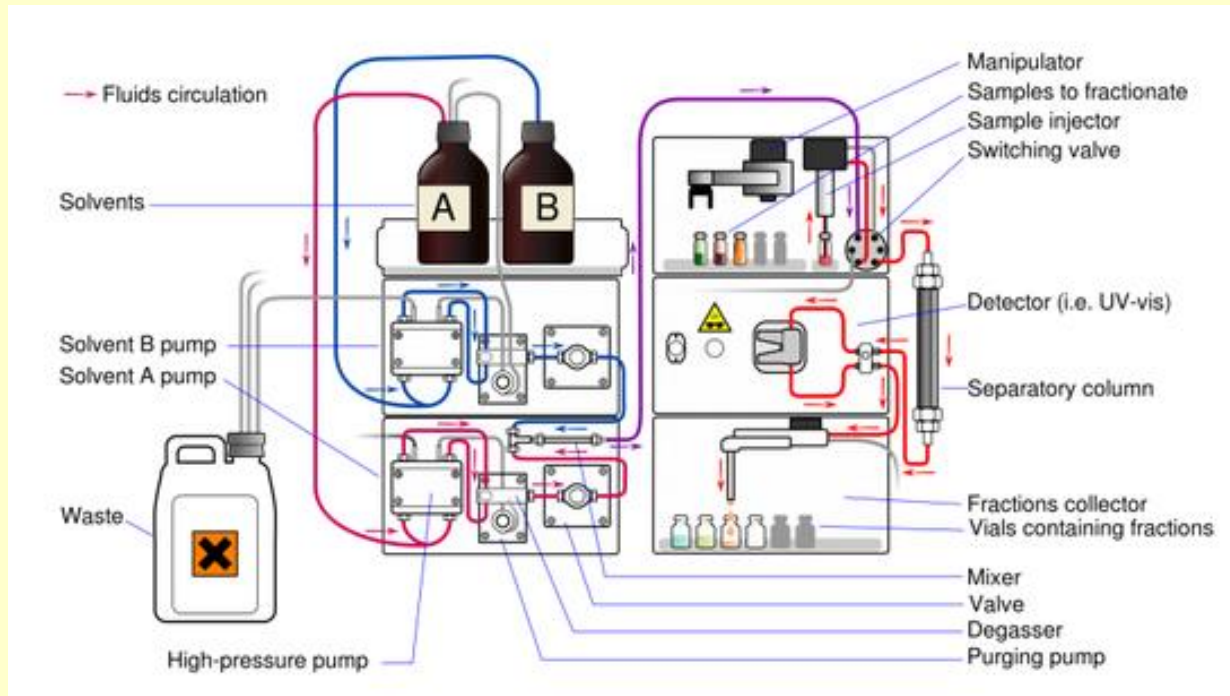


Lezione ed Esercitazione di

Cromatografia liquida

Prof. Ranieri Urbani

a.a. 2019-2020



INTRODUZIONE

- *La fase mobile è LIQUIDA;*
- *Nella LC classica (Tswett, 1906) venivano utilizzate colonne di vetro con diametro interno tra 1 e 5 cm e L = 50 - 500 cm;*
- *Per garantire velocità di flusso adeguate alla operatività in laboratorio (fino a 1 ml/min) si utilizzavano particelle di dimensione di 150-200 μm (per particelle di dimensioni inferiori le separazioni erano molto lente);*
- *Aumento di velocità con pompe o applicazione di vuoto non migliorava le prestazioni (aumento di velocità lineare implica aumento H);*
- *Per aumentare l'efficienza di colonna le particelle della f.s. andavano ridotte, ma al tempo non c'erano dispositivi per applicare alle colonne una pressione sufficiente da garantire una certa velocità di eluizione anche con impaccamento così "denso".*
- *Alla fine degli anni '60 del secolo scorso si iniziarono ad utilizzare particelle di diametro di 3-10 μm e nuovi moduli strumentali con adeguate pompe per far fluire la fase mobile -> **High Performance Liquid Chromatography (HPLC)**.*

Cromatografia Liquida (LC) la fase eluente è un liquido

Nella **Liquido-Liquido (LLC) o di ripartizione**, la fase stazionaria è un liquido, immiscibile con la fase mobile, che impregna un supporto solido inerte; questo tipo di cromatografia è basato sulla diversa **ripartizione** di due o più soluti fra le due fasi liquide.

Nella **Liquido-Solido (LSC) o di adsorbimento**, la fase stazionaria è un materiale solido costituito da particelle con grande area superficiale: in questo caso il solido non è un semplice supporto inerte, ma è in grado di **adsorbire** superficialmente i soluti da separare. Il meccanismo di separazione è quindi determinato dalla diversa affinità dei soluti per la fase solida. Come materiali solidi adsorbenti si usano generalmente gel di silice, allumina, carbone attivo.

Nella cromatografia a **Scambio-Ionico (IEC)**, la fase stazionaria è costituita da una resina a scambio ionico, ossia un supporto organico al quale sono legati dei gruppi ionici o ionizzabili (ad esempio $-\text{SO}_3^-$, $-\text{COO}^-$, $-\text{NR}_3^+$). I gruppi ionici della resina trattengono per mezzo di interazioni elettrostatiche, controioni di carica opposta che possono essere scambiati con gli ioni presenti nella fase mobile. Il meccanismo di separazione è basato perciò sulla diversa affinità che i diversi soluti (ionici) presentano nei confronti dei gruppi attivi della resina.

Nella cromatografia di **Esclusione (SEC)**, la fase stazionaria è costituita da materiale poroso, avente i pori delle dimensioni delle molecole da separare (ad esempio setacci molecolari inorganici, tipo zeoliti, oppure polimeri organici di porosità controllata). Il meccanismo di separazione è determinato esclusivamente dalle dimensioni dei soluti: le molecole più grandi si muovono velocemente lungo la fase stazionaria, mentre quelle più piccole sono più trattenute perché penetrano all'interno dei pori della fase stazionaria.

CROMATOGRAFIA SU COLONNA CLASSICA (bassa pressione)

Le **colonne** impiegate sono generalmente in vetro o in plastica e possono essere di varie dimensioni secondo le esigenze.

Il **riempimento della colonna** può essere costituito da materiale solido adsorbente, finemente suddiviso, asciutto e scelto opportunamente in base alla separazione da effettuare (per **LSC**) oppure la colonna viene riempita con supporto granulare inerte, generalmente gel di silice, che viene impregnato con solvente opportuno e che costituirà la fase fissa (per **LLC**) o ancora una resina a scambio ionico per cromatografia ionica.

Il **solvente** scelto, contenente la miscela da separare, viene fatto fluire attraverso la colonna.



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:

- ❖ a fase legata (BPC = *Bonded Phase Chromatography*)
- ❖ a fase non legata (LLC = *Liquid Liquid Chromatography* o *NPLC*)

Oggi giorno la LC più diffusa è la RPLC (reverse phase LC) in cui la fase stazionaria è meno polare del solvente (al contrario di NPL, normal phase LC), la separazione dell'analita è basata prevalentemente sulla partizione di esso tra le due fasi.

HPLC (High Performance Liquid Chromatography) (alta pressione)

Il metodo strumentale della cromatografia liquida ad alta pressione è frutto dell'evoluzione tecnologica delle tecniche di cromatografia su colonna.

I principi sono sempre quelli dell'adsorbimento e della ripartizione, ma le fasi stazionarie sono impaccate in colonne chiuse, con materiali di granulometria molto fine (5-10 μm) e controllata: in tal modo viene aumentata la superficie di contatto fra fase mobile e fase stazionaria e l'impaccamento diviene più omogeneo.

Utilizzando queste colonne è necessario che la fase mobile venga fatta fluire ad alta pressione perché, attraverso colonne con impaccamento a granulometria così fine, il flusso dell'eluente diventa molto lento.

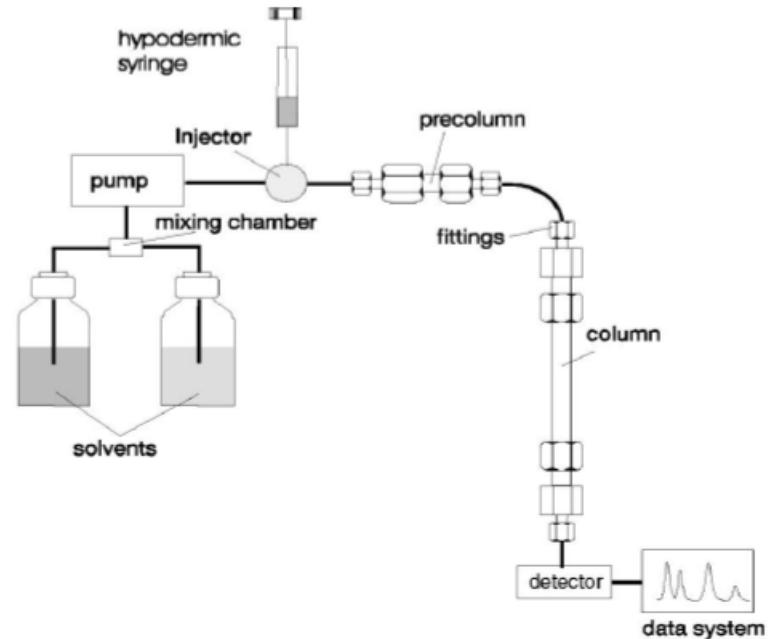
Con l'impiego di pompe particolari, capaci di applicare pressioni di 50-150 atm, diventa possibile ottenere flussi di alcuni ml/min, sufficienti ad ottenere l'eluizione in tempi ragionevolmente brevi.

Schema di un'apparecchiatura HPLC

La strumentazione

La strumentazione consiste nelle seguenti componenti:

- Sistema di pompaggio;
- Riserve di solvente;
- Sistema di iniezione del campione;
- Colonna cromatografica;
- Rivelatore



Il filtro e la precolonna presenti nel circuito servono ad evitare danneggiamenti della colonna analitica, per l'eventuale presenza di solidi sospesi nel solvente.

Solvente e sostanza in esame passano attraverso la colonna nella quale avviene la separazione.

I componenti separati, vengono quindi convogliati nella zona di misura del rivelatore e quindi in un recipiente di raccolta degli scarti.

Il segnale prodotto dal rivelatore, opportunamente elaborato, viene registrato.

Le fasi stazionarie in HPLC sono costituite da particelle di **silice** (più raramente **allumina**) che funzionano:

- da **ADSORBENTE** (cromatografia di adsorbimento = LSC)
- da **SUPPORTO** (cromatografia di partizione = LLC).

L'uso 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).

Fasi stazionarie

La **fase stazionaria** più comune è costituita da particelle microporose di silice ad elevata purezza, permeabili al solvente e con elevata area superficiale (alcune centinaia di m^2/g). Questa fase stazionaria viene generalmente impiegata per cromatografia di adsorbimento. Più comunemente, si realizza la cromatografia di ripartizione impiegando **fasi stazionarie legate (BPC)**, ossia fissate covalentemente alla superficie della silice.

Fasi polari comuni		Fasi non polari comuni	
$R = (CH_2)_3NH_2$	ammino	$R = (CH_2)_{17}CH_3$	ottadecile
$R = (CH_2)_3CN$	ciano	$R = (CH_2)_7CH_3$	ottile

La C18 (anche indicata con ODS) è la fase stazionaria di gran lunga più utilizzata in HPLC

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 (RPLC)	FASE MOBILE: polare (H_2O , CH_3OH , CH_3CN) FASE STAZIONARIA: non polare ($Si-O-SiR_3$) SOLUTI: non polari
------------------------------	---

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

Il processo di eluizione

In *cromatografia di adsorbimento*, le molecole di solvente competono con le molecole di soluto per la fase stazionaria: l'eluizione avviene quando il solvente sposta il soluto dalla fase adsorbente. La **forza eluente** (ϵ°) è una misura dell'energia di adsorbimento di vari solventi sulla superficie di silice, scegliendo come 0 di riferimento il pentano. Si è creata così la seguente scala definita **serie eluotropica** di vari solventi.

Solvente	Forza eluente (ϵ°)
Pentano	0.00
Esano	0.01
Eptano	0.01
Triclorotrifluoroetano	0.02
Toluene	0.22
Cloroformio	0.26
Diclorometano	0.30
Etere dietilico	0.43
Acetato di etile	0.48
Metil t-butil etere	0.48
Diossano	0.51
Acetonitrile	0.52
Acetone	0.53
Tetraidrofurano	0.53
2-propanolo	0.60
Metanolo	0.70

Viene ottenuta misurando il calore svolto dal solvente quando interagisce con la fase stazionaria, ricavando in tal modo la grandezza ϵ° ; maggiore è l'interazione, maggiore risulterà il calore svolto.

Cromatografia a fase normale

- Fase stazionaria **polare**, solvente **meno polare**
- Solventi **più polari** hanno **maggiore forza eluente**

Cromatografia a fase inversa

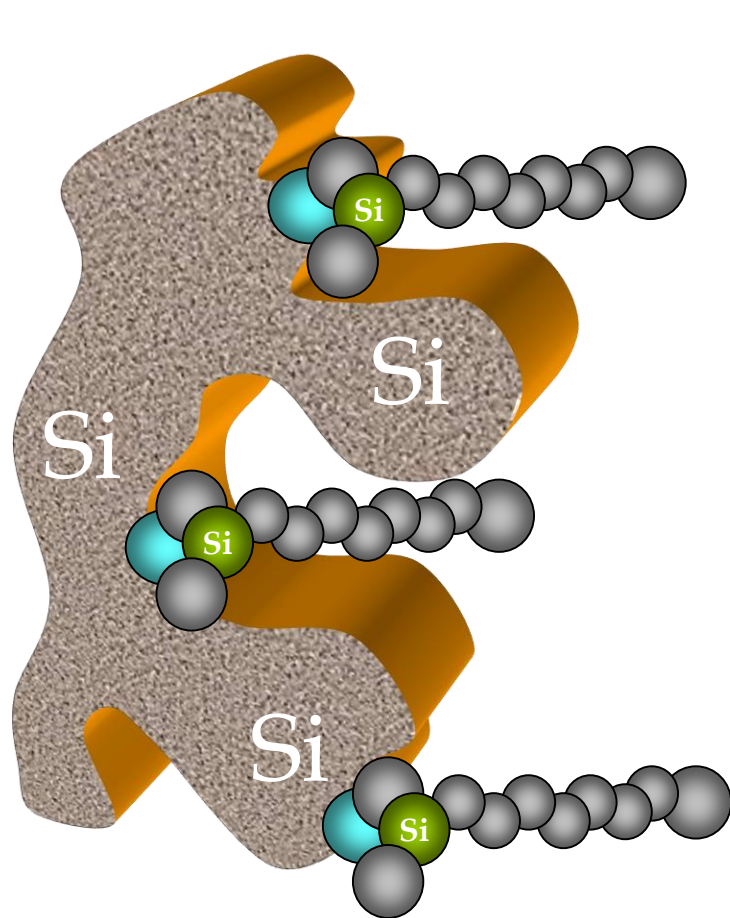
- Fase stazionaria **apolare**, solvente **più polare**
- Solventi **meno polari** hanno **maggiore forza eluente**

La cromatografia in fase inversa elimina la codatura dei picchi poiché la fase stazionaria ha pochi siti che possono adsorbire fortemente il soluto.

È anche meno sensibile alle impurezze polari (come l'acqua) nel solvente.

CROMATOGRAFIA IN FASE INVERSA

Reverse Phase Chromatography (RPC)

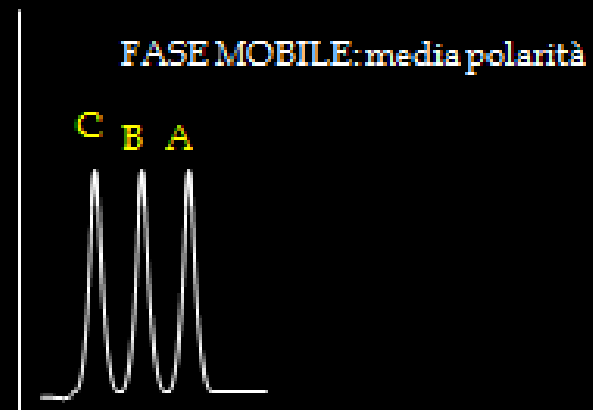
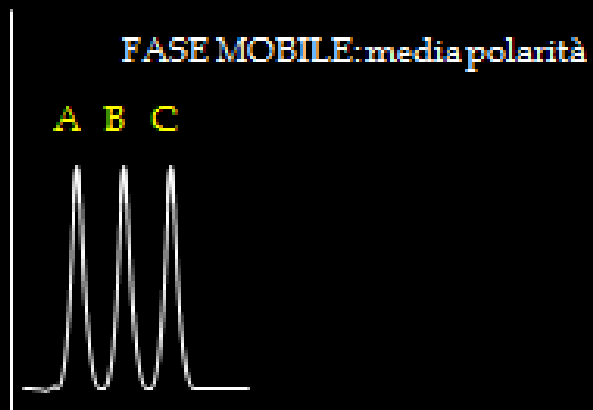
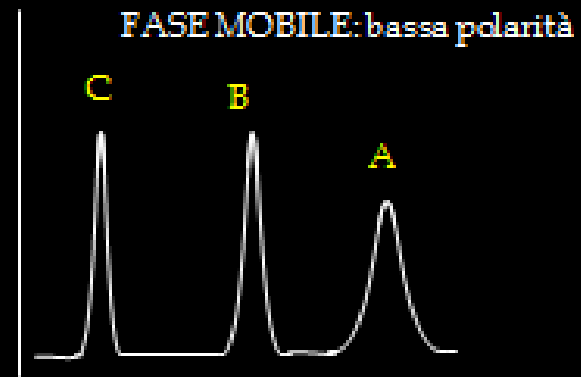
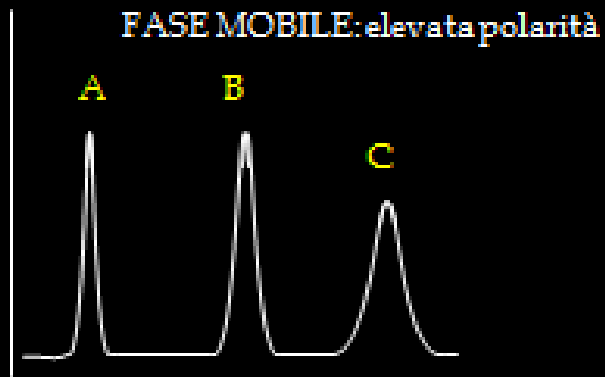


fase mobile
(polare)

fase stazionaria
(non polare)

CROMATOGRAFIA IN FASE INVERSA

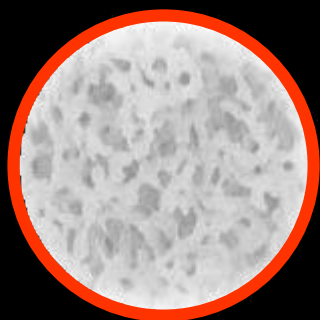
CROMATOGRAFIA IN FASE DIRETTA



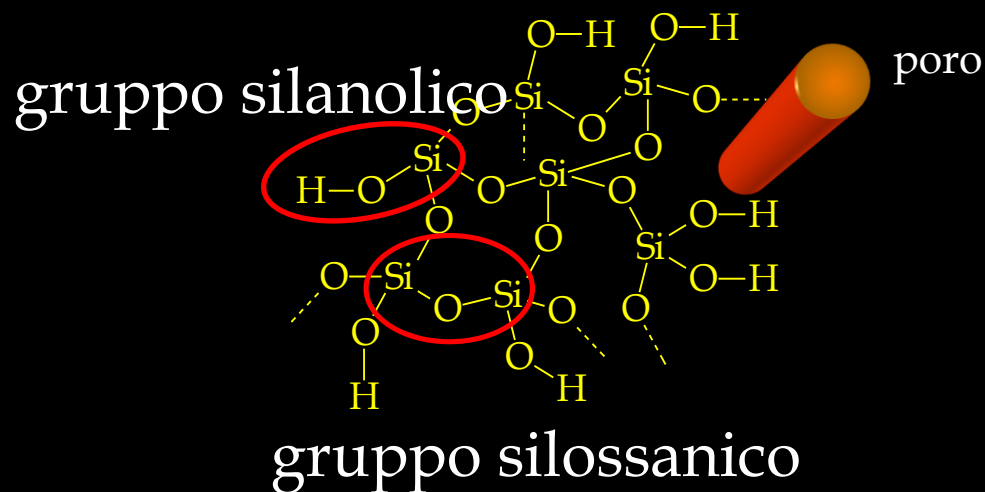
POLARITA' DEI SOLUTI: $A > B > C$

FUNZIONALIZZAZIONE DELLA SILICE

Il trattamento con HCl a refluxo produce l'idrolisi dei gruppi silossanici superficiali con formazione di gruppi silanolici, mentre con il riscaldamento a 200°C si elimina l'acqua di idrolisi senza produrre la ricondensazione dei gruppi silanolici in gruppi silossanici. La superficie porosa del supporto consente una migliore adesione della fase legata.



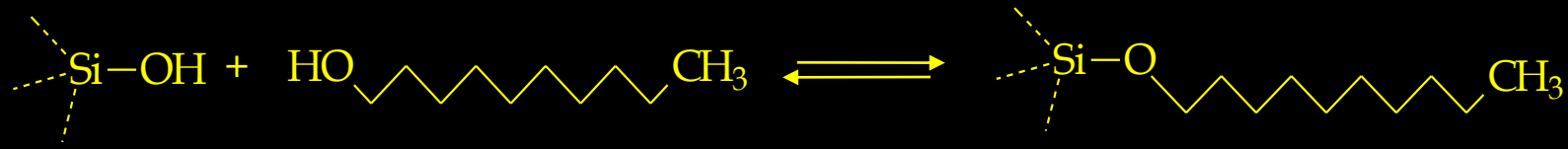
silice al microscopio
elettronico



Ai gruppi silanolici così ottenuti si possono legare composti organici diversi, con quattro meccanismi di reazione differenti (funzionalizzazione).

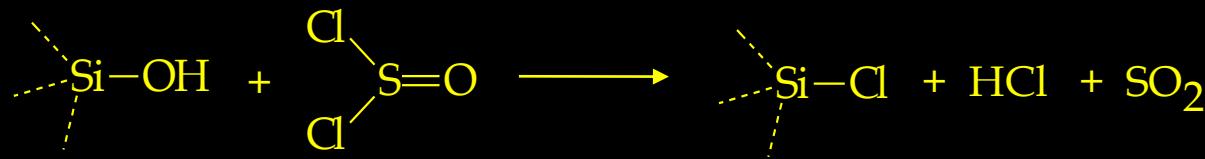
1. Eterificazione (*fase etere*)

La silice viene riscaldata a riflusso in sospensione con alcoli alifatici (decanolo) anche se, essendo una reazione di equilibrio, si forma solo parzialmente il decanossi-silicato (peraltro instabile).



