



# METODI “GREEN” IN CROMATOGRAFIA LIQUIDA

**L'attività legata al “Premio Giovane Ricercatore” conferito per l'anno 2024 dalla Divisione di Chimica Analitica della Società Chimica Italiana riguarda lo sviluppo di metodi analitici sostenibili e le loro applicazioni in diversi ambiti, in linea con le tendenze attuali di minimizzare l'uso di reagenti e solventi tossici per l'ambiente e la salute dell'operatore, nonché i consumi energetici.**

La linea di ricerca legata al “Premio Giovane Ricercatore 2024” della Divisione di Chimica Analitica della Società Chimica Italiana riguarda il lavoro avviato durante il dottorato di ricerca e proseguito negli anni successivi, che mi hanno vista impegnata prima nel settore Ricerca&Sviluppo dell'azienda Chromaleont Srl (ME) e successivamente come ricercatrice presso l'Università degli Studi di Messina. Le attività qui descritte sono state svolte nei laboratori coordinati dai Proff. Luigi Mondello e Paola Dugo.

Lo sviluppo di metodi di cromatografia liquida (LC) miniaturizzata rappresenta il minimo comune denominatore di diverse attività di ricerca condotte. Una di queste ha sfruttato la possibilità di trasferire l'eluente dalla colonna nanoLC direttamente ad uno spettrometro di massa a ionizzazione elettronica (EI-MS), sviluppando un prototipo strumentale noto come nanoLC-EI-MS.

I benefici di tale accoppiamento si evincono dal confronto riportato in Tab. 1 tra le due tipologie di sorgenti di ionizzazione più comunemente interfacciate a sistemi cromatografici [1].

Lo svantaggio principale della tecnica EI-MS consiste nella poca versatilità di questa sorgente applicabile a molecole in fase gassosa, compatibilmente con le condizioni di alto vuoto della camera di ionizzazione. Difatti, tale sorgente è usualmente interfacciata a sistemi di gas cromatografia (GC), restando limitata a composti termostabili e volatili. Nonostante vari tentativi di interfacciare sistemi LC con rivelatori EI-MS già a partire dagli anni Ottanta [2-4], l'avvento delle sorgenti di ionizzazione a pressione atmosferica (API) ha reso queste ultime le interfacce di elezione in strumenti LC-MS. Gli spettri di massa prodotti nei sistemi LC-MS sono altamente dipendenti dalle fasi mobili impiegate e dalle condizioni atmosferiche stesse, tanto che non esistono database spettrali

Sorgenti EI	Sorgenti API
Camera di ionizzazione sotto alto vuoto Assenza di effetto matrice Spettri di massa altamente riproducibili Pattern di frammentazione esteso e altamente informativo ( <i>fingerprinting</i> ) Possibilità di impiego di librerie spettrali universali disponibili in commercio Non adatte a molecole termolabili e non volatili Normalmente accoppiate a sistemi GC	Camera di ionizzazione a pressione atmosferica Effetto matrice significativo Spettri di massa poco riproducibili Frammentazione limitata (ulteriori step di frammentazione sono richiesti per la delucidazione strutturale) Assenza di librerie spettrali universali (librerie lab-made possono essere impiegate in condizioni analitiche standardizzate) Particolarmente adatte a macromolecole e molecole termolabili Normalmente accoppiate a sistemi LC

Tab. 1 - Confronto tra sorgenti EI e API [1]

