

# PREPARAZIONE DEL CAMPIONE:

Tecniche estrattive

# Metodologia o scelte strategiche

- Natura del quesito analitico
- Natura del campione
- Natura dell'analita
- Strumentazione analitica disponibile

# Natura del quesito analitico

- analisi quali- e/o quantitativa
- analisi di tracce
- analisi multicomponente

# Natura del campione

- matrice solida, liquida o gassosa
- matrice semplice o complessa
- interazioni analiti- matrice
- concentrazione presunta analiti in matrice

# Natura dell'analita

- proprietà chimico fisiche
- reattività
- rivelabilità analitica

# Preparazione campione

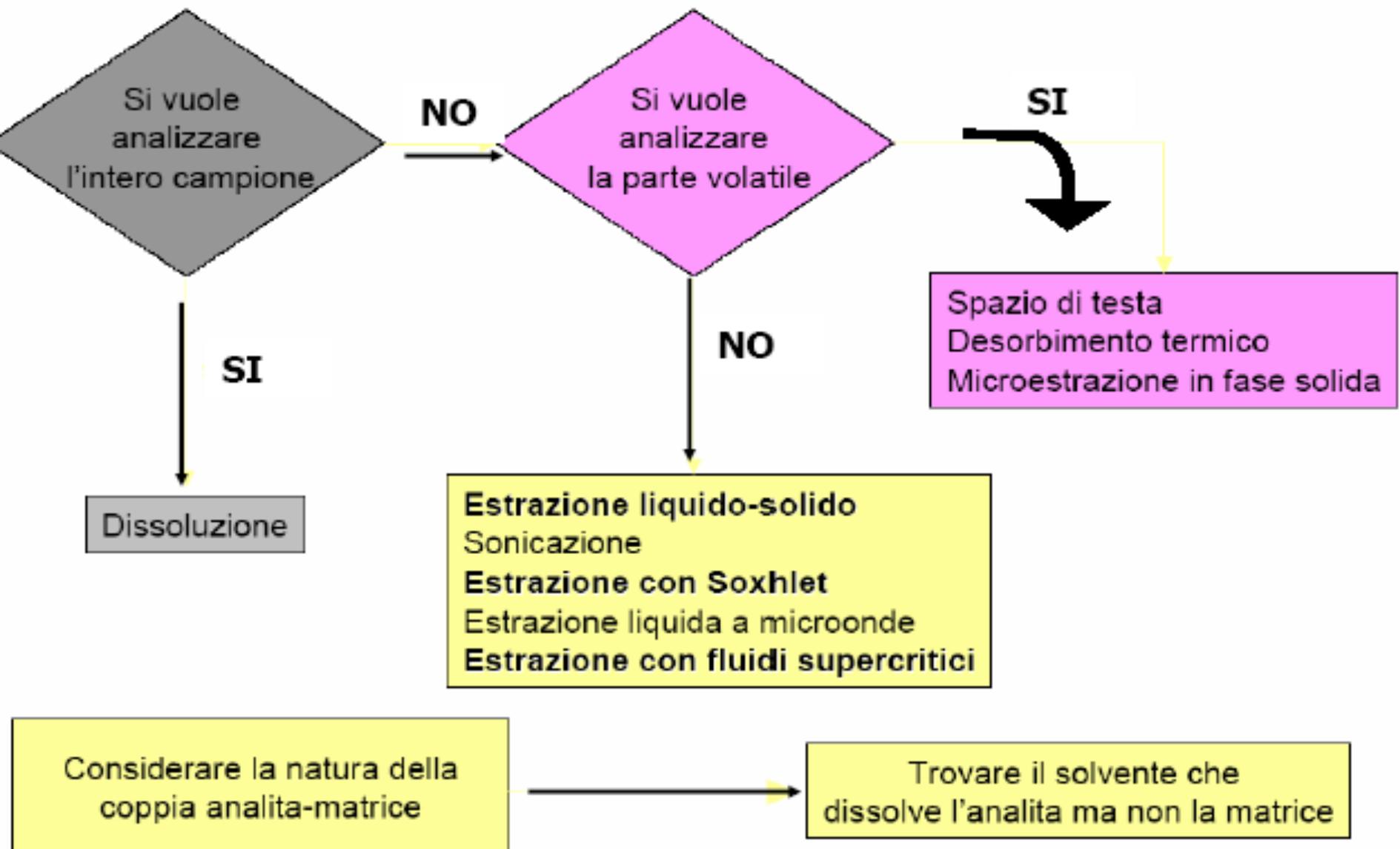
**preparare campione = renderlo adatto alla tecnica analitica prescelta**

- solvente e pH
- concentrazione
- forma molecolare rilevabile
- assenza di interferenze

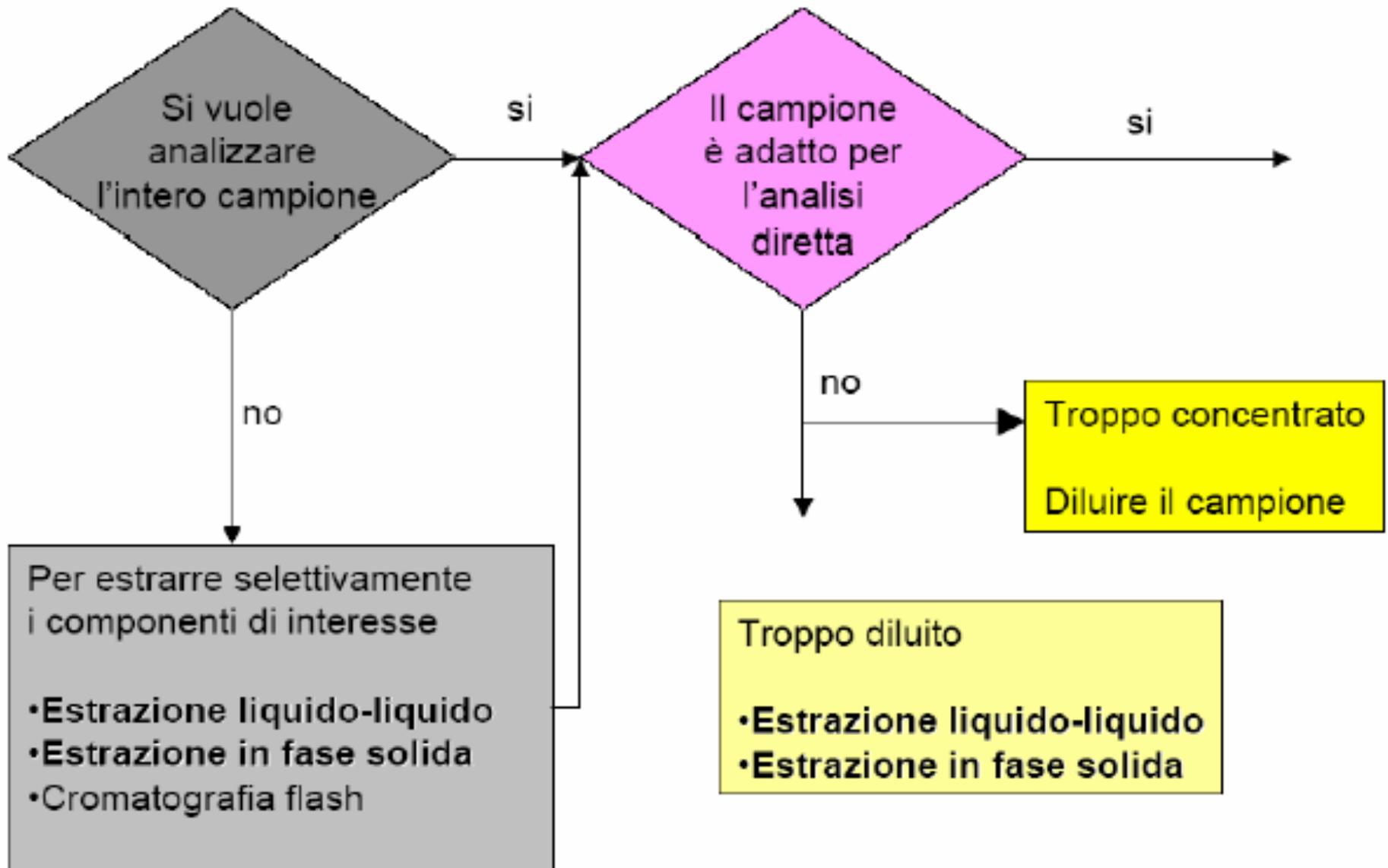
# **TECNICHE ESTRATTIVE**

- **Estrazione liquido-solido. Dissoluzione**
- **Estrazione liquido-solido in continuo (Soxhlet)**
- **Estrazione liquido-liquido (LLE)**
- **Estrazione in fase solida (SPE)**
- **Estrazione accelerata con solvente (ASE)**
- **Estrazione a dispersione di fase solida (MSPD)**
- **Microestrazione in fase solida (SPME)**
- **Tecnica dello spazio di testa**

# Campione solido



# Campione liquido



# Solventi per estrazione

Solvente	Bp (C°)	Infiammabilità	Tossicità	Commenti
n-Esano	69	++++	+	Per composti apolari, facilmente seccabile
N-Eptano	98	++++	+	Per composti apolari, facilmente seccabile
Benzene	80.1	+++	+++++	
Diclorometano	40	0	++	Facilmente seccabile, forma emulsioni
Cloroformio	61.7	0	++++	Facilmente seccabile, forma emulsioni
Etere etilico	34.5	++++	++	Buon solvente generale, assorbe molta acqua
Etile acetato	77.1	+	+	Per composti polari, assorbe acqua
2-butanolo	99.5	+++	+++	Per composti molto polari, altobollente

## Electronegatività

E. è usato per indicare se un certo legame è polare, non polare, covalente o ionico.

E. è definita come la capacità di un atomo, in una certa molecola, di attirare gli elettroni dell'orbitale di legame verso di sé.

## Electronegativities of the Elements

1998 Dr. Michael Blaber

1A												3A 4A 5A 6A 7A						
H	2A											B	C	N	O	F		
21												20	25	30	35	40		
Li	Be											Al	Si	P	S	Cl		
1.0	1.5											1.5	1.8	2.1	2.5	3.0		
Na	Mg	3B	4B	5B	6B	7B	8B		1B	2B	Ga	Ge	As	Se	Br			
0.9	1.2									1.6	1.8	2.0	2.4	2.8				
K	Ca	Sc	Ti	V	Cr	Mn	Fe	Co	Ni	Cu	Zn	In	Sn	Sb	Te	I		
0.8	1.0	1.3	1.5	1.6	1.6	1.5	1.8	1.9	1.9	1.9	1.6	1.7	1.8	1.9	2.1	2.5		
Rb	Sr	Y	Zr	Nb	Mo	Tc	Ru	Rh	Pd	Ag	Cd	Tl	Pb	Bi	Po	At		
0.8	1.0	1.2	1.4	1.6	1.8	1.9	2.2	2.2	2.2	1.9	1.7	1.8	1.9	1.9	2.0	2.2		
Cs	Ba	La	Hf	Ta	W	Re	Os	Ir	Pt	Au	Hg	Tl	Pb	Bi	Po	At		
0.7	0.9	1.0	1.3	1.5	1.7	1.9	2.2	2.2	2.2	2.4	1.9	1.8	1.9	1.9	2.0	2.2		

3.0-4.0

2.0-2.9

1.5-1.9

<1.5

# Elettronegatività

Esprime l'attitudine di un atomo ad attrarre verso di sé gli elettroni; è correlata all'energia di ionizzazione e all'affinità elettronica.

Nel legame tra due atomi uguale non si ha polarizzazione del legame e quindi la specie è neutra

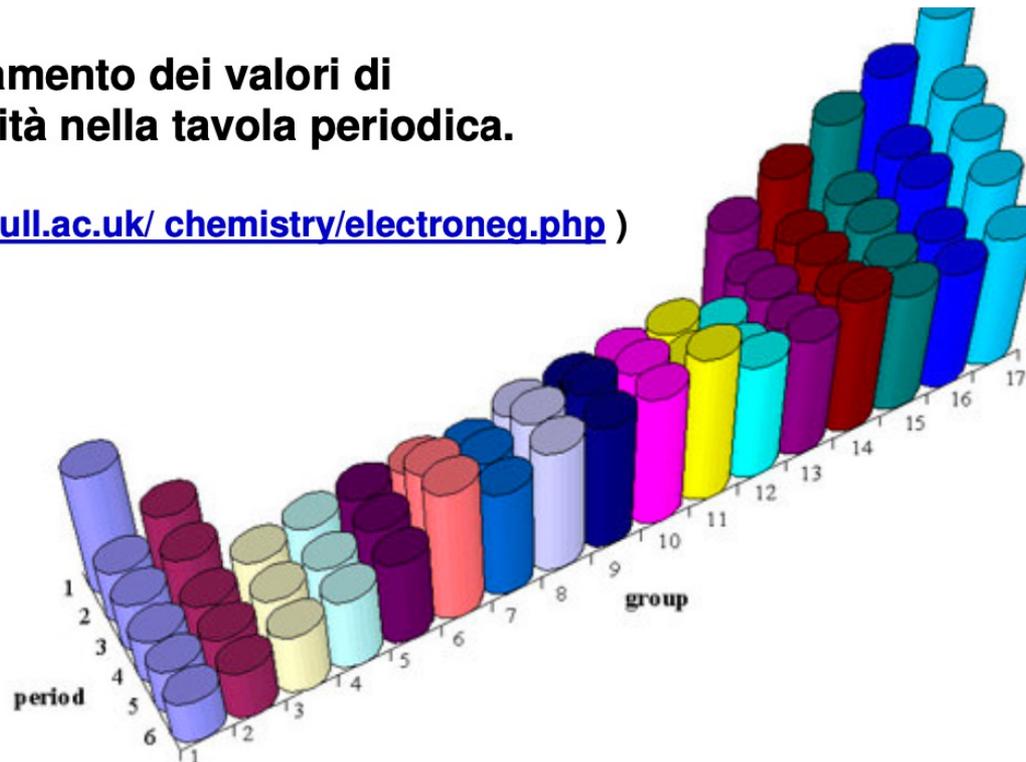
Nel legame tra due atomi diversi si ha sempre la formazione di un dipolo

**In presenza di due o più legami tra eteroatomi la specie può essere o non essere un dipolo (GEOMETRIA!)**

# Andamento dell'elettronegatività lungo la tavola periodica

**Fig.4.1 – Andamento dei valori di elettronegatività nella tavola periodica.**

(tratto da: [www.hull.ac.uk/chemistry/electroneg.php](http://www.hull.ac.uk/chemistry/electroneg.php) )



# Momento dipolare

Struttura, forma e simmetria di una molecola essenziali per capire le forze intermolecolari.

**Forze intermolecolari** che determinano lo stato di aggregazione della materia, **punto di fusione e solubilità**

La materia si aggrega sulla base di forze elettrostatiche di diversa entità, quindi la presenza di un dipolo determina l'attrazione tra molecole

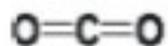
La forza del dipolo dipende da:

Distanza tra gli atomi

Carica

Grado di conicità del legame (che dipende dalla differenza di elettronegatività)

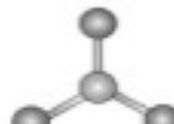
# Polarità e apolarità



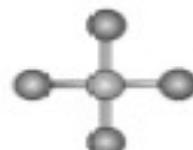
Vector  
cancellation  
nonpolar



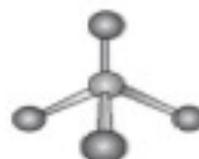
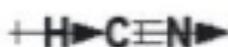
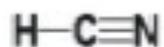
Linear



Trigonal Planar



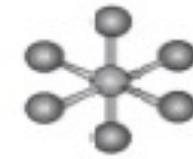
Square Planar



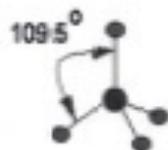
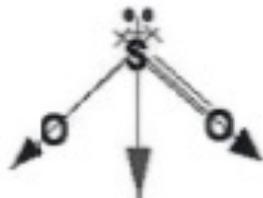
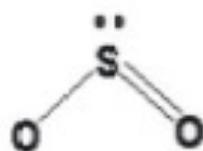
Tetrahedral



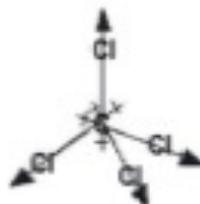
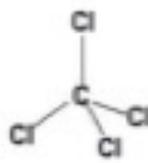
Trigonal Bipyramidal



Octahedral



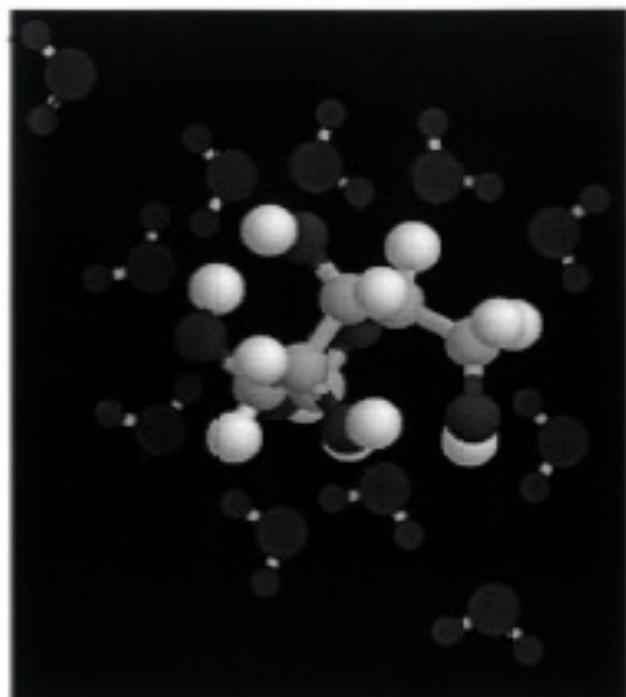
Tetrahedral



vector cancellation  
nonpolar molecule

## Idrofilicità e idrofobicità

### Glucosio in acqua



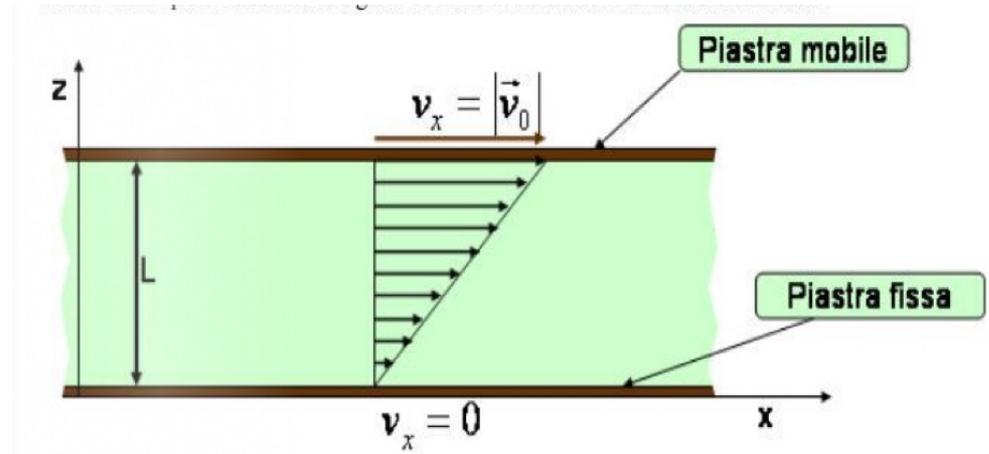
Una molecola idrofilica, o un suo gruppo, è caratterizzato da una polarizzazione elettrica ed è capace di formare legami idrogeno. Questo determina la capacità di dissolversi più facilmente in acqua piuttosto che in olio o in altri solventi non polari. Le molecole idrofiliche formano legami idrogeno con le molecole di acqua. Questo è termodinamicamente favorito e rende queste molecole solubili in acqua.

## Altre caratteristiche dei solventi e delle soluzioni: **viscosità** e **diffusione**

**Viscosità:** La viscosità rappresenta l'attrito interno.

È chiaramente visibile nei fluidi ed esprime la maggiore o minore facilità di scorrimento di uno strato rispetto a un altro adiacente.

La viscosità può essere considerata anche come un indice della resistenza alle deformazioni.



Due lastre parallele, separate da uno spazio di altezza  $L$ , occupato da un liquido; se la piastra inferiore è ferma e quella superiore, di area  $A$ , si muove con velocità costante  $v_0$ , per ottenere questo movimento occorre esercitare su di essa una forza  $F$ . Le particelle di fluido a contatto con la piastra inferiore sono ferme, mentre quelle a contatto con la piastra superiore si muovono con velocità  $v_0$ . Immaginando lo spessore di liquido compreso fra le due piastre suddiviso in strati si intuisce come le particelle appartenenti a ciascuno strato abbiano velocità minore di quella dello strato superiore e maggiore di quella dello strato inferiore.

# Viscosità

In una tecnica di estrazione la viscosità si oppone al passaggio del solvente verso gli strati più interni del campione solido.

