

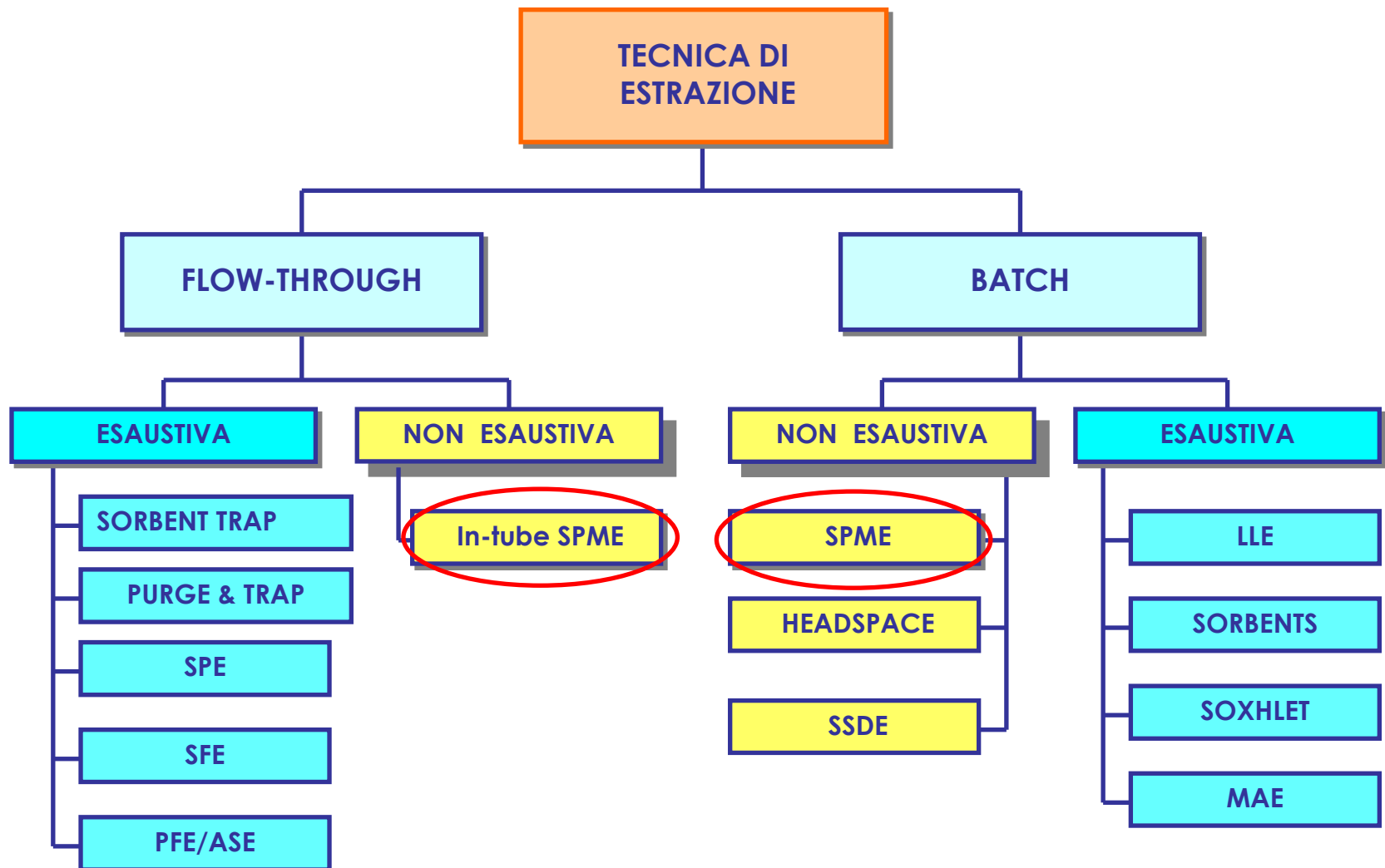
# Tecniche di estrazione usate in Chimica Analitica

Nonostante la strumentazione analitica attualmente disponibile abbia raggiunto livelli di sensibilità elevatissimi molto spesso si rende necessario **estrarre e, contestualmente, pre-concentrare un particolare analita a partire dalla matrice in cui è disciolto.**

Tale obiettivo può essere raggiunto attraverso una serie molto variegata di approcci, che possono essere suddivisi in due grandi categorie:

- ✓ **flow-through**: la soluzione contenente l'analita fluisce continuamente sul mezzo/attraverso il mezzo destinato a concentrarlo;
- ✓ **batch**: il mezzo di estrazione viene introdotto all'interno della soluzione di analita.

Ciascuna delle due categorie si suddivide in altrettante tipologie, a seconda che l'analita venga estratto completamente o parzialmente: **procedura esaustiva/non esaustiva.**

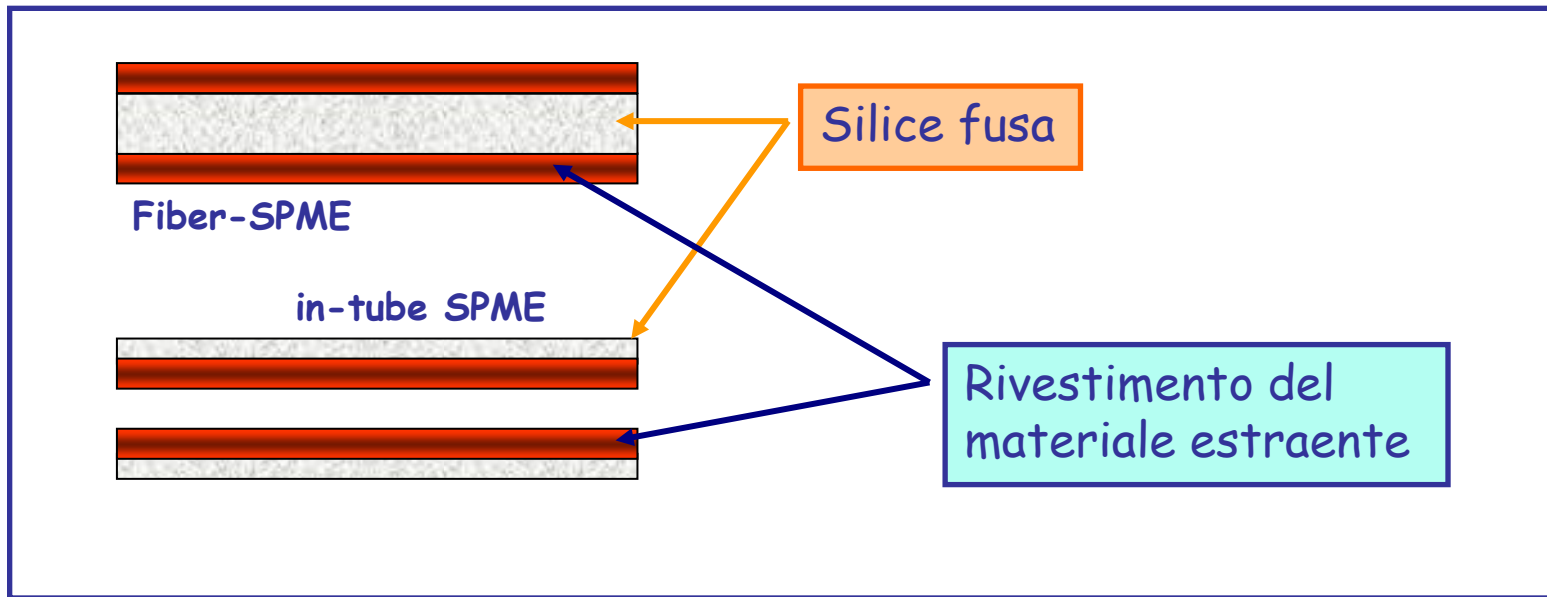


Acronimi usati per i diversi tipi di estrazione (E finale = extraction):

LLE = liquid-liquid; SPE = solid-phase; SFE = supercritical fluid; PFE = pressurized fluid; ASE = accelerated solvent; MAE = microwave assisted; SSDE = single solvent drop; SPME = solid phase micro-extraction

## Micro-Estrazione in Fase Solida (SPME)

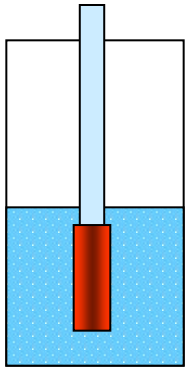
Il principio su cui si basa la tecnica SPME è l'estrazione dell'analita d'interesse dalla matrice mediante un materiale per il quale l'analita abbia un'affinità, tipicamente depositato su una fibra (*fiber SPME*) o all'interno di un capillare (*in-tube SPME*) realizzati in silice fusa:



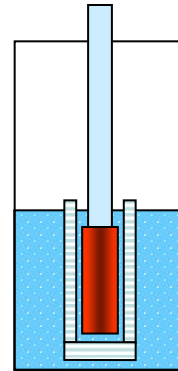
L'interazione fra analita e materiale estraente è analoga a quella che si manifesta in cromatografia, tipicamente un **adsorbimento** o una **ripartizione**.