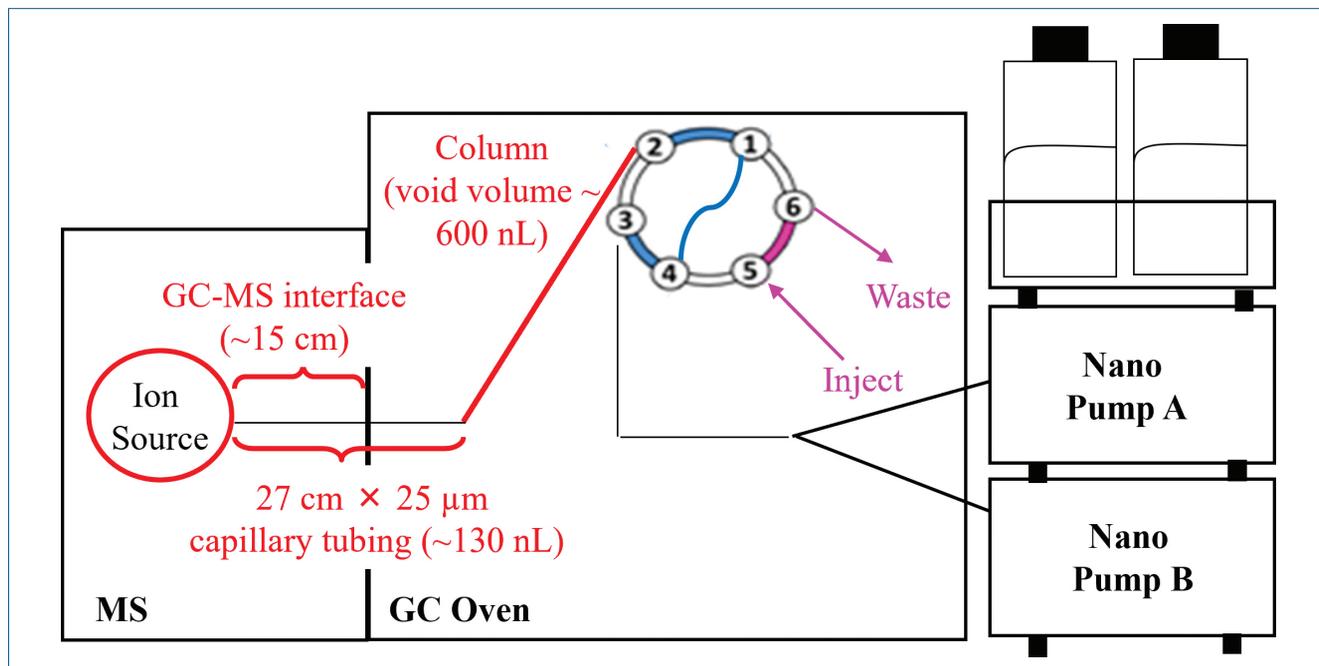


Fig. 1 - Schema del prototipo nanoLC-EI-MS [7]

universali e l'identificazione delle molecole è basata sull'interpretazione manuale degli spettri. Inoltre, si tratta di sorgenti di ionizzazione *soft* che generano una blanda frammentazione degli ioni, non utile ai fini della delucidazione strutturale.

L'ampio impiego delle tecniche LC-MS in molteplici ambiti di applicazione è imputabile all'estrema versatilità delle sorgenti di ionizzazione API nei confronti di biomolecole e analiti termolabili.

I progressi nelle tecniche miniaturizzate, ovvero la disponibilità di strumenti in grado di produrre nanoflussi con elevata riproducibilità e accuratezza e di colonne robuste ed efficienti, hanno consentito l'accoppiamento diretto di un sistema nanoLC con un rivelatore EI-MS. È stato evidenziato che flussi nel range 150-300 nL/min. non perturbano in maniera significativa l'alto vuoto della sorgente, eliminando la necessità di sistemi di splittaggio dell'eluente che determinavano perdite di campione, riduzione della sensibilità e introduzione di volumi morti nel sistema. Il sistema nanoLC-EI-MS sviluppato (Fig. 1) è stato applicato con successo all'analisi di campioni difficili da iniettare in un sistema GC-MS, tra cui la fase acquosa di campioni di bio-oil derivanti dalla pirolisi di biomasse [5], la frazione di acidi grassi liberi di campioni alimentari [6] e la caratterizzazione della frazione non volatile di oli essenziali agrumari [7, 8].

L'impiego di tale strumento si traduce nei seguenti vantaggi: iniezione di campioni acquosi senza necessità di estrazione con solventi organici normalmente richiesta prima di un'analisi GC; rivelazione di analiti non volatili nella loro forma nativa senza derivatizzazione, comunemente richiesta prima dell'iniezione in un sistema GC al fine di rendere più volatili gli analiti di interesse.

In un secondo momento, è stata messa a punto una strategia identificativa basata sul concetto di indice di ritenzione lineare (LRI), mimando anche in questo caso un approccio consolidato in GC, ma difficile da applicare in LC a causa della minore riproducibilità del dato di ritenzione. Il lavoro di ricerca, anche oggetto di brevetto [9], ha sfruttato una serie omologa costituita da trigliceridi composti da acidi grassi a numero dispari di atomi di carbonio per la costruzione di un database di LRI di composti lipidici. L'impiego di una serie omologa di riferimento composta da molecole con caratteristiche chimico-fisiche analoghe agli analiti da determinare ha consentito di correggere in maniera opportuna variazioni dei tempi di ritenzione legati a condizioni operative differenti.

Le due strategie identificative sopra menzionate possono essere usate in maniera complementare e indipendente per l'identificazione univoca di analiti incogniti.

