

SciSep 2014

Danilo Corradini

Istituto di Metodologie Chimiche del CNR

Area della Ricerca di Roma 1

danilo.corradini@cnr.it

Incontri di Scienza delle Separazioni: stato dell'arte e innovazioni delle tecniche separative in campo agroalimentare, biomedico e ambientale

Lo scorso dicembre si è tenuto a Roma, presso l'Aula Marconi della sede centrale del CNR, il Convegno *Incontri di Scienza delle Separazioni: stato dell'arte e innovazioni delle tecniche separative in campo agroalimentare, biomedico e ambientale* (SciSep 2014). Il Convegno ha visto l'attenta partecipazione di 104 tra ricercatori, dottorandi e docenti, provenienti da 29 diverse sedi (università, enti di ricerca, imprese), distribuite sull'intero territorio nazionale. Le comunicazioni presentate hanno fornito un'ampia panoramica dello stato dell'arte della Scienza delle Separazioni in Italia, particolarmente attiva nei settori delle tecniche separative bidimensionali (GCxGC e LCxLC), della proteomica, metabolomica e biomedicina, delle tecniche di preparazione del campione e d'isolamento di biomolecole in matrici naturali complesse per la valorizzazione degli scarti dell'industria agroalimentare, nella determinazione di contaminanti emergenti, nel monitoraggio ambientale e della filiera agroalimentare.

Il Convegno è stato organizzato dal Gruppo Interdivisionale di Scienza delle Separazioni della Società Chimica Italiana (GISS) con il patrocinio dell'Istituto di Metodologie Chimiche del CNR e delle Divisioni di Chimica Analitica e di Chimica dell'Ambiente e dei Beni Culturali della Società Chimica Italiana. Il GISS è costituito da soci della Società Chimica Italiana che conducono ricerca e/o svolgono attività tecnico/scientifiche nel campo della Scienza delle Separazioni. Questa disciplina, che integra le tecniche separative, principalmente cromatografia ed elettroforesi, con la spettrometria di massa e le altre tecniche strumentali di riconoscimento e caratterizzazione molecolare, ha assunto un ruolo fondamentale in molteplici ambiti scientifici ed è sempre più praticata sia in campo accademico sia industriale. L'organizzazione di questo convegno, come degli analoghi programmati negli anni precedenti, denominati *Incontri di Scienza delle Separazioni*, costituisce un'attività centrale del GISS, finalizzata a favorire momenti d'incontro e discussione tra i praticanti la Scienza delle Separazioni in Italia, soprattutto dei più giovani, ai quali gli *Incontri* sono preferenzialmente rivolti.

L'edizione 2014 è stata organizzata con il generoso contributo di alcuni sponsor (LabService Analytica, Shimadzu, SRA Instruments, Thermo Scientific, Waters) che ha permesso la partecipazione gratuita, favorendo così la presenza di giovani ricercatori non strutturati e di dottorandi di ricerca che hanno presentato la maggior parte delle comunicazioni scientifiche. Il GISS ha inoltre destinato tre borse di studio, dell'importo massimo di euro 250 cadauna, a giovani ricercatori non strutturati (dottorandi, assegnisti di ricerca, borsisti) di età inferiore a 32 anni con sede lavorativa e residenza fuori della regione Lazio. Le borse hanno coperto, fino all'importo massimo stabilito, le spese di viaggio e soggiorno documentate e sono state assegnate, dopo attenta valutazione dei titoli presentati, a Vincenzo Ferrone (Università di Chieti), Mariarosa Maimone (Università di Messina) e Luca Rivoira (Università di Torino). Il volume dei riassunti delle relazioni presentate e il programma scientifico di SciSep 2014, costituito da una relazione magistrale, 28 brevi comunicazioni e 7 comunicazioni flash presentate dal podio, prevalentemente da giovani ricercatori e studenti di dottorato di ricerca, sono consultabili alla pagina del Gruppo Interdivisionale di Scienza delle Separazioni del sito della Società Chimica Italiana.



Società Chimica Italiana
Divisione di Chimica dell'Ambiente e dei Beni Culturali

Incontri di Scienza delle Separazioni

Stato dell'arte e innovazioni delle tecniche separative in campo agroalimentare, biomedico e ambientale



Roma, 12 dicembre 2014

Aula Marconi del CNR, P.le Aldo Moro, 7



Un momento della premiazione per borse di studio SciSep 2014

Il Convegno, introdotto da chi scrive come Coordinatore del GISS e Chairman di SciSep 2014, è stato aperto dai saluti del Direttore del Dipartimento di Scienze Bio-Agroalimentari del CNR, Francesco Loreto e del Vice-presidente della Divisione di Chimica Analitica della SCI, Aldo Laganà. Inoltre, lo scrivente ha portato i saluti del Presidente del CNR, Luigi Nicolais, assente per sopraggiunti impegni istituzionali.

