

# Appunti di

# Analisi dei Farmaci IV

## UNIFI – SSU – CdL SFA-CQ

### Alessandro Sussi

---

## Sommario

---

### ESTRAZIONE DEGLI ANALITI

ESTRAZIONE LIQUIDO-LIQUIDO →

ESTRAZIONE SU FASE SOLIDA →

ESTRAZIONE ED ANALISI IN SPAZIO DI TESTA →

2

2

2

3

### CROMATOGRAFIA

CLASSIFICAZIONE →

TEORIA DEI PIATTI →

TEORIA DELLE VELOCITÀ →

RANGE DI RIVELAZIONE DINAMICO →

3

3

3

4

5

### GASCROMATOGRAFIA

VAPORIZZAZIONE →

INIETTORI →

COLONNE →

DETECTOR →

6

6

7

9

9

### HPLC

DEGASSER →

POMPA →

ELUIZIONE E SISTEMI DI POMPAGGIO →

VALVOLA A SEI VIE →

COLONNE →

DETECTOR →

11

11

12

12

12

13

13

## Estrazione degli analiti

I principali metodi di estrazione degli analiti dalla matrice sono i seguenti:

- Estrazione liquido-liquido (LLE);
- Estrazione su fase solida (SPE);
- Estrazione (ed analisi) in spazio di testa.

### Estrazione liquido-liquido →

L'estrazione liquido-liquido, abbreviata con la sigla LLE (Liquid-Liquid Extraction), è una tecnica utilizzata per estrarre gli analiti, sia volatili che non, da una matrice liquida, tramite l'utilizzo di un solvente più affine alle sostanze da estrarre.

Questa estrazione si basa sul coefficiente di ripartizione che l'analita stabilisce fra i due solventi immiscibili, che in genere sono uno polare e l'altro apolare, l'efficienza dell'estrazione dipende quindi dal tempo impiegato per raggiungere l'equilibrio di ripartizione, e quindi dalla superficie di scambio, che dipende a sua volta dall'agitazione.

L'agitazione, necessaria all'estrazione, porta spesso alla formazione di emulsioni, che devono essere rotte per avere la separazione delle fasi; per fare ciò si può seguire quattro strade:

- Tempo;
- Calore;
- Aumento della forza ionica;
- Centrifugazione.

La LLE di base si effettua con imbuto separatore ed è una tecnica estremamente semplice ma poco utilizzata, questo perché necessita di grosse quantità di solvente, non è selettiva, è molto lunga, non è automatizzabile ed è difficilmente ripetibile, dato che varia in base all'operatore.

L'estrazione liquido-liquido può anche essere effettuata su supporto inerte, in particolare si parla di LLE su terre di diatomee, cioè una fase granulare a base di silicato di magnesio.

Questa tecnica si basa sull'adsorbimento della matrice liquida sui granuli, che permette di aumentare enormemente la superficie di scambio, migliorando velocità ed efficacia dell'estrazione, e diminuendo il volume di solvente necessario.

### Estrazione su fase solida →

L'estrazione su fase solida (SPE → Solid Phase Extraction) è una tecnica estrattiva di analiti in soluzione che prevede la deposizione su una fase solida grazie all'adsorbimento, e la successiva eluizione tramite solvente, la SPE permette anche la separazione degli analiti in base al loro equilibrio di affinità fra fase solida e solvente.

Esistono varie tipologie di fase solida, che si scelgono in base alla natura degli analiti, si parla quindi di:

- **Adsorbimento in fase normale:** la fase solida è polare e il gradiente della fase mobile inizia con il solvente più apolare, i primi analiti ad uscire sono quelli meno polari.
- **Adsorbimento in fase inversa:** la fase solida è apolare (silice C18, etc.) ed il gradiente della fase mobile inizia dal più polare, i primi analiti ad uscire sono quelli più polari.
- **Scambio ionico:** la fase solida è funzionalizzata con gruppi carichi, si ha scambio cationico (gruppi -) e anionico (gruppi +), gli analiti vengono poi eluiti modificando il pH.

La SPE è una tecnica estremamente efficace, economica e facilmente automatizzabile, ed è il principio base della cromatografia.

La SPE si esegue in quattro fasi:

- Lavaggio (con solvente di eluizione) e asciugatura;
- Condizionamento (non portare a secco).
- Deposizione e asciugatura;
- Eluizione.

### Estrazione ed analisi in spazio di testa →

Lo spazio di testa è la fase gassosa che sovrasta quella solida o liquida all'interno di un recipiente chiuso, e che contiene quindi le sostanze volatili.

L'analisi dello spazio di testa è quindi utile per determinare le sostanze volatili e la procedura prevede che si riscaldi il campione per avere i composti volatili nello spazio di testa, che viene poi prelevato ed analizzato in GC.

Se i composti volatili sono troppo diluiti e devono essere concentrati è necessaria un'estrazione in spazio di testa, e questa avviene grazie a materiali adsorbenti, in due modi differenti:

- **Estrazione statica:** lo spazio di testa viene messo in contatto con materiale assorbente, che estrae le componenti volatili, e viene poi desorbito termicamente per l'analisi.
- **Estrazione dinamica:** nell'estrazione dinamica un gas inerte trascina i composti volatili attraverso un letto adsorbente (colonna), che viene poi desorbito termicamente, questo avviene utilizzando una bottiglia Drechsel come contenitore.

