

Università degli Studi di Urbino “Carlo Bo”



1506
UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI URBINO
CARLO BO

DIPARTIMENTO di SCIENZE PURE ed APPLICATE

Corso di Dottorato di Ricerca in Scienze di Base ed Applicazioni

Curriculum scienze chimiche e scienze farmaceutiche

CICLO XXIX

*SVILUPPO DI NANOTECNOLOGIE INNOVATIVE NEL CAMPO DELLA CROMATOGRAFIA LIQUIDA E
DELLA SPETTROMETRIA DI MASSA*

Settore Scientifico Disciplinare Chim/01

RELATORE

Chiar.mo Prof. Achille Cappiello

DOTTORANDA

Dott.ssa Laura Magrini

AA 2015/2016

SOMMARIO

SOMMARIO.....	1
INTRODUZIONE.....	3
ELENCO PUBBLICAZIONI	5
PARTECIPAZIONI AI CONGRESSI:	6
PARTE TEORICA.....	7
1. PREPARAZIONE DEL CAMPIONE	7
1.2 TECNICHE INNOVATIVE DI ESTRAZIONE	8
1.2.1 MEMBRANE INTRODUCTION MASS SPECTROMETRY (MIMS)	9
1.2.1.1 CONDENSED PHASE MIMS (CP-MIMS)	12
1.2.2 MICROEXTRACTION BY PACKED SORBENT (MEPS)	14
2. NANO-HPLC	16
2.1 PROCESSO DI MINIATURIZZAZIONE.....	17
3. RIVELATORI ACCOPPIATI ALLA HPLC	23
3.1 RIVELATORI UV-VIS.....	23
3.2 INTERFACCE LC-MS.....	26
3.2.1 INTERFACCIA ELETTROSPRAY	27
3.2.2 INTERFACCIA APCI	29
3.2.3 INTERFACCIA APPI	30
3.2.4 INTERFACCIA LC-MS DIRECT-EI.....	32
4. RIVESTIMENTI SOL-GEL.....	38
4.1 CHIMICA DEL SOL-GEL	38
4.1.1 FILM DI XEROGEL.....	41
PARTE SPERIMENTALE.....	42
5. MICROEXTRACTION BY PACKED SORBENT (MEPS)-UHPLC-UV: UN METODO SEMPLICE ED EFFICIENTE PER LA DETERMINAZIONE DI 5 BENZODIAZEPINE IN UNA BEVANDA ALCOLICA.	42
5.1 MATERIALI E METODI	43
5.2 RISULTATI E DISCUSSIONE	44
5.3 CONCLUSIONI	50
6. ACCOPPIAMENTO MIMS-DIRECT-EI: ANALISI ON-LINE DI IDROCARBURI POLICICLICI AROMATICI IN CAMPIONI ACQUOSI COMPLESSI.	51

6.1 PARTE SPERIMENTALE	52
6.2 RISULTATI E DISCUSSIONE	56
6.3 CONCLUSIONI	60
7. AUMENTO DELL'EFFICIENZA D'ANALISI DELL'INTERFACCIA CROMATOGRAFIA LIQUIDA – SPETTROMETRIA DI MASSA DIRECT-EI MEDIANTE SORGENTE A IONIZZAZIONE ELETTRONICA RICOPERTA DA CERAMICA.	61
7.1 MATERIALI E METODI	62
7.1.1 COPERTURA DI CERAMICA.....	62
7.1.2 CONDIZIONI DIRECT-EI LC-MS	65
7.2 RISULTATI E DISCUSSIONE	66
7.2.1 PROVE D'APPLICAZIONE DELLA CERAMICA.....	69
7.2.2 ESPERIMENTI SULLA MISCELA 16 IPA.....	70
7.2.3 ESPERIMENTI CON LA SORGENTE RICOPERTA DA CERAMICA	71
7.2.4 ANALISI DEGLI ORMONI STEROIDEI.....	73
7.3 CONCLUSIONI	76
8. VALUTAZIONE DI DIVERSE SUPERFICI DI VAPORIZZAZIONE IN LC-EI-MS	77
8.1 MATERIALE E METODI	78
8.1.1 PRETRATTAMENTO ACIDO	79
8.1.2 COPERTURE SOL-GEL	79
8.1.3 CONDIZIONI DIRECT-EI LC-MS	81
8.2 RISULTATI E DISCUSSIONE	82
8.2.1 RIVESTIMENTI DELLA SORGENTE DI IONIZZAZIONE	82
8.2.2 STABILITA' TERMICA	82
8.2.3 ANALISI CON SORGENTE ACCIAIO INOX 318	85
8.2.4 ANALISI NUOVE SUPERFICI DI VAPORIZZAZIONE	89
8.3 CONCLUSIONI	93
9. VALUTAZIONE DELLA PRESENZA DI CONTAMINANTI AMBIENTALI IN TESSUTI CEREBRALI DI FETI DI NEONATI MORTI SENZA CAUSA APPARENTE MEDIANTE GAS CROMATOGRAFIA- SPETTROMETRIA DI MASSA TANDEM..	94
9.1 MATERIALI E METODI	95
9.2 RISULTATI E DISCUSSIONE	99
9.3 CONCLUSIONI	103
CONCLUSIONI	104
BIBLIOGRAFIA	106

INTRODUZIONE

La cromatografia accoppiata alla spettrometria di massa (MS) è una delle tecniche analitiche d'elezione per la determinazione di composti organici. L'accoppiamento della cromatografia liquida (LC)-MS ha permesso di ampliare il numero di sostanze analizzabili rispetto alla gas cromatografia (GC)-MS, includendo quelle termolabili e a peso molecolare (PM) molto elevato. Sebbene la LC-MS sia una tecnica di efficacia comprovata, è ancora in fase di sviluppo e perfezionamento. Dal punto di vista dell'apparato cromatografico la ricerca ha portato alla realizzazione della HPLC (High Performance Liquid Chromatography), alla sua miniaturizzazione, ovvero la nano-HPLC, anche in versione UHPLC (Ultra High Pressure Liquid Chromatography) che ne migliora ulteriormente le prestazioni sia in termini di risoluzione sia di tempi d'analisi. Il processo di miniaturizzazione dell'hardware e di riduzione dei flussi di fase mobile (FM) all'ordine dei nano-litri/minuto, oltre ad offrire vantaggi dal punto di vista dei costi, dei tempi di analisi e della sensibilità ha permesso l'accoppiamento della LC con la MS a ionizzazione elettronica (EI) fino a qualche decennio fa considerato quasi impossibile. Un interessante esempio di tale accoppiamento è il Direct-EI. Tale interfaccia è stata realizzata interamente dal gruppo di ricerca del Prof. Cappiello (laboratorio LC-MS, Università di Urbino) ed è unica nel suo genere ed ancora in fase di sviluppo.

Anche i sistemi d'estrazione/purificazione dei campioni sono andati evolvendosi di pari passo con la miniaturizzazione dell'apparato cromatografico. Infatti, è sempre maggiore la richiesta di tecniche estrattive efficienti, che lavorino con piccole quantità di solventi organici e che permettano analisi in modalità on-line e in real-time. Tra queste metodiche innovative possiamo menzionarne due: la MEPS (*Microextraction by Packed Sorbent*) e la MIMS (*Membrane Introduction Mass Spectrometry*), usate entrambe per due applicazioni strumentali durante il progetto di dottorato. La prima è stata impiegata per la determinazione di benzodiazepine in bevande alcoliche analizzate mediante sistema nano-UHPLC-UV-Vis mentre, la seconda è stata impiegata in un progetto sperimentale di accoppiamento diretto con il Direct-EI senza separazione cromatografica. I composti indagati in quest'ultimo caso appartengono alla classe degli idrocarburi policiclici aromatici (IPA).

Un problema riscontrato con il Direct-EI è stato il portare in fase gassosa composti a PM e temperatura d'ebollizione elevati, come alcuni ormoni estrogenici ed IPA. Una buona o cattiva vaporizzazione degli analiti si riflette sulla loro ionizzazione e quindi sull'efficienza dell'analisi finale. La difficoltà di determinazione di questi composti è dovuta ad una loro probabile adesione sulla superficie della sorgente EI su cui essi si depositano prima di passare in fase gassosa in modo graduale e non immediato. Ciò determina un segnale meno intenso e caratterizzato da eccessiva codatura.

Per evitare tale adesione sono state testate diverse tipologie di coperture anti-aderenti della sorgente di ionizzazione EI, normalmente realizzata in acciaio inox 318³¹⁸, inerte per analisi GC. La sperimentazione di nuove superfici di vaporizzazione è iniziata applicando una copertura sol-gel di nano-ceramica, su una comune sorgente EI pretrattata fisicamente con carta abrasiva. I risultati sono stati ottimi ma la delicatezza della copertura e le difficoltà di adesione della medesima su una superficie estremamente liscia e ricurva, hanno dato lo spunto per iniziare una collaborazione con il Dipartimento di Chimica dell'Università di Parma. Durante tale collaborazione sono state testate altre 3 coperture (TEOS, titanio e zirconio) realizzate sempre mediante tecnologia sol-gel e con un pretrattamento della sorgente realizzato mediante attacco acido. L'acido crea dei micro pori che favoriscono l'adesione della copertura. I risultati ottenuti sono ancora preliminari.

Durante il progetto di dottorato, ho collaborato alla messa a punto di un metodo analitico GC-MS/MS per la determinazione di contaminanti ambientali in tessuti cerebrali di feti e neonati vittime di morte improvvisa fetale (SIUDS) e del lattante (SIDS). Il progetto, condotto in collaborazione con l'Università degli Studi di Milano, Dipartimento di Anatomia Patologica, si è proposto di studiare una possibile correlazione fra l'insorgenza di queste morti improvvise e l'esposizione prenatale e postnatale a composti meglio noti come distruttori endocrini.

ELENCO PUBBLICAZIONI

- **“Boosting the Detection Potential of Liquid Chromatography-Electron Ionization Mass Spectrometry Using a Ceramic Coated Ion Source”**

L. Magrini, G. Famiglioni, P. Palma, V. Termopoli, A. Cappiello. Journal of the American Society for Mass Spectrometry, pp. 1-8. First online: 08 September 2015

- **“Occurrence of specific environmental risk factors in brain tissues of sudden infant death and sudden intrauterine unexpected death victims assessed with gas chromatography-tandem mass spectrometry”**

V. Termopoli, G. Famiglioni, P. Palma, L. Magrini, A. Cappiello. Analytical Bioanalytical Chemistry (2015) 407: 2463-2472

- **“Microextraction by packed sorbent (MEPS)-UHPLC-UV: A simple and efficient method for the determination of five benzodiazepines in an alcoholic beverage”.**

L. Magrini, A. Cappiello, G. Famiglioni, P. Palma. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 125 (2016)48-53.

- **"Sol-gel coated ion sources for liquid chromatography-direct electron ionization mass spectrometry"**

N. Riboni, L. Magrini, F. Bianchi, M. Careri, A. Cappiello. Analytical Chemistry submitted for publication.

PARTECIPAZIONI AI CONGRESSI:

- **XXV congresso nazionale della Società Chimica Italiana** Rende, 07-12 settembre 2014

“New strategies to improve the nebulization process in Direct-EI interface”

Laura Magrini, Giorgio Famiglini, Veronica Termopoli, Fabiana Capriotti, Achille Cappiello.

- **Toscana Umbria Marche Abruzzo (TUMA) 2014** Pesaro, 15- 18 settembre 2014

“New developments to improve the nebulization/vaporization process in Direct-EI LC-MS interface”

Laura Magrini, Giorgio Famiglini, Veronica Termopoli, Pierangela palma, Achille Cappiello.

- **Incontri di Scienza delle Separazioni** Roma, 12 dicembre 2014

“Nuovi sviluppi dell’interfaccia LC-MS Direct-EI”

Laura Magrini, Giorgio Famiglini, Veronica Termopoli, Pierangela Palma, Achille Cappiello.

- **American Society for Mass Spectrometry (ASMS) 2016** San Antonio, 4-9 giugno 2016

“Study of vaporization surfaces in liquid chromatography – electron ionization mass-spectrometry”

Federica Bianchi, Laura Magrini, Niccolò Riboni, Maria Careri, Achille Cappiello.

PARTE TEORICA

1. PREPARAZIONE DEL CAMPIONE

La preparazione del campione è uno step cruciale dello sviluppo di un metodo analitico poiché contribuisce in modo importante alla riuscita di un'analisi sia dal punto di vista dei risultati che dei costi e dei tempi d'esecuzione. È perciò basilare valutare le caratteristiche del campione e la tipologia di analiti che si vuole analizzare ai fini di scegliere ed ottimizzare il metodo più opportuno. L'obiettivo principale è quello di estrarre gli analiti d'interesse da matrici che possono essere più o meno complesse rimuovendo eventuali sostanze interferenti che potrebbero alterare i risultati delle analisi. Segue all'estrazione anche una fase di purificazione del campione ed una di concentrazione se i composti da analizzare sono presenti in tracce. Alla preparazione del campione, segue la determinazione analitica dei composti d'interesse. Tale step prevede tecniche separative di diversa tipologia e metodi di rilevamento [1] (Figura 1).



Figura 1. Schematizzazione generale di un processo analitico.

Nello specifico delle tecniche cromatografiche un ruolo importante è svolto dalla tipologia del rivelatore utilizzato che può essere per esempio un ultravioletto-visibile (UV-Vis) poco sensibile e non selettivo od uno

mass-spettrometrico (MS o MS/MS), molto selettivo e sensibile, con la differenza che, il primo richiede tecniche d'estrazione selettive ed accurate mentre il secondo può richiedere un trattamento del campione "meno aggressivo". Da qui l'impiego di tecniche estrattive sempre più veloci che cercano di utilizzare il minor quantitativo di solvente organico possibile (spingendosi nella direzione di una *green chemistry*) e che spesso prevedono lo step d'estrazione simultaneo a quello di purificazione. Riducendo infatti il numero di passaggi necessari alla preparazione del campione si riducono anche eventuali contaminazioni e/o perdite di analiti [2-5]. Tecniche innovative in tal senso sono la MIMS, il QuEChERS (*Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe*) e la MEPS. Ciò non deve indurre in errore ovvero, occorre sempre utilizzare tecniche estrattive efficaci e selettive sia per evitare eventuali deterioramenti della strumentazione analitica che eventuali interferenze da parte di sostanze co-estratte con gli analiti d'interesse che potrebbero andare a sopprimere o ad incrementare il segnale, fenomeno questo appena descritto, noto come effetti matrice (ME) [6]. L'obiettivo sarebbe di sviluppare metodi semplici, efficaci, rapidi e sicuri. Ciò purtroppo non è sempre possibile, poiché i fattori da considerare sono molteplici ma, il criterio da seguire è che il metodo utilizzato sia idoneo all'obiettivo prefissato (*fit-for-purpose*) [1].

1.2 TECNICHE INNOVATIVE DI ESTRAZIONE

Il processo di estrazione consiste nell'isolare gli analiti d'interesse da una matrice più o meno complessa, che può essere un semplice campione acquoso od uno più complesso di tipo alimentare o biologico e, come in precedenza detto, cui segue o è eseguito in simultanea (nelle tecniche più innovative) un successivo step di purificazione. Esistono un'infinità di tecniche diverse ma in linea di massima queste possono essere suddivise, in base alla modalità di contatto fra gli analiti e la fase estraente in: statiche, dinamiche e a regime mediato (estrazione tramite membrana) [1] (Figura 2). Il principio base, è la diversa ripartizione degli analiti fra il campione (in cui sono presenti originariamente) e la fase estraente, in base all'affinità che mostrano fra le due fasi, seguendo i principi della termodinamica e della cinetica [7]. Nonostante sia ancora esteso l'impiego di metodi estrattivi tradizionali che, di fatto, si oppongono alla normale evoluzione delle pratiche analitiche volte ad una miniaturizzazione e velocizzazione generale di tutto il sistema analitico, negli ultimi anni hanno preso sempre più piede tecniche estrattive innovative.



Figura 2. Semplificazione delle differenti tecniche d'estrazione in base alla modalità di contatto.

Quest'ultime permettono:

- impiego di limitati volumi di solventi organici;
- tempi d'esecuzione ridotti;
- analisi su piccole quantità di campioni;
- accoppiamento on-line con i rilevatori.

L'accoppiamento on-line prevede di eseguire in "simultanea" l'estrazione degli analiti, dalla matrice in cui sono dispersi e la determinazione analitica sia di tipo qualitativo che quantitativo. Se poi la strumentazione utilizzata per la rilevazione è di dimensioni accettabili e può essere trasportata con una certa facilità, si può eseguire contemporaneamente anche il campionamento, riducendo il tempo che intercorre fra questo step e l'analisi dei composti. Ciò permette di eseguire analisi molto veloci e di ridurre eventuali degradazioni/perdite degli analiti. Due tecniche estrattive che meritano attenzione in tal senso sono la MIMS e la MEPS, entrambe impiegate nel progetto di dottorato per i loro vantaggi d'utilizzo e d'efficienza.

1.2.1 MEMBRANE INTRODUCTION MASS SPECTROMETRY (MIMS)

La MIMS è una tecnica estrattiva-purificativa che non richiede separazione cromatografica pre-analizzatore e che, per diversi decenni, è stata usata come metodo di monitoraggio diretto di composti organici provenienti da campioni ambientali come aria ed acqua tramite l'impiego dello spettrometro di massa [8,9]. Tale tecnica è, infatti, utile in applicazioni di tipo ambientale e ha assunto sempre più importanza nell'ambito analitico [10,11] soprattutto per analisi on-line ed in-situ. Ultimamente il range d'applicazione della MIMS si è spostato anche in

ambito agro-alimentare e biologico. La membrana agisce come una barriera semipermeabile che trattiene all'esterno la matrice e tutte le sostanze interferenti e permette il passaggio degli analiti pre-concentrandoli. Questo movimento, in prossimità della membrana, è governato dalla legge di Fick, detta anche legge di diffusione [12] ed è correlata alle proprietà intrinseche delle molecole da estrarre come la relativa solubilità degli analiti nel campione rispetto alla membrana e alla magnitudo del coefficiente di ripartizione. Il flusso di massa attraverso una membrana monodimensionale è descritto dalla seguente equazione (Eq.1):

$$\frac{dM}{dt} = \frac{D \times A \times (K_1 \times C_1 - K_2 \times C_2)}{h} \quad (1)$$

dove:

- dM/dt è la velocità di assorbimento;
- D è il coefficiente di diffusione e dipende dalle caratteristiche chimico-fisiche della sostanza e dalla viscosità della soluzione;
- A è la superficie della membrana a contatto con il campione;
- K_1 è il coefficiente di ripartizione degli analiti fra la membrana e fase donatrice;
- C_1 è la concentrazione della sostanza nella fase donatrice;
- K_2 è il coefficiente di partizione della molecola tra membrana e fase accettrice;
- C_2 è la concentrazione della molecola nella fase accettrice;
- h è lo spessore della membrana.

Considerando la fase accettrice come infinita e considerando pertanto C_2 molto minore di C_1 , Si può semplificare la formula come qui di seguito:

$$\frac{dM}{dt} = \frac{D \times A \times k_1 \times C_1}{h} \quad (2)$$

In generale risulta che il flusso di massa attraverso una membrana semipermeabile è direttamente proporzionale alla superficie di membrana, alla concentrazione degli analiti nel campione, al coefficiente di ripartizione e al coefficiente di diffusione mentre, è inversamente proporzionale allo spessore della membrana ottenendo che, membrane più sottili incrementano il flusso degli analiti e riducono il tempo di risposta da parte del rilevatore. Il processo è schematizzato nella Figura 3.

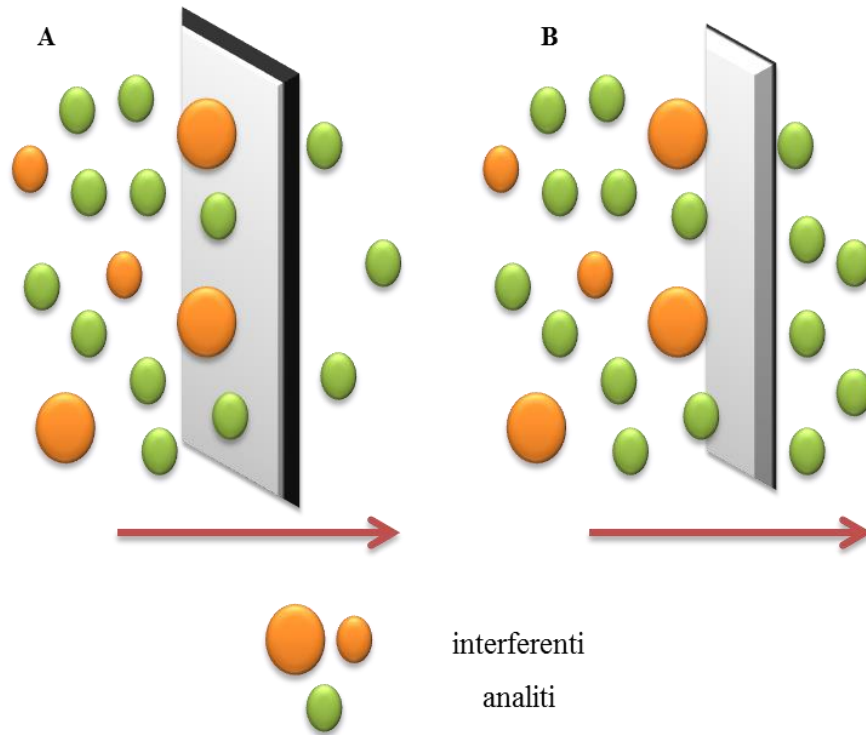


Figura 3. Schema di un'estrazione selettiva mediata da membrana monodimensionale. A) membrana a maggior spessore, B) membrana più sottile.

Poiché la MIMS lavora sotto flusso continuo (come detto prima la fase accettrice tende all'infinito) si può usare un approccio on-line per seguire le variazioni delle concentrazioni degli analiti. Il monitoraggio on-line è limitato dal tempo richiesto per attraversare la membrana, è correlato alla cinetica di trasporto ed è funzionale al coefficiente di diffusione [12] ottenendo l'equazione numero 3:

$$t(10 - 90\%) = \frac{l^2}{D}$$

Fattori estrinseci correlati all'interfaccia come: materiale usato, dimensioni dell'apparato, temperatura e pressione, giocano un ruolo importante nel fenomeno di diffusione e possono essere variati secondo necessità per incrementare la sensibilità, la selettività ed il tempo dell'analisi. Numerose sono le tipologie della MIMS, sia per quanto riguarda la natura della membrana (solitamente SiliconeTM), sia la natura della fase accettrice, sia il rilevatore impiegato [13-15]. Il primo prototipo della MIMS era composto da: poli-dimetil-silossano come materiale siliconico, elio (He) come fase accettrice (*gaseous phase*, GP) e un MS ad ionizzazione elettronica come rilevatore. La prima applicazione della GP-MIMS MS-EI, è stata la determinazione di composti organici volatili (VOCs) in matrici ambientali [13,14]. I Limiti di Rilevabilità (LODs) delle prime analisi però non erano ottimali ma, grazie a successive modifiche dell'apparato come la riduzione dello spessore della membrana siliconica, è stato possibile abbassarne i valori fino a parti per trilione e quadrilione (ppt e ppq), così come di ridurre il tempo di risposta ed aumentare la specificità d'analisi [16,17]. Un limite d'applicazione della GP-MIMS è nella natura dei composti da analizzare. Questi infatti, devono essere volatili o sufficientemente volatilizzabili per passare dalla fase donatrice alla fase accettrice (gas). Tale ostacolo è stato risolto per i composti semivolatili, aggiungendo un riscaldatore nel lume della m26

embrana (*hollow fibre membrane*, HFM). Per i composti non volatili invece, è stato necessario cambiare la natura della fase accettrice ovvero usarne una liquida (*condensed phase*) CP.

1.2.1.1 CONDENSED PHASE MIMS (CP-MIMS)

Come in precedenza detto, i composti con bassa tensione di vapore, sono difficili da analizzare mediante GP-MIMS. Inoltre, il passaggio degli analiti attraverso la membrana nel gas di trasporto avviene per dissipazione, guidato solo dal gradiente di concentrazione fra la fase donatrice e quella accettrice. La sostituzione della fase gassosa con un solvente liquido e un'appropriata tecnica di ionizzazione a pressione atmosferica come l'*atmospheric pressure chemical ionization* (APCI) e l'*electrospray* (ESI) [18,19], ha permesso un rapido ampliamento dell'impiego della MIMS ad un ampio range di sostanze diverse non volatili, inclusi contaminanti polari, composti farmaceutici e molecole biologiche. Nel corso degli anni sono stati testati diversi materiali siliconici con altrettanti diversi spessori. Il poli-dimetil-silossano, con uno spessore variabile (a seconda della necessità) dai 30 ai 300 µm, è stato il migliore in termini di costi (molto economico), resistenza (la membrana se trattata correttamente può durare anche anni) e selettività nei confronti degli analiti (trattenendo fuori acqua e sali che inficerebbero l'efficienza stessa della ionizzazione). Il *carry over* del sistema invece, può essere semplicemente ridotto, o addirittura eliminato, tramite un corretto ciclo di lavaggio della membrana in solvente organico (metanolo, MeOH). Per quanto riguarda lo spessore si è visto che l'efficacia estrattiva è

inversamente proporzionale allo spessore della membrana, ovvero più è sottile più la quantità di analiti che l'attraversano è maggiore, fino però ad un certo limite, poiché se troppo sottile (circa 10 μm) [20] si ha una cospicua permeazione di acqua e sali. Inoltre più è sottile più è fragile, con possibile formazione di veri e propri "buchi" sulla membrana anche se, negli ultimi anni si è riusciti ad utilizzare PDMS HFM con uno spessore fino ai 500 nm, con riduzione del tempo d'uscita del segnale (circa 1 minuti, quindi 10 volte più veloce rispetto ad una membrana con spessore di 200 μm) e del LOQ (limite di quantificazione) [21]. L'impiego di una membrana così sottile è reso possibile dalla miniaturizzazione del supporto metallico e dalla possibilità di splittaggio della fase accettrice, riducendo il flusso dall'ordine dei microlitri/min a quello dei nanolitri/min. A sua volta questo ha permesso analisi quantitative in piccolissime quantità di campione (es. 400 μL) così come analisi on-line, in situ ed in vivo [22]. Il supporto metallico è detto *J-probe* e per la sua preparazione occorre seguire minuziosamente la procedura facendo soprattutto attenzione a mantenere pervi e senza bordi affilati le estremità di metallo tagliate, soprattutto quelle su cui verrà posta la membrana. Infatti eventuali irregolarità potrebbero danneggiarla. La membrana o va inserita (se ha uno spessore di 500 nm) all'interno del tubo di metallo e bloccata con della colla epossidica, oppure per spessori maggiori (dai 500 nm ai 170 μm) si fa in modo che il tubo di metallo entri nella membrana per almeno qualche millimetro. La lunghezza della membrana libera di entrare in contatto con il campione è invece di 2-3 cm. Il supporto metallico è costituito interamente d'acciaio con un diametro interno di 0,25 mm (Figura 4) [21]. La fase accettrice è costituita da un solvente organico meno polare dell'acqua e più affine agli analiti (di solito MeOH), che viene spinto nel supporto d'acciaio e quindi nella membrana siliconica mediante una pompa peristaltica.

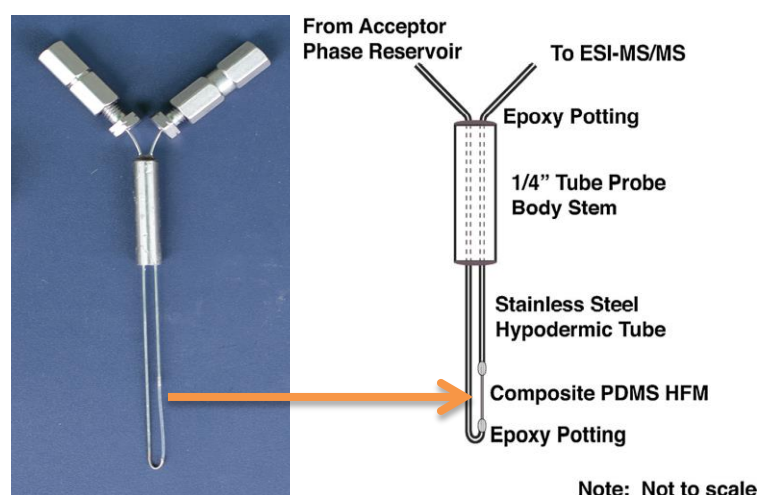


Figura 4: Disegno schematico del supporto metallico.

Da qui poi entrerà nello spettrometro di massa. Per facilitare il passaggio degli analiti, il campione viene mantenuto sotto agitazione continua ed un flusso di He viene fatto gorgogliare nella fase accettrice per eliminare eventuali bolle d'aria che aumenterebbero il rumore di fondo dell'analisi spettrometrica. I vantaggi di tale tecnica risultano perciò essere:

- Analisi dirette di campioni complessi, senza step di preparazione del campione;
- Analisi in tempo reale, con possibili monitoraggi in loco;
- Ridotto effetto matrice;
- Tecnica di rilevamento sensibile per campioni complessi ed in piccole quantità;
- Strumentazione a costi ridotti.

1.2.2 MICROEXTRACTION BY PACKED SORBENT (MEPS)

La MEPS è una tecnica innovativa nel campo della preparazione del campione, introdotta da Abdel-Rehim nei primi anni 2000 [23-24]. Essa combina il campionamento, l'estrazione e la purificazione degli analiti in un unico passaggio completamente automatico, eliminando eventuali errori manuali da parte dell'operatore. Si può poi decidere di iniettare l'estratto nell'apparato cromatografico (GC o LC) in un secondo momento, modalità off-line, o sequenzialmente all'estrazione collegando la MEPS ad un auto campionatore [25-28], modalità on-line (Figura 5).

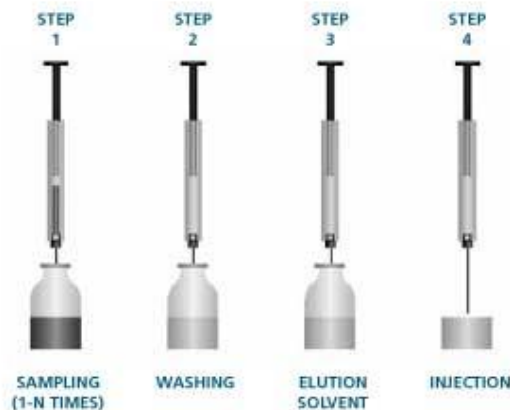


Figura 5. Procedura schematica MEPS [29].

La MEPS è uno sviluppo miniaturizzato dell'estrazione in fase solida (SPE) in cui la fase adsorbente (circa 2 mg) viene termo-impaccata all'interno di una siringa, sotto forma di cartuccia posizionata fra l'ago e lo stantuffo (Figura 6). Sono commercialmente disponibili diverse tipologie di fase stazionaria come quella a fase inversa (C8, C18 e C2), a fase normale (SiOH, Mg₂SiO₃, Al₂O₃) o a scambio ionico, tale da estendere l'uso della MEPS ad un ampio range di analiti (nonostante sia comunque inferiore rispetto a quello coperto dalla tecnica SPE). Inoltre le cartucce adsorbenti possono essere usate molte volte, circa 100 per campioni biologici e fino a 400 per campioni acquosi [30], prima di perdere la capacità estrattiva. Ovviamente occorre eseguire i giusti cicli di lavaggio e ricondizionamento per mantenere integra la cartuccia ed evitare il fenomeno del *carry over*.

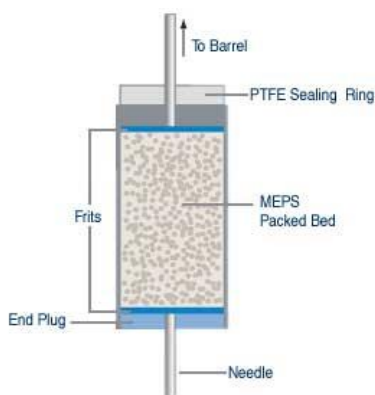


Figura 6. Rappresentazione della fase stazionaria all'interno dell'apparato MEPS [29].

Questo è un grande vantaggio rispetto alle cartucce SPE, per le quali si raccomanda una sola estrazione. Data la miniaturizzazione del sistema e della fase stazionaria, anche la quantità di solvente organico impiegato è estremamente ridotta. Le siringhe mostrano un intervallo di volumi che vanno dai 5 ai 1000 µL, ed è proprio questa miniaturizzazione del sistema che ha permesso l'accoppiamento on-line di tale tecnica con la cromatografia. Comparata con altre tecniche quali la SPE, la MEPS riduce quindi i tempi di preparazione del campione ed il consumo di solvente organico. Risulta essere anche più robusta ed è meno influenzata dalla natura della matrice del campione (come plasma ed urina). Nonostante ciò anche la MEPS evidenzia alcuni problemi, come la formazione di bolle, se il *Purge* ed il *Prime* (condizionamento in base alla natura del solvente) della cartuccia non vengono eseguiti in maniera opportuna. Si può presentare poi qualche problema nel connettere la MEPS in modalità on-line all'apparato cromatografico, poiché non è sempre compatibile con tutti i macchinari. Per quanto riguarda invece la modalità off-line, ai fini dei recuperi, occorre fare attenzione alla

velocità di aspirazione e di rilascio. Infatti una velocità troppo sostenuta non permette l'adsorbimento degli analiti con risultati scadenti ed irriproducibili.

2. NANO-HPLC

Un efficace metodo di separazione deve essere in grado di separare una miscela costituita da un gran numero di composti anche molto simili fra loro, oltre che dare informazioni sia di tipo qualitativo sia quantitativo. In questi termini la HPLC risulta essere una delle tecniche separative più efficienti [31]. Per questa ragione i metodi d'analisi basati sul suo impiego a più di 70 anni dalla sua ideazione sono aumentati esponenzialmente. Gli inventori di questa cromatografia, Martine e Synge (1941) [32], ritenevano che più erano piccole le particelle che componevano la fase stazionaria (FS), più l'efficienza separativa fosse elevata ma, per lavorare con una FS così impaccata erano necessarie pressioni molto elevate tali da forzare letteralmente la FM attraverso la colonna. Si spiega così perché l'acronimo HPLC spesso venga tradotto "erroneamente" con *High Pressure Liquid Chromatography*. Tale tecnica, negli ultimi decenni ha subito numerosi cambiamenti che in particolar modo hanno interessato la chimica e la struttura delle colonne cromatografiche, l'automatizzazione dell'analisi ed i rilevatori interfacciati al sistema. In particolar modo, questi cambiamenti si sono indirizzati verso una miniaturizzazione del sistema, con incremento della sensibilità, e verso un'accelerazione del processo analitico, con aumento della produttività (Figura 7) [33].

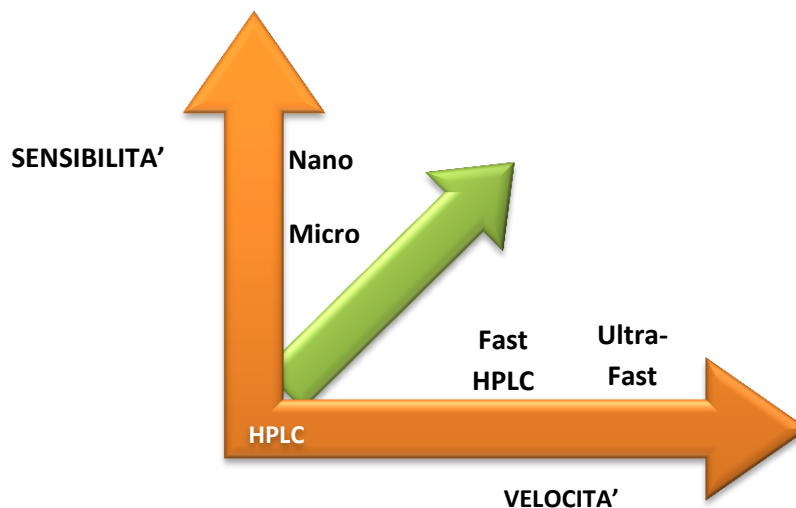


Figura 7. Tendenza di sviluppo della HPLC.

La performance di una colonna può essere misurata in termini di Altezza Equivalente dei Piatti Teorici (HETP o H) calcolata tenendo in considerazione la lunghezza della colonna (L) e l'efficienza della colonna medesima o il numero dei piatti teorici (N) secondo la formula 4. "N" a sua volta è ottenuto dal tempo di ritenzione (Tr) e dalla deviazione standard del picco cromatografico. Per cui maggiore è la lunghezza della colonna maggiore sarà il numero dei piatti teorici in essa contenuti.

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

4)

Un recente sviluppo dell'HPLC è l'UHPLC acronimo di *Ultra High Performance Liquid Chromatography*, una tecnica innovativa che ha incrementato la velocità, la sensibilità e la risoluzione cromatografica [34,35]. Come per l'HPLC anche l'UHPLC prevede la cromatografia in fase normale, in fase inversa, a scambio ionico e a setaccio molecolare, ma a differenza della prima di cui conserva i principi teorici, l'innovazione è incentrata totalmente sulla FS ovvero sulla sua chimica, sulla sua granulometria (inferiore ai 2 µm) e sulle modalità d'impaccamento. Ciò ha permesso di lavorare con colonne più corte o con velocità di flusso maggiore pur mantenendo un'elevata efficienza cromatografica. Un esempio di nuova particella impiegata nell'impaccamento di colonne UHPLC a fase inversa è un ibrido di silice derivatizzata con molecole C18 dal diametro di 1,7 µm [33] ma ne esistono tante altre tipologie, a seconda dell'utilizzo che si desidera farne. Proseguendo verso una miniaturizzazione del sistema si è arrivati alla nano-HPLC e poi con l'introduzione della UHPLC anche alla nano-UHPLC. Si è infatti visto che un diametro maggiore delle colonne (convenzionalmente una colonna HPLC ha un diametro interno di 4,6 mm) non è indice di maggior efficienza separativa come potrebbe esserlo la lunghezza, ma anzi si avevano performance inferiori rispetto a colonne con un diametro interno (i.d.) più piccolo.

2.1 PROCESSO DI MINIATURIZZAZIONE

Karlsson e Novotny [36] impaccarono semplici capillari di silice fusa con diametri diversi comparando l'efficienza separativa ottenuta dai diversi test eseguiti con rivelatori a fluorescenza. Notarono che al diminuire del diametro si riduceva la larghezza della banda cromatografica e aumentava il numero dei piatti teorici, con conseguente incremento dell'efficienza separativa. Essi ottennero il miglior risultato con un capillare da 44 µm di diametro interno. La riduzione del diametro delle colonne ha permesso di ridurre considerevolmente la quantità di FM necessaria durante il processo cromatografico, poiché tale quantità diminuisce in base al

diametro al quadrato della colonna e ciò ha ripercussioni analitiche positive quali una minor diluizione cromatografica (D) del campione, e la necessità conseguente di soluzioni meno concentrate per le analisi. “ D ” aumenta al quadrato del raggio e alla radice quadrata della lunghezza della colonna, sottolineando l’importanza del calibro di quest’ultima. La formula 5 è esplicativa in tal senso:

$$D = \frac{[\varepsilon\pi r^2(1+k)\sqrt{2\pi LH}]}{V_{inj}} \quad (5)$$

- ε : porosità FS;
- r : raggio colonna;
- k : fattore di ritenzione;
- L : lunghezza colonna;
- H o HETP: altezza equivalente dei piatti teorici;
- V_{inj} : volume soluzione iniettata.

Il tutto è riassumibile nel rapporto fra la C_i (concentrazione del campione iniettato) e la C_{max} (ovvero la concentrazione del campione nel vertice del picco cromatografico):

$$D = \frac{C_i}{C_{max}} \quad (6)$$

Per cui considerando che le colonne HPLC hanno convenzionalmente un diametro interno (*internal diameter*, i.d.) di 4,6 mm mentre quelle nano di 75 μm (Tabella 1), si ha un incremento della sensibilità cromatografica. L’aumento della sensibilità permette di ridurre il rumore migliorando il rapporto S/N (segnale/rumore di fondo) che a sua volta si traduce in un abbassamento dei limiti di rilevabilità (LODs) e di quantificazione (LOQs). Alla riduzione del diametro della colonna, segue una riduzione del flusso operativo dall’ordine dei millilitri (mL)/min ai nanolitri (nL)/min. Questo necessita un riadattamento di tutto il sistema HPLC: volume di iniezione, connessioni, tipologia d’impaccamento e sistemi di per ridurre il flusso di fase mobile etc. Importante è stata la miniaturizzazione delle connessioni tali da resistere ad elevate pressioni ed evitare volumi morti che inficerebbero i risultati [37]. Prendendo in considerazione colonne da 75 μm i.d. (375 μm e.d. x 150 mm) e flusso tra i 300-400 nL/min, le connessioni ottimali sono state quelle da 10-20 μm i.d.

