

Parte tecnico-analitica

Cromatografia liquida ad alta risoluzione: aspetti analitici e preparativi

F. GASPARRINI, M. GIOVANNOLI e B. GALLI

Istituto di Chimica Organica, Facoltà di Farmacia, Università degli Studi, Roma

INTRODUZIONE.

La cromatografia è un metodo fisico di separazione, per mezzo del quale miscele complesse sono separate nei loro componenti per distribuzione tra due fasi: una fase mobile ed una stazionaria.

La fase mobile può essere un gas (come nella G.C.), o un liquido (come nella L.C.).

Negli ultimi anni, la cromatografia liquida ha subito un notevole sviluppo in seguito al perfezionamento della tecnologia, che ha permesso di raggiungere in tempi sempre più brevi risultati migliori. Infatti, mentre fino ad alcuni anni orsono l'analisi con una normale colonna cromatografica richiedeva un tempo lungo e presentava una scarsa risoluzione, ora con l'uso di colonne ad alta efficienza [1] (in cui le dimensioni delle particelle dell'impaccamento sono dell'ordine di 3-10 μ , e le dimensioni della colonna molto ridotte rispetto a quelle della cromatografia tradizionale) si riduce molto la distanza che i componenti della miscela devono percorrere, e quindi anche il tempo necessario a tale operazione. L'utilizzazione di queste colonne è resa possibile dalla disponibilità di pompe ad alta pressione (500-6000 p.s.i.). Oltre alla rapidità e all'alta risoluzione, un altro vantaggio di questo metodo di analisi è l'alta sensibilità. A seconda del tipo di campione e del detector usato, è spesso possibile rilevare 1ng di sostanza, e con detectors speciali si arriva all'apprezzamento di picogrammi.

L'importanza della cromatografia liquida risulta evidente osservando la Fig. 1: in essa si vede chiaramente che il campo di applicazione dell'H.P.L.C. è notevolmente più ampio di quello gas-cromatografico, che non può essere esteso ai prodotti non volatilizzabili e termolabili. Questo non significa, comunque, che l'H.P.L.C. sostituisce la G.C., ma che permette di risolvere con un metodo cromatografico problemi prima difficilmente risolvibili, e che in alcuni casi è complementare alla G.C.

Tra gli svantaggi di questo metodo di analisi si può considerare, oltre all'alto costo della strumentazione, il fatto che un cromatografo liquido, mentre permette la separazione di una miscela nei suoi componenti, non dà informazioni atte a identificare una sostanza, per cui bisogna ricorrere all'uso di altri strumenti, ad es. lo spettrometro di massa, ecc. Inoltre, attualmente non esiste un detector universale e convenientemente sensibile allo stesso tempo: infatti, il detector a indice

di rifrazione è universale, ma ha sensibilità limitata, mentre il detector ultravioletto è molto sensibile, ma selettivo, e dal punto di vista quantitativo non dà risposte proporzionali alla concentrazione dei vari componenti la miscela; ciò a causa del fatto che le sostanze possono non avere tutte lo stesso coefficiente di estinzione.

Parallelamente, nel campo della G.C. si sono messe a punto nuove tecniche, usando colonne capillari [2]. Queste ultime, avendo bassa capacità (dell'ordine di nanogrammi) devono essere sufficientemente inerti, dato che l'assorbimento anche di una piccola quantità di campione può causare la perdita di una notevole percentuale di prodotto, specie se di natura polare. Per questo motivo, all'acciaio e al nichel è stato preferito il vetro, in quanto si può, con opportuni trattamenti, renderlo eccezionalmente inerte. Tra i vari tipi di vetro, si è notato che la silice fusa è sufficientemente adatta allo scopo. Essa si ottiene infatti fondendo SiO_2 amorfa al 99,9%, prodotta bruciando SiH_4 o SiCl_4 in O_2 , e contiene quindi meno impurezze metalliche del quarzo naturale, impurezze che possono causare la perdita della fase stazionaria dalla superficie della colonna, per decomposizione.

Dandereau *et al.* [2] hanno controllato l'efficienza e l'inerzia di una colonna di silice fusa (22 m \times 0,20 mm),

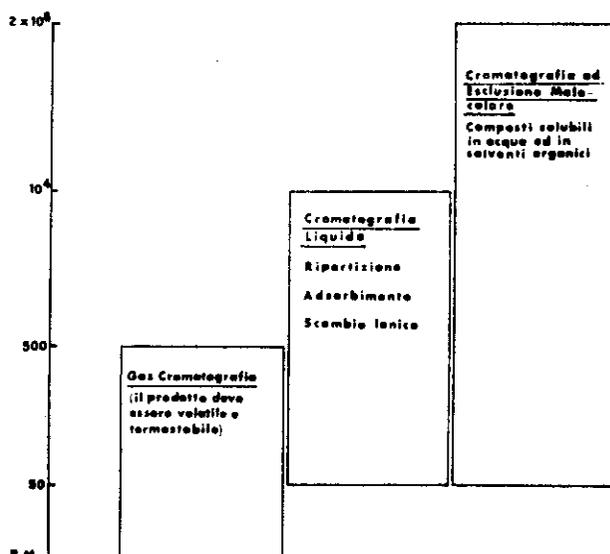


FIG. 1. - Campi di applicazione dell'H.P.L.C. e della G.C.

disattivata con Carbowax 20M, e quindi rivestita con metil silicone SP 2100, risolvendo una miscela di sostanze a diversa polarità composta di fenoli, alcoli, ammine, alcani. La separazione è stata ottima, ed è stata resa possibile dalle caratteristiche neutre della colonna.

La disattivazione è stata necessaria, poiché la silice fusa mostra ancora una certa acidità di Lewis, anche se molto inferiore ad altri tipi di vetro usati per le colonne convenzionali (ad es. borosilicati). La superficie della silice fusa è altresì adatta alla derivatizzazione con organosilani, con i quali si ottiene una superficie modificata, così come avviene per gli impaccamenti per H.P.L.C.

STRUMENTAZIONE.

La Fig. 2 mostra lo schema di un cromatografo per H.P.L.C.:

La strumentazione si compone di:

a) un serbatoio di solvente che contiene la fase mobile. È necessario che il solvente, in cui il campione deve essere solubile, sia ad alto grado di purezza. I solventi più usati sono esano, CHCl_3 , CH_2Cl_2 , AcOEt, CH_3CN , CH_3OH , THF, H_2O ;

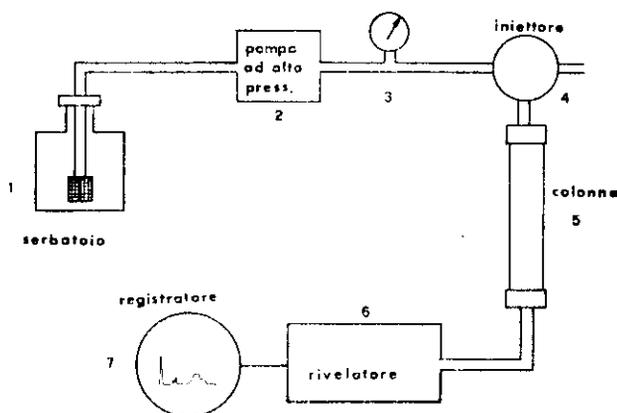


FIG. 2. - Schema di strumentazione per H.P.L.C.

b) una pompa ad alta pressione, costruita con materiali chimicamente inerti, che convoglia il solvente nella colonna. Di solito, si usano, per scopi analitici, pressioni fino a 5000-6000 p.s.i. e flussi compresi tra 0,5 e 2,0 ml/min. È inoltre possibile operare in gradiente di solvente: cioè, durante l'analisi si ha un cambiamento nella composizione della fase mobile (di solito verso il solvente più affine al campione in esame) allo scopo di migliorare la separazione;

c) un manometro per controllare la pressione a monte della colonna;

d) un iniettore, di solito del tipo *sample loop*, per introdurre la soluzione col campione nel flusso della fase mobile, della capacità di $1 \mu\text{l} \div 2\text{ml}$;

e) una colonna, solitamente un tubo di acciaio, impaccata con piccole particelle del materiale usato per effettuare la separazione. Le dimensioni di una colonna analitica (ad eccezione di quelle usate per G.P.C. ed I.E.C.) sono di 10-30 cm, 3-4 mm I.D. Le colonne per G.P.C. sono solitamente più grandi

di 3/8 di pollice, le colonne preparative hanno diametro da 3/8 ad 1 pollice ed oltre;

f) un detector che rivela la presenza dei componenti del campione all'uscita della colonna, e genera segnali elettrici proporzionali alla quantità dei componenti stessi.

I detector più usati sono fotometri ultravioletti a lunghezza d'onda fissa, spettrofotometri a lunghezza d'onda variabile, il detector a indice di rifrazione, a fluorescenza, elettrochimici, infrarossi; a volte, come detector può essere usato uno spettrometro di massa. Il detector a indice di rifrazione è quello a più ampio spettro d'azione, ma è il meno sensibile (campione minimo analizzabile: $5 \times 10^{-7}\text{g/ml}$).

I detector ultravioletti sono un migliaio di volte più sensibili, ma registrano l'assorbimento di una sostanza limitatamente ad una o due lunghezze d'onda, e non tutte le sostanze presentano bande di assorbimento in queste regioni dello spettro. Gli spettrofotometri a lunghezza d'onda variabile, invece, risultano meno sensibili dei precedenti;

g) un registratore potenziometrico, che riporta su carta il risultato dell'analisi: il cromatogramma.

APPLICAZIONI.

Le applicazioni dell'H.P.L.C. sono molteplici: a parte la separazione di una miscela nei suoi componenti, si usa per il controllo di qualità dei prodotti, per determinare rapidamente un prodotto di cui si sospetti la presenza in un campione, per l'analisi di tracce di materia organica nell'acqua, ecc.

MECCANISMI DI SEPARAZIONE.

La vastità del campo di applicazione dell'L.C. è dovuta alla diversità dei metodi di separazione utilizzabili dall'analista. I differenti tipi di H.P.L.C. sono classificati in base alla natura dell'affinità esistente tra il materiale di impaccamento ed i componenti del campione e si possono ricondurre a quattro gruppi fondamentali:

- liquido-solido (cromatografia di adsorbimento);
- liquido-liquido (cromatografia di ripartizione);
- cromatografia a scambio ionico;
- cromatografia ad esclusione molecolare.

Si parla di cromatografia di adsorbimento quando i componenti interagiscono con la superficie di un materiale solido poroso (ad es. silica gel), che possieda un elevato rapporto tra area superficiale e volume. Se il solido viene ricoperto da uno strato liquido in cui i componenti siano diversamente solubili, si parla di cromatografia di ripartizione.

Uno degli ulteriori sviluppi dell'H.P.L.C., sviluppo che l'ha resa più attuale, è stata la scoperta di un metodo per legare chimicamente lo strato sottile di liquido alla particella solida dell'impaccamento, cosicché il liquido non viene continuamente lavato via, e si può stabilire un equilibrio chimico tra le frazioni delle specie da analizzare, dissolte nelle due fasi liquide.

Per tale motivo, il termine *bonded-phase chromatography* ha rimpiazzato nell'H.P.L.C. quello di cromatografia di ripartizione.

In cromatografia, il solvente che scorre attraverso la colonna viene chiamato fase mobile, mentre il substrato solido (impaccamento) e lo strato liquido ad esso legato vengono chiamati fase stazionaria. Nella normale cromatografia di ripartizione, la fase mobile è costituita da un liquido non polare, mentre la fase stazionaria è polare. In molti casi si è reso possibile ottenere delle migliori separazioni invertendo la polarità delle due fasi liquide. In tal caso si parla di cromatografia in fase inversa o R.P.L.C., che è attualmente la variante più usata della H.P.L.C.

Altri due tipi di H.P.L.C. sono la cromatografia a scambio ionico e la cromatografia ad esclusione molecolare. Nella prima, si usano come materiali di impaccamento per la colonna resine a scambio ionico, sotto forma di piccole particelle porose. Tale tecnica è in genere limitata ad alcuni usi particolari, quali l'analisi degli aminoacidi, in cui le specie da separare sono sotto forma ionica. Nella cromatografia ad esclusione molecolare le dimensioni dei pori del materiale da impaccamento rendono possibili le interazioni con le molecole di soluto sufficientemente piccole da penetrare nei pori; grosse molecole, quali i polimeri, sono fisicamente impedito ad ogni forma di ritenzione.

IMPACCAMENTI PER LA CROMATOGRAFIA LIQUIDA AD ALTA PRESSIONE.

I miglioramenti ottenuti nell'area degli impaccamenti e nella tecnologia delle colonne cromatografiche sono stati impressionanti negli ultimi anni. Fin dal 1969 si è passati dagli impaccamenti completamente porosi di dimensioni relativamente grandi a quelli pellicolari di 30-50 μ , costituiti da un corpo centrale inerte non poroso ricoperto da una sottile pellicola (1-2 μ) di adsorbente, che permette un trasferimento rapido di solvente e di soluto e genera una migliore efficienza rispetto agli impaccamenti di pari dimensioni completamente porosi (Fig. 3).

Inoltre, la sfericità del supporto consente la preparazione di colonne facilmente impaccabili e con alta riproducibilità. In seguito ai lavori di Van Deemter e Huber, risultò chiaro che la migliore efficienza si aveva con supporti costituiti da particelle « piccole » e totalmente porose e bene impaccate. Comunque, i materiali allora disponibili erano costituiti da particelle con un *range* di dimensioni molto ampio; questo comportava alta pressione di entrata e scarsa efficienza. Nel 1970 la tecnologia ha reso disponibili particelle

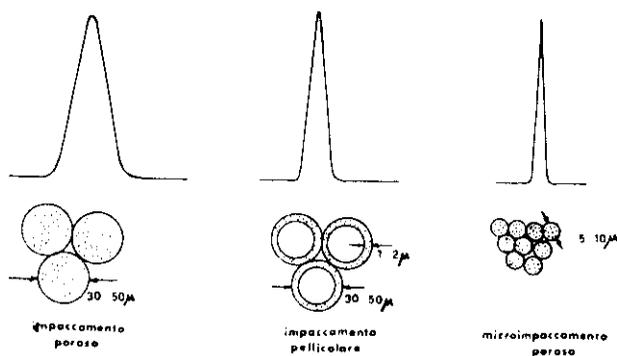


FIG. 3. - Rappresentazione dell'efficienza in funzione del tipo di impaccamento

per L.C. di dimensioni contenute entro un *range* molto più ristretto, ma non si era risolto il problema dell'impaccamento di questi materiali per ottenere colonne ad alta efficienza.

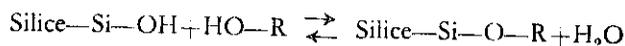
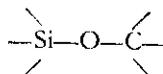
Oggi, invece, sono utilizzabili due metodi principali, che permettono di ottenere colonne ad alta efficienza. Il primo consiste nell'uso di solventi ad alta densità (*balanced density method*), mescolati nelle giuste proporzioni per bilanciare la densità del microimpaccamento; il secondo (*viscosity method*) fa uso di solventi viscosi (glicerina, cicloesano, glicoli polietilenici, ecc.) per tenere le particelle sospese.

Pressioni notevolmente elevate, nell'ordine di 6.000-10.000 p.s.i., sono richieste per spingere la dispersione del supporto nel tubo della colonna cromatografica, per ottenere impaccamenti riproducibili ed elevate efficienze. Comunque, colonne già impaccate sono ora disponibili a prezzi ragionevoli.

Inoltre, per superare i molti problemi associati con la cromatografia liquido-liquido tradizionale, le fasi stazionarie sono state legate chimicamente al supporto, (*bonded phase*), facendo reagire la superficie attiva della silice con opportuni reattivi, per dare materiali cromatografici che hanno le stesse proprietà di quelli già usati nella L.L.C. convenzionale.

I vantaggi delle *bonded phases* sulle fasi depositate fisicamente sul supporto sono evidenti nel campo della stabilità e durata della colonna. Il problema più ovvio in cui si incorre, depositando fisicamente la fase stazionaria sul supporto, è la perdita della fase stazionaria stessa, dovuta all'alta pressione del vapore nella gascromatografia o alla solubilità nella fase mobile in cromatografia liquido-liquido. La fase mobile può dissolvere e asportare meccanicamente la fase stazionaria. Spesso, l'impoverimento della fase stazionaria nella colonna è un problema che insorge rapidamente, provocando un drastico cambiamento nelle condizioni operative tra una cromatografia e l'altra. Una soluzione parziale a questo problema è stata la presaturazione della fase mobile con la fase stazionaria. Questo può portare a migliorare le prestazioni della colonna, anche se non si raggiunge necessariamente l'optimum. Una certa perdita è ancora dovuta a fattori, quali i cambiamenti di temperatura, che influiscono sulla solubilità della fase stazionaria. Le tecniche di presaturazione possono altresì cambiare la natura delle fasi mobili e quindi impedire la separazione.

La stabilizzazione delle condizioni sperimentali nella cromatografia liquida, insieme alle aumentate prestazioni della colonna, può essere raggiunta attraverso le fasi legate chimicamente. Non si deve pensare che le fasi legate siano immuni da problemi di routine, poiché possono essere facilmente alterate o distrutte se non vengono trattate correttamente. Effetti della temperatura, reazioni chimiche, e persino azioni microbiologiche, sono agenti che possono rendere le « fasi legate chimicamente » inefficienti, causando la degradazione della colonna. Due tipi di fasi chimicamente legate hanno trovato larga applicazione: il primo comporta la diretta esterificazione delle funzioni silanoliche della silice con gruppi alcoolici, per formare legami del tipo:



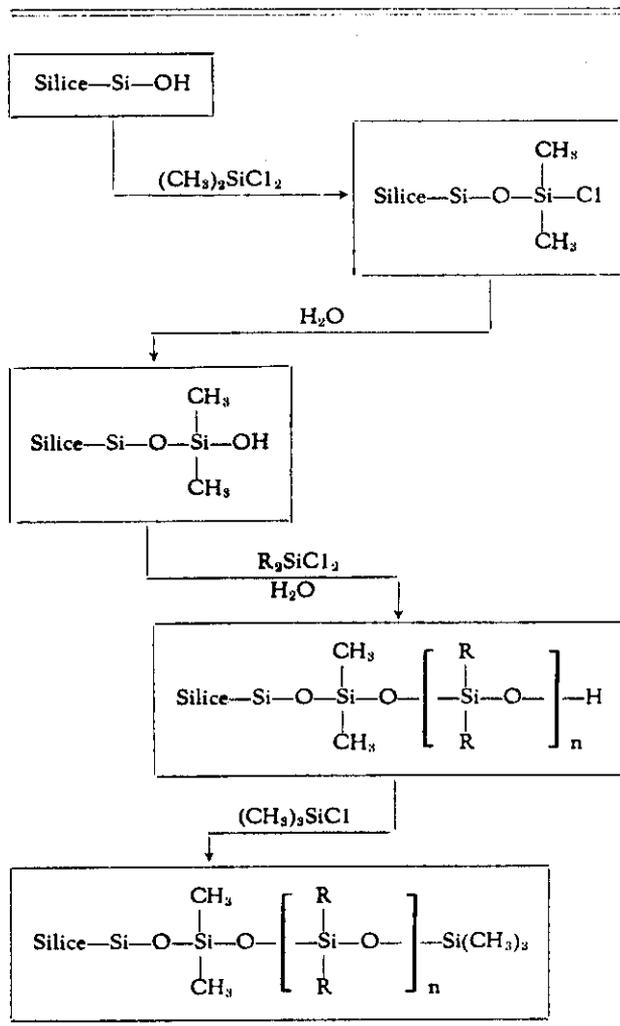
Questi materiali, *brush materials*, sono stati studiati da Halasz [3] sia come applicazioni alla G.C. che alla L.C.

Sfortunatamente, il legame $\begin{array}{c} \diagup \\ \text{Si}-\text{O}-\text{C} \\ \diagdown \end{array}$ è termolabile

e tende a idrolizzarsi facilmente in presenza di MeOH e di H₂O; questa instabilità ne limita pertanto l'uso in particolari condizioni.

Un secondo tipo di fasi legate è quello preparato per silanizzazione degli $\begin{array}{c} \diagup \\ \text{Si}-\text{OH} \\ \diagdown \end{array}$ della superficie della silice [4] (Tab. 1). La procedura dettagliata della preparazione di queste fasi polimeriche è stata descritta da Aue *et al.* [5, 6].

Tabella 1. - Schema della preparazione per silanizzazione delle fasi legate.



È importante notare che il legame $\begin{array}{c} \diagup \\ \text{Si}-\text{O}-\text{Si}-\text{C} \\ \diagdown \end{array}$

è stabile termicamente e presenta, inoltre, resistenza notevole all'idrolisi, per cui si possono usare tranquillamente soluzioni acquose, sia in condizioni acide che basiche (pH 2 ÷ 9).

La Tab. 2 illustra schematicamente le reazioni che hanno luogo tra mono-, di-, e triclorosilani o alcossisilani e gel di silice. Correntemente si ammette che il numero di gruppi -OH accessibili sulla superficie della

silice sia compreso tra 4 e 5 per (Å)² [7]. Per ragioni steriche, soltanto due dei tre gruppi triclورو o triclucosi possono reagire col silanolo della superficie, come descritto in tabella. I gruppi della molecola di organosilano che non hanno reagito possono essere facilmente idrolizzati e dar vita a gruppi ossidrilici, che possono a loro volta reagire con l'eccesso di reagente solo per formare un rivestimento polimerico.

Tali polimeri sono stati utilizzati da Aue *et al.* [5, 6] per ottenere eccellenti separazioni in gas-cromatografia. In cromatografia liquida questi polimeri possono portare al deterioramento della efficienza, a causa della formazione di sacche stagnanti di fase mobile intrappolata. I gruppi ossidrilici liberi possono anche interferire con la separazione cromatografica, a causa dei meccanismi di ritenzione mista. Per prevenire la formazione di gruppi -OH liberi sugli organosilani, nonché dei loro polimeri, la reazione deve avvenire in solventi anidri. L'acqua legata al gel di silice deve essere anch'essa rimossa. L'eliminazione di questi gruppi può essere realizzata mediante successiva silanizzazione.

Le fasi legate più comunemente disponibili sul mercato vengono preparate con silani monofunzionali, bifunzionali, e anche trifunzionali. Di solito, queste fasi sono ulteriormente trattate con clorotrimetilsilano per rimuovere i residui gruppi ossidrilici. Attualmente, alcune case stanno cominciando a preparare fasi da silani monofunzionali.

Una gran varietà di fasi può essere legata al supporto o sintetizzata su di esso, una volta che al supporto sia stato legato un adatto materiale di partenza. Quest'ultimo approccio è stato descritto da Novotny [8]. Le principali fasi legate che oggi sono disponibili in commercio sono riportate nella Tab. 3.

Sebbene siano stati preparati molti tipi di fasi legate, solo poche hanno raggiunto una vasta popolarità. Dopo gli alcani, che saranno trattati successivamente, la fase non polare più comunemente usata è quella fenilica. Per certi sistemi, dove le interazioni $\pi-\pi$ possono essere importanti, separazioni significativamente differenti si possono ottenere con la fase legata fenilica.

Sono state preparate molte fasi a media polarità. Nella gas-cromatografia le fasi legate più note sono i Carbowax (polietilenglicoli), mentre nella cromatografia liquida sono quelle con gruppi cianoalchilici e amminoalchilici. Di queste ultime, la prima è meno polare della seconda, e può essere usata anche in fase inversa. La fase con gruppi « amminici » può agire come un debole scambiatore anionico in soluzioni acquose. Vengono usate anche fasi eterie o poliammidiche, anche se non così di frequente come altre fasi di media polarità. Allorché si abbia bisogno di fasi polari, nonostante siano state preparate fasi stazionarie con gruppi ossidrilici (DIOL), si fa ricorso di frequente all'uso di adsorbenti come il gel di silice.

Sono disponibili fasi legate scambiatrici di ioni, che vengono utilizzate attualmente per analisi di routine.

Kirkland [9] ha illustrato l'uso della fase polieterea nell'H.P.L.C. per la risoluzione di varie miscele: egli ha ottenuto eccellenti risoluzioni e tempi rapidi di analisi di tioldrossammati, di isomeri della fenilendiammina, e fenoli sostituiti. Questo lavoro è significativo perché discute l'effetto di carico di polimeri di vario tipo sulle caratteristiche di ritenzione osservate nel sistema cromatografico. Knox e Vasvari [10] hanno descritto un metodo per la valutazioni delle fasi legate scambiatrici di

Tabella 2. - Schema delle reazioni che hanno luogo tra i clorosilani o alcossisilani e il gel di silice.

Monofunzionale



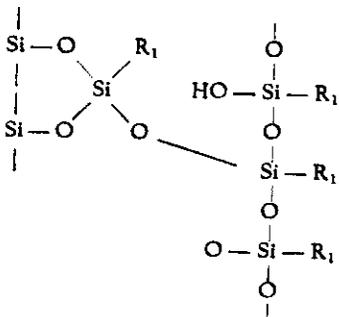
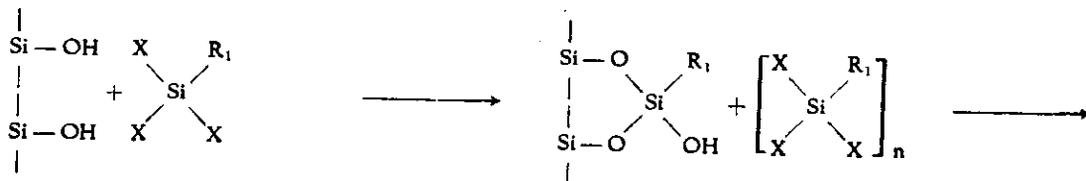
Bifunzionale



Trifunzionale (in solventi anidri)



Trifunzionale (in solventi con tracce di acqua)



X = Cl o OCH₃
R₁ = Supporto organico

Tabella 3. - Principali fasi legate disponibili in commercio e loro polarità.

GRUPPO FUNZIONALE	POLARITÀ
- C ₁₈ H ₃₇	Bassa
- C ₈ H ₁₇	Bassa
- C ₆ H ₅	Bassa
- C ₂ H ₅	Bassa
- (CH ₂) ₃ CN	Intermedia
- CH ₂ CHOHCH ₂ OH	Intermedia
- (CH ₂) ₃ NH ₂	Intermedia
- (CH ₂) ₃ N(CH ₂) ₃ ⁺ I ⁻	Alta
- (CH ₂) ₃ C ₆ H ₄ SO ₃ ⁻ X ⁺	Alta

ioni. Sebbene essi abbiano studiato uno scambiatore anionico, il loro approccio è applicabile anche a scambiatori cationici.

