



Analisi strumentale nel settore alimentare

La Shimadzu Italia, filiale italiana di Shimadzu Corporation (leader mondiale nella produzione di strumentazione scientifica), ha dato il suo contributo al seminario "Tecnologie chimiche nel settore alimentare", svoltosi a Genova il 20 ottobre 2000, proponendo i seguenti tre interventi: la presentazione

di un impiego innovativo della tecnica gascromatografica, realizzato in collaborazione con l'Università degli Studi di Messina, un'applicazione pratica della tecnica HPLC e un approccio alternativo all'utilizzo del fornetto di grafite in AAS. In questo articolo vengono pubblicati i primi due.

Fast GC per lo studio di matrici complesse

Luigi Mondello, Giovanni Zappia, Giovanni Dugo

a cura di Franco Bruno

L'analisi di miscele naturali complesse, mediante gascromatografia convenzionale, richiede spesso tempi piuttosto elevati, a volte anche di alcune ore.

Usando le tecniche di GC veloce, il tempo di analisi può essere drasticamente ridotto a pochi minuti, mantenendo o addirittura migliorando la risoluzione rispetto alle analisi ottenute con colonne convenzionali.

In generale per velocizzare un'analisi in gascromatografia si possono scegliere diversi approcci in base alla complessità del campione da analizzare:

- *utilizzo di colonne con diametro interno e spessore del film della fase stazionaria ridotti (colonne microbore)* [1-6]
- *utilizzo di colonne multicapillari* [7-9] che presentano, rispetto ad una singola colonna microbore, maggiore capacità ma risoluzione più bassa. Questo tipo di colonne, infatti, è costituito da un fascio, della lunghezza di 1 metro, di 800 capillari, uguali tra di loro, ciascuno del diametro interno di 40 µm e rivestito di un film di fase stazionaria di 0,2 µm.
- *utilizzo di colonne microimpaccate* [10-11]. Anch'esse posseggono capacità maggiore rispetto alle colonne microbore ma una bassissima efficienza dovuta alla diffusione Eddy che contribuisce fortemente all'allargamento della banda cromatografica [9].

Luigi Mondello, Giovanni Zappia, Giovanni Dugo, Facoltà di Farmacia, Università di Messina; Franco Bruno, Gascromatografia, Shimadzu Italia Srl, Milano, sim@shimadzu.it - www.shimadzu.it

Le colonne capillari a diametro interno e spessore del film di fase stazionaria ridotti permettono di ottenere separazioni veloci come indicato dall'equazione di Golay in cui sia il raggio che lo spessore del film della fase stazionaria sono direttamente proporzionali all'altezza minima del piatto teorico:

$$H = \frac{2D_M}{u} + \frac{r^2 (1+6k + 11k^2)u}{24D_M(1+k)^2} + \frac{2k d_f^2 u}{3(1+k)^2 D_s}$$

Inoltre se si mantiene il rapporto di fase β ($2r/d_f$) molto alto il contributo della resistenza ai trasferimenti di massa nella fase stazionaria è molto piccolo e può essere ritenuto nullo. In questo caso l'altezza minima del piatto teorico alla velocità lineare ottimale tenderà ad essere uguale al diametro interno della colonna utilizzata.

In aggiunta se si utilizza per queste separazioni l'idrogeno come gas di trasporto si possono ottenere altissime efficienze anche a velocità lineari molto alte, come si può evincere dalla parte ascendente delle curve di H vs u che per l'idrogeno si presentano più piatte di quelle per l'elio.