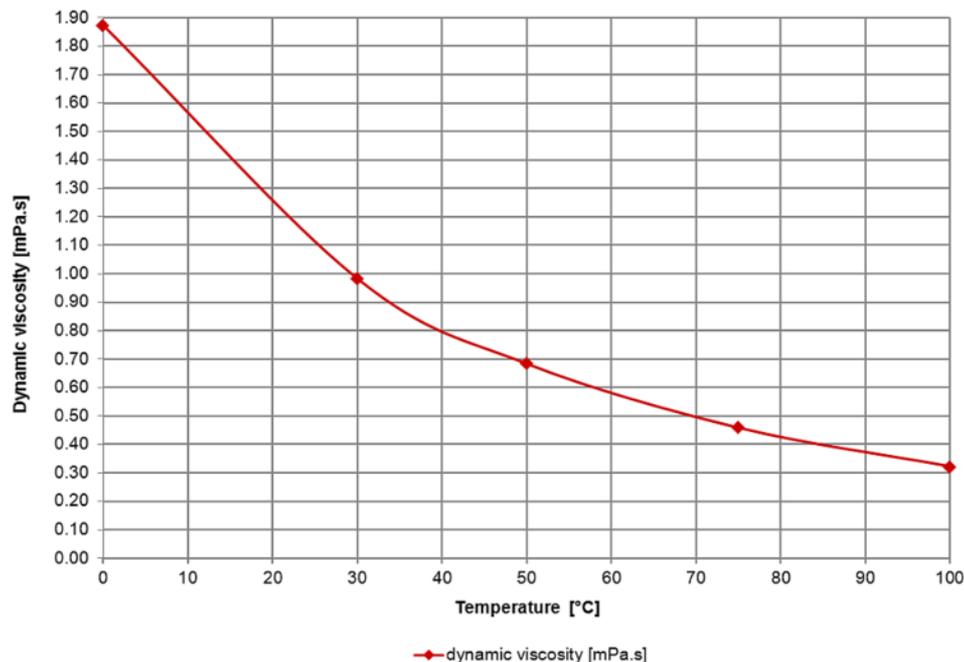
Ridurre la viscosità del solvente, a parità di polarità, è un obiettivo

La viscosità può essere ridotta aumentando la temperatura

Limiti: ebollizione del solvente, stabilità termica degli analiti, stabilità termica del campione

Nr. crt.	Solvent	$[\eta]$ , dL/g	$[\eta]'$
1	<i>n</i> -Heptane	1.5738	0.6062
2	Cyclohexane	2.2385	0.8622
3	Benzene	0.6871	0.2646
4	Toluene	0.7289	0.2807
5	<i>o</i> -Xylene	1.2697	0.4890
6	Methyl-ethyl cetone	-	-
7	Cyclohexanone	-	-
8	Ethyl acetate	-	-
9	Ethane dichloride	-	-
10	Chloroform	0.4726	0.1820
11	Carbon tetrachloride	2.5962*	1.0000
12	Trichlorethylene	1.6174	0.6229
13	Benzene chloride	0.6370	0.2453
14	oil SAE 10W	1.5355	0.5914

\*the maximum intrinsic viscosity value



## 1.1. Diffusione

Lo spostamento di massa per diffusione è il trasporto o spostamento naturale di una sostanza sotto l'influenza di un gradiente di concentrazione; le sostanze (molecole di soluto) si spostano da zone a concentrazione maggiore verso zone a concentrazione minore fino al raggiungimento dell'equilibrio.

La velocità di diffusione è regolata dalla legge di Fick:

$$v = D \cdot A \cdot \Delta c / l$$

Dove:

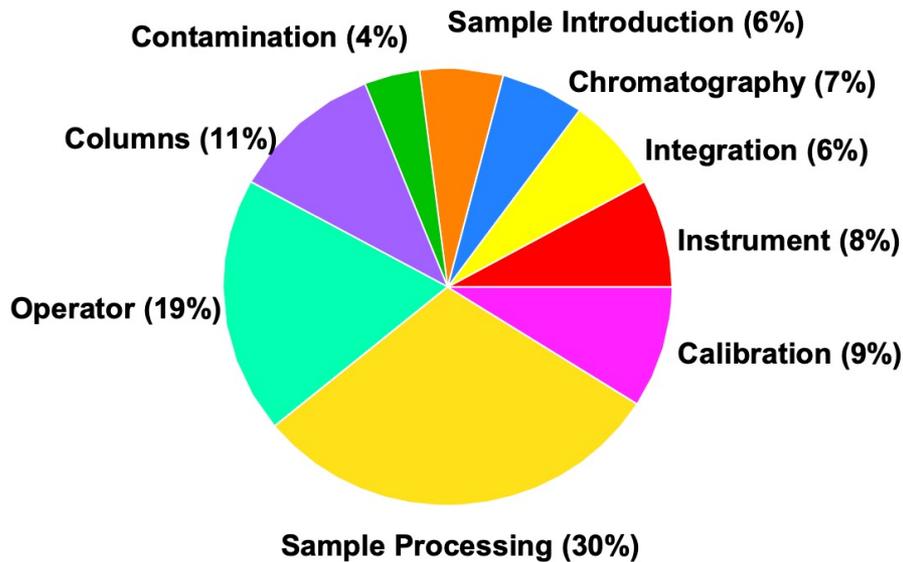
$v$  = velocità di diffusione delle molecole di soluto fra due punti della soluzione;

$A$  = area della superficie attraverso la quale avviene la diffusione;

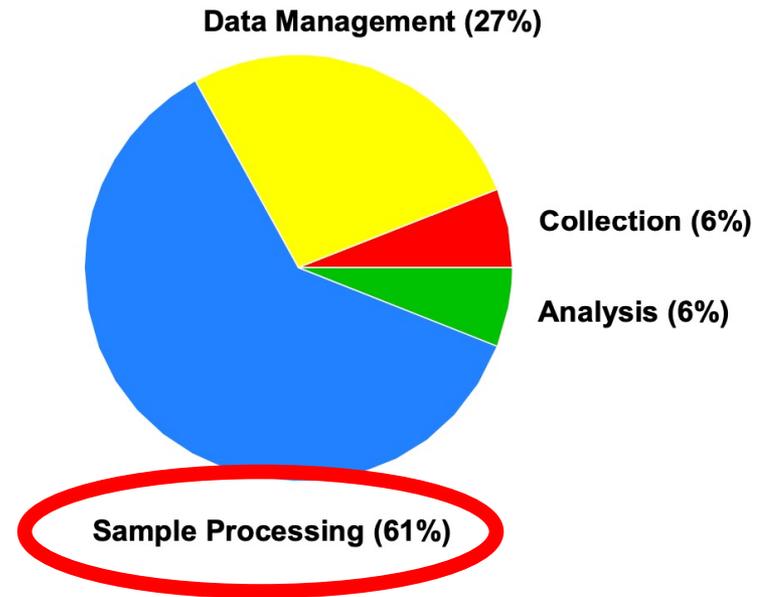
$\Delta c$  = differenza di concentrazione fra i due punti;

$l$  = distanza fra i due punti;

# Sources of Error Generated and Time Spent During a Typical Chromatographic Analysis



**Sources of Error**



**Time Spent**

Tempo di analisi e fonti di errore

# Estrazione liquido-liquido

Questa tecnica si basa sulla distribuzione del soluto tra due liquidi essenzialmente non miscibili di cui uno solitamente è un solvente organico, l'altro una soluzione acquosa. All'equilibrio, un soluto che sia solubile in entrambe le fasi sarà distribuito tra le due fasi in una proporzione fissa secondo un coefficiente di ripartizione o distribuzione **K**

$$K = C_o / C_a$$

Coefficiente di ripartizione

K è indipendente dalla quantità di soluto preso e dalla quantità di solvente usato

Nella separazione liquido liquido (due fasi liquide non miscibili)

Il componente in esame si trasferisce da una fase all'altra più delle sostanze interferenti.

L'estrazione con solventi è una delle tecniche più utilizzate per la sua semplicità strumentale e operativa.

È sufficiente un **imbuto separatore** e l'operazione, che richiede generalmente in pochi minuti, può essere applicata sia a impurezze presenti in tracce che ai costituenti principali.

Mediante tale tecnica è possibile

1. L'identificazione di una sostanza sulla base del coefficiente di ripartizione
2. L'arricchimento di un componente
3. Separazione
4. Lo studio di equilibri in soluzione.

# Estrazione liquido-liquido

Separazione dei costituenti di una miscela tra 2 solventi non miscibili tra di loro.

- o La tecnica si basa sulle caratteristiche chimiche delle sostanze da separare.
- o Può separare sostanze con punti di ebollizione vicini (non separabili per distillazione).

il grado al quale i composti (organici o inorganici) si distribuiscono tra 2 liquidi non miscibili tra loro differisce enormemente.

Queste differenze possono essere sfruttate per scopi analitici per separare interferenti.

## Coefficiente di distribuzione

Costante di equilibrio che descrive la distribuzione di un soluto tra due solventi non miscibili

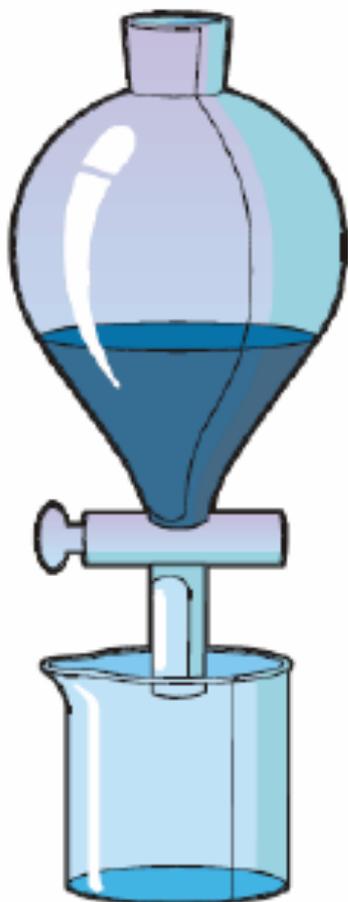


$$K_d = \frac{[A]_{org}}{[A]_{acq}}$$



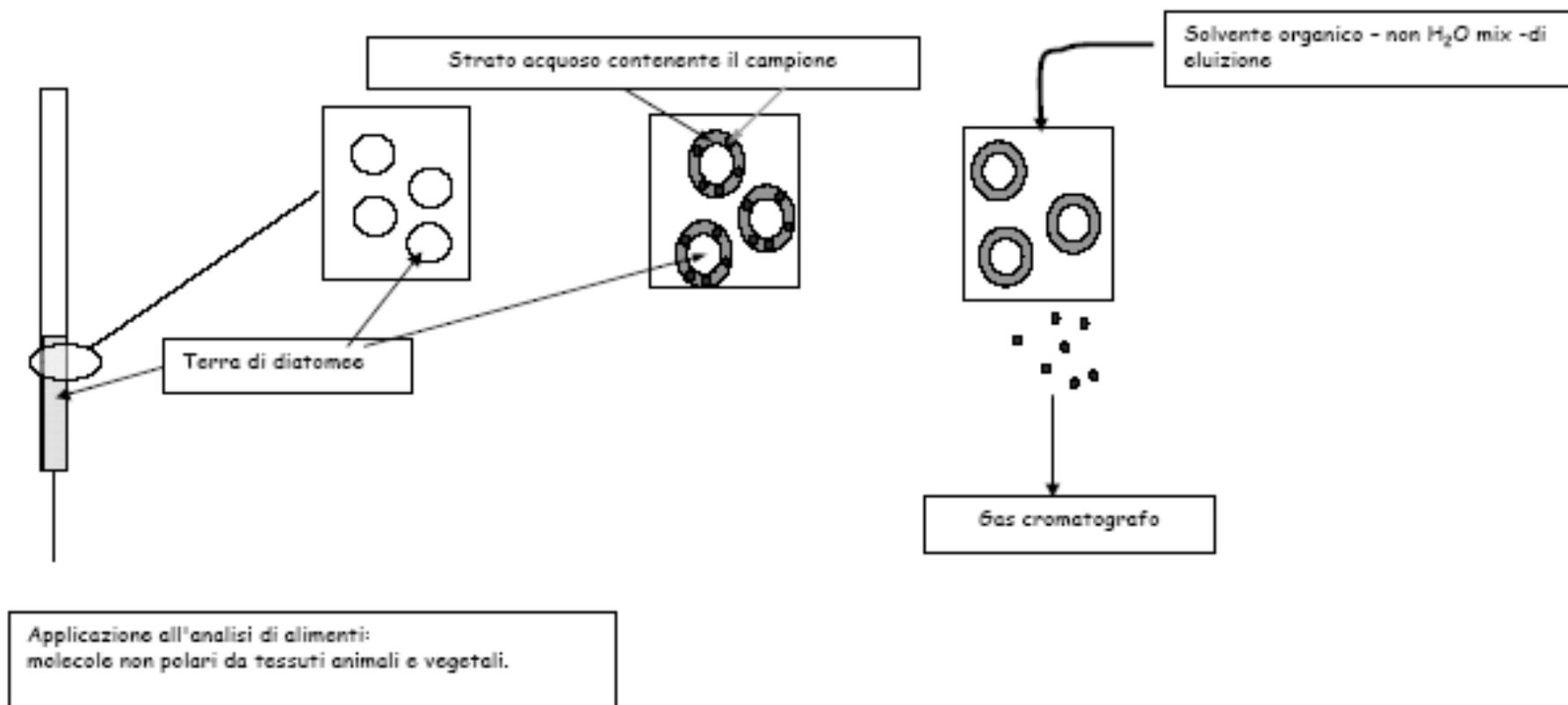
Il solvente più pesante si ripartisce nella parte inferiore dell'imbuto separatore

# Estrazione: esecuzione



1. Imbuto separatore deve contenere più del doppio del volume da estrarre.
2. Si sceglie il solvente per l'estrazione ed il suo volume
3. Sotto cappa si carica nell'imbutto, previamente sistemato sull'opportuno sostegno, la soluzione da estrarre ed il solvente scelto in ragione di circa un terzo del volume totale previsto e si tappa l'imbutto
4. Capovolto l'imbutto, si agita lentamente (attenzione pressione!!) e si apre il rubinetto per eliminare sovrappressione
5. Si agita vigorosamente e quindi si lascia assestare la miscela.
6. Si separano le due fasi e si raccoglie in un becker quella di interesse
7. Si ripetono i punti 3-6 per 3 volte

# Estrazione liquido-liquido



Terra di diatomee offre grande superficie → film polare di campione che offre una ampia superficie di scambio fase polare/fase apolare

**Vantaggio:** ridotto volume di solvente di estrazione utilizzato

# Estrazione con solventi chimicamente attivi

- Si usano sostanze che reagiscono chimicamente con il composto da estrarre attraverso l'aggiustamento dei parametri chimici pH, forza ionica

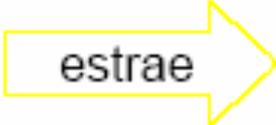
Soluzione  $\text{NaHCO}_3$  5%

Soluzione  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  5%

Soluzione  $\text{NaOH}$  5%

Soluzione  $\text{HCl}$  5%

estrae



Acidi carbossilici

Acidi deboli

Fenoli

Composti basici

## Use of different methods for testing antioxidative activity of oregano essential oil

T. Kulisic<sup>a</sup>, A. Radonic<sup>b</sup>, V. Katalinic<sup>c</sup>, M. Milos<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup>*Department of Biochemistry and Food Chemistry, Faculty of Chemical Technology, University of Split, Teslina 10/V, 21000 Split, Croatia*

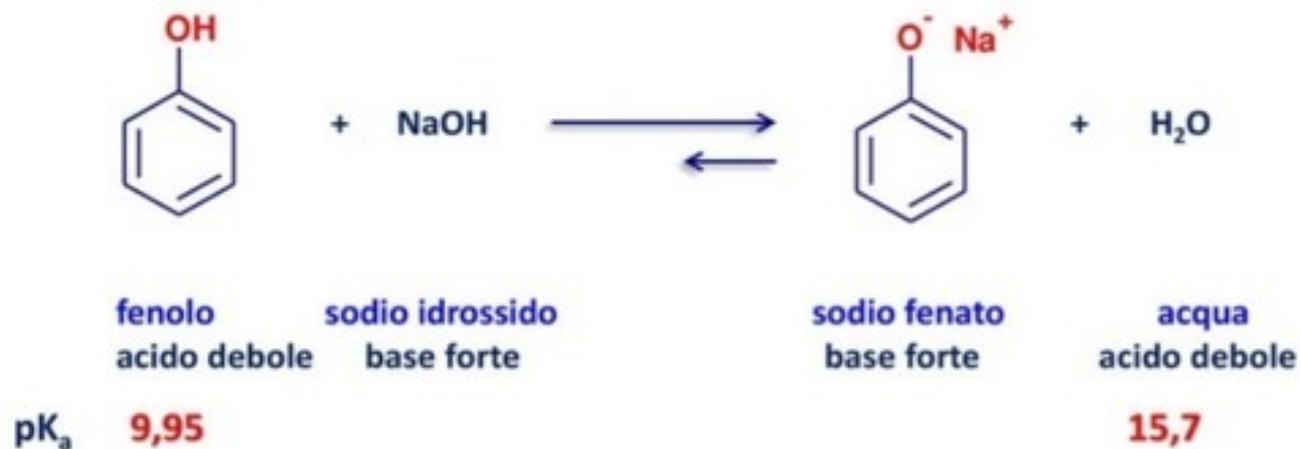
<sup>b</sup>*Department of Organic Chemistry, Faculty of Chemical Technology, University of Split, Teslina 10/V, 21000 Split, Croatia*

<sup>c</sup>*Institute of Naval Medicine, University of Split, Šoltanska 1, 21000 Split, Croatia*

In order to obtain a fraction of phenolic compounds, 1 g of the essential oil was dissolved in 5 ml pentane and extracted with sodium hydroxide solution (20%) in water. In this manner, phenolic compounds were removed from the pentane layer. The aqueous phase, containing dissolved phenolic compounds sodium salts, was neutralized with hydrochloric acid solution (10%) in water. Finally, isolation of the phenolic compounds was performed by extraction with pentane (5 × 5ml).

Cosa accade nello step 1?

In order to obtain a fraction of phenolic compound 1 g of the essential oil was dissolved in 5 ml pentane and extracted with sodium hydroxide solution (20%)

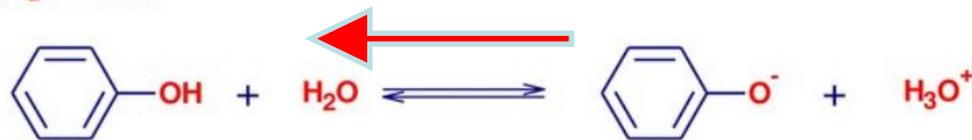


water. In this manner, phenolic compounds were removed from the pentane layer. The aqueous phase,

Cosa accade nello step 2?

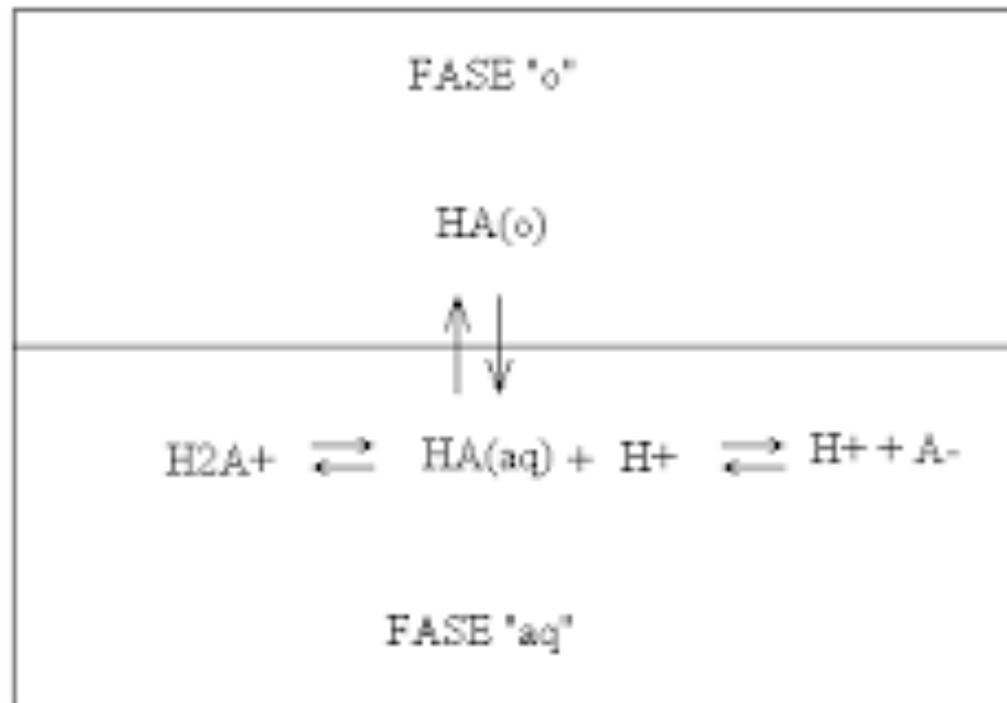
removed from the pentane layer. The aqueous phase, containing dissolved phenolic compounds sodium salts, was neutralized with hydrochloric acid solution (10%)

Fenolo:  $pK_a = 9.95$



Cosa accade nello step 3?

water. In this manner, phenolic compounds were removed from the pentane layer. The aqueous phase,



# Estrazione liquido-solido

Estrazione da campione solido (finemente tritato) con solvente

Solvente polare  $\longrightarrow$  Componenti polari

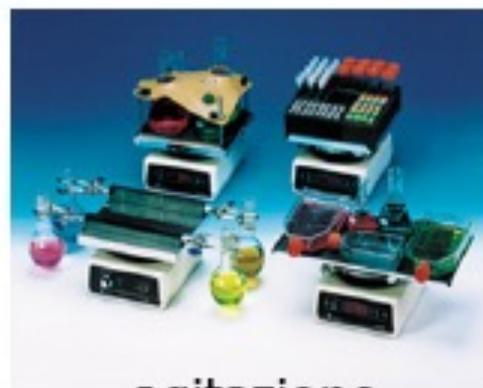
Solvente apolare  $\longrightarrow$  componenti apolari

All'estrazione segue una fase di separazione del solido dal liquido

- Filtrazione
- Decantazione
- Centrifugazione

# Strumentazione:

- vetreria da laboratorio (discontinua)
- strumentazione dedicata (continua o semi-continua)

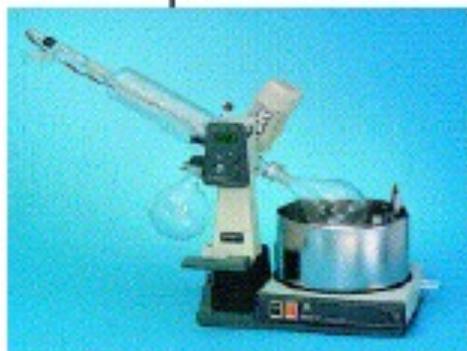


agitazione

Contenitore con campione

omogeneizzazione

Evaporazione



filtrazione



## 2.4. Procedures

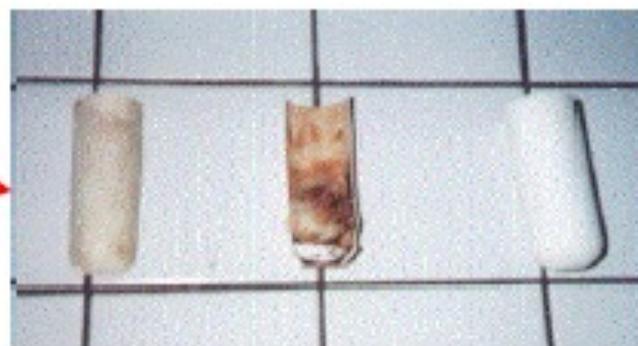
Samples of apples and pears were purchased in different local supermarkets of Alcalá de Henares (Madrid, Spain). Both apples and pears were peeled and the peel was separated from the pulp. Whole green beans and peel fractions were carefully homogenized and the pulp was cut into little pieces. Lentils were ground to a particle size of 1 mm.