Tipologia HPLC	Diametro interno	Range di flusso operativo
HPLC preparativa	> 10 mm	> 20 mL/min
HPLC standard	4 – 5 mm	1 – 10 mL/min
HPLC micro	1 – 2 mm	50 – 100 μ L/min
HPLC capillare	100 – 1000 μ m	0,4 – 200 μ L/min
HPLC nano	25 – 100 μ m	24 – 4000 nL/min

Tabella 1. Suddivisione sistemi HPLC, i.d. colonne e flussi operativi.

Solitamente, dato che tali capillari sono estremamente sottili (375 μ m di diametro esterno) vengono anche usate degli inserti di PEEK® (polietere-etero-chetone) che posti nelle connessioni creano una compressione sul capillare tale da indurre una maggior tenuta del collegamento evitando perdite, volumi morti o che il capillare stesso venga espulso per le elevate contropressioni. Tali connessioni composte da una punta (*ferrule*) ed una vite con dado (*nut*) sono solitamente costituite dello stesso materiale (entrambe d'acciaio o di PEEK). Questi collegamenti non sono ottimali per la nano-UHPLC, per la quale sono state sviluppate delle connessioni *fingertight* (come le *nanoViper* della *Thermo Scientific*) che sono fissate al capillare medesimo e sono certificate a volumi morti nulli e resistenti fino a pressioni di 1000 bar (Figura 8).

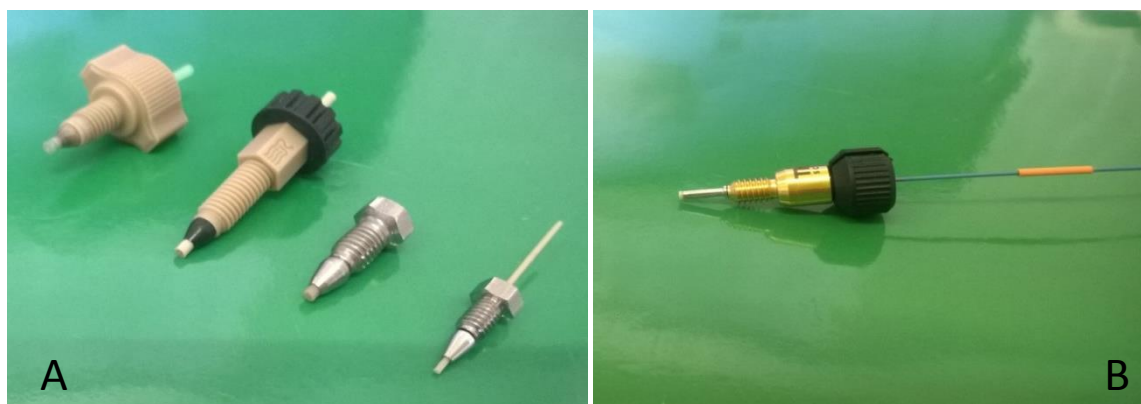


Figura 8. A) Connessioni da 1/16" e 1/32" sia di PEEK sia d'acciaio tipiche per nano HPLC. B) Connessione nano Viper da 1/32" con capillare, per nano-UHPLC.

Per generare flussi così ridotti e gradienti riproducibili occorrono dei “sistemi dedicati”, alcuni prevedono l’impiego di sistemi di splittaggio della FM, altri no. I tre sistemi fondamentali sono: splittaggio passivo, splittaggio attivo, e senza splittaggio, in ordine di comparsa [37]. Il primo prevede di ridurre la FM dividendo il flusso fra la colonna ed un restrittore, le cui dimensioni di lunghezza e diametro interno determinano il rapporto di splittaggio. In tal caso qualsiasi variazione di viscosità, creata da una diversa composizione della FM, o resistenza creata dalla colonna portano ad una variazione del rapporto di splittaggio e in ultima analisi ad un flusso poco stabile e poco riproducibile. Perciò si è passati al sistema di splittaggio attivo che permette flussi più stabili dato che, regola la pressione della pompa in base alla variazione della viscosità. Tutta la FM splittata, ovvero quella che non entra in colonna, viene raccolta in un *scarico* ed eliminata. Questo comporta un considerevole inquinamento e notevoli sprechi. Il sistema si è così evoluto verso la tipologia *splitless* (senza split) a sua volta distinto in altri due modelli: *continuous flow* e *solvent refill*. Il primo prevede l’impiego di pompe a due pistoni che garantiscono un flusso continuo poiché mentre un pistone spinge la FM, l’altro la ricarica, con una precisione tale da garantire flussi stabili fino a 50-100 nL/min. L’altro sistema *splitless* invece sfrutta pompe a siringa o pneumatiche con un’unica camera interna ed una valvola che permette di passare dalla modalità d’aspirazione a quella di dispensazione in modo automatico. Il range di flussi operativi è maggiore rispetto al precedente sistema ma, in questo caso, si ha interruzione del flusso in colonna [37] in fase di ricarica. In penultima analisi occorre prendere in considerazione come è stato modificato il sistema di iniezione del campione. Si può iniettare direttamente il campione come in un HPLC convenzionale, ma rimane il problema del basso volume di iniezione e di un’eventuale introduzione di sostanze interferenti. Per ovviare a ciò sono state elaborate diverse strategie [37] quali l’iniezione diretta in *large-volume injection* utilizzando degli specifici accorgimenti, la pre-concentrazione in modalità off-line e la pre-concentrazione in modalità on-line, mediante una pre-colonna che funge da trappola (Figura 9). La prima modalità prevede un caricamento diretto del campione, anche di volumi piuttosto grandi. Occorre però fare attenzione in caso di campioni sporchi e/o complessi poiché se non trattati con accuratezza possono portare ad un’occlusione parziale o totale della colonna. La seconda modalità prevede la riduzione del volume del campione portandolo a secco o liofilizzandolo; in taluni casi si esegue anche uno step di desalazione. Da qui l’uso della trappola pre-colonna che permette di caricare fino a 100 µL e di lavare il campione prima dell’introduzione in colonna. Esistono due tipologie di trappole: *vented column* e *switching column*. Il primo sistema prevede una valvola dopo la trappola che devia il flusso di FM nello scarico durante il caricamento del campione in colonna. Questo sistema è di solito accoppiato ai sistemi di splittaggio passivo poiché la valvola viene usata anche per lo split. Lo svantaggio è che si ha una momentanea interruzione del flusso che, in caso di accoppiamento con uno spettrometro di massa con interfaccia elettrospray, comporta una riduzione dello spray. La seconda configurazione invece richiede due pompe che lavorano in simultanea, una è una nano-pompa che permette un flusso continuo della

FM in colonna, l'altra invece è una pompa di caricamento che lavora a flussi più elevati ed è in linea con la trappola pre-colonna. Il solvente spinto in quest'ultima permette la purificazione del campione venendo poi raccolto in uno scarico. La trappola in questo caso è montata su una valvola dopo la pompa di caricamento e al cambio di posizione da caricamento ad iniezione si ha il collegamento della nano-pompa con la trappola permettendo l'entrata degli analiti nella colonna e la loro successiva separazione [37]. Lo svantaggio di tale tecnica rimane la possibile perdita di analiti all'interno della trappola senza elevate contropressioni ed interruzioni di flusso tipiche della modalità *vented column*. L'ultimo punto da prendere in visione per chiarire il processo di miniaturizzazione dell'apparato cromatografico, è quello dell'impaccamento delle colonne. Per le colonne nano, con un diametro inferiore ai 100 μm , il protocollo di impaccamento è stato messo a punto solo negli ultimi 20 anni. Nonostante diverse tipologie di nano-colonne siano reperibili in commercio, ancora numerosi laboratori tendono ad impaccare le colonne in loco. La tecnica di impaccamento maggiormente impiegata è quello dello *slurry packing*. Essa consiste nella preparazione di una miscela di FS/solvente organico m/v in rapporto 3:1, chiamata *slurry*, versata in un *reservoir*, e da qui spinto mediante una pompa insieme al solvente dentro un capillare di silice alla cui estremità finale era già stato sintetizzato il *frit* per trattenere la FS. Dato l'elevato grado di polimerizzazione dello *slurry*, il processo d'impaccamento richiede l'impiego di ultrasuoni, per rendere omogenea la disposizione delle particelle di FS ed una pompa pneumatica o reciprocante a pressione costante con la quale si può regolare il flusso di solvente. Il flusso durante l'impaccamento va infatti aumentato mantenendo costante la pressione intorno ai 300 bar e va diminuito gradualmente a fine processo. Una modifica necessaria per trattenere le piccole particelle della FS è la sostituzione del classico *frit* d'acciaio di una colonna HPLC con uno sintetizzato direttamente all'interno del capillare di silice prima del processo di impaccamento (Figura 10). Questo per evitare volumi morti che inficerebbero il risultato della separazione. Attualmente sono disponibili in commercio anche delle colonne monolitiche. In questo caso la FS viene polimerizzata direttamente dentro il capillare di silice ed aderendo alla superficie interna della colonna e non richiede l'impiego del *frit* [37]. Considerato quanto esposto sopra, nonostante alcuni problemi rappresentati da un apparato nano quali la delicatezza del sistema e la possibilità di occlusione della colonna, possiamo dire che la nano-HPLC pur basandosi sugli stessi principi della HPLC tradizionale evidenzia notevoli vantaggi in più rispetto a quest'ultima, quali:

1. Sensibilità maggiore;
2. Riduzione consumo solventi;
3. Analisi di campioni a ridotti volumi;
4. Aumento della risoluzione cromatografica e dell'efficienza separativa;
5. Accoppiamento con spettrometri di massa.

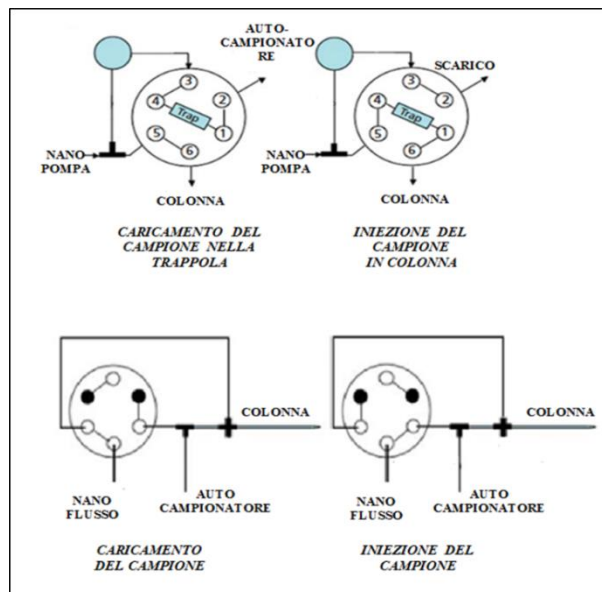


Figura 9. Rappresentazione schematica di due sistemi d'introduzione del campione con la differenza fra la fase di caricamento e di iniezione. A) switching column e B) vented column [38].

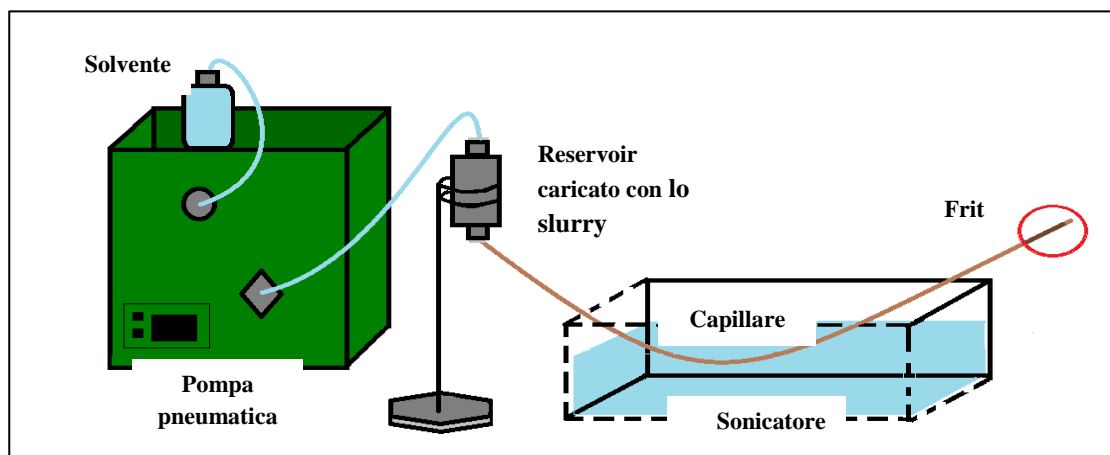


Figura 10. Rappresentazione schematica dell'apparato per l'impaccamento con tecnica dello Slurry Packing.

3. RIVELATORI ACCOPPIATI ALLA HPLC

Il punto focale della chimica analitica è ottenere sempre più bassi limiti di rivelazione in matrici biologiche, ambientali ed alimentari anche molto complesse. Per realizzare quest'obiettivo il ruolo del rivelatore o più comunemente *detector*, è di fondamentale importanza. Come menzionato nel precedente capitolo è noto che la sensibilità aumenta al diminuire del diametro della colonna e all'aumentare della sua lunghezza, ma dato il piccolo volume iniettato, la diluizione cromatografica influisce notevolmente sulla sensibilità. Per ovviare a quest'ostacolo l'uso di un appropriato detector è di fondamentale importanza e nonostante la tecnica di rivelamento più sensibile ed efficiente sia la spettrometria di massa, tecniche di rivelazione basate sull'assorbimento UV-Vis, la fluorescenza o l'elettrochimica sono tuttora usate nell'80% dei laboratori, per la semplicità d'impiego e i bassi costi [39]. Nella scelta del detector occorre tenere quindi in considerazione numerosi fattori oltre alla sensibilità, ovvero: l'intervallo di linearità, il volume della cella di rivelamento e la preservazione del campione.

3.1 RIVELATORI UV-VIS

Tra queste tecniche, una delle più utilizzate in accoppiamento con la HPLC è l'assorbimento UV-Vis.- tale rivelatore si basa sulla legge di Lambert-Beer secondo cui la quantità di luce adsorbita da un composto è correlata alla sua natura chimica, alla sua concentrazione e al mezzo attraversato (formula 7):

$$I_{tr} = I_0 \times 10^{-\epsilon lc} \quad ; \quad A = \epsilon lc \quad (7)$$

- I_{tr} è la luce trasmessa attraverso la soluzione;
- I_0 è la luce incidente;
- ϵ è il coefficiente d'assorbimento;
- l è la lunghezza della cella
- c è la concentrazione della soluzione
- A è l'assorbimento (direttamente proporzionale a l e a c)

La variazione di A con la lunghezza d'onda (λ) è conosciuta come spettro di assorbimento, e varia fra composti diversi tanto che è usata come elemento discriminante per identificarli. Per un dato composto, l'assorbimento ad

una singola λ varia in modo lineare con la concentrazione. La maggior parte dei composti assorbono nella regione dell'UV per cui il rivelatore è di largo impiego benché non sia universale [40]. La scelta del solvente può avere un ruolo importante nell'analisi e conoscere la lunghezza d'onda cui risponde è importante per impostare il *cut-off* dello strumento. I valori di *cut-off* a lunghezza d'onda cui assorbono alcuni dei più comuni solventi organici sono riportati in Tabella 2.

Solvente	UV cut off (nm)
Acetonitrile	190
Diclorometano	233
Etil-Acetato	256
n-Esano	192
Metanolo	205
Isopropanolo	205
Acqua	<190
Acido trifluoro-acetico al 0,1%	210
Fosfato di potassio, pH7,2 al 0,1%	200
Sodio citrato 10 mM	225
NaCl 1 M	208

Tabella 2. Tipici *cut-off* di alcuni dei più comuni solventi organici in HPLC.

Un tipico rilevatore UV-Vis prevede l'impiego di una o più lampade in modo da coprire l'intero spettro delle lunghezze d'onda. Per esempio si può utilizzare una singola lampada a deuterio ricoprendo gli spettri dai 190 ai 600 nm, o una doppia lampada a deuterio e tungsteno o alogena tale da arrivare a coprire i 900 nm. L'impiego di una sola lampada permette d'avere uno schema ottico dello strumento più semplice, ma non viene coperto l'intero campo spettrale. Importante per un detector UV-Vis è anche la geometria della cella di rilevamento, che influenza in particolare la sensibilità. Infatti la lunghezza del cammino ottico è direttamente proporzionale all'assorbanza, per cui un suo aumento comporta un miglioramento dei LODs e dei LOQs. Comunque, tale aumento deve essere bilanciato mantenendo il volume della cella sufficientemente piccolo tale da non indurre un allargamento della banda cromatografica. Ne consegue che la maggior parte dei detector UV-Vis, in particolare quelli interfacciati ad una nano-HPLC usano una cella a Z come mostrato in Figura 11. Queste celle incrementano notevolmente la sensibilità ma, se l'area di incrocio è troppo piccola possono nascere altri problemi come l'aumento del rumore di fondo, così come occorre fare attenzione durante la loro

progettazione a non creare volumi morti o interruzioni di flusso a livello degli angoli fra l'ingresso del campione e l'uscita del campione con la cella medesima [41].

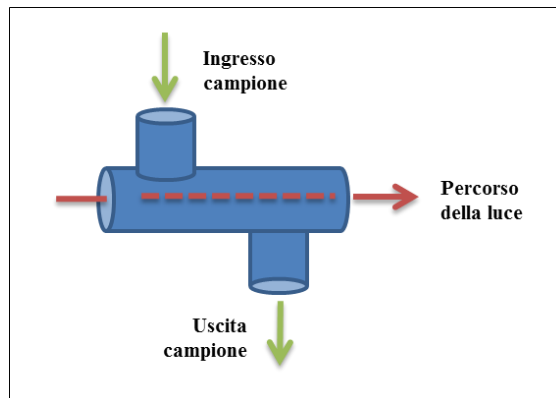


Figura 11. Rappresentazione schematica di una Z-cella di rilevamento in un detector UV-Vis.

Esistono due principali tipi di detector UV-Vis: quelli a λ fissa e quelli a λ variabile. Il primo tipo prevede una lampada a mercurio (Hg) che passa attraverso la cella di rilevamento ed arriva al fotodiodo. Qui l'intensità della luce assorbita è direttamente proporzionale alla concentrazione dell'analita. I vantaggi sono i bassi costi strumentali e l'elevata sensibilità per i composti che assorbono a 254 nm data la grande intensità della radiazione emessa. Lo svantaggio principale è invece che lavorando a λ fissa si ha bassa selettività. Dall'altro lato abbiamo la tipologia a λ variabile, quello maggiormente utilizzato in HPLC. Qui la luce proveniente da una lampada a deuterio viene scomposta nelle sue componenti tramite un monocromatore a gradini. Anche in questo caso, la luce trasmessa viene misurata attraverso un fotodiodo ed è proporzionale alla concentrazione degli analiti. I vantaggi rispetto alla prima tipologia sono una maggior versatilità d'impiego potendo coprire a seconda della lampada tutto il campo spettrale, una maggior sensibilità potendo impostare la λ ottimale cui gli analiti rispondono ed una più elevata selettività potendo variare e lavorare in simultanea con λ diverse tali da discriminare sostanze diverse co-eluite assieme ma che assorbono a diverse λ , e in ultimo ma non meno importante si può lavorare in gradiente, spiegandone il maggior utilizzo in HPLC. In realtà di detector UV-Vis a λ variabile ne esistono di due tipologie diverse: una tipologia in cui le λ impostate vengono selezionate mediante uno specchio o un reticolo regolabile che fa passare solo le lunghezze d'onda selezionate. In questo caso si può lavorare variando le lunghezze d'onda impostate in fase d'analisi o in modalità scan, ovvero scansionando tutte le λ , riducendo in questo caso la sensibilità e la risoluzione. La seconda tipologia invece utilizza un sensore a

serie di fotodiodi. Qui l'intero spettro viene focalizzato sulla cella di rilevamento e la luce trasmessa passa attraverso una fessura e in seguito viene dispersa attraverso una grata sulla prima serie di fotodiodi che registra l'assorbanza a più lunghezze d'onda in modo simultaneo. Sebbene tale detector sia più costoso rispetto alle altre tipologie appena descritte permette d'ottenere grafici tridimensionali in funzione dell'assorbanza, della λ e del tempo. [40].

3.2 INTERFACCE LC-MS

Lo spettrometro di massa è un dispositivo analitico che consente di misurare il rapporto massa su carica (m/z) di ioni in fase gas, da cui si può risalire al peso molecolare. La grande e veloce diffusione della spettrometria di massa si deve alla capacità di eseguire analisi di tipo qualitativo e quantitativo di un gran numero di analiti diversi, in matrici anche molto complesse. Per molto tempo la realizzazione di un'interfaccia LC-MS sembrava impossibile, al contrario dell'accoppiamento GC-MS, a causa dell'incompatibilità fra la natura dell'eluato cromatografico (liquido) ed il sistema interno della camera di ionizzazione sotto alto vuoto. I primi spettrometri di massa avevano infatti tutti la ionizzazione elettronica (EI). I tentativi iniziali d'interfacciamento risalgono ai primi anni '60 ma con scarsi risultati. E' solo dopo venti anni che si è riusciti a ionizzare molecole non volatili, cariche e polari, mediante tecniche di ionizzazione a pressione ambientale, che prevedevano l'uso di un elettrodo induttivo senza filamenti incandescenti. Da qui sono nate le attuali tecniche di ionizzazione a pressione atmosferiche note come API (*Atmospheric Pressure Ionization*) [41], un esempio di tecniche a ionizzazione "soft". Il termine *soft* fa riferimento alla quantità d'energia necessaria al processo di ionizzazione, non sufficiente ad indurre la frammentazione delle molecole (tipica della ionizzazione elettronica). L'importanza di tale invenzione fu tale che nel 2002 il Premio Nobel per la Chimica fu assegnato a John Fenn per aver inventato la tecnica di ionizzazione *elettrospray* (ESI), anche se i primi tentativi vennero avviati verso la meta degli anni '80 da Vestal [42]. La caratteristica di queste tecniche è di ionizzare e portare in fase gassosa molecole senza frammentarle, permettendo di studiare per esempio lo stato di *folding* delle proteine, i legami non covalenti e la doppia elica del DNA [33]. È stato possibile studiare molecole anche molto pesanti senza l'impiego di un analizzatore estremamente potente. In questo caso però, le informazioni ricavabili sono risultate esigue, circoscritte al PM. Per ottenere informazioni aggiuntive è necessario indurre frammentazione. Ciò ha spinto a sviluppare analizzatori in grado di indurla, quali spettrometri di massa tandem (triplo quadrupolo, QqQ) o strumenti dotati di una risoluzione elevata, quali: il tempo di volo (TOF) e l'orbitrap. Tra le tecniche API, oltre all'ESI, importante sono la Ionizzazione Chimica a Pressione Atmosferica (APCI) utilizzata in particolar modo per composti apolari (non analizzabili con l'ESI) a PM medio basso e non termolabili, e la

Fotoionizzazione a Pressione Atmosferica (APPI), introdotta come sviluppo delle altre due tecniche API per espandere ancor di più l'intervallo delle applicazioni a composti prettamente apolari. Ne risulta che la complementarità (Figura 12) tra la tecnica di ionizzazione elettronica (EI), accoppiata con GC, e le tecniche ESI, APCI e APPI, rende lo spettrometro di massa uno strumento analitico con cui poter analizzare qualitativamente e quantitativamente la quasi totalità delle sostanze organiche [33].

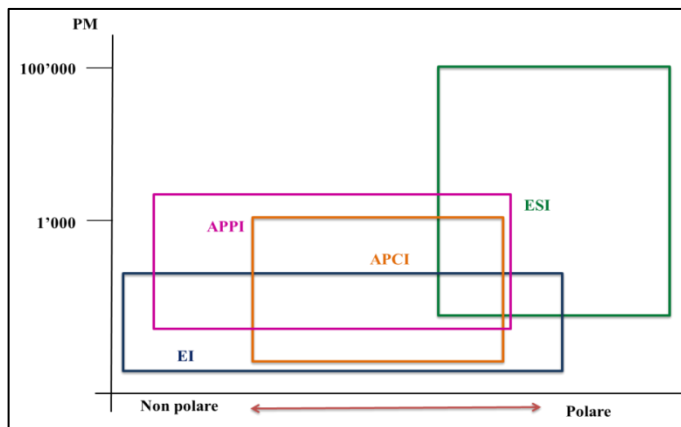


Figura 12. Range d'applicazione delle diverse sorgenti di ionizzazione.

3.2.1 INTERFACCIA ELETTROSPRAY

Dalla sua ideazione l'ESI è diventata la tecnica LC-MS preferita per la sua elevata sensibilità. La Figura 13 riporta lo schema del processo di ionizzazione. L'eluente cromatografico con un flusso dell'ordine dei microlitri/min passa in un capillare d'acciaio di diametro interno (i.d.) di 75-100 μm sulla cui punta viene applicato un potenziale elettrico. La differenza di potenziale fra la punta ed il contro-elettrodo è di qualche KV. In tal modo l'eluato contenente gli ioni passa in fase gassosa. Gli ioni si formano per lo più in fase liquida ma l'eccesso di H^+ che si forma dopo l'applicazione del potenziale genera un eccesso di cariche positive. Il primo step prevede la formazione del cono di Taylor da cui poi si genera un aerosol di goccioline cariche positivamente o negativamente in base al segno del potenziale applicato. Nel processo di nebulizzazione interviene anche un flusso coassiale di gas inerte quale l'azoto. Per analizzare determinati composti, spesso occorre aggiungere alla soluzione iniziale acidi o basi a seconda se si vuole operare in PI (*Positive Ionization*) o NI (*Negative Ionization*),

poiché le molecole da analizzare devono essere in forma ionica. Il secondo step invece prevede l'evaporazione del solvente tale da indurre un aumento della carica specifica delle goccioline precedentemente formate che, raggiunto il limite di repulsione coulombiana detto anche limite di Rayleigh, esplodono. Il processo si ripete fino a che dall'ultima esplosione vengono liberati gli ioni tal quali che, grazie al campo elettrico applicato, vengo spinti verso il polo di carica opposta. Un'altra teoria accreditata suggerisce che non vi è alcuna esplosione ma, una completa e graduale evaporazione del solvente fino a che gli ioni non siano completamente liberi. Il terzo step prevede così l'ingresso di questi ioni non solvatati in un cono campionatore e, attraverso uno *skimmer*, nell'analizzatore. Si passa così da una zona a pressione atmosferica che è quella dove avviene la nebulizzazione, ad una ad alto vuoto (analizzatore) [43-45]. Caratteristica di questa tecnica di ionizzazione è la formazione, per composti con elevato PM, di ioni multi carica $[M+nH]^{n+}$ o $[M-nH]^{n-}$ o di veri e propri addotti chimici con il sodio (Na^+), il potassio (K^+), lo ione ammonio (NH_4^+), il cloro (Cl^-) e l'acetato. Per quanto riguarda gli ioni multi carica questi portano ad ottenere uno spettro contenente più ioni molecolari in base al rapporto m/z (massa/carica) semplificabile mediante software matematici che risolvono tutti i segnali formati in un unico spettro di massa deconvoluto. Pur avendo bisogno di un processo di deconvoluzione per risalire al PM, la formazione di ioni multi carica permette di analizzare molecole molto grandi e pesanti anche se a disposizione si ha un analizzatore con un range di scansione m/z limitato [43-45]. Un problema dell'elettrospray sono i ME, accennato nel primo capitolo. Tale fenomeno consiste in un aumento o soppressione del segnale per la presenza di sostanze co-eluite insieme all'analita e non rimosse nel processo d'estrazione-purificazione o per cambiamenti nella composizione della FM. Tra tutte le interfacce API, l'ESI è quella che ne risente maggiormente dato che la ionizzazione avviene per lo più in fase liquida. Un aiuto nel minimizzare i ME, oltre a ottimizzare il più possibile l'intera procedura di preparazione del campione o a utilizzare costosi standard deuterati, è dato proprio dalla nanoHPLC, che grazie alla riduzione del flusso della FM e del volume della soluzione analizzata, riduce la quantità di possibili interferenti in fase d'analisi.

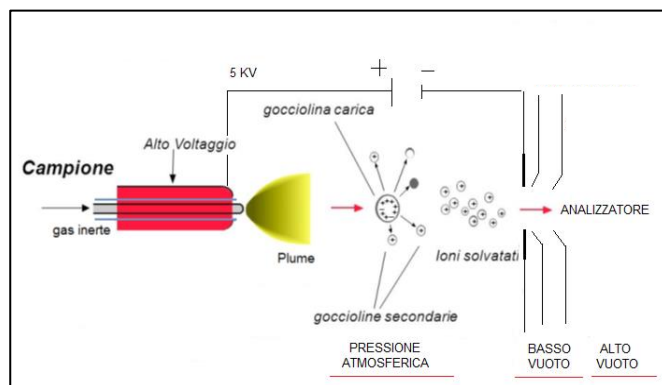


Figura 13. Rappresentazione schematica di una sorgente di ionizzazione elettrospray [46].

Inoltre flussi dell'ordine dei nanolitri/min permettono d'aumentare notevolmente l'efficienza di ionizzazione e di fatto i limiti strumentali. In particolare per ottimizzare l'unione della nanoHPLC con l'ESI si è sviluppato un'interfaccia alternativa, nanoESI, in cui si preferiscono usare capillari di silice piuttosto che di metallo e il potenziale viene applicato mediante un elettrodo a diretto contatto con la FM (*Liquid Junction*) oppure ricoprendo il capillare di materiale metallico conduttore come l'oro. Unico svantaggio è la breve resistenza della copertura in seguito all'applicazione della corrente.

3.2.2 INTERFACCIA APCI

L'interfaccia APCI è una tecnica di ionizzazione chimica in fase gassosa. È impiegata per l'analisi di sostanze poco polari e PM basso (< 1000 g/mol). Il principio di base (Figura 14) è la vaporizzazione del campione prima della ionizzazione, la quale avviene facendo passare l'eluato cromatografico in un capillare di metallo riscaldato (350-600 °C) con l'ausilio di un gas (aria o azoto). La combinazione dell'alta temperatura con il gas permette un'immediata vaporizzazione della miscela generando uno spray pneumatico. Lo spray così formato entrerà in una regione a pressione atmosferica dove è presente un ago, *ago corona*, sul cui apice viene applicato un potenziale di 5-6 kV. Si genera così una zona ad alta densità di cariche, positive o negative a seconda del potenziale elettrico applicato, che permetteranno la formazione dei cosiddetti *ioni primari* (N_2^+ , O_2^+ , H_2O^+ , NO^+ e O_2^- , O^- , NO_2^- , NO_3^- , O_3^- , CO_3^-) [47,48]. Questi ioni, cedono la propria carica alle molecole di solvente ionizzandole, *ioni reagenti*, che a loro volta trasferiranno la carica agli analiti d'interesse. Si formeranno così gli ioni molecolari d'interesse $[M + H]^+$ o $[M - H]^-$. Anche in questa tecnica di ionizzazione si possono avere ME, ma in misura minore rispetto all'ESI dato che la ionizzazione avviene in fase gas.

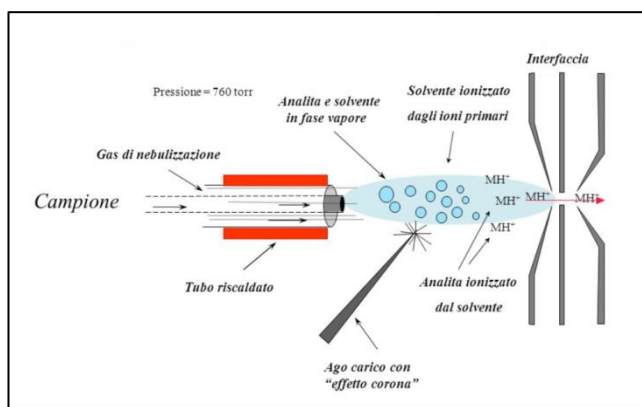


Figura 14: Rappresentazione schematica di una sorgente di ionizzazione APCI [46].

3.2.3 INTERFACCIA APPI

L'interfaccia APPI è stata introdotta di recente nel campo delle API per la ionizzazione di molecole apolari non analizzabili in ESI e/o APCI. Il principio di base prevede la ionizzazione mediante raggi UV delle molecole, portate già in fase gassosa mediante l'ausilio di elevate temperature e di un gas di nebulizzazione. La ionizzazione avviene all'interno di una camera a pressione atmosferica e la lampada impiegata è una *Vacuum Ultra Violet* (VUV) in grado d'emettere raggi UV con una lunghezza d'onda di 123,9 e 116,5 nm. L'energia messa in gioco, 10,3 e 10,64 eV rispettivamente, non è sufficiente per ionizzare le molecole di solvente, di gas o dell'aria e, la ionizzazione degli analiti avviene solo qualora l'energia delle radiazioni luminose, quindi dei fotoni, risulta essere maggiore dell'energia di ionizzazione degli analiti. Il risultato di questo primo passaggio (ionizzazione primaria) è la formazione degli ioni molecolari radicalici. È però necessario precisare che anche le molecole di solvente a volte possono essere ionizzate, poiché il loro numero è notevolmente maggiore rispetto a quello degli analiti, a parità di volume. Questo comporta una perdita d'efficienza di ionizzazione e di sensibilità dello strumento, che può essere ulteriormente aumentata da eventuali collisioni degli analiti, dato il piccolo volume in cui vengono ionizzati e l'assenza di vuoto spinto. Si vengono così a creare dei veri e propri meccanismi di trasferimento di carica che possono essere ridotti impiegando una sostanza fotosensibile, detta dopante, che viene ionizzata direttamente dai raggi UV e in seguito trasferisce la carica agli analiti d'interesse per reazioni secondarie. Alcuni esempi di composti dopanti, sono: benzene, acetone, toluene, tetraidrofurano, clorobenzene, bromobenzene) [49]. Esistono comunque due diverse geometrie dell'APPI, una in-linea ed una ortogonale (Figura 15 e 16). Il principio di funzionamento è il medesimo, cambia semplicemente la posizione del capillare e della lampada VUV rispetto all'ingresso dell'analizzatore. Ovvero, nella prima tipologia abbiamo che è la lampada posta ortogonalmente all'asse principale capillare-analizzatore, nella seconda invece è il capillare d'ingresso che è posto perpendicolarmente all'asse VUV-analizzatore [48]. Nella geometria in-linea è importante l'uso della sostanza dopante, portata nello strumento mediante un gas ausiliario. Nella geometria ortogonale invece, l'uso del dopante non è necessario, ma consigliato, poiché la posizione della lampada permette un'efficienza di ionizzazione maggiore [50]. Di recente è stata proposta una modifica dell'APPI che permette l'analisi di molecole polari, termolabili e non volatili come le proteine. Definita APECD (*Atmospheric Pressure Electron Capture Ionization*) tale sorgente ha permesso d'ampliare il range di molecole analizzabili con l'APPI, ottenendo i medesimi limiti dell'ESI (inferiori alle pico moli). Il principio base prevede in aggiunta ad un classico schema APPI, un nebulizzatore (*nebulizer o sprayer*) riscaldato in modo elettro-pneumatico [51].

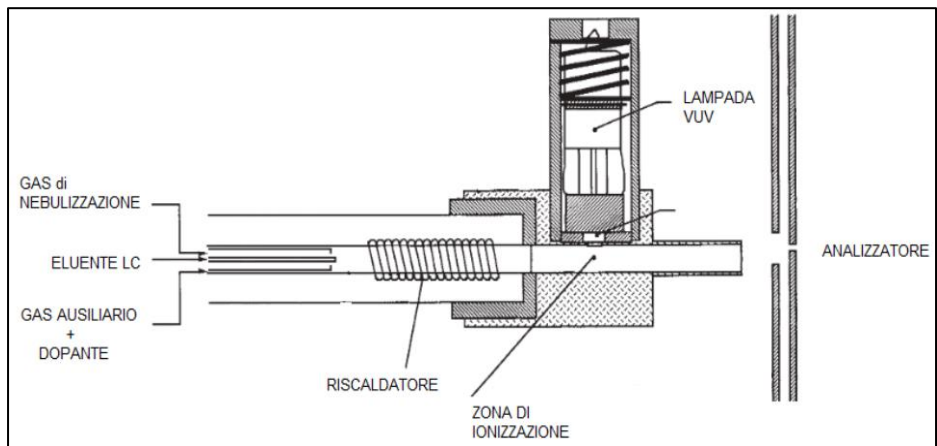


Figura 15. Diagramma schematico APPI con geometria in-linea [48].

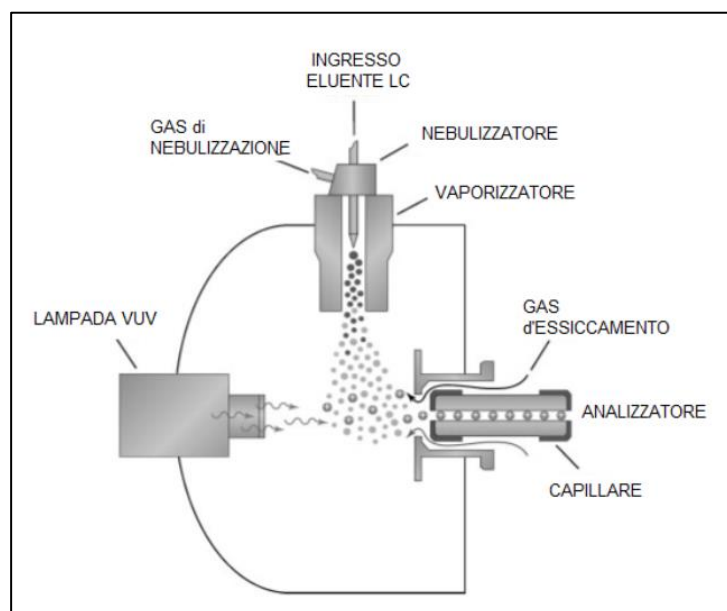


Figura 16. Diagramma schematico APPI con geometria ortogonale [48].

3.2.4 INTERFACCIA LC-MS DIRECT-EI

La ionizzazione elettronica (EI) è stata sviluppata da Dempster agli inizi del secolo scorso e migliorata successivamente da Bleakney e Nier [52,53] e, negli anni a seguire, utilizzata come parte fondamentale della tecnica GC-MS. Infatti gli analiti vengono ionizzati in fase gassosa con l'interazione di un fascio di elettroni ad alta energia. L'energia messa in gioco, circa 70 eV, è responsabile del processo di frammentazione cui vanno incontro le molecole da ionizzare. Tale processo, essendo altamente riproducibile e specifico per ogni molecola, permette una rapida e precisa identificazione delle sostanze se si comparano gli spettri elettronici ottenuti con quelli depositati in librerie elettroniche disponibili anche on-line. L'energia degli elettroni messa in gioco è quindi alla base del processo di ionizzazione e della modulazione della frammentazione. I vari step che portano alla formazione degli ioni e al loro ingresso nel detector sono riportati in Figura 17. Una volta impostati i parametri strumentali di lavoro come la temperatura della sorgente di ionizzazione o l'energia degli elettroni, gli spettri EI sono il risultato solo di reazioni intramolecolari e non sono influenzati da altri parametri più complessi tipici invece di altre tecniche di ionizzazione. I dati risultanti da spettri EI sono quindi i più facili da comparare rispetto, per esempio, agli spettri ESI, ed il semplice principio di ionizzazione permette l'analisi di qualsiasi molecola purché volatile o volatilizzabile, senza tener conto del suo background chimico. Il solvente organico usato come fase mobile nell'apparato cromatografico in questo caso, rispetto ad una tecnica di ionizzazione come l'ESI, non gioca un ruolo nel processo di ionizzazione e non è stata riscontrata nessuna interazione *molecola-ione*. Il tipico spettro EI è altamente informativo e la sua riproducibilità, come prima accennato, permette la comparazione degli spettri ottenuti in modo sperimentale con migliaia di altri presenti in librerie di riconoscimento disponibili commercialmente (come la NIST o Wiley). Inoltre la EI può beneficiare di un recente sofisticato algoritmo sviluppato dalla NIST (*National Institute of Standards and Technology*) chiamato AMDIS (*Automated MS Deconvolution and Identification System*) che estrae lo spettro di massa degli analiti da un mix cromatografico complesso con numerosi picchi sovrapposti [54]. La EI, come detto in precedenza avviene in fase gassosa per cui è ideale per quei composti a basso PM volatili-volatilizzabili e termostabili comunemente analizzati in GC. Il meccanismo d'azione (Figura 18) consiste nell'introdurre gli analiti già in fase gas all'interno della sorgente di ionizzazione sotto alto vuoto ($10^{-6}/10^{-5}$ torr) e elevate temperature (200-300 °C). Successivamente, attraverso il riscaldamento di un filo di tungsteno o renio percorso da corrente elettrica, si ha l'emissione di un fascio di elettroni che nel loro percorso verso il polo di carica opposta, vanno a interagire con le molecole da ionizzare (e non con le molecole d'aria, grazie all'alto vuoto) creando una mutua distorsione sia dell'onda elettronica sia dell'orbitale dell'analita, con la conseguente possibilità di ionizzazione di quest'ultimo. Si verrà così a formare uno ione positivo radicalico spinto verso il detector tramite un repeller di medesima carica e focalizzato mediante delle lenti elettrostatiche.