Oggi è possibile utilizzare questi metodi veloci di separazione grazie alla disponibilità commerciale di colonne dal diametro interno di 100 o addirittura 50 µm e soprattutto perché sono disponibili commercialmente gascromatografi che hanno i seguenti requisiti:

- elevata pressione di esercizio: fino a circa 1.000 kPa;
- elevato flusso del gas di trasporto per elevati valori di split-taglio: fino a circa 1.000 ml/min;
- elevati incrementi lineari di temperatura di circa 60-90 °C/min





Parte Sperimentale

Materiali e strumentazione: standard di esteri metilici di acidi grassi (C8:0-C12:0; C13:0-C17:0; C16:1, C18:1, C20:1, C22:1 ottenuti dalla Sigma-Aldrich (Milano, Italia). Esteri metilici di acidi grassi C18:0-C22:0 ottenuti dalla Restek (Chebios, Roma, Italia). Gli esteri metilici degli acidi grassi dei campioni reali sono stati ottenuti per simultanea transesterificazione dei campioni nelle seguenti condizioni: 1 µl dell'olio o 1 g del grasso sono stati addizionati di una soluzione di metanolo al 10% in H₂SO₄ e posti per due ore a 110 °C in stufa.

Le analisi convenzionali sono state ottenute su un sistema Shimadzu GC-17A, ver. 3 (Shimadzu, Milano, Italia) munito di iniettore split/splitless, campionatore AOC-20i e rivelatore FID. I dati sono stati analizzati tramite software Class-VP 4.3 (Shimadzu, Milano, Italia). Colonna Supelcowax 30 m x 0,25 mm d.i., 0,25 µm di spessore del film. T. Progr.: 50 °C a 250 °C a 5 °C/min. P. Progr.: 53 kPa a 73 kPa a 0.5 kPa/min. Gas di trasporto: H₂. u: 35 cm/s. Inj. Vol.: 0,2 µl. Split Ratio: 1:10. Rivelatore: FID H₂: 60 kPa. Air: 50 kPa, Make-up: 80 kPa (He). Frequenza di campionamento: 10 Hz.

Le analisi veloci e ultraveloci sono state ottenute su un sistema Shimadzu GC-17AHA, ver. 3 (Shimadzu, Milano, Italia) munito di iniettore split/splitless, campionatore AOC-20i e rivelatore FID. I dati sono stati analizzati tramite software Class-VP 4.3 (Shimadzu, Milano, Italia). Colonna Supelcowax 20 m x 0,10 mm d.i., 0,10 µm di spessore del film (Supelco, Milano, Italia).

GC veloce. T. Progr.: 50 °C a 250 °C a 8,9 °C/min. P. Progr.: 289 kPa a 413 kPa a 5,6 kPa/min. Carrier: H₂. u: 43 cm/s. Inj. Vol.: 0,2 µl. Split Ratio: 1:100. Rivelatore: FID H₂: 60 kPa. Air: 50 kPa, Make-up: 80 kPa (He). Frequenza di campionamento: 50 Hz.

GC ultraveloce. T. Progr.: 50 °C a 150 °C a 80 °C/min quindi a 250 °C a 70 °C/min. P. Progr.: 586 kPa a 740 kPa a 123,2 kPa/min quindi a 896 kPa a 109,2 kPa/min. Gas di trasporto: H₂. u: 81 cm/s. Inj. Vol.: 0,2 µl. Split Ratio: 1:100. Rivelatore: FID H₂: 60 kPa. Air: 50 kPa, Make-up: 80 kPa (He). Frequenza di campionamento: 50 Hz.

a seconda della zona di temperatura;

- elevata frequenza di campionamento del rivelatore: >50 Hz. In questo articolo si metteranno a confronto (qualitativo e quantitativo) le analisi ottenute tramite gascromatografia convenzionale con quelle ottenute tramite gascromatografia ve-

Tabella 1 - Confronto di H, N, N/m ottenuti iniettando l'estere metilico dell'acido grasso C14:0 sulla colonna convenzionale e ultraveloce