Samples of 5 g of fresh red wine pomace, 5 and 10 g of peel and pulp (apples and pears), respectively, 5 g of fresh green beans and 2 g of dried lentils were extracted at room temperature and in the absence of light with methanol (pure methanol for fruits and 80%, v/v, aqueous methanol for red wine pomace, fresh green beans and lentils) containing 1% 2,6-di-*tert.*-butyl-4-methylphenol (BHT) as an antioxidant agent using an ultrasonic bath. The conventional extraction procedure was optimized in order to obtain a quantitative extraction (higher than 95% in phenolic of interest). The samples were extracted with 10 ml of solvent for 1 h, 10 ml for 30 min, and then 5 ml for 30 min. The extracts were then combined to a final volume of 25 ml. The solutions chosen for HPLC analysis were filtered through membrane filters (0.5- $\mu\text{m}$  pore size) prior to injection. Immediately after the sampling, tissues were extracted under no oxidation conditions and the extracts were stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  until chromatographic and spectrophotometric analysis ( $n=5$ ). All the prepared samples (solutions and extracts) were filtered through 0.45- $\mu\text{m}$  membranes (Millipore) and degassed in an ultrasonic bath before use.



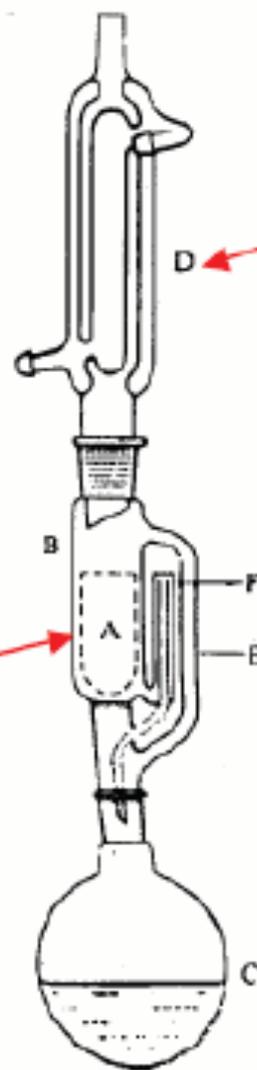
# Estrazione liquido-solido semicontinua



- opera in due fasi più una di recupero del solvente distillato
  - Fase 1: solvente all'ebollizione
  - Fase 2: solvente a t.a

# Estrazione in continuo liquido solido

## Estrattore Soxhlet



Refrigerante

D

B

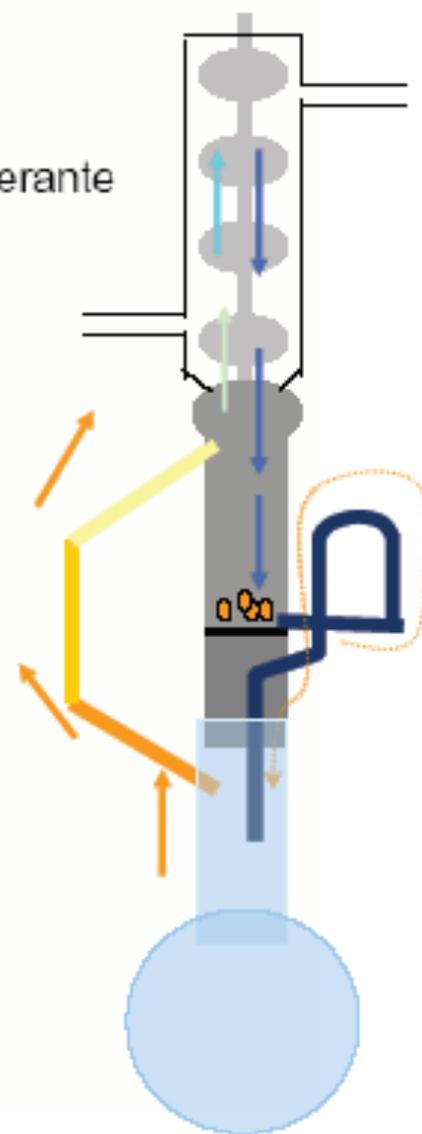
C

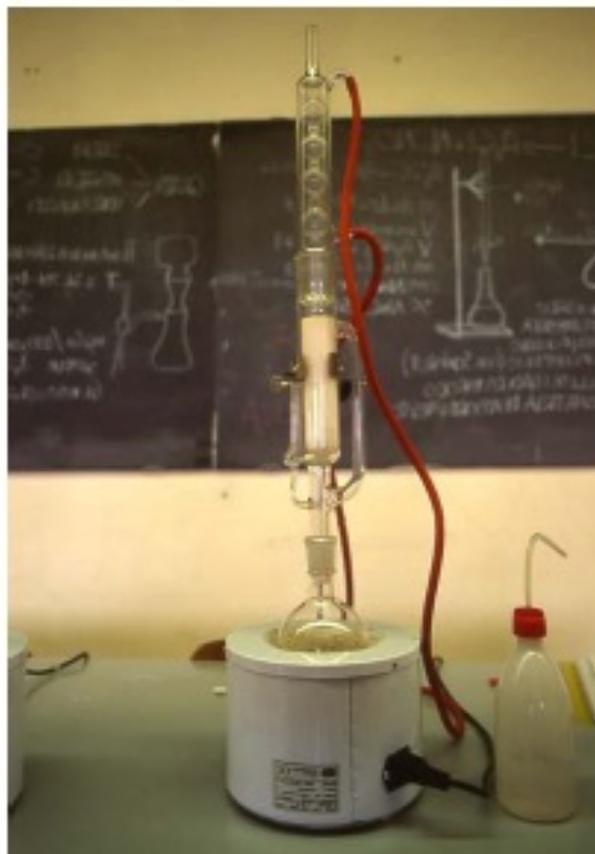
A

F

E

Ditale di estrazione  
con sostanza solida





### **SOXTEC:**

Parametri: materia grassa totale.

Principio: idrolisi acida del campione, estrazione materia grassa.

Peculiarità:

- Sistema in gran parte automatizzato;
- Condizioni di sicurezza secondo le norme EN50014 e EN50019

**Norme di rif.: AOAC 991.36 (carni), EPA n.°3541 (soia).**



# Fat Determination in Feed Samples by Soxhlet Extraction according to European Directive 2009/152/EC

HydroEx H-506,

FatExtractor E-500 Soxhlet: Fat determination in feed samples by Soxhlet extraction

## 1. Introduction

Fat determination is one of the key analysis performed in the feed industry. For procedure A the sample is extracted with the FatExtractor E-500 Soxhlet. For procedure B the sample is hydrolyzed with the HydroEx H-506 prior the extraction with the FatExtractor E-500 Soxhlet. After the extract has been dried to a constant weight, the total fat content is measured gravimetrically.

## 2. Experimental

Equipment: HydroEx H-506, FatExtractor E-500 Soxhlet

Sample: Feed for domestic turkey (certified reference material, fat content: 4.76 %, limit of tolerance 4.35 - 5.19 %).

Procedure A: 5 g of homogenous sample and 10 g of sodium sulfate were weight into a cellulose thimble. The extraction was performed using the E-500 SOX applying the parameters specified in Table 1.

Procedure B: 20 g of quartz sand and 2 g Celite® were added to a glass sample tube. The sample was weighed into a hydrolysis vessel containing 2 g of Celite®. After adding 2 x 50 mL hydrochloric acid (4 M) into each vessel the sample was hydrolyzed for 30 min using the HydroEx H-506. The hydrolyzate was transferred into the glass sample tubes and the vessels washed with warm (50 °C) deionized water, until a neutral pH was obtained. The glass sample tubes were dried. After cooling down in a desiccator another layer of quartz sand (20 g) was added to the glass sample tube.

The extraction was performed using the FatExtractor E-500 Soxhlet applying the parameters specified in Table 1.

## 3. Results

The determined fat content of the feed sample is lower than the certified value for total fat, independently of the extraction time (2 h or 6 h) by using Procedure A. The results are shown in Table 2. These findings were independent of the extraction time.

Procedura A	Extraction time:	Extraction time:
	120 min	360 min
Mean value [%]	4.08	4.15
rsd [%]	0.29	0.76

Quali sono le condizioni di lavoro migliori??

Procedura B	Extraction time:	Extraction time:
	120 min	360 min
Mean value [%]	4.79	5.13
rsd [%]	2.57	0.53

## 4. Conclusion

The determination of the total fat content using the HydroEx H-506 and the FatExtractor E-500 SOX provides reliable and reproducible results. The determined total fat content corresponds well to the declared value of the feed sample.

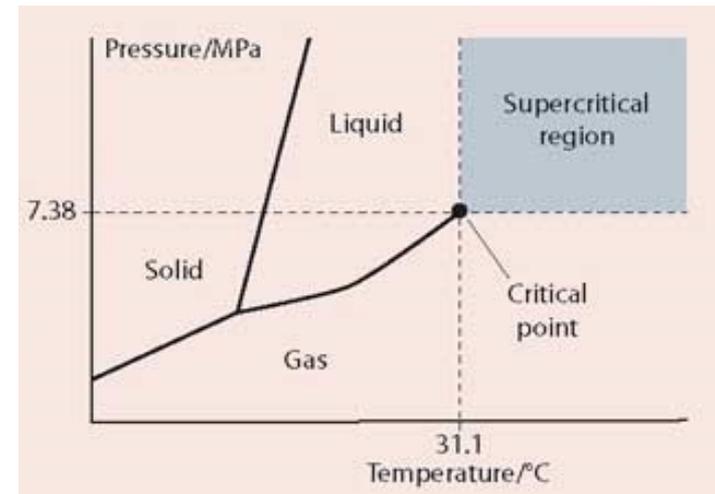
The determined crude fat content using Procedure A of the feed sample is lower than the certified value for total fat, independently of the extraction time (2 h or 6 h). According to the directive, Procedure B including acid hydrolysis has to be used for this sample. It was shown that an extraction time of 2 h is sufficient to receive reliable and reproducible results for total fat determination using Procedure B.



# Estrazione accelerata (ASE)

L'estrazione con solvente tradizionale, pur garantendo ottime prestazioni, presenta alcuni inconvenienti tra cui i tempi lunghi di trattamento, le elevate quantità di solvente utilizzato e la scarsa adattabilità all'automazione. Per questo motivo, sono state sviluppate alcune varianti

Nell'estrazione pressurizzata o accelerata con solvente (PSE o ASE) si utilizza un solvente in condizioni sub-critiche, nelle quali l'efficienza di estrazione è molto maggiore. Si lavora in recipiente chiuso, pressurizzato e termostato. Ciò consente di ridurre i tempi di estrazione e la quantità di solvente necessaria; inoltre è possibile automatizzare il processo



# Applicazioni dell'ASE

La tecnica ASE è ormai d'uso corrente per il trattamento di campioni solidi. Esempi di applicazioni in cui la tecnica è preliminare all'analisi cromatografica sono:

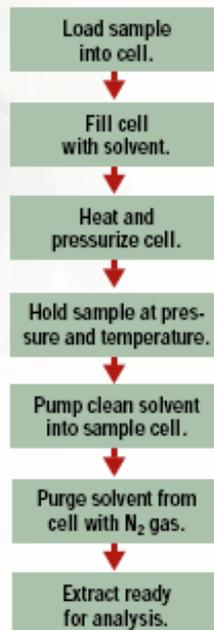
- . Estrazione di pesticidi fosforici da frutta e verdura con acetato di etile
- . Estrazione di idrocarburi policiclici aromatici (PAH) da terreni con miscela diclorometano/acetonitrile
- . Estrazione di composti organico-arsenici da pesce con miscela acqua/metanolo

## Accelerated solvent extraction (ASE)

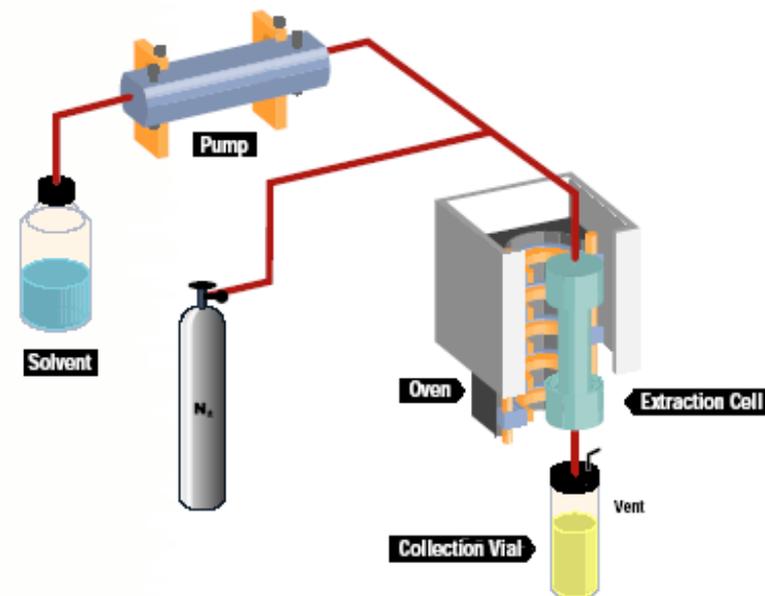
• Combinazione di alta temperatura e alta pressione



- Aumenta la solubilità degli analiti
- Riduce l'effetto matrice
- Maggiore velocità di diffusione dell'analita dalla matrice al solvente di estrazione
- Riduce la viscosità del solvente
- La pressione elevata mantiene il solvente allo stato liquido ad alte temperature



Extract ready for analysis.



ASE Extraction Steps

### ASE Saves Solvent, Time & Money

	Average Solvent Used per Sample	Average Extraction Time per Sample	Average Cost per Sample*
Soxhlet	200-500 mL	4-48 hr	\$27
Automated Soxhlet	50-100 mL	1-4 hr	\$16
Sonication	100-300 mL	30 min-1 hr	\$24
SFE	8-50 mL	30 min-2 hr	\$23
ASE	15-40 mL	12-18 min	\$14

\*Based on 2000 samples per year. Costs (in U.S. dollars) are based on appropriate instrumentation per technique (including amortization of initial capital investment), reagents, laboratory equipment (e.g., fume hood), labor, and all consumables.

- Caricare il campione nella cella
  - La cella è riempita di solvente
  - Aumento di T e P
  - Mantenimento per x tempo di T e P
- Rimuovere il solvente con nuovo solvente
- Rimuovere il solvente residuo dal campione con N<sub>2</sub>
- Il campione è pronto per l'analisi



The time-consuming ether-extraction makes this test cumbersome. Therefore, some food labs have successfully applied accelerated solvent extraction (ASE)

Results have shown the effectiveness of ASE - compared to Soxhlet extraction methods - in analyzing fats, oils and pesticides from foods and agricultural products. In the extraction of unbound fats from snack foods, such as potato and corn chips, recoveries with ASE equaled those of Soxhlet. However, extraction speeds were significantly faster, and the amount of solvent used was a fraction of that required by the Soxhlet method.

Similar results were obtained with extraction of oil from oil seeds and pesticide residue from foods. With ASE, extractions were performed in minutes, compared to hours using the Soxhlet method, and the quantity of solvent used was less by a factor of 10.

### ASE Saves Solvent, Time & Money

	Average Solvent Used per Sample	Average Extraction Time per Sample	Average Cost per Sample *
Soxhlet	200-500 mL	4-48 hr	\$27
Automated Soxhlet	50-100mL	1-4 hr	\$16
Sonication	100-300 mL	30 min-1hr	\$24
SFE	8-50 mL	30 min-2 hr	\$23
ASE	15-40 mL	12-18 min	\$14

\*Based on 2000 samples per year. Costs (in U.S. dollars) are based on appropriate instrumentation per technique (including amortization of initial capital investment), apparatus, laboratory equipment (e.g., fume hood), labor, and all consumables.



## ESEMPI di Condizioni di estrazione ASE

<i>Matrici</i>	<i>Analiti separati</i>	<i>Solvente utilizzati</i>	<i>T(°C) /P (MPa)</i>
Frutta, verdure e farine	Pesticidi clorurati	Esano+acetone, acetonitrile	125/10
Cibi affumicati	Idrocarburi policiclici aromatici (PAH)	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> +10 acetonitrile	80/10
Pesce	Aromi Lipidi, PCB	Esano + acetato di etile esano	80/10
Cibi dietetici	Vitamina K1		
Latte in polvere, burro, cacao,carne,cioccolato, salse,cereali	grassi	Etere di petrolio	100/13,8

## **Estrazione assistita da microonde (MASE)**

Per effetto delle microonde che attivano le transizioni rotazionali dei legami molecolari, si giunge ad un rapido equilibrio di ripartizione tra il solido da estrarre ed il solvente( maggiore è la sua costante dielettrica , maggiore è assorbimento MW) in quanto si accelera il processo di solubilizzazione, il tutto agitato da un'ancoretta magnetica per mantenere continua l'agitazione delle fasi. Possibilità di usare sia solventi polari che apolari : questi ultimi non riscaldandosi alle microonde assorbono gli analiti dalla matrice senza danneggiare composti termolabili (es. aromi solforati dell'aglio o i lipidi dei pesci).

Applicazioni negli alimenti:

- Determinazioni del mercurio organico ed inorganico
- Aminoacidi liberi
- Antibiotici
- PCB e diossine
- Pesticidi organoclorurati
- Oli

## Digestione umida mediante reattivi di solubilizzazione in sistemi chiusi (WD)

Processo di mineralizzazione della sostanza organica per la preparazione del campione alimentare



Porta alla formazione di specie ioniche libere determinabili mediante cromatografia ionica.

### Esempi:

1. Digestione umida di carboidrati (zuccheri, amidi, cellulosa): ac. Nitrico a 180°C li mineralizza completamente
2. Digest. Umida dei grassi: ac. Nitrico a 200°C più difficile se alimento contiene ac. grassi insaturi e esteri di ac. Linoleico e linolenico causa trasformazione in acidi corr.

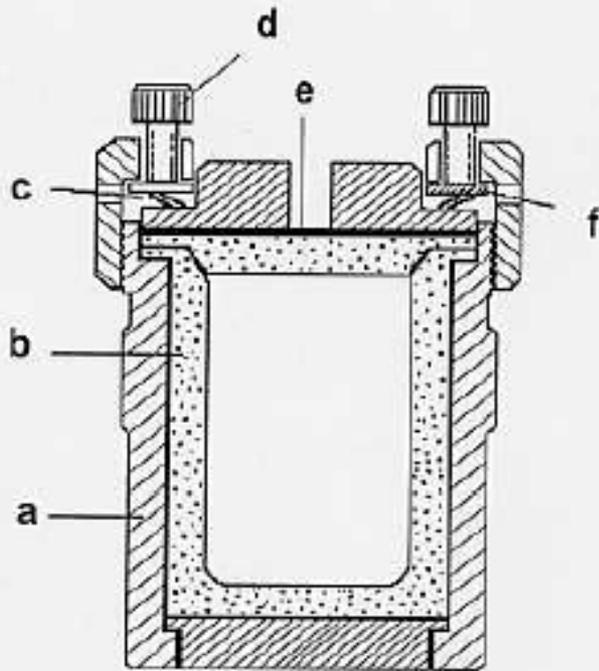


Figura 2. Apparato tradizionale di digestione umida in sistema chiuso. (a) – corpo in acciaio inossidabile, (b) – contenitore in PTFE (o FEP o PFA) con coperchio e guarnizione di tenuta, (c) – molle, (d) – viti di compressione, (e) – setto di sicurezza (sensore della pressione interna) e (f) – anello per esercitare una compressione uniforme sul coperchio.

