



Università
Ca' Foscari
Venezia

Dipartimento di Scienze Molecolari e Nanosistemi

Corso di Laurea in Chimica

Tesi di Laurea magistrale

—
Ca' Foscari
Dorsoduro 3246
30123 Venezia

Determinazione di composti organici nell'aerosol atmosferico mediante LC-MS ad alta risoluzione.

Relatore

Prof. Andrea Gambaro

Correlatrice:

Dott.ssa Roberta Zangrando

Laureanda

Michela Turchet

Matricola 834423

Anno Accademico

2011 / 2012

INDICE

CAPITOLO I

Introduzione	1
--------------	---

CAPITOLO II

L'aerosol atmosferico	4
1. L'aerosol atmosferico	5
2. Origine dell'aerosol atmosferico	10
3. Composizione chimica dell'aerosol	12
4. Effetti del particolato atmosferico	13
5. La combustione di Biomassa	19

CAPITOLO III

Gli analiti	22
1. I metossifenoli	23
2. Gli acidi grassi	27
2.1. <i>Aerosol organico e acidi grassi</i>	28

CAPITOLO IV

Strumentazione analitica	31
1. HPLC-MS	32

2. High Performance Liquid Chromatography (HPLC)	32
3. Spettrometria di massa	35
3.1. <i>Lo strumento LTQ Orbitrap XL</i>	36
3.2. <i>Sorgenti di ionizzazione</i>	37
3.3. <i>L'interfaccia LTQ XL</i>	42
3.4. <i>La trappola ionica lineare</i>	43
3.5. <i>L'analizzatore Orbitrap</i>	47
3.6. <i>La cella di collisione HCD (Higher Energy Collisional Dissociation)</i>	52

CAPITOLO V

Messa a punto e ottimizzazione di un metodo analitico	56
1. Premessa	57
2. Sviluppo e ottimizzazione del metodo strumentale	57
2.1. <i>Sviluppo del metodo per lo spettrometro di massa</i>	57
2.2. <i>Sviluppo del metodo cromatografico</i>	58
2.3. <i>Ottimizzazione della sorgente di ionizzazione ESI</i>	58
3. Validazione	58
4. Quantificazione	60

CAPITOLO VI

Campionamento	62
1. Il sito di campionamento	63
2. Il campionatore	65
3. Calibrazione del campionatore	66

CAPITOLO VII

Materiali, solventi e strumenti utilizzati	67
1. Materiali standard di riferimento	68
2. Solventi e reagenti	70
3. Attrezzatura di laboratorio e materiali	70
4. Strumentazione	71
5. Colonne cromatografiche	71

CAPITOLO VIII

Metodologie analitiche	73
1. Preparazione degli standard dei metossifenoli	74
2. Condizioni strumentali per la determinazione dei metossifenoli	75
3. Preparazione degli standard degli acidi grassi	78
4. Condizioni strumentali per la determinazione degli acidi grassi	81
5. Trattamento del campione	84
6. Procedura pre-analitica.	85

CAPITOLO IX

Risultati e discussione	89
1. Scelta delle impostazioni strumentali per la determinazione dei metossifenoli	90
2. Validazione del metodo per i metossifenoli	93
3. Analisi dei campioni di particolato atmosferico per la determinazione dei metossifenoli.	100
4. Scelta delle impostazioni strumentali per la determinazione degli acidi grassi	103

5. Problematiche riscontrate nell'analisi degli acidi grassi	110
CAPITOLO X	
Conclusioni	113
CAPITOLO XI	
Bibliografia	115

CAPITOLO I

INTRODUZIONE

Lo sviluppo tecnologico e industriale che ha caratterizzato il nostro secolo ha portato, insieme al miglioramento della qualità della vita, dei servizi e delle relazioni sociali, anche un insieme di problematiche legate all'inquinamento atmosferico a cui solo negli ultimi anni si è prestata maggiore attenzione. Per questo motivo molti paesi hanno adottato standard di qualità dell'aria mirati alla protezione della salute umana e ambientale, ma, malgrado i sostanziali investimenti per il controllo dell'inquinamento, la qualità dell'aria nelle aree urbane dei paesi industrializzati resta ancora preoccupante. Nello stesso tempo, nelle nazioni in via di sviluppo la situazione è peggiorata a causa della crescita della popolazione, dell'industrializzazione, e dell'incremento nell'uso di veicoli.

Lo studio di questa contaminazione è importante sia per capire le dimensioni di questo problema che affligge il pianeta, sia per capire le modalità di trasporto degli inquinanti, che possono essere trasportati a migliaia di chilometri dalla zona di emissione, sia per individuarne le sorgenti di immissione.

In questo quadro s'inserisce lo studio dei prodotti della combustione della biomassa, una grande varietà di composti in grado di influenzare pesantemente la qualità dell'aria, con conseguenze sia dal punto di vista ambientale e climatico che dal punto di vista sanitario.

Il primo scopo di questo lavoro di tesi è stato lo sviluppo di una metodologia analitica per la determinazione dei metossifenoli, una classe di markers molecolari indicatori della combustione della biomassa utili indicatori del tipo di legna bruciata. Altro obiettivo prefisso era la messa a punto di una metodologia analitica per la quantificazione degli acidi grassi, una classe di composti di origine biogenica, ma anche prodotti da combustioni: un ulteriore tassello nello studio della composizione chimica ed in particolare della frazione polare e idrosolubile dell'aerosol atmosferico che tanta importanza ha nella formazione dei nuclei di condensazione delle nubi e per l'interazione con la radiazione solare.

E' stato scelto di sviluppare questi metodi di analisi utilizzando un cromatografo liquido ad elevate prestazioni (HPLC) accoppiato ad uno spettrometro di massa ad altissima risoluzione LTQ Orbitrap LX, questo al fine di ottenere informazioni di tipo quantitativo sugli analiti studiati, sia, in un secondo momento, mediante la trattazione dei dati ottenuti in full scan in alta risoluzione, dal punto di vista qualitativo al fine di ottenere nuove informazioni dai campioni analizzati. Questa tecnica analitica permette inoltre l'analisi di queste classi di composti senza procedure di derivatizzazione degli analiti riducendo così i tempi d'analisi e il rischio di contaminazione dei campioni.

Ulteriore scopo della tesi è quello di utilizzare una procedura pre-analitica, messa a punto precedentemente per la determinazione del levoglucosan (*Perrone M.G., 2012*), in modo da analizzare il maggior numero di analiti in uno stesso campione estratto e ridurre così i tempi di analisi e incrementare le informazioni ottenute.

CAPITOLO II

L'AEROSOL ATMOSFERICO

1. L'aerosol atmosferico

L'inquinamento atmosferico è definito come l'insieme di tutti gli agenti chimici, fisici e biologici che alterano le caratteristiche naturali dell'atmosfera e che derivano sia dall'ambiente naturale sia dall'azione dell'uomo; i cambiamenti climatici e le conseguenze sulla salute umana, che soprattutto le fonti antropiche dell'inquinamento hanno causato, sono stati i fattori che hanno influenzato la decisione di interessarsi allo studio delle alterazioni atmosferiche.

L'aerosol è presente naturalmente in atmosfera, ma lo sviluppo delle attività umane ha introdotto nuove sostanze con effetti negativi sull'ambiente; è fondamentale quindi indagare le caratteristiche dell'aerosol per determinare le sostanze più dannose e le fonti da cui esse derivano (nella tabella 1 è riportata l'origine delle particelle in funzione di diverse caratteristiche).

	ORIGINE	
Caratteristiche	Naturale	Antropica
Caratteristiche fisiche	Dimensioni grosse forme irregolari	Dimensioni piccole (fino a 0,1 µm) Forme regolari (sferiche)
Caratteristiche chimiche	Sali carbonatici Ossidi di ferro e di Alluminio Composti di silice Minerali che costituiscono la litosfera	Solfati Nitrati Composti organici del piombo Idrocarburi
Metodi di produzione	Erosione Spray marino Evaporazione del mare Trasporto eolico	Edilizia Agricoltura -fertilizzanti -anticrittogamici Opere civili -operazioni di scavo -trasporto Industria -processi non confinati -macinazione -miscelazione -manipolazione Combustione -produzione energetica primaria -produzione energetica termica industriale -riscaldamento civile
Fattori condizionanti	Tipo di suolo Vegetazione Umidità Meteorologia	Combustibile Processo di carburazione Sistemi di abbattimento Meteorologia

Tabella 1: origine delle particelle in funzione delle diverse caratteristiche (Marconi A., 2003).

L'aerosol è una sospensione di materiale allo stato solido o liquido con bassa velocità di sedimentazione in un mezzo gassoso. Le particelle disperse in atmosfera presentano dimensioni variabili e forme irregolari; è perciò utile introdurre un termine che ne permetta una classificazione: il diametro aerodinamico equivalente (d_{ae}) è definito come il diametro di una particella sferica avente densità unitaria ed un comportamento aerodinamico, in particolare a velocità di sedimentazione uguale a quella della particella considerata nelle stesse condizioni di temperatura, pressione e umidità relativa.

Il concetto di diametro aerodinamico equivalente è utile per formulare le seguenti definizioni:

- **TSP(particelle totali sospese)**: sono particelle le cui dimensioni sono tali da restare in sospensione per il tempo necessario al campionamento; sono particelle con diametro aerodinamico inferiore a $100\mu\text{m}$;
- **PM₁₀**: frazione di aerosol raccolta da un sistema di campionamento tale per cui le particelle con diametro aerodinamico di $10\mu\text{m}$ sono campionate con efficienza del 50%;
- **PM_{2,5}**: frazione di aerosol raccolta da un sistema di campionamento il quale permette di campionare particelle con diametro aerodinamico uguale a $2,5\mu\text{m}$ con un'efficienza del 50%; rappresentano circa il 60% delle PM₁₀.

Le proprietà degli aerosol sono soggette a continui cambiamenti dovuti a numerosi processi di natura chimica e fisica. I diversi meccanismi di formazione influenzano

anche la distribuzione dimensionale delle particelle aerodisperse. Le particelle ambientali sono generalmente comprese in un intervallo di diametri tra 0,01 e 100 μm . Distinguiamo quindi le seguenti frazioni:

- **ultrafine** (ultra-sottile): il diametro aerodinamico di queste delle particelle in questa frazione è compreso tra 0,01 e 0,1 μm ; generalmente queste particelle sono costituite dai prodotti della nucleazione omogenea dei vapori sovrasaturi (SO_2 , NH_3 , NO_x e prodotti della combustione);
- **fine** (sottile): fanno parte di questa frazione particelle con diametro aerodinamico compreso tra 0,1 e 2,5 μm ; la loro formazione avviene per coagulo di particelle ultrafini e attraverso i processi di conversione gas-particella, processo di nucleazione eterogenea oppure per condensazione di gas su particelle preesistenti nell'intervallo di accumulazione. I maggiori costituenti di queste particelle nelle aree industrializzate sono solfati, i nitrati, lo ione ammonio, il carbonio elementare e quello organico; a questi si aggiungono particelle di origine biologica come spore fungine, lieviti, batteri ecc. Le particelle fini in generale sono troppo piccole per sedimentare per gravità e troppo grandi per coagulare e formare particelle di dimensioni maggiori; per questo motivo hanno tempo di residenza in atmosfera piuttosto lunghi e possono essere trasportate a lunga distanza;
- **coarse** (grossolana): la frazione comprende particelle di diametro aerodinamico compreso tra 2,5 e 100 μm ; queste sono essenzialmente prodotte da processi meccanici quali erosione, risospensione meccanica o eolica, macinazione e contengono elementi presenti nel suolo e nei sali

marini. Sono particelle relativamente grandi e tendono quindi a sedimentare in poche ore o minuti: ciò sta a significare che spesso si ritrovano vicino alle sorgenti di emissione in funzione della loro altezza.

La seguente figura, (Fig.1) rappresenta la distribuzione dimensionale in termini di massa o volume delle particelle aerodisperse, l'origine e la reazione dinamica tra le particelle ed il mezzo in cui sono sospese:

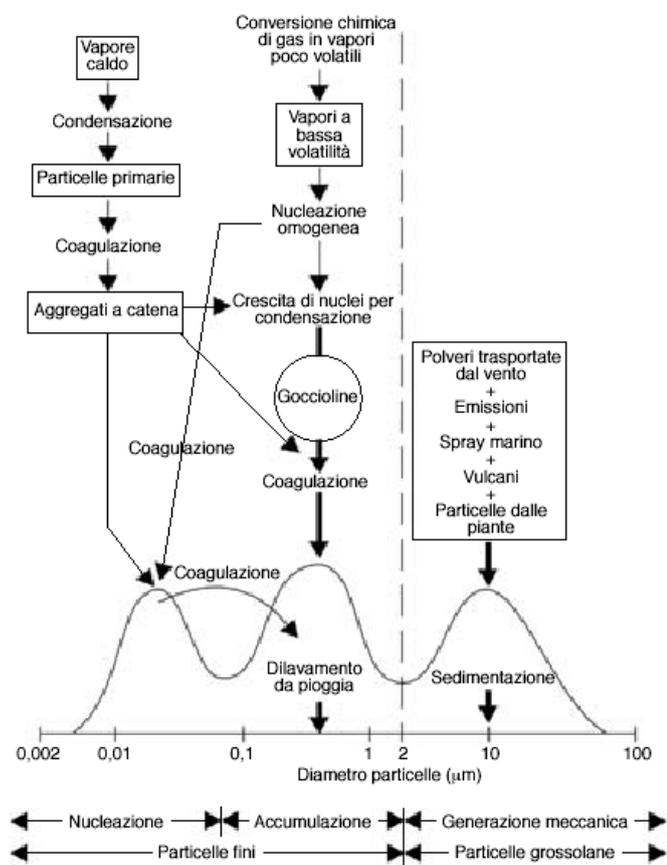


Figura 1: Distribuzione dimensionale in termini di massa o volume delle particelle aerodisperse e illustrazione schematica della loro origine e della relazione dinamica tra particelle delle varie dimensioni e mezzo (Marconi A., 2003)

In conclusione la dimensione delle particelle è il principale parametro che permette di caratterizzarle potendone determinare comportamento, origine, composizione e tempo di permanenza in atmosfera (*Marconi A.,2003*).

2. Origine dell'aerosol atmosferico

L'aerosol atmosferico può essere suddiviso, oltre che in funzione alle dimensioni delle particelle, anche in funzione ai processi che lo hanno generato; in base a questa classificazione distinguiamo l'aerosol primario e secondario.

L'aerosol primario, che si identifica con la frazione "coarse", è costituito da particelle che vengono immesse direttamente in atmosfera tali e quali, senza subire modifiche successive all'immissione. Questo tipo di particelle sono prodotte per via meccanica da fonti naturali o antropiche come ad esempio il sollevamento di sabbia e polvere dal suolo, la produzione di spray marino dalla rottura di bolle sulla superficie del mare, il trasporto di pollini o altre particelle biologiche, l'attività vulcanica e la produzione di ceneri durante la combustione di biomassa. Date le dimensioni di queste particelle non sono contemplati fenomeni di aggregazione e la loro deposizione avviene in breve tempo per forza di gravità o a causa delle precipitazioni.

L'aerosol secondario comprende inquinanti che si formano in atmosfera come conseguenza di reazioni chimiche tra le varie sostanze presenti (un esempio è la formazione dell'ozono nello smog); queste particelle possono subire aggregazione attraverso il processo di nucleazione. I composti coinvolti in questo tipo di processo sono ossidi di azoto (NO_x), ossidi di zolfo (SO_2 , SO_3), ammoniaca (NH_3) e idrocarburi

La tabella 2 evidenzia le sorgenti del particolato atmosferico distinguendo tra particelle primarie e secondarie.

Tipo di Particolato	Sorgenti antropiche		Sorgenti naturali	
	Primario	Secondario	Primario	Secondario
Fine	Uso di combustibili fossili	Ossidazione di SO ₂	Spray marino	Ossidazione di SO ₂ e H ₂ S emessi da incendi e vulcani
	Emissioni di autoveicoli	Ossidazione di NO _x	Erosione di rocce	Ossidazione di NO _x prodotto da suolo e luce
	Polveri volatili	Emissione di NH ₃ da agricoltura e allevamento	Incendi boschivi	Emissione di NH ₃ da animali selvatici
	Usura di pneumatici e freni	Ossidazione di idrocarburi emessi dagli autoveicoli		Ossidazione di idrocarburi emessi dalla vegetazione (terpeni)
Grossolano	Polveri volatili da agricoltura	---	Erosione rocce	---
	Spargimento di sale		Spray marino	
	Usura asfalto		Frammenti di piante ed insetti	

Tabella 2: sorgenti del particolato atmosferico

Una volta immesse nell'atmosfera le particelle secondarie vanno incontro a diversi meccanismi quali: la condensazione di vapori o gas presenti in atmosfera che determinano un aumento rapido delle dimensioni della particella, la condensazione di nuclei secondari su particelle di origine primaria e la coagulazione (o aggregazione) di particelle di origine secondaria.

La rimozione dell'aerosol dall'atmosfera avviene attraverso due processi principali: deposizione gravitazionale o secca e la deposizione per mezzo delle precipitazioni o deposizione umida. La deposizione secca è il trasferimento diretto sulla superficie terrestre; la deposizione umida invece comprende tutti i processi che implicano il trasferimento sulla superficie terrestre in forma acquosa.

3. Composizione chimica dell'aerosol atmosferico

Il particolato atmosferico, in generale, contiene solfati, nitrati, ammonio, materiali organici, specie cristalli (silicio, ferro, calcio, alluminio...), sali marini, ioni idrogeno e acqua; di questi, il solfato, l'ammonio, il carbonio organico e alcuni metalli di transizione si trovano in concentrazioni maggiori nelle particelle fini, che sono legate principalmente a fonti secondarie (*Marconi A., 2003*).

Tuttavia, nella frazione fine si trovano anche composti di origine primaria, come il carbonio elementare, alcuni metalli e gli IPA (idrocarburi policiclici aromatici). Materiali cristalli e le particelle organiche biogeniche (polline, spore, frammenti di piante), invece, fanno parte della frazione grossolana, che deriva principalmente da fonti primarie.

Gli ioni inorganici solubili in acqua costituiscono uno dei maggiori componenti dell'aerosol atmosferico: Cl^- , NO_3^- , Na^+ , Mg^{2+} e Ca^{2+} predominano nel particolato grossolano, SO_4^{2-} e NH_4^+ si trovano principalmente in quello fine. La figura 2 mostra il bilancio chimico dei costituenti dell'aerosol in Italia.

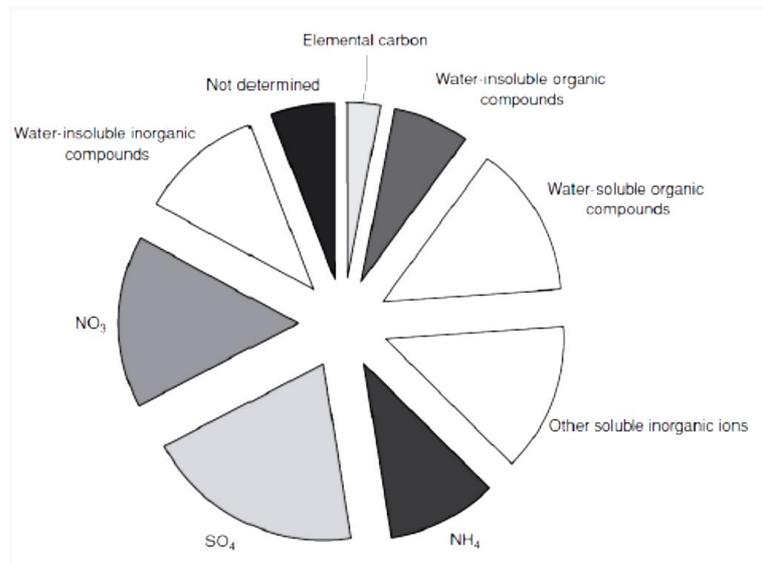


Figura 2: bilancio chimico elementare dei costituenti dell'aerosol in Italia (Colbeck,2008)

La composizione chimica del particolato dipende dall'area di provenienza e dalla tipologia delle sorgenti di emissione e quindi dal tipo di insediamenti della zona e, poiché le particelle possono rimanere sospese nell'aria per parecchi giorni e quindi trasportate anche a grandi distanze, il loro carico in una città dipende non solo dalle fonti locali ma anche dalla quota trasportata (Marconi A.,2003).

4. Effetti del particolato atmosferico

L'aerosol ha un ruolo importante nell'influenzare diversi processi atmosferici quali la formazione di nubi, la variazione della visibilità e il trasferimento della radiazione solare; riveste inoltre un ruolo principale nell'acidificazione di nubi, pioggia e nebbia con conseguenze sul clima e sulla salute umana. Le specie organiche si distribuiscono secondo la loro dimensione e ciò risulta importante e necessario per

valutare quantitativamente il ruolo che queste svolgono sui meccanismi che portano alle alterazioni climatiche.

Vediamo ora nel dettaglio alcuni degli effetti sopracitati.

- **. Effetti sul clima e microclima**

I composti organici dell'aerosol contribuiscono al bilancio radiativo della terra in quanto attraverso i nuclei di condensazione delle nuvole (CCN) possono assorbire o riflettere la radiazione solare in funzione della loro dimensione e composizione chimica e in funzione della lunghezza d'onda della radiazione.

I CCN sono particelle che in presenza di vapore acqueo sovrassaturo vengono attivate per formare nuvole e gocce di nebbia; l'origine e la natura del CCN è diventata una questione centrale nel cambiamento climatico per la loro capacità di modulare la microstruttura della nuvola e, di conseguenza, le proprietà radiative (*Jiming S., 2005*).

Quando le particelle di aerosol agiscono come nuclei di condensazione per le nuvole, aumentandone la probabilità di formazione, si ha come conseguenza il raffreddamento del pianeta: è la riflessione della luce solare da parte delle nuvole a portare ad un raffreddamento radiativo della superficie terrestre. Di contro i CCN possono anche assorbimento la radiazione infrarossa terrestre contribuendo positivamente al riscaldamento della terra (*Lutgens et al, 1995*).

L'aerosol atmosferico ha effetti anche sul microclima urbano: nei centri urbani l'inquinamento dell'aria contribuisce all'effetto "isola di calore" che viene a crearsi dall'elevata cementificazione delle città, inibendo la perdita di radiazioni ad onde lunghe durante la notte. L'aerosol presente su città di grandi dimensioni può inoltre ridurre anche più del 15% la quantità di radiazione solare che raggiunge il suolo. Sulle città le nubi e la nebbia si formano frequentemente a causa delle attività umane che nelle aree urbane producono elevate quantità di particelle che agiscono

da nuclei di condensazione, favorendo la formazione di nubi e nebbie; quando i nuclei igroscopici sono numerosi il vapor d'acqua condensa rapidamente su di essi portando ad un aumento delle precipitazioni. (*Lutgens et al, 1995*).

- ***Effetti sulla visibilità***

La visibilità è definita come la più grande distanza, in una data direzione, alla quale può essere visto e identificato un oggetto scuro alla luce del giorno, o una fonte di luce non focalizzata nella notte . La riflessione della radiazione solare ad opera dell'aerosol è la causa principale della diminuzione della visibilità atmosferica (*Samara, Kouimtzis et al, 2003*).

- ***Effetti sugli ecosistemi, su piante e materiali***

L'aerosol atmosferico, come conseguenza della deposizione secca o umida, può contribuire ai processi di acidificazione degli ecosistemi marini e terrestri. L'acidificazione dei suoli può portare al rilascio di sostanze nocive causando danni alle piante e alle forme di vita.

L'azione acida e ossidante delle particelle danneggia i tessuti della vegetazione oppure possono formare una spessa crosta sulla superficie fogliare creando una sorta di barriera per la luce solare interferendo così con la fotosintesi ed inibendo lo sviluppo della pianta.

L'azione combinata del clima e dell'inquinamento atmosferico porta ad una degradazione del patrimonio artistico, architettonico ed archeologico; è stato osservato che i danni ai materiali sono legati soprattutto alla composizione chimica e allo stato fisico dell'inquinante. Un primo danno indiretto è causato dall'annerimento dei materiali dovuto alla sedimentazione del particolato atmosferico il quale funge anche da serbatoio di acidi provocando corrosioni. I

processi corrosivi si intensificano con l'aumento dell'umidità in atmosfera; come già visto il particolato funge da nuclei di condensazione per le goccioline di acqua nelle quali si dissolvono molti gas che causano un aumento dell'acidità delle deposizioni (Lutgens et al, 1995).

- ***Effetti sulla salute umana***

A seguito di numerosi studi epidemiologici in diversi paesi è stata evidenziata una correlazione tra l'incremento della concentrazione di particelle fini (PM10 e PM2,5) e la morbidità e mortalità, specie per individui affetti da patologie respiratorie o cardiovascolari. Gli effetti biologici delle particelle aerodisperse che entrano nel sistema respiratorio umano dipendono dalla natura delle particelle stesse e dal sito della loro deposizione. Si osserva anche che gli effetti patologici sono proporzionali al diametro delle particelle depositate nelle diverse regioni del tratto respiratorio. La figura 3 illustra le curve di deposizione delle particelle inalate nelle varie regioni dell'apparato respiratorio in funzione delle loro dimensioni.

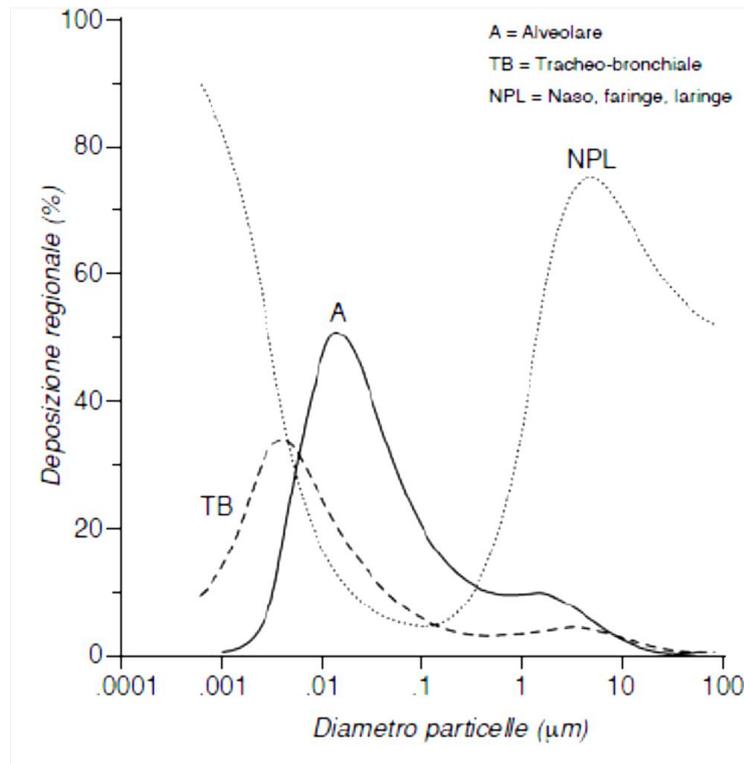


Figura 3: Deposizione delle particelle inalate nelle varie regioni dell'apparato respiratorio in funzione delle dimensioni delle particelle (Marconi A., 2003).

Sulla base di queste considerazioni sono state definite per le frazioni di aerosol che si depositano lungo il tratto respiratorio le seguenti categorie:

- frazione inalabile: rappresenta la porzione di aerosol che viene effettivamente campionata dalla testa umana vista come campionatore a selezione dimensionale;
- frazione toracica: parte della frazione inalabile che penetra e si deposita oltre la laringe;
- frazione respirabile: parte della frazione inalabile che penetra e si deposita nelle vie aeree non ciliate.