## Modalità di estrazione in SPME

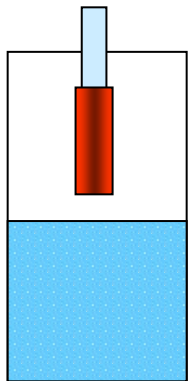
Esistono **tre modalità fondamentali** per effettuare un'estrazione SPME con fibra:



**Direct SPME:** la fibra viene immersa direttamente all'interno della matrice (liquida, di solito)

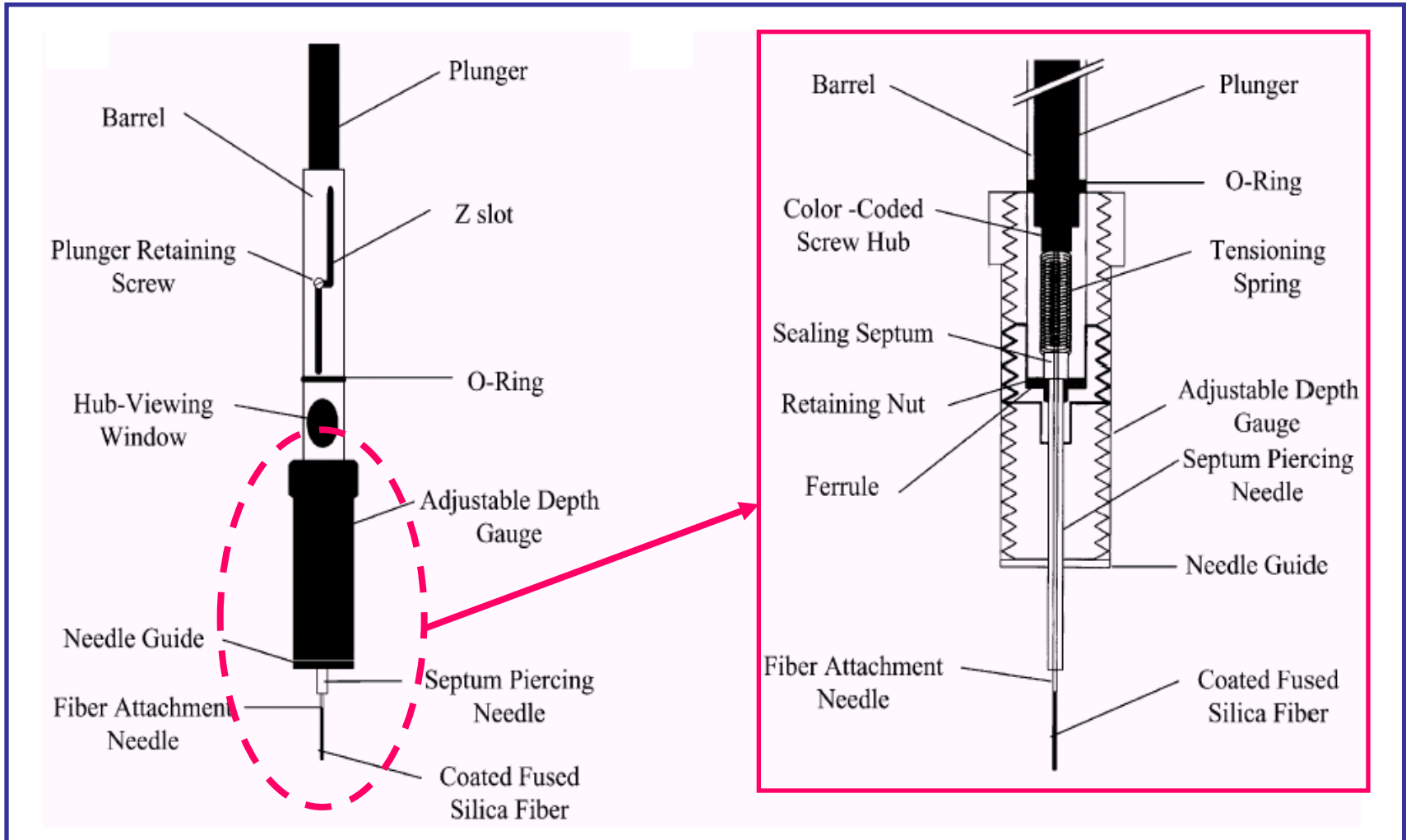


**Membrane SPME:** una membrana protegge la fibra dall'adsorbimento di macromolecole che potrebbero interferire con l'estrazione

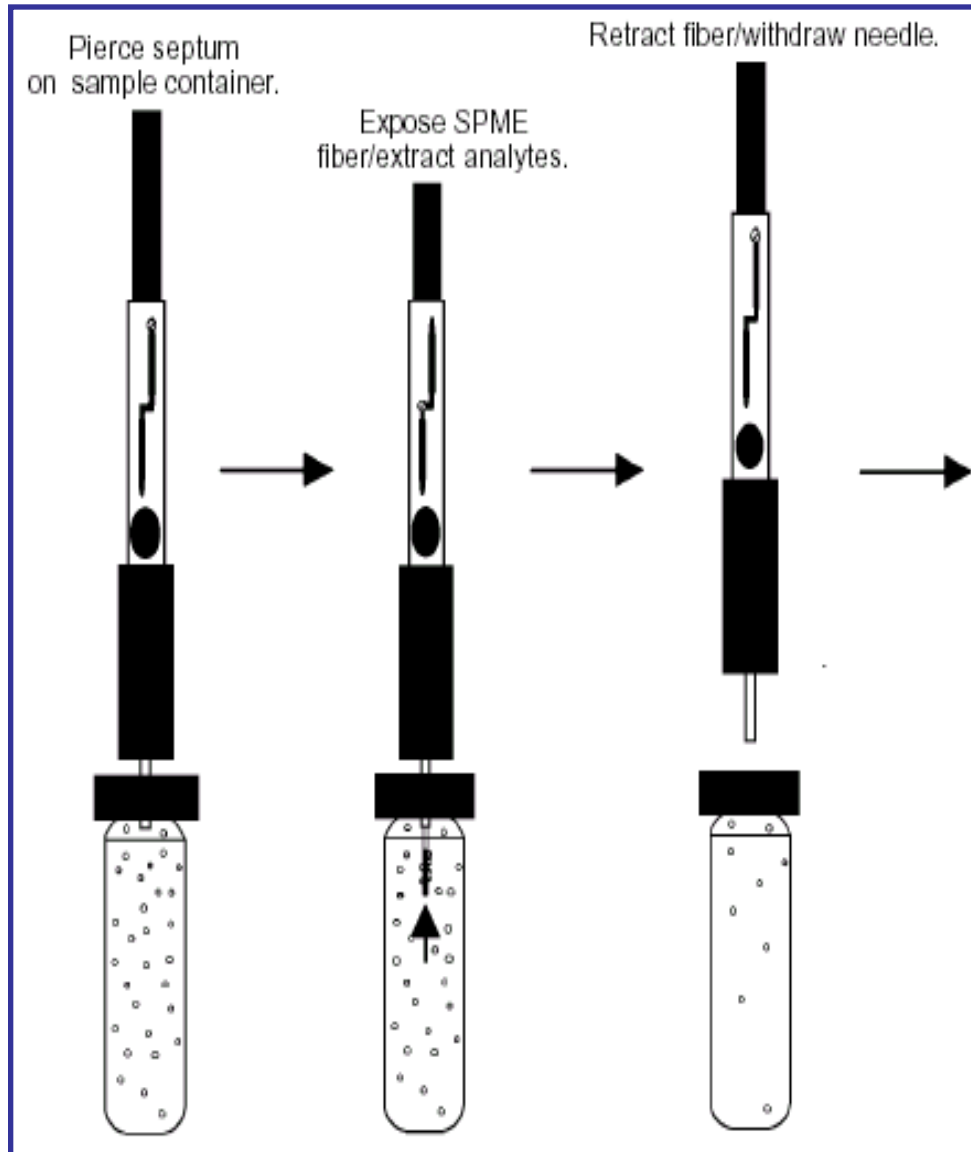


**Headspace SPME:** la fibra viene immersa nel volume sovrastante la matrice all'interno di un contenitore chiuso. Tale volume rappresenta lo "spazio di testa" (**headspace**), nel quale si raccolgono gli analiti più volatili, che si distribuiscono fra le fasi liquida (o solida) e gassosa a contatto. Eventualmente lo spazio di testa può essere confinato, ossia separato dalla fase liquida prima dell'estrazione.

La fibra è solitamente montata su un opportuno dispositivo meccanico, che permette la sua estrusione da un ago utilizzato per forare temporaneamente il setto siliconico che limita il contenitore contenente il campione:



## Procedura di estrazione da matrice liquida



La fibra viene inserita all'interno di un recipiente chiuso, riempito completamente (o parzialmente) con la matrice e tipicamente provvisto di un tappo con setto simile a quelli usati negli iniettori GC.

L'ago del dispositivo SPME viene infilato attraverso il setto, poi la fibra viene fatta passare attraverso la cavità dell'ago fino ad essere immersa nella soluzione (o nello spazio di testa).

Al termine della fase di estrazione la fibra viene ritirata all'interno dell'ago e questo viene estratto dalla soluzione e sfilato attraverso il setto.

## Materiali estraenti impiegati in SPME

Numerosi materiali vengono impiegati in SPME per l'estrazione di analiti, differenziandosi per **natura chimica, tipo di ricoprimento, polarità e spessore**. I principali sono riportati nella seguente figura:

### Films - **A**bsorbimento:

Coating	Type	Polarity
7 $\mu\text{m}$ Polydimethylsiloxane (PDMS)	Absorbent	Nonpolar
30 $\mu\text{m}$ PDMS	Absorbent	Nonpolar
100 $\mu\text{m}$ PDMS	Absorbent	Nonpolar
85 $\mu\text{m}$ Polyacrylate (PA)	Absorbent	Polar
60 $\mu\text{m}$ PEG (Carbowax)	Absorbent	Polar



### Particelle - **A**dsorbimento:

Coating	Type	Polarity
85 $\mu\text{m}$ Carboxen-PDMS	Adsorbent	Bipolar
65 $\mu\text{m}$ PDMS-DVB	Adsorbent	Bipolar
55 $\mu\text{m}$ /30 $\mu\text{m}$ DVB/Carboxen-PDMS	Adsorbent	Bipolar



Il Carboxen è un materiale brevettato, a base di carbonio, utilizzato per l'estrazione di composti relativamente poco polari.

## SPME in condizioni di equilibrio

Il caso più generale dell'SPME in condizioni di equilibrio prevede la presenza della fibra nello spazio di testa.