Contenitore in acciaio inossidabile che racchiude un altro contenitore in PTFE inserito in un blocco riscaldante, con reattivi di solubilizzazione e/o ossidazione ( $\text{HNO}_3$  conc,  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , acido perclorico) + campione.

## Digestione umida assistita da microonde ( MOD)

Supera i limiti della digestione umida tradizionale:

- Maggiore rapidità di riscaldamento del campione
- tempi ridotti

Si lavora sia a bassa pressione ( massimo 1000 kPa) che ad alta pressione (oltre 7000 kPa) per matrici alimentari termicamente più resistenti.

Contenitori fatti in materiali trasparenti rispetto alle MW (PTFE, quarzo)

## Applicazioni di alimenti mediante digestione umida (MOD o WD)

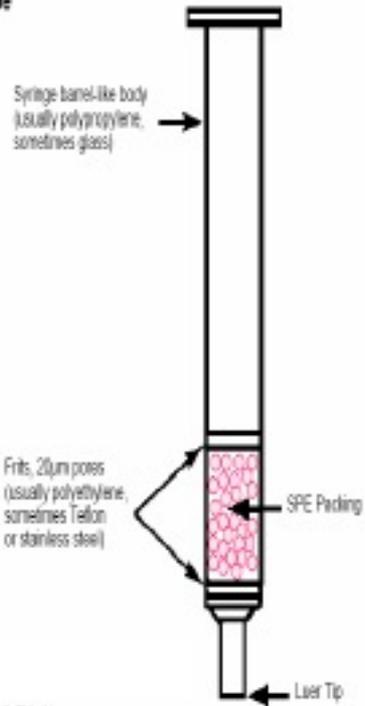
<i>Matrici</i>	<i>Tipo di digestione</i>	<i>Reattivi</i>	<i>Elementi determinati</i>
carne	MOD	HNO <sub>3</sub>	Se
The	MOD	HNO <sub>3</sub>	Ba, Cu, Fe, Pb,, Zn
Vino	MOD	HNO <sub>3</sub>	Pb
Vino	WD	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> e H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Ni
Latte e derivati	WD	HNO <sub>3</sub> , HClO <sub>4</sub> , HCl	Cd,Co, Cr,Cu,Fe,Ni,Pb, Zn
Farine, amidi, carne, latticini, uova	WD	HNO <sub>3</sub>	Al,Ca,Cd,Co, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, Ni, Pb, Sr, Zn
Succhi di frutta	MOD	HNO <sub>3</sub>	metalli
crostacei	WD	HNO <sub>3</sub> , HF, HClO <sub>4</sub>	Al, Ca,Fe, K, Mg, Mn, Na, Zn
Oli, zuccheri, the	WD	HNO <sub>3</sub>	Cd,Cu, Pb, Zn

**MOD: estrazione assistita da microne**

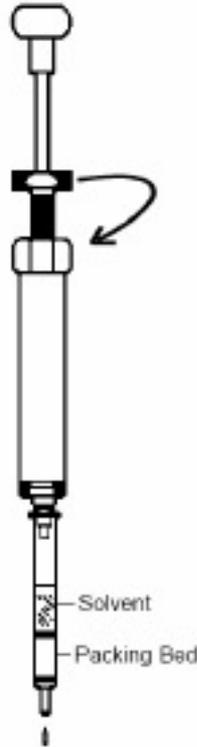
**WD: digestione umida**

# Estrazione in fase solida – SPE -

SPE Tube



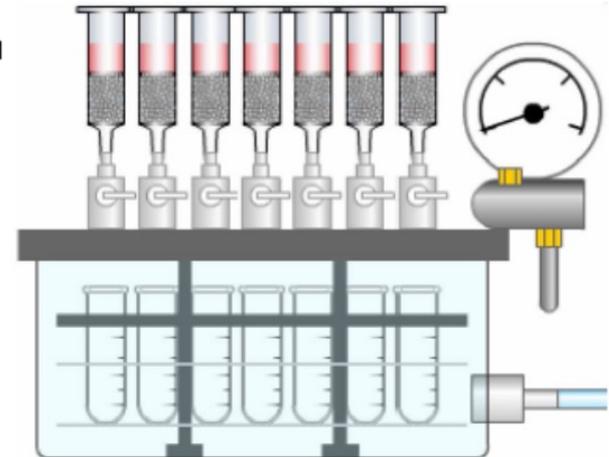
Rotate Knurled Knob for Slow Flow



Depress Plunger for Rapid Flow



1



Le tecniche preparative di estrazione in fase solida (SPE) si stanno sempre più diffondendo in campo alimentare, in risposta alla crescente domanda di metodi pratici e veloci, ma anche altamente selettivi.

Per l'analisi degli alimenti si possono indicare tre principali aree di applicazione:

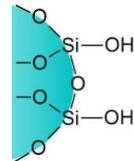
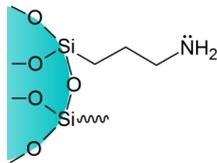
- analisi di additivi (dolcificanti artificiali, coloranti, aromi, ecc.)
- analisi di sostanze nutritive (carboidrati, vitamine, colesterolo, acidi organici, lipidi, ecc.)
- analisi di residui (pesticidi, erbicidi, tossine).



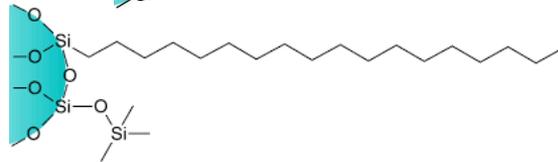
L'estrazione in fase solida SPE, al contrario, condotta su colonnine pre-impaccate, disposte su accessori di aspirazione, unisce l'organizzazione razionale di serie multiple di campioni, al concetto di selettività e diminuzione di solvente da utilizzare.

Le colonnine SPE con impaccamenti silica-legati forniscono una selezione di principi estrattivi che può essere suddivisa, per tipo di ritenzione, in tre classi di colonnine:

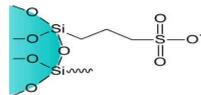
– polari;



– non polari;



– a scambio ionico.



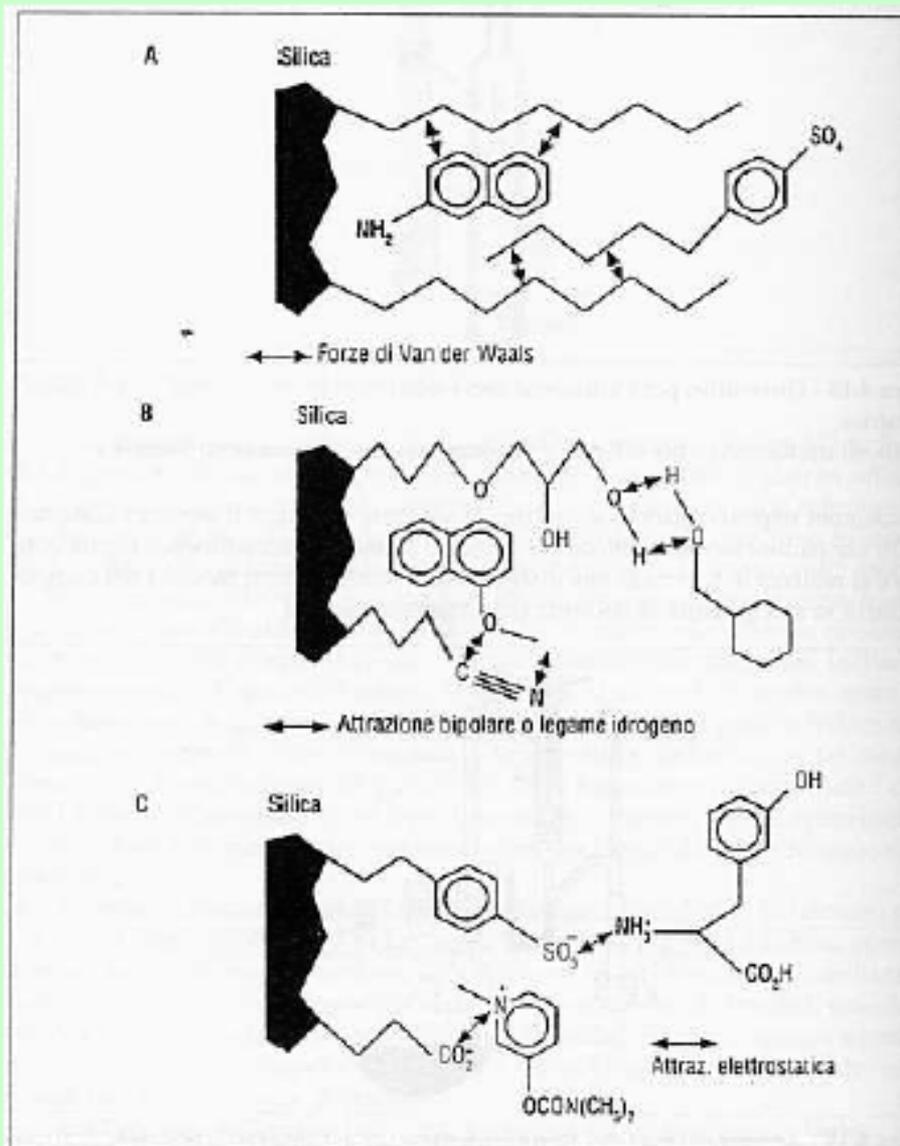


Figura 4.20 - Esempi di interazioni nell'adsorbimento in fase solida:  
 A) interazione non polare  
 B) interazione polare  
 C) interazione ionica

L'estrazione in fase solida si basa su una serie di interazioni qui descritte.

Fasi Inverse (trattengono in genere le sostanze idrofobe): *Ottadecil* ( $C_{18}$ )

Applicazione: analisi di alimenti, aromi e coloranti alimentari, tracce di organici in acqua, campioni biologici- plasma, urine - o ambientali, vitamine idrosolubili; *Ottil* ( $C_8$ ) : cambia lunghezza catena idrocarburica; diversi tipi a seconda della % dei C carichi e end-capping

Fase Normale: Cianopropil -  $(CH_2)_3CN$   
 amminopropil -  $NH_2$

Applicazioni: isolamento da solventi acquosi e organici, droghe in fluidi fisiologici, metaboliti da muffe e prodotti della fermentazione

Scambio Ionico: propil sulfonil  
 Applicazioni: separazione di saccaridi, estraz. composti polari

T... di... (H1, 12)

Il meccanismo di estrazione in fase inversa

Le fasi non polari sono le più utilizzate. In particolare la C18, è spesso la prima ad essere provata quando si cerca di sostituire la tecnica liquido/liquido con quella SPE.

In molte applicazioni la colonna SPE è impiegata come un *filtro chimico* che rimuove gli interferenti non polari.

La stessa colonna può essere utilizzata per estrarre composti polari da matrice lipofila.

## Reversed-Phase SPE

Retention Mechanism:

Non-polar or hydrophobic interactions

- Van der Waals or dispersion forces

Sample Matrix:

Aqueous samples

- Biological fluids (serum, plasma, urine)
- Aqueous extracts of tissues
- Environmental water samples
- Wine, beer and other aqueous samples

Analyte Characteristics:

Analytes exhibiting non-polar functionalities

- Most organic analytes
- Alkyl, aromatic, alicyclic functional groups

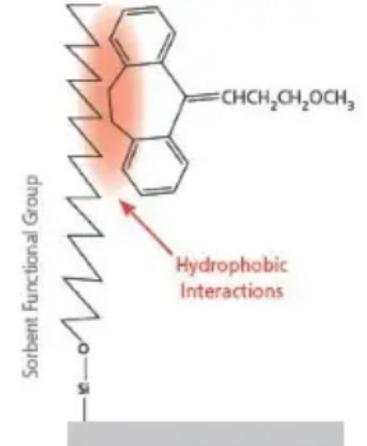
Elution Scheme:

Disrupt reversed-phase interaction with solvent or solvent mixtures of adequate non-polar character

- Methanol, acetonitrile, dichloromethane
- Buffer/solvent mixtures

Common Applications:

- Drugs and metabolites in biological fluids
- Environmental pollutants in water
- Aqueous extracts of tissues and solids



**Figure 1.** Aqueous Sample Matrix/Mobile Phase Environment

## Il meccanismo di estrazione polare

Le colonnine polari – cianopropil, diol, silica, amminopropil – sono tipicamente usate per interagire con composti polari disciolti in solvente organico non polare (etilacetato, n-esano, ecc.). Del resto, l'omogeneizzazione della matrice e la sua estrazione con solvente organico sono condizioni spesso ricorrenti, e che già predispongono l'analita al meccanismo dell'estrazione polare.

Le fasi polari offrono possibilità di ritenzioni selettive quali legami di tipo dipolo-dipolo (CN) o ponti idrogeno (DIOL, NH<sub>2</sub>) ed anche una riproducibilità nella qualità di queste interazioni.

## Normal-Phase SPE

- Retention Mechanism**
- Polar Interactions
- Hydrogen bonding,  $\pi$ - $\pi$ , dipole-dipole, and induced dipole-dipole

- Sample Matrix**
- Non-polar samples
- Organic extracts of solids
  - Very non-polar solvents
  - Fatty oils, hydrocarbons

- Analyte Characteristics**
- Analytes exhibiting polar functionalities
- Hydroxyl groups, carbonyls, amines, double bonds
  - Hetero atoms (O, N, S, P)
  - Functional groups with resonance properties

### **Elution Scheme**

- Polar interactions disrupted with a more polar solvent or solution
- Acetonitrile, methanol, isopropanol
  - Combinations of buffer/solvent or solvent/solvent mixtures

### **Common Applications**

- Cleanup of organic extracts of soils and sludge
- Fractionation of petroleum hydrocarbons
- PCBs in transformer oil
- Isolation of compounds in cosmetics

## Il meccanismo di estrazione a scambio ionico

Le colonnine scambiatrici si sono rivelate molto utili nella preparazione all'analisi di campioni di pesticidi, erbicidi, tossine ecc., che solitamente contengono un gruppo funzionale ionizzabile. In particolare lo scambio ionico, ha una enorme potenzialità quale meccanismo di grande selettività e quindi elevata pulizia degli estratti.

Si possono perciò estrarre, con questo meccanismo, composti basici (fasi a scambio cationico) e composti acidi (fasi a scambio anionico), sia da matrici acquose ma anche, in molti casi, da solventi organici come metanolo o diclorometano. Le fasi legate coprono un range di scambiatori cationici ed anionici deboli e forti.

# SCAMBIO IONICO

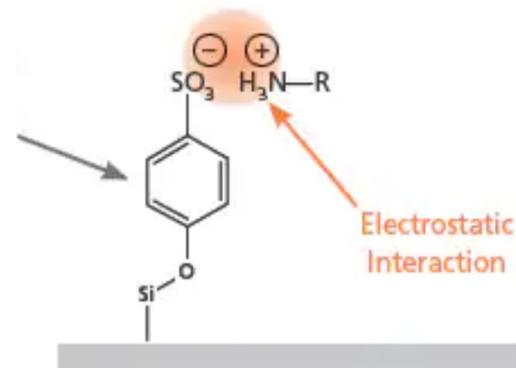
**Retention Mechanism:** Electrostatic attraction of charged functional groups of the analyte(s) to oppositely charged functional groups on the sorbent. Combination of reversed-phase and ion-exchange for mixed-mode

**Sample Matrix:** Aqueous or organic samples of low salt concentration (< 0.1M)

- Biological fluids
- Solution phase synthesis reactions

**Analyte Characteristics:** Analytes exhibiting non-polar functionalities

- Use anion-exchange for isolating acidic compounds: carboxylic acids, sulphonic acids, and phosphates
- Use cation-exchange for isolating basic compounds: primary, secondary, tertiary, and quarternary amines



1. Ion Exchange Methodology

**Elution Scheme:** Electrostatic interactions disrupted via:

- pH modification to neutralize compound and/or sorbent functional groups
- Increase salt concentration (> 1M); or use a more selective counter-ion to compete for ion-exchange binding sites

**Common Applications:**

- Drugs of abuse and pharmaceutical compounds in biological fluids
- Fatty acids removal in food/agricultural samples
- Cleanup of synthetic reactions
- Organic acids from urine
- Herbicides in soil

# SCAMBIO IONICO

Affinché si verifichi la ritenzione elettrostatica, sia i gruppi funzionali dell'analita che quelli assorbenti devono essere nella loro forma di metodologia di scambio ionico ionizzato.

Questo viene fatto attraverso un rigoroso controllo del pH della matrice del campione.

Per gli analiti ALCALINI, il pH deve essere regolato ad almeno 2 unità di pH al di sotto del pKa della molecola.

Per gli analiti ACIDI, il pH deve essere regolato ad almeno 2 unità di pH al di sopra del pKa della molecola.

Per eluire, è vero il contrario. Regolando il pH dell'eluente ad almeno due unità di pH sopra o al di sotto del pKa degli analiti e/o del sorbente, è possibile neutralizzare efficacemente uno o entrambi i gruppi funzionali interrompendo l'interazione elettrostatica consentendo l'eluizione.

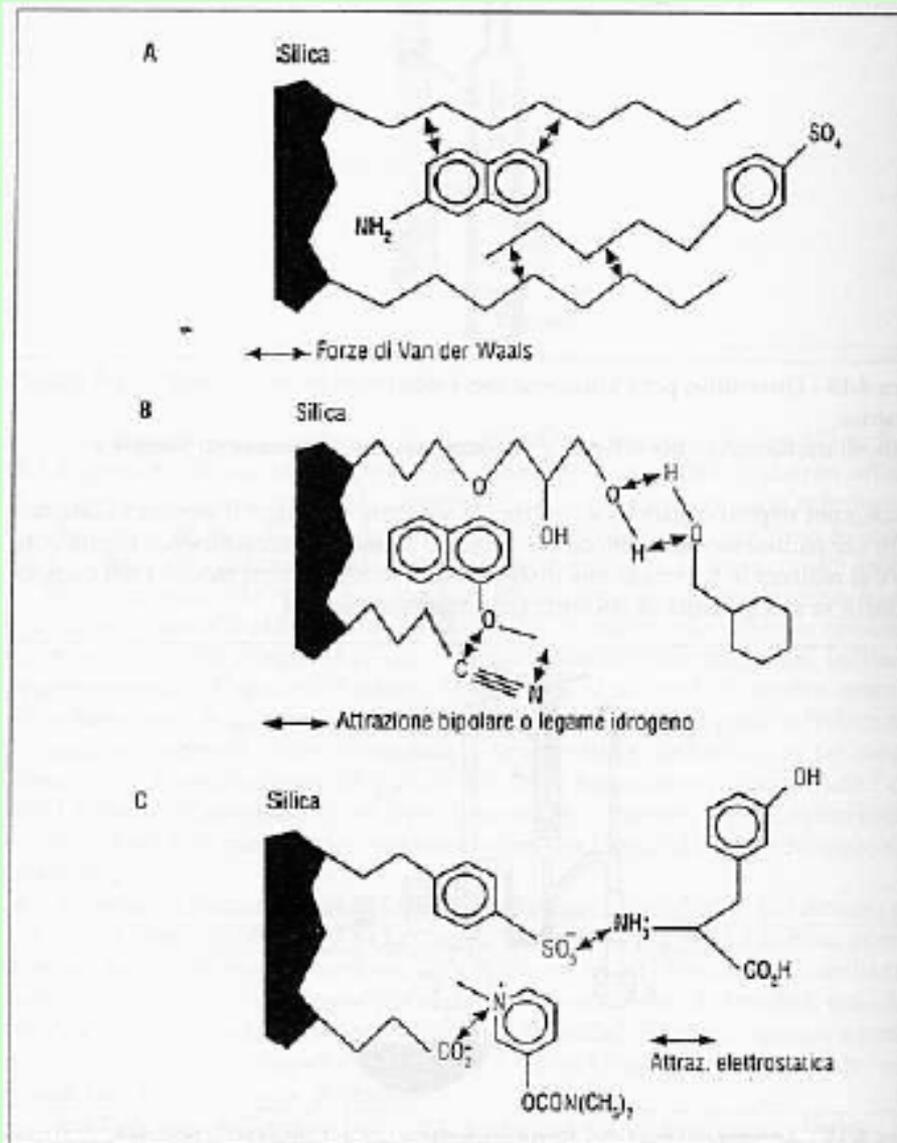


Figura 4.20 - Esempi di interazioni nell'adsorbimento in fase solida:  
 A) interazione non polare  
 B) interazione polare  
 C) interazione ionica

L'estrazione in fase solida si basa su una serie di interazioni qui descritte.

