

Rivelatore a spettrometria di massa

Anche in HPLC (come in GC) l'introduzione di un sistema di rivelazione come lo spettrometro di massa ha creato una vera e propria tecnica accoppiata, la **HPLC-MS**, di crescente successo negli ultimi anni (anche grazie a una sensibile riduzione dei costi). Lo spettrometro di massa, lo ricordiamo, è un rivelatore universale, ad alta sensibilità e con un buon intervallo di linearità e rappresenta quindi la soluzione ideale per moltissime applicazioni.

Le difficoltà di affermazione dell'HPLC-MS sono dovute essenzialmente al problema dell'interfaccia. Non è banale, infatti, accoppiare lo spettrometro di massa, che funziona in condizioni di alto vuoto, con il cromatografo, che produce in uscita un'elevata quantità di solvente. Il problema è stato risolto mettendo a punto particolari sistemi che consentono, in modi diversi, di eliminare l'eluente e di mandare al sistema di frammentazione solo la banda eluita. I sistemi per interfacciare un HPLC e uno spettrometro di massa che più si sono imposti sono la *ionizzazione chimica a pressione atmosferica* (APCI) e l'*elettrospray* (ESI).

Lo sviluppo di colonne che operano con flussi minimi (per esempio di 10-50 $\mu\text{L}/\text{min}$, con le moderne *microbore* e *nanobore*) ha incrementato in modo decisivo le potenzialità di questo sistema accoppiato. Senza soffermarci sulle specifiche soluzioni oggi disponibili, citiamo la possibilità di effettuare misure quantitative e anche di registrare spettri di massa (per impatto elettronico oppure per ionizzazione chimica). Allo stato attuale non esistono però banche dati, ovvero librerie di spettri, LC-MS paragonabili a quelle per GC-MS, per cui l'analisi qualitativa incontra ancora serie limitazioni. Per una trattazione più puntuale si veda il capitolo 27 sulla spettrometria di massa.

Rivelatore fluorimetrico

Questo dispositivo (► fig. 22.24) misura le radiazioni di fluorescenza emesse da particolari classi di sostanze quando vengono eccitate con radiazioni UV o con un laser.

I composti che possono emettere fluorescenza sono quelli che presentano massimi di assorbimento intensi al di sopra di 250 nm. L'emissione di fluorescenza varia secondo i sostituenti presenti nella molecola: in particolare aumenta procedendo da sinistra verso destra nella serie:



La fluorescenza aumenta anche all'aumentare della polarità del solvente.

Con questo tipo di rivelatori si possono usare quasi tutti i solventi per UV a meno che non deprimano la fluorescenza di un composto da rivelare.²³

²³ Per esempio, per separare la chinolina non si può usare *n*-esano, perché in questo solvente la molecola non manifesta fluorescenza e invece si può usare etanolo. I solventi alogenati spesso deprimono la fluorescenza di molti composti.

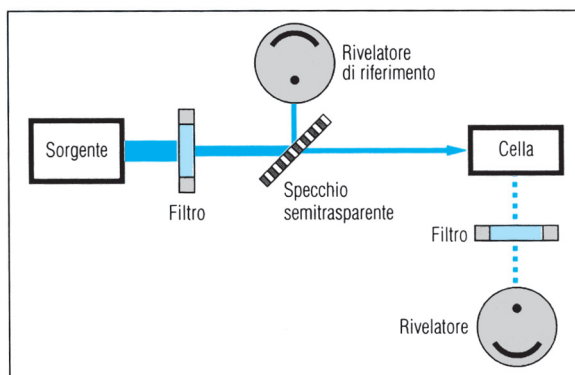


Figura 22.24

Rappresentazione schematica di un fluorimetro per HPLC. Il riferimento è realizzato contro aria. La radiazione fluorescente viene raccolta con una angolazione di 90° rispetto a quella incidente, per evitare interferenze.

I fluorimetri hanno buona sensibilità (fino a 10^{-10} g/mL), sono molto selettivi, insensibili agli sbalzi termici, alla velocità del flusso e compatibili con gradienti di eluizione. Sono particolarmente indicati per le analisi in campo biologico.

Il dispositivo è costituito da una sorgente UV al mercurio o allo xenon: la lunghezza d'onda standard di eccitazione è di solito quella a 360 nm, ma è anche possibile selezionare altre lunghezze d'onda. La radiazione, opportunamente filtrata, è inviata sulla microcella, che riemette radiazioni di fluorescenza. Queste ultime vengono filtrate e raccolte da un normale fotomoltiplicatore.

Tabella 22.11 Assorbimento dei principali gruppi cromofori.