In questa circostanza l'analita si distribuirà in tre fasi: matrice, spazio di testa e fibra (materiale estraente).

L'equazione del suo bilancio di massa, all'equilibrio, sarà quindi:

$$C_0 V_s = C_c^\infty V_c + C_h^\infty V_h + C_s^\infty V_s$$

dove:

$C_0$  = concentrazione iniziale nella matrice

$C_c^\infty$ ,  $C_h^\infty$ ,  $C_s^\infty$  = concentrazioni all'equilibrio dell'analita nel rivestimento della fibra (c = coating), nello spazio di testa (h = headspace) e nel campione (s = sample)

$V_c$ ,  $V_h$ ,  $V_s$  = volumi delle tre fasi (nel caso della fibra si tratta del volume di materiale estraente).





Se si introducono i coefficienti di distribuzione fra le fasi:

$$K_{ch} = C_c^\infty / C_h^\infty$$

$$K_{hs} = C_h^\infty / C_s^\infty$$

la massa di analita estratta nel rivestimento della fibra:


$$n = C_c^\infty V_c$$

può essere espressa come:

$$n = K_{ch} C_h^\infty V_c = K_{ch} K_{hs} C_s^\infty V_c$$

Moltiplicando e dividendo per  $C_0 V_s$  e sostituendo al denominatore l'espressione di  $C_0 V_s$  vista in precedenza si ottiene:

$$\frac{K_{ch} K_{hs} C_s^\infty V_c C_0 V_s}{C_c^\infty V_c + C_h^\infty V_h + C_s^\infty V_s} = \frac{K_{ch} K_{hs} \cancel{C_s^\infty} V_c C_0 V_s}{K_{ch} K_{hs} \cancel{C_s^\infty} V_c + K_{hs} \cancel{C_s^\infty} V_h + \cancel{C_s^\infty} V_s}$$


$$C_0 V_s$$

Introducendo, inoltre, la costante apparente relativa all'equilibrio fra il rivestimento estraente e la soluzione contenente l'analita:

$$K_{cs} = K_{ch} K_{hs}$$

l'equazione di  $n$  si può semplificare nella forma:

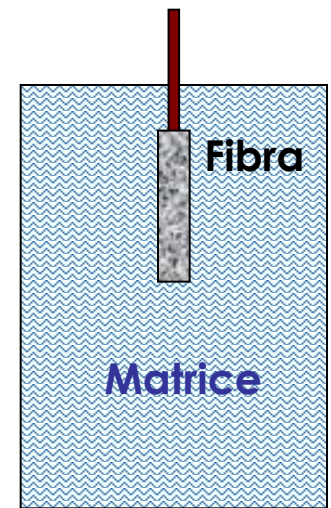
$$n = \frac{K_{cs} V_c C_0 V_s}{K_{cs} V_c + K_{hs} V_h + V_s}$$



La quantità di analita estratta dalla fibra all'equilibrio, a parità dei parametri sperimentali (volumi delle varie fasi in gioco) e termodinamici (coefficienti di distribuzione), dipende linearmente dalla concentrazione di analita nel campione.

Nel caso in cui sia **assente** lo spazio di testa l'equazione per  $n$  diventa:

$$n = \frac{K_{cs} V_c C_0 V_s}{K_{cs} V_c + \cancel{K_{hs} V_h} + V_s} \quad \longrightarrow \quad n = \frac{K_{cs} V_c C_0 V_s}{K_{cs} V_c + V_s}$$



Se il termine  $K_{cs} V_c$  è trascurabile rispetto a  $V_s$ , il che accade:

- ☞ se il volume di campione è molto maggiore di quello del ricoprimento della fibra
- ☞ se il coefficiente  $K_{cs}$  è molto piccolo (il che significa che la quantità di analita estratto è trascurabile rispetto a quella nel campione)

l'equazione si semplifica ulteriormente:

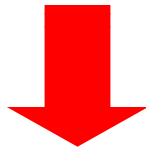
$$n = K_{cs} V_c C_0$$

Nel **caso inverso, molto raro**, l'equazione si trasforma in una relazione che rappresenta la **microestrazione esaustiva**:

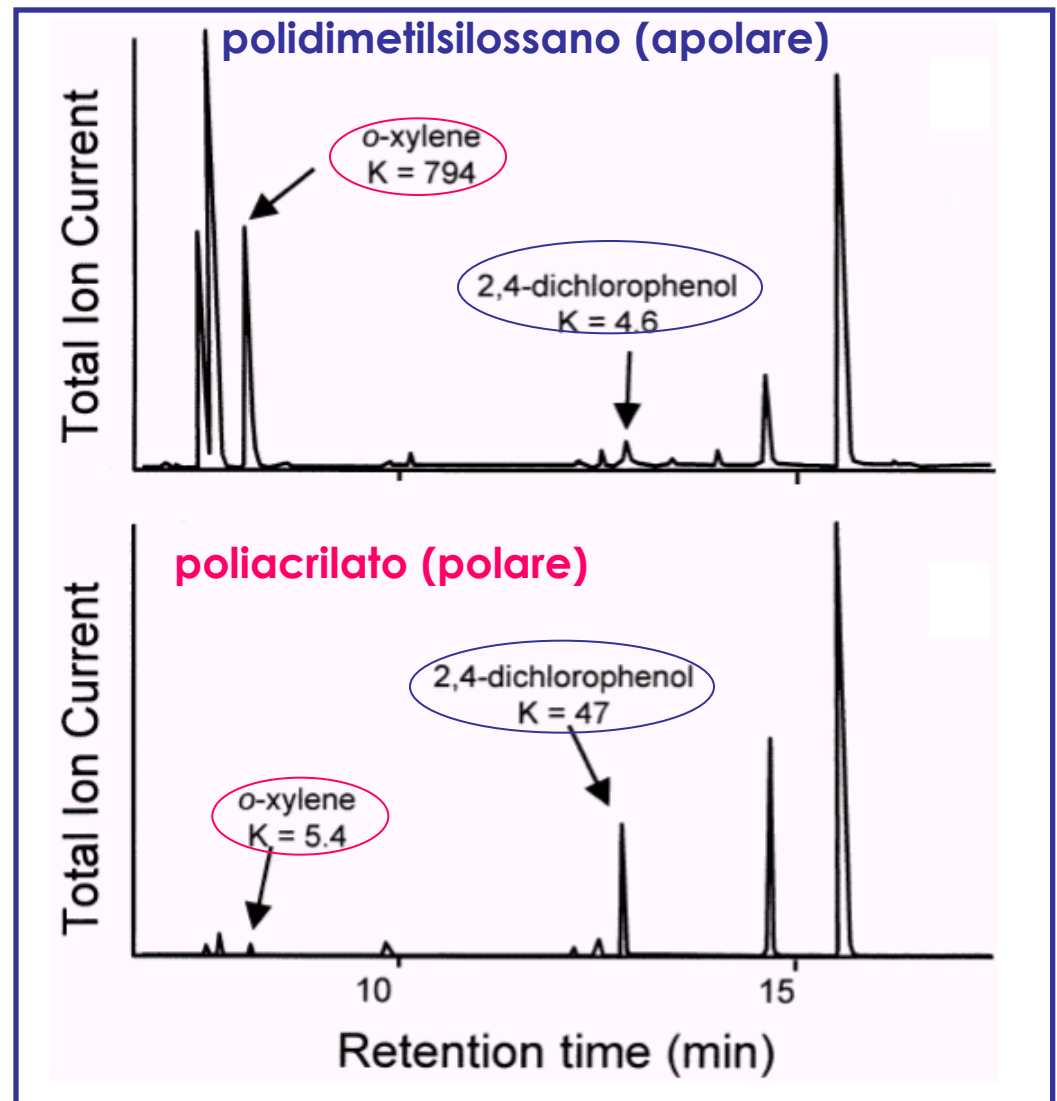
$$n \approx V_s C_0$$

$$n = \frac{K_{cs} V_c C_0 V_s}{K_{cs} V_c + V_s}$$

$$n = K_{cs} V_c C_0$$



Le equazioni che esprimono n mostrano chiaramente che la costante  $K_{cs}$ , e quindi la natura del materiale estraente, influisce sulle quantità dei diversi analiti estratti da una matrice complessa, come evidenziato nella figura a destra.



Cromatogrammi GC-MS (modalità TIC) relativi all'estratto SPME di una soluzione acquosa contenente benzene, toluene, etilbenzene, o, m, p-xileni (BTEX) e 2,4-diclorofenolo.

## SPME in condizioni di non equilibrio

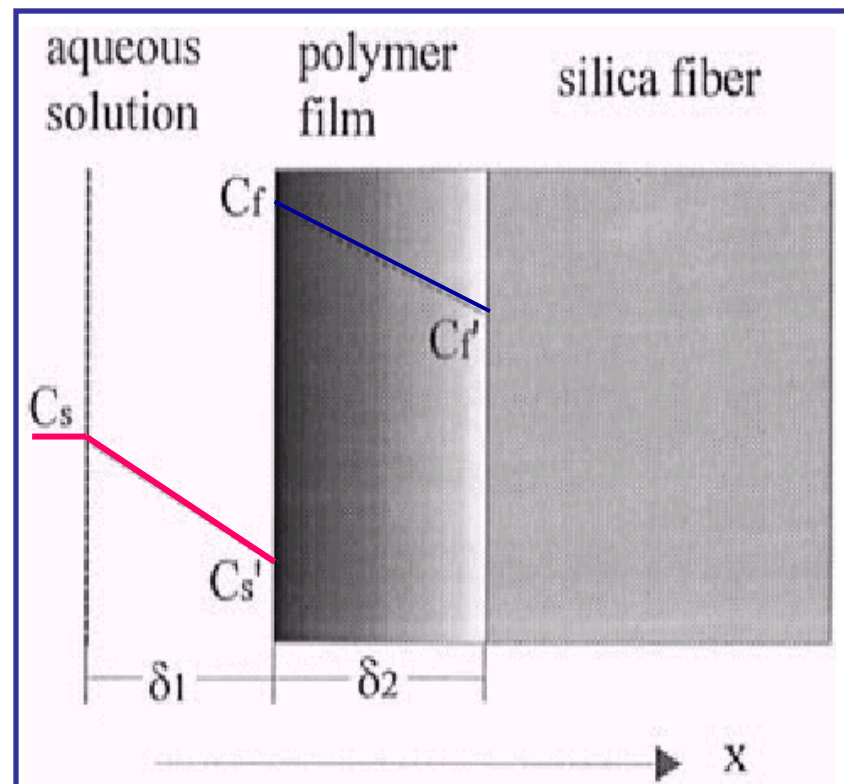
Per ridurre i tempi di estrazione di un analita si preferisce spesso effettuare la procedura SPME in condizioni di non equilibrio.