Queste elaborazioni, sotto forma di norme di valore internazionale, definiscono anche delle convenzioni per il campionamento a cui devono conformarsi gli strumenti di prelievo delle particelle nelle varie frazioni. Le nuove convenzioni sono

state definite per il campionamento delle frazioni inalabile, toracica e respirabile e sono rappresentate da curve aventi il 50% di efficienza in corrispondenza del diametro aerodinamico pari a $100\ \mu\text{m}$, $10\ \mu\text{m}$ (o PM_{10}) e $4\ \mu\text{m}$ (o PM_{4}). Per la salvaguardia delle persone più suscettibili negli ambienti di vita è stata definita anche una curva con il 50% di efficienza in corrispondenza del diametro aerodinamico di $2,5\ \mu\text{m}$ ($\text{PM}_{2,5}$) (Marconi A., 2003).

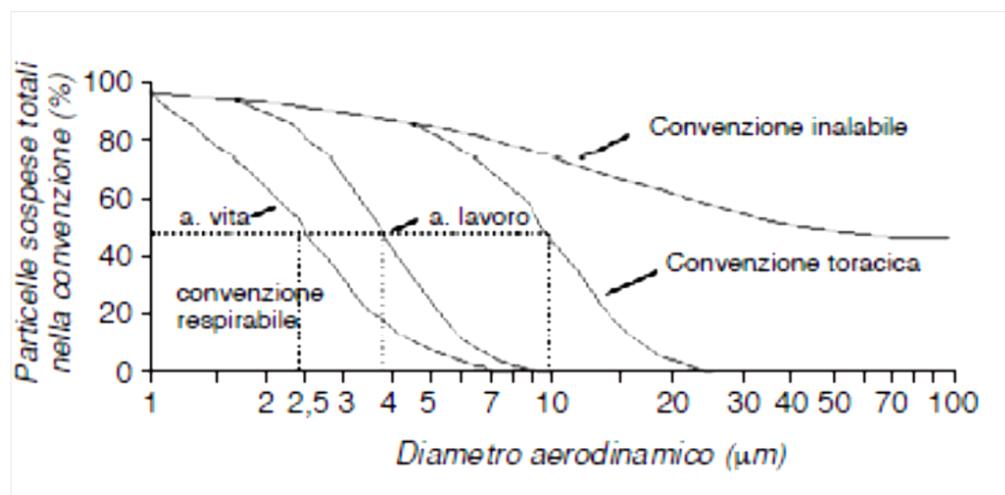


Figura 4: Convenzioni per il campionamento delle frazioni, inalabile, toracica e respirabile espresse come percentuale delle particelle sospese totali negli ambienti di lavoro e di vita (Marconi A., 2003).

La tossicità dell'aerosol non dipende solo dalla distribuzione dimensionale delle particelle, ma anche dalla composizione delle stesse; in particolare dalla presenza di solfati e nitrati, di sostanze caratterizzate da elevata acidità e elementi in tracce (soprattutto metalli pesanti).

Le evidenze degli effetti sulla salute umana hanno indotto molti paesi ed organizzazioni internazionali a revisionare gli standard di qualità dell'aria (SQA) esistenti per l'aerosol atmosferico: l'Unione Europea ha affrontato questo problema con la direttiva 1999/30/EC, nella quale sono stabiliti i valori limite di qualità dell'aria ambiente per il PM_{10} , mentre per il $\text{PM}_{2,5}$ non viene fissato un valore limite, ma viene richiesto agli stati membri di effettuare campionamenti e fornire

informazioni al pubblico anche su questo parametro. La direttiva europea è stata recepita in Italia con il decreto ministeriale no. 60 del 2 aprile 2002 (*Marconi A.,2003*).

5. La combustione di Biomassa

Con il termine combustione di Biomassa (biomass burning) si intende la combustione di materiale organico vegetale vivente dovuta a cause antropogeniche o determinata da incendi boschivi naturali.

La biomassa ha una composizione chimica costituita circa un 25- 30% di lignina e un 75% di carboidrati, ovvero molecole di zucchero unite a formare lunghe catene polimeriche. I due carboidrati principali che si riscontrano sono la cellulosa, i cui lunghi polimeri costituiscono le fibre che conferiscono resistenza alle piante, mentre la lignina funge da collante per mantenerle unite; l'emicellulosa che ha il compito di mantenere associate cellulosa e lignina.

La lignina inoltre riduce la permeabilità all'acqua intervenendo in tutti i processi metabolici e di scambio di minerali e nutrienti.

La cellulosa è un polisaccaride naturale la cui formula generale è $(C_6H_{10}O_5)_n$; è insolubile in acqua formando la struttura di sostegno di tutte le biomasse presenti sulla terra e costituisce circa il 50% dei costituenti la parete cellulare.

L'emicellulosa è formata da una struttura ramificata che si diversifica a seconda del tipo di biomassa: legnoso o erbaceo. L'emicellulosa è costituita da diversi zuccheri le cui catene sono di solito formate da 50-200 unità monometriche.

La combustione di Biomassa comprende una sequenza di reazioni chimiche che hanno come prodotto finale anidride carbonica e acqua attraverso l'ossidazione di carbone e ossigeno.

In parziale carenza di ossigeno i prodotti finali sono invece numerosi: si forma monossido di carbonio (CO), idrocarburi poliaromatici (IPA), composti organici volatili (il più usato è l'acronimo inglese VOC) e del particolato (*Faravelli T., 2006*).

Le percentuali medie di ogni specie prodotte dalla combustione di biomassa sono 40 % di CO₂, 32 % di CO, 20% di particolato e 50% di composti altamente cancerogeni quali gli IPA (*Curtis L., 2002*).

Si registra inoltre anche la formazione di idrocarburi "non metanici" (NMHC_s) e composti organici parzialmente ossidati come aldeidi, chetoni, alcoli, acidi organici e carbon black in forma particolata.

La combustione è costituita da 5 fasi quali il riscaldamento del solido, la perdita d'acqua e quindi l'essiccamento, la pirolisi con rilascio di composti volatili, combustione primaria in fase gas ed infine la combustione secondaria eterogenea gas-solido.

Il Biomass burning può quindi considerarsi una sorgente di gas e particolato, avente dimensioni e composizione chimica diverse, che si disperdono nell'atmosfera.

Le proprietà del particolato dipendono dalla tipologia di materiale combusto, dalle condizioni in cui avviene la combustione, dalla temperatura del fuoco e dall'ambiente circostante (*Laskin A., 2009*).

Il metodo di analisi più comunemente utilizzato per la determinazione dei composti derivanti dalla combustione della biomassa è la Gas Cromatografia interfacciata alla Spettrometria di massa. Sono stati individuati soprattutto alcani, alcheni, aldeidi, chetoni, acidi grassi, alcoli, metossifenoli, monosaccaridi, di- e tri-terpenoidi (*Laskin A., 2009*).

Vi sono dei composti organici che permettono di identificare la presenza di particolato ottenuto da combustione di biomassa; questi particolari composti si dicono marker molecolari della combustione e tra questi il più comune è il levoglucosan.

Ogni specie di pianta a seguito della combustione emette composti organici naturali e termicamente alterati specifici della pianta stessa; si ha una sorta di “impronta digitale chimica” che permette di individuarne provenienza e composizione chimica. L’identificazione della provenienza della biomassa è importante in quanto il particolato emesso ha un impatto significativo sul clima a causa dell’interazione con la radiazione solare incidente e determina modificazioni sulle proprietà delle nubi (*Laskin A., 2009*).

CAPITOLO III

GLI ANALITI

1. I metossifenoli

I metossifenoli sono composti derivanti dalla combustione delle lignine e sono costituiti da un anello fenolico a cui sono legati uno o più gruppi metossili (-CH₃O); in base alla struttura della molecola varia la loro reattività in atmosfera e la loro volatilità; sono stati determinati nel PM₁₀ e con elevate concentrazioni anche nel PM_{2,5}.

La lignina è un polimero tridimensionale irregolare che presenta struttura complessa; viene sintetizzato per polimerizzazione deidrogenativa per via enzimatica di tre principali precursori: alcol *p*-coumarilico, alcol sinapilico e alcol coniferilico.

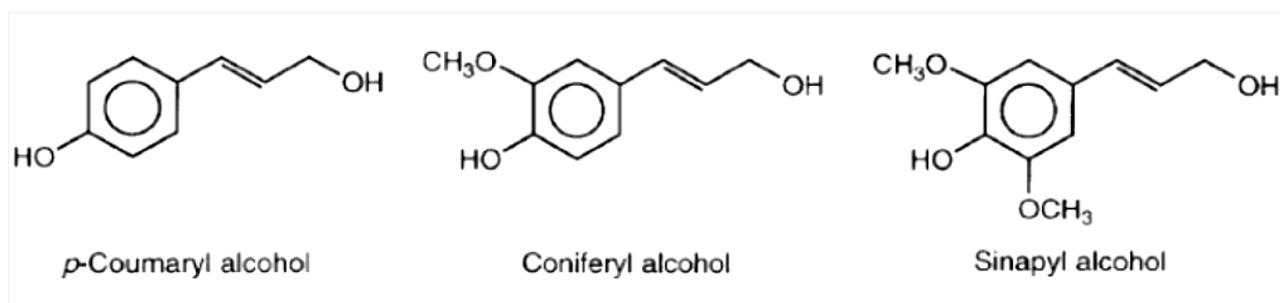


Figura 5: : precursori della lignina

Le lignine in base alla quantità relativa dei tre precursori nelle diverse essenze si possono suddividere in tre tipi:

- lignina softwood: nella struttura si ha prevalenza di alcol coniferilico, mentre l'alcol cumarilico si riscontra in quantità minore; questo tipo di lignina è principalmente caratterizzata da composti aventi un solo gruppo metossile nel

nucleo benzenico. La famiglia di piante in cui è maggiormente presente sono le conifere;

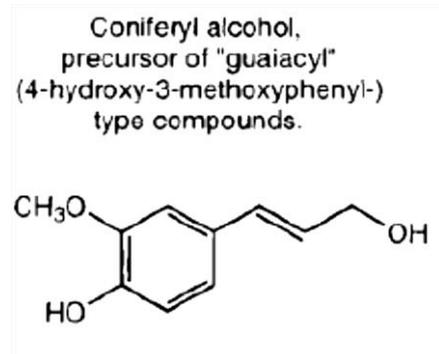


Figura 6: alcol coniferilico

- lignina hardwood: il precursori dominanti sono l'alcol coniferilico e sinapilico; è caratterizzata da composti aventi uno o due gruppi metossile nell'anello benzenico. Con questa classe si identifica la famiglia delle Angiosperme;

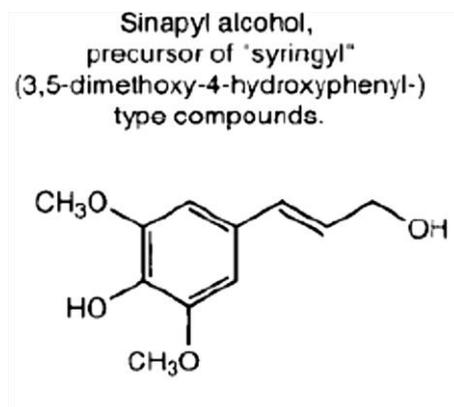


Figura 7: alcol sinapilico

- lignina erbacea: in questo tipo di lignina ritroviamo derivati di alcool p-cumarilico in quantità abbondanti, denominati nuclei anisilici. I derivati

siringilici e guaiacilici sono presenti in quantità ridotta. Questa struttura è tipica delle monocotiledoni erbacee (Simoneit B. R. T., 1993).

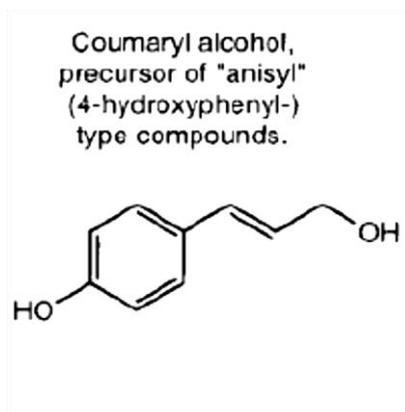
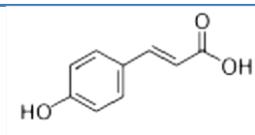
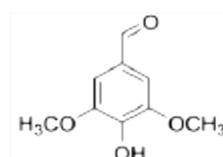


Figura 8: alcol cumarilico

Le figure 6, 7 e 8 mostrano la struttura delle diverse lignine a partire dagli alcoli precursori (Schauer J. C. G., 2001).

Nel presente lavoro di tesi sono stati presi in considerazione solo i metossifenoli presenti nell'aerosol con elevati fattori di emissione (Iinuma Y, 2007- Hoffmann D., 2007):

Nome	Sigla	PM	Formula chimica	Struttura chimica
Acido p-Cumarico	PA	164	$C_9H_8O_3$	
Siringaldeide	SyAH	182	$C_9H_{10}O_4$	

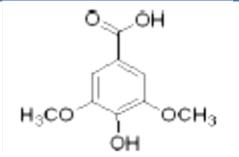
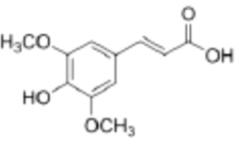
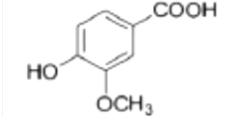
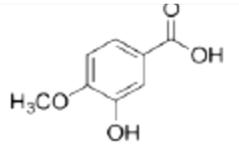
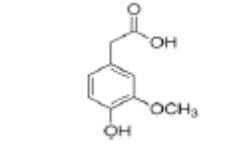
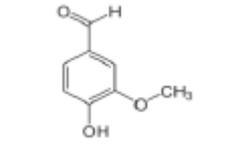
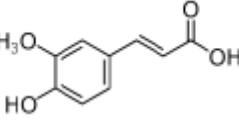
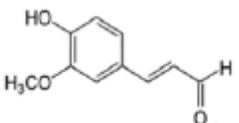
Acido Siringico	SyA	198	$C_9H_{10}O_5$	
Acido Sinapico	SA	224	$C_{11}H_{12}O_5$	
Acido Vanillico	VA	168	$C_8H_8O_4$	
Acido Isovanillico	IVA	168	$C_8H_8O_4$	
Acido Omovanillico	HVA	182	$C_9H_{10}O_4$	
Vanillina	VAN	152	$C_8H_8O_3$	
Acido Ferulico	FA	194	$C_{10}H_{10}O_4$	
Coniferilaldeide	CAH	178	$C_{10}H_{10}O_3$	

Tabella 3: Nome, PM, formula e struttura chimica dei metossifenoli analizzati in questo lavoro di tesi

I metossifenoli sono utilizzati come traccianti ambientali indicatori della combustione della lignina, per facilitare la comprensione delle sorgenti di emissione

e del trasporto a lungo raggio di questo tipo di analiti. La reattività dei fenoli metossilati si deve sia alla presenza del gruppo ossidrilico che alla presenza del gruppo metossile anche se con contributo inferiore. Coeur–Tourneur et al. (2010) hanno calcolato il tempo di vita medio in atmosfera dei metossifenoli che è risultato essere di 1,7-8,1 ore. Questo suggerisce che probabilmente non tutti i metossifenoli sono adatti a svolgere la funzione di tracciante molecolare (Coeur-Tourneur C., 2010).

2. Gli acidi grassi

Gli acidi grassi sono acidi monocarbossilici alifatici che costituiscono quasi tutti i lipidi e i grassi di origine vegetale e animale. In base alla presenza o meno nella catena carboniosa di doppi legami gli acidi grassi si possono distinguere in saturi, in cui non vi sono doppi legami ed in insaturi, in cui possono essere presenti da uno o più doppi legami.

In questo studio di tesi sono stati analizzati gli standard di acidi grassi saturi aventi numero di atomi di carbonio da 6 a 23 e dieci acidi grassi insaturi:

Nome	PM	Insaturazioni	Formula chimica
Ac.Elaidico	296	18:1	C ₁₈ H ₃₄ O ₂
Ac.Erucico	352	22:1	C ₂₂ H ₄₂ O ₂
Ac.Palmitoleico	268	16:1	C ₁₆ H ₃₀ O ₂
Ac.Nervonico	380	24:1	C ₂₄ H ₄₆ O ₂
Ac.Oleico	296	18:1	C ₁₈ H ₃₄ O ₂

Ac.Docosahaexanoico	342	22:6	C ₂₂ H ₃₂ O ₂
Ac.Linolenico	292	18:3	C ₁₈ H ₃₀ O ₂
Ac.Arachidonico	318	20:4	C ₂₀ H ₃₂ O ₂
Ac.Linoleico	294	18:2	C ₁₈ H ₃₂ O ₂
Ac.Petroselinico	296	18:1	C ₁₈ H ₃₄ O ₂

Tabella 4: Nome, PM, formula e insaturazioni degli acidi grassi insaturi analizzati in questo lavoro di Tesi

Una tabella descrittiva della formula bruta degli acidi grassi saturi pari e dispari è riportata nel capitolo VIII, paragrafo 4 (tabella 12).

2.1. Aerosol organico e acidi grassi

I composti organici costituiscono una frazione importante dell'aerosol atmosferico in scala globale influenzandone composizione, caratteristiche e proprietà.

Si è osservato che gran parte del carbonio organico presente in atmosfera deriva per il 54% da combustione di biomassa, dovuta sia a processi naturali che antropici, il 36% da combustibili fossili ed il 10% da fonti naturali (*Jacobson et al., 2000*).

Oggetto di studio sono stati sia i composti idrofobici che idrofilici e in particolare la frazione organica idrofila in quanto da essa dipende l'igroscopicità e l'attività dei nuclei di condensazione delle nuvole (*Michihiro Mochida, 2006*).

L'interesse si è orientato verso i tensioattivi organici che possono influenzare la tensione superficiale delle particelle e il trasferimento di massa. Tensioattivi potenziali includono gli acidi grassi che possono essere rilasciati da fonti marine e terrestri (*Michihiro Mochida, 2006*).

Dallo spray marino, ovvero dallo scoppio di bolle sulla superficie di mari e oceani, gli acidi grassi vengono immessi in atmosfera attraverso l'interfaccia acqua-aria dove si accumulano i composti organici di origine biologica. Per quanto riguarda le fonti

terrestri il rilascio in atmosfera può essere dovuto semplicemente all'alzarsi di sabbia e polvere dal suolo o ancora per eruzioni vulcaniche (*Michihiro Mochida,2002*). Il materiale organico adeso all'aerosol atmosferico ne altera fortemente le proprietà chimiche (*Michihiro Mochida,2002*). Gli effetti degli strati organici tensioattivi sulle particelle di aerosol sono diversi:

- inibizione del trasporto di molecole stabili e radicali liberi reattivi come OH e HO₂ dalla fase gas alle particelle;
- riduzione dell'evaporazione dell'acqua dalla superficie dell'aerosol;
- riduzione dell'efficienza di deposizione umida delle particelle da nebbie e gocce di pioggia.

In quest'ultimo caso il film organico aumenta il tempo di vita in atmosfera delle particelle di aerosol che risulta superiore rispetto a quelli attesi se il film non fosse presente (*Michihiro Mochida,2002*).

Come già anticipato la presenza di determinati acidi grassi all'interno dell'aerosol è utile per comprendere l'origine dell'aerosol e le modalità di trasporto. La Southern African Fire-Atmosphere Research Initiative (SAFARI), infatti, ha condotto una ricerca che combina l'analisi chimica degli acidi grassi all'interno dell'aerosol con l'analisi delle traiettorie delle masse d'aria per meglio comprendere le fonti dell'aerosol e il trasporto nella regione (*Kaycie A.,2003*).

Gli acidi grassi di origine biogenica persistono durante il trasporto atmosferico a lunga distanza e sono quindi potenziali marker di materia organica terrestre su grandi distanze. Inoltre resistono alla combustione della vegetazione e sono potenziali indicatori del trasporto del prodotto della combustione di biomassa (*Kaycie A.,2003*); gli acidi grassi estratti dai campioni di vegetazione bruciata dipendono dalla composizione della biomassa combusta (*Standley and Simoneit, 1987*).

Un esempio della funzione degli acidi grassi come marker biologici lo si riscontra in uno studio condotto al largo delle coste orientali dell'Asia che ha stabilito la presenza di acidi grassi aventi catene di atomi di carbonio tra C20 e C30; l'elevato rapporto dell'acido grasso C24:0 (acido tetracosanoico) rispetto al OC (carbonio organico) evidenzia l'origine dovuta a combustione di biomassa, mentre la presenza di acido palmitico suggerisce l'origine marina. In questo particolare studio si può osservare come la distribuzione dimensionale delle specie organiche sia necessaria per valutare quantitativamente il ruolo di questi composti sui processi atmosferici relativi al clima (*Michihiro M.,2006*).

Una ricerca condotta al largo dell'oceano Pacifico (*Jiasong F.,2002*) ha riscontrato inoltre una variazione della concentrazione di acidi grassi in funzione della stagione; è stato osservato che acidi grassi a basso peso molecolare (in questo caso considerati gli acidi aventi catena carboniosa da C12-19) presentavano concentrazioni minori in inverno e maggiori d'estate; di contro acidi grassi a catena lunga (C20-34) presentavano concentrazioni massime in inverno e minime in estate. Questa differenza è con tutta probabilità dovuta ai diversi processi biologici marini che avvengono nelle due stagioni (*Jiasong F.,2002*).

Dallo stesso studio si evince anche che acidi grassi a basso peso molecolare derivino, almeno in parte, da organismi marini; acidi grassi ad alto peso molecolare, invece, trovano origine da piante terrestri. Il rilevamento di acidi grassi insaturi C16:1 e C18:1 nell'aerosol è indicativo di recente attività biologica in quanto gli acidi grassi insaturi sono instabili: essi possono essere ossidati rapidamente e spesso non sono rilevati nell'atmosfera marina nonostante la loro abbondanza nelle piante e nelle alghe. Le marcate concentrazioni di acidi grassi C16:1 e C18: 1 nei campioni di aerosol in questo studio potrebbero indicare anche un contributo da fonti antropiche come la cottura della carne, che può produrre acidi grassi C18: 1 (*Jiasong F.,2002*).

CAPITOLO IV

STRUMENTAZIONE ANALITICA

1. HPLC-MS

La cromatografia liquida ad alta prestazione interfacciata alla spettrometria di massa è una tecnica che accoppia un cromatografo, la cui funzione è quella di separare gli analiti contenuti nel campione, con uno spettrometro di massa che funge da rivelatore.

Gli strumenti utilizzati in questo lavoro di tesi sono il cromatografo l'UHPLC (Ultra High Performance Liquid Chromatography) UltiMate 3000 (Dionex) e lo spettrometro di massa ad alta risoluzione LTQ Orbitrap XL (Thermo Scientific).

La tecnica strumentale LC/MS viene solitamente utilizzata per l'analisi di aerosol organico evitando preliminare derivatizzazione e garantendo un'elevata selettività anche in caso di separazione cromatografica non ottimale.

2. High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

La tecnica cromatografica consente di separare, identificare (qualitativamente) e determinare quantitativamente due o più analiti presenti in una matrice in soluzione. La separazione degli analiti contenuti nel campione avviene sulla base della ripartizione tra la fase mobile e fase stazionaria.

Si utilizza come strumento un cromatografo liquido ad alta prestazione (HPLC), il quale consente di identificare e separare analiti polari, termolabili o difficilmente volatilizzabili, che risulterebbe difficile determinare con altre tecniche cromatografiche.

La fase stazionaria è formata da particelle solide impaccate, di granulometria molto fine (tra 1.8 e 10 μm), alloggiata all'interno di una colonna adatta a sopportare le alte pressioni con cui lavora lo strumento; generalmente questa è in acciaio o in peek.

Per evitare l'intasamento della colonna, che può essere causato da eventuale materiale presente nel campione, si può far ricorso ad una pre-colonna o colonna di guardia la quale viene posta tra l'iniettore e la colonna stessa: la pre-colonna, lunga generalmente qualche mm, deve avere la stessa fase stazionaria della colonna.

La fase mobile può essere costituita da un liquido puro o da una miscela di solventi a composizione nota, che viene fatta fluire attraverso la fase stazionaria della colonna cromatografica. Per quanto riguarda l'eluizione questa può essere isocratica, in cui i solventi fluiscono con la stessa composizione durante tutta la corsa cromatografica, oppure a gradiente di polarità, in cui si variano le quantità relative dei solventi nel il corso dell'analisi.

L'affinità con le fasi della colonna è data dalla diversa polarità e dalle diverse caratteristiche chimiche dei composti della miscela da separare: analiti poca affinità con la fase stazionaria non vengono trattenuti ed eluiscono quindi velocemente trasportati dalla fase mobile; di contro analiti che presentano maggiore affinità saranno maggiormente trattenuti ed usciranno in tempi più lunghi.

L'uscita degli analiti dalla colonna in tempi differenti, a differenti tempi di ritenzione, ha come risultato una distinzione sia dal punto di vista qualitativo che quantitativo mediante un rivelatore collegato ad un computer che acquisisce il dato analitico e ne permette la sua elaborazione con successiva visualizzazione di un cromatogramma.

In questo lavoro di tesi lo strumento UHPLC (Ultra High Performance Liquid Chromatography) impiegato è UltiMate 3000 della ditta Dionex (figura 9).

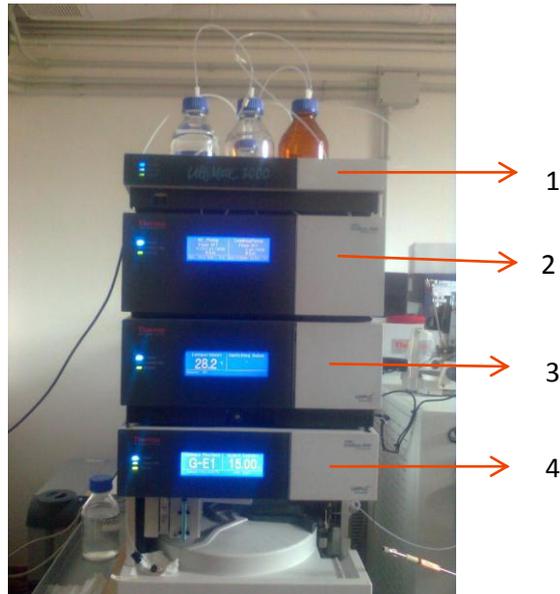


Figura 9: immagine del cromatografo UHPLC UltiMate 3000

Lo strumento è dotato di due pompe: la fase mobile può essere pompata sia da una pompa analitica che da una nano pompa (RSLC nano system) permettendo di operare una separazione cromatografica anche a flussi molto bassi (alcuni nL/min, con le opportune regolazioni strumentali) e di accoppiare a questo strumento un analizzatore di massa.

Le componenti fondamentali sono riportate in Figura 9 e si distinguono il *degaser*, sistema che consente di eliminare eventuali bolle presenti nel solvente le quali potrebbero compromettere l'efficienza cromatografica ed eventualmente il funzionamento dei rivelatori; l'alloggiamento della pompa analitica e la nano pompa; il vano termostato in cui è alloggiata la colonna analitica ed infine l'autocampionatore.

La colonna è sicuramente una parte fondamentale dello strumento: le colonne che si trovano sul mercato sono molteplici e differiscono per il tipo di fase stazionaria, per la lunghezza, per il diametro e per le diverse dimensioni dei pori della fase stazionaria.