Hartwich e Brown [11] hanno usato fasi legate scambiatrici di anioni per la separazione dei nucleotidi; Schwarzenbach [12] ha utilizzato una fase legata amminopropilica per la separazione di saccaridi; Rabel [13] ha descritto una fase polimerica per H.P.L.C., che possiede molti siti capaci di formare legami idrogeno: la migliore efficacia si ha con soluti che possono formare tali legami. Grushka e Scott [14] hanno tentato di usare dei peptidi legati come fasi per H.P.L.C. Kikta e Grushka [15] hanno dimostrato l'utilità di peptidi legati nelle separazioni di amminoacidi, peptidi e PTH-amminoacidi. Un lavoro recente [16] ha mostrato come dei diastereoisomeri peptidici possano essere separati con tale fase legata.

Una delle applicazioni più stimolanti delle fasi legate si è avuta nella separazione degli enantiomeri otticamente attivi. Dotsavi *et al.* [17] hanno ad esempio utilizzato crown-eteri (otticamente attivi), legati chimicamente, per la risoluzione ottica di amminoacidi e dei loro esteri salificati. Mikes *et al.* [18] hanno separato eliceni racemici mediante agenti complessanti chirali a trasferimento di carica, legati chimicamente al supporto.

IMPACCAMENTI PELLICOLARI E MICROIMPACCAMENTI.

Il fattore importante da tener presente è la differenza di superficie nelle due classi di impaccamenti. Infatti, i microimpaccamenti più comunemente utilizzati hanno una superficie attiva di circa 400 m²/g, contro i 15/30 m²/g degli impaccamenti pellicolari (a). Questa differenza sostanziale si riflette in tutta un'altra serie di differenze che sono riassunte nella Tab. 4.

Tabella 4. - Confronto tra le più significative caratteristiche dei microimpaccamenti e degli impaccamenti pellicolari.

MICROIMPACCAMENTI	IMPACCAMENTI PELLICOLARI
Alta superficie (350m ² /g)	Basse superfici (15 m ² /g)
Impaccamento difficile	Impaccamento facile
Elevata capacità (lavori preparativi)	Bassa capacità (solo scopi analitici)
Alta efficienza (40.000 piatti/m, 10μ)	Efficienza moderata (1.000 piatti/m, 32-50 μ)
Scopi ristretti in condizioni isocratiche	Larghi scopi in condizioni isocratiche

I microimpaccamenti presentano un'alta capacità e sono, pertanto, raccomandati in lavori di tipo preparativo, mentre quelli pellicolari sono indicati solo per scopi analitici. Inoltre, quando i primi sono usati in condizioni isocratiche, i componenti del campione in esame che hanno un'alta polarità saranno molto ritenuti. Le colonne pellicolari, invece, con le loro superfici ridotte, fanno eluire i componenti più rapidamente in condizioni isocratiche e, pertanto, possono essere usate nelle indagini preliminari su campioni incogniti.

SCelta DEL MECCANISMO DI SEPARAZIONE.

Un altro problema che deve essere affrontato dall'analista è quello della scelta del metodo di separazione da seguire. In genere, con un dato tipo di colonna, predomina uno dei quattro modi fondamentali di separazione riportati precedentemente.

(a) È bene ricordare che esistono anche microimpaccamenti con superfici di pochi m²/g, per cui la suddetta divisione è solo di comodo.

Comunque, vi sono spesso associati contributi da parte degli altri meccanismi: per es., con una colonna di silice il meccanismo di separazione predominante è quello di adsorbimento, ma, quando si usano miscele di solventi come eluente, non sono da escludere meccanismi di ripartizione; per questo in una analisi è difficile determinare l'esatto meccanismo di separazione.

Dalle considerazioni di carattere generale sulle proprietà del campione si giunge ad una logica scelta per la selezione del meccanismo di separazione ideale.

CROMATOGRAFIA DI ADSORBIMENTO.

La cromatografia liquido-solido viene generalmente utilizzata per la separazione di composti aventi diverse polarità.

In generale, se una molecola presenta più di un gruppo funzionale, il più polare ha il maggior peso nel determinare il fattore di capacità (K'), che è legato al tempo di eluizione del composto. Per questa ragione, nella cromatografia di adsorbimento le separazioni avvengono in funzione delle classi di composti. Il meccanismo di separazione è schematizzato in Fig. 4.

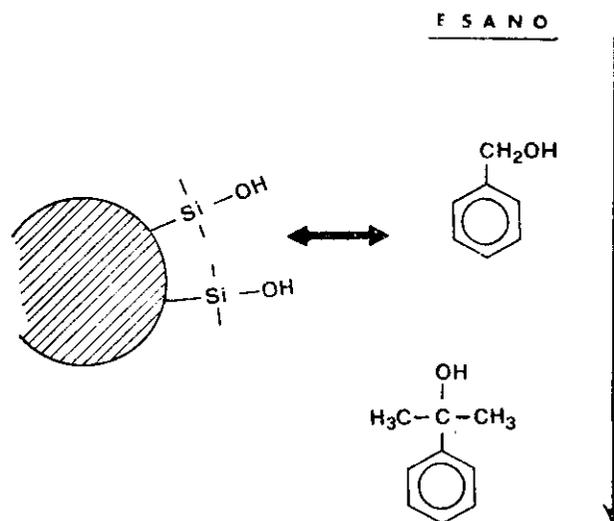


FIG. 4. - Schematizzazione del meccanismo di separazione mediante adsorbimento

In genere, la T.L.C. può essere un test preliminare della applicabilità delle colonne di adsorbimento ad un determinato problema. Normalmente, i risultati della T.L.C. non sono direttamente trasferibili alla L.C. su colonna, ma ultimamente sono apparse in commercio delle lastre H.P.T.L.C. (High Performance Thin Layer Chromatography) preparate con lo stesso materiale delle colonne cromatografiche. In quest'ultimo caso i risultati possono essere trasferiti alla L.C. su colonna. Bisogna tuttavia tener presente che, a differenza della H.P.L.C., in cui ci si trova sempre in condizioni di equilibrio, nella T.L.C. l'eluizione avviene quasi sempre in condizioni di non equilibrio, specialmente se l'eluente è una miscela di solventi con pronunciate differenze di polarità.

Le caratteristiche di efficienza di queste lastre sono riportate nella Tab. 5.

Tabella 5. - Caratteristiche di efficienza delle lastre H.P.T.L.C.

Migrazione dell'eluente ZF (in mm)	20	30	40	50	60
Numero di piatti teorici N°	950	1.850	2.650	3.100	3.450

Risulta dalla tabella che già sviluppando su 30-60 mm si ottengono ottimi risultati.

La T.L.C. è una tecnica semplice, rapida ed economica, che permette di determinare la natura e la composizione approssimativa del sistema eluente da utilizzare, e di verificare che il solvente scelto non dia luogo a fenomeni di demiscelazione.

CROMATOGRAFIA DI RIPARTIZIONE.

In questo tipo di cromatografia la fase stazionaria è supportata fisicamente su materiale poroso e deve essere immiscibile con la fase mobile. Il meccanismo di separazione è riprodotto in Fig. 5.

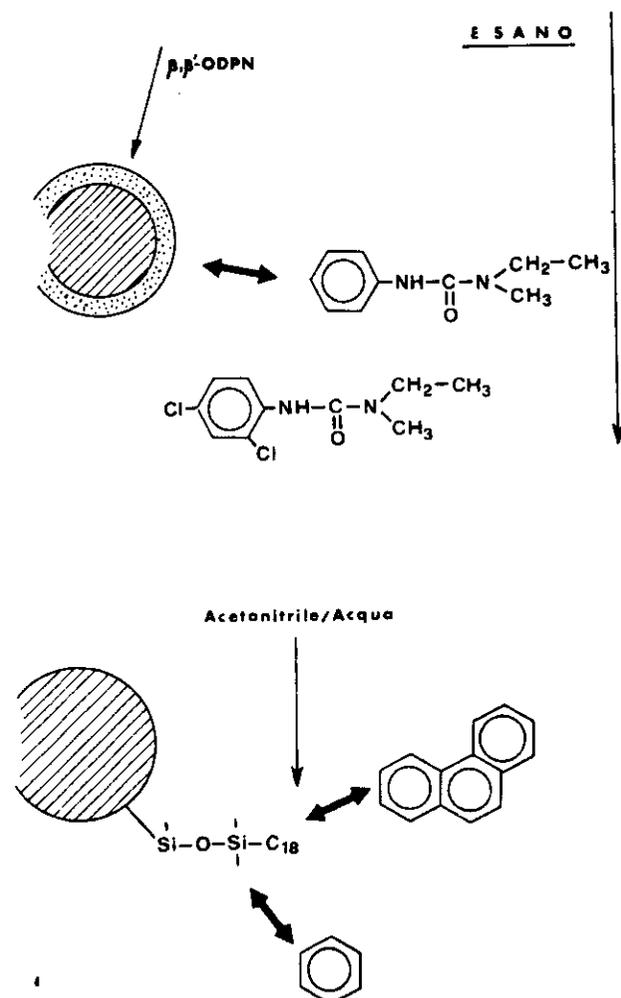


Fig. 5. - Schematizzazioni del meccanismo di separazione mediante distribuzione tra fasi. In alto: fase fissa assorbita fisicamente; in basso: fase fissa legata chimicamente

La cromatografia di ripartizione liquido-liquido è più indicata per separazioni di composti aventi diverse solubilità (serie omologhe). Comunque, con l'uso delle *bonded phases* sono molto spesso coinvolti fenomeni di adsorbimento nel meccanismo di separazione e si ha quindi un *overlap* con la cromatografia di adsorbimento.

Nel caso di fasi legate lipofile (C₂, C₈, C₁₂, ecc.), l'ordine di eluizione in genere è inverso rispetto a quello della cromatografia in fase normale e si parla, pertanto, di cromatografia liquida in fase inversa. La fase mobile è polare o molto polare ed è costituita da una miscela di H₂O con solventi miscibili in H₂O (MeOH, CH₃CN, THF, ecc.).

Lavori intesi a far luce sul meccanismo di ritenzione sulle fasi alchiliche legate sono stati effettuati in G.C. [19, 20] e, più estesamente, in H.P.L.C. [22-25]. I dati più recenti in G.C. sembrano indicare che i soluti non polari interagiscono principalmente coi gruppi alchilici legati, e la ritenzione sembra essere dovuta ad adsorbimento sulla fase legata [26]. Senza dubbio, i gruppi -OH di superficie che non hanno reagito possono influenzare il comportamento cromatografico dei soluti [27]. Importanti variazioni nei meccanismi di ritenzione possono essere dovute al fatto che si stia usando una fase a *brush* o una fase polimerica, ed alla entità della superficie coperta.

La cromatografia liquida presenta un caso molto più complesso, perché la fase mobile gioca un ruolo attivo nel processo cromatografico e le interazioni soluto-fase mobile devono essere considerate in sovrapposizione alle interazioni con i gruppi alchilici legati. I più recenti lavori sulla cromatografia a fase inversa sembrano indicare che, oltre alla disattivazione della superficie da parte dei gruppi alchilici, anche effetti idrofobici sono implicati nelle separazioni e nelle selettività. L'associazione reversibile dei soluti con le fasi alchiliche legate è responsabile del tempo di ritenzione dei soluti. Questa associazione è funzione della natura della fase mobile e della sua forma ionica.

In cromatografia liquida, il termine « cromatografia a fase inversa » è usato per le fasi alchiliche legate, dato che, come fasi mobili, vengono usate miscele acquose. La fase alchilica legata di uso più frequente è l'ottadecilsilano (ODS), sebbene catene idrocarburiche più corte siano attualmente reperibili sul mercato. Per soluti contenenti significativi residui alchilici, come gli acidi grassi, il tempo di ritenzione è chiaramente correlato alla lunghezza della catena. Esempi simili sono riportati da Hastings *et al.* [28], che hanno separato *n*-idrocarburi usando una fase poliottadecilsilanicca su Chromosorb G.

Nella R.P.L.C. (cromatografia liquida a fase inversa), la fase stazionaria (tipicamente idrocarburica) è meno polare della fase mobile. Le sostanze vengono così eluite in un ordine generale di polarità decrescente, e la forza della fase mobile aumenta proporzionalmente al decrescere della polarità (così l'acetonitrile è un solvente più forte dell'acqua).

Già una significativa maggioranza delle separazioni biochimiche per L.C. sono realizzate per mezzo della R.P.L.C., usando fasi stazionarie legate e fasi mobili acqua/solvente organico [29, 30]. Le fasi legate sono, come già detto in precedenza, preparate per reazione di appropriati cloro- o alcossilani con gel di silice completamente ossidrilato.

Per ragioni steriche [7], non tutti i gruppi silanologici possono reagire: infatti, a causa della lunghezza delle catene di R, solo il 45% verrà legato. La superficie del gel consisterà quindi in un misto di catene idrofobiche e di gruppi silanologici che possono essere rimossi mediante trattamento con trimetilclorosilano, piccolo agente silanizzante. Come risultato della reazione di legame, una superficie idrofila è convertita in una sostanzialmente idrofoba, consistente in uno strato idrocarburico.

I materiali commerciali sono tipicamente composti di etile, ottile, o ottadecile (ODS); si possono usare catene di varia lunghezza: da C_{22} a C_2 .

Da un punto di vista di trasferimento di massa, uno strato monomero composto di *bristles* di catene alchiliche è in genere da preferire ad uno strato polimerico, che può rigonfiarsi e impedire la penetrazione delle molecole, provocando una bassa diffusione [14, 33, 49]. Perciò, la reazione con i monoclorosilani è preferita a quella con gli analoghi dicloro e triclorosilani, dato che non può avvenire alcuna polimerizzazione. Inoltre, reazioni incomplete con gli analoghi dicloro- e tricloro- provocano la formazione di gruppi silanologici per idrolisi di silanoli che non hanno reagito [7]. Il ruolo della lunghezza della catena n-alchilica nella separazione non è, al momento, completamente chiarito. Comunque, in generale, le ritenzioni aumentano con la lunghezza della catena [30, 31] ed anche la capacità della colonna aumenta all'aumentare della lunghezza della catena. Relativamente alla selettività, sembrano esserci delle differenze dovute alla lunghezza della catena [32]; comunque, in generale, le differenze non sono così marcate come quelle dei tempi di ritenzione. Invero, il controllo della selettività mediante modificazioni della fase mobile sembra essere il tipo di approccio adottato dalla maggior parte dei ricercatori.

La Tab. 6 riassume le caratteristiche positive e le limitazioni della R.P.L.C., in particolare le loro rela-

zioni con la cromatografia liquida nel campo di applicazione biofarmaceutica.

Molecole di soluto, che hanno gruppi polari e che interagiscono più fortemente con l'eluente polare, sono meno trattenute rispetto a composti affini privi di sostituenti polari. La ionizzazione di soluti appropriati, attraverso la regolazione del pH dell'eluente, conduce ad un brusco aumento della loro interazione elettrostatica con l'eluente acquoso e ad una diminuzione concomitante della ritenzione cromatografica. D'altra parte, la rimozione della carica elettrica dai soluti per mezzo del controllo del pH o la formazione di complessi aumenta la ritenzione.

CROMATOGRAFIA A SCAMBIO IONICO.

La scelta dello scambio ionico come meccanismo di separazione dipende dalla presenza di gruppi ionici nella molecola. In genere composti non ionici non vengono ritenuti, mentre quelli che hanno ioni con diverse affinità per la resina possono essere separati. Lo schema del meccanismo di separazione è riportato in Fig. 6.

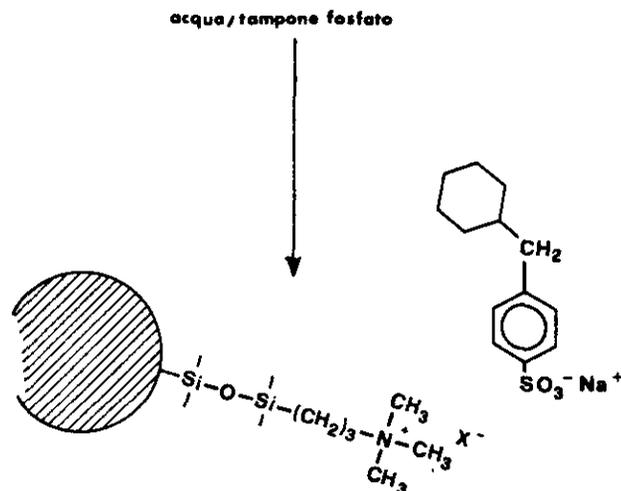


FIG. 6. - Schematizzazione del meccanismo di separazione mediante scambio ionico

Tabella 6. - Vantaggi, svantaggi e limitazioni nella R.P.L.C.

Vantaggi:

- 1) Fase mobile parzialmente o completamente acquosa; compatibilità con le sostanze biologiche, semplicità operativa, equilibri chimici selettivi, speciali metodiche di rivelazione.
- 2) Deboli energie superficiali delle fasi alchiliche legate: analisi rapide, rapidi scambi della fase mobile, arricchimenti di tracce.
- 3) Colonne ad alte prestazioni: efficienza, selettività.
- 4) Strumento per caratterizzazioni fisico-chimiche: idrofobicità, equilibri di complessazione, determinazioni di purezza.

Svantaggi:

- 1) Relativamente limitato intervallo di pH delle fasi legate (2-7,5).
- 2) Presenza di gruppi silanologici attivi che non hanno reagito: ritenzione di sostanze basiche.
- 3) Incompleta comprensione del meccanismo di ritenzione.
- 4) Insufficienza delle attuali colonne commerciali: stabilità, riproducibilità della ritenzione e della selettività, efficienza della colonna.

PAIRED ION CHROMATOGRAPHY - « P.I.C. ».

Una variante della cromatografia liquida è stata recentemente sviluppata per risolvere problemi tradizionalmente associati con campioni contenenti specie ioniche: si tratta della *Paired Ion Chromatography* (P.I.C.).

Lo sviluppo della cromatografia a coppia ionica viene generalmente attribuito a G. Schill e ai suoi collaboratori [34-39], che per la prima volta hanno applicato le tecniche estrattive a coppia ionica alla moderna cromatografia liquida. Essi osservarono che colonne di silice o di cellulosa possono essere ricoperte con un reagente capace di formare coppie ioniche e che, usando fasi mobili relativamente non polari, si possono ottenere delle separazioni di ottimo livello di specie ioniche.

Successivamente, altri hanno sviluppato questa tecnica [40-45], dimostrandone la versatilità nella separazione di vari tipi di composti (ammine biogene, farmaci, metaboliti, coloranti, acidi carbossilici, ecc.).

La P.I.C. impiega un «contro-ione organico» nella fase mobile, che entra in un complesso equilibrio con le specie presenti nel campione; le specie risultanti possono essere facilmente cromatografate per H.P.L.C. in fase inversa.

Usando la P.I.C., invece della tradizionale *Ion Exchange Chromatography*, si possono evitare i problemi connessi al preciso controllo del pH e si avrà una maggiore durata della colonna. Inoltre, mediante la P.I.C. si possono determinare contemporaneamente composti neutri e ionici, cosa molto difficile e spesso impossibile con la cromatografia a scambio ionico.

Le teorie di base della P.I.C. sono state discusse da Schill [36]. Tuttavia, malgrado esse siano state ampiamente confermate, il meccanismo della P.I.C. non è stato finora completamente chiarito. Allo scopo di comprendere alcuni fatti sperimentali, sono stati proposti vari modelli, di cui qui si riportano soltanto due fondamentali. Nel primo, si postula che la molecola di soluto formi una coppia ionica con il contro-ione nella fase mobile; questa coppia ionica neutra si ripartisce quindi tra le fasi. Nel secondo meccanismo si postula che il contro-ione, ripartitosi nella fase stazionaria, vi si fissa orientando il gruppo ionico verso la superficie: la colonna si comporta quindi come una colonna a scambio ionico.

Nella realtà, il meccanismo reale comporta sicuramente ambedue i postulati, ma è reso probabilmente più complesso dall'adsorbimento, dalla formazione di micelle e dalla formazione di complessi, sia del soluto che del reattivo a coppia ionica. In ogni caso, il modello con la formazione della coppia ionica nella fase mobile è concettualmente di più semplice comprensione, e viene riportato in Fig. 7.

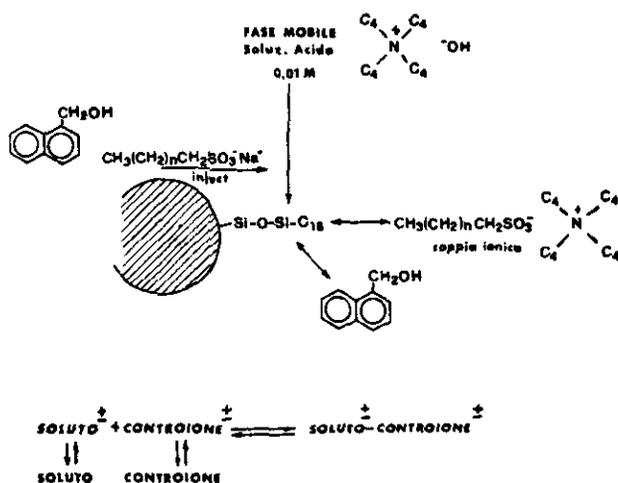


FIG. 7. - Schematizzazione del meccanismo di separazione mediante coppia ionica

Vi sono molti fattori che entrano in gioco in una R.P.-P.I.C.; la Tab. 7 descrive il ruolo di ognuno di essi.

Considerato il numero piuttosto elevato di parametri necessari per operare una separazione, risulta piuttosto difficile selezionare un punto di partenza per uno studio.

Con campioni contenenti composti debolmente o fortemente ritenuti, è spesso necessario usare l'eluizione con gradiente. Nella R.P.-P.I.C., se si vuole

Tabella 7. - Variabili presenti in una separazione R.P.-P.I.C.

VARIABILE	EFFETTO
Tipo di «contro-ione»	Maggiore sarà l'abilità di formare coppie ioniche, più lunga sarà la ritenzione.
Grandezza del «contro-ione»	Un aumento di grandezza del «contro-ione» porterà ad un aumento della ritenzione.
Concentrazione del «contro-ione»	Un aumento della concentrazione provoca un aumento della ritenzione fino ad un certo limite.
pH	L'effetto dipende dalla natura del soluto. La ritenzione aumenta quando il pH porta al valore massimo la concentrazione della forma ionica del soluto.
Tipo di modificatore organico	La ritenzione diminuisce con l'aumento della lipofilia.
Temperatura	La ritenzione diminuisce con l'aumento della temperatura.
Concentrazione del modificatore organico	La ritenzione diminuisce con l'aumento della concentrazione.
Fase stazionaria	La ritenzione aumenta con l'aumento della lipofilia e col grado di ricopertura.

operare su gradiente, può essere necessario modificare i seguenti parametri:

1) variazione del carattere lipofilo del «contro-ione» (ad es. mediante l'uso di «contro-ioni» misti): diminuendo la lipofilia del «contro-ione» diminuirà la ritenzione (Figg. 7, 8, 9);

2) concentrazione del «contro-ione»: diminuendola si avrà una diminuzione della ritenzione (Figg. 9, 10);

3) pH: una diminuzione del grado di ionizzazione diminuirà la ritenzione;

4) concentrazione del modificatore organico: un aumento della concentrazione organica abbassa la ritenzione.

In pratica, solo i parametri 1, 2 e 4 sono stati usati, ma il punto 4 è il più noto per la sua somiglianza alle normali tecniche R.P. La cromatografia in fase inversa (R.P.C.) su fasi legate è attualmente una tecnica molto nota e la sua versatilità nella separazione di un gran numero di soluti polari e non polari è stata ampiamente dimostrata. Se tutte le variabili, ad esclusione della concentrazione del modificatore organico, vengono controllate, la separazione a coppia ionica può essere considerata come una separazione in fase inversa, ad es.: eluizione in ordine decrescente di «polarità» della coppia ionica.

Il controllo del pH è un fattore molto importante, in quanto determina la concentrazione della forma ionica del soluto. Ovviamente, se si desidera una maggiore

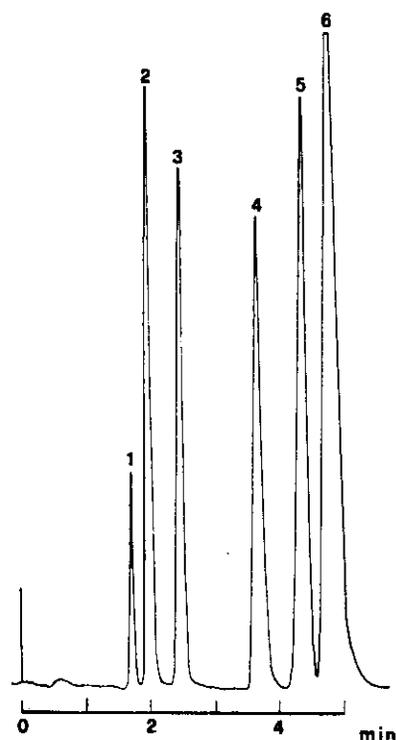


FIG. 8. - Colonna: μ Bondapak C_{18} , 4 mm ID \times 30 cm; eluente: metanolo/acqua con 0,005 M ac. pentansolfonico e 1% ac. acetico 50/50; flusso: 2 ml/min; det.: UV 254 nm a 0,1 AUFS. Picchi: 1) ac. maleico, 2) fenilefrina, 3) fenilpropanolammina, 4) nafazolina, 5) fenacetina, 6) pirlammina (Dal manuale "Liquid Chromatography School" della Millipore-Divisione Waters)

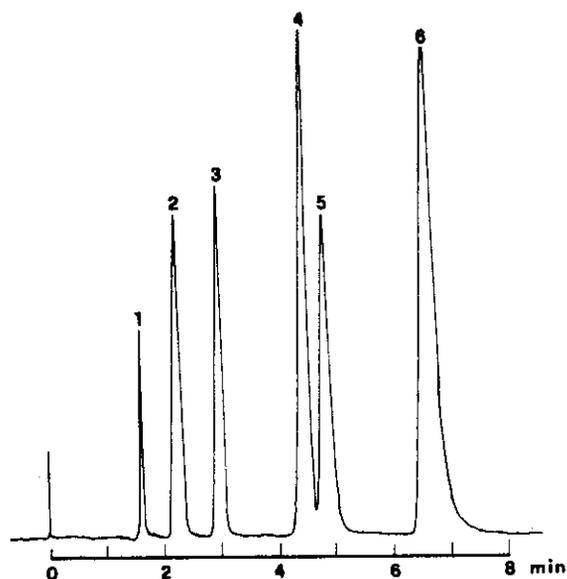


FIG. 9. - Colonna: μ Bondapak C_{18} , 4 mm ID \times 30 cm; eluente: metanolo/acqua con 0,005 M ac. esansolfonico e 1% ac. acetico 50/50; flusso: 2 ml/min; det.: UV 254 nm a 0,1 AUFS. Picchi: 1) ac. maleico, 2) fenilefrina-HCl 12,5 μ g, 3) fenilpropanolammina-HCl 25 μ g, 4) fenacetina, 5) nafazolina-HCl 2,5 μ g, 6) pirlammina maleato 2,5 μ g (Dal manuale "Liquid Chromatography School" della Millipore-Divisione Waters)

ritenzione, bisogna ottenere la massima ionizzazione. Per quanto riguarda i solventi, come nel caso dell'R.P., le combinazioni piú comunemente usate sono $H_2O/MeOH$ e H_2O/CH_3CN . La maggiore limitazione è costituita dalla solubilità del reattivo a coppia ionica.

