



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI MESSINA

DIPARTIMENTO DI
SCIENZE CHIMICHE, BIOLOGICHE, FARMACEUTICHE ED AMBIENTALI

CORSO DI DOTTORATO IN "SCIENZE CHIMICHE"
DOCTOR OF PHILOSOPHY IN "CHEMICAL SCIENCES"

**Sviluppo di metodi analitici "green" e innovativi per
la caratterizzazione generale dei composti volatili e
per la determinazione di residui fitosanitari in
campioni alimentari e ambientali**

***Development of "green" and innovative analytical
methods for the general profiling of volatile
compounds and the determination of phytosanitary
residues in food and environmental samples***

Tesi di Dottorato di:
Antonio FERRACANE

Supervisore:
Chiar.mo Prof.
Peter Q. TRANCHIDA

Coordinatore:
Chiar.ma Prof.ssa
Concetta DE STEFANO

Indice

1. Scopo del lavoro di ricerca.....	1
1.1 Scope of the research project.....	5
2. Tecniche di estrazione, convenzionali, innovative e green.....	9
2.1 La preparazione del campione in campo alimentare e ambientale e i principi della <i>green chemistry</i>	10
2.2 Aspetti teorici della microestrazione in fase solida.....	16
2.2.1 <i>Solid phase microextraction</i>	23
2.2.2 <i>Fabric phase sorptive extraction</i>	27
2.2.3 <i>Capsule phase microextraction</i>	31
2.3 <i>Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe</i>	32
3. Cromatografia: aspetti teorici.....	38
3.1 Cenni storici e introduzione sulla cromatografia.....	39
3.2 Principi teorici della cromatografia su colonna.....	40
3.3 Gascromatografia bidimensionale <i>comprehensive</i>	43
3.3.1 I Modulatori: introduzione e aspetti teorici.....	50
3.3.1.1 Modulatori Termici.....	51
3.3.1.2 Modulatori a Flusso.....	55
3.4 I rivelatori, caratteristiche per l'accoppiamento con la GC×GC....	62
3.4.1 Rivelatore a ionizzazione di fiamma.....	64
3.4.2 Spettrometria di massa.....	65
3.4.2.1 Spettrometria di massa a singolo quadrupolo.....	67
3.4.2.2 Spettrometria di massa a triplo quadrupolo.....	69
3.5 Gascromatografia veloce.....	70
3.6 Cromatografia liquida ad alte prestazioni.....	82
3.6.1 Rivelatore spettrofotometrico a serie di diodi.....	87

4. Sezione sperimentale	93
4.1 Elucidazione del profilo volatile di campioni di whisky mediante microestrazione in fase solida <i>Arrow</i> e gascromatografia bidimensionale <i>comprehensive</i> accoppiata a spettrometria di massa	94
4.1.1 Introduzione.....	95
4.1.2 Parte sperimentale.....	96
4.1.3 Risultati e discussioni.....	99
4.1.4 Conclusioni.....	114
4.2 Analisi di prodotti fitosanitari in campioni alimentari e ambientali tramite gascromatografia accoppiata a spettrometria di massa	120
4.2.1 Determinazione multiresiduale in prodotti vegetali utilizzando un metodo QuEChERS a "scala ridotta" e gascromatografia bidimensionale <i>comprehensive</i> con modulatore a flusso accoppiata a spettrometria di massa a triplo quadrupolo	120
4.2.1.1 Introduzione.....	121
4.2.1.2 Parte sperimentale.....	123
4.2.1.3 Risultati e discussioni.....	129
4.2.1.4 Conclusioni.....	137
4.2.2 Uso della tecnica CPME con fase sol-gel ottadecilsilossano per il monitoraggio di pesticidi organofosforici in campioni di acqua ambientale	142
4.2.2.1 Introduzione.....	143
4.2.2.2 Parte sperimentale.....	145
4.2.2.3 Risultati e discussioni.....	149
4.2.2.4 Conclusioni.....	160
4.3 Analisi di prodotti fitosanitari in campioni alimentari e ambientali tramite cromatografia liquida ad alte prestazioni	165

4.3.1 MI-FPSE come dispositivo di estrazione per il monitoraggio di insetticidi a base di benzoilurea in campioni d'acqua mediante HPLC-DAD	166
4.3.1.1 Introduzione.....	167
4.3.1.2 Parte sperimentale.....	169
4.3.1.3 Risultati e discussioni.....	173
4.3.1.4 Conclusioni.....	185
4.3.2 Protocollo CPME accoppiato a HPLC-DAD per il monitoraggio di insetticidi a base di benzoilurea in campioni di succo di mela	189
4.3.2.1 Introduzione.....	190
4.3.2.2 Parte sperimentale.....	192
4.3.2.3 Risultati e discussioni.....	196
4.3.2.4 Conclusioni.....	205
4.4 Determinazione di acidi grassi in campioni di sangue umano e integratori alimentari tramite preparazione automatizzata del campione e GC-MS veloce	210
4.4.1 Introduzione.....	211
4.4.2 Parte sperimentale.....	213
4.4.3 Risultati e discussioni.....	217
4.4.4 Conclusioni.....	229

Tutte le figure e le tabelle sono state riprodotte con il permesso di Elsevier, Springer
e John Wiley and Sons

1 Scopo del lavoro di ricerca

L'obiettivo del mio lavoro di ricerca, presentato in questo lavoro di tesi di dottorato, è stato quello di sviluppare e validare metodiche analitiche rapide e *green* attraverso l'uso di tecniche cromatografiche avanzate e protocolli innovativi di preparazione del campione per lo studio di campioni alimentari, ambientali e biologici. Tali tecniche sono state usate per approfondire le conoscenze in merito alla composizione di alcuni alimenti di particolare interesse commerciale e per indagare l'eventuale presenza di contaminanti (residui di prodotti fitosanitari) presenti in campioni alimentari e ambientali. I prodotti fitosanitari vengono usati per distruggere o tenere sotto controllo qualsiasi organismo nocivo (tra cui microrganismi e piante infestanti), impedendo o prevenendo i danni che tali organismi possono causare nelle fasi di produzione, raccolta e commercializzazione dei prodotti alimentari. La persistenza dei prodotti fitosanitari negli alimenti dopo l'immissione in commercio può essere dannosa per il consumatore, inoltre un uso spropositato di tali prodotti può portare ad inquinamento dell'ecosistema e delle falde acquifere. Per tale motivo l'uso dei prodotti fitosanitari è strettamente regolamentato a diversi livelli da diverse direttive nazionali ed europee che ne indicano e limitano gli usi e ne pongono i limiti residuali sui prodotti posti in commercio [1].

Inoltre, è stata posta attenzione anche allo studio di integratori alimentari e campioni biologici (plasma e sangue) per lo studio della composizione in acidi grassi di queste matrici attraverso l'uso di tecniche automatizzate di preparazione del campione e di separazioni cromatografiche veloci.

Sono state studiate e impiegate tecniche quali: gascromatografia convenzionale e veloce accoppiata a spettrometria di massa (GC-MS); gascromatografia bidimensionale *comprehensive* con modulatore a flusso accoppiata a spettrometria di massa a triplo quadrupolo (FM GC×GC-QqQMS) e rivelatore a ionizzazione di fiamma (FID); cromatografia liquida ad alte prestazioni accoppiata a rivelatore spettrofotometrico a serie di diodi (HPLC-DAD).

Durante il corso del triennio particolare attenzione è stata posta allo sviluppo di metodi estrattivi e separativi in linea con le linee guida della *Green Analytical Chemistry* [2–4] che si pone diversi obiettivi, tra i quali l'eliminazione o la riduzione dell'uso di solventi organici nocivi sia per l'uomo che per l'ambiente, la riduzione dei

tempi di analisi, la miniaturizzazione dei processi estrattivi riducendo anche la quantità di campione usata, la robotizzazione della preparazione dei campioni. Tecniche convenzionali come l'estrazione liquido-liquido o liquido-solido fanno spesso uso di un'elevata quantità di campione e reattivi causando sia un dispendio economico sia un inquinamento da scarti di laboratorio. A tal proposito durante il triennio di dottorato sono state messe a punto diversi protocolli per l'estrazione di contaminanti in matrici ambientali e alimentari facendo ricorso a tecniche di microestrazione in fase solida (SPME) e tecniche miniaturizzate ed a scala ridotta.

Il dottorato ha previsto una collaborazione semestrale con il partner aziendale del progetto PON, Shimadzu Italia S.r.l. (Milano). Il periodo in azienda si è svolto sotto la supervisione del tutor aziendale Mattia Casanova, durante il quale sono state effettuate analisi attraverso l'applicazione di protocolli SPME nello spazio di testa (HS) e separazione tramite FM GC×GC-MS, per l'elucidazione della frazione volatile di campioni di salsa di pomodoro, pesto di basilico e miele. Inoltre, tali analisi avevano lo scopo di monitorare l'eventuale presenza di composti volatili vietati dalla normativa vigente attraverso una tecnica preparativa semplice e *solvent-free* ma al tempo stesso robusta. È interessante riportare come dalle analisi condotte sui campioni di miele è stata rilevata presenza di benzaldeide in alcuni di questi. La benzaldeide è un composto con forte odore di mandorle amare e viene usata in apicoltura per allontanare le api dal favo. La comunità europea ha più volte sconsigliato l'uso di benzaldeide nella produzione di miele.

Inoltre, ho trascorso un semestre presso la "Vienna University of Technology" (Vienna), partner europeo del progetto PON, sotto la supervisione del Prof. Erwin Rosenberg. Durante il semestre sono stati condotti studi su inquinanti in acque ambientali e succhi di frutta soffermandomi principalmente sull'ottimizzazione dei protocolli di estrazione attraverso tecniche di microestrazione in fase solida. Altri studi hanno riguardato l'uso della SPME *Arrow* accoppiata a GC×GC con modulatore criogenico e spettrometro di massa a singolo quadrupolo per l'esplorazione della frazione volatile di bevande alcoliche e non alcoliche.