Fasi Inverse (trattengono in genere le sostanze idrofobe): *Ottadecil (C<sub>18</sub>)*

Applicazione: analisi di alimenti, aromi e coloranti alimentari, tracce di organici in acqua, campioni biologici- plasma, urine - o ambientali, vitamine idrosolubili; *Ottil (C<sub>8</sub>)* : cambia lunghezza catena idrocarburica; diversi tipi a seconda della % dei C carichi e end-capping

Fase Normale: Cianopropil - (CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>CN  
 amminopropil -NH<sub>2</sub>

Applicazioni: isolamento da solventi acquosi e organici, droghe in fluidi fisiologici, metaboliti da muffe e prodotti della fermentazione

Scambio Ionico: propil sulfonil

Applicazioni: separazione di saccaridi, estraz. composti polari

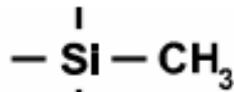
Terre di diatomee (pH1-13)

## Non-polar phases:

Sorbent

Structure primary  
functional group

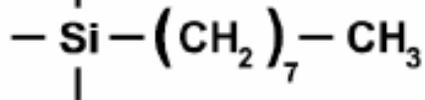
C1



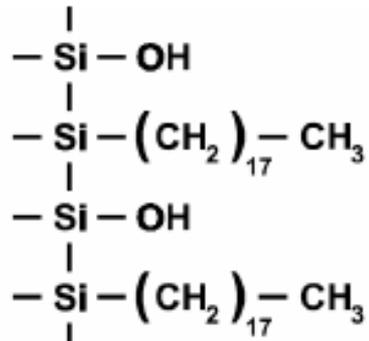
C2



C8

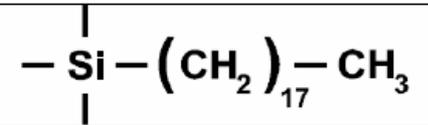


C18OH



Colonna apolare (C18)

HySphere-  
C18 (EC)

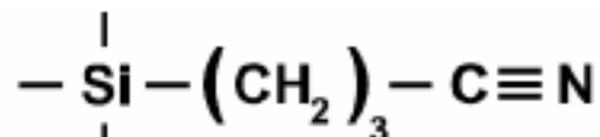


## *Polar phases:*

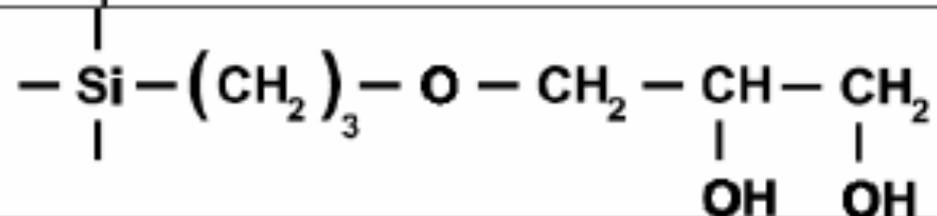
*Sorbent*

*Structure primary  
functional group*

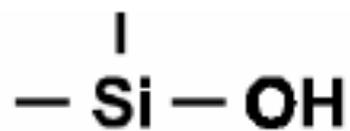
*CN*



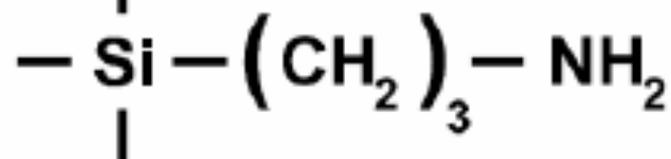
*2OH*



*Si*



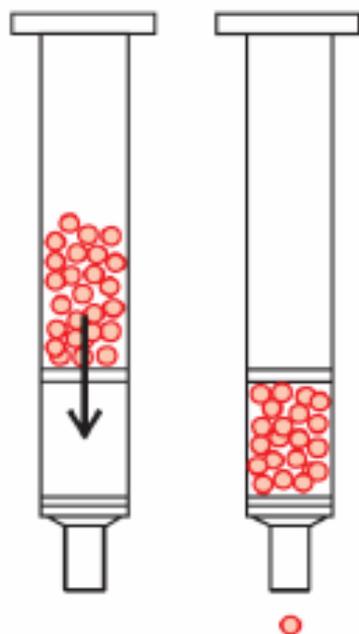
*NH<sub>2</sub>*



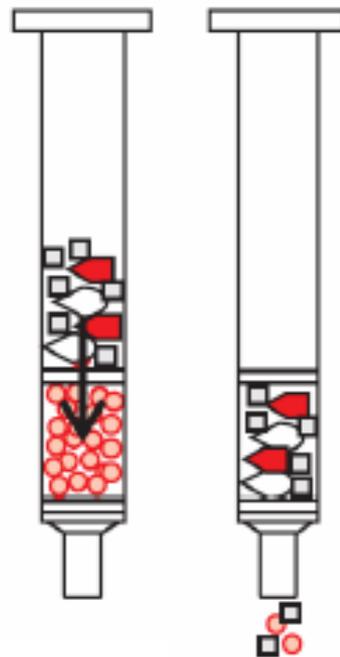
**Table 1: Mechanisms of SPE phase separation**

	<b>Reverse Phase</b>	<b>Normal Phase</b>	<b>Ion Exchange</b>
Retention Mechanism	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Non-polar/ hydrophobic interactions</li> <li>• Van der Waals or dispersion forces</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Polar interactions</li> <li>• Hydrogen bonding, pi-pi, dipole-dipole, and induced dipole-dipole</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Electrostatic attraction</li> <li>• Attraction between charged analyte functional groups with oppositely charged sorbent functional groups</li> </ul>
Analyte Characteristics	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Non-polar functionalities</li> <li>• Most organic analytes</li> <li>• Alkyl, aromatic, alicyclic functional groups</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Polar functionalities</li> <li>• Hydroxyl groups, carbonyls, amines, alkenes</li> <li>• Heteroatoms</li> <li>• functionalities with resonance</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Acids (use anion exchange)</li> <li>• Bases (use cation exchange)</li> </ul>
Sample Matrices	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Aqueous-based</li> <li>• Biological samples (serum, plasma, urine)</li> <li>• Tissue extracts</li> <li>• Environmental water samples</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Non-polar samples</li> <li>• Organic extracts</li> <li>• Very non-polar solvents</li> <li>• Fatty oils, hydrocarbons</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Aqueous or organic samples (low salt concentration)</li> <li>• Biological fluids</li> <li>• Solution phase synthesis</li> </ul>
Elution Considerations	Disrupt interaction with solvents with adequate non-polar character	Disrupt interaction with solvents with a more polar character	Disrupt interactions by: <ul style="list-style-type: none"> <li>• pH modification</li> <li>• Increase salt concentration</li> </ul>
Common Sorbents	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Bonded silica (C8, C18)</li> <li>• Polymeric</li> <li>• Carbon</li> </ul>	Bare silica, Alumina, Bonded silica (aminopropyl, diol) Florisil	Bonded silica (SAX, WAX; SCX, WAX)

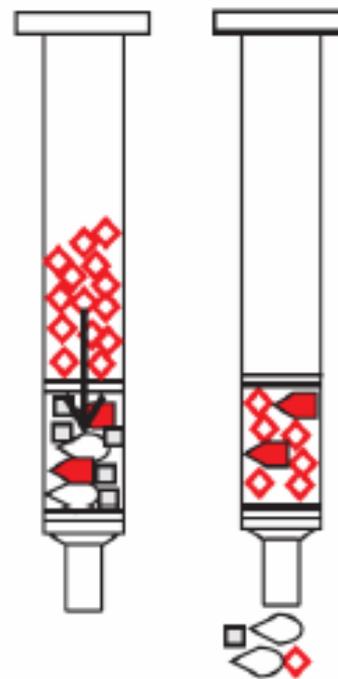
### Condition the SPE Tube or Disk



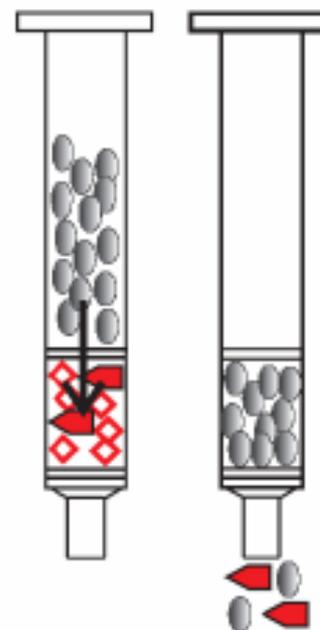
### Add the Sample



### Wash the Packing



### Elute the Compounds of Interest



### Key to Processes

-  = Matrix
-  = Impurity
-  = Compound of interest
-  = Solvent A
-  = Solvent B
-  = Solvent C

## 1. Sample pre-treatment

## 2. Column conditioning

## 3. Column pre-equilibration

## 4. Sample loading

## 5. Wash away interferences

## 6. Elute compounds of interest

Six Steps of SPE to

Suggerimenti utili da ricordare quando si esegue SPE

Non lasciare asciugare la fase solida a base di silice tra il condizionamento e il caricamento del campione poiché ciò può influire sui livelli di recupero.

Applicare il solvente immediatamente dopo il precedente.

Prima dell'eluizione, le cartucce completamente asciutte garantiscono un recupero ottimale dell'analita

Ottimizzazione della fase di carico: considerazioni sul pH

Il pH del campione può influenzare notevolmente i livelli di recupero dell'analita. Il pH ottimale del campione è quel pH che mette il campione in uno stato ottimale per interagire con il materiale assorbente.

## **Caricamento del campione in SPE in fase inversa**

I composti neutri non sono influenzati dal pH (non è necessario regolare il pH del campione) Per i composti caricati, utilizzare a un pH al quale il composto non viene caricato. Neutralizzare la molecola secondo quanto segue:

Per i composti basici, la molecola neutra esiste almeno 2 unità di pH al di sotto del pKa del composto Per i composti acidi, la molecola neutra esiste almeno 2 unità di pH sopra il pKa del composto.

## **Caricamento del campione in SPE in fase normale**

Il pH non è normalmente un problema nelle normali interazioni di fase, poiché i solventi utilizzati sono tipicamente solventi organici non polari, piuttosto che acqua. Non è necessario verificare il pH dell'applicazione del campione

## **Caricamento del campione nella fase di scambio ionico**

pH e pKa sono importanti: i composti acidi vengono estratti aggiustando il pH del campione a  $\text{pH} > 2$  unità rispetto a pKa dell'analita.

I composti basici vengono estratti aggiustando il pH del campione a  $\text{pH} < 2$  unità rispetto a pKa dell'analita.

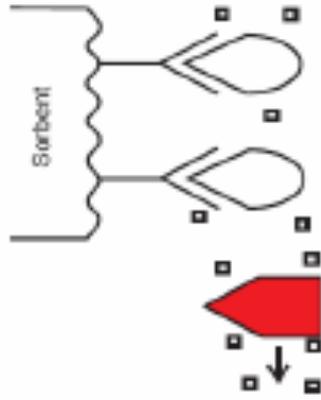
## Riepilogo dei parametri regolabili in SPE che influiscono sui livelli di recupero

Le considerazioni sul pH possono fare la differenza in termini di livelli di recupero. Il pH può essere ottimizzato utilizzando tamponi appropriati per garantire che il campione caricato sulla colonna SPE sia nel suo stato ottimizzato.

<b>pH levels</b>	<b>Wash solvent</b>	<b>Elution solvent</b>
<ul style="list-style-type: none"><li>• Sample loading</li><li>• Buffers used</li><li>• Elution</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Use a wash solvent is selected that does not recover the analyte of interest</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Select a solvent that is strong enough to remove the compounds of interest and one in which the analytes are soluble.</li><li>• Polarity</li><li>• Solubility</li><li>• Elutropic strength</li></ul>

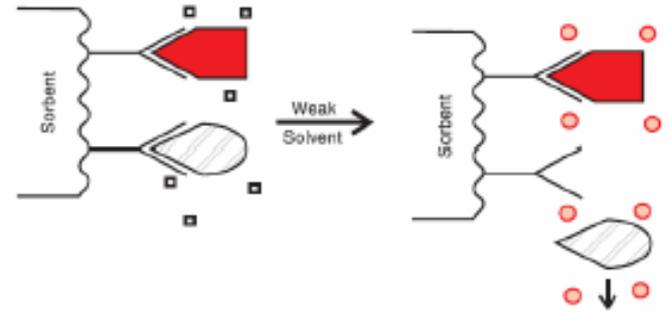
## Ritenzione di interferenti

SCHEME 1

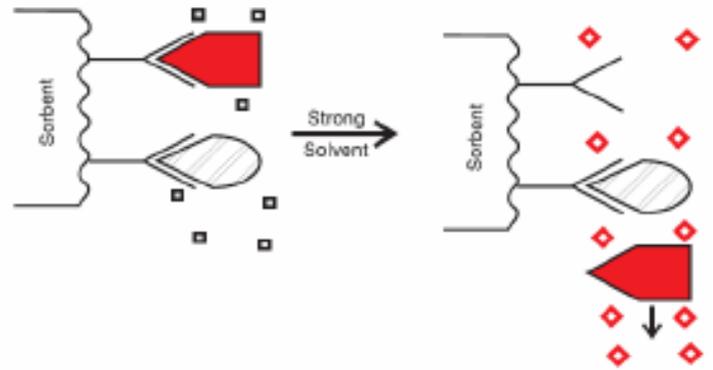


## Ritenzione di analita

SCHEME 2



SCHEME 3



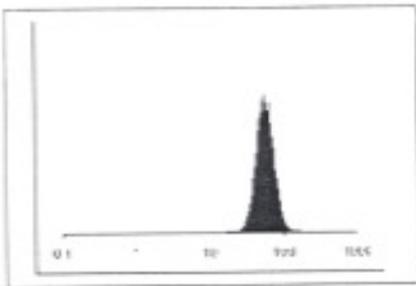


Fig. 1 Ideal particle size distribution for SPE

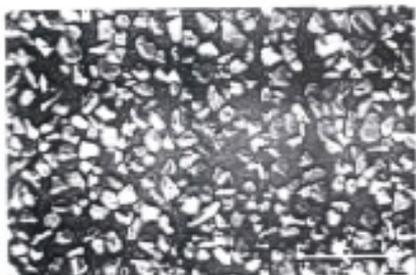


Fig. 3 Irregular silica particles

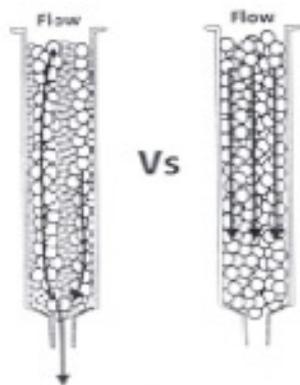


Fig. 2 Impact of fines on flow

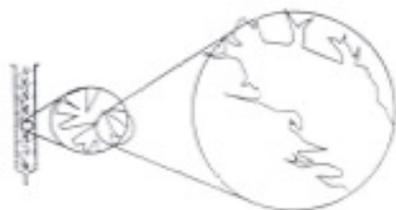
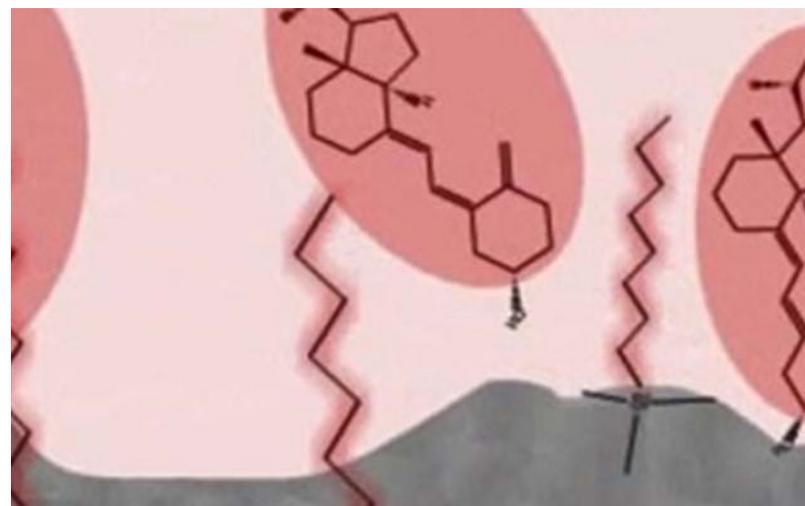


Fig. 4 Porous nature of sorbent



Solvatazione

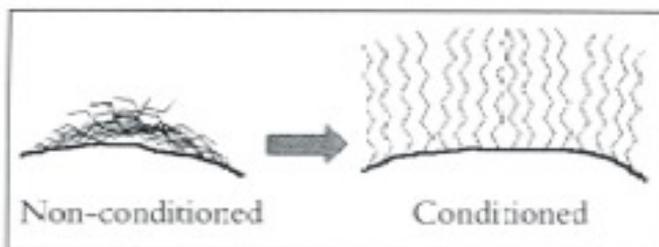


Fig. 5 Effect of conditioning on C18 bonded silica

## *Estrazione con fasi solide di campioni alimentari*

Matrice	Analiti separati	Gruppo funzionale ed eluente
Formaggi, oli, margarine, maionese	Antiossidanti e conservanti	Scambio cationico, alcol isopropilico
Frutta, verdure, succhi	proantocianidine	C18, acetone + acqua e ac. acetico
pane	bromati	C18
Carne, uova	antibiotici	Cationico forte, tampone citrato (pH 4)
Cibi conservati e trattati	zuccheri	Amminopropil, acetonitrile e acqua (4:1)

# Pretrattamento del campione prima del passaggio in SPE

**Latte:** generalmente si usa SPE in fase inversa o a scambio ionico. Il campione può essere diluito con acqua o con metanolo (max 1:2). Alcune procedure possono richiedere di precipitare le proteine (trattamento acido con HCl H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> o acido tricloroacetico). **Dopo la precipitazione si allontanano i grassi per centrifugazione e si utilizza il surnatante per purificazione in SPE**

**Vino, birra e bevande acquose:** queste possono essere processate senza pretrattamento, ad eccezione di una diluizione per portare etanolo <8% se si lavora in fase inversa. Se necessario rimuovere solidi sospesi per filtrazione.

**Succhi di frutta:** queste possono essere processate senza pretrattamento, ad eccezione di una centrifugazione per separare eventuali solidi, se i succhi sono particolarmente viscosi possono essere diluiti con acqua o tampone per aggiustare il pH.

**Carni e pesce:** l'alimento viene omogeneizzato con solvente acquoso o miscela idroalcolica, può essere necessaria una digestione acida della componente proteica e, per lavorare in fase inversa, una saponificazione dei lipidi. Il campione viene centrifugato e il surnatante usato in SPE. Nel caso di estrazione con solventi apolari si può lavorare in fase normale.

**Estrazione di composti polifenolici da olio di oliva tramite tecnica SPE con colonne C18, misura.**

#### **PROCEDIMENTO**

##### **Preparazione del campione**

- Pesare 1.0 g di campione
- Scioglierlo in 5 ml di esano.

##### **Condizionamento della colonna**

- Aggiungere alla colonna 2x5 ml di metanolo e eluirli con una velocità di 1-2 gocce per secondo.
- Aggiungere alla colonna 2x2 ml di esano e eluirli con una velocità di 1-2 gocce per secondo.

##### **Caricamento del campione**

- Introdurre il campione nella colonna e eluire con una velocità di 1-2 gocce per secondo.
- Aggiungere 3 ml di esano nel contenitore del campione e dopo accurata agitazione, aggiungerli in colonna ed eluirli c.s.

##### **Eluizione delle interferenze con esano**

- Aggiungere 2x2 ml di esano in colonna ed eluirli c.s.

##### **Eluizione dei polifenoli con metanolo**

- Aggiungere alla colonna 2x5 ml di metanolo e eluirli con una velocità di 1-2 gocce per secondo. RECUPERANDO L'ELUITO IN MATRACCIO TARATO DA 10 ml, PORTARE A VOLUME CON METANOLO (10 ml).
- Su questo estratto eseguire il metodo Folin per la determinazione dei polifenoli.

The prepreparation and separation conditions for automatic SPE and column switching methods

Compound	Matrix	Preparation	Precolumn	Column	Mobile phase	Detection	Ref
Heterocyclic aromatic amines	Food	Dilution, homogenization, off-line automatic SPE		TSK ODS-80 250×4.6 mm, 5 μm TSK ODS-Super 100×4.6 mm, 2 μm	Gradient MeCN-10 mM ammonium acetate buffer, pH 3.2-10 mM ammonium acetate buffer, pH 4.0	UV, FD, EI-MS	[16]
Aflatoxins	Milk, corn, nut	Centrifugation (milk), extraction, filtration, dilution (corn, nut), off-line automatic SPE		ODS C <sub>18</sub> 150×4.6 mm, 5 μm	MeOH-water (50:50)	FD ex 365 nm em 400 nm	[17]
PAHs	Oil, fat	Dilution, filtration, column switching	Chromspher PI 80×3 mm, 20°C	Two Chromspher 5 PAH 250×4.6 mm, 20°C	Gradient water-MeCN-ethyl acetate	FD	[21]
Penicillins, oxacillins	Pork meat	Extraction, column switching	LiChroCART LiChrospher RP-18 4×4 mm, 5 μm	LiChrospher 100 RP-18e 250×4 mm, 5 μm, 35°C	MeCN-0.2 M phosphate buffer, pH 3.0 (35:65) containing 2 mM EDTA	ED +0.65 V postcolumn derivatization	[22]
Streptomycin, dihydrostreptomycin	Animal tissue	Precipitation, extraction, centrifugation, off-line SPE, column switching	Inertsil C <sub>8</sub> 40×4.6 mm, 5 μm	LC8-DB 250×4.6 mm, 5 μm	Water-MeCN (83:17) containing 10 mM HXSA and 0.4 mM NQS at pH 3.3	FD ex 347 nm em 418 nm postcolumn derivatization	[23]

## I MIP

Lo stampo molecolare è un processo di polimerizzazione in cui monomeri specifici (scelti in base ai loro gruppi funzionali) vengono fatti auto assemblare intorno ad una molecola stampo in presenza di crosslinker.

Successivamente la molecola stampo viene rimossa dal polimero prodotto, si formano così cavità complementari in forma e funzionalizzazione (alla molecola stampo) che successivamente legheranno composti omologhi o strutturalmente simili alla molecola stampo.