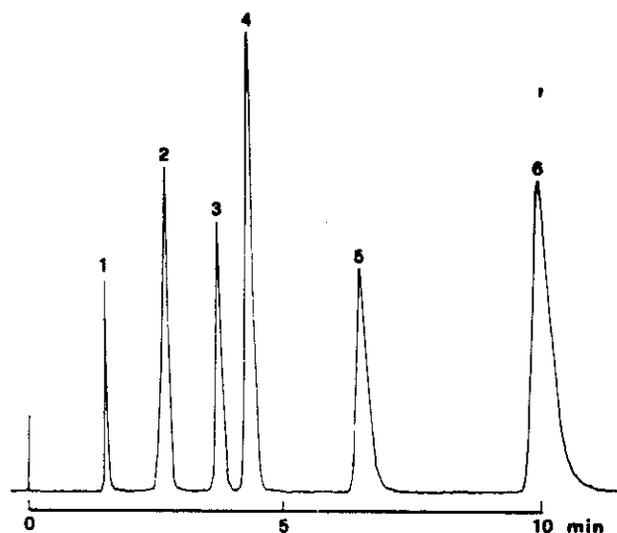


FIG. 10. - Colonna: μ Bondapak C_{18} , 4 mm ID \times 30 cm; eluente: metanolo/acqua con 0,005 M P.I.C. Reagent B-7 50/50; flusso: 2 ml/min; det.: UV 254 nm a 0,1 AUFS. Picchi: 1) ac. maleico, 2) fenilefrina, 3) fenilpropanolammina, 4) fenacetina, 5) nafazolina, 6) pirlammina (Dal manuale "Liquid Chromatography School" della Millipore-Divisione Waters)

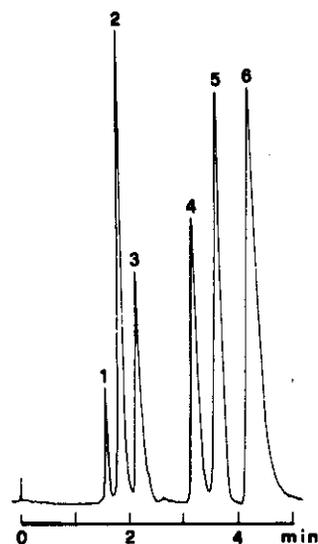


FIG. 11. - Colonna: μ Bondapak C_{18} , 4 mm ID \times 30 cm; eluente: metanolo/acqua con 0,001 M P.I.C. Reagent B-7 50/50; flusso: 2 ml/min; det.: UV 254 nm a 0,2 e 0,02 AUFS. Picchi: 1) ac. maleico, 2) fenilefrina, 3) fenilpropanolammina, 4) nafazolina, 5) fenacetina, 6) pirlammina (Dal manuale "Liquid Chromatography School" della Millipore-Divisione Waters)

La Tab. 8 riporta i diversi tipi di contro-ioni e le loro applicazioni.

Per quanto concerne le colonne, sono stati usati gli impaccamenti in fase inversa con gruppi alchilici a C_2 , C_8 , e C_{18} [38, 39, 44, 45]; la lunghezza del gruppo alchilico può essere o non essere un parametro importante, dato che il meccanismo di separazione può variare con la lunghezza del gruppo alchilico. L'adsorbimento può giocare un ruolo importante. Un rendimento e una durata ottimali vengono ottenuti in un range di ph da 2 a 7,4.

Tabella 8. - Vari tipi di contro-ioni e relative applicazioni.

TIPO	APPLICAZIONE PRINCIPALE
Ammine quaternarie: ad es. ioni tetrametil-, tetrabutil-, palmitil-, trimetilammonio.	Con acidi forti e deboli. Pigmenti solfonati, acidi carbossilici.
Ammine terziarie (ad es. triottilammina).	Solfonati.
Alchil- e aril-solfonati, ad es. metan- ed etan-solfonato, acido canforsolfonico.	Con basi forti e deboli. Sali di benzalconio, catecolamine.
Acido perclorico.	Forma coppie ioniche molto forti con un'ampia serie di soluti basici.
Alchilsolfati; laurilsolfato.	Simile agli acidi solfonici: presenta diversi tipi di selettività.

CROMATOGRAFIA AD ESCLUSIONE MOLECOLARE.

La cromatografia ad esclusione molecolare è un'altra forma di cromatografia liquida, che utilizza supporti a porosità controllata per separare i materiali in base alle dimensioni. Lo schema del meccanismo di separazione è riportato in Fig. 12. Le molecole piccole possono penetrare nel supporto poroso e saranno ritardate rispetto a quelle grandi.

Si parla in genere di *gel permeation* e *gel filtration*: il primo termine è generalmente riferito a separazioni che usano acqua come eluente, mentre il secondo è riservato ai solventi organici, pur restando lo stesso il processo di separazione.

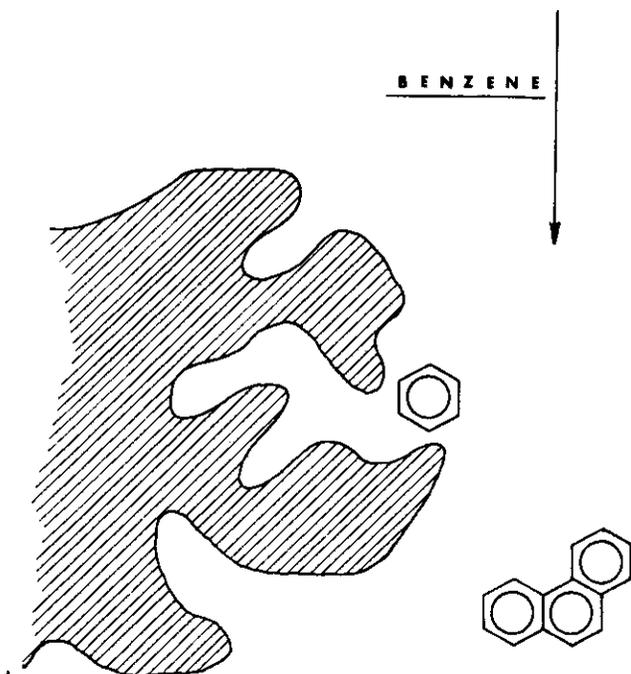


Fig. 12. - Schematizzazione del meccanismo di separazione mediante esclusione sterica

Il grado di ritenzione dipende dalle dimensioni delle molecole di soluto in soluzione, rispetto alle dimensioni dei pori del supporto: infatti, le molecole molto piccole riusciranno a permeare tutti i pori, le molecole di dimensioni intermedie soltanto una parte di essi, mentre quelle molto grandi saranno completamente escluse. Pertanto, in un meccanismo di esclusione puro le molecole più grandi eluiscono prima di quelle più piccole.

H.P.L.C. QUANTITATIVA.

La cromatografia liquida ad alta risoluzione si presta molto bene per analisi quantitative, in quanto i rivelatori usati hanno risposte lineari verso le concentrazioni.

I parametri che vengono usati sono le altezze e le aree dei picchi. Il secondo metodo è più accurato, in quanto richiede un minore controllo delle condizioni sperimentali; quando si usa un normale registratore è preferibile usare il primo metodo, in quanto l'altezza dei picchi è facilmente e direttamente ricavabile dal cromatogramma.

L'area dei picchi si può misurare con i seguenti metodi:

- triangolazione;
- pesata del picco;
- planimetro;
- integrazione elettronica.

Il metodo dell'integrazione elettronica è largamente applicato, in quanto permette di ottenere una elevata precisione nelle misure (0,2 % di errore).

H.P.L.C. PREPARATIVA.

La cromatografia liquida ad alta pressione consente di operare su elevate quantità di campione e le frazioni separate possono essere facilmente raccolte. La tecnica può essere usata sia per scopi di identificazione che per la preparazione di quantità relativamente grandi di composti puri. È bene ricordare che in lavori preparativi sono indicati soltanto i supporti completamente porosi ad alta superficie.

Come regola generale, la massima quantità che si può cromatografare su una colonna non può superare il 5 % del peso dell'impaccamento; questo significa che in una colonna della lunghezza di un metro e del diametro di 7 mm, che contiene circa 25 g di impaccamento, non si può applicare più di 1,25 g di campione per iniezione. La quantità da iniettare varia notevolmente da caso a caso a seconda della complessità del problema da risolvere. Il rivelatore gioca un ruolo molto importante nella H.P.L.C. preparativa: il rifrattometro differenziale (rivelatore universale) è particolarmente indicato per lavori preparativi in quanto, essendo meno sensibile del rivelatore U.V., si satura meno facilmente. Lo scopo principale è quello di ottenere la maggior quantità di prodotto puro nel minor tempo possibile; viene chiamato *throughput* la quantità di campione purificato per unità di tempo. Il termine « purezza » è relativo e puramente arbitrario; è inoltre

LE PRINCIPALI FASI DI UNA SEPARAZIONE
SU COLONNA UTILIZZANTE IL PRINCIPIO
DELLA COMPRESIONE ASSIALE

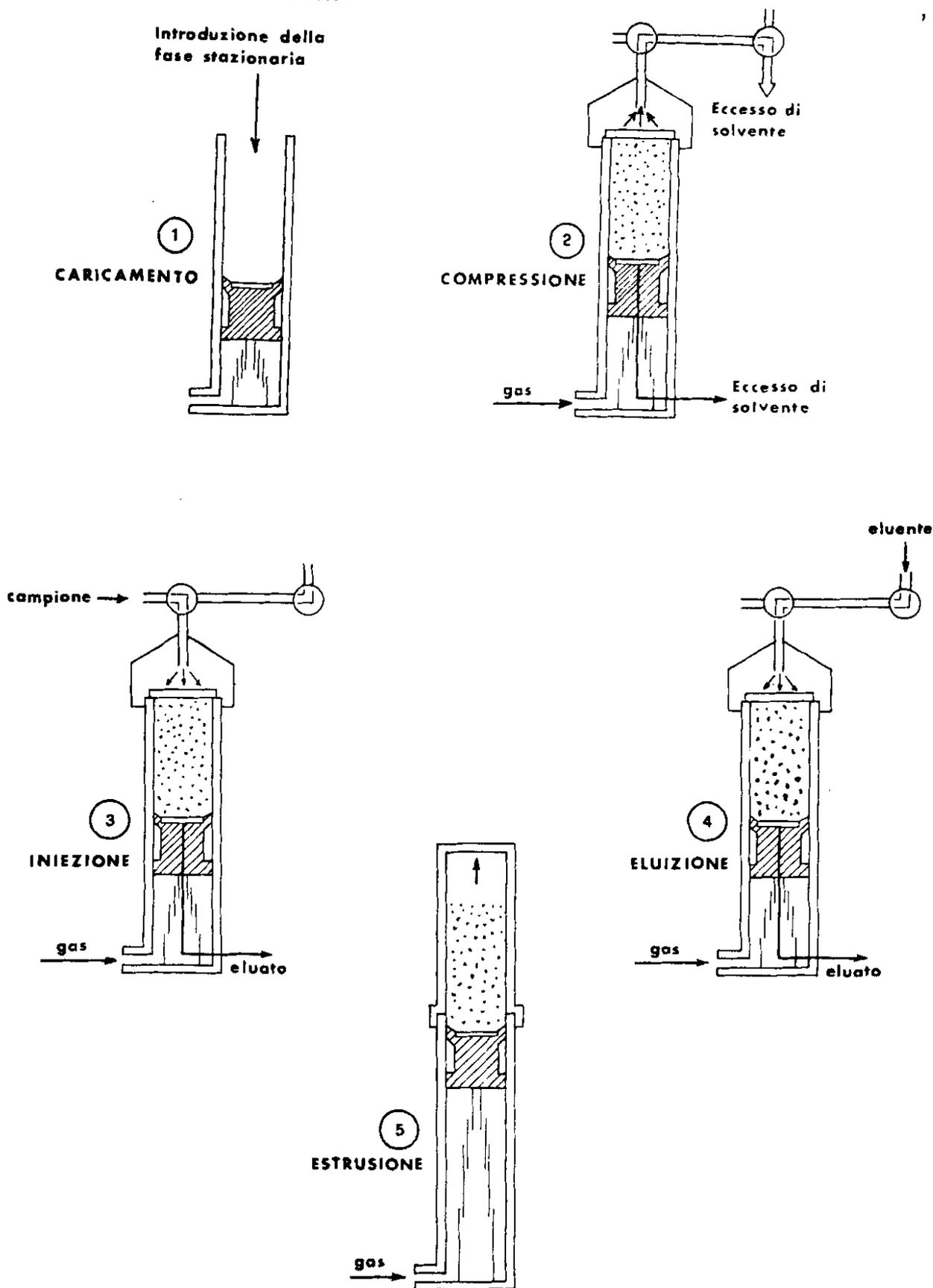


FIG. 13. - Principali fasi operative per separazioni utilizzando colonne a compressione assiale (Dal manuale "Preparative High Performance Liquid Chromatography", di A. Dugois, L. Charles e S. Montastier, della Jobin-Yvon)

importante nella L.C. preparativa, quando si valuta il *throughput*, considerare il *load*, cioè l'ammontare del campione grezzo cromatografato in un singolo passaggio su colonna. Il *load* deve essere ottimizzato per ottenere il massimo livello di *throughput*.

Lo scopo principale della cromatografia in fase liquida preparativa è la separazione dei componenti di miscele, ma anche:

- concentrazione dei prodotti in quantità sufficienti a permetterne l'identificazione;
- produzione, su scala industriale, dei prodotti di interesse commerciale (oli essenziali, coloranti, medicinali, molecole molto complesse, ecc.);
- miglioramento delle ricerche di sintesi organica;
- realizzazione delle sperimentazioni in farmacodinamica e biologia;
- misura molto accurata delle attività specifiche.

Tenuto conto dei diversi aspetti insiti nella problematica precitata, in particolare delle differenti quantità di campione messe in gioco, si può senz'altro compilare la Tab. 9, che può servire ad indirizzare nella scelta dello strumento più idoneo. Le tecniche utiliz-

Tabella 9. - Tipo di apparecchiatura in funzione della quantità di campione da separare.

QUANTITÀ DI CAMPIONE	TIPO DI APPARECCHIO
10 mg	Apparecchi analitici.
Da 10 mg a 100 mg ..	Apparecchi analitici attrezzati con componenti idonei allo scopo (iniettore, colonne).
Da 1 mg ad 1 g	Minipreparativi.
Da 10 mg a 10 g	Chromatospac Prep 10 o Waters Prep 500 (1 cartuccia).
Da 500 mg a 70 g ...	Chromatospac Prep 100 o Waters Prep 500 (2 cartucce).
Da 70 mg/h a oltre 100 g/h	Prepamatic.

zate oggi in L.C. preparativa, nel montaggio delle colonne ad alta efficienza, sono essenzialmente due: compressione assiale (Fig. 13) e compressione radiale (Fig. 14).

Le problematiche della L.C. preparativa possono riportarsi a tre casi principali illustrati dalle Figg. 15-18.

L'approccio ad una separazione preparativa, qualunque sia il problema pratico, consiste nell'ottimizzazione dell' α (fattore di selettività) su scala analitica, A.L.C. (*Analytical Liquid Chromatography*) o T.L.C., e nel trasferire le condizioni a livello preparativo.

TRATTAMENTO DEL CAMPIONE.

L'analisi dei prodotti si presenta molto spesso abbastanza difficile per la complessità della matrice in cui si trovano le sostanze da determinare, per cui si rendono necessarie delle operazioni preliminari nel cam-

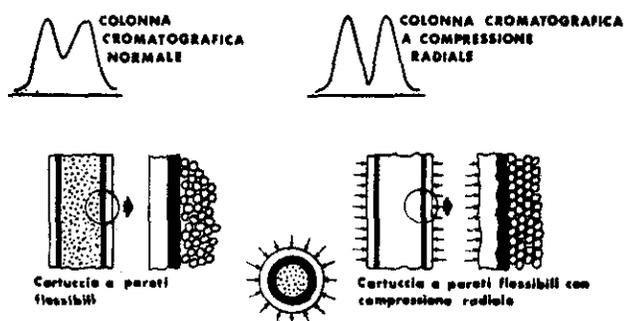


FIG. 14. - Principio della compressione radiale (Dal manuale "Liquid Chromatography School" della Millipore-Divisione Waters)

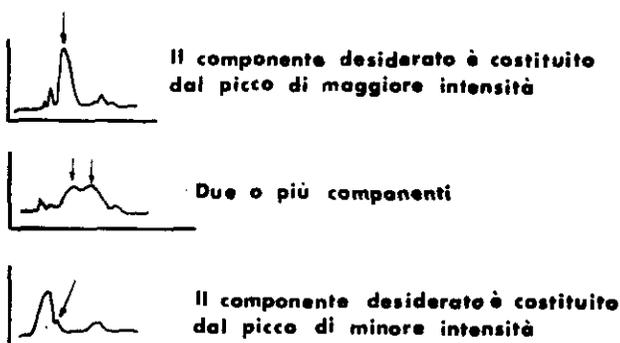


FIG. 15. - Principali casi che si presentano all'atto di eseguire una separazione preparativa

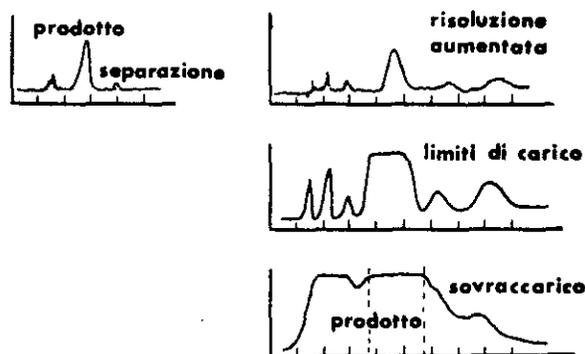


FIG. 16. - Si cerca di migliorare la risoluzione, modificando il tenore in solvente di maggiore polarità, in modo da poter iniettare quantità rilevanti di prodotto

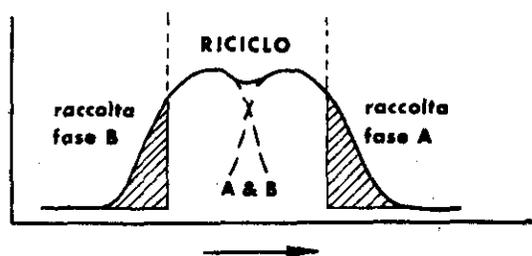


FIG. 17. - Se la risoluzione necessaria non viene raggiunta, qualunque sia il sistema solvente, e i due prodotti rimangono separati, è necessario aumentare la lunghezza della colonna ed operare in riciclo.

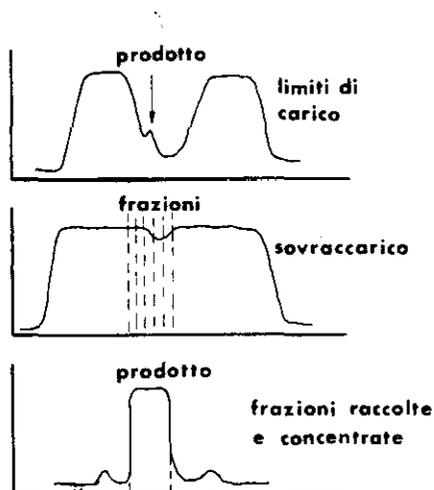


FIG. 18. - Bisogna arricchire in impurezze, per cui, come nel caso della Fig. 16, va ricercata la risoluzione ottimale

pione prima di passare all'H.P.L.C. Queste operazioni sono riassunte di seguito:

- 1) purificazione del campione;
- 2) arricchimento di tracce;
- 3) analisi di matrici complesse.

Alcuni di questi problemi possono essere facilmente risolti utilizzando opportune cartucce, costituite da materiali analoghi a quelli delle colonne cromatografiche (ad es. silice normale, silice C_{18} , ecc.), come risulta dagli esempi di seguito riportati nelle Figg. 19 e 20.

Queste cartucce, se usate in modo opportuno, possono essere impiegate anche per concentrare il composto qualora fosse presente in piccolissime quantità (Fig. 21).

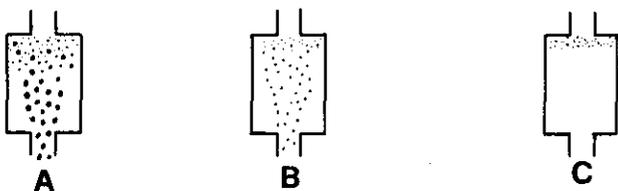


FIG. 19. - Strategia della preparazione del campione mediante cartuccia C_{18} . A: eliminazione dei composti polari; B: rimozione del composto di interesse; C: composti poco polari che rimangono nella cartuccia

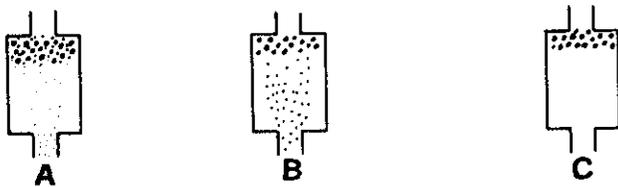


FIG. 20. - Strategia della preparazione del campione mediante cartuccia di gel di silice. A: eliminazione dei composti poco polari; B: eluizione del composto di interesse; C: composti altamente polari che rimangono nella cartuccia

ANALISI DI TRACCE.

Un traguardo maggiore della L.C. biofarmaceutica è la rivelazione, a bassi livelli di concentrazione, nell'ordine di pg/ml, in soluzioni o in liquidi fisiologici.

Finora sono stati compiuti molti sforzi per individuare i vari fattori che controllano l'ottimizzazione della L.C. per l'analisi di tracce. Oggi, è possibile fare una analisi di microtracce al livello di picogrammi.

I campi di interesse sono: la colonna e le sue condizioni sperimentali, il rivelatore, la derivatizzazione pre- e/o post-colonna. Esamineremo in breve i primi due.

La colonna viene considerata come un dispositivo di diluizione che aumenta al crescere della ritenzione. Perciò il campione entra come una miscela relativamente concentrata ed esce dalla colonna diluito circa 10-100 volte o più dalla fase mobile. In verità, attraverso il controllo appropriato delle condizioni cromatografiche si possono ottenere, a seconda del problema di separazione, diluizioni di solo 3-5 volte.

Le colonne ad alte prestazioni sono ideali per l'analisi di tracce, con K' (fattore di capacità) sufficientemente bassi.

Un parametro particolarmente critico è il volume del campione iniettato nella colonna se l'eluizione avviene in condizioni isocratiche. Se si usa lo stesso solvente sia per il campione che per la fase mobile, vanno in particolare notati due punti significativi: in primo luogo, per un dato diametro di colonna possono essere iniettati volumi di campioni più grandi nelle colonne da L.C. che, per esempio, in quelle da G.C.; questo è

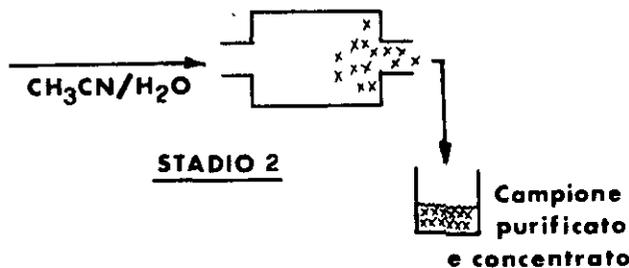
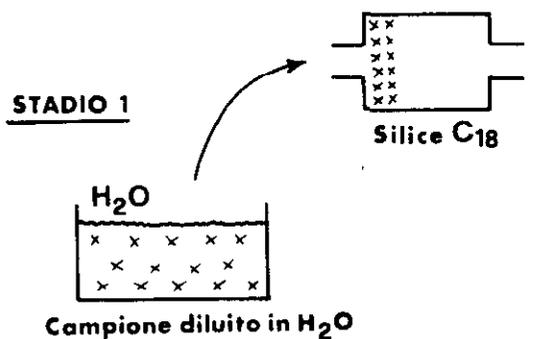


FIG. 21. - Uso della cartuccia C_{18} per purificare e concentrare campioni molto diluiti. Stadio 1: fissazione del composto sulla cartuccia; Stadio 2: rimozione del composto purificato e concentrato

senz'altro un vantaggio rispetto alla G.C., in cui il campione dovrebbe essere concentrato prima di venire iniettato in colonna. Tuttavia, potrebbero insorgere dei problemi con la solubilità dei componenti nella matrice, nel qual caso le procedure di concentrazione potrebbero essere limitate. In secondo luogo, spesso si presume che l'analisi di tracce richieda l'uso di colonne strette piuttosto che larghe, poiché la diluizione del campione è minore.

Una naturale estensione della tecnica del grande volume di campione è quella di usare un solvente di iniezione che sia significativamente più debole di quello della fase mobile.

In questo caso, si avrà una preconcentrazione del soluto nella parte alta della colonna, man mano che la fase mobile al principio della colonna viene convertita nel solvente di iniezione, più debole. Storicamente, l'approccio della preconcentrazione era ben noto e veniva applicato nella programmazione di temperatura in G.C. e nella programmazione di solventi in L.C.

Con l'introduzione delle colonne a fase inversa, l'iniezione di soluzioni acquose è diventata veramente popolare per l'analisi di tracce, e la tecnica generale è chiamata «arricchimento di tracce». Il sistema è diventato di routine specialmente nell'analisi di inquinamento [46], dove volumi molto grandi (per es. centinaia di ml) sono stati iniettati in colonne a fase inversa, ed eluiti in gradiente.

L'arricchimento di tracce sta diventando di uso crescente nella L.C. biofarmaceutica. Una relazione di Frei *et al.* dimostra che l'analisi quantitativa di tracce di peptidi, per es. dell'ossitocina, è possibile attraverso questo sistema [25] mediante iniezioni di quasi 2 ml di una soluzione tampone acquosa.

Se l'arricchimento di tracce ha chiaramente una grande importanza nella L.C. biofarmaceutica, ciò nondimeno si deve riconoscere che anche eventuali impurezze tendono a concentrarsi insieme ai soluti e che i volumi dei campioni di liquidi fisiologici devono essere in definitiva limitati.