### Estrazione da una fase liquida

Si creano gradienti lineari di concentrazione nelle due fasi a contatto (soluzione acquosa e film di materiale estraente)

Il numero di moli estratte nell'unità di tempo per unità di superficie è dato dalle equazioni (1<sup>a</sup> Legge di Fick):

$$\frac{1}{A} \frac{dn}{dt} = \frac{D_1}{\delta_1} (C_s - C_s') = \frac{D_2}{\delta_2} (C_f - C_f')$$



In cui  $D_1$  e  $D_2$  rappresentano i coefficienti di diffusione dell'analita nella soluzione e nel materiale estraente, rispettivamente.

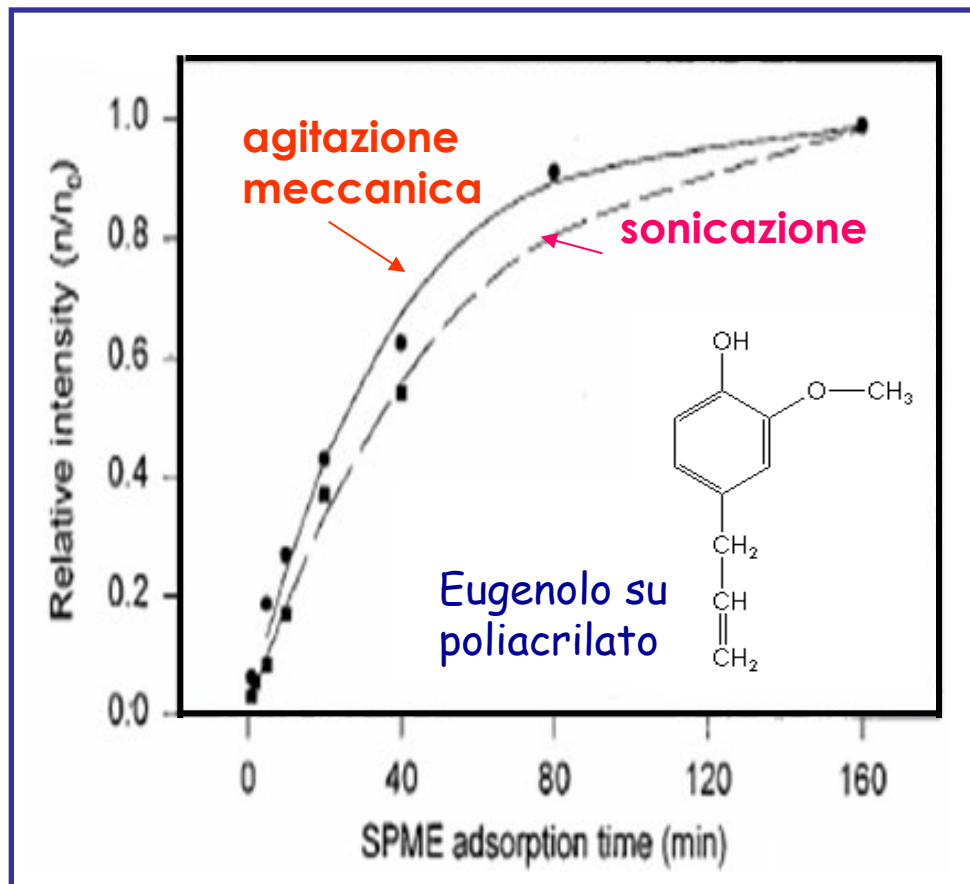
L'equazione differenziale può essere risolta considerando le **condizione al contorno**  $n = 0$  per  $t = 0$  e  $n = n_0$  per  $t = \infty$  e se ne ottiene la relazione:

$$n = n_0 [1 - \exp(-at)]$$

in cui:

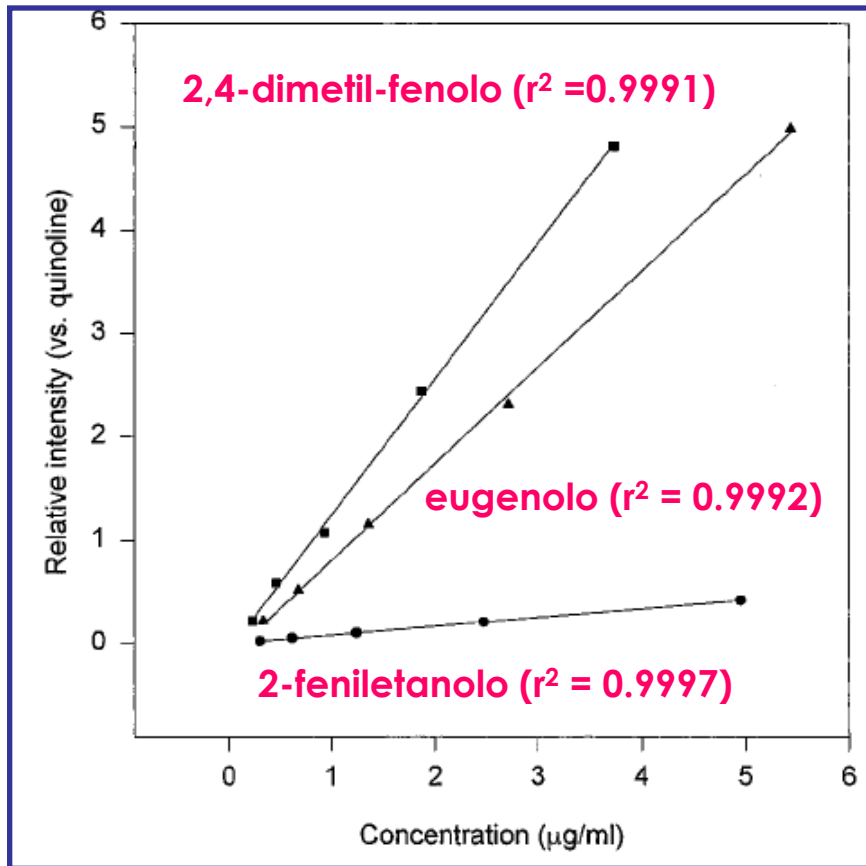
$n_0$  è, di fatto, il numero di moli di analita estratte all'equilibrio

$a$  è una **costante** dipendente dai valori di  $D$  e  $\delta$ , dalla costante di equilibrio fra le due fasi a contatto, dalle dimensioni fisiche della matrice e del film estraente.



Sperimentalmente si osserva un aumento iniziale della quantità di analita estratto. A tempi elevati la curva tende asintoticamente al valore  $n_0$ . **La sua forma** (dovuta al parametro  $a$ ) dipende fortemente anche dalle condizioni di agitazione della soluzione in cui è immersa la fibra. In particolare, la pendenza iniziale della curva aumenterà all'aumentare della convezione.

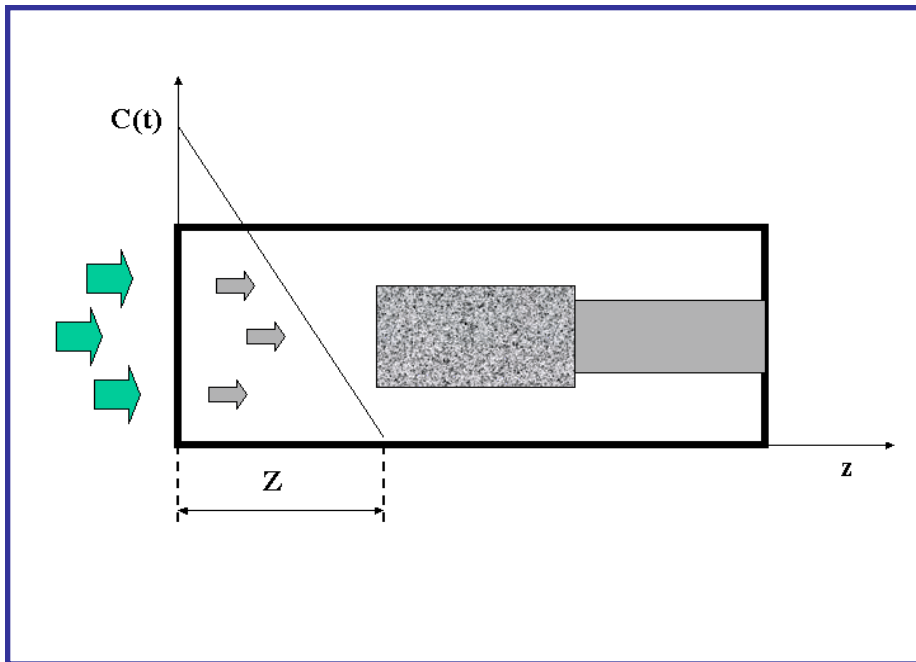
L'estrazione SPME in condizioni di non equilibrio deve essere effettuata controllando rigorosamente il tempo di estrazione e le condizioni sperimentali (agitazione, temperatura) in modo da garantire la riproducibilità dell'estrazione.