Numerosi sono anche i rivelatori che si possono trovare in cromatografia liquida, ma i più comuni sono sicuramente i rivelatori che rispondono alle proprietà fisiche globali della fase mobile come l'indice di rifrazione, la costante dielettrica, la densità ecc.; rivelatori delle proprietà del soluto come assorbanza, fluorescenza, intensità di corrente ecc. e più utilizzati che sono detector UV-visibile o IR; sempre maggiore diffusione però stanno avendo gli spettrometri di massa.

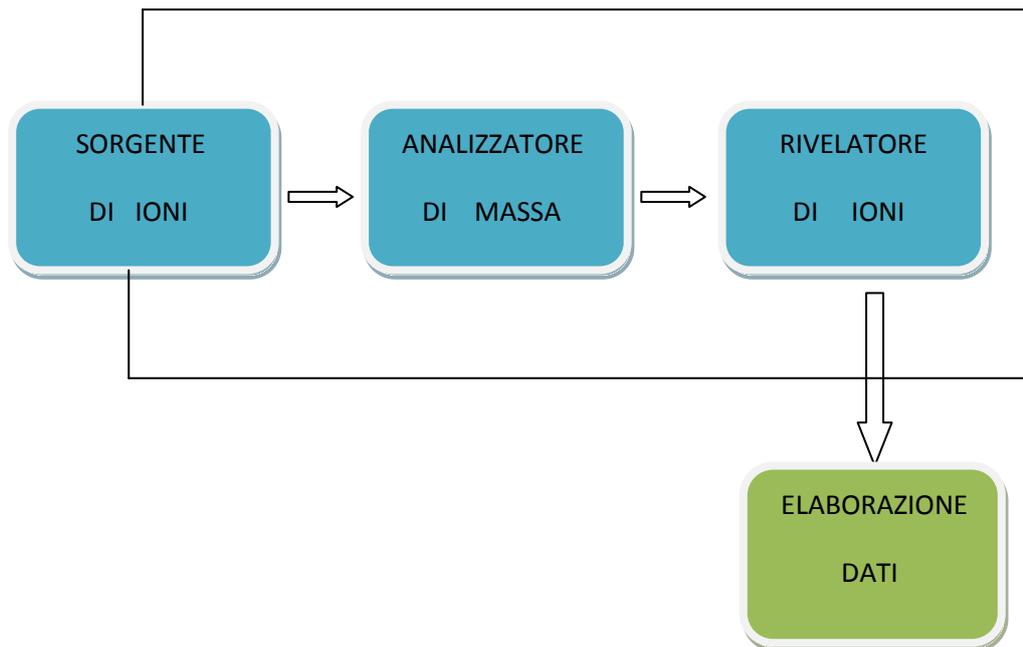
3. Spettrometria di massa

La spettrometria di massa è una tecnica analitica che permette la separazione di ioni presenti in miscele complesse sulla base del diverso rapporto massa/carica (m/z) degli ioni generati mediante ionizzazione dagli analiti in esame.

Il composto analizzato viene dapprima ionizzato, gli ioni prodotti vengono separati nell'analizzatore secondo il rapporto m/z e raggiungono il rivelatore, che attraverso l'emissione secondaria di elettroni generano un segnale elettrico opportunamente ampliato per produrre lo spettro di massa.

La tecnica permette inoltre di dare una misura dell'abbondanza relativa dei singoli ioni.

Lo schema a blocchi in sottostante rappresenta i costituenti fondamentali dello strumento.



Lo strumento LTQ Orbitrap XL (*Hardware manual LTQ Orbitrap XL*)

La Figura 10 mostra una vista schematica dello strumento LTQ Orbitrap XL che consiste della sorgente ionica (1), la zona d'interfaccia e di focalizzazione degli ioni (2), la trappola ionica (selezione e frammentazione degli ioni) (3), un dispositivo intermedio di stoccaggio degli ioni richiesto per iniezione degli ioni in brevi impulsi (4), l'analizzatore Orbitrap per l'analisi in trasformata di Fourier (5) e una cella di collisione per esperimenti di frammentazione CID ad alta energia (6).

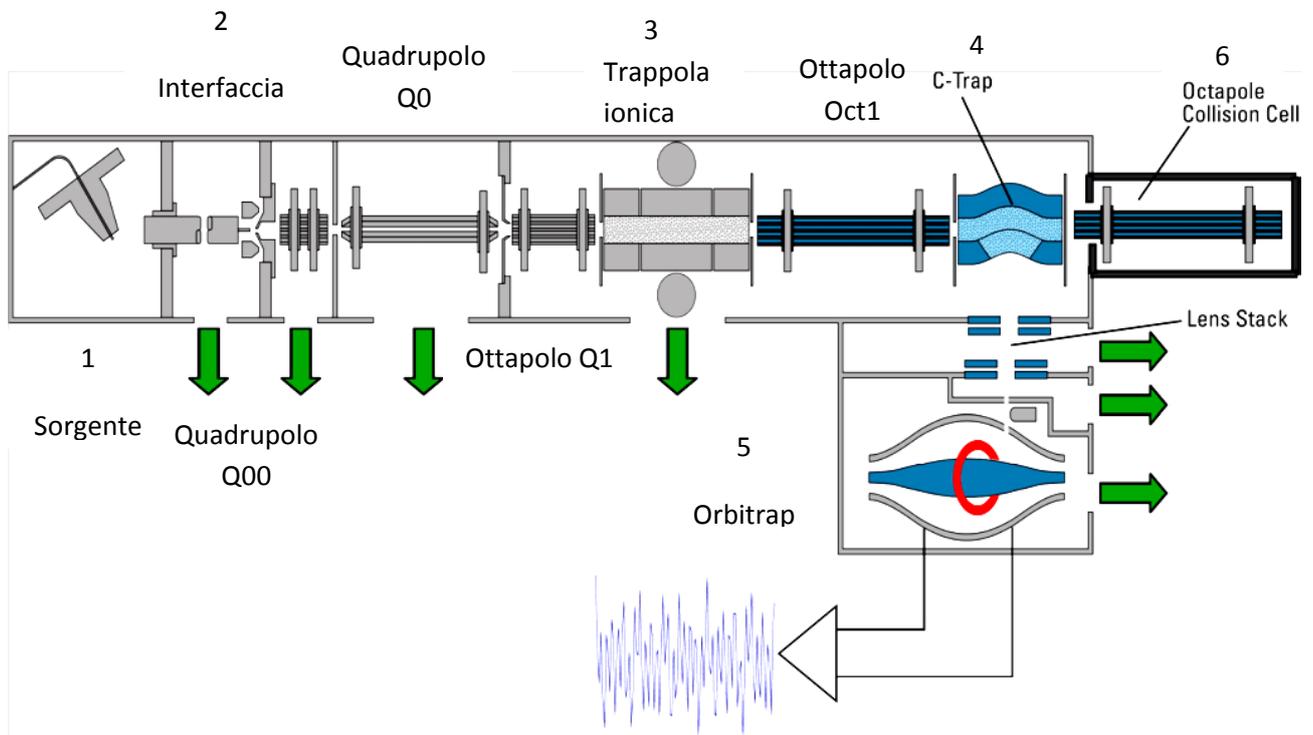


Figura 10: vista schematica dello strumento LTQ Orbitrap XL

Sorgenti di ionizzazione

L'accoppiamento fra un cromatografo liquido con uno spettrometro di massa è stato per molto tempo problematico, infatti in HPLC si utilizza, come eluente, un liquido, con flussi che possono arrivare anche a 5 mL min^{-1} ; invece, lo spettrometro di massa, e in particolare l'analizzatore, sono strumenti analitici che devono operare a pressioni molto basse $10^{-5} \div 10^{-10}$ torr. L'iniezione diretta della soluzione in uscita dalla colonna all'interno della sorgente di ionizzazione dello spettrometro di massa,

rappresenta un punto critico dell'accoppiamento HPLC/MS e richiede l'applicazione di tecniche di ionizzazione capaci di ionizzare gli analiti, rimuovere completamente l'eluente e costituire un interfaccia in grado di trasmettere gli ioni all'analizzatore senza perturbarne il vuoto.

I sistemi di ionizzazione più diffusi nell'accoppiamento HPLC/MS sono le sorgenti ESI (Electrospray Ionization) e APCI (Atmospheric Pressure Chemical Ionization).

Queste sono sorgenti di ionizzazione "soft": provocano una scarsa frammentazione del campione per cui lo spettro di massa presenta ioni protonati $[M + H]^+$, deprotonato $[M - H]^-$ o addotti dell'analita con specie ioniche come Na^+ , K^+ etc.

Electospray Ionization (ESI) (*Hardware manual LTQ series*)

L'ESI è una tecnica di ionizzazione che attraverso l'elettro-nebulizzazione converte ioni in soluzione in ioni in fase gassosa. Questo tipo di sorgente è adatta alla ionizzazione di molecole tremolabili o ad alto peso molecolare e per composti che tendano a formare spontaneamente ioni in soluzione. L'ESI risulta perciò particolarmente adatta alla ionizzazione di composti polari e solo di piccole molecole, ma anche i proteine, peptidi, polimeri industriali; questo grazie alla formazione di ioni multicarica. La ionizzazione elettrospray avviene a pressione atmosferica e la temperatura può essere incrementata allo scopo di migliorare l'evaporazione del solvente e la declusterizzazione.

La soluzione contenente gli analiti e precedentemente separata per via cromatografica in colonna, viene iniettata attraverso un capillare metallico nella camera di ionizzazione della sorgente, l'ingresso è favorito dall'applicazione di un elevato potenziale elettrico che può essere negativo o positivo in base all'analita. Coassialmente al capillare è presente un flusso di gas (Sheath gas) con la funzione di nebulizzare la soluzione in un sottile aerosol all'uscita del capillare.

Viene a formarsi così uno spray di gocce cariche, di diametro di qualche micron (1-60 μm), che è indirizzato verso l'apertura posta sul controelettrodo costituita da un capillare e da uno skimmer.

La desolvatazione che permette di diminuire il volume della goccia con conseguente aumento di densità di carica superficiale è favorita dalla temperatura della sorgente e dal flusso di un gas ausiliario, l'Auxiliary gas che, applicato esternamente, ha il compito di assistere lo Sheath gas nella nebulizzazione del campione e nell'evaporazione del solvente.

Il processo prosegue fino al raggiungimento del "limite di Rayleigh", limite in cui la tensione superficiale della goccia non sopporta più la repulsione coulombiana fra le cariche con conseguente esplosione "coulombiana": le gocce si disgregano ottenendo dimensioni inferiori di queste, come schematizzato in Figura 11.

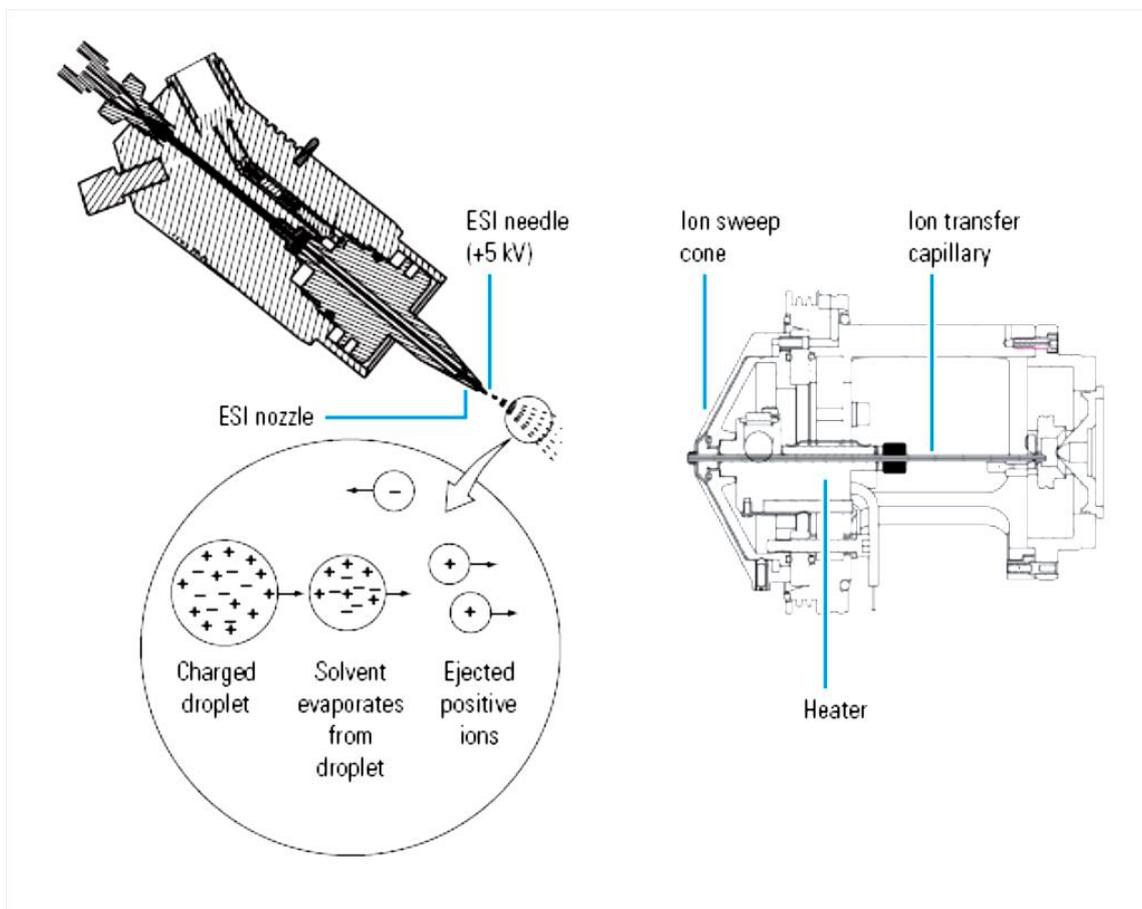


Figura 11: Schema del processo di ionizzazione ESI in polarità positiva.

Il meccanismo si ripete fino a che tutto il solvente è evaporato con conseguente formazione di ioni desolvatati di analita in fase gas, i quali possono avere carica unitaria o multipla. L'angolo della sorgente è posto a 60° rispetto all'asse del capillare di trasferimento (ion transfer capillary) al fine di mantenerlo pulito. L'ion swipe cone costituisce una barriera meccanica che ha la funzione di proteggere il capillare di trasferimento dalle gocce di dimensioni maggiori e dal particolato. Gli ioni passano poi attraverso l'ion transfer capillary nel detector di massa.

Atmospheric Pressure Chemical Ionization (APCI) (*Hardware manual LTQ series*)

L'Atmospheric Pressure Chemical Ionization (APCI) è una tecnica di ionizzazione soft che può essere applicata per la ionizzazione di composti di bassa o media polarità, di piccole dimensioni e caratterizzati da una certa volatilità.

In figura 12 è rappresentato il meccanismo generale di ionizzazione di una sorgente APCI.

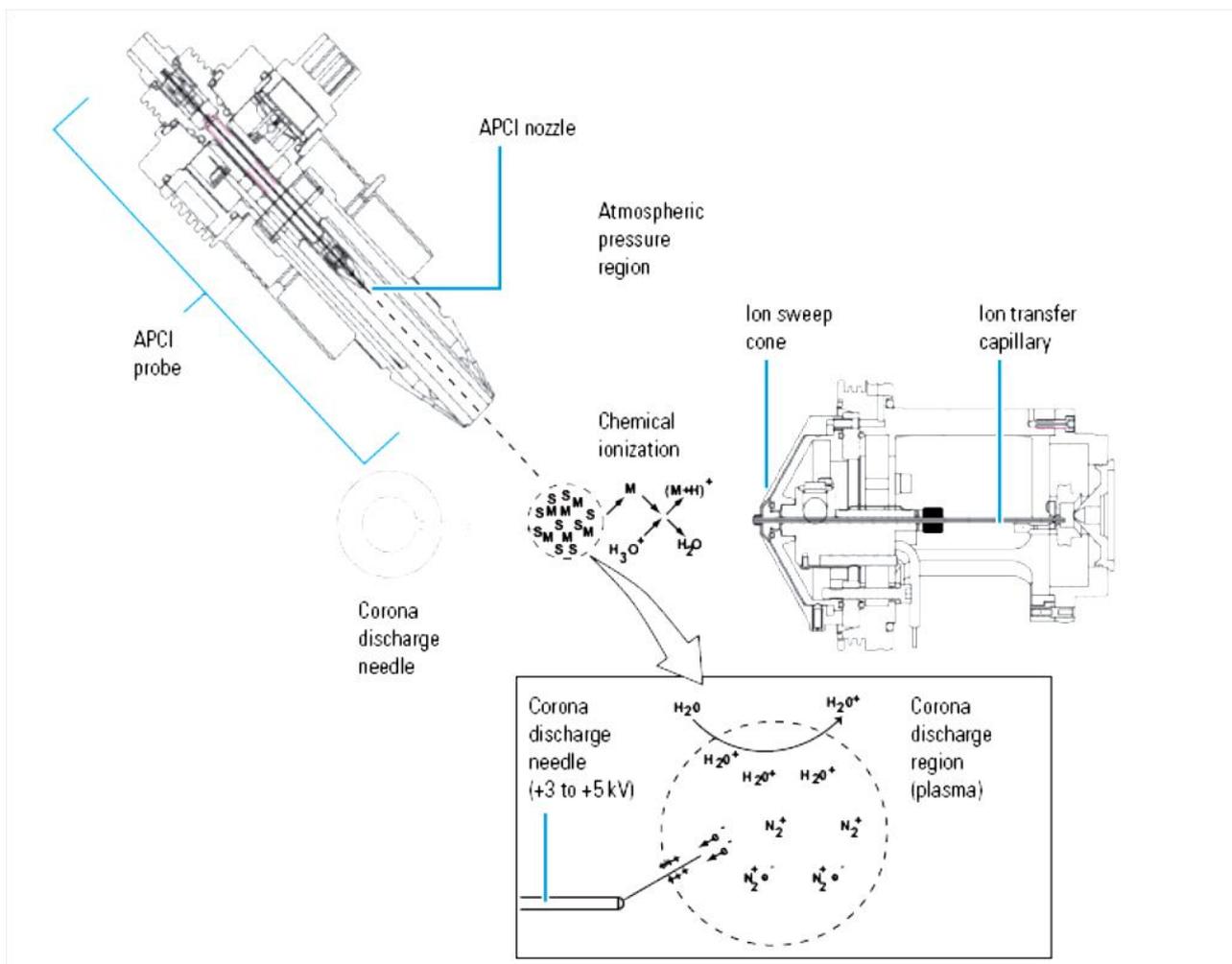


Figura 12: Processo di ionizzazione APCI in polarit  positiva.

L'introduzione della soluzione da analizzare   condotta mediante un nebulizzatore pneumatico. La soluzione   convertita in spray all'interno di una camicia tubolare riscaldata ad alta temperatura. Gli analiti vaporizzati sono poi sottoposti a ionizzazione a pressione atmosferica. La ionizzazione delle molecole di gas (N_2), le quali provengono dal flusso di gas (Sheath gas),   permessa dalla carica a corona applicata all'ago (figura 11). Gli ioni cos  prodotti reagiscono con le molecole di solvente vaporizzato, formando nuovi ioni in fase gassosa che, a loro volta, reagiscono con le molecole dell'analita in fase vapore portando alla ionizzazione dell'analita stesso. La formazione di ioni negativi   favorita dalla presenza di basi forti in fase gas, mentre quella di ioni positivi   legata alla presenza di acidi forti. La

sorgente APCI è generalmente usata con una velocità di flusso che varia tra 50 e 2000 $\mu\text{L min}^{-1}$.

L'interfaccia LTQ XL (*Hardware manual LTQ series*)

L'interfaccia della sorgente ionica consiste di quei componenti che, tranne lo swipe cone, sono tenuti sotto vuoto.

I costituenti principali sono: l'ion swipe cone, lo spray cone (posto immediatamente dietro l'ion swipe cone), sul quale è direttamente connesso l'ion transfer capillary (capillare metallico riscaldato) che costituisce il mezzo attraverso il quale gli ioni attratti dal capillary voltage ad esso applicato e aspirati da una differenza di pressione, rispetto alla camera di ionizzazione a pressione atmosferica (760 Torr), entrano nella prima regione a pressione ridotta (2 Torr) dello spettrometro di massa.

All'interfaccia dello strumento è applicato in flusso di gas aggiuntivo (Sweep gas) in uscita dal retro dello sweep cone che aiuta nella declusterizzazione degli ioni e nella riduzione degli addotti, declusterizzazione che si completerà durante il passaggio all'interno del capillare di trasferimento.

All'uscita del capillare è posta la tube lens che focalizza gli ioni verso l'apertura dello skimmer.

Il tube lens è in parametro che deve essere accuratamente aggiustato, poiché riveste una grande importanza nell'intensità con cui sarà rivelata una specie ionica, rappresentando una discriminante fra il grado di declusterizzazione e di frammentazione di uno ione.

Gli ioni prodotti dalla sorgente (ioni precursori) quindi passano attraverso l'interfaccia e ad un sistema costituito da 2 quadrupoli Q00 e Q0 e un ottapolo Q1 in

serie (Fig.10), che ha la funzione di focalizzarli, accelerarli e convogliarli lungo zone dello strumento a depressione crescente fino alla trappola ionica lineare.

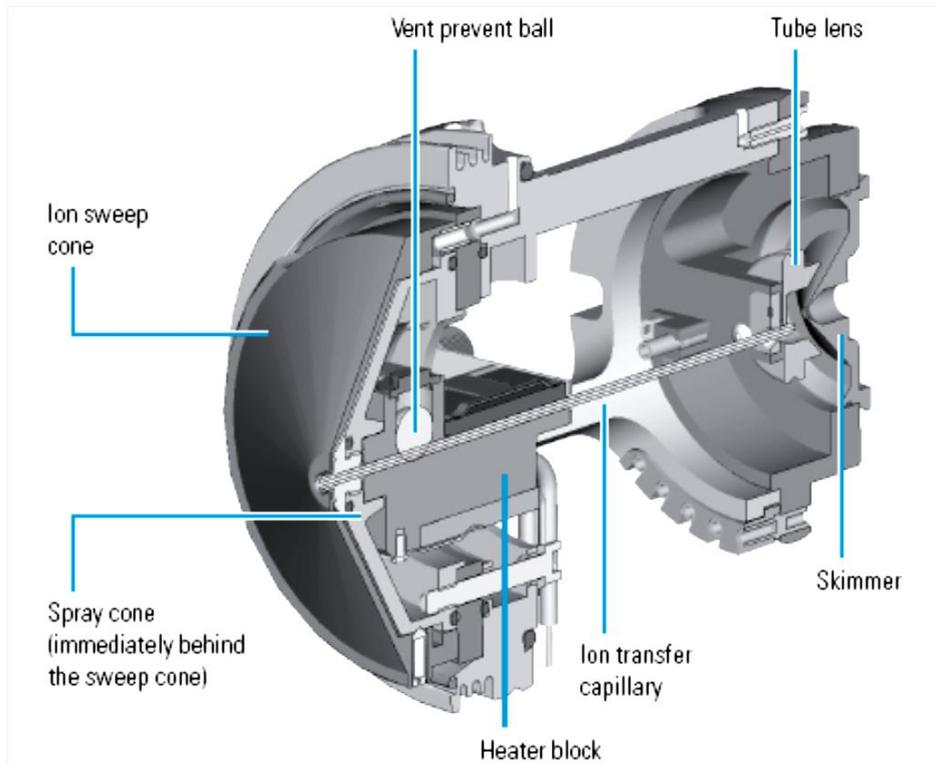


Figura 13: interfaccia LTQ XL

La trappola ionica lineare (*Hardware manual LTQ series*)

La trappola ionica lineare è un analizzatore di massa, che nel sistema globale dello strumento è in grado di lavorare in modo indipendente: può immagazzinare, isolare e frammentare gli ioni, rilevandoli mediante i suoi detector SEM. Altrimenti gli ioni sono inviati all'Orbitrap per l'analisi in alta risoluzione.

Per produrre uno spettro di massa, nella trappola ionica sono variati i voltaggi dc (corrente continua) e rf (radiofrequenza) al fine di espellere sequenzialmente gli ioni

in base al loro rapporto m/z . Oppure variando solo il voltaggio rf l'analizzatore può prima espellere tutti gli ioni, eccetto alcuni ioni precursori e poi sfruttando le collisioni con le molecole d'elio (buffer gas) in essa contenuto, frammentarle ottenendo così gli ioni prodotto. Gli ioni prodotto sono poi espulsi dalla trappola in base al loro rapporto m/z e ottenendo così uno spettro di massa (fig.14).

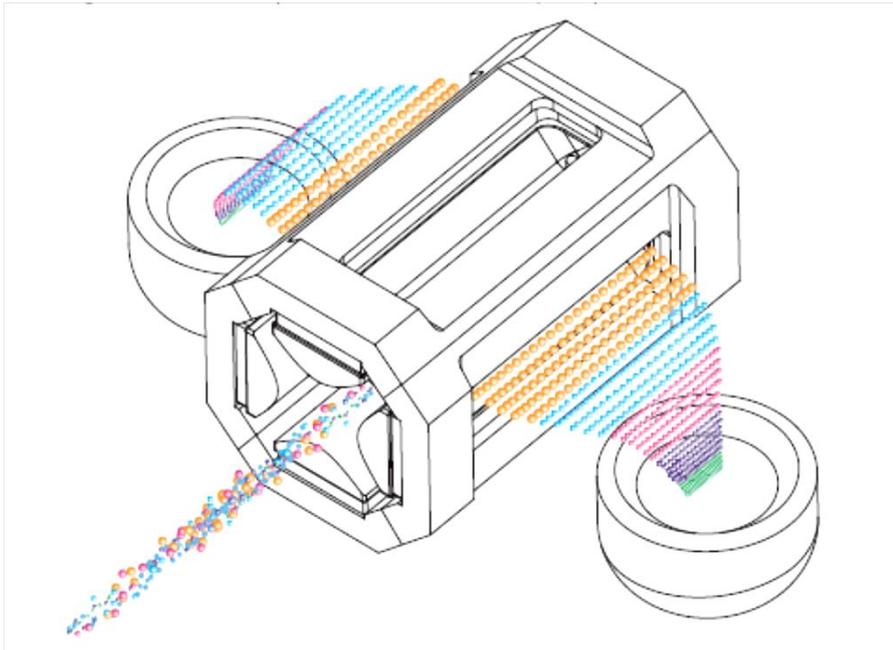


Figura 14: Rappresentazione visiva della selezione di massa operata da una trappola ionica lineare LTQ.

Il numero di fasi di analisi di massa si può rappresentare come MS^n , in cui ogni fase di analisi di massa con $n > 1$ include una fase di selezione di massa. Con una trappola ionica lineare LTQ sono possibili fino da $n=1$ a $n=10$ scansioni di massa.

I tipi di scansione effettuabili utilizzando una trappola ionica sono:

- Full scan: questa modalità di scansione (singola scansione di massa $n=1$) permette di ottenere uno spettro di massa completo durante un particolare tempo di scansione. In un full scan, nel corso dell'espulsione degli

ioni l'analizzatore effettua una scansione continua dalla prima all'ultima massa comprese in un dato range di massa.

Il full scan si può effettuare sull'intera popolazione ionica prodotta dalla sorgente, è utile per l'analisi qualitativa.

