

Tecnica analitica: **cromatografia liquida – rivelatore spettrofotometrico a serie di diodi (HPLC-DAD)**

Campionamento e tipo di analisi: adatta alla determinazione qualitativa e quantitativa di composti organici in campioni (~1 mg) liquidi o solidi, dopo opportuno pre-trattamento chimico ad umido (a seconda degli analiti di interesse possono essere necessari step di estrazione, idrolisi, derivatizzazione). Analisi microinvasiva e microdistruittiva.

Principio di funzionamento: il campione viene iniettato all'interno di un sistema cromatografico costituito da una colonna, attraversata da flusso controllato di eluente liquido (o miscela di eluenti). Le varie specie chimiche che compongono il campione vengono separate durante il loro percorso nella colonna e rilevate dallo spettrofotometro UV-visibile a serie di diodi (DAD).

Procedura analitica adottata per i campioni di unguenti antichi: il campione (0,1-1 mg) viene sottoposto a idrolisi (metanolisi) con soluzione di acido cloridrico in metanolo a caldo in bagno ad ultrasuoni. In seguito si effettua una filtrazione su membrane di PTFE, si porta a secco il campione e lo si riprende con un'opportuna quantità di solvente. 20 •L dell'estratto finale sono iniettati nel sistema cromatografico e analizzati. Nel caso di campioni che possano contenere coloranti estremamente labili, prima dell'idrolisi vi è una fase di estrazione più blanda, in solvente organico (dimetilsolfossido) a caldo in bagno ad ultrasuoni.

Strumentazione e condizioni sperimentali adottate: è stato utilizzato un sistema HPLC che consiste in una pompa PU-2089 Quaternary Gradient Pump con degassatore (Jasco International Co., Japan), equipaggiata con una valvola di iniezione da 20 •L (Rheodyne Model 7125) e accoppiata a un rivelatore spettrofotometrico a serie di diodi MD-2010 (Jasco International Co.). I dati sono stati processati tramite software JascoChromNAV®.

La lunghezza d'onda di lavoro è stata impostata a 275 nm, e gli spettri DAD sono stati acquisiti nell'intervallo 200-650 nm, con uno step di 4 nm.

Le condizioni della separazione gas cromatografica sono state le seguenti:

- colonna analitica in fase inversa C18 (Colonna Agilent TC-C18 (2), 4,6 x 250 mm, 5 •m e 4.6 x 150 mm, 5•m) connessa a una pre-colonna C18 (1 mm Opti-Guard C18, Optimize Technologies Inc., Oregon, USA)
- temperatura della colonna pari a temperatura ambiente (25 °C);
- flusso dell'eluente: 1.0 mL/min;
- sono state impiegate due programmate; la prima, per i coloranti antrachinonici, tannici, flavonoici e indigoidi; la seconda, per le betacianine e betaxantine contenute nel succo di rapa, utilizzato in molti preparati:

- 1) eluenti: eluente A: costituito da 95% acqua bidistillata, 5% acetonitrile, 0.1% acido trifluoroacetico; eluente B: costituito da 100% acetonitrile, 0.1% acido trifluoroacetico; gradiente di eluizione: da 0 a 5 min, 89.5% A e 10.5

% B; da 5 a 30 min, rampa fino a 53% A e 47% B; da 30 a 40 min, rampa fino a 31.6% A e 68.4% B; da 40 a 50 min, rampa fino a 10.5% A e 89.5% B; isocratica per 5 minuti.

- 2) eluenti: eluente A: acqua bidistillata con l'1% di acido formico; eluente B: metanolo; gradiente di eluizione: 100% A per 5 minuti; gradiente da 100% A a 50% A e 50% B da 5 a 20 minuti; isocratica per 10 minuti.

Informazioni ottenibili: L'analisi HPLC-DAD fornisce un profilo molecolare dettagliato dei composti organici, che vengono identificati mediante confronto con composti standard. Il profilo a sua volta può essere confrontato con quello ottenuto dall'analisi di materiali di riferimento. È possibile investigare i coloranti organici naturali presenti (flavonoidi, antrachinoni, indigoidi, tannini, carotenoidi) in base alla presenza di specifici biomarker molecolari (cromofori), e ai rapporti tra di essi (analisi semi-quantitativa). Il profilo cromatografico generalmente permette l'identificazione del tipo di colorante a livello di classe colorante, ma solo in pochi casi permette una precisa determinazione della fonte animale o vegetale, soprattutto a causa di fenomeni di foto-ossidazione che alterano i rapporti relativi tra i cromofori di interesse.

Esempio di analisi: Cromatogramma ottenuto mediante HPLC-DAD dell'estratto di succo di rapa, confrontato con un unguento preparato in laboratorio contenente succo di rapa (campione Pro-Igne III). Mentre nell'estratto di succo di rapa si nota la presenza delle betacianine e della betaxantina, nel preparato non è stato possibile identificare i cromofori attesi.