Tecniche separative multidimensionali

Il programma scientifico è stato avviato con la relazione magistrale di Peter Quinto Tranchida, dell'Università degli Studi di Messina, che ha presentato un'approfondita panoramica sui recenti sviluppi della gascromatografia multidimensionale di tipo *comprehensive*. Tranchida svolge l'attività di ricerca scientifica presso i Laboratori del Settore Analitico-Alimentare del Dipartimento di Scienze del Farmaco e Prodotti per la Salute dell'Università degli Studi di Messina, coordinati da Luigi Mondello. Sin dall'inizio della sua carriera accademica, Tranchida si è dedicato alle tecniche gascromatografiche, con particolare attenzione a sviluppo e applicazione in campo agroalimentare di tecniche innovative, come la gascromatografia bidimensionale "comprehensive" (GCxGC), ricevendo numerosi riconoscimenti internazionali, tra i quali il premio "John Phillips Award" nel 2012.

La relazione di Tranchida ha trattato aspetti teorici e pratici della gascromatografia bidimensionale *comprehensive* GCxGC. Questa tecnica permette la risoluzione di miscele complesse mediante l'impiego di due dimensioni separative complementari, realizzate utilizzando due colonne cromatografiche di diversa selettività poste in serie tra loro. Una tecnica separativa bidimensionale è definita "comprehensive" (globale) quando la totalità del campione è soggetta a entrambe le dimensioni di separazione e, nel caso più generale di tecniche separative multidimensionali, ogni separazione successiva preserva la separazione precedente. Il dispositivo che intrappola le frazioni separate dalla prima colonna in attesa che queste passino nella seconda colonna per la successiva separazione, è chiamato "modulatore". La relazione ha illustrato i principi sui quali sono basati i diversi tipi di "modulatori", discutendone le caratteristiche, i vantaggi e gli svantaggi. In particolare, è stata esaminata in dettaglio l'evoluzione e le prospettive future dei "modulatori" che non utilizzano fluidi criogenici, soffermandosi sulle caratteristiche peculiari dei "modulatori pneumatici" o "modulatori a flusso", i cui costi strumentali e di esercizio sono minori di quelli che utilizzano i fluidi criogenici.

La cromatografia multidimensionale non è una prerogativa della gascromatografia e le successive comunicazioni hanno illustrato diverse applicazioni sia di gascromatografia sia di cromatografia liquida multidimensionale, tre delle quali presentate da Arigò, Maimone e Russo dei Laboratori coordinati da Luigi Mondello, all'avanguardia nello sviluppo di tecniche separative multidimensionali. Mariarosa Maimone, vincitrice di una delle borse poste in palio dal GISS, ha descritto un sistema di gascromatografia tridimensionale su scala preparativa, accoppiato in linea con la cromatografia liquida a elevate prestazioni (HPLC) in fase diretta. La separazione mediante HPLC, eseguita prima delle tre separazioni gascromatografiche, è introdotta come stadio di pre-separazione e per minimizzare l'effetto matrice del campione. Lo strumento a quattro dimensioni così realizzato è stato utilizzato con successo per l'isolamento dei principali sesquiterpeni ossigenati dell'olio essenziale di sandalo (*Santalum album*).

Adriana Arigò ha illustrato l'impiego di un sistema HPLC multidimensionale per la separazione, l'isolamento e il riconoscimento di limonoidi (triterpeni altamente ossigenati) estratti dai semi di limone. Marina Russo ha invece illustrato l'impiego di un HPLC bidimensionale per separazioni su scala preparativa di composti biologicamente attivi estratti dai prodotti di scarto dei processi di trasformazione industriale degli agrumi. Il sistema è costituito da due colonne HPLC preparative di diversa selettività, collegate in serie mediante un

dispositivo (autocollettore) che raccoglie le frazioni contenente i composti biologicamente attivi separati dalla prima colonna e li inietta nella seconda per la loro definitiva separazione e purificazione. Il sistema utilizza due rivelatori in serie: uno spettrofotometro a serie di fotodiodi e uno spettrometro di massa. Il segnale di quest'ultimo è anche utilizzato dall'autocollettore per la raccolta automatizzata delle frazioni da sottoporre alla seconda dimensione separativa.