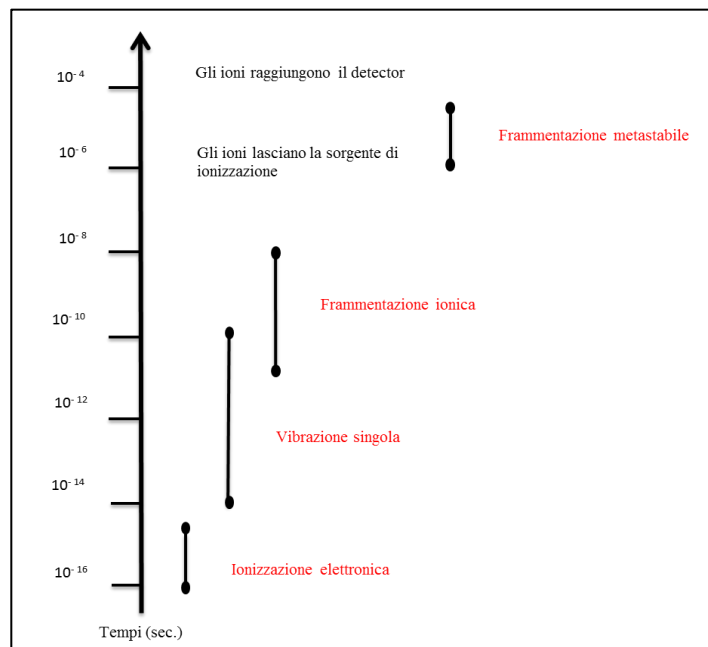


Figura 17. Sequenza temporale del processo di ionizzazione elettronica.

Dato l'enorme quantitativo di energia messa in gioco, gli analiti vanno incontro, secondo il principio di Frank-Condon, ad un processo di frammentazione tipico e caratteristico per ogni analita e solo i frammenti carichi verranno indirizzati verso l'analizzatore. Quelli neutri o gli analiti non ionizzati verranno aspirati dalla pompa del vuoto e quindi persi. Queste perdite sono comunque evidenziabili dallo spettro di massa. La ripetibilità della frammentazione deriva dal fatto che le rotture avvengono a livello dei legami più deboli e la carica positiva radicalica si forma sul carbocatione più stabile. Fino a pochi decenni fa l'accoppiamento LC-EI-MS, in riferimento a quanto detto prima, sembrava impossibile dato che gli analiti da analizzare sono disciolti in un liquido ma, l'arrivo della cromatografia liquida su nano scala, ha dato l'impulso alla nascita di alcune interfacce sperimentali, tra cui il Direct-EI [55]. L'interfaccia è frutto di numerosi tentativi ed è nata da esperienze passate rafforzate da nuove tecnologie (tra cui la nano HPLC) che hanno permesso di superare i punti più critici dell'accoppiamento. Essa infatti deriva da una precedente interfaccia LC-EI-MS detta *Particle Beam* che però operava con flussi di FM maggiori all'attuale Direct-EI e non effettivamente funzionali (anche se utilizzati) alla ionizzazione elettronica, come quelli al momento impiegati. Nel Direct-EI la FM proveniente dalla colonna cromatografica entra direttamente in sorgente con un flusso che va da 100 a 1000 nL/min [56] (mediamente 500 nL/min) e l'originalità di quest'approccio consiste nel relegare tutto il processo di interfacciamento all'interno del volume della sorgente di ionizzazione, come evidenziato dalla Figura 19.

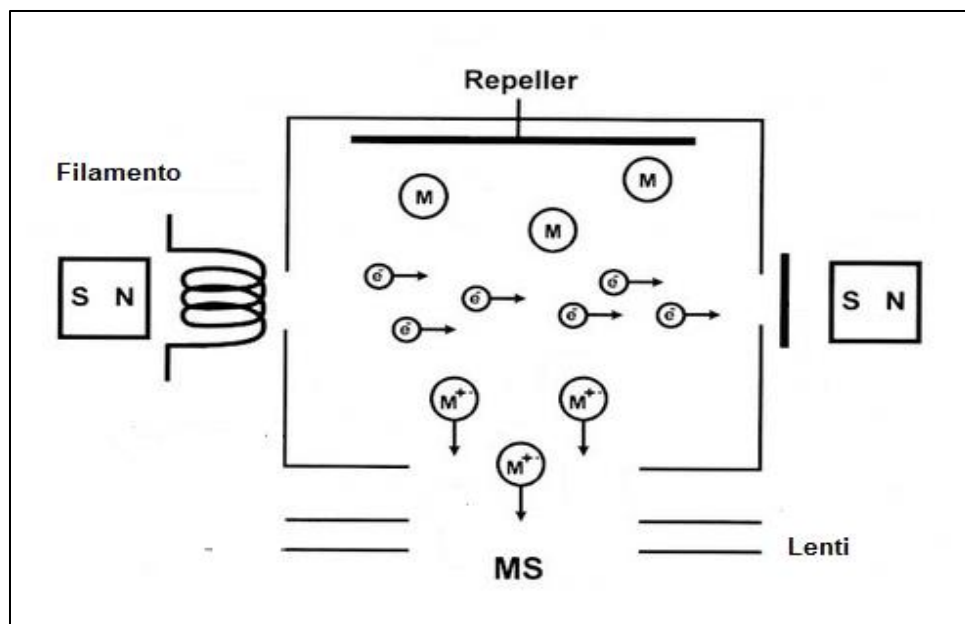


Figura 18. Rappresentazione schematica meccanismo di ionizzazione elettronica.

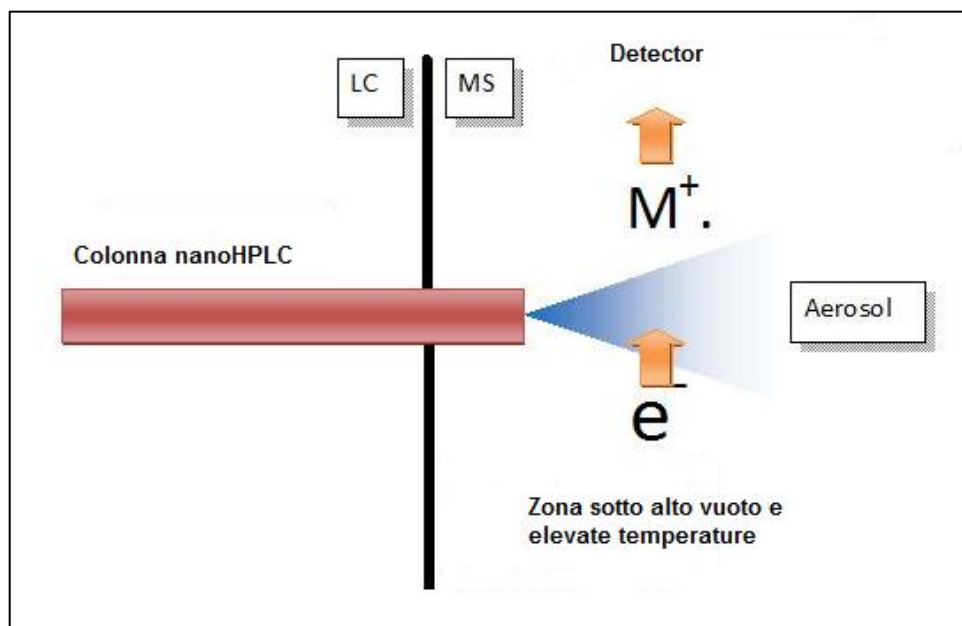


Figura 19. Diagramma schematico dell'interfaccia Direct-ESI.

Il meccanismo dell'interfaccia (Figura 20) è basato sulla formazione di un aerosol in condizioni di alto vuoto, seguito da una rapida desolvatazione delle goccioline di solvente e finale vaporizzazione del soluto. Per le molecole con PM maggior la vaporizzazione avviene dopo che le medesime hanno preso contatto con la superficie metallica (acciaio inox 318) del corpo della sorgente di ionizzazione, prima della ionizzazione stessa. Il processo è veloce ed avviene in meno di 8 mm di lunghezza. Il punto focale dell'interfaccia è quindi un nano nebulizzatore la cui punta protrude di pochi millimetri all'interno della sorgente. L'alta temperatura di quest'ultima, fra i 200 e i 350 °C, ha una duplice funzione: compensare il calore latente di vaporizzazione durante la desolvatazione delle goccioline di solvente e convertire il soluto in fase gas. Il nebulizzatore è connesso ad una nano-colonna cromatografica tramite un semplice capillare di silice fusa di diametro interno di 25 µm (miglior compromesso fra la formazione dell'aerosol e la possibile occlusione del capillare) reso termicamente isolato dall'alta temperatura mediante un rivestimento di PEEK® al fine d'evitare una prematura vaporizzazione della FM e possibile degradazione o precipitazione dei soluti da analizzare (Figura 21).



Figura 20. Rappresentazione grafica della formazione dell'aerosol.

Né il meccanismo di ionizzazione né il campo elettrico sono risultati essere influenzati dall'introduzione della FM in sorgente (dato il flusso ridotto), ottenendo spettri di massa di alta qualità. Un ovvio vantaggio è inoltre l'estrema compattezza e semplicità dell'interfaccia, caratteristiche che la distinguono dalle comuni tecniche LC-MS assai più complicate e delicate. Inoltre la mancanza di qualsiasi meccanismo di trasporto aggiuntivo nel

processo riduce eventuali perdite degli analiti aumentando la sensibilità dello strumento ed estendendo il range delle possibili applicazioni. Alcuni dei vantaggi che hanno permesso al Direct-El di emergere nell'ambito della spettrometria di massa sono:

- Possibilità d'ottenere spettri di massa di alta qualità e perfettamente comparabili con quelli presenti in librerie elettroniche;
- Assenza di ionizzazione chimica con un'elevata riproducibilità delle abbondanze degli isotopi previsti;
- Assenza di effetti matrice dovuti ad interferenti presenti nel campione (matrici complesse);
- Possibilità di ottenere LODs fino all'ordine di pochi picogrammi di quantità assoluta per analisi effettuate in *SIM mode*.

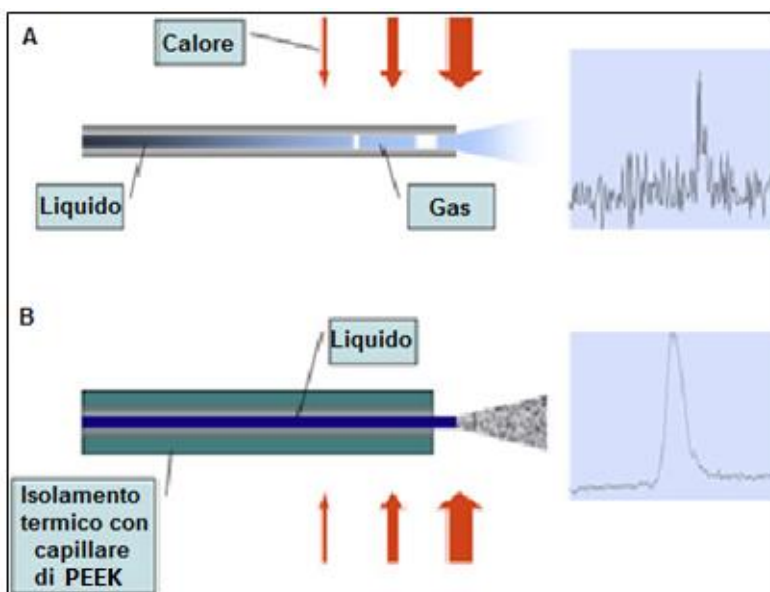


Figura 21. Effetto dell'isolamento termico del capillare sulla formazione dello spray e del profilo del picco corrispondente; (a) nebulizzatore non protetto (b) nebulizzatore termicamente isolato.

Grazie alla sua semplicità ed alla riduzione di soppressione del segnale o di altri effetti matrice, il Direct-El può offrire un grande vantaggio rispetto all'ESI, soprattutto per analisi di molecole con PM medio basso, indipendentemente dalla loro polarità [57]. Sono infatti stati analizzati numerosi composti d'interesse ambientale, forense, farmaceutico e biologico [58,59] come: EDCs (*Endocrine Disrupting Compounds*), pesticidi, ormoni e acidi grassi liberi non esterificati [60,61] con ottimi risultati. In questo momento esistono due versioni del Direct-El, una montata su un analizzatore a singolo quadrupolo Agilent Technologies 5975 Inert MSD interfacciato ad una nano pompa LC Agilent Technologies 1100 Series e, una di nuova generazione montata su un analizzatore a triplo quadrupolo Agilent Technologies 7010 QqQ interfacciato a una pompa UHPLC Agilent Technologies 1290 Infinity. In questo caso si è reso necessario usare uno splitter post colonna per ridurre il flusso entrante in sorgente all'ordine dei nL/min.

4. RIVESTIMENTI SOL-GEL

L'interesse nella tecnologia sol-gel per la produzione di ceramiche inorganiche e materiali vetrosi è nato intorno alla prima metà del 1800 grazie agli studi di Ebelman e Graham sui gel silicei [62]. Essi hanno osservato che l'idrolisi del composto tetra-etossi-orto-silicato (TEOS), sotto condizioni acide generava SiO_2 , con un aspetto simile al vetro. Comunque è stato necessario più di un anno per evitare la polverizzazione del gel e, di conseguenza fino ad allora l'interesse in questo campo è stato esiguo. E' solo verso la fine del '800 e primi del '900 che tale campo della chimica ha acquistato sempre più interesse grazie alla scoperta del fenomeno chimico degli Anelli di Liesegang (ioni dispersi in un mezzo colloidale allo stato di gel, che, in determinate condizioni precipitano formando strutture ad anelli) [62]. Nonostante i numerosi studi la chimica alla base del fenomeno di precipitazione e della formazione di cristalli a partire da un gel è rimasta per molto tempo confusa. Occorre attendere il 1950-1960 per la prima applicazione della tecnologia sol-gel per la realizzazione di nuove ceramiche a base ossidica di: Al, Si, Ti, Zr [62]. Attualmente la tecnologia sol-gel permette d'ottenere materiali ceramici/vetrosi di alta qualità con caratteristiche d'anti-aderenza e di resistenza anche alle alte temperature. Diversi sono i settori in cui tali prodotti hanno avuto rilevanze pratiche non indifferenti [63]. La tecnica sol-gel è sempre è più apprezzata nella realizzazione di diversi materiali funzionali come: fibre ceramiche, membrane inorganiche e rivestimenti. In particolare sempre più apprezzata è l'applicazione di sottili film su diverse tipologie di superfici. Tale tecnologia è importante anche nella realizzazione di componenti in elettronica ma anche in odontoiatria e nella produzione di lenti ottiche e nei rivestimenti dei pannelli fotovoltaici. Sono altresì usati come rivestimenti di pentolame proprio per la proprietà anti-aderente e di resistenza precedentemente menzionate [64]. E sono queste due caratteristiche che hanno spinto la loro sperimentazione anche in chimica analitica-spettrometria di massa come rivestimenti della superficie interna della sorgente di ionizzazione EI, trattata più avanti nella sezione sperimentale della tesi.

4.1 CHIMICA DEL SOL-GEL

La tecnica sol-gel può essere definita come la preparazione di materiali ceramici, nello specifico ossidi di metalli, tramite tre step principali: formazione di un sol (sospensione colloidale di particelle solide in una fase liquida), formazione di un gel (reticolo solido continuo e tridimensionale che racchiude una fase liquida) tramite reazioni di idrolisi e di condensazione e, la rimozione del solvente mediante processi termici [65] (Figura22).

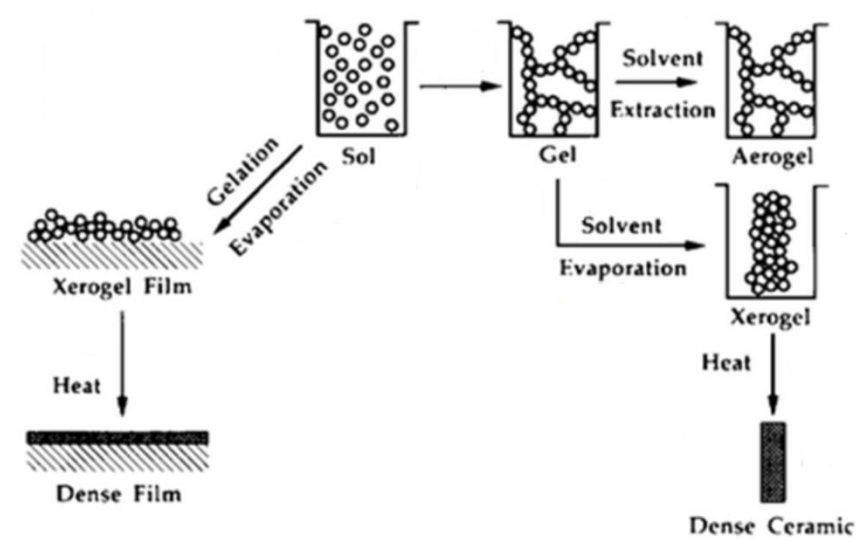


Figura 22. Rappresentazione schematica delle principali fasi della tecnica sol-gel.

I precursori per la preparazione del sol sono elementi metallici o semi-metallici uniti a diversi ligandi. Per esempio comuni precursori per l'ossido di alluminio includono sali inorganici come $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ (nitrato di alluminio) e composti organici come $\text{Al}(\text{OC}_4\text{H}_9)_3$ (tri-butossi-alluminio) [65]. Quest'ultimo è un esempio di alcossido ovvero un composto ottenuto per sostituzione di un atomo di idrogeno (H) di un alcool con un atomo di metallo (M). Ne risulta che fra il carbonio (C) e l'atomo metallico si trova un atomo di ossigeno (O): C-O-M ed è proprio l'ossigeno che differenzia questa classe di composti dagli organo-metalli in cui l'atomo metallico si lega direttamente sul carbonio: C-M. Un importante esempio di metallo alcossido è il TEOS (tetra-etossi-silano o tetra-etile-ortosilicato). I metalli alcossidi sono i precursori maggiormente usati nella tecnologia sol-gel poiché reagiscono immediatamente con l'acqua. La reazione in questione è una idrolisi, dato che uno ione idrossido (OH^-) si lega all'atomo di metallo con formazione di un alcool. A seconda della quantità di acqua e del catalizzatore la reazione può arrivare a completamento dell'idrolisi o fermarsi a metà ottenendo un metallo solo parzialmente idrolizzato. Se avviene la seconda opzione può verificarsi una reazione di condensazione, ovvero due molecole di complesso metallico parzialmente idrolizzato si uniscono liberando piccole molecole come acqua o alcoli. La reazione di condensazione può continuare fino a formare dei polimeri (o macromolecole). Questi di solito mostrano strutture lineari o circolari, ma se contengono unità polifunzionali ($f > 2$) le catene della struttura possono unirsi mediante legami crociati con strutture finali tridimensionali [66]. Di fatto, se un monomero può fare più di due legami, non vi sono limiti sulla grandezza della molecola finale e, se una molecola raggiunge dimensioni macroscopiche che si estendono per quasi l'intero volume della soluzione,

il prodotto ultimo è un gel la cui struttura è diversa a seconda se è di tipo particellare o polimerico. Infatti nel primo caso si otterrà un gel con struttura a nano-sfere (100 nm di diametro) nel secondo invece un gel ramificato (Figura 23).

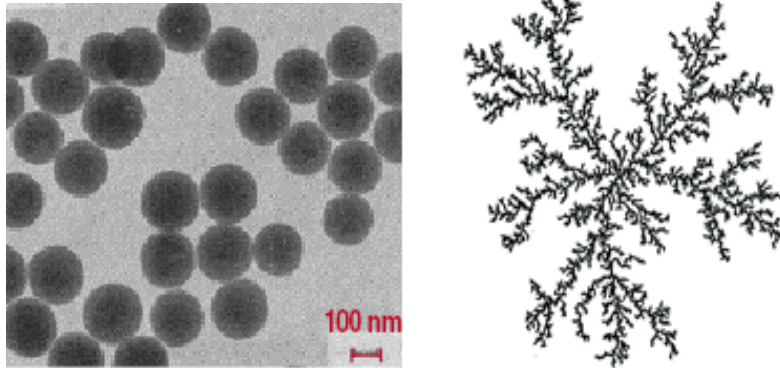


Figura 23: Due diverse strutture di gel. A sinistra struttura a sfere (gel particellare), a destra struttura ramificata (gel polimerico).

Perciò un gel è una sostanza che contiene uno scheletro continuo che a sua volta ingloba una fase liquida. La continuità della struttura solida è ciò che dona elasticità alla sostanza. Il gel risultante non è ancora una struttura stabile, è possibile infatti che continuino a verificarsi diverse tipologie di reazioni data la presenza della fase liquida e di ulteriori legami. È necessario quindi indurre l'evaporazione della fase liquida per ottenere il prodotto ultimo del processo. In questo caso se s'induce l'evaporazione del solvente in condizioni normali si ottiene uno xerogel (dove "xero" sta per asciutto) con notevole riduzione del volume iniziale. Se invece si estrae il solvente mediante un processo detto essiccazione supercritica ponendo il gel in un'autoclave si ottiene un aerogel. Xerogel e aerogel sono utili nella preparazione di ceramiche dense [65] ma, sono apprezzati anche come substrati catalitici e come filtri per la loro elevata porosità. Nonostante molti gel comunque siano amorfi, ovvero non abbiano una struttura cristallina, anche dopo il processo di essiccazione, alcuni di loro possono assumerla se riscaldati. Per cui per ottenere una ceramica priva di pori (richiesta in particolari condizioni di anti-aderenza e levigatezza), è necessario scaldare il gel a temperature sufficientemente elevate da indurre un processo di sinterizzazione, ovvero un processo di collasso dei pori. Il processo può avvenire o per alte temperature o per azione meccanica.

4.1.1 FILM DI XEROGEL

Lo Xerogel è possibile impiegarlo anche come film di rivestimento [67]. La sua applicazione è semplice e di notevole interesse tecnologico, ed avviene mediante 3 metodi principali: *spinning*, *dipping* e *spraying*. Il primo caso prevede che la superficie da ricoprire sia sotto rotazione controllata e continua [68] con applicazione simultanea della copertura. Permette di depositare uno strato estremamente di prodotto e di ricoprire superfici minute o ricurve. Infatti, il liquido si espande per azione della forza centrifuga ricoprendo tutta la superficie disponibile. L'eccesso della copertura viene invece rimosso sempre per azione della forza centrifuga. Il secondo caso di applicazione del film avviene per dipping, ovvero per immersione [69]. Consiste nell'immergere l'oggetto da rivestire nella soluzione ad una velocità controllata. Il liquido si deposita sulla superficie e l'eccesso scivola via per gravità. Allo stesso tempo il solvente evapora ed il film va incontro a gelificazione. In questo modo è possibile controllare anche lo spessore del film. A differenza del primo metodo, il secondo è idoneo ad applicare film su superficie ampie e piane. Il terzo ed ultimo metodo, è quello dello spraying. Esso prevede di spruzzare letteralmente il film sulla superficie da ricoprire mediante aerografo. Occorre in questo caso fare attenzione ad ottenere un film omogeneo come spessore e senza irregolarità.

PARTE SPERIMENTALE

5. MICROEXTRACTION BY PACKED SORBENT (MEPS)-UHPLC-UV: UN METODO SEMPLICE ED EFFICIENTE PER LA DETERMINAZIONE DI 5 BENZODIAZEPINE IN UNA BEVANDA ALCOLICA.

L. Magrini, A. Cappiello, G. Famiglioni, P. Palma

“Microextraction by packed sorbent (MEPS)-UHPLC-UV: A simple and efficient method for the determination of five benzodiazepines in an alcoholic beverage”. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 125 (2016)48-53.

L'impiego delle benzodiazepine (BDZ) è associato al trattamento di numerosi disordini psicologici come stati d'ansia, attacchi di panico, insonnia, spasmi muscolari e crisi epilettiche. Il numero di persone affette da questi problemi è in costante aumento e ne consegue un diffuso utilizzo di BDZ nella popolazione che può sfociare in un abuso vero e proprio con possibile intossicazione associata ad alterazione del comportamento. Ed è proprio per questi effetti collaterali e per la facilità con cui si possono manifestare (nonostante la necessità di prescrizione medica) che le BDZ vengono usate come “arma” in crimini di violenza definiti *drug facilitated crimes* (DFC). La loro somministrazione avviene, per questi crimini, attraverso l'utilizzo di bevande alcoliche poiché l'alcool aumenta l'effetto delle benzodiazepine rendendo la vittima incapace di reagire e, molto spesso, di ricordare la violenza subita e ne maschera la presenza. Questo ha suscitato un crescente interesse riguardo la determinazione di tali sostanze e nei metodi analitici atti a rilevarle. In particolare è necessario sviluppare un metodo rapido, accurato e sensibile poiché le BDZ e i loro metaboliti hanno evidenziato un'emivita piuttosto breve e i campioni prelevati come prove in casi clinici o forensi sono di esigua quantità. Inoltre, anche se le BDZ hanno strutture chimiche molto simili fra loro, evidenziano polarità anche molto differenti rendendo difficile l'applicazione di una singola tecnica estrattiva idonea ad una ricerca simultanea. Numerosi sono infatti i metodi che si possono ritrovare in letteratura per la determinazione di questi analiti e, l'accoppiamento GC-MS è quello più usato oltre che, il GC-NPD (detector azoto-fosforo) ed il GC-ECD (detector a cattura di elettroni) [70,71]. Il problema è che alcune BDZ sono termolabili degradandosi ad elevate temperature e, per eseguire analisi in GC occorre prima derivatizzarle [71,73]. Altri approcci impiegano la cromatografia elettrocinetica micellare (MECC o MECK) accoppiata ad un detector a fluorescenza indotta da un colorante cianinico ed una elettroforesi capillare a zona (CZE) [74]. Anche la LC è ampiamente impiegata se accoppiata ad un MS o ad un rivelatore UV [75] e, sebbene lo spettrometro di massa sia più specifico e sensibile, il rivelatore a serie di foto-

diodi aggiunge informazioni sullo spettro che possono essere usate per l'identificazione degli analiti inoltre, è più economico ed usato dalla maggior parte dei laboratori analitici. In aggiunta, le analisi con la LC non necessitano del processo di derivatizzazione ed sono compatibili con un maggior range di polarità. La piccola quantità e la complessità del campione richiedono però un metodo estrattivo efficiente. La *liquid-liquid extraction* (LLE), la *solid phase extraction* (SPE), la *dispersive liquid-liquid microextraction* (DLLME), la *microwave assisted extraction*, sono già state impiegate con successo nell'estrazione delle BDZ da differenti tipologie di matrici quali urina, plasma, sangue e bevande [76-82]. Tutte queste tecniche però richiedono l'impiego di una cospicua quantità di solvente organico. Anche la SPME [83-86] è stata impiegata nella ricerca di BDZ in fluidi biologici. Il problema però è l'esigua quantità di campione disponibile. Preferendo tecniche estrattive che riescono ad estrarre, purificare e concentrare in un singolo step operativo, la MEPS è stata un'ottima alternativa alle più comuni tecniche estrattive. Il seguente lavoro si è focalizzato sulla determinazione di 5 BDZ (clordiazepossido, lorazepam, diazepam, oxazepam, medazepam) in una comune bevanda alcolica come la grappa. Il metodo validato prevede l'impiego della MEPS come tecnica estrattiva, in modalità off line, e l'UHPLC-UV-Vis come tecnica analitica.

5.1 MATERIALI E METODI

Per la realizzazione del seguente lavoro sono state preparate 5 soluzioni madri: 10000 ng/μL per il clordiazepossido e 5000 ng/μL per le restanti 4 BDZ in 100% metanolo (MeOH). Da qui è stata preparata la prima soluzione calibrata: 2000 ng/μL per il clordiazepossido e 1000 ng/μL per gli altri analiti in 90-10 v/v ACN-H₂O acidificate entrambe allo 0,1% con acido formico (HCOOH), da cui per diluizioni seriali si sono ottenute le successive soluzioni impiegate nei vari step della validazione del metodo: 2,0-20,0-50,0-100,0-200,0 ng/μL (clordiazepossido) e 1,0-10,0-25,0-50,0-100,0 ng/μL (lorazepam, diazepam, oxazepam, medazepam) per la retta di calibrazione e, 4,0-50,0-200,0 ng/μL (clordiazepossido) e 2,-25,0-100,0 ng/μL (lorazepam, diazepam, oxazepam, medazepam) per la precisione inter- ed intra-day ed i recuperi. In quest'ultimo caso le soluzioni usate per valutare il recupero sono state ottenute diluendo le soluzioni calibrate 10,0-125,0-500,0 ng/μL (20,0-250,0-1000,0 per il clordiazepossido) con una grappa disponibile in commercio. Data la sensibilità delle BDZ alla luce e alla temperatura, le soluzioni sono state conservate in frigo a 4 °C in contenitori ambrati, per prevenire una loro eventuale degradazione. Gli standard in polvere sono stati donati dall'ospedale universitario di Ancona mentre i solventi organici sono stati acquistati dalla *VWR international* (Milano) e l'acido formico dalla *PANREAC QUIMICA SA* (Barcellona, Spagna). L'acqua deionizzata ultra pura è stata prodotta in loco mediante un sistema di purificazione Millipore direct-Q 3 UV (*Millipore Corp.*, Milano). L'estrazione degli analiti è stata eseguita mediante eVol® XR MEPS con cartuccia C18 (Lab Service Analytical s.r.l., Bologna). In questo caso non

si è reso necessario alcuno step di purificazione pre estrazione ma solo una diluizione 1:5 v/v con H₂O. Per l'estrazione è stata usata una siringa da 100 µL di volume e la cartuccia di fase adsorbente veniva cambiata approssimativamente ogni 50 estrazioni. Per facilità d'impiego e per l'esigua quantità di campione, si è scelto di operare in modalità off-line. La procedura MEPS opera in cicli, ed ogni ciclo prevede un'aspirazione ed un'erogazione, la cui velocità operativa è impostata a seconda dello step. Il protocollo impiegato in questo lavoro prevede:

1. Condizionamento della cartuccia: 3 cicli con ACN e 3 con H₂O a velocità 10 µL/s
2. Asciugatura della cartuccia: con 20 cicli a velocità di 10 µL/s semplicemente aspirando aria
3. Estrazione degli analiti: con 3 cicli a velocità 1 µL/s aspirando le soluzioni o il campione reale)
4. Seconda asciugatura della cartuccia come nel punto 2
5. Eluizione degli analiti dalla cartuccia con 3 cicli a velocità 1 µL/s aspirando la fase eluente 90-10 v/v ACN-H₂O acidificate entrambe allo 0,1% con acido formico.
6. Pulizia accurata della cartuccia con 2 cicli a velocità 10 µL/s con 2- propanolo.

Il volume di aspirazione ed erogazione è sempre lo stesso per cui gli analiti non vengono concentrati o diluiti e, la riduzione della velocità ai punti 3 e 5 serve per incrementare l'efficienza d'estrazione. Le analisi poi sono state condotte con un *Thermo Scientific Dionex UltiMate 3000 Rapid Separation LC* (RSLC) dotata di sistema *UltiMate 3000 Variable Wavelength UV* con una Z-cella di volume 3 nL (Waltham, MA, USA). Le 5 BDZ sono state separate mediante una colonna cromatografica nano Acquity C18 (75 µm x 150 mm) con particelle dal diametro di 1,8 µm prodotta da Waters Atlantis (Milford, MA, USA) e FM, H₂O e ACN, con gradiente d'eluizione (t in minuti): t 0 B=0%, t 2,5 B=40%, t 32,5 B=70%, t 34,5 B=0%. Il flusso è stato impostato a 300 nL/min e il volume d'iniezione a 10 nL. Infine, per ottimizzare la risposta, sono state selezionate due lunghezze d'onda: 254 nm per clordiazepossido e medazepam e 233 nm per lorazepam, oxazepam e diazepam.

5.2 RISULTATI E DISCUSSIONE

Per ottimizzare al massimo l'estrazione dal campione reale, la procedura MEPS è stata adattata al caso in questione. Sono state eseguite diverse prove con solventi organici diversi, MeOH e ACN, a diverse percentuali

di solvente organico/acqua (90%-10%, 70%-30%, 60%-40% (v/v), con o senza l'aggiunta del 0,1% di acido formico (il cui impiego si è reso utile per la caratteristica di anfotericità dei composti). La soluzione impiegata per queste analisi preliminari era una miscela 5, di concentrazione 20 ng/μL (40 ng/μL per il Clordiazepossido). La fase eluente 90%-10% v/v ACN-H₂O acidificata con lo 0,1% di acido formico è risultata la migliore alla fine di queste prove d'estrazione. I valori erano tutti superiori al 60%. La Figura 24 mostra i recuperi fra ACN e MeOH neutri (a) e fra la fase 90-10 v/v ACN-H₂O neutre ed acidificate (b). L'ACN, più apolare del MeOH, si è dimostrato migliore in termini di recupero, a tutte le diluizioni. Esso è un solvente aprotico a differenza degli altri due, che sono protici ed evidenzia un valore di forza estrattiva maggiore (37) rispetto al MeOH (33) e all'EtOH (24). Sono state eseguiti test preliminari anche sulla diluizione del campione pre-estrazione, determinando che era necessario diluirlo con H₂O in rapporto 1:5 v/v (grappa:H₂O). La diluizione è servita a rendere le BDZ più affini alla fase adsorbente della cartuccia della MEPS rispetto alla fase alcoolica in cui erano disperse e prevenire poi in corso di analisi cromatografica la codatura dei picchi per un eccessivo contenuto alcolico residuo. I test sono stati eseguiti in triplicato. Ovviamente prima di far ciò sono state eseguite delle prove per escludere eventuali interferenze da parte della matrice, iniettando in triplicato la grappa tal quale. La validazione del metodo è stata eseguita in accordo alle linee guide internazionali [87] verificando i seguenti parametri: linearità (R^2), LOD e LOQ, ripetibilità inter- ed intra-day, recuperi, precisione e *carry-over* per ogni analita. La linearità è stata valutata con il metodo dello standard esterno. Ogni composto è stato iniettato in triplicato, per 5 punti a concentrazione crescente, 3 ordini di grandezza. Dalla retta di calibrazione sono poi state estrapolate: l'intercetta, la pendenza ed il coefficiente di determinazione R^2 . Quest'ultimo è risultato essere $\geq 0,994$ per tutti i composti. I LODs e i LOQs, stimati considerando il rapporto S/N 3:1 e 10:1 rispettivamente, sono stati: 1,0 e 2,0 ng/μL per il clordiazepossido e, 0,5 e 1,0 ng/μL per le altre 4 benzodiazepine (Tabella 3). Per la ripetibilità intra-day sono state eseguite 5 analisi consecutive in uno stesso giorno tre diverse concentrazioni: 2,0 ng/μL, 25,0 ng/μL e 100,0 ng/μL (4,0; 50,0; 200,0 ng/μL per il clordiazepossido). 5 analisi consecutive al giorno per 5 giorni consecutivi sono state eseguite per la ripetibilità inter-day con le medesime soluzioni.

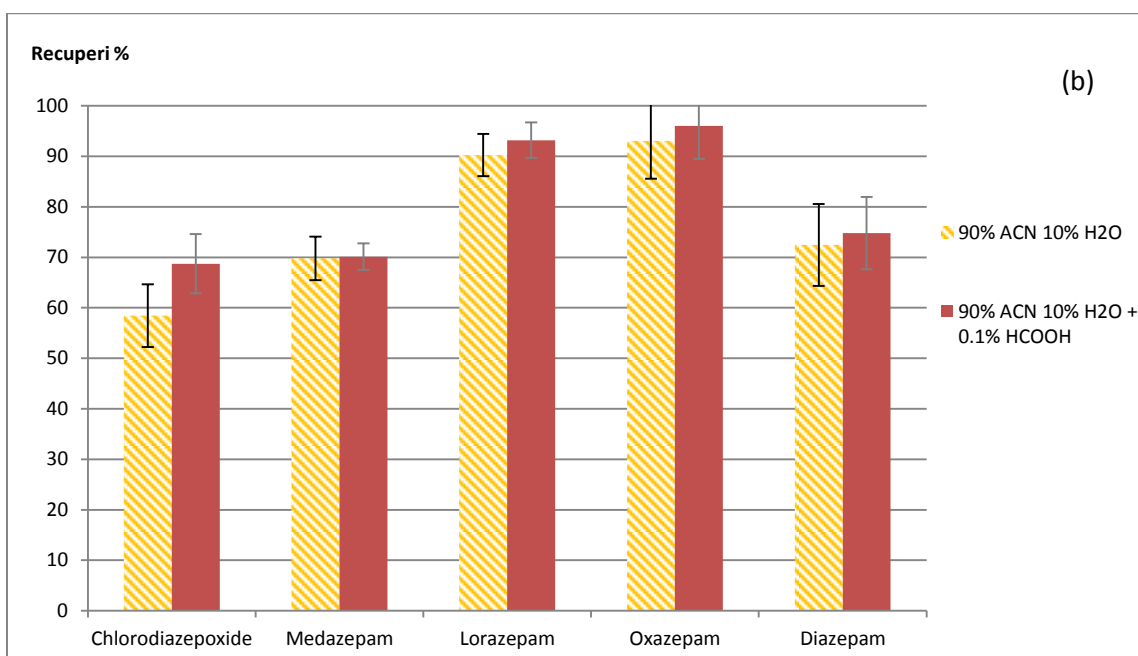
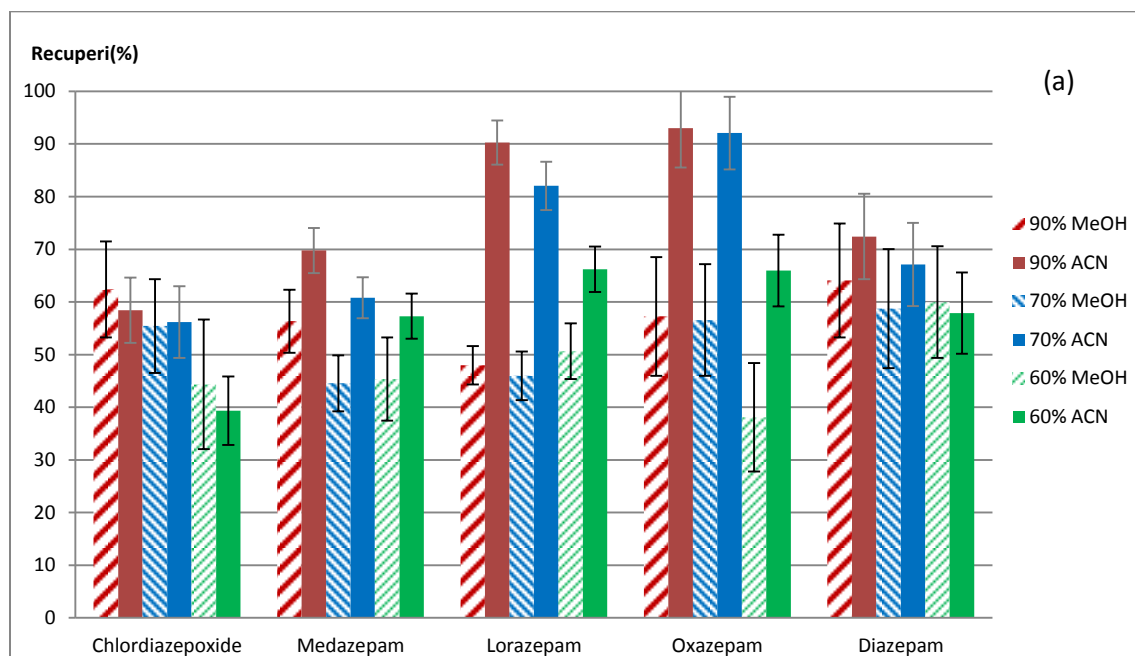


Figura 24: Prove di diverse fasi estraenti. a) MeOH e ACN neutre con diverse proporzioni. b) 90-10 v/v ACN-H₂O neutre vs acidificate al 0,1% con HCOOH

Analiti	t _r (min)	λ (nm)	Range di linearità (ng/μL)	Pendenza ^a	Intercetta ^a	r ²
Clordiazepossido	16,54 (±0,08)	254	2,0 ^b – 200 (1,0 ng/μL ^c)	0,0078 to 0,0079	0,0211 to 0,0271	0,9999
Medazepam	19,55 (±0,09)	254	1,0 ^b – 100 (0,5 ng/μL ^c)	0,0096 to 0,0096	0,0108 to 0,0116	0,9996
Lorazepam	23,68 (±0,06)	233	1,0 ^b – 100 (0,5 ng/μL ^c)	0,0062 to 0,0064	0,0030 to 0,0050	0,9999
Oxazepam	24,43 (±0,07)	233	1,0 ^b – 100 (0,5 ng/μL ^c)	0,0061 to 0,0062	0,0018 to 0,0041	1,0000
Diazepam	28,06 (±0,07)	233	1,0 ^b – 100 (0,5 ng/μL ^c)	0,0075 to 0,0077	0,0005 to 0,0050	0,9994

Tabella 3. Dati validazione del metodo. ^{a)} valori al 95% livello di confidenza su tre curve di calibrazione indipendenti. ^{b)} LOQ. ^{c)} LOD

I valori di RSD%, riportati in Tabella 4, riguardanti al ripetibilità intra-day ed inter-day, sono risultati buoni con valori inferiori al 12% per la ripetibilità intra-day e al 10% per quella inter-day. I test per valutare i recuperi sono stati condotti usando le soluzioni standard e i campioni di grappa fortificati alle stesse concentrazioni usate per le ripetibilità inter e intra-day.