## Cromatografia

La cromatografia è una tecnica di separazione basata sulla migrazione differenziata delle sostanze da separare attraverso due fasi tra loro immiscibili; le due tecniche cromatografiche che vedremo nel dettaglio sono la Gascromatografia (GC) e la cromatografia liquida ad alta efficienza (HPLC).

### Classificazione →

Le varie tipologie di cromatografia vengono classificate sulla base di alcune caratteristiche:

- **Tipologia di fase mobile e stazionaria:** la fase mobile può essere liquida o gassosa, invece, la fase stazionaria può essere solida o liquida.
- **Forma del letto:** il letto può essere una colonna od un piatto, queste sono le due forme più comuni.
- **Tecnica di sviluppo:** l'analisi si può sviluppare per capillarità o per spinta.

Ad esempio, la cromatografia TLC ha fase mobile liquida, fase stazionaria solida, letto piatto e sviluppo per capillarità, l'HPLC cambia per letto a colonna e sviluppo per spinta, e la GC è uguale ma con la fase mobile gassosa.

Un'altra classificazione si basa sul meccanismo di separazione utilizzato, che può avvenire per adsorbimento, per ripartizione fra fasi legate (stazionaria) e mobile, per esclusione (gel filtration e permeation), per scambio ionico e per coppia ionica (annullare la carica per ottenere lipofilia → fase inversa).

### Teoria dei piatti →

Per la teoria dei piatti le zone dove le sostanze sono in equilibrio fra le due fasi sono dette piatti teorici, dato che nella colonna cromatografica non possono essere osservati, sulla base di questo equilibrio si definisce il coefficiente di distribuzione, che a T=k è

$$K = \frac{[C_{\text{soluto}} F. \text{stazionaria}]}{[C_{\text{soluto}} F. \text{mobile}]}$$

Il coefficiente di distribuzione è diverso per ogni soluto, e determina il tempo che questi impiegano ad uscire dalla colonna; questo è uno dei parametri di ritenzione, che sono:

- **Tempo di ritenzione ( $t_R$ ):** è il tempo necessario per eluire un soluto dalla colonna.
- **Tempo morto ( $t_m$ ):** il tempo morto è il tempo impiegato dalla fase mobile per uscire dalla colonna ed arrivare al detector.
- **Tempo di ritenzione relativo ( $t'_R$ ):** è il tempo che il soluto trascorre effettivamente nella fase stazionaria, si calcola come differenza fra i precedenti ( $t'_R = t_R - t_m$ ).

Con questi parametri si può calcolare il rapporto di ripartizione ( $k$ ), che esprime il rapporto tra quantità di soluto in fase stazionaria ed in fase mobile, ed indica quindi l'affinità del soluto per la fase stazionaria.

$$k = \frac{t'_R}{t_m}$$

Come ogni altro metodo di analisi, anche in cromatografia si possono misurare l'efficienza, la selettività e la risoluzione.

L'efficienza di un sistema cromatografico si esprime come numero di piatti teorici ( $N$ ), più è alto il valore e maggiore è l'efficienza. La formula è la seguente:

$$N = 16 \left( \frac{t_R}{w_b} \right)^2 = 5,54 \left( \frac{t_R}{w_{1/2h}} \right)^2$$

Per quanto riguarda la selettività questa è indicata con  $\alpha$  e descrive la posizione reciproca di due picchi adiacenti in base al loro centro, non dà quindi informazioni sulla larghezza delle bande. La formula è:

$$\alpha = \frac{t'_{R2}}{t'_{R1}} = \frac{k_2}{k_1} = \frac{K_2}{K_1}$$

Infine, la risoluzione ( $R$ ) indica se due picchi adiacenti sono risolti, cioè se non si sovrappongono; in particolare, due picchi sono risolti se  $R > 1,5$ . La formula è:

$$R = \frac{2(t_{R2} - t_{R1})}{w_{b2} + w_{b1}} \quad \text{oppure} \quad R = \frac{\sqrt{N}}{4} \left( \frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \left( \frac{k_2}{1 + k_2} \right)$$

## Teoria delle velocità →

La teoria dei Piatti affronta la separazione cromatografica in modo statico, trascurando la diffusione del soluto e l'influenza della fase mobile, questi problemi sono risolti dalla teoria delle velocità, che considera i piatti teorici in funzione della velocità della fase mobile, e quindi da un punto di vista dinamico.

La teoria delle velocità permette quindi di predire gli effetti sulla performance della colonna dati dai seguenti fattori:

- Proprietà e spessore della fase fissa;
- Diffusione dei soluti;
- Coeff. di ripartizione;
- Velocità della fase mobile.

La teoria delle velocità si basa sulla teoria del non-equilibrio di Giddings e unifica i tre fenomeni che causano allargamento dei picchi, cioè:

- **Diffusione vorticoso:** le molecole di soluto entrano nel letto cromatografico nello stesso momento, ma all'interno della colonna seguono percorsi diversi, ed escono quindi in tempi diversi. La diffusione vorticoso si calcola come doppio prodotto fra la costante di impaccamento ( $\lambda$ ) ed il diametro delle particelle ( $dp$ ):

$$A = 2\lambda dp$$

- **Diffusione longitudinale:** è una vera e propria diffusione secondo gradiente, che avviene avanti e indietro lungo la direzione di scorrimento del flusso, fra fase mobile e stazionaria; questa con il tempo di percorrenza, e può quindi essere evitata aumentando la velocità del flusso. La sua formula è data dal doppio prodotto del fattore di ostruzione ( $\gamma$ ) per il coeff. di diffusione ( $D_M$ ):