Rette di regressione ottenute dopo SPME (con film di poliacrilato) effettuata su soluzioni di tre composti usando l'agitazione meccanica (ancoretta magnetica) e per un tempo di 10 minuti.

## Impiego di una fibra SPME come campionatore passivo

Una fibra SPME può essere particolarmente utile quando sia necessario **campionare un analita in un'atmosfera gassosa per tempi prolungati**:



In questo caso la fibra viene arretrata all'interno dell'ago protettivo e l'analita viene trasportato dall'esterno verso l'interno dell'ago unicamente per diffusione (**campionamento passivo**).

Nell'ipotesi che il gradiente di concentrazione sia lineare la **quantità di analita  $dn$  estratta nel tempo  $dt$**  è data da:

$$dn = AD \frac{dC}{dz} dt = AD \frac{\Delta C(t)}{Z} dt$$

dove  $\Delta C(t)$  è la differenza fra  $C(t)$  e la concentrazione in prossimità della fibra,  $C_z$ ,  $A$  è la superficie estraente esposta.



Se il coefficiente di distribuzione gas-fibra dell'analita è elevato la sua concentrazione in prossimità della fibra sarà trascurabile e quindi  $\Delta C(t) \approx C(t)$ .

Il valore di  $n$  si può quindi ricavare **integrando membro a membro l'equazione di  $dn$** :

$$n = D \frac{A}{Z} \int_0^t C(t) dt$$

Per valori di  $t$  piccoli al posto di  $C(t)$  si può introdurre un valore di concentrazione,  $C_{av}$ , che rappresenta la media di quelli effettivi nell'intervallo di estrazione e si può ricavare la **velocità di estrazione**:

$$\frac{n}{t} = D \frac{A}{Z} C_{av}$$

Il termine  $DA/Z$  ha le dimensioni di un flusso ed è il **corrispondente del flusso di pompaggio ( $R$ ) nei sistemi a campionamento attivo**, in cui  $n/t = RC_{av}$ .

**E' possibile aumentare il tempo di integrazione senza andare incontro alla saturazione del film estraente** aumentando  $Z$ , diminuendo  $A$  o aumentando la capacità della fase estraente (ossia aumentando il volume di materiale estraente o usandone uno con elevato coefficiente di distribuzione per l'analita).

## Accoppiamento fra fibra SPME e strumentazione per il desorbimento e la rivelazione dell'analita estratto

L'obiettivo ultimo della procedura SPME è rivelare l'analita estratto dalla fibra.

Ciò implica mettere a punto un'interfaccia mediante la quale la fibra possa essere introdotta all'interno della strumentazione adottata per la rivelazione e l'analita possa esserne desorbito prima dell'analisi.

### Accoppiamento SPME-GC

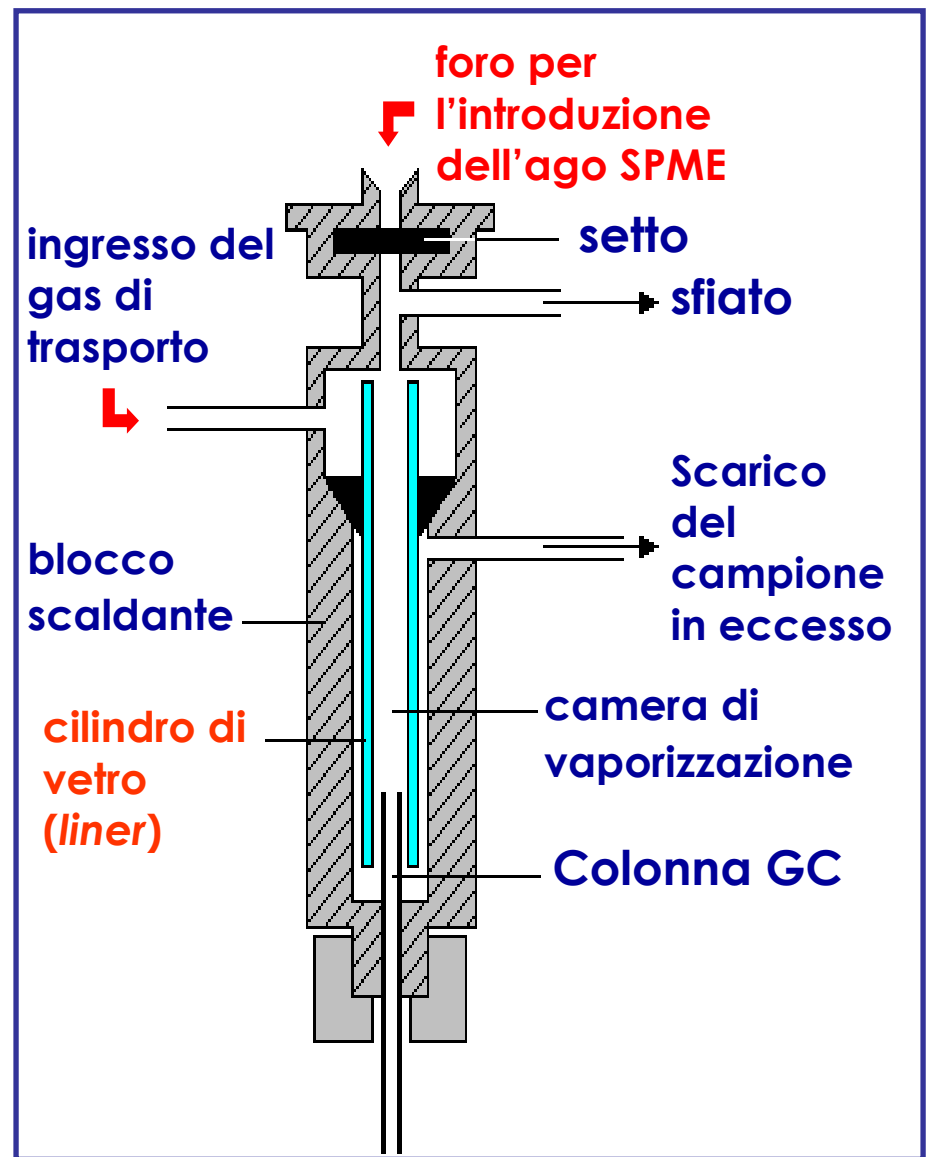
L'accoppiamento fra SPME e gas-cromatografia è uno dei più semplici. Tipicamente implica l'uso dell'iniettore stesso del gas-cromatografo (split/splitless) o di un dispositivo apposito, mediante il quale la fibra su cui è stato estratto l'analita viene introdotta all'interno di un tubo riscaldato nel quale fluisce il gas di trasporto.

In entrambi i casi l'analita viene desorbito dalla fibra termicamente e convogliato dal gas verso la colonna gas-cromatografica.

L'ago protettivo del dispositivo SPME sostituisce in questo caso l'ago della microsiringa per GC.

La fibra penetra all'interno della camera di vaporizzazione, limitata dal *liner* ed il riscaldamento improvviso determina il desorbimento dell'analita (o degli analiti) precedentemente estratto.

La quantità di analita estratto dipende dal tempo e dalla temperatura di desorbimento.

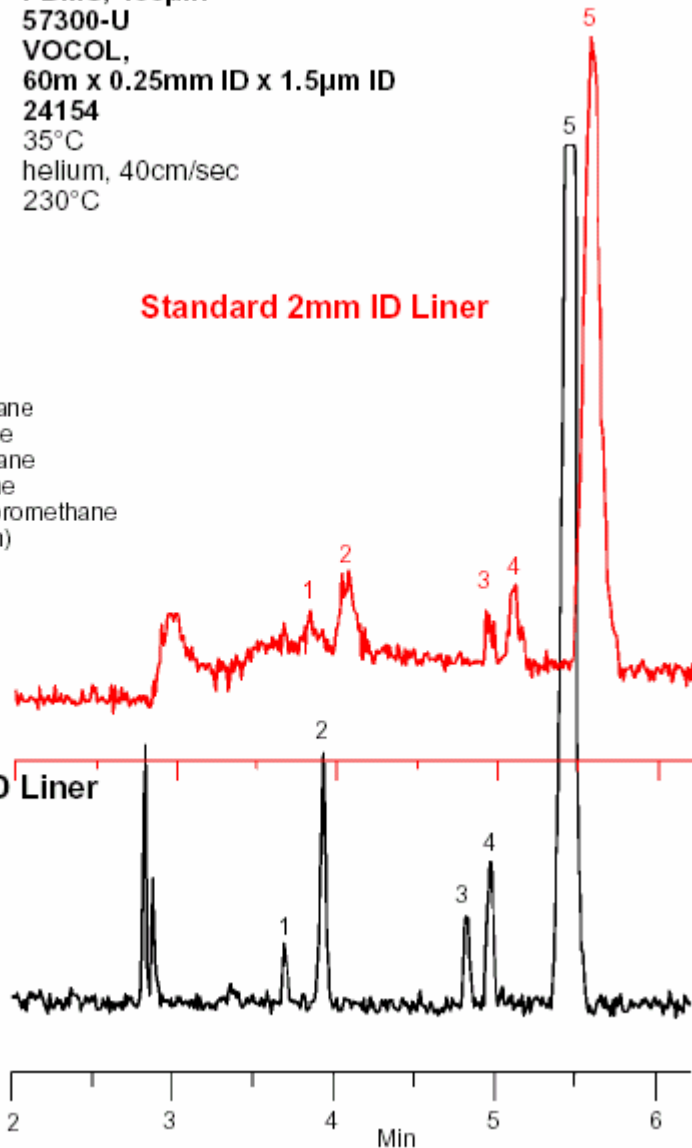


Fiber: PDMS, 100µm  
Cat. No.: 57300-U  
Column: VOCOL,  
60m x 0.25mm ID x 1.5µm ID  
Cat. No.: 24154  
Oven: 35°C  
Carrier: helium, 40cm/sec  
Inj.: 230°C