BIBLIOGRAFIA

- McNAIR, H. M., 1980. Basic considerations in H.P.L.C. *Int. Lab.*, p. 51-59 e Bibl. ivi inclusa.
- DANDEREAU, R., BENTE, P., ROONEY, T. & HISKES, R. 1979. Flexible fused silica columns: an advance in high resolution gas chromatography. *Am. Lab.*, pp. 58-63.
- HALASZ, I. & SEBESTIAN, I. 1969. Neue stationäre Phase für die Chromatographie. *Angew. Chem.* **81**: 464, 465.
- ABEL, E. W., POLLARD, F. W., UDEN, P. C. & NICLESS, G. D. 1966. A new gas-liquid chromatographic phase. *J. Chromatogr.* **22**: 23-28.
- AUE, W. A. & HASTINGS, C. R. 1969. Preparation and chromatographic uses of surface-bonded silicones. *J. Chromatogr.* **42**: 319-335.
- AUE, W. A. & KAPILA, S. 1974. *Bonded stationary phases in chromatography*. E. Grushka (Ed.), Ann. Arbor Science. p. 13.
- UNGER, K. K. 1972. Structure of porous adsorbents. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **11**: 267-278.
- NOVOTNY, M. 1974. *Bonded stationary phases in chromatography*. E. Grushka (Ed.), Ann. Arbor Science, p. 199.
- KIRKLAND, J. J. 1971. High speed liquid-partition chromatography with chemically bonded organic stationary phases. *J. Chromatogr. Sci.* **9**: 206-214.
- KNOX, J. H. & VASVARI, G. 1974. The performance of packings in high speed liquid chromatography-IV. A chemically bonded anion exchanger. *J. Chromatogr. Sci.* **12**: 449-452.
- HATWICK, R. H. & BROWN, P. R. 1975. The performance of microparticle chemically bonded anion-exchange resins in the analysis of nucleotides. *J. Chromatogr.* **112**: 651-662.
- SCHWARZENBACH, R. 1976. A chemically bonded stationary phase for carbohydrate analysis in liquid chromatography. *J. Chromatogr.* **117**: 206-210.
- RABEL, F. M. 1973. Separations on a unique pellicular polyamide liquid chromatographic packing. *Anal. Chem.* **45**: 957-962.
- GRUSHKA, E. & SCOTT, P. W. 1973. Polypeptides as a permanently bound stationary phase in liquid chromatography. *Anal. Chem.* **45**: 1626-1632.
- KIKTA JR, E. J. & GRUSHKA, E. 1977. Bonded peptide stationary phases for the separation of amino acids and peptides using liquid chromatography. *J. Chromatogr.* **135**: 367-376.
- GRUSHKA, E. & FONG, G. W. K. 1977. *risultati non pubblicati*: SUNY a Buffalo, N.Y.
- DOTSAVI, G., SOGAH, Y. & CRAM, D. J. 1976. Total chromatographic optical resolutions of α -amino acids and ester salts through chiral recognition by a host covalently bound to polystyrene resin. *J. Am. Chem. Soc.* **98**: 3038-3041.
- MIKES, F., BOSHAUT, G. & GIL-AV, E. 1976. Resolution of optical isomers by H.P.L.C., using coated and bonded chiral chiral transfer complexing agents as stationary phases. *J. Chromatogr.* **122**: 205-221.
- LITTLE, J. N., DARK, W. A., FARLINGER, P. J. & BOMBAUGH, K. G. 1970. G.C. packings with chemically-bonded stationary phases. *J. Chromatogr. Sci.* **8**: 647-652.
- MORI, S. 1977. Comparison of chemically bonded and physically coated polyethylene glycol stationary phases in gas-chromatography. *J. Chromatogr.* **135**: 261-272.
- UNGER, K. K., BECKER, N. & ROUMELIOTIS, P. 1976. Recent developments in the evaluation of chemically bonded silica packings for liquid chromatography. *J. Chromatogr.* **125**: 115-127.

22. KIKTA, E. J. Jr & GRUSHKA, E. 1976. Retention behavior on alkyl bonded stationary phases in liquid chromatography. *Anal. Chem.* **48**: 1098-1104.
23. KARCH, K., SEBESTIAN, I. & HALASZ, I. 1974. Preparation and properties of reversed phases. *J. Chromatogr.* **122**: 3-16.
24. MAJORS, R. E. & HOPPER, M. J. 1974. Studies of siloxanes phases bonded to silica gel for use in H.P.L.C. *J. Chromatogr. Sci.* **12**: 767-778.
25. HORVATH, C., MELANDER, W. & MOLNAR, I. 1977. Liquid chromatography of ionogenic substances with nonpolar stationary phases. *Anal. Chem.* **49**: 142-154.
26. PESAK, J. J. & GRAHAM, J. A. 1977. Evidence for solute-brush interactans on nonpolar chemically bonded stationary phases in gas-chromatography. *Anal. Chem.* **49**: 133-137.
27. KARGER, B. L. & SIBLEY, G. 1973. Study of chemically bonded supports in gas chromatography. *Anal. Chem.* **45**: 740-748.
28. HASTINGS, C. R., AUE, W. A. & LARSEN, F. N. 1971. "In situ" synthesis of silicone liquid phases for chromatography. *J. Chromatogr.* **60**: 329-334.
29. COLIN, H. & GUIOCHON, G. 1977. Introduction to reversed-phase H.P.L.C. *J. Chromatogr.* **141**: 289-312.
30. HEMETSBERGER, H. M., MAASFELD, W. & RICKEN, H., 1976. The effect of chain length of bonded organic phases in reversed phase H.P.L.C. *Chromatographia* **9**: 303-310.
31. KARCH, K., SEBESTIAN, I., HALASZ, I. & HENGELHARDT, H. 1976. Optimization of reversed-phase separations. *J. Chromatogr.* **122**: 171-184.
32. SCOTT, R. P. W. & KUCERA, P. 1977. Examination of five commercially available liquid chromatographic reversed phases (including the nature of the solute-solvent-stationary phase interactions associated with them). *J. Chromatogr.* **142**: 213-232.
33. KNOX, J. H. & PRYDE, A. 1975. Performance and selected applications of a new range of chemically bonded packing materials in H.P.L.C. *J. Chromatogr.* **112**: 171-188.
34. EKSBERG, S. & SCHILL, G. 1973. Ion pair partition chromatography of organic ammonium compounds. *Anal. Chem.* **45**: 2092-2100.
35. EKSBERG, S., LAGERSTROM, P. O., MODIN, R. & SCHILL, G. 1973. Ion-pair chromatography of organic compounds. *J. Chromatogr.* **83**: 99-110.
36. SCHILL, G. 1976. *Assay of drugs and other trace compounds in biological fluids*. E. Reid (Ed.) North Holland Publishing Co., New York.
37. WAHLUND, K. G. 1975. Reversed-phase ion-pair partition chromatography of carboxylates and sulphonates. *J. Chromatogr.* **115**: 411-422.
38. WAHLUND, K. G. & LUND, U. 1976. Reversed-phase ion-pair partition chromatography of phenylacetic, mandelic and pyridinecarboxylic acid derivatives. *J. Chromatogr.* **177**: 269-276.
39. FRANSSON, B., WAHLUND, K. G., JOHANSSON, I. M. & SCHILL, G. 1976. Ion-pair chromatography of acidic drug metabolites and endogenous compounds. *J. Chromatogr.* **125**: 327-334.
40. PERSSON, B. A. & KARGER, B. L. 1974. High performance ion pair-partition chromatography: the separation of biogenic amines and their metabolites. *J. Chromatogr. Sci.* **12**: 521-528.
41. KRAAK, J. S. & HUBER, J. F. K. 1974. Separation of acidic compounds by high-pressure liquid-liquid chromatography involving ion-pair formation. *J. Chromatogr.* **102**: 333-351.
42. KNOX, J. H. & LAIRD, G. R. 1976. Soap chromatography - A new H.P.L.C. technique for separation of ionizable materials. Dyestuff intermediates. *J. Chromatogr.* **122**: 17-34.
43. JURAND, J. 1976. *High pressure liquid chromatography in clinical chemistry*. P. F. Dixon (Ed.) Academic Press, New York.
44. WITTMER, D. P., NEUSSELE, N. O. & HANEY, W. G. 1976. Simultaneous analysis of tartrazine and its intermediates by reversed phase liquid chromatography. *Anal. Chem.* **47**: 1422-1423.
45. FITZGERALD, E. 1976. Separation and quantitation of diazonium salts as heptanesulfonate ion pairs by H.P.L.C. *Anal. Chem.* **48**: 1734, 1735.
46. LITTLE, J. N. & FALLIK, G. J. 1975. New considerations in detector-application relationships. *J. Chromatogr.* **112**: 389-397.

La spettrometria di massa: considerazioni generali ed il suo impiego quale «rivelatore» in gas cromatografia

A. DI DOMENICO

Laboratorio di Tossicologia Comparata ed Ecotossicologia, Istituto Superiore di Sanità, Roma

PREMESSA.

Com'è noto, le tecniche cromatografiche rappresentano uno strumento di grande capacità selettiva nella chimica fine e nella microanalisi di tracce di prodotti. In gas cromatografia, il rilevamento delle sostanze eluite avviene mediante rivelatori che possono essere raggruppati in tre classi fondamentali: a termo-conducibilità, a ionizzazione di fiamma, a cattura d'elettroni. Nel passare dal primo tipo all'ultimo, la risposta diventa sempre più selettiva: in altri termini, mentre il rivelatore a termo-conducibilità rileva tutte le sostanze da cui viene attraversato, quello a cattura d'elettroni rileva, con sensibilità molto elevata, solo le sostanze elettroaffini ed è relativamente insensibile alle altre. L'argomento della presente relazione verte su un «rivelatore» particolare, lo spettrometro di massa, che unisce ad una elevata sensibilità, una marcata capacità d'identificazione.

Se a una molecola, altrimenti stabile, si fornisce una sufficiente quantità di energia, essa si decompone in frammenti di varie dimensioni: il limite ultimo di tale decomposizione è rappresentato dagli stessi atomi costituenti. Ad ogni frammento sono associate una certa probabilità di formazione, una massa m , e, eventualmente, una carica e , o sua multipla. L'insieme dei frammenti caricati elettricamente, idealmente suddivisi in gruppi ognuno dei quali distinto da uno specifico rapporto m/e , può essere risolto nei singoli gruppi proprio come un raggio di sole può essere risolto nelle singole componenti monocromatiche, i colori dell'iride. Lo strumento che effettua tali operazioni - ionizzazione e frammentazione della molecola; risoluzione dei frammenti carichi secondo i rapporti m/e ; registrazione, per ogni m/e , delle relative abbondanze - è lo spettrometro di massa.

Nella Fig. 1 è schematizzato uno spettrometro a settore magnetico a focalizzazione semplice: gli ioni sono prodotti e accelerati nella camera di ionizzazione A; il raggio ionico ottenuto viene risolto attraversando un campo magnetico generato dall'elettromagnete B; gli ioni vengono, infine, registrati in C. Il sistema è fornito di fenditure ad ampiezza variabile, frazioni di mm, per modificare secondo le necessità le dimensioni del pennello di ioni.

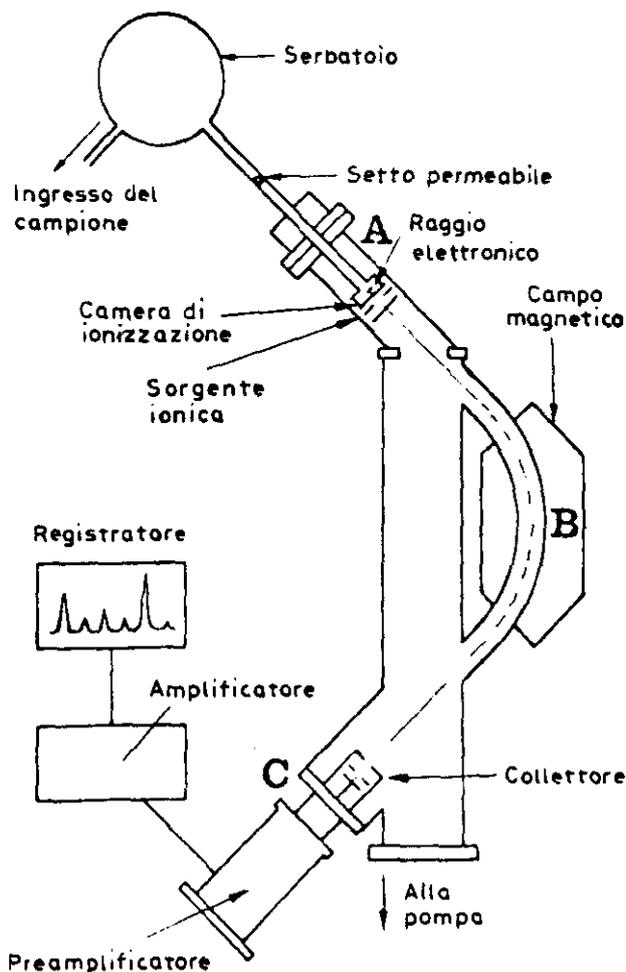


FIG. 1. - Schema di spettrometro di massa a settore magnetico (a focalizzazione singola)

NOMENCLATURA E ASPETTI GENERALI.

Di seguito si è tentato di presentare sinteticamente alcuni aspetti essenziali della M.S. (Mass Spectrometry) per fornire, più che altro, un tessuto di riferimento, senza la pretesa, tuttavia, di esaurire in alcun modo il soggetto. Gli argomenti trattati sono stati selezionati

La spettrometria di massa: considerazioni generali ed il suo impiego quale «rivelatore» in gas cromatografia

A. DI DOMENICO

Laboratorio di Tossicologia Comparata ed Ecotossicologia, Istituto Superiore di Sanità, Roma

PREMESSA.

Com'è noto, le tecniche cromatografiche rappresentano uno strumento di grande capacità selettiva nella chimica fine e nella microanalisi di tracce di prodotti. In gas cromatografia, il rilevamento delle sostanze eluite avviene mediante rivelatori che possono essere raggruppati in tre classi fondamentali: a termo-conducibilità, a ionizzazione di fiamma, a cattura d'elettroni. Nel passare dal primo tipo all'ultimo, la risposta diventa sempre più selettiva: in altri termini, mentre il rivelatore a termo-conducibilità rileva tutte le sostanze da cui viene attraversato, quello a cattura d'elettroni rileva, con sensibilità molto elevata, solo le sostanze elettroaffini ed è relativamente insensibile alle altre. L'argomento della presente relazione verte su un «rivelatore» particolare, lo spettrometro di massa, che unisce ad una elevata sensibilità, una marcata capacità d'identificazione.

Se a una molecola, altrimenti stabile, si fornisce una sufficiente quantità di energia, essa si decompone in frammenti di varie dimensioni: il limite ultimo di tale decomposizione è rappresentato dagli stessi atomi costituenti. Ad ogni frammento sono associate una certa probabilità di formazione, una massa m , e, eventualmente, una carica e , o sua multipla. L'insieme dei frammenti carichi elettricamente, idealmente suddivisi in gruppi ognuno dei quali distinto da uno specifico rapporto m/e , può essere risolto nei singoli gruppi proprio come un raggio di sole può essere risolto nelle singole componenti monocromatiche, i colori dell'iride. Lo strumento che effettua tali operazioni - ionizzazione e frammentazione della molecola; risoluzione dei frammenti carichi secondo i rapporti m/e ; registrazione, per ogni m/e , delle relative abbondanze - è lo spettrometro di massa.

Nella Fig. 1 è schematizzato uno spettrometro a settore magnetico a focalizzazione semplice; gli ioni sono prodotti e accelerati nella camera di ionizzazione A; il raggio ionico ottenuto viene risolto attraversando un campo magnetico generato dall'elettromagnete B; gli ioni vengono, infine, registrati in C. Il sistema è fornito di fenditure ad ampiezza variabile, frazioni di mm, per modificare secondo le necessità le dimensioni del pennello di ioni.

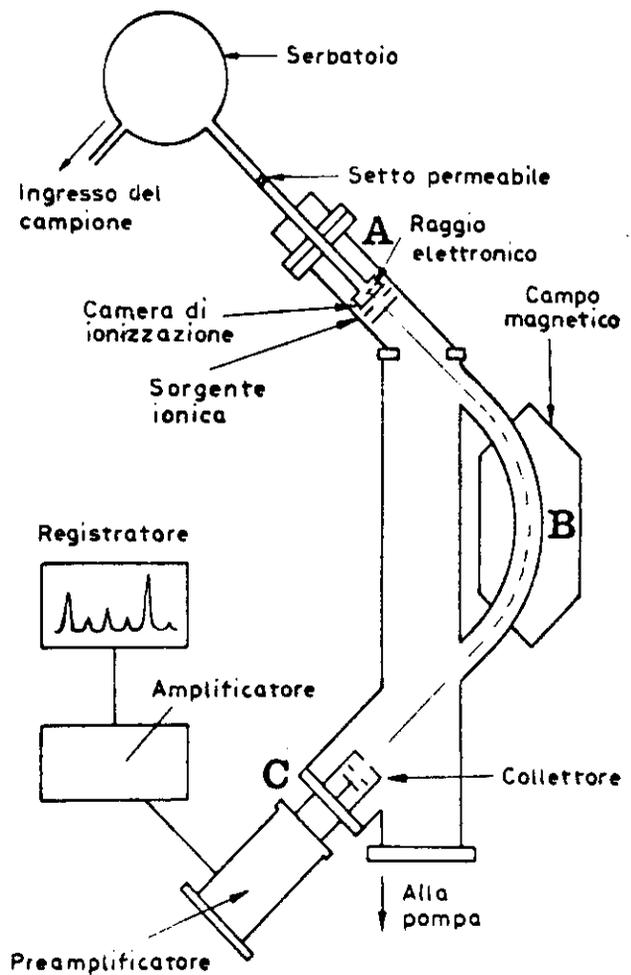


FIG. 1. - Schema di spettrometro di massa a settore magnetico (a focalizzazione singola)

NOMENCLATURA E ASPETTI GENERALI.

Di seguito si è tentato di presentare sinteticamente alcuni aspetti essenziali della M.S. (Mass Spectrometry) per fornire, più che altro, un tessuto di riferimento, senza la pretesa, tuttavia, di esaurire in alcun modo il soggetto. Gli argomenti trattati sono stati selezionati

sia perché d'interesse assolutamente generale nell'impiego della M.S., sia perché particolarmente attinenti al suo uso come tecnica microanalitica, soprattutto quando in abbinamento con la gas cromatografia. Per ulteriori e più dettagliate informazioni, si rimanda alle pubblicazioni specializzate [1-6].

Formazione degli ioni.

In genere, la ionizzazione viene effettuata sulla sostanza a dispersione molecolare. Uno dei metodi più comuni è quello d'introdurre la sostanza, mediante una sonda, direttamente nella sorgente ionica; il campione è contenuto generalmente in un piccolo capillare di quarzo, e può essere riscaldato fino a 300-400 °C per favorirne la volatilizzazione. Gas o liquidi molto volatili sono contenuti in un serbatoio; da questo diffondono lentamente nella camera di ionizzazione, a causa del gradiente di pressione. Nell'ultimo decennio si è diffusa la combinazione gas cromatografo-spettrometro di massa: in questo caso il gas cromatografo fornisce i prodotti da analizzare allo stato di vapore e dopo un processo di separazione ed isolamento.

1) *Impatto elettronico.* È usato comunemente per ionizzare sostanze organiche. Uno schema di questa sorgente è riportato in Fig. 2. Il filamento è costruito

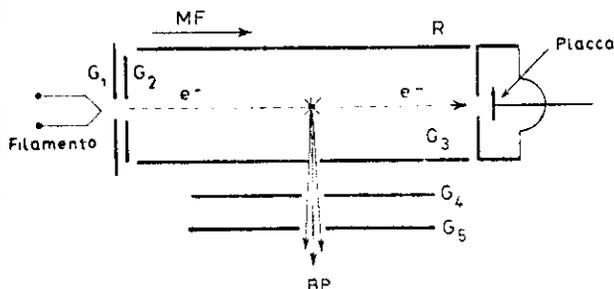


FIG. 2. - Schema di sorgente ionica per la produzione di ioni mediante impatto elettronico. Nell'impiego analitico, l'energia EE degli elettroni e^- emessi dal filamento è mantenuta tra 40 e 70 eV poiché la corrente ionica totale raggiunge un massimo, e risulta poco sensibile alle variazioni di EE, nell'intervallo 50-150 eV. Il potenziale acceleratore su G_3 può arrivare fino ad alcuni kV

in tungsteno o in renio, ed emette elettroni per effetto termoionico; MF rappresenta la direzione in un campo magnetico (~ 150 gauss), eventualmente applicabile per diminuire la dispersione degli elettroni. La placca è a potenziale positivo (≤ 100 V) rispetto alla schermatura, equipotenziale con G_2 , e misura la corrente elettronica. R è una placca repulsiva a potenziale positivo; la sua funzione è di respingere gli ioni positivi BP che si formano per collisione tra la sostanza a dispersione molecolare, introdotta ortogonalmente rispetto alla direzione di propagazione degli elettroni, ed il raggio elettronico. Con G si indicano griglie di accelerazione e focalizzazione: G_1 e G_2 a potenziale positivo; G_3 , G_4 , e G_5 a potenziale negativo. Oltre a ioni positivi, si formano anche radicali e ioni negativi: questi rimangono nella camera di ionizzazione quando la distribuzione dei potenziali è quella descritta.

2) *Ionizzazione chimica.* Il campione viene ionizzato da un'altra specie chimica ionizzata e presente in quantità preponderante. La specie ionizzante è otte-

nuta mediante impatto elettronico. Questo tipo di ionizzazione produce spettri generalmente poco affollati e dai quali si ricava facilmente il peso molecolare della sostanza in esame. Trova un impiego più limitato dell'impatto elettronico, ma si è rivelata di notevole utilità nella determinazione quantitativa di sostanze d'interesse biologico (cfr. *Reazioni ione-molecola*, p. 664).

Risoluzione dei frammenti ionici.

1) *Settore magnetico.* La risoluzione del fascio di ioni ottenuto nelle singole componenti, ciascuna caratterizzata da un particolare rapporto m/e , viene effettuata in varie maniere. Una delle più diffuse, e la prima in ordine di tempo, utilizza l'applicazione di un campo magnetico le cui linee di forza siano normali alla traiettoria degli ioni (Fig. 1 e 3). Se V è il potenziale acce-

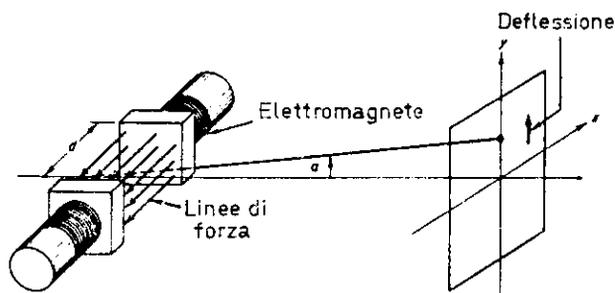


FIG. 3. - Rappresentazione della deflessione magnetica

latore ed e la carica di uno ione individuato da un rapporto m/e qualsiasi, $eV = (1/2) mV^2$ sarà la sua energia dopo l'accelerazione ($V =$ velocità dello ione di massa m). Evidentemente, a parità d'energia, all'aumentare della massa la velocità diminuisce.

Se uno ione in movimento incontra un campo magnetico d'intensità H , ortogonale alla traiettoria, quest'ultima subisce una deflessione la cui entità è definita dall'equilibrio tra la forza deviatrice esercitata dal campo magnetico e la forza centrifuga. Si può dimostrare che ($R =$ raggio della traiettoria):

$$R = mV/eH; \quad m/e = (1/2) (H^2 R^2 / V) = k(H^2 / V).$$

Il magnete ha, quindi, il duplice effetto di focalizzare ciascuna singola frazione a cui corrisponde un preciso m/e , e di risolvere il fascio di ioni nelle singole frazioni: infatti, se H e V sono costanti, al variare di m/e dovrà variare R . In genere, sia la sorgente che il collettore di ioni sono fissi ($R = \text{cost.}$) e, di conseguenza, per focalizzare successivamente i singoli raggi sul collettore si deve variare V o, preferenzialmente, H .

2) *Selettore a quadrupolo.* Lo spettrometro di massa a quadrupolo, spesso indicato come «filtro di massa», è costituito da quattro barre parallele cilindriche (Fig. 4) oppure, più propriamente, di sezione iperbolica. Gli elettrodi sono tra loro collegati elettricamente a coppie alterne. Al sistema è applicato un voltaggio continuo U , ed un voltaggio modulato a rf $V = V_0 \cos \omega t$. Il voltaggio sugli elettrodi positivi sarà $+(U + V_0 \cos \omega t)$ e quello sugli elettrodi negativi $-(U + V_0 \cos \omega t)$. Gli ioni vengono immessi nel campo a rf in direzione ortogonale al piano della figura. Per

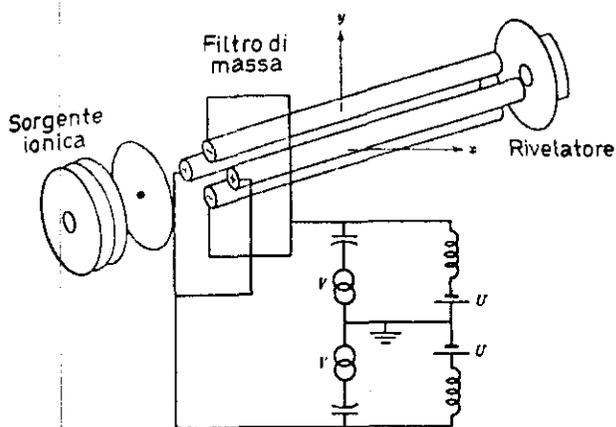


FIG. 4. - Schema di filtro di massa quadrupolare

una determinata combinazione di U , V_0 , e ω solo frammenti caratterizzati da un certo m/e possono raggiungere il rivelatore oscillando stabilmente attraverso la regione a rf; tutti gli altri urteranno contro le barre e si disperderanno. La scansione delle masse si attua variando U e V_0 (con $U/V_0 = \text{cost.}$), oppure variando ω .

La Fig. 5 mostra l'andamento delle funzioni di scansione $m = f(t)$ e l'andamento della separazione tra masse m/e adiacenti per alcuni comuni selettori.

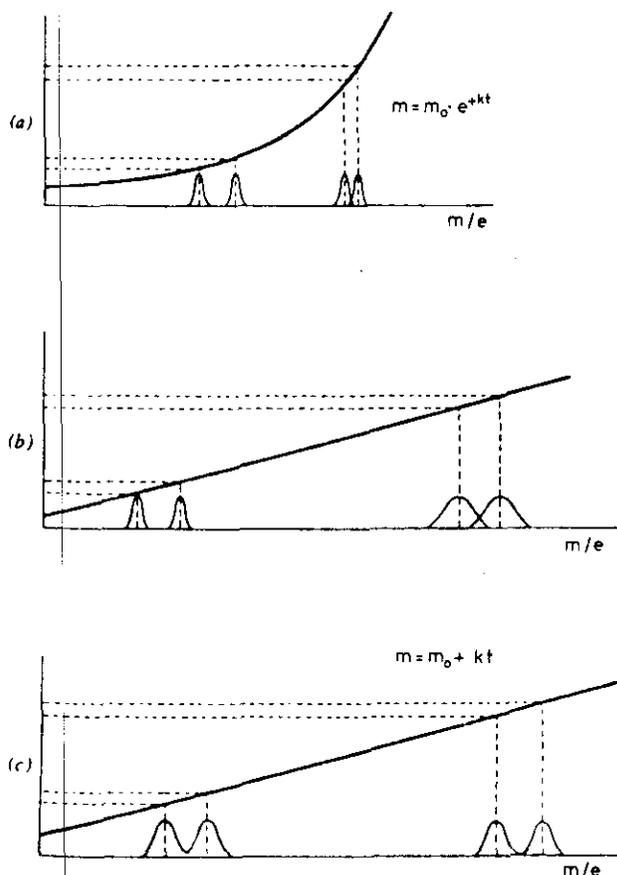


FIG. 5. - Variazioni delle larghezze dei picchi di massa nelle seguenti scansioni: (a) scansione esponenziale magnetica; (b) scansione magnetica linearizzata elettronicamente; (c) scansione quadrupolare

Rivelatori.