$$B = 2\gamma D_M$$

- **Trasferimento di massa:** il trasferimento di massa considera la velocità con la quale il soluto viene assorbito e desorbito, e quindi diffonde, in ciascuna fase; maggiore è la velocità del flusso e meno tempo ha il soluto per raggiungere l'equilibrio fra le fasi, e quindi la banda si allargherà. La formula è la somma fra la resistenza nella fase stazionaria, in quella mobile, e quella mista:

$$C = C_s + C_m + C_s$$

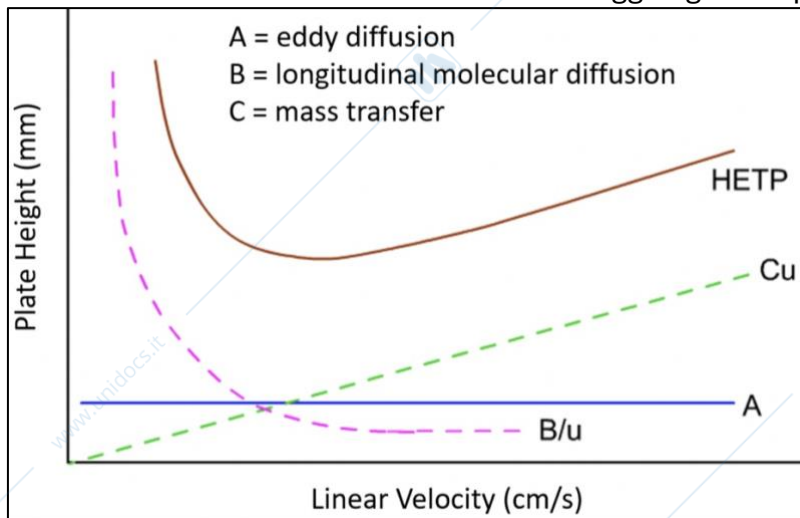
Come abbiamo già detto, la teoria delle velocità riunisce questi tre fattori e li relaziona appunto alla velocità del flusso, per calcolare l'altezza equivalente del piatto teorico (HETP o H), che si relaziona al numero di piatti grazie alla lunghezza della colonna, secondo la formula

$$HETP = \frac{L}{N}$$

Si arriva quindi alla base della teoria delle velocità, che è l'equazione di Van Deemter:

$$H = A + \frac{B}{\mu} + C\mu$$

Riportandola in un grafico con HETP sull'asse y e la velocità ( $\mu$ ) sull'asse x, si ha una curva che scende all'aumentare della velocità fino a raggiungere un punto minimo ( $H_{min}$ ), per poi risalire.



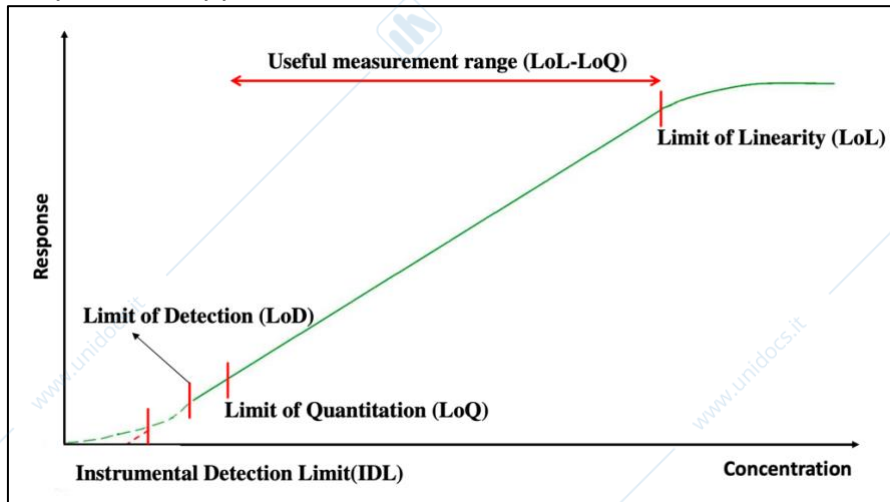
### Range di rivelazione dinamico →

In cromatografia quantitativa, come in ogni altra analisi, la capacità di un rivelatore di misurare correttamente un analita dipende da tre limiti fondamentali:

- **Limit of Detection (LOD):** è la minima quantità di analita rilevabile dallo strumento, ma non necessariamente quantificabile con precisione. Corrisponde al punto in cui il segnale inizia a distinguersi dal rumore.
- **Limit of Quantitation (LOQ):** è la più piccola quantità di analita che può essere quantificata in modo accurato e preciso; è sempre maggiore del LOD.
- **Limit of Linearity (LOL):** è il limite superiore oltre il quale la risposta del rivelatore non è più proporzionale alla concentrazione, e quindi la calibrazione non è più lineare.

A partire da questi limiti, si definiscono due tipi di intervallo utili in analisi:

- **Range dinamico assoluto:** va dal LOD al limite massimo di risposta dello strumento e rappresenta l'intero intervallo in cui il rivelatore reagisce alla presenza dell'analita.
- **Range di linearità:** il range utile di misura è la parte più importante in ambito quantitativo, va dal LOQ al LoL e rappresenta l'intervallo in cui la risposta del rivelatore è lineare, affidabile e proporzionale alla concentrazione dell'analita; è quindi l'intervallo nel quale è possibile applicare una retta di calibrazione.



