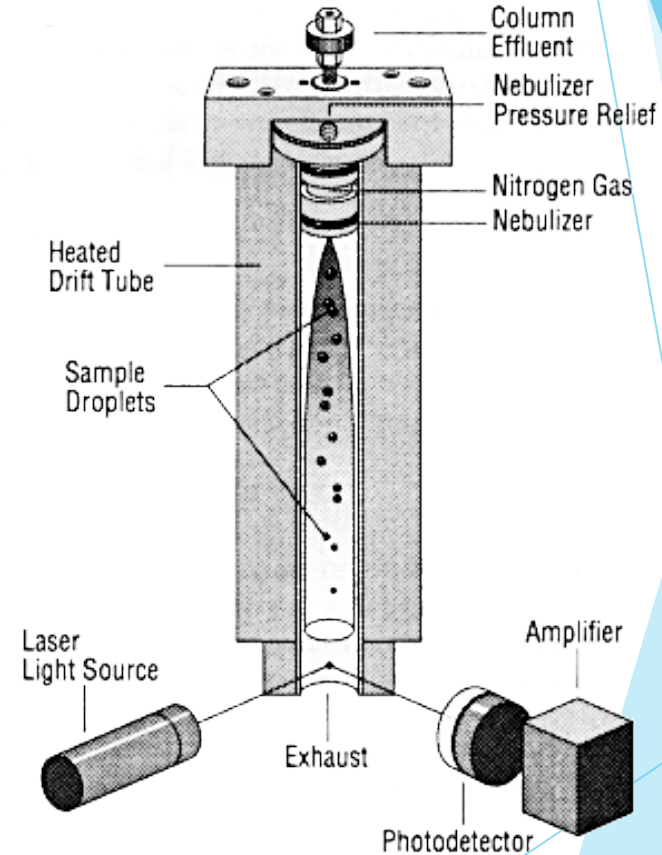


- ▶ basato sulla misura dell'indice di rifrazione dell'eluato (tipico rivelatore *bulk*)
- ▶ non adatto con eluizione in gradiente

- sensibilità tipica: 0. 1 ppm
- completamente aspecifico
- necessita di termostatazione accuratissima
- si usa per composti non attivi nel range UV-visibile (zuccheri)
- è un sistema non distruttivo
- Meno selettivo di altri detector poiché l'indice di rifrazione è meno specifico per le varie sostanze e può essere influenzato anche da soluti presenti nella fase mobile.

Rivelatore evaporative light scattering

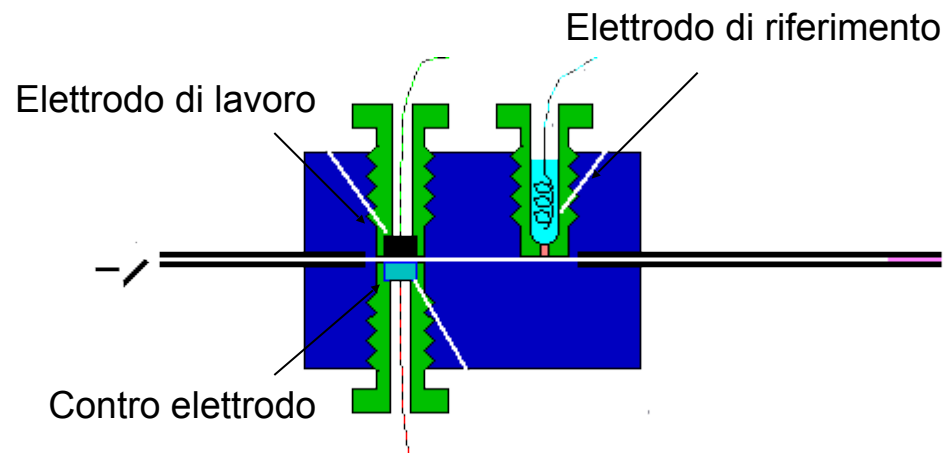
- ▶ l'eluato è trasformato in aerosol, desolvato e mandato in una cella nella quale si misura lo scattering della luce
- ▶ necessita di fasi mobili volatili
- ▶ ideale per composti ad alto PM, zuccheri e acidi non volatili
- ▶ è un sistema distruttivo



Rivelatore elettrochimico

- ▶ tra i più sensibili (sensibilità tipica: 1 ppt, femtomoli in modalità amperometrica)
- ▶ possibilità di misura in
 - ▶ voltammetria (per applicazioni particolari)
 - ▶ amperometria
 - ▶ coulometria (raro)
 - ▶ conducimetria (utilizzato in cromatografia ionica)
- ▶ generalmente poco adatto all'eluizione in gradiente

Rivelatore elettrochimico amperometrico



Questo rivelatore permette l'analisi di composti elettroattivi che possono essere cioè ossidati o ridotti. Ad esempio possono essere elettrochimicamente ossidati fenoli, ammine, mercaptani, perossidi, purine e alcuni eterocicli. Mentre possono essere elettrochimicamente ridotti aldeidi, chetoni e nitrocomposti.

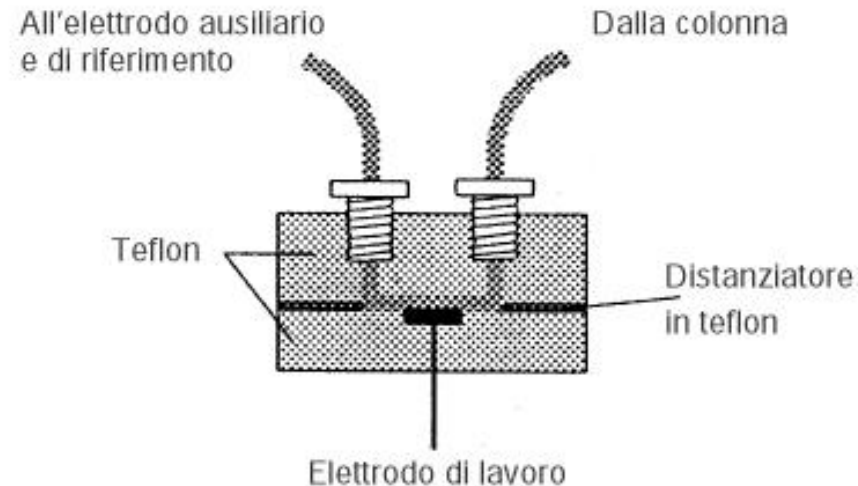
Un potenziale costante viene mantenuto tra l'elettrodo di lavoro e l'elettrodo di riferimento e la corrente, prodotta dalla reazione di ossidazione o riduzione dell'analita, è misurata tra l'elettrodo di lavoro e il contro elettrodo ed è proporzionale alla concentrazione di analita nel campione. Per soluti ossidabili si utilizzano elettrodi in Cu o glassy carbon, mentre per specie riducibili si utilizzano in genere elettrodi di Hg.