La realizzazione di un sistema bidimensionale "comprehensive" HPLCxUHPLC è stata illustrata da Eduardo Sommella dell'Università di Salerno. Il sistema, realizzato in collaborazione con il Gruppo di Francesco Gasparrini dell'Università Sapienza di Roma, utilizza due colonne in serie a fasi inverse di diversa selettività e dimensione, eluite a due differenti valori di pH (alcalino la prima, acido la seconda colonna) e velocità di flusso della fase mobile di 20 $\mu\text{L}/\text{min}$ e 2,5 mL/min , rispettivamente per la prima e per seconda colonna. Le due colonne sono collegate in serie mediante una valvola a dieci porte. La velocità di separazione della seconda colonna è nettamente superiore a quella della prima e sufficiente a garantire che ogni ciclo di separazione che avviene nella seconda dimensione è completato prima del campionamento delle frazioni separate nella prima dimensione. Il sistema è stato applicato con successo alla separazione di peptidi rilasciati dalla digestione enzimatica di proteine del latte.

Peptidi, proteine e proteomica

Il ruolo chiave svolto dall'HPLC nell'analisi di peptidi e proteine e in proteomica è emerso anche nel corso di questo convegno. Susy Piovesana, dottoranda presso il gruppo di ricerca di Aldo Laganà dell'Università di Roma "La Sapienza", ha illustrato l'impiego della nano-HPLC accoppiata alla spettrometria di massa per lo studio dell'adsorbimento di proteine alla superficie di liposomi utilizzati come vettori di farmaci. Lo studio, è stato condotto realizzando un approccio di proteomica *shotgun*, con accoppiamento del sistema nano-HPLC a uno spettrometro di massa LTQ Orbitrap XL. Valentina Colapicchioni, dello stesso gruppo di ricerca, ha illustrato lo sviluppo di una piattaforma analitica per la caratterizzazione di micro particelle piastriniche basata su un approccio proteomico. Il metodo sviluppato prevede sia l'analisi diretta mediante nano-HPLC-MS/MS dei peptidi prodotti dalla digestione enzimatica del campione, sia il preventivo arricchimento delle proteine a bassa concentrazione e massa molecolare, presenti nel campione da digerire, utilizzando micro particelle di idrogel. La piattaforma analitica ha consentito l'identificazione di 603 proteine estratte da



micro particelle piastriniche, delle quali 243 non riportate in letteratura. Un ulteriore risultato dell'attività di ricerca in proteomica condotta presso il gruppo di ricerca di Laganà è stato presentato da Riccardo Zenezini Chiozzi, il quale ha illustrato due protocolli innovativi per l'estrazione e la purificazione di peptidi endogeni nel latte di asina, finalizzati allo studio del peptidoma di questo tipo di latte, per il quale si riscontra un crescente interesse da parte di consumatori allergici alle proteine del latte vaccino. Il primo

protocollo è basato sulla precipitazione con acetone a freddo di tutte le proteine, mentre nel secondo si esegue la precipitazione selettiva delle caseine, a pH 4,6. In entrambi i protocolli d'analisi la separazione e identificazione dei peptidi è eseguita mediante nano-HPLC-MS/MS. Il metodo ha condotto all'identificazione di 1.330 peptidi totali, 1.104 per il protocollo acetone e 984 per l'altro.

La minore concentrazione delle proteine fosforilate rispetto a quelle non-fosforilate, generalmente presenti nei campioni biologici, è solo uno dei fattori che rendono l'analisi di queste biomolecole particolarmente problematica. Valentina Longo del gruppo di ricerca di Zolla presso l'Università della Tuscia ha illustrato un approccio innovativo di spettrometria di massa "label free" per quantificare il grado di fosforilazione di specifici peptidi appartenenti ad importanti proteine del globulo rosso (β -spettina, anchirina, α -adducina, dematina, glicoforina A e glicoforina C) in funzione del tempo di conservazione di concentrati eritrocitari in condizioni standard. Il metodo sviluppato prevede la digestione con tripsina del campione, l'arricchimento dei fosfopeptidi mediante estrazione solido-liquido con micro-cartucce impaccate con ossido di titanio e la

successiva analisi dei peptidi mediante nano-HPLC-MS. Da questo gruppo di ricerca è inoltre pervenuto il contributo, presentato da Federica Gevi, relativo a un approccio metabolomico per l'analisi di ormoni e amminoacidi in campioni di urine che utilizza la cromatografia liquida a ultra elevata prestazione accoppiata alla spettrometria di massa (UHPLC-MS), utilizzando colonne per interazione idrofilia (HILIC).