Più nel dettaglio, vengono riportate le applicazioni per quanto riguarda la sfera degli inquinanti.

È stato sviluppato un protocollo QuEChERS a scala ridotta per il monitoraggio di 88 residui di prodotti fitosanitari in cetrioli, pomodori, lattuga iceberg e peperoni rossi. Le separazioni cromatografiche sono state condotte tramite FM GC×GC-QqQMS. Lo scopo della ricerca è stato quello di dimostrare la possibilità di utilizzo dei modulatori a flusso per analisi di composti in tracce [5].

È stato applicato il metodo *capsule phase microextraction* (CPME) per l'estrazione e la preconcentrazione di pesticidi organofosforici (OPP) da campioni di acqua ambientale usando l'assorbente monolitico sol-gel ottadecil silossano (sol-gel C₁₈) incapsulato all'interno di capsule porose di polipropilene. L'identificazione è stata condotta attraverso l'uso di un GC-MS. Il metodo è stato ottimizzato per garantire un'elevata sensibilità ed è stato completamente validato [6].

Sono stati ottimizzati e validati due protocolli di estrazione di prodotti fitosanitari a base di benzoilurea, in acque ambientali (fiume, lago, stagno, rubinetto) e succhi di mela. Vista la natura polare dei composti presi in esame la determinazione è stata effettuata attraverso l'uso di un HPLC-DAD. Le estrazioni sono state condotte attraverso due diverse tecniche, *magnet-integrated fabric phase sorptive extraction* (MI-FPSE) per i campioni di acqua, mentre i succhi di mela sono stati sottoposti ad estrazione tramite CPME. Entrambi i protocolli hanno consentito di ottenere elevati fattori di preconcentramento degli analiti dal campione di partenza, permettendo di ottenere buoni risultati in termini di limiti di rilevabilità [7,8].

In merito ad analisi di tipo *untargeted*, attraverso l'utilizzo della fibra SPME Arrow è stata ottenuta l'estrazione dei composti volatili, importanti per le caratteristiche organolettiche di diversi whisky, la cui determinazione è stata eseguita mediante gascromatografia bidimensionale *comprehensive* con modulatore criogenico (CM-GC×GC) accoppiata alla spettrometria di massa. Dopo l'ottimizzazione, il metodo è stato usato per l'analisi di whisky irlandese, whisky scozzese *single malt* e whisky scozzese *blended*. L'uso della fibra SPME Arrow combinata con GC×GC-MS si è dimostrato un potente strumento analitico per l'esplorazione del profilo volatile di campioni complessi, consentendo di identificare differenze in importanti composti aromatici per i tre diversi tipi di whisky studiati [9].

Inoltre, mi sono dedicato all'ottimizzazione di una preparazione automatizzata del campione e di un metodo rapido di gascromatografia accoppiato a spettrometria di massa (GC-MS) per l'analisi degli esteri metilici degli acidi grassi (FAME) in campioni di sangue e integratori alimentari, con l'obiettivo primario di riduzione del tempo di analisi. La separazione dei FAME è stata ottenuta in circa 11 minuti utilizzando una colonna a *microbore* di dimensioni $15\text{ m} \times 0,10\text{ mm ID} \times 0,10\text{ }\mu\text{m } d_f$ con una fase stazionaria di polietilenglicole. La novità della ricerca consiste nel ridurre i tempi di analisi utilizzando il metodo GC-MS veloce con maggiore affidabilità e sensibilità di identificazione. L'accuratezza del metodo è stata valutata analizzando materiali di riferimento certificati [10].

1.1 Scope of the research project

The objective of the research work, presented in this Ph.D. thesis, was the development of fast and “green” analytical methods using advanced chromatographic techniques and innovative sample preparation protocols for the study of food, environmental and biological samples. These techniques have been used to deepen the knowledge regarding the composition of some foods and to investigate the possible presence of contaminants (residues of plant protection products) present in food and environmental samples. Plant protection products are used to destroy or control any harmful organism and preventing the damage that these organisms can cause in the production. The persistence of plant protection products in foods after they have been placed on the market can be harmful to the consumer, and an excessive use of these products can lead to pollution of the ecosystem and groundwater. For this reason, the use of plant protection products is strictly regulated at various levels by various national and European directives which indicate and limit their uses and place residual limits on the products placed on the market.

Different techniques have been studied and employed, such as: conventional and fast gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS); two-dimensional comprehensive gas chromatography coupled to triple quadrupole mass spectrometry (FM GC×GC-QqQMS) and flame ionization detector (FID); high performance liquid chromatography coupled to diode array spectrophotometric detector (HPLC-DAD).

Particular attention was paid to the development of extraction and separation methods following the guidelines of Green Analytical Chemistry which has various objectives, including elimination or reduction of the use of organic solvents (harmful to both humans and the environment), reduction of analysis times, miniaturization of extraction processes also reducing the amount of sample used, robotization of sample preparation. Conventional techniques such as liquid-liquid or liquid-solid extraction often make use of large quantities of sample and reagents causing both economic expenditure and laboratory waste pollution. In this regard, during the PhD course, various protocols were developed for the extraction of contaminants in environmental and food matrices using solid phase microextraction techniques (SPME) and miniaturized and scaled techniques.

The PhD has foreseen a six-monthly collaboration with the corporate partner of the PON project, Shimadzu Italia S.r.l. (Milan). The period in the company took place under the supervision of the company tutor Mattia Casanova, during which analyzes were carried out through the application of head space SPME protocols and separation using FM GC×GC-MS, for the elucidation of the volatile fraction of tomato sauce, basil pesto and honey samples. Furthermore, these analyzes had the purpose of monitoring the possible presence of volatile compounds prohibited by current legislation through a simple and solvent-free but at the same time robust preparation technique. It is interesting to report how from the analyzes conducted on the honey samples the presence of benzaldehyde was found in some of these. Benzaldehyde is a compound with a strong smell of bitter almonds and is used in beekeeping to keep the bees away from the comb. The European community has repeatedly advised against the use of benzaldehyde in the production of honey.

Furthermore, I spent a semester at the “Vienna University of Technology” (Vienna), European partner of the PON project, under the supervision of Prof. Erwin Rosenberg. During the semester, studies were conducted on pollutants in environmental waters and fruit juices, focusing mainly on the optimization of extraction protocols through solid phase microextraction techniques. Other studies involved the use of the SPME Arrow coupled to a GC×GC equipped with a cryogenic modulator and single quadrupole mass spectrometer for the exploration of the volatile fraction of alcoholic and non-alcoholic beverages.

More in detail, the applications regarding the sphere of pollutants are reported.

A reduced scale QuEChERS protocol was developed for monitoring 88 plant protection product residues in cucumbers, tomatoes, iceberg lettuce and red peppers. The chromatographic separations were carried out by the use of a FM GC×GC-QqQMS. The aim of the research was to demonstrate the possibility of using flow modulators for the analysis of trace compounds [5].

The capsule phase microextraction (CPME) method was applied for the extraction and preconcentration of organophosphorus pesticides (OPPs) from environmental water samples using monolithic sol-gel octadecyl siloxane (sol-gel C₁₈) absorbent encapsulated within porous polypropylene capsules. Identification was

conducted through the use of a GC-MS system. The method has been optimized to ensure high sensitivity [6].

Two extraction protocols of benzoylurea-based plant protection products were optimized and validated in environmental waters (river, lake, pond, tap) and apple juices. Given the polar nature of the compounds examined, the determination was carried out through the use of an HPLC-DAD system. The extractions were conducted through two different techniques, magnet-integrated fabric phase sorptive extraction (MI-FPSE) for water samples, while the apple juices were subjected to extraction by CPME. Both protocols allowed to obtain high preconcentration factors of the analytes from the starting sample [7,8].

With regard to untargeted analyses, the extraction of volatile organic compounds of various whiskies was obtained through the use of the SPME Arrow fiber. The analytes separation and determination were performed by the use of two-dimensional comprehensive gas chromatography equipped with a cryogenic modulator (CM GC×GC) coupled to mass spectrometry. After optimization, the method was used for the analysis of Irish whisky, single malt Scotch whiskey and blended Scotch whisky. The use of SPME Arrow fiber combined with GC×GC-MS has proven to be a powerful analytical tool for the exploration of the volatile profile of complex samples, allowing to identify differences in important flavor compounds for the three different whiskeys studied [9].

Additionally, I was involved in the optimization of an automated sample preparation and fast gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) method for the analysis of fatty acid methyl esters (FAMES) in human blood and dietary supplement samples. FAME separation was achieved in approximately 11 minutes using a 15 m × 0.10 mm ID × 0.10 μm d_f microbore column with a polyethylene glycol stationary phase. The novelty of the research consists in reducing the analysis times by using the fast GC-MS method with greater reliability and identification sensitivity. The accuracy of the method was evaluated by analyzing certified reference materials [10].