I polimeri a stampo molecolare (MIP dall'inglese Molecularly Imprinted Polymer) sono strutture con "memoria" di forma e gruppi funzionali affini ad una molecola stampo. Tale materiale riconosce selettivamente la molecola stampo usata nel processo di polimerizzazione, anche in presenza di composti con struttura e funzionalità simili quelle della molecola stampo.

I polimeri a stampo molecolare hanno un comportamento simile a quello degli anticorpi. Diverse molecole possono essere utilizzate al fine di ottenere elevato riconoscimento molecolare.

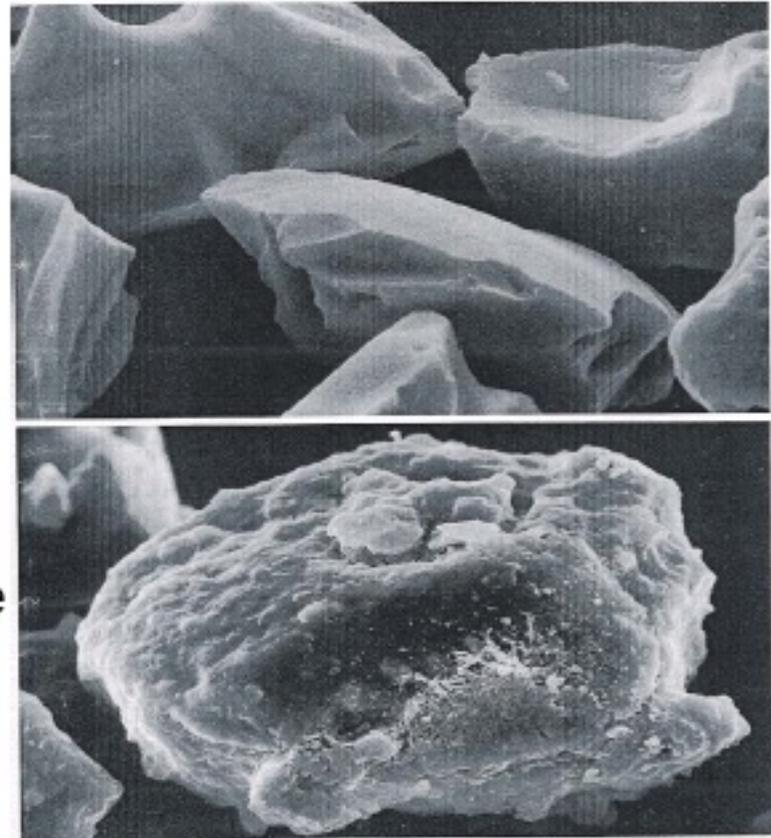
# Estrazione MSPD

Dispersione della Matrice in  
Fase Solida:

- Omogeneizzazione
- Disgregazione cellulare
- Purificazione

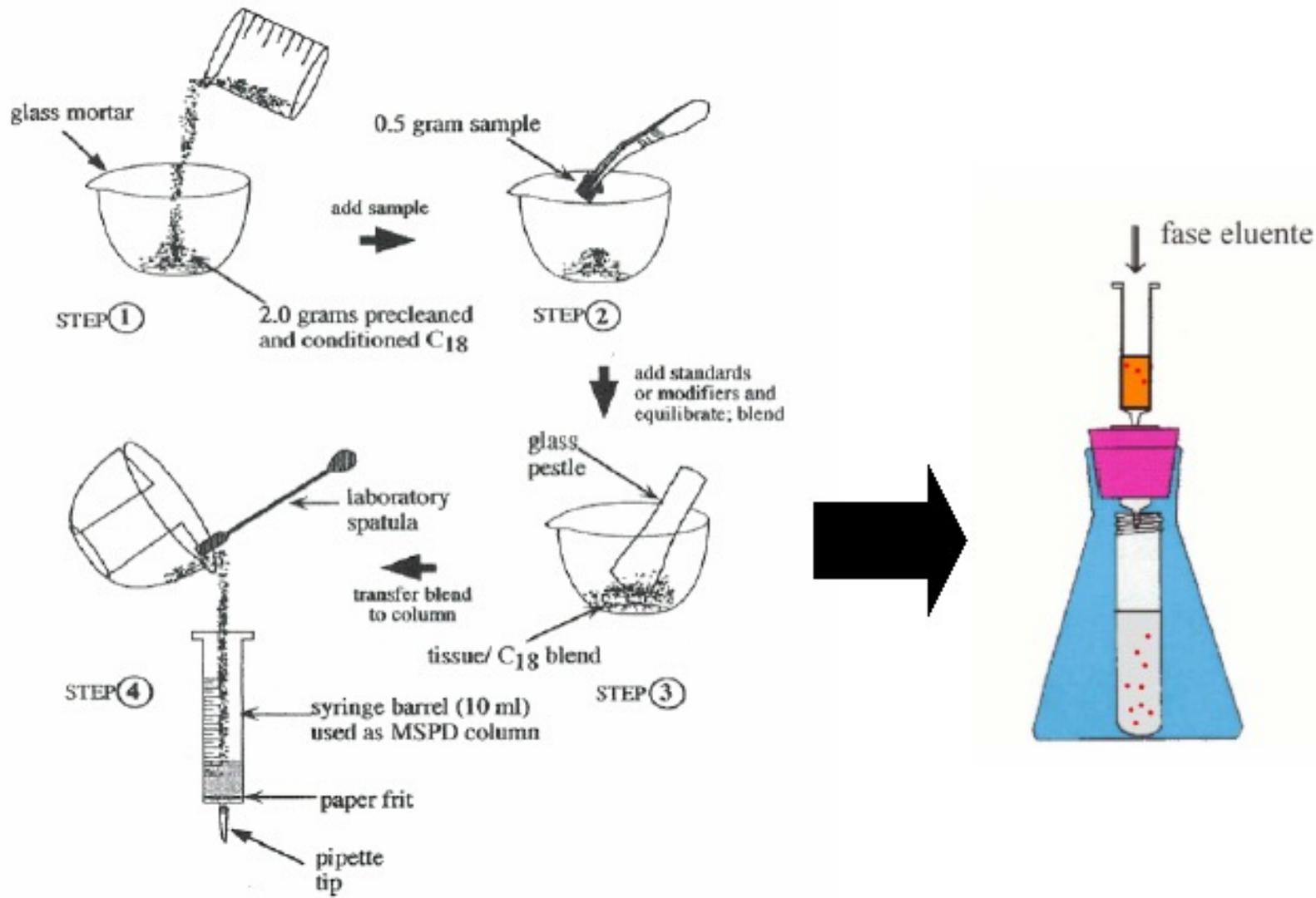
Vantaggi:

- Procedura rapida e semplice
- Basso consumo di solventi



# MSPD

## Procedura di Estrazione



## MSPD



### Matrix Solid Phase Dispersion (MSPD)

Varian has two rapid and economical solid phase extraction methods: one for the extraction of herbicides from fruits and vegetables and one for the extraction of pesticides from several food sources including meats, fish, vegetables, fruits, and various commercially processed products such as baby foods. The entire extraction procedure is very fast, with a total extraction time (from start of sample preparation to injection onto HPLC) of less than 30 minutes. The method requires far less solvent (10mL vs. 300mL for typical liquid/liquid extractions) and no emulsions are encountered.

The new procedures utilize matrix solid phase dispersion (MSPD)\* a technique that combines homogenization and extraction in a single step. The MSPD technology was first developed as a means of isolating antibiotics and herbicides from milk and infant formula (very high fat content matrices) and to extract drug residues from solid animal tissue samples. Varian was the first company to recognize the benefits of MSPD and licensed the technology from the developers at Louisiana State University.

Extraction procedure methods need to be simplified not only to shorten the working times but also to increase controls. The matrix solid-phase dispersion (MSPD) process requires simple devices and permits the miniaturization of the extraction step. It has also proved to be suitable for the isolation of several classes of compounds. Application of MSPD in fruits and vegetables can greatly decrease analysis time, increase sample throughput and reduce the use of solvent volumes [20].

# Solid Phase Extraction by Matrix Solid Phase Dispersion (MSPD) and HPLC Determination of 6 Sulfonamides in Milk

## Solid Phase Extraction

Extraction column:

LiChrolut® RP-18e, Cat. No. 76121 2R  
Glass columns, 8 ml, Cat. No. 76136 2H  
Teflon frits, Cat. No. 76137 2J

Eluents:

**A:** n-Hexane  
**B:** Dichloromethane  
**C:** Methanol

Sorbent Pretreatment:

The sorbent needed is washed/conditioned with solvents **A**, **B** and **C** (e. g. for 10 g sorbent 15 ml) and dried in vacuum

Sample Application:

2 g sorbent are placed in a glass vessel and 0.5 ml of commercially available milk is pipetted on to the sorbent. After one minute the sample is carefully mixed to homogeneity using a glass rod, then poured into a glass column with PTFE frits which form a seal on the top and bottom. Then, compressing of the column packing is performed by using a glass rod

Cleaning Step:

2 x 4 ml **A**

Drying Step:

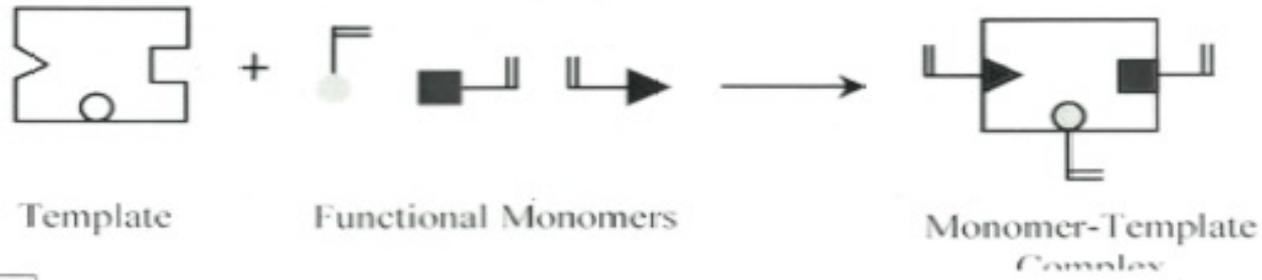
Not necessary

Elution Step:

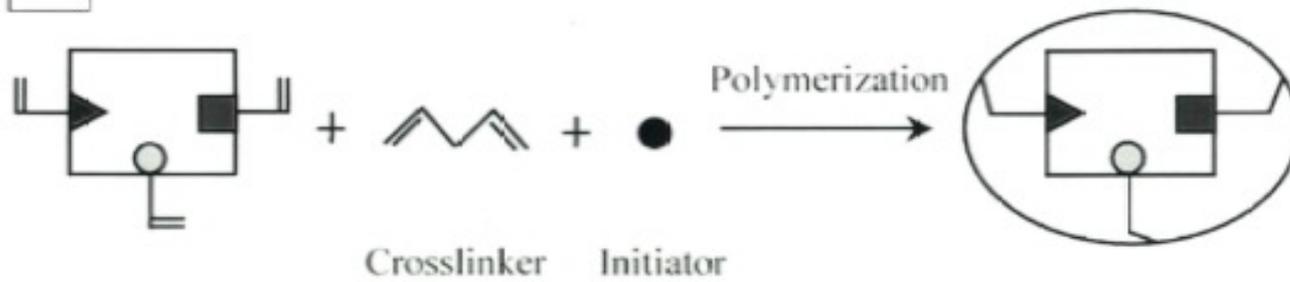
Elute twice with 4 ml **B**, evaporate the solvent, dissolve residue in 1 ml mobile phase, 3 min. ultrasonication, filtrate through 0.2 mm Anotop filter (Cat. No. 11318)

# MIP

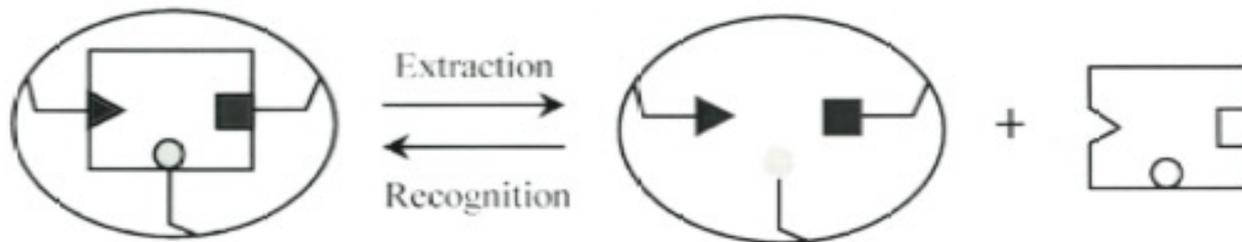
**A**



**B**

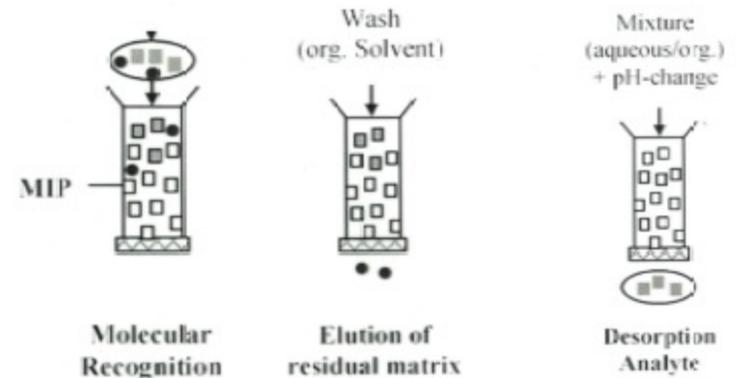
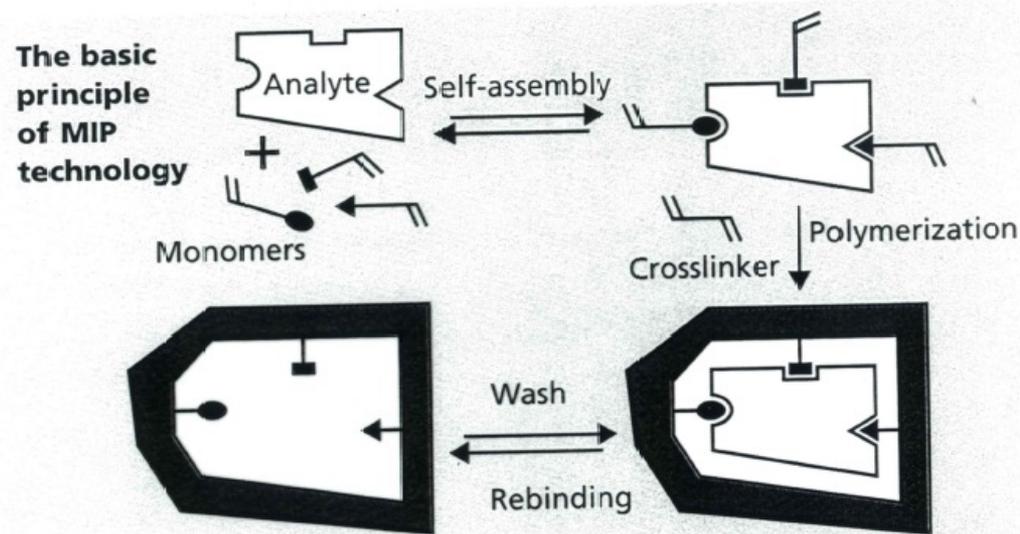


**C**



## The analyte

MIPs can be routinely prepared for a variety of low-molecular weight compounds, with molecular weights up to about 3000 Da. New, high mass transfer Molecular Imprinting



## **ESTRAZIONE DI SOSTANZE VOLATILI**

**Analiti che a temperatura pressione ambiente si trovano in fase gassosa o in equilibrio tra fase gassosa e un'altra (soluzione, solida, dispersione)**

**Lo spazio di testa indica la porzione di gas in equilibrio con una fase liquida o solida all'interno di un contenitore ermeticamente chiuso**

**Lo spazio di testa è influenzato dalla temperatura a cui è tenuto il campione**

**Il raggiungimento delle condizioni di equilibrio dello spazio di testa sono soggette a una cinetica che varia con la temperatura, la composizione della matrice e la concentrazione dell'analita e il volume del contenitore porta campione.**

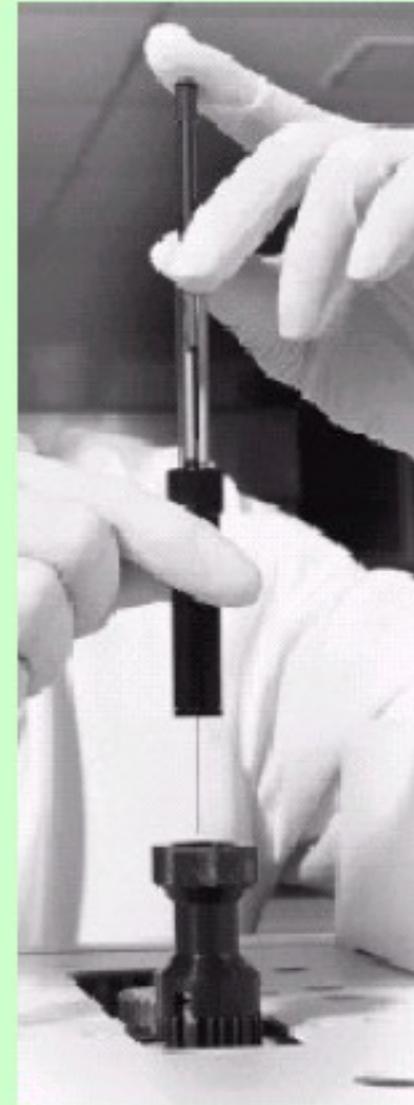
## SPME (microestrazione in fase solida)

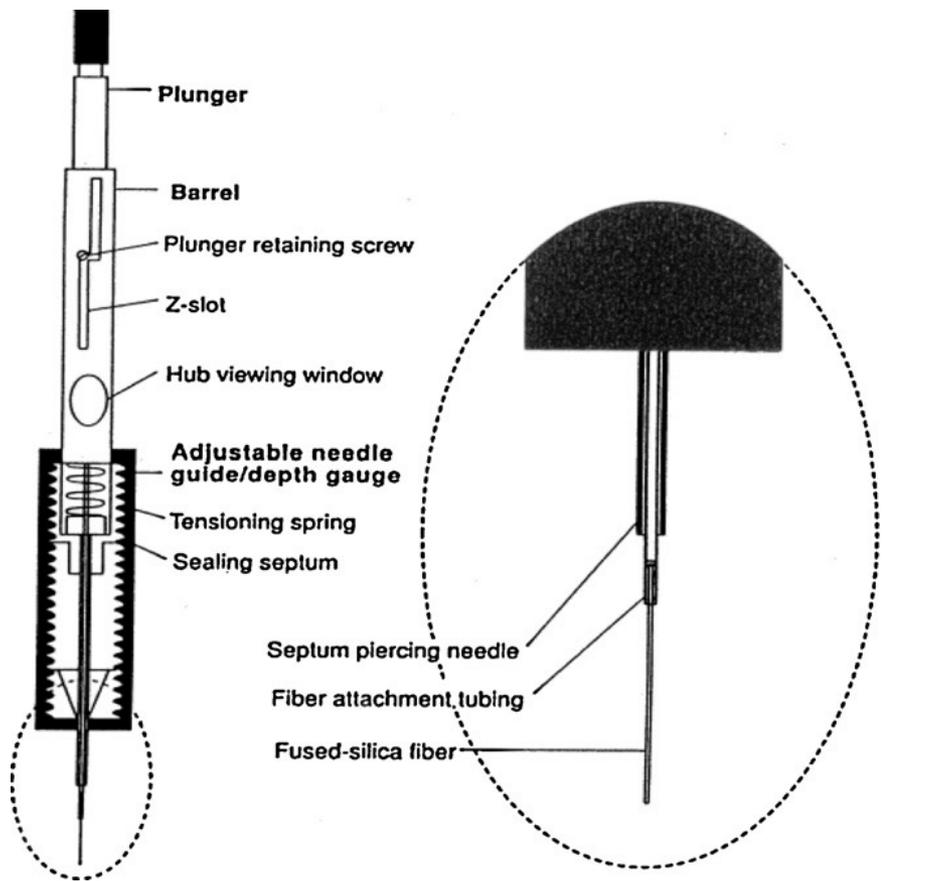
E' una tecnica che sfrutta il potere adsorbente di una fibra di silice fusa ricoperta da una fase stazionaria (polimero) appropriata. E' una tecnica:

economica, rapida, , senza l'utilizzo di solventi ( solvent-free), utile per l'estrazione di composti organici da soluzioni acquose o solidi a livelli inferiori di ppb (in tracce).

La fibra è applicata all'estremità di un capillare che po' scorrere all'interno dell'ago di una siringa e lo scorrimento della fibra viene comandato da un opportuno dispositivo.

L'SPME per l'estrazione di analiti volatili può poi essere accoppiata sia ad un GC che ad un HPLC.