### Standard 2mm ID Liner

1. Chloromethane
2. Vinyl chloride
3. Bromomethane
4. Chloroethane
5. Trichlorofluoromethane  
(50ppb each)

### 0.75mm ID Liner

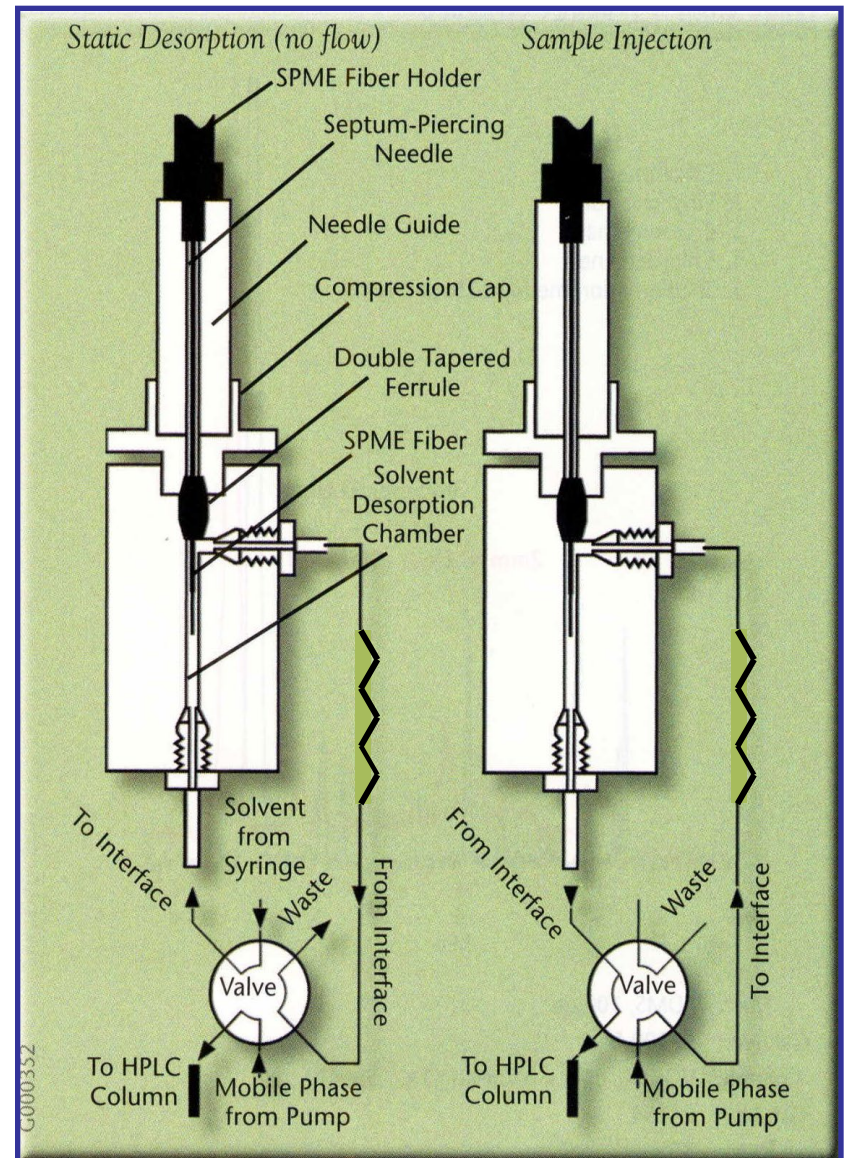
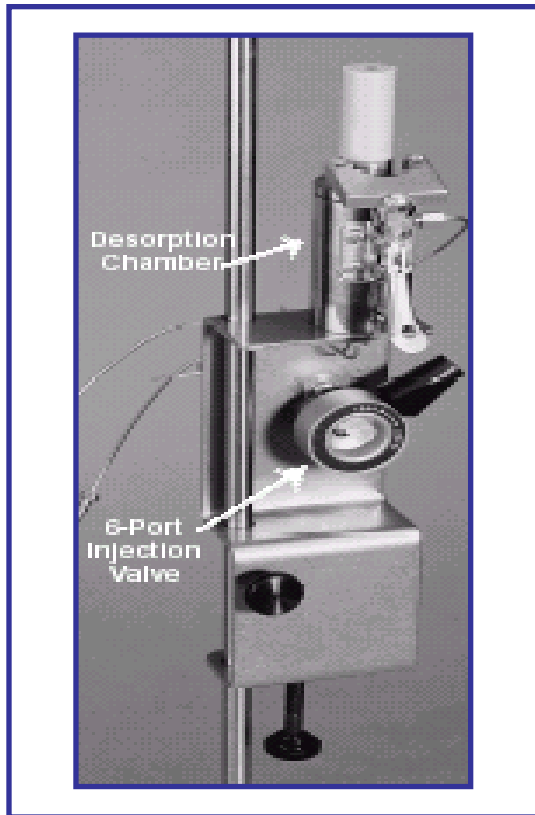


Il diametro interno del *liner* è determinante per garantire un **desorbimento rapido dell'analita dalla fibra e, conseguentemente, ottenere una banda iniettata più stretta e una migliore risoluzione cromatografica.**

Un *liner* più stretto garantisce infatti un più efficiente trasferimento di calore dal blocco scaldante alla fibra **ed una minore dispersione dell'analita dopo il desorbimento.**

# Accoppiamento SPME-HPLC

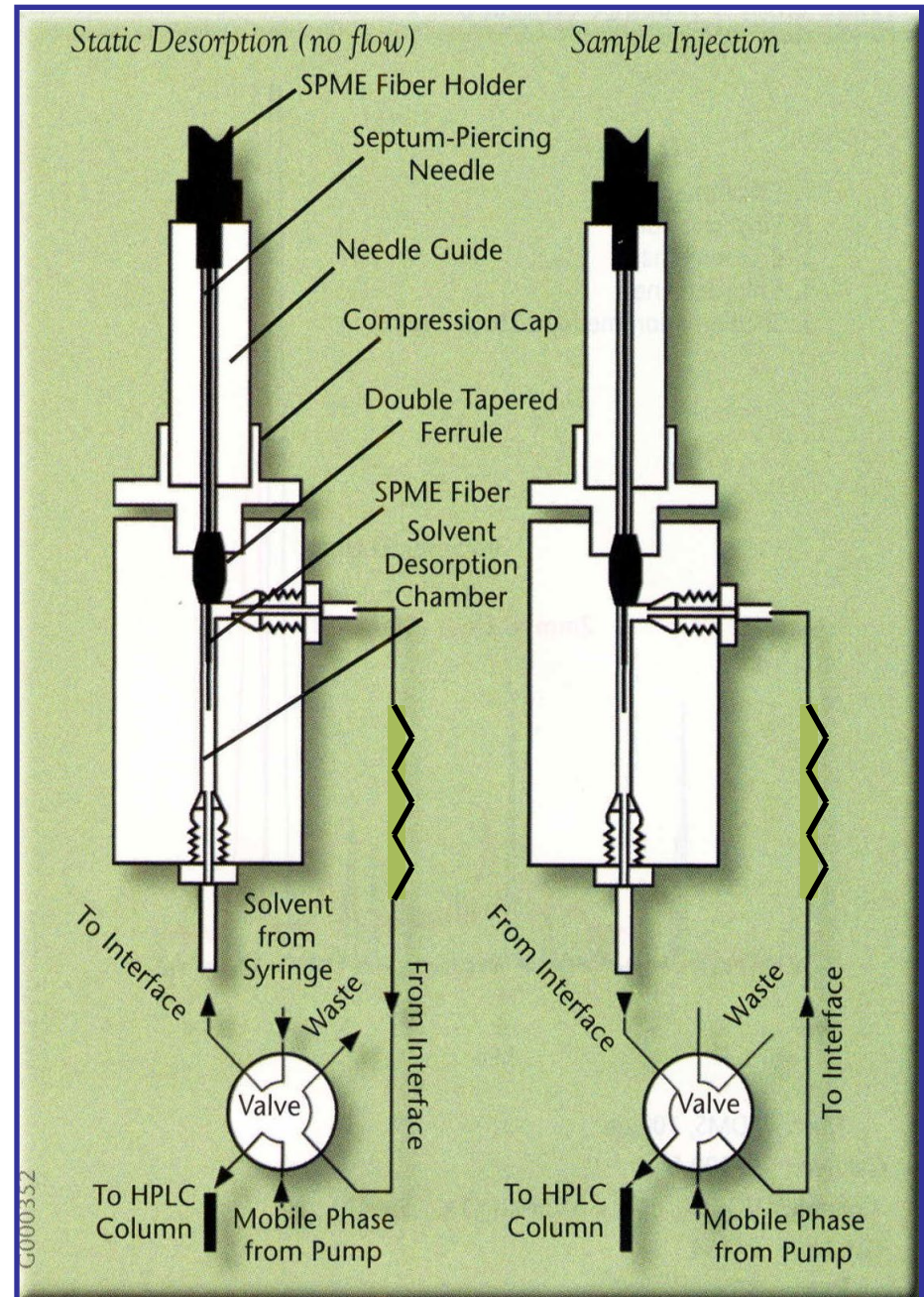
Nel caso dell'accoppiamento con l'HPLC l'analita estratto dalla fibra SPME dev'essere portato via dalla fase mobile cromatografica. Ciò avviene in **un opportuno dispositivo**:



Quando si opta per un **desorbimento statico** la fibra è inserita nella camera di desorbimento e poi in questa viene introdotto con una siringa il solvente di desorbimento (che può essere anche di composizione identica a quella della fase mobile cromatografica iniziale).

In questa fase **la valvola è in posizione LOAD**, quindi il solvente che deve estrarre l'analita riempie il loop prima di andare allo scarico, che viene di solito bloccato per evitare perdita di campione desorbito.