Riferimenti bibliografici:

- [1] I Atti adottati a norma dei trattati CE/Euratom la cui pubblicazione è obbligatoria. <http://www.efsa.europa.eu>.
- [2] S. Armenta, S. Garrigues, M. de la Guardia, *Green Analytical Chemistry*, *TrAC Trends in Anal. Chem.* 27 (2008) 497–511. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2008.05.003>.
- [3] M. Tobiszewski, Introduction to Green Analytical Chemistry, in: *Handbook of Green Chemistry*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany, 2018: pp. 103–116. <https://doi.org/10.1002/9783527628698.hgc117>.
- [4] A. Gałuszka, Z. Migaszewski, J. Namieśnik, The 12 principles of green analytical chemistry and the SIGNIFICANCE mnemonic of green analytical practices, *TrAC Trends in Anal. Chem.* 50 (2013) 78–84. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2013.04.010>.
- [5] A. Ferracane, M. Zoccali, F. Cacciola, T.M.G. Salerno, P.Q. Tranchida, L. Mondello, Determination of multi-pesticide residues in vegetable products using a “reduced-scale” QuEChERS method and flow-modulated comprehensive two-dimensional gas chromatography-triple quadrupole mass spectrometry, *J Chromatogr A.* 1645 (2021) 462126. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2021.462126>.
- [6] N. Manousi, A. Ferracane, A. Kabir, K.G. Furton, P.Q. Tranchida, G.A. Zachariadis, J. Płotka-Wasyłka, L. Mondello, V.F. Samanidou, E. Rosenberg, Green capsule phase microextraction employing hydrophobic monolithic sol-gel octadecyl siloxane platforms for the monitoring of organophosphorus pesticides in environmental water samples, *Sustain Chem Pharm.* 30 (2022) 100892. <https://doi.org/10.1016/j.scp.2022.100892>.
- [7] N. Manousi, A. Ferracane, A. Kabir, K.G. Furton, P.Q. Tranchida, G.A. Zachariadis, L. Mondello, V.F. Samanidou, E. Rosenberg, A monolithic capsule phase microextraction method combined with HPLC-DAD for the monitoring of benzoyl urea insecticides in apple juice samples, *Microchemical J.* 181 (2022) 107768. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2022.107768>.
- [8] N. Manousi, V. Alampanos, A. Ferracane, G. Efstratiadis, A. Kabir, K.G. Furton, P.Q. Tranchida, G.A. Zachariadis, L. Mondello, E. Rosenberg, V.F. Samanidou, Magnet integrated fabric phase sorptive extraction as a stand-alone extraction device for the monitoring of benzoyl urea insecticides in water samples by HPLC-DAD, *J Chromatogr A.* 1672 (2022) 463026. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2022.463026>.
- [9] A. Ferracane, N. Manousi, P.Q. Tranchida, G.A. Zachariadis, L. Mondello, E. Rosenberg, Exploring the volatile profile of whiskey samples using solid-phase microextraction Arrow and comprehensive two-dimensional gas chromatography-mass spectrometry, *J Chromatogr A.* 1676 (2022) 463241. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2022.463241>.
- [10] A. Ferracane, I. Aloisi, M. Galletta, M. Zoccali, P.Q. Tranchida, G. Micalizzi, L. Mondello, Automated sample preparation and fast GC–MS determination of fatty acids in blood samples and dietary supplements, *Anal Bioanal Chem.* (2022). <https://doi.org/10.1007/s00216-022-04379-8>.

Capitolo 2.
**Tecniche di estrazione,
convenzionali, innovative e *green***

2.1 La preparazione del campione in campo alimentare e ambientale e i principi della *green chemistry*

Uno dei punti cardine per la riuscita di una buona analisi chimica è la preparazione del campione. La preparazione del campione, sia che si tratti di una semplice diluizione che di processi come estrazione e purificazione dei campioni, è una fase fondamentale e molto importante dell'analisi chimica in quanto molti dei campioni presenti in natura non possono essere direttamente analizzati. La preparazione del campione che probabilmente è la fase più impegnativa e dispendiosa in termini di tempo va quindi valutata di volta in volta in base alla natura chimica del campione stesso, agli analiti che si vogliono estrarre ed analizzare ed alla tecnica separativa che intendiamo utilizzare. La raccolta di un campione rappresentativo è generalmente seguita da una serie di operazioni che spesso includono filtrazione, centrifugazione, precipitazione delle proteine, estrazione dell'analita, eluizione in solvente organico, evaporazione del solvente e ricostituzione del campione. Molti di questi passaggi vengono eseguiti manualmente, il che alla fine prolunga il tempo complessivo di analisi.

Il seguente capitolo, dopo una trattazione generale delle tecniche di preparazione del campione principalmente utilizzate in ambito ambientale e alimentare, prenderà in esame le singole metodiche che sono state utilizzate nel corso dei tre anni di dottorato sia per le analisi di tipo non mirato della frazione volatile in campioni di particolare interesse alimentare, sia per le analisi mirate di contaminanti in campioni alimentari e ambientali.

L'importanza di una tecnica efficiente di preparazione del campione diventa maggiormente rilevante quando si tratta di effettuare analisi di analiti presenti in tracce e dispersi in matrici complesse, ad esempio come nel caso dei contaminanti in campioni ambientali, alimentari e biologici. Per diversi motivi, questi campioni non sono generalmente adatti per l'iniezione e l'analisi diretta, in quanto: i costituenti chimici della matrice possono esercitare un effetto negativo sulle prestazioni dello strumento analitico o possono interferire con l'analisi degli analiti target; la concentrazione degli analiti target nella matrice del campione può essere inferiore al limite di rilevabilità della strumentazione analitica utilizzata; la matrice del campione potrebbe essere incompatibile con la strumentazione analitica. Tra gli obiettivi

principali della preparazione del campione c'è quello di isolare e concentrare gli analiti target dalla matrice del campione, cercando di ridurre l'interferenza della matrice in modo che la soluzione di analiti risulti più pulita da un punto di vista chimico e possa essere utilizzata per la separazione, l'identificazione e quantificazione [1]. Isolamento e preconcentrazione degli analiti target sono quindi aspetti importanti in molti metodi analitici per migliorarne la selettività e la sensibilità.

Tra le tecniche esaurienti di preparazione del campione ritroviamo l'estrazione liquido-liquido (LLE) e l'estrazione in fase solida (SPE) che pur rientrando tra le tecniche convenzionali e classiche ricadono ancora oggi tra le scelte principali per la preparazione di campioni analitici. Queste tecniche generalmente utilizzano un grande volume di solventi organici tossici e pericolosi per l'uomo e l'ambiente, spesso comportano diversi step con l'aumento di possibili errori. A tal proposito, si rendono necessarie procedure a basso costo, rapide ed ecocompatibili per migliorare la qualità della vita e proteggere l'ambiente. Inoltre, l'uso di grandi volumi di solvente organico è in contrasto con le linee guida della *Green Analytical Chemistry* (GAC) che saranno discusse alla fine di questo paragrafo [2,3].

Una svolta nella preparazione dei campioni si ha nel 1987 quando Pawliszyn *et al.* [4] introdussero l'uso della microestrazione in fase solida (SPME), una tecnica di estrazione in cui l'uso dei solventi organici è minimizzato o completamente assente e in cui le fasi assorbenti sono riutilizzabili virtualmente per un numero infinito di analisi. Grazie alla SPME alcuni dei problemi delle tecniche LLE e SPE sono stati mitigati. L'SPME ha guadagnato in breve tempo un'enorme popolarità in diversi campi di applicazione, dovuta ai sostanziali vantaggi rispetto alle tecniche convenzionali di preparazione dei campioni. La sensibilità della tecnica SPME ha portato poi negli anni allo sviluppo di diverse tecniche di microestrazione che presentano una maggiore capacità di assorbimento, tra cui SPME *in-tube* [5], *stir bar sorptive extraction* (SBSE) [6] e *thin-film microextraction* (TFME) [7] proposto da Pawliszyn per migliorare l'efficienza di estrazione della fibra SPME convenzionale. In linea di principio, la microestrazione può essere definita come un metodo in cui l'estrattore (che può essere liquido o solido) ha un volume sostanzialmente inferiore (tipicamente <100 μL o <100 mg) rispetto al campione (>1 mL nelle tecniche non miniaturizzate); in quanto tale la frazione estratta dell'analita è spesso non esaustiva.

Le tecniche di microestrazione sono al centro di un'intensa ricerca che ha portato anche all'automatizzazione, la miniaturizzazione e la semplificazione dei metodi preparativi. Le tecniche di microestrazione sono ad oggi una realtà nei laboratori di ricerca nonché per le analisi di routine, sia per le analisi di tipo *target* che *untarget*.

Oltre alle tecniche SPME e affini, per la preparazione del campione nelle analisi in campo ambientale e alimentare nel corso dell'ultimo decennio si è sempre più utilizzata la tecnica QuEChERS (acronimo di: *quick, easy, cheap, effective, rugged, and safe*), presentata per la prima volta al 4° EPRW (*European Pesticide Residue Workshop*) nel 2002 da Anastassiades e Lehotay. Tale tecnica prevede due passaggi di preparazione del campione, uno di estrazione e uno di *clean-up*, prima dell'analisi attraverso tecniche cromatografiche. La tecnica QuEChERS, nata per l'analisi di prodotti fitosanitari in campioni alimentari, ha visto un ampio sviluppo e centinaia di metodi sono stati sviluppati per analisi di composti *target* in campo ambientale e alimentare.

Nel corso degli ultimi decenni i ricercatori si sono posti anche il problema relativo a quanto siano inquinanti i metodi analitici proposti. A tal proposito le tecniche di microestrazione e miniaturizzazione possono essere un punto di partenza per la salvaguardia ambientale e degli operatori dal rischio chimico e microbiologico. Un altro importante aspetto è quello legato ad approvvigionamento di solventi, reattivi e gas con costi sempre maggiori per gli utilizzatori. Per tale ragione lo sviluppo di metodologie *green* ad oggi è sempre più importante, ricercata e favorita. La chimica analitica verde (*Green Analytical Chemistry*) si concentra sulla creazione procedure analitiche più rispettose dell'ambiente e più sicure umani.

Lo sviluppo di metodi più *eco-friendly* è stato anche oggetto di diverse ricerche, le quali hanno contribuito allo sviluppo nel 2013 dei 12 principi della *Green Analytical Chemistry*[2]. L'obiettivo principale della *Green Analytical Chemistry* (GAC) è ridurre al minimo o eliminare l'uso di sostanze tossiche o la generazione di rifiuti, ridurre il fabbisogno energetico e il numero di fasi procedurali; impiegare metodi di screening per una semplice misurazione qualitativa (presenza/assenza) progettata per evitare l'elaborazione di un gran numero di campioni necessari per l'analisi quantitativa completa.