Rosalinda Mazzei, dell'Istituto per la Tecnologia delle Membrane del CNR di Rende, ha presentato i risultati di uno studio condotto per valutare alcuni parametri chimico-fisici e operativi che influenzano la separazione delle due principali proteine del siero, l' α -lattoalbumina (14 kDa) e la β -lattoglobulina (18 kDa), mediante ultrafiltrazione. Lo studio è stato condotto a diversi valori di pH e forza ionica, utilizzando membrane per ultrafiltrazione in cellulosa rigenerata da 30 kDa, cariche positivamente e non cariche. I risultati hanno mostrato che a pH 3,4 le membrane con carica positiva sono in grado di separare la proteina α -LA dalla β -LG con elevata purezza e fattore di recupero.

Biomedicina, analisi farmaceutica e forense

Anche numerose e di qualità sono state le comunicazioni inerenti le applicazioni delle tecniche separative alle problematiche analitiche in campo biomedico, farmaceutico e forense. Alessia Ciogli, dell'Università di Roma "La Sapienza", ha presentato i risultati di una ricerca condotta con Francesco Gasparrini, per valutare l'impiego di supporti cromatografici chirali, di dimensione inferiore a 2,0 μ m, in cromatografia supercritica (HSPSFC), in cui la fase mobile è un fluido supercritico. La comunicazione ha evidenziato che in HSPSFC le colonne possono essere eluite a velocità di flusso maggiore rispetto all'impiego della stessa fase in UHPLC. La comunicazione ha inoltre descritto lo sviluppo di metodi di screening in cui 129 racemati di interesse farmaceutico (33 acidi, 38 neutri e 58 basici) sono stati analizzati. La maggior parte dei campioni acidi e neutri è stata risolta (61 campioni su 71) e nel 65% dei casi la risoluzione ha presentato valori superiori a 2.

La determinazione mediante cromatografia elettrocinetica micellare (MEKC) di alcuni nucleosidi marcati ottenuti per tioalchilazione della deossi-adenosina è stata illustrata da Valentina Bosi, dell'Università di Ferrara. Il metodo sviluppato utilizza due distinti procedimenti di pre-concentrazione del campione. Uno basato sulla micro estrazione in fase solida (μ -SPE) e l'altro sull'iniezione con polarità dell'elettrodo invertita. La micro estrazione in fase solida è stata condotta utilizzando nanoparticelle d'oro. Il metodo sviluppato ha permesso di ottenere fattori di arricchimento 300-400 volte maggiori rispetto alla MEKC tradizionale, con percentuali relative di recupero dei nucleosidi marcati comprese tra il 95% ed il 103% e bassi limiti di rivelazione. L'approccio *Quality by Design* (QbD) è stato applicato per ottimizzare un metodo per la determinazione, mediante elettroforesi capillare (CE), della purezza enantiomerica del farmaco neurolettico atipico levosulpiride (S-SUL). I dettagli di questo studio sono stati presentati da Benedetta Pasquini dell'Università di Firenze. L'approccio QbD ha anche contribuito ad accrescere la comprensione del processo di separazione in elettroforesi capillare.

Vincenzo Ferrone, vincitore di una delle borse poste in palio dal GISS, ha illustrato un metodo RP-HPLC, sviluppato presso il Laboratorio di Carlucci dell'Università di Chieti, presso il quale sta svolgendo il dottorato di ricerca, mediante il quale eseguire l'analisi simultanea dell'octreotide e del metabolita del gagesato mesilato in fluidi di drenaggio pancreatico umano. Il gagesato mesilato o etile-*p*-(6-guanidinoesanoilossi)benzoato metansolfonato è un inibitore sintetico non specifico della serin proteasi plasmatica e pancreatica, utilizzato nella terapia delle pancreatiti e della coagulazione intravascolare disseminata e come anticoagulante nelle emodialisi. L'octreotide è un octapeptide ciclico sintetico a lunga durata d'azione, analogo della somatostatina, utilizzato nel trattamento clinico dei disturbi endocrini dove agisce inibendo il rilascio dell'ormone della crescita, dell'insulina, del glucagone, e di altri ormoni. Scotti, dello stesso gruppo di ricerca, ha presentato un metodo per la simultanea quantificazione di arginina e arginine metilate in plasma umano e liquidi follicolari. I campioni, dopo estrazione, sono derivatizzati con OPA e analizzati mediante UHPLC a fase inversa con sistema di rivelazione in fluorescenza. Alessandro Taddeo, dell'Università di Chieti, ha descritto l'ottimizzazione e l'applicazione di un metodo RP-HPLC per l'analisi di alcuni metaboliti biologicamente attivi (prenilossifenilpropanoidi) d'interesse farmaceutico, estratti da miele, propoli e semi di pompelmo. Il metodo utilizza una colonna C18 e rivelazione spettrofotometrica UV-Vis.