Vel. Lineare (cm/sec)	GC convenzionale (30m, 0,25 mm, 0,25 µm)			Ultraveloce (20m, 0,10 mm, 0,10 µm)		
	H	N 10 ³	N/m	H	N 10 ³	N/m
20	0,340	88	2900	0,140	143	7100
30	0,310	97	3200	0,122	164	8200
40	0,340	88	2900	0,157	127	6400
50	0,390	77	2600	0,190	105	5300
60	0,460	65	2200	0,220	91	4500
70	0,510	59	2000	0,280	71	3600
80	0,630	48	1600	0,400	50	2500

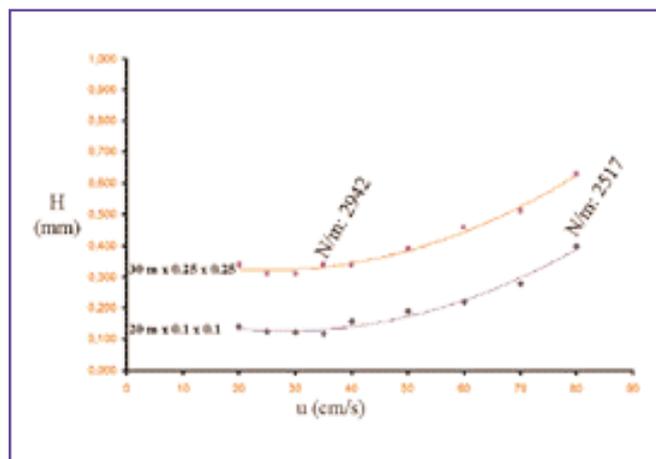


Figura 1 - Curva di Van Deemter per la colonna convenzionale e veloce

loce ed ultraveloce utilizzando sia composti puri che matrici reali complesse.

Risultati e discussione

I metodi GC veloci e ultraveloci sono stati sviluppati dopo diverse considerazioni. La dimensione della colonna veloce è stata scelta in base alle capacità strumentali del gascromatografo. Riducendo il diametro interno e lo spessore del film di fase stazionaria è stato possibile ottenere analisi veloci e ad elevata risoluzione come mostrato dall'equazione di Golay. La Figura 1 mostra la curva di Van Deemter ottenuta plottando l'altezza del piatto teorico contro la velocità lineare media di otto differenti analisi dell'estere metilico dell'acido grasso C14:0 a differenti velocità lineari sia con la colonna convenzionale che con la colonna veloce. Dalla Figura si può notare che l'altezza minima del piatto teorico tende a raggiungere il valore del diametro interno per entrambe le colonne come la teoria suggerisce per colonne con alto rapporto di fase. L'efficienza per la colonna veloce alla velocità lineare ottimale (35 cm/s) è molto alta (168067 piatti) come riportato in Tabella 1. La colonna convenzionale alla sua velocità lineare ottimale presenta invece soltanto 96774 piatti. Da questo si deduce che la colonna veloce pur essendo 10 m più corta risulta più efficiente a velocità lineari comparabili. Di conseguenza lavorando ad efficienze paragonabili la colonna veloce può operare a velocità lineari maggiori.

Tabella 2 - Confronto tra i valori di risoluzione e TZ per i tre metodi

GC	Convenzionale		Veloce		Ultraveloce	
Tempo di analisi	32,088		18,454		2,893	
Fattore di riduzione del tempo di analisi (guadagno)	*		1,74		11,09	
	R	TZ	R	TZ	R	TZ
16:0/17:0	26,7	22,2	27,7	23	10,5	7,9
18:0/19:0	24,4	23,3	24,3	19,5	9,2	7,4
16:0/16:1	5,8	4,0	5,5	3,7	3,1	1,7
18:0/18:1	2,8	2,2	3,2	1,7	1,7	0,5