La GAC promuove gli sviluppi dell'uso di strumentazione in loco, campionamento in loco, nuovi approcci per eliminare o ridurre l'uso di solventi organici e reagenti tossici dalle procedure analitiche, la miniaturizzazione e l'automazione. Oltre allo sviluppo della strumentazione e delle metodologie, necessarie per migliorare la qualità delle analisi chimiche, si stanno compiendo sforzi per ridurre l'impatto negativo delle analisi chimiche sull'ambiente e per consentire l'attuazione dei principi di sviluppo sostenibile nei laboratori di analisi. In questo contesto, il GAC dovrebbe essere riconosciuto come uno stimolante per il progresso della chimica analitica. La sfida più importante per il futuro di questa disciplina è il raggiungimento di un compromesso tra la crescente qualità dei risultati richiesti e il miglioramento della compatibilità ambientale dei metodi analitici[2].

I 12 principi della GAC sono i seguenti: devono essere applicate tecniche analitiche dirette per evitare il trattamento del campione; usare la quantità minima di campione e il numero minimo di campioni; devono essere eseguite misurazioni in situ; l'integrazione dei processi e delle operazioni analitiche consente di risparmiare energia e ridurre l'uso di reagenti; dovrebbero essere selezionati metodi automatizzati e miniaturizzati; la derivatizzazione dovrebbe essere evitata; dovrebbe essere evitata la generazione di un grande volume di rifiuti analitici e dovrebbe essere fornita una gestione adeguata dei rifiuti analitici; i metodi multianalita o multiparametro sono preferiti rispetto ai metodi che utilizzano un analita alla volta; l'uso di energia dovrebbe essere ridotto al minimo; dovrebbero essere preferiti i reagenti ottenuti da fonte rinnovabile; i reagenti tossici devono essere eliminati o sostituiti; la sicurezza dell'operatore dovrebbe essere aumentata [2]. Seguendo le linee guida su menzionate, sono stati sviluppati dei software in che permettono di misurare il grado di ecocompatibilità dei metodi, tenendo conto di criteri chiave come la tossicità dei reagenti, la produzione di rifiuti, il consumo di energia e la sicurezza degli utenti. A tal proposito possono essere anche utilizzati per una pratica e veloce comparazione del grado di ecocompatibilità tra diversi metodi. Uno dei software maggiormente utilizzati è AGREE (*Analytical GREENness Metric Approach and Software*) il quale usando un criterio 0-1 (insoddisfatto-soddisfatto) permette di calcolare il grado di misurare il grado di accettabilità per ognuno dei 12 principi della GAC. Infine, il software riporta un grafico come quello presente in figura 1 dove è possibile vedere i singoli risultati e

la media tra di essi. Una scala cromatica dal verde al rosso permette una più facile individuazione di quali parametri rispettano i principi della GAC e quali invece non rispecchiano le linee guida [8].



Figura 1. Risultato generico della valutazione attraverso il software AGREE e relativa scala cromatica di riferimento.

Un altro software utilizzato è il *ComplexGAPI* (*Complementary green analytical procedure index and software*), inizialmente nato come GAPI è stato successivamente modificato e integrato di nuove funzioni nel 2021 da Justyna Płotka-Wasyłka e Wojciech Wojnowski [9,10]. Il GAPI utilizza un pittogramma per classificare ogni passaggio di una metodologia analitica, applicando una scala cromatica, con due o tre livelli di valutazione per ciascuno passaggio. I reagenti, le procedure e la strumentazione sono pertanto valutato singolarmente prendendo in considerazione molti fattori, tra cui la salute da rischio chimico e il rischio ambientale, la quantità e il tipo di rifiuti, e il fabbisogno energetico. Di contro si può affermare che il software GAPI evidentemente indica i punti più deboli nelle procedure analitiche. Tuttavia, questo approccio ha alcune carenze in quanto non prende in considerazione (come anche il software AGREE) che al giorno d'oggi, vengono prodotti nuovi solventi, assorbenti, reagenti, colonne, ecc, per migliorare non solo l'efficienza ma anche le caratteristiche *green* di una procedura analitica. Questi aspetti, ovvero produzione/sintesi di nuovi reagenti specifici, solventi o altri materiali prima della preparazione del campione e dell'analisi finale devono essere comunque valutati per poter avere un quadro chiaro e soddisfacente della procedura proposta. A tal proposito, è stato proposto il nuovo indice di valutazione *ComplexGAPI*, uno strumento che integra la metrica GAPI esistente con un campo esagonale che riflette i processi eseguiti prima della fase di preparazione del campione e analisi finale.

Gli schemi che spiegano le strutture del GAPI e del ComplexGAPI sono riportati rispettivamente in Figura 2 e 3.

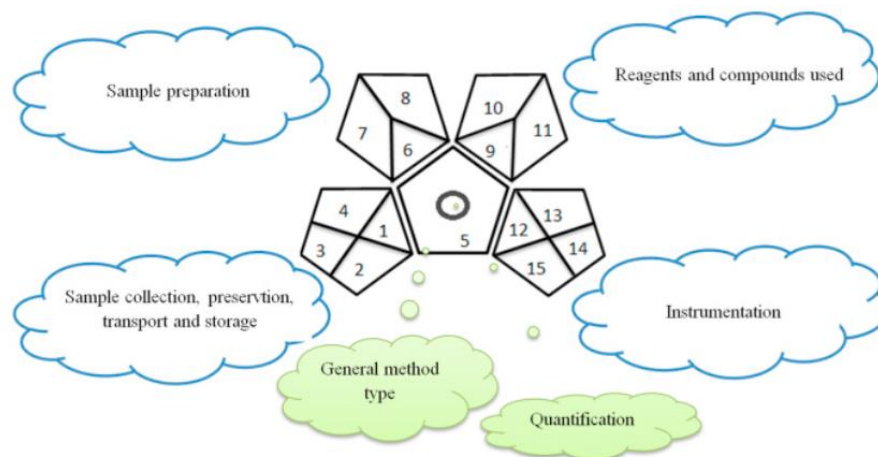


Figura 2. Rappresentazione schematica del pittogramma GAPI con descrizione dei pentagoni

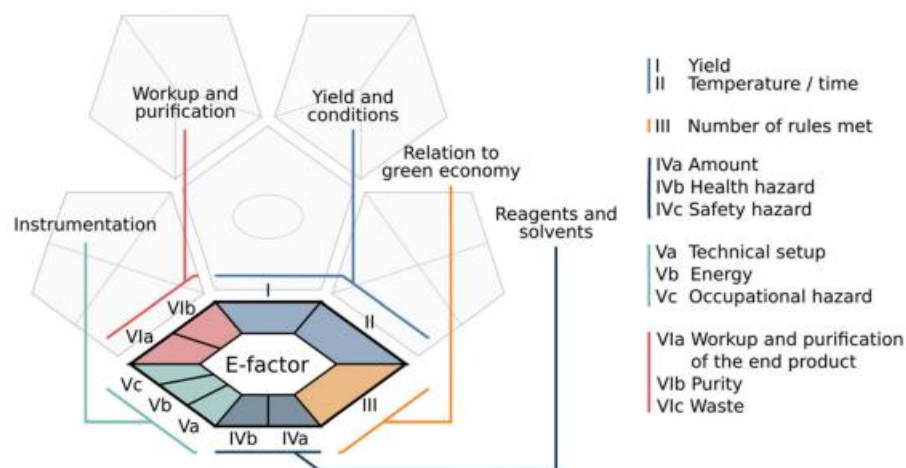


Figura 3. Rappresentazione schematica del pittogramma ComplexGAPI, con evidenziati i campi dell'esagono raggruppati e codificati a colori.

Ciò che è molto importante è che tramite questi pittogrammi grazie ad una rapida occhiata è possibile effettuare il confronto di diversi metodi e facilmente selezionare il metodo più ecologico per un determinato studio.

2.2 Aspetti teorici della microestrazione in fase solida

La microestrazione in fase solida (SPME) è uno strumento di preparazione del campione versatile e non esaustivo che ha dimostrato di essere adatto per un'analisi facile ed efficace di un'ampia gamma di composti in una moltitudine di studi e diversi campi di applicazione tra cui: analisi delle sostanze volatili di campioni alimentari, analisi in vivo di inquinanti, analisi in loco dei suoli, analisi di campioni d'acqua, studi di metabolomica in vitro e in vivo, analisi farmaceutica e biomedica.

Le proprietà termodinamiche determinano la quantità massima di analita che può essere estratta per unità di massa assorbente in determinate condizioni di estrazione. La cinetica controlla la velocità di estrazione e quindi il tempo necessario per raggiungere l'equilibrio di estrazione. Lo sviluppo di nuove tecniche di microestrazione mira a soddisfare sia la crescente richiesta in maggiore sensibilità (che si può ottenere aumentando la quantità di materiale assorbente), sia a trovare soluzioni che riducano il tempo di preparazione del campione. Un problema di cui sono interessati diversi sistemi di microestrazione attualmente in commercio è la tecnologia di rivestimento utilizzata per immobilizzare il materiale assorbente/adsorbente sulla superficie del substrato, un ulteriore problema è legato al formato fisico del sistema di estrazione che determina la superficie di contatto primaria (PCSA) del dispositivo e di conseguenza la cinetica di estrazione. La PCSA è definita come l'area superficiale del mezzo di estrazione a cui è possibile accedere direttamente dalla matrice del campione durante il processo di estrazione stesso. Quindi per ottenere una tecnica di preparazione del campione che sia altamente sensibile e veloce, sia la tecnologia di rivestimento che la PCSA devono essere adeguatamente ottimizzate. Sebbene siano stati compiuti enormi sforzi per aumentare la sensibilità dei sistemi di microestrazione, semplicemente aumentando il carico di assorbente/adsorbente sullo stesso substrato (fibra di silice fusa/tubo di vetro) come nel caso delle fibre SPME *Arrow*, a livello commerciale è stato fatto poco per aumentare la superficie di contatto primaria (PCSA) del dispositivo di estrazione. Una delle tecniche che ha permesso l'aumento della PCSA è la *fabric phase sorptive extraction* (FPSE) introdotta nel 2014 da Kabir e Furton e presentata come tecnica altamente efficiente ed ecologica [1]. Rispetto ad una fibra SPME, la quantità di materiale adsorbente nei media FPSE è di circa 400 volte

maggiore. La tecnica verrà discussa più dettagliatamente, come anche le tecniche SPME (convenzionale e *Arrow*) e CPME, nei successivi paragrafi di questo capitolo.