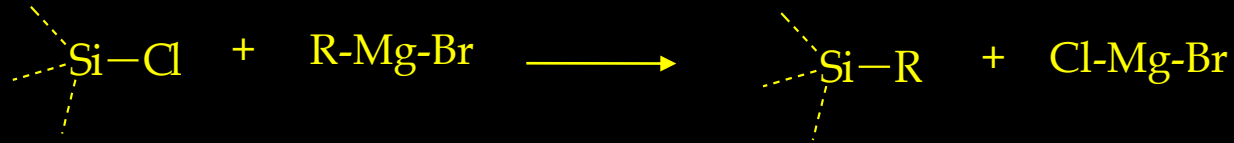
2. Dialchilamminazione (*fase dialchilammina*)

La silice viene riscaldata a riflusso in sospensione con cloruro di tionile e il cloro-silicato che si forma viene fatto reagire con un'ammina secondaria. Si forma il dialchilammino-silicato.



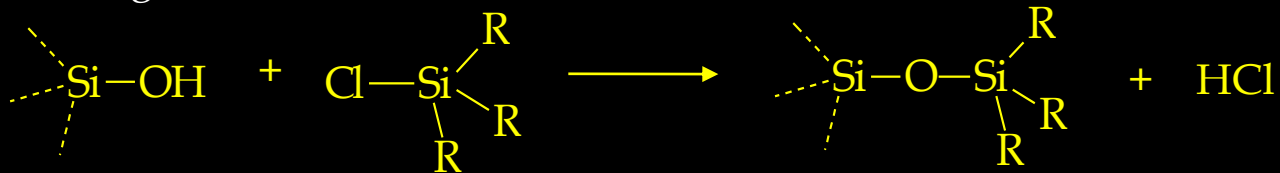
3. Alchilazione (*fase idrocarburica*)

Il cloro-silicato ottenuto in condizioni anidre viene fatto reagire in condizioni anidre con *reattivo di Grignard*; seppure con una resa bassa si forma un alchil-silicato.



4. Silanizzazione (*fase silossanica*)

La silice, in sospensione con un solvente non polare anidro (esano o toluene), viene fatta reagire a riflusso con un agente silanizzante, mantenendo la miscela in ebollizione.

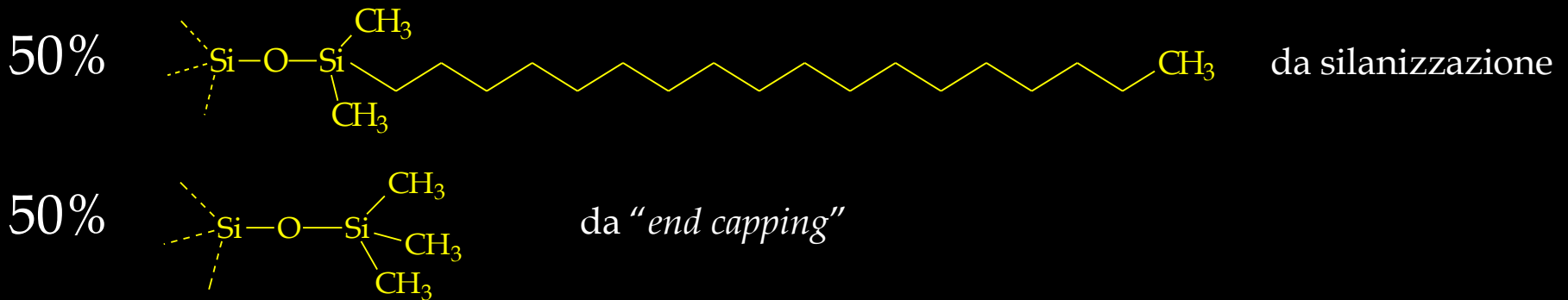


L'agente silanizzante, in realtà, può essere un trialchilclorosilano (R_3SiCl), un dialchilidiclorosilano (R_2SiCl_2) o un alchiltriclorosilano (RSiCl_3). Il primo agente silanizzante produce una funzionalizzazione *a fase monomerica* (i sostituenti alchilici sono sullo stesso atomo di silicio), con una resa del 50% circa. Il secondo e terzo agente silanizzante producono una funzionalizzazione *a fase polimerica* (i sostituenti alchilici sono su atomi di silicio vicinali), con una resa rispettivamente del 100% e del 50% circa. La funzionalizzazione *a fase monomerica* conferisce una maggior mobilità conformazionale alla catena idrocarburica e dunque un più spiccato **carattere [pseudo]liquido** alla fase legata.

La funzionalizzazione della superficie di silice conferisce proprietà caratteristiche alla fase stazionaria, ma la grande polarità dei gruppi silanologici residui (da 8 $\mu\text{moli}/\text{m}^2$ la silanizzazione li riduce a 4 $\mu\text{moli}/\text{m}^2$, con una resa di circa il 50%) può perturbare queste proprietà acquisite. È il motivo per cui si opera una definitiva silanizzazione (“*end-capping*” o “*capping off*”) con trimetilclorosilano (TMS), che funzionalizza tutti i gruppi silanologici residui con un agente *a fase monomerica*.

Esempio

La prima silanizzazione con ottadecildimetilclorosilano e l’*end-capping* con trimetilclorosilano producono una silice funzionalizzata:



NB: I materiali alternativi alla silice (carbone attivo, polietilene, copolimeri stirene/divinilbenzene) sono non polari e dunque non consentono le reazioni di funzionalizzazione.

FASE MOBILE

Nella LC di ripartizione è il **fattore di capacità k'** quello più facile da modificare perché k' dipende essenzialmente dalla composizione della fase mobile.

Tempo relativo che occorre all'analita per eluire dalla colonna rispetto ad un analita non trattenuto

Fattore di capacità

$$k' = \frac{t_R - t_M}{t_M} = \frac{t'_R}{t_M}$$

M_S = massa dell'analita nella fase stazionaria

M_M = massa dell'analita nella fase mobile

$$k' = \frac{t'_R}{t_M} = \frac{M_S}{M_M} = Kd \times \frac{V_S}{V_M}$$

V_S = volume della fase stazionaria

V_M = volume della fase mobile

Il "range" ideale del k' è compreso tra 2 e 10, ma per miscele molto complesse l'intervallo può estendersi da 0,5 a 20. Solo dopo aver ottimizzato il k' si può agire sul fattore di selettività α (a questo punto modificando la sola fase stazionaria) e, infine, sul fattore di efficienza N (utilizzando una colonna di lunghezza maggiore o di diametro interno minore).

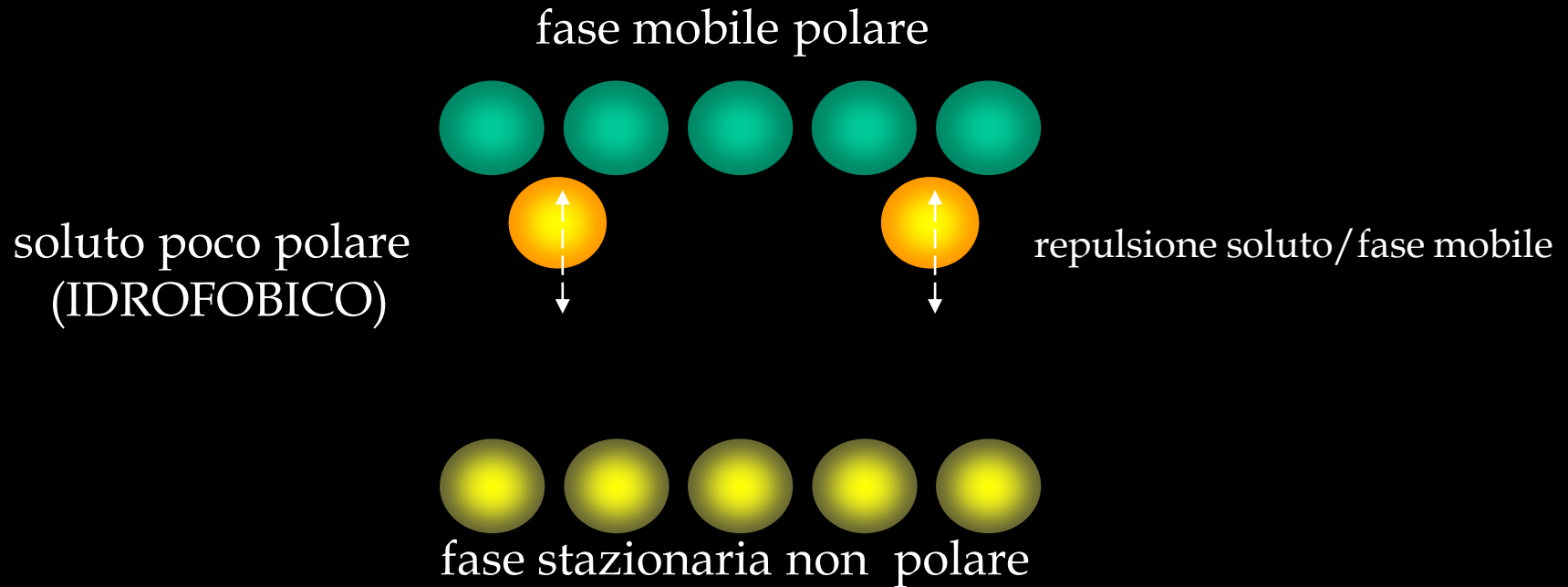
Teoria solvofobica

Nella cromatografia liquida di ripartizione RPC l'equilibrio che determina la ritenzione dei soluti è basato sulla “teoria solvofobica”, secondo la quale i soluti “idrofobici” **si ripartiscono tra la fase stazionaria e la fase mobile non per effetto delle interazioni attrattive con la fase stazionaria, ma per le interazioni repulsive con la fase mobile.**

Più precisamente, i soluti poco polari, che hanno una repulsione verso la fase mobile, occupano lo spazio minimo disponibile nella fase mobile e conseguentemente tenderanno a trasferirsi nella fase stazionaria.

Meno polare è il soluto e più polare è la fase mobile, tanto maggiore è il trasferimento del soluto nella fase stazionaria e tanto maggiore sarà il suo tempo di ritenzione.

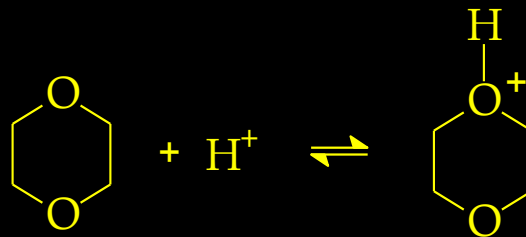
RPC: TEORIA SOLVOFOBICA



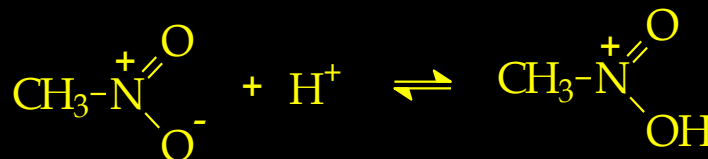
I solventi della fase mobile che interagiscono in modo rilevante con i soluti sono detti “**forti**” (in termini di maggiore polarità). Nella cromatografia di partizione la “forza” del solvente (che è definita “**forza dell’eluente**” o ϵ°) è detta **indice di polarità (P’)**. Snyder definisce questo indice come:

*“la solubilità di una sostanza in tre solventi: **diossano** (accettore di protoni con basso momento dipolare), **nitrometano** (accettore di protoni con elevato momento dipolare) e **alcol etilico** (donatore di protoni con elevato momento dipolare)”*

$$\mu = 0,45 \text{ D}$$



$$\mu = 3,50 \text{ D}$$



$$\mu = 1,69 \text{ D}$$



N.B. La fase mobile deve, idealmente, possedere **3 requisiti**:

1. *bassa viscosità*, per evitare pressioni di esercizio troppo elevate;
2. *punto di ebollizione sufficientemente elevato*, che ne eviti la volatilizzazione;
3. *polarità maggiore dei soluti*, per evitare dei t_R troppo elevati

La serie eluotropa dei solventi e le loro principali proprietà chimico-fisiche sono riportate nella tabella successiva (**in rosso i solventi più utilizzati nella LC di partizione**).

SOLVENTE	INDICE DI RIFRAZIONE	VISCOSITA' (cP)	PUNTO DI EBOLLIZIONE (°C)	INDICE DI POLARITA' (P')
fluoroalcani	1,27-1,29	0,4-2,6	50-174	< - 2
<i>n</i> -esano	1,372	0,30	69	0,1
cicloesano	1,423	0,90	81	0,2
1-clorobutano	1,400	0,42	78	1,0
tetraclorometano	1,457	0,90	77	1,6
<i>i</i> -propiltere	1,365	0,38	68	2,4
toluene	1,494	0,55	110	2,4
etere etilico	1,350	0,24	35	2,8
tetraidrofurano	1,405	0,46	66	4,0
cloroformio	1,443	0,53	61	4,1
<u>etanolo</u>	1,359	2,08	78	4,3
acetato di etile	1,370	0,43	77	4,4
<u>diossano</u>	1,420	1,20	101	4,8
metanolo	1,326	0,54	65	5,1
acetonitrile	1,341	0,34	82	5,8
<u>nitrometano</u>	1,380	0,61	101	6,0
glicole dietilenico	1,431	16,5	182	6,9
acqua	1,333	0,89	100	10,2

Considerando che l'indice di polarità varia da - 2 (fluoroalcani) a 10,2 (acqua), si può ottenere qualunque indice di polarità entro questi due estremi, miscelando solventi diversi.

Per una fase mobile binaria (A e B) l'indice di polarità è espresso dalla formula:

$$P'_{AB} = \%P'_A + \%P'_B$$

dove: P'_A = indice di polarità del solvente A

P'_B = indice di polarità del solvente B

% = percentuali in volume di A e B nella miscela

Esempio:

30:70 metanolo/acqua (v/v)

$$\begin{aligned} P_{\text{metanolo/acqua}} &= 0.3 P_{\text{metanolo}} + 0.7 P_{\text{acqua}} = 0.3*5.1 + 0.7*10.2 \\ &= 1.53 + 7.14 = 8.67 \end{aligned}$$

Per ottimizzare il fattore di capacità k' si agisce sull'indice di polarità P' della fase mobile: una variazione di 2 unità di P' produce approssimativamente la decuplicazione di k' , come si deduce dalla relazione:

$$\frac{k'_2}{k'_1} = 10^{(P'_2 - P'_1)/2}$$

Dove k'_1 e k'_2 sono i valori iniziali e finali di k' di un dato soluto e P'_1 e P'_2 sono i corrispondenti valori di P' . Si può facilmente verificare che se $P'_2 - P'_1 = 2$, il fattore di capacità $k'_2 = 10 k'_1$.

NB:

- L'indice di polarità (P') è **INDIPENDENTE** dalla fase stazionaria utilizzata;
- Se la fase stazionaria è **APOLARE** la serie eluotropica è inversa rispetto a quanto riportato in tabella.

- se *polarità soluti* > *polarità fase mobile* la *affinità per fase mobile* > *affinità per fase stazionaria* ($t_R = t_0$)
- se *polarità soluti* < *polarità fase mobile* la *affinità per fase stazionaria* > *affinità per fase mobile* ($t_R \rightarrow \infty$)

La conclusione ovvia è che la polarità dei soluti deve essere intermedia tra quella della fase stazionaria e quella della fase mobile.

Con l'eluizione a gradiente, piccole variazioni della composizione della fase mobile possono produrre grandi variazioni dei t_R dei soluti e questo è il motivo principale per formulare una prima considerazione:

la straordinaria influenza della polarità della fase mobile sul risultato del processo separativo rende la LC la tecnica di separazione più complessa e sempre suscettibile di continue ottimizzazioni.

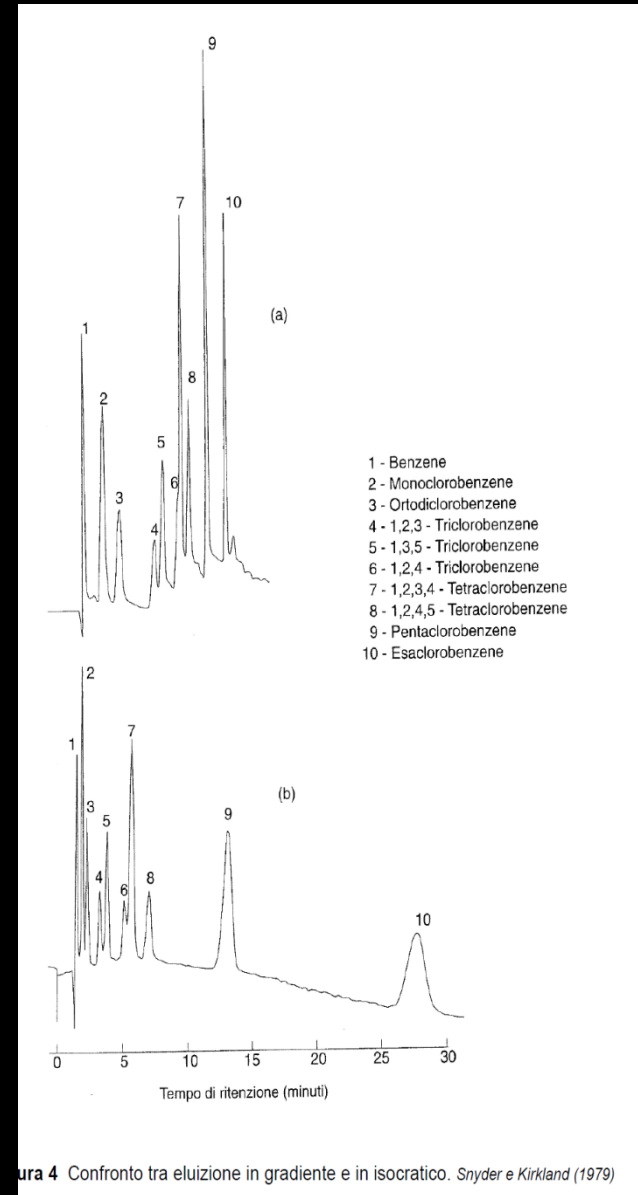
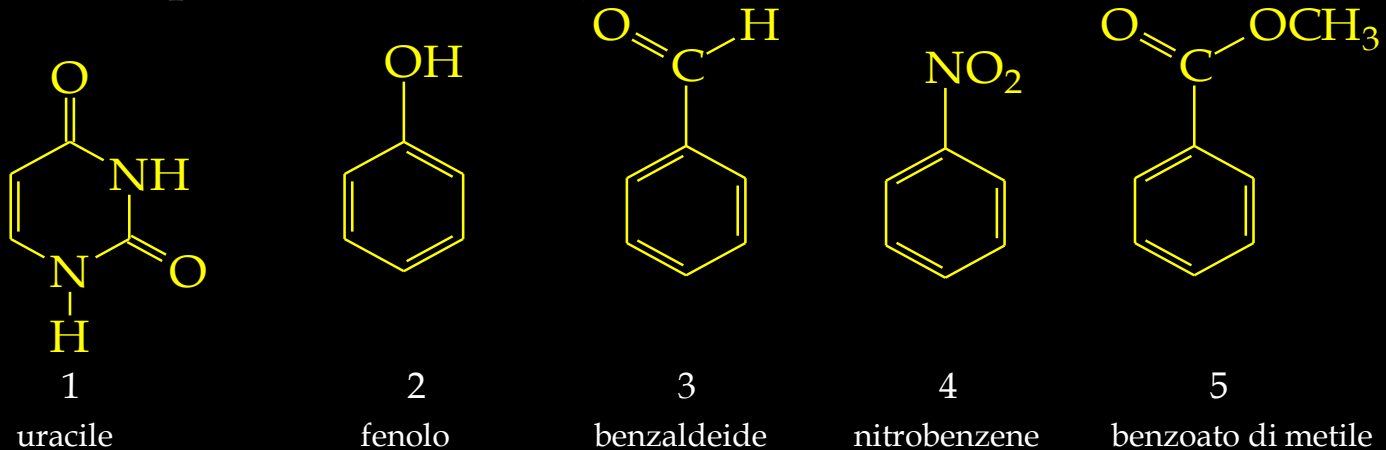


Figura 4 Confronto tra eluizione in gradiente e in isocratico. Snyder e Kirkland (1979)

ESEMPIO

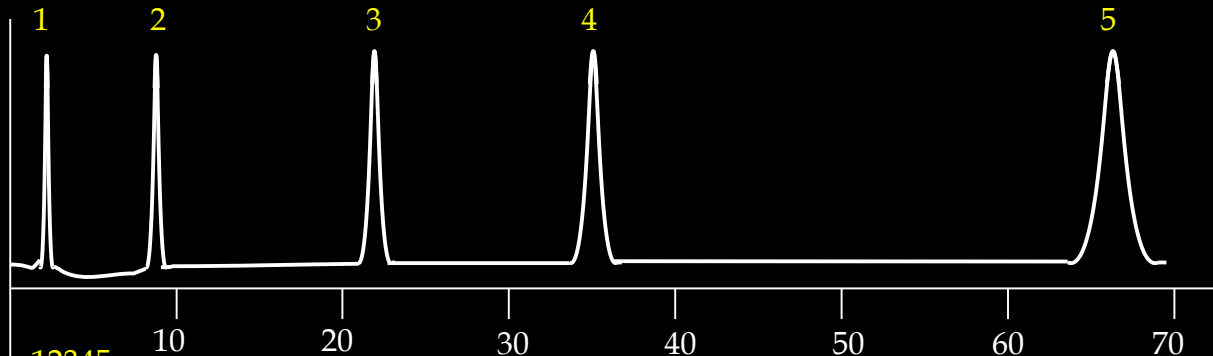
Supponiamo di operare con una colonna riempita con fase stazionaria a fase legata C18 (non polare) e che la miscela da separare sia costituita dai seguenti soluti (in ordine di polarità crescente):



- eluendo con **acqua:metanolo = 76:24** ($P' \approx 9$) si ottiene il tracciato 1, nel quale è evidente l'eccessiva separazione dei picchi e i t_R troppo elevati, a causa di una percentuale troppo alta di acqua.
- eluendo con **acqua:metanolo = 37:63** ($P' \approx 6$) o **acqua:metanolo = 18:82** ($P' \approx 7$) si ottengono i tracciati 2 e 3 nei quali è altrettanto evidente la scarsa separazione dei picchi e i t_R troppo bassi, a causa di una percentuale troppo elevata di metanolo.
- Eluendo con **acqua:metanolo = 57:43** ($P' \approx 8$) si ottiene il tracciato 4, dal quale si desume che il rapporto percentuale dei due solventi è ottimale, sia per la separazione dei soluti che per i loro t_R .