Poiché sono necessari eluenti conduttivi, questo tipo di rivelatori è utilizzato nelle separazioni a fase inversa impiegando solventi acquosi o polari contenenti elettroliti disciolti, generalmente dei tamponi.

Rivelatore elettrochimico amperometrico

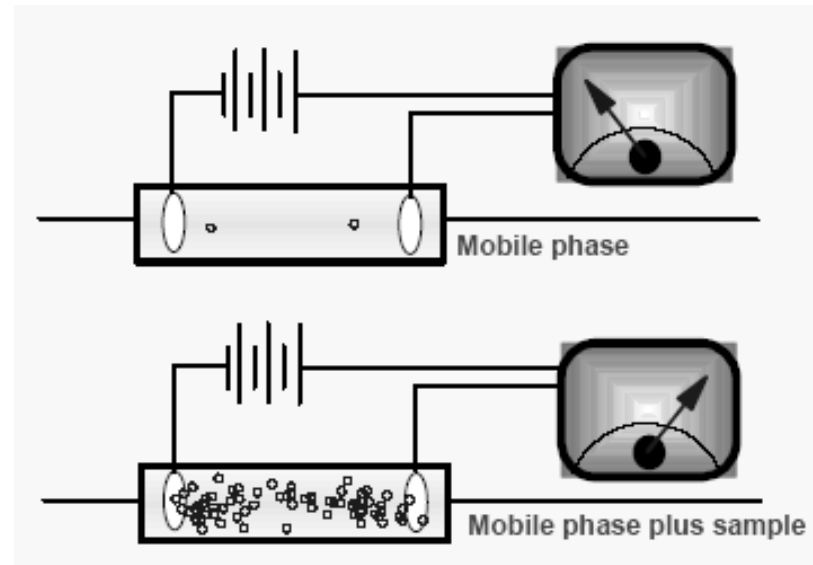
- ▶ basata sulla misura della corrente risultante da un'elettrolisi (ossidazione o riduzione) di molecole di analita alla superficie di un elettrodo
- ▶ il più sensibile tra i rivelatori per LC (fino a femtomoli per alcune applicazioni \Rightarrow dopamina)
- ▶ utilizzabile per tutte le sostanze elettroattive nel range di potenziale dell'elettrodo di lavoro impiegato

- possibile avvelenamento degli elettrodi
- utilizzo non semplice
- è un sistema parzialmente distruttivo



Rivelatore elettrochimico: conducimetria

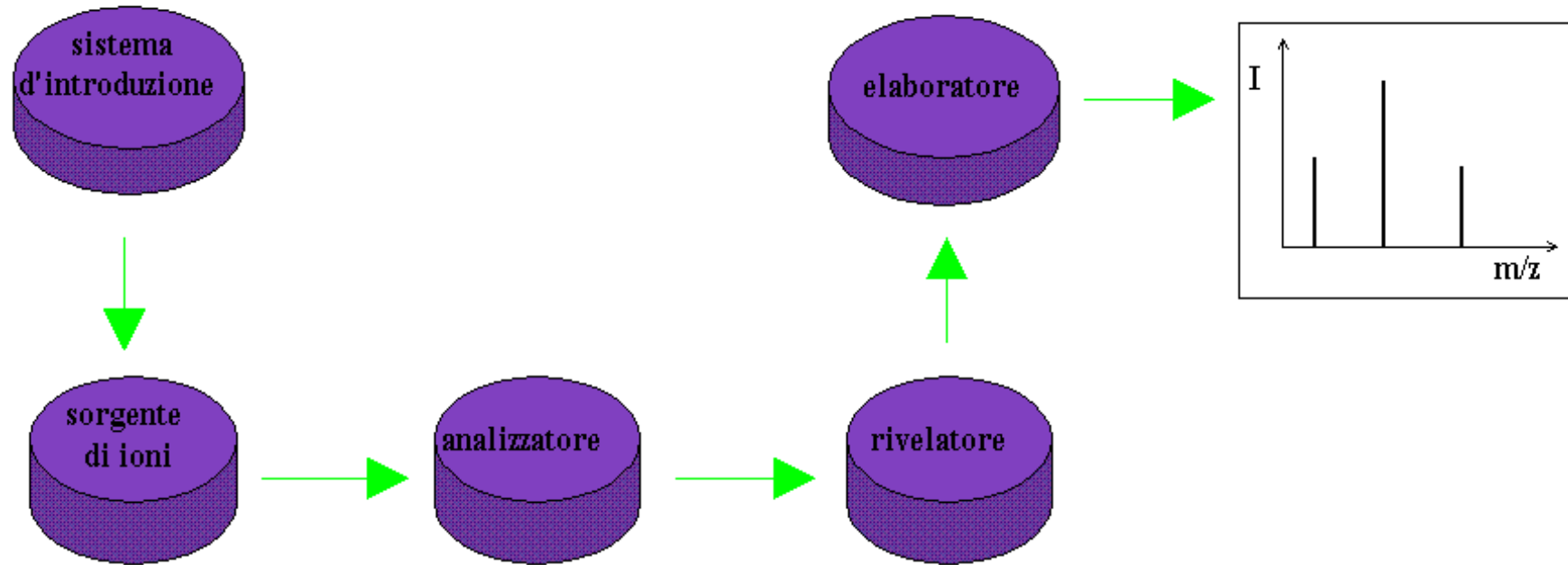
- ▶ basato sulla misura della corrente elettrica trasportata da ioni disciolti in un campo elettrico
- ▶ utile per sostanze ioniche o ionizzabili
- ▶ rivelatore più comune in cromatografia ionica
- sensibilità inferiore rispetto al rivelatore amperometrico
- utilizzo molto semplice
- è un sistema non distruttivo



Rivelatore a spettrometria di massa

La spettrometria di massa è una tecnica analitica in grado di ionizzare atomi e/o molecole e quindi di separarli e rivelarli come ioni gassosi in base al rapporto massa/carica (m/z). Il suo impiego consente di identificare composti incogniti (organici, inorganici e biomolecole), di ottenere informazioni strutturali e, mediante l'accoppiamento con altre tecniche analitiche quali la gascromatografia e la cromatografia liquida, di effettuare un'analisi quantitativa di analiti in miscele complesse. La spettrometria di massa si basa sulla ionizzazione di una molecola per assorbimento di energia (elettrica, termica, meccanica ed elettromagnetica).