Il principio di funzionamento delle tecniche di microestrazione in fase solida è basato sull'equilibrio [7] e sulle interazioni tra gli analiti e il materiale di estrazione. Il principio di funzionamento è riportato nell'equazione 1.

$$n = \frac{K_{es} * V_e * V_s * C_0}{K_{es} * V_e + V_s} \quad \text{Equazione 1}$$

L'equazione riporta le condizioni di equilibrio in cui la quantità di analita estratto (n) dal mezzo utilizzato è proporzionale al coefficiente di ripartizione tra la fase di estrazione e la matrice del campione (K_{es}), il volume della fase di estrazione (V_e), il volume del campione (V_s) e la concentrazione originale dell'analita (C_0). L'equazione suggerisce che la quantità dell'analita estratto è direttamente proporzionale al volume del materiale di estrazione e quindi può essere aumentata incrementando il volume del materiale di estrazione. Tuttavia, secondo la teoria cinetica dell'estrazione, l'incremento del volume del materiale di estrazione tramite aumento dello spessore del rivestimento può comportare un lungo tempo di equilibrio dell'estrazione stessa.

$$te_{,95\%} = \frac{B * d * b * K_{es}}{D_s} \quad \text{Equazione 2}$$

Quando il materiale di estrazione viene disperso come una sottile pellicola sul substrato, la diffusione degli analiti attraverso lo strato limite controlla la cinetica di estrazione (velocità di estrazione). Pertanto, il tempo necessario per estrarre il 95% della quantità degli analiti che normalmente si raggiunge all'equilibrio, $te_{,95\%}$, può essere calcolato come riportato nell'equazione 2, dove b è lo spessore del sorbente di estrazione, d è lo spessore dello strato limite, K_{es} è la costante di distribuzione dell'analita tra il materiale di estrazione e la matrice del campione, D_s è il coefficiente di diffusione dell'analita nella matrice del campione e B è un fattore geometrico riferito alla geometria su cui è rivestito il materiale di estrazione. Il tempo di estrazione dell'equilibrio può essere ridotto riducendo lo spessore del rivestimento (b),

aumentando la superficie di contatto primaria del mezzo di estrazione (B) o aumentando la diffusione dell'analita nel campione matrice applicando stimoli esterni, ad esempio agitazione, sonicazione, agitazione, ecc.

La velocità di estrazione nelle tecniche di microestrazione non è lineare, è molto veloce all'inizio del processo di estrazione e rallenta man mano che l'estrazione procede verso l'equilibrio. La velocità iniziale di estrazione (dn/dt) è proporzionale alla superficie della fase di estrazione (A). Pertanto, è ovvio che per aumentare la sensibilità del sistema, è necessario aumentare la quantità del sorbente. D'altra parte, per ridurre il tempo di equilibrio di estrazione, è necessario aumentare la superficie del dispositivo di estrazione come si evince dall'equazione 3.

$$\frac{Dn}{Dt} = \frac{D_s * A}{d} * C_0 \quad \text{Equazione 3}$$

Per un'esaustiva descrizione quantitativa dei processi di microestrazione, altri due parametri sono essenziali e devono essere introdotti: l'efficienza di estrazione del metodo, ovvero il recupero (R, *recovery*) e il fattore di arricchimento (E). Il parametro R% è descritto dall'equazione 4:

$$R(\%) = \frac{K_{es}}{K_{es} + \varphi - 1} * 100 \quad \text{Equazione 4}$$

Dove φ rappresenta il rapporto tra il volume del materiale adsorbente e il volume del campione. Il parametro E rappresenta il rapporto tra R e φ . Come evidenziato dalle precedenti equazioni, il parametro R dipende non solo dal coefficiente di partizione di un analita ma anche dal rapporto di fase. Sebbene bassi valori di R non siano un problema, grazie all'avvento di rivelatori altamente sensibili, è possibile migliorarli ulteriormente aumentando il volume del rivestimento assorbente (aumento φ) o mediante l'impiego di prodotti chimici di rivestimento ad alto coefficiente di ripartizione (K_{es}). Se il recupero dell'analita è ancora insufficiente per il rivelatore scelto, o nei casi in cui l'obiettivo è estrarre in modo esaustivo gli analiti di interesse, possono essere eseguite anche estrazioni multiple dello stesso campione [11,12].

La microestrazione può essere inoltre utilizzata per le analisi dello spazio di testa (HS-SPME), in questo caso ci sono ulteriori parametri che devono essere considerati. Nella HS-SPME durante l'estrazione si verrà a creare un equilibrio tra il campione, lo spazio di testa e il materiale adsorbente. Tenendo in considerazione la legge di conservazione di massa, si avrà che la massa totale degli analiti deve restare costante e che il bilancio di massa alla condizione di equilibrio è dettato dall'equazione 5.

$$C_0V_s = C_f^\infty V_f + C_h^\infty V_h + C_s^\infty V_s \quad \text{Equazione 5}$$

dove $C_0, C_f^\infty, C_h^\infty, C_s^\infty$ rappresentano le concentrazioni degli analiti nel campione iniziale e all'equilibrio nel rivestimento, nello spazio di testa e nel campione; V_f, V_h, V_s rappresentano rispettivamente i volumi del rivestimento, dello spazio di testa e del campione.

Il principio termodinamico comune a tutte le tecniche di estrazione chimica prevede la distribuzione dell'analita tra la matrice del campione e la fase di estrazione. Nelle analisi HS-SPME vanno anche considerate le costanti di distribuzione che saranno due, una tra il materiale assorbente e lo spazio di testa (equazione 6); la seconda tra lo spazio di testa e il campione.

$$K_{fh} = C_f^\infty / C_h^\infty \quad \text{Equazione 6}$$

Nel caso delle analisi HS-SPME n (numero di moli di analita) può essere espresso dall'espressione 7:

$$n = \frac{K_{fh}V_f C_0 V_s}{K_{fs}V_f + K_{hs}V_h + V_s} \quad \text{Equazione 7}$$

Quest'ultima equazione indica che esiste una relazione proporzionale tra la concentrazione del campione e la quantità di analita estratta sul rivestimento (n), che è la base per la quantificazione dell'analita quando si usano le tecniche SPME.

Da un punto di vista sperimentale, diversi fattori possono influenzare l'efficienza di estrazione e devono essere quindi ottimizzati per ottenere la massima efficienza.

I principi termodinamici consentono di valutare gli effetti dei parametri di estrazione sul coefficiente di partizione. Queste condizioni di estrazione possono essere ottimizzate utilizzando un numero minimo di esperimenti. In particolare, i parametri che possono influenzare la K_{fs} degli analiti sono: temperatura di estrazione, metodi di agitazione, pH, forza ionica e presenza di solvente organico.

L'effetto della temperatura è descritto nell'equazione 8.

$$K_{fs} = K_0 \exp\left[-\frac{\Delta H}{R}\left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_0}\right)\right] \text{ Equazione 8}$$

dove, K_0 è la costante di distribuzione quando sia la fibra che il campione sono a temperatura T_0 , ΔH è la variazione molare dell'entalpia dell'analita quando passa dal campione al rivestimento della fibra e R è la costante dei gas. Quando il valore K_{fs} per un analita è maggiore di 1, l'analita ha un'energia potenziale inferiore nel rivestimento della fibra rispetto al campione e la partizione dell'analita nella fibra deve essere un processo esotermico con ΔH inferiore a 0. Ciò significa che aumentando la temperatura la costante di distribuzione dell'analita diminuisce. Per questo durante lo studio dei parametri che possono influenzare il processo di estrazione la temperatura è un parametro molto importante da ottimizzare. D'altra parte, un aumento della temperatura durante l'estrazione migliora la diffusione dell'analita verso il rivestimento della fibra e nella modalità di estrazione HS-SPME la temperatura aiuta a trasferire gli analiti nello spazio di testa. Per risolvere il problema della riduzione della costante di distribuzione durante un aumento della temperatura, il rivestimento può essere raffreddato contemporaneamente al riscaldamento del campione come sviluppato da Pawliszyn nel 2007 [13].

La quantità di analiti estratti con tecniche di microestrazione ci si aspetta che aumenti all'aumentare del volume di campione, effettivamente questa condizione si verifica fino ad un certo punto in cui non c'è più un incremento di analiti estratti (ovvero fin quando il sistema di estrazione non è praticamente saturo ed incapace di legare altri analiti). Stessa condizione si avrà per il tempo di estrazione, con il

raggiungimento di un *plateau* oltre il quale non si avrà un ulteriore aumento di estrazione. La diffusione degli analiti tra la matrice e il materiale di estrazione può essere aumentata anche attraverso sonicazione del campione e agitazione. Nel caso dell'agitazione è possibile che dopo aver raggiunto un *plateau* continuando a condurre esperimenti a velocità superiori si abbia addirittura un decremento della quantità assorbita in quanto le forze fisiche possono portare ad un desorbimento degli analiti. Sonicazione e riscaldamento vanno considerati se compatibili con la natura chimica del campione. Un altro problema associato al metodo della sonicazione è l'eventuale presenza di analiti termicamente instabili, perché l'uso della sonicazione produce il riscaldamento del campione. Un altro problema della sonicazione come l'agitazione è associato alla durata delle fibre [14].