Sostanza	Formula	λ (nm)		Intensità relativa
		Eccitazione	Emissione	
Benzene	C_6H_6	270	310	10 (rifer.)
Toluene	$C_6H_5 - CH_3$	270	320	17
Propilbenzene	$C_6H_5 - C_3H_7$	270	320	17
Fluorobenzene	$C_6H_5 - F$	270	320	10
Clorobenzene	$C_6H_5 - Cl$	275	345	7
Bromobenzene	$C_6H_5 - Br$	290	380	5
Iodobenzene	$C_6H_5 - I$	–	–	0
Fenolo	$C_6H_5 - OH$	285	365	18
Ione fenato	$C_6H_5 - O^-$	310	400	10
Anisolo	$C_6H_5 - OCH_3$	285	345	20
Anilina	$C_6H_5 - NH_2$	210	405	20
Ione anilinio	$C_6H_5 - ^+NH_3$	–	–	0
Acido benzoico	$C_6H_5 - COOH$	310	390	3
Benzonitrile	$C_6H_5 - CN$	280	360	20
Nitrobenzene	$C_6H_5 - NO_2$	–	–	0

Rivelatore rifrattometrico

Il principio su cui si basa il **rifrattometro** è la misura in continuo dell'indice di rifrazione (n_D) dell'eluente in uscita dalla colonna. La variazione dell'indice di rifrazione del solvente, dovuta al passaggio del soluto, viene convertita in segnale elettrico e inviata al sistema di elaborazione dei segnali.

I rifrattometri sono considerati rivelatori universali perché in pratica qualsiasi sostanza ha un indice di rifrazione diverso da quello dell'eluente. Nella scelta dell'eluente conviene orientarsi verso quelli con basso indice di rifrazione e procedere a un accurato degasaggio, per evitare che si formino bollicine d'aria nella microcella del rivelatore.

I rifrattometri sono molto versatili e trovano un grande impiego soprattutto in SEC e nell'analisi degli zuccheri. Non hanno però grande sensibilità (fino a $5 \cdot 10^{-7}$ g/mL), richiedono una rigida termostatazione della temperatura²⁴ e non possono essere usati quando si effettuano eluizioni in gradiente, a meno di non usare solventi che abbiano lo stesso indice di rifrazione.

Gli strumenti usati comunemente funzionano secondo due diversi principi: *riflessione* oppure *deflessione* del raggio.

Nei **rifrattometri a riflessione** (tipo Fresnel) un raggio di luce colpisce la superficie dell'eluente e viene riflesso. L'intensità del raggio riflesso è inversamente proporzionale

²⁴ Per compensare le fluttuazioni dovute alla temperatura, sono stati realizzati **rifrattometri differenziali** in cui, con una cella di riferimento, si misura in continuo la differenza di n_D tra l'eluente puro e quello in uscita dalla colonna. Con questo sistema si possono compensare al 98-99% le variazioni di temperatura.

all'indice di rifrazione e quindi, in pratica, si misura la percentuale di luce riflessa (o trasmessa) all'interfaccia vetro/soluzione della microcella di misura.

Nei **rifrattometri a deflessione** un raggio di luce monocromatica viene fatto passare attraverso una microcella triangolare e inviato a un fotorivelatore. La deviazione del raggio monocromatico dovuta al passaggio di un soluto nell'eluente viene compensata automaticamente, con uno spostamento della sorgente o del fotorivelatore, in modo da mantenere l'allineamento ottico. Tale movimento viene comunicato al sistema di elaborazione dei segnali.

Rivelatore conduttimetrico

La rivelazione delle sostanze in uscita dalla colonna può essere effettuata misurando la variazione di conduttanza della fase mobile. Tale variazione può essere dovuta a cambiamenti di conducibilità specifica o di costante dielettrica dell'eluente, a causa della presenza di specie ioniche o di specie con polarità nettamente diversa da quella del solvente.

I rivelatori conduttimetrici sono molto utili quando si usano fasi mobili acquose e soluti a carattere ionico, in particolare in IEC, negli analizzatori di aminoacidi (*v.* paragrafo 20.9.2) e in GFC.

Sono sensibili alla temperatura (la conduttanza può variare del 2% per ogni °C) e non possono essere usati per eluizioni in gradiente. Consentono una elevata sensibilità (fino a 10^{-8} g/mL), ma risentono della conducibilità di fondo della fase mobile ionica, con conseguente diminuzione del limite di rivelabilità.

Le misure vengono effettuate in corrente alternata, per evitare la polarizzazione degli elettrodi. Questi ultimi sono costituiti da due lamine piatte oppure da due anelli di platino, di acciaio o di grafite, posti in una microcella. Il sistema microcella-elettrodi deve essere perfettamente rigido, per evitare che il *flusso* ad alta pressione dell'eluente ne modifichi anche minimamente l'assetto.

Rivelatore amperometrico

Si basa sulla misura dell'intensità di corrente che si sviluppa nelle reazioni di ossidazione o di riduzione di soluzioni di specie chimiche elettroattive. Tale corrente è proporzionale alla concentrazione dell'analita. Lo schema di base è quello di un polarografo adattato alle misure su piccoli volume.

Rivelatore evaporativo a diffusione di luce laser (*Evaporative Light-Scattering Detector, ELSD*)

È un rivelatore universale, di recente introduzione e di grande interesse (►fig. 22.25). All'uscita della colonna, il flusso di eluente (che deve essere volatile) viene rapidamente vaporizzato e l'aerosol, costituito dai vapori dell'eluente e dalle particelle del campione finemente disperse, passa in una cella dove viene colpito da un raggio laser. La luce diffusa viene raccolta da un fotodiodo che genera un segnale elettrico. Il limite di rivelabilità si aggira intorno a 5 ng/ μ L e non risente delle variazioni di temperatura.