Diagramma a blocchi di un generico spettrometro di massa.



Il campione, immesso nello spettrometro dal dispositivo d'introduzione viene ionizzato nella sorgente dando luogo ad un fascio di ioni positivi o negativi che vengono separati dall'analizzatore di massa in funzione al rapporto m/z e rivelati da un detector che trasforma il fascio ionico in un segnale elettrico; quest'ultimo viene registrato ed elaborato da un computer in uno spettro di massa

Gli analizzatori

Negli spettrometri di massa la funzione degli analizzatori è quella di separare gli ioni in base al rapporto carica/massa.

Sulla base della dipendenza dal tempo di uno o più parametri del sistema analizzatore sono stati suddivisi in due gruppi:

1. *analizzatori statici:*

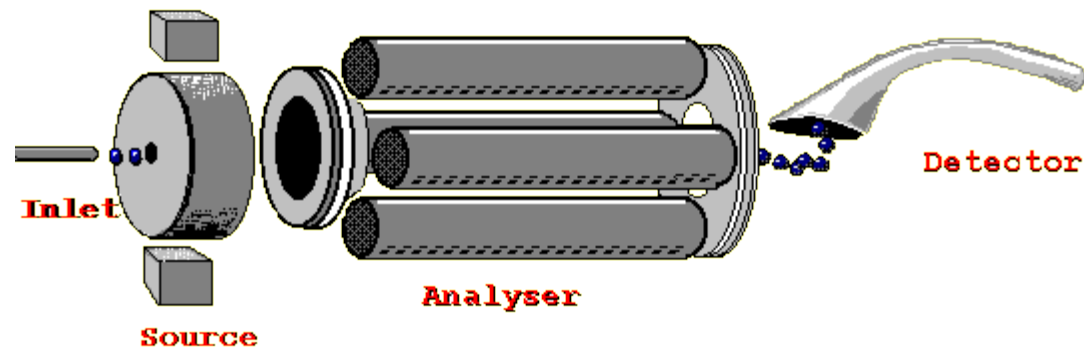
- *settori magnetici* a semplice o doppia focalizzazione; (originariamente i campi elettrici e magnetici venivano mantenuti costanti rispetto al tempo). Sono noti anche come analizzatori di quantità di moto.

2. *analizzatori dinamici:* a loro volta possono essere suddivisi in diversi sottogruppi:

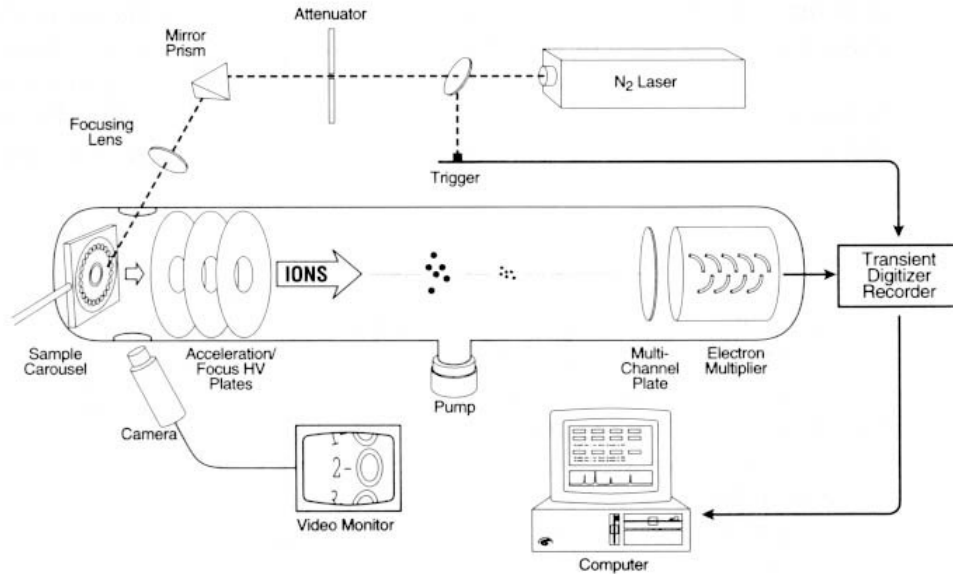
- analizzatori a stabilità di percorso (*quadrupolo*)
- analizzatori a tempo di volo (*TOF=Time Of Flight*)
- analizzatori a trappola ionica (ion trap e FT-ICR= Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance)

Caratteristiche del quadrupolo

- semplicità e la compattezza
- elevata velocità di scansione
- elevata sensibilità
- sufficiente risoluzione
- possibilità di effettuare rapide inversioni di polarità degli elettrodi



Analizzatori a tempo di volo (TOF)



Il principio essenziale dell'analizzatore a tempo di volo è che se gli ioni con differenti masse sono accelerati alla stessa energia cinetica, ciascuno ione acquista una velocità caratteristica che dipende dal suo valore di m/z .

Il tempo di volo presenta altri **vantaggi** oltre alla sua *semplicità* e *robustezza*:

- *la velocità*: l'intero spettro di massa è ottenuto in ogni singolo ciclo di misura senza necessità di scansione di voltaggi e correnti ed i tempi di volo richiedono da 1 a 30 μs ;
- *la sensibilità*: poiché gli ioni attraversano pochi elementi ottici, la loro trasmissione dal punto di ionizzazione al detector è usualmente più alta di qualsiasi altro analizzatore (si potrebbe arrivare ad analizzare quantità femtomolari);
- *un intervallo di masse da analizzare praticamente illimitato* (potrebbero essere rilevati ioni a singola carica fino a 1Mda).