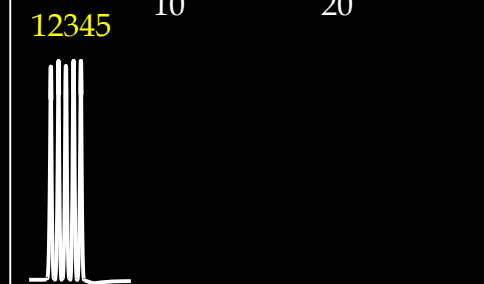
acqua:metanolo = 76:24
($P' = 9,078$)

1



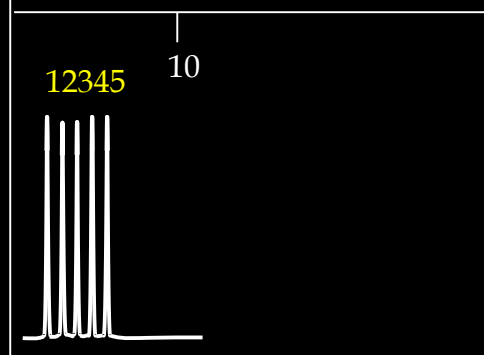
acqua:metanolo = 18:82
($P' = 6,018$)

2



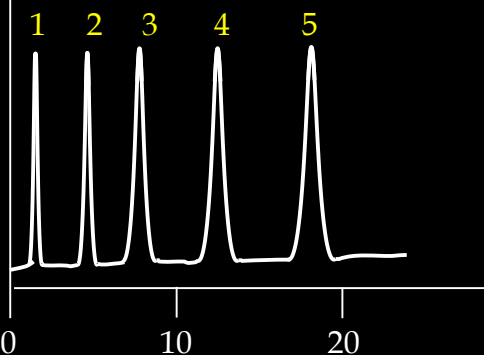
acqua:metanolo = 37:63
($P' = 6,987$)

3



acqua:metanolo = 57:43
($P' = 8,007$)

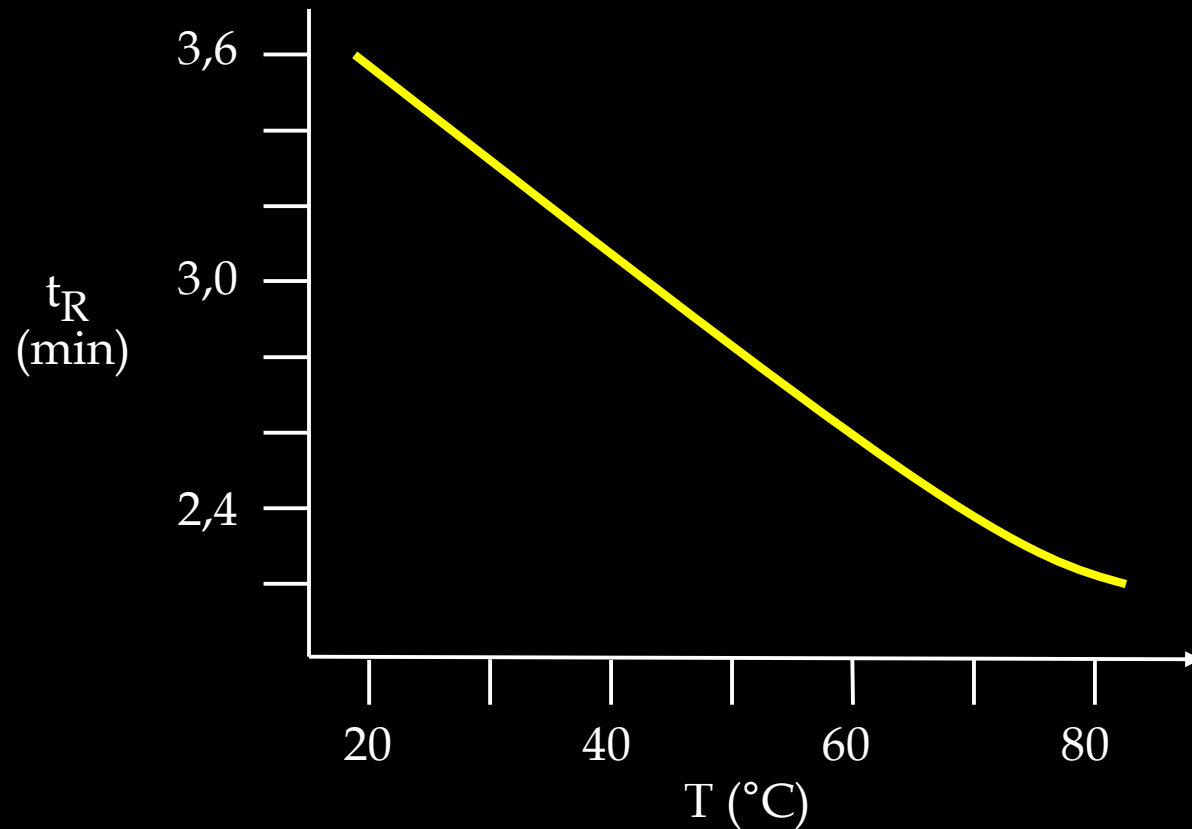
4



P'	TEMPI DI RITENZIONE				
	1	2	3	4	5
≈ 9	1,6	9,8	23,0	37,0	68,0
≈ 6	1,7	1,8	1,9	2,0	2,1
≈ 7	1,4	2,3	3,0	3,8	5,0
≈ 8	1,3	4,2	7,0	12,0	18,0

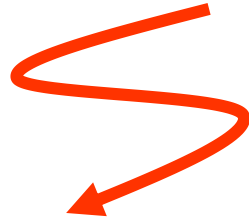
TEMPERATURA

In generale la temperatura ha scarsa influenza sulle separazioni nella cromatografia liquida. Tuttavia un aumento di T produce una diminuzione dei t_R perché diminuisce l'affinità con la fase stazionaria.



L'aumento di temperatura determina anche la riduzione della viscosità della fase mobile e dunque, a parità di flusso, occorre meno pressione delle pompe.

Eluizione isocratica e a gradiente



Con 1 solo solvente o con una miscela di solventi di composizione costante.



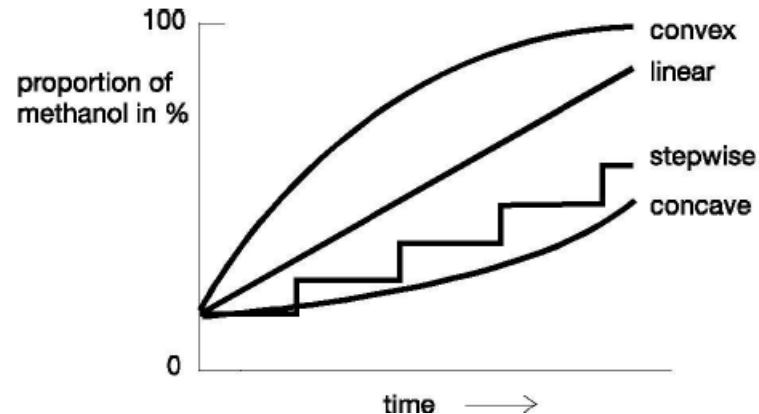
Variazione continua della composizione del solvente per aumentare la forza eluente. Una forza eluente crescente è necessaria per eluire i soluti più fortemente trattenuti e per migliorare le separazioni.

ELUIZIONE A GRADIENTE

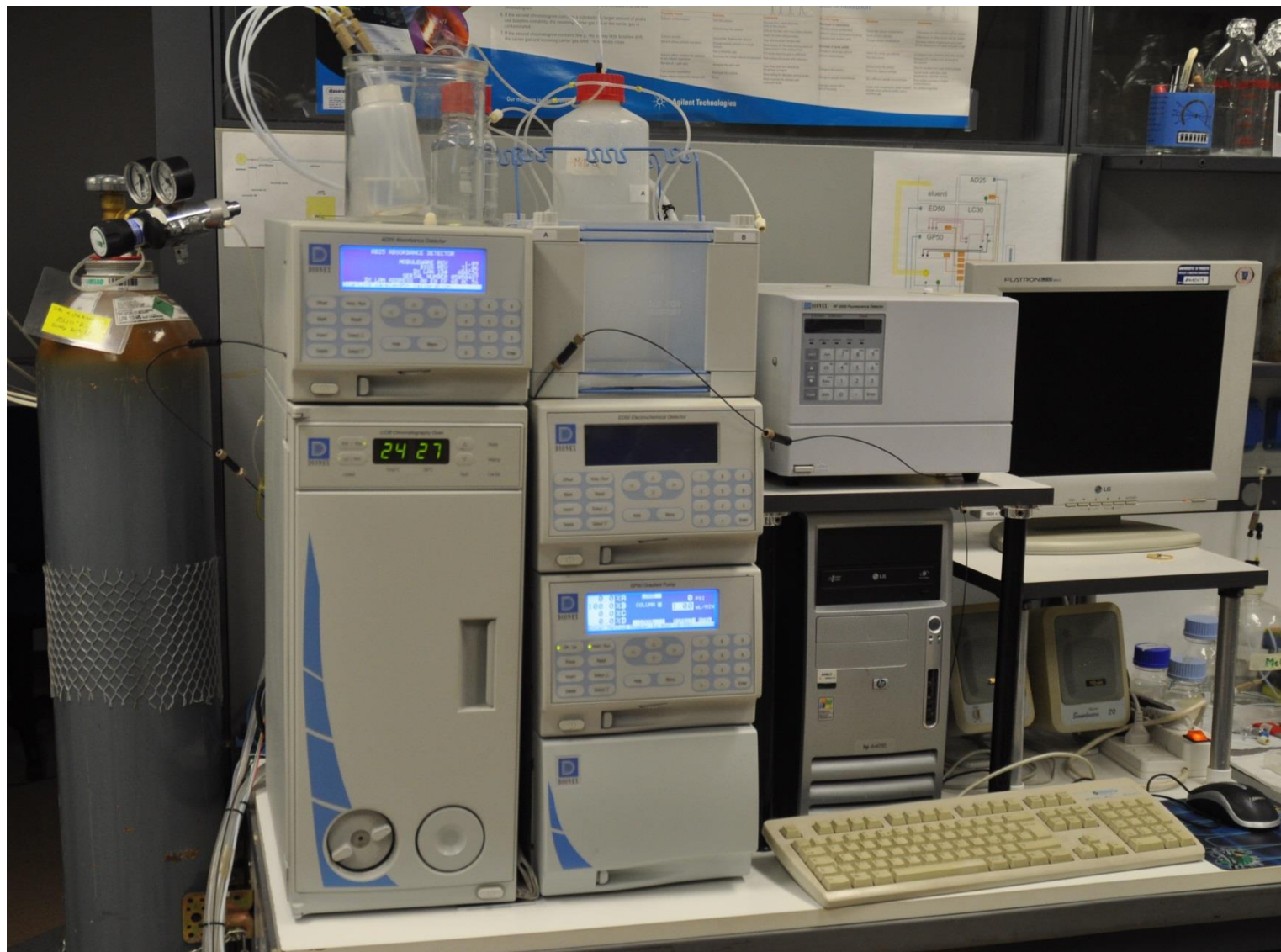
Separazioni migliori in tempi minori si ottengono di solito in gradiente di eluizione, in cui la forza dell'eluente è in genere incrementata gradualmente durante l'analisi.

Si possono usare 2 o più solventi e il gradiente può essere lineare, a gradini, concavo o convesso;

La modulazione della composizione e della forza dell'eluente consente di promuovere l'uscita di soluti (analiti) affini alla fase stazionaria

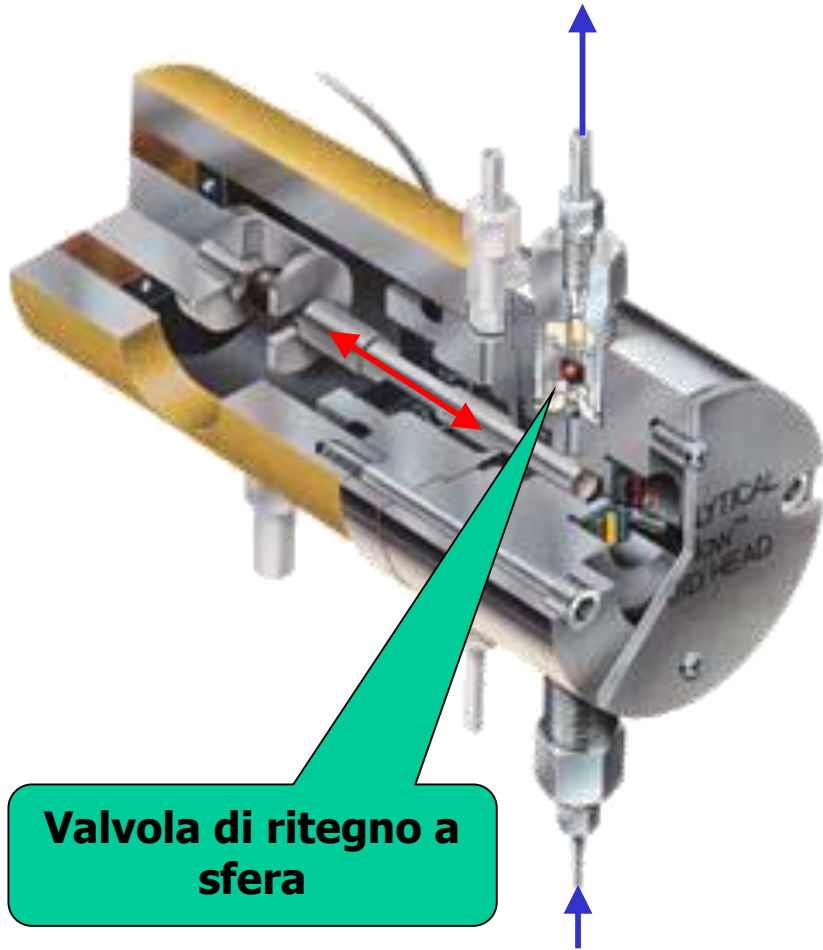


LO STRUMENTO



Iniezione e rivelazione in HPLC: **Pompe e valvole di iniezione**

La **pompa** più diffusa è quella alternativa a pistone. Il pistone viene mosso da un motore mentre le valvole di ritegno si aprono alternativamente.



Valvola di ritegno a sfera

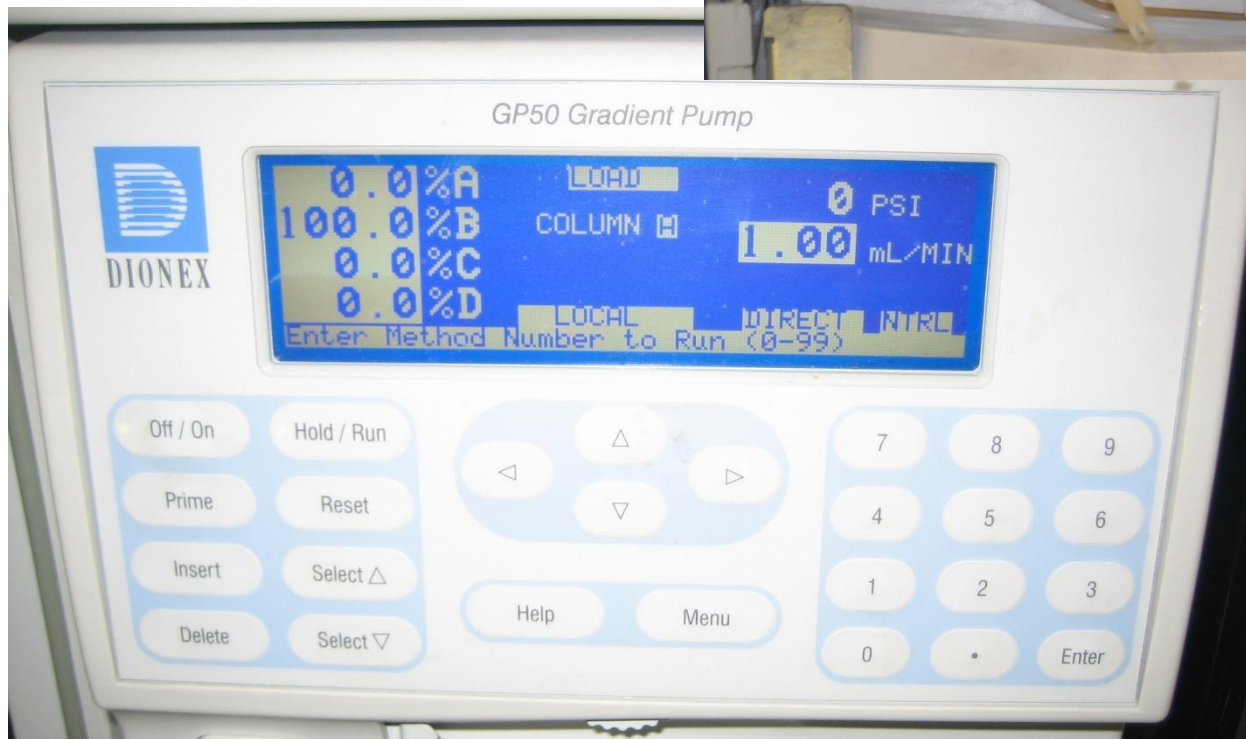
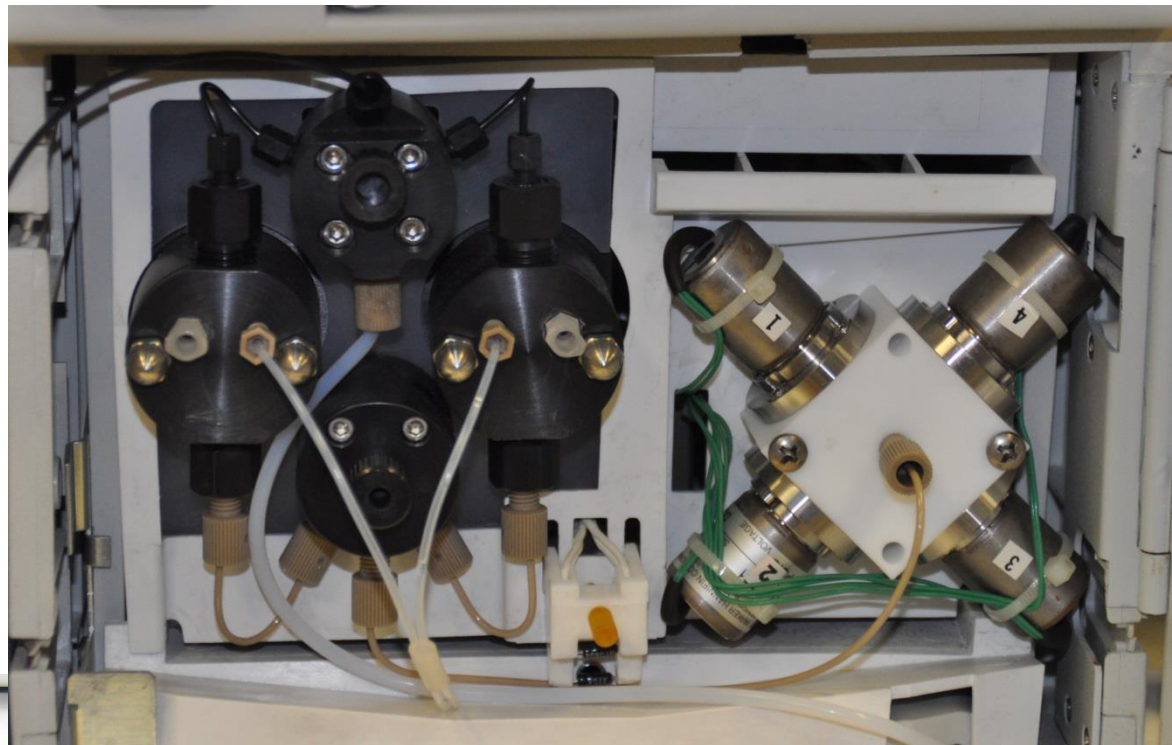
Vantaggi:

- Robustezza
- Pressioni in uscita molto elevate (fino a 3000-4000 PSI~ 200-300 atm)
- Volume interno ridotto (50 μ l) -> adatte all'utilizzo in gradiente
- Flussi costanti

Il principale difetto è che produce un flusso pulsato che deve essere smorzato -> fluttuazioni della linea di base

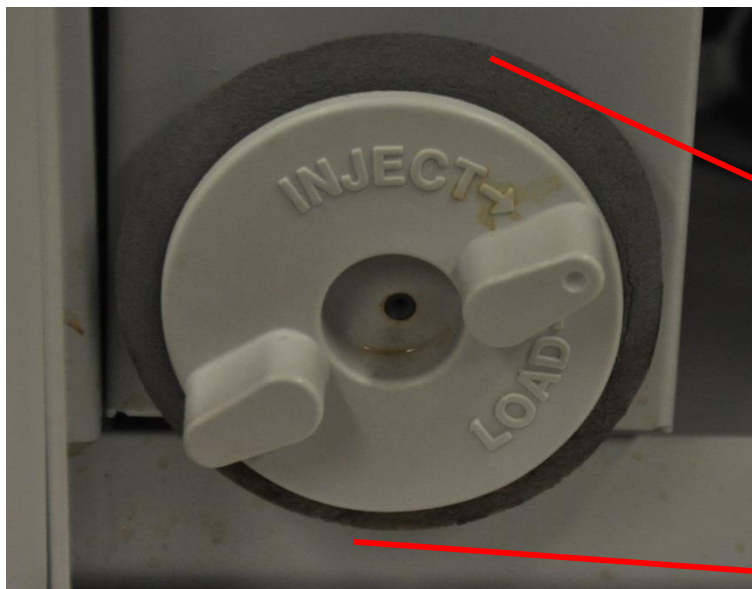
Come alternativa si possono utilizzare pompe a siringa e pneumatiche