- Full scan in due fasi: in questa modalità si hanno due fasi di scansione di massa ($n=2$). Nella prima fase gli ioni prodotti in sorgente sono accumulati nella trappola, in seguito uno ione con un particolare rapporto m/z (ione precursore) viene selezionato, mentre tutti gli altri sono espulsi dalla trappola. Lo ione precursore è frammentato mediante collisione con le molecole del buffer gas con conseguente produzione di ioni frammento. La seconda fase di analisi di massa è costituita dall'immagazzinamento degli ioni prodotti e la successiva scansione dell'analizzatore, si produce lo spettro di massa degli ioni frammento generati.
- Selected Ion Monitoring (SIM): in questa modalità di acquisizione a singola scansione di massa ($n=1$) si ha il monitoraggio di un solo ione o una serie di ioni selezionati. Nella scansione SIM, gli ioni prodotti in sorgente sono accumulati nella trappola, ioni con un certo valore di m/z o una serie di ioni con un selezionato valore m/z sono selezionati e tutti gli altri espulsi dalla trappola ionica. In seguito gli ioni selezionati sono scansiti in modo sequenziale producendo uno spettro di massa SIM.

In modalità di acquisizione SIM, in cui lo strumento monitora esclusivamente gli ioni di interesse, si ha un incremento sia nella velocità di acquisizione che della sensibilità (limiti di rivelabilità, LOD, inferiori), utile nell'analisi di composti target presenti in tracce in matrici complesse.

- Selected Reaction Monitoring (SRM): è un metodo di acquisizione in due fasi in cui si monitorano sia lo ione precursore che lo ione frammento. Gli ioni precursori prodotti in sorgente sono accumulati nella trappola ionica, uno ione con un certo rapporto m/z , è selezionato all'interno della trappola e tutti gli altri ioni sono espulsi, in seguito per collisione con il buffer gas all'interno della trappola viene frammentato producendo uno o più ioni frammento. Nella seconda fase di selezione di massa, gli ioni frammento sono accumulati all'interno dell'analizzatore, uno o più ioni con dato rapporto m/z sono selezionati, gli altri sono espulsi dalla trappola. Gli ioni selezionati sono scansiti sequenzialmente e si ottiene uno spettro SRM degli ioni prodotto. Come in SIM, la scansione SRM è più veloce, rispetto ad un acquisizione in full scan. Inoltre, poiché si monitorano lo ione precursore e i suoi ioni frammento questo tipo di acquisizione è caratterizzata, rispetto al SIM, da una maggiore selettività.
- Consecutive Reaction Monitoring (CRM): è un metodo di acquisizione multistadio (da $n=3$ a $n=10$), è simile a quanto avviene per il SIM o SRM e sono monitorati cammini di frammentazione multipli. Considerando quanto descritto nella sezione SRM, una volta ottenuto lo ione frammento, questo diventa nel processo il nuovo ione precursore, è selezionato e frammentato ulteriormente, gli ioni frammento sono poi accumulati, alcuni ioni caratterizzati da un dato valore m/z sono selezionati e poi scansiti in SRM, portando all'acquisizione di uno spettro CRM. In questo metodo di acquisizione in cui si ha un MS^3 o superiore si ha un incremento della specificità del metodo, benché a scapito della sensibilità, soprattutto se gli ioni studiati presentano cammini di frammentazione multipli.

L'analizzatore Orbitrap (*Hardware manual LTQ Orbitrap XL*)

Il cuore del sistema è un analizzatore di massa, costituito da un elettrodo interno a forma di fuso, posto coassialmente ad un elettrodo esterno a forma di campana (fig.15). L'Orbitrap impiega campi elettrici per catturare e confinare gli ioni al suo interno.

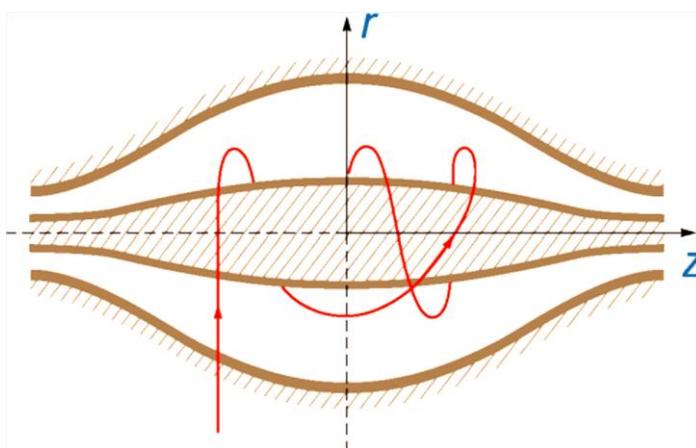


Figura 15: Vista schematica dell'analizzatore Orbitrap ed esempio di traiettoria ionica stabile.

Nell'analizzatore di massa mostrato in figura 15, ioni con traiettoria stabile ruotano attorno ad un elettrodo centrale con oscillazioni armoniche lungo il suo asse. La frequenza ω di queste dipende solo dal rapporto massa su carica e dalla costante strumentale k .

$$\omega = \sqrt{\frac{q}{m} \times k}$$

(1)

Le due metà dell'elettrodo esterno dell'Orbitrap rilevano la corrente immagine prodotta dall'oscillazione degli ioni. Poi mediante una Fast Fourier Transformation (FTT, Trasformata di Fourier veloce) della corrente immagine si ottengono le frequenze di oscillazione assiale da cui mediante la (1) si ricava il rapporto massa sul carica degli ioni.

Prima di raggiungere l'Orbitrap (fig. 15) gli ioni provenienti dalla trappola lineare LTQ-XL si muovono attraverso un ottapolo RF (Oct1) sotto vuoto e raggiungono una trappola lineare curva contenente gas chiamata C-Trap.. Gli ioni entrano nella C-Trap attraverso il gate electrode e sono trattenuti al suo interno dall'elettrodo di intrappolamento (Trap electrode) posto all'altra estremità. Si vengono a trovare così in un ambiente contenente azoto usato come gas di collisione (bath gas) che ha la funzione di dissipare l'energia cinetica posseduta dagli ioni, "raffreddandoli" e focalizzandoli sull'asse della trappola lineare curva e impedendo loro di sfuggire attraverso il Gate.

I voltaggi applicati alle estremità delle aperture della C-Trap sono poi aumentati al fine di creare una barriera di potenziale lungo il suo asse. Tali voltaggi in seguito sono incrementati progressivamente in modo da "schacciare" gli ioni in uno stretto fascio lungo il suo asse.

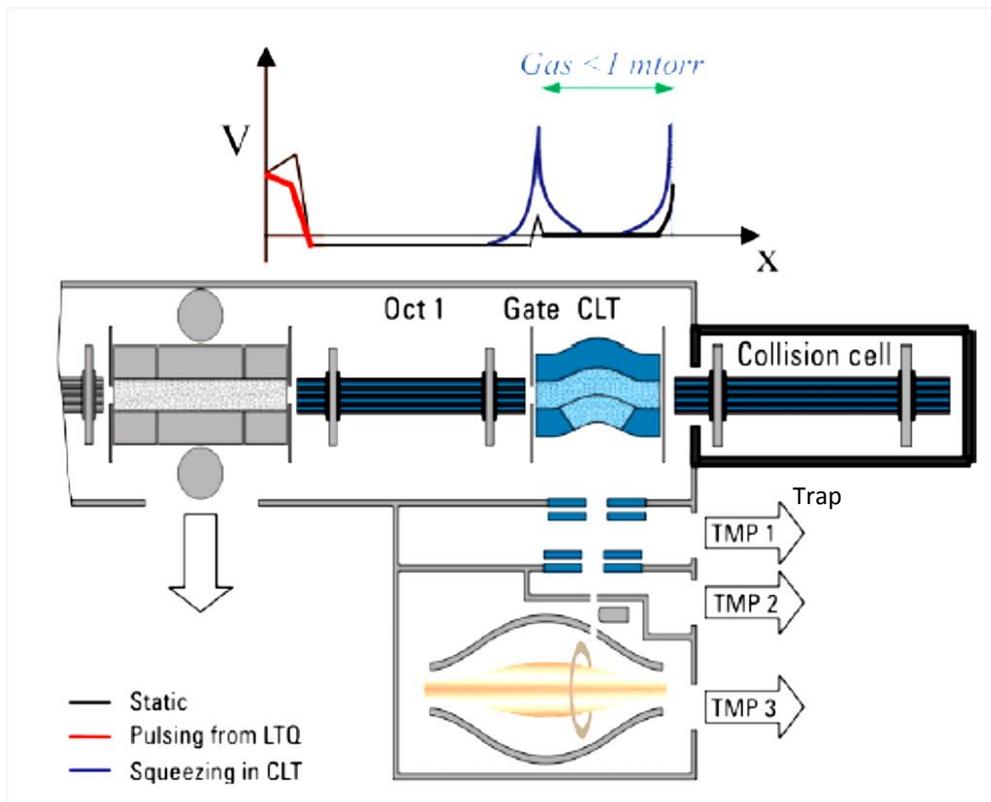


Figura 16: Layout dello strumento.

Per l'estrazione degli ioni il potenziale di radiofrequenza applicato alle barre curve della C-Trap è spento e agli elettrodi sono applicati dei voltaggi pulsati che estraggono gli ioni spingendoli ortogonalmente all'asse curvo attraverso una fessura posta nell'elettrodo iperbolico interno. A causa della curvatura iniziale della C-Trap e delle lenti successive, il fascio ionico converge all'entrata nell'Orbitrap. Le lenti formano anche delle fessure a zone di pompaggio differenziale che portano ad una focalizzazione spaziale del fascio ionico all'entrata dell'Orbitrap.

A causa della veloce pulsazione degli ioni dalla C-Trap, ioni di ciascun rapporto massa su carica arrivano all'entrata dell'Orbitrap in piccoli "pacchetti", lunghi solo qualche mm ad impulsi di 100-200 nsec. Per ogni popolazione di un dato rapporto massa su carica corrisponde ad un allargamento durante il tempo di volo solo di poche centinaia di nanosecondi per m/z , tempi considerabilmente inferiori al semiperiodo di oscillazione degli ioni all'interno della trappola.

Gli ioni sono iniettati nell'Orbitrap ad una certa distanza dall'equatore (fig. 17) e i pacchetti di ioni iniziano un'oscillazione assiale coerente.

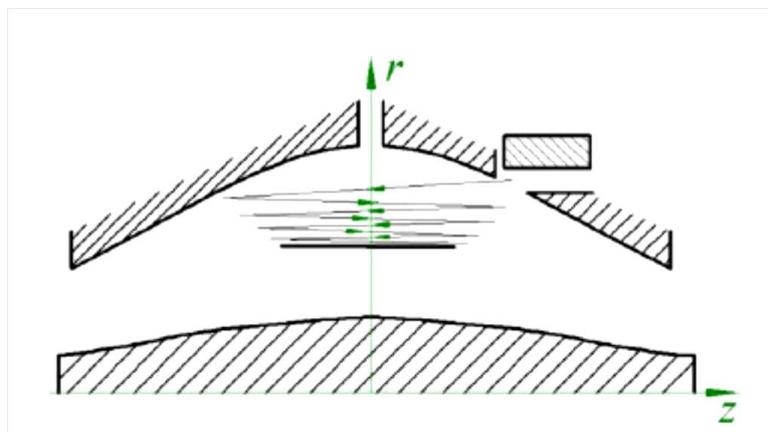


Figura 17: Principio di "schiacciamento" degli ioni all'interno dell'Orbitrap che avviene con l'aumento della forza del campo elettrico applicato.

In fig.17 è illustrato l'evoluzione del pacchetto di ioni durante l'aumento del campo elettrico.

Quando gli ioni iniettati si avvicinano all'elettrodo opposto per la prima volta, l'aumento del campo elettrico (dovuto al cambiamento del voltaggio applicato all'elettrodo centrale) contrae il raggio della nube di ioni di una certa percentuale. I voltaggi applicati sono aggiustati per prevenire la collisione degli ioni con l'elettrodo. Un ulteriore aumento del campo continua a schiacciare la traiettoria vicina all'asse e nel contempo permette anche ai nuovi ioni in arrivo (normalmente caratterizzati da un maggior rapporto massa su carica) di entrare nella trappola.

Quando tutti gli ioni di tutti i rapporti m/z sono entrati nell'Orbitrap, il voltaggio applicato sul elettrodo interno è mantenuto costante e la rilevazione delle correnti immagine ha inizio, durante questa fase sia l'elettrodo centrale che il deflector sono mantenuti a voltaggi molto stabili al fine di evitare qualsiasi drift di massa.

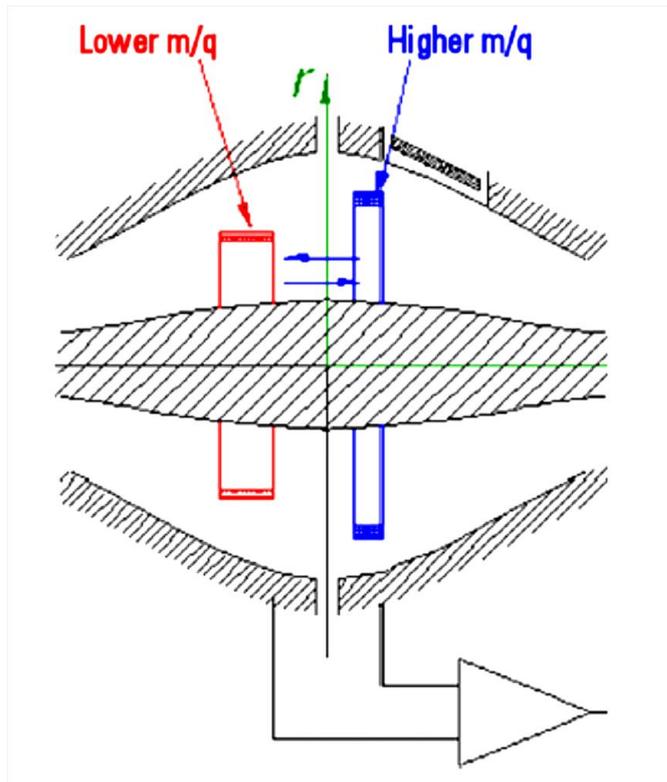


Figura 18: Forma approssimata dei pacchetti ionici di diverso m/z in seguito alla stabilizzazione dei potenziali.

Traiettorie stabili all'interno dell'Orbitrap combinano oscillazioni lungo l'asse z con rotazione attorno all'elettrodo centrale (fig. 15) e vibrazioni nella direzione radiale. Per ogni valore di m/z solo il valore di frequenza delle oscillazioni assiali è completamente indipendente dai parametri ionici iniziali, mentre i valori di frequenza rotazionali e radiale mostrano forti dipendenze dal raggio iniziale e dall'energia. Quindi, ioni con lo stesso m/z continuano ad oscillare lungo l'asse z insieme rimanendo in fase per molte migliaia di oscillazioni.

Al contrario le frequenze di moto radiale e rotazionale varieranno leggermente in base a piccole differenze dei parametri iniziali. Ciò significa che nella direzione radiale gli ioni defasano con una velocità di ordini di grandezza superiore a quella nella direzione assiale, in un processo che avviene in un periodo di sole 50-100 oscillazioni. In seguito a questo, i pacchetti di un dato m/z assumono la forma di un anello con gli ioni uniformemente distribuiti lungo la sua circonferenza.

A causa della diffusione angolare e radiale, le frequenze radiali e rotazionali non possono apparire in uno spettro di massa misurato. Nel frattempo, le oscillazioni assiali persisteranno e lo spessore dell'anello di ioni rimarrà piccolo in confronto all'ampiezza assiale. L'elettrodo esterno è diviso in due parti a $z=0$, muovendosi da una metà all'altra dell'elettrodo esterno, tale anello di ioni indurrà una corrente immagine su ciascuna metà dell'elettrodo esterno, tali correnti opposte saranno amplificate in modo differenziale, si otterrà un segnale che sarà sottoposto a conversione analogico – digitale e poi processato mediante l'algoritmo della trasformata di Fourier veloce.

La cella di collisione HCD (Higher Energy Collisional Dissociation)

La cella di collisione è costituita da un multipolo montato all'interno di un tubo metallico connesso e linea diretta con la C-Trap. Attraverso delle fessure nella camicia metallica è riempita di un gas, in generale azoto, che fornisce all'interno della cella una pressione maggiore. La parte anteriore della cella è dotata di lenti per il tunaggio della trasmissione ionica e per l'espulsione/iniezione da e per la C-Trap. Mediante collisioni con le molecole di gas presenti nella cella gli ioni precursori sono frammentati, si ottengono spettri di frammentazione ad alta energia che forniscono informazioni complementari a quelle ottenute dalla trappola ionica. I frammenti ottenuti sono inviati, attraverso la C-Trap all'Orbitrap e viene acquisito uno spettro in alta risoluzione.



Figura 19: : HCD collision celle C-Trap

Lo strumento LTQ Orbitrap XL è definito come uno spettrometro di massa “ibrido” a causa della presenza all’interno della sua ottica ionica di più analizzatori di massa: trappola ionica, HCD e Orbitrap, risulta pertanto un sistema complesso e molti sono i modi in cui può essere impiegato.

- Una prima modalità è il Full scan: questa modalità di acquisizione, può essere condotta sia
 - nella trappola ionica a bassa risoluzione,
 - nella trappola orbitalica ad alta risoluzione.

Questo strumento permette di effettuare diversi tipi di esperimenti:

- La frammentazione di ioni:
 - in MS/MS, sia nella trappola ionica che nella cella di collisione HCD
 - esperimenti di frammentazione MS^n (da $n=3$ a $n=10$) utilizzando la trappola ionica

Gli ioni frammento ottenuti dalle frammentazioni condotte nella trappola ionica possono essere rilevati mediante i detector della trappola ionica o inviati all’Orbitrap

e rilevati in alta risoluzione, gli ioni frammento ottenuti dalla cella di collisione sono rivelati solo dall'Orbitrap in alta risoluzione.

I principali punti di forza di questo strumento sono rappresentati dall'alta risoluzione e accuratezza di massa.

La capacità di uno spettrometro di differenziare le masse è dato dal potere risolvete che può essere definito come la capacità di differenziare le masse (*Holler, 2007*); la sua espressione per l'Orbitrap (*Perry 2008*) è data dalla formula:

$$R = \frac{m}{\Delta m} \quad (2)$$

dove m è la massa del picco e Δm è l'ampiezza del picco alla metà della sua altezza (FWHM: Full Width at Half Maximum peak height). L'LTQ Orbitrap può lavorare a diversi valori di risoluzione (7500, 15000, 30000, 60000) fino ad un massimo di 100000 ad un valore m/z di 400.

Accuratezza di massa: è un parametro che dipende direttamente dalla capacità di uno strumento di separare i picchi adiacenti e quindi dalla risoluzione (*Perry; 2008*).

La stima dell'accuratezza di massa è espressa mediante il valore dell'errore sulla massa misurata, espressa in parti per milione (ppm), è determinato dalla funzione:

$$e_m = \frac{m_a - m_t}{m_t} * 10^6 \quad (3)$$

dove m_a = massa accurata misurata strumentalmente

m_t = massa esatta teorica (*Wung, Ming Gu; 2005*).

La capacità di misurare la massa di un composto con un'accuratezza adeguata determina direttamente la possibilità di ottenere la sua composizione elementare (*Makarov, Scigelova; 2010*).

Perché ciò sia possibile lo strumento deve essere scrupolosamente calibrato: la calibrazione esterna è effettuata al massimo ogni 48 ore mediante l'infusione diretta di una miscela di composti noti (caffeina, tetrapeptide MRFA e Ultramark 1621), in un range di massa da 50 a 2000 m/z e consente di ottenere un'accuratezza di massa di 5 ppm.

Una migliore accuratezza, fino a 2 ppm, si può ottenere utilizzando una calibrazione interna impiegando uno ione di riferimento a massa nota, derivante da una molecola (presente in miscele di solventi, o un eventuale interferente, contaminante o da specie introdotte volutamente) detta Lock mass, di cui si conosce con precisione analitica la massa esatta.

CAPITOLO V

MESSA A PUNTO E OTTIMIZZAZIONE DI UN METODO ANALITICO

1. Premessa

La creazione di un metodo strumentale HPLC/MS vede come primo *step* la messa a punto delle condizioni strumentali dello spettrometro di massa (relative alla parte dell'analizzatore); successivamente viene sviluppato il metodo cromatografico al fine di ottenere la migliore separazione fra gli analiti in esame, si esegue poi l'ottimizzazione delle condizioni strumentali relative alla sorgente ionica dello spettrometro di massa. Una volta messo a punto il metodo analitico strumentale questo è pronto per essere impiegato nella messa a punto e convalida della procedura pre-analitica. Alla fine di questo processo si procederà all'analisi dei campioni reali.

2. Sviluppo e ottimizzazione del metodo strumentale

2.1. Sviluppo del metodo per lo spettrometro di massa

Lo sviluppo di un metodo analitico per lo spettrometro di massa consiste inizialmente nell'infusione di una soluzione standard dell'analita in esame e la ricerca dei migliori valori di voltaggio (parametri strumentali) legati ai diversi componenti dell'ottica ionica dell'analizzatore dello spettrometro di massa; questo al fine di ottenere la maggior intensità del segnale. Questa procedura è effettuata automaticamente dallo strumento ed è chiamata: *tunaggio*. In seguito si procede alla valutazione di quale sia la polarità di ionizzazione (in positivo o in negativo) più adatta per l'analisi dei composti studiati, in base alla maggiore intensità del segnale ottenuto.

2.2. Sviluppo del metodo cromatografico

Lo sviluppo del metodo cromatografico consiste nella scelta della colonna cromatografica (in base dell'interazione tra gli analiti da separare e la fase stazionaria) e della fase mobile. L'eluizione si può condurre sia isocraticamente che in gradiente al fine di ottenere la migliore separazione fra i costituenti analizzati. In generale, nel metodo finale sono impiegate le condizioni che portano alla maggior risoluzione ed efficienza; questi parametri indicano la separazione del picco e l'ampiezza dello stesso rispettivamente: picchi ben separati, stretti ed intensità elevata rappresentano la condizione ideale.

2.3. Ottimizzazione della sorgente di ionizzazione ESI

Una volta ottenuta la migliore separazione cromatografica occorre ottimizzare i parametri strumentali relativi alla sorgente ESI nelle condizioni di eluizione degli analiti studiati.

3. Validazione

La validazione del metodo è un procedimento indispensabile per verificare che il metodo strumentale creato per gli analiti sia adatto allo scopo richiesto.

I parametri che vengono considerati nella validazione sono:

- **Linearità della risposta:** è definita dal coefficiente di correlazione R^2 della retta di calibrazione; per essere soddisfacente il coefficiente deve superare il 99%. Si può quindi esprimere come la capacità del metodo di fornire risposte direttamente proporzionali alla concentrazione di analita.
- **Limite di rilevabilità (LOD):** si definisce come la minor concentrazione alla quale si può ottenere una risposta strumentale significativamente superiore al segnale generato dal bianco, quindi la minor concentrazione di analita rilevabile dallo strumento:

$$\text{LOD} = S_B + 3\sigma_B \quad (4)$$

dove S_B è il segnale medio di n misure replicate dal bianco e σ_B è la deviazione standard di tali misure.

- **Limite di quantificazione (LOQ):** definita come la minor concentrazione di analita quantificabile nelle condizioni sperimentali del metodo che genera una risposta sufficientemente accurata e precisa:

$$\text{LOQ} = S_B + 10\sigma_B \quad (5)$$

- **Accuratezza:** accordo tra valore vero e sperimentale; è una misura della capacità del metodo di fornire valori della concentrazione di analita il più possibile vicini a quelli reali. Viene misurata come errore relativo percentuale:

$$E\% = \frac{x - \mu}{\mu} 100 \quad (6)$$

- **Precisione:** esprime la concordanza tra risultati di prove indipendenti; si valuta attraverso due parametri:

RIPETIBILITA': accordo dei dati ottenuti dallo stesso operatore e nello stesso laboratorio operando sotto le stesse condizioni sperimentali; viene espressa come coefficiente di variazione percentuale tra i dati medi (\bar{x}) e la loro deviazione standard.

$$CV\% = \frac{\sigma}{\bar{x}} 100 \quad (7)$$

RIPRODUCIBILITA': accordo tra dati ottenuti applicando le stesse procedure analitiche, ma operando con operatori diversi e in laboratori diversi.

- **Recupero:** quantità di analita che può essere determinata rispetto alla quantità totale effettiva presente nel campione; il recupero, o resa, è calcolato come percentuale del rapporto tra il valore sperimentale osservato (x) e il valore vero (μ):

$$R\% = \frac{x}{\mu} 100 \quad (8)$$

4. Quantificazione

La procedura finale affinché un metodo analitico sia considerato valido per l'analisi dei campioni consiste nella quantificazione che in questo studio è stata condotta con il metodo dello standard interno. Il procedimento consiste nell'aggiungere ai campioni una quantità nota di una molecola che può essere lo stesso composto

oggetto di studio nella sua forma marcata isotopicamente oppure una sostanza diversa ma con caratteristiche cromatografiche, spettroscopiche e proprietà chimico-fisiche simili. Questo modo di operare permette di considerare, e quindi correggere, eventuali imprecisioni ed errori sia dovuti allo strumento, sia alla fase di preparazione degli standard che nel corso della preparazione dei campioni. Per la quantificazione si sfrutta la relazione tra il segnale strumentale di nativo e standard interno (m) e la loro concentrazione:

$$A_n : C_n = A_m : C_m \quad (9)$$

Dove:

A_n = area del picco cromatografico dell'analita

C_n = concentrazione dell'analita

A_m = area del picco cromatografico dello standard interno

C_m = concentrazione dello standard interno

Successivamente è calcolato il fattore di risposta strumentale (FR) ottenuto dall'analisi di una soluzione standard contenente sia il composto nativo che il marcato; dai valori sperimentali relative alle aree e le concentrazioni impiegate si può calcolare il FR:

$$FR = \frac{A_n C_m}{A_m C_n} \quad (10)$$

Conoscendo il fattore di risposta si può ora quantificare la concentrazione di analita nei campioni:

$$C_n = \frac{A_n C_m}{A_m FR} \quad (11)$$

CAPITOLO VI

CAMPIONAMENTO

1. Il sito di campionamento

L'area di studio presa in esame in questo lavoro di tesi comprende la zona urbana di Belgrado, la capitale della Repubblica di Serbia (coordinate geografiche 44°49'14" N; 20°27'44" E). Il clima proprio della zona rispecchia le caratteristiche di un clima continentale temperato con inverni piuttosto freddi ed estati calde. Il vento prevalente ha direzione nord o nord-ovest, ma una peculiarità della città di Belgrado è la presenza di un vento chiamato *Košava*, che è caratterizzato da raffiche molto fredde provenienti da sud o sud-est, dai monti Carpazi, e discende verso la regione di Belgrado.

Fortunatamente il *Košava* proviene da zone a basso grado di antropizzazione portando ad un miglioramento della dispersione orizzontale e diluendo la quantità degli inquinanti in atmosfera a livello del suolo della città di Belgrado (ANIČIĆ, et al. 2009).

La zona urbana di Belgrado copre circa un'area di 360 km²; in figura 19 è illustrata una veduta aerea della città di Belgrado e riportato il punto esatto di campionamento.