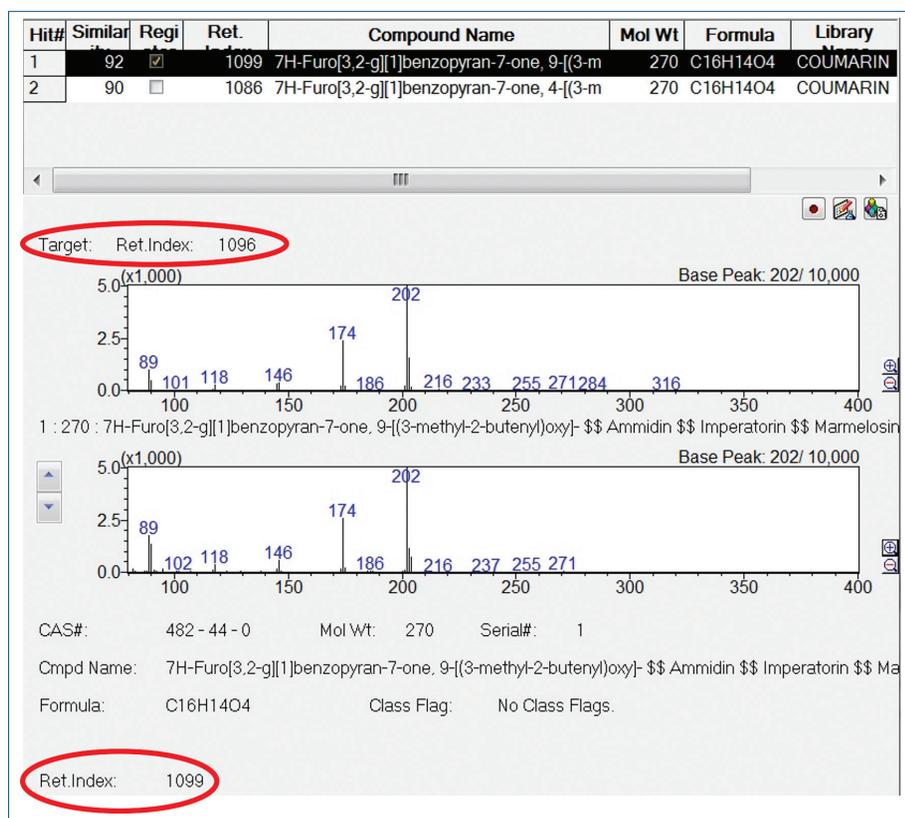


Fig. 2 - Ricerca in libreria spettrale corredata da LRI (valore tabulato e sperimentale cerchiati in rosso) [8]

Da ciò è nata l'idea di applicare la strategia degli LRI al sistema nanoLC-EI-MS.

La Fig. 2 riporta un esempio di identificazione automatica di una furocumarina in un olio essenziale. Considerando esclusivamente lo spettro di massa, la ricerca nella libreria spettrale fornisce due candidati con similarità superiore al 90%, mentre l'applicazione della libreria a doppio filtro MS/LRI permette di escludere l'isomero con un comportamento di ritenzione differente (massima tolleranza LRI  $\pm 5$  unità).

È necessario specificare che nel caso di molecole a peso molecolare medio-basso, una miscela di alchilarilchetoni, già riportata in letteratura [10], è stata impiegata per il calcolo degli LRI.

Recentemente, la miniaturizzazione è stata sfruttata per produrre un sistema portatile LC capillare, utile per analisi *in situ*, in un'ottica di sostenibilità ambientale e riduzione dei costi. Il sistema è stato applicato per la determinazione di cannabinoidi in infiorescenze di canapa (Fig. 3) [11]. Una configurazione a doppia colonna basata sulla connessione di due diverse fasi stazio-

narie, ciascuna accoppiata a un rivelatore UV, ha consentito la determinazione di due valori LRI per ciascun analita. Inoltre, poiché sui rivelatori UV sono state utilizzate due diverse lunghezze d'onda, il rapporto delle assorbanze misurate su ciascuna traccia cromatografica ha rappresentato un terzo criterio di identificazione, soddisfacendo così le raccomandazioni dello Scientific Working Group for The Analysis of Seized Drugs sulle tecniche da utilizzare e il numero minimo di parametri richiesti per un'identificazione univoca (Recommendation 8.0. 2019). Il processo di identificazione è stato automatizzato grazie alla messa a punto di un software dedicato. Infine, la *greenness* del metodo è stata quantitativamente stimata attraverso il software Agree [12], che assegna un punteggio e un