## Gas Cromatografia

La gascromatografia (GC) è una tecnica cromatografica con fase mobile gassosa e fase stazionaria principalmente solida, che procede per spinta attraverso un letto a colonna. Questa tecnica è utilizzata nell'analisi di composti organici per l'elevata risoluzione, la disponibilità di fasi stazionarie, il funzionamento con detector sia selettivi che universali e soprattutto il facile accoppiamento con spettrometri di massa. Vi sono però anche note negative, difatti la GC è limitata all'analisi di composti sufficientemente volatili, termicamente stabili e apolari (o poco polari).

Un'analisi in GC inizia con il prelievo del campione e la sua vaporizzazione, in seguito si ha l'ingresso nel flusso di gas carrier e quindi l'iniezione in colonna, poi la separazione cromatografica, ed infine si arriva al detector.

### Vaporizzazione →

Dopo il prelievo da parte della siringa, il campione liquido deve essere portato in fase gassosa, e questo avviene nel Liner, dove l'alta temperatura porta alla vaporizzazione istantanea.

Durante la fase di iniezione nel Liner si può verificare il fenomeno della discriminazione dell'ago, per il quale la vaporizzazione avviene in modo non uniforme; in particolare si ha una differenza fra tipologia di composti:

- **Composti volatili:** i composti volatili vaporizzano rapidamente ed entrano facilmente nel flusso del carrier.
- **Composti poco volatili:** i composti poco volatili vaporizzano più difficilmente, perciò potrebbero rimanere nel liner, per aderenza alle pareti o perché non completamente vaporizzati in tempo utile.

Il fenomeno della discriminazione porta quindi ad un profilo alterato e riduce l'accuratezza, soprattutto nelle analisi quantitative, ma fortunatamente può essere evitato grazie ad alcuni accorgimenti. I metodi per ridurre la discriminazione sono l'ottimizzazione della temperatura

del liner, l'utilizzo corretto della siringa (se manuale) ed il suo lavaggio, ed infine la scelta dell'iniettore adatto.

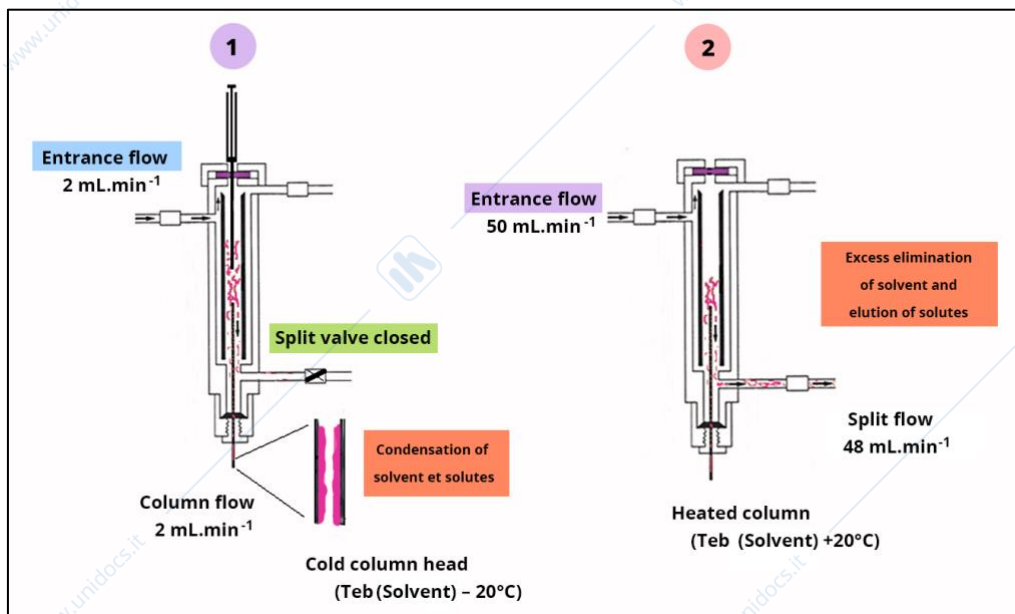
Il lavaggio della siringa, come la scelta dell'iniettore, è il modo più efficace per ridurre la discriminazione, e permette anche di aumentare la ripetibilità e l'accuratezza, e di evitare il carry-over fra campioni. Il lavaggio viene effettuato prima e dopo l'iniezione, si parla quindi di:

- **Prelavaggio:** viene effettuato con un solvente compatibile con il campione ed è utile a rimuovere residui e condizionare la siringa.
  - **Postlavaggio:** serve ad eliminare dalla siringa le tracce del campione appena iniettato.
- Il metodo migliore per evitare la discriminazione resta però la scelta di iniettori adatti.

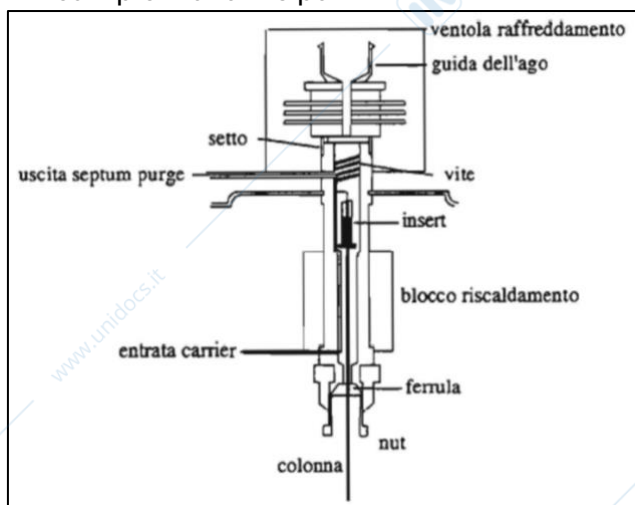
## Iniettori →

Gli iniettori si occupano di inserire il campione all'interno della colonna, e sono anche la componente all'interno della quale si trova il liner, cioè la camera di vaporizzazione; ne esistono quattro tipologie principali:

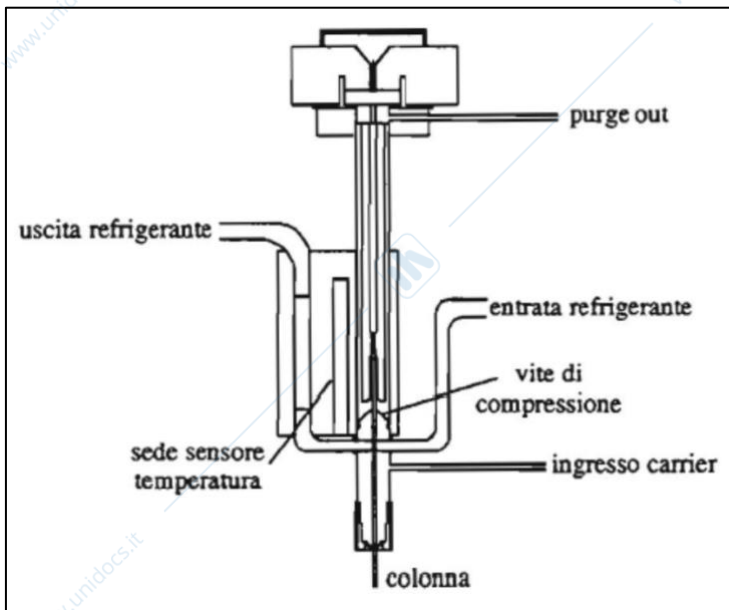
- **Iniettore Split / Splitless:** l'iniettore split/splitless è il più comune e versatile, dato che è riproducibile e facilmente automatizzabile; nonostante ciò, non evita la discriminazione, e può portare a degradazione termica. All'interno di questo iniettore il carrier viene suddiviso, una piccola parte è indirizzata verso il setto, cioè la parte dove si inserisce l'ago, per poi uscire tramite un canale apposito; questo flusso continuo garantisce l'assenza di residui sul setto. La maggior parte del gas passa nel liner e da questo si divide ulteriormente fra la colonna ed una valvola di scarico. La differenza fra le due modalità sta proprio nel funzionamento di questa valvola.
  - *Iniezione split:* in modalità split la valvola è aperta, e solo parte del campione entra nella colonna, il resto viene invece espulso. Questa iniezione è ottima per campioni concentrati, permette un tempo di iniezione breve ed una risoluzione elevata, a scapito però della sensibilità. In un'iniezione split si inizia con la temperatura del forno pari a quella di evaporazione del solvente, per poi avviare la rampa lenta dopo l'iniezione, fino a raggiungere la temperatura di vaporizzazione del campione.
  - *Iniezione splitless:* in modalità splitless la valvola è quasi sempre chiusa, si ha quindi un flusso di gas minore, e questo concede al campione più tempo per vaporizzare, per poi entrare totalmente nella colonna; dopo di che la valvola si apre per un certo periodo di tempo (purge time), per scaricare l'eccesso. Questa modalità è più sensibile e quindi utilizzata per analiti presenti in tracce, ma ha una risoluzione peggiore, tempi di iniezione più lunghi, e soprattutto non permette di eliminare la matrice. Nell'iniezione splitless la temperatura iniziale è di 30°C inferiore a quella di evaporazione del solvente, e resta in isoterma fino a che il carrier non ha svuotato il liner dal campione, in seguito si apre la valvola di split e si porta rapidamente la temperatura a 30°C sopra quella di evaporazione del solvente; infine, si inizia la rampa di temperatura come in split.



- Iniettore On-Column:** l'iniettore on-column si differenzia dagli altri per l'assenza della camera di vaporizzazione, infatti inserisce il campione nella colonna ancora in forma liquida, ad una temperatura poco più bassa di quella di evaporazione del solvente. Il campione agisce quindi come un tappo che impedisce il flusso del gas, e con il riscaldamento della stufa inizia la vaporizzazione, il "tappo" viene meno, ed inizia la separazione. Questa tecnica elimina la discriminazione ed è sicura anche per composti termolabili, ma le dimensioni dell'ago rendono difficile l'automazione, e limitano l'uso a campioni diluiti e puliti.



- Iniettore PTV:** l'iniettore PTV (Programmable Temperature Vaporizer) racchiude tutti i pregi degli altri iniettori, ha infatti un'uscita di spurgo, e può quindi operare in modalità split/splitless, e la sua camera di vaporizzazione è a temperatura controllata, cosicché il campione entri a "freddo" per poi riscaldarsi gradualmente, ed essere infine inserito in colonna. Questo iniettore evita la discriminazione, permette l'analisi di sostanze termolabili, e grazie al controllo della temperatura ed alla valvola split è possibile effettuare il "solvent venting".