Pompa quaternaria

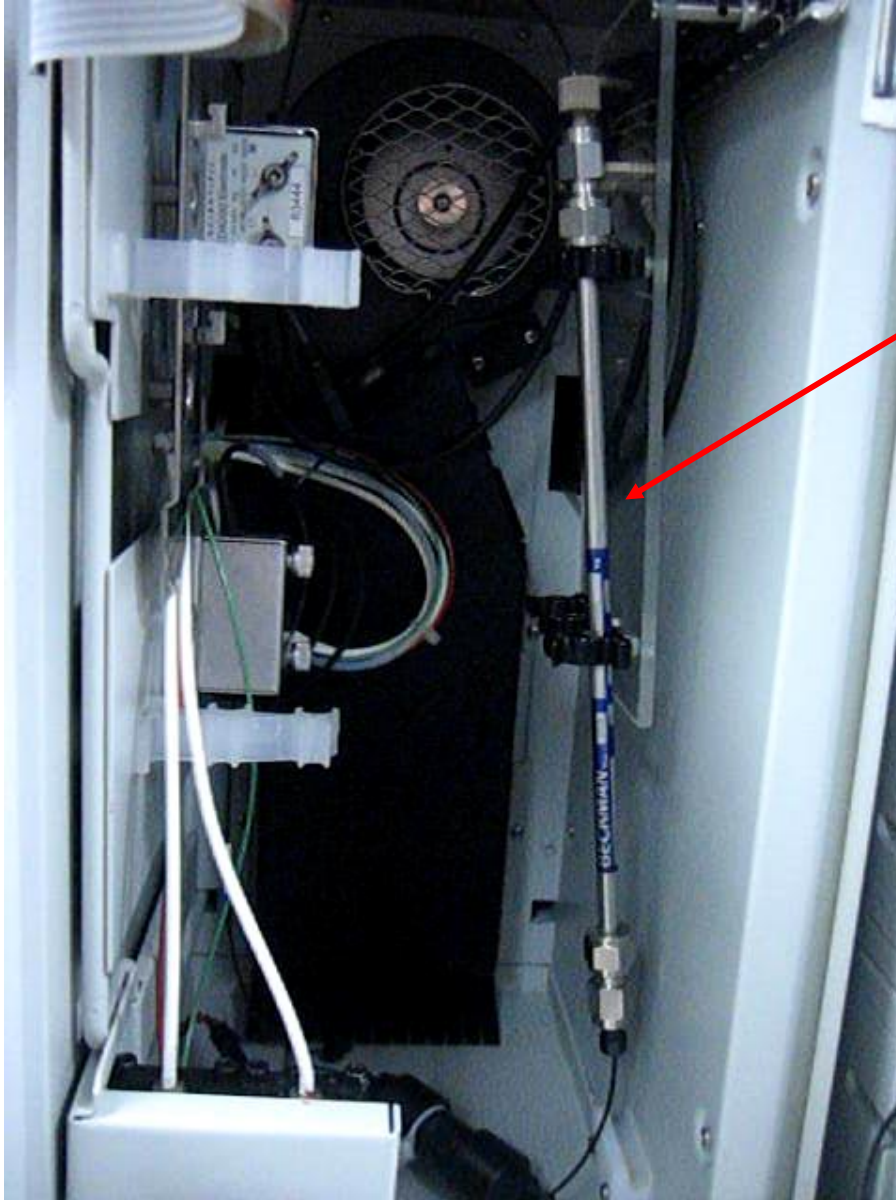


Forno
termostato

iniettore



Interno del forno

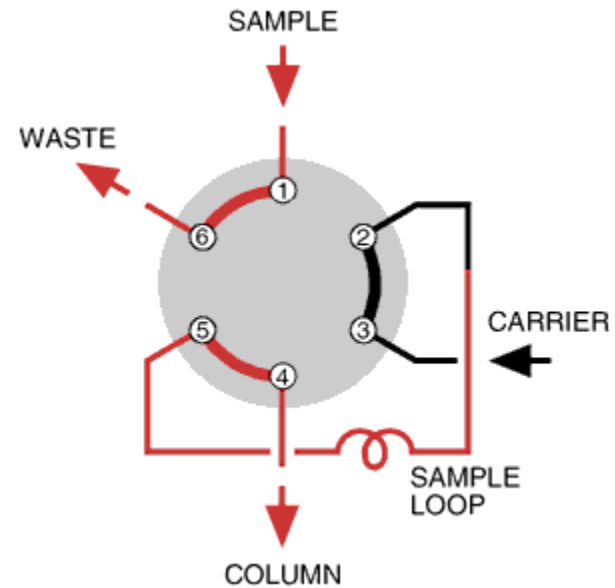
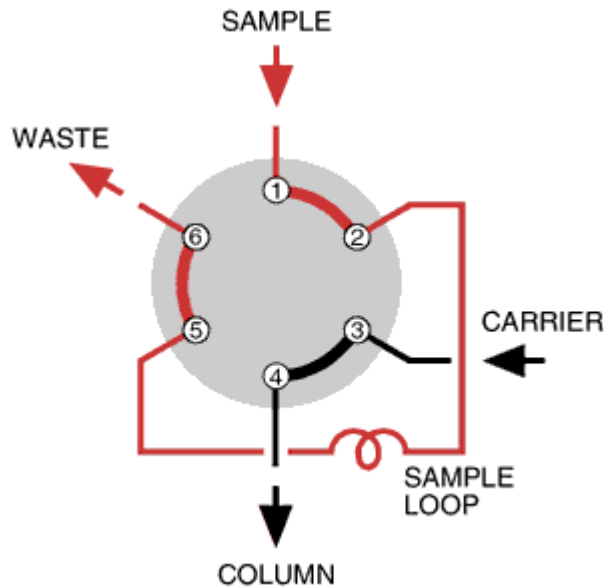


Colonna C18
250mm

Iniezione e rivelazione in HPLC: Pompe e valvole di iniezione



L'interfaccia universalmente utilizzata per introdurre il campione è la valvola a 6 vie.



A seconda del **loop** montato varia il volume del campione iniettato in colonna

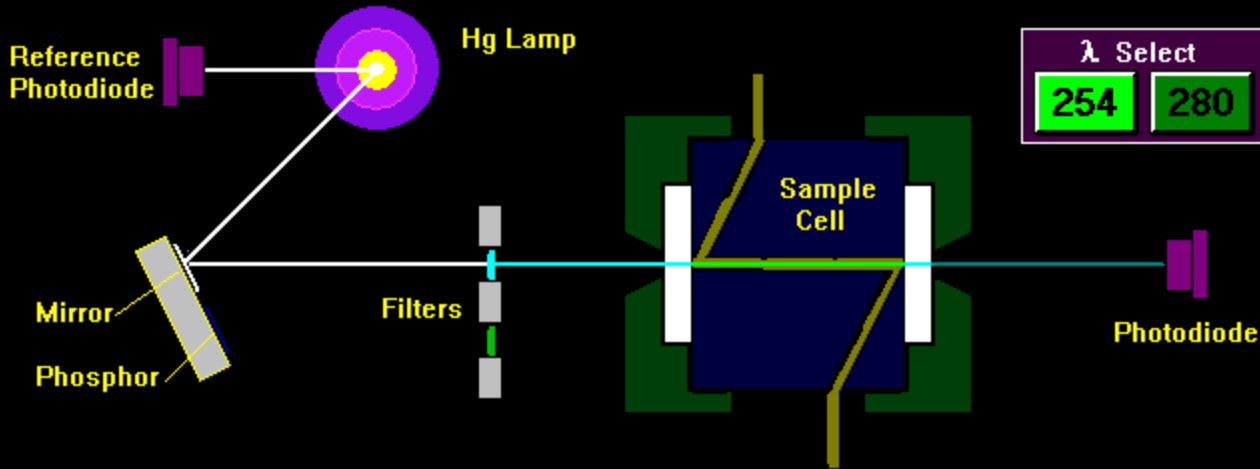
Iniezione e rivelazione in HPLC: Rivelatori

- 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

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	0.1-1	generale	SI

Iniezione e rivelazione in HPLC: Rivelatori

Rivelatore UV a λ fissa



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.

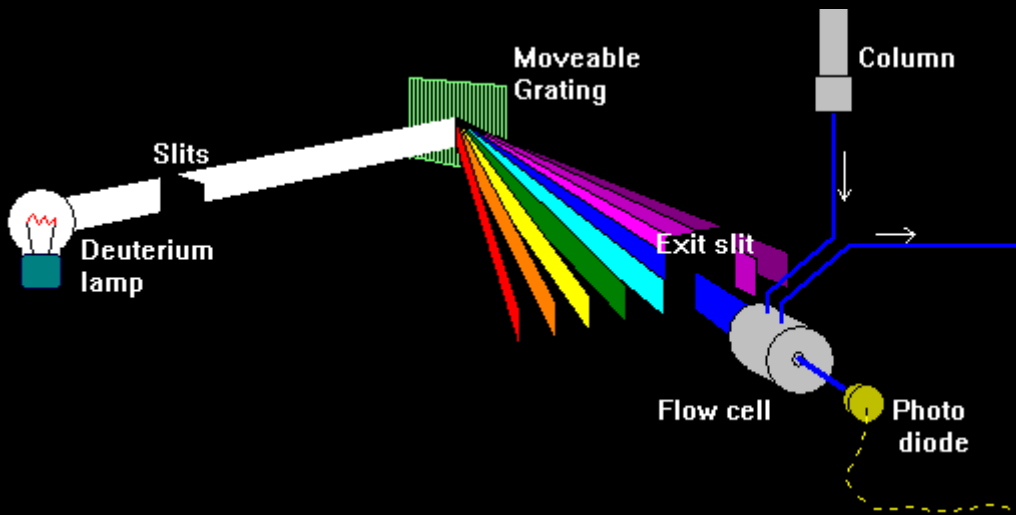
Vantaggi e svantaggi

Il principale vantaggio è il basso costo. Inoltre l'elevata intensità della radiazione della lampada a Hg permette di ottenere elevata sensibilità per composti che assorbono a 254 nm.

Il principale svantaggio è determinato dalla scarsa selettività dovuta alla necessità di lavorare a λ fissa.

Iniezione e rivelazione in HPLC: Rivelatori

Rivelatore UV a λ variabile



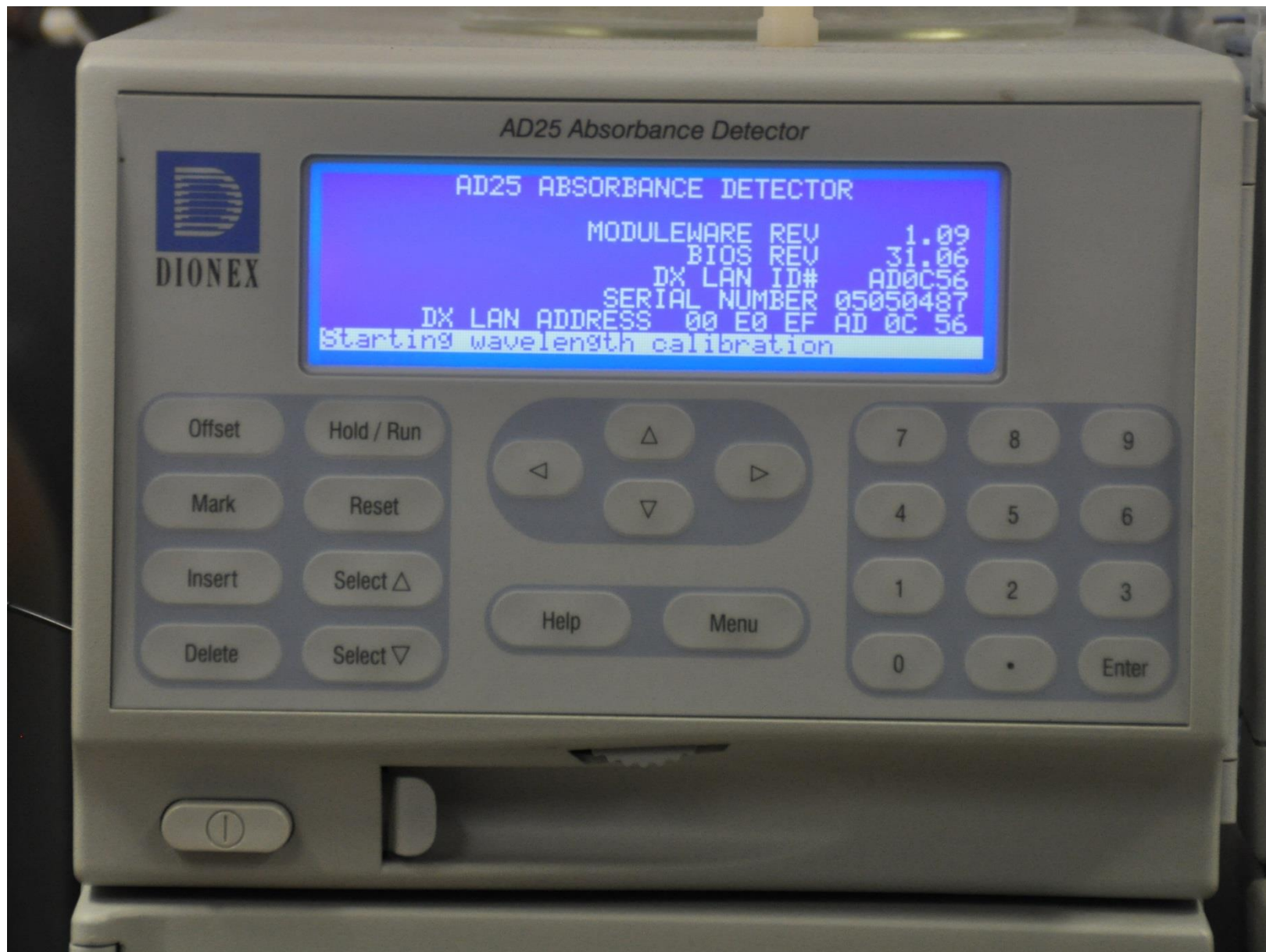
Il rivelatore UV a λ variabile è sicuramente quello maggiormente utilizzato in HPLC.

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

Vantaggi

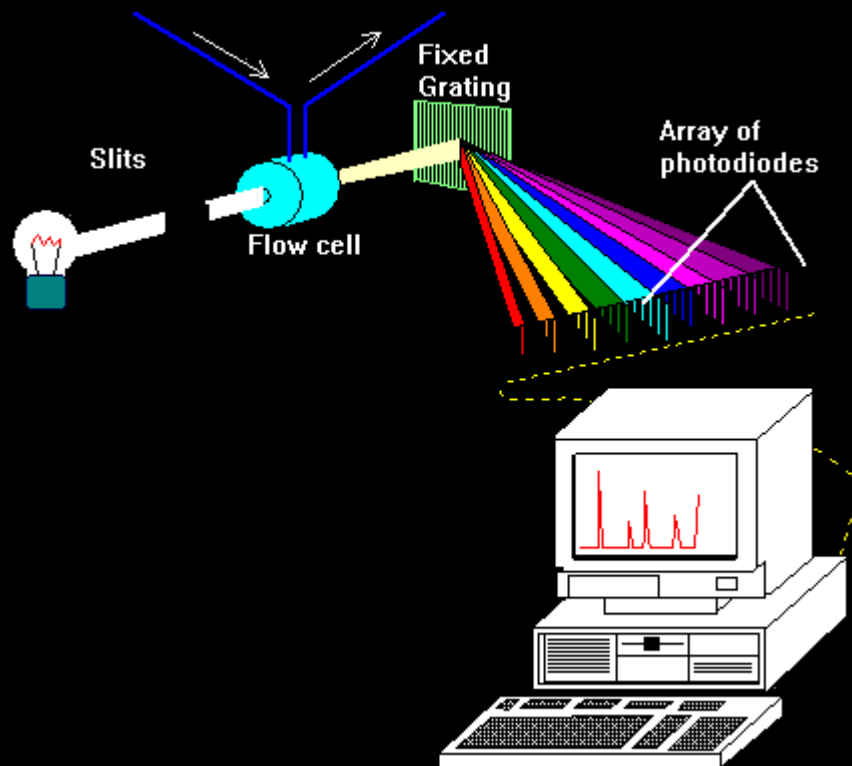
- Versatilità: possibilità di selezionare λ da 190 a 800 nm.
- Elevata sensibilità: potendo scegliere la λ ottimale (max assorbanza) per un analita.
- Selettività: quando si hanno sovrapposizioni di picchi si può variare la λ in modo tale da minimizzare l'assorbimento degli interferenti.
- Possibilità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

Detector UV-visible



Iniezione e rivelazione in HPLC: Rivelatori

Rivelatore UV a diode array



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 .

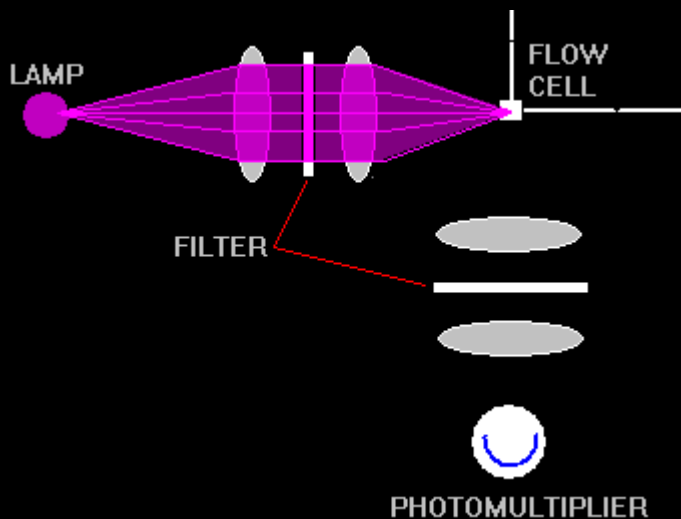
Vantaggi e svantaggi

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.

Iniezione e rivelazione in HPLC: Rivelatori

Rivelatore a Fluorescenza



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.

Vantaggi e svantaggi

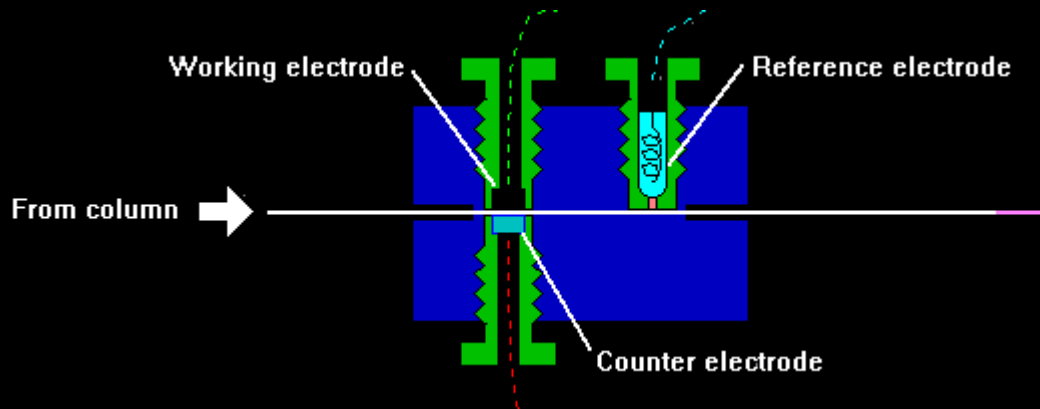
È un rivelatore molto sensibile, ma risponde soltanto ai pochi analiti fluorescenti. Per aumentarne l'applicabilità si possono legare covalentemente dei *marker* fluorescenti. Questa derivatizzazione può essere fatta o prima della separazione o post-colonna aggiungendo i reattivi marcanti tra la colonna e il rivelatore.

Detector a fluorescenza



Iniezione e rivelazione in HPLC: Rivelatori

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 controlettrodo 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.

Detector elettrochimico



Iniezione e rivelazione in HPLC: Rivelatori

Spettrometro di massa

Lo spettrometro di massa può fornire informazioni qualitative e quantitative sui componenti della miscela analizzata mediante HPLC.

Per ottenere uno spettro di massa, le molecole portate in fase gassosa, vengono ionizzate. Gli ioni sono quindi accelerati per mezzo di un campo elettrico e vengono poi separati in base al loro rapporto massa/carica (m/q).

L'accoppiamento HPLC-MS è una tecnica relativamente "giovane" e sempre più utilizzata.

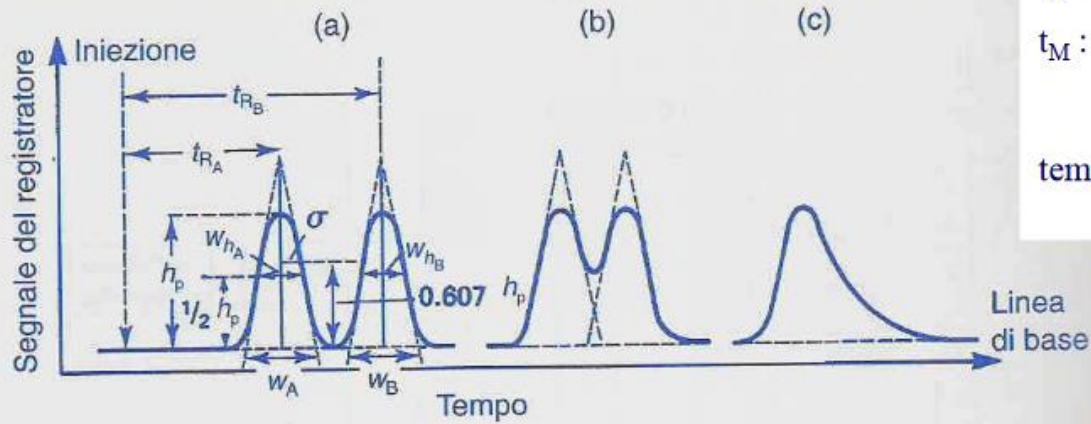
Lo MS in un sistema integrato HPLC-MS può servire come rivelatore universale (o comunque come un rivelatore che risponde ad un'estesa gamma di soluti) e sensibile.

L'accoppiamento HPLC/MS è stato realizzato già molti anni fa (fine anni '60), ma soltanto dalla metà degli anni '70 appaiono le prime pubblicazioni scientifiche.

Le difficoltà di tutti i metodi HPLC-MS derivano dal fatto che in **HPLC si utilizzano solventi molto diversi**, in funzione del tipo di analisi, (es. acqua, solventi organici, tamponi); inoltre **i flussi in LC sono molto elevati** rispetto a quelli richiesti per lo spettrometro di massa.

Per accoppiare le 2 tecniche sono pertanto necessarie opportune **interfacce che oltre a ridurre i flussi dovranno consentire anche la vaporizzazione degli analiti** mediante riscaldamento.

TEORIA DELLA CROMATOGRAFIA



t_R : tempo di ritenzione $(V_R = t_R \times Fc)$

t_M : tempo morto $(V_M = t_M \times Fc)$

tempo di ritenzione aggiustato: $t'_R = t_R - t_M$

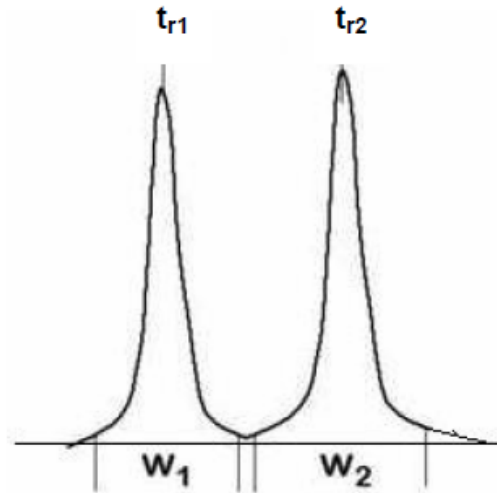
Fc : velocita' di flusso

Parametri per valutare la qualità delle separazioni

1. Risoluzione, R

E' una grandezza che viene calcolata dal cromatogramma, e permette di caratterizzare la separazione di due picchi cromatografici. Questo è importante per poter identificare e quantificare esattamente due sostanze.

$$R = \frac{t_{r2} - t_{r1}}{\frac{W_1 + W_2}{2}} = \frac{2\Delta t}{W_1 + W_2}$$



t_{r1} e t_{r2} = tempi di ritenzione per le specie 1 e 2

W_1 e W_2 = larghezze dei picchi 1 e 2 misurate al punto di intersezione delle tangenti coi flessi del picco con la linea di base

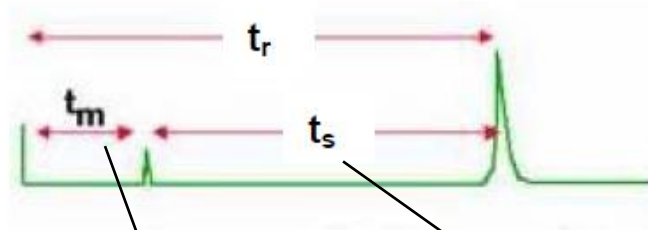


una completa separazione dei picchi è ottenuta per $R > 1.5$.