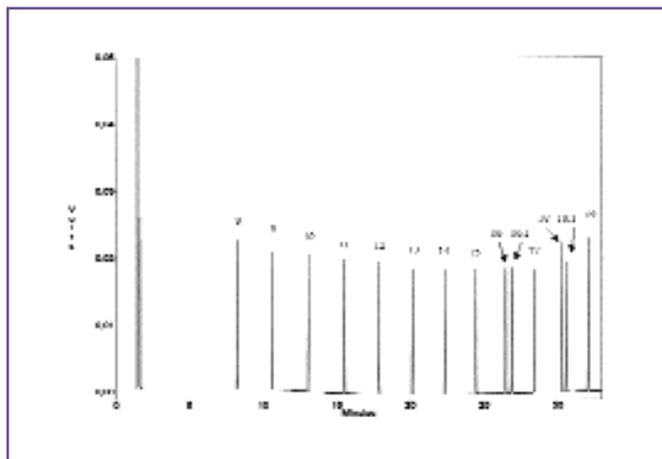


Figura 2 - Analisi convenzionale di 19 FAMES, ultimo picco eluito a 32,088 min

Dopo aver ottimizzato i metodi gascromatografici in base alle sopra citate esperienze sono state analizzate le miscele di esteri metilici di acidi grassi (FAMES) standard, gli esteri metilici degli acidi grassi di un olio di fegato di merluzzo e di un olio extravergine di oliva.

La miscela standard è stata dapprima analizzata utilizzando un metodo convenzionale (Figura 2). Quindi sono stati utilizzati un metodo di analisi veloce (Figura 3) e un metodo ultraveloce (Figura 4). Come si può notare dalla Tabella 2, dove sono riportati per le tre analisi i tempi di analisi e i valori della risoluzione (R) e del numero di Trenzahl (TZ), per alcune coppie critiche, l'analisi veloce è stata ottenuta con una riduzione dei tempi di analisi di circa 1,7 volte mantenendo R e TZ uguali a quelli dell'analisi convenzionale mentre l'analisi ultraveloce è stata ottenuta con una riduzione dei tempi di analisi di circa 11 volte. Sebbene in questa ultima analisi i valori di R e TZ siano più bassi di quelli delle due analisi precedenti, come si può vedere dalla Tabella 2 e dalla Figura 4 essi sono tali da permettere una separazione soddisfacente anche di tutte le coppie critiche.

Dopo l'ottimizzazione dei tre metodi con la miscela standard sono stati analizzati con gli stessi metodi gli esteri metilici di un olio di fegato di merluzzo e di un olio extravergine di oliva e di un burro del commercio. Nelle Figure 5 e 6 sono riportati

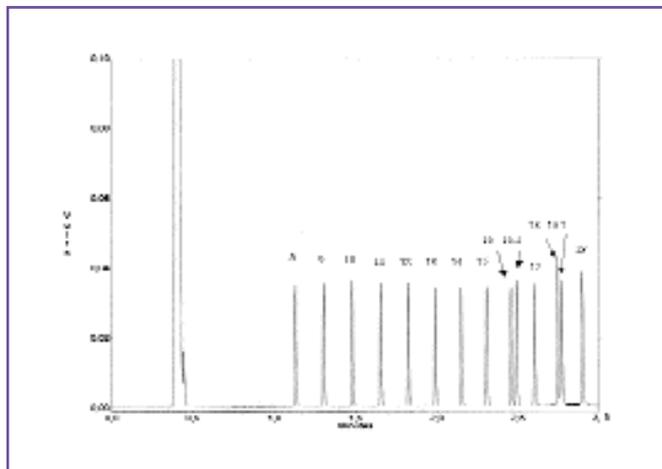


Figura 4 - Analisi "GC ultraveloce" di 19 FAMES, ultimo picco eluito a 2,893 min. Guadagno: 11,09