I risultati di uno studio condotto per mettere a punto una procedura analitica per la rivelazione di cannabinoidi sintetici in urina tramite LC-MS/MS sono stati presentati da Camilla Montesano dell'Università di Roma "La Sapienza". Il metodo utilizza una colonna a fase inversa "core-shell" (5,0x2,1

mm, 5 µm particle size) e l'accoppiamento del sistema HPLC a uno spettrometro di massa con analizzatore a triplo quadrupolo e sorgente di ioni ESI, utilizzando la modalità di acquisizione precursor ion scan. La selezione degli ioni precursori specifici, corrispondenti a delle frazioni comuni alle varie sostanze, consente di rilevare un discreto numero di cannabinoidi sintetici e metaboliti. La preparazione del campione prevede l'uso della tecnica µ-SPE, che permette la riduzione dei tempi e del volume di campione da utilizzare.

Manuel Sergi, dell'Università di Teramo, ha illustrato un metodo rapido ed accurato per eseguire l'identificazione e la quantificazione di cannabinoidi e loro metaboliti nei capelli. L'estrazione degli analiti dalla matrice pilifera è eseguita mediante estrazione con liquido pressurizzato (PLE o ASE) usando come solvente di estrazione una miscela acqua/metanolo (80/20 v/v) con aggiunta di sodio dodecil solfato. Il liquido estraente è successivamente purificato mediante SPE, sia per ridurre l'effetto matrice sia per concentrare gli analiti, al fine di raggiungere i limiti di rivelazione richiesti. L'analisi è eseguita con un sistema UHPLC accoppiato ad uno spettrometro di massa tandem ibrido quadrupolo/trappola orbitale (Q-Orbitrap) in modalità Target MS (MS/MS) in ionizzazione positiva, con minimo due frammenti diagnostici per ciascun analita.

Ambiente

Il rilascio di sostanze biologicamente attive di origine antropica nell'ambiente sta assumendo dimensioni sempre più rilevanti e preoccupanti. Salvatore Ventura, del gruppo di ricerca di Laganà dell'Università di Roma "La Sapienza", ha presentato i risultati di una ricerca condotta per lo sviluppo di un efficiente metodo di estrazione e analisi in acque lacustre di composti impiegati come filtri UV nelle creme solari. Questi composti, contenuti anche in altri prodotti industriali, costituiscono una classe di inquinanti ambientali emergenti verso i quali è crescente l'attenzione di ricercatori e autorità deputate al controllo dell'ambiente. Il metodo multi-residuale sviluppato è altamente sensibile ed è basato sull'estrazione del campione in fase solida (SPE), utilizzando carbone grafitizzato come materiale assorbente, seguita da cromatografia liquida ad ultra elevate prestazioni accoppiata alla spettrometria di massa tandem (UHPLC-MS/MS). I limiti di rilevabilità e di quantificazione riportati sono, rispettivamente, nell'intervallo tra 0,7-3,5 e 1,9-11,8 ng/L.

La comunicazione presentata da Roberta Guzzinati dell'Università di Ferrara e del Centro Ricerca Casaccia Enea, descrive un metodo per la preconcentrazione e determinazione di composti perfluoroalchil carbossilati in matrici acquose. Questi composti, ampiamente utilizzati per la produzione di rivestimenti, fluoropolimeri, ritardanti di fiamma, adesivi, vernici ecc., sono inquinanti emergenti estremamente persistenti. Il metodo sviluppato da Guzzinati, in collaborazione con Cavazzini dell'Università di Ferrara, prevede che la preconcentrazione del campione e la successiva analisi mediante HPLC-MS siano eseguiti online. La preconcentrazione del campione è eseguita utilizzando una cartuccia impaccata con materiale perfluorurato, con il quale i composti perfluoroalchil carbossilati interagiscono in modo selettivo (fluorofilicità), mentre la successiva separazione HPLC è eseguita utilizzando una colonna C18. I risultati dello studio delle interazioni stabilite da fasi stazionarie perfluorate con alchilbenzeni fluorurati e non sono stati illustrati da Martina Catani, che ha condotto l'indagine presso il gruppo di ricerca di Cavazzini.