2. Selettività, α

misura la separazione relativa di due picchi

$$\alpha = \frac{t_{r2} - t_m}{t_{r1} - t_m}$$



tempo richiesto da un composto che non interagisce (non trattenuto) con la fase stazionaria per essere eluito

tempo che il soluto trascorre nella fase stazionaria prima di essere eluito

3. Fattore di capacità, k'

Tempo relativo che occorre all'analita per eluire dalla colonna rispetto ad un analita non trattenuto

$$k' = \frac{t_R - t_M}{t_M} = \frac{t'_R}{t_M}$$

M_S = massa dell'analita nella fase stazionaria

M_M = massa dell'analita nella fase mobile

$$k' = \frac{t'_R}{t_M} = \frac{M_S}{M_M} = K_d \times \frac{V_S}{V_M}$$

V_S = volume della fase stazionaria

V_M = volume della fase mobile

Il piatto teorico

Sebbene la cromatografia sia un processo in continuo, si può immaginare che la colonna sia divisa in N sezioni, in ciascuna delle quali viene raggiunto l'equilibrio tra fase stazionaria e fase mobile. Ognuna di queste sezioni è un **piatto teorico**. Se la lunghezza totale della colonna è L , l'**altezza equivalente a un piatto teorico (HETP)** è:

$$HETP = \frac{L}{N}$$

- Per convenzione l'efficienza di una colonna è espressa in N piatti teorici.
- Tanto maggiore è il numero di piatti teorici, tanto maggiore è l'efficienza della colonna.
- L'efficienza di una colonna dipende dal fatto che i picchi siano più o meno allargati, picchi stretti danno una buona separazione.
- Essendo l'altezza del piatto equivalente correlata ad N , maggiore è N , minore è HETP, e maggiore è l'efficienza della colonna.

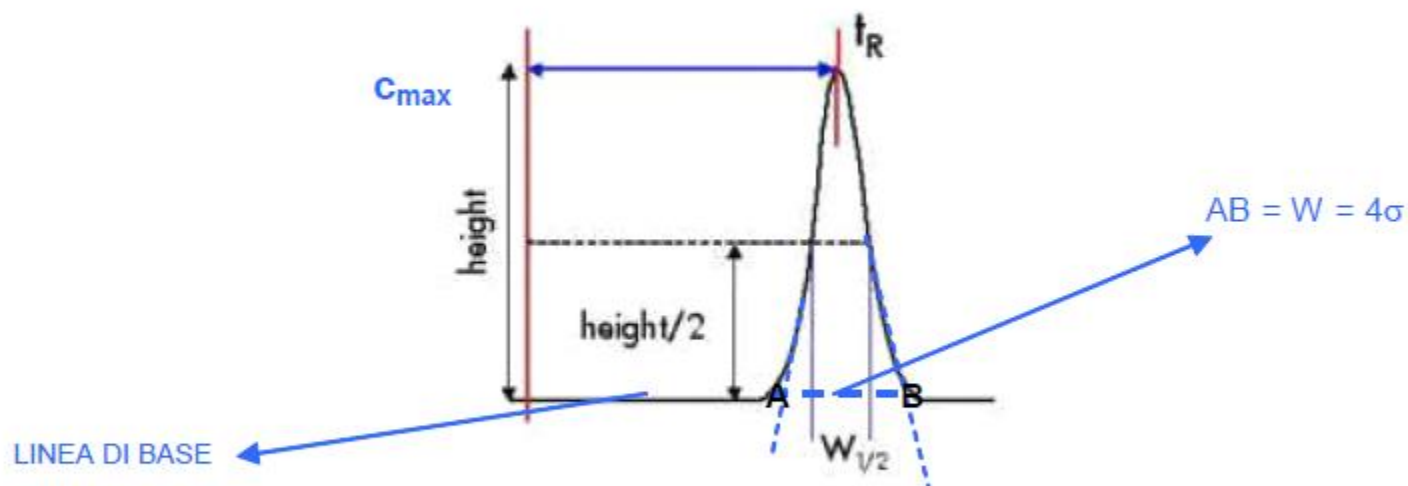
Non è raro che una colonna cromatografica possieda diverse migliaia di piatti teorici.

Es.

Se una colonna di 1m possiede 10^4 piatti teorici, $HETP = 1 \text{ m} / 10^4 = 10^{-4} \text{ m}$

Proprietà dei picchi gaussiani

L'andamento delle bande d'eluizione o picchi cromatografici è generalmente di tipo gaussiano:



L'ampiezza di una banda gaussiana è proporzionale alla deviazione standard della banda.

L'ampiezza di banda alla linea di base, W , è definita come 4σ , dove σ è la deviazione standard.

Misurando il tempo di ritenzione e la larghezza di banda (in unità di tempo) si ricava il numero dei piatti teorici:

$$N = \frac{t_r^2}{\sigma^2} = 16 \frac{t_r^2}{W^2} = 5.54 \left(\frac{t}{W_{1/2}} \right)^2$$

Esempio:

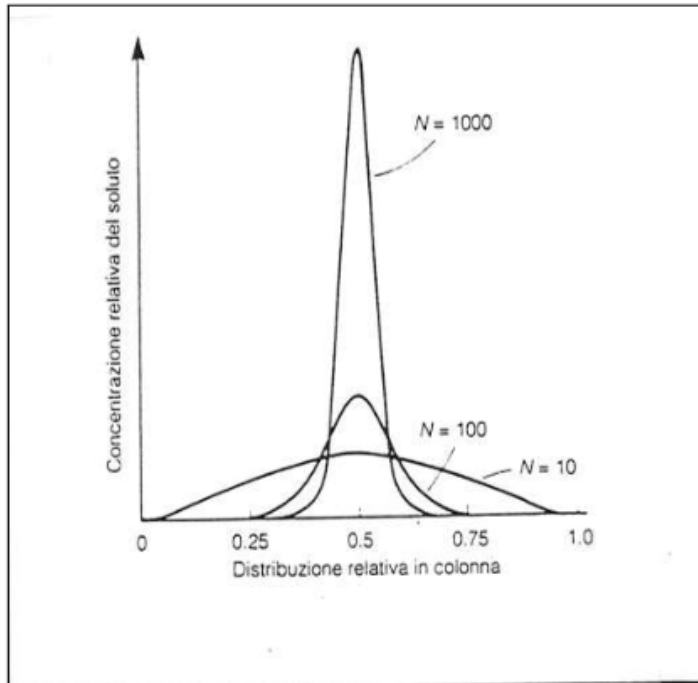


Figura 10.4 Diagramma dell'effetto del numero di piatti teorici (N) sull'aspetto della distribuzione del soluto.

Più piccola è l'altezza del piatto teorico (più grande è il valore di N) più stretto è il picco dell'analita

Esempio : un analita eluisce da una colonna sotto forma di un picco Gaussiano con un tempo di ritenzione di 7 min 45 s e una larghezza della base del picco di 30 s.

Calcolate:

- il numero di piatti teorici della colonna;
- l'altezza dei piatti se la colonna è lunga 7.5 cm



$$N = 16 \left(\frac{t_R}{w} \right)^2$$

(i) $N = 16 \times (465/30)^2$, quindi $N = 3844$

(ii) $H = L/N = 7.5 \times 10^4 / 3844$, quindi $H = 19.5 \mu\text{m}$

In base a questa relazione la risoluzione può essere calcolata dai parametri di selettività (α), capacità (k') e numero dei piatti teorici (N):

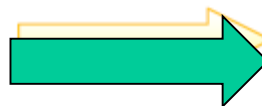
$$R = \frac{\Delta t_r}{W}$$

$$k' = \frac{V_r - V_m}{V_m} = \frac{t_r - t_m}{t_m}$$



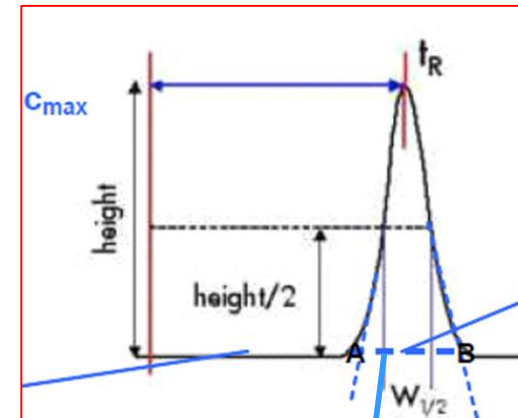
$$t_r = t_m(k' + 1)$$

$$N = \frac{t_r^2}{\sigma^2} = 16 \frac{t_r^2}{W^2} = 5.54 \left(\frac{t}{W_{1/2}} \right)^2$$



$$W = 4 \frac{t_r}{\sqrt{N}}$$

$$\alpha = \frac{t_{r2} - t_m}{t_{r1} - t_m}$$



$$AB = W = 4\sigma$$

$$R = \frac{1}{4} \sqrt{N} \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \left(\frac{k'}{k' + 1} \right)$$

↓
↓
↓

Efficienza della colonna
Selettività
Capacità

Effetto dei diversi parametri sulla risoluzione

Fattore di separazione o selettività

$$\alpha = K'_B / K'_A$$

Fattore di capacità

$$K' = (t_R - t_M) / t_M$$

$$R = 1 / 4 \sqrt{N} \cdot \left[\frac{(\alpha - 1)}{\alpha} \right] \left[\frac{k'}{1 + k'} \right]$$

Per ottimizzare la risoluzione si può quindi:

1. Allungare la colonna o il percorso lungo la fase stazionaria

↪ aumento tempo di ritenzione, allargamento banda.

2. Ridurre HETP riducendo le dimensioni delle particelle della fase stazionaria

3. Modificare il fattore di capacità k' variando la temperatura (GC) o la composizione della fase mobile (LC)

↪ E' l'approccio più facile ed efficace.

4. Modificare il fattore di selettività α

▪ Variando la composizione della fase mobile

▪ Variando la temperatura della colonna

▪ Variando la natura della fase stazionaria

▪ Con additivi particolari nella fase mobile

↪ Il risultato è più difficile da prevedere e può verificato solo empiricamente.

Fattori che determinano la risoluzione di una colonna cromatografica

$$R_S = \frac{\sqrt{N}}{4} \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \left(\frac{k'_2}{1 + k'_{av}} \right)$$

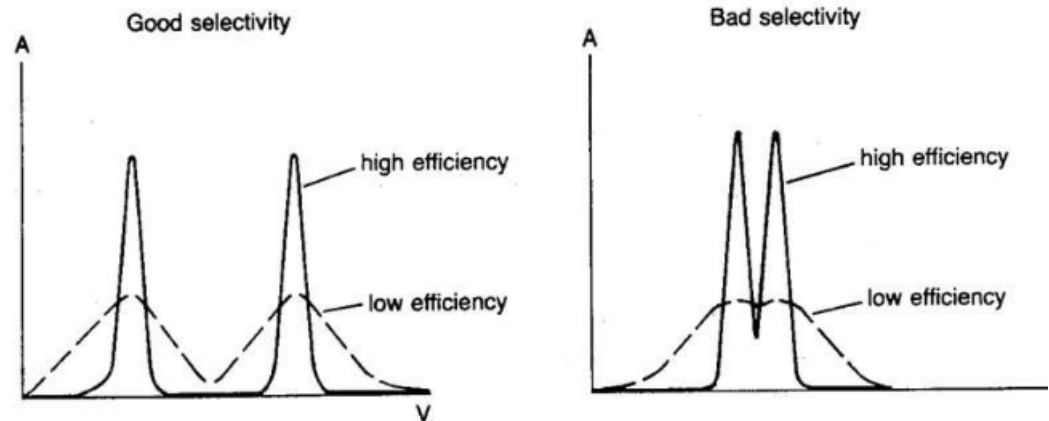


Fig. 6. The effect of selectivity and efficiency on resolution.

R si può migliorare aumentando N , cioè cercando di diminuire la larghezza del picco cromatografico:

- diminuendo le dimensioni delle particelle
- diminuendo la viscosità dell'eluente
- aumentando la temperatura (aumenta la velocità del trasferimento di massa)



Non si deve aumentare troppo la lunghezza della colonna (tempi di separazione troppo lunghi)

- I parametri k' e α sono modulabili cambiando la composizione dei solventi nella f.m.;
- Il parametro più importante di un solvente è per applicazioni LC la sua polarità
- Si sceglie prima la fase stazionaria che dovrebbe aver polarità simile ai costituenti della miscela che si deve separare, e conseguentemente si sceglie la fase mobile in modo che k' abbia valori tra 2 e 5;
- La fase mobile si può selezionare sulla base del meccanismo atteso di separazione, ma i meccanismi coinvolti possono essere più d'uno;
- Se le polarità di f.m. e f.s. sono troppo diverse, il tempo di ritenzione sarà molto piccolo
- Se le polarità di f.m. e f.s. sono molto simili, il tempo di ritenzione sarà molto grande
- Spesso la soluzione ottimale si trova con un processo per “*Trial & error*”;

$$R = 1/4\sqrt{N} \cdot \left[\frac{(\alpha-1)}{\alpha} \right] \left[\frac{k'}{1+k'} \right]$$

Effetto della selettività, dell'efficienza e del fattore di capacità sulla risoluzione



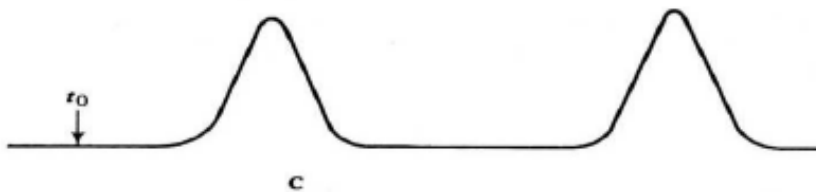
risoluzione scarsa

← picchi non separati



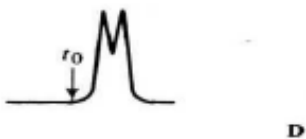
buona risoluzione dovuta a buona efficienza

← picchi stretti



buona risoluzione dovuta a buona selettività

← picchi distanti



risoluzione scarsa dovuta ad un basso fattore di capacità

Allargamento delle bande cromatografiche

E' misurato dal numero di piatti teorici nel processo cromatografico considerato, ed è dovuto al fatto che le molecole di analita, pur uguali fra di loro, e quindi con uguale K_D , possono trascorrere tempi differenti all'interno della colonna, per varie ragioni.

Un modo conveniente per riassumere tali ragioni è presentato dall'**equazione di van Deemter**, secondo cui l'altezza equivalente del piatto teorico in funzione della velocità lineare u della fase mobile è data:

$$HETP = A + \frac{B}{u} + Cu$$

→ Resistenza al trasferimento di massa

Diffusione longitudinale

u = velocità lineare della fase mobile

Diffusione vorticosa

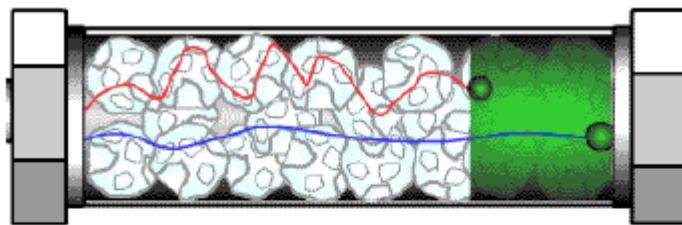
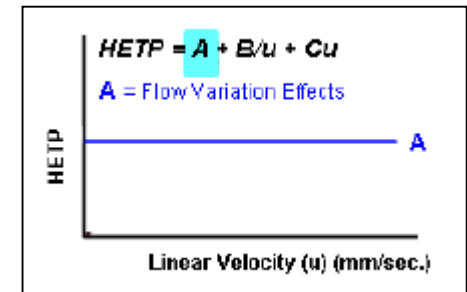
I tre termini dell'equazione di van Deemter corrispondono alle diverse cause di allargamento del picco cromatografico:

Tutti i fattori elencati contribuiscono a migliorare il processo cromatografico, se diminuiscono, in quanto fanno diminuire l'altezza del piatto teorico, e quindi il numero dei piatti teorici.

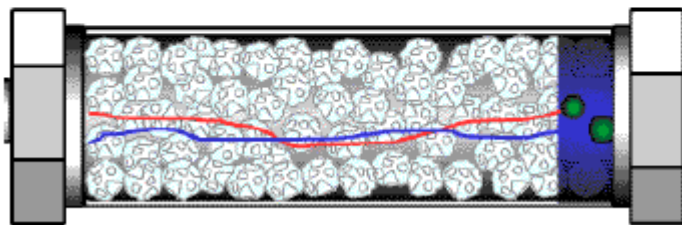
Eddy Diffusion (Diffusione vorticososa)

The first of the 'factors' relating to band broadening is that of Eddy Diffusion. This is a generic term, often used to describe variations in mobile phase flow or analyte flow path within the chromatographic column.

Eddy diffusion itself relates to the fact that an analyte molecule, within a 'band' of analytes, can take one of many 'paths' through the column. These multiple paths arise due to inhomogeneities in column packing and small variations in the particle size of the packing material. This multiple path effect tends to make the band of analytes broader as it moves through the column.



Large Particles



Small Particles

$$A = 2d_p \lambda$$

d_p = diametro delle particelle impaccate
 λ = misura dell'irregolarità dell'impaccamento

Minimise Eddy Diffusion by:

- Selecting well packed columns
- Using smaller stationary phase particles
- Using particles with a narrow size distribution

Longitudinal Diffusion

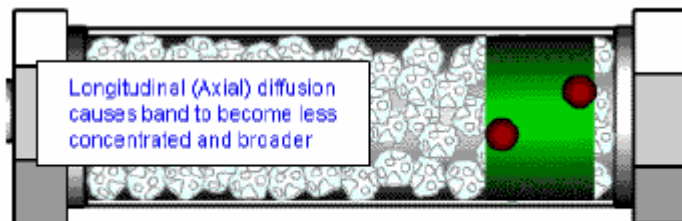
A band of analyte molecules contained in the injection solvent will tend to disperse in every direction due to the concentration gradient at the outer edges of the band.

This broadening factor is called 'Longitudinal diffusion' because inside tubes, the greatest scope for broadening is along the axis of flow. The band will broaden in all system tubing, but the worst effects will be encountered in the column itself.

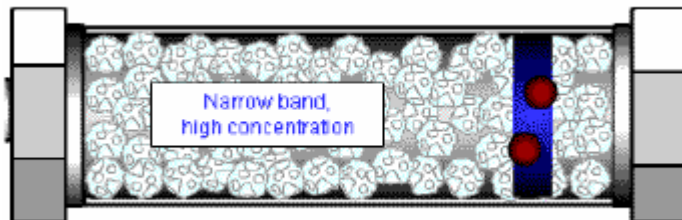
Longitudinal diffusion occurs whenever the HPLC system contains internal volumes that are larger than necessary and some instances of this are:

- Tubing length too long
- Tubing that is too wide (internal diameter)
- Tubing joined by unions
- Incorrectly connected Zero Dead Volume fittings
- Using the wrong column nuts and ferrules
- Using a detector flow cell that has a large internal volume

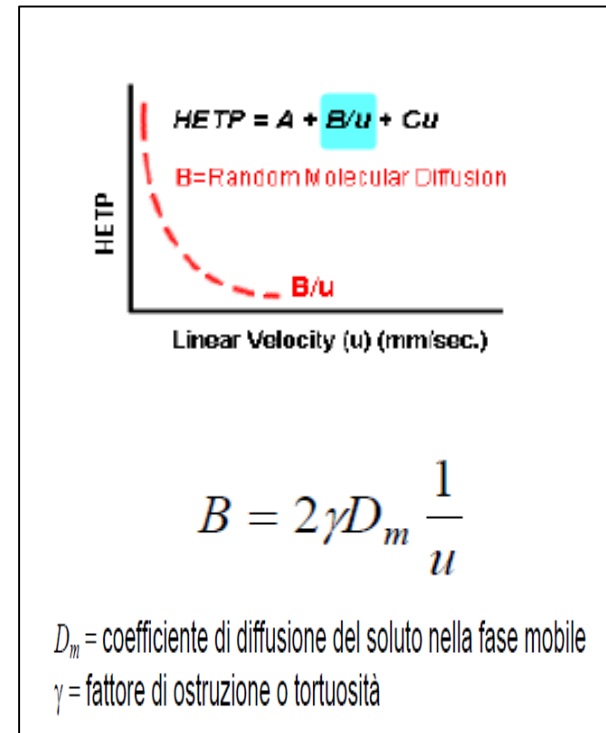
As can be seen, Longitudinal diffusion has a much larger effect at low mobile phase velocity (flow). Therefore, using high linear velocity (high mobile phase flow with narrow columns), will reduce the effects of this broadening factor.



Low mobile phase linear velocity



High mobile phase linear velocity



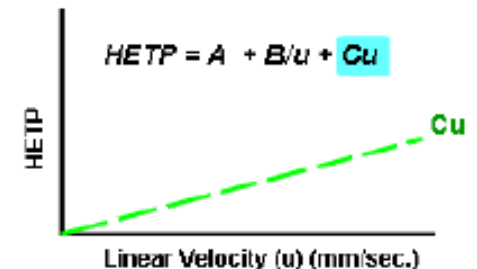
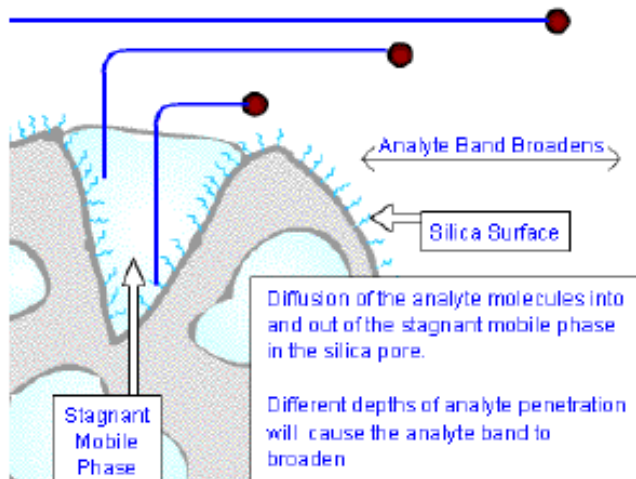
Minimise Longitudinal Diffusion by:

- Using higher mobile phase flow rates
- Keep system tubing short and as narrow as possible (careful with back-pressure) (<0.12mm i.d. is ideal)
- Use correct nuts, ferrules and fittings wherever possible

Mass Transfer

This term in the Van Deemter equation arises largely due to the fact that the stationary phase material is porous and the mobile phase within the pores is 'stagnant' or stationary. The packing material is porous to allow a very large surface area for separation to occur.

As the analyte molecules move through the stagnant mobile phase to reach the surface of the packing material, they do so by diffusion only. Analyte molecules entering the pore, those that don't enter the pore and those that penetrate more deeply into the pore, will all be held up at that point to different extents –causing a broadening of the band. This is the 'C' term.