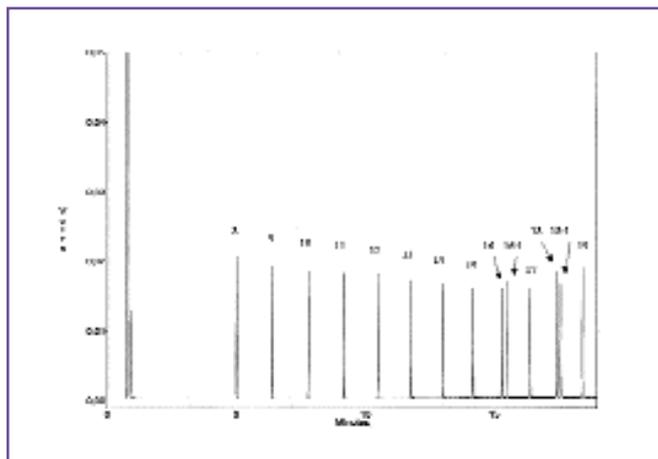


Figura 3 - Analisi "GC veloce" di 19 FAMES, ultimo picco eluito a 18,454 min. Guadagno: 1,74

i cromatogrammi dei primi due campioni ottenuti con il metodo ultraveloce. Come si può vedere dalle due Figure i tempi di analisi, per i due campioni, sono stati, rispettivamente, di circa 4 e 3 minuti. In entrambi i casi la separazione dei vari componenti è stata soddisfacente e i risultati quantitativi paragonabili a quelli delle analisi GC convenzionali come si può osservare dalla Tabella 3 dove sono messi a confronto i risultati ottenuti per gli acidi grassi del burro con il metodo convenzionale e con quello ultraveloce.

Conclusioni

L'utilizzo di colonne microbore (oggi facilmente reperibili in commercio) e di strumentazione gascromatografica che consente elevate pressioni di esercizio, elevato flusso del gas di trasporto, elevati valori di splittaggio, elevati incrementi lineari di temperatura, elevate frequenze di campionamento del rive-

Tabella 3 - Valori delle aree percentuali degli esteri metilici del burro ottenuti mediante analisi convenzionale e ultraveloce

	Convenzionale (tempo di analisi: 33,0 min.)	Ultraveloce (tempo di analisi: 3,0 min.)
C4:0	2,4	2,7
C6:0	1,7	1,9
C8:0	1,0	1,1
C10:0	2,6	2,6
C10:1	0,2	0,2
C12:0	3,2	3,0
C14:0	11,4	10,9
C14:1	0,8	0,8
C15:0	1,3	1,0
C16:0	32,8	32,2
C16:1	1,6	1,8
C17:0	0,2	0,3
C17:1	0,3	0,2
C18:0	10,9	10,3
C18:1	23,5	24,5
C18:2	2,5	2,8
C18:3	0,5	0,6



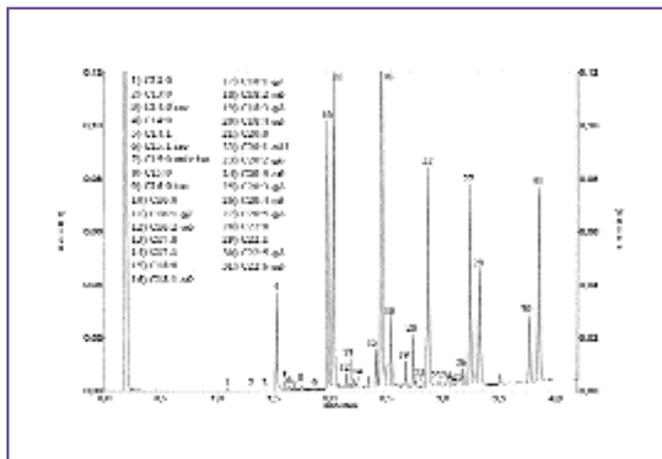


Figura 5 - Analisi "GC ultraveloce" degli esteri metilici degli acidi grassi (FAMES) dell'olio di fegato di merluzzo