Altri inquinanti emergenti di cui si è discusso nel corso del Convegno sono i fluorochinoloni, la cui determinazione richiede accurati e robusti metodi analitici. La comunicazione presentata da Andrea Speltini dell'Università di Pavia ha discusso i risultati di uno studio, condotto con Antonella Profumo, per lo sviluppo di un materiale per l'estrazione in SPE di fluorochinoloni in matrici acquose. Il materiale adsorbente è stato preparato legando monostrati di grafene ossido (GO) a micro-particelle di silice derivatizzata con gruppi amminopropilici e, successivamente, trattati con una soluzione acquosa di idrazina per ottenere GO ridotto (RGO). Il materiale finale (silice-RGO) è stato caratterizzato mediante analisi termogravimetrica, microscopia a scansione elettronica e analisi BET, e per la prima volta testato come fase SPE "mixed-mode" per la pre-concentrazione di 5 fluorochinoloni in acque naturali. Il nuovo materiale è risultato essere superiore alle cartucce SPE commerciali in termini di efficienza estrattiva ed economicità, in quanto riutilizzabili per oltre 10 estrazioni consecutive.

Gli alchilfenoli polietossilati (APEOs) e i loro metaboliti carbossilici e fenolici sono altri inquinanti che si ritrovano tutt'oggi in uscita dagli impianti di depurazione e nelle acque superficiali, nonostante la Comunità Europea ne abbia ristretto l'uso e la commercializzazione. La comunicazione presentata da Ciofi, dell'Università di Firenze, ha descritto lo sviluppo di un metodo di estrazione e analisi simultanea di APEOs e dei corrispondenti alchilfenossi carbossilati ed alchilfenoli in matrici acquose. Il metodo è basato

sull'automazione del processo di estrazione del campione e del suo accoppiamento in serie (online) con il sistema HPLC-MS/MS utilizzato per la separazione e il riconoscimento degli analiti.

Luca Rivoira, dell'Università di Torino, vincitore di una delle borse di studio poste in palio dal GISS, ha presentato i risultati di uno studio condotto presso il gruppo di ricerca di Bruzzoniti, mediante il quale è stata eseguita la valutazione delle proprietà adsorbenti di diversi materiali per la rimozione dell'erbicida bentazone dalle acque. Le proprietà di rimozione dei materiali investigati sono state verificate tramite batch-test, ponendo a contatto ciascun materiale con soluzioni a titolo noto di bentazone e determinando, mediante HPLC, la concentrazione residua dell'erbicida nella soluzione. Il carbon black è risultato essere il substrato più efficiente nella rimozione, presentando però lo svantaggio di non poter essere facilmente rigenerato per utilizzi successivi.

Lo sviluppo di un metodo per la determinazione della componente organica polare dell'aerosol atmosferico, rappresentata da composti organici polari, inclusi acidi carbossilici, zuccheri e fenoli, è stato presentato da Marco Visentin che ha condotto la ricerca presso il laboratorio di Maria Chiara Pietrogrande dell'Università di Ferrara. Il metodo analitico è basato sulla gas cromatografia-spettrometria di massa (GC-MS e GC-MS/MS) ed ha preso in considerazione 59 composti organici polari, potenzialmente presenti nel particolato atmosferico. L'attento studio delle condizioni sperimentali utilizzate per l'estrazione e la derivatizzazione del campione, la scelta del programma di temperatura e del metodo di acquisizione in MS, hanno determinato lo sviluppo di un metodo analitico del quale è stata provata l'adeguatezza al monitoraggio ambientale.

Agroalimentare e fitochimica

L'apporto delle tecniche separative alle problematiche analitiche in campo agroalimentare e fitochimico, anche emerso da alcune delle comunicazioni inerenti le applicazioni delle tecniche separative multidimensionali o/e l'approccio proteomico, è stato ulteriormente illustrato dalle seguenti comunicazioni.