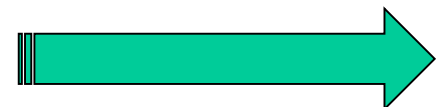


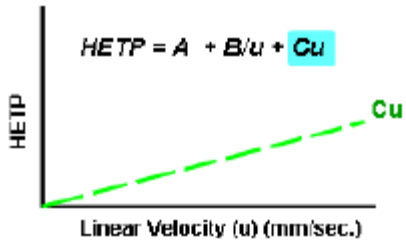
$$C = C_f + C_p$$

Further, the analyte residence time in (or on) the stationary phase is also variable – again causing a variation in elution time and band broadening. These effects may be minimised by reducing the size (diameter) of the packing material particle size to make the pores as shallow as possible. The effects of mass transfer are also lower at lower linear velocity of the mobile phase.

Minimise Mass Transfer effects by:

- Using smaller (diameter) stationary phase particles
- Using lower mobile phase flow rates
- Heating the column (at higher temperatures the diffusion processes are speeded up and the differences in elution time from the particle pore are reduced)





$$C = C_f + C_p$$

$$C_f = \frac{fp(1-p)d_f^2}{D_f} u$$

C_f = diffusione nel film

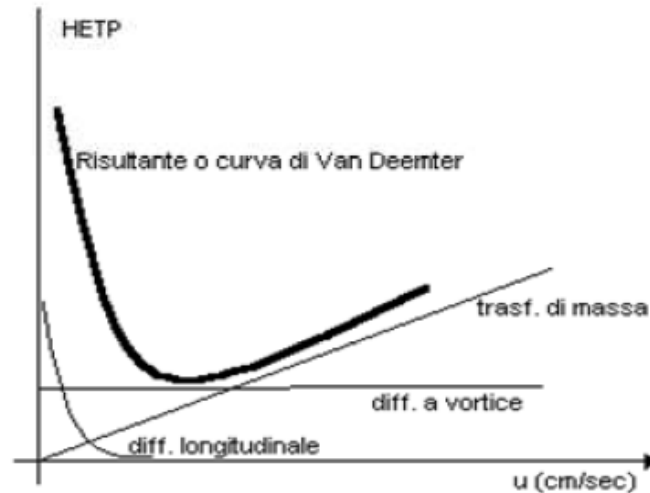
$$C_p = \frac{\omega d_p^2}{D_m} u$$

C_p = diffusione all'interno della particella

f = fattore di forma per la fase stazionaria
 p = concentrazione di soluto nella fase stazionaria
 $(1-p)$ = concentrazione di soluto nella fase mobile
 d_f = spessore del film
 D_f = coefficiente di diffusione del soluto nel film

d_p = diametro particelle
 D_m = coefficiente di diffusione del soluto nella fase mobile
 ω = misura della qualità del processo di impaccamento

Riportando in grafico l'equazione di Van Deemter ($HETP$ vs u) si ottiene una funzione iperbolica:



$$HETP = A + B/u + Cu$$

A: diffusione microvorticosa
B: diffusione molecolare longitudinale
C: resistenza al trasferimento di massa
u: velocità lineare media del gas/fluido di trasporto

- a velocità estremamente basse, il termine B/u dà il maggior contributo all' $HETP$
- a velocità elevate diventa importante il termine Cu
- l'impiego di particelle di piccole dimensioni diminuisce anche il termine A

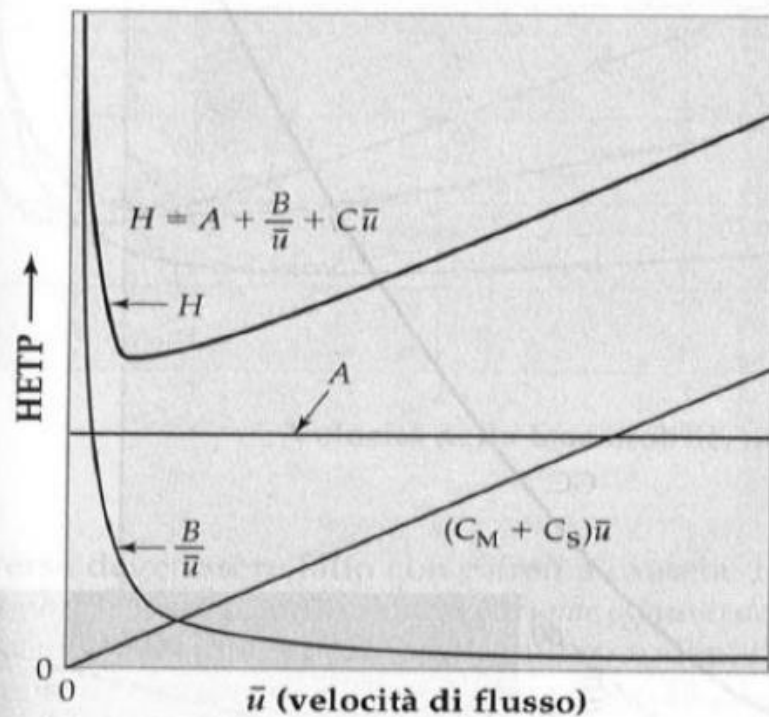
La velocità di flusso ottimale è quella che corrisponde al minimo della curva. L'equazione di van Deemter permette quindi di ottimizzare il processo in funzione della velocità di flusso, ma non è in grado di predire né l'ampiezza della dispersione né l'effetto della modifica di alcune variabili, quali la velocità di flusso o la dimensione delle particelle.

TEORIA DEI PIATTI TEORICI

Allargamento di banda: Equazione di van Deemter

(a)

In HPLC

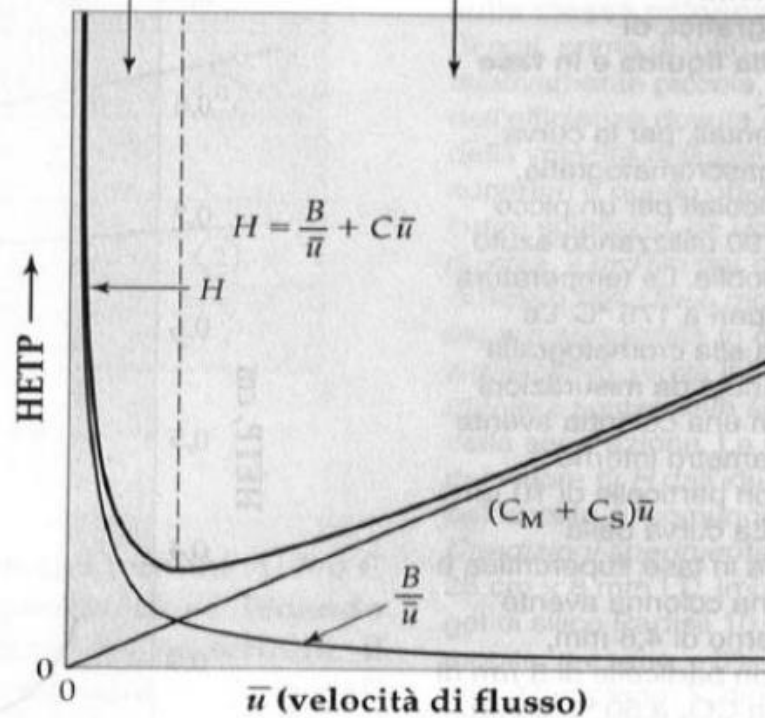


(b)

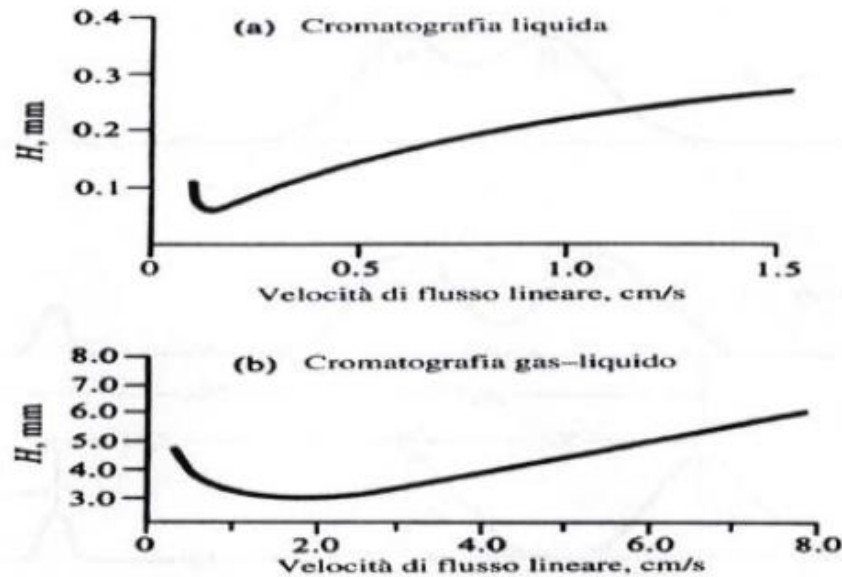
Allargamento di banda dovuto soprattutto alla diffusione

Allargamento di banda dovuto soprattutto al trasferimento di massa

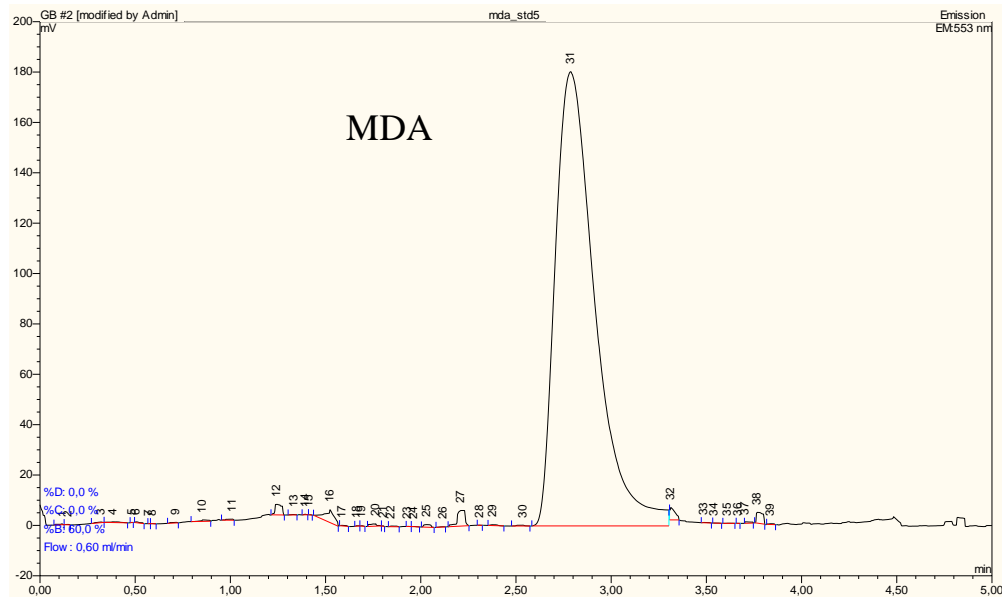
In GC



Effetto VELOCITA' della FASE MOBILE su HEPT per HPLC e GC



- Minimo valore di H (massima efficienza) per valori bassi di flusso
- Flussi e H più bassi per HPLC
- GC più efficiente per lunghezza colonne (50 m contro 25 cm)
- Numero piatti N in GC molto maggiore che in HPLC



Nel nostro laboratorio, mediante HPLC-FL-UV e GC-MS valutiamo biomarcatori di stress psicofisico ed ossidativo cellulare in:

- urine,
- saliva,
- colture cellulari,
- colture batteriche,
- tessuto cerebrale

MDA, 8OHdG, Potere antiossidante, ecc. in urina e saliva
Cortisolo ed alfa-amilasi in saliva

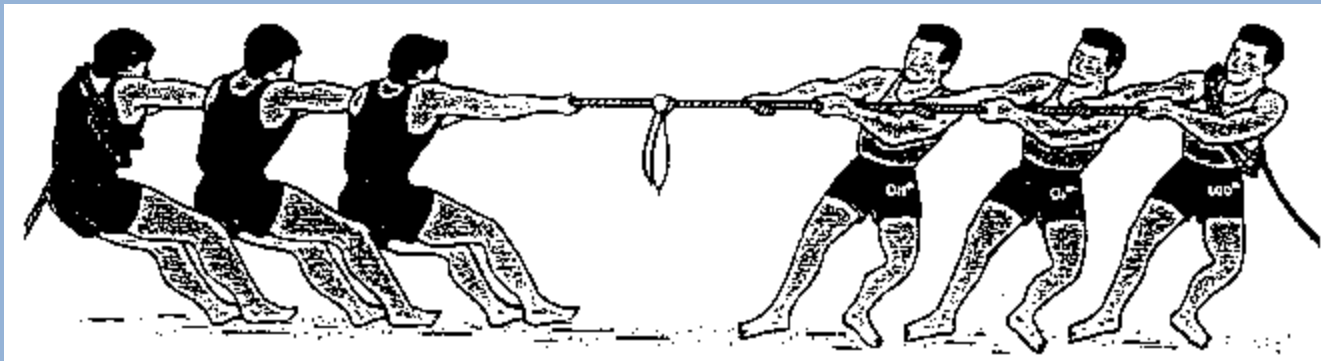
Caso di studio ed «Esercitazione» di laboratorio:

- **Determinazione della MDA salivare ed urinaria**
- **Valutazione dello stress ossidativo cellulare di atleti di Judo di medio ed alto livello**

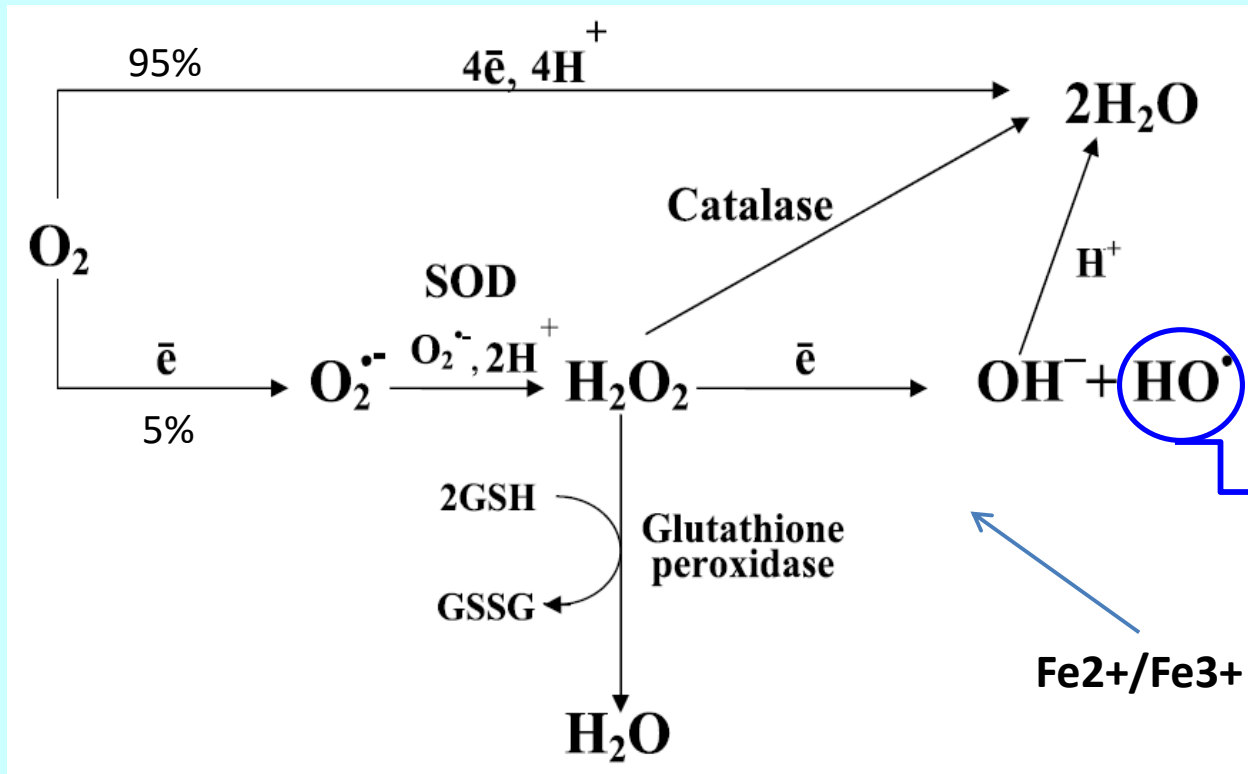
Cos'è lo Stress ossidativo

La rottura di un equilibrio

Lo stress ossidativo è un tipo particolare di stress chimico indotto dalla presenza, in un organismo vivente, di un eccesso di specie chimiche reattive, generalmente centrate sull'ossigeno (ROS), dovuto ad un'aumentata produzione delle stesse e/o a una ridotta efficienza dei sistemi fisiologici di difesa antiossidante.



mechanisms of redox regulation



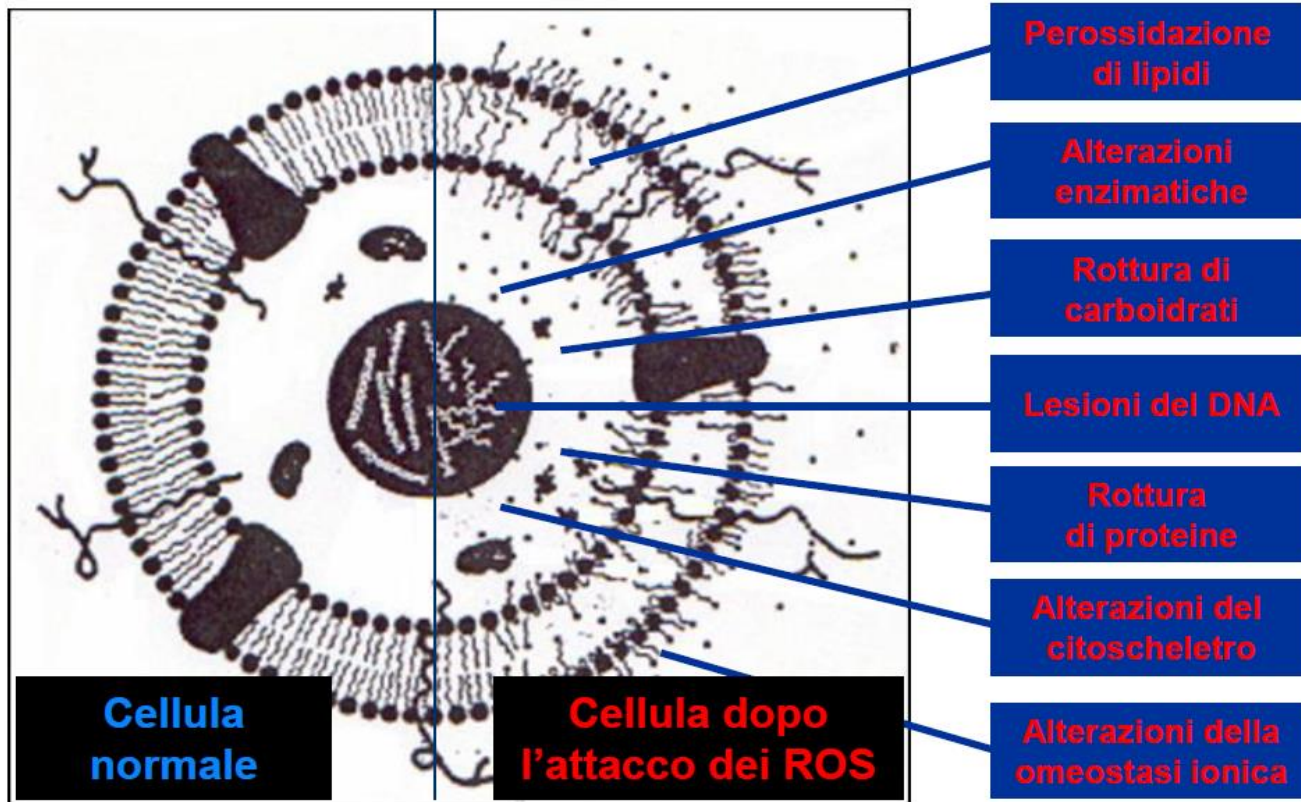
since there are not specific enzymatic systems dealing on the hydroxyl radical HO^\bullet , the best way to avoid its adverse effects is the prevention of HO^\bullet formation.

Fig. 1.1. Four- and one-electron reduction pathway of molecular oxygen.

Generally, oxidative stress results from the metabolic reactions that use oxygen and represents a delicate balance between physiological and patho-physiological effects of RONS achieved by mechanisms called redox regulation.