Analiti (ng/μL)	RSD% Intra-day			RSD% Inter-day		
	2,0 (4,0)	25,0 (50,0)	100,0(200,0)	2,0 (4,0)	25,0 (50,0)	100,0 (200,0)
Clordiazepossido	5,9	1,0	3,5	6,9	10,0	0,4
Medazepam	2,0	1,0	2,0	4,4	0,8	0,7
Lorazepam	3,1	0,6	2,5	5,2	2,4	0,3
Oxazepam	9,9	0,5	0,7	8,3	4,0	1,2
Diazepam	12,0	0,7	2,5	6,5	0,4	1,1

Tabella 4: Valori della ripetibilità inter- ed intra-day RSD. I valori all'interno della parentesi sono le concentrazioni riferite al clordiazepossido.

Ogni campione è stato estratto in triplicato e le percentuali di recupero sono riportate in Tabella 5.

Analiti (ng/μL)	Recuperi % (RSD %)		
	2,0 (4,0) ^b	25,0 (50,0) ^b	100,0(200,0) ^b
Clordiazepossido	63,7 (14,3)	60,8 (9,6)	60,9 (1,2)
Medazepam	66,8 (8,9)	62,3 (4,2)	60,5 (0,2)
Lorazepam	83,3 (4,4)	86,6 (4,1)	81,4 (4,4)
Oxazepam	90,6 (12,4)	91,3 (7,2)	88,2 (4,6)
Diazepam	71,3 (15,2)	72,0 (9,9)	70,3 (2,3)

Tabella 5: Valori percentuali dei recuperi e RSD . I valori all'interno della parentesi sono i valori di RSD. ^{b)} concentrazioni del clordiazepossido.

Per il clordiazepossido e per il medazepam sono stati ottenuti recuperi intorno al 60% ma, dati gli ottimi risultati della ripetibilità dell'estrazione (0,2 e 9,6% per le concentrazioni alta e media) tali recuperi possono essere considerati accettabili, come riportato nelle linee guida internazionali [87]. Per le basse concentrazioni invece il recupero è più o meno uguale ma la RSD% leggermente maggiore. Questo è dovuto al fatto che i dati ottenuti sono prossimi al LOQ. Quando si usa una fase adsorbente, il fenomeno di *carry over* cioè di ritenzione degli analiti post-estrazione deve essere attentamente valutato per evitare recuperi non veritieri. Quest'aspetto è stato verificato ripetendo gli step numero 4 e 5 della procedura MEPS, dopo ogni estrazione, ed iniettando l'eluato finale. Quello che si otteneva erano cromatogrammi completamente bianchi. La procedura d'estrazione è quindi risultata adeguata per eluire completamente tutti gli analiti d'interesse. Un farmaco contenente il diazepam 5000 ng/μL (Valium®) è stato impiegato nella simulazione di un caso reale. Sono stati contaminati 10 mL di grappa in modo che post diluizione si ottenessero le seguenti concentrazioni finali: 2,0 25,0 e 100,0 (ng/μL). Tali campioni sono equivalenti in termini di matrice, farmaco e concentrazioni con quelli riscontrati nei casi DFC, perciò è più corretto usare la seguente terminologia: equivalente al campione reale [88]. I recuperi ottenuti (Tabella 6) sono stati confrontati con quelli standard alle medesime concentrazioni. I valori sono molto simili, dimostrando che il metodo è applicabile in casi di DFC.

Equivalente campione reale (ng/μL)	Recuperi % (RSD)		
	2	25	100
Valium	71,9 (6,2)	70,7 (7,9)	74,1 (4,9)

Tabella 6: Valori percentuali dei recuperi e RSD su un equivalente del campione reale.

Nella Figura 25, a supporto della Tabella 6, è riportata la sovrapposizione di un cromatogramma di una soluzione standard di cinque composti alla concentrazione di 100 ng/μL (200 ng/μL il clordiazepossido) con il cromatogramma di un estratto equivalente al campione reale alla medesima concentrazione di principio farmacologico.

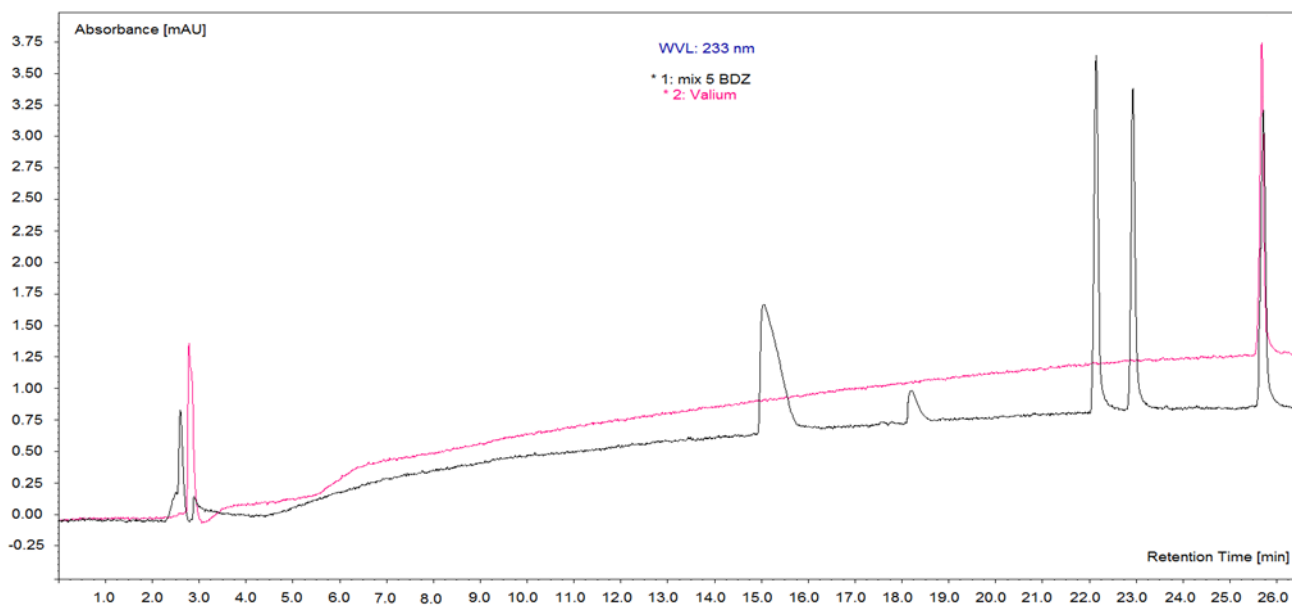


Figura 25: in blu soluzione calibrata 5: 200 ng/μL: Clordiazepossido, 100 ng/μL: Medazepam, Lorazepam, Oxazepam, Diazepam, in rosa simulazione caso reale con Valium (diazepam 100 ng/μL).

5.3 CONCLUSIONI

La determinazione e la quantificazione delle BDZ in una bevanda alcolica è stata realizzata mediante un'innovativa tecnica d'estrazione, le MEPS, ed un rivelatore nano-UHPLC-UV. Il metodo è stato ottimizzato e validato per essere accurato e sensibile per il range di concentrazioni selezionate. In questo caso non è stata necessaria alcuna procedura di preparazione del campione ma solamente una semplice diluizione con H₂O. La MEPS ha dimostrato d'essere una novità nel campo delle tecniche estrattive: versatile, semplice, rapida, e con il minimo intervento manuale possibile da parte dell'operatore e, grazie al ridotto consumo di solvente organico, con un approccio *environmental-friendly*. Inoltre, il volume d'eluizione non richiede alcuno step di pre-concentrazione del campione ed è compatibile con il volume d'iniezione LC. La cartuccia adsorbente può essere usata fino a 50 volte e più, prima di perdere parte della sua capacità estrattiva e, dopo il suo utilizzo è facilmente rimpiazzabile, in accordo con quanto sostenuto dal produttore. Non è stata osservata nessuna interferenza e qualsiasi fenomeno di *carry over* è stato facilmente evitato con un semplice lavaggio della cartuccia dopo ogni estrazione. L'impiego di un apparato nano-UHPLC-UV ha permesso di ridurre ulteriormente il consumo complessivo di solvente organico rafforzando lo spirito "*green*" dell'approccio. Inoltre, i risultati sono stati ottenuti con una strumentazione di facile utilizzo e poco costosa. Infine, il metodo proposto è risultato essere indicato anche per indagini forensi con piccoli volumi di campione. In futuro si pensa di testare il metodo anche su altre matrici più complesse come i succhi di frutta o gli energy drinks, analizzando un numero maggiore di BDZ.

6. ACCOPPIAMENTO MIMS-DIRECT-EI: ANALISI ON-LINE DI IDROCARBURI POLICICLICI AROMATICI IN CAMPIONI ACQUOSI COMPLESSI.

V. Termopoli, G. Famiglioni, Pierangela Palma, A. Cappiello, Erik T. Krogh, Chris G. Gill

Condensed Phase Membrane Introduction Mass Spectrometry with Direct Electron Ionization: On-Line measurement of PAHs in Complex Aqueous Samples.

In seguito al periodo di due mesi trascorso presso la Vancouver Island University, durante il quale ho appreso la tecnica della MIMS, è stata avviata una proficua collaborazione fra la Vancouver Island University, laboratorio AERL (Applied Environmental Research Laboratory) e il laboratorio LC-MS di Urbino allo scopo di interfacciare la tecnica estrattiva-purificativa on-line e real-time della MIMS con il Direct-EI. Vi è un crescente interesse nello sviluppo di metodologie analitiche on-line e real-time, per consentire la rivelazione diretta di analiti presenti in tracce anche in campioni complessi. La combinazione di metodologie di ionizzazione a pressione atmosferica con tecnologie MS mobili offre un gran potenziale nelle analisi chimiche e numerosi ricercatori stanno cercando di trarre vantaggi da questi sviluppi in numerosi settori di ricerca [82]. Potenzialmente, questi approcci possono fornire risultati analitici rapidi, riducendo ritardi nelle esecuzioni delle analisi e possibili contaminazioni e/o perdite durante la lavorazione del campione e le analisi off-line con i convenzionali metodi d'analisi. Uno di questi approcci on-line è costituito dalla MIMS [89,90], che usa membrane semipermeabili per trasferire gli analiti dal campione (gas, acqua o fluidi) ad uno spettrometro di massa per la loro determinazione [91]. Le due varianti della MIMS, ovvero GP-MIMS e CP-MIMS sono già state descritte ampiamente nel capitolo 1 della tesi. È utile però ricordare i vantaggi di tale tecnica ovvero: analisi dirette, analisi real-time e in-situ, assenza di manipolazioni del campione con riduzione di perdite ed eventuali contaminazioni, costi assai ridotti. Negli ultimi anni sono aumentati gli sforzi per sviluppare nuovi approcci atti a ionizzare analiti presenti in tracce direttamente da soluzioni liquide mediante la ionizzazione elettronica cercando di superare gli ostacoli delle più comuni tecniche di ionizzazione chimica (la più nota è l'elettrospray) e di combinare i vantaggi della EI con la LC. Tra queste nuove interfacce compaiono l'interfaccia che sfrutta il *Supersonic molecular beam* del gruppo di ricerca di Amirav [92, 93] e il Direct-EI [94-96] del nostro gruppo di ricerca il cui funzionamento è stato descritto nel capitolo 4 della tesi in esame. È nata così l'idea di combinare i vantaggi di una tecnica on-line, real-time come la CP-MIMS con il Direct-EI: CP-MIMS-DEI per analisi dirette, sia di tipo qualitativo sia quantitativo, utili in caso di rapidi screening e monitoraggi on-line di sostanze deperibili o prodotti di reazione le cui concentrazioni variano nel corso del tempo. Qui di seguito verranno riportati gli esperimenti eseguiti per testare l'accoppiamento CP-MIMS-DEI. Gli analiti ricercati sono una miscela di IPA a basse concentrazioni

(ordine dei ng/mL) in matrici complesse acquose come: acqua di fiume, di mare e di zone vicine ad impianti estrattivi di gas metano. Per la realizzazione del lavoro è stata valutata la curva di calibrazione e quindi il range di linearità, la precisione e i limiti di rivelabilità oltre al monitoraggio in real-time dell'adsorbimento con carbone grafitato dei medesimi.

6.1 PARTE SPERIMENTALE

Gli analiti usati nel presente lavoro sono IPA (naftalene, acenaftalene, fluorene, fenantrene, antracene, pirene, crisene, benzo[a-h]antracene, benzo[b]fluorantene, benzo[a]pirene, indeno[1,2,3 c-d]pirene e benzo[g-h-i]perilene) ad elevato grado di purezza. Alcuni di essi sono stati acquistati come solidi (naftalene, antracene e pirene dalla Sigma Aldrich, Milano, Italia) ed altri come mix standard liquidi 100 ng/μL 100% ACN (Dr. Ehrenstorfer GmbH, Milano, Italia). I solventi, MeOH ed ACN, con grado di purezza per HPLC (VWR International PBI, Milano, Italia) sono stati degassati in corso di analisi con elio puro al >99% (Air Liquide Milano, Italia). Le soluzioni sono state preparate con metodo gravimetrico in metanolo e aggiunte ai campioni da analizzare mediante siringa analitica (Phenomenex, Bologna, Italia). Il carbone grafitato ad elevata superficie (carbon 4, 130 m²/g; LARA Laboratories Roma, Italia) è stato invece usato negli esperimenti in real-time di adsorbimento degli analiti di cui sopra. Infine l'acqua deionizzata milliQ (DI) è stata ottenuta mediante sistema di purificazione Millipore (Direct Q3, Merck Millipore, Milano, Italia). I campioni reali analizzati includono: acqua di mare prelevata da una località balneare (Pesaro, Italia), acqua proveniente dal Canal Grande di Venezia e da un canale generico del centro città, acqua fluviale da un fiume vicino la città di Pesaro (Fiume Foglia) e acqua di mare presa nei pressi di una piattaforma di estrazione di gas metano nell'Adriatico. I campioni sono stati stoccati tal quali, senza alcuna filtrazione in frigo a 4 °C in bottiglie sigillate. Solo successivamente sono stati filtrati tramite siringa con membrana PTFE da 0,2 μm (Agilent, Waldbronn, Germania), prima dell'aggiunta degli analiti, e conservati in vial da 40 mL con tappo dotato di filtro in teflon (Tipologia EPA/VOA; Scientific Specialties Inc., Hanover, MD, USA). Data la cura nel processo di conservazione (nonostante sia durato per diversi mesi) era impossibile evidenziare eventuali perdite di analiti, per cui tali campioni sono stati presi come esempio di matrici ambientali e addizionati con gli analiti d'interesse a basse ma rilevabili concentrazioni. Per agevolare la misurazione, il tappo dei vial è stato rimosso in modo tale da poter immergere la membrana, ed il supporto su cui è montata, direttamente all'interno della fase donatrice-campione. Importante è stato mantenere in fase d'analisi il campione sotto agitazione continua, mediante agitatore magnetico (VELP Scientifica, Monza-Brianza, Italia), in modo da assicurare un'adeguata miscelazione degli analiti e favorirne il contatto con la membrana medesima. Quest'ultima è lunga 2 cm e spessa 170 μm,

con diametro esterno (*outer diameter*, o.d.) di 0,64 mm ed interno (*internal diameter*, i.d.) di 0,30, composta da una HFM di PDMS, montata su un supporto metallico, il *J-Probe* (Figura 26).

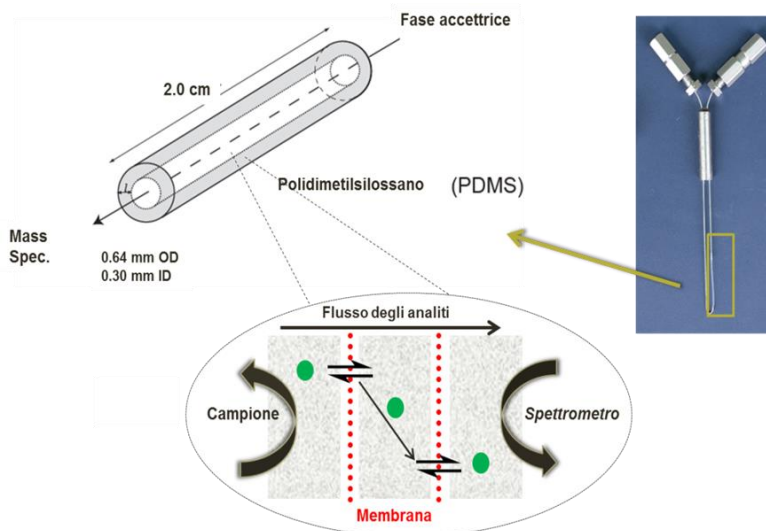


Figura 26: Rappresentazione schematica del supporto metallico *J-Probe* e della membrana a fibre vuote di PDMS usate nella realizzazione del presente lavoro (2 cm lunghezza, 0,64 mm o.d., 0,30 mm i.d.). In figura è riportato anche il funzionamento della membrana con passaggio degli analiti dal campione alla fase accettrice.

Per la determinazione simultanea degli IPA riportati in Figura 27 invece, è stata usata una membrana più sottile, 500 nm di spessore, con aumento della permeazione degli analiti e della sensibilità dello strumento. In Figura 28 invece è riportato lo schema dell'interfaccia CP-MIMS-DEI. La pompa impiegata per spingere la fase accettrice all'interno del *J-Probe* e quindi all'interno della membrana è una HPLC modificata (Agilent 1100 HPLC pump, Santa Clara, CA, USA) operante a 200 $\mu\text{L}/\text{min}$. Le modifiche apportate alla pompa hanno incluso: la riduzione del diametro dei tubi e la riduzione del numero delle linee di ingresso alla pompa rimpiazzate con semplici capillari di PEEK 1/16" di diametro lunghi 40 cm (Blue Stripped PEEK, 254 μm i.d., 1,588 mm o.d., VICI Valco, Brockville, ON, Canada). Tali capillari permettono di collegare direttamente la membrana con la porta d'ingresso della pompa. In tal maniera, è stato possibile ridurre il flusso della fase accettrice con aumento della sensibilità e riduzione della possibilità di danneggiare la membrana. Inoltre l'attenuatore delle pulsazioni della pompa HPLC ed il piccolo volume interno del filtro in linea (0,5 μm), sono stati direttamente connessi alla porta d'uscita della pompa, in modo da aiutare a stabilizzare il flusso della fase accettrice e prevenire l'ingresso di particolati nel capillare che ne provocherebbero una eventuale occlusione.

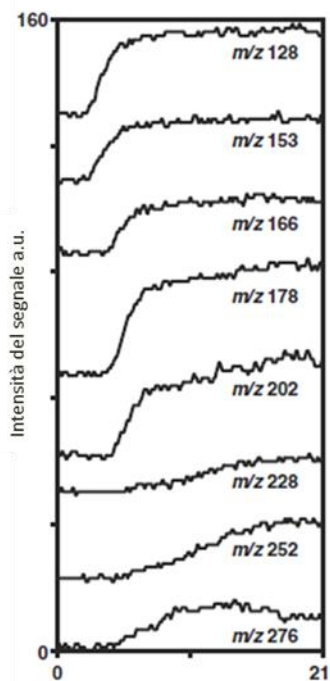


Figura 27: Dimostrazione della simultanea ricerca di un mix di IPA selezionati in un campione acquoso (segnali sfalsati lungo l'asse delle Y per miglior chiarezza). Membrana PDMS HFM di 500 nm.

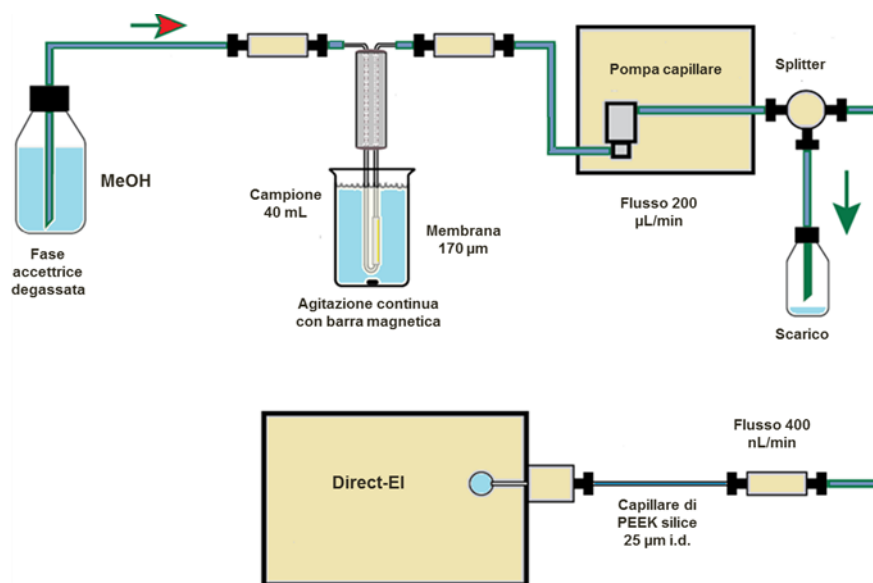


Figura 28: Rappresentazione schematica dell'accoppiamento del sistema CP-MIMS-Direct-EI.

Per assicurare un flusso stabile a 200 $\mu\text{L}/\text{min}$ e 47 Bar, è stato introdotto un ulteriore capillare di PEEK 0,5 m di lunghezza e 50 μm di i.d. tra il filtro in linea e lo splitter. Un flusso di 200 $\mu\text{L}/\text{min}$ non è però compatibile con il Direct-EI (flusso operativo ottimale intorno ai 400 nL/min) necessitando di un riduttore (o splitter) con rapporto di splittaggio fisso. Lo splitter impiegato è stato un tre vie con volume interno estremamente piccolo (Tee Connection, VICI Valco). Dal tre vie partiva un capillare di PEEK SILICE (PEEKSil) 25 μm i.d. lungo 0,5 m (Agilent Technologies, Waldbronn) che entrava direttamente in sorgente. Per regolare ed ottenere un flusso stabile, dal tre vie si è fatto partire un secondo capillare di PEEK 127 μm i.d. e 1,588 mm o.d., considerato lo scarico, la cui lunghezza, 14 cm, è stata determinata sperimentalmente per assicurare un flusso di 400 nL/min. Per assicurare un rapporto di splittaggio costante e per verificare che il flusso entrante in massa fosse effettivamente di 400 nL/min si è usato un secondo capillare identico a quello entrante in massa. Attraverso quest'ultimo è stata fatta flussare acqua deionizzata DI (o milliQ) cronometrando il tempo. L'acqua raccolta in una eppendorf è stata pesata su una bilancia analitica. La configurazione dell'interfaccia Direct-EI per questi esperimenti è stata descritta in precedenza nella tesi (capitolo 4). Lo spettrometro usato è stato un triplo quadrupolo (7000 A QqQ, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) modificato per l'interfaccia Direct-EI. La temperatura della sorgente di ionizzazione è stata impostata a 300 °C per convertire rapidamente i soluti in fase gas. Il sistema operava in modalità SIM (100 ms dwell time per ogni m/z) ricercando gli ioni molecolari degli IPA.

Analiti target	PM (g/mol)	Log Kow	Pressione di Vapore (Pa)	Solubilità in acqua ($\mu\text{g}/\text{L}$)	SIM (m/z)
Naftalene	128,17	3,3	11	31000	128
Acenaftalene	154,21	3,92	$2,6 \times 10^{-1}$	3900	153
Fluorene	166,22	4,18	8×10^{-2}	1700	166
Fenantrene	178,23	4,46	$1,6 \times 10^{-2}$	1200	178
Antracene	178,23	4,45	$8,7 \times 10^{-4}$	45	178
Pirene	202,25	4,88	$6,0 \times 10^{-4}$	135	202
Crisene	228,29	5,81	$8,3 \times 10^{-7}$	2	228
Benzo[a]antracene	228,29	5,76	$2,8 \times 10^{-5}$	9,4	228
Benzo[b]fluorantene	252,31	5,78	$6,7 \times 10^{-5}$	1,5	252
Benzo[k]fluorantene	252,31	6,11	$1,3 \times 10^{-7}$	0,8	252
Benzo[a]pirene	252,31	6,13	$7,3 \times 10^{-7}$	1,6	252
Indeno[1,2,3 c-d]pirene	276,33	6,70	$1,6 \times 10^{-8}$	0,19	276
Benzo[g-h-i]perilene	276,33	6,63	1×10^{-8}	0,26	276

Tabella 7: Proprietà chimico-fisica e parametri mass spettrometrici degli IPA selezionati per l'analisi. Le proprietà fisiche sono stati prese da SRC PHYSICAL PROPERTIES DATABASE [16].

La Tabella 7 riporta i parametri di acquisizione spettrometrica e le proprietà chimiche dei singoli IPA. L'impiego della modalità SIM è stata preferita a quella MRM poiché permetteva d'ottenere una miglior sensibilità. Per la dimostrazione della determinazione multipla degli IPA riportata in Figura 27, è stato invece usato un Direct-EI con singolo quadrupolo (5975 B Inert MSD, Agilent Technologies) operante a 350 °C e 35 μ Torr nella sorgente di ionizzazione.

6.2 RISULTATI E DISCUSSIONE

La prima modifica che è stata necessaria apportare per combinare il sistema CP-MIMS con il Direct-EI è stata la riduzione del flusso mediante uno splitter fisso. Ciò ha permesso di ridurre di circa 500 volte il flusso di FM che dalla membrana (200 μ L/min) entra nella sorgente di ionizzazione (400 nL/min). Con un flusso di MeOH pari a 400 nL/min, il vuoto registrato era pari a 11,2 (\pm 0,1) mTorr (pompa meccanica) e 70 μ Torr (pressione di base del collettore). Monitorando il vuoto durante tutti gli esperimenti successivi è stato possibile valutare la stabilità del sistema. Il MeOH è stato scelto come solvente rispetto all'ACN poiché, da test preliminari, ha fornito segnali più intensi. Il procedimento prevede di immergere la membrana montata sul J-Probe in un vial contenente 39 mL di acqua DI sotto agitazione con ancoretta magnetica. È stato così monitorato lo ione m/z 128 per assicurare la stabilità del sistema e successivamente, è stato aggiunto del naftalene (m/z /128) raggiungendo una concentrazione finale di 430 ng/mL. Dopo qualche minuto si è registrato il segnale dell'analita fino al raggiungimento del plateau. Il supporto è stato poi rimosso ed immerso in una soluzione di lavaggio (39 mL MeOH) fino a che il segnale non è scomparso e la linea di base stabilizzata. Tenendo presente che i segnali sono buoni per entrambi i solventi MeOH ed ACN, per il secondo è stato registrato un segnale più basso del circa il 60%. Ciò è coerente con altri studi svolti con il Direct-EI, dove i segnali degli analiti erano meno intensi quando la FM era ACN [95]. Il metodo è stato poi validato eseguendo curve di calibrazione di soluzioni acquose di IPA dai 4 ng/mL ai 18000 ng/mL. È stato registrato un buon range di linearità per tutti i composti analizzati la cui concentrazione era superiore al loro limite di solubilità in acqua. Il coefficiente di determinazione (r^2) è stato di 0,99 per tutti gli IPA analizzati (Tabella 8), inoltre le concentrazioni più basse che sono state analizzate hanno fornito anche rapporti $S/N \geq 3$, permettendo di determinare, insieme al limite inferiore di linearità, anche i LODs dei composti target studiati. I LODs potrebbero però essere abbassati riducendo o addirittura interrompendo momentaneamente il flusso della fase accettrice [97-100]. Il segnale MS comincia a comparire in un tempo compreso fra 2,8 e 4,7 minuti per il naftalene e pirene rispettivamente. Il tempo di risposta dipende dalla cinetica di permeazione ovvero all'aumentare del volume molare diminuisce il coefficiente di diffusione. A differenza dell'uscita del segnale, il suo decadimento (corrisponde al tempo di lavaggio della membrana) è più veloce, soprattutto se la soluzione di lavaggio è MeOH e non acqua DI [98].

Analiti	Range di linearità (ng/mL)	Media dell'aumento del segnale ($t_{10\%-90\%}$)/ min	Media del decadimento del segnale ($t_{10\%-90\%}$)/ min	Equazione retta di calibrazione	r^2
Naftalene	4-18000	2,8	2,2	$Y=2,60x-69,2$	0,989
Antracene	4-34	3,2	2,1	$Y=3,95x+5,07$	0,995
Pirene	4-130	4,7	2,5	$Y=2,77x+20,4$	0,986

Tabella 8: Dati riguardanti la curva di calibrazione e tempi di risposta di soluzioni acquose preparate con acqua DI. I dati sono stati ottenuti sottraendo il fondo e rappresentano la media di 100 misurazioni.

Il tempo di comparsa del segnale può essere però ridotto. Esso infatti è inversamente proporzionale allo spessore della membrana PDMS HFM per cui, per velocizzare il passaggio dei composti dal campione alla fase accettrice, è sufficiente usare membrane più fini. Successivamente è stata valutata la precisione del metodo, ovvero la ripetibilità inter- ed intra-day, immergendo la membrana in 39 mL di acqua contaminata con IPA ad una concentrazione finale di 85 ng/mL ciascuno. Il segnale è stato registrato per 15 minuti per tutti gli analiti e i risultati sono riportati in Figura 29a (ripetibilità intraday).

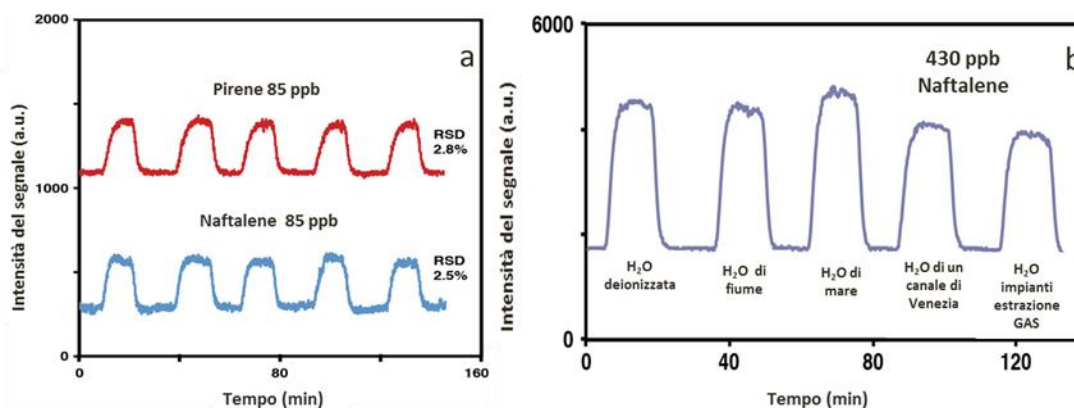


Figura 29: a) Replicati ottenuti per misurazioni simultanee di 5 campioni di acqua DI contaminati con 85 ng/mL finali di pirene e naftalene. Il segnale del pirene è stato impostato con un off-set di 1000 per rappresentare con chiarezza i segnali dei due composti. b) Comparazione del segnale del naftalene 430 ng/mL in 39 mL di campioni reali acquosi con misurazione diretta. Fra una misurazione e l'altra la membrana è stata lavata con MeOH fino a che la linea base ritornava stabile.

I valori di RSD registrati sono tutti inferiori al 3% ad eccezione dell'antracene che non è stato analizzato poiché la sua concentrazione era troppo elevata rispetto al suo limite di solubilità in acqua. Da studi pregressi il Direct-

EI ha sempre dimostrato di essere poco influenzato dall'effetto matrice [96] e l'interfacciamento della CP-MIMS con il Direct-EI ha fornito risultati nettamente migliori (come soppressione o aumento del segnale) rispetto a quelli ottenuti con l'ESI [97,99]. Per valutare l'effetto di eventuali interferenti (come i sali) provenienti dalla matrice sono stati testati diversi campioni ambientali. Aliquote di 39 mL di campione sono state addizionate con naftalene fino ad ottenere una concentrazione finale sempre di 430 ng/mL. I dati, riportati in Figura 29b, mostrano come la riduzione del segnale, per la presenza di interferenti, è insignificante. I valori di ME calcolati [101] sono riportati in Tabella 9 e variano dal 81% al 104%.

Campioni	Intensità del segnale a. u. (naftalene 430 ng/mL)	*Effetto matrice (%)
Acqua DI	2652	-
Fiume di Pesaro	2596	98
Mare di Pesaro	2770	104
Canale di Venezia	2332	88
Piattaforma estrattiva	2146	81

Tabella 9: Calcolo dell'effetto matrice per la misurazione diretta del naftalene 430 ng/mL in diversi campioni acquosi.
 *[segnale campione reale/ segnale in acqua DI]x 100

Sebbene i campioni d'acqua proveniente dal Canal Grande di Venezia e dalle vicinanze di una piattaforma estrattiva mostrino le riduzioni maggiori (88% ed 81% rispettivamente), gli effetti matrice sono comunque poco rilevanti rispetto ai vantaggi apportati da una tecnica on-line, real-time e diretta (senza step di purificazione, diluizione e separazione cromatografica) come la CP-MIMS-DEI. Per dimostrare come tale tecnica sia concretamente efficace in caso di monitoraggi ambientali (e non solo) è stato eseguito un test di adsorbimento in tempo reale mediante carbone grafitato ad elevata superficie (130 m²/g). Le prove prevedono l'aggiunta di 500 mg di carbone a soluzioni acquose di IPA (naftalene, antracene pirene) 430 ng/mL in 39 ml di acqua DI. Monitorando costantemente il segnale degli analiti si è visto come esso decresca velocemente (pochissimi minuti) fino a tornare alla linea base. La velocità di abbassamento del segnale è compatibile con la diminuzione della frazione di IPA liberi in soluzione (Figura 30). In ultima analisi è stata esaminata una soluzione mix 13 IPA 256 ng/mL in acqua DI (IPA dimensioni variabili: dal naftalene m/z 128 al benzo[g,h,i]perilene m/z 276) usando una membrana PDMS HFM più sottile rispetto ai precedenti test (500 nm) per migliorare le performance analitiche.

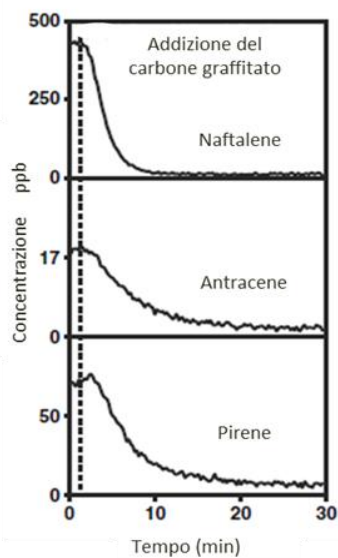


Figura 30: Monitoraggio in tempo reale di soluzioni IPA 430 ng/mL in sospensioni acquose eterogenee sotto agitazione costante con aggiunta di 12,5 g/L di carbone graffitato ($130 \text{ m}^2/\text{g}$). Decremento del segnale in seguito ad adsorbimento degli IPA da parte del carbone.

La Figura 30 riporta 20 minuti di analisi (modalità acquisizione dati SIM) con 8 diversi ioni selezionati. Per gli IPA con dimensioni comprese fra il naftalene ed il pirene, il segnale mass-spettrometrico aumenta rapidamente e si stabilizza in 2-3 minuti. I segnali dei composti più pesanti invece (dal crisene al benzo[g,h,i,]perilene) mostrano un aumento più lento, nell'ordine dei 5-10 minuti. Ciò potrebbe essere dovuto anche ad una loro difficoltà di passare in fase gas una volta all'interno della sorgente di ionizzazione. È evidente come all'aumentare della massa molecolare aumenta anche la temperatura di ebollizione e di conseguenza il loro passaggio in fase gas avviene più lentamente e con più difficoltà, spiegando i risultati ottenuti per gli IPA più pesanti. Sebbene non disponibile al momento della ricerca con la CP-MIMS-DEI, la copertura di ceramica della sorgente di ionizzazione potrebbe migliorare i risultati agevolando il passaggio in fase gas dei composti meno volatili [102] come descritto nel prossimo capitolo di tesi.

6.3 CONCLUSIONI

In questo lavoro è stato riportato il primo accoppiamento CP-MIMS-DEI per analisi dirette, on-line e real-time di IPA a basse concentrazioni in campioni acquosi. Il MeOH è risultato essere la fase accettrice migliore rispetto all'ACN (solitamente usato come solvente nell'interfaccia LC-MS Direct-EI). I limiti di rilevabilità sono risultati corrispondere alla concentrazione più bassa del range di linearità ovvero 4 ng/mL, con aumento del segnale in 2,8 minuti e 4,7 minuti per il naftalene e pirene rispettivamente. È stato inoltre riportato un buon coefficiente di linearità per tutti gli IPA ad una concentrazione inferiore al limite di solubilità in acqua. L'effetto matrice è poi risultato quasi insignificante, compreso fra l'81% ed il 104%. In conclusione è stato dimostrato come l'accoppiamento di una tecnica estrattiva come la CP-MIMS con una d'analisi come il Direct-EI, sia effettivamente utile e fruttuosa. La CP-MIMS-DEI permette screening o monitoraggi in real-time, on-line e diretti senza cioè step di preparazione – purificazione – estrazione dei composti che potrebbero portare ad una loro perdita o ad eventuali contaminazioni dei campioni. Questo permetterà analisi mirate con riduzione dei tempi e dei costi complessivi. Ovviamente per confermare le qualità di tale accoppiamento saranno necessarie ulteriori prove, su composti e matrici diverse. Gli sforzi migliorativi verranno rivolti allo spessore della membrana, al flusso di fase accettrice e all'uso di standard interni direttamente aggiunti a quest'ultima [99]. Le migliorie dovranno riguardare non solo l'apparato estrattivo ma anche l'apparato mass-spettrometrico per migliorare il passaggio in fase gas degli analiti con pressione di vapore molto bassa.

7. AUMENTO DELL'EFFICIENZA D'ANALISI DELL'INTERFACCIA CROMATOGRAFIA LIQUIDA - SPETTROMETRIA DI MASSA DIRECT-EI MEDIANTE SORGENTE A IONIZZAZIONE ELETTRONICA RICOPERTA DA CERAMICA.