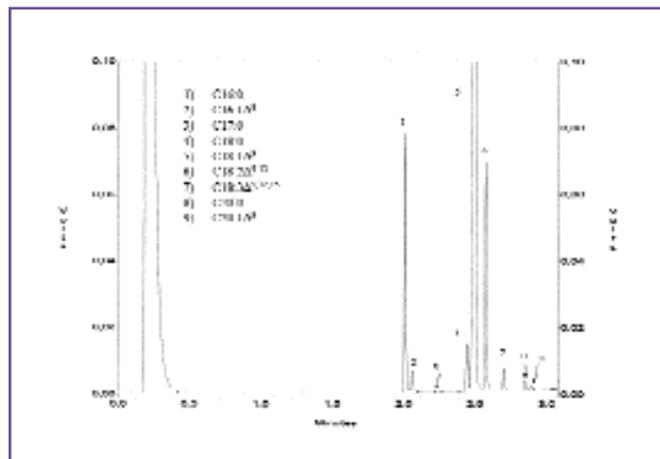


Figura 6 - Analisi "GC ultraveloce" degli esteri metilici degli acidi grassi (FAMES) dell'olio extra vergine d'oliva

latore, consente riduzioni drastiche dei tempi di analisi consentendo allo stesso tempo l'ottenimento di risultati qualitativi e quantitativi paragonabili a quelli delle analisi convenzionali.

Bibliografia

- [1] L. Mondello, G. Zappia, *et al.*, *J. Microcol. Sep.*, 2000, **12**, 41.
- [2] A. van Es, *High Speed Narrow Bore Capillary Gas Chromatography*, Huethig, Heidelberg, 1992.
- [3] L. Mondello, G. Zappia, *et al.*, *LC-GC Europe*, 2000, **7**, 495.
- [4] A.D. Broske, I. Blumberg, D.R. Gere, *in: P. Sandra (Ed) Proc. 20th Int. Symp. on Capillary Chromatography*, Riva del Garda, May 26-29, 1998, Huthig, Heidelberg.
- [5] A.D. Broske, I. Blumberg, D.R. Gere, *in: P. Sandra (Ed) Proc. 20th Int. Symp. on Capillary Chromatography*, Riva del Garda, May 26-29, 1998, Huthig, Heidelberg.
- [6] F. David, D.R. Gere, *et al.*, *in: P. Sandra (Ed) Proc. 20th Int. Symp. on Capillary Chromatography*, Riva del Garda, May 26-29, 1998, Huthig, Heidelberg.
- [7] W.S. Cooke, *Today's Chemist at Work*, 1996, **1**, 16.
- [8] P. Sandra, B. Denoulet, F. David, *in: P. Sandra (Ed) Proc. 18th Int. Symp. on Capillary Chromatography*, Riva del Garda, Italy, May 20-24, 1996.
- [9] M. van Lieshout, M. van Deursen, *et al.*, *J. Microcol. Sep.*, 1999, **11**, 155.
- [10] Y. Shen, M.L. Lee, *J. Microcol. Sep.*, 1997, **9**, 21.
- [11] Y. Shen, Y.J. Yang, M.L. Lee, *Anal. Chem.*, 1997, **69**, 628.

Impiego della tecnica HPLC per la determinazione di micotossine nelle granaglie

a cura di Stefano Ogliari

Un attento programma di monitoraggio delle micotossine richiede la disponibilità di metodi di analisi precisi, sensibili e accurati. Il campionamento è una fase cruciale dell'analisi poiché le micotossine non sono uniformemente distribuite nelle derrate alimentari. Un campionamento poco accurato potrebbe seriamente compromettere il risultato finale dell'analisi.

I metodi analitici per la determinazione di micotossine in prodotti agro-alimentari prevedono, generalmente, l'estrazione della tossina dalla matrice, una fase di purificazione (cleanup) dell'estratto allo scopo di eliminare possibili interferenze

dovute all'effetto matrice e, infine, la rivelazione della tossina mediante un'opportuna tecnica strumentale.

La purificazione dell'estratto è una fase essenziale dell'analisi, soprattutto quando vengono usate tecniche cromatografiche per la determinazione finale della tossina a livelli di tracce.