The process of redox regulation protects living organisms from various oxidative stresses and maintains redox homeostasis by controlling the redox status *in vivo*

Effetti dello stress ossidativo sulla cellula



Bersaglio dell'attacco dei ROS sono *non solo i lipidi* ma *qualsiasi biomolecola* presente nella cellula

L'invecchiamento e almeno 50 malattie sono correlate con lo STRESS OSSIDATIVO

Malattia di Alzheimer

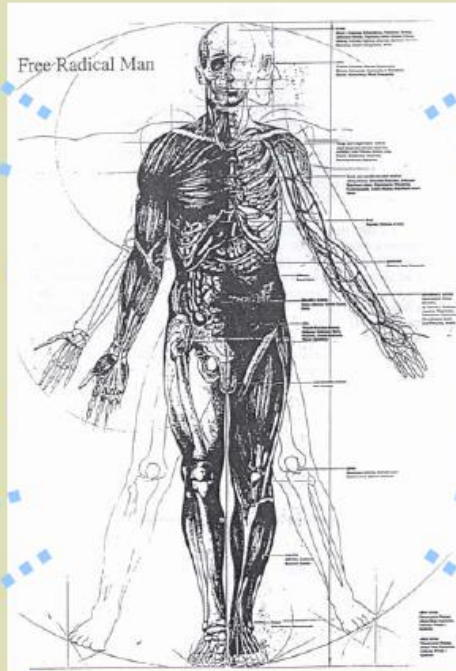
Stroke

Aterosclerosi

Pancreatite

Infarto del miocardio

Obesità



Malattia di Parkinson

Cataratta

Artrite reumatoide

Malattia di Chron

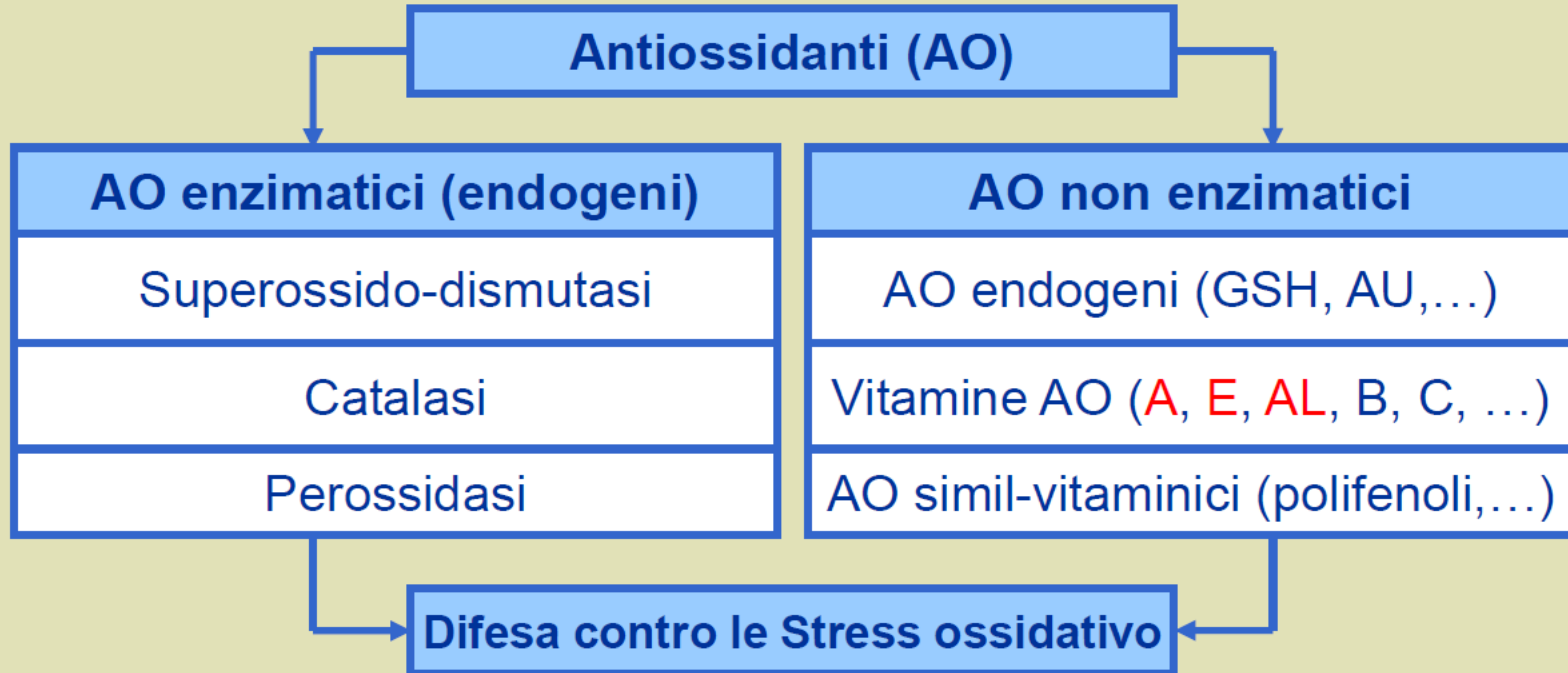
Diabete mellito

Cancro

INVECCHIAMENTO

"The free radical man"

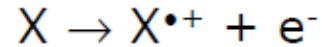
Il sistema antiossidante negli organismi viventi



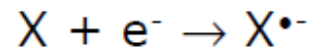
antiossidanti enzimatici e non enzimatici, esogeni e endogeni, **lipofili** e idrofili difendono dallo stress ossidativo

Meccanismi di formazione di radicali

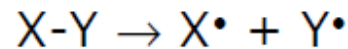
- Perdita di un elettrone:



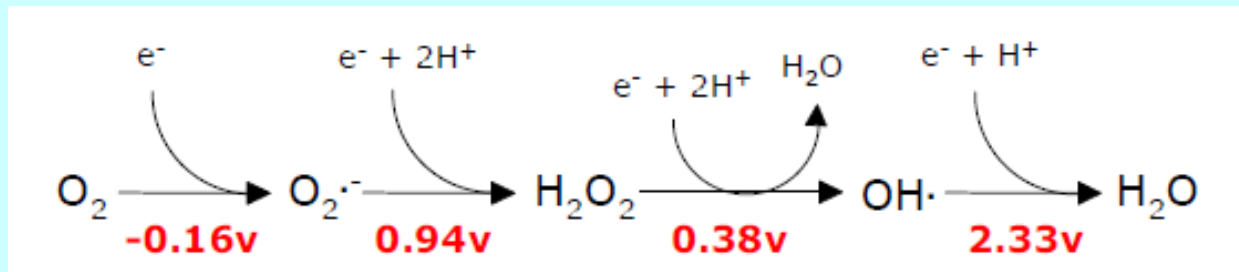
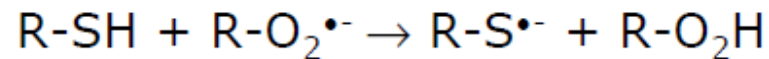
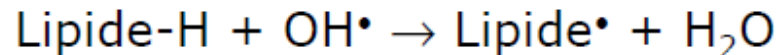
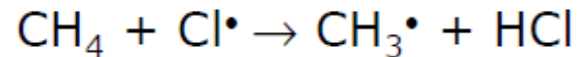
- Acquisto di un elettrone:



- Scissione omolitica di un legame covalente:



- Astrazione di un atomo di idrogeno (H^{\bullet}) da parte di un'altra specie radicalica:



Specie Reattive dell'Ossigeno (ROS)

- Specie non radicaliche

- H_2O_2 *acqua ossigenata (perossido di idrogeno)*
- HOBr *acido ipobromoso*
- HOCl *acido ipocloroso*
- O_3 *ozono*
- $\text{O}_2\ ^1\Delta_g$ *ossigeno singoletto*
- LOOH *perossido lipidico*
- ONOOH *perossinitrito*

- Radicali prodotti per riduzione ad un elettrone

- $\text{O-O}^\bullet + e^- \rightarrow \text{O-O}^{\bullet-}$ *anione superossido*
- $\text{O}_2^{\bullet-} + \text{OH}^\bullet \rightarrow \text{O}_2 + \text{OH}^-$ *ossigeno singoletto*
- $2\text{O}_2^{\bullet-} + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2$ *perossido*
- $\text{O}_2^{\bullet-} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{HOO}^\bullet$ *idroperossiradicale*
- $\text{H}_2\text{O}_2 + e^- \rightarrow \text{OH}^- + \text{OH}^\bullet$ *radicale idrossido*
- $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{Fe}^{2+} (\text{Cu}^+) \rightarrow \text{Fe}^{3+} (\text{Cu}^{2+}) + \text{OH}^- + \text{OH}^\bullet$ (R. Fenton)
- $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2^{\bullet-} (\text{cat. Cu/Fe}) \rightarrow \text{O}_2 + \text{OH}^- + \text{OH}^\bullet$ (R. Haber-Weiss)
- $\text{L} + \text{O}_2^{\bullet-} \rightarrow \text{LOO}^{\bullet-}$ *anione lipoperossido*

Specie Reattive dell'Azoto (RNS)

- Prodotti prevalentemente dallo smog fotochimico

- Specie non radicaliche

- HNO_2 *acido nitroso*
- NO^+ *catione nitrosile*
- NO^- *anione nitrosile*
- N_2O_4 *tetrossido di diazoto*
- N_2O_3 *triossido di diazoto*
- NO_2^+ *nitrile*
- ROONO *alchilperossinitrito*
- NO_2Cl *cloruro di nitrile*

- Specie radicaliche

- $\text{O}_2 + \text{L-arginina} \rightarrow \text{NO}^\bullet + \text{L-citrullina}$ *ossido d'azoto*
- $\text{O}_2^{\bullet-} + \text{NO}^\bullet \rightarrow \text{ONOO}^-$ *perossinitrito*
- $\text{ONOO}^- + \text{CO}_2 \rightarrow \text{ONOOCO}_2^-$ *nitroperossicarbonato*
- $\text{ONOOCO}_2^- \rightarrow \text{NO}_2^\bullet + \text{CO}_3^{\bullet-}$ *biossido d'azoto*

Stabilità dei radicali

RADICALE		TEMPO DI VITA
Radicale idrossido	$\cdot\text{OH}$	10^{-9} s
Radicale alcossido	$\cdot\text{OR}$	10^{-6} s
Ossigeno singoletto	$^1\text{O}_2$	10^{-5} s
Anione perossinitrito	ONOO^-	0.05-1.0 s
Ossido di azoto	$\cdot\text{NO}$	1-10 s
Radicale perossido	$\text{ROO}\cdot$	7 s
Anione superossido	$\text{O}_2\cdot^-$	10^3 - 10^4 s

Sorgenti di Radicali

- Endogene:
 - Catena respiratoria,
 - Fotosintesi,
 - Sintesi di prostaglandine,
 - Metabolismo dei nucleotidi
 - Perossisomi,
 - Autossidazione,
 - Fagocitosi,
 - Ossiemoglobina,
 - Enzimi ossidativi...
- Esogene:
 - Xenobiotici,
 - Radiazioni
 - Ionizzanti (raggi X)
 - Non ionizzanti (UV)
 - Calore,
 - Infezione,
 - Iperossia,
 - Inquinamento...

NELLO SPORT...



La richiesta sempre più alta genera paura



La paura genera stress



Lo stress genera fatica



La fatica genera rifiuto



Burn out !

Cosa posso fare per conoscere l'attuale livello di stress di un atleta e massimizzarne la performance?

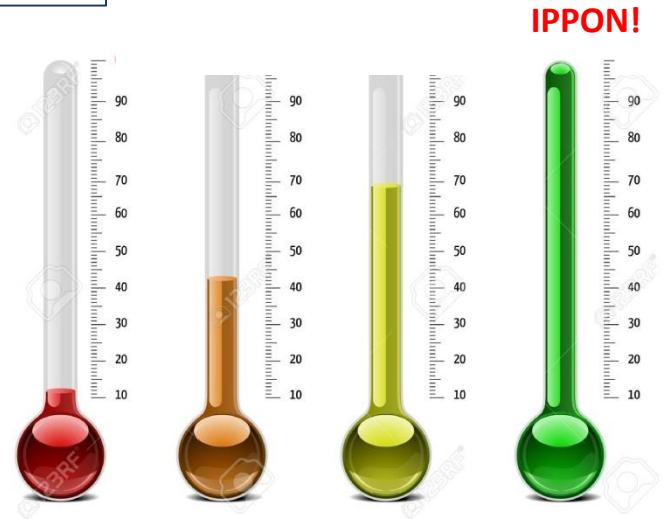
NON esistono strategie universali, ma solo individuali

Bisogna monitorare le risposte del singolo atleta al processo di allenamento

1) metodo di valutazione della percezione dello stress, della stanchezza e di altre variabili fisiologiche

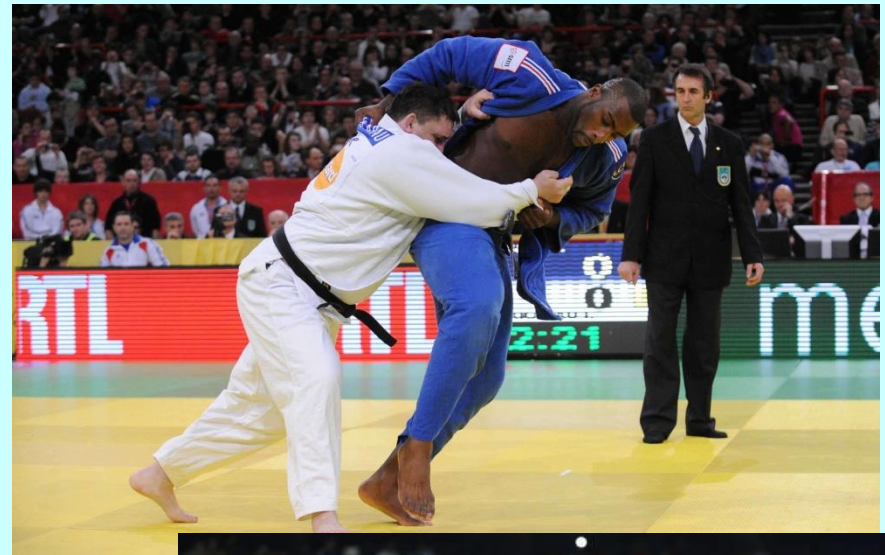
2) metodo di valutazione dello stress psicologico attraverso i biomarcatori salivari

3) metodo di valutazione dello stress ossidativo cellulare



Stress ossidativo ed esercizio fisico

L'attività fisica (aerobica, anaerobica e esercizi di resistenza) determinano un aumento della produzione di sostanze fortemente ossidanti, dipendenti soprattutto dall'intensità delle azioni muscolari



ATTIVITA' FISICA e STRESS OSSIDATIVO

Mentre una regolare e media attività fisica determina un adattamento fisiologico che produce principalmente benefici nel senso delle difese antiossidanti, è noto fin dal 1978 che l'esercizio fisico intenso, anche nella fase di recupero (Shalin et al, 1992), **aumenta la produzione di sostanze ROS** e queste possono eccedere le difese antiossidanti endogene e quelle esogene introdotte con la dieta

In risposta ad una intensa attività fisica, la capacità antiossidante dell'organismo può decrescere temporaneamente dopo la seduta di allenamento o dopo l'evento di gara e tale stato viene evidenziata dalla capacità antiossidante plasmatica.

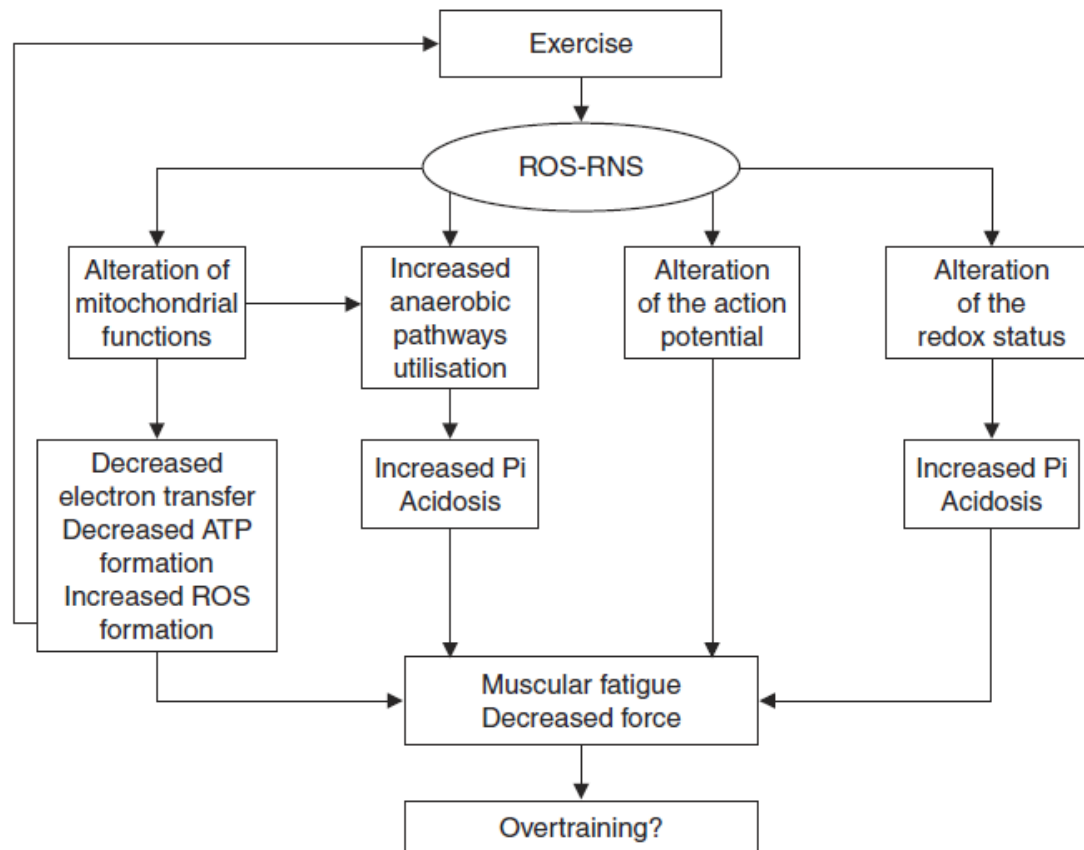


Fig. 3. The different hypothesis about the effects of reactive oxygen species (ROS) on muscular fatigue. **ATP** = adenosine triphosphate; **redox** = oxidation-reduction; **RNS** = reactive nitrogen species; **Pi** = inorganic phosphate.

Meccanismo aerobico

- Nessun effetto per $VO_2 < 50\% VO_{2max}$
- Dipendenza dallo stato di fitness (adattamento)

Produzione di RONS a seguito di:

- Esercizio massimale
- Esercizio sub-massimale, dipendente dalla durata e dall'intensità
 - ✓ Da 20 min al 50% di VO_{2max}
a 90 min al 60% di VO_{2max} (cicloergometro)
 - ✓ Corsa da 10 a 80 Km oppure da 2.5 a 3 ore
 - ✓ Corsa in discesa per contrazione eccentrica
per danno muscolare

Meccanismo anaerobico

Produzione di RONS in esercizi:

- isometrici (50-60% massima contrazione)
- di sprint (Wingate test di 30 sec al cicloergometro)
- di endurance

Dovuto essenzialmente a:

- all'attivazione di enzimi (xantina ossi-reduttasi, NADPH ossidasi)
- alterazione dell'omeostasi del calcio
- alterazione delle proteine contenenti Fe
- danni muscolari (in recupero)

Forte dipendenza dallo stato di fitness (adattamento= risultante cumulativa di esercizi con sufficiente carico, intensità e durata)

Valutazione di stress ossidativo a seguito di esercizio anaerobico/aerobico

Marcata produzione di RONS in esercizi intermittenti !!!



È il caso del JUDO !

Intermittente:

Azioni ad alta intensità

Forza esplosiva e forza massima

Endurance

Generalmente 5-15 sec di attività (anche massimale)

5-10 sec di intervallo submassimale

Combinazione di forza massima, forza rapida ed endurance



Stimolazione alternata del sistema metabolico aerobico ed anaerobico



Produzione di RONS !

Biomarcatore di stress ossidativo:

ossidazione dei lipidi, malondialdeide (MDA)

I fosfolipidi di membrana e i trigliceridi nelle lipoproteine LDL sono particolarmente sensibili all'attacco dei radicali attivi, con formazione di malondialdeide (MDA) rilevabile nel plasma o nelle urine. L'MDA viene rilevato con il saggio dell'acido tiobarbiturico (TBA) per via cromatografica (HPLC-fluorescenza) su campioni di urina/saliva.

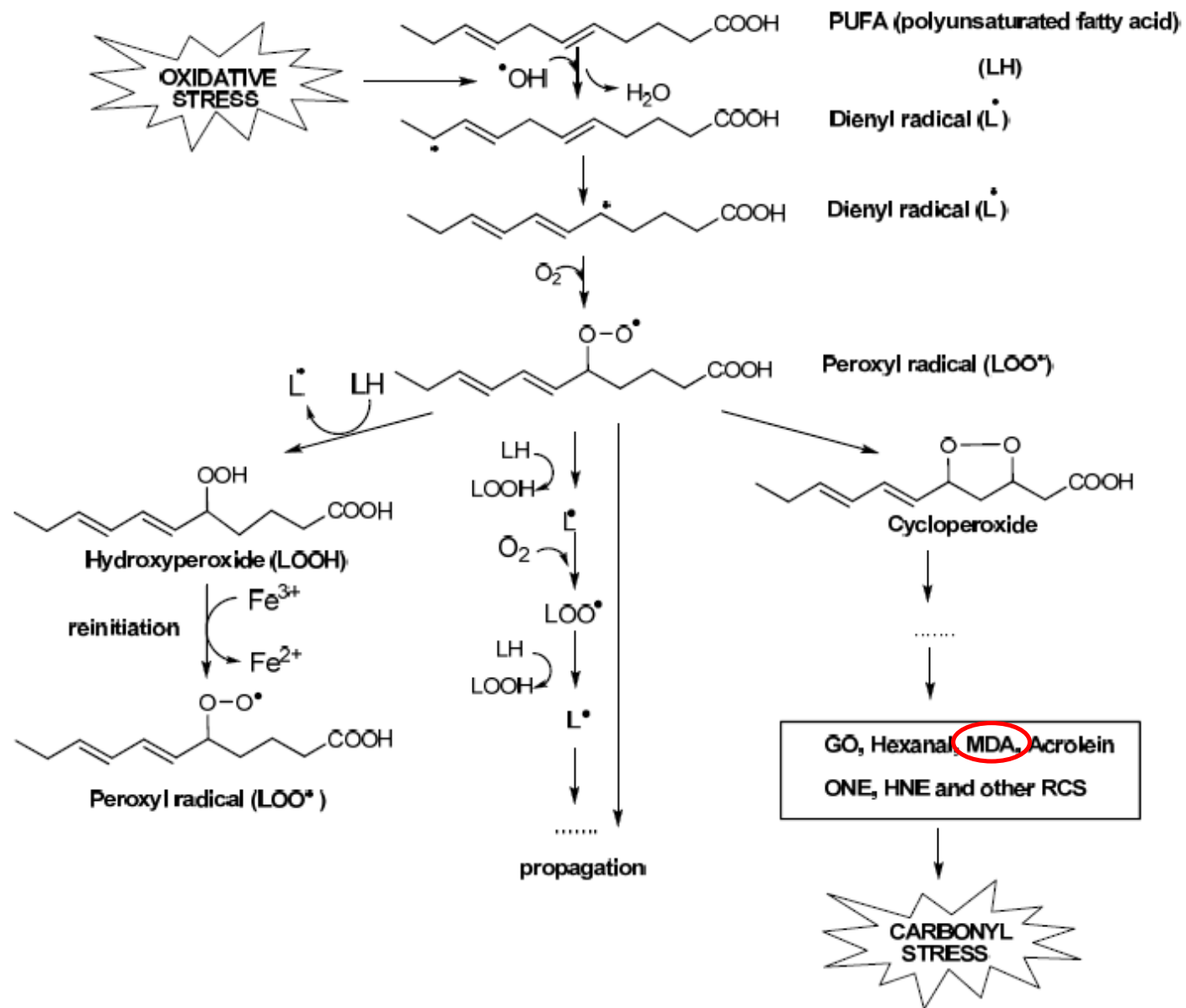


Fig. 5. Suggested pathways of lipid peroxidation and its relation to oxidative and carbonyl stresses (modified from (Iushchak et al., 2011c)).

CAMPIONAMENTO SALIVA

E' importante seguire alcune linee guida di campionamento della saliva in modo da minimizzare la varianza nei risultati delle analisi.

1) **EVITARE** alimenti e bevande con alto contenuto di zuccheri, caffeina o con alta acidità per almeno 2 h prima del campionamento.

2) **NON** sottoporsi a cure dentali per almeno 48h prima del prelievo e non lavare i denti per almeno 45 min prima.

3) **PRIMA** del prelievo lavare la bocca per almeno 3-5 min con acqua. Deglutire la prima quantità di saliva prodotta. Poi procedere al prelievo.

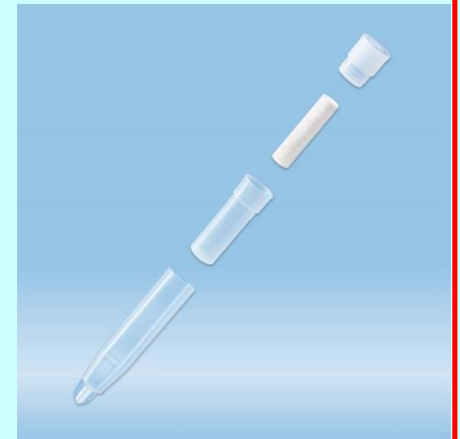
PRELIEVO MEDIANTE SALIVETTE® (Sarsted Inc.)