Figura 20: vista dall'alto della zona di campionamento a Belgrado

La legislazione in materia ambientale della Serbia non è all'avanguardia: solo nel 2004 è stato introdotto un quadro giuridico atto alla protezione dell'ambiente attraverso la stesura di quattro leggi: *legge sulla protezione dell'ambiente*, *legge sulla valutazione ambientale strategica*, *legge sulla valutazione di impatto ambientale* e *legge sulla prevenzione e il controllo integrato dell'inquinamento* (Gazzetta Ufficiale della Repubblica di Serbia, n. 135/2004). Queste nuove leggi sono in armonia con le Direttive UE in materia di impatto ambientale (85/337/CEE), valutazione ambientale strategica (2001/43/CE), IPPC (96/61/CE) e le norme per quanto riguarda la partecipazione del pubblico (2003/35/CE).

Per quanto concerne le sorgenti di immissione di inquinanti in atmosfera si deve considerare che nella parte meridionale della città è situato un grande complesso industriale, tra cui un impianto petrolchimico, uno stabilimento di fertilizzanti e una raffineria di petrolio. Questa zona industriale è stata duramente colpita dai bombardamenti NATO nell'aprile 1999 causando il rilascio nell'ambiente di numerose sostanze altamente tossiche.

In quest'area si riscontra quindi una situazione di inquinamento ambientale critica sia a livello ecologico che per la salute umana.

2. Il campionatore

Parte di una metodologia analitica e rappresentata anche dalla fase di raccolta del campione. Il campionamento è stato effettuato mediante un campionatore ad alto volume TE 5000, Tisch Environmental Inc. il cui schema è riportato in Figura 20:

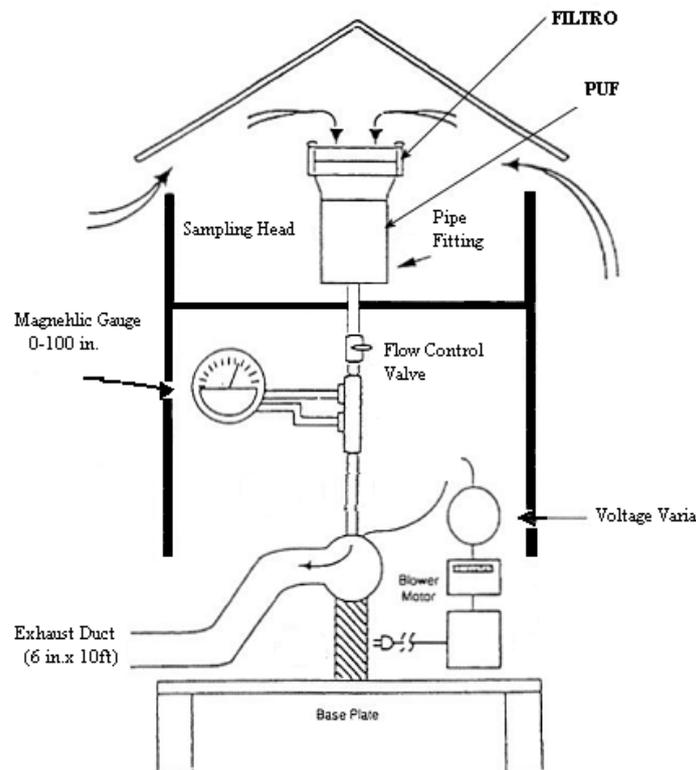


Figura 21: schema del campionatore ad alto volume

Questo sistema viene utilizzato per il campionamento simultaneo di particolato solido sospeso e di microinquinamenti organici in fase vapore.

Il campionatore ha una struttura esterna in alluminio anodizzato anticorrosivo®, resistente alle diverse condizioni meteorologiche e alla corrosione, caratterizzato da un basso grado di contaminazione del campione. La parte superiore è coperta per garantire la protezione dalle precipitazioni ed il passaggio dell'aria avviene attraverso delle aperture laterali. Il campionatore è composto da due comparti: la parte superiore comprende il contenitore per la raccolta dei campioni, il sampling head, il quale è collegato, attraverso il tubo di aspirazione, alla parte inferiore dove si trovano il flussimetro, il manometro (magnehelic gauge), il sistema di pompaggio e un temporizzatore. Il sampling head a sua volta comprende due dispositivi per il campionamento dei microinquinanti: il filtro in fibra di quarzo nella parte superiore e il bicchiere in vetro contenente il PUF (polyurethane foam) nella parte sottostante. Il campionamento avviene per aspirazione dell'aria ad opera di una pompa, posta a valle del sampling head e progettata in modo da minimizzare le possibili fonti di contaminazione per il campione raccolto.

3. Calibrazione del campionatore

La calibrazione del campionatore viene eseguita all'inizio e al termine del periodo di campionamento per poter avere una misura accurata del flusso di aspirazione della pompa il quale servirà poi nel calcolo dei m³ di aria campionata. Il calibratore registra la differenza tra la pressione atmosferica e quella esercitata dalla pompa di aspirazione in corrispondenza della testa del filtro (*De Pieri S.,2002*).

Viene poi costruita una retta di calibrazione che mette in relazione la forza di aspirazione con le variazioni di pressione.

La curva di calibrazione è considerata soddisfacente quando il coefficiente di correlazione lineare R² è superiore a 0.990.

CAPITOLO VII

MATERIALI, SOLVENTI E STRUMENTI UTILIZZATI

1. Materiali standard di riferimento

Le tabelle sottostanti sono un elenco di tutti i composti utilizzati in questo studio in cui vengono riportati n°CAS, purezza e fornitore.

METOSSIFENOLI

COMPOSTO	n° CAS	PUREZZA	FORNITORE
NATIVI			
Ac.Siringico	530-57-4	≥ 95%	Sigma-Aldrich®
Ac.Isovanillico	645-08-9	97%	Sigma-Aldrich®
Siringaldeide	134-96-3	≥ 97%	Fluka®
Ac.Omovanillico	306-08-1	≥ 98%	SigmaAldrich®
Ac.Ferulico	537-98-4	≥ 99%	Fluka®
Vanillina	121-33-5	99%	Sigma-Aldrich®
Ac.p-cumarico	501-98-4	≥ 98%	Sigma-Aldrich®
Coniferaldeide	458-36-6	98%	SigmaAldrich®
Ac.Sinapico	530-59-6	≥ 98%	Sigma-Aldrich®
Ac.Vanillico	121-34-6	≥ 97%	Fluka®
MARCATI			
Vanillina ¹³ C ₆	121-33-5	99%	Sigma-Aldrich®
Ac. Vanillico ¹³ C	121-34-6	99%	Sigma-Aldrich®

Tabella 5: nome, numero CAS, purezza e casa fornitrice dei composti standard di metossifenoli

ACIDI GRASSI

COMPOSTO	n° CAS	PUREZZA	FORNITORE
NATIVI			
C6	R-420060	98%	Sigma-Aldrich®
C7	R-420070	98%	Sigma-Aldrich®
C8	R-420080	98%	Sigma-Aldrich®
C9	R-420090	98%	Sigma-Aldrich®
C10	R-420100	98%	Sigma-Aldrich®
C11	R-420110	98%	Sigma-Aldrich®
C12	R-420120	98%	Sigma-Aldrich®
C13	R-420130	98%	Sigma-Aldrich®
C14	R-420140	98%	Sigma-Aldrich®
C15	R-420150	98%	Sigma-Aldrich®
C16	R-420160	98%	Sigma-Aldrich®
C17	R-420170	98%	Sigma-Aldrich®
C18	R-420180	98%	Sigma-Aldrich®
C19	R-420190	98%	Sigma-Aldrich®
C20	R-420200	98%	Sigma-Aldrich®
C21	R-420210	98%	Sigma-Aldrich®
C22	R-420220	98%	Sigma-Aldrich®
C23	R-420230	98%	Sigma-Aldrich®
C24	R-420240	98%	Sigma-Aldrich®
Ac. Palmitoleico	R-303945	98%	Sigma-Aldrich®

Ac.Oleico	R-420550	98%	Sigma-Aldrich®
Ac.Linoleico	R-420570	98%	Sigma-Aldrich®
Ac.Linolenico	R-420590	98%	Sigma-Aldrich®
Ac.Nervonico	R-476190	98%	Sigma-Aldrich®
Ac.Docosahaexanoico	R-303930	98%	Sigma-Aldrich®
Ac.Elaidico	R-476185	98%	Sigma-Aldrich®
Ac.Petroselinico	R-476195	98%	Sigma-Aldrich®
Ac.Erucico	R-420680	98%	Sigma-Aldrich®
MARCATI			
Ac. Palmitoleico ¹³ C	*	98%	Sigma-Aldrich®
Ac. Ottanoico ¹³ C	85541-42-0	98%	Sigma-Aldrich®
Ac. Stearico ¹³ C	59669-18-8	98%	Sigma-Aldrich®

Tabella 6: nome, numero CAS, purezza e casa fornitrice dei composti standard degli acidi grassi. *l'acido Palmitoleico non presenta n° CAS in quanto lo standard è stato prodotto su richiesta.

2. Solventi e reagenti

- Acido Formico (CH₂O₂) (98%) (Fluka, Sigma Aldrich®, Buchs, Switzerland).
- Acqua Ultrapura (18,2 MΩ cm, 0,01 TOC).
- Ammoniaca (Romil LTD, Cambridge, UK).
- Detergente per vetreria Contrad® 2000 conc. (VWR International s.r.l. Milano, Italia).
- Isopropanolo (Romil LTD, Cambridge, UK).
- Metanolo *Ultragradient* (Romil LTD, Cambridge, UK).

3. Attrezzatura di laboratorio e materiali

- Beute da 50 ml (Vetrotecnica, Padova, Italia).
- Filtri in fibra di quarzo (QFF), porosità 1 μm , diametro 10 cm, modello To-13 (SKC Inc., Eighty Four, Pennsylvania, USA).
- Filtri in PTFE, \varnothing 25 mm, 0,45 μm (National Scientific Company, Rockwood, Tennessee, USA).
- Micropipette da 10, 20, 100, 200, 1000, 5000 μL , con puntali sterili in polietilene (Eppendorf AG, Hamburg, Germania).
- Micropipette da 10, 20, 50, 100, 200 μL , con capillari in vetro, per trasferimento di solventi organici Transferpettor Brand (Rudolf Brand GMBH + CO, Wertheim - Glashütte, Germania).
- Siringhe in vetro da 10 mL Fortuna[®] Optima[®] (Poulten & Graf GmbH, Wertheim, Germania).
- Vial in vetro da 2 mL, per autocampionatore (Agilent, Waldbronn, Germania).
- Vial ambrate in vetro da 2, 4, 7 da stoccaggio (Supelco, Bellefonte, USA)

4. Strumentazione

- Bagno a ultrasuoni (Ultrasonic FALC)
- Bilancia analitica a 5 cifre KERN ALT 220-4NM (KERN & Sohn GmbH, Belling, Germania).

- Impianto di depurazione dell'acqua Purelab: Option-R pure water system accoppiato a Purelab Ultra Analytic ultra pure water system (Elga Lab Water, High Wycombe, UK).
- UHPLC (Ultra High Performance Liquid Chromatography) UltiMate 3000 (Dionex Softron GmbH, Part of Thermo Fisher Scientific Inc., Germering, Germany)
- LTQ Orbitrap XL (Thermo Scientific, USA Watham, Massachusetts).

5. Colonne cromatografiche

- XBridge Shield RP18 2.1x100mm 3.5 μm (Waters Corporation, Milford, Massachusetts)
- Poroshell 120 SB-C18 2.1x150mm 2.7 μm (Agilent Technologies, PaloAlto, USA)
- Kinetex C18 75x2.10mm 2.6 μm (Phenomenex, Torrance, USA)
- Eclipse 2.1x150mm 3.5 μm (Agilent Technologies, USA)
- Extend C18 4.6x150mm 3.5 μm (Agilent Technologies, USA)
- Filtro in acciaio HPLC column In-line filter, S.S 0.5 μm Porosity x 1.5mm (Phenomenex, Torrance, USA)

CAPITOLO VIII

METODOLOGIE ANALITICHE

1. Preparazione degli standard dei metossifenoli

Gli standard di composti nativi e marcati appartenenti alla classe dei metossifenoli sono stati preparati sciogliendo circa 10 mg di composto solido in 10 ml di metanolo; le soluzioni ottenute sono state impiegate per la preparazione di due miscele: una per gli analiti nativi ed una per i composti marcati (vanillina e acido vanillico) usati come standard interni.

Nella tabella sottostante sono riportate le pesate e le concentrazioni di ogni composto nella soluzione standard madre, nello standard utilizzato per la sviluppo del metodo strumentale, per la preparazione della soluzione per il calcolo del fattore di risposta impiegato nella convalida del metodo e nella quantificazione dei campioni.

COMPOSTO	PESO (mg)	SOLUZIONE MADRE ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	SOLUZIONE STANDARD ($\text{ng}/\mu\text{l}$)	FATTORE DI RISPOSTA ($\text{ng}/\mu\text{l}$)
Ac.Siringico	11.6	1.16	1.16	0.04
Ac.Isovanillico	10.2	1.02	1.02	0.01
Siringaldeide	11.7	1.17	1.17	0.04
Ac.Omovanillico	11.1	1.11	1.11	0.04
Ac.Ferulico	10,1	1.01	1.01	0.01
Vanillina	10.1	1.01	1.01	0.04
Ac.p-cumarico	11.7	1.17	1.17	0.04
Coniferaldeide	10.6	1.06	1.06	0.01

Ac. Vanillico	10	1.00	1.00	0.07
Vanillina ¹³ C ₆	10.3	1.03	1.03	0.01
Ac. Vanillico ¹³ C	10.1	1.01	1.01	-

Tabella 7: valori delle concentrazioni delle soluzione madri dei vari metossifenoli, delle soluzioni standard e del fattore di risposta (l'acido vanillico marcato non compare in quanto la validazione è stata fatta solo con vanillina marcata).

2. Condizioni strumentali per la determinazione dei metossifenoli

La strumentazione HPIC/MS è quella descritta in §3.1. La sorgente di ionizzazione è stata impiegata in modalità negativa; si ha la formazione degli ioni $[M-H]^-$ i valori di m/z registrati sono riportati in tabella 8. L'acquisizione dei dati è avvenuta in full scan, nel range di massa 100-300 m/z , utilizzando come analizzatore la trappola orbitalica a risoluzione di 60000.

E' stata impiegata la lock mass a m/z 283.2642 relativa allo ione $[M-H]^-$ dell'acido stearico.

Nome	Formula chimica	Massa esatta mono isotopica	$[M-H]^-$
Ac. <i>p</i> -cumarico	C ₉ H ₁₀ O ₄	164.0468	163.0401
Siringaldeide	C ₉ H ₁₀ O ₅	182.0579	181.0506
Ac.Siringico	C ₉ H ₈ O ₃	198.0528	197.0455
Ac. Vanillico	C ₈ H ₈ O ₄	168.0423	167.0350

Ac.Isovanillico	C ₈ H ₈ O ₄	168.0423	167.0350
Ac.Omovanillico	C ₉ H ₁₀ O ₄	182.0579	181.0506
Vanillina	C ₈ H ₈ O ₃	152.0473	151.0401
Ac.Ferulico	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	194.0579	193.0506
Coniferilaldeide	C ₁₀ H ₁₀ O ₃	178.0630	177.0557
Vanillina ¹³ C ₆	C ₈ H ₈ O ₃	158.0890	157.0810
Ac. Vanillico ¹³ C	C ₈ H ₈ O ₄	169.0660	1979860

Tabella 8: nome, formula chimica, massa esatta monoisotopica e massa dello ione [M-H]- dei metossifenoli.

Il tunaggio è stato condotto, per infusione diretta utilizzando la pompa a siringa integrata nell'hardware dello spettrometro di massa ad flusso di 10 $\mu\text{L min}^{-1}$. Le soluzioni standard per gli analiti studiati sono riportate in tabella 7. Il tunaggio è stato effettuato per tutti i composti, per ciascuno sono state valutate le condizioni migliori al fine di ottenere la massima sensibilità, in seguito si è scelto un tunaggio che potesse essere impiegato per tutti gli analiti. Dal confronto si è deciso di applicare il quello dell'acido vanillico, con una finestra di tunaggio per l'analisi dell'acido *p*-cumarico.

La separazione cromatografica è condotta con una colonna Poroshell 120 SB-C18 (2.1x150mm 2.7 μm), cui viene applicato un filtro in linea in acciaio. Le fasi mobili impiegate sono A: Acqua+Ac.Formico 0.001%, B: MeOH/ACN 80%:20%.

In tabella 11 è riportata la descrizione della corsa cromatografica. Il flusso dell'eluente è 200 $\mu\text{L min}^{-1}$. Il volume d'iniezione del campione è 15 μL .

Minuti	$\mu\text{L}/\text{min}$	%B
0	200	15

0	200	15
2	200	15
3	200	30
12	200	45
14	200	100
22	200	100
24	200	15
29	200	15

Tabella 9: corsa cromatografica per la determinazione dei metossifenoli.

Una volta definite le condizioni cromatografiche sono stati individuati i parametri ottimali per la sorgente di ionizzazione, le condizioni utilizzate per l'acquisizione dei dati sono quelle riportate nella tabella 10.

	Tunaggio Acido Vanillico	Tunaggio Acido p-cumarico
T° sorgente	200°C	200°C
Polarità	Negativa	Negativa
Sheat Gas	30	39
Sweep Gas flow rate	0	0
Auxilry Gas flow rate	10	5
Spray voltage (KV)	3.5	3.5
Capillary voltage (V)	-9	-19

T° capillary	275°C	275°C
Tube lens (V)	-47.97	-47.97

Tabella 10: valori dei diversi parametri individuati per l'ottimizzazione della sorgente ESI per i metossifenoli.

Per la quantificazione è stato utilizzato il metodo dello standard interno, per confronto del picco degli analiti studiati con quello della vanillina marcata utilizzata come standard interno. I risultati sono stati poi corretti mediante il fattore di risposta strumentale valutato analizzando una soluzione in acqua ultrapura contenente sia i composti nativi che la vanillina marcata alle concentrazioni riportate in tab. 7.

3. Preparazione degli standard degli acidi grassi

Gli standard nativi e marcati degli acidi grassi sono stati preparati sciogliendo circa 2 mg di composto solido o liquido in 2 ml di isopropanolo, fatta eccezione per il C24 che ha richiesto isopropanolo e cloroformio in rapporto 70/30 (gli standard C6 e C8 sono stati sciolti in 5ml, mentre gli acidi Erucico, Nervonico e Petrosenilico in 1 ml) ; le soluzioni ottenute sono state poi diluite e successivamente sono state preparate due miscele in acqua: una con i composti nativi ed una dei composti marcati impiegati come standard interno. Nella tabella sottostante sono riportate le pesate e le concentrazioni di ogni composto nella soluzione standard madre, nello standard utilizzato per lo sviluppo del metodo strumentale, per la preparazione della soluzione per il calcolo del fattore di risposta impiegato nella convalida del metodo e nella quantificazione dei campioni.

COMPOSTO	PESO (mg)	SOLUZIONE MADRE (µg/µl)	SOLUZIONE STANDARD (ng/µl)	FATTORE DI RISPOSTA (pg/µl)
C6	42	4.2	4.2	8
C7	28	2.8	2.8	14
C8	56	5.6	5.6	11.20
C9	18	1.8	1.8	9
C10	23	2.3	2.3	11.50
C11	25	2.5	2.5	12.50
C12	18	1.8	1.8	9
C13	23	2.3	2.3	11.50
C14	19	1.9	1.9	9.50
C15	25	2.5	2.5	12.50
C16	18	1.8	1.8	9
C17	22	2.2	2.2	11
C18	18	1.8	1.8	9
C19	18	1.8	1.8	9
C20	23	2.3	2.3	11.50
C21	22	2.2	2.2	11
C22	17	1.7	1.7	8.50

C23	23	2.3	2.3	11.50
C24	23	2.3	2.3	11.50
Ac. Elaidico	20	2.0	2.0	10
Ac.Oleico	21	2.1	2.1	10.50
Ac.Petroselinico	10	1.0	1.0	10
Ac.Nervonico	14	1.4	1.4	14
Ac.Docosaesanoico	21	2.1	2.1	10.50
Ac.Palmitoleico	21	2.1	2.1	10.50
Ac.Arachidonico	18	1.8	1.8	9
Ac.Linolenico	18	1.8	1.8	9
Ac.Linoleico	22	2.2	2.2	11
Ac.Erucico	9	0.9	0.9	9
Ac.Palmitoleico ¹³ C ₁₆	22	2.2	2.2	11
Ac.Ottanoico ¹³ C ₈	23	2.3	2.3	11.50
Ac.Stearico ¹³ C ₁₈	22	2.2	2.2	11

Tabella 11: valori delle concentrazioni delle soluzione madri dei vari acidi grassi, delle soluzioni standard e del fattore di risposta.

4. Condizioni strumentali per la determinazione degli acidi grassi.

Nome	Formula chimica	Massa esatta mono isotopica	[M-H] ⁻
C6	C ₆ H ₁₂ O ₂	116.0837	115.0765
C7	C ₇ H ₁₄ O ₂	130.0994	129.0921
C8	C ₈ H ₁₆ O ₂	144.1150	143.1078
C9	C ₉ H ₁₈ O ₂	158.1307	157.1234
C10	C ₁₀ H ₂₀ O ₂	172.1463	171.1391
C11	C ₁₁ H ₂₂ O ₂	186.1620	185.1547
C12	C ₁₂ H ₂₄ O ₂	200.1776	199.1704
C13	C ₁₃ H ₂₆ O ₂	214.1933	213.1860
C14	C ₁₄ H ₂₈ O ₂	228.2089	227.2017
C15	C ₁₅ H ₃₀ O ₂	242.2246	241.2173
C16	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	256.2402	255.2330
C17	C ₁₇ H ₃₄ O ₂	270.2559	269.2486
C18	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	284.2715	283.2643
C19	C ₁₉ H ₃₈ O ₂	298.2872	297.2799
C20	C ₂₀ H ₄₀ O ₂	312.3028	311.2956
C21	C ₂₁ H ₄₂ O ₂	326.3185	325.3112
C22	C ₂₂ H ₄₄ O ₂	340.3344	339.3269

C23	C ₂₃ H ₄₆ O ₂	354.3498	353.3425
C24	C ₂₄ H ₄₈ O ₂	368.3654	367.3582
Ac. Elaidico	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	282.2559	281.2486
Ac.Oleico	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	282.2559	281.2486
Ac.Petroselinico	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	282.2559	281.2486
Ac.Nervonico	C ₂₆ H ₄₆ O ₂	366.3498	365.3225
Ac.Arachidonico	C ₂₀ H ₃₂ O ₂	304.4660	303.4580
Ac.Docosaesanoico	C ₂₂ H ₃₂ O ₂	328.2402	327.2330
Ac.Palmitoleico	C ₁₆ H ₃₀ O ₂	254.2246	253.2173
Ac.Linolenico	C ₁₈ H ₃₀ O ₂	278.2246	277.2173
Ac.Linoleico	C ₁₈ H ₃₂ O ₂	280.2402	279.2330
Ac.Erucico	C ₂₂ H ₄₂ O ₂	388.3185	337.3112
Ac.Palmitoleico¹³C₁₆	C ₁₆ H ₃₀ O ₂	270.2780	269.2710
Ac.Ottanoico¹³C₈	C ₈ H ₁₆ O ₂	152.1480	151.1348
Ac.Stearico¹³C₁₈	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	302.3380	301.3246

Tabella 12: nome, formula chimica, massa esatta mono isotopica e massa dello ione [M-H]⁻ degli acidi grassi.

Similmente a quanto descritto precedentemente la sorgente di ionizzazione è stata impiegata in modalità negativa; è stata osservata la formazione degli ioni [M-H]⁻ i valori di m/z registrati sono riportati in tabella 12. L'acquisizione dei dati è avvenuta in full scan, nel range di massa 50-500 m/z , utilizzando come analizzatore la trappola orbitalica a risoluzione di 60000. E' stata impiegata la lock mass a m/z 265.1479 relativa uno ione [M-H]⁻ rilevato nel background dello strumento.

Per infusione diretta delle soluzioni standard riportate nella tab. 11 è stato effettuato il tuning per l'individuazione delle condizioni strumentali migliori che permettano di ottenere la migliore sensibilità per ogni analita studiato, verificando in seguito che il tuning che si prestava all'acquisizione di tutti gli analiti, individuando quello dell'acido oleico.

Per la separazione cromatografica è stata impiegata la colonna XBridge Shield C18 cui viene applicato un filtro in linea in acciaio. Le fasi mobili impiegate sono A: Acqua, B: MeOH con un'iniezione di ammoniaca post colonna alla concentrazione del 12.5% al flusso di $1.5 \mu\text{L min}^{-1}$. Il flusso dell'eluente è $200 \mu\text{L min}^{-1}$. Il volume d'iniezione del campione è $19 \mu\text{L}$.

In tabella 16 è riportata la descrizione della corsa cromatografica.

Minuti	$\mu\text{L}/\text{min}$	%B
0	200	15
0	200	15
2	200	15
3	200	80
18	200	100
20	200	15
30	200	15

Tabella 13: corsa cromatografica per il metodo degli acidi grassi.

Una volta definite le condizioni cromatografiche sono stati individuati i parametri ottimali per la sorgente di ionizzazione, le condizioni utilizzate per l'acquisizione dei dati sono quelle riportate nella tabella 14.

	Tunaggio Acido Oleico
T° sorgente	300°C
Sheat Gas	20
Sweep Gas flow rate	0
Auxilry Gas flow rate	15
Spray voltage (KV)	4
Capillary voltage (V)	-9
T° capillary	275°C
Tube lens (V)	-47.97

Tabella 14: valori dei diversi parametri individuati per l'ottimizzazione della sorgente ESI per gli acidi grassi.

5. Trattamento del campione

Le procedura pre-analitica consiste nella scelta della metodologia più adatta ed efficace per l'estrazione e la purificazione dei campioni, al fine di poter trasferire gli analiti in esame dalla matrice originaria ad una iniettabile in uno strumento analitico. La preparazione dei campioni è una delle fasi più delicate e importanti allo scopo di ottenere una quantificazione accurata e precisa degli composti presi in esame; è in questa fase infatti che il rischio di contaminazione dei campioni è più alto. Per limitare i problemi dovuti alla contaminazione è eseguita una attenta procedura di pulizia del materiale di laboratorio; nello specifico la vetreria prima dell'utilizzo è stata lasciata in un bagno ad acqua e sapone Contrad® per 24 ore, dopodiché sciacquata abbondantemente con acqua ultrapura. Per eliminare eventuali residui organici è stata inoltre sottoposta a due cicli da 14 minuti l'uno in bagno a ultrasuoni con acqua ultrapura.

Prima del campionamento i filtri vengono trattati in muffola per 4 ore a 400°C. Una volta effettuato il campionamento i filtri vengono conservati in cold room protetti dalla contaminazione da un triplo strato di fogli d'alluminio alla temperatura di circa -20°C al fine di evitare la degradazione microbica del campione.

In questo lavoro di tesi il particolato atmosferico è stato estratto in ultrasuoni e l'estratto così ottenuto è stato successivamente filtrato al fine di eliminarne il materiale particolato residuo e tracce del filtro impiegato come supporto di campionamento.

Poiché metossifenoli e acidi grassi sono composti ubiquitari, al fine di minimizzare la contaminazione ambientale la procedura di preparazione dei composti è stata condotta all'interno di una cappa a flusso laminare.

6. Procedura pre-analitica

Uno degli scopi di questo lavoro di tesi è la determinazione di un gran numero di analiti nello stesso campione applicando la stessa procedura pre-analitica in modo da accorciare i tempi di preparazione del campione e massimizzare le informazioni ottenibili. In particolare si è voluta adottare la procedura già esistente per l'estrazione del levoglucosan (*Bourcier L., 2010*) ed impiegarla per la determinazione sia dei metossifenoli che degli acidi grassi.