L. Magrini, G. Famiglioni, P. Palma, V. Termopoli, A. Cappiello.

Boosting the Detection Potential of Liquid Chromatography-Electron Ionization Mass Spectrometry Using a Ceramic Coated Ion Source.

Una comune sorgente di ionizzazione elettronica (EI) è costituita d'acciaio inox 318 (*Stainless Steel, SS*), un materiale considerato sufficientemente inerte e non-reattivo per molte applicazioni in GC-MS. Inoltre il suo design è progettato per ottimizzare il processo di ionizzazione dei composti. Nel corso degli anni si sono susseguite svariate modifiche per migliorare il più possibile le prestazioni della strumentazione MS, sebbene poche siano state quelle che hanno riguardato nello specifico la sorgente. È stato infatti riscontrato che determinate superfici o la presenza di interferenti possono indurre anomalie negli spettri di massa EI (analisi GC-MS), in relazione alla complessità della matrice, alla temperatura della sorgente ed alla pulizia della stessa, nonché alla concentrazione degli analiti. In particolare, l'adsorbimento e la degradazione termica dei composti, in seguito a contatto con la superficie metallica della sorgente, possono causare la codatura dei picchi e ridurre di conseguenza la risposta analitica, soprattutto per i composti poco volatili e termolabili [103-105]. Questo fenomeno è spesso sottostimato sebbene abbia un impatto significativo sulla sensibilità e sulla ripetibilità delle analisi. Nel corso degli anni si è cercato di migliorare l'inerzia della sorgente di ionizzazione mediante l'impiego di coperture fabbricate con differenti materiali, come riportato in letteratura [106-111]. Qualcuno di questi lavori è stato brevettato e riporta l'uso di differenti materiali [TiC, SiC, boruro metallico, oro, leghe, carbonio simile al diamante (DLC)] con significativi miglioramenti nella qualità degli spettri di massa. In questa ricerca è stata testata una copertura in ceramica, come quella usata per le padelle antiaderenti, che fa affidamento sulla tecnologia sol-gel. Quest'ultima è una tecnica innovativa impiegata nella fabbricazione di numerosi prodotti (ceramica, mattoni, elementi di ingegneria e molti altri) e può essere considerata un ibrido fra la chimica organica e l'inorganica. Tale tecnologia permette d'ottenere coperture più dure e resistenti alle alte temperature (maggiori di 450 °C) di quelle convenzionali finora usate, fatte in fluoro-polimeri. Nella tecnologia antiaderente sol-gel i monomeri, sono applicati prima sulla superficie e solo successivamente polimerizzati tramite reazione chimica. Qui di seguito è stato dimostrato che il nuovo materiale applicato sulla superficie interna di una tipica sorgente EI può eccezionalmente migliorare il segnale degli analiti selezionati.

7.1 MATERIALI E METODI

I solventi impiegati sono stati tutti acquistati dalla VWR International (Milano, Italia) e l'acqua milli-Q è stata ottenuta in laboratorio tramite il sistema di purificazione Millipore-direct-Q 3 UV (Millipore Corp., Milano, Italia). I 16 idrocarburi policiclici aromatici (IPA) sono stati acquistati già diluiti in 100% ACN alla concentrazione di 100 ng/ μ L presso Dr. Ehrenstorfer GmbH (Milano, Italia) mentre gli ormoni, i fenossiacidi, i carbammati, i fenoli e le triazine sono stati forniti dalla Sigma Aldrich (Milano, Italia). Per l'esecuzione del lavoro sono state preparate due soluzioni: una miscela 12 a concentrazione 10 ng/ μ L in 50:50 v/v MeOH:EtOH (Tabella 10) e una miscela 16 IPA 100 ng/ μ L 100% ACN (Tabella 10) conservate entrambe in contenitori da 4 mL ambrati a 4 °C.

7.1.1 COPERTURA DI CERAMICA

La copertura di ceramica sulla superficie della sorgente di ionizzazione è stata applicata dalla ditta TVS S.p.A. (Fermignano, Italia) usando la miscela ILAG Ceralon (ILAG, Wangen, Svizzera). La copertura è basata sulla tecnica sol-gel ed è priva di PTFE (Politetrafluoroetilene). Comparato con il PTFE, la copertura di sol-gel è più dura (9H secondo la scala inglese di durezza delle matite) ed è particolarmente adatta per oggetti che vengono a contatto con temperature molto elevate, con ottime proprietà di rilascio. In seguito al processo d'indurimento, che avviene a 200 °C, si ottiene un prodotto con caratteristiche simili al vetro per l'estrema levigatura, bassa porosità, l'attività di anti-aderenza, e la durezza e la resistenza termica. Per ottenere una buona resistenza della copertura è necessario però pretrattare il metallo con carta abrasiva (Al_2O_3 , 80 mesh) e pulire con estrema accuratezza la superficie, per eliminare qualsiasi traccia di polvere o grasso che potrebbe impedire una corretta adesione della ceramica. Eventuali residui possono essere poi rimossi con aria pressurizzata seguita da lavaggio in acqua milliQ. Una volta preparata così la superficie da ricoprire si passa all'applicazione della copertura composta da una base e da un *top coat*, applicati con un rapporto 2:1. L'ILAG normalmente fornisce un kit completo con 3 componenti: A, B, C, che devono essere preparati simultaneamente. Per la preparazione della ceramica è necessario seguire precisi passaggi: 1) pesare 6,8 g del componente A; 2) aggiungere 4,6 g del componente B sotto gentile agitazione mediante ancoretta magnetica e chiudere il contenitore per evitare possibili evaporazioni e contaminazione del preparato; 3) lasciare sotto agitazione per due ore; 4) pesare 8,6 g del componente C e agitarlo con un miscelatore elettrico ad alta velocità per 5-10 min fino a che non è completamente disperso; 5) ridurre la velocità dell'agitazione della miscela A+B ed aggiungere C, chiudendo il contenitore; 6) lasciare in agitazione per 30 min; 7) filtrare la miscela A+B+C con un filtro di nylon (250 mesh/ 60 μ m) e conservare il filtrato in un contenitore al chiuso al riparo dalla luce (data la sensibilità della componente C ad essa) e ad una temperatura fra 5 °C e 10 °C.

Soluzioni	Composti	g/mol	m/z monitorati
Mix 16 IPA 100 [ng/μL]			
	NAFTALENE	128	128
	ACENAFTENE	153	153
	ACENAFTILENE	152	152
	FLUORENE	166	166
	ANTRACENE/ FENANTRENE	178	178
	FLUORANTENE/ PIRENE	202	202
	CRISENE/ BENZO(a)ANTRACENE	228	228
	BENZO(a)PIRENE/ BENZO(b)FLUORANTENE/ BENZO(k)FLUORANTENE	252	252
	DIBENZO(a,h)ANTRACENE	278	278
	BENZO(g-h-i)PIRENE/ INDENO(1,2,3, c-d)PIRENE	276	276
Mix 12 10 [ng/μL]			
	ALDICARB	190	115,100,89
	ATRAZINA	215	200,215,173
	CARBARYL	201	144,115,116
	BISFENOLO-A	228	213,228,119
	17-β-ESTRADIOLO	272	272,160,213
	2,4 D	221	162,164,220
	17-α-ETINILESTRADIOLO	296	213,296,160
	2,4 DB	249	162,164,87
	MCPB	228	142,107,228
	DIETILSTILBESTROLO	268	268,239,145
	SILVEX	269	196,198,200
	MESTRANOLO	310	227,310,174

Tabella 10: Parametri modalità d'acquisizione dati SIM.

È importantissimo lavorare con guanti di cotone e sotto cappa aspirante poiché la miscela è molto elettrostatica ed attira la polvere. Il preparato può essere conservato per massimo 12 ore. Prima dell'applicazione è necessario agitare dolcemente il sol-gel per 30 min. L'applicazione avverrà mediante un aerografo (foro da 3 micron). Dato che i prodotti hanno una viscosità davvero molto bassa, per prevenire gocce/accumuli e per ottenere una copertura sufficientemente fine è stata sperimentata la seguente procedura: 1) pre-riscaldare la sorgente di ionizzazione a 40 °C; 2) applicare un primo strato di copertura base 15-20 µm; 3) eseguire breve asciugatura all'aria; 4) applicare un secondo strato di copertura 10-15 µm; 5) applicare bagnato su bagnato il *top coat*, ovvero l'ultimo strato, 5-7 µm (eccedendo tale strato si può avere la rottura della copertura). Lo spessore totale si aggira intorno ai 40 µm. Le condizioni di "cottura"/"indurimento" sono invece le seguenti: da 20 °C a 140 °C in 7 minuti, da 140 °C a 200 °C in 5 min e mantenimento della temperatura per 20 minuti (o 220 °C, temperatura massima, per 10-15 minuti). La copertura di ceramica è stata applicata (come sopra descritto) solo nello strato interno della sorgente di ionizzazione e solo nel volume ionico (Figura 31), lasciando il resto del corpo della sorgente e tutti i componenti elettrici non ricoperti.

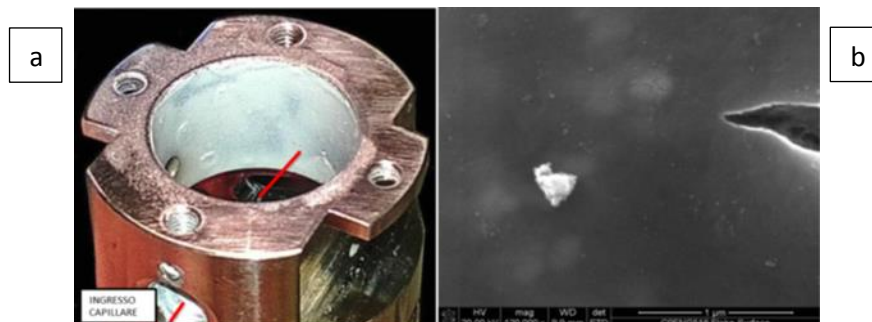


Figura 31. a) Sorgente di ionizzazione EI con copertura interna di ceramica; b) 120,00X SEM immagine di un frammento della copertura. L'imperfezione bianca luminosa è servita per la messa a fuoco dello strumento mentre l'imperfezione sulla destra di color scuro è un'imperfezione vera e propria della copertura.

In questo modo la copertura è stata applicata solo sulla superficie coinvolta nel processo di vaporizzazione e di ionizzazione, limitando la sua influenza sui potenziali elettrici della sorgente. Per testare la qualità della copertura sono state eseguite analisi a diffrazione raggi X (XRD) (Tabella 11 e Figura 32) ed analisi con il SEM/EDX. La copertura è risultata essere costituita principalmente da ossigeno, silicene (carburo di silicio, SiC), carbonio titanio e sodio, mentre la superficie ha mostrato un aspetto amorfo e simil-vetroso, ovvero è straordinariamente liscia e praticamente priva di pori (inferiori a 1 µm).

usato è un Agilent 5975 Inert MSD (*Mass Selective Detector*) con singolo quadrupolo (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, USA). La calibrazione dello strumento è stata eseguita quotidianamente a 200 °C usando come composto di riferimento la perfluorotributillamina (PTFBA) e monitorando i suoi tre ioni caratteristici: m/z 69, 219, 502. Durante la fase di calibrazione non è stata fatta entrare la FM, mantenendo il Direct-EI momentaneamente isolato dalla nano-HPLC. Prima di procedere con le analisi, i parametri della calibrazione sono stati attentamente valutati al fine di verificare l'integrità dei potenziali della sorgente di ionizzazione e l'assenza del rumore di fondo. In particolar modo sono stati presi in considerazione l'elettro-moltiplicatore, il repeller, le lenti e la risoluzione e, i segnali degli ioni della PTFBA, sono stati registrati per un'accurata valutazione della sensibilità dello strumento. Ad eccezione del primo giorno in cui è stato difficile eseguire la calibrazione dello strumento, i giorni successivi d'analisi (dopo un giorno intero di condizionamento a 300 °C e sotto flusso costante 500 nL/min 90-10 v/v ACN/H₂O) non hanno evidenziato sostanziali differenze rispetto alla calibrazione con una comune sorgente SS. Per le analisi della miscela 12 la temperatura è stata portata a 350 °C (temperatura massima raggiungibile), mentre gli esperimenti in FIA della miscela 16 IPA sono stati eseguiti a tre temperature: 250 °C, 300 °C, 350 °C. Tutte le analisi sono state condotte su una comune sorgente d'acciaio e su una ricoperta di ceramica per confrontare i risultati. Le analisi sono state condotte in SIM per la miscela dei 16 IPA (Tabella 10) e in scan per la miscela 12. I parametri scan impostati sono stati i seguenti: range di massa da m/z 80,00 a 550,00 soglia = 10 e 0,8 scansioni/secondo.

7.2 RISULTATI E DISCUSSIONE

Lo spunto che ha indotto a ricercare nuovi materiali antiaderenti ed inerti per il rivestimento della sorgente è stato il tentativo di analizzare con il Direct-EI LC-MS una miscela di contaminanti ambientali nel latte in polvere per neonati. Il campione è stato separato usando una colonna Atlantis C18 nano-HPLC con le stesse condizioni operative riportate sopra. Durante le analisi è stato osservato che due composti hanno dato un segnale molto scarso o nullo come mostrato nel cromatogramma riportato in Figura 33 [112]. I due composti assenti sono il 17- β -estradiolo ed il 17- α -etinilestradiolo (picchi numero 6 e 7 rispettivamente). Gli ormoni steroidei normalmente danno segnali poco evidenti in EI e non possono essere determinati efficientemente in GC-MS senza prima derivatizzarli. Sebbene ci si aspettasse una loro difficile determinazione, la totale assenza dei segnali è stata una sorpresa, soprattutto perché quelli del dietilstilbestrolo e del mestranolo erano visibili (picchi 10 e 12). In un precedente lavoro [106] è stato messo in evidenza il ruolo che gioca la superficie della sorgente EI nel processo di vaporizzazione e di conseguenza di ionizzazione elettronica di alcuni analiti nell'interfaccia Particle Beam (PB). Nel PB ogni sostanza entrante nell'interfaccia è convertita in un fascio di particelle di soluto che in seguito entrano nella sorgente di ionizzazione.

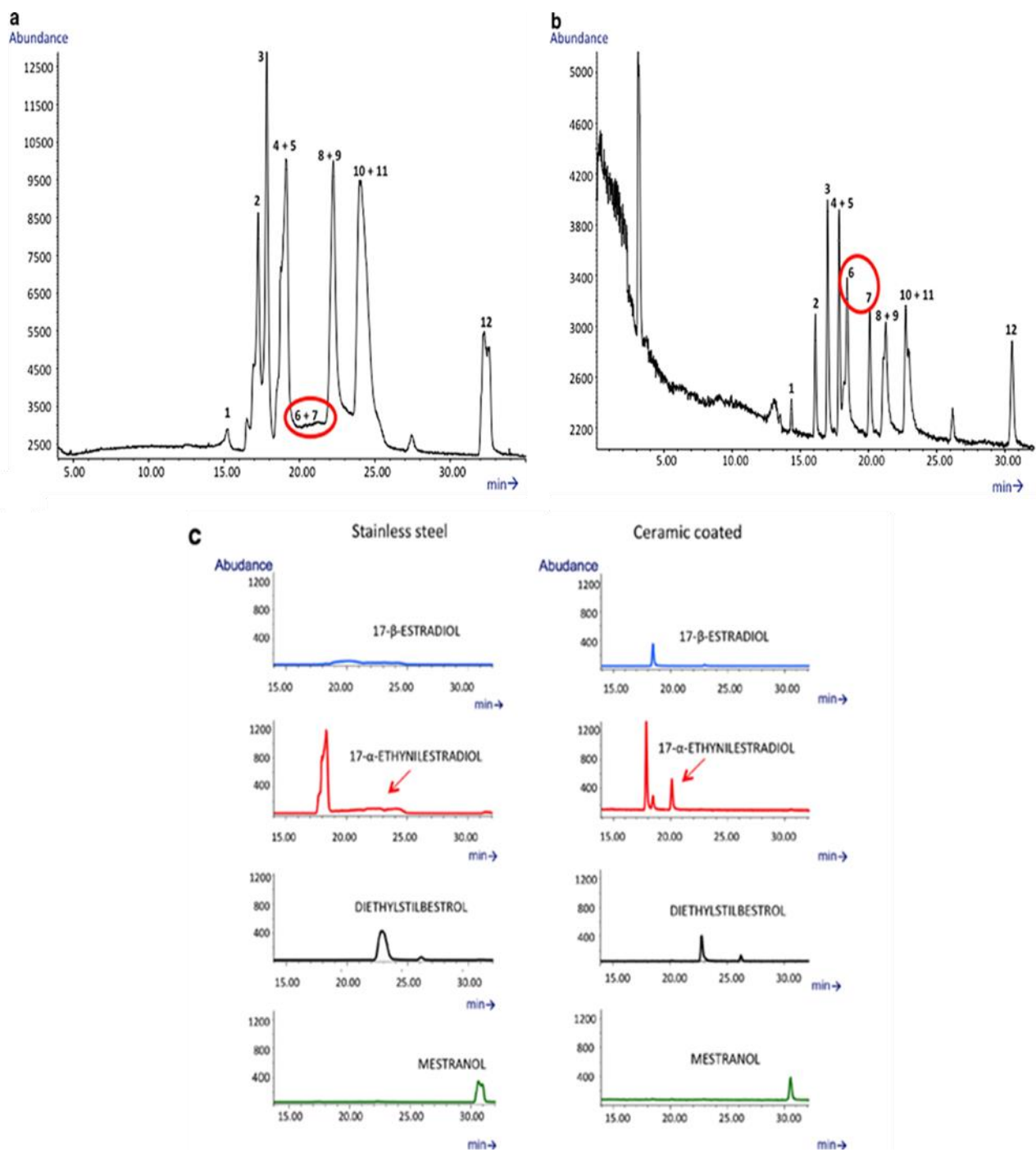


Figura 33. TIC (Total Ion Chromatogram) dell'analisi Direct-EI LC-MS della miscela 12 [10 ng/μL]. a) TIC con sorgente d'acciaio; b) TIC con sorgente ricoperta da ceramica; In ordine dall'alto verso il basso troviamo: 1. Aldicarb, 2. Atrazine, 3. Carbaryl, 4. BPA, 5. 2,4-D, 6. 17-β-estradiolo, 7. 17-α-etinilestradiolo, 8. 2,4 DB, 9. MCPB, 10. Dietilstilbestrolo, 11. Silvex, 12. Mestranolo. c) Estrazione dei 4 ioni corrispondenti ai 4 ormoni ricercati (sinistra: analisi condotte con sorgente d'acciaio, a destra: con sorgente ricoperta).

Il fascio termina il suo percorso su un punto specifico della sorgente riscaldata ad elevate temperature dove le particelle vengono vaporizzate e le molecole rilasciate in fase gassosa. Nel lavoro in questione è stato dimostrato che l'impatto fisico delle particelle di soluto genera un *background ionico* dovuto alle tracce delle sostanze eluite nell'analisi precedente, che rimangono depositate sulla superficie metallica. Questo è particolarmente evidente per molecole con un'elevata affinità per l'acciaio di cui è composta la sorgente. Gli ioni generati dai residui sono visibili negli spettri di massa e vengono acquisiti fino a che l'ultima traccia di analita viene rimossa dalle particelle che via via entrano in sorgente. L'interfaccia Direct-EI è fortemente correlata alla PB, anzi ne è uno sviluppo, ed ambo le strumentazioni prevedono la nebulizzazione dell'eluente cromatografico contenente gli analiti d'interesse prima della vaporizzazione. Comunque, l'effetto memoria fino ad ora non è stato mai osservato nel Direct-EI e questo perché opera a bassi flussi di FM, generando particelle di soluto più piccole non in grado di generare un background così elevato come la PB. Questo è vero per molecole a PM molecolare medio-basso e bassa temperatura d'ebollizione, mentre per composti più pesanti ed alto bollenti si è registrato un effetto memoria anche notevole, come verificato in Figura 34 per l'indeno (1,2,3 c-d)pirene.

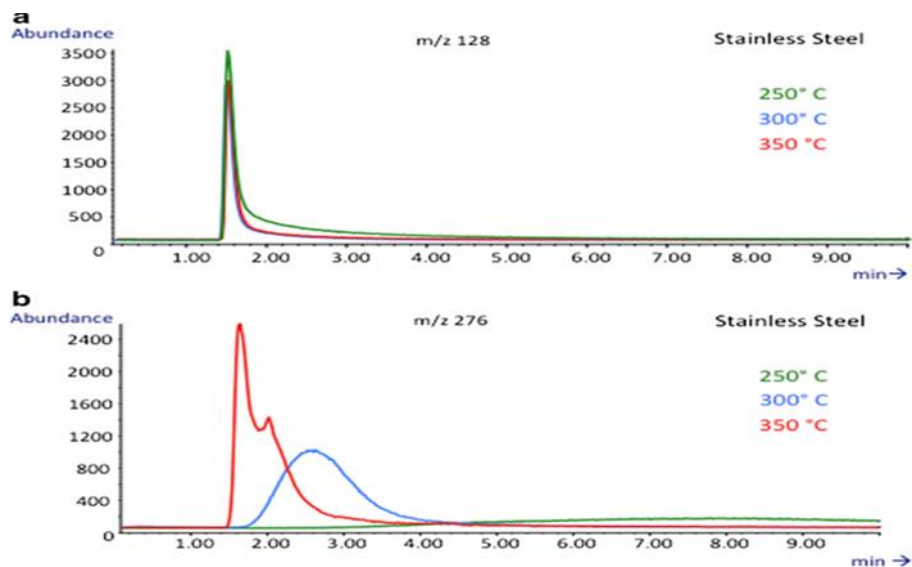


Figura 34: Ioni selezionati da analisi con sorgente in acciaio inox: a) m/z 128 naftalene e b) m/z 276 benzo(g,h,i)perilene ed indeno(1,2,3 c-d)pirene. Le analisi sono condotte a 3 diverse temperature (250-300-350 °C) iniettando tutte e 16 i composti insieme (modalità d'analisi FIA).

Nonostante che la ionizzazione avvenga in fase gassosa, il range delle sostanze analizzabili col Direct-El rispetto ad una comune tecnica GC-MS, è maggiore [113-116]. La combinazione di un veloce trasferimento di calore alle particelle degli analiti ed un'efficiente vaporizzazione riducono drasticamente la possibilità di una decomposizione termica, permettendo perciò l'analisi di molti analiti separabili in LC, così come quelli analizzabili in GC ma, con ancora alcuni problemi per composti più pesanti e altobollenti. Di fatto la conversione dell'eluato in fase gas non è mai stata investigata a fondo e ciò ha spinto a studiare più nel dettaglio il ruolo delle proprietà fisiche delle sostanze e la natura della superficie della sorgente di ionizzazione nel processo di vaporizzazione che influisce pesantemente su l'esito finale dell'analisi.

7.2.1 PROVE D'APPLICAZIONE DELLA CERAMICA

Il lavoro è iniziato cercando di applicare, direttamente in laboratorio la medesima ceramica che è stata applicata in seguito dalla ditta TVS S.p.A. Sono state condotte diverse prove di pretrattamento della superficie e di applicazione della copertura su alcune lamine d'acciaio inox 318. Sono stati impiegati diversi tipi di carta abrasiva per aver linee d'incisione con diverso spessore e orientamento altrettanto diverso (circolare, incrociate, parallele, etc). Sono state testate anche due punte diverse per l'aerografo (5 e 3 micron). I vari tentativi sono riportati in Figura 35. Ne è risultato che non è necessario incidere profondamente l'acciaio per indurre una maggior aderenza della copertura mentre è necessario una punta estremamente fine (3 micron) dell'aerografo per aver la miglior nebulizzazione possibile della copertura ed evitare il formarsi di gocce. Purtroppo l'applicazione di tale copertura su una superficie piana è ben diversa dalla medesima su una superficie piccola, chiusa, e ricurva e, le prove eseguite in laboratorio su una sorgente di ionizzazione non sono state molto soddisfacenti (Figura 36).

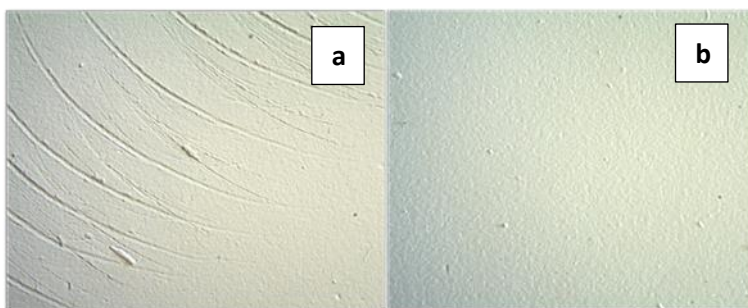


Figura 35: Immagini al microscopio ottico, ingrandimento 40X, di due diverse piastre d'acciaio inox ricoperte mediante aerografo con foro da 3 micron. a) piastra trattata con andamento circolare mediante carta abrasiva (40 mesh); b) piastra trattata con andamento longitudinale mediante carta abrasiva (80 mesh), e applicando meno forza durante il trattamento.

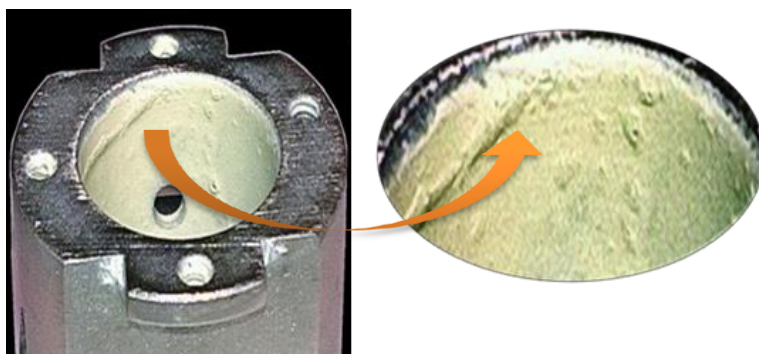


Figura 36: Sorgente EI ricoperta in laboratorio mediante tecnica sol-gel. Strato di ceramica maggiore di 40 micron, con numerose irregolarità sulla superficie.

7.2.2 ESPERIMENTI SULLA MISCELA 16 IPA

Sono stati scelti per questo studio 16 composti con struttura simile e quindi con simili proprietà chimico-fisiche ma con progressivo aumento della temperatura di ebollizione direttamente proporzionale all'aumentare del PM. Gli IPA sono chimicamente stabili e per questo motivo generano spettri di massa semplici (solo lo ione molecolare con pochi frammenti). Queste caratteristiche li rendono relativamente semplici da analizzare anche a basse concentrazioni ed idonei alla nostra ricerca, focalizzata sul determinare l'influenza del PM e del punto di ebollizione sul processo di vaporizzazione e del segnale MS, isolando eventuali problemi riconducibili alle proprietà chimiche delle sostanze. Come riportato in un altro articolo [113] la formazione dello spray e le dimensioni delle goccioline nel Direct-EI sono influenzati da differenti fattori: geometria di nebulizzazione, temperatura, flusso di FM e tensione superficiale della medesima. Il medesimo nebulizzatore e la velocità di flusso della FM sono rimasti invariati per tutti gli esperimenti eseguiti. Dato il piccolo volume d'iniezione (20 nL), il flusso nell'ordine dei nanolitri e l'acquisizione dei segnali in modalità SIM e, soprattutto la mancanza di una separazione cromatografica (FIA) ci si sarebbe aspettati una risposta veloce (entro un minuto dall'iniezione, considerando la portata del capillare di connessione fra la sorgente e la LC), un unico segnale sufficientemente stretto, contenente tutti e 16 gli IPA per ogni analisi, e nessuna interazione fra i composti e la sorgente [117]. Questo se il PM e la T ebollizione non avessero interferito in maniera così decisiva nel processo di vaporizzazione. I risultati ottenuti (a tutte e tre le temperature) sono stati sorprendenti. Per valutare l'allargamento della banda cromatografica dopo l'analisi MS è stata usata la larghezza del picco a metà altezza piuttosto che alla base. La Figura 34 a mostra il segnale per lo ione m/z 128 ottenuto con una sorgente di metallo mentre la Figura 34 b mostra il segnale ottenuto alle stesse condizioni operative dello ione m/z 276 (indeno(1,2,3 c-d)pirene e benzo(g,h,i)perilene). Come evidente dalla figura in questione i risultati sono notevolmente diversi. Il naftalene genera un gruppo di segnali sufficientemente stretti e sovrapponibili anche

se leggermente ritardati e con piccola codatura a 250°C. I picchi acquisiti dello ione m/z 276 invece sono nettamente peggiori sia in termini di ritardo sia di larghezza del picco, alterando notevolmente il profilo FIA atteso. A 250 °C l'effetto è particolarmente evidente, con un ritardo di circa 4 minuti ed una larghezza del picco di 7-8 minuti rispetto agli 1,5 e 0,1 minuti ottenuti per il naftalene, rispettivamente. Come prevedibile, la situazione migliorava a temperature più elevate, con una considerevole riduzione del tempo per ogni aumento di temperatura. È da notare che a 350 °C il segnale dello ione m/z 276 si divide in due picchi non separati (irrisolti) come risultato di una parziale risoluzione dei due composti (indeno(1,2,3 c-d)pirene e benzo(g,h,i)perilene) i quali mostrano lo stesso peso molecolare ma diversi punti di ebollizione (536 °C e 442 °C rispettivamente). I rapporti segnale/rumore (S/N) calcolati per questi picchi sono: 23 a 250 °C, 69 a 300 °C, 315 a 350 °C. Anche gli altri IPA mostrano un aumento dell'allargamento del segnale via via che aumenta il loro PM e di conseguenza la temperatura di ebollizione. La spiegazione più logica di tale comportamento è riconducibile al ruolo giocato dalla superficie interna della sorgente di ionizzazione, scartando un possibile coinvolgimento della FM dato che il vuoto all'interno della sorgente, costantemente misurato, ha sempre registrato una pressione costante di $2,5 \times 10^{-5}$ Torr. Questo a dimostrare che i vapori generati dalla diretta infusione della FM dalla LC sono rimossi/aspirati dalla pompa del vuoto. La spiegazione più plausibile è che i composti a PM maggiore e con elevata temperatura d'ebollizione evidenzino difficoltà nel passare in fase gassosa una volta all'interno della sorgente di ionizzazione. In questo modo, a differenza di composti più leggeri e volatili, vanno a toccare la superficie metallica riscaldata della sorgente. Si viene a instaurare un contatto fisico vero e proprio in seguito al quale tali i composti più pesanti tendono a depositarsi sulla superficie riscaldata e a passare in fase gassosa in modo graduale, spiegando così il ritardo e la smisurata codatura del segnale ottenuto.

7.2.3 ESPERIMENTI CON LA SORGENTE RICOPERTA DA CERAMICA

Gli stessi esperimenti sono stati ripetuti per testare la sorgente di ceramica. I segnali ottenuti con la sorgente ricoperta sono riportati in Figura 37 (a e b). Come si può osservare chiaramente, le differenze rispetto ad una comune sorgente di metallo, sono estremamente rilevanti. A 350 °C tutti i segnali ottenuti sono cromatograficamente eccellenti, senza ritardo e senza codatura, indipendentemente dal peso molecolare e dalla temperatura di ebollizione. Le differenze osservate in precedenza fra il segnale del naftalene e dell'indeno(1,2,3 c-d)pirene sono scomparse con la nuova copertura. È stato osservato solo un leggero allargamento del segnale per lo ione m/z 276 a 250 °C (Figura 37 b), come volevasi dimostrare data la grande differenza fra la temperatura della sorgente e la temperatura dei due composti che rispondo allo ione in esame. Dati gli ottimi segnali, anche il rapporto S/N è migliorato notevolmente per tutti i composti, in particolar modo per il segnale m/z 276 che ha registrato un aumento di quasi 40 volte.

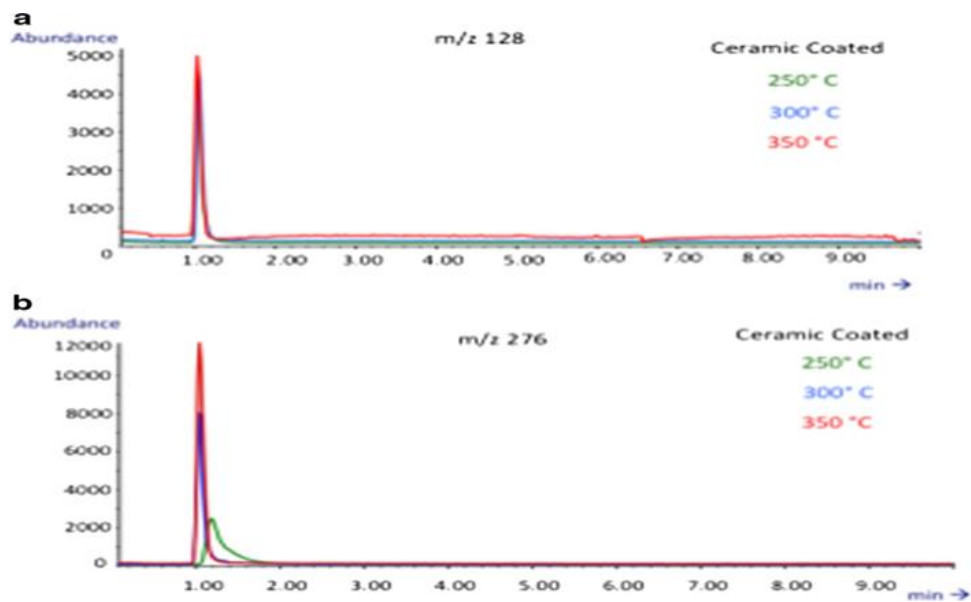


Figura 37: Ioni selezionati da analisi con sorgente ricoperta di ceramica: a) m/z 128 naftalene e b) m/z 276 benzo(g,h,i)perilene e indeno(1,2,3 c-d)pirene. Le analisi sono condotte a 3 diverse temperature (250-300-350 °C) iniettando tutte e 16 i composti insieme (modalità d'analisi FIA).

Le conclusioni sono quindi state chiare, potendo assumere che la copertura di ceramica in questione interviene nel migliorare il processo di vaporizzazione che si ripercuote in un miglioramento del potenziale d'analisi. Nella Tabella 12 sono riportate le larghezze dei picchi a metà altezza, per tutti e 16 i composti per ambo le sorgenti. Le analisi, sono state eseguite in triplicati per ogni temperatura e come in precedenza riportato senza alcuna differenza tecnica fra quelle condotte con una comune sorgente SS ed una ricoperta. Ad eccezione dei primi composti, quelli più leggeri, per i quali il segnale è buono, indipendentemente dalla presenza o meno della copertura e, con una leggera dipendenza dalla temperatura della sorgente (anche se con la ceramica il segnale migliora ulteriormente) la differenza nei risultati è ben evidente per i composti più pesanti come il benzo(g,h,i)perilene e l'indeno(1,2,3 c-d)pirene. È sufficiente notare come alla temperatura di 250 °C la larghezza del segnale passi da circa 3.299 (± 0.007) min a 0.099 (± 0.051) min con una sorgente SS e ricoperta con ceramica (Ceramic Coating, CC) rispettivamente o come, per la medesima temperatura, vi sia una differenza di più di 3 min fra il segnale m/z 128 e m/z 276 ottenuti con una sorgente SS, e di 0.058 min con la sorgente CC. Ovviamente anche il segnale ottenuto con la ceramica migliora progressivamente all'aumentare della temperatura, evidenziando uno scostamento approssimativo fra il segnale m/z 128 e m/z 276 a 350 °C di soli 0.004 min.

m/z	Tempo (min)					
	SS			CC		
	250 °C	300 °C	350 °C	250 °C	300°	350 °C
128	0.069±0.002	0.071±0.001	0.074±0.001	0.041±0.001	0.041±0.001	0.039±0.001
153	0.072±0.001	0.072±0.002	0.079±0.001	0.043±0.001	0.041±0.001	0.040±0.001
152	0.076±0.002	0.071±0.001	0.077±0.002	0.043±0.001	0.042±0.001	0.040±0.001
166	0.073±0.002	0.07±0.002	0.075±0.001	0.042±0.002	0.042±0.001	0.043±0.002
178 (2)	0.088±0.002	0.071±0.002	0.069±0.002	0.037±0.001	0.046±0.02	0.044±0.002
202 (2)	0.137±0.001	0.082±0.001	0.083±0.003	0.044±0.001	0.045±0.001	0.044±0.01
228 (2)	0.418±0.004	0.112±0.058	0.066±0.001	0.054±0.002	0.040±0.001	0.044±0.001
252 (3)	1.518±0.002	0.264±0.001	0.090±0.003	0.069±0.004	0.040±0.002	0.046±0.002
278	3.099±0.007	0.684±0.001	0.153±0.002	0.095±0.002	0.039±0.002	0.044±0.002
276	3.299±0.007	0.739±0.002	0.161±0.002	0.099±0.051	0.039±0.002	0.043±0.002

Tabella 12: Larghezza dei picchi a metà altezza della miscela 16 IPA. I dati sono stati ottenuti a tre diverse temperature: 250 °C, 300 °C e 350 °C sia con sorgente d'acciaio (SS) che con sorgente ricoperta di ceramica (CC). (2) (3): numero di composti con lo stesso valore m / z.

7.2.4 ANALISI DEGLI ORMONI STEROIDEI

La nuova sorgente ricoperta è stata poi testata realizzando una separazione cromatografica, ovvero la separazione della miscela 12 vista in precedenza, riportata in Figura 33, alle medesime condizioni operative. Il TIC, ottenuto anche in questo caso in modalità scan, è riportato in Figura 33 b, e da esso sono chiaramente visibili i miglioramenti ottenuti in termini di efficienza di vaporizzazione. Basti vedere come i picchi 6 e 7 (17- β -estradiolo ed il 17- α -etinilestradiolo) sono ora inequivocabilmente presenti e la risoluzione sia aumentata a tal punto da avere una parziale risoluzione dei picchi cromatografici che in precedenza erano co-eluiti (ad esempio 8-9, e 10-11, in Figura 33 b). Comunque la dimostrazione più eclatante dei vantaggi apportati dalla copertura di ceramica sono mostrati dai profili dei singoli 4 ioni riportati in Figura 33 c e dalla Figura 38 a e b. Quest'ultima riporta la sovrapposizione dei 4 ioni estratti dei singoli ormoni alle tre diverse temperature sia per le analisi condotte con una sorgente SS sia per quelle ottenute con sorgente CC.