La comunicazione di Laura Magrini, dell'Università di Urbino, ha illustrato l'impiego dell'interfaccia nano-HPLC-Direct-EI per la separazione e identificazione di un mix di contaminanti ambientali (pesticidi ed

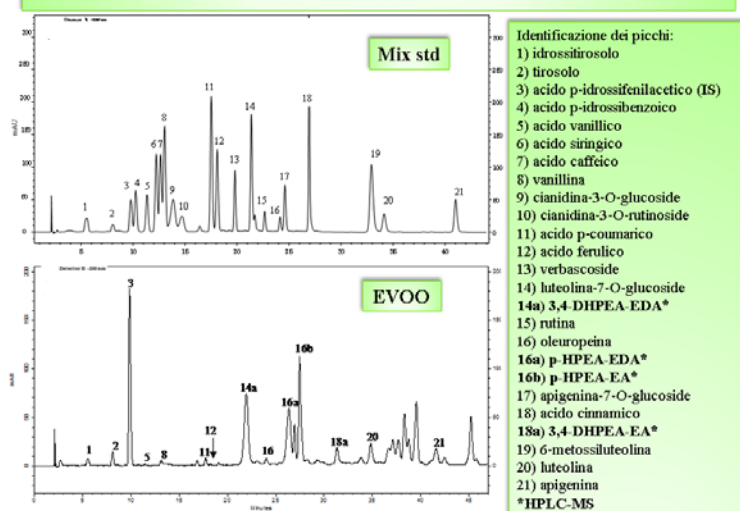


ormoni) in un campione di latte in polvere. La Direct-EI è un interfaccia sperimentale che combina la nano cromatografia liquida ad alte prestazioni (nano-HPLC) con uno spettrometro di massa operante in ionizzazione elettronica (EI), dotato di un analizzatore a singolo quadrupolo. L'utilizzo di tale interfaccia permette di sfruttare i vantaggi di ambo le tecniche, quali: una semplice ed accurata identificazione degli analiti mediante confronto con librerie elettroniche presenti in commercio; una notevole riduzione dell'effetto matrice rispetto alle comuni tecniche LC-MS; possibilità di analisi nella medesima corsa cromatografica di un

ampio range di sostanze con caratteristiche chimico fisiche diverse; strumentazione a basso costo. Il principio di funzionamento dell'interfaccia è piuttosto semplice e si sviluppa in 4 passaggi: 1) formazione dell'aerosol, 2) evaporazione del solvente, 3) vaporizzazione del soluto, 4) ionizzazione delle molecole in fase gassosa.

Anna Rocco, dell'Istituto di Metodologie Chimiche del CNR - Unità di ricerca Processi Analitici Sostenibili per Nutraceutici, Farmaci e Droghe coordinata da Salvatore Fanali, ha presentato i risultati di uno studio condotto per sviluppare un metodo di cromatografia liquida nano per l'analisi di flavonoidi con nota attività biologica (miricetina, quercetina, naringenina, esperitina e kaempferolo). Lo studio ha valutato le

RP-HPLC DI COMPOSTI FENOLICI IN EVOO



prestazioni di diversi supporti cromatografici (Kinetex® C18 core-shell, 2,6 µm particle size; Hydrise-based RP-C18, sub-2 µm particle size; LiChrospher® 100 RP-18 endcapped, 5 µm particle size) con i quali sono state impaccate le colonne capillari con diametro interno di 75 µm e lunghezza di impaccamento di 10 cm. Sono stati presentati dati sperimentali che hanno evidenziato le migliori prestazioni offerte dalla colonna impaccata con Hydrise-based RP-C18 che, pertanto, è stata utilizzata per la successiva validazione del metodo, poi applicato alla determinazione dei flavonoidi in integratori e matrici alimentari.

Le ammine biogene sono contaminanti naturali prodotti in alimenti di origine vegetale e animale tramite decarbossilazione microbica degli aminoacidi. La loro determinazione negli alimenti è generalmente eseguita per acquisire informazioni sul processo produttivo, la freschezza dell'alimento, le pratiche igienico-sanitarie seguite nella conservazione e l'autenticità della materia prima. La comunicazione presentata da Roberta Bernacchia dell'Università di Roma "La Sapienza", ha illustrato le fasi di ottimizzazione di un metodo HPLC a fase inversa che utilizza una colonna impaccata con particolato "core-shell" di 2,6 µm di diametro medio. Lo studio ha preso in considerazione i vari parametri che influenzano la separazione cromatografica, utilizzando 11 ammine biogene standard che sono state derivatizzate pre-column con cloruro di dansile e rivelate mediante rivelatore fluorimetrico ($\lambda_{exc}=320$ nm, $\lambda_{em}=523$) e UV ($\lambda=254$ nm). Il metodo validato è stato applicato per la determinazione di ammine biogene in vini rossi, succhi di frutta e prosciutti crudi e cotti.