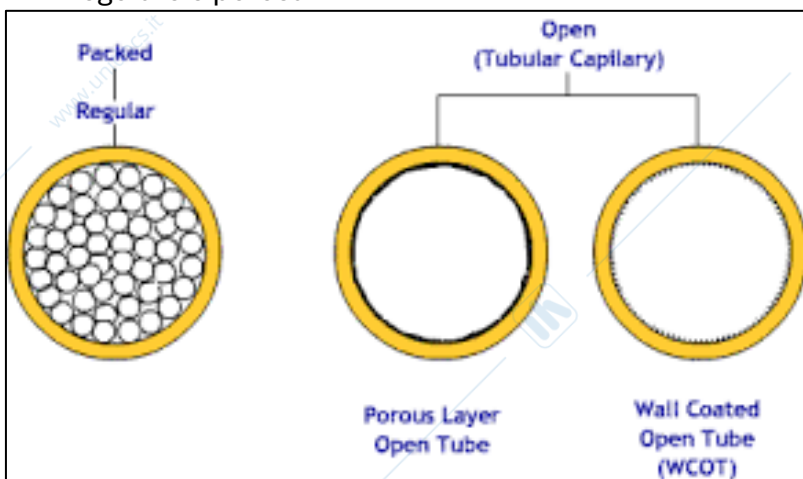


### Colonne →

In cromatografia si hanno due tipologie di colonne, quelle classiche (simil-HPLC) che hanno la fase stazionaria granulare ed impaccata, e quelle capillari, nelle quali la fase stazionaria non è riempitiva ma si trova come strato sulla superficie interna della colonna.

Le colonne capillari sono realizzate in silice fusa, cosicché sia sufficiente funzionalizzare il loro interno per ottenere lo strato di fase stazionaria; esistono due tipologie di colonne capillari:

- **WCOT:** le colonne capillari WCOT (Wall Coated Open Tube) sono caratterizzate da un rivestimento di fase stazionaria liquida, ottima per grandi molecole organiche ma poco interattive con molecole più piccole, data la superficie liscia.
- **PLOT:** le colonne capillari PLOT (Porous Layer Open Tube) presentano una fase stazionaria solida e granulare, che ha una capacità di ritenzione minore ed è adatta ad analiti piccoli e molto volatili, a scapito però dell'efficienza, che diminuisce per via della superficie irregolare e porosa.

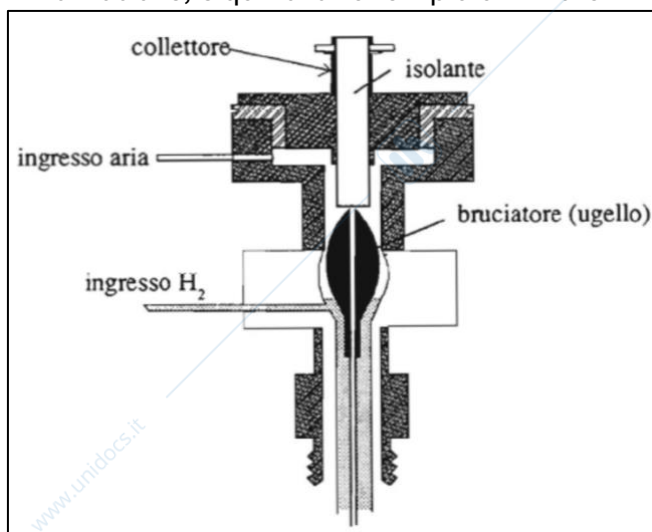


### Detector →

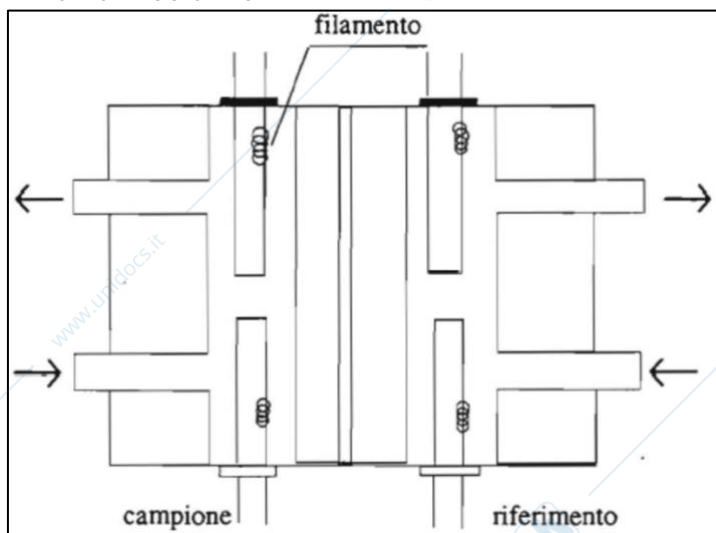
Come abbiamo già visto la gascromatografia si applica molto bene all'accoppiamento con spettrometro di massa, ma i suoi detector principali sono i seguenti quattro:

- **FID:** il Flame Ionization Detector utilizza una fiamma all'idrogeno per bruciare il flusso in uscita dalla colonna, liberando così ioni e generando quindi una corrente proporzionale