Con l'uso delle tecniche SPME, solo le specie neutre vengono estratte dal rivestimento delle fibre e, pertanto, la conversione degli analiti in forme neutre mediante regolazione del pH può migliorare significativamente la sensibilità del metodo. Di conseguenza, valori di pH bassi migliorano l'estrazione di composti acidi e un pH elevato migliora quella dei composti basici. Il pH di una soluzione acquosa cambia la costante per specie dissociabili, secondo l'equazione 9.

$$K = K_0 \frac{[H^+]}{K_a + [H^+]} \quad \text{Equazione 9}$$

dove K_0 è la costante di distribuzione tra il campione e la fibra della forma indissociata e ka è la costante di acidità dell'analita dissociabile.

L'aggiunta di sale può aumentare o diminuire il coefficiente di diffusione degli analiti, a seconda degli analiti da estrarre. L'effetto dell'aggiunta di sale generalmente aumenta con l'aumentare della polarità dei composti, in tal senso l'aggiunta di sale rende i composti organici meno solubili e i coefficienti di ripartizione possono migliorare. D'altra parte, la presenza di sale nella matrice del campione aumenta la viscosità della soluzione e di conseguenza riduce la velocità di diffusione degli analiti, per cui l'aggiunta di sale (e in quale quantità) va studiata di caso in caso in modo da determinare l'*optimum* per il metodo che stiamo ottimizzando.

Prendendo in considerazione la polarità degli analiti analizzabili con le tecniche di microestrazione è facile notare come non esista un solvente universale per

la fase di eluizione, in quanto non tutti i solventi presenterebbero la stessa efficacia di desorbimento. Per tale motivo è opportuno ottimizzare anche la fase di eluizione, sia in merito al tipo di solvente o miscela di solventi, sia al tempo di eluizione. Inoltre, va studiata l'eluizione sia senza stimoli esterni sia in condizioni di agitazione o sonicazione. Tutti questi parametri devono essere indagati singolarmente per poter stabilire quali siano le condizioni ottimali di lavoro. Un basso volume di solvente durante la fase di eluizione è preferito, in quanto manterrà alta la preconcentrazione, non sarà richiesta una successiva evaporazione o ricostituzione, tutte fasi dispendiose in termini di tempo ed economiche e che possono portare ad errori nella quantificazione dei composti.

Per ultimo ma non meno importante va menzionato che uno degli aspetti principali per la buona riuscita di esperimenti SPME è la selezione del rivestimento della fibra. Le proprietà della fase di estrazione devono essere accuratamente ottimizzate perché determinano la selettività e l'affidabilità del metodo di estrazione. L'efficienza del processo di estrazione dipende dalla costante di distribuzione, K_{fs} , degli analiti tra il rivestimento della fibra e la matrice del campione. Pertanto, è molto utile utilizzare il rivestimento giusto per la data applicazione. Ad esempio, la polarità della fibra può fornire selettività migliorando l'affinità del rivestimento per gli analiti polari rispetto a un rivestimento in fibra non polare.

La scelta del rivestimento in fibra è basata sull'affinità della fase stazionaria verso l'analita da estrarre. Pertanto, il rivestimento polare come il rivestimento in poliacrilato (PA) ha una maggiore affinità con il fenolo, mentre il rivestimento bipolare come polidimetilsilossano-divinilbenzene (PDMS-DVB), Carboxen-PDMS (CAR-PDMS) può essere utilizzato per estrarre analiti come alcoli, ammine ed eteri. D'altra parte, il rivestimento non polare come il PDMS viene utilizzato per estrarre, ad esempio, BTEX e IPA [15–17]. I rivestimenti basati su meccanismo assorbente sono solitamente polimeri liquidi, mentre i rivestimenti basati su meccanismo adsorbente sono materiali solidi.

Nel caso di rivestimenti liquidi, la partizione degli analiti avviene nella fase di estrazione in cui le molecole vengono solvate dalle molecole di rivestimento. Il coefficiente di diffusione nel rivestimento liquido consente alle molecole di penetrare l'intero volume del rivestimento entro un tempo di estrazione ragionevole, se il

rivestimento è sottile. L'assorbente può essere una gomma o un olio viscoso che contiene agenti reticolanti e il polimero può essere applicato in vari spessori sulla fibra come nel caso del PDMS. La ritenzione degli analiti si basa anche sullo spessore del rivestimento in fibra. Ad esempio, è difficile per le fasi assorbenti trattenere piccoli analiti a meno che non venga utilizzato un rivestimento spesso. I tre rivestimenti liquidi disponibili in commercio sono il polidimetilsilossano (PDMS), il poliacrilato (PA) e il polietilenglicole (PEG). Nei rivestimenti adsorbenti un materiale solido, solitamente un polimero solido, è sospeso in un polimero liquido e rivestito su fibra. In questo caso, l'interazione degli analiti con una fase stazionaria è con particelle solide. Il rivestimento adsorbente ha una struttura cristallina ben definita, che se densa riduce il coefficiente di diffusione. Pertanto, entro il tempo sperimentale l'estrazione avviene solo sulla superficie del rivestimento. La ritenzione dell'analita dipende dalla dimensione dell'analita e dal diametro dei pori. La superficie di un adsorbente può interagire con un analita attraverso: il legame π - π , il legame idrogeno o le interazioni di van der Waals. La capacità di un adsorbente di trattenere gli analiti dipende dalla superficie totale, dalla quantità di porosità e dalla dimensione dei pori che sono divisi in macro- (aperture con diametri di 500 Å), meso- (aperture nell'intervallo di 20 -500 Å) e micropori (aperture nell'intervallo 2-20 Å). In questo caso, gli analiti possono essere estratti solo sulla superficie del rivestimento adsorbente. La superficie e il numero di siti disponibili per l'adsorbimento limita la quantità di analiti estratti. Questo è un punto cruciale nell'estrazione da matrici estremamente complesse in cui le specie interferenti possono sostituire gli analiti sul rivestimento. Per evitare questo e il problema della saturazione viene utilizzato un tempo di estrazione più breve.

Tutti i parametri fin qui menzionati sono stati presi in considerazione nello sviluppo dei metodi di estrazione che saranno riportati in dettaglio nella parte sperimentale del presente lavoro di tesi e che sono stati condotti con le tecniche di microestrazione che sono riportate nei seguenti sottoparagrafi.

2.2.1 Solid phase microextraction

La SPME è una tecnica che permette l'estrazione di analiti *target* dal campione tramite adsorbimento/assorbimento su una fase estrattiva che rivestite fisicamente un supporto di silice fusa o metallico che prende il nome di fibra. L'estrazione è seguita

dal desorbimento degli analiti mediante calore o applicazione di solvente di desorbimento. La scelta del materiale per il rivestimento delle fibre SPME è dettata dalla natura degli analiti che si vogliono analizzare. Nella maggior parte delle applicazioni la SPME è accoppiata con analisi GC ed in questi casi la fibra viene messa a desorbire termicamente nella porta di iniezione del gascromatografo, limitando l'uso della tecnica principalmente all'analisi di composti volatili (o volatilizzabili) e termicamente stabili. La SPME può essere utilizzata anche per analizzare composti non volatili e termicamente instabili accoppiando tale estrazione con la LC. Tuttavia, in tal caso, il desorbimento viene effettuato utilizzando solvente organico o fase mobile invece del desorbimento termico. L'uso di alte temperature durante il desorbimento può portare alla degradazione del polimero di estrazione e al desorbimento incompleto di molti composti non volatili. L'SPME è divenuta una delle tecniche di estrazione più utilizzate nell'analisi di campioni ambientali [18], alimentari [19], farmaceutici e biologici [20]. Nel corso degli anni, la tecnica e i supporti hanno subito diverse modifiche ed evoluzioni sia per quanto riguarda le diverse geometrie costruttive, che per i supporti e strategie di rivestimento. Decine di diverse geometrie SPME sono attualmente disponibili sul mercato. Durante il corso del triennio di dottorato sono state effettuate analisi e ottimizzati metodi di estrazione usando sia l'SPME convenzionale che l'SPME *Arrow*, entrambe le tecniche sono di seguito discusse più nel dettaglio evidenziando pregi e punti critici di entrambe.

Gli strumenti per l'analisi SPME sono costituiti da un supporto porta fibra (simile ad una siringa da gascromatografia) chiamato *Holder* e dalla fibra vera e propria la quale ha una forma cilindrica, solitamente lunga da 1 a 2 cm e con un diametro <100 μm , lo schema generico è riportato in figura 4.

È possibile utilizzare tale tecnica in tre diverse modalità di estrazione quali: l'estrazione diretta, in cui la fibra è immersa direttamente nel campione (e la si usa per ovvie ragioni solo con campioni acquosi); estrazione dello spazio di testa (HS, *headspace*), in cui la fibra viene esposta nello spazio aereo appena sopra il campione; estrazione con membrana, in cui viene utilizzata una membrana per proteggere la fibra da possibili composti interferenti.