1) *Moltiplicatore d'elettroni dinodico.* Il funzionamento di questo rivelatore è in tutto simile a quello di un comune fototubo, con la variante che il processo primario (estrazione degli elettroni dal catodo) è innescato dai frammenti ionizzati, positivi o negativi, e non dai fotoni. Il fattore di moltiplicazione è dell'ordine di 10^6 , e ciò rende possibile misurare correnti ioniche estremamente basse, fino a 10^{-18} A se ulteriormente amplificate.

2) *Moltiplicatore d'elettroni a dinodo continuo.* I dinodi di moltiplicazione sono sostituiti da uno strato uniforme di materiale ad alta resistività elettrica, distribuito sopra un supporto inerte di vetro. Una ddp continua di qualche kV è applicata tra il catodo e l'altra estremità del moltiplicatore. Il fattore di moltiplicazione è simile al precedente.

Potere risolutivo.

È questa una caratteristica molto importante; esso viene definito come l'abilità a separare ioni di masse differenti e si esprime, generalmente, con la relazione $R = m/\Delta m$. Supponiamo di considerare N_2 e C_2H_4 , i cui pesi molecolari m sono calcolabili dai valori riportati in Tab. 1. La differenza è $\Delta m = 0,0252$ uma, cui corrisponde un rapporto $m/\Delta m = 28,0/0,0252 = 1100$: lo strumento sarà in grado di separare l'etilene dall'azoto se il suo potere risolutivo è maggiore di 1100. Due picchi si dicono risolti quando l'altezza della valle, determinata dalla loro parziale sovrapposizione, è inferiore in quota ad una certa percentuale dell'altezza dei picchi stessi. Così, il potere risolutivo viene riferito, in genere, al 10% o al 50% di sovrapposizione con altezze paragonabili (Fig. 6).

Il potere risolutivo attuale, riferito a due « standards » può servire a determinare le condizioni di sensibilità di uno spettrometro. Se si considerano, ad es., condizioni operative normali quelle per cui $R=1100$, allora i picchi corrispondenti alle due sostanze succitate devono essere risolti con una sovrapposizione massima del 10%.

Requisiti di alto vuoto.

Per consentire la produzione, l'accelerazione e il movimento degli ioni dalla sorgente al moltiplicatore d'elettroni, in tutta la linea ionica si mantiene una condizione di vuoto spinto (10^{-5} - 10^{-7} torr) mediante l'impiego di pompe rotative e a diffusione. In sostituzione di queste ultime, vengono spesso utilizzate pompe turbomolecolari.

Lo spettro di massa.

Segue una descrizione delle specie ioniche che contribuiscono, comunemente, alla formazione degli spettri di massa.

1) *Ione molecolare.* Esso prende origine per collisione tra un elettrone, di energia superiore o uguale al potenziale di ionizzazione della molecola M (~ 6 - 15 eV, per le sostanze organiche), e la molecola stessa:

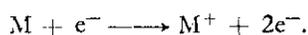
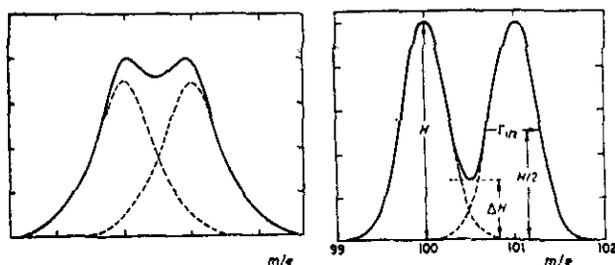


Tabella 1. - Masse nuclidiche (μma) e abbondanze isotopiche relative (%) di alcuni isotopi naturali ($C^{12} = 12,000\ 000$).

ELEMENTO	Peso atomico	Numero atomico	Numero di massa	Massa nuclidica	Abbondanza relativa
H Idrogeno	1,00797	1	1	1, 007 825	99,985
			2	2, 014 102	0,015
C Carbonio	12,01115	6	12	12, 000 000	98,888
			13	13, 003 355	1,112
N Azoto	14,0067	7	14	14, 003 073	99,633
			15	15, 000 108	0,367
O Ossigeno	15,9994	8	16	15, 994 914	99,759
			17	16, 999 134	0,037
			18	17, 999 160	0,204
P Fosforo	30,9738	15	31	30, 973 768	100,000
S Zolfo	32,064	16	32	31, 972 074	95,018
			33	32, 971 460	0,750
			34	33, 967 864	4,215
			36	35, 967 091	0,017
Cl Cloro	35,453	17	35	34, 968 853	75,771
			37	36, 965 903	24,229
Br Bromo	79,909	35	79	78, 918 328	50,537
			81	80, 916 287	49,463
I Iodio	126,9044	53	127	126, 904 471	100,000

Fig. 6. - Potere risolutivo e sua visualizzazione grafica: « valle » (ΔH), 28 %.

Ovviamente, il peso molecolare ricavabile da M^+ è corrispondente a quello della molecola di partenza. Aumentando l'energia incidente, prima intervengono fenomeni di ionizzazione e frammentazione, poi cominciano a comparire ioni con più di una carica. L'abbondanza percentuale dello ione molecolare dipende dalla sua tendenza a successive frammentazioni e può, quindi, fornire indicazioni sulla natura del composto in esame. In genere tutte le strutture che consentono forti delocalizzazioni della carica determinano ioni molecolari caratterizzati da notevole stabilità.

2) *Ioni di frammentazione.* Poiché gli elettroni ionizzanti hanno un'energia superiore a quella di ionizzazione, essi determinano normalmente marcati fenomeni di frammentazione. Nello studio dei meccanismi di frammentazione occorre tener presenti i seguenti parametri: a) la stabilità del frammento carico; b) la stabilità del frammento neutro; c) l'energia necessaria a dissociare quel determinato legame; d) i fattori sterici. Come esempio, si guardi la Fig. 7; in essa sono

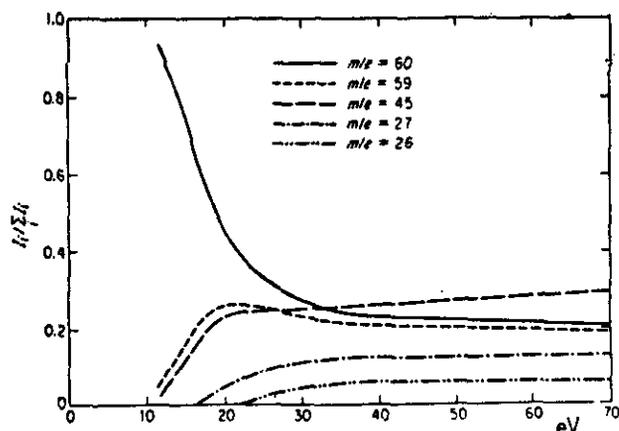
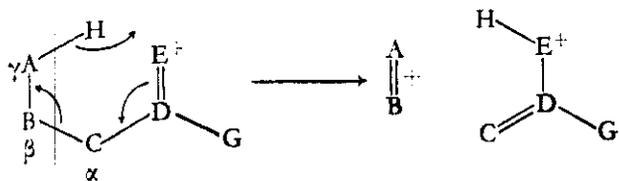


Fig. 7. - Rappresentazione grafica della frammentazione del solfuro di etilene in funzione dell'energia elettronica, eV. In ordinata viene riportata la corrente ionica relativa (probabilità di formazione) di ciascuna specie ionica

riportate le correnti ioniche relative a cinque specie ottenute dal solfuro di etilene. Lo ione molecolare è la specie più abbondante per $EE < 20$ eV, mentre la sua intensità cala rapidamente all'aumentare dei contributi degli altri frammenti. Intorno ai 10 eV lo ione molecolare risulta l'unica specie ionica presente.

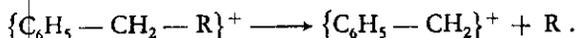
3) *Ioni di riarrangiamento o di trasposizione.* Le reazioni di riarrangiamento sono, in genere, abbastanza specifiche e perciò possono fornire delle buone indicazioni sulla struttura della molecola. Esse sono particolarmente favorite dagli stati di transizione che presentano una struttura ciclica a sei termini, ma si possono, talvolta, spiegare ammettendo la formazione di un

intermedio ciclico a tre, quattro, o cinque termini. I fenomeni di trasposizione più comuni avvengono con lo spostamento dell'idrogeno, ma da numerose osser-



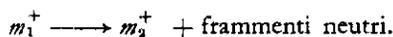
vazioni, si può concludere che anche gruppi alchilici e nuclei aromatici migrano in ambienti opportuni (riarrangiamento di McLafferty). Questo meccanismo interviene solo se vi è un legame multiplo tra D ed E, e un idrogeno in γ disponibile per il trasferimento. Il riarrangiamento è più intenso a seconda che l'H in γ sia legato a un carbonio terziario, secondario, o primario.

Nei composti alchilbenzenici si ottiene una riga molto intensa in corrispondenza della massa 91. Essa si spiega ammettendo un processo di frammentazione secondo il seguente meccanismo:



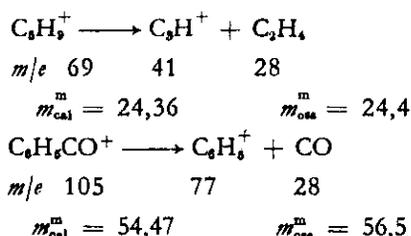
La notevole stabilità dello ione viene attribuita alla formazione di un anello a sette termini, il « tropilio », che porta la carica dispersa uniformemente su tutta la molecola. Si è, infatti, dimostrato che la struttura alchilbenzenica isomerizza a struttura completamente ciclizzata a sette atomi di carbonio, tutti equivalenti ($C_7H_7^+$).

4) *Ioni metastabili.* Uno ione di massa m_1 appena formato può frammentarsi secondo lo schema:



Lo ione di massa m_2 viene poi normalmente accelerato e registrato in accordo al rapporto m_2/e . Può accadere che m_1^+ si frammenti dopo aver lasciato la camera di ionizzazione, durante la traiettoria, in un punto qualsiasi tra la zona di accelerazione ed il rivelatore: una parte dell'energia cinetica viene sottratta, in tal caso, dal frammento neutro.

L'energia cinetica e il momento dello ione m_2^+ , formato durante la traiettoria e rappresentato con m^m , saranno minori di quelli che lo caratterizzano quando si forma nella sorgente ionica. L'effetto deviatore del campo magnetico risulta, quindi, diverso da quello che si ha sullo ione m_2^+ , anche se in realtà $m^m = m_2$, e lo ione metastabile verrà registrato in corrispondenza di un rapporto $m/e \neq m_2/e$, secondo la relazione matematica $(m_2)^2/m_1 = m^m$. I picchi dovuti agli ioni metastabili sono riconoscibili perché, in genere, presentano forma bassa e allargata; essi si trovano in corrispondenza di valori m/e sia interi che frazionari.



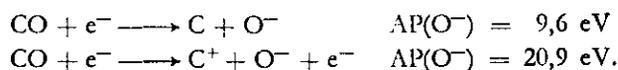
Si può notare come dallo spettro risulti apparentemente $m^m < m_2$: questo è in accordo con la relazione $R = mv/eH$, da cui si vede come il raggio della traiettoria sia direttamente proporzionale alla quantità di moto dello ione. Negli esempi precedenti abbiamo calcolato m^m ritenendo note m_1 ed m_2 ; in pratica si può conoscere direttamente solo m^m , in quanto facilmente identificabile nello spettro. Le masse m_1 ed m_2 si ricavano, invece, ricorrendo ad alcuni metodi semplici (ad es., i nomogrammi di Benon), tenendo presente che, normalmente, m_1^+ e m_2^+ danno righe piuttosto marcate.

5) *Ioni con carica doppia.* Questi ioni sono facilmente individuabili se hanno massa dispari, poiché il rapporto m/e è frazionario. Se invece la massa è pari, occorrerà procedere all'individuazione della massa isotopica ($m + 1$). Dalla presenza di ioni con più cariche si ricavano informazioni sulla facilità di ionizzazione e sulla stabilità dello ione finale.

6) *Ioni negativi.* Questi ioni vengono prodotti per impatto elettronico, mediante i seguenti meccanismi:

- Cattura di risonanza: $AB + e^- \longrightarrow AB^-$;
- Cattura di risonanza dissociativa: $AB + e^- \longrightarrow A + B^-$;
- Produzione di coppie: $AB + e^- \longrightarrow A^+ + B^- + e^-$.

Nei processi a) e b) non sono prodotti elettroni che possano eliminare l'energia in eccesso, e la formazione di ioni può determinarsi solo a basse energie degli elettroni incidenti ($EE \leq 10$ eV) e su intervalli d'energia piuttosto ristretti. Il processo c) non è di risonanza e l'energia eccedente può ritrovarsi come energia cinetica dell'elettrone prodotto; in questo caso, le curve di resa della ionizzazione assomigliano a quelle già incontrate per gli ioni positivi. Nei casi b) e c) l'energia in eccesso può ritrovarsi come energia cinetica, vibrazionale, o elettronica dei frammenti. I seguenti processi sono raffigurati in Fig. 8:



La larghezza del picco di cattura di risonanza è, in parte, dovuta alla dispersione dell'energia degli

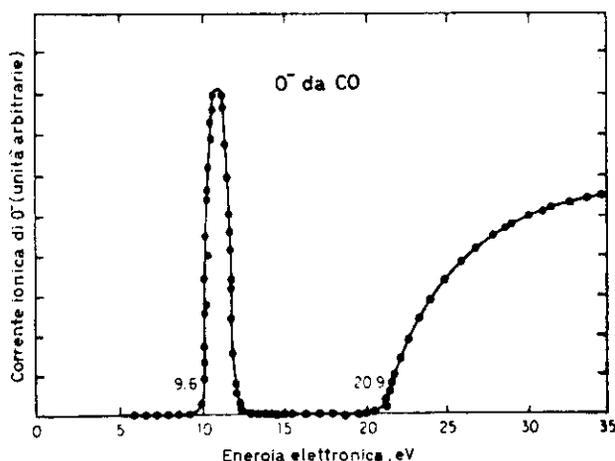


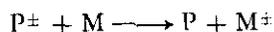
FIG. 8. - Andamento dell'efficienza di ionizzazione nella formazione di O^- da CO

elettroni incidenti. Gli ioni negativi sono, in genere, meno intensi di quelli positivi.

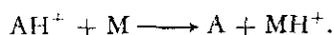
7) *Reazioni ione-molecola.* Queste sono reazioni bimolecolari, raramente a molecolarità superiore, tra ioni e molecole. Esse vengono favorite da pressioni elevate ($1 \cdot 10^{-3}$ torr) nella sorgente ionica. Le sorgenti ioniche impiegate sono, pertanto, più chiuse e meno sfinestate di quelle convenzionali. La reazione tra l'*i*-esimo ione primario P_i^+ e la specie molecolare M con produzione del *j*-esimo ione secondario S_j^+ può essere descritta brevemente con:



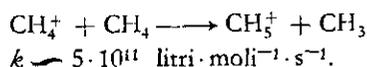
Tra le reazioni ione-molecola occorre menzionare quelle dove si ha solo trasferimento di carica (e^-), e non di massa. Esse possono schematizzarsi brevemente così (trasferimento di carica di risonanza):



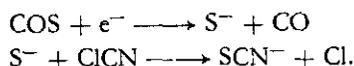
In reazioni frequentemente usate nella spettrometria di massa applicata all'analisi organica (ionizzazione chimica), lo ione primario è una specie che può cedere facilmente un protone, mentre l'accettore ha, in genere, una notevole affinità per lo stesso. Si ottiene, così, un intenso ione molecolare di massa ($m + 1$):



MH^+ può a sua volta subire vari processi degradativi. Alla reazione descritta è associata una costante di velocità k determinabile sperimentalmente. Per la reazione:



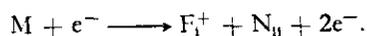
Nella Fig. 9 è mostrato un tipico grafico di reazioni tra ioni precursori negativi S^- e molecole neutre ClCN, secondo lo schema:



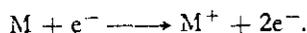
Lo ione precursore e lo ione secondario si riconoscono poiché il secondo è nettamente meno intenso del primo e, spesso, appare in corrispondenza del potenziale di apparizione (e dell'eventuale cattura di risonanza, per ioni negativi) dello ione primario.

Potenziali di apparizione, potenziali di ionizzazione.

Il potenziale di apparizione (AP) è l'energia minima richiesta per produrre un certo frammento ionizzato, F_i^+ , e gli eventuali frammenti neutri complementari, N_{ij} , da una data molecola (o ione, o radicale), M:



Il potenziale di ionizzazione (IP) di una molecola (o atomo, o radicale) è la minima energia necessaria per allontanare un elettrone dalla specie non ionizzata, M:



L'interesse nella determinazione sperimentale delle due grandezze definite è motivato dal fatto che esse rappresentano un'utile informazione per la definizione di alcune importanti proprietà di una molecola, tra cui l'elettronegatività, l'ordine e l'energia di legame, l'entalpia di formazione, l'affinità elettronica, ecc.

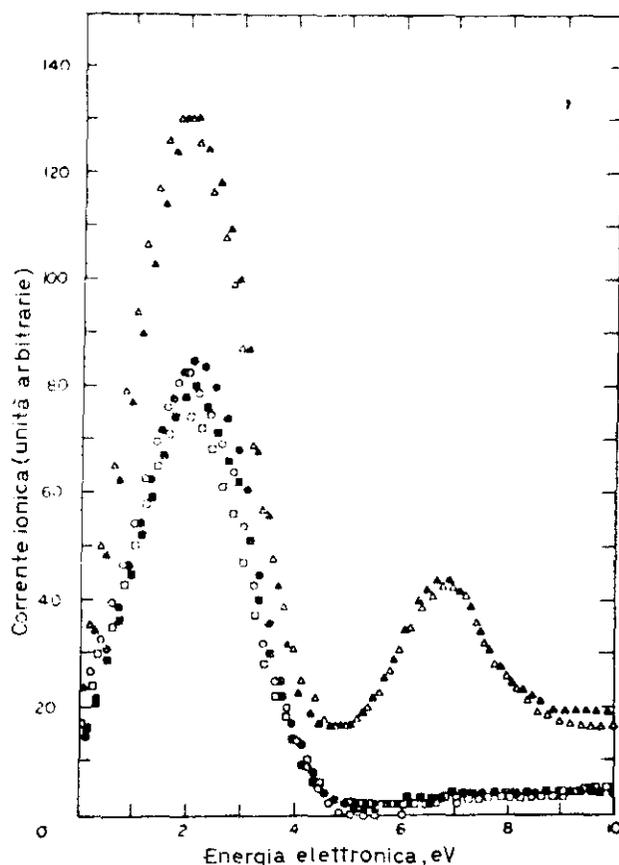


Fig. 9. - Curve delle efficienze di ionizzazione nella formazione di ioni negativi primari e secondari nel sistema ClCN-COS. Tempo di reazione: 500 ns; p(ClCN): 0,011 mmHg; p(COS): 0,008 mmHg; CN^- , triangoli; S^- , cerchi; SCN^- , quadrati. $I(\text{CN}^-) : I(\text{S}^-) : I(\text{SCN}^-) = 10 : 1 : 200$. Da: Di Domenico *et al.* [7]

Rappresentazione degli spettri di massa.

In uno spettro di massa i rapporti m/e sono uniformemente ordinati secondo valori crescenti da sinistra a destra. A ciascun m/e è associata una linea verticale proporzionale alla probabilità di formazione (o intensità) del frammento corrispondente. Poiché in genere i picchi sono numerosi, si cerca di rappresentare uno spettro nel modo più semplice e chiaro. La riga più intensa si pone uguale a 100 (o 1000), e le altre si riportano in proporzione (Fig. 10). Si può anche considerare la corrente ionica totale, riportando poi tutte le righe significative proporzionalmente alle singole percentuali. Deve essere sottolineato che il profilo pressoché « gaussiano » di ciascuna singola linea m/e emerge chiaramente se la scala delle masse viene adeguatamente amplificata. Tale profilo si perde quando uno spettro di massa è osservato nel suo insieme (Fig. 11). Gli stessi criteri vengono adottati per rappresentare uno spettro di massa con tavole numeriche, invece che graficamente. A parità di condizioni sperimentali, le probabilità di formazione dei singoli frammenti si mantengono sostanzialmente costanti: in altri termini, due spettri di massa della stessa sostanza, presi in identiche condizioni, saranno praticamente sovrapponibili. Nelle Figg. 10 e 11 sono mostrati gli spettri, ottenuti mediante strumenti a settore magnetico, della trietilammina e del colesterolo (parziale). Solo lo spet-

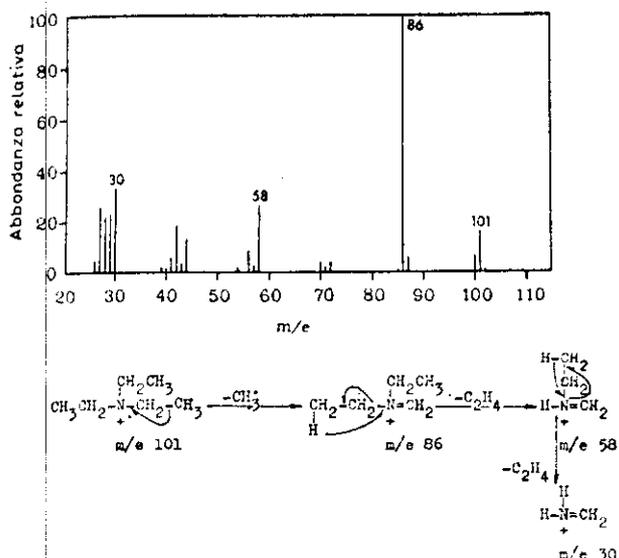


FIG. 10. - Spettro di massa ed alcuni canali di frammentazione della trietilammina

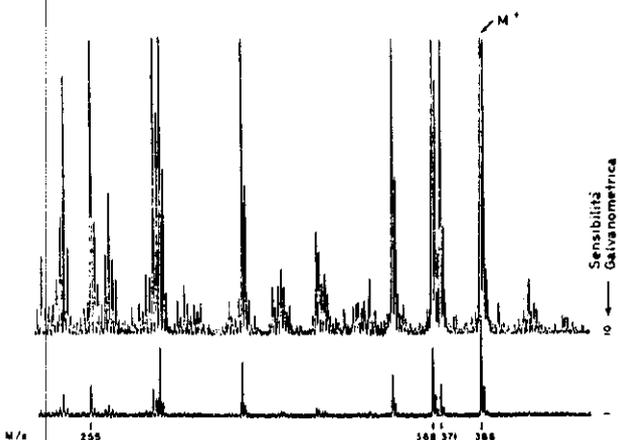


FIG. 11. - Spettro parziale (non normalizzato) del colesterolo registrato a due diverse sensibilità ($\times 1$ e $\times 10$) del registratore

tro di Fig. 10 è stato normalizzato, privato dei segnali indesiderati, e riprodotto graficamente sostituendo linee ai picchi originali, secondo i criteri accennati. Nella stessa figura sono indicati alcuni canali di frammentazione della molecola: può essere interessante notare che la carica positiva risiede sull'etero-atomo, e che la produzione del frammento ionico m/e 86, cui è associata la massima probabilità di formazione, corrisponde alla formazione di un azoto quaternario.

ASPETTI APPLICATIVI.

Separatori molecolari.

Da alcuni anni è piuttosto frequente l'abbinamento tra spettrometria di massa e gas cromatografia. Solo le sostanze sufficientemente volatili possono essere analizzate mediante la combinazione G.C.-M.S., che si è rivelata particolarmente utile nelle analisi di composti organici in miscele anche molto complesse. L'identificazione dei vari componenti in cui viene risolta una miscela complessa può offrire, a volte, notevoli diffi-

coltà anche per le piccole quantità di sostanza che, spesso, si hanno a disposizione. I picchi gas cromatografici ottenuti dopo la separazione possono essere, invece, facilmente e rapidamente analizzati mediante M.S., poiché la quantità di sostanza necessaria ad effettuare tale analisi è estremamente piccola ($< 10^{-7}$ g). Occorre aggiungere che uno spettro di massa può essere registrato anche in pochi secondi e ciò consente, ad esempio, di analizzare uno stesso picco gas cromatografico sia in « salita » che in « discesa ».

Quando si collegano direttamente un gas cromatografo ed uno spettrometro di massa è necessario inserire tra i due strumenti un « separatore molecolare » per evitare che il gas di trasporto penetri nello spettrometro in quantità eccessiva.

1) *Separatore di Ryhage* (Fig. 12). Il separatore è collegato a pompe rotative e a diffusione; il gas di trasporto viene eliminato perché, a causa della massa molecolare molto piccola, è soggetto a *scattering* in misura maggiore rispetto alle più pesanti molecole da analizzare. Il principale difetto di questo separatore è di essere costruito in acciaio: le superfici metalliche calde provocano in alcuni casi fenomeni di decomposizione piuttosto accentuati. Si lavora con flussi operativi fino a 30-40 ml/min.

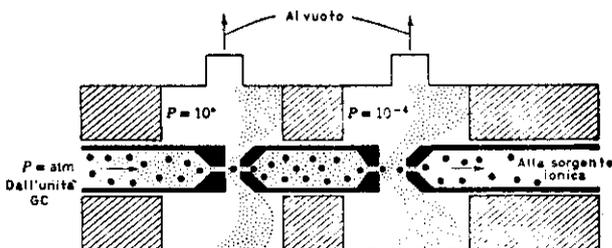


FIG. 12. - Separatore molecolare di Ryhage

2) *Separatore di Watson e Biemann* (Fig. 13). La separazione avviene in quanto il gas di trasporto (He) diffonde attraverso la superficie porosa del separatore molto più rapidamente degli altri componenti. Questo separatore è costruito interamente in vetro e presenta come unico inconveniente quello di chemi-adsorbire parzialmente le sostanze che lo attraversano. Il flusso massimo che può passare attraverso questo tipo d'interfaccia è di circa 12 ml/min; valori più elevati determinano picchi di forma irregolare.