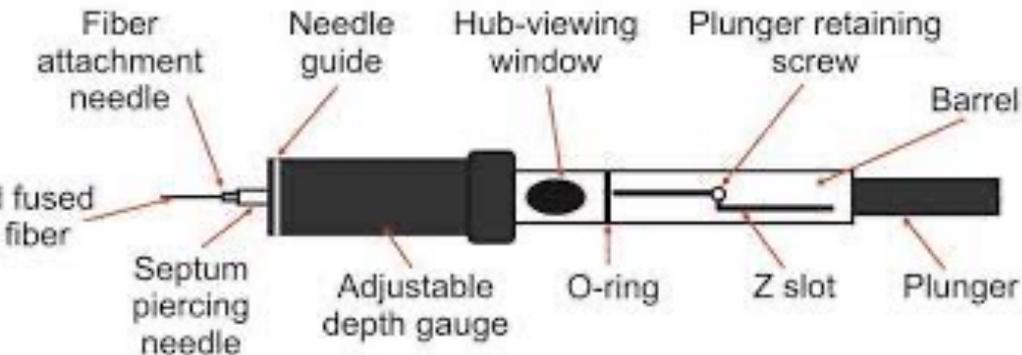


La fibra in silice fusa è contenuta all'interno di un ago che serve a forare il setto del contenitore porta campione

La fibra è fatta muovere nell'ago tramite un sistema di molle

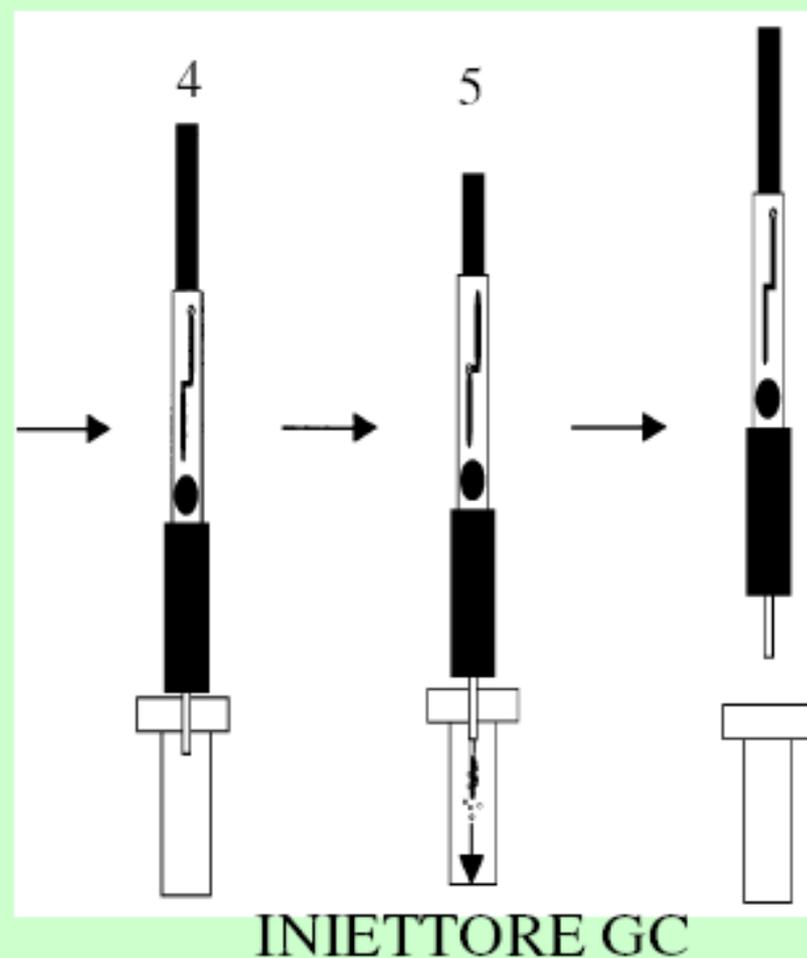
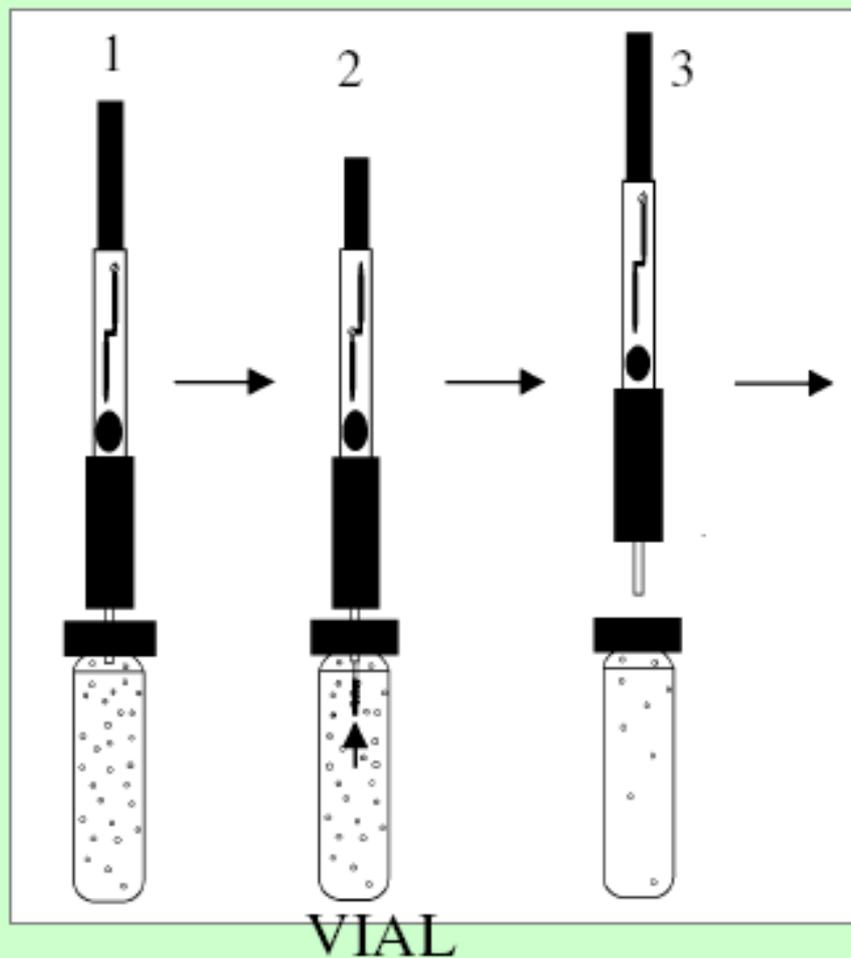
Nella porzione terminale della fibra è contenuto il materiale assorbente.

La fibra serve da supporto a tale materiale



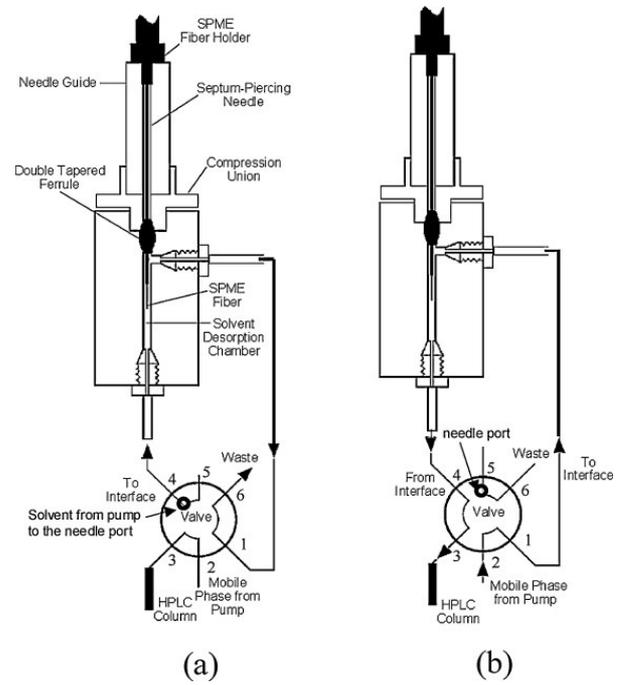
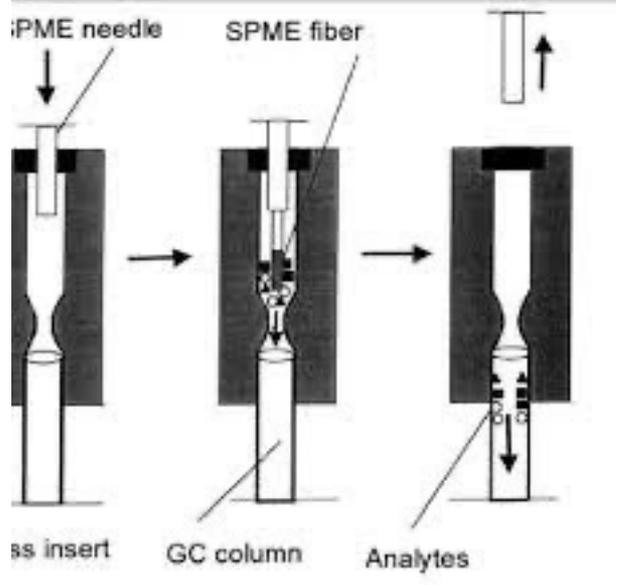
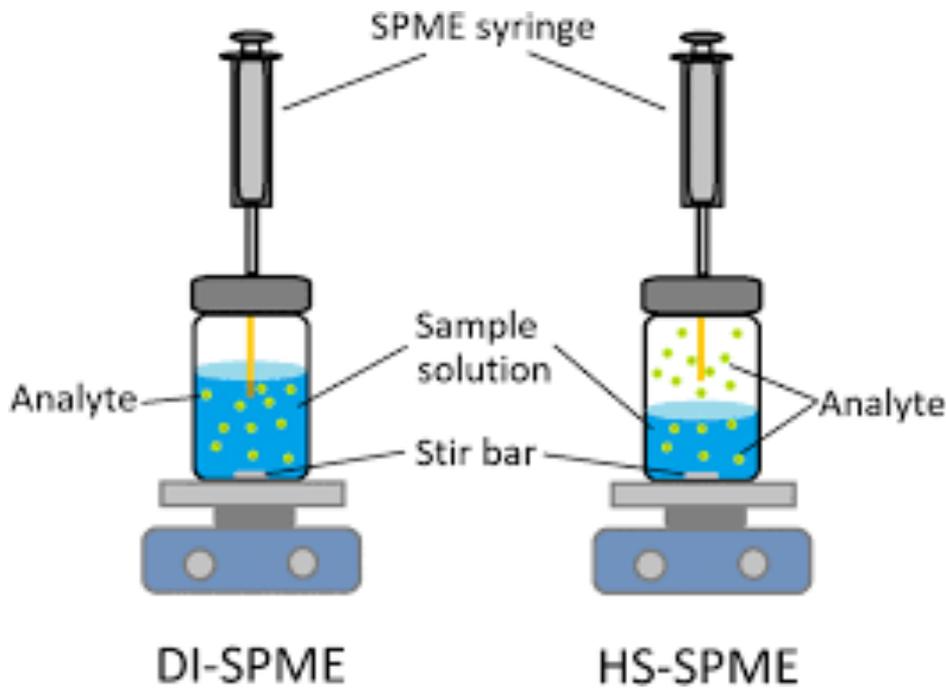
## *Modalità di utilizzo di una fibra SPME*

1. attraversamento del setto nel vial del campione
2. fuoriuscita della fibra ed adsorbimento analiti
3. retrazione della fibra
4. introduzione nell'iniettore GC o interfaccia HPLC
5. fuoriuscita della fibra e desorbimento degli analiti
6. Retrazione degli analiti

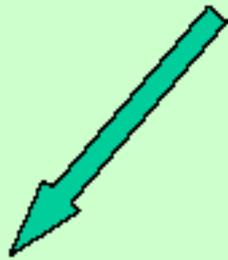


# Desorbimento

# Assorbimento

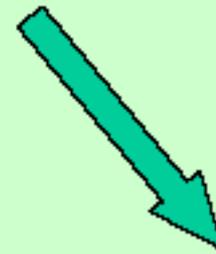


## La fase di isolamento dei volatili da una matrice mediante SPME



### *Spazio di testa statico:*

si introduce la fibra nello spazio di testa del campione cioè immersa nella fase vapore sovrastante il campione che è chiuso in un contenitore grazie ad un setto a tenuta nel quale l'ago del sistema può entrare. Possibilità studiare campioni solidi, non solo soluzioni, equilibrio di adsorbimento più veloce.



### *Per immersione*

la fibra è direttamente immersa nella matrice liquida; tempi più lunghi per l'adsorbimento, utilizzabile per un numero inferiore di campioni

Adatta ad estrarre analiti dai più volatili fino ad alto PM (PM=30-600)

## Equilibrio termodinamico (partizione)

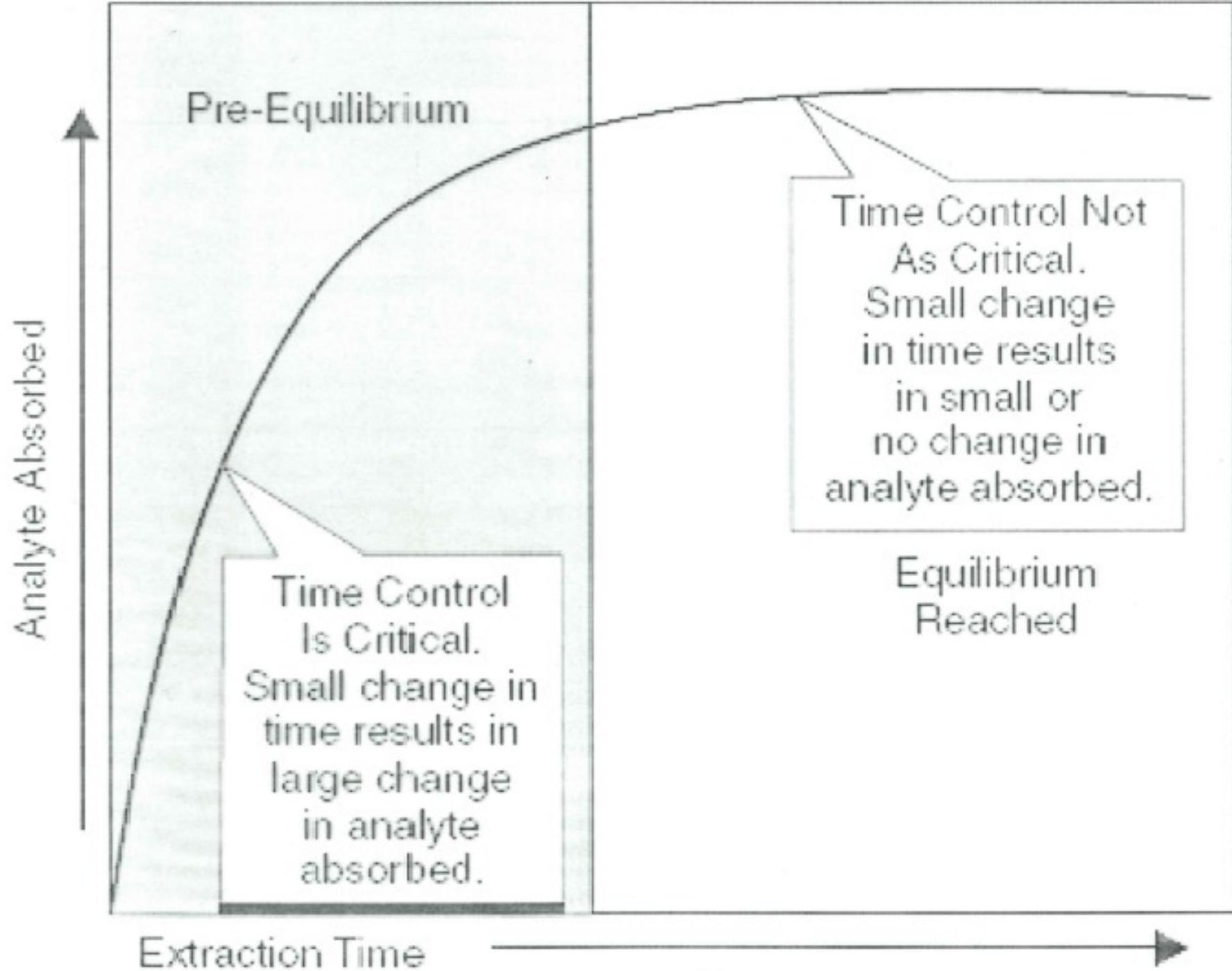
In un'analisi in spazio di testa statico il campione viene estratto da un sistema statico chiuso (vial chiuso) dopo che si è instaurato un equilibrio termodinamico (partizione) tra matrice liquida (o solida) e lo spazio di testa sovrastante che si è stabilito.

In SPME si creano un equilibrio (favorito dall'agitazione) tra la concentrazione dell'analita nel campione, nello spazio di testa sopra il campione, ed il rivestimento polimerico della fibra.

L'ammontare dell'analita assorbito dalla fibra ( $n$ ) dipende dallo spessore del polimero e dalla costante di distribuzione ( $K_{fs}$ ) dell'analita:

$$n = \frac{K_{fs} V_f V_s C_o}{K_{fs} V_f + V_s}$$

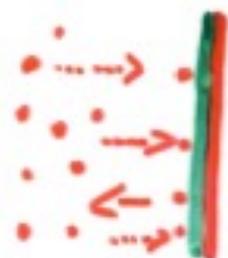
$V_f$  = volume del polimero  
 $V_s$  = volume del campione



# OTTIMIZZAZIONE DI SPME

- SCELTA DI MODALITA' DI ESTRAZIONE
- SCELTA DELLA FASE DI RIVESTIMENTO
- OTTIMIZZAZIONE DELL'ESTRAZIONE
  - tempo
  - agitazione
  - temperatura
  - pH
  - sali
- OTTIMIZZAZIONE DI DESORBIMENTO

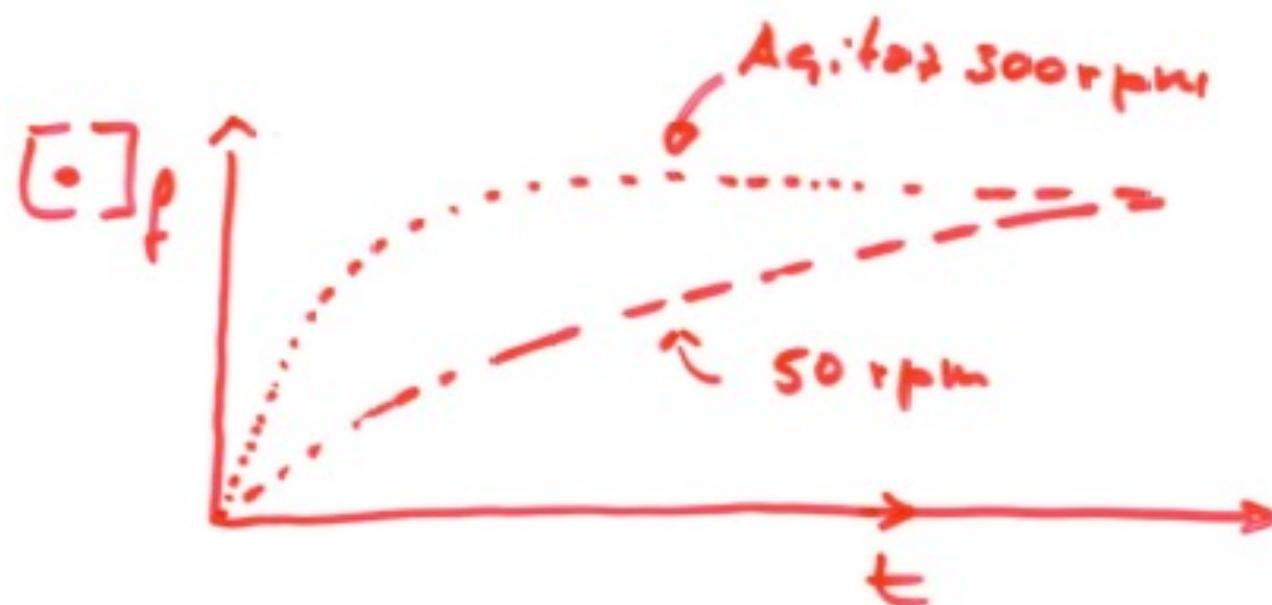
# SPME



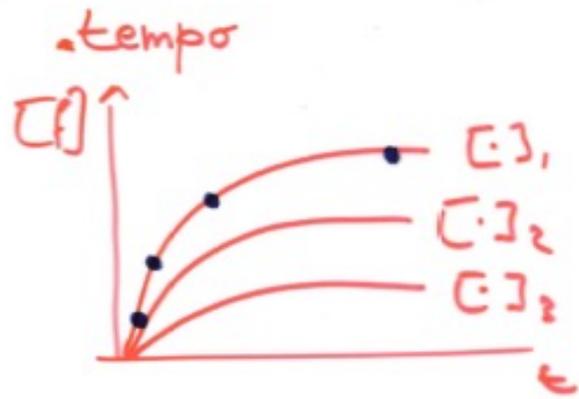
$$K_d = \frac{[\cdot]_f}{[\cdot]_s}$$



max  $[\cdot]_f$  all'equilibrio



- Parametri di estrazione.



agitazione

- accelera il trasferimento di analita alla fibra
- agitazione troppo elevata portava non riproducibilità

sali

l'uso di sali favorisce l'estrazione in HS-SPME

temperatura

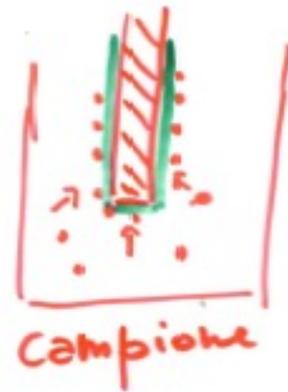
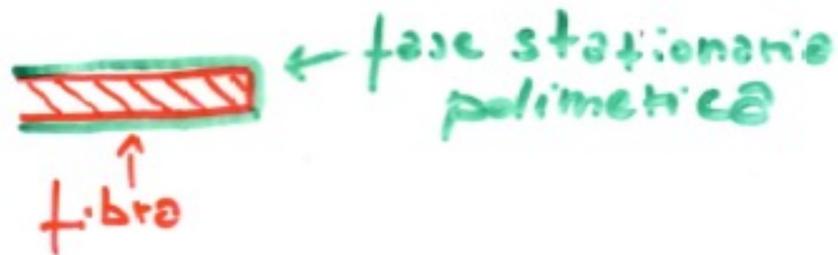
↑ velocità di estrazione  
↓  $K_d$

pH

analisi acide ↓ pH  
analisi basiche ↑ pH → forma indissociata

⇒ compromesso!