1) mettere in bocca il tampone della Salivette e **tenerlo per un tempo preciso** (2 min oppure di più, ma sempre lo stesso per tutti i prelievi), **senza masticare**, passando il tampone da un lato all'altro della bocca;

3) recuperare il tampone e riinserirlo nel tubo;

4) inserirle in un sacchetto da alimenti, segnando l'apposito codice su una scheda che verrà fornita.

5) refrigerare in borsa frigo e portarlo al primo congelatore (-20°C) disponibile (casa, palestra,...).



PRELIEVO URINE

Le urine vengono raccolte in contenitori sterili (provette da 50 mL) reperibili in farmacia.

Il contenitore **NON** deve essere riempito fino all'orlo, ma fino a circa 40 mL.

3) trasportare in borsa frigo e quanto prima congelate a -20°C nello stesso sacchetto con il campione di saliva.



Analisi HPLC per MDA

Agarwal et al., 2002. J. Chrom. B, 775: 121-126

REAGENTI

Soluzione etanolica di BHT 0.05%.

L'idrossitoluene butilato $[(\text{CH}_3)_3\text{C}]_2\text{C}_6\text{H}_2(\text{CH}_3)\text{OH}$ viene sciolto in etanolo al 95% (50mg/100 mL)

Soluzione di acido fosforico 0.44 M.

86 mL di H_3PO_4 (85%, 5.102M) concentrato viene diluito al volume finale di 1L.

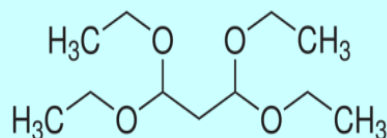
Soluzione TBA 42 mM.

6.054 g di acido 2-tiobarbiturico $[\text{C}_4\text{H}_4\text{N}_2\text{O}_2\text{S}]$, viene disciolto in un litro di acqua e posto su un agitatore riscaldato a 50-55°C.

Soluzione 40% di etanolo. Diluire 420 mL di etanolo 95% a 1 litro.

STANDARDS

1,1,3,3-tetraethoxypropano (TEP, Malonaldehyde bis(diethyl acetal),



PREPARAZIONE DEL CAMPIONE

1) in tubo con tappo da 2 mL mettere

- 200 μL di campione (urina, saliva,...) o di standard
- 80 μL di BHT
- 136 μL di H_3PO_4
- Vortexare ed attendere 10 min
- 232 μL di TBA
- 110 μL di acqua

2) agitare al Vortex e incubare per 1h a 100°C i stufa.

3) raffreddare in ghiaccio per 5 min

4) centrifugare a 14000 giri per 3 min

5) filtrare su Durapore 0.45 μm in vials per HPLC.

CONDIZIONI HPLC

Flow: 0.8 ml/min

Eluente: tampone fosfato-metanolo (60:40 v/v)

Tampone fosfato 50 mM a pH=6.8 (con KOH 5M)

T= 30°C

FL: $\lambda_{\text{exc}} = 515 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 553 \text{ nm}$

UV: $\lambda = 532 \text{ nm}$

Colonna: 5 μ ODS, 100x4.6

NB: MDA degrada circa il 10% all'ora, pertanto fare analisi entro l'ora !!!

Il programma di eluizione

```
Pump_InjectValve.State                               LoadPosition
  Data_Collection_Rate =                             5.00 [Hz]
  Rise_Time =                                          2.0 [s]
  Wavelength =                                        532 [nm]
  UV_Lamp =                                            On
  Visible_Lamp =                                      On
  Emission.Gain =                                     16.0
  Emission.Response =                                0.5 [s]
  Emission.Sensitivity =                              High
  Emission.Step =                                     0.20 [s]
  Emission.Average =                                 Off
  Temperature.Nominal =                               27 [°C]
  Pressure.LowerLimit =                              200 [psi]
  Pressure.UpperLimit =                              3000 [psi]
  %A.Equate =                                         "%A"
  %B.Equate =                                         "%B"
  %C.Equate =                                         "%C"
  %D.Equate =                                         "%D"

-1.000        %A.Equate =                             "%A"
              Flow =                                  0.8 [ml/min]
              %B =                                    100.0 [%]
              %C =                                    0.0 [%]
              %D =                                    0.0 [%]
              Curve =                                 5
              %B.Equate =                             "%B"
              %C.Equate =                             "%C"
              %D.Equate =                             "%D"
              Emission.EmWavelength =                 553 [nm]
              Emission.ExWavelength =                 515 [nm]

0.000        Message "INIETTA IL CAMPIONE !!!"
              UV.Autozero
              Emission.Autozero
              UV_VIS_1.AcqOn
              Emission.AcqOn
              Pump_InjectValve.InjectPosition         Duration=30.00

6.000        %B =                                     100.0 [%]
              %C =                                     0.0 [%]
              %D =                                     0.0 [%]
              Curve =                                  5

              UV_VIS_1.AcqOff
              Emission.AcqOff
              End
```

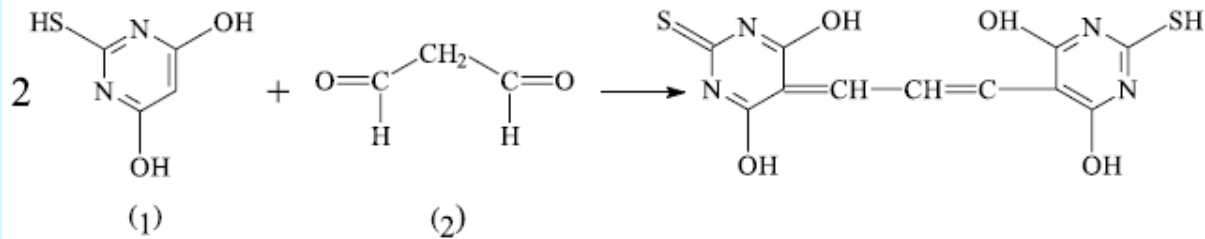
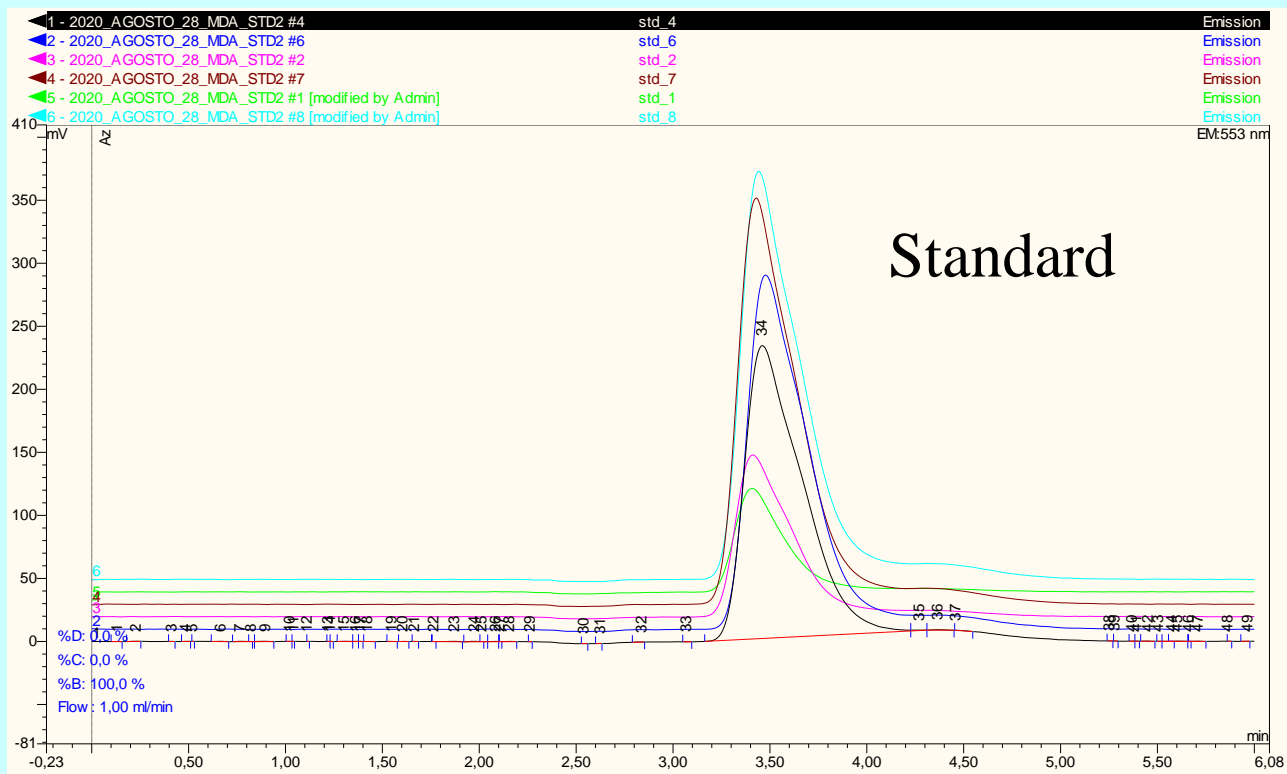
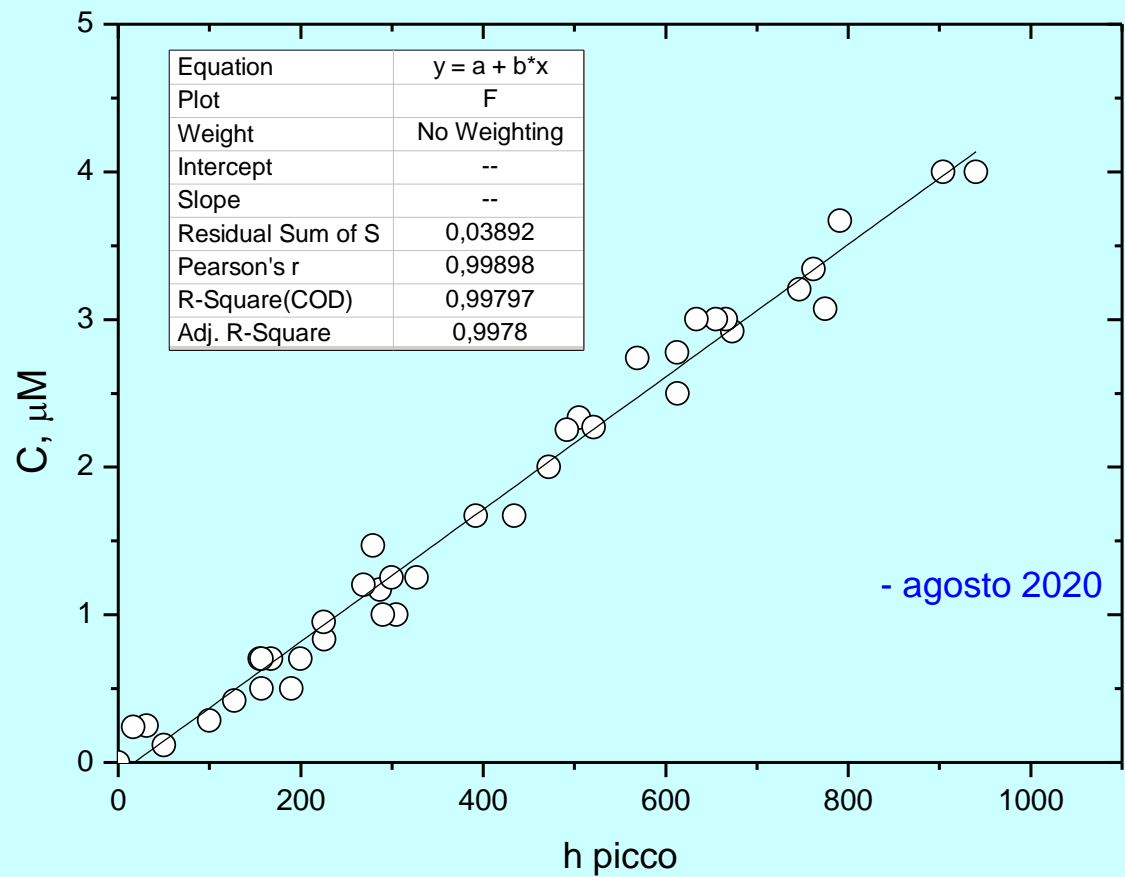


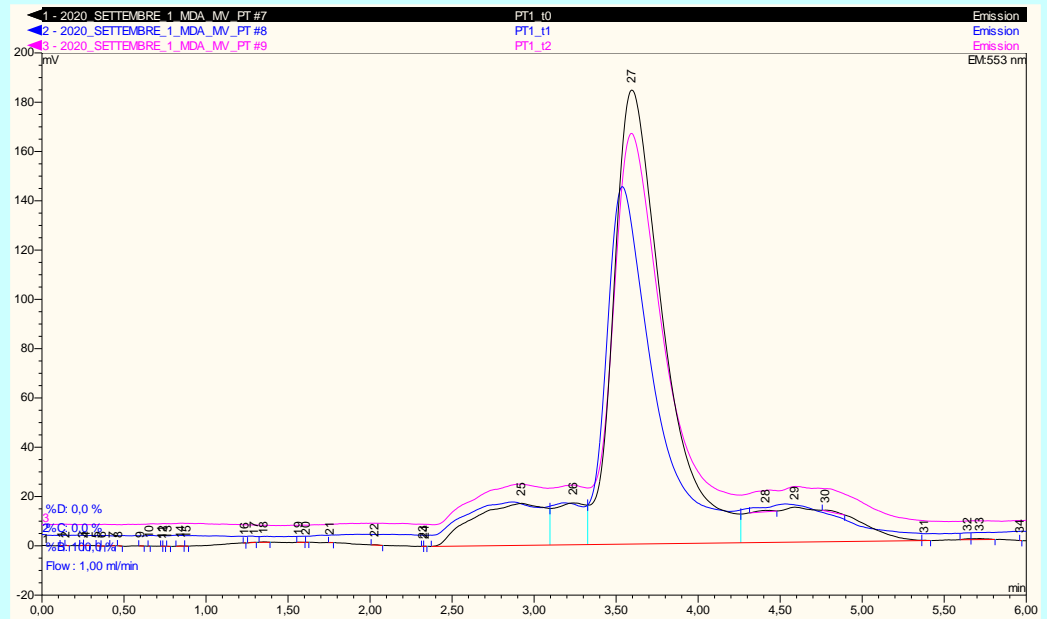
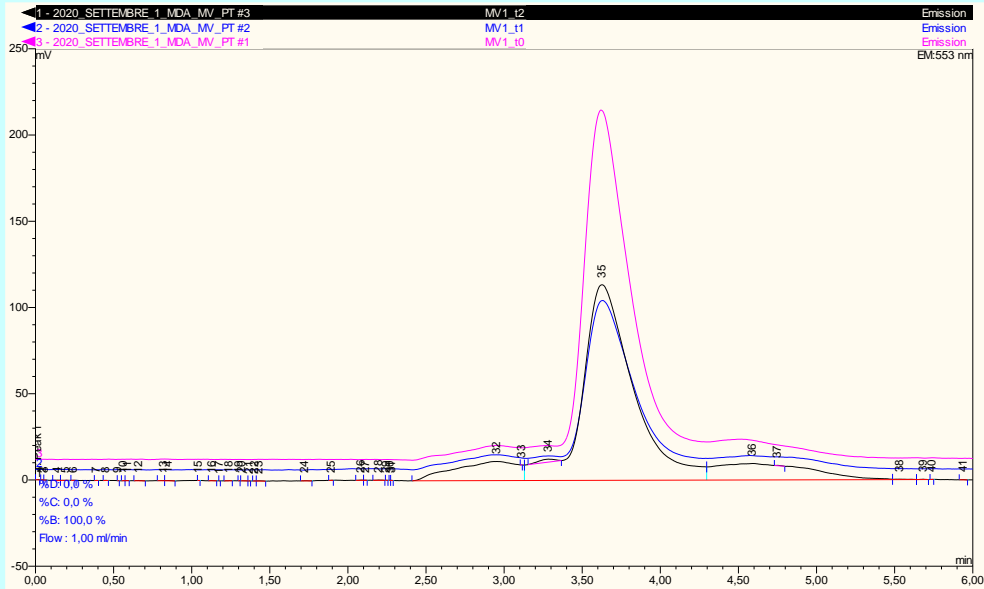
Fig. 8. Reaction of TBA (1) and MDA (2) leading to the TBA-MDA adduct (3).



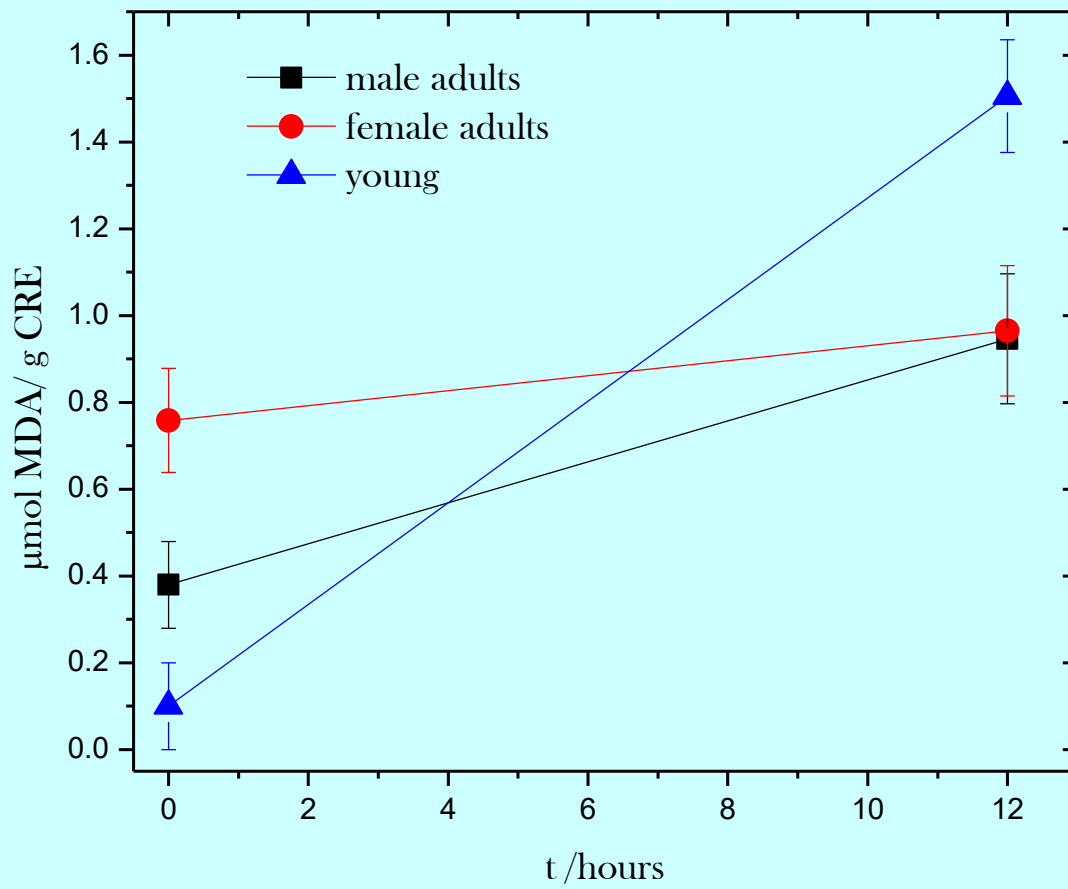
Retta di calibrazione per MDA

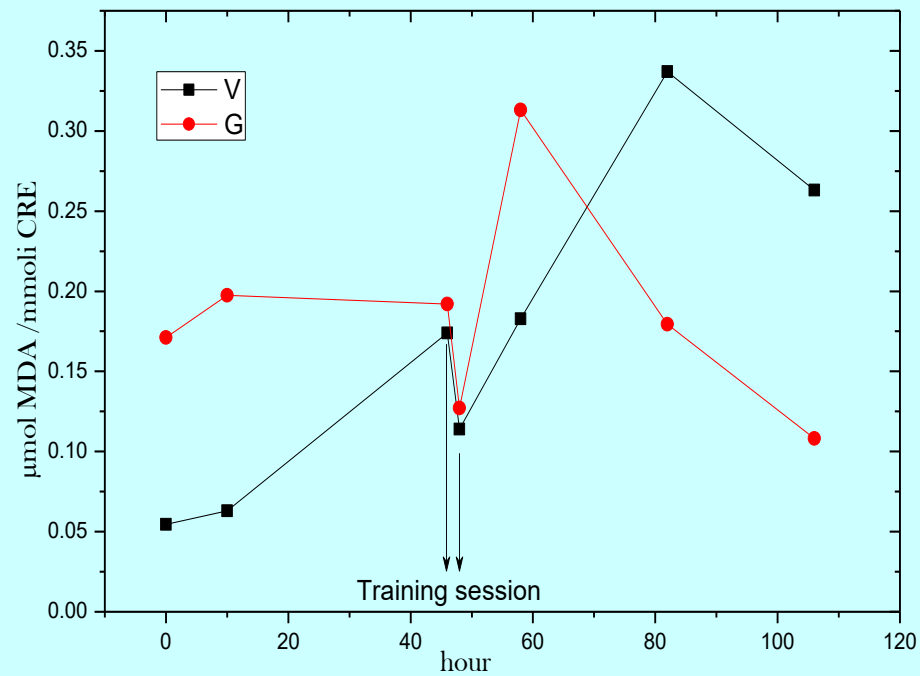
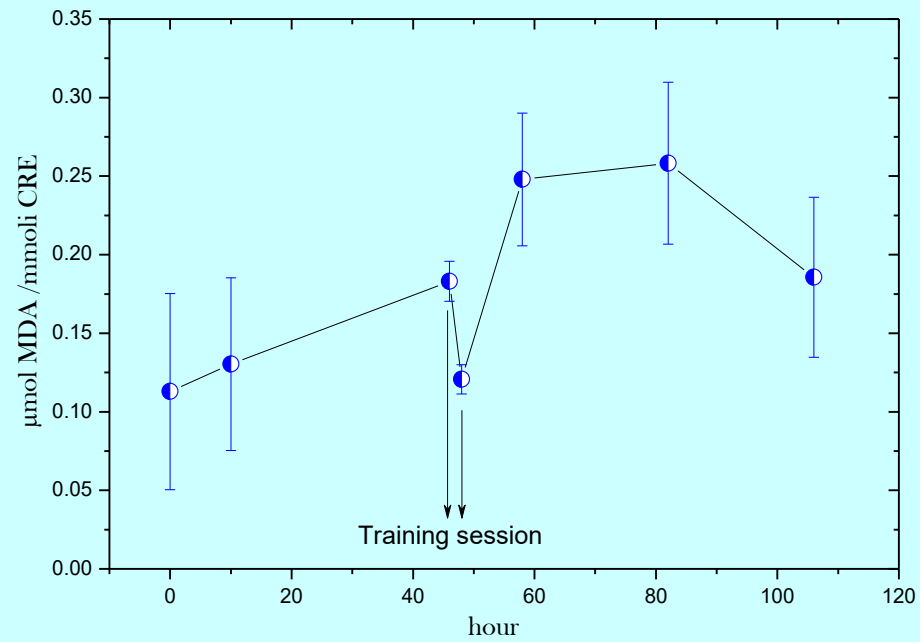


Campioni di saliva di atleti a tempi diversi pre- e post-gara



Post-esercizio







No stress !

Grazie per l'attenzione