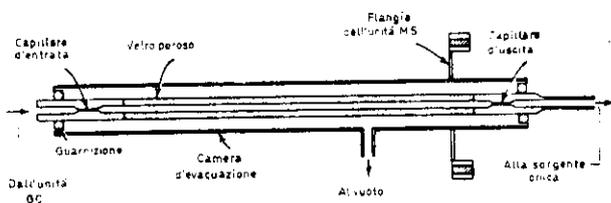


FIG. 13. - Separatore molecolare di Watson-Biemann

3) *Separatore a membrana*. Il materiale eluito passa attraverso un diaframma di gomma al silicone: la separazione avviene in quanto l'He è poco solubile nella gomma predetta, mentre quest'ultima è notevolmente permeabile alle sostanze organiche

L'uso dell'elio come gas di trasporto è dovuto, prevalentemente, all'alto potenziale di ionizzazione ed alla sua inerzia chimica. Malgrado il separatore, infatti, una piccola quantità di *carrier* penetra nella sorgente ionica e incontra il flusso d'elettroni. L'elio si ionizza meno di tutti gli altri gas, e determina perciò il minor numero d'interferenze. Esso, inoltre, non reagisce con le sostanze da analizzare. L'idrogeno, l'unico gas che potrebbe sostituire l'He per quanto riguarda la tendenza a diffondere e la massa molecolare, può provocare visibili fenomeni d'idrogenazione.

La « resa » di un separatore molecolare è definita come il rapporto tra la quantità di campione che entra nello spettrometro e la quantità di campione che entra nel separatore; essa può arrivare fino al 90%. Il « fattore di arricchimento » si ottiene dividendo il rapporto campione/*carrier* allo spettrometro di massa per lo stesso rapporto all'entrata del separatore molecolare.

Recentemente è stato anche realizzato l'interfacciamento tra spettrometro di massa e cromatografo a *carrier* liquido (H.P.L.C.), con il risultato di estendere notevolmente il campo d'applicabilità delle tecniche cromatografiche in combinazione con la M.S.

Due applicazioni della tecnica G.L.C.-M.S.

Nei due casi che seguono, la M.S. è stata utilizzata come tecnica di identificazione e conferma a sostegno di procedure gas cromatografiche di più facile esecuzione e disponibilità.

1) Il cloruro di cetilpiridinio, $C_{21}H_{38}ClN$, è comunemente usato come disinfettante e antisettico nella pratica ospedaliera. Per un controllo di qualità, l'analisi può essere effettuata per via gas cromatografica sulla soluzione alcolica del prodotto salificato. Le domande che venivano poste erano: *a)* se il prodotto subiva degradazione termica nell'iniettore gas cromatografico; *b)* in caso affermativo, quali prodotti passavano nella

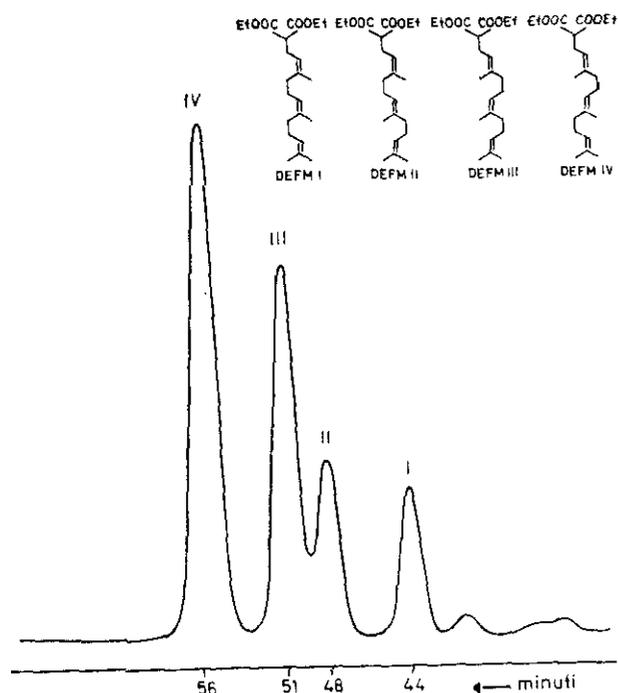


FIG. 14. - Gas chromatogramma (F.I.D.) del 2-carbetosifarnesilacetato di etile

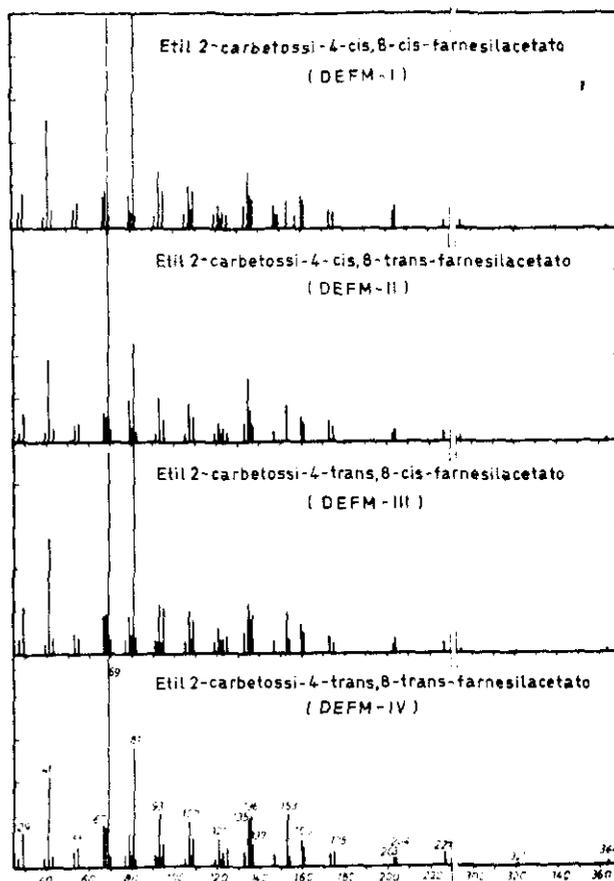
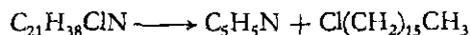


FIG. 15. - Spettri di massa degli isomeri cis-trans del 2-carbetosifarnesilacetato di etile. Da: Di Domenico e Misiti [8]

colonna gas cromatografica; *c)* se tali prodotti potevano essere usati ai fini analitici per identificazione e dosaggio. La risposta al punto *c)* doveva risultare affermativa, dal momento che la G.C. veniva normalmente impiegata per questo tipo d'analisi. Il CPC fu, perciò, sottoposto a varie prove di pirolisi tra 375 e 770 °C, e si vide che l'unico componente gas cromatografico di rilievo si formava in modo riproducibile alle temperature considerate. Tale componente aveva uno spettro di massa corrispondente a quello del cloruro di cetile, già noto dalla letteratura. Dalle evidenze sperimentali si dedusse che il CPC si degradava termicamente secondo lo schema seguente:



e che tale degradazione poteva essere utilizzata nella pratica analitica. Può essere utile notare che nello spettro del cloruro di cetile la maggior parte dei frammenti non contiene l'alogeno (mancanza del picco isotopico caratteristico), mentre il Cl^{35} ed il suo isotopo Cl^{37} sono presenti a *m/e* 91-93, 105-107, 119-121, 133-135, 147-149 come si desume dalle intensità relative dei due frammenti isotopici costituenti ogni coppia (es., $I(91): I(93) = 3:1$. Cfr. Tab. 1).

2) Da uno studio preliminare mediante G.C.-M.S. su alcuni campioni commerciali di farnesilacetato di geraniolo (Gefarnato), fu possibile accertare che ogni campione conteneva non meno di due componenti, spesso in numero superiore. Dalla procedura di sintesi era possibile attribuire un'identità ai vari componenti

che accompagnavano quello principale ma, dato l'impiego medicinale del prodotto, si ritenne fosse giustificato confermare le varie ipotesi tramite uno studio appropriato.

Dalla duplicazione del procedimento di sintesi, si riuscirono ad ottenere miscele complesse di farnesilacetato di metile, in tutto simili alle miscele ottenute per idrolisi e metilazione del farnesilacetato di geraniolo commerciale. I risultati delle analisi degli intermedi di sintesi confermarono le ipotesi iniziali. Per es., il 2-carbetossifarnesilacetato di etile, $C_{22}H_{36}O_4$, era presente nelle quattro forme isomeriche possibili (Fig. 14), prevedibili in base ai due centri d'isomeria cis-trans presenti nella molecola al C-4 ed al C-8. L'affinità strutturale dei quattro prodotti suddetti risalta dai loro spettri di massa (Fig. 15), nei quali è individuabile lo ione molecolare. Nello studio con la M.S. l'obiettivo non era la ricerca dei meccanismi di frammentazione dei derivati dell'acido farnesilacetico, bensì la conferma qualitativa della presenza di certe strutture. Per una discussione più dettagliata dell'argomento, si rimanda alla letteratura [8]. Qui basta sottolineare, a sostegno della notevole specificità della spettrometria di massa, che i quattro spettri della Fig. 15 sarebbero, tra loro, virtualmente indistinguibili se non fosse per il frammento a $m/e = 81$ uma, la cui intensità presenta marcate differenze, passando dalla forma 8-trans a quella 8-cis.

Clusters isotopici.

Dalla Tab. 1 si vede che la miscela isotopica naturale del cloro è costituita da Cl^{35} e Cl^{37} , nel rapporto 0,75771 : 0,24229. Quindi, nel caso una molecola contenga un solo atomo di cloro, noi ci aspetteremo, laddove è presente l'alogeno, coppie di frammenti ionici in cui il secondo dei due dista dal primo 2 uma, ed è circa tre volte meno intenso. Se la molecola contiene due atomi di cloro, quale sarà l'intensità relativa dei singoli frammenti ionici isotopici contenenti i due atomi di cloro nelle combinazioni $Cl^{35} Cl^{35}$, $Cl^{35} Cl^{37}$, e $Cl^{37} Cl^{37}$? La risposta si ottiene facilmente applicando la relazione $(a + b)^n$. Nel nostro caso:

$$(0,75771 + 0,24229)^2 = \frac{0,5741}{100} + \frac{0,3672}{64} + \frac{0,0587}{10}$$

Nel secondo membro, il primo termine è proporzionale alla intensità che, nel gruppo isotopico, avrà lo ione contenente due Cl^{35} ; il secondo all'intensità dello ione contenente un Cl^{35} ed un Cl^{37} , a 2 uma di distanza; ed il terzo all'intensità dello ione a 4 uma di distanza dal primo, contenente due Cl^{37} . Brevemente, indicheremo le intensità relative come:

$$I(X) : I(X + 2) : I(X + 4) = 100 : 64 : 10.$$

Analogamente, nel caso dello ione CCl_3^+ ci aspetteremo le seguenti abbondanze frazionarie:

$$(0,75771 + 0,24229)^3 = \frac{0,4350}{100} + \frac{0,4173}{96} + \frac{0,1335}{31} + \frac{0,0142}{3}$$

relative ai contributi di Cl_3^{35} , $Cl_2^{35}Cl^{37}$, $Cl^{35}Cl_2^{37}$, e Cl_3^{37} . Anche in questo caso diremo:

$$I(X) : I(X + 2) : I(X + 4) : I(X + 6) = 100 : 96 : 31 : 3.$$

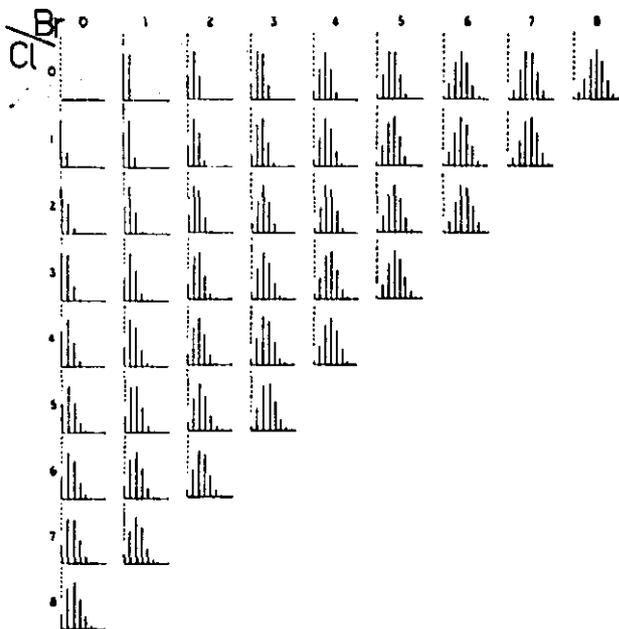


FIG. 16. - Abbondanze isotopiche relative attese per frammenti ionici contenenti fino ad 8 atomi di cloro e/o di bromo

Infine, nel caso siano presenti quattro atomi di cloro, si avrà:

$$I(X) : I(X + 2) : I(X + 4) : I(X + 6) : I(X + 8) = 78 : 100 : 48 : 10 : 1.$$

Le intensità relative attese per il contributo degli isotopi del Cl e/o del Br in un frammento ionico sono mostrate in Fig. 16. Il numero massimo considerato, per ciascuna singola specie, è 8. Si deve osservare che i componenti con intensità trascurabili non risultano dalla figura.

Cenni sui criteri d'identificazione.

In base alle considerazioni fatte, è facile individuare gli ioni contenenti atomi di cloro, ed il numero degli stessi, negli spettri presentati in Fig. 17. Per es., nel caso del TDE (i due spettri superiori) e del DDT il gruppo a $m/e = 235$ uma è formato da frammenti ionici contenenti due atomi di cloro, mentre nel caso della TCDD (i due spettri centrali) il gruppo isotopico a $m/e = 320$ uma è chiaramente dovuto al contributo di quattro atomi di cloro e corrisponde, infatti, allo ione molecolare. Deve essere, infine, notato il limitato numero di picchi presenti negli spettri suddetti e come quelli più intensi siano riconducibili a ioni contenenti l'alogeno. Nel caso specifico, la forte elettronegatività del cloro e la presenza del substrato aromatico orientano nettamente il corso della frammentazione. Da quanto detto, risulta evidente come la presenza di elementi con elettronegatività fortemente dissimile da quella di C e H, e con composizione isotopica caratteristica, introduca negli spettri di massa alcuni tratti peculiari che, spesso, sono di grande aiuto nella interpretazione di uno spettro incognito.

L'utilizzazione dell' H^2 , ed in generale degli isotopi pesanti stabili come C^{13} , O^{18} e N^{15} , per marcare la molecola in esame è piuttosto frequente: tale tecnica consente di seguire i meccanismi di frammentazione

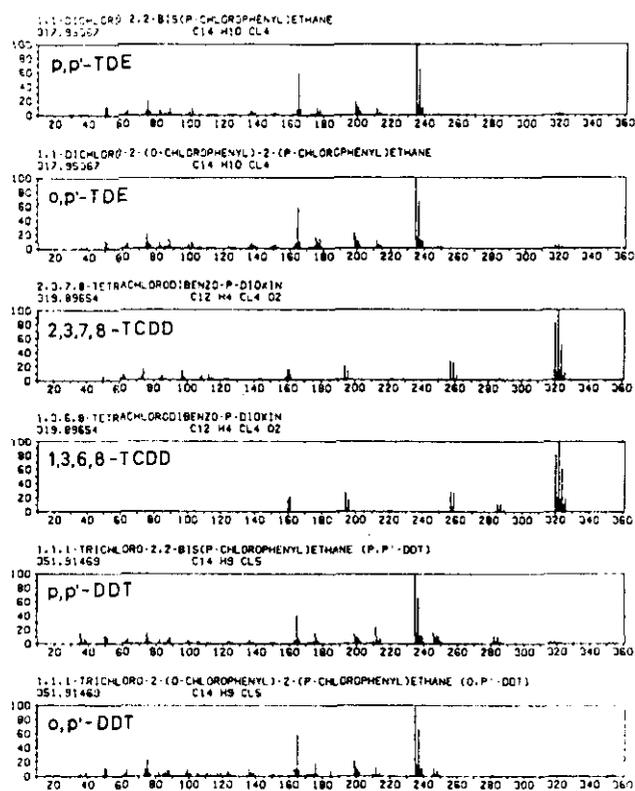


Fig. 17. - Spettri di massa a confronto di: TDE, TCDD e DDT

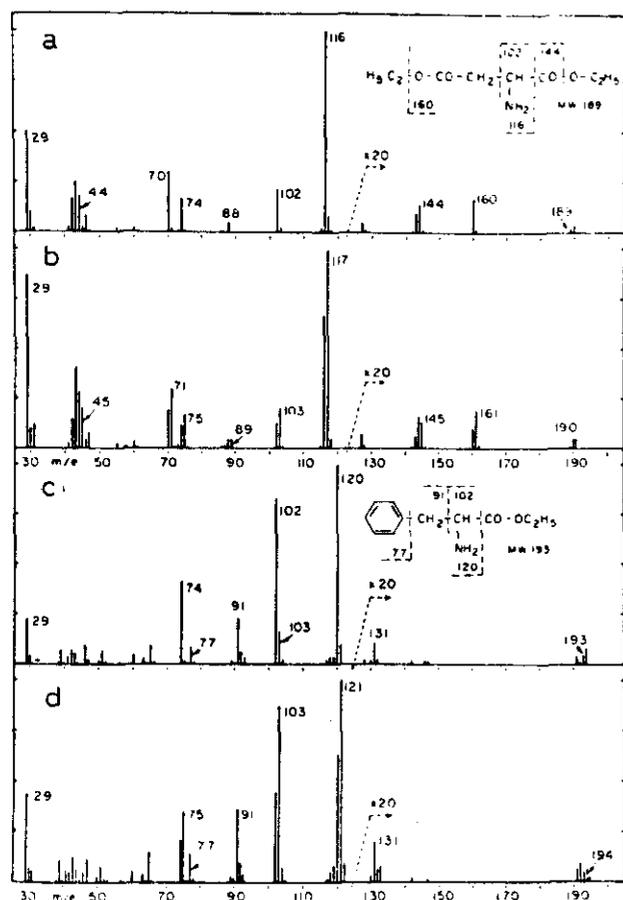


Fig. 18. - Effetto della « marcatura » con N^{15} sull'estere etilico dell'acido aspartico (a, b), e sull'estere etilico della fenilalanina (c, d). Resa della marcatura, circa 60 %

e, quindi, risalire alla struttura della molecola. Nella Fig. 18 viene mostrato l'effetto sugli spettri di massa dell'introduzione di N^{15} in molecole contenenti un gruppo amminico primario. Si nota che, nel prodotto marcato, tutti i frammenti contenenti azoto sono spostati di 1 uma.

Per ricostruire la struttura di una sostanza totalmente sconosciuta si segue schematicamente il seguente procedimento: a) si ricava dal rapporto m/e della riga corrispondente allo ione molecolare, il peso molecolare esatto (possibilmente in alta risoluzione) della sostanza; b) si individuano nello spettro i frammenti ionici più significativi; c) si cercano correlazioni tra i meccanismi di frammentazione noti, i frammenti rilevati, e l'ipotetica struttura della sostanza in esame. L'esperienza costituisce un valido aiuto per inquadrare la ricerca. Quando questo procedimento non porta a risultati soddisfacenti, si ricorre a tecniche più elaborate come la marcatura o la formazione di derivati, e si utilizzano informazioni ottenute con altri metodi (I.R., U.V., E.S.R., N.M.R., ecc.).

FRAGMENTOGRAFIA DI MASSA.

La registrazione di uno spettro di massa si basa sul rilevamento delle intensità di tutti gli ioni caratterizzati da valori $(m/e)_i$ compresi tra i limiti estremi, prestabiliti, dell'intervallo di scansione, $(m/e)_{in} \text{---} (m/e)_{out}$. In tale processo, il tempo di registrazione a disposizione del singolo ione i -esimo $(m/e)_i$, è una frazione del tempo totale di scansione, in genere tanto più ridotta quanto più ampio è l'intervallo suddetto. Se immaginiamo di avvicinare progressivamente gli estremi $\{(m/e)_{in}, (m/e)_{out}\}$, fino a convergenza, lasciando contemporaneamente immutate tutte le altre condizioni di scansione, ogni ione nell'intervallo potrà usufruire di tempi di rilevamento sempre più lunghi: a convergenza avvenuta, il periodo di rilevamento sarà concentrato su un singolo ione. L'effetto finale sarà la perdita dei segnali relativi a tutti i frammenti ionici tranne uno, la cui intensità risulterà grandemente aumentata.

Nell'abbinamento G.C.-M.S., il rilevamento di un singolo ione va anche sotto il nome di S.I.D. (*Single Ion Detection*). Gli strumenti attuali sono in grado di rilevare individualmente, ed allo stesso tempo, più di uno ione con una tecnica detta M.I.D. (*Multiple Ion Detection*) o S.I.M. (*Selected Ion Monitoring*): queste ultime due sono meglio conosciute sotto la definizione impropria di Frammentografia di Massa (M.F.). La M.F. è importante perché all'elevata capacità di separazione della G.C. viene abbinata l'estrema specificità e sensibilità del rilevamento frammentografico.

Un frammentogramma di massa appare simile ad un gas cromatogramma. Esso dà informazioni sul tempo di ritenzione caratteristico del composto, con le aree dei picchi (ogni m/e selezionato) proporzionali alla quantità della sostanza iniettata. Ovviamente, le intensità relative dei picchi si mantengono uguali a quelle degli stessi ioni nello spettro di massa stabilendo, così, un potente criterio d'identificazione. In generale, la frammentografia di massa è da 100 a 1000 volte più sensibile dei rivelatori a ionizzazione di fiamma (F.I.D.),

e della combinazione G.C.-M.S. quando il rilevamento è fatto sull'abbondanza ionica totale. La sensibilità è dovuta sia al numero limitato di frammenti ionici rilevati, sia alla possibilità di selezionare quelli più intensi e con rapporto segnale/« fondo » più favorevole. La massima specificità di rilevamento si ottiene quando S.I.D. o M.I.D. sono eseguiti con spettrometri ad elevato potere risolutivo.

Un tipico frammentogramma di massa della 2,3,7,8-tetraclorodibenzodiossina è mostrato in Fig. 19. Del caratteristico pentupletto relativo allo ione molecolare, soltanto i tre ioni più intensi ($m/e = 320, 322$ e 324) sono correntemente utilizzati [9].

Nella Fig. 20, il cluster isotopico dello spettro 1 corrisponde allo ione molecolare del TDE, mentre nello spettro 2 troviamo quello della TCDD che immaginiamo di dover ricercare in un campione a composizione sconosciuta. Negli spettri 3 e 4 sono mostrati due clusters isotopici dovuti a frammenti ionici dell'*o,p'*-DDT e del *p,p'*-DDT, rispettivamente (cfr. Fig. 17). Appare chiaro che, se la TCDD deve essere determinata in presenza di tali composti; la sovrapposizione di segnali caratterizzati da m/e uguali modificherà, con contributi decrescenti da $m/e = 320$ a $m/e = 324$ una, l'intensità dei picchi tipici della TCDD, con conseguente alterazione dei rapporti d'intensità rispetto a quelli attesi. Queste alterazioni, se sufficientemente marcate [$> \pm 10\%$, $I(322) = 100$] indicano all'operatore che vi è interferenza da parte di sostanze estranee.

Vi sono vari modi, oltre all'elaborazione matematica, per risolvere una difficoltà come questa. Per es.,

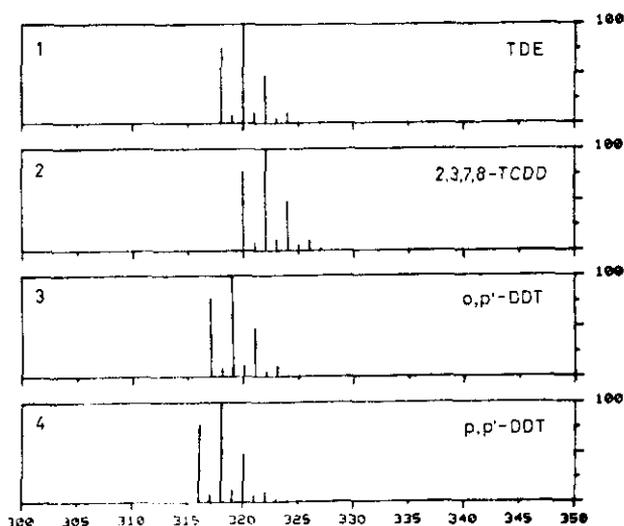


FIG. 20. - Clusters isotopici intorno a $m/e = 320$ di TDE, TCDD e DDT

sia una più efficiente separazione gas cromatografica, sia un miglioramento delle tecniche di purificazione (arricchimento in TCDD) del campione possono portare a un dosaggio accurato. Anche la M.S. ad alta risoluzione può essere utilizzata per ottenere una maggiore specificità. Un modo semplice, comunque, d'effettuare la determinazione è quello di considerare segnali non interferiti in aggiunta, o in luogo, di quelli normalmente utilizzati. Nel caso della TCDD, gli unici frammenti ionici alternativi, di utilità pratica, hanno $m/e = 257$ e 259 una ($M - COCl$).

CALCOLATORI « ON LINE ».

I segnali ottenuti dai moltiplicatori d'elettroni sono detti *analogici* e possono essere inviati ad un registratore potenziometrico, oppure a un registratore oscillografico, per la rappresentazione grafica (Fig. 21, a). La scelta dell'uno o dell'altro è legata alla durata della scansione: per es., i sistemi oscillografici, in genere caratterizzati da notevole velocità di risposta, vengono utilizzati per scansioni molto rapide (dell'ordine di alcuni secondi). Normalmente, per evidenziare sia i picchi più intensi che quelli più deboli, una registrazione è eseguita contemporaneamente su almeno due tracce, ognuna caratterizzata da un proprio fondo-scala (Fig. 11).

I segnali analogici possono anche essere registrati su traccia magnetica, e riportati graficamente, dalla registrazione effettuata, solo in un secondo tempo. È, così, possibile introdurre i dati raccolti in un calcolatore *off-line*, e ottenerne l'elaborazione desiderata. La registrazione su traccia magnetica è necessaria quando i tempi di scansione sono troppo rapidi anche per i registratori oscillografici.