I metodi comunemente impiegati richiedono tempi lunghi di analisi e notevoli consumi di solvente. Negli ultimi anni l'introduzione di metodi basati sull'impiego di anticorpi specifici ha rivoluzionato i metodi tradizionali di analisi di micotossine. In particolare, l'uso di colonne ad immuno affinità per la purificazione e concentrazione dell'analita, in combinazione con la cromatografia liquida ad alta pressione (HPLC) fornisce una serie di vantaggi rispetto ad altri metodi di analisi comunemente in uso: ottenimento di estratti privi di interferenze a causa della specificità dell'anticorpo per la tossina o gruppo di tossine che possono essere facilmente separate mediante

Stefano Ogliari, HPLC, Data Handling, Shimadzu Italia, Milano.



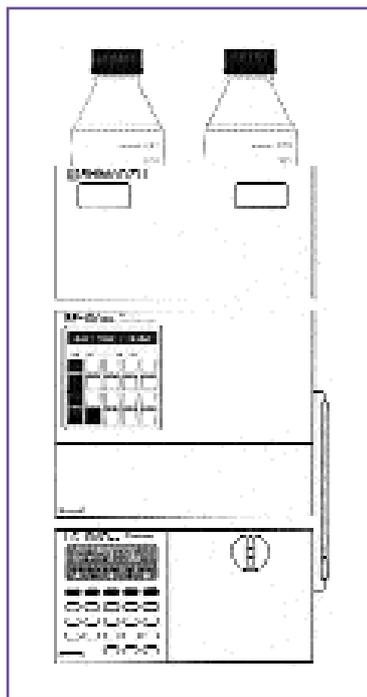


Figura 1 - Il sistema HPLC Shimadzu

HPLC, ottime prestazioni in termini di precisione e accuratezza, ridotti tempi di analisi e, infine, limitato uso di pericolosi solventi organici.

Le colonne ad immuno affinità sono oggi disponibili per le seguenti micotossine: aflatoxine B₁, B₂, G₁ e G₂, aflatosina M₁, ocratossina A, fumonisina B₁, B₂, e B₃, Zearalenone e deossivalenolo (DON).

Metodi analitici che utilizzano colonne ad immuno affinità sono stati recentemente saggati in studi interlaboratorio e sottoposti a valutazione da parte di organizzazioni internazionali (European Standardization Organization, Association of Official Analytical

Chemists International, European Committee for Standard) per essere adottati come metodi ufficiali di analisi.

Analisi - Determinazione di Zearalenone nel mais

• Standard e materiali

Preparare una soluzione stock di Zearalenone (Sigma) sciogliendo lo standard in metanolo (1 mg/ml). Preparare le soluzioni standard utili per effettuare la curva di calibrazione diluendo opportunamente la soluzione stock di Zearalenone in metanolo o fase mobile. Colonne per immuno affinità Vicam Zearala Test e carta da filtro. Matrice (bianco) di mais certificata.

• Strumentazione

Il sistema HPLC consiste in una unità di pompaggio Shimadzu LC-10ADVP con iniettore Rheodyne modello 7725i e loop da 50 µl, una colonna analitica Supelco reverse phase LC18 150 x 4,6 mm 5 µm, spettrofluorimetro Shimadzu RF-10 AxI e un software di acquisizione dati Class-VP4.

• Preparazione del campione

Circa 1 kg di campione viene finemente macinato o omogeneizzato. 20 g di campione vengono addizionati con 2 g di KCl e si estraggono con 50 ml di acetonitrile-acqua (90:10 v/v) agitando moderatamente per due minuti. Si raccoglie l'estratto filtrato su carta, se ne prelevano 10 ml che si diluiscono a 100 ml con acqua. 10 ml di diluito vengono fatti passare attraverso una colonna per immuno affinità Zearala Test alla velocità di una goccia al secondo. Dopo il lavaggio con acqua, si raccoglie lo Zearalenone con 1,5 ml di metanolo. Portare a secco il raccolto in corrente di azoto e ricostruire con 250 µl di fase mobile.