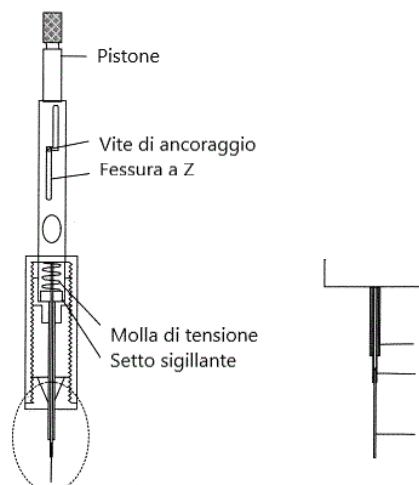


Figura 4. Dispositivo per l'analisi SPME (holder e fibra)

In figura 5 è riportato lo schema di lavoro della fibra SPME quando vengono effettuate analisi nello spazio di testa. Il campione posto in una fiala chiusa con tappo ermetico dotato di setto forabile (che può essere stato oggetto di diluizione, modifica della forza ionica, correzione del pH, derivatizzazione, etc) viene posto a riscaldare a bagno maria per un tempo determinato. L'eventuale aumento di temperatura permette che i composti volatili presenti nel campione evaporino andando a saturare lo spazio aereo. Dopo un determinato tempo di equilibrio la fibra viene esposta allo spazio di testa per l'assorbimento degli analiti. Durante questa fase la fiala e la fibra sono mantenute a temperatura costante. Inoltre, un'agitazione può essere applicata per favorire l'evaporazione degli analiti. Successivamente trascorso il tempo necessario a raggiungere l'equilibrio tra fibra e spazio di testa (che solitamente si attesta al raggiungimento del 95% del valore teorico atteso all'equilibrio), la fibra viene estratta e sottoposta a desorbimento termico all'iniettore del GC.

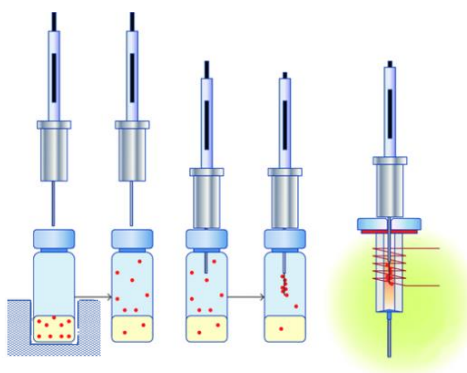


Figura 5. Procedura esemplificata di un'estrazione HS-SPME

In commercio esistono fibre costituite da diversi rivestimenti che vanno a differenziarle per grado di polarità. Inoltre, possono essere sia costituite da un solo polimero come nel caso delle fibre in poliacrilato (PA), polidimetilsilossano (PDMS) o polietilenglicole (CARBOWAX) oppure da fibre bifasiche come polidimetilsilossano/divinilbenzene (PDMS/DVB) o da fibre trifasiche come DVB/CAR/PDMS. Seguendo in parte il design della fibra SPME a distanza di circa 30 anni è stata sviluppata e commercializzata dalla CTC *Analytics* AG una versione di fibra più robusta e con maggiore fase stazionaria che prende il nome di SPME *Arrow*. Lo schema di lavoro delle due fibre è sostanzialmente identico. Nella figura 6 sono mostrate a confronto le due fibre, convenzionale e *Arrow*, ed è possibile identificare le parti comuni e le differenze costruttive. Entrambe permettono attraverso una vite colorata (A) di identificare il materiale con cui sono costruite le fibre, una parte centrale metallica che funge sia da protezione per la fibra sia come ago per forare il setto (C). In più la fibra *Arrow* presenta una punta metallica a freccia che aiuta ad aumentare la robustezza meccanica del supporto stesso, poiché la forza richiesta per penetrare nei setti della fiala e/o dell'iniettore del GC è inferiore rispetto ad una fibra SPME convenzionale, nonostante l'aumento di diametro.

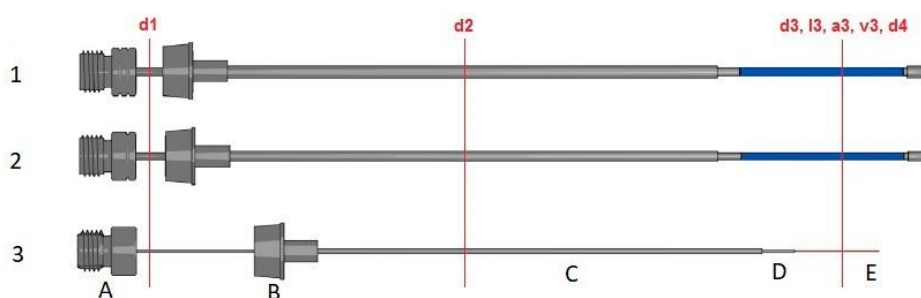


Figura 6. Fibre SPME *Arrow* e convenzionale a confronto

Le SPME *Arrow* sono state progettate per superare alcune carenze delle fibre SPME convenzionali, tra le quali robustezza meccanica limitata e piccoli volumi della fase di estrazione. Il corpo di una fibra SPME è realizzato in acciaio inossidabile e la fase di estrazione è tipicamente rivestita di silice fusa, il che comporta la mancanza di durabilità fisica. Inoltre, anche il corpo della fibra SPME convenzionale è prodotto con materiali molto sottili e fragili. Le fibre SPME tradizionali hanno diametri esterni di 0,5 mm circa mentre la SPME *Arrow* ha un diametro esterno che va da 1,1 e 1,5 mm, che è rispettivamente circa 2 e 3 volte il diametro delle tradizionali fibre SPME. Il

maggiore diametro esterno è in gran parte responsabile della maggiore robustezza meccanica delle SPME *Arrow*. Anche le fibre *Arrow* sono disponibili in commercio con differenti fasi stazionarie che coprono diversi range di polarità permettendo di usarle in una moltitudine di analisi differenti. Come per le convenzionali sono prodotte con fasi singole, bifasiche e trifasiche. Uno dei problemi legati all'uso delle fibre *Arrow* è la non diretta compatibilità con i sistemi di iniezione originali dei gascromatografi. Presentando un diametro esterno maggiore da 2 a 3 volte non è possibile usare la stessa porta di iniezione che si utilizza per le iniezioni liquide o la SPME convenzionale. Per tale motivo deve essere effettuata una modifica all'iniettore del GC sostituendo la testa dell'iniettore e utilizzando dei *liner* SPME dedicati con diametro interno maggiore dei convenzionali. In diverse pubblicazioni è stato riportato come i metodi di estrazione ottimizzati tramite l'uso di fibre convenzionali possono essere usati con le fibre *Arrow* ottenendo un incremento dei segnali che in base alla natura chimica dei composti e alla loro tensione di vapore varia da 2 a 6 volte rispetto a quelli ottenuti con fibre convenzionali [21]. Tale incremento è dovuto alla differenza in quantità di fase presente nelle due fibre, infatti, prendendo in considerazione due fibre ricoperte con un film da 100 μm di PDMS nella SPME convenzionale da 1 cm il volume della fase è 0,6 μL contro i 3,8 μL della fibra SPME *Arrow* da 1,1 mm. La differenza rappresenta un aumento di 6 volte del volume della fase assorbente, che si traduce in una maggiore sensibilità e capacità di estrazione.

Durante il corso del triennio di dottorato l'uso delle fibre SPME convenzionale e *Arrow* è stato applicato allo studio della frazione volatile di campioni di particolare interesse alimentare. È stato effettuato uno studio di comparazione dei due tipi di fibra in termini di sensibilità e riproducibilità nell'estrazione della frazione volatile di tre differenti varietà di whiskey (vedi sezione 4.1) [22].

2.2.2 *Fabric phase sorptive extraction*

La tecnica di estrazione FPSE integra i vantaggi della tecnologia di rivestimento sol-gel e l'ampia superficie chimica dei tessuti in cellulosa, poliestere o fibra di vetro. Tale combinazione permette di generare un dispositivo di microestrazione con una capacità assorbente molto elevata, sotto forma di un rivestimento ultrasottile. Il rivestimento sol-gel assorbente e poroso e il substrato

permeabile facilitano sinergicamente l'equilibrio ottenendo delle estrazioni rapide. La flessibilità del dispositivo FPSE ne consente l'inserimento diretto in campioni senza alcuna modifica del campione stesso o in supporti di estrazione con particolari conformazioni. In figura 7 viene riportato un dispositivo FPSE, delle dimensioni di 2 cm di diametro, prima del suo utilizzo. È possibile, tuttavia, adattare dimensioni e formati in base alle performance che si vogliono ottenere.

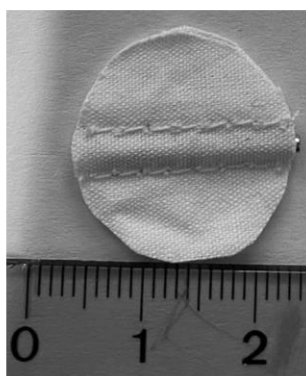


Figura 7. Dispositivo FPSE con diametro da 2 cm

Il legame chimico tra il sol-gel assorbente e il substrato del tessuto consente l'esposizione dei dispositivi FPSE a qualsiasi solvente organico per l'eluizione dell'analita. I dispositivi FPSE possono essere usati per la preparazione del campione utilizzando la modalità di immersione diretta. Inoltre, l'elevata area della superficie di contatto primaria (PCSA) del dispositivo FPSE e la struttura porosa dei rivestimenti sol-gel permettono elevata sensibilità di estrazione in un periodo di tempo relativamente breve con limiti di rivelazione in base all'analita preso in esame che possono raggiungere le parti per trilione mantenendo una buona ripetibilità. Uno dei principali problemi legati ai dispositivi di microestrazione è la tecnologia utilizzata per creare il rivestimento adsorbente che solitamente è realizzata attraverso un film superficiale che ricopre il substrato e successiva reazione di reticolazione dei radicali liberi per immobilizzare il film stesso [23]. Tale processo di realizzazione porta però a dei problemi dovuti alla debole adesione fisica del polimero al substrato come, ad esempio: un elevato rilascio di fase, il lavaggio del polimero attraverso l'uso di solventi organici, tempo di equilibrio di estrazione lungo, selettività limitata, scarsa riproducibilità dell'estrazione e rigonfiamento del materiale adsorbente se esposto a solventi organici. Si ritiene che la mancanza di legame chimico tra il sorbente

polimerico e il substrato sia la causa principale di questi problemi relativi al rivestimento. Per far fronte a questi problemi nella realizzazione del FPSE viene applicata la tecnologia sperimentata da Malik *et al.* [24] che si è dimostrata la più conveniente e versatile. Questo è un processo sol-gel che comporta l'idrolisi catalitica dei precursori sol-gel e la successiva policondensazione dei precursori idrolizzati, con conseguente transizione di una sospensione colloidale liquida (particelle solide con diametro di 1-100 nm) nota come “sol” in una rete 3D di “gel” a matrice solida con pori di dimensioni submicrometriche e catene polimeriche la cui lunghezza media è maggiore di un micrometro.