Se la scansione è molto veloce, i segnali possono essere acquisiti direttamente da un calcolatore *on-line*, cioè collegato allo spettrometro di massa ed interattivo con esso in fase di scansione. In questo caso, il calcolatore assolve ai seguenti compiti: a) controllo della scansione; b) raccolta ed immagazzinamento dei dati

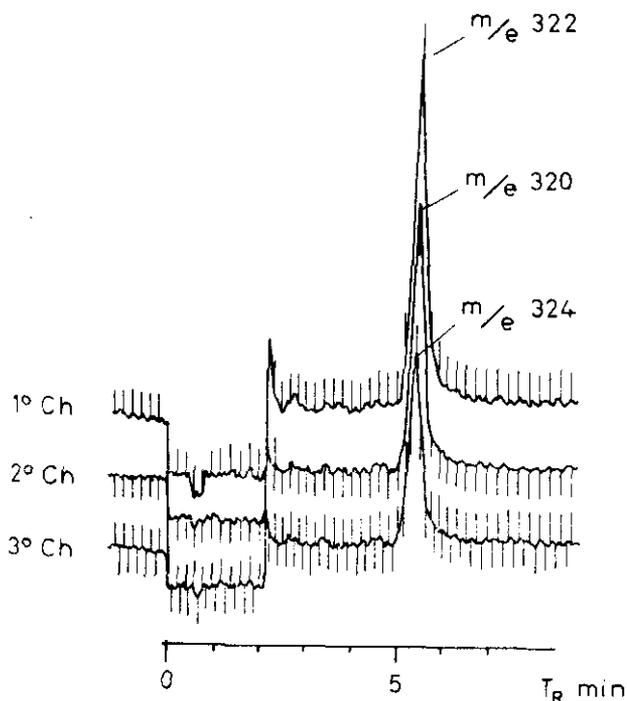


FIG. 19. - Analisi frammentografica della 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-diossina mediante l'impiego delle tre masse isotopiche più intense selezionate dal pentupletto dello ione molecolare. Condizioni gas cromatografiche: colonna in vetro $2\text{ mm} \times 2,2\text{ m}$ di OV-61 al 3% su Chromosorb W-HP 100-120 mesh; temperatura dell'iniettore, 300°C ; temperatura della colonna, 240°C ; gas di trasporto, elio con flusso di 30 ml/min ; separatore molecolare di Ryhage; spettrometro di massa a settore magnetico e a focalizzazione semplice Da: Di Domenico [9]

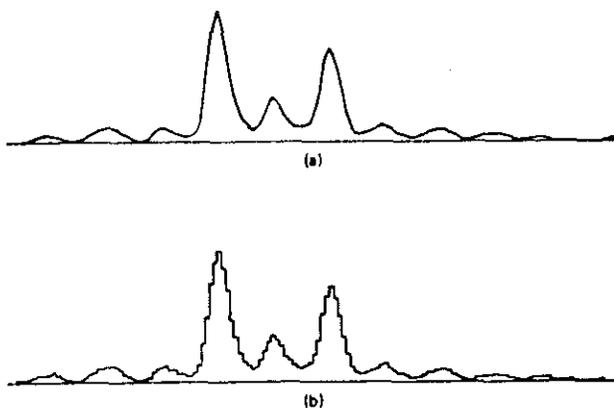


FIG. 21. - Visualizzazione di due diversi modi di scansione: (a) analogica; (b) digitale

via via ottenuti per una successiva elaborazione; c) rappresentazione grafica durante la scansione (e successiva a quest'ultima, secondo le richieste dell'operatore). Per effettuare le varie operazioni, il segnale analogico proveniente dal moltiplicatore di elettroni viene convertito in impulsi digitali (*bits*) tramite il convertitore A/D, e così conservato su nastro o disco magnetico. Il segnale analogico può essere rigenerato mediante il convertitore D/A, e riprodotto tramite un registratore convenzionale (Fig. 21, b). Le informazioni logiche, conservate su nastro o disco magnetico, contengono tutti i dati necessari allo studio della registrazione medesima. Oggi si dispone di numerose librerie di riferimento (raccolte di spettri di massa standard su nastri o dischi) per procedere all'individuazione degli spettri in studio mediante confronto tra questi e quelli disponibili in libreria.

CONCLUSIONI.

In questa breve nota, si è cercato di mettere in rilievo l'elevata specificità che caratterizza i reperti ottenuti mediante uno spettrometro di massa. Né deve sfuggire la multifortuna possibilità d'utilizzazione di tale tecnica, sia quando si osservi il solo campo della microanalisi chimica, sia quando si considerino i numerosi altri settori in cui la M.S. si è mostrata strumento d'insostituibile efficacia. Al riguardo, possiamo citare, per es.: l'identificazione di strutture molecolari, anche molto complesse; la determinazione di grandezze d'interesse chimico-fisico; lo studio di reazioni chimiche in fase

gassosa, e la caratterizzazione delle relative cinetiche; ecc.

L'uso dello spettrometro di massa quale *rivelatore* nell'analisi gas cromatografica è, probabilmente, il più importante impiego specializzato dello strumento sia per le conseguenze che ha avuto nel diffondere la tecnica della M.S., ed incentivarne lo sviluppo, sia in termini di generico impatto nel mondo scientifico. Infatti, l'uso combinato della G.C. e M.S. sembra aver prodotto un incremento quasi esponenziale nell'impiego e nella diffusione degli spettrometri di massa. A tale incremento, di relativamente recente acquisizione, ha fatto riscontro un chiaro miglioramento delle prestazioni generali di tale strumentazione. In relazione all'abbinamento G.C.-M.S., è utile ricordare che la specificità dei reperti aumenta grandemente quando si utilizzano colonne capillari. Queste colonne, di difficile preparazione rispetto a quelle impaccate e, in genere, più delicate di quest'ultime nell'impiego, stanno diventando d'uso sempre più frequente, soprattutto per la necessità di disporre di sistemi d'analisi altamente selettivi. Ciò risulta evidente quando si considerano alcuni dei campi d'applicazione della G.C.-M.S.: la ricerca dei microinquinanti ambientali, vera e propria sfida per la microanalisi chimica; l'individuazione, l'identificazione, e il dosaggio di prodotti metabolici; la determinazione delle impurezze in prodotti industriali d'interesse farmaceutico; ecc. In tutti questi campi, è necessario disporre di sistemi d'analisi che, oltre a garantire elevata specificità, permettano di raggiungere sensibilità al livello di parti per bilione o per trillione.

Le colonne capillari offrono numerosi vantaggi rispetto a quelle impaccate, oggi comunemente in uso. Per es., non richiedono interfacciamento con lo spettrometro di massa e possono essere portate direttamente fino alla sorgente ionica; inoltre, esse hanno modesta interazione con la miscela eluita. Questi due fattori si riflettono in un aumento della capacità di rilevamento (abbassamento della soglia di rilevabilità) del sistema combinato G.C.-M.S. Oggi, l'impiego di tali colonne ed un miglioramento generale del disegno delle sorgenti ioniche e dei filtri di massa, dei sistemi d'alto vuoto, dell'elettronica e dei rivelatori, permettono di considerare il limite di rilevabilità di 10^{-15} g come un obiettivo concretamente perseguibile e, probabilmente, realizzabile in un prossimo futuro. Attualmente sono già note determinazioni eseguite mediante le tecniche S.I.D. nell'intervallo 10^{-15} - 10^{-12} g.

BIBLIOGRAFIA

1. BEYNON, J. H. 1960. *Mass Spectrometry and Its Applications to Organic Chemistry*. Elsevier Publishing Company, New York.
2. MCLAFFERTY, F. W. (Ed.). 1963. *Mass Spectrometry of Organic Ions*. Academic Press, New York.
3. KISER, R. W. 1965. *Introduction to Mass Spectrometry and Its Applications*. Prentice-Hall, Inc., Englewood Cliffs (N.J.).
4. KNEWSTUBB, P. F. 1969. *Mass Spectrometry and Ion-Molecule Reactions*. Cambridge University Press.
5. MCFADDEN, W. 1973. *Techniques of Combined Gas Chromatography/Mass Spectrometry: Applications in Organic Analysis*. John Wiley & Sons.
6. LIGON, W. V. JR. 1979. Molecular Analysis by Mass Spectrometry. *Science* **205**: 151-159.
7. DI DOMENICO, A., SEN SHARMA, D. K., FRANKLIN, J. L. & DILLARD, J. G., 1971. Collision Reactions of Negative Ions in Several Sulfur Compounds and in Their Mixtures with ClCN. *J. Chem. Phys.* **54**: 4460-4467.
8. DI DOMENICO, A., MISITI, D. 1975. Identification of Stereo-isomeric Methyl Farnesylacetates. *Chem. Scr.* **8**: 84-90.
9. DI DOMENICO, A. 1977. Valutazione della TCDD nel Terreno - Sviluppo della Metodologia Analitica e Definizione del Sistema di Approntamento di una Mappa di Contaminazione. *ISTISAN* 1977/4.

Identificazione di alcaloidi minori in campioni commerciali di colchicina

M. A. IORIO (a), A. MAZZEO FARINA (a), G. CAVINA (a) e L. BONIFORTI (b)

(a) Laboratorio di Chimica del Farmaco (b) Laboratorio di Tossicologia, Istituto Superiore di Sanità, Roma

L'esame cromatografico (T.L.C.) di campioni commerciali di colchicina, provenienti da fonti diverse (Aldrich o Fluka Chemical Co.), ha messo in evidenza la presenza di tracce di altre tre sostanze, probabilmente alcaloidi a struttura colchicino-simile, che in tutti i sistemi eluenti provati si spostavano più lentamente della colchicina.

Un concentrato di impurezze è stato ottenuto cristallizzando la colchicina commerciale da acetato di etile e concentrando parzialmente a più riprese le acque

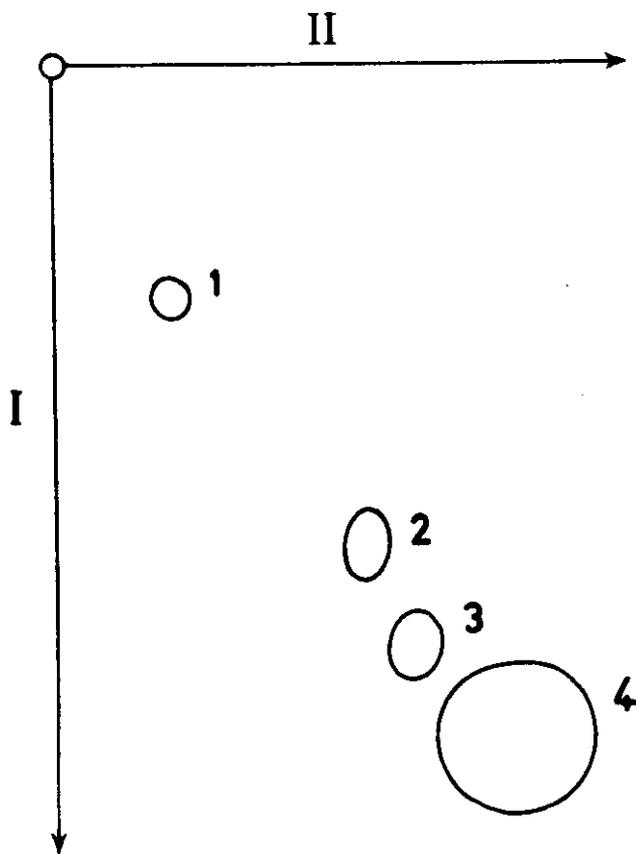


FIG. 1. - T.L.C. su Stratocrom SI F 254 (C. Erba) del residuo delle acque madri di cristallizzazione. I, $\text{CHCl}_3\text{-Me}_2\text{CO-Et}_3\text{NH}$ (50-40-10); II, $\text{CHCl}_3\text{-MeOH-NH}_4\text{OH}$ (90 : 9 : 1). Visualizzazione alla lampada UV, 254 nm. La macchia 4 corrisponde alla colchicina

madri di cristallizzazione in modo da ottenere ulteriore separazione di colchicina. Il residuo finale dà il cromatogramma illustrato in Fig. 1.

Per poter valutare il contenuto originale di questi alcaloidi minori nella colchicina commerciale è stata utilizzata la cromatografia liquida (H.P.L.C.) nelle condizioni sperimentali illustrate in Fig. 2. In queste condizioni l'alcaloide 1 non veniva eluito; usando un solvente più polare come cloroformio contenente il 10 % di metanolo, ed operando in isocratico, il suo tempo di ritenzione era di 8,1 min. La corrispondenza dei picchi in H.P.L.C. con le macchie in T.L.C. è stata ottenuta sia iniettando campioni degli alcaloidi isolati per verificarne il tempo di ritenzione, sia addizionando gli stessi, separatamente, alla colchicina commerciale e verificando l'aumentata intensità del picco corrispondente. Il contenuto degli alcaloidi minori nella colchicina commerciale risultava di circa il 6 %.

In Fig. 2 è anche riportato il tempo di ritenzione della β -lumicolchicina, un alcaloide che si ritrova nelle solu-

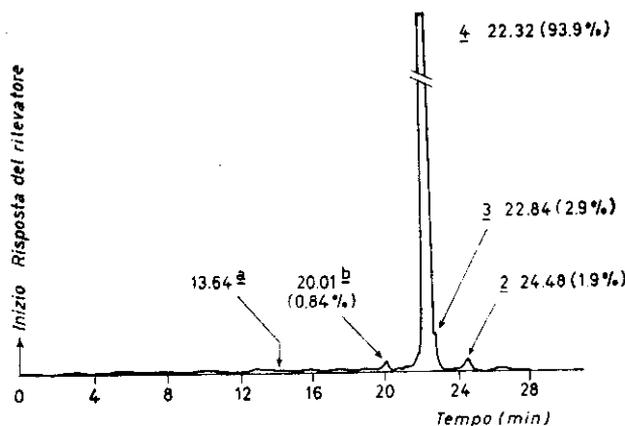
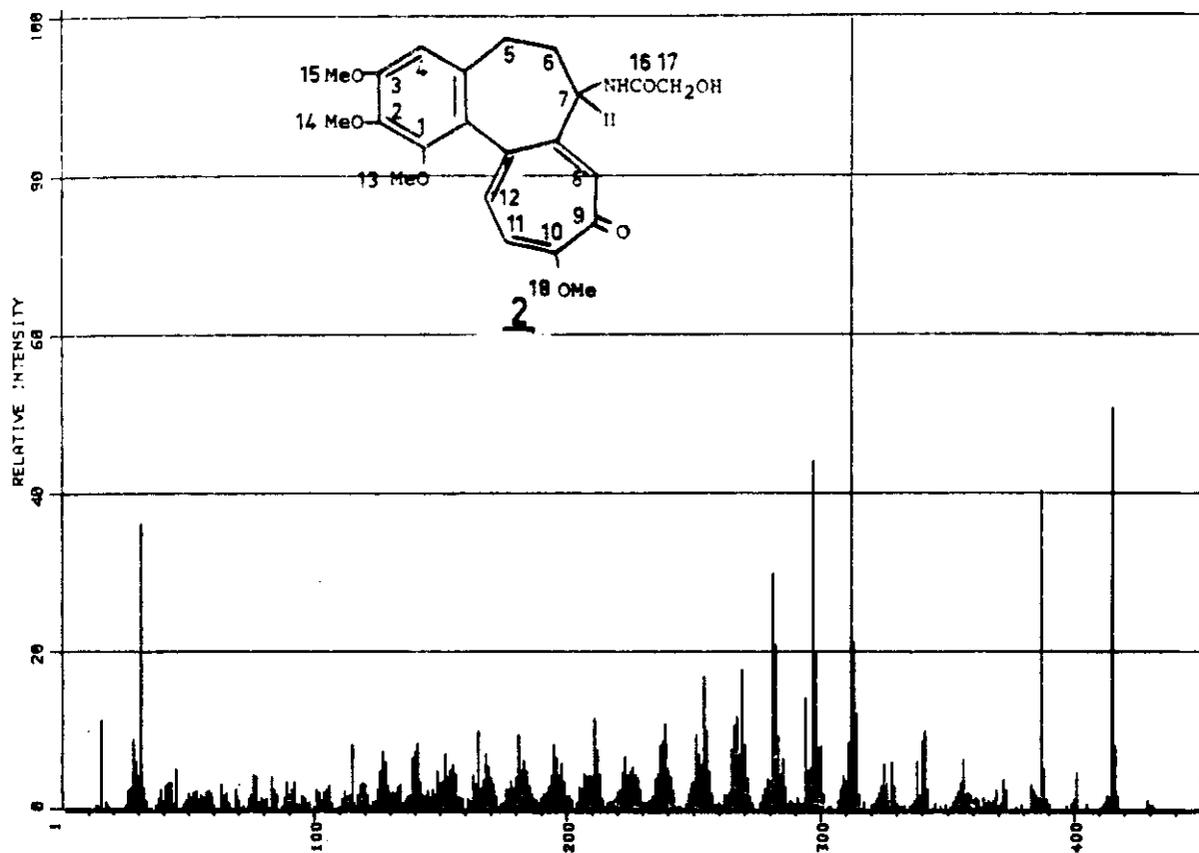
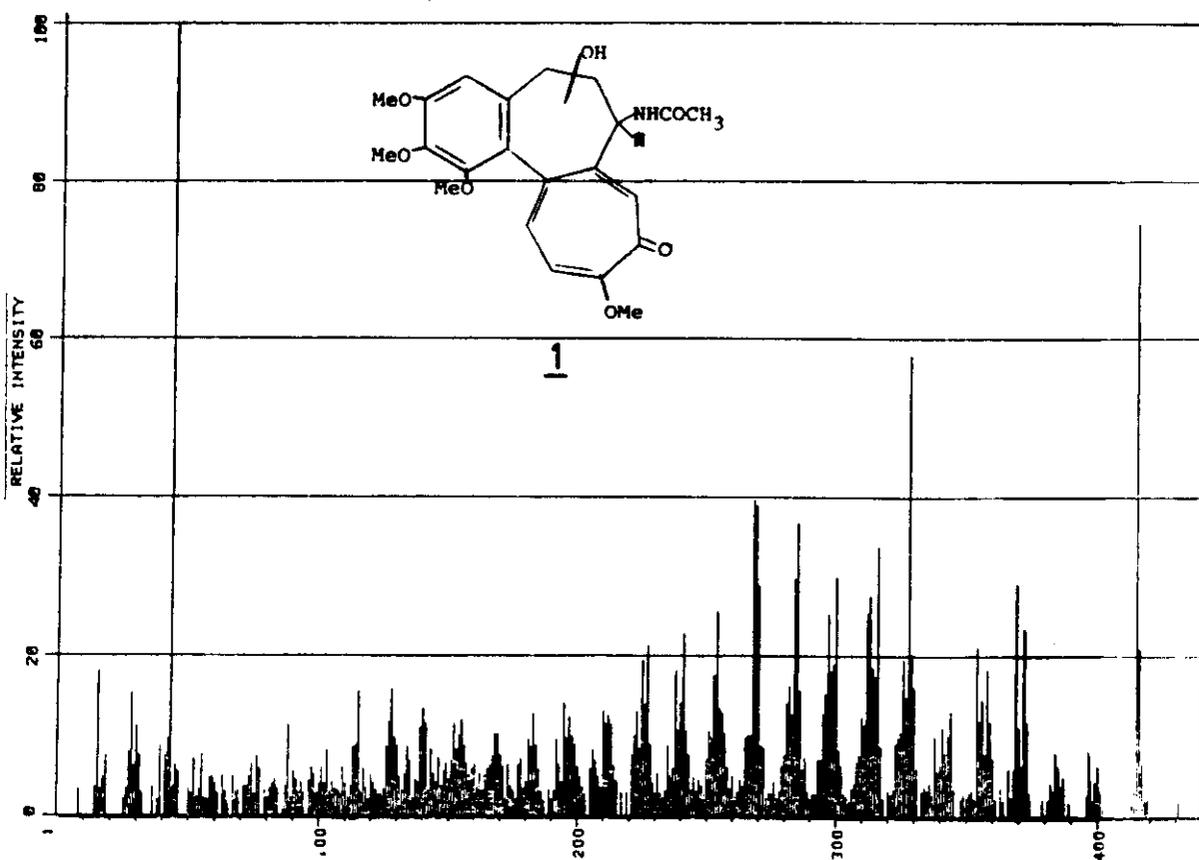


FIG. 2. - Separazione per H.P.L.C. (Hewlett-Packard 1084, colonna Lichrosorb Si-100 Merck) di alcaloidi minori in campioni commerciali di colchicina (10 μg in 50 μl di cloroformio) con i tempi di ritenzione e le aree percentuali. Fase mobile: (A), cloroformio saturo d'acqua, prelavato tre volte con acqua per allontanare l'etanolo usato come stabilizzante; (B), lo stesso cloroformio contenente 5 % di metanolo e in più lo 0,2-0,3 % di acqua per completare la saturazione. Il gradiente inizia da A con il 10 % di B per arrivare al 100 % di B in 20 min, seguito da un isocratico di 10 min e da un ritorno alle condizioni iniziali e di ricondizionamento di 20 min. Lunghezza d'onda del rivelatore fissa a 254 nm, flusso 1 ml/min

Fig. 5. - Spettro di massa dell'alcaloide **2**Fig. 6. - Spettro di massa dell'alcaloide **1**

regione delle basse masse, dove il picco caratteristico per la colchicina è m/z 43 (COMe), per $\underline{2}$ m/z 31 e per $\underline{3}$ nessun picco di particolare intensità. L'alcaloide $\underline{3}$, M^+ 385, è stato identificato come N-formil-deacetil-colchicina, un alcaloide molto noto [3,4] che si ritrova nelle stesse piante che producono colchicina.

L'alcaloide $\underline{2}$, M^+ 415, è risultato essere un nuovo alcaloide, mai isolato da piante del genere colchico, che si differenzia dalla colchicina per la catena laterale in C-7 $NHCOCH_2OH$, invece di $NHCOCI_3$. Questo gruppo glicolico è responsabile del frammento m/z 31 che compare nello spettro di massa di $\underline{2}$ (Fig. 5); che esso sia dovuto al gruppo CH_2OH è stato confermato iniettando nello spettrometro di massa una soluzione di $\underline{2}$ in $CDCl_3$ con una goccia di acqua deuterata. Nello spettro è comparso anche il picco a m/z 32 dovuto allo scambio dell'idrogeno del gruppo ossidrilico con deuterio e inoltre il picco molecolare ed il

picco a 387 (M^+-CO) sono stati fiancheggiati da due picchi, maggiori di una o due unità di massa, dovuti al parziale scambio con deuterio sia dell'OH che dell'NH ammidico.

L'alcaloide più polare $\underline{1}$ ha lo stesso ione molecolare, M^+ 415, di $\underline{2}$, ma un diverso andamento di frammentazione (Fig. 6), il che indica che le variazioni strutturali rispetto alla colchicina non risiedono più nella catena laterale ma in un'altra posizione del sistema tricyclico. Dal tipo di frammentazione ottenuto un gruppo OH dovrebbe essere presente nell'anello B. Oltre ai processi di frammentazione, notati precedentemente, lo ione molecolare per perdita di H_2O e CO dava un picco a m/z 369. Dal suo punto di fusione, 169-171° dec. (da acetato di etile), corrispondente a quello riportato per il β -6-idrossicolchicina, si può ipotizzare che si tratti dello stesso alcaloide isolato da Šantavý dal *C. Latifolium* [5].

BIBLIOGRAFIA

1. GREWE, R. & WULF, W. 1951. Die Umwandlung des Colchicins durch Sonnenlicht. *Chem. Ber.* **84**: 621-625.
2. WILSON, J. M., OHASHI, M., BUDZIKIEWICZ, H., ŠANTAVÝ, F. & DJERASSI, C. 1963. Mass spectrometry in structural and stereochemical problems-XXXIII. *Tetrahedron.* **19**: 2225-2231.
3. ŠANTAVÝ, F. & REICHSTEIN, T. 1950. Isolierung neuer Stoffe aus den Samen der Herbstzeitlose *Colchicum autumnale* L. Substanzen der Herbstzeitlose und ihre Derivate. *Helv. Chim. Acta* **33**: 1606-1627.
4. RAFFAUF, R. F., FARREN, A. L. & ULLYOT, G. E. 1953. Constituents of U.S.P. colchicine: N-formyltrimethylcolchicine acid methyl ether. *J. Am. Chem. Soc.* **75**: 3854.
5. PORĚŠILOVÁ, H., DOLEJŠ, L., SEDMERA, P. & ŠANTAVÝ, F. 1977. Constitution of three alkaloids (10,11-epoxycolchicine, colchicine and 3-demethyl-N-deacetyl-N-formylcolchicine) isolated from the seeds of *Colchicum latifolium* S.S. *Collect. Czech. Chem. Com.* **42**: 1571-1580.

Purificazione dell'acido folinico mediante cromatografia preparativa ad alta efficienza

P. CELLETTI

Laboratorio di Ricerche Analitiche, SIGMA TAU, Pomezia.

PREMESSA.

È stato intrapreso questo studio sul folinico per poter recuperare quelle partite di sintesi che, per cause varie, sono risultate fuori specifiche.

Poiché le tecniche tradizionali di purificazione, da numerose prove effettuate non hanno fornito risultati soddisfacenti, si è reso necessario l'uso della tecnica cromatografica preparativa anche in considerazione dell'alto costo della materia prima. Inoltre, esiste la necessità di dover disporre di standard di lavoro ad elevate purezze nel più breve tempo possibile.

Le nostre prove sono state effettuate su una materia prima con il titolo H.P.L.C. analitico del 66% e microbiologico del 68% come calcio folinato pentaidrato. Dal cromatogramma analitico, si notano 4 gruppi di sostanze, come si vede dalla Fig. 1.

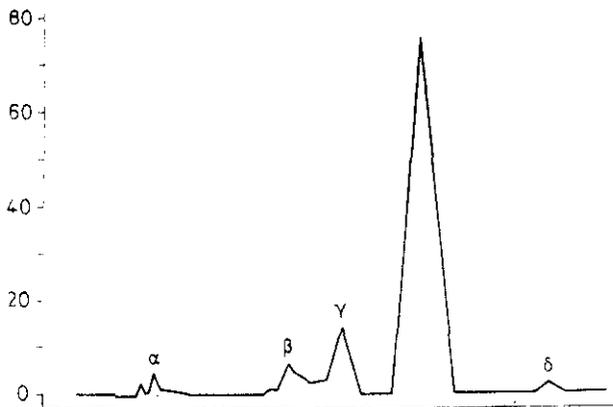


FIG. 1. - Cromatogramma analitico di un lotto di folinato di calcio pentaidrato a titolo 66%. Oltre al picco del folinico si nota la presenza di 4 gruppi di sostanze individuate come α , β , γ , δ

Le percentuali di impurezze sono calcolate rispetto all'area totale, anche in considerazione del fatto che gli spettri delle impurezze sono qualitativamente simili allo spettro del folinico. Inoltre, la somma delle impurezze è complemento ai titoli riscontrati.

PROVE PRELIMINARI

Tabella 1.

1) Fase normale:
Licroprep 15-25 μ (100 g);
Butanolo: acido acetico: acqua = 70: 20: 10.
I prodotti vengono eluiti col fronte del solvente.
2) Fase inversa:
Licroprep RP-8 5-20 μ (100 g);
Acqua: acetone = 99: 1.
Separazione buona.
3) Fase inversa:
Licroprep RP-8 5-20 μ (200 g);
Acqua: acetone = 99,5: 0,5.

La separazione (3) è risultata migliore della precedente e pertanto è stata adottata questa fase mobile, per le successive separazioni, che ha anche il vantaggio di essere estremamente poco costosa.

Non è stato possibile adottare la fase mobile usata in analitica, perché in essa il folinico non è sufficientemente solubile.

PROVE DI PURIFICAZIONE.

Tabella 2.

Condizioni	
Fase stazionaria	Licroprep RP-8 5-20 μ (200 g)
Pressione di impaccamento	8-10 bar
Fase mobile	acqua allo 0,5% in acetone
Pressione fase mobile	6-8 bar
Flusso	16-12 ml/min
Detector	I.R. (solo in un caso si è usato il doppio rivelatore I.R.-U.V.)
Sensibilità	64-32

2 g di materia prima al 67% (pari a 1,34 g di folinico puro), disciolti in circa 10 ml di fase mobile e filtrati, sono stati iniettati e sono state raccolte frazioni da 20 ml usando il doppio detector, ottenendo il cromatogramma di Fig. 2.