Trascorso il tempo adottato per il desorbimento **la valvola passa in posizione INJECT**: la fase mobile passa attraverso il loop (in verso opposto) e porta il campione verso la colonna.



In tale configurazione la fase mobile potrebbe continuare a far desorbire l'analita dalla fibra, con il vantaggio di allontanarlo completamente, evitando il fenomeno del *carry-over*, ossia la presenza di analita sulla fibra prima di una nuova estrazione SPME.

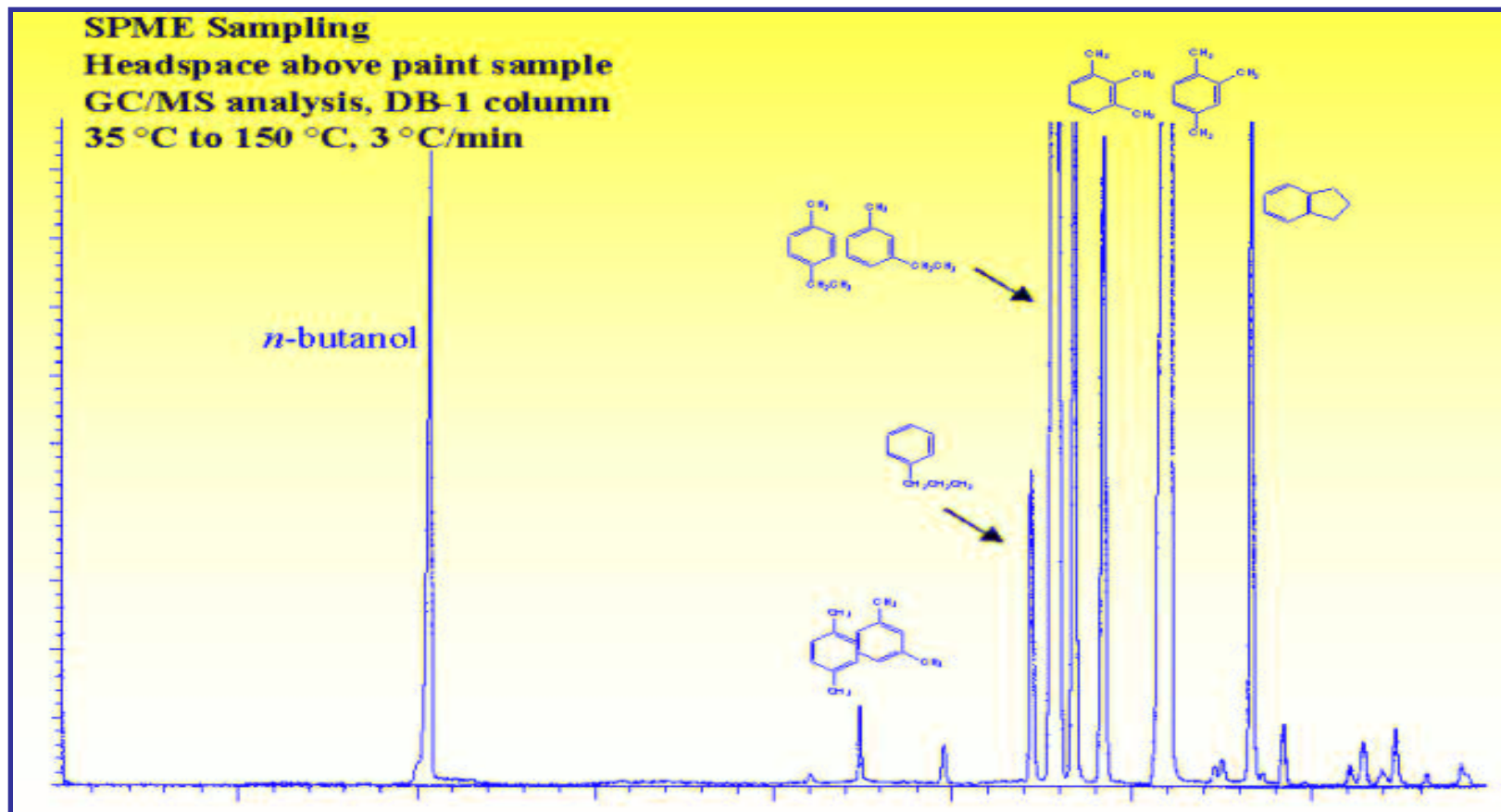
D'altra parte l'ingresso continuo di analita in colonna, successivamente alla banda contenuta nel loop, potrebbe provocare scodatura dei picchi cromatografici.

Si può parzialmente ovviare a tale inconveniente riportando in posizione LOAD la valvola dopo essersi accertati del totale svuotamento del loop.

Nel caso del *desorbimento dinamico* l'allontanamento dell'analita dalla fibra da parte della fase mobile avviene continuamente, quindi il rischio di *carry-over* è minimo, ma la successiva separazione cromatografica è più complicata, con elevata possibilità di scodature nei picchi.

# Applicazioni dell'SPME: matrici di interesse ambientale

Analisi dei composti volatili rilasciati dalle vernici usate per ricoprire gli scafi delle navi da guerra (USA)



SPME dello spazio di testa di un campione di scafo verniciato, seguita da rivelazione GC-MS

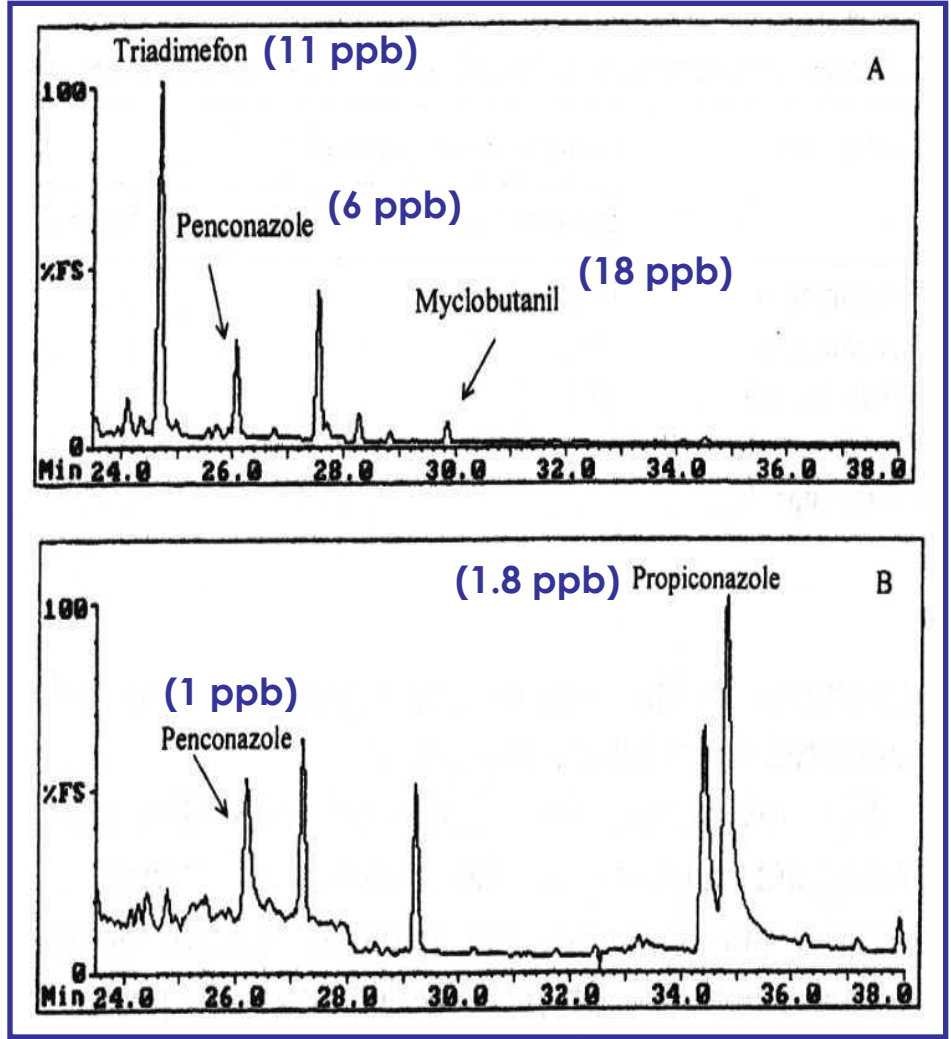
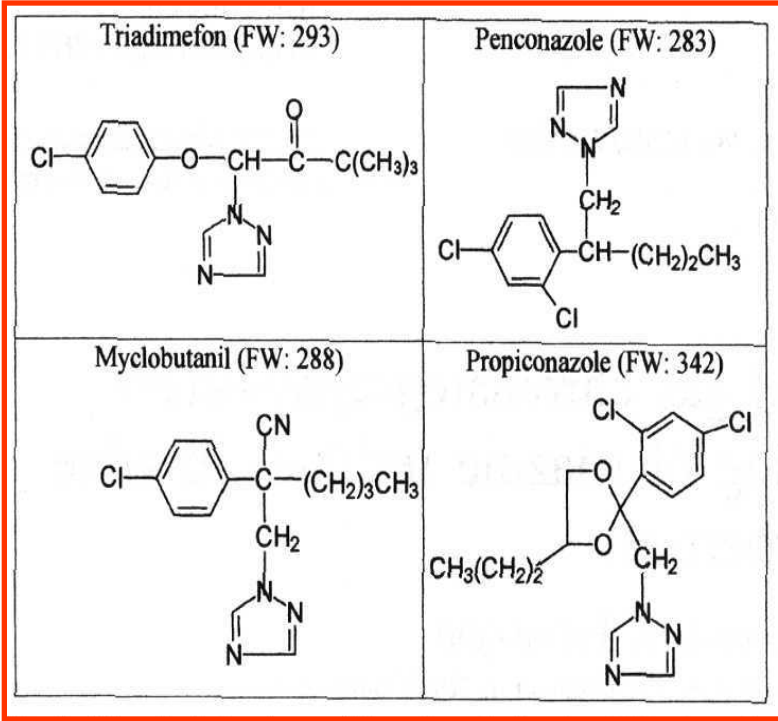