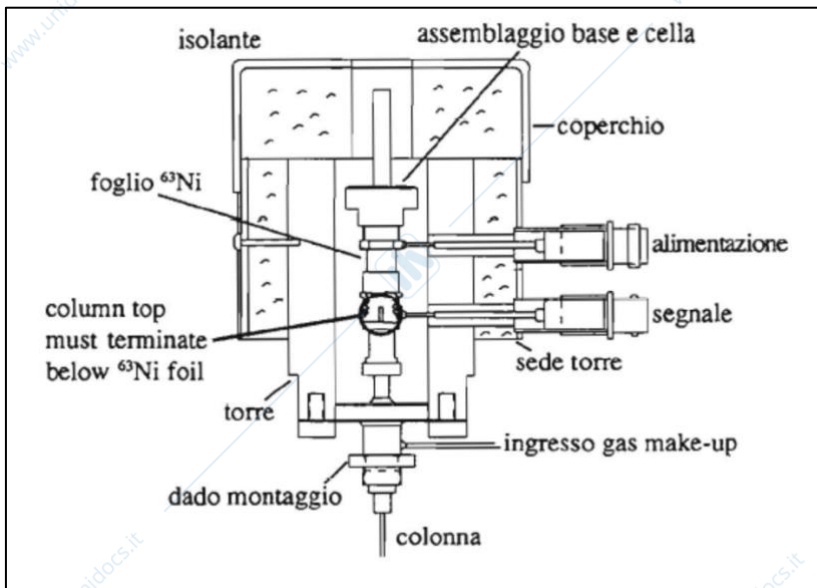
alla quantità di analita, che viene rilevata tramite elettrodi. Questo detector è distruttivo e selettivo per i composti organici, ha un range dinamico di  $10^6$ , ed è il più semplice ed affidabile, e quindi anche il più utilizzato.



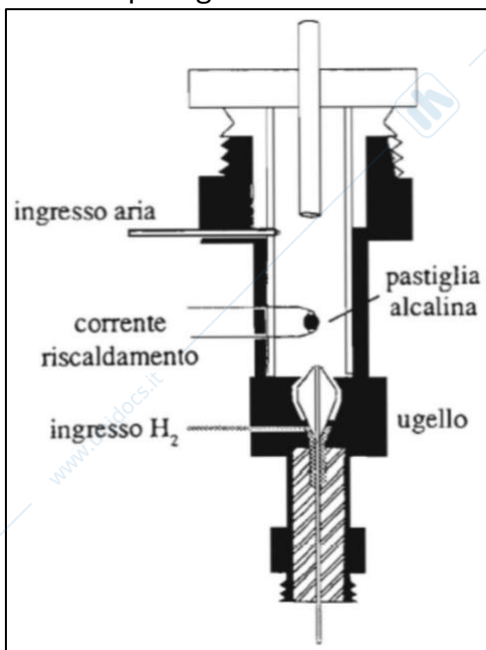
- **TCD:** il Thermal Conductivity Detector si basa sulla differente conducibilità termica fra il gas carrier e gli analiti, e la misura grazie agli sbalzi di resistenza elettrica causati. In particolare, il flusso in uscita viene fatto passare attraverso una camera contenente un filamento elettrico, questo ha una certa resistenza, che varia al variare della temperatura, causato dal passaggio degli analiti; la differenza di resistenza viene misurata grazie ad un filamento di controllo, che si trova in una camera dove scorre solo il gas carrier. Il TCD è un detector non distruttivo ed universale, è anche molto semplice e robusto, ed ha un range dinamico di  $10^6$ .



- **ECD:** l'Electron Capture Detector basa la rivelazione sulla diminuzione di una corrente elettrica generata da un flusso di elettroni emesso da una sorgente radioattiva ( $^{63}\text{Ni}$ ); infatti, quando una sostanza elettronegativa passa dal flusso di elettroni li assorbe, portando ad una diminuzione della corrente proporzionale alla quantità di analita. Questo detector non è distruttivo, ma è poco utilizzato per vari motivi; innanzitutto, è selettivo per i composti che presentano gruppi elettronegativi, in particolare gli alogenati, ha un range dinamico basso ( $10^3$ ), ed a causa della sorgente radioattiva è molto più inquinante, pericoloso e costoso degli altri.



- **NPD:** il Nitrogen Phosphorous Detector è un FID modificato per essere selettivo ai composti contenenti azoto e fosforo, in particolare la fiamma viene modificata da una pastiglia di sale alcalino (cesio o rubidio) per renderla selettiva a N e P. Questo detector è quindi utilizzato per l'analisi di pesticidi, ovviamente è distruttivo, ed ha un range dinamico di  $10^4$ , il suo difetto più grande è la necessità di manutenzione, data dal deterioramento della pastiglia.



## HPLC

La cromatografia liquida ad alte prestazioni (High Performance Liquid Chromatography) è una tecnica cromatografica con fase stazionaria solida e fase mobile liquida caratterizzata dall'alta pressione del circuito (40-400atm); recentemente sono nati sistemi a pressioni ancora più elevate (1000atm) detti uHPLC.

Adesso vediamo i componenti dell'HPLC in ordine.

**Degasser** →

Utilizzando una fase mobile liquida è necessario che in questa non vi siano gas disciolti, che andrebbero a danneggiare l'apparecchiatura, e questo è compito del degasser, che consiste in una camera sottovuoto nella quale passano dei tubi a membrana semipermeabile nei quali scorrono i vari solventi; la depressione provoca il ritorno in fase gassosa e l'aspirazione dei gas disciolti, che vengono così eliminati.

### Pompa →

Per creare il flusso di fase mobile a pressione elevata la pompa deve vincere una forza elevata, e questo è possibile grazie al meccanismo a camma rotante.

La camma rotante spinge un pistone di zaffiro avanti ed indietro all'interno di una camera, questa presenta un ingresso ed un'uscita, entrambi con valvole di non ritorno, cosicché durante l'aspirazione la camera non sia in comunicazione con la colonna, e nella spinta sia chiusa la via per il serbatoio.