colore (da 0 a 1 e da rosso a verde scuro) a ciascuno

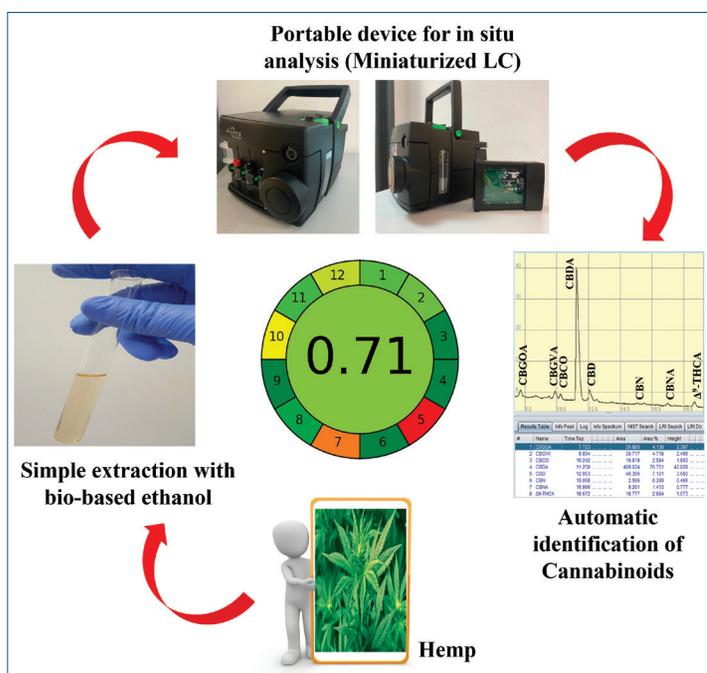


Fig. 3 - Analisi *in situ* di cannabinoidi in infiorescenze di canapa - workflow [11]



dei 12 principi della *green analytical chemistry* [13]. In conclusione, l'attività di ricerca condotta si è posta l'obiettivo di soddisfare molteplici aspetti della *green analytical chemistry* [13]: drastica diminuzione dei consumi di solvente, automatizzazione dell'intero processo analitico, preferibilmente basato su metodi multi-analiti e su semplici procedure di preparazione del campione senza derivatizzazioni, riduzione dei consumi energetici, possibilità di analisi "sul campo".

### Ringraziamenti

Ringrazio la Divisione di Chimica Analitica per il riconoscimento e il gruppo di ricerca a cui appartengo per il costante supporto.

### Bibliografia

- [1] F. Rigano *et al.*, *TrAC-Trend. Anal. Chem.*, 2019, **118**, 112.
- [2] R.C. Willoughby, R.F. Browner, *Anal. Chem.*, 1984, **56**, 2626.
- [3] M. Vestal, 1989, U.S. Patent No. US4958529.
- [4] R. Brandt, R. Nordman, 1989, U.S. Patent No. 4863491.
- [5] D. Tomasini *et al.*, *Anal. Chem.*, 2014, **86**, 11255.
- [6] F. Rigano *et al.*, *Anal. Chem.*, 2016, **88**, 3421.
- [7] M. Russo *et al.*, *J. Sep. Sci.*, 2016, **39**, 2018.
- [8] F. Rigano *et al.*, *J. Chromatogr. A*, 2020, **1610**, 460581.
- [9] L. Mondello, F. Rigano, 2016, EP Patent, EP3535579B1.
- [10] R.M. Smith, *J. Chromatogr. A*, 1982, **236**, 313.
- [11] R. La Tella *et al.*, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2022, **414**, 6341.
- [12] F. Pena-Pereira *et al.*, *Anal. Chem.*, 2020, **92**, 10076.
- [13] A. Galuszka *et al.*, *TrAC-Trend. Anal. Chem.*, 2013, **50**, 78.

### Green Methods in Liquid Chromatography

The research activity related to the "Young Researcher Award" of the Analytical Chemistry Division of the Italian Chemical Society for the Year 2024 refers to the development of sustainable analytical methods and their applications in different areas, according to recent trends for minimizing the use of toxic chemicals for both environment and operator, as well as energy consumption.

PUBBLIREDAZIONALE

## COME L'IA STA TRASFORMANDO LA GESTIONE DEI LABORATORI: l'evoluzione dei sistemi LIMS

I **LIMS**, strumenti essenziali per i laboratori scientifici, evolvono grazie all'integrazione dell'intelligenza artificiale, **migliorando efficienza, accuratezza e capacità predittive**. L'IA aiuta nell'analisi dei dati, gestione delle risorse e manutenzione predittiva, riducendo errori e sprechi. Non sostituisce l'operatore, ma **lo supporta**, potenziando le sue capacità. **Polisystem Informatica** sta investendo con decisione, sviluppando nuove funzionalità all'interno del suo nuovo **LIMS web, "ActiveLIMS"**, che combinano le potenzialità delle tecnologie emergenti con la solidità della nostra esperienza pluridecennale.



Qualunque sia  
la tipologia del tuo laboratorio



ActiveLIMS

è la soluzione



Polisystem Informatica s.r.l.

Soluzioni Software per i Laboratori prove