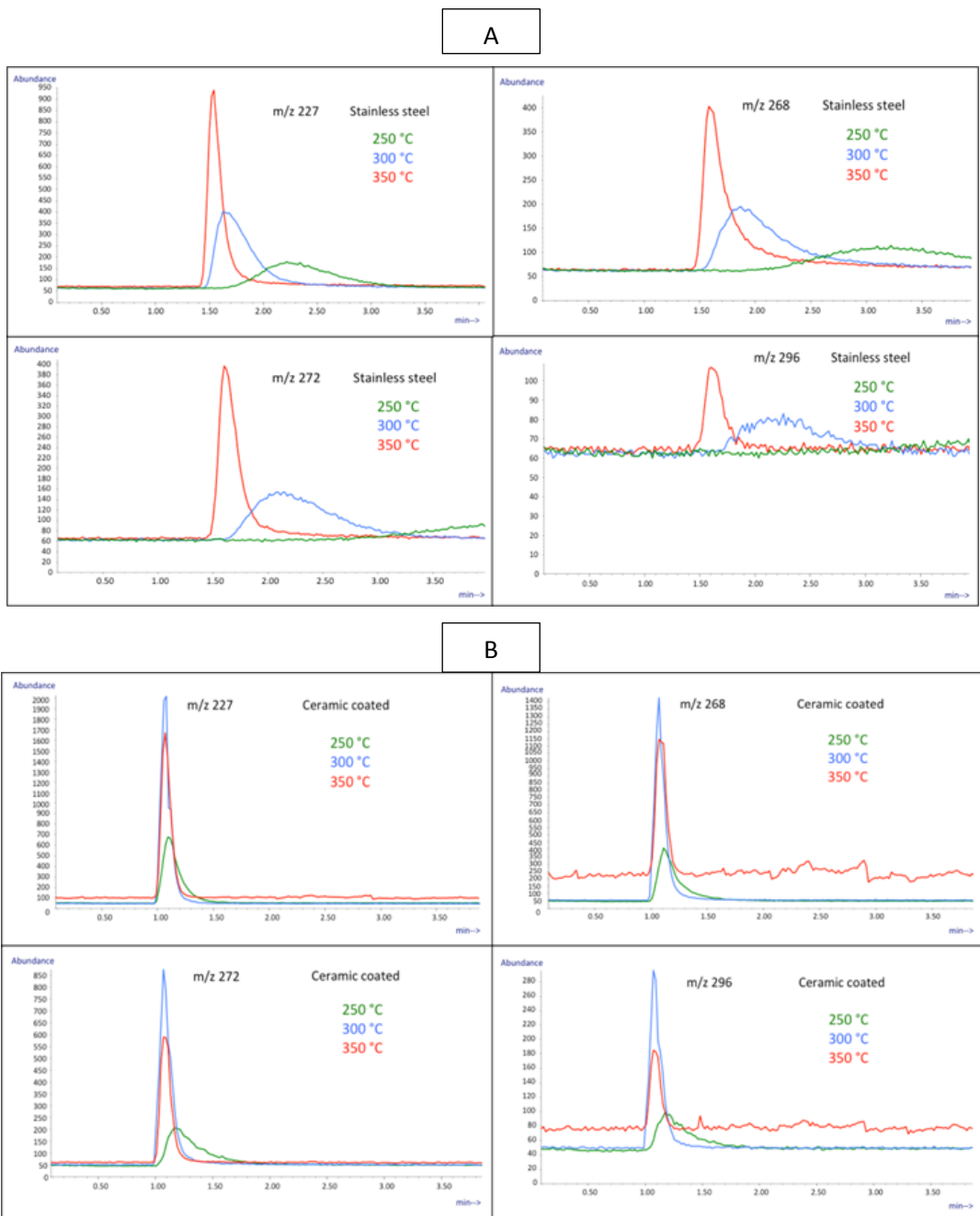


Figura 38: Ioni dei 4 ormoni selezionati. Analisi FIA sono state condotte a 3 diverse temperature con: (A) sorgente SS e (B) ricoperta di ceramica CC. I composti sono. m/z 227, (mestranolo); m/z 268, (dietilstilbestrolo); m/z 272 (17- β -estradiolo); m/z 296 (17- α -etinilestradiolo).

Nelle Tabelle 13 e 14 sono riportati i profili ionici dei 4 ormoni sia per le analisi condotte con sorgente d'acciaio inox 318 che per le analisi condotte con sorgente ricoperta di ceramica. Ovviamente è stata anche valutata se la presenza della ceramica nel volume ionico interferisse con gli spettri di massa, alterandone il profilo in qualche modo. I valori riportati in Tabella 15, ottenuti dal confronto fra gli spettri sperimentali e quelli

depositati nella NIST dimostrano la mancanza totale d'interferenza. I composti selezionati erano tutti identificati con la probabilità di riconoscimento compresa fra il 67,3% ed il 92,6%.

Composti	Ritardo del segnale (SS) (tempo min)			Ritardo del segnale (CC) (tempo min)		
	250 °C	300 °C	350 °C	250 °C	300°	350 °C
Mestranolo	1.580±0.002	1.436±0.002	1.419±0.001	0.968±0.02	0.968±0.001	0.967±0.001
Dietilstilbestrolo	1.888±0.005	1.463±0.003	1.421±0.002	0.968±0.001	0.968±0.002	0.968±0.003
17-β-estradiolo	2.607±0.006	1.602±0.001	1.425±0.003	1.007±0.002	0.968±0.001	0.969±0.004
17-α-etinilestradiolo	3.288±0.003	1.646±0.003	1.426±0.001	1.013±0.003	0.969±0.002	0.968±0.002

Tabella 13: Ritardi del segnale degli ormoni selezionati. I dati sono stati ottenuti a tre diverse temperature sorgente di ionizzazione: 250 °C, 300 °C e 350 °C, sia con sorgente d'acciaio (SS) che con sorgente ricoperta di ceramica (CC).

Composti	Tempo (min)					
	SS			CC		
	250 °C	300 °C	350 °C	250 °C	300°	350 °C
Mestranolo	0.451±0.012	0.204±0.016	0.097±0.004	0.177±0.012	0.092±0.009	0.102±0.001
Dietilstilbestrolo	0.855±0.025	0.358±0.014	0.121±0.010	0.209±0.011	0.105±0.014	0.115±0.005
17-β-estradiolo	1.122±0.031	0.527±0.026	0.102±0.009	0.331±0.021	0.115±0.028	0.114±0.001
17-α-etinilestradiolo	1.035±0.091	0.4180±0.032	0.129±0.001	0.332±0.009	0.114±0.022	0.112±0.004

Tabella 14. Larghezza del picco a metà altezza degli ormoni selezionati. I dati sono stati ottenuti a tre diverse temperature della sorgente di ionizzazione: 250 °C, 300 °C e 350 °C, sia con sorgente d'acciaio (SS) che con sorgente ricoperta di ceramica (CC).

Composti	Match	Reverse Match	Probabilità (%)
Mestranolo	881	887	73,7
Dietilstilbestrolo	807	828	67,3
17-β-Estradiolo	873	874	90,1
17-α-Etinilestradiolo	842	842	92,6

Tabella 15: Parametri di qualità degli spettri di massa dei 4 ormoni in esame

7.3 CONCLUSIONI

Dopo le iniziali difficoltà riscontrate nel determinare le migliori condizioni possibili per applicare uno strato di ceramica liquida sufficientemente sottile e soprattutto resistente e priva d'irregolarità, i dati riportati nel seguente lavoro hanno dimostrato come tale copertura, realizzata con tecnica sol-gel, quando applicata nel volume ionico di una sorgente di ionizzazione EI possa inequivocabilmente migliorare il processo di vaporizzazione degli analiti nel Direct-EI LC-MS e di conseguenza l'intero potenziale d'analisi dell'interfaccia. La rapida e più efficiente vaporizzazione delle molecole a maggior PM riduce una loro eventuale degradazione termica, estendendo il campo delle possibili applicazioni dell'interfaccia. Da questo lavoro è iniziata una collaborazione con il Dipartimento di chimica dell'Università di Parma. Tale collaborazione prevede di trattare l'acciaio con altre tecniche, non fisiche ma chimiche, come l'attacco acido, e nell'applicare altre tipologie di coperture sviluppate e prodotte direttamente in laboratorio. I risultati sono riportati nel capitolo successivo.

8. VALUTAZIONE DI DIVERSE SUPERFICI DI VAPORIZZAZIONE IN LC-EI-MS

“Study of Vaporization Surfaces in Liquid Chromatography – Electron Ionization Mass-Spectrometry”. F. Bianchi, L. Magrini, N. Riboni, M. Careri, A. Cappiello. ASMS 2016 San Antonio, 4-9 giugno 2016

“Sol-gel coated ion sources for liquid chromatography-direct electron ionization mass spectrometry”. N. Riboni, L. Magrini, F. Bianchi, M. Careri, A. Cappiello. Analytical Chemistry, submitted for publication.

L'interfaccia LC-MS Direct-EI è una tecnica innovativa che ha permesso di accoppiare la cromatografia liquida con la spettrometria di massa a ionizzazione elettronica. Tale tecnica, già ampiamente descritta nel capitolo 4 della tesi, vede l'introduzione dell'effluente cromatografico direttamente nella sorgente di ionizzazione [118] permettendo di sfruttare sia i vantaggi della LC sia dell'EI [118]. Come riportato però in un lavoro precedente, [101] il principale ostacolo dell'interfaccia è che la sorgente EI, composta d'acciaio inox 318, inerte per composti analizzabili in GC-MS e quindi volatili o volatilizzabili, non è risultata esserlo altrettanto per composti a PM e temperatura d'ebollizione elevati. Sono stati infatti evidenziati fenomeni di adsorbimento e degradazione termica dei composti più pesanti e polari sulla superficie interna della sorgente SS con effetti evidenti sulla sensibilità e riproducibilità dei dati. Per questa ragione è stato testato un rivestimento di ceramica della sorgente realizzato mediante tecnologie sol-gel in modo da migliorare il processo di vaporizzazione e di conseguenza il potenziale d'analisi di composti a più alto peso molecolare [101]. Da questa idea di rivestire la sorgente è nata poi una interessante collaborazione con l'Università di Parma per la realizzazione, applicazione e validazione di nuove coperture sol-gel per sorgenti EI. La tecnologia sol-gel è una valida alternativa alla normale procedura di rivestimento delle superfici: infatti, è un processo chimico a basso costo che permette di sintetizzare una grande varietà di strutture reticolari inorganiche da precursori monomerici a base silconica o metallica alcossica. La stabilità chimica e la resistenza ad elevate temperature, la morfologia controllata ed un elevato grado di purezza sono le principali caratteristiche che la rendono una tecnica molto apprezzata nel campo delle coperture [119-122]. In questo lavoro è riportata un'interessante applicazione di alcuni rivestimenti sol-gel nell'ambito della spettrometria di massa. Le coperture sviluppate ed applicate sulla superficie interna di una comune sorgente EI SS sono: TEOS (componente principale: silice), Titanio e Zirconio. Queste sono state applicate combinando due metodi, lo spinning e lo spraying, per ottimizzare la copertura e sono state testate a tre diverse temperature della sorgente: 250 °C, 300 °C e 350 °C

iniettando direttamente in sorgente senza separazione cromatografica (FIA) alcuni contaminanti ambientali come IPA e ormoni steroidei.

8.1 MATERIALE E METODI

I solventi sono stati tutti acquistati dalla VWR International (Milano, Italia) mentre l'acqua milli-Q è stata ottenuta in laboratorio tramite il sistema di purificazione Millipore-direct-Q 3 UV (Millipore Corp., Milano, Italia). I 2 idrocarburi policiclici aromatici (IPA) sono stati acquistati presso Dr. Ehrenstorfer GmbH (Milano, Italia) mentre gli ormoni e la caffeina, dalla Sigma Aldrich (Milano, Italia). Per l'esecuzione del lavoro sono state preparate 3 soluzioni: una miscela 2 IPA 100 ng/μL 100% ACN, una miscela 4 ormoni 100 ng/μL in 100% EtOH, ed una soluzione di caffeina 100 ng/μL 50-50 v/v H₂O-ACN. Tutte le soluzioni sono state conservate in vial da 4 mL ambrati a 4 °C (Tabella 16).

Soluzioni	Composti	PM (g/mol)	m/z Monitorati	DWELL Millisecondi
2 IPA 100 [ng/μL]				
	Naftalene	128	128	450
	INDENO(1,2,3,C-D)PIRENE	276	276	450
4 ORMONI 100 ng/μL]				
	Mestranolo	272	272,160,213	100
	Dietilstilbestrolo	296	213,296,160	100
	17-β-Estradiolo	268	268,239,145	100
	17-α-Etinilestradiolo	310	227,310,174	100
CAFFEINA 100 [ng/μL]		194	88,104,194	400

Tabella 16: Soluzioni standard e parametri d'acquisizione dati in modalità SIM

8.1.1 PRETRATTAMENTO ACIDO

A differenza del lavoro eseguito con la copertura di ceramica, in cui la sorgente d'acciaio inox 318 era trattata in modo meccanico mediante carta abrasiva, in questo lavoro è stato deciso di pretrattare la superficie metallica mediante attacco acido. L'uso dell'acido infatti permette di creare dei micro avvallamenti (che scompaiono una volta applicato il rivestimento) che faciliterebbero l'adesione della copertura liquida rendendola più resistente nel tempo. Il processo prevede i seguenti step: A) sonicazione del corpo della sorgente in acetone; B) pulizia della superficie con carta abrasiva molto morbida (1200 mesh), poi con un panno abrasivo 5/PK usato per la normale pulizia e manutenzione della massa ed infine con una pasta abrasiva a base d'allumina; C) attacco acido; D) lavaggio con H₂O milli-Q; E) stoccaggio della sorgente completamente immersa in EtOH, in contenitori ben chiusi. La soluzione per l'attacco acido usa come solventi l'acido fluoridrico (HF) e l'acido nitrico (HNO₃). Il primo scioglie lo strato cromato della superficie metallica e quindi la copertura d'inertizzazione che rendeva inattiva la sorgente, il secondo invece elimina eventuali residui non ossidati. Il trattamento avviene per completa immersione della sorgente dopo aver protetto tutte le parti che non devono essere interessate dal trattamento. Per prima cosa s'immerge la sorgente in una soluzione di HF al 50% e H₂O in rapporto 2:1 per circa 45-60 minuti. In seguito si sciacqua il tutto con H₂O milliQ e s'immerge nuovamente in una soluzione di HNO₃ al 65% e H₂O in rapporto 2:1 per 30 minuti. Il tutto ad una temperatura costante di 60-70 °C. Terminato il processo, occorre lavare accuratamente la sorgente per eliminare qualsiasi residuo e lasciarla per almeno una notte intera completamente immersa in EtOH per stabilizzare la superficie ed eliminare eventuali tracce di acido.

8.1.2 COPERTURE SOL-GEL

Le 3 diverse coperture realizzate mediante tecnica sol-gel a base di silice (TEOS), titanio e zirconio sono state tutte realizzate ed applicate presso l'Università di Parma, dipartimento di Chimica. Le formulazioni delle tre diverse coperture, sono riportate in Tabella 17. La loro preparazione è stata ottimizzata per ogni copertura e riportata qui di seguito:

- TEOS: tutti i componenti sono miscelati insieme e sonicati per tutta la notte a temperatura ambiente;
- Titanio: prima si miscelano insieme l'EtOH, l'etile-aceto-acetato ed il titanio (IV) isopropossido ed H₂O, si sonica il tutto per una notte intera e in seguito si aggiunge l'OH-TSO. La soluzione sol-gel è pronta dopo due ore di sonicazione;

- Zirconio: la soluzione alcolica di Zirconio è miscelata con l'etile-aceto-acetato e sonicata per 3 ore, in seguito sono aggiunti i 15 μL di acqua e sonicato il tutto per 30 minuti. Ottenuta una soluzione completamente trasparente, si lascia sonicare tutta la notte e solo dopo è aggiunto l'OH-TSO.

- TEOS	Titanio	Zirconio
2 mL TEOS	1 mL titanio tetrabutossido	2 mL zirconio(IV) isopropossido in isopropanolo 0,2M
1,7 mL OH-TSO*	3080 μL EtOH assoluto	115 μL etile-aceto-acetato
400 μL acido acetico	191 μL etile-aceto-acetato	16 μL H ₂ O
200 μL EtOH assoluto	40 μL H ₂ O	200 μL OH-TSO*
	200 μL OH-TSO*	

Tabella 17: Composizione chimica delle tre diverse coperture; * poli dimetil silossano idrossi terminato.

Tutte le soluzioni sono state conservate in provette ben chiuse fino ad un massimo di 3 settimane, dopodiché iniziano a polimerizzare. Anche la loro applicazione avviene in modo sequenziale e preciso. Prima di tutto occorre sonicare per 30 minuti le soluzioni e solo dopo è possibile applicarle mediante aerografo (foro da 0,5 micron) sulla superficie interna della sorgente di ionizzazione e nello specifico solo nel volume ionico. Per evitare depositi irregolari le soluzioni vengono applicate più volte in strati estremamente sottili. Terminato il processo, si lasciano asciugare le coperture all'aria per una notte intera a temperatura ambiente sotto rotazione a 3000 rpm. In seguito si aumenta gradualmente la temperatura dai 50 °C ai 350 °C (2 °C/min). Si lascia il tutto a 350 °C per 2 ore per indurre la polimerizzazione della copertura. Le coperture rivestite sono riportate in Figura 39. La qualità dei rivestimenti è stata ottenuta mediante analisi termo gravimetrica (TGA) svolta mediante TGA 7 (Perkin-Elmer, Waltham, MA) ad una temperatura di 300 °C 400 °C (con incremento della temperatura di 5 °C al minuto) sotto atmosfera inerte (N₂). Lo spessore e la superficie delle coperture è stata studiata mediante microscopio a scansione elettronica ambientale (ESEM) Leica 430i (Leica, Solms, Germania). Mentre le analisi al microscopio a forza atomica sono state eseguite con un XE-100 AFM (Park Systems, Suwon, Corea del Sud).



Figura 39: Sorgenti ricoperte con i tre diversi rivestimenti sol-gel. in ordine da sinistra verso destra abbiamo: TEOS, Titanio e Zirconio.

8.1.3 CONDIZIONI DIRECT-EI LC-MS

Tutte le analisi sono state condotte con un sistema di nano-HPLC Agilent serie 1100 (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, USA) ed eseguite in FIA. La FM è stata impostata a 90:10 v/v ACN: H₂O con un flusso di 300 nL/min mentre, il volume d'iniezione è di 10 nL. Lo spettrometro di massa usato è un Agilent 5975 inerte MSD (Mass Selective Detector) con singolo quadrupolo (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, USA) equipaggiato per diventare un'interfaccia LC-MS-Direct-EI. Durante l'esecuzione del lavoro per garantire una buona performance strumentale, ogni giorno è stata eseguita la calibrazione dello strumento valutando l'abbondanza di tre ioni (m/z 69-219-502) di un composto di riferimento ovvero, la perfluorotributillamina. Durante la calibrazione la sorgente era mantenuta sotto alto vuoto, senza cioè FM, e la temperatura era mantenuta costantemente a 200 °C. Durante la procedura di calibrazione sono stati presi in considerazione anche altri parametri fondamentali per valutare lo stato di buon funzionamento dello spettrometro di massa: elettromoltiplicatore, repeller, lenti e risoluzione. Questi parametri consentono di valutare l'integrità dei potenziali della sorgente di ionizzazione e l'assenza di un eventuale rumore di fondo che potrebbe interferire con l'intensità del segnale e la ripetibilità. Come riportato nell'articolo precedente sulla ceramica, anche in questo caso per tutte e tre le coperture, ad eccezione del primo giorno in cui è stato difficile eseguire la calibrazione dello strumento, i giorni successivi d'analisi (dopo un giorno intero di condizionamento a 300 °C e sotto flusso costante 300 nL/min 90-10 v/v ACN/H₂O) non hanno evidenziato sostanziali differenze rispetto alla calibrazione con una comune sorgente SS. Le analisi sono state eseguite impostando la sorgente di ionizzazione a 3 diverse temperature: 250 °C, 300 °C, 350 °C. Per variare la temperatura senza sottoporre le coperture ad uno shock termico che potrebbe danneggiarne le superfici, è stato deciso di aumentarla in modo graduale: 10 °C ogni 5 minuti. Ovviamente le analisi sono state condotte tutte con le medesime condizioni operative, sia per le sorgenti ricoperte sia per la sorgente d'acciaio inox, tali da poterle confrontare. L'acquisizione dei dati è stata ottenuta in SIM (Tabella 16) per tre giorni consecutivi e tre d'iniezioni per ogni temperatura. Per assicurare una

risposta riproducibile nel tempo e il corretto funzionamento dello strumento, ogni giorno è iniettata la soluzione di caffeina a 300 °C, FM impostata a 50-50 v/v H₂O-ACN 300 nL/min e i dati sono stati acquisiti sempre in modalità SIM.

8.2 RISULTATI E DISCUSSIONE

8.2.1 RIVESTIMENTI DELLA SORGENTE DI IONIZZAZIONE

I film sol-gel a base di silice, titanio e zirconio sono stati sintetizzati dai corrispondenti alcossidi metallici aggiungendo un plastificante termicamente stabile, l'OH-TSO, per ottenere materiali sufficientemente flessibili privi di crepe. L'uso di questo plastificante ha garantito la sua piena integrazione nella struttura del gel, man mano che avveniva il processo di gelificazione, garantendo così un'eccellente libertà conformazionale del prodotto finale in grado di sopportare le sollecitazioni meccaniche e termiche dovute alle alte temperature cui opera la sorgente di ionizzazione. L'applicazione del sol mediante aerografo (*spraying*) è stato un altro parametro fondamentale nell'ottimizzazione di questi rivestimenti. Infatti è stato possibile ricoprire solo la regione interna della sorgente coinvolta nel processo di ionizzazione e di desorbimento. Un altro importante vantaggio è legato alla possibilità di controllare visivamente lo spessore del rivestimento, evitando di produrre rivestimenti troppo spessi che sarebbero più rigidi andando incontro a rottura con più probabilità. Infine, la presenza di crepe e d'esfoliazioni sono state evitate aumentando in modo molto graduale la temperatura durante la fase di essiccamento.

8.2.2 STABILITA' TERMICA

Il profilo termico di tutte e tre le coperture è stato testato mediante metodo termogravimetrico riportato in Figura 40. È stata registrata un'ottima stabilità termica fino ai 350 °C – 400 °C con una perdita di peso trascurabile. Rispettivamente le perdite sono state del 2,8 % 2,2 % e 5,3 % per silice, titanio e zirconio. È stata poi valutata anche la morfologia dei rivestimenti mediante microscopia a scansione elettronica (Figura 41). Tutti e tre sono risultati essere omogenei, sufficientemente lisci e privi di crepe. Lo spessore medio calcolato su tre prove di applicazione diverse su piastre d'acciaio inox 318 è risultato essere: 75 μm ± 3μm per il TEOS, 11 μm ± 2 μm per il titanio e 6 μm ± 1 μm. Ovviamente, si possono ottenere anche rivestimenti con spessori diversi, secondo il numero di strati di sol applicati.

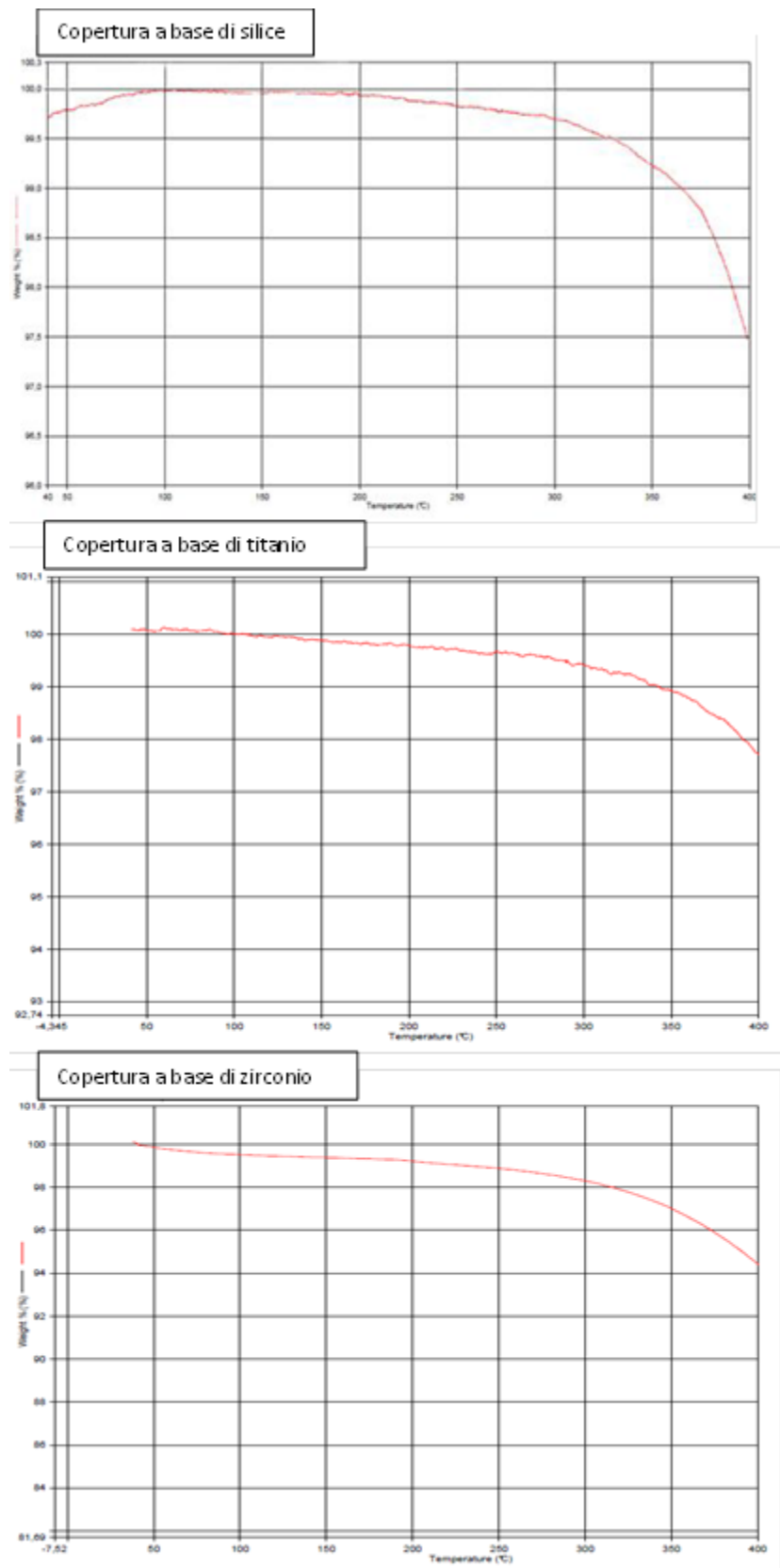


Figura 40: Risultati delle prove termogravimetriche eseguite sulle tre diverse coperture.

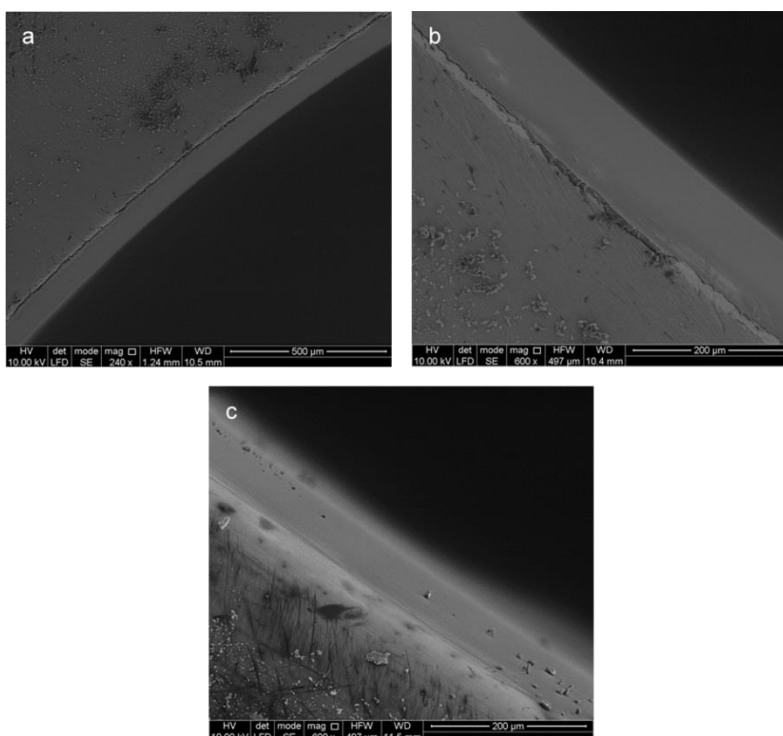
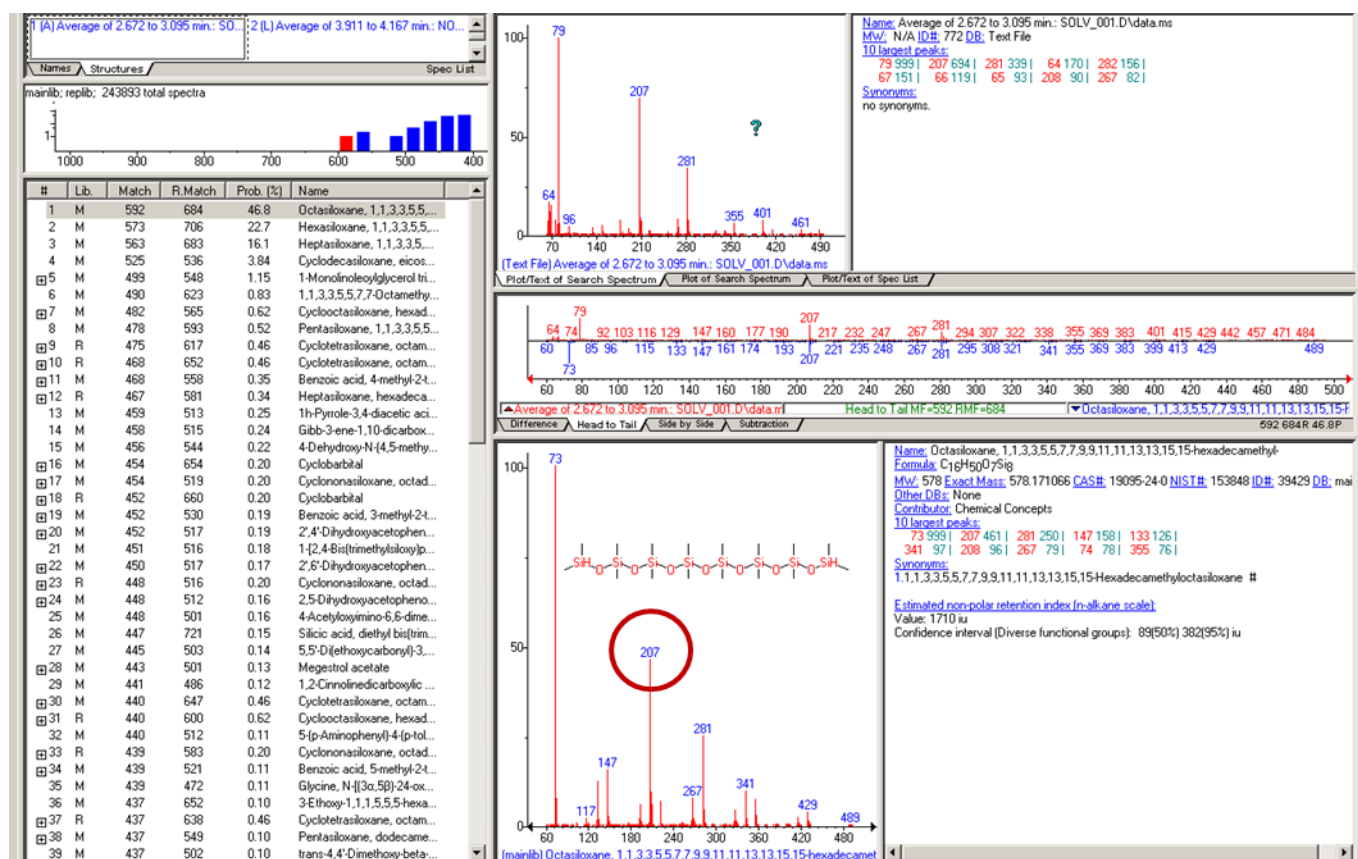


Figura 41: Immagini al SEM dei tre rivestimenti a base di: a) silice, b) titanio, c) zirconio

Questo è un aspetto cruciale dato che come già menzionato, coperture più spesse possono andare incontro a fenomeni di rottura più facilmente quando sottoposti a shock termici importanti. E se le crepe si formano quando la sorgente di ionizzazione è montata e portata ad elevate temperature, si può avere il rilascio nel volume ionico sia di materiali solidi sia dei residui di solvente e sostanze silconiche. Questo è stato confermato da due calibrazioni manuali eseguite sulla sorgente ricoperta con TEOS dopo: avere eseguito le analisi, smontato e rimontato la sorgente con importante shock termico. La calibrazione evidenziava la presenza in sorgente dello ione m/z 207 con abbondanza superiore a 10000. In seguito è stata condotta un'analisi in scan, introducendo in sorgente solo la FM (senza iniettare alcun composto) valutando anche in questo caso la presenza dello stesso ione che, dalla comparazione con gli spettri depositati nella NIST è risultato essere un silossano (combinazione di ossigeno, silicio ed alcano) (Figura 42).



8.2.3 ANALISI CON SORGENTE ACCIAIO INOX 318

Prima di testare le nuove coperture, le analisi in FIA dei composti prima menzionati (Tabella 16) sono state condotte con una comune sorgente di metallo (stainless steel, SS), come nel precedente lavoro sulla ceramica [101]. I parametri presi in considerazione sono ampiezza, ritardo ed area di picco. I dati ottenuti (Tabelle 18-20) sono una media di tre repliche per ogni temperatura della sorgente di ionizzazione (250 °C, 300 °C, 350 °C) e per tre giorni consecutivi. Ciò per confermare i dati ottenuti dal precedente lavoro sulla ceramica e per avere dei termini di paragone con i dati ottenuti con le nuove superficie di vaporizzazione. Il fine è di valutare ed in caso confermare l'effettiva anti aderenza, inerzia e resistenza alle elevate temperature delle nuove coperture. Caratteristiche queste, richieste per analizzare in LC-MS Direct-EI i composti a PM e temperatura d'ebollizione elevati, con conseguente difficoltà a passare in fase gassosa prima di essere ionizzati.

LARGHEZZA DEI PICCHI (min) ±STD (RSD%)				
Composti T °C	Acciaio Inox	TEOS	Titanio	Zirconio
Mestranolo				
250	N.D.	0,100±0,008(8,0)	N.D.	N.D.
300	0,800±0,520(65,0)	0,100±0,006(6,0)	0,760±0,322(42,4)	N.D.
350	0,100±0,050(50,0)	0,100±0,010(10,0)	0,1000±0,11(11,0)	0,100±0,007(7,0)
Dietilstilbestrolo				
250	N.D.	0,100±0,003(3,0)	N.D.	N.D.
300	0,910±0,530(58,2)	0,100±0,004(4,0)	1,000±0,420(42,0)	N.D.
350	0,100±0,050(50,0)	0,100±0,009(9,0)	0,210±0,045(21,4)	0,120±0,025(20,8)
17-β-Estradiolo				
250	N.D.	0,100±0,006(6,0)	N.D.	N.D.
300	1,380±0,660(47,8)	0,100±0,005(5,0)	N.D.	N.D.
350	0,360±0,210(58,3)	0,100±0,012(12,0)	0,230±0,048(20,9)	0,100±0,013(13,0)
17-α-Etinilestradiolo				
250	N.D.	0,100±0,013(13,0)	N.D.	N.D.
300	1,000±0,530(53,0)	0,100±0,006(6,0)	N.D.	N.D.
350	0,300±0,170(56,6)	0,100±0,012(12,0)	0,330±0,068(20,6)	0,150±0,019(12,7)
Naftalene				
250	0,100±0,008(8,0)	0,100±0,002(2,0)	0,100±0,003(3,0)	N.D.
300	0,100±0,005(5,0)	0,100±0,003(6,0)	0,100±0,003(3,0)	N.D.
350	0,100±0,004(4,0)	0,100±0,002(2,0)	0,100±0,016(16,0)	0,200±0,028(14,0)
Indeno[1,2,3 c,d]pirene				
250	N.D.	0,300±0,001(4,0)	N.D.	N.D.
300	1,200±0,900(75,0)	0,100±0,003(3,0)	N.D.	N.D.
350	0,400±0,250(63,0)	0,00±0,013(13,0)	0,700±0,120(17,0)	0,350±0,028(8,0)

Tabella 18: Dati sulla larghezza dei picchi ottenuti da tre replicati per tre giorni consecutivi a tutte e tre le diverse temperature. Le analisi sono state condotte sia con una comune sorgente SS sia con le sorgenti ricoperte con TEOS, titanio e zirconio. *N.D.: non determinati.

MEDIA RITARDO NELL' USCITA DEI SEGNALI (min) ± STD, (RSD%)				
COMPOSTI T °C	Acciaio Inox (SS)	TEOS	TITANIA	ZIRCONIA
Mestranolo				
250	N.D.	0,6±0,0(1,5)	N.D.	N. D
300	0,8±0,1(12,0)	0,6±0,0(0,5)	0,7±0,0(7,1)	N.D.
350	0,7±0,1(14,0)	0,6±0,0 (1,1)	0,7±0,0(5,0)	0,9±0,0(1,5)
Dietilstilbestrolo				
250	N.D.	0,6±0,0 (1,2)	N.D.	N.D.
300	0,8±0,1(8,8)	0,6±0,0 (0,5)	0,7±0,0(5,1)	N.D.
350	0,7±0,1(13,9)	0,6±0,0 (0,6)	0,7±0,0(3,1)	0,9±0,0(2,1)
17-β-Estradiolo				
250	N.D.	0,6±0,0 (1,0)	N.D.	N.D.
300	1,2±0,3(29,5)	0,6±0,0 (0,3)	N.D.	N.D.
350	0,7±0,1(15,3)	0,6±0,0 (0,6)	0,7±0,0(3,0)	0,9±0,0(1,5)
17-α-Etinilestradiolo				
250	N.D.	0,6±0,0(1,3)	N.D.	N.D.
300	1,3±0,6(47,5)	0,6±0,0 (0,3)	N.D.	N.D.
350	0,7±0,1(15,3)	0,6±0,0 (1,2)	0,7±0,1(8,8)	0,9±0,0(3,6)
Naftalene				
250	0,7±0,1(14,1)	0,6±0,0(1,3)	0,6±0,0(3,9)	N.D
300	0,7±0,1(15,5)	0,6±0,0(1,2)	0,7±0,0(3,7)	N.D
350	0,6±0,1(17,4)	0,6±0,0(1,3)	0,7±0,0(4,7)	0,9±0,1(5,7)
Indeno[1,2,3 c,d]pirene				
250	N.D.	0,6±0,0(0,9)	N.D	N.D
300	0,8±0,2(27,3)	0,6±0,0(1,0)	N.D	N.D
350	0,7±0,1(15,2)	0,6±0,0(1,3)	0,7±0,0(4,6)	0,9±0,0(1,6)

Tabella 19: Ritardo nell'uscita del segnale. I dati sono stati ottenuti da tre replicati per tre giorni consecutivi a tutte e tre le diverse temperature. Le analisi sono state condotte sia con una comune sorgente SS sia con le sorgenti ricoperte con TEOS, titanio e zirconio. *N.D.: non determinati.

AREA DEI PICCHI ±STD (RSD%)				
COMPOSTI T °C	Acciaio Inox	TEOS	TITANIA	ZIRCONIA
Naftalene				
250	60000±8000(13,3)	65000±3000(4,6)	38000±(10;5)	N.D
300	60000±5000(8,3)	62000±5000(8,1)	38000±(5,4)	N.D
350	63000±3000(4,8)	38000±1300(7,1)	38000±(32,2)	37000±9000(24,3)
Indeno[1,2,3 c,d]pirene				
250	N.D.	132000±(8,3)	N.D	N.D
300	127000±16000(12,6)	150000±(4,0)	N.D.	N.D.
350	140000±22000(15,7)	166000±(4,2)	93000±(7,5)	56000±18000(31,1)

Tabella 20: Area dei picchi dei due IPA ottenuti da tre replicati per tre giorni consecutivi a tutte e tre le diverse temperature. Le analisi sono state condotte sia con una comune sorgente SS sia con le sorgenti ricoperte con TEOS, titanio e zirconio. * N.D.: non determinati.

Il processo di vaporizzazione però, necessario proprio alla ionizzazione dei composti, determina l'efficienza globale delle analisi ed in particolare la sensibilità e la ripetibilità di quest'ultime. Le analisi condotte con l'acciaio riflettono questa difficoltà di vaporizzazione per i composti d'interesse. Infatti, pur iniettando in simultanea i composti (i due IPA e i 4 ormoni vengono però iniettati separatamente) senza separazione cromatografica, si registrava un ritardo nell'uscita dell'indeno(1,2,3 c-d)pirene rispetto al naftalene a tutte e tre le temperature. Ritardo che andava a diminuire all'aumentare della temperatura e non era riproducibile. Non solo si registrava un ritardo temporale nell'uscita dei picchi ma anche la forma e l'abbondanza del segnale non erano accettabili. Frequente era l'assenza del segnale a 250 °C sia per l'indeno(1,2,3, c-d)pirene che per due ormoni (17-β-estradiolo e 17-α-etinilestradiolo). Tale comportamento è riconducibile a fenomeni di degradazione termica e di adsorbimento sulla superficie interna della sorgente di ionizzazione a livello del volume ionico. Tali fenomeni coinvolgono i composti a PM e temperatura d'ebollizione elevati poiché, prima di passare in fase gas, vanno a toccare il corpo della sorgente riscaldato venendo in parte degradati e in parte rimanendovi adesi con un loro rilascio graduale. Questo spiega la bassa intensità ed il ritardo del segnale nonché la sua codatura.