### Eluizione e sistemi di pompaggio →

Se la fase mobile di eluizione ha una composizione fissa (eluizione isocratica) è sufficiente una sola pompa, ma nel caso di un'eluizione a gradiente, nella quale si deve variare la composizione di una miscela di due o più solventi, la cosa si fa più complessa. In particolare, si può procedere in due modi:

- **Gradiente ad alta pressione:** nel primo sistema la miscelazione avviene ad alta pressione, la camera di miscelazione si trova quindi a valle delle pompe, che sono una per ogni solvente; questo metodo è il più utilizzato, data la sua semplicità, ma è limitato a due componenti.
- **Gradiente a bassa pressione:** nel sistema a bassa pressione la camera di miscelazione si trova prima della pompa, che è una sola, e la composizione dell'eluente viene dettata da una valvola proporzionatrice controllata dal computer. Questo sistema ha costi inferiori e permette di usare fino a quattro solventi, ma è meno utilizzato per la complessità.

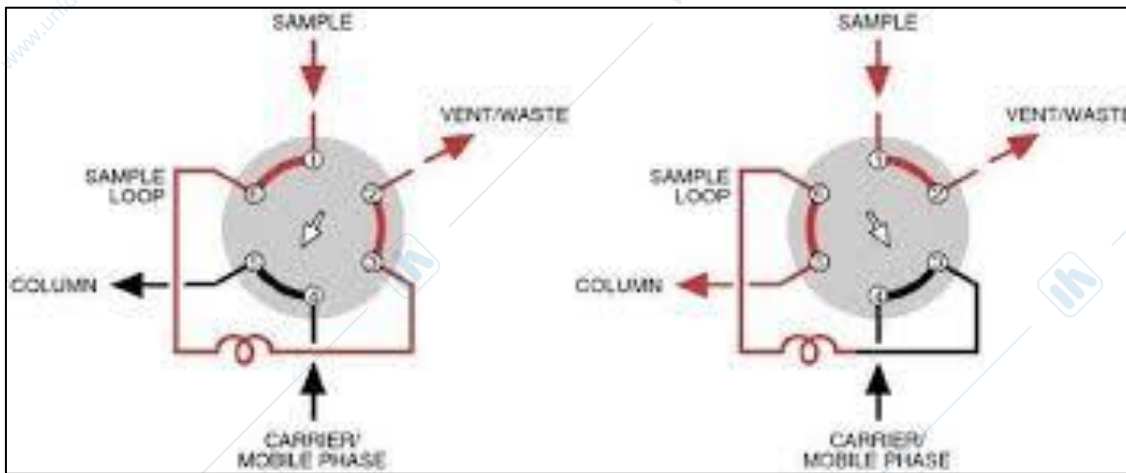
### Valvola a sei vie →

Una volta preparato e portato a pressione l'eluente è necessario iniettare il campione, e questo viene effettuato grazie alla valvola a sei vie, un componente che permette l'ingresso degli analiti senza interrompere il flusso della fase mobile e vincendo la pressione.

Come suggerisce il nome, la valvola presenta sei porte, ciascuna con una funzione specifica: due sono dedicate all'ingresso del campione e del carrier, altre due gestiscono l'uscita del fluido verso la colonna e verso lo scarico, mentre le ultime due collegano il loop, cioè un tubo a volume fisso e noto nel quale stanzia il campione prima dell'iniezione.

La valvola può assumere due posizioni:

- **Caricamento:** in posizione di caricamento, il flusso della fase mobile passa direttamente verso la colonna senza attraversare il loop; nel mentre il campione viene caricato nel loop, senza interferire con il flusso principale, ed uscendo verso gli scarti.
- **Iniezione:** in posizione di iniezione la fase mobile viene fatta passare per il loop contenente il campione viene inserito spingendolo verso la colonna, mentre il flusso diretto verso la colonna viene deviato verso lo scarico



### Colonne →

In HPLC le colonne hanno una struttura metallica, necessaria a sopportare la pressione elevata, e la fase solida è data da granuli di silice funzionalizzata; le colonne differiscono fra loro per lunghezza, diametro e diametro delle particelle.

### Detector →

Esistono vari detector interfacciabili con l'HPLC, fra i quali il più complesso è lo spettrometro di massa, del quale non ci occuperemo; i più utilizzati sono i seguenti:

- **UV-Vis (DAD):** la spettrofotometria UV-Vis è la forma di detector più semplice e diffusa, in particolare non viene utilizzato uno spettrofotometro normale, ma un rilevatore a schiera di diodi (Diode Array Detector), dato che permette di acquisire contemporaneamente lo spettro di assorbimento a più lunghezze d'onda. Questo detector non è distruttivo ma non è nemmeno considerabile universale, dato che non tutte le molecole assorbono nella regione UV-Vis; nonostante ciò, è il rilevatore più utilizzato, dato che funziona per la stragrande maggioranza delle molecole.
- **Fluorescenza:** rileva l'energia rilasciata sotto forma di fluorescenza dopo eccitazione tramite raggi UV, è un detector non distruttivo ma selettivo.
- **Rifrazione:** si basa sulla variazione dell'indice di rifrazione del flusso in uscita dalla colonna rispetto al carrier puro, ha quindi bisogno di una camera di controllo e non si può utilizzare in gradiente, ma è universale e non distruttivo.
- **Light-scattering:** il detector a light-scattering misura la diffusione della luce di un laser da parte degli analiti portati in aerosol; in particolare, l'eluato viene nebulizzato e poi riscaldato, così da allontanare il solvente, un gas carrier inerte si occupa quindi di trasportare gli analiti verso il fascio del laser, dove danno diffusione in modo proporzionale alla loro quantità. Questo detector è distruttivo e poco sensibile, ma è veramente universale, dato che si può utilizzare anche in gradiente e che non dipende dalla temperatura.