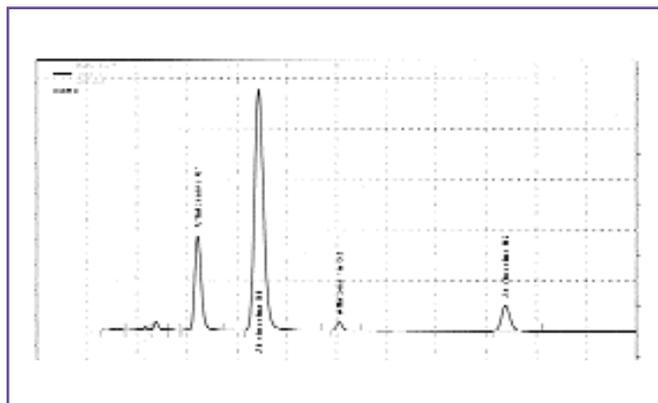


Figura 2 - Cromatogramma standard aflatoxine G₁, B₁, G₂, B₂

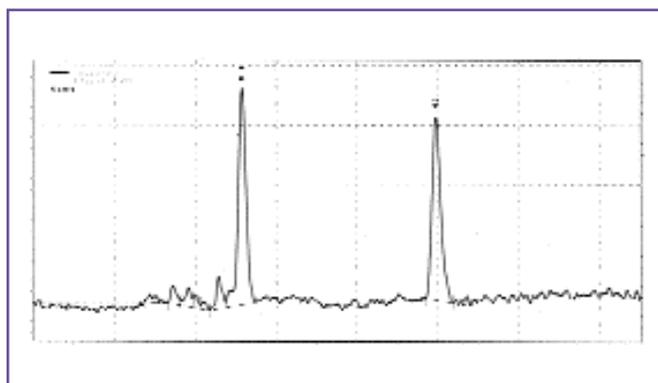


Figura 3 - Cromatogramma standard aflatoxine M₁ e M₂ (ppb nel latte)

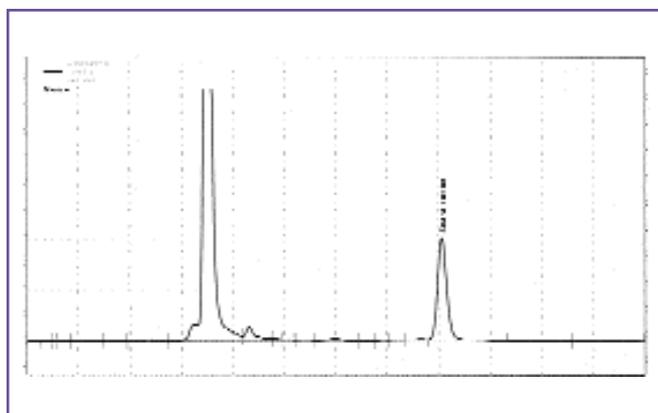


Figura 4 - Cromatogramma standard Zearalenone (granaglie)

• Determinazione HPLC

50 µl di ricostruito vengono iniettati nel sistema HPLC ed eluiti con una fase mobile composta da acqua (790 ml), acetonitrile (70 ml), metanolo (70 ml), e acido acetico (70 ml). Le lunghezze d'onda impostate sono a 365 nm per l'eccitazione e 440 nm per l'emissione. La velocità di flusso è pari a 1 ml/min.

La quantità minima di Zearalenone quantificabile (L.O.D.) è stata di 2 ng/g con un rapporto s/n = 3.

Impiegando la stessa strumentazione analitica e utilizzando colonne ad immuno affinità specifiche per le varie tossine si possono eseguire saggi in differenti matrici come riportato nei cromatogrammi delle Figure 2, 3 e 4.