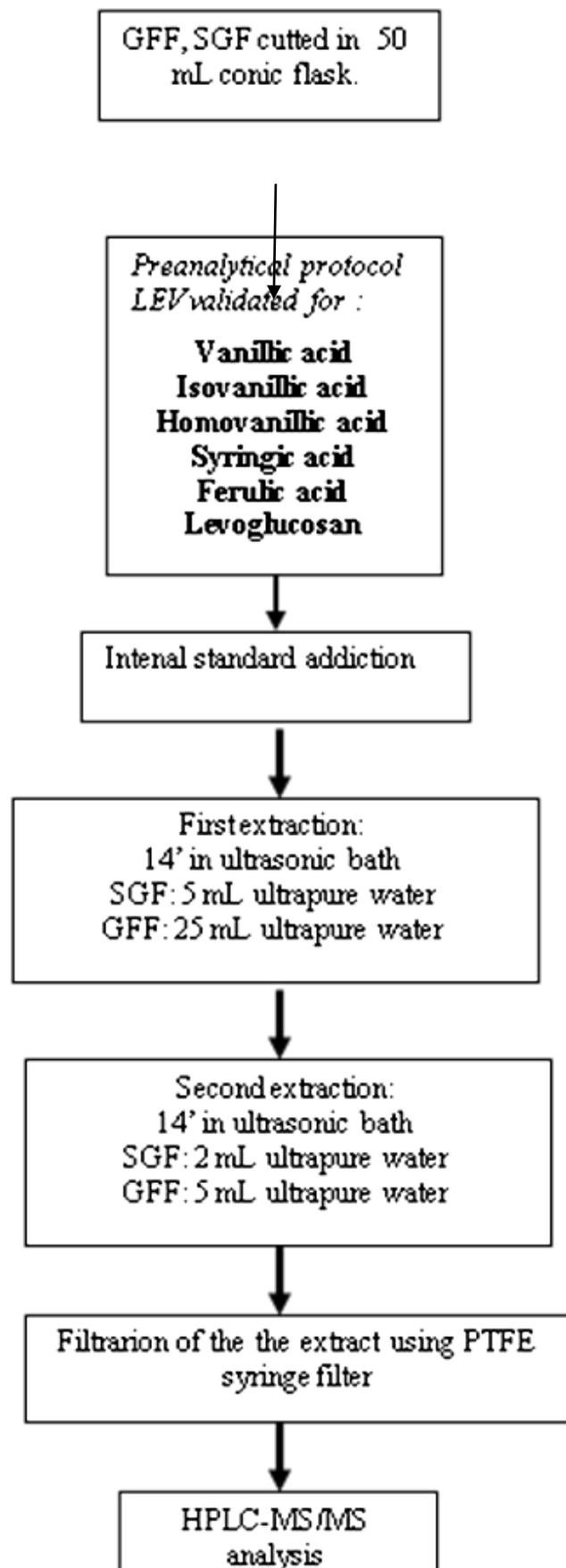


Figura 22: schema della procedura pre-analitica applicata per la determinazione di metossifenoli e acidi grassi (Boucier L.,2010).

Il metodo analitico messo a punto per l'analisi dei metossifenoli e acidi grassi deve essere validato andando a valutare la linearità della risposta strumentale attraverso la costruzione della retta di calibrazione, il calcolo del LOD e dell' LOQ, della resa (o recupero) e dell'accuratezza e andando a preparare i bianchi procedurali.

Il primo passo è stato il lavaggio della vetreria da utilizzare (vedi paragrafo 5); successivamente sono stati presi dei filtri in fibra di quarzo puliti che sono stati precedentemente posti in muffola a 400°C per 4 ore.

Per la procedura di estrazione del levoglucosan di ogni filtro ne sono stati tagliati 3/8 e spezzettati all'interno delle beute:

- 3 beute per i bianchi (B1-B2-B3);
- 3 beute per la valutazione dell'accuratezza (A1-A2-A3);
- 3 beute per la valutazione del recupero (R1-R2-R3).

Successivamente sono state fatte le aggiunte delle soluzioni standard dei campioni nativi e degli standard interni marcati; volumi aggiunti e procedura sono riportati in Tabella 15:

B1	Ai filtri spezzettati nelle beute sono stati aggiunti 70 µl di miscela di standard di acidi grassi e 70 µl di miscela di standard di metossifenoli.
B2	
B3	
A1	Ai filtri spezzettati nelle beute sono stati aggiunti 70 µl di miscela di standard nativi di acidi grassi e 70µl di miscela di standard nativi di metossifenoli insieme a 70 µl di miscela di standard marcati di acidi grassi e 70 µl di miscela di standard marcati di metossifenoli.
A2	
A3	
R1	Ai filtri spezzettati nelle beute sono stati aggiunti 70 µl di miscela di nativi di acidi grassi e 70 µl di miscela di nativi di metossifenoli e solo al termine della procedura pre-analitica sono stati aggiunti 70 µl di miscela di standard marcati di acidi grassi e 70 µl di miscela di standard marcati di metossifenoli.
R2	
R3	

Tabella 15: descrizione delle aggiunte delle miscele di composti nativi e marcati.

Dopo l'aggiunta delle soluzioni standard sono stati aggiunti 5 ml di acqua ultrapura. I campioni sono stati estratti in bagno a ultrasuoni per 14 minuti facendo attenzione che la temperatura dell'acqua non fosse troppo alta (a questo proposito si è aggiunto del ghiaccio nel bagno) per evitare la perdita per volatilizzazione dei metossifenoli.

Dopo l'estrazione le soluzioni sono state raccolte e si è proceduto con una seconda estrazione da 14 minuti, aggiungendo in ogni beuta 2 ml di acqua ultrapura; il secondo estratto è stato poi raccolto e unito al primo avendo cura di strizzare molto bene i filtri con una spatola per recuperare la maggior quantità di analita possibile.

Gli estratti sono poi stati filtrati con filtri PTFE da 0.45 μm , i quali sono stati attivati con 10 ml di metanolo, e divisi in due vial: una per l'analisi degli acidi grassi ed una per quella dei metossifenoli.

CAPITOLO IX

RISULTATI E DISCUSSIONE

1. Scelta delle impostazioni strumentali per la determinazione dei metossifenoli

I metossifenoli sono prodotti di combustione della legna, pertanto tradizionalmente la caratterizzazione del fumo di legna e del particolato atmosferico è stata condotta mediante la tecnica GC/MS (*Iinuma Y., 2007 - Oros, D. R., 2006 - Simpson, C. D., 2005 - He, J., 2010*). Questa tecnica però richiede spesso lunghe procedure preanalitiche che comportano la derivatizzazione degli analiti, con rischio di: perdita di analita, derivatizzazione incompleta e contaminazione. Un lavoro interessante è quello recentemente pubblicato (*Orasche J., 2011*) in cui si determinano alcuni metossifenoli, mediante la tecnica GC-TOFMS (IDTD-GC-TOFMS) si esegue un derivatizzazione in situ e volatilizzazione degli analiti per desorbimento termico.

Per quanto riguarda la cromatografia liquida accoppiata alla spettrometria di massa (LC/MS) per la determinazione di composti fenolici, in letteratura sono riportati numerosi esempi in campo farmaceutico (*Zheng X.H., 2007*), agricolo (*Tian S., 2005*) e nell'industria alimentare (*Tian S., 2005*); mentre in campo ambientale si riscontrano poche applicazioni: esempi sono quelli riportati in cui sono utilizzati l'HPLC/APCI-MS (*Oros, D. R., 2006*) e CE/ESI-MS (*Iinuma Y., 2003*) per determinare composti fenolici come biomarkers da combustione di biomassa nell'aerosol.

In questo lavoro di tesi è stato messo a punto un metodo analitico strumentale che impiega la cromatografia liquida accoppiata ad uno spettrometro di massa ad alta risoluzione, con sorgente di ionizzazione electrospray HPLC/ESI(-)/HRMS, al fine di determinare più marcatori di combustione impiegando una procedura pre-analitica utilizzata per l'analisi del levoglucosan (*Boucier L., 2010*).

Nella messa a punto del metodo analitico strumentale la prima fase ha riguardato la fase di tuning (cap 5, par 2.1), nel corso della quale la soluzione standard dell'analita studiato è stato infuso direttamente nella sorgente ionica, le

concentrazioni sono riportate nel cap. VIII tab 7). Mediante una procedura automatica sono stati scelti i valori di voltaggio migliori applicati ai componenti dell'ottica ionica (cap IV, par 3.3) (lenti elettrostatiche, quadrupoli, ottapoli) responsabili della focalizzazione e della trasmissione degli ioni.

Una volta trovato il tuning ottimale sia in polarità positiva che negativa per ciascun analita, è stato osservato che in polarità negativa l'efficienza di ionizzazione risultava molto più alta conducendo ad un segnale molto più intenso. Successivamente per ogni tuning ottenuto per un particolare composto è stata valutata la risposta per gli altri analiti in esame e ne è stato scelto uno che potesse essere adattato a tutti. Dal confronto si è osservato come i valori di tuning trovati per l'acido vanillico fossero adatti anche all'acquisizione degli altri analiti, tranne l'acido p-cumarico per il quale è stato necessario inserire una finestra di acquisizione che impiegasse esattamente il suo tuning. La separazione cromatografica ha previsto la scelta di una colonna che garantisse accanto ad una buona separazione per gli analiti, l'ottenimento di picchi più stretti e simmetrici.

Sono state valutate 3 colonne cromatografiche: Poroshell 120 SB-C18 2.1x150mm 2.7 μm , Eclipse 2.1x150mm 3.5 μm , Extend C18 4.6x150mm 3.5 μm , tutte fornite da Agilent Technologies.

Fra queste la colonna Extend C18 è stata scartata perché caratterizzata da scarsa efficienza e in quanto avendo un diametro interno maggiore rispetto alle altre, richiedeva un flusso maggiore (500 $\mu\text{L min}^{-1}$), portando ad una maggior diluizione dell'analita con conseguente diminuzione della sensibilità.

È stata scelta la colonna Poroshell 120 SB-C18 con diametro particellare di 2.7 μm , caratterizzata da una tecnologia core shell che rende le sue caratteristiche cromatografiche simili a quelle ottenibili dalle fasi stazionarie con diametro particellare di 1.8 μm , utilizzato in UHPLC senza risentire dei gravi effetti che un impiccamento così sottile provoca alla contropressione in colonna, garantendo

maggior risoluzione cromatografica ed efficienza, in confronto con la colonna Eclipse 2.1x150mm 3.5 μm .

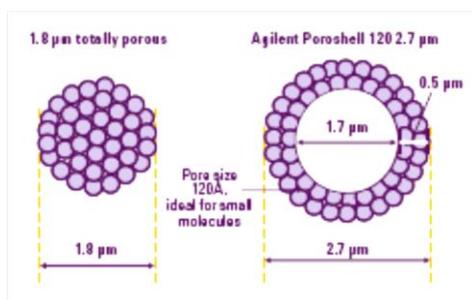


Figura 23: Illustrazione relativa alla diversa tecnologia costruttiva fra le particelle totalmente porose e le particelle core shell. (Agilent Poroshell 120 Columns for HPLC and UHPLC, The measure of confidence "Perform rugged, fast LC with confidence" Agilent Technologies).

Un inconveniente osservato nel corso dello sviluppo del metodo è stato lo sdoppiamento dei picchi cromatografici relativi all'acido vanillico dovuto all'acidità di questo analita, problema che è stato risolto aggiungendo nella fase acquosa una piccola percentuale di acido formico (0.001%), che ha permesso la sua neutralizzazione. Nonostante la ionizzazione degli analiti avvenga in polarità negativa la presenza di questa piccola quantità di acido non ha minimamente inficiato la resa di ionizzazione, non riducendo quindi la sensibilità del metodo.

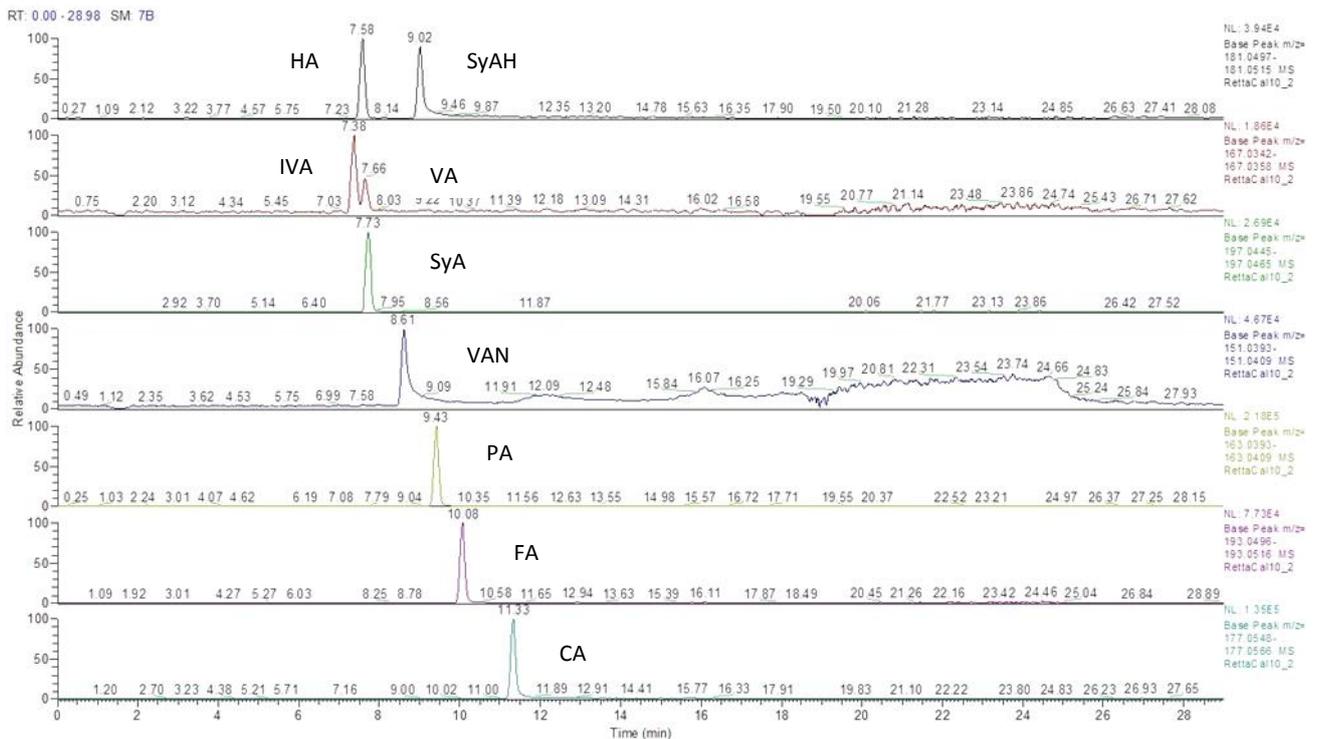


Figura 24: cromatogrammi relativi ai metosifenoli presi in analisi.

2. Validazione del metodo per i metosifenoli

La quantificazione dei campioni è stata effettuata impiegando il metodo dello standard interno, utilizzando come standard la vanillina marcata, confrontando l'area del picco del composto nativo con l'area dello standard interno. Il risultato è stato corretto per ogni composto utilizzando il fattore di risposta strumentale valutato per ogni analita preparando una soluzione standard contenente sia gli standard nativi che lo standard usato come standard interno. La concentrazione degli standard è riportato in tabella 7 cap. VIII. Il metodo analitico messo a punto per la determinazione dei metosifenoli è stato convalidato valutando la linearità della risposta strumentale attraverso la costruzione della retta di calibrazione, la preparazione dei bianchi procedurali, il calcolo del LOD, del LOQ, della resa, la precisione (ripetibilità) e dell'accuratezza della procedura analitica.

Le rette di taratura per ogni analita sono state ottenute iniettando soluzioni contenenti sia i composti nativi alle concentrazioni di 0,1 pg/μL, 0,5 pg/μL, 1 pg/μL, 2 pg/μL, 5 pg/μL, 10 pg/μL, 50 pg/μL, 75 pg/μL, 100 pg/μL, sia gli standard interni acido vanillico e vanillina alla concentrazione costante di 10 pg/μL.

Sono state costruite le rette riportando il rapporto tra la concentrazione del composto nativo (C_n) e quella dello standard interno (C_m) in ascissa, e con il rapporto tra l'area del composto nativo (A_n) e quella del composto marcato isotopicamente (A_m) in ordinata. In figura 25 è riportata come esempio la retta di calibrazione per l'acido siringtonico.

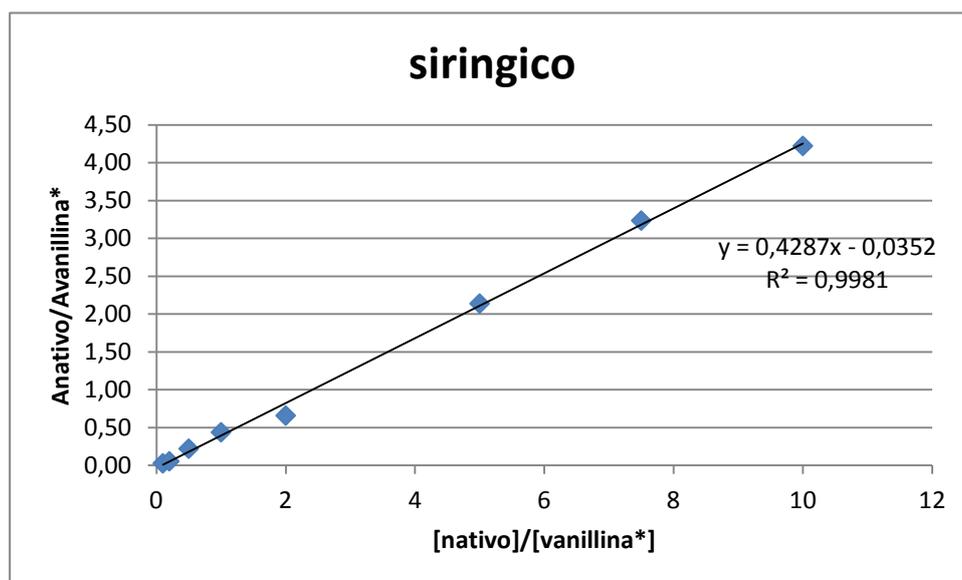


Figura 25: esempio di retta di calibrazione dell'acido siringtonico.

In tabella si riportano i valori di pendenza, intercetta e coefficiente di correlazione per tutti i composti:

Composti	Pendenza	Intercetta	R ²
Ac.Vanillico	0.2734	0.0031	0.9951
Ac. Isovanillico	0.1282	0.0052	0.9978
Ac. Omovanillico	0.6731	0.0288	0.9971
Coniferilaldeide	2.6338	0.1099	0.9961
Ac.p-Cumarico	3.3786	0.5240	0.9945
Siringaldeide	0.5919	0.0341	0.9975
Vanillina	0.8546	0.0260	0.9983
Ac.Ferulico	1.1292	0.0357	0.9974
Ac.Sinapico	0.5855	0.1136	0.9963
Ac.Siringico	0.4287	0.0352	0.9981

Figura 26: valori di intercetta, pendenza e coefficiente di correlazione.

Poiché non è disponibile commercialmente un materiale certificato per la convalida del metodo sono stati aggiunti degli spike delle soluzioni a concentrazione nota degli analiti in esame (concentrazioni riportate in tabella 7 secondo la procedura descritta nel paragrafo 6 Cap. VIII) al filtro in fibra di quarzo pulito.

Per la valutazione dell'accuratezza del metodo, sono stati aggiunti come spike 70 µl di soluzione standard di metossifenoli e 70µl di soluzione di metossifenoli marcati all'inizio della procedura di preparazione del campione mentre per la valutazione della resa della procedura gli standard nativi sono stati aggiunti all'inizio della procedura mentre quelli marcati alla fine.

E' stato valutato inoltre il valore di bianco procedurale, analizzando i filtri puliti con la stessa procedura impiegata per i campioni. In tabella 14 si riportano le cifre di

merito stimate per valori di bianco procedurale, resa (n=3), precisione (n=3) e accuratezza (n=3) dei metossifenoli:

Composto	Bianco procedurale (ng assoluti)	CV% bianco	Resa (%)	CV% (Resa)	Errore (%)
Ac.Vanillico	3.29	12.71	68.14	7.17	-0.23
Ac. Isovanillico	9.83	2.82	86.56	11.48	-2.33
Ac. Omovanillico	0.87	17.50	78.64	9.23	7.41
Coniferaldeide	0.87	7.87	77.71	5.14	6.61
Ac.p-Cumarico	0.47	8.82	70.80	8.67	1.46
Siringaldeide	2.33	13.45	71.61	3.52	2.59
Vanillina	6.00	13.14	76.54	10.52	8.12
Ac.Ferulico	0.23	30.46	79.35	8.66	8.85
Ac.Siringico	0.19	15.23	75.70	9.63	10.68

Figura 27: valori di bianco procedurale, resa e accuratezza dei metossifenoli.

Dalla tabella si può notare come la resa di processo sia buona, compresa fra il 68% e l'87%, in genere la riproducibilità presenti un coefficiente di variazione inferiore al 10% e che l'errore percentuale è per tutti inferiore al 10%. Questi risultati sono simili a quelli riportati in letteratura dove si riportano mediane di rese di estrazione del 74% (65%-100%) (*Simpson C.D., 2005*), medie dell'80% (*Parchintsev J., 2010*), e fra il 70 e il 104% (*Hoffmann D., 2007*)

Il limite di rivelabilità e il limite di quantificazione della metodica sono stati calcolati in base ai bianchi di campo (n=5) con le seguenti formule:

$$\text{MDL} = 3 \cdot \text{STD}_b$$

$$\text{MQL} = 10 \cdot \text{STD}_b$$

dove STD_b è la deviazione standard del bianco di campo.

In tabella è riportato inoltre la stima del limite di rivelabilità come rapporto segnale rumore calcolato per una quantità nota di analita iniettato (pg assoluti).

Composto	Bianco di campo (ng assoluti)	STD _b (ng ass)	MDL (ng ass)	MQL (ng ass)	S/N
Ac.Siringico	-	-	-	-	-
Ac.Isovanillico	3.35	1.55	12.42	41.39	18 (16.65 pg ass)
Siringaldeide	1.09	0.64	5.12	17.07	29 (8.25 pg ass)
Ac.Omovanillico	0.34	0.15	1.22	4.06	30 (8.25 pg ass)
Ac.Ferulico	0.17	0.07	0.54	1.81	21 (8.25 pg ass)
Vanillina	3.03	0.73	5.83	19.44	16 (8.25 pg ass)
Ac.p-cumarico	0.18	0.08	0.61	2.04	35 (1.66 pg ass)
Coniferilaldeide	0.16	0.10	0.81	2.71	97 (8.25 pg ass)
Ac.Vanillico	1.22	0.25	2.02	6.73	13 (8.25 pg ass)

Tabella 16: valori di bianco di campo, deviazione standard, MDL e MQL in ng ass e valori di S/N; per l'acido Siringico non è stato individuato il picco, per questo non compaiono i valori di bianco, STD, MDL, MQL e N/S.

Il confronto con i dati riportati in letteratura evidenzia come i limiti di rivelabilità strumentali ottenuti con questo metodo siano simili a quelli pubblicati, infatti Orasche et al. (*Orasche J., 2011*), che ottiene LOQ fra i valori migliori riportati dichiara per l'acido vanillico 47 pg ass, l'acido siringico 25 pg ass, la siringaldeide 88 pg ass.

Considerando un volume di campionamento medio di 366.2 m³ si può calcolare il MDL che per siringaldeide e coniferilaldeide sono di 47 pg m⁻³ e 7 pg m⁻³ rispettivamente contro i valori di 80 pg m⁻³ e 100 pg m⁻³ riportati da Simpson et al. (*Simpson C.D., 2005*).

Nel corso della validazione anche l'acido vanillico marcato è stato valutato come standard interno ma non è stato possibile utilizzarlo.

Infatti, dall'analisi delle soluzioni standard relative alla verifica della linearità della risposta ci si è resi conto di un limitato range dinamico e la comparsa di un plateau a concentrazioni superiori a 20 pg/uL.

Questo è stato spiegabile considerando le caratteristiche dell'acido vanillico marcato, che presenta un solo atomo ¹³C, e del cluster isotopico teorico dell'acido vanillico nativo riportato in figura 28:

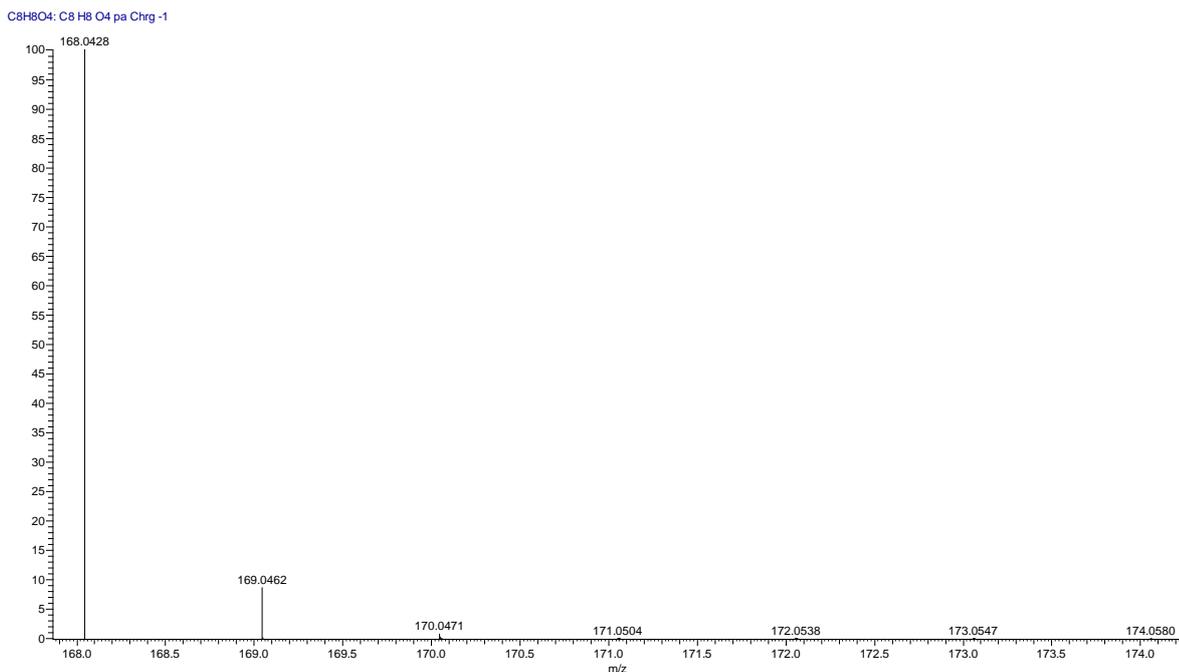


Figura 28: cluster isotopico teorico dell'acido vanillico nativo.