Tre delle quattro comunicazioni presentate da miei collaboratori hanno riguardato lo sviluppo di metodi HPLC per la separazione e identificazione di metaboliti secondari in matrici agroalimentari, messi a punto presso l'Unità di ricerca dell'Istituto di Metodologie Chimiche del CNR "Metabolomica dei Sistemi Biologici in Campo Alimentare, Fitochimico e Biomedico", da me coordinata. Elena Albanese ha illustrato un metodo RP-HPLC-MS per l'analisi di composti fenolici in olio extra vergine di oliva, applicato al monitoraggio della loro variazione in relazione al tempo e alle condizioni di stoccaggio di questo alimento. Luisa Aruanno ha illustrato un lavoro condotto nell'ambito di una collaborazione con Laura De Gara dell'Università Campus Biomedico di Roma, presso il quale ha conseguito la laurea magistrale, relativo all'identificazione e caratterizzazione di flavonoidi in foglie di *Cyclanthera pedata*, pianta edibile e medicinale originaria del Sud America. L'identificazione dei flavonoidi separati mediante RP-HPLC è stata eseguita sulla base degli spettri di assorbimento UV e di massa ottenuti, rispettivamente, con il rivelatore PDA ed ESI-MS in modalità di ionizzazione positiva. L'indagine ha consentito l'identificazione in foglie di *Cyclanthera pedata* di un nuovo flavonoide glicosilato, l'apigenina-7-O-glucoside, non ancora riportato in letteratura. Daniela Martini ha presentato i risultati di un lavoro svolto in collaborazione con il CRA nell'ambito dell'attività di ricerca del dottorato di ricerca, condotto presso l'Università Campus Biomedico di Roma. La comunicazione ha illustrato lo sviluppo di un metodo RP-HPLC, con impiego di colonna narrow-bore C18, rivelatore UV a serie di fotodiodi (PDA) e spettrometro di massa con sorgente di ioni per elettrovaporizzazione (ESI-MS). Il metodo è stato applicato per studiare l'effetto del processo di decorticazione del grano duro, che consiste nell'abrasione e frizione delle cariossidi, sul contenuto di metaboliti secondari con attività antiossidante (acidi fenolici) negli scarti di decorticazione (DF) e nelle granelle decorticate (DK), nonché l'impatto dell'uso di DK e di DF nel processo di pastificazione. Marika Pellegrini, dell'Università dell'Aquila (ora dottoranda dell'Università di Teramo) ha invece presentato i risultati di una ricerca, condotta presso l'Unità di ricerca "Metabolomica dei Sistemi Biologici in Campo Alimentare, Fitochimico e Biomedico" dell'Istituto di Metodologie Chimiche del CNR, per lo sviluppo di un metodo per l'identificazione di N-acil-omoserinattoloni (AHL), molecole segnale rilasciate da alcuni batteri per monitorare la densità di popolazione. Il

metodo utilizza la HPLC-ESI-MS, con impiego di una colonna narrow-bore a fase inversa. Il metodo HPLC è stato sviluppato da un approccio "Quality-by-Design", utilizzando il software di modellazione cromatografica DryLab®, per ottimizzare il tempo di gradiente, la temperatura della colonna, la composizione ed il pH dell'eluente, la velocità di flusso e la concentrazione iniziale e finale del gradiente.

Conclusioni

SciSep 2014, analogamente ai precedenti convegni organizzati dal Gruppo Interdivisionale di Scienza delle Separazioni, ha costituito un valido momento di confronto tra giovani ricercatori impegnati in attività di ricerca per le quali l'apporto delle tecniche separative è rilevante. Le comunicazioni presentate hanno evidenziato la vivace e qualificata partecipazione dei nostri giovani ricercatori alle aree emergenti del panorama scientifico internazionale, oltre alla loro attenzione alle problematiche aperte dai bisogni individuali e collettivi, alle quali la scienza è chiamata a fornire risposte. C'è inoltre l'auspicio che lo scambio d'informazioni e d'idee avvenuto durante SciSep 2014 abbia contribuito a rafforzare le collaborazioni in atto e posto le base per promuoverne di nuove.