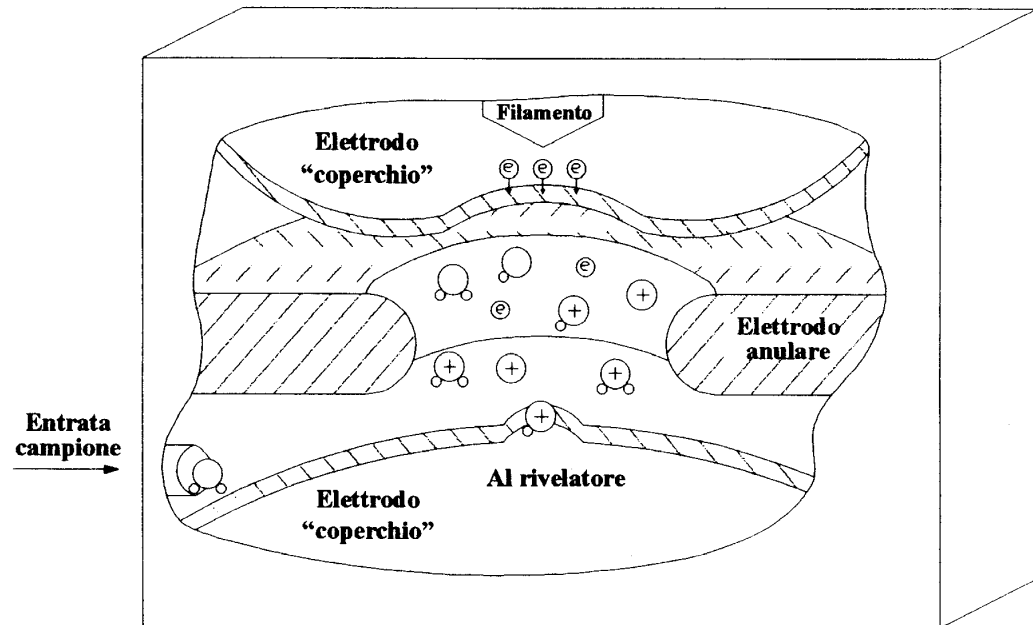
Analizzatori a trappola ionica

Una trappola ionica è un dispositivo in cui ioni gassosi possono essere trattieneuti nel suo interno per prolungati periodi di tempo mediante l'applicazione di campi elettrici e/o magnetici.

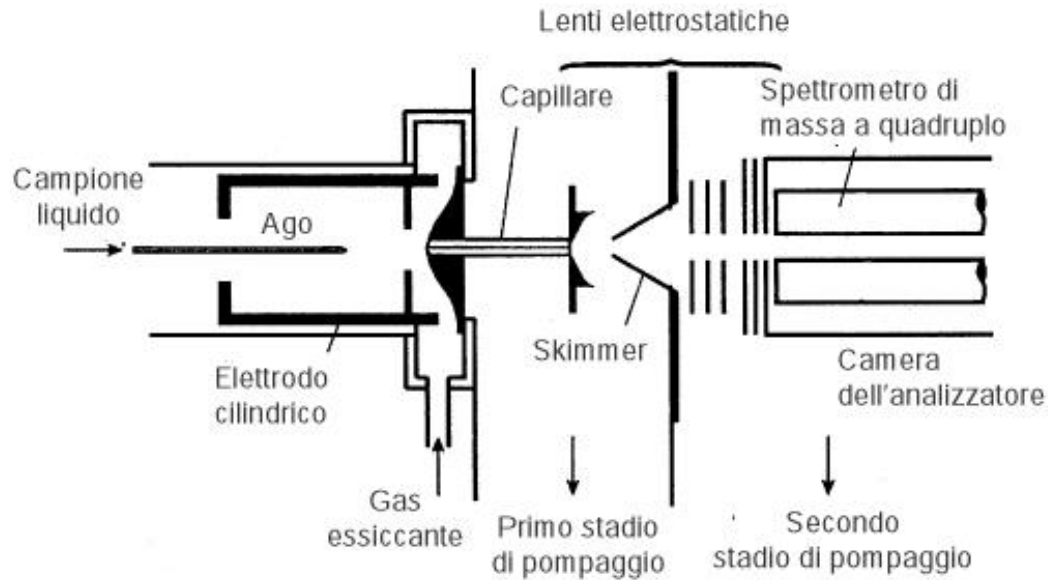
Sono state studiate diversi tipi di trappole, ma quelle più comuni sono due:

1. trappola ionica quadrupolare (più semplice)
2. trappola ionica a risonanza di ciclotrone (più complessa)

E' simile al quadrupolo, ma in esso il filtro a quadrupolo e' sferico e trattiene tutti gli ioni che vengono rilasciati progressivamente verso il rivelatore variando il campo elettrico.



Rivelatore a spettrometria di massa



- ▶ il detector finale: sensibile, selettivo e universale, può permettere la caratterizzazione chimica del campione
- ▶ possibilità di discriminare analiti coeluiti in modalità SIM

- sensibilità tipica: 0.1 ppb
- limitato dall'interfaccia e dalla necessità di rimuovere il solvente dal campione
- gli analiti devono essere ionizzabili

Analytical, Nutritional and Clinical Methods

HPLC-UV determination of total vitamin C in a wide range of fortified food products

Patric Fontannaz, Tamara Kiliç, Olivier Heudi *

Department of Quality Assurance, Nestlé Research Center, Nestec Ltd., Vers-chez-les-Blanc, 1000 Lausanne 26, Switzerland

Received 12 August 2004; received in revised form 28 January 2005; accepted 14 February 2005