Come si vede chiaramente dalla figura l'acido vanillico naturale, presenta un cluster isotopico in cui l'isotopomero avente un atomo di ^{13}C rappresenta il 10% dell'abbondanza isotopica del picco base, di conseguenza una soluzione di acido vanillico nativo alla concentrazione di 100 pg/ μL , contribuisce al segnale prodotto dall'acido vanillico marcato alla concentrazione di 10 pg/ μL raddoppiandone di fatto l'area. Questo è stato esattamente quanto osservato dall'elaborazione delle rette di calibrazione: all'aumentare della concentrazione dell'acido vanillico nativo si è osservato un incremento progressivo ed ingiustificato dell'area del picco dello standard interno. Questa osservazione ha portato a rigettare l'acido vanillico marcato (con un solo atomo di ^{13}C) e arrivare alla conclusione che standard interni marcati da utilizzare impiegando l'acquisizione in full scan con l'orbitrap devono contenere un alto numero di isotopi di ^{13}C tale da mettere al riparo da problemi di interferenza da parte degli isotopomeri presenti naturalmente negli standard non arricchiti isotopicamente e molecole con distribuzione isotopica naturale.

3. Analisi dei campioni di particolato atmosferico per la determinazione dei metossifenoli.

La procedura analitica messa a punto per la determinazione di metossifenoli nell'aerosol atmosferico è stata applicata su campioni reali permettendo di determinare la concentrazione di questi analiti in 15 filtri raccolti durante una campagna di campionamento nella zona di Belgrado tra settembre e novembre 2008. I dati raccolti sono riassunti nella tabella 17.

Data	Nome	VA	IVA	HA	CAH	VAN	SyA	SyAH	PA	FA
	campione	pg m ⁻³								
01/09	270	323		29	55	265	383	431	48	105
07/09	299	522	46	31	52	155	283	443	46	120
13/09	279	105		31	28	148	68	188	31	55
19/09	249	253		74	142	451	460	1292	29	60
25/09	342	479	102	207	138	401	746	453	37	119
01/10	367	545	45	120	200	666	969	1099	205	185
07/10	354	2112	85	829	464	3350	3012	2836	1771	1008
13/10	319	2474	502	1468	467	1301	5252	5252	267	1060
19/10	322	1038	38	466	224	1578	1869	1775	340	413
25/10	307	2396		1973	395	1424	3089	2389	916	1146
31/10	360	349		59	176	511	1210	1210	57	98
06/11	323	656		258	117	656	976	976	276	317

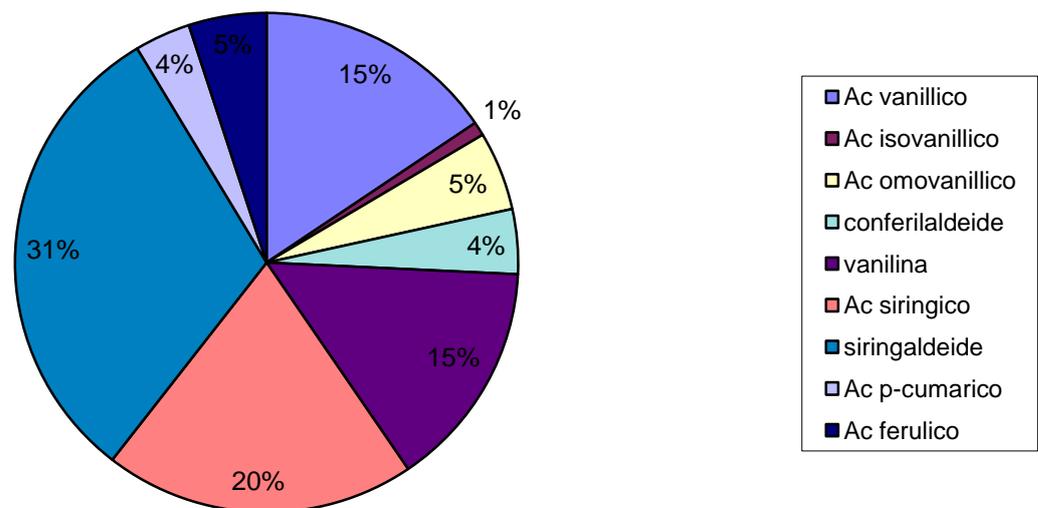
12/11	361	4758	201	2150	1163	3702	7979	9754	589	1021
24/11	365	2575	82	481	1334	1476	2722	10415	78	11
30/11	314	1803	93	429	936	1697	1987	8097	198	209

Tabella 17: concentrazione dei metossifenoli (in pg m⁻³) relative a ciascun campione.

In generale la determinazione dei metossifenoli è stata fatta in aeree residenziali influenzate dalla combustione della biomassa (*Simpson C.D., 2005 – Dutton S.J., 2010 – Bari M.A., 2010*) o in zone pesantemente impattate da incendi (*Ward T.J., 2006*).

A Dettenhausen (Germania) nella stagione autunnale si sono registrate concentrazioni di SyAH in un range che va da 10 a 61000 pg m³ e concentrazioni di CAH tra 20 e 5210 pg m³ (*Bari M.A., 2010*), circa cinque volte superiori ai nostri valori; a Seattle (WA, USA) invece troviamo concentrazioni tra 80-1520 pg m³ per la SyAH e tra 100 e 1160 pg m³ per la CAH (*Simpson C.D., 2005*), range di valori molto simile a quello registrato nell'area di Belgrado. Valori molto alti sono stati riscontrati anche in Missoula (Montana) in cui il range per la SyAH era di 30-4030 pg m³ e per la CAH di 30-12460 pg m³ (*Ward T.J., 2006*); valori così elevati sono conseguenza della stagione degli incendi. Sono anche state considerate la somma delle concentrazioni di VA, SyAH e CAH nei mesi di settembre ottobre e novembre: a Denver (Colorado, USA) si osservano valori maggiori di concentrazione nei mesi freddi, fino a 11290 pg m³, e minori nei più caldi, intorno ai 200 pg m³ (*Dutton S.J., 2010*). Similmente, a Singapore si registrano valori delle concentrazioni di VA, SyAH e CAH che vanno da 950 pg m³ in agosto a 6400 pg m³ per il mese di ottobre (*He J., 2010*). Facendo la somma delle concentrazioni dei nostri campioni per gli stessi analiti troviamo lo stesso tipo di andamento crescente e possiamo infatti osservare che la concentrazione per il mese di settembre è di 799 pg m³, per il mese di ottobre è di 4476 pg m³ e per il mese di novembre di 6697 pg m³.

Considerando poi i valori medi degli analiti trovati nei campioni considerati espressi come percentuale rispetto al totale, si osserva come i composti maggiormente presenti nella zona di Belgrado nel periodo autunnale sono la siringaldeide (31%), l'acido siringico (20%), la vanillina (15%) e l'acido vanillico (15%).



Questa evidenza ci fornisce indicazioni su quale tipo di legna è stata combusta. In particolare elevate concentrazioni di acido siringico e siringaldeide sono proprie della lignina hardwood (*Simoneit B.R.T., 1993*), rappresentativa della classe delle Angiosperme.

E' possibile poi valutare l'andamento temporale della somma delle concentrazioni degli analiti considerati (fig .29). Come è ragionevole aspettarsi i livelli atmosferici più bassi sono stati determinati nei campioni di settembre con un progressivo aumento dei mesi di ottobre e di novembre, accordandosi bene con l'andamento generale della temperatura (linea verde).

La figura 25 evidenzia poi due periodi di maggior emissione di metossifenoli che coincidono con bruschi abbassamenti della temperatura. I dati suggeriscono quindi

che la fonte primaria dei metossifenoli in atmosfera sia costituita dal riscaldamento domestico, che fa uso principalmente di legna di tipo hardwood.

Per completezza dello studio sono stati inseriti anche la somma di IPA determinati negli stessi campioni in un precedente lavoro di tesi (Senese D., 2011) dai quali, si osserva un aumento progressivo del livello di concentrazione. E' difficile però, vista la scarsità dei dati, individuare similitudini nell'andamento temporale.

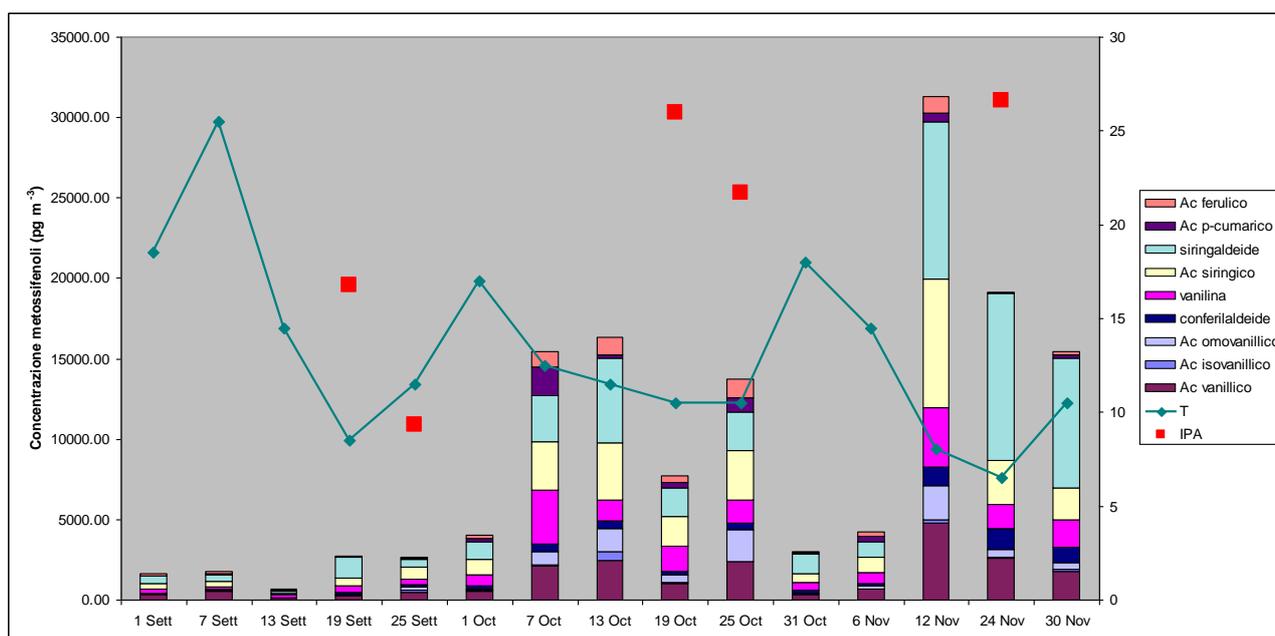


Figura 29: Andamento temporale dei metossifenoli determinati, in verde si nota l'andamento della temperatura (°C) e i quadrati rossi indicano la somma degli Idrocarburi policiclici aromatici determinati negli stessi campioni. La scala dell'asse y è in °C per la temperatura e in pg/m³ per gli IPA.

4. Scelta delle condizioni strumentali per la determinazione degli acidi grassi

La maggior parte dei metodi utilizzati per la determinazione degli acidi grassi è basata sull'estrazione liquido-liquido utilizzando metil tert-butil etere e successiva

derivatizzazione ai loro rispettivi metil-trimetilsilil-esteri ed analisi utilizzando la tecnica Gas Cromatografia (GC) o GC accoppiata a spettrometria di massa (*Guoliang L., 2011*). In contrasto con la GC, l'High Performance Liquid Chromatography (HPLC) permette la conversione diretta degli acidi grassi in un gran numero di differenti derivati. La derivatizzazione permette di risolvere alcuni problemi che si riscontrano durante l'analisi come l'allargamento e scodatura dei picchi e problemi di bassa sensibilità del detector UV o a fluorescenza. Grazie all'alta polarità degli acidi grassi è possibile l'analisi senza derivatizzazione utilizzando tecniche HPLC accoppiate alla spettrometria di massa (*Guoliang L., 2011*).

Le matrici in cui generalmente gli acidi grassi vengono ricercati sono di tipo vegetale (*Guoliang L., 2011 – Filitz H., 2011 – Heron S., 2009*), scarsi invece sono gli esempi di applicazione per la matrice aerosol.

Uno degli scopi di questo lavoro di tesi è stato la messa a punto di una metodica analitica per la determinazione degli acidi grassi mediante HPLC/HRMS nell'aerosol atmosferico.

Come descritto precedentemente il lavoro è iniziato con la ricerca delle migliori condizioni di tuning per ogni analita considerato, mediante infusione diretta delle soluzioni standard descritte in tabella 11.

La scelta della colonna utilizzata per la separazione degli acidi grassi è stata fatta, come per i metossifenoli, dal confronto tra colonne diverse: XBridge Shield RP18 2.1x100mm 3.5 μm , Poroshell 120 SB-C18 2.1x150mm 2.7 μm , Kinetex C18 75x2.10mm 2.6 μm , Eclipse 2.1x150mm 3.5 μm , Extend C18 4.6x150mm 3.5 μm .

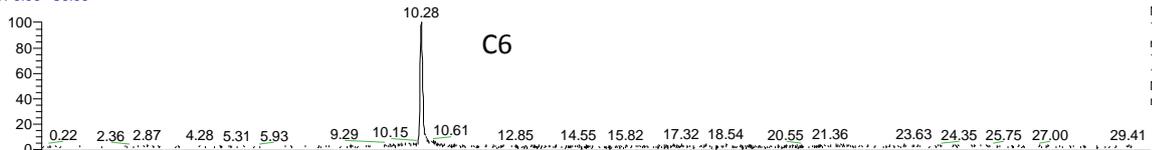
La maggior parte delle colonne considerate sono state scartate a causa di pesanti effetti di scodatura dei picchi, fra queste le migliori sono risultate le colonne Kinetex e XBridge Shield. La scelta è caduta su quest'ultima per la migliore forma dei picchi e risoluzione cromatografica fra tutti gli acidi grassi saturi e insaturi. Non siamo in ogni

caso riusciti a separare i 3 acidi grassi isomeri acido oleico, elaidico e petroselinico che coeluiscono.

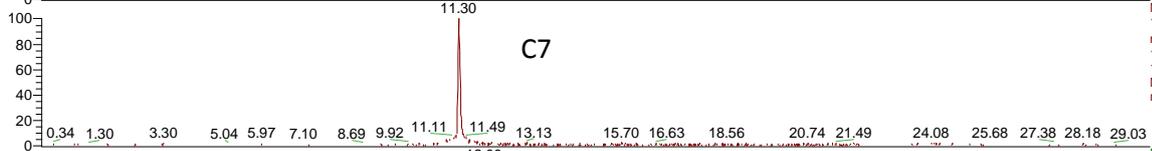
Un problema che si è manifestato immediatamente è stato quello della scarsa resa di ionizzazione, in polarità positiva quasi assente, in polarità negativa migliore ma comunque non soddisfacente ai fini dell'ottenimento di un metodo caratterizzato da alta sensibilità. Per incrementare allora la resa di ionizzazione in polarità negativa si è ricorsi allora ad un'aggiunta post colonna mediante una nanopompa di una soluzione di ammonio idrossido 12.5% ad un flusso di $1.5 \mu\text{L min}^{-1}$.

La scelta dell'aggiunta post colonna è giustificata dal fatto che la colonna scelta non sopporta pH basici. Inoltre la concentrazione ottimale è stata calcolata sulla base del flusso massimo raggiungibile dalla nano pompa, di modo che la concentrazione in sorgente fosse di circa lo 0,1 %, condizione ottimale verificata precedentemente mediante infusione diretta in sorgente. La figura 30 mostra i cromatogramma relativi all'analisi degli acidi grassi.

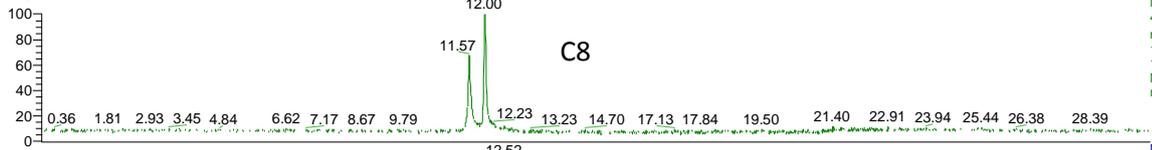
RT: 0.00 - 30.00



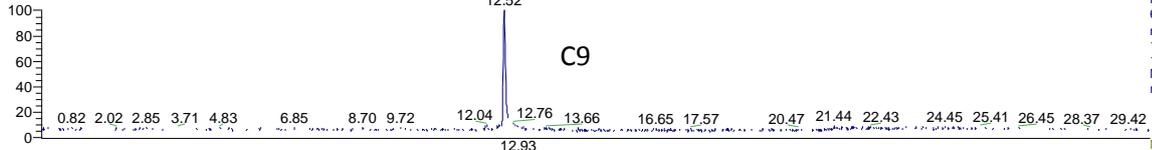
NL:
1.66E6
m/z=
115.0759-
115.0771 MS
Mlxh2o20pgxb
ridge02



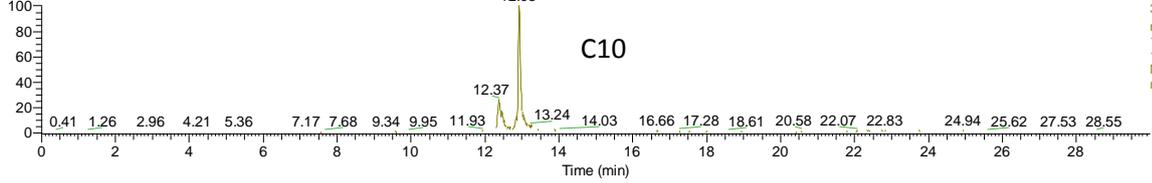
NL:
1.61E6
m/z=
129.0915-
129.0927 MS
Mlxh2o20pgxb
ridge02