# SPME



- tipi di fase stationary:

non-bonded  $\longrightarrow$  solventi organici polari (EtOH, MeOH, AcN)

bonded  $\longrightarrow$  solventi organici apolari

partially crosslinked  $\longrightarrow$  solventi organici polari

highly crosslinked  $\longrightarrow$  C.S

→ Principio: "similia similibus"

polydimethylsiloxane (PDMS) apolare  
- temperaturstabil  $\sim 300^\circ\text{C}$

polyacrylate (PA) med. polare

Dimethylbenzol (DVB) + Carboxen  
+ Carbowax } Diinertmed.

$\uparrow K \xrightarrow{\text{th.}}$   $\Rightarrow \uparrow \text{eq. time, } \uparrow \text{ capacity,}$   
 $\uparrow \text{ dead time.}$

# Desorbimento

## - termico

spessore della fibra  
temp iniettore  
tempo di iniezione

## - con solvente

- dinamico

- statico

(x analisi poco trattate, e fibre con  
spessore sottile)

(fibre  $\geq$  spessore)

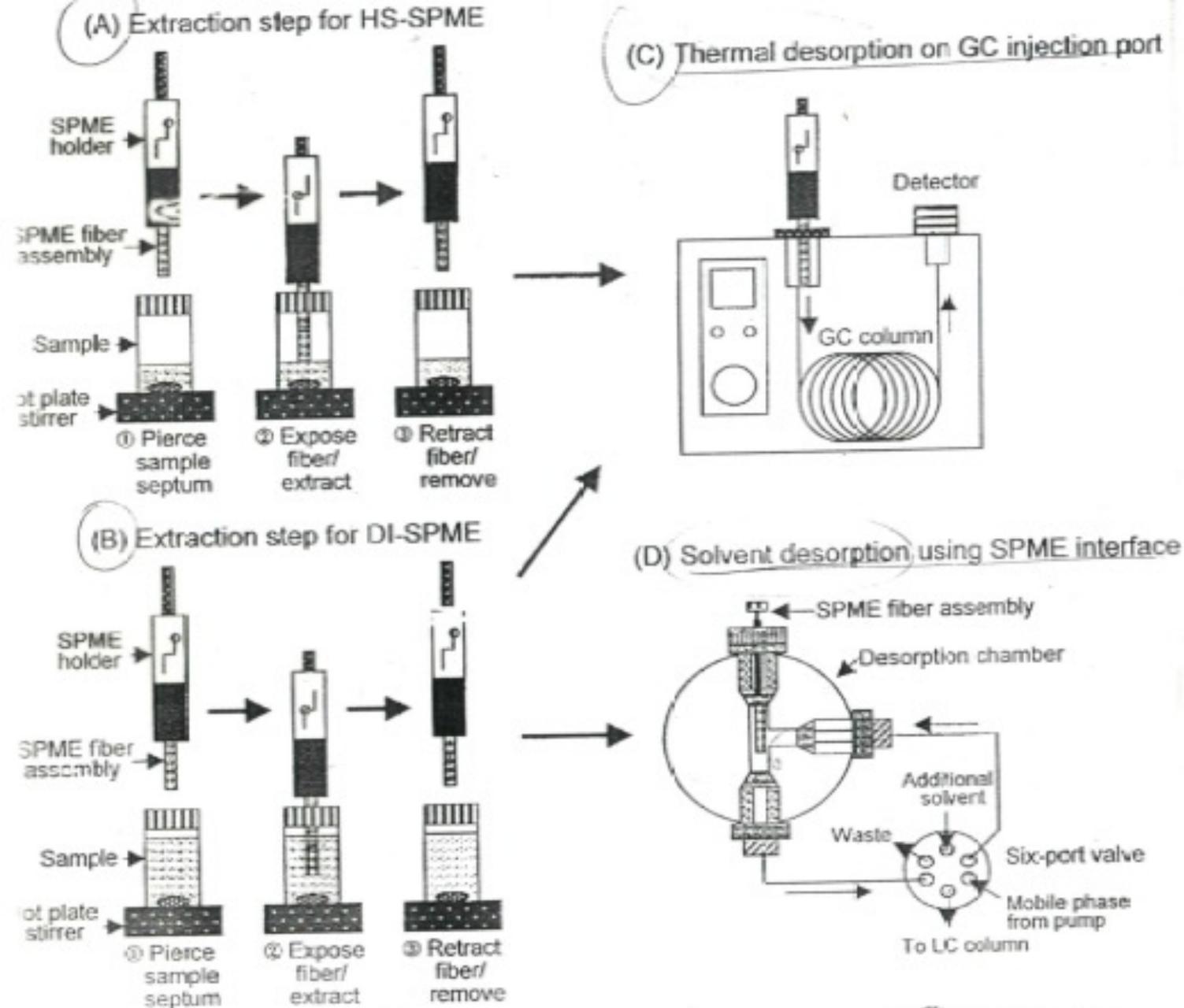


Fig. 3. Extraction process by headspace and immersion fiber SPME, and desorption systems for GC and HPLC analyses.

## Tipi di fibre SPME

Fasi	Diametro film( $\mu\text{m}$ )	Tipo di film	Polarità	Volume fase( $\text{m}^3$ )
PDMS	7	Omogeneo	Apolare	$26 \times 10^{-12}$
PDMS	30	Omogeneo	Apolare	$132 \times 10^{-12}$
PDMS	100	Omogeneo	Apolare	$612 \times 10^{-12}$
PDMS/DVB	65	Poroso	Polare	$357 \times 10^{-12}$
Carboxen/ PDMS	75	Poroso	Polare	$436 \times 10^{-12}$
Carbowax/ DVB	65	Omogeneo	Polare	$357 \times 10^{-12}$
PA	85	Omogeneo	Polare	$521 \times 10^{-12}$



PDMS Fiber, 7  $\mu\text{m}$



PDMS Fiber, 30  $\mu\text{m}$



PDMS Fiber, 100  $\mu\text{m}$



Acrylate Fiber, 85  $\mu\text{m}$

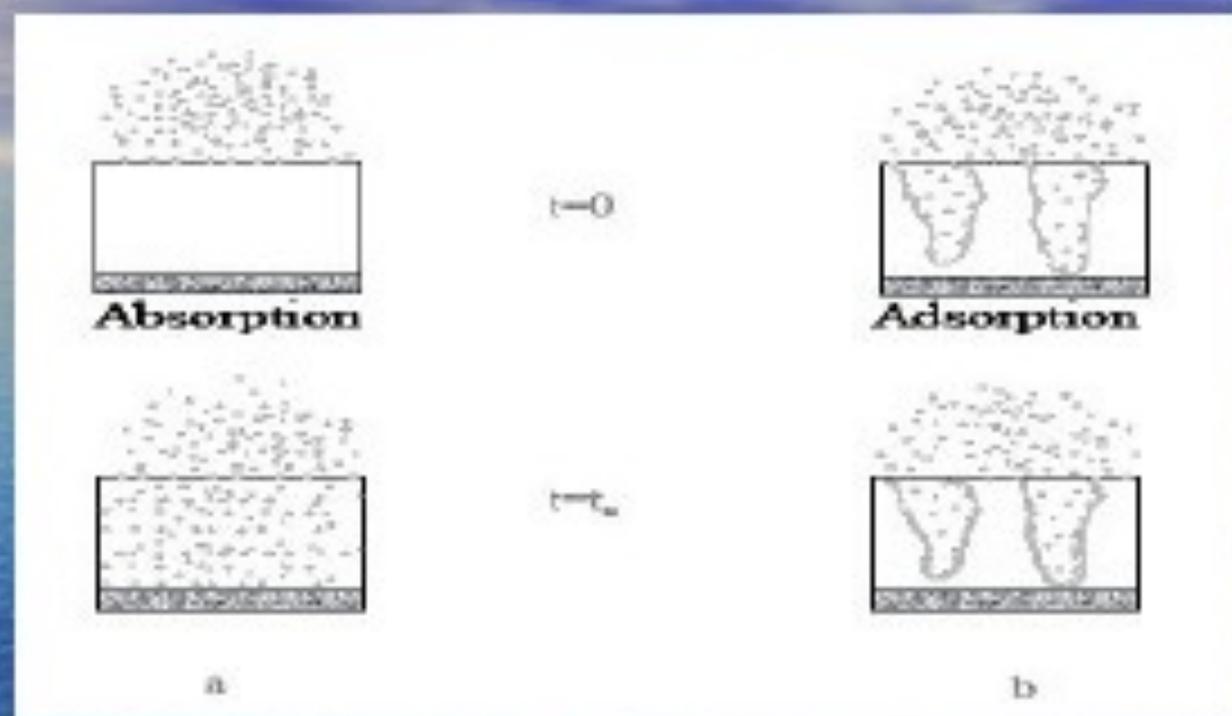


Carbon WR Fiber / PDMS, 95  $\mu\text{m}$



DVB / PDMS, 65  $\mu\text{m}$

## Meccanismi con i quali avviene l'estrazione dell'analita sulla fibra

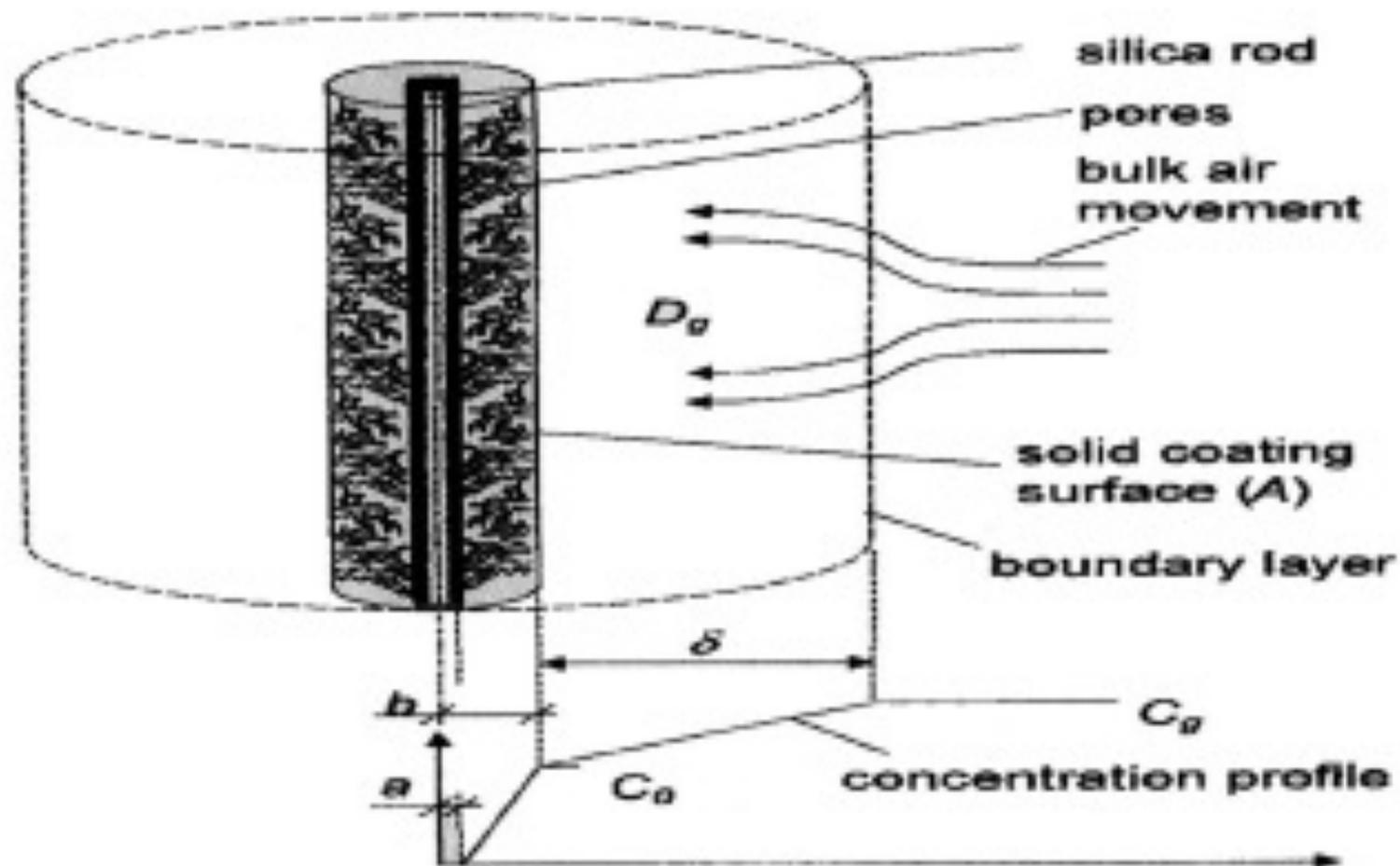


L'assorbimento è tipico dei rivestimenti a fase liquida come il polidimetilsilossano (PDMS) ed il poliacrilato (PA), in cui le molecole degli analiti si ripartiscono nella fase della fibra, fino ad occuparne l'intero volume.

Nell'adsorbimento, fenomeno che si ottiene nei substrati solidi come il Carboxen (CAR), la struttura porosa del rivestimento permette di fissare l'analita nei pori della fase solida.

# Campionamento SPME con fibra porosa

Da Anal. Chem, 72; pag.5179 (2000) Ed. American Chemical Society



## Purge & Trap (Spazio di testa dinamico) - PAT

Il PAT è un processo in cui i composti organici più o meno volatili vengono estratti in continuo a temperatura ambiente da una matrice liquida e concentrati su una trappola di assorbimento. Le sostanze vengono portate via dalla trappola mediante desorbimento termico per poi raggiungere un gascromatografo come campione concentrato per essere qui separati e rilevati nei singoli analiti.

E' una tecnica efficace per estrarre e concentrare composti organici volatili presenti in matrici solide e liquide (terreni, sedimenti, matrici acquose, alimenti, bevande, farmaci) , adatta soprattutto per composti organici poco solubili o insolubili in acqua.

La procedura di analisi consiste in tre step:

- fase purge con simultanea concentrazione
- fase di desorbimento
- fase di condizionamento della trappola

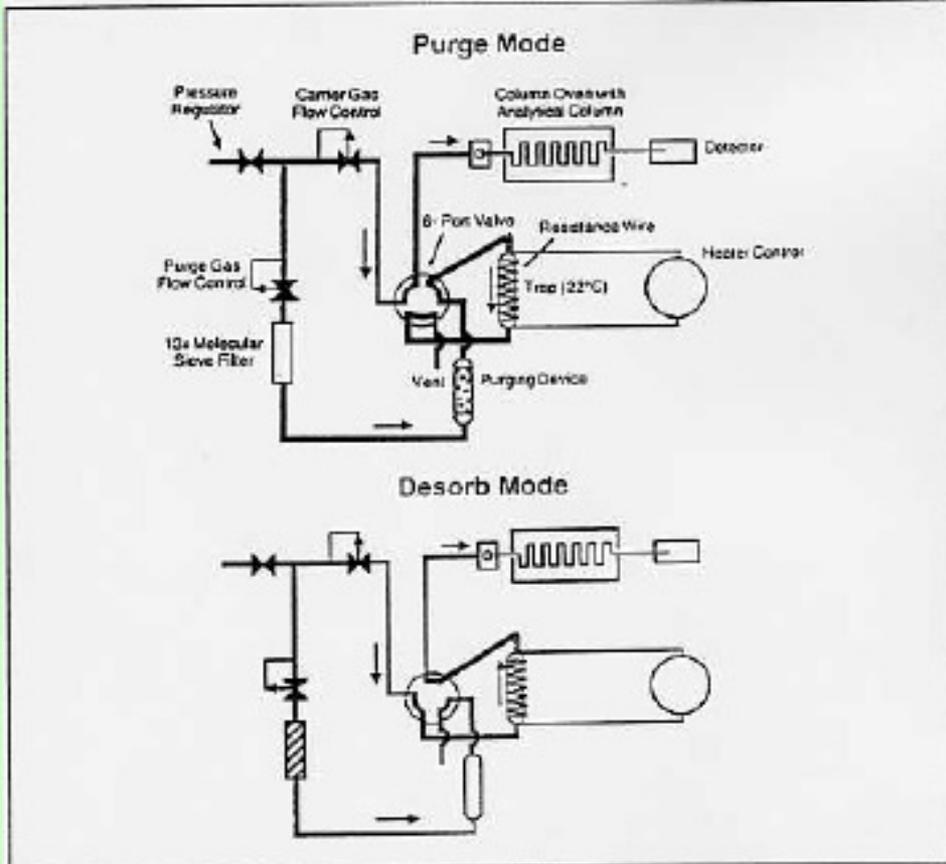
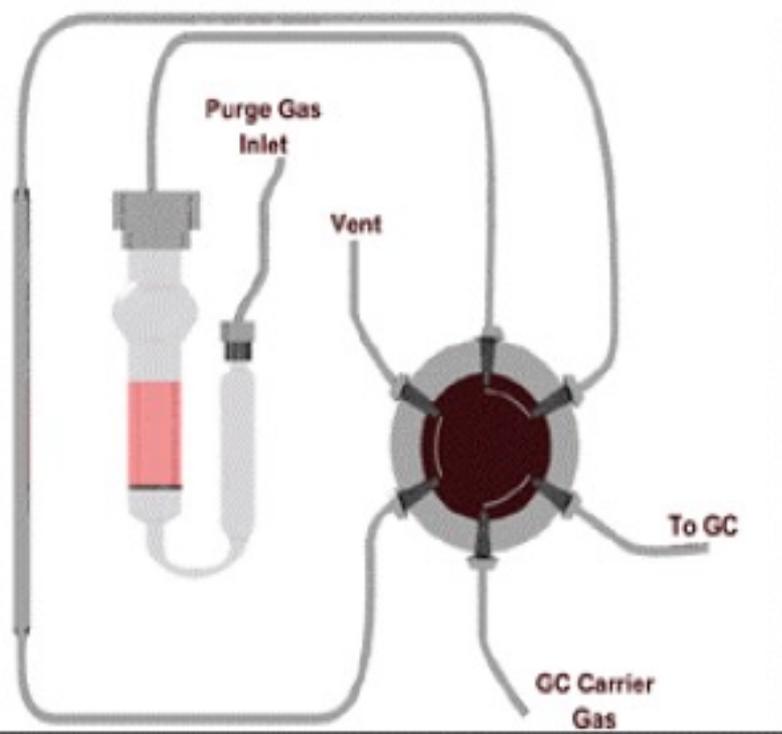


Figura 4.7 - Purge and Trap: schema che illustra le condizioni di purge mode e di desorb mode.

Nel centro c'è un tubo ad U (purging tube). Un purge gas inerte (N<sub>2</sub> o He) viene fatto gorgogliare nel campione disperso in ambiente acquoso a T ambiente per effettuare lo strippaggio dei composti organici volatili dalla fase acquosa alla fase vapore. Il flusso di gas inerte (fase purge) trascina il vapore in una trappola contenente materiali adsorbenti (ad es. Tenax). Dopo un determinato tempo di purge, la T della trappola viene rapidamente aumentata e i composti che erano intrappolati e concentrati nella trappola vengono desorbiti dal gas inerte (switch della valvola a sei vie) e portati verso il GC.

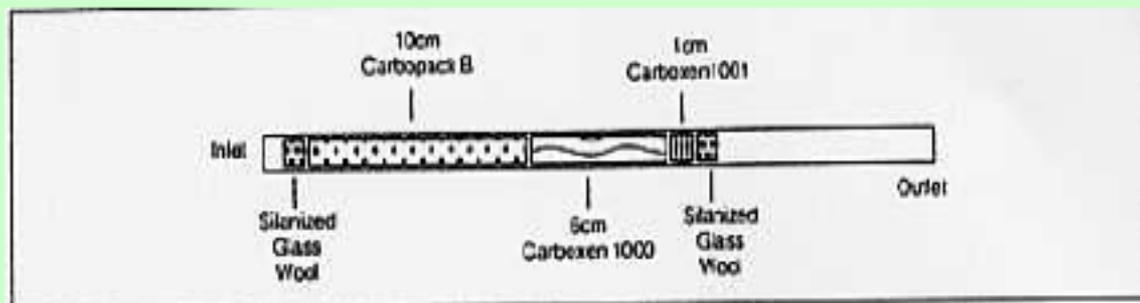


Figura 4.8 - Schema di una cartuccia utilizzata per il «Purge and Trap».

Le cartucce costituenti le trappole possono essere impaccate con letti multipli di diversi materiali adsorbenti per intrappolare una vasta gamma di composti (polari e apolari, alto e basso PM).

Tenax: tutte le sostanze eccetto  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  come applicazione; Desorb T:  $230^\circ\text{C}$

OV-1 Tenax Silica gel: tutte le sostanze; Desorb T:  $225^\circ\text{C}$

Carbopack B CarbosieveSIII: tutte le sostanze; desorb T:  $250^\circ\text{C}$

## Desorbitore termico

La trappola è esterna quindi possibilità di mettere in serie le trappole.

la trappola : lunga 8 cm, fase airtoxy,carbowax

si carica il tubo a 40°C, si fa passare il flusso di N<sub>2</sub> con 5 ml/min per anche 60' e poi si effettua il desorbimento.