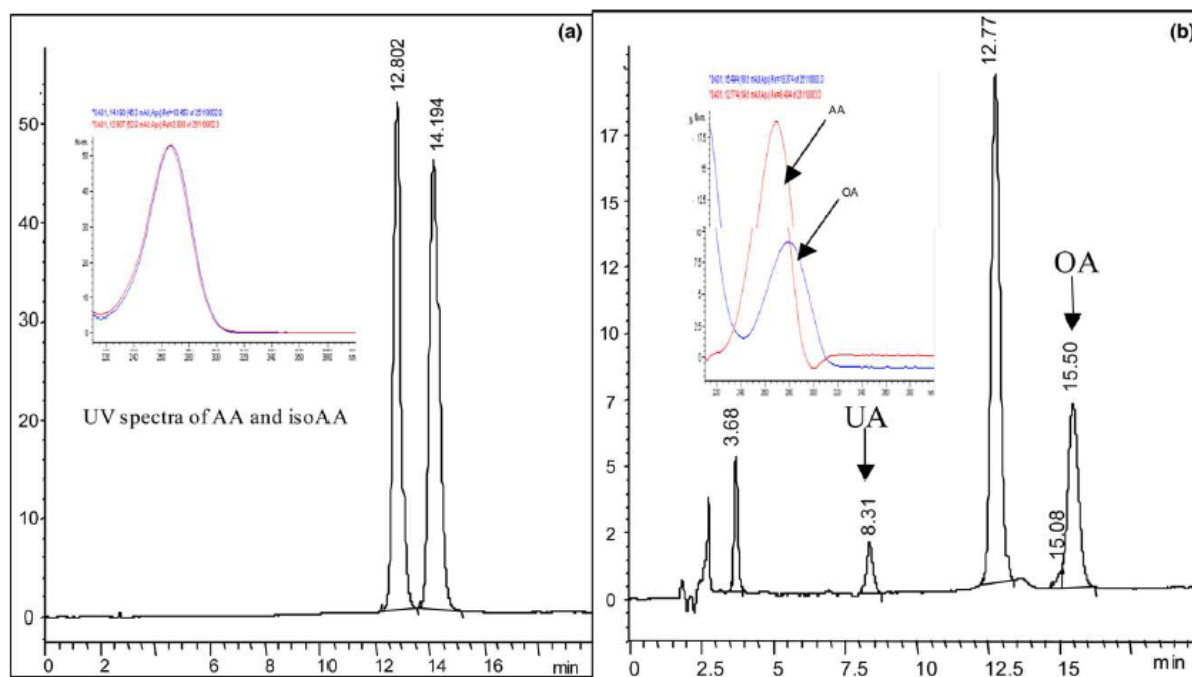


Fig. 1. HPLC-UV chromatograms of (a) AA and isoAA standards and (b) a dietetic milk powder. The retention times of AA and that of isoAA are 12.8 and 14.19 min, respectively. UA, uric acid; OA, orotic acid.

Analysis of ethyl carbamate in Korean soy sauce using high-performance liquid chromatography with fluorescence detection or tandem mass spectrometry and gas chromatography with mass spectrometry

Sung-Kug Park ^a, Cheong Tae Kim ^b, Joo-Won Lee ^c, Ok Hwa Jhee ^{c,d}, Ae Seon Om ^d, Ju Seop Kang ^c, Tae Wha Moon ^{b,*}

^a Center for Food Standard Evaluation, Korea Food and Drug Administration, 231 Jinheungno, Eunpyeong-gu, Seoul 122-704, Republic of Korea

^b School of Agricultural Biotechnology and Center for Agricultural Biomaterials, Seoul National University, San 56-1, Sillim-dong, Gwanak-gu, Seoul 151-921, Republic of Korea

^c Department of Pharmacology, College of Medicine, Hanyang University, 17 Heangdang-dong, Sungdong-gu, Seoul 133-791, Republic of Korea

^d Department of Food and Nutrition, College of Human Ecology and Institute of Biomedical Science, Hanyang University, 17 Heangdang-dong, Sungdong-gu, Seoul 133-791, Republic of Korea

Received 19 December 2005; received in revised form 19 May 2006; accepted 26 May 2006

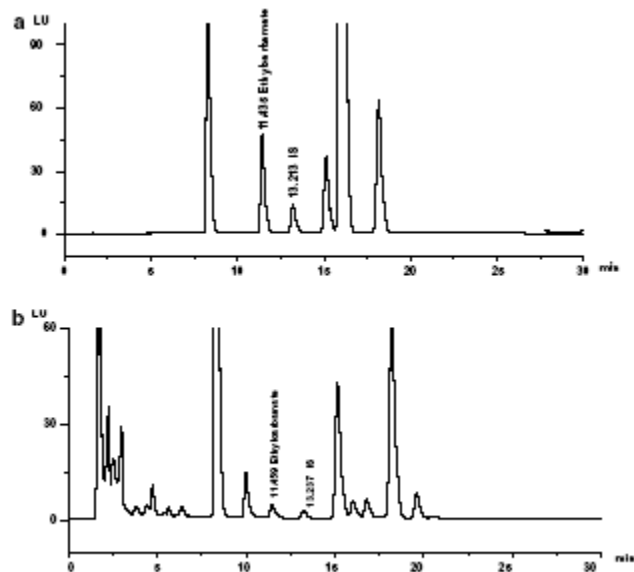


Fig. 2 HPLC/FLD chromatograms of ethyl carbamate and propyl carbamate. ((a) standard, (b) soy sauce).