NL:
4.11E6
m/z=
143.1071-
143.1085 MS
Mlxh2o20pgxb
ridge02

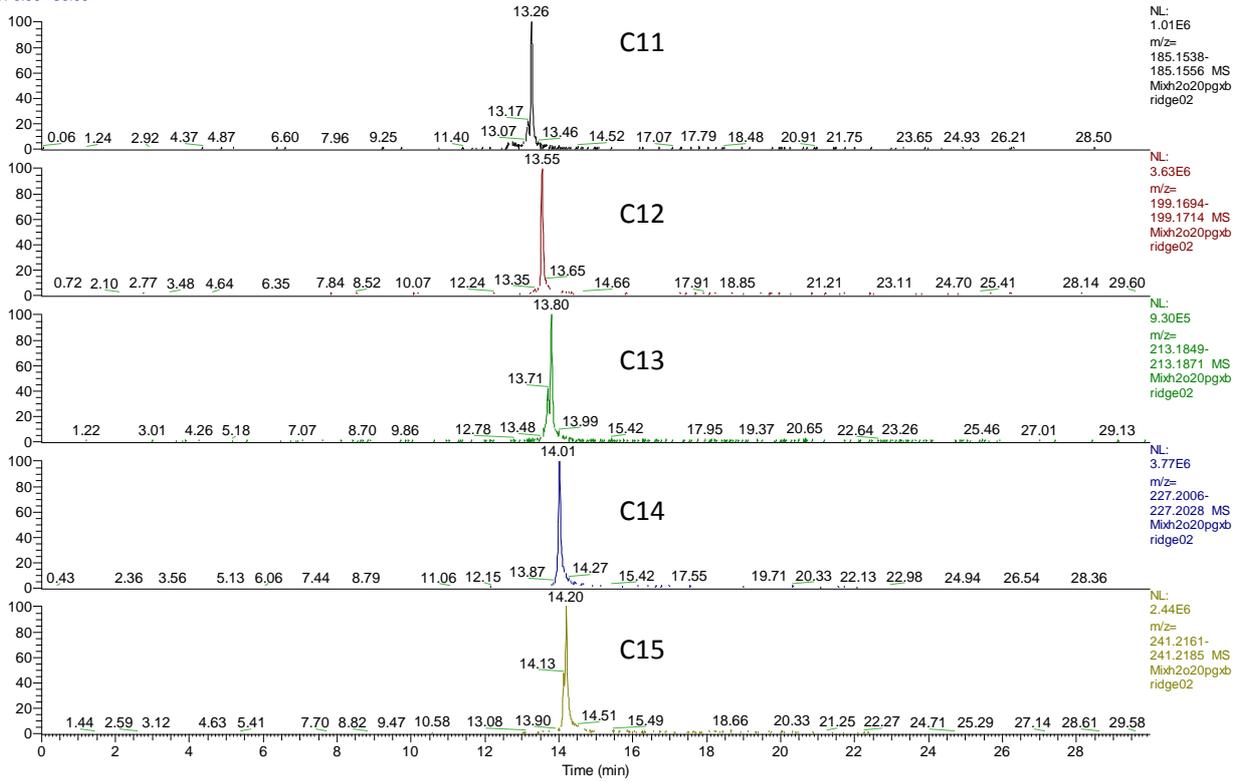


NL:
6.28E6
m/z=
157.1226-
157.1242 MS
Mlxh2o20pgxb
ridge02

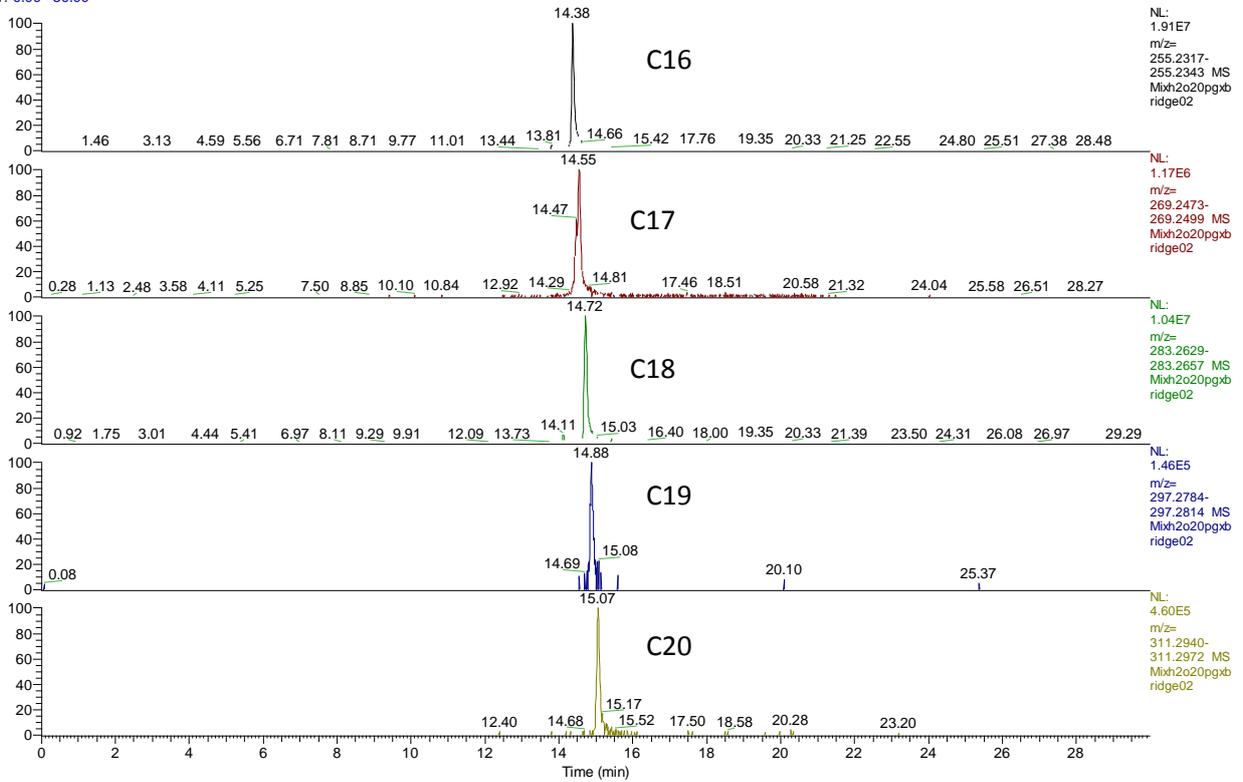


NL:
3.57E6
m/z=
171.1382-
171.1400 MS
Mlxh2o20pgxb
ridge02

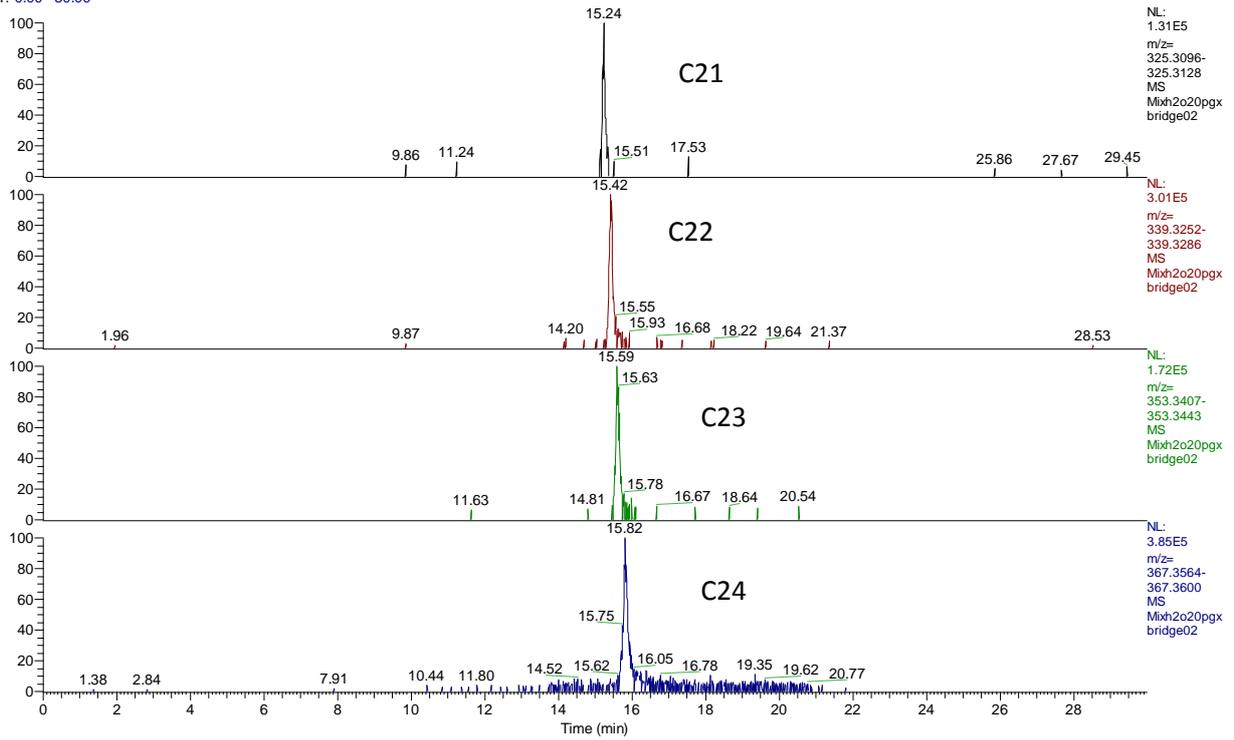
RT: 0.00 - 30.00



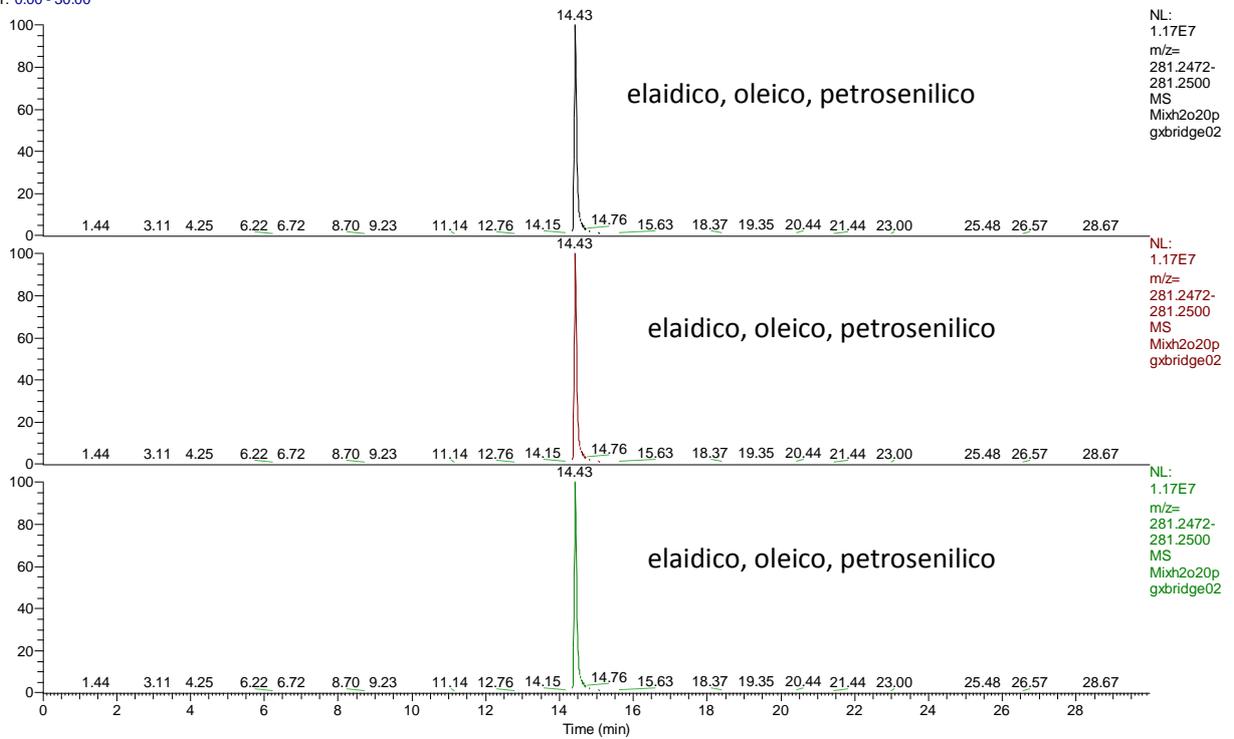
RT: 0.00 - 30.00



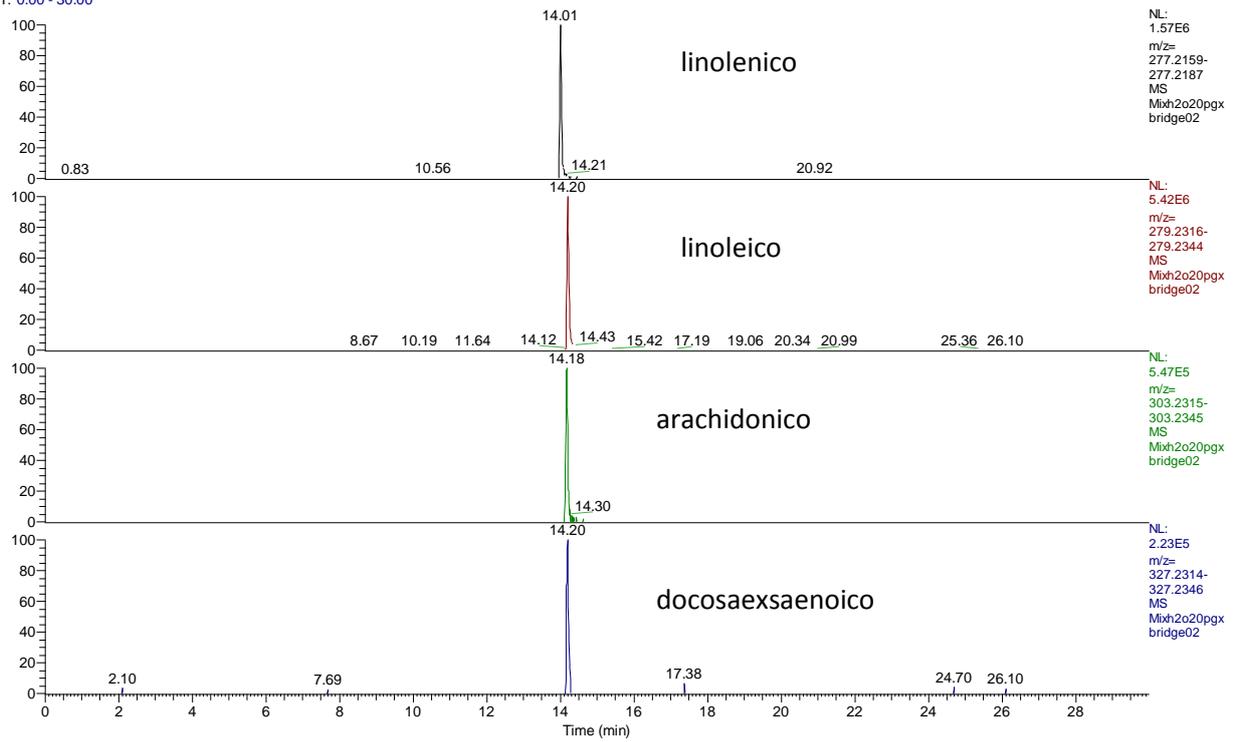
RT: 0.00 - 30.00



RT: 0.00 - 30.00



RT: 0.00 - 30.00



RT: 0.00 - 30.00

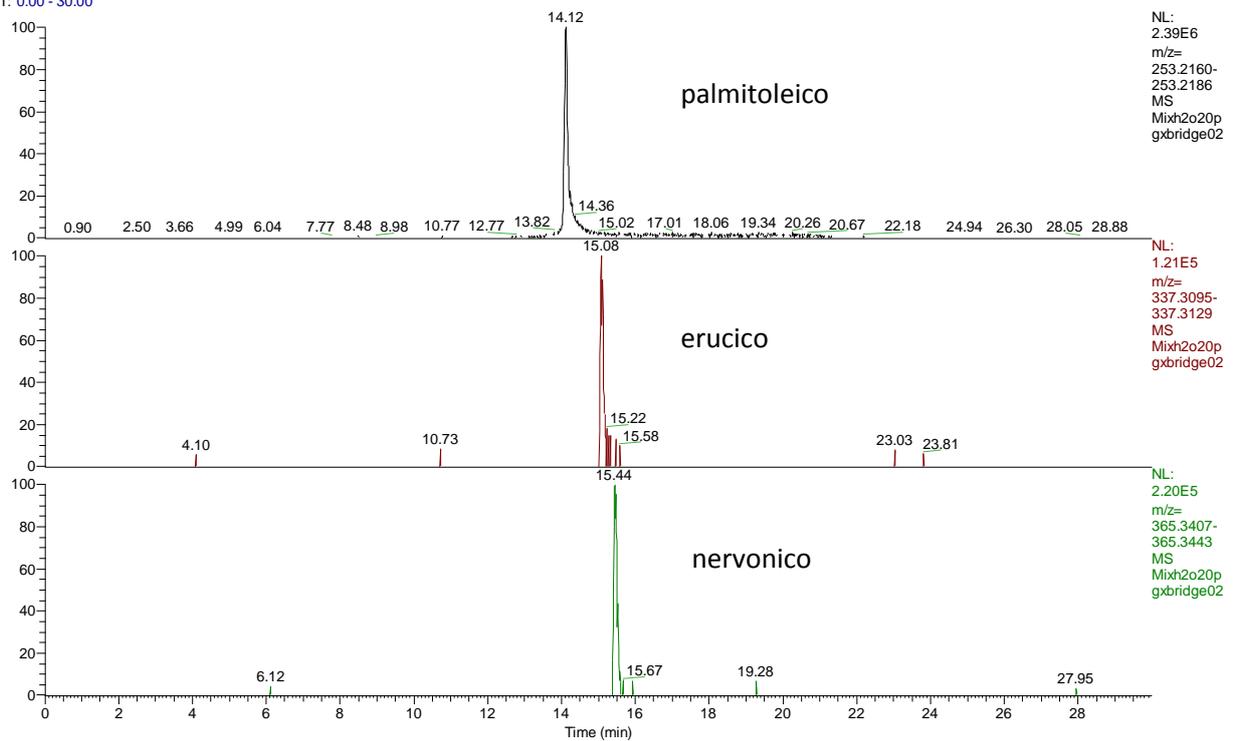


Figura 30: cromatogrammi relativo all'analisi degli acidi grassi.

5. Problematiche riscontrate nel corso della validazione del metodo per l'analisi degli acidi grassi

Nonostante il metodo strumentale sia stato messo a punto con successo, la determinazione degli acidi grassi ha riscontrato diverse problematiche che hanno impedito la convalida del metodo analitico.

Il principale problema riscontrato è stato la pesante contaminazione dei campioni.

La quantificazione dei campioni doveva essere effettuata impiegando il metodo dello standard interno, utilizzando come standard interni acido palmitoleico, acido ottanico e acido stearico marcati al ^{13}C , confrontando l'area del picco del composto nativo con l'area dello standard interno. Il risultato è stato corretto per ogni composto utilizzando il fattore di risposta strumentale valutato per ogni analita preparando una soluzione standard contenente sia gli standard nativi che lo standard usato come standard interno.

Come nel caso dei metossifenoli il metodo doveva essere convalidato valutando la linearità della risposta strumentale attraverso la costruzione della retta di calibrazione, la preparazione dei bianchi procedurali, il calcolo del LOD, del LOQ, della resa, la precisione (ripetibilità) e dell'accuratezza della procedura analitica.

Dall'analisi dei campioni preparati per la validazione del metodo è stato chiaro il pesantissimo problema della contaminazione in cui sia nei campioni preparati per la valutazione della resa che dell'accuratezza, le aree degli standard aggiunti erano molto simili a quelle degli analiti presenti nei campioni preparati per la valutazione dei bianchi procedurali, come contaminanti e simili anche alla contaminazione presente nei campioni di acqua ultrapura utilizzata per l'estrazione.

In Fig. 31 è riportata la retta di calibrazione dell'acido grasso saturo C17 il cui andamento è spiega perfettamente il grave problema .

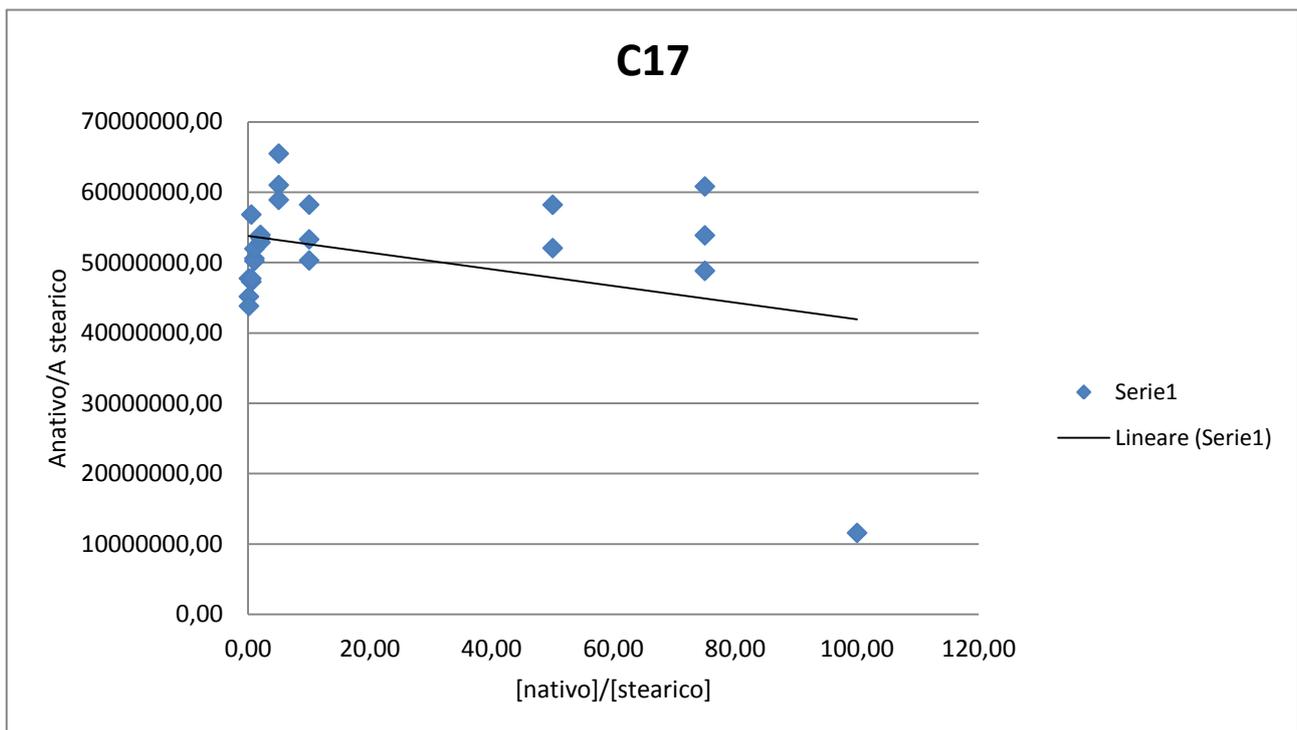


Figura 31: esempio di retta di calibrazione dell'acido grasso saturo C17.

Nei diversi punti della retta di calibrazione le aree dei picchi sono molto simili e questo indica che l'area del picco non dipende dall'aggiunta dello standard quanto piuttosto dalle fluttuazioni casuali del livello di contaminazione.

Nella messa a punto del metodo, i prossimi passi riguarderanno l'individuazione quali siano le fonti di tale contaminazione:

- Un insufficiente decontaminazione del materiale da laboratorio impiegato nella preparazione e manipolazione del campione.
- Contaminazione atmosferica: nonostante i campioni e soluzioni siano stati preparati sotto cappa a flusso laminare probabilmente sarà necessario affrontare la preparazione del campione all'interno di una clean room.
- L'acqua utilizzata è ottenuta da sistemi per la produzione di acqua ultrapura. Sarà necessario valutare i livelli di background dell'acqua prodotta da altri sistemi o acquistare acqua ultrapura commercialmente disponibile.

Che il problema della contaminazione non sarebbe stato di facile soluzione era stato chiaro fin dal principio, infatti fra le lock mass prodotte in polarità negativa proposte per l'analizzatore orbitrap comparivano anche acido palmitico e acido stearico, suggerendo un certo livello di contaminazione ubiquitaria e non eliminabile già a livello strumentale.

Proprio riguardo all'apparato strumentale sono stati riscontrati problemi dovuti a effetto memoria all'interno dell'autocampionatore: si è osservato che l'ago non veniva pulito efficientemente dalla soluzione normalmente utilizzata per la pulizia, costituita da acqua e metanolo. Individuata la causa, la soluzione di lavaggio dell'ago è stata sostituita con una soluzione di esano e isopropanolo in rapporto 1:1 che ha garantito una pulizia migliore.

Per concludere si riporta forse il problema più grave e più difficile da risolvere: la scarsa stabilità degli analiti in esame, soprattutto per gli acidi grassi insaturi, confermata anche da studi di letteratura (*Jiasong F.,2002*), che è stata osservata durante lo sviluppo del metodo cromatografico, assistendo iniezione dopo iniezione ad una progressiva diminuzione dell'altezza dei picchi cromatografici causata al deterioramento degli analiti. Portare la temperatura del piatto dell'autocampionatore alla temperatura di 4°C, per tenere i campioni refrigerati e conservarli quando non sottoposti ad analisi, alla temperatura di -20°C, non ha risolto il problema.

Per le motivazioni sopra descritte, quindi, non siamo riusciti a convalidare il metodo per gli acidi grassi, e si dovranno perciò affrontare e risolvere le diverse problematiche per raggiungere lo scopo prefisso.

CAPITOLO X

CONCLUSIONI

In questo lavoro di tesi è stata affrontata la messa a punto di due metodiche analitiche: per la determinazione di composti appartenenti alla classe dei metossifenoli e un'altra per l'analisi degli acidi grassi mediante la tecnica HPLC/HRMS nell'aerosol atmosferico.

Per quanto riguarda la determinazione dei metossifenoli è stato sviluppato un metodo analitico strumentale che successivamente è stato applicato ad una procedura preanalitica preesistente. La metodologia analitica è stata convalidata mediante la valutazione della linearità della risposta strumentale, la valutazione dei bianchi procedurali, il calcolo del LOD, del LOQ strumentali, del limite di rivelabilità e di quantificazione della metodologia analitica, della resa, della precisione (ripetibilità) e dell'accuratezza.

Sono stati poi analizzati 15 campioni di particolato atmosferico provenienti dalla zona di Belgrado e raccolti fra settembre e novembre 2008, evidenziando come il sito sia influenzato da fenomeni di biomass burning, presumibilmente dovuto al riscaldamento domestico. Il livelli rilevati sono in linea con i livelli riscontrati in aree residenziali e riportati in letteratura nello stesso periodo di campionamento.

Dai dati ottenuti si è avuta l'indicazione che l'area studiata sia soggetta a combustione di materiale vegetale contenente lignina di tipo hardwood.

Per quanto concerne invece gli acidi grassi, è stato sviluppato un metodo analitico strumentale, ma a causa di pesanti problemi di contaminazione la convalida del metodo non ha avuto successo. Lo sviluppo di questa metodologia analitica richiederà ulteriore lavoro.

CAPITOLO XI

BIBLIOGRAFIA

Agilent Poroshell 120 Columns for HPLC and UHPLC, The measure of confidence
“Perform rugged, fast LC with confidence” Agilent Technologies.

ANIČIĆ, M., M. TASIĆ, M.V. FRONTASYEVA, and M. TOMAŠEVI. “Active moss biomonitoring of trace elements with Sphagnum girgensohnii moss bags in relation to atmospheric bulk deposition in Belgrade, Serbia.” *Environmental Pollution* 157 (2009): 673-679.

Bari, M. A.; Baumbach, G.; Kuch, B.; Scheffknecht, G., Temporal variation and impact of wood smoke pollution on a residential area in southern Germany. *Atmospheric Environment* 2010, 44, (31), 3823-3832.

Bourcier L., Sellegri K., Masson O., Zangrando R., Barbante C., Gambaro A., Pichon J. M., Boulon J., Laj P. «Experimental evidence of biomass burning as a source of atmospheric ^{137}Cs , puy de Dôme (1465 m a.s.l.), France.» *Atmospheric Environment* 44, 2010: 2280-2286.

C Samara^a, Th Kouimtzi^a, R Tsiouridou^b, G Kanias^c, V Simeonov^d ^a (2003) “Chemical mass balance source apportionment of PM_{10} in an industrialized urban area of Northern Greece” .

Coeur-Tourneur C., Cassez A., Wenger J. C. «Rate Coefficients for the Gas-Phase Reaction of Hydroxyl Radicals with 2-Methoxyphenol.» *Journal of Physical Chemistry A*, 2010: 11645–11650.

Colbeck, I. (2008). *Environmental chemistry of Aerosols*. Blackwell Publishing Ltd.

De Pieri S., **2002**. Evoluzione temporale del flusso di microinquinanti organici

Dutton, S. J.; Rajagopalan, B.; Vedal, S.; Hannigan, M. P., Temporal patterns in daily measurements of inorganic and organic speciated $\text{PM}(2.5)$ in Denver. *Atmospheric Environment* 2010, 44, (7), 987-998.

Faravelli T., A. Frassoldati S. Granata, A. Cuoci, E. Ranzi; 2006. Fenomenologia della combustione di biomasse. LEAP; pp 171-219.

Gao-Ling Wei, Eddy Y. Zeng 2011 “Gas chromatography-mass spectrometry and high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry in quantifying fatty acids”

Guoliang Li, Jinmao You, Yourui Suo, Cuihua Song, Zhiwei Sun, Lian Xia, Xianen Zhao, Junyou Shi "A developed pre-column derivatization method for the determination of free fatty acids in edible oils by reversed-phase HPLC with fluorescence detection and its application to *Lycium Barbarum* seed oil".

H.Filiz Ayyildiz, Huseyin Kara, S.T.H. Sherazi 2011 "A Novel Approach for Determination of Free Fatty Acids in Vegetable Oils by a Flow Injection System with Manual Injection".

Hardware Manual "LTQ Orbitrap XL" Thermo Scientific.

Hardware Manual "LTQ Series" Thermo Scientific.

He, J.; Zielinska, B.; Balasubramanian, R., Composition of semi-volatile organic compounds in the urban atmosphere of Singapore: influence of biomass burning. *Atmospheric Chemistry and Physics* 2010, 10, (23), 11401-11413.

Hoffmann, D.; Iinuma, Y.; Herrmann, H., Development of a method for fast analysis of phenolic molecular markers in biomass burning particles using high performance liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionisation mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 2007, 1143, (1-2), 168-175.

Iinuma Y., Brüggemann E., Gnauk T., Müller K., Andreae O., Helas G., Parmar R., Herrmann H. «Source characterization of biomass burning particles: The combustion of selected European conifers, African hardwood, savanna grass, and German and Indonesian peat.» *Journal of Geophysical Research* 112, 2007: 26.

Iinuma, Y.; Herrmann, H., Method development for the analysis of particle phase substituted methoxy phenols and aromatic acids from biomass burning using capillary electrophoresis/electro spray ionization mass spectrometry (CE/ESI-MS). *Journal of Chromatography A* 2003, 1018, (1), 105-115.

IPA) entranti nella Laguna di Venezia tramite l'aerosol atmosferico. Tesi di Laurea in

Jacobson, M. C., Hansson, H.-C., Noone, K. J., & Charlson, R. J. (2000, Maggio). Organic atmospheric aerosols: review and state of science. *Reviews of Geophysics*, 38 (2), p. 267-294.

Jiasong Fang, Kimitaka Kawamura, Yutaka Ishimura and Kouhei Matsumoto “Carbon Isotopic Composition of Fatty Acids in the Marine Aerosols from the Western North Pacific: Implication for the Source and Atmospheric Transport” (2002).

Jiming Sun (2005). “ Atmospheric organic and bio-aerosols as cloud condensation nuclei (CCN): A review”. Departments of Atmospheric and Oceanic Sciences, and Chemistry, McGill University.

Kaycie A. Billmark, Robert J. Swap, and Stephen A. Macko “Characterization of sources for southern African aerosols through fatty acid and trajectory analyses” (2003).

Luke Curtis; 2002. BIOMASS BURNING: WOOD, LEAVES, GRASS, FORESTS, CROPS and TRASH. Burning Issues Special Edition.

Laskin A. et al.; 2009. Molecular Characterization of Biomass Burning Aerosol using High-Resolution Mass Spectroscopy. Anal. Chem.; 81: 1512-1521.

Lutgens, F. K., and E. J. Tarbuck, 1995: *The Atmosphere*. Prentice-Hall.

M.G. Perrone, B.R. Larsen, L. Ferrero, G. Sangiorgi, G. De Gennaro, R. Udusti, R. Zangrando, A. Gambaro, E. Bolzacchini (2012) “Sources of high PM_{2.5} concentrations in Milan, Northern Italy: Molecular marker data and CMB modelling”

Makarov, Scigelova; 2010. “Coupling liquid chromatography to Orbitrap mass spectrometry”. Journal of Chromatography; 1217, 3938-3945.

Marconi A. «Materiale particellare aerodisperso: definizioni, effetti sanitari, misura e sintesi delle indagini ambientali effettuate a Roma.» Annali dell' Istituto superiore di sanità (ISSN) 39, 2003: 329-342.

Michihiro Mochida, Yasuyuki Kitamori, and Kimitaka Kawamura “Fatty acids in the marine atmosphere: Factors governing their concentrations and evaluation of organic films on sea-salt particles” (2002).

Michihiro Mochida,^{1,2} Nobuhiko Umemoto,¹ Kimitaka Kawamura,¹ Ho-Jin Lim,^{3,4} and Barbara J. Turpin³ “Bimodal size distributions of various organic acids and fatty acids in the marine atmosphere: Influence of anthropogenic aerosols, Asian dusts, and sea spray off the coast of East Asia” (2002).

Orasche, J.; Schnelle-Kreis, J.; Abbaszade, G.; Zimmermann, R., Technical Note: In-situ derivatization thermal desorption GC-TOFMS for direct analysis of particle-

bound non-polar and polar organic species. *Atmospheric Chemistry and Physics* 2011, 11, (17), 8977-8993.

Oros, D. R.; bin Abas, M. R.; Omar, N.; Rahman, N. A.; Simoneit, B. R. T., Identification and emission factors of molecular tracers in organic aerosols from biomass burning: Part 3. Grasses. *Applied Geochemistry* 2006, 21, (6), 919-940.

Parshintsev, J.; Kivilompolo, M.; Ruiz-Jimenez, J.; Hartonen, K.; Kulmala, M.; Riekkola, M. L., Particle-into-liquid sampler on-line coupled with solid-phase extraction-liquid chromatography-mass spectrometry for the determination of organic acids in atmospheric aerosols. *Journal of Chromatography A* 2010, 1217, (33), 5427-5433.

Richard H. Perry, R. Graham Cooks, and Robert J. Noll (2008) "Orbitrap mass spectrometry: instrumentation, ion motion and applications" Department of Chemistry, Purdue University, West Lafayette, IN 47907

Schauer J., Cass G., Simoneit B.R.T. «Highly Polar Organic Compounds Present in Wood Smoke and in the ambient atmosphere.» *Environmental Science Technology* 35, 2001: 1912-1919.

Simoneit B.R.T. «Lignin Pyrolysis Products, Lignans, and Resin Acids as Specific Tracers of Plant Classes in Emissions from Biomass Combustion.» *Environmental Science Technology*, 1993: 2533-2541.

Simpson, C. D.; Paulsen, M.; Dills, R. L.; Liu, L. J. S.; Kalman, D. A., Determination of methoxyphenols in ambient atmospheric particulate matter: Tracers for wood combustion. *Environmental Science & Technology* 2005, 39, (2), 631-637.

Simpson, C. D.; Paulsen, M.; Dills, R. L.; Liu, L. J. S.; Kalman, D. A., Determination of methoxyphenols in ambient atmospheric particulate matter: Tracers for wood combustion. *Environmental Science & Technology* 2005, 39, (2), 631-637.

Sylvie Heron, Marie Genevieve Maloumbi, Thomas Silou, Eric Verette, Michel Dreux, Alain Tchaplal "Calibration of an Evaporative Light-Scattering Detector for the Universal Quantitative Analyses in Liquid Chromatography-Application to the Determination of Triglycerols in Cucurbitaceus Oils" 2010.

Tesi Senese Daniela "Caratterizzazione chimica dell'aerosol nella zona urbana di Belgrado", 2011.

Tian, S.; Nakamura, K.; Cui, T.; Kayahara, H., High-performance liquid chromatographic determination of phenolic compounds in rice. *Journal of Chromatography A* 2005, 1063, (1-2), 121-128.

Ward, T. J.; Hamilton, R. F.; Dixon, R. W.; Paulsen, M.; Simpson, C. D., Characterization and evaluation of smoke tracers in PM: Results from the 2003 Montana wildfire season. *Atmospheric Environment* 2006, 40, (36), 7005-7017.

Wung, Ming Gu; 2005 "The concept of spectral accuracy for MS". *Anal. Chem.* 82, 7055-7062).

Zheng, X. H.; Zhao, X. F.; Zhao, X.; Wang, S. X.; Wei, Y. M.; Zheng, J. B., Determination of the main bioactive metabolites of Radix *Salvia miltiorrhizae* in Compound Danshen Dripping Pills and the tissue distribution of Danshensu in rabbit by SPE-HPLC-MS. *Journal of Separation Science* 2007, 30, (6), 851-857.