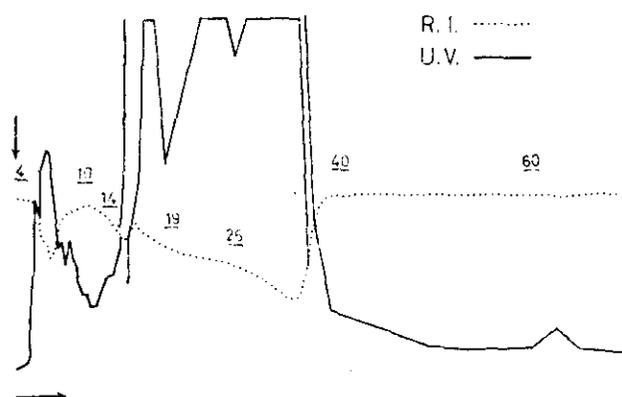


FIG. 2. - Cromatogramma preparativo del folinato di calcio pentaidrato con doppio rivelatore a Indice di rifrazione e Ultra violetto λ 254. Sul grafico sono segnate le varie frazioni da 20 ml che successivamente sono state riunite, concentrate ed analizzate

Tutte le frazioni sono state cromatografate su strato sottile, opportunamente riunite, tirate a secco e titolate mediante H.P.L.C. e titolo microbiologico. Fino alla frazione 14 il folinico è risultato assente (Tab. 3), mentre si sono avuti i titoli di 65% per le frazioni 15-19 (68% H.P.L.C. e 62% microbiologico), 80% per le frazioni 20-26 e 98% per le frazioni 27-40 (H.P.L.C. e microbiologico).

Tabella 3.

Frazione 4-10	mg 189	Folinico assente
Frazione 11-14	mg 116	Folinico assente
Frazione 15-19	mg 241	68% H.P.L.C. - 62% M.B.
Frazione 20-26	mg 500	80% H.P.L.C. - 77% M.B.
Frazione 27-40	mg 867	98% H.P.L.C. e M.B.
Frazione 41-60	mg 24	Folinico assente
Frazione 61-80	mg 12	Folinico assente

In Fig. 3, sono riportati 4 cromatogrammi relativi a quantità crescenti di prodotto iniettato, mentre in Fig. 4, sono riportati i cromatogrammi analitici dei purificati corrispondenti a 4-6-8 g. Altri dati analitici sono esposti in Tab. 4:

Tabella 4.

ANALISI	Prodotto iniziale %	Purificati da 4 g %	Purificati da 6 g %	Purificati da 8 g %
Titolo M.B.	68	98	98	94
Titolo H.P.L.C.	66	99	96	92

Per abbreviare i tempi, tra una iniezione e l'altra si è lavata la colonna con circa 100 ml di T.H.F. all'80%, riuscendo così a portare a termine 3-4 cicli nell'arco della giornata lavorativa.

Sulla stessa colonna, è stato possibile effettuare fino a 5 iniezioni anche in 2 giorni diversi. Le rese sono risultate oscillanti tra 65 e 72%.

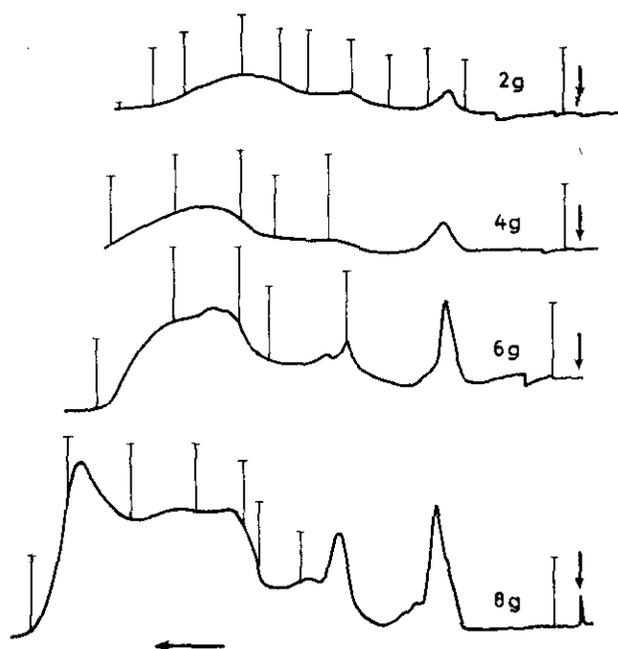


FIG. 3. - Comparazione di cromatogrammi preparativi con rivelatore a Indice di rifrazione, all'aumentare della carica: 1-4-6-8 grammi rispettivamente

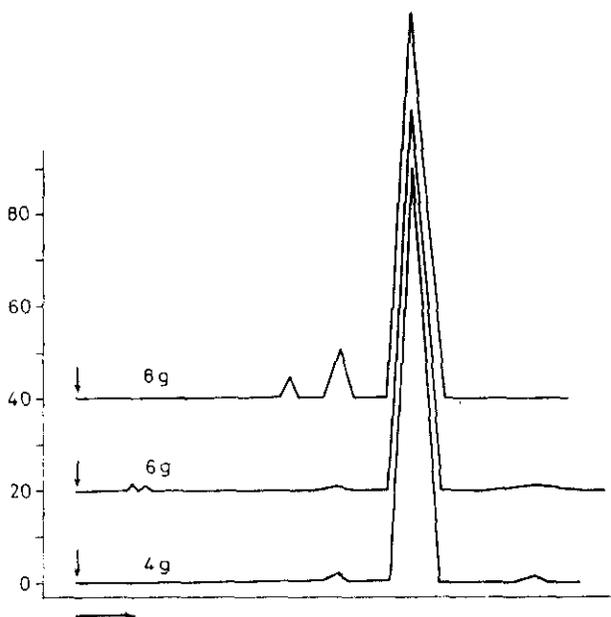


FIG. 4. - Cromatogrammi analitici del prodotto purificato. Al variare della carica iniziale, 4-6-8 g rispettivamente, diminuisce la purezza del prodotto ottenuto

Per la preparazione dello standard, si è ovviamente partiti da un folinico in specifica.

Considerata conclusa la fase di messa a punto, è stata eseguita una serie di purificazioni su vari lotti.

Tabella 5.

STRUMENTAZIONE:	
H.P.L.C. Analitico	Waters pompa 6000 - rivelatore 440 a $\lambda = 254$ nm
H.P.L.C. Preparativo	Jobin Yvon Chromatospac Prep. 100
I.R.	Knauer
U.V.	Beckman LC 25

Esempi di criteri di purezza di farmaci steroidei

G. CAVINA (a), G. MORETTI (a), R. ALIMENTI (a), B. GALLINELLA (b), R. PORRÀ (c) e L. VALVO (b)

(a) Laboratorio di Chimica del Farmaco; (b) Ospite presso il Laboratorio di Chimica del Farmaco, Istituto Superiore di Sanità, Roma; (c) Ospite presso l'Istituto di Fisiologia Generale dell'Università degli Studi, Roma

Gli esempi che qui si riportano sono due, per i quali si utilizza la stessa metodica di base, un procedimento di H.P.L.C. su colonne di acido silicico da 10 o 5 μm , eluizione a gradiente da CHCl_3 esente da alcool, saturo di acqua, a CHCl_3 esente da alcool, saturo di acqua con il 5% di MeOH, miscela questa resa anch'essa satura di acqua (gradiente lineare di 20 min, flusso 1 ml/min con adeguato ricondizionamento della colonna).

Il primo esempio riguarda la possibilità di mettere in rilievo profonde alterazioni anche in una miscela

complessa di corticosteroidi, quale quella costituita da un estratto di corteccia surrenale per uso farmaceutico, quando questo venga preparato allo stato liofilizzato in modo non appropriato e sottoposto a prove di stabilità accelerata (35 gg a 45°). Il procedimento di H.P.L.C. da noi studiato consente di ottenere una buona separazione per i principali corticosteroidi naturali, come è illustrato nella Fig. 1, e di determinare singolarmente il titolo di ciascun corticoide [1].

Nel caso studiato il titolo in corticosteroidi totali, analizzati con il metodo al B.T., era di 900,5 $\mu\text{g}/\text{fiala}$

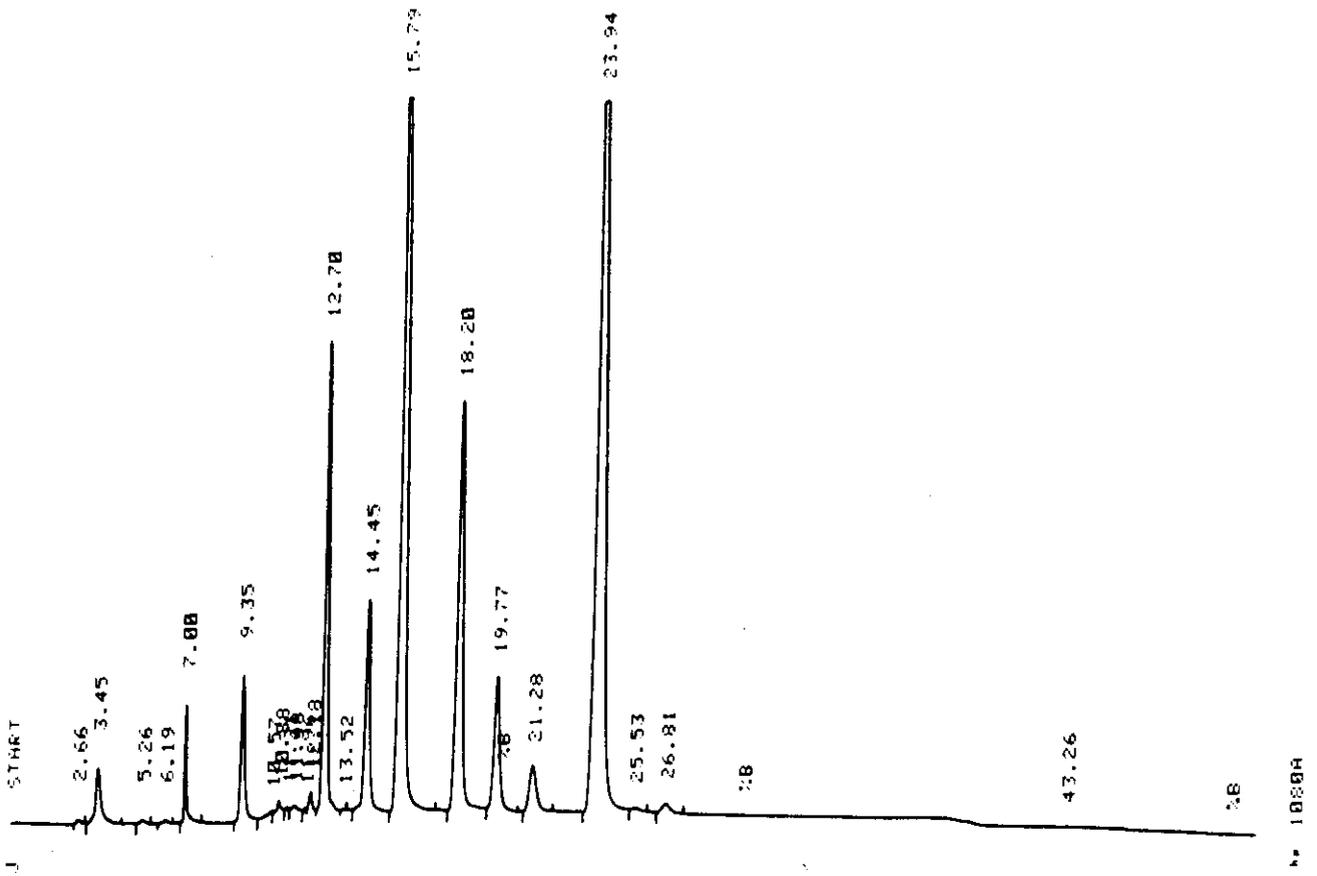


FIG. 1. - Cromatogramma di una miscela di corticosteroidi di riferimento. 20 μg in 100 μl . - Colonna: LiChrosorb Si-100/10 μm . - Flusso: 1 ml/min; Gradiente: A) Cloroformio esente da etanolo, saturo di acqua e B) 5% metanolo e 0,3% di acqua nello stesso solvente, lineare da 10% di B in A a 100% di B in 20 min seguito da 10 min di isocratico con 100% di B e ritorno a 10% di B in 5 min; Velocità della carta: 0,5 cm/min; Attenuazione: 28 : 1 cm = 256×10^{-4} A.U. La successione dei picchi è la seguente (t.r. in min): 9,35 min: desossicorticosterone; 12,70 min: 11-deidrocorticosterone; 14,45 min: 11-desossicortisolo; 15,79 min: corticosterone; 18,20 min: cortisone; 19,77 min: aldosterone; 21,28 min: sconosciuto; 23,94 min: cortisolo

liofilizzata e di 889,6 $\mu\text{g}/\text{fiala}$ con il metodo dell'assorbimento nell'U.V.; il contenuto in singoli corticosteroidi risultante con il nostro metodo cromatografico è riportato in Tab. 1. Inizialmente il totale era l'87,21% sul trovato U.V. (889,6 μg) e dopo l'esperimento scen-

Tabella 1. - Valutazione del contenuto in corticosteroidi di una preparazione farmaceutica di estratto corticosurrenale liofilizzato.

STEROIDE	Contenuto iniziale μg	Contenuto dopo 35 gg. a 45° μg
11-deidrocorticosterone	124,70	—
11-desossicortisolo	25,78	—
Corticosterone	185,64	183,38
Cortisone	122,35	—
Aldosterone	14,53	—
Idrocortisone	302,84	30,88
TOTALE ...	775,84	214,26

deva al 24,08%. Le profonde alterazioni che si verificano nell'estratto sono immediatamente evidenziate dal cromatogramma H.P.L.C. (Fig. 2) ed i risultati analitici indicano chiaramente l'entità della trasforma-

zione (corticosteroidi U.V. assorbenti totali 578,75 μg su 889,6: 65,0%; B.T. totali 200,64 μg su 900,5; 22,28%).

Il secondo esempio riguarda la valutazione delle impurezze presenti in un campione di idrocortisone e il confronto di un metodo L.C. con quello basato sulla T.L.C. attualmente prescritto dalla F. Eur. e analogamente dalla F.U. VIII.

L'applicazione del nostro procedimento di eluizione a gradiente al problema analitico indicato è mostrata nella Fig. 3 (cromatogramma ottenuto con 100 μg di idrocortisone). Limitando al momento attuale le nostre considerazioni alla individuazione dei picchi ed al confronto dei due procedimenti cromatografici, si può affermare che questi consentono una valutazione pressoché parallela delle impurezze presenti in questo campione di steroide, come risulta dai dati presenti nella Tab. 2.

Per quanto concerne le applicazioni quantitative del procedimento L.C., il discorso, specie a livello normativo, deve farsi più complesso. Un possibile approccio sperimentale potrebbe essere il seguente, articolato in vari punti, come di seguito esposto:

a) *Quantità del campione da iniettare.* L'importanza di stabilire questo dato deriva in primo luogo da considerazioni che sono principalmente di tipo cromatografico e precisamente: natura del sistema da separare (sostanza + impurezze); necessità di un compromesso fra riduzione del carico in colonna che migliora la risoluzione e necessità di non scendere a valori tali da far correre il rischio di perdere i picchi minori (aree troppo

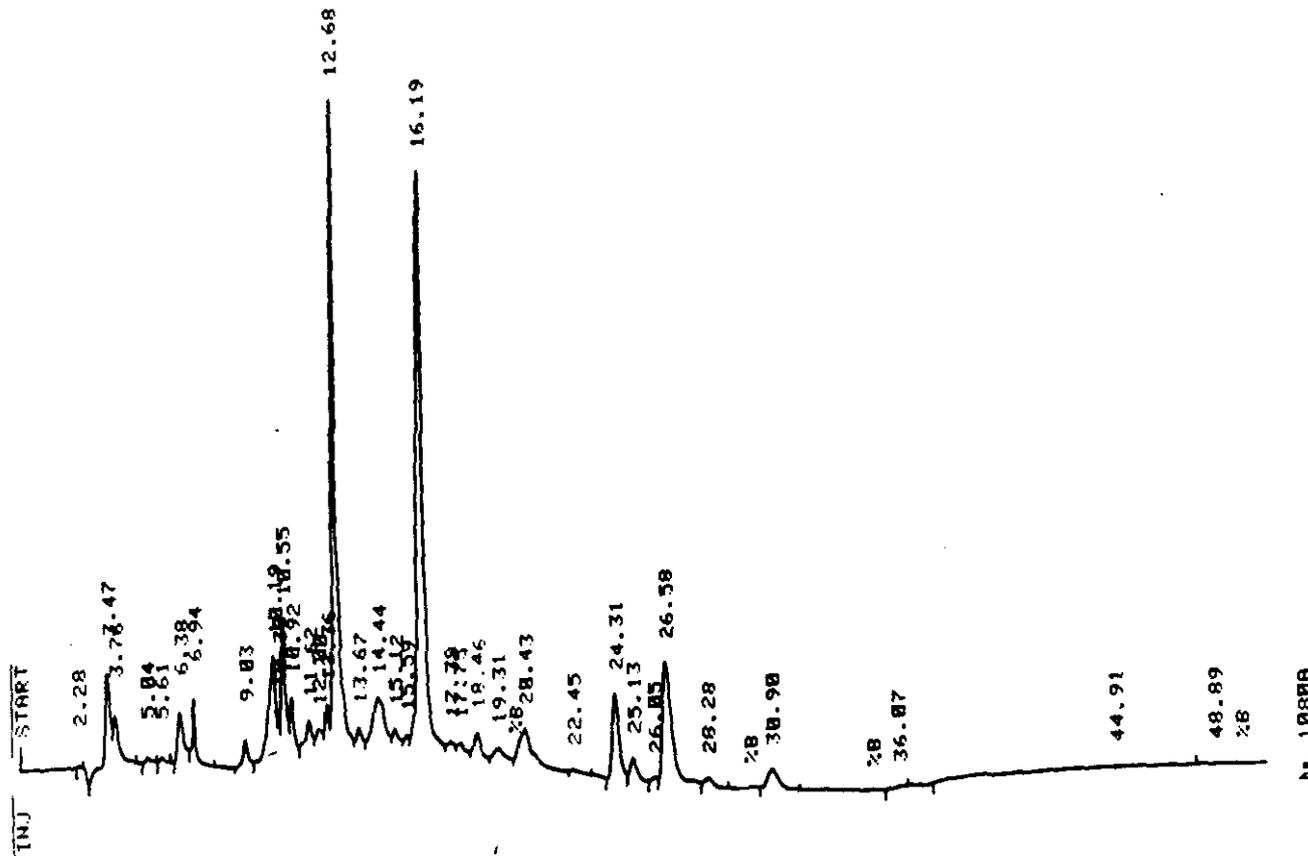


Fig. 2. - Cromatogramma di un Estratto corticale liofilizzato dopo la prova di stabilità accelerata. Condizioni di analisi come in Fig. 1. Si nota la scomparsa pressoché totale dei picchi del cortisone, cortisolo, aldosterone; si nota il picco a 16,19 min identificato per corticosterone, relativamente stabile

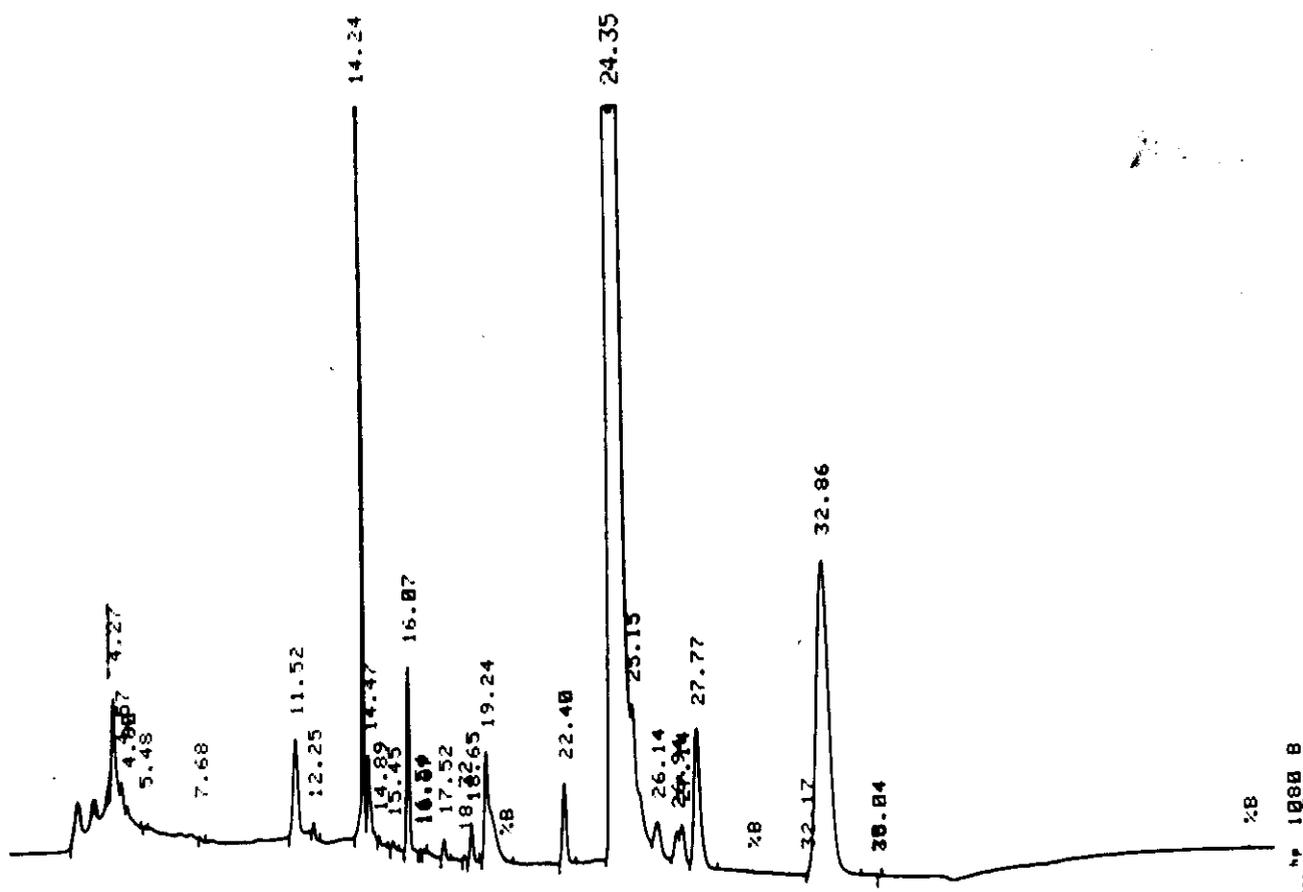


FIG. 3. - Cromatogramma di un campione di Idrocortisone; 100 μg in 50 μl . Condizioni di analisi come in Fig. 1, ma con attenuazione 27 : 1 $\text{cm} = 128 \times 10^{-4}$ A.U. colonna Si-100 5 μm . Per la valutazione orientativa dei picchi secondari e per la correlazione con la T.L.C. vedi Tab. 2

basse o profilo non integrabile), in tal caso conducendo ad un miglioramento artificioso del titolo del prodotto (se si lavora in area %). In secondo luogo, occorre tenere conto della rivelabilità della sostanza (assorbanza nell'U.V. nel caso più generale di uso di un rivelatore di assorbimento ottico nell'U.V.) e della linearità della risposta del rivelatore nell'U.V.: bisogna tenere conto ancora delle caratteristiche dell'integratore, se questo

è in dotazione. Si fa osservare che esisterà facilmente il rischio di una disparità di capacità di valutazione nel fare l'area % fra il picco principale vicino al 100 % ed i picchi minori compresi attorno all'1 % ed allo 0,1 %. Converterà, per una valutazione orientativa con questo procedimento, scegliere un valore di quantità di campione da iniettare, per il quale la risposta del sistema rivelatore-integratore sia lineare nell'intervallo

Tabella 2. - Osservazioni sulle prove di purezza con steroidi (campione: idrocortisone F.U.).

LIVELLO INIEZIONE μg	Picchi considerati				Osservazioni In T. L. C. Rf macchie corrispondenti
	Tr. min.	Numero battute	Area %	Area % picchi considerati	
100/100 μl	14,24	25.240	0,407	0,410	0,41 (tracce)
	19,24	19.520	0,315	0,317	0,32 (tracce)
	22,40	15.780	0,255	0,256	0,27 (< 0,5 %)
	24,33	5.886.000	94,934	95,633	0,21
	27,77	53.700	0,866	0,872	0,15 (0,5-1 %)
	32,86	154.500	2,492	2,510	0,12 (1-2 %)
	—	6.154.740	99,269	99,998	—

da 1 a 1000 per avere risposte ottimali in accuratezza (p. es., battute da 1000 a 1.000.000 o da 10.000 a 10.000.000).

b) *Procedimenti di calcolo dei titoli del campione e delle impurezze.* Al punto a) si è delineato come venga individuato un profilo evidenziabile di impurezze. Per valutare queste, un primo procedimento potrebbe essere quello di determinare per via cromatografica il titolo del composto principale contro uno standard puro ed ufficialmente definito, mediante procedimenti usuali (standard esterno o interno) e quindi per differenza la somma delle impurezze (procedimento simile a quello del Single Steroid Assay dell'U.S.P. XIX). In alternativa, le impurezze potrebbero essere determinate singolarmente contro uno standard di prodotto in studio, opportunamente diluito per ragioni di linearità della risposta e di maggior accuratezza di valutazione (procedimento simile a quello adottato dalla F. Eur. nei confronti in T.L.C.). La condizione ideale sarebbe quella di conoscere esattamente la natura di

tutte le impurezze, di poter disporre di esse e quindi sarebbe possibile riferire un campione ad una miscela standard in cui entrano le varie impurezze, che vengono così valutate singolarmente e più accuratamente in base alle loro assorbanze specifiche che possono essere molto diverse da quella del composto principale, come possono essere le lunghezze d'onda dei massimi d'assorbimento. Occorre quindi fissare la o le lunghezze d'onda alle quali operare con il rivelatore spettrofotometrico o forzatamente con quello a λ fissa. A tutto ciò deve essere fatta una necessaria premessa: al discorso quantitativo, al quale si è posto l'accento, deve essere sempre fatto precedere quello qualitativo, o di individuazione dei composti apparentati, che potrà richiedere una pluralità di condizioni operative cromatografiche, la quale dovrebbe comprendere almeno un sistema cromatografico a fase diretta ed uno a fase inversa. La pluralità è necessaria anche per escludere la presenza di picchi dovuti ad artefatti analitici, picchi che possono originarsi attorno ad un picco principale in condizioni operative critiche.

BIBLIOGRAFIA

1. CAVINA, G., MORETTI, G., ALIMENTI, R. & GALLINELLA, B. 1979. Analysis of natural corticosteroids in adrenal extracts and in biological fluids by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* **175**: 125-140.