8.2.4 ANALISI NUOVE SUPERFICI DI VAPORIZZAZIONE

Le tre coperture sperimentali a base di silicio, titanio e zirconio sono state testate eseguendo le medesime prove in precedenza condotte con una comune sorgente EI SS con i medesimi composti. Prima però di iniziare le prove giornaliere di tali composti è stato necessario iniettata la caffeina per testare la stabilità del sistema. Questo perché a prescindere dalla tipologia di rivestimento, il primo giorno di test, era impossibile eseguire materialmente qualsiasi analisi, poiché lo strumento o non si auto-calibrava o si calibrava ma, con abbondanze dei tre ioni della PTFB molto più basse rispetto al normale per cui, il voltaggio dell'elettromoltiplicatore aumentava eccessivamente per completare la calibrazione (Figura 43).

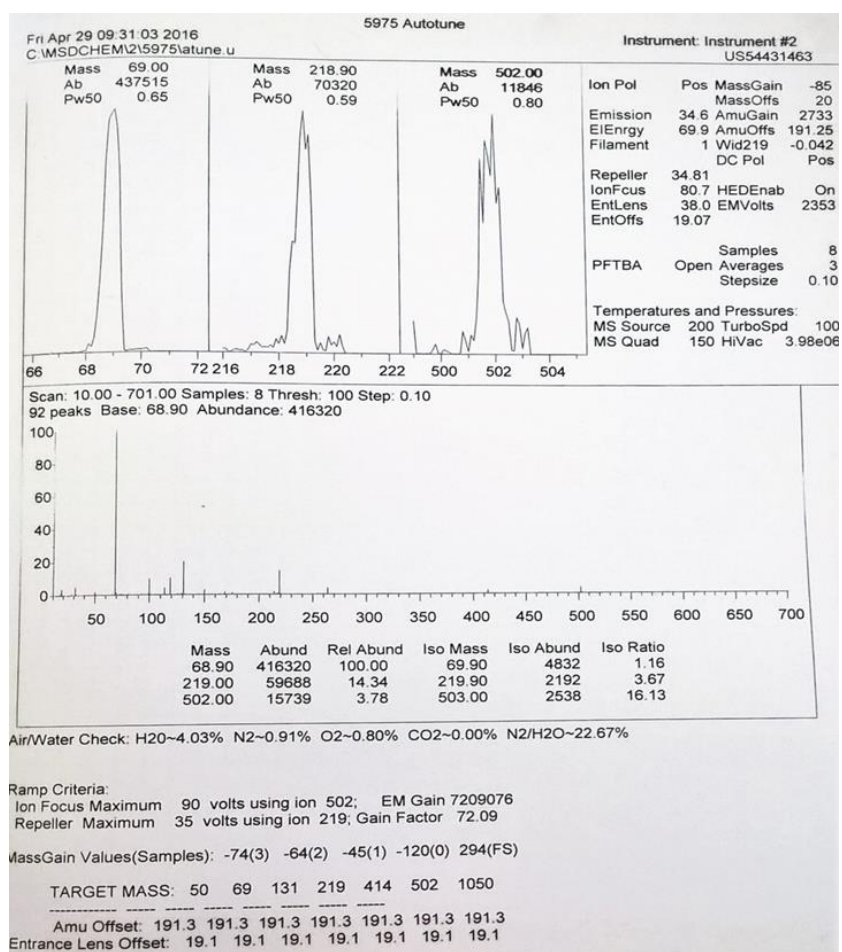


Figura 43: Report dell'autocalibrazione dello MS singolo quadrupolo del primo giorno di analisi con sorgente rivestita con TEOS. EM VOltS (voltaggio dell'elettromoltiplicatore): 2353 ed abbondanze degli ioni m/z 69, 219, 502: 10 volte inferiori alla norma (comune sorgente d'acciaio inox)

I parametri valutati nell'analisi in FIA sono la larghezza, il tempo d'uscita e l'abbondanza del segnale a tutte e tre le temperature (Tabelle 18-20) Come si evince dalle tabelle, il TEOS è l'unico rivestimento che ha dato ottimi risultati. Infatti sia per gli IPA sia per gli ormoni sono stati ottenuti ottimi segnali senza alcun ritardo per ogni temperatura impostata e senza codatura. I segnali infatti sono risultati sufficientemente stretti e questo ha determinato un aumento dell'intensità del segnale apprezzabile. Il miglioramento è evidente anche dai cromatogrammi delle analisi condotte a 300 °C con la comune sorgente SS e quella ricoperta con TEOS (Figura 44). Il rapporto S/N, ricavato dai dati ottenuti dalle analisi con la sorgente ricoperta con TEOS a 300 °C rispetto alle medesime condotte con una sorgente SS, è aumentato di circa 10-40 volte. Infine, sono stati ottenuti ottimi risultati anche in termini di precisione. Infatti la RSD% calcolata da tre replicati per tre giorni consecutivi è stata inferiore al 10% evidenziando la stabilità dei rivestimenti. I risultati ottenuti con gli altri due rivestimenti sono stati meno soddisfacenti. Per entrambi non sono stati ottenuti dei miglioramenti rispetto alla sorgente SS ma, anzi dei peggioramenti per il mestranolo ed il dietilstilbestrolo (Figura 45). Infatti, a basse temperature si aveva la perdita del segnale sia per l'indeno(1,2,3 c-d)pirene che per gli ormoni, in particolare per il 17- β -estradiolo che per il 17- α -etinilestradiolo. La perdita del segnale è stata particolarmente accentuata per le analisi condotte con lo zirconio. Come si vede dalle Tabelle 18-19 mancano i segnali di tutti gli ormoni sia a 250 °C sia a 300 °C.

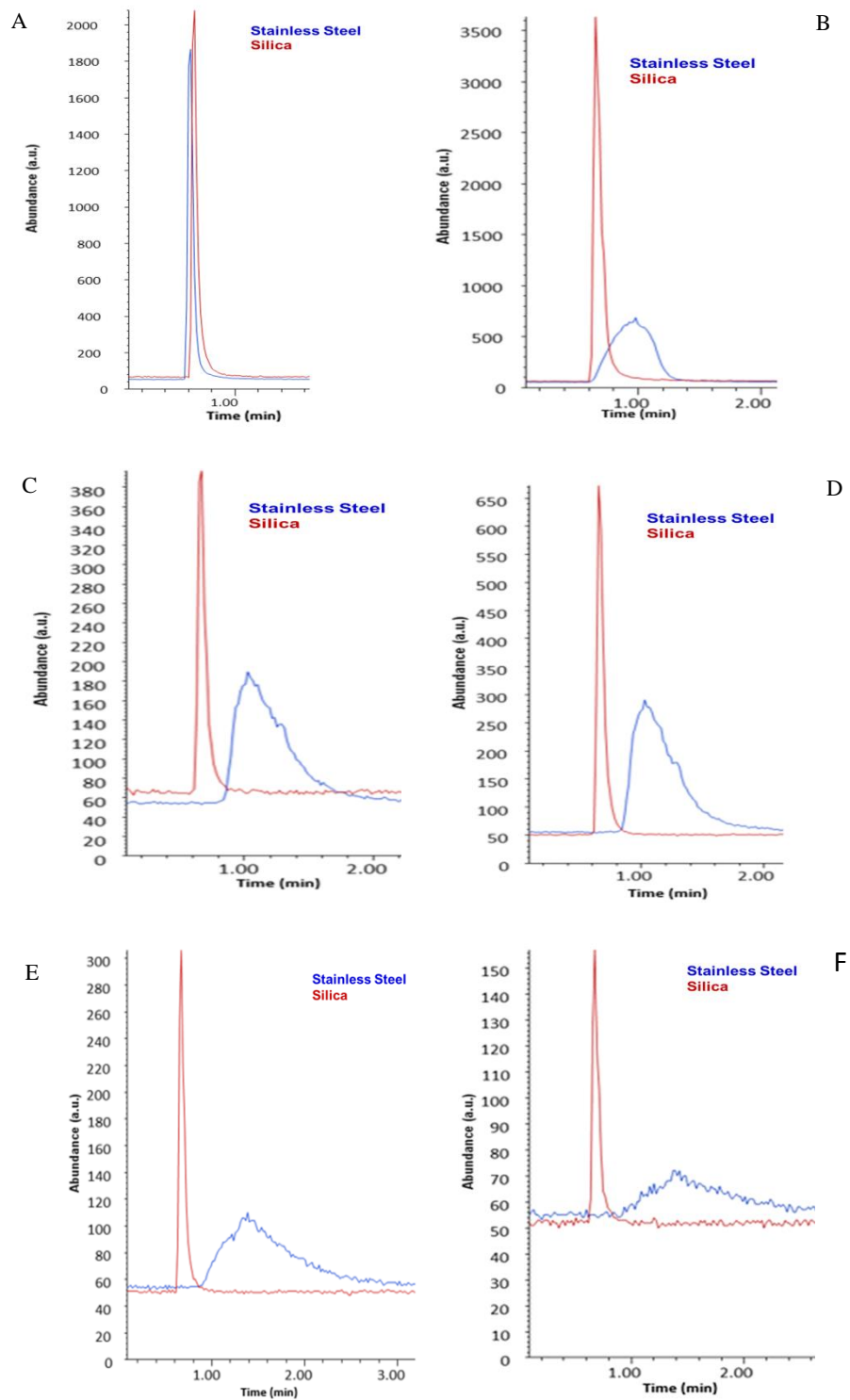


Figura 44: Sovrapposizione dei segnali dei singoli ioni estratti. Analisi condotte con sorgente SS e con sorgente ricoperta con TEOS, a 300 °C. A) Naftalene, B) Indeno(1,2,3,c,d)pirene, C) Mestranolo, D) Dietilstilbestrolo, E) 17- β -estradiolo, F) 17- α -etinilestradiolo.

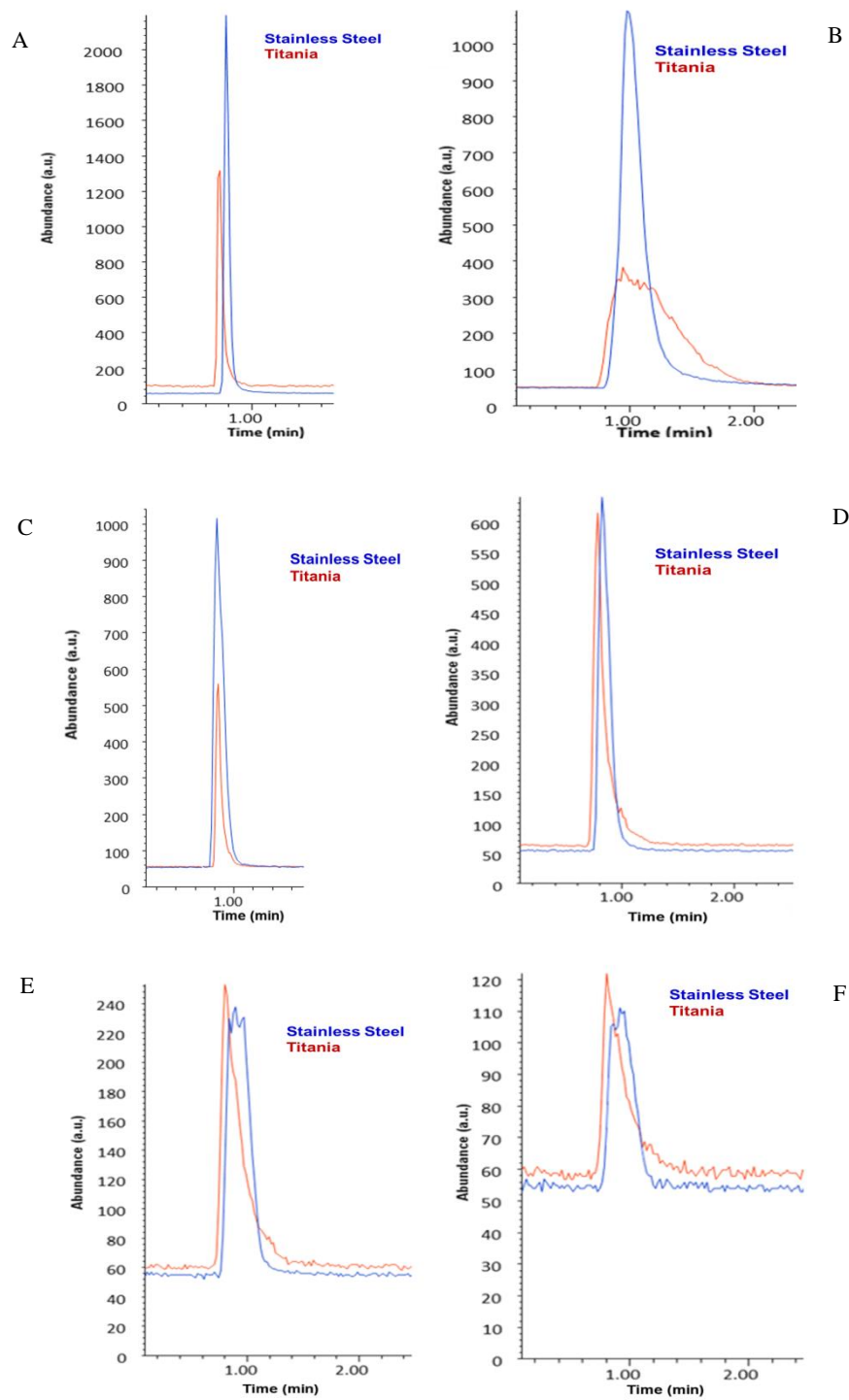


Figura 45: Sovrapposizione dei segnali dei singoli ioni estratti dei 4 ormoni. Analisi condotte con sorgente SS e con sorgente ricoperta con titanio, a 350 °C. A) Naftalene, B) Indeno(1,2,3 c,d)pirene, C) Mestranolo, D) Diethylstilbestrolo, E) 17- β -estradiolo, F) 17- α -etinilestradiolo.

8.3 CONCLUSIONI

La tecnologia sol-gel è stata usata per la creazione di nuovi film di rivestimento per ricoprire la superficie interna di una comune sorgente d'acciaio inox 318 usata per la ionizzazione elettronica, e nello specifico nell'interfaccia sperimentale LC-MS Direct-EI. L'interfaccia, unica nel suo genere, permette di unire i vantaggi della LC con quelli dell'EI ed è stata già ampiamente impiegata per analisi di contaminanti ambientali ed alimentari in matrici più o meno complesse con ottimi risultati. L'unico grosso ostacolo riscontrato è la vaporizzazione di composti a PM e temperature di ebollizione elevati. È stato infatti dimostrato che tali composti passano lentamente in fase gas e solo dopo aver preso contatto con la superficie della sorgente. Essa è considerata inerte ma per composti analizzabili in GC ovvero volatili o volatilizzabile e non per composti così pesanti. Per questo motivo, sono state sintetizzate e testate tre nuove superfici di cui sopra. I risultati sono ancora preliminari e dovranno essere ulteriormente confermati, ma sono stati piuttosto incoraggianti quelli ottenuti con il rivestimento a base di silice mentre, non hanno dato buoni risultati quelli con i rivestimenti a base di titanio e zirconio per i quali sono in progetto nuove formulazioni. Comunque, dalle analisi al SEM e al TGA, le coperture sono risultate essere sufficientemente lisce e resistenti alle elevate temperature anche se al termine delle analisi sono stati evidenziate delle fratture visibili ad occhio nudo. Il progetto continuerà in questa direzione cercando d'ottenere il miglior rivestimento sol-gel possibile in termini di resistenza, levigatezza ed antiaderenza.

9. VALUTAZIONE DELLA PRESENZA DI CONTAMINANTI AMBIENTALI IN TESSUTI CEREBRALI DI FETI DI NEONATI MORTI SENZA CAUSA APPARENTE MEDIANTE GAS GROMATOGRAFIA- SPETTROMETRIA DI MASSA TANDEM

V. Termopoli, G. Famiglioni, P. Palma, L. Magrini, A. Cappiello

“Occurrence of specific environmental risk factors in brain tissues of sudden infant death and sudden intrauterine unexpected death victims assessed with gas chromatography-tandem mass spectrometry”. Analytical Bioanalytical Chemistry 407, (2015) 2463-2472.

Le sindromi della morte improvvisa intrauterina (SIUDS) e del lattante (SIDS) costituiscono ancora due delle cause principali di mortalità entro il primo anno di vita nei paesi sviluppati. La SIUDS è definita come la morte inaspettata di un feto apparentemente sano dopo la XXV settimana di gestazione in assenza di malformazioni. La SIDS invece è definita come la morte improvvisa di un neonato, apparentemente sano, entro il primo anno di vita, la quale causa rimane inspiegata anche dopo un'accurata indagine sulle circostanze del decesso (attenta autopsia, esame della scena della morte e storico della cartella clinica dell'infante). Sono numerosi i fattori che intervengono in questi tristi eventi, incluse alterazioni genetiche ed esposizioni a determinati fattori di rischio come il fumo di sigaretta e/o abuso d'alcool o droga da parte della madre [123-128]. Sono stati eseguiti studi per ricercare un'eventuale correlazione fra tali sindromi e la contaminazione ambientale. I contaminanti maggiormente ricercati sono pesticidi organo clorurati (OCPs), eteri-difenili-poli bromurati e bi-fenili-poli clorurati poiché persistenti nell'ambiente, lipofili e biomagnificati nella catena alimentare e, sebbene il loro uso in questo momento sia stato vietato o ridotto, sono ancora ubiquitariamente dispersi nell'ambiente. Tali sostanze vanno ad accumularsi nel tessuto adiposo materno e, durante la gravidanza, quando il tessuto adiposo è mobilizzato, attraversano facilmente la placenta fino ed entrare nel flusso sanguigno fetale con severe conseguenze per la salute del feto: aborti, gestosi, riduzione del peso alla nascita, ritardo nella crescita e disfunzioni psicomotorie e cognitive [129-134]. Numerosi sono stati gli sforzi per meglio comprendere il loro trasferimento placentale e la loro determinazione nel sangue del cordone ombelicale, nel siero e nel tessuto adiposo materno. Inoltre tali sostanze possono anche arrivare attraverso il latte materno ai neonati [135]. Altri composti come pesticidi organo fosforici (OPP), boscalid e bisfenolo A (BPA) non sono considerati persistenti nell'ambiente, ma sono talmente tanto usati che la popolazione ne è continuamente esposta, seppur a bassa concentrazione [136]. Studi recenti sono riusciti a correlare l'esposizione materna durante la gravidanza a tali contaminanti con effetti negativi sulla salute del feto come: riflessi anomali, abilità cognitive ridotte e problemi dell'attenzione [137-138-139]. Però, la maggior parte di questi lavori sono stati focalizzati sul trasferimento

placentale di questi pesticidi e pochi sono quelli che ne hanno ricercato la presenza direttamente nei tessuti fetali [1140-142, 143]. Anzi nessuno si è preoccupato di determinarli nel tessuto cerebrale di feti e di neonati. Alla luce di ciò, l'accertamento dell'esposizione fetale insieme alla determinazione dei contaminanti ambientali in tessuti cerebrali collezionati da vittime di SIUDS e SIDS, sono la chiave per aiutare ad individuare una possibile correlazione con le anomalie comunemente riscontrate nel sistema anatomico nervoso in ambo le sindromi [144,145]. Il nostro gruppo di ricerca ha già pubblicato un metodo GC-MS per l'estrazione l'identificazione e la quantificazione di 25 distruttori endocrini nel fegato e nel tessuto cerebrale da vittime di SIDS e SIUDs [146] e sebbene la GC-MS sia la tecnica maggiormente impiegata per la determinazione dei medesimi per l'estrema affidabilità e semplicità, potrebbe non essere sufficientemente sensibile per analisi in ultra-traccia di matrici complesse come i tessuti biologici. È stato così sviluppato un nuovo metodo analitico: GC-MS/MS con triplo quadrupolo (QqQ) come analizzatore, che ha permesso di migliorare sensibilità e specificità e di confermare l'eventuale presenza di 20 OCPs, 2 OPPs, BPA, e boscalid nella corteccia cerebrale di feti e di neonati vittime di SIUDS e SIDS. I 2 OPPs, il chlorpyrifos, il chlorfenvinfos, ed il boscalid sono stati scelti in accordo a quanto in uso in Italia ed Unione Europea in campo agricolo [147-149]. In più si è deciso di includere una gran numero di OCPs poiché la loro presenza nei tessuti materni è largamente documentata. Il QqQ permette di migliorare la specificità e minimizzare o eliminare il ME, inoltre l'impegno della modalità MRM (*multiple reaction monitoring*) offre una maggior sensibilità comparata con la modalità SIM (*selected ion monitoring*) potendo semplificare la procedura di purificazione. I campioni sono cortecce cerebrali di vittime di SIUDS e SIDS (con 1 ora di vita fino a un massimo di 12 mesi) provenienti da 3 aree del nord Italia con coltivazione agricola intensiva. Seguendo quanto detto dalla legge italiana 31/2006 approvata il febbraio 2, 2006 [150], tutti gli infanti morti improvvisamente di sospetta SIDS e tutti i feti morti di SIUDS devono essere sottoposti ad un profondo esame anatomopatologico, concentrandosi in particolar modo sul sistema nervoso. Da ogni autopsia, è stata collezionata una porzione di corteccia cerebrale di un 1 cm³ circa.

9.1 MATERIALI E METODI

Per lo svolgimento di questo lavoro sono state preparate le seguenti *stock solutions*: miscela di pesticidi OCPs 100 ng/μL in toluene-esano v/v 50-50, da una miscela disponibile in commercio a 2000 ng/μL (Sigma Aldrich, Milano, Italia) sempre in toluene-esano v/v 50-50 (α -BHC, β -BHC, γ -BHC, δ -BHC, aldrin, α -clordano, p,p' -DDE, p,p' -DDT, p,p -DDD, α -endosulfan, β -endosulfan, endosulfan solfato, endrin aldeide, endrin chetone, heptachlor, heptachlor epossido, dieldrin, endrin e methoxychlor), il chlorpyrifos, il chlorfenvinfos ed il boscalid (Fluka, Milano, Italia) sono stati preparati separatamente alla stessa concentrazione e miscela di solventi dei precedenti, ed infine, dai 5 isotopi deuterati usati come standard interni ($BPA-D_{16}$, p,p' -DDE- D_8 , p,p' -DDT- D_8 ,

methoxychlor-D₁₄ e *chlorfenvifos-D₁₀*) (Dr. Ehrenstorfer, Ausburg, Germania) sono state preparate 5 soluzioni 100 ng/ μ L in 100% acetone. Da qui sono poi state ottenute per successive diluizioni le *working standard solutions*, conservate in vials ambrati a una temperatura di circa 4 °C. Tutti i solventi impiegati (esano, acetone e toluene) sono a elevato grado di purezza (>98%) (Fluka, Milano, Italia) mentre per la procedura d'estrazione SPE sono state usate cartucce di *Superclean ENVI-Florisil* 200 mg/3 mL (Phenomenex, Bologna, Italia). Per ragioni etiche e per la scarsa reperibilità dei casi controllo (feti e neonati morti per cause non correlate a contaminazione ambientale) tutta la validazione del metodo è stata eseguita su corteccia cerebrale di agnello, conservato in freezer ad almeno -20 °C. Nell'eseguire la validazione si è reso necessario considerare le differenze nella composizione della corteccia cerebrale dell'animale e di quella umana, riportate in letteratura [151]. I casi reali invece di SIUDS e SIDS (riportati in Tabella 21) sono stati collezionati durante le singole autopsie e, una volta pesati accuratamente 0,5 g per ogni campione, conservati anch'essi in freezer a -20 °C.

	SESSO	SINDROME ED ETA'	CAMPIONE
1	Femmina	SIUDS (35 settimane)	F2
2	Femmina	SIUDS (34 settimane e 5 giorni)	F3
3	Femmina	SIUDS (39 settimane)	F4
4	Maschio	SIDS (2 giorni)	N5
5	Maschio	SIUDS (40 settimane)	F6
6	Femmina	SIUDS (30 settimane e 1 giorno)	F7
7	Maschio	SIUDS (39 settimane)	F8
8	Femmina	SIUDS (39 settimane e 3 giorni)	F9
9	Femmina	SIUDS (38 settimane e 4 giorni)	F10
10	Maschio	SIUDS (34 settimane e 1 giorno)	F11
11	Femmina	SIDS (4 mesi)	N12
12	Femmina	SIUDS (29 settimane e 5 giorni)	F13
13	Maschio	SIDS (4 mesi)	N14
14	Femmina	SIDS (4 mesi)	N15

Tabella 21: Campioni di SIUDS e SIDS analizzati

I 0,5 grammi di tessuto cerebrale congelato di agnello, dopo essere stati triati finemente, sono stati contaminati con 2,5 μ L di una soluzione standard in acetone contenente tutti i pesticidi d'interesse a 3 diverse concentrazioni: 0,2 – 2,0 – 10,0 ng/ μ L. Le concentrazioni finali degli analiti nel tessuto erano 1,0 – 10,0 – 50,0 ng/g. Separatamente sono poi stati aggiunti 3,7 μ L della soluzione contenente tutti i 5 standard interni a 20 ng/ μ L

in acetone. La concentrazione finale era 150 ng/g. I campioni fortificati sono poi stati omogenizzati per 5 minuti e lasciati a riposo per circa 2 ore a temperatura ambiente per fare evaporare i solventi di fortificazione. Agli omogenati sono poi stati aggiunti 1,5 mL di esano ed agitati vigorosamente con il vortex per 10 min e successivamente centrifugati per 5 min a 3500 rpm. Prelevati così i surnatanti, sono stati fatti passare attraverso la cartuccia SPE e purificati mediante fasi Florisil in precedenza condizionate con 2 mL di esano. I campioni sono stati poi raccolti in un vials di vetro ed i volumi finali portati a 200 µL sotto flusso d'azoto. Per ogni analisi, 1 µL d'estratto è stato prelevato per l'analisi GC-MS/MS. Il sistema GC (Agilent 7890B, Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) è stato abbinato ad uno MS a EI con analizzatore QqQ (Agilent 7000 A, Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA). La separazione cromatografica è stata preformata con un capillare di silice fusa HP-5MS (30 m x 0,25 mm i.d.) e un film interno di 0,25 µm (Agilent J&W GC column, Agilent Technologies, Folsom, CA, USA). La temperatura del forno GC è stata impostata come segue: 80 °C per un minuto, poi da 80 a 180 °C con aumento di temperatura di 30 °C al minuto, poi da 180°C a 225 °C alla velocità di 3 °C al minuto, mantenendo la temperatura a 225 °C per 4 minuti, e poi aumentandola fino a 300 °C a 20 °C al minuto. L'iniettore è stato impostato a 250 °C in modalità splitless e flusso di He di 1 ml/min. L'interfaccia e la sorgente di ionizzazione sono state impostate a 290 e 300 °C rispettivamente. L'analizzatore QqQ è stato usato in modalità MRM adoperando l'azoto come gas di collisione con un flusso di 1,5 mL/min. L'He è stato invece usato come *quenching* gas con flusso di 2,2 mL/min. Gli spettri MS (range di scansione m/z 50-550, 200 millisecondi, 6,1 cicli/s) e quelli MS/MS (range di scansione m/z 50-400, 4,2 cicli/s) sono stati acquisiti per ogni analita per selezionare il precursore migliore e gli ioni prodotto risultanti. Il tempo di ritenzione, gli ioni precursori e prodotti, e l'ottimizzazione dell'energia di collisione per ogni composto sono riportati in Tabella 22.

Composti	Tempo di ritenzione (min)	Ioni precursori (m/z) ¹	CE*	Ioni prodotti (m/z)	Q/q ⁽²⁾ (RSD%)
α-BHC	7,5	181	20	145	2,0 (4)
		219	20	147	
γ-BHC	8,1	181	20	145	1,7 (3)
		218	20	147	
β-BHC	8,8	181	20	145	1,7 (6)
		219	20	147	
δ-BHC	9,4	181	20	145	1,9 (5)
		219	20	147	
heptachlor	10,2	100	20	65	1,5 (1)
		272	20	237	
aldrin	11,2	263	30	193	1,2 (10)
		293	30	222	
chlorpyrifos	11,5	314	25	258	1,7 (1)

		197	25	169	
heptachlor epoxide	12,7	353	30	263	2,1 (4)
		353	20	219	
chlorfenvinphos D10 ³	12,9	323	25	268	1,3 (9)
chlorfenvinphos	13,1	323	25	267	1,6 (4)
		323	25	159	
γ-chlordane	13,6	373	30	266	1,5 (12)
		373	30	264	
α-endosulfan	14,2	241	25	206	1,3 (5)
		207	20	172	
α-chlordane	14,3	373	30	266	1,3 (5)
		373	30	264	
BPA D16 ³	15,3	224	20	125	1,1 (7)
BPA	15,4	213	15	119	1,8 (8)
		213	15	91	
DDE D8 ³	15,4	254	20	184	1,4 (11)
dieldrin	15,5	79	15	77	1,9 (6)
		79	15	51	
DDE	15,6	318	20	246	1,3 (7)
		318	20	283	
endrin	16,0	263	20	193	1,3 (3)
		263	20	228	
β-endosulfan	16,3	195	15	125	2,4 (5)
		237	15	143	
DDD	16,6	235	20	165	1,2 (7)
		235	20	199	
endrin aldehyde	16,8	250	10	215	2,3 (5)
		345	10	245	
endosulfan sulfate	17,3	272	20	237	1,4 (2)
		387	20	241	
DDT D8 ³	17,4	243	20	173	2,0 (3)
DDT	17,5	235	20	165	2,7 (4)
		235	20	199	
endrin ketone	18,1	317	10	101	1,7 (2)
		317	10	245	
methoxychlor D14 ³	18,3	241	25	177	1,9 (5)
methoxychlor	18,4	227	25	168	1,5 (2)
		227	25	212	
boscalid	20,6	140	15	76	1,2 (3)
		140	15	112	

Tabella 22: Condizioni sperimentali per il metodo EI-MRM. *CE: energia di collisione. ^a standard marcati. ^b La prima linea fornisce la quantitativa e la seconda la qualitativa. ^c media su 3 iniezioni (3 replicati ognuno) e tra parentesi la RSD.

9.2 RISULTATI E DISCUSSIONE

Il metodo prima di essere validato è stato ottimizzato per tutti i composti usando soluzioni standard in esano. Nello specifico gli spettri in *scan* da cui scegliere gli ioni precursori (picchi più abbondanti di ogni spettro) sono stati ottenuti iniettando una miscela standard 100 pg/μL. Sono state testate anche differenti energie di collisione (da 15 a 30 eV) per indurre la frammentazione ottimale: due ioni precursori più intensi da cui sono generati gli ioni prodotto. Quando ciò non era possibile, sono state usate due transizioni da un unico ione precursore. La transizione più intensa è stata scelta come quantificatore “Q” mentre la seconda come qualificatore “q” secondo i criteri stabiliti. Alla fine, per ogni composto si sono scelte comunque due transizioni ad eccezione degli standard interni, i quali richiedono solo una transizione (quella più intensa). Le transizioni Q e q e l’energia di collisione sono riportate in Tabella 22. La media dei rapporti Q/q, ottenuti da soluzioni standard a 3 differenti concentrazioni (50, 100, 200 pg/ μL) ognuno iniettato in triplicato (n=9) sono stati poi presi come “valori teorici” (Tabella 22). Sono stati ottenuti valori soddisfacenti di deviazione standard relativa di 15% o meno. Anche i *dwell time* sono stati ottimizzati per ottenere buoni picchi cromatografici e i risultati migliori sono stati ottenuti con una range di 0,01-0,7 secondi. Il rapporto Q/q è stato usato per confermare l’identità dei picchi nei campioni reali e quelli contaminati ovvero i valori sperimentali Q/q, ottenuti dai campioni reali, sono stati comparati con quelli teorici e la conferma degli analiti ricercati nei campioni reali è stata considerata positiva quando il rapporto mostrava valori compresi fra $\pm 20\%$ della media Q/q calcolata dagli standard. Questi rapporti, insieme ai tempi di ritenzione forniscono un’identificazione inequivocabile dei composti selezionati. Ottimizzati i diversi parametri si è passati alla validazione del metodo valutando: LOD, LOQ, R^2 , ripetibilità intra-day ed inter-day, recuperi e precisione. I LODs, definiti come rapporto segnale/rumore ($S/N \geq 3$) per la transizione meno intensa, variano da 0,03 a 0,1 ng/g per ogni composto (Tabella 23). I LOQs ($S/N \geq 10$) oscillava invece fra i 0,2 e 0,6 ng/g (Tabella 23). Il metodo analitico ha così dimostrato di essere sufficientemente sensibile. La linearità del metodo è stata valutata usando 0,5 g di cervello d’agnello precedentemente analizzato per appurare l’assenza dei composti d’indagine. In questo modo 0,5 g di tessuto cerebrale “bianco” sono stati fortificati a sette diverse concentrazioni comprese fra 0.2 e 200 ng/g. I primi 4 punti della calibrazione (0,2-2,0-10,0-20,0 ng/g) sono stati scelti a basse concentrazioni, quelle di maggiore interesse per il tipo d’indagine di nostro interesse. Ogni concentrazione è stata iniettata in triplicato. Sono stati ottenuti adeguati valori di R^2 , tutti maggiori di 0,9940 (Tabella 23). I recuperi sono stati valutati tramite esperimenti di recupero a tre diverse concentrazioni (1,0-10,0-50,0 ng/g) vicine alla concentrazione aspettata nei campioni reali. Ogni campione di corteccia cerebrale d’agnello è stato contaminato ed estratto 3 volte.

Composti	IS	LOD ng/g	LOQ ng/g	Equazione	R ²
α-BHC	DDE D ₈	0,07	0,21	y=7,0x+0,01	0,9956
γ-BHC	DDE D ₈	0,07	0,25	y=6,04x+0,001	0,9946
β-BHC	DDE D ₈	0,03	0,13	y=3,2x-0,01	0,9942
δ-BHC	DDE D ₈	0,07	0,20	y=4,1x-0,002	0,9970
heptachlor	DDE D ₈	0,07	0,21	y=4,05x+0,003	0,9960
aldrin	DDE D ₈	0,07	0,22	y=1,05x-0,002	0,9957
chlorpyrifos	chlorfenvinphos D ₁₀	0,03	0,17	y=2,1x-0,01	0,9988
heptachlor epoxide	DDE D ₈	0,10	0,32	y=0,06x+2,4E004	0,9944
chlorfenvinphos	chlorfenvinphos D ₁₀	0,07	0,24	y=1,3x+0,006	0,9945
γ-chlordane	DDT D ₈	0,03	0,13	y=0,25x+4,5E004	0,9945
α-endosulfan	DDT D ₈	0,20	0,61	y=0,38x+1,2E004	0,9951
α-chlordane	DDT D ₈	0,07	0,20	y=0,14x+4,5E004	0,9945
BPA	BPA D ₁₆	0,07	0,21	y=4,4x+0,05	0,9754
dieldrin	DDT D ₈	0,10	0,33	y=0,40x+0,01	0,9936
DDE	DDE D ₈	0,07	0,22	y=2,70x-6,4E004	0,9949
endrin	DDT D ₈	0,07	0,24	y=0,06x+1,9E004	0,9928
b-endosulfan	DDT D ₈	0,07	0,23	y=0,03x+1,9E004	0,9948
DDD	DDT D ₈	0,07	0,27	y=1,80x+0,005	0,9944
endrin aldehyde	methoxychlor D ₁₄	0,07	0,24	y=0,02x+1,4E004	0,9949
endosulfan sulfate	methoxychlor D ₁₄	0,10	0,31	y=0,11x-6,5E004	0,9891
DDT	DDT D ₈	0,07	0,26	y=0,47x+0,002	0,9962
endrin ketone	methoxychlor D ₁₄	0,07	0,21	y=0,08x+3,6E004	0,9955
methoxychlor	methoxychlor D ₁₄	0,03	0,17	y=1,45x-9,4E004	0,9943
boscalid	chlorfenvinphos D ₁₀	0,03	0,17	y=7,009431x+0,013391	0,9956

Tabella 23: LODs, LOQs e parametri di calibrazione nella corteccia cerebrale di agnello.

L'istogramma riportato in Figura 46 riporta i valori di percentuale di recupero ottenuti a 3 livelli di fortificazione: questi valori sono soddisfacenti per la maggior parte dei composti e compresi fra i 70 e i 120%. La precisione infine è stata espressa come ripetibilità intra-day ed inter-day (deviazione standard relativa, RSD %). La ripetibilità intra-day è stata valutata usando le medesime soluzioni degli esperimenti di recupero (n=3) mentre, per la ripetibilità inter-day è stata usata una soluzione standard 50 pg/μL preparata giornalmente ex-novo (5 iniezioni al gg per 5 giorni). I valori di RSD si aggiravano fra 2-6% per la ripetibilità intra-day e, 8-18% per quella inter-day. I risultati ottenuti indicano una buona ripetibilità ed accuratezza del metodo.

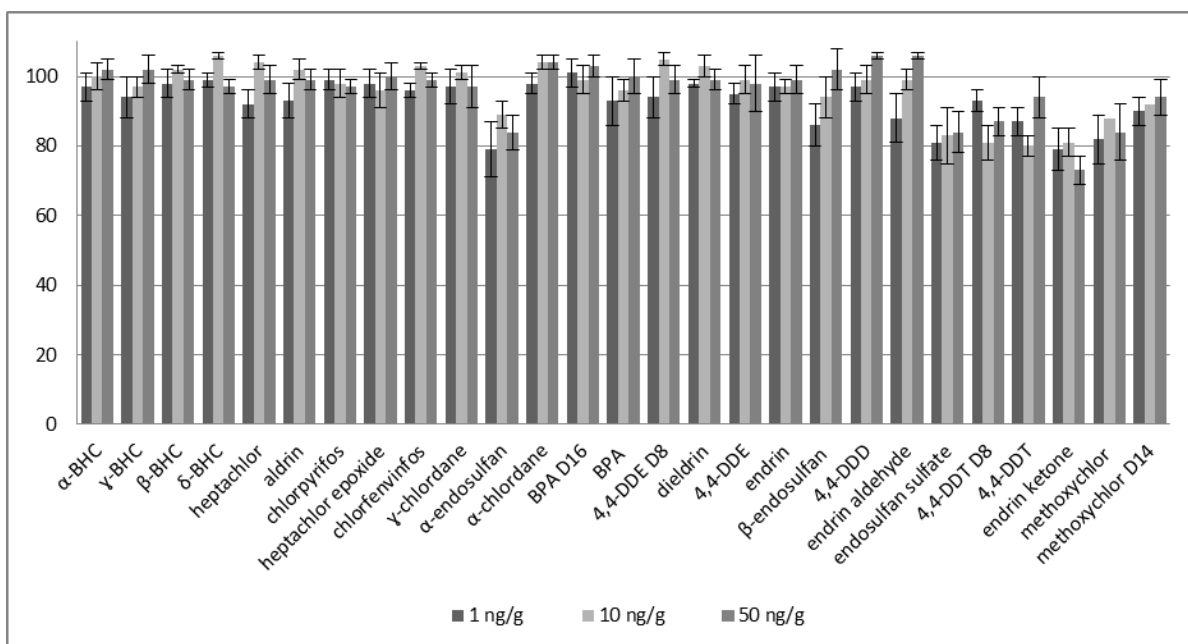


Figura 46: Istogramma ottenuto dai recuperi delle matrici fortificate 1,0-10,0-50,0 ng/g del BPA.

Dopo la validazione del metodo si è passati ai casi reali di SIUDS e SIDS (14 campioni). Alcuni contaminanti ambientali sono stati ritrovati in 8 campioni come riportato in Tabella 24. Ciò potrebbe indurre a pensare che molto probabilmente questi contaminanti possano passare dalla madre ai feti e accumularsi nel tessuto cerebrale. E' interessante notare che 4 campioni contengano numerosi OCPs e altri 3 contengano 2 OPPs (chlorpyrifos e chlorfenvivos). Per confermare i campioni positivi agli analiti d'interesse con concentrazioni intorno al LOQ o comprese fra il LOQ ed il LOD, ci si è basati sull'uso delle due transizioni selezionate, sulla conformità col rapporto Q/q, e sui tempi di ritenzione. Come esempio in Figura 47 sono riportati i cromatogrammi, con i relativi valori sperimentali Q/q per due dei composti ritrovati in 2 campioni di SIDS (Figura. 43 a, caso N12) e SIUDS (Figura 43 b, caso F11) ripetitivamente. I rapporti Q/q calcolati per tutti i campioni positivi sono nel range di tolleranza accettata intorno alla media sperimentale Q/q dei valori ottenuti dagli standard di riferimento. Il metodo ha permesso la conferma e la quantificazione di tutti i composti selezionati in un range di 0,2-0,6 ng/g.