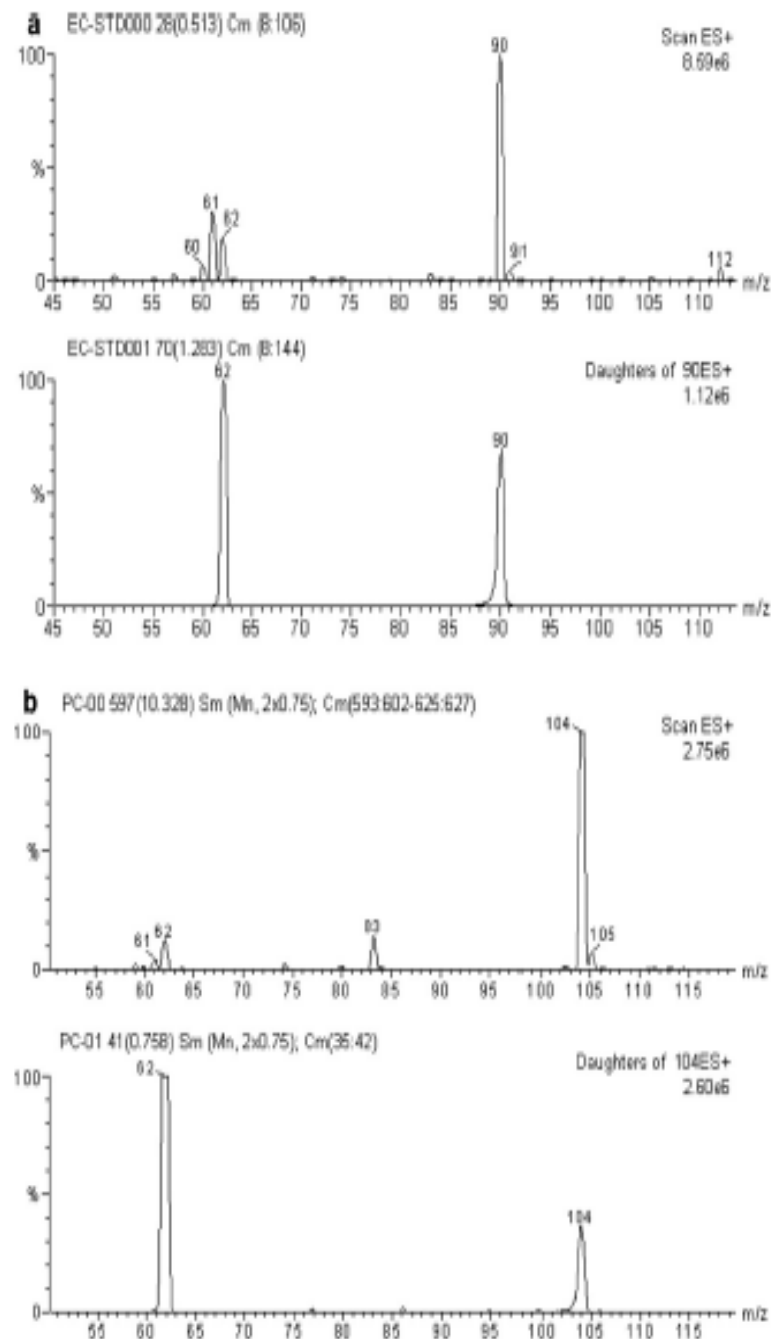


Fig. 4 Full and daughter-ion scan spectra of ethyl carbamate (a) and propyl carbamate (b).

Quantitative analysis of flavonols, flavones, and flavanones in fruits, vegetables and beverages by high-performance liquid chromatography with photo-diode array and mass spectrometric detection

Ulla Justesen*, Pia Knuthsen, Torben Leth

Danish Veterinary and Food Administration, Markhøj Bygade 19, DK-2860 Søborg, Denmark

Received 23 July 1997; received in revised form 7 October 1997; accepted 17 October 1997

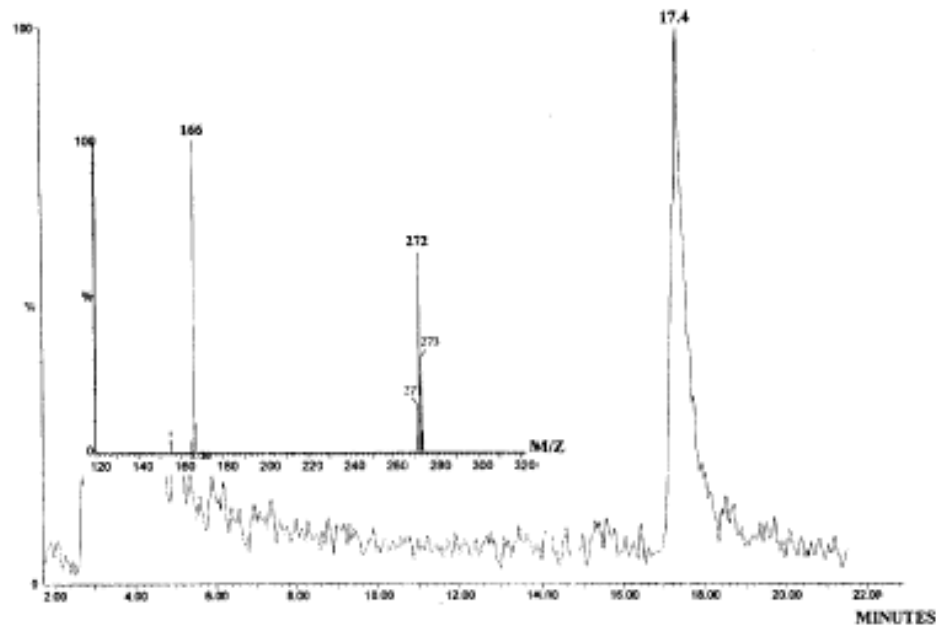


Fig. 3. HPLC-MS analysis of a hydrolysed tomato sample. Ion chromatogram of m/z 272 and mass spectrum at t_r 17.4 min. Identified as naringenin by comparison with commercial standard.