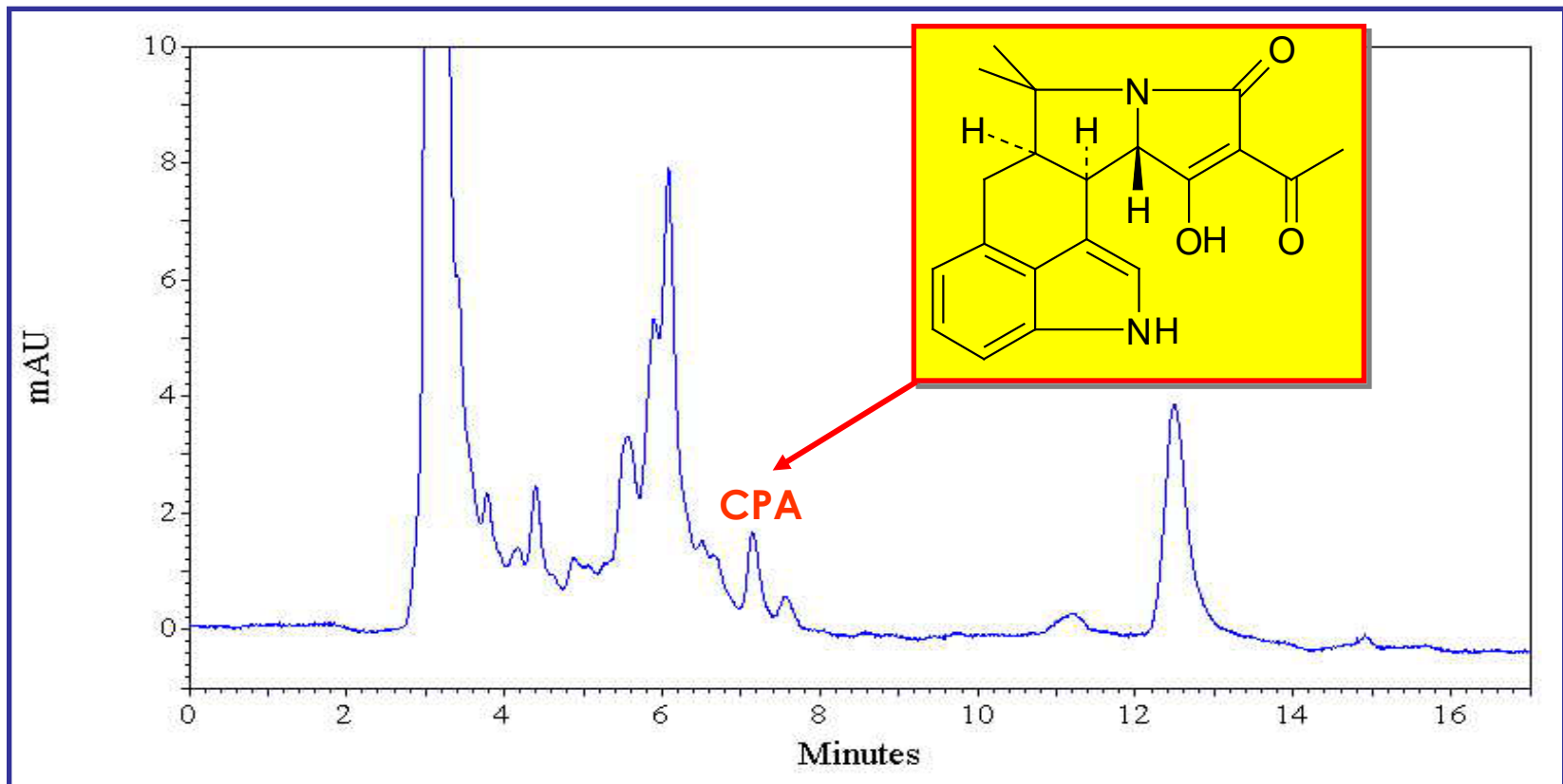
# Applicazioni dell'SPME: matrici alimentari

## Analisi di residui di pesticidi/micotossine

Cromatogrammi GC-MS ottenuti dopo SPME su un campione di

- A. fragole
- B. vino



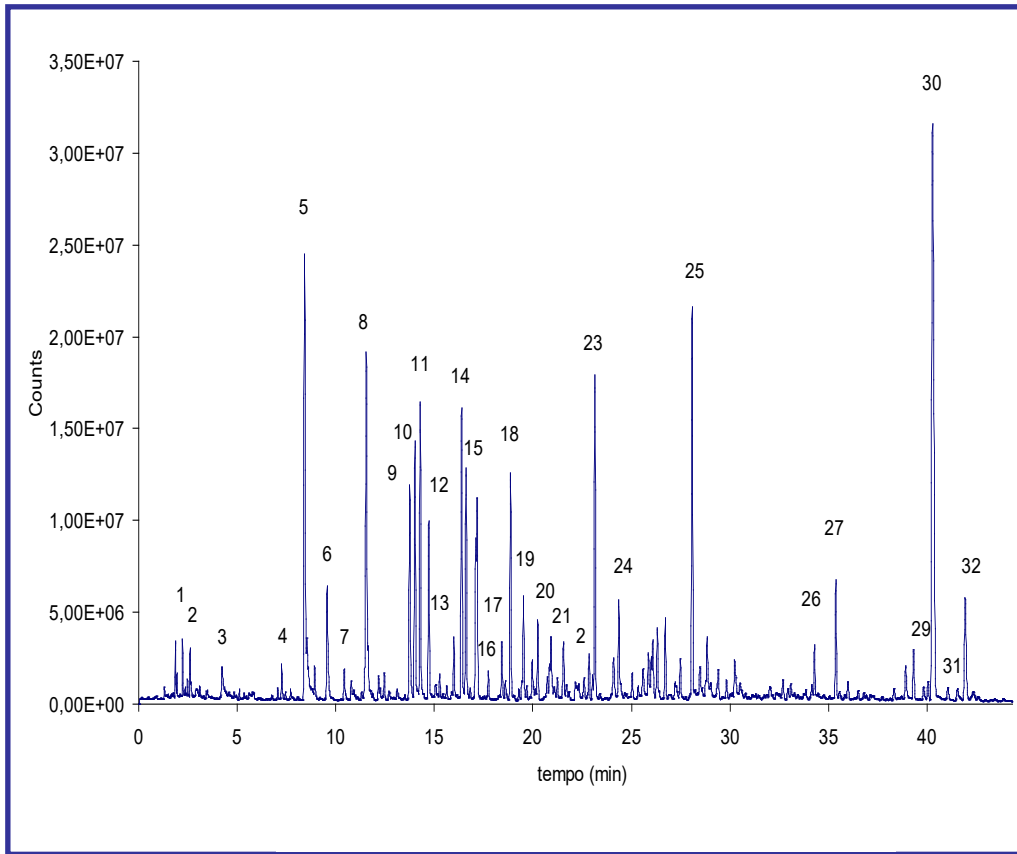


Cromatogramma **SPME-HPLC** con rivelazione UV relativo ad un campione di latte contaminato da CPA (concentrazione stimata: 8 ppb)

**Condizioni sperimentali:** tempo di estrazione: 30 min; temperatura di estrazione: ambiente; pH = 3; **desorbimento dinamico.**

## Analisi dei composti volatili (aroma)

L'aroma del caffè è costituito da un enorme numero di composti volatili che lo caratterizzano in termini di proprietà organolettiche e il cui profilo di concentrazione può essere specifico della varietà di caffè considerata:



Picco n°	Molecola	Picco n°	Molecola
1	2-metil-furano	17	2,6-dietilpirazina
2	2-metilbutanale	18	3-etil-2,5-dimetilpirazina
3	3,3-dimetilbutanone	19	2-etil-3,5-dimetilpirazina
4	1-metil-1H-pirrolo	20	2,5-dimetilfurano
5	piridina	21	etandiolo diacetato
6	pirazina	22	etandiolo propanoato
7	2-metossi-metil-furano	23	3-furan-metanolo acetato
8	4-metil-pirimidina	24	5-metil-furancarbossialdeide
9	4,6-dimetil-pirimidina	25	furanmetanolo
10	4,5-dimetil-pirimidina	26	1-(2-furanil-metil-)-1-H-pirrolo
11	etil-pirazina	27	4-metossifenolo
12	2,3-dimetil-pirazina	28	1-(1H-pirrol-2-il)-etanone
13	etil-piridina	29	2-2'ossibis(metilen)bisfurano
14	2-etil-6-metil-pirazina	30	fenolo
15	2-etil-5-metil-pirazina	31	1H-pirrol-carbossialdeide
16	propilpirazina	32	4-etil-2-metossifenolo

Cromatogramma GC-MS ottenuto dopo SPME sullo spazio di testa di un campione di caffè commerciale.

## SPME: riepilogo degli aspetti salienti

Gli aspetti salienti dell'SPME possono essere così riassunti:

- ✓ è una **procedura relativamente semplice**
- ✓ **riduce l'impiego di solventi organici**, utilizzati solitamente nelle estrazioni liquido-liquido convenzionali
- ✓ può consentire una **notevole riduzione dei tempi di analisi**
- ✓ consente l'**automazione dello stadio di preparazione del campione e la sua integrazione con quello del campionamento**, il che è particolarmente utile nel caso di **analisi *in situ* e nel controllo di processo**
- ✓ **normalmente non è una tecnica di estrazione esaustiva**, dunque consente di non modificare in modo rilevante matrici la cui composizione non può essere cambiata significativamente (ad esempio **matrici biologiche durante campionamenti in vivo**).