Nomi campioni	Descrizione campioni	Composti	Concentrazione (ng/g)	Q/q sperimentale	Q/q teorico
F3	SIUDS (35 weeks), F	Methoxychlor	0,2	1,55	1,52
F4	SIUDS (34+5 weeks), F	Methoxychlor	<LOQ ^(a)	1,57	1,52
F6	SIUDS (40+4 weeks), M	DDE	<LOQ ^(a)	1,36	1,32
F8	SIUDS (49 weeks), M	Chlorpyrifos	0,4	1,68	1,72
F9	SIUDS (39+3 weeks), F	β -endosulfan	2,8	2,23	2,45
F11	SIUDS (34+1 weeks), F	Chlorfenvinfos	9,9	1,67	1,60
N12	SIDS (4 months), F	DDE	0,6	1,31	1,32
		Chlorpyrifos	2,1	1,75	1,72
		Heptachlor	n.c. ^(b)	---	
		DDD	n.c. ^(b)	---	
		Methoxychlor	n.c. ^(b)	---	
		γ -BHC	n.c. ^(b)	---	
N14	SIDS (4 months), M	Heptachlor	n.c. ^(b)	---	
		Chlorfenvinfos	0,5	1,53	1,60
		α -chlordane	n.c. ^(b)	---	
		DDE	0,4	1,39	1,32
		β -endosulfan	3,1	2,51	2,45

Tabella 24: Composti target in tessuti cerebrali di vittime di SIDS e SIUDS. NC: non confermati per il basso responso della transizione di conferma (q). ^a Rilevati ma non quantificati. ^b tra LOD e LOQ.

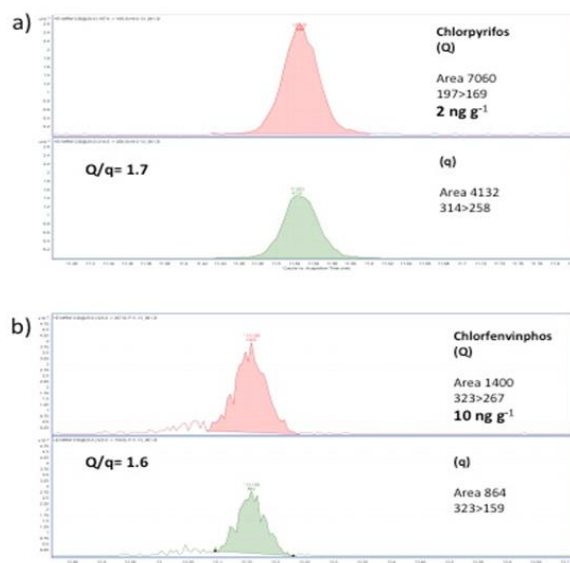


Figura 47: Cromatogramma MRM due composti selezionati in due tessuti cerebrali diversi provenienti da un SIDS (a) e SIUDS (b). Q: transizione di quantificazione, q: transizione di qualificazione.

9.3 CONCLUSIONI

In questo lavoro è stato proposto un metodo GC-MS/MS per la determinazione qualitativa e quantitativa di specifici contaminanti ambientali in tessuti cerebrali di feti umani e neonati alle concentrazioni finali di 0,2-0,6 ng/g. L'uso di un analizzatore QqQ, operante in modalità MRM, ha fornito specificità e sensibilità eccellenti soprattutto se comparate al precedente lavoro GC-MS con singolo quadrupolo. La specificità è stata migliorata tenendo in considerazione 2 transizioni con due differenti ioni precursori, per la maggior parte dei composti. I rapporti ottenuti sono stati usati come parametri di conferma, insieme ai tempi di ritenzione. Sebbene i contaminanti selezionati siano stati rilevati solo in parti per miliardo, la verifica di una probabile esposizione fetale e/o neonatale, insieme alla determinazione di questi composti in tessuti cerebrali degli stessi, è uno step critico per lo studio di una possibile correlazione tra questi analiti e le sindromi in questione. Il metodo proposto potrebbe portare a futuri sviluppi ed essere impiegato per analisi di un gran numero di campioni e per estendere lo studio ad altre classi di contaminanti come poli-clorinati, difenili e ftalati.

CONCLUSIONI

Il progetto di dottorato è stato incentrato sull'applicazione di nanotecnologie innovative nel campo della cromatografia liquida-spettrometria di massa e del campionamento e preparazione dei campioni pre-analisi. L'obiettivo principale della ricerca è stato il miglioramento del processo di vaporizzazione dell'interfaccia sperimentale LC-MS Direct-EI. In lavori precedenti erano state riscontrate alcune difficoltà nell'analizzare composti a maggior peso molecolare e temperatura d'ebollizione elevata. Tali composti infatti rimanevano adesi sulla superficie metallica della sorgente di ionizzazione con risultati cromatografici e mass-spettrometrici inadeguati. L'applicazione di un sottile strato di una copertura definita nano-ceramica, realizzata mediante tecnologia sol-gel, ha contribuito a risolvere il problema. La copertura ha evidenziato concrete caratteristiche di anti-aderenza, necessarie per l'analisi di tale tipologia di composti. I risultati concernenti le analisi condotte con la sorgente ricoperta di ceramica riportano un inequivocabile miglioramento del processo di vaporizzazione. Infatti, composti come l'indeno(1,2,3 c,d)pirene, il 17- α -etinilestradiolo ed il 17- β -estradiolo hanno generato segnali cromatografici eccellenti rispetto a quelli ottenuti con una comune sorgente di ionizzazione elettronica d'acciaio inox 318, con la quale si erano registrati sia uno slittamento temporale del segnale sia una sua eccessiva codatura. Data però la fragilità della copertura di nano-ceramica, sono state testate altre tre diverse coperture, realizzate sempre mediante tecnologia sol-gel: una a base di silicio, una a base di titanio ed una terza a base di zirconio. I risultati ottenuti sono stati contrastanti. I dati ottenuti con la sorgente di titanio non hanno evidenziato alcun ritardo nel segnale rispetto a quelli ottenuti con una comune sorgente di ionizzazione elettronica, purtroppo non erano riproducibili. La copertura di zirconio non ha apportato alcun vantaggio, né per il tempo d'uscita del segnale né per la sua larghezza. La copertura a base di silice ha invece fornito risultati interessanti: i segnali ottenuti erano sufficientemente stretti e senza alcun ritardo, anche se il rapporto segnale/rumore non ha mostrato miglioramenti apprezzabili a causa dell'aumento del rumore di fondo. Gli ottimi risultati ottenuti con la nano-ceramica prima, e con la copertura a base di silicio poi, suggeriscono di continuare la ricerca riguardo nuove coperture sol-gel che permettano di ampliare il numero delle sostanze analizzabili con una comune sorgente a ionizzazione elettronica, e nello specifico con il Direct-EI.

Il Direct-EI è stato poi interfacciato ad una tecnica di campionamento, estrattiva e purificativa che permette l'introduzione diretta degli analiti all'interno dello spettrometro di massa. La MIMS sfrutta membrane siliconiche, con uno spessore fino a 500 nanometri, per estrarre dal campione i composti d'interesse e portarli all'interno dello spettrometro. L'interfacciamento fra le due tecniche non è stato immediato ed è stato necessario ridurre il flusso fino all'ordine dei nL/min poiché la sorgente EI non è compatibile con flussi operativi maggiori. La validazione del metodo è stata condotta analizzando soluzioni acquose di IPA. I dati ottenuti hanno confermato l'utilità della nuova interfaccia CP-MIMS-EI sia dal punto di vista dell'efficienza, sia in termini di costi e di tempi d'analisi. È infatti un'interfaccia che permette analisi on-line, in real-time ed *in situ*.

Infine le nanotecnologie hanno permesso di ridurre sensibilmente anche i sistemi d'estrazione senza rinunciare all'efficienza. Come riportato nella tesi, la MEPS ha dimostrato d'essere versatile, semplice, rapida, e di permettere un ridotto consumo di solvente organico. Inoltre, la tecnica in questione non necessita di grandi quantità di campione ed è quindi adatta ad essere utilizzata anche in caso d'indagini forensi dove spesso la quantità del reperto da analizzare è veramente esigua.

BIBLIOGRAFIA

- [1] Moret S., Purcaro G., Conte L. S.. *Il campione per l'analisi chimica*. Springer-Verlag Italia 2014;
- [2] Witkiewicz Z. *Podstawy Chromatografii*. Warszawa: WNT 1995, 401– 430;
- [3] Namieśnik, J., Jamrògiewicz, Z. *Fizykochemiczne Metody Kontroli Zanieczyszczeń s'rodowisk*. Warszawa: WNT 1998, 296–312;
- [4] Czapski J., Grajek W., Pospiech E. *Surowce, Technologia i Dodatki a Jakość _zywności*. Poznań: WAR 1999, 343–358;
- [5] Smith RM. *Before the injection--modern methods of sample preparation for separation techniques*. Journal of Chromatography A 2003, 1000, 3–27;
- [6] Mitra S (Ed.). *Sample Preparation Techniques in Analytical Chemistry*. Wiley-Interscience, New Jersey 2003;
- [7] Pawliszyn J. *Comprehensive sampling and sample preparation*. Elsevier Amsterdam 2012, Vol. 3;
- [8] Hoch G., Kok B. *Mass spectrometer inlet system for sampling gases dissolved in liquid phases*. Archives Biochemistry Biophysics 1963, 101, 160;
- [9] Westover L.B., Tou J.C., Marl J.H. *Hollow fiber probe*. Analytical Chemistry 1974, 46, 568;
- [12] Ketola R.A., Kotiaho T., Ciser M.E., Allen T.M. *A two-dimensional quadrupole ion trap mass spectrometer*. Journal of Mass Spectrometry. 2002, 37, 457;
- [11] Llamas A.M., Ojeda C.B., Rojas F.S. *Process Analytical Chemistry—Application of Mass Spectrometry in Environmental Analysis: An Overview*. Applied Spectroscopy Reviews 2007,42,345,
- [12] LaPack M.A., Tou J.C., Enke C.G. *Environmental Applications of Membrane Introduction Mass Spectrometry*. Analytical Chemistry 1990, 62, 1265;
- [13] Johnson R.C., Cooks R.G., Allen T.M., Cisper M.E., Hemberger P.H. *Membrane introduction mass spectrometry: trends and applications*. Journal of Mass Spectrometry 2000,19,1;
- [14] Ketola R.A., Kotiaho T., Cisper M.E., Allen T.M. *Environmental applications of membrane introduction mass spectrometry*. Journal of Mass Spectrometry 2002, 37, 457;
- [15] Davey N.G., Krogh E.T., Gill C.G. *Membrane Introduction Mass Spectrometry (MIMS)*. Trends Analytical Chemistry 2011, 30, 1477;
- [16] Soni M., Bauer S., Amy J.W., Wong P., Cooks R.G. *Direct determination of organic compounds with mass spectrometry*. Analytical Chemistry 1995, 67, 1409;

- [17] Cisper M.E., Gill C.G., Townsend L.E., Hemberger P.H. *Measurement of spatial and temporal variation in volatile hazardous air pollutants in Tacoma, Washington, using a mobile membrane introduction mass spectrometry (MIMS) system*. *Analytical Chemistry* 1995, 67, 1423;
- [18] Clinton R., Creaser C.S., Bryant D. *Real-time monitoring of a pharmaceutical process reaction using a membrane interface combined with atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry*. *Analitica Chimica Acta* 2005, 21, 423;
- [19] VanHassel E., Bier M.E. *An electrospray membrane probe for the analysis of volatile and semi-volatile organic compounds in water*. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 2007, 413-420;
- [20] Johnson R.C., Koch K., Cooks R.G. *On-line monitoring of reactions of epichlorohydrin in water using liquid membrane introduction mass spectrometry*. *Industrial & engineering chemistry research* 1999, 38,343;
- [21] Willis M.D., Duncan K.D., Krogh E.T., Gill C.G. *Delicate polydimethylsiloxane hollow fibre membrane interfaces for condensed phase membrane introduction mass spectrometry (CP-MIMS)*. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 2014, 28, 671;
- [22] Duncan K.D., Willis M.D., Krogh E.T., Gill C.G. *A miniature condensed-phase membrane introduction mass spectrometry (CP-MIMS) probe for direct and on-line measurements of pharmaceuticals and contaminants in small, complex samples*. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 2013, 27, 1213;
- [23] Abdel-Rehim M. *New trend in sample preparation: on-line microextraction in packed syringe for liquid and gas chromatography applications: I. Determination of local anaesthetics in human plasma samples using gas chromatography–mass spectrometry*. *Journal of Chromatography B* 2004, 317, 321;
- [24] Abdel-Rehim M., Altun Z., Blomberg L. *Microextraction in packed syringe (MEPS) for liquid and gas chromatographic applications. Part II—Determination of ropivacaine and its metabolites in human plasma samples using MEPS with liquid chromatography/tandem mass spectrometry*. *Journal of Mass Spectrometry* 2004, 39, 1488;
- [25] Jagerdo E., Abdel-Rehim M. *Screening of Cocaine and Its Metabolites in Human Urine Samples by Direct Analysis in Real-Time Source Coupled to Time-of-Flight Mass Spectrometry After Online Preconcentration Utilizing Microextraction by Packed Sorbent*. *Journal of Mass Spectrometry* 2009, 20, 891;
- [26] Matysik S., Matysik F.M. *Microextraction by packed sorbent coupled with gas chromatography—mass spectrometry: application to the determination of metabolites of monoterpenes in small volumes of human urine*. *Microchimica Acta* 2009, 166, 109;
- [27] Morales-Cid G., Gebefugi I., Kanawati B., Harir M., Hertkorn N., Rosselló-Mora R., Schmitt-Kopplin P. *Automated microextraction sample preparation coupled on-line to FT-ICR-MS: application to*

desalting and concentration of river and marine dissolved organic matter. Analytical and Bioanalytical Chemistry 2009, 395, 797;

[28] Said R., Hassan Z., Hassan M., Abdel-Rehim M. *Rapid and Sensitive Method for Determination of Cyclophosphamide in Patients Plasma Samples Utilizing Microextraction by Packed Sorbent Online with Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry (MEPS-LC-MS/MS)*. Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies 2008, 31, 683;

[29] www.infochroma.ch/fran/prep/spe_meps.html;

[30] Altun Z., Abdel-Rehim M., Blomberg L.G. *New trends in sample preparation: on-line microextraction in packed syringe (MEPS) for LC and GC applications: Part III: Determination and validation of local anaesthetics in human plasma samples using a cation-exchange sorbent, and MEPS-LC-MS-MS*. Journal of Chromatography B 2004, 813, 29;

[31] Meyer V.R. *Practical High-Performance Liquid Chromatography, quinta edizione*. John Wiley & Sons, Ltd. 2010;

[32] Martin A.J.P., Synge R.L.M. *A new form of chromatogram employing two liquid phases*. Biochemistry Journal 1941,35, 1358;

[33] Polesello S., Polesello A., Guenzi S., Roscioli C. *Le tecniche separative* 2007, Vol. II;

[34] Swartz M.E., Murphy B.J., Sievers D. *UPLC: Expanding the limits of HPLC*. Screening 2004, 5 (3), 36-38;

[35] Swartz M.E., Murphy B.J., Sievers D. *UPLC: Expanding the limits of HPLC*. GIT Lab J. 2004, 8(5): 43-45;

[36] Karlson K.E., Novotny M. *Separation efficiency of slurry-packed liquid chromatography microcolumns with very small inner diameters*. Analytical Chemistry 1988, 60, 1662-1665;

[37] Rieux L., Sneekes E.J., Swart R. *NanoLC principles, evolution, and state-of-the-art of the technique*. LCGC North America 2011, 29, 926-935;

[38] Wehr T. *A NanoLC-MS primer for expression proteomics, Part I*. LCGC North America 2006, 24, 286-294;

[39] Imran A., Assan Y. Aboul-Enein, Gupta Vinod K. *Detection in Nanochromatography and Nanocapillary Electrophoresis*. Nanochromatography and nanocapillary electrophoresis 2009, 4, 91-108;

[40] Morgan N.Y., Smith P.D. *HPLC detectors*. Handbook of HPLC 2010, 7, 207-231;

- [41] Poppe H. *The performance of some liquid phase flow-through detectors*. *Analitica Chimica Acta* 1983, 145, 17-26;
- [42] Blakley C.R., Vestal M.L. *Thermospray interface for liquid chromatography/mass spectrometry*. *Analytical Chemistry* 1983, 55, 750-754;
- [43] Cech N.B., Enke C.G. *Practical implications of some recent studies in electrospray ionization fundamentals*. *Journal of Mass Spectrometry* 2001, 20, 362;
- [44] Cody R.B. *Electrospray Ionization Mass Spectrometry: history, theory and instrumentation*. *Applied Electrospray Mass Spectrometer*, Marcel Dekker, Inc., New York 2002, 1-104;
- [45] Cech N.B., Enke C.G. *Practical implications of some recent studies in electrospray ionization fundamentals*. *The encyclopedia of Mass Spectrometry*, vol. 8, Elsevier, Amsterdam 2006, 171-180;
- [46] www.slideplayer.it;
- [47] Raffaelli A. *Atmospheric pressure chemical ionization (APCI)*. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands 2007, 11-25;
- [48] Raffaelli A., Saba A. *Atmospheric pressure photoionization mass spectrometry*. *Mass Spectrometry Reviews* 2003, 22, 318;
- [49] Kaupila T.J., Kostianen R., Bruinis A.P. *Anisole, a new dopant for atmospheric pressure photoionization mass spectrometry of low proton affinity, low ionization energy compounds*. *Rapid Communication Mass Spectrometry* 2004, 18, 808;
- [50] Hanold K.A., Fisher S.M., Cormia P.H., Miller C. *Atmospheric pressure photoionization. 1. General properties for LC/MS*. *Analytical Chemistry* 2004, 76, 2842;
- [51] Robb D.B., Rogalski J.C., Kast J., Blades M.W. *Atmospheric pressure-electron capture dissociation of peptides using a modified PhotoSpray ion source*. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 2010, 24, 3303-8;
- [52] Bleakney W.A. *A new method of positive ray analysis and its application to the measurement of ionization potentials in mercury vapor*. *Physical Reviews* 1929, 34, 157;
- [53] Winn E.B., Nier A.O. *A Simplified Emission Regulator for Mass-Spectrometer Ion Sources*. *Journal of Physics E: Scientific Instruments* 1949, 20, 773;
- [54] Ausloos P., Clifton C.L., Lias S.G., Mikaya A.I., Stein S.E., Tchekhovskoi D.V., Sparkman, O.D., Zaikin V., Zhu D. J. *The critical evaluation of a comprehensive mass spectral library*. *Journal of Mass Spectrometry* 1999, 10, 287;

- [55] Trufelli H., Famiglini G., Termopoli V., Cappiello A. *Profiling of non-esterified fatty acids in human plasma using liquid chromatography-electron ionization mass spectrometry*. *Analytical Bioanalytical Chemistry* 2011, 400, 2933- 2941;
- [56] Cappiello A., Famiglini G., Palma P., Siviero A. *Liquid chromatography-electron ionization mass spectrometry: Fields of application and evaluation of the performance of a Direct-El interface*. *Journal of Mass Spectrometry* 2005, 24, 978;
- [57] Cappiello A., Palma P., Famiglini G. *LC-MS Interfaces: State of the Art and Emerging Techniques*. *Handbook of HPLC*, 101, 8, 233-256;
- [58] Cappiello A., Famiglini G., Bruner F. *Determination of acidic and basic/neutral pesticides in water with a new microliter flow rate LC/MS particle beam interface*. *Analytical Chemistry* 1994, 66 (9), 1416-1423;
- [59] Famiglini G., Palma P., Pierini E., Trufelli H., Cappiello A. *Overcoming Matrix Effects in Liquid Chromatography-Mass Spectrometry*. *Analytical Chemistry* 2008, 80, 3445-3449;
- [60] Cappiello A., Famiglini G., Mangani F., Palma P., Siviero A. *Nano-high-performance liquid chromatography-electron ionization mass spectrometry approach for environmental analysis*. *Analitica Chimica Acta* 2003, 493, 125-136;
- [61] Cappiello A., Famiglini G., Palma P., Siviero A., Rezai MA. *Determination of Endocrine Disrupting Compounds in Marine Water by Nanoliquid Chromatography/Direct-Electron Ionization Mass Spectrometry*. *Analytical Chemistry* 2005, 77, 7654- 7661;
- [62] Henk L.L., West J.K. Chem. Rev. 1990, 90 (1), 33-72;
- [63] LC Klein. *Sol-Gel Technology for Thin Film, Fibers, Performs, Electronics and Specialty Shape*. Noyes, Park ridge, NJ, 1988
- [64] Wright J. D., Sommerdijk N. A.J.M. *Sol-Gel Materials: Chemistry and Applications*. CRC Press, 2001.
- [65] Brinker C. J., Scherer G. W. *Sol-Gel Science: The Physics and Chemistry of Sol-Gel Processing*. Academic Press 1990;
- [66] Flory, P. J., and D. Y. Yoon. *Faraday disc, chem. Soc* 57 (1974): 7-18.
- [67] <http://www.enco-journal.com>;
- [68] Yoldas, Bulent E. *Transparent porous alumina*. *American Ceramic Society Bulletin* 54.3 (1975): 286-288.

- [69] Avnir D., Kaufman V. R. *Alcohol is an unnecessary additive in the silicon alkoxide sol-gel process.* Journal of Non-Crystalline Solids 1987, 192, 180;
- [70] Acikko M., Mercam S., Karadayi S. *Simultaneous Determination of Benzodiazepines and Ketamine from Alcoholic and Nonalcoholic Beverages by GC-MS in Drug Facilitated Crimes.* Chromatographia 2009, 70 (7/8), 1295-1298;
- [71] Famiglini G., Capriotti F., Palma P., Termopoli V., Cappiello A. *The rapid measurement of benzodiazepines in a milk-based alcoholic beverage using QuEChERS extraction and GC-MS analysis.* Journal Analytical Toxicology 2015, 39 (4), 306-312;
- [72] Karlonas N., Padarauskas A., Ramanavicius A., Ramanaviciene A. *Mixed-mode SPE for a multi-residue analysis of benzodiazepines in whole blood using rapid GC with negative-ion chemical ionization MS.* Journal of Separation Science 2013, 36, 1437- 1445;
- [73] Bishop S.C., Lerch M., McCord B.R. *Detection of nitrated benzodiazepines by indirect laser-induced fluorescence detection on a microfluidic device.* Journal of Chromatography A 1154 2007, (1-2), 481-484;
- [74] Webb R., Doble P., Dawson M. *A rapid CZE method for the analysis of benzodiazepines in spiked beverages.* Electrophoresis 2007, 28, 3553-3565;
- [75] D'Aloise P., Chen H. *Rapid determination of flunitrazepam in alcoholic beverages by desorption electrospray ionization-mass spectrometry.* Science Justice 2012, 52, 2-8;
- [76] Bugey A., Staub C. *Rapid analysis of benzodiazepines in whole blood by high-performance liquid chromatography: use of a monolithic column.* Journal of Pharmacological Biomedical Analysis 2004, 35, 555-562;
- [77] Ming D.S., Heathcote J. *A rapid and accurate UPLC/MS/MS method for the determination of benzodiazepines in human urine.* Journal of Chromatography B 2011, 879 (5-6), 421-428;
- [78] Chen Y.C., Hu A. *Simultaneous determination of trace benzodiazepines from drinks by using direct electrospray probe/mass spectrometry (DEP/MS).* Forensic Science Int. 1999, 103,79-88;
- [79] Borrey D., Meyer E., Lambert W., Van Peteghem C., De Leenheer A.P. *Simultaneous determination of fifteen low-dosed benzodiazepines in human urine by solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry.* Journal of Chromatography B 2001, 765, 187-197;
- [80] Lillsunde P., Seppala T. *Simultaneous screening and quantitative analysis of benzodiazepines by dual-channel gas chromatography using electron-capture and nitrogen-phosphorus detection.* Journal of Chromatography B 1990, 533, 97-110;

- [81] Fernandez P., Gonzales C., Pena M.T., Carro A.M., Lorenzo R.A. *A rapid ultrasound-assisted dispersive liquid–liquid microextraction followed by ultra-performance liquid chromatography for the simultaneous determination of seven benzodiazepines in human plasma samples*. *Analitica Chimica Acta* 2013, 767, 88-96;
- [82] Fernandez P., Vasquez C., Lorenzo R.A., Carro A.M. *Experimental design for optimization of microwave-assisted extraction of benzodiazepines in human plasma*. *Analytical Bioanalytical Chemistry* 2010, 397, 677-685;
- [83] Walles M., Mullett W.M., Pawliszyn J. *Monitoring of drugs and metabolites in whole blood by restricted-access solid-phase microextraction coupled to liquid chromatography–mass spectrometry*. *Journal of Chromatography A* 2004, 1025, 85-92;
- [84] Mullet W.M., Levsen K., Lubda D., Pawliszyn J. *Bio-compatible in-tube solid-phase microextraction capillary for the direct extraction and high-performance liquid chromatographic determination of drugs in human serum*. *Journal of Chromatography A* 2002, 963, 325-334;
- [85] Johansen Reubsæet K., Ragnar Norli H., Hemmersbach P., Rasmussen K.E. *Determination of benzodiazepines in human urine and plasma with solvent modified solid phase micro extraction and gas chromatography; rationalisation of method development using experimental design strategies*. *Journal of Pharmaceutical Biomedical Analysis* 1998, 18, 667-680;
- [86] Mullet W.M., Pawliszyn J. *Direct determination of benzodiazepines in biological fluids by restricted-access solid-phase microextraction*. *Analytical Chemistry* 2002, 74, 1081-1087;
- [87] Ich, I. C. H. *Q2 (R1): Validation of analytical procedures: text and methodology*. International Conference on Harmonization, Geneva. 2005;
- [88] Brenneisen, R., L. Raymond, and S. J. Salamone. *Benzodiazepines and GHB: Detection and Pharmacology*. (2001): 1-20.
- [89] Davey N.G., Krogh E.T., Gill C.G. *Membrane-introduction mass spectrometry (MIMS)*. *Trends Analytical Chemistry* 2011, 30, 1477–1485;
- [90] Krogh E.T., Gill C.G. *Membrane introduction mass spectrometry (MIMS): a versatile tool for direct, real-time chemical measurements*. *Journal of Mass Spectrometry* 2014, 49, 1205–1213;
- [91] Bell R.J., Davey N.G., Martinsen M., Collin-Hansen C., Krogh E.T., Gill C.G. *A field-portable membrane introduction mass spectrometer for real-time quantitation and spatial mapping of atmospheric and aqueous contaminants*. *Journal of Mass Spectrometry* 2014, 26, 212-223;
- [92] Amirav A., Granot O. *Liquid chromatography mass spectrometry with supersonic molecular beams*. *Journal of Mass Spectrometry* 2000, 11, 587–591;

- [93] Granot O., Amirav A. *LC-MS with electron ionization of cold molecules in supersonic molecular beams*. Journal of Mass Spectrometry 2005, 244, 15–28;
- [94] Cappiello A., Famiglini G., Pierini E., Palma P., Trufelli H. *Advanced liquid chromatography– mass spectrometry interface based on electron ionization*. Analytical Chemistry 2007, 79, 5364–5372;
- [95] Cappiello A., Famiglini G., Palma P., Pierini E., Termopoli V., Trufelli H. *Direct-EI in LC-MS: Towards a universal detector for small-molecule applications*. Journal of Mass Spectrometry 2011, 30, 1242–255;
- [96] Cappiello A., Famiglini G., Palma P., Pierini E., Termopoli V., Trufelli H. *Overcoming matrix effects in liquid chromatography– Mass Spectrometry*. Analytical Chemistry 2008, 80, 9343–9348;
- [97] Duncan K.D., McCauley E.P.B., Krogh E.T., Gill C.G. *Characterization of a condensed-phase membrane introduction mass spectrometry (CP-MIMS) interface using a methanol acceptor phase coupled with electrospray ionization for the continuous on-line quantitation of polar, low-volatility analytes at trace levels in complex aqueous samples*. Rapid Communication Mass Spectrometry 2011, 25, 1141–1151;
- [98] Duncan K.D., Willis M.D., Krogh E.T., Gill C.G. *A miniature condensed-phase membrane introduction mass spectrometry (CP-MIMS) probe for direct and on-line measurements of pharmaceuticals and contaminants in small, complex samples*. Rapid Communication Mass Spectrometry 2013, 27, 1213–1221;
- [99] Duncan K.D., Vandergrift G.W., Krogh E.T., Gill C.G. *Ionization suppression effects with condensed phase membrane introduction mass spectrometry: methods to increase the linear dynamic range and sensitivity*. Journal of Mass Spectrometry 2014, 50, 437–443;
- [100] Willis M.D., Duncan K.D., Krogh E.T., Gill C.G. *Delicate polydimethylsiloxane hollow fibre membrane interfaces for condensed phase membrane introduction mass spectrometry (CP-MIMS)*. Rapid Communication Mass Spectrometry 2014, 28, 671–681;
- [101] Trufelli H., Palma P., Famiglini G., Cappiello A. *An overview of matrix effects in liquid chromatography–mass spectrometry*. Journal of Mass Spectrometry Rev. 2011, 30, 491–509;
- [102] Magrini L., Famiglini G., Palma P., Termopoli V., Cappiello, A. *Occurrence of specific environmental risk factors in brain tissues of sudden infant death and sudden intrauterine unexpected death victims assessed with gas chromatography–tandem mass spectrometry*. Journal of Mass Spectrometry 2015, 1-8;
- [103] Fialkov A.B., Steiner U., Lehotay S.J., Amirav A. *Sensitivity and noise in GC-MS: Achieving low limits of detection for difficult analytes*. Journal of Mass Spectrometry 2007, 260, 31–48;

- [104] Brocks J.J., Hope J.M. *Tailing of chromatographic peaks in GC–MS caused by interaction of halogenated solvents with the ion source*. Journal of Chromatographic Science 2014, 52, 471–475;
- [105] D’Autry W., Wolfs K., Yarramraju S., Van Shepdael A., Hoogmartens J., Adams E. *Characterization and improvement of signal drift associated with electron ionization quadrupole mass spectrometry*. Analytical Chemistry 2010, 82(15), 6480– 6486;
- [106] Cappiello A., Famiglini G. *Analysis of thermally unstable compounds by a liquid chromatography/mass spectrometry particle beam interface with a modified ion source*. Analytical Chemistry 1995, 67, 412–419;
- [107] Jones G.A., Douce D.S., Farooq A.. US Patent 2012/0286152A1, 2012;
- [108] Kroska J.D. US Patent 6,878,932, 2005;
- [109] Perkins P.D. US Patent 7,304,299, 2007;
- [110] Taylor D.M., Amy J.W., Stafford G.C. US Patent 5,055,678, 1991;
- [111] Joyce T.H., Lu J.Q. US Patent 7,075,067, 2006;
- [112] Cappiello A., Capriotti F., Famiglini G., Palma P., Termopoli V.. Proceedings of the 61th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, Minneapolis, MN, June 9–13 (2013);
- [113] Cappiello A., Famiglini G., Palma P., Pierini E., Termopoli V. *Direct-EI in LC–MS: Towards a universal detector for small-molecule applications*. Journal of Mass Spectrometry Review 2011, 30, 1242–1255;
- [114] Famiglini G., Palma P., Termopoli V., Trufelli H., Cappiello A. *Single-step LC/MS method for the simultaneous determination of GC-amenable organochlorine and LC-amenable phenoxy acidic pesticides*. Analytical Chemistry 2009, 81, 7373–7378;
- [115] Trufelli H., Famiglini G., Termopoli V., Cappiello A. *Profiling of non-esterified fatty acids in human plasma using liquid chromatography–electron ionization mass spectrometry*. Analytical Bioanalytical Chemistry 2011, 400, 2933–2941;
- [116] Cappiello A., Famiglini G., Palma P., Termopoli V., Trufelli H. *A new liquid chromatography–mass spectrometry approach for generic screening and quantitation of potential genotoxic alkylation compounds without derivatization*. Journal of Chromatography A, 2012, 1255, 286–290;
- [117] Trufelli H., Palma P., Famiglini G., Cappiello A. *An overview of matrix effects in liquid chromatography–mass spectrometry*. Journal of Mass Spectrometry Review 2011, 30, 491–509;

- [118] Cappiello A., Famiglini G., Mangani F., Palma P. *New trends in the application of electron ionization to liquid chromatography—mass spectrometry interfacing*. Journal of Mass Spectrometry Review 2001, 20, m88-104;
- [119] Shende C., Kabir A., Townsend E., Malik A. *Sol–Gel Poly (ethylene glycol) Stationary Phase for High-Resolution Capillary Gas Chromatography*. Analytical Chemistry 2003, 75, 3518-3530;
- [120] Bianchi F., Mattarozzi M., Betti P., Bisceglie F., Careri M., Mangia A., Sidisky L., Ongarato S., Dalcanale E. *Innovative Cavitand-Based Sol–Gel Coatings for the Environmental Monitoring of Benzene and Chlorobenzenes via Solid-Phase Microextraction*. Analytical Chemistry 2008, 80, 6423-6430;
- [121] Bianchi F., Bisceglie F., Careri M., Di Bernardino S., Mangia A., Musci M. *Innovative sol–gel coatings for solid-phase microextraction: development of fibers for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons at trace level in water*. Journal of Chromatography A 2008, 1196-1197, 15-22;
- [122] Mattarozzi M., Bianchi F., Bisceglie F., Careri M., Mangia A., Mori G., Gregori A. *Planar solid-phase microextraction-ion mobility spectrometry: a diethoxydiphenylsilane-based coating for the detection of explosives and explosive taggants*. Analytical Bioanalytical Chemistry 2011, 399, 2741-2746;
- [123] Fares I., McCulloch K.M., Raju T.N. *Intrauterine cocaine exposure and the risk for sudden infant death syndrome: a meta-analysis*. Journal of Perinatology 1997, 17, 179-182.
- [124] Klonoff-Cohen H.S., Leigh Edelstein S., Schneider Lefkowitz E., Srinivasan I.P., Kaegi D., Chun Chang J., Wiley K. J.. JAMA 1995, 273, 795-798.
- [125] Adgent M.A. *The effect of passive smoking and tobacco exposure through breast milk on sudden infant death syndrome*. Birth Defects Research Part B: Developmental and Reproductive Toxicology 2006, 77, 69-85.
- [126] Lavezzi A.M., Mecchia D., Maturri L. *Neuroanatomical dysmorphology of the medial superior olivary nucleus in sudden fetal and infant death*. Autonomic Neuroscience 2012, 166, 29-34.
- [127] Lavezzi A.M., Corna M.F., Alfonsi G., Maturri L.. BMC Pulmonary Medicine 2014, 14, doi: 10.1186/1471-2466-14-11.
- [128] Lavezzi A.M., Ottaviani G., Maturri L. *Possible role of the $\alpha 7$ nicotinic receptors in mediating nicotine's effect on developing lung—implications in unexplained human perinatal death*. Neurobiological Disease 2005, 20, 601-607.
- [129] Bergonzi R., De Palma G., Specchia C., Dinolfo M., Tomasi C. *Persistent organochlorine compounds in fetal and maternal tissues: evaluation of their potential influence on several indicators of fetal growth and health*. Science of The Total Environment 2011, 409, 2888-2893.

- [130] Lopez.Espinosa M.J., Murcia M., Iniguez C., Vizcaino N., Llop S., Vioque J., Grimalt J.O., Rebagliato M., Ballester F. *Occurrence of specific environmental risk factors in brain tissues of sudden infant death and sudden intrauterine unexpected death victims assessed with gas chromatography–tandem mass spectrometry*. Pediatrics 2011, 128, e1-e8.
- [131] Rylander L., Stromberg U., Hagmar L. *Lowered birth weight among infants born to women with a high intake of fish contaminated with persistent organochlorine compounds*. Chemosphere 2000, 40, 1255–1262.
- [132] Longnecker M.P., Klebanoff M.A., Zhou H., Brock J.W. *Association between maternal serum concentration of the DDT metabolite DDE and preterm and small-for-gestational-age babies at birth*. Lancet 2001, 358, 110–114.
- [133] Siddiqui M.K.J., Srivastava S., Srivastava S.P., Mehrotra P.K., Mathur N., Tandon I. *Persistent chlorinated pesticides and intra-uterine foetal growth retardation: a possible association*. International Archives of Occupational and Environmental Health 2003, 76, 75–80.
- [134] Patandin, Svati, et al. *Effects of environmental exposure to polychlorinated biphenyls and dioxins on cognitive abilities in Dutch children at 42 months of age*. The Journal of pediatrics 134.1 (1999): 33-41.
- [135] Shen H., Main K.M., Virtanen H.E., Damggard I.N., Haavisto A.M., Kaleva M. *From mother to child: investigation of prenatal and postnatal exposure to persistent bioaccumulating toxicants using breast milk and placenta biomonitoring*. Chemosphere 2007, 67, S256-S262.
- [136] Oehlmann J., Schulte-Oehlmann U., Kloas W., Jagnytsch O., Lutz I., Kusk K., Wollenberger L., Santos E.M., Paull G.C., Van Look K.J., Tyler C.R., Phil Trans R. *A critical analysis of the biological impacts of plasticizers on wildlife*. Soc. B 2009, 364, 2047-2062.
- [137] Engel S.M., Wetmur J., Chen J., Zhu C., Barr D.B., Canfield R.L., Wolff MS. *Prenatal exposure to organophosphates, paraoxonase 1, and cognitive development in childhood*. Environmental Health Perspectives 2011, 119, 1182-1188.
- [138] Bouchard M.F., Chevrier J., Harley K.G., Kogut K., Vedar M., Calderon N. *Prenatal exposure to organophosphate pesticides and IQ in 7-year-old children*. Environmental Health Perspectives 2011,119, 1189-1195.
- [139] Rauch S.A., Braun J.M., Barr D.B., Calafat A.M., Khoury J., Montesano M.A., Yolton K., Lanphear P.L. *Associations of prenatal exposure to organophosphate pesticide metabolites with gestational age and birth weight*. Environmental Health Perspectives 2012,120, 1055-1060.
- [140] Doucet J., Tague B., Arnold D.L., Cooke G.M., Hayward S., Goodyer C.G. *Persistent organic pollutant residues in human fetal liver and placenta from Greater Montreal, Quebec: a longitudinal study from 1998 through 2006*. Environmental Health Perspectives 2009, 117, 605–610.

- [141] Porpora M.G., Lucchini R., Abballe A., Ingelido A.M., Valentini S., Fuggetta E. *Placental Transfer of Persistent Organic Pollutants: A Preliminary Study on Mother-Newborn Pairs*. International Journal Environmental Research Public Health 2013, 10, 669-711.
- [142] Rawn D., Gaertner D., Sun W., Casey V., Curran I., Cooker G. *Polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in Canadian human fetal liver and placental tissues*. Organohalogen Compounds 2011, 73, 563-566.
- [143] Zhao Y., Ruan X., Li Y., Yan M., Qin Z. *Polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in aborted human fetuses and placental transfer during the first trimester of pregnancy*. Environmental Scientific Technology 2013, 47, 5939-5946.
- [144] Weese-Mayer D.E., Berry-Kravis E.M., Zhou L., Maher B.S., Curran M.E., Silvestri J.M., Marazita M.L. *Sudden infant death syndrome: case-control frequency differences at genes pertinent to early autonomic nervous system embryologic development*. Journal of Pediatric Researches 2004, 56, 391-395.
- [145] Maturri L., Lavezzi A.M. *Unexplained stillbirth versus SIDS: common congenital diseases of the autonomic nervous system—pathology and nosology*. Early Human Device 2011, 87, 209-215.
- [146] Capiello A., Famigliani G., Palma P., Termopoli V., Lavezzi A.M., Maturri L. *Determination of selected endocrine disrupting compounds in human fetal and newborn tissues by GC-MS*. Analytical Bioanalytical Chemistry 2014, 406, 2279-2288.
- [147] www.appa.provincia.tn.it
- [148] European Commission n. 839/2008
- [149] Law 31 - February 2, 2006 "Regulations for Diagnostic Post Mortem Investigation in victims of the Sudden Infant Death Syndrome (SIDS) and Unexpected Fetal Death" published on Gazzetta Ufficiale no. 34 -February 10, 2006.
- [150] Maturri L., Ottaviani G., Lavezzi A.M. *Techniques and criteria in pathologic and forensic-medical diagnostics in sudden unexpected infant and perinatal death*. American Journal of Clinic Pathology 2005, 124, 259-268.