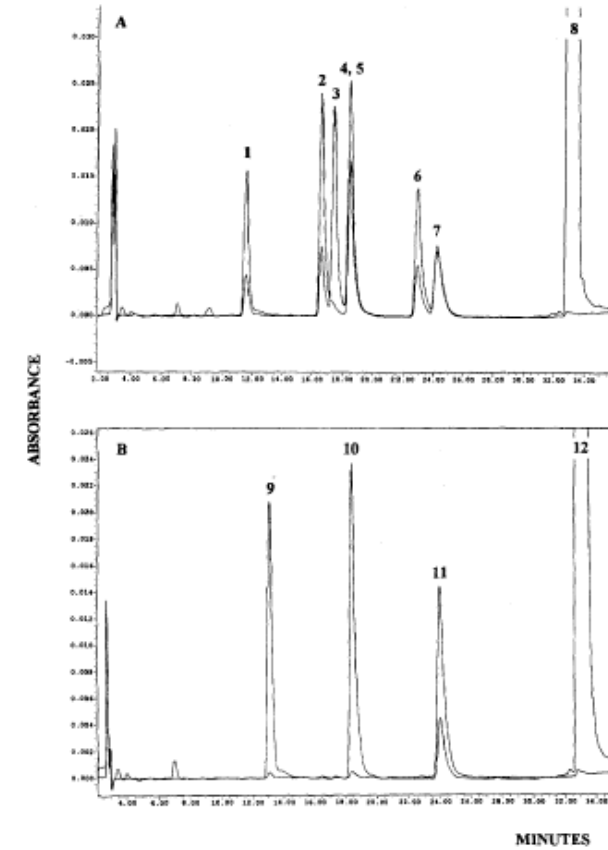


Fig. 2. HPLC chromatograms of the standard mixtures recorded at 290 and 365 nm. (A) 1, Myricetin; 2, quercetin; 3, naringenin; 4, luteolin; 5, hesperetin; 6, kaempferol; 7, apigenin; 8, BHA (antioxidant); (B) 9, eriodictyol; 10, phloretin; 11, isorhamnetin; 12, BHA.

Multi-class analysis of new psychoactive substances and metabolites in hair by pressurized liquid extraction coupled to HPLC-HRMS

Camilla Montesano,^{a*} Gabriele Vannutelli,^a Maristella Massa,^a Maria Chiara Simeoni,^b Adolfo Gregori,^c Luigi Ripani,^c Dario Compagnone,^b Roberta Curini^a and Manuel Sergi^{b*}

In this paper, an analytical method has been developed and validated for the analysis of new psychoactive substances (NPS) and metabolites in hair samples. The method was based on pressurized liquid extraction (PLE) followed by solid-phase extraction (SPE) clean-up and high performance liquid chromatography-high resolution mass spectrometry (HPLC-HRMS) analysis. To evaluate extraction efficiency and the applicability of the method, hair samples were fortified by soaking in order to obtain a good surrogate for drug user's hair; the amount of incorporated drug related to their lipophilicity, similarly to *in vivo* drug incorporation. To the best of our knowledge, this is the first method that allowed for the analysis of both cathinones (5) and synthetic cannabinoids (7) in hair with a single extraction procedure and chromatographic run. A phenethylamine (2C-T-4), 4-fluorophenylpiperazine and methoxetamine were also included showing that PLE coupled to SPE clean-up was suitable for a multi-class analysis of NPS in hair. In addition, the use of PLE significantly reduced hair analysis time: decontamination, incubation, clean-up, and liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) analysis were carried out in approximately 45 min. The method was fully validated according to Scientific Working Group for Forensic Toxicology (SWGTOX) and Society of Hair Testing (SoHT) guidelines. Limit of quantification (LOQ) values ranged from 8 to 50 $\mu\text{g mg}^{-1}$ for cathinones, phenethylamines and piperazines, and from 9 to 40 $\mu\text{g mg}^{-1}$ for synthetic cannabinoids (10 $\mu\text{g mg}^{-1}$ for methoxetamine). Matrix effects were below 15% for all the analytes, demonstrating the effectiveness of the clean-up step. Inaccuracy was lower than 9% in terms of bias. Copyright © 2016 John Wiley & Sons, Ltd.

Keywords: new psychoactive substances; cathinones; synthetic cannabinoid; hair; HPLC-HRMS

Analyte	Elemental composition	Retention time	Precursor ion	Monitored fragments	Quantifier/Qualifier ratio
2-FMC	$\text{C}_{10}\text{H}_{17}\text{FNO}$	2.10	182.1	164.08656 143.06313	4.1
2-Methoxymethcathinone	$\text{C}_{11}\text{H}_{19}\text{NO}_2$	2.56	194.1	176.10667 163.08319	10.2
4-FPP	$\text{C}_{12}\text{H}_{17}\text{FN}_2$	2.61	181.1	167.33555 138.07132	19.4
Mephedrone	$\text{C}_{11}\text{H}_{17}\text{NO}$	2.81	178.1	160.11166 145.08817	5.0
Methoxetamine	$\text{C}_{12}\text{H}_{19}\text{NO}_2$	3.18	248.1	203.10669 175.11182	1.4
α -PVP	$\text{C}_{13}\text{H}_{21}\text{NO}$	3.40	232.1	161.09618 126.12792	1.6
MDPV	$\text{C}_{13}\text{H}_{21}\text{NO}_3$	3.48	276.1	175.07486 149.02259	1.3
2C-T-4	$\text{C}_{11}\text{H}_{17}\text{NO}_2$	4.10	256.1	239.10930 197.06262	1.1
JWH-200	$\text{C}_{20}\text{H}_{29}\text{N}_3\text{O}_2$	4.76	385.1	155.04877 114.09135	1.5
WIN 55, 212-2	$\text{C}_{22}\text{H}_{33}\text{N}_5\text{O}_6$	5.91	427.2	203.12752 155.04887	1.8
JWH-018/N-(5-hydroxypentyl)	$\text{C}_{15}\text{H}_{23}\text{NO}_2$	5.95	358.1	155.04872 91.05761	66.6
MAM-2201 N-(5-pentanoic acid)	$\text{C}_{22}\text{H}_{33}\text{NO}_3$	5.98	386.1	169.06448 155.05922	7.9
JWH-25.0	$\text{C}_{22}\text{H}_{33}\text{NO}_2$	6.28	336.2	121.06479 188.14323	1.3
JWH-081	$\text{C}_{23}\text{H}_{35}\text{NO}_2$	6.43	372.2	214.12218 185.05939	3.2
URB-144	$\text{C}_{23}\text{H}_{35}\text{NO}$	6.55	312.2	214.12209 125.06992	6.2

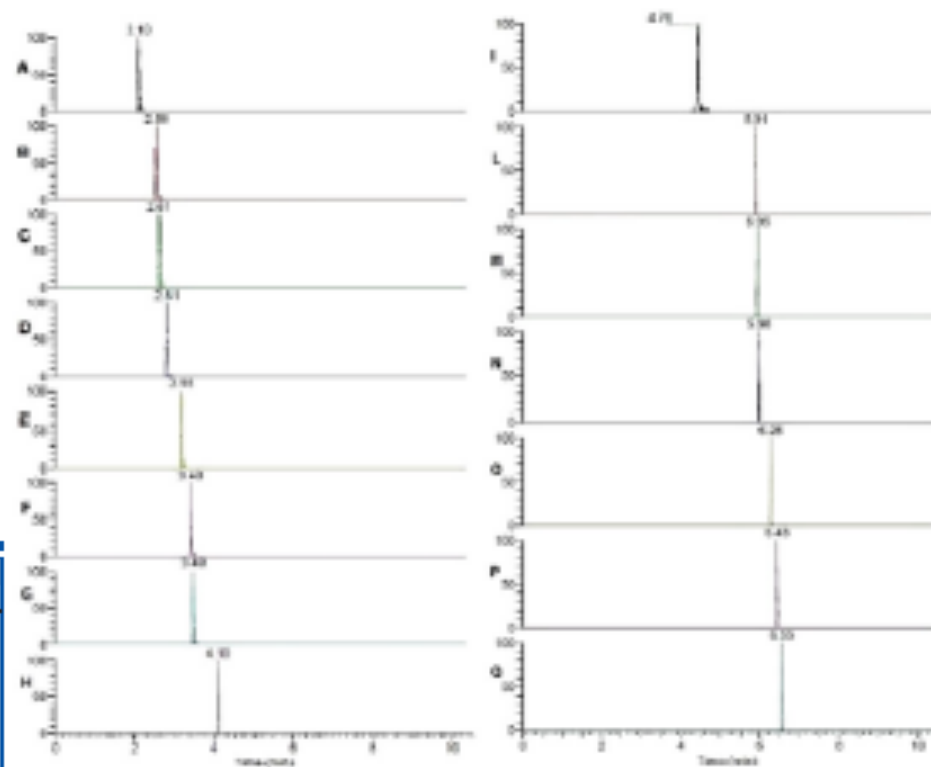
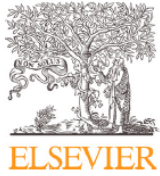


Figure 1. Extracted ion currents for the selected analytes obtained by targeted MS/MS scan from a spiked hair sample: 2-FMC (A); 2-methoxymethcathinone (B); 4-FPP (C); mephedrone (D); methoxetamine (E); α -PVP (F); MDPV (G); 2C-T-4 (H); JWH-200 (I); WIN 55, 212-2 (L); JWH-018/N-(5-hydroxypentyl) (M); MAM-2201 N-(5-pentanoic acid) (N); JWH-25.0 (O); JWH-081 (P); URB-144 (Q).



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Chromatography A

journal homepage: www.elsevier.com/locate/chroma

Targeted and semi-untargeted determination of phenolic compounds in plant matrices by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

Eleonora Oliva, Eduardo Viteritti, Federico Fanti, Fabiola Eugelio, Alessia Pepe, Sara Palmieri, Manuel Sergi*, Dario Compagnone

University of Teramo, Faculty of Bioscience and Technology for Food, Agriculture and Environment, Teramo, Italy

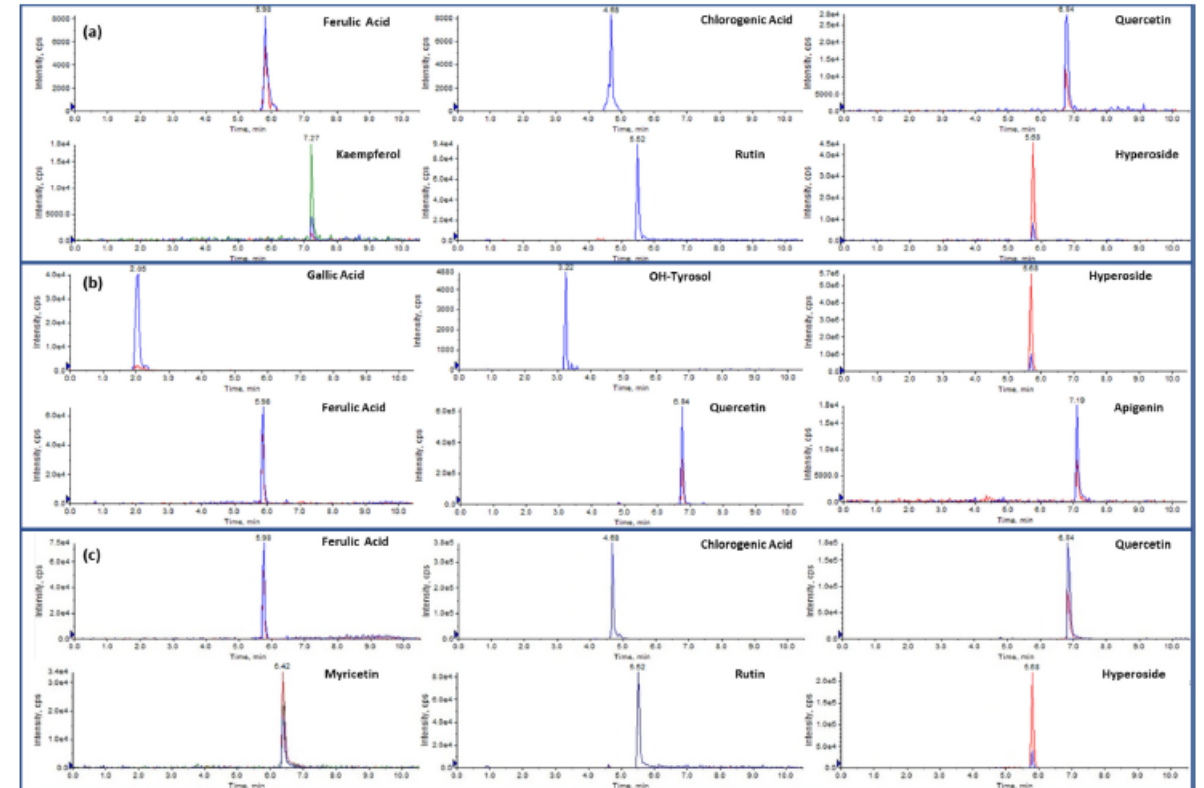


Fig. 1. Chromatographic profiles obtained with the MRM method expressed as extracted ion currents (XICs) of curry leaves (a), hemp (b) and blueberry (c).