Una delle caratteristiche che offre questa tecnologia di rivestimento è la possibilità di realizzare materiali multicomponenti che possono convenientemente personalizzare la morfologia superficiale, la selettività e l'affinità del sorbente verso gli analiti target. Il rivestimento assorbente creato dalla tecnologia sol-gel è altamente poroso e legato chimicamente al substrato. Di conseguenza, tali rivestimenti dimostrano una notevole stabilità termica e ai solventi organici. Non per ultimo, l'elevata porosità del rivestimento sol-gel consente inoltre di raggiungere l'equilibrio di estrazione in una frazione del tempo spesso richiesto dalle fibre SPME commerciali. Grazie a questo tipo di geometria fisica, la membrana FPSE combina la modalità di estrazione di SPME/SPE in un'unica piattaforma tecnologica e quindi può essere utilizzata sia in una modalità di estrazione basata sull'equilibrio (come avviene nell'estrazione per immersione diretta in SPME) o in una modalità di estrazione esauriente (come per le cartucce SPE). A differenza della SPME non richiede nessun equipaggiamento strumentale particolare per il suo utilizzo e analisi degli analiti post estrazione.

Per la fabbricazione dei supporti FPSE possono essere usati materiali diversi, sia per quanto riguarda i materiali di substrato che possono essere naturali o sintetici e di tipo idrofilo o idrofobo (cellulosa/poliestere/biossido di titanio) che tra i sol-gel che variano da apolari a polari coprendo un vasto range di polarità di analiti che possono essere analizzati. In merito alla natura dei sol-gel possono essere classificati come: non polare PDMDPS (polidimetildifenilsilossano), C₁₈, PDMS (polidimetilsilossano); mediamente polari PTHF (politetraidrofurano); polari PEO-PPO-PEO [poli(ossido di propilene)–poli(ossido di etilene)–poli(ossido di propilene)], Grafene, CW20

(Carbowax® 20 M), PEG-PPG-PEG [poly(ethylene glycol)-poly(propylene glycol)-poly(ethylene glycol)]; altamente polari PEG (poly(ethylene glycol)) [25]. Prendendo in considerazione i materiali che possono essere usati come substrato e i differenti sol-gel sono decine le combinazioni di FPSE realizzabili.

Inoltre, va sottolineato come la FPSE è la prima tecnologia di preparazione del campione che sfrutta anche la chimica superficiale del substrato. Infatti, la selettività e l'efficienza di estrazione della membrana FPSE derivano dall'intera combinazione del polimero organico, uno o più precursori inorganici organicamente modificati e dalla chimica superficiale del substrato del tessuto. In quanto tale, ad esempio, la selettività e l'efficienza di estrazione del rivestimento sol-gel PDMS su tessuto di cellulosa è sostanzialmente diversa da quella del rivestimento sol-gel PDMS su tessuto in poliestere o fibra di vetro [26].

Tra le peculiarità di utilizzo della tecnica FPSE troviamo: la capacità di preconcentrare gli analiti target direttamente da campioni tal quale senza alcuno step di pulizia o filtrazione; resistenza ad ambienti chimici aggressivi (cioè altamente acidi e basici) in modo che il pH della matrice possa essere regolato su valori di pH più ampi; la capacità di utilizzare qualsiasi solvente organico per eluire gli analiti estratti in modo che la soluzione finale possa essere iniettata simultaneamente in diversi sistemi separativi (GC, HPLC, CE); uguale efficacia nel campionamento sul campo e nella preparazione del campione per eliminare gli oneri della raccolta, del trasporto, della conservazione e della preparazione del campione in laboratorio; capacità di raggiungere un elevato fattore di preconcentrazione durante l'estrazione in modo da evitare l'evaporazione del solvente e la ricostituzione del campione; capacità di raggiungere l'equilibrio di estrazione abbastanza velocemente aumentando il numero di campioni preparati per unità di tempo.

Le estrazioni condotte con la procedura FPSE seguono tipicamente lo schema seguente: il protocollo prevede l'immersione del FPSE in un sistema di solventi per eliminare eventuali residui indesiderati provenienti dalla sintesi dei media, seguita dal successivo risciacquo con acqua deionizzata per rimuovere i solventi organici residui. Una quantità nota di campione contenente gli analiti target viene posta in una fiala di vetro con tappo a vite. Il FPSE viene inserito nella fiala insieme a un'ancoretta magnetica pulita rivestita di teflon. La soluzione campione viene agitata per un tempo

di estrazione definito per l'assorbimento degli analiti. Il mezzo FPSE viene quindi rimosso dalla fiala di estrazione e inserito in un'altra fiala contenente il solvente di eluizione, per un tempo definito. Infine, l'eluente può essere filtrato per rimuovere eventuale particolato prima dell'analisi. Il mezzo FPSE può essere quindi riutilizzato per successivi cicli di estrazione.

A partire dal 2014, la tecnica FPSE è stata principalmente utilizzata per lo sviluppo di metodi estrattivi e identificativi di farmaci e prodotti farmaceutici. Successivamente la FPSE è stata modificata tramite l'integrazione di una barra metallica creando un sistema che integra estrazione e agitazione al tempo stesso. Usando la *magnet integrated-FPSE* (MI-FPSE), la ricerca condotta durante l'ultimo anno del triennio di dottorato si è anche focalizzata sull'ottimizzazione e validazione di metodi di estrazione e identificazione di prodotti fitosanitari *target* da campioni ambientali, ottimizzando un metodo per l'analisi di pesticidi a base di benzoilurea usando come fase adsorbente un sol-gel Carbowax 20M. L'identificazione è stata effettuata attraverso l'uso di cromatografia liquida accoppiata a DAD (vedi sezione 4.3.1) [27]. Lo studio appena citato sarà trattato in modo approfondito nel capitolo dedicato alla produzione scientifica del triennio di dottorato.

2.2.3 Capsule phase microextraction

La CPME è una tecnica di preparazione del campione di nuova generazione, sviluppata per semplificare l'attuale stato dell'arte delle pratiche di preparazione dei campioni. Sfrutta le proprietà e tecnologie avanzate dei materiali assorbenti ibridi inorganici-organici (come visto nella tecnica FPSE), integra il meccanismo di filtrazione del campione nel dispositivo stesso e fornisce l'indipendenza della preparazione del campione sia in laboratorio che sul campo senza sacrificare la qualità dei dati analitici. La CPME presenta molte somiglianze con le tecniche FPSE, SBSE e LPME poiché si basa sull'estrazione guidata dall'equilibrio. Il dispositivo di microestrazione può essere costruito in diverse dimensioni: normalmente 1 cm, 2 cm e 3 cm per diversi volumi di campione (da 1 mL a 100 mL) e può essere riutilizzato più volte. Le capsule di microestrazione sono costituite da tre parti: una fibra ibrida sol-gel rivestita con adsorbente inorganico-organico (solitamente costituita da cotone) e un adsorbente adsorbito sulla fibra (tra cui PTHF, PEG, PDMS), un magnete

cilindrico e una membrana in polipropilene microporosa permeabile. La membrana microporosa in funge da guaina protettiva per ridurre al minimo la possibilità di contaminazione della fibra estraente rivestita da sol-gel dal particolato, biomasse, proteine e altri interferenti che possono essere presenti nel campione. La membrana microporosa ha una porosità di 200 nm, ancora più fitta di un tipico filtro considerando che questi ha solitamente una dimensione dei pori di 450 nm. Una delle caratteristiche più vantaggiose delle CPME è la tecnologia di rivestimento. La tecnica delle estrazioni condotte con CPME includono tutte le caratteristiche della FPSE, il protocollo di attivazione, estrazione e lavaggio segue gli stessi step includendo inoltre la capacità filtrante nel sistema di stesso di estrazione. La CPME, quindi, può essere utilizzato per l'analisi di quei campioni biologici, alimentari e ambientali che richiederebbero uno step di filtrazione prima dello step di estrazione. Nel corso degli esperimenti condotti durante il triennio di dottorato la tecnica CPME con un rivestimento in sol-gel costituito da poly(caprolactone)-poly(dimethylsiloxane)-poly(caprolactone) è stata utilizzata per l'ottimizzazione e validazione di un protocollo di estrazione di prodotti fitosanitari a base di benzilurea in succo di mela commerciale non chiarificato e non pretrattato seguita da identificazione tramite LC-DAD (vedi sezione 4.3.2) [28]. Inoltre, sempre usando la tecnica CPME è stato ottimizzato e validato un metodo per l'analisi di pesticidi organoclorurati in campioni di acque di superficie le cui analisi sono state eseguite usando un sistema GC-MS (vedi sezione 4.2.2) [29]. Gli studi appena citati saranno trattati in modo approfondito nel capitolo dedicato alla produzione scientifica del triennio di dottorato.

2.3 Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe

Oltre alle tecniche di microestrazione, nel corso degli ultimi decenni, un'altra tecnica di preparazione è diventata sempre più presente nel panorama scientifico per analisi di contaminanti in campioni alimentari e ambientali. La tecnica QuEChERS (acronimo di *quick, easy, cheap, effective, rugged, and safe*, tradotto in veloce, facile, economica, efficiente, robusta e sicura), è una tecnica che prevede una fase di estrazione del campione tramite partizionamento liquido-liquido utilizzando acetonitrile e una successiva pulizia dell'estratto attraverso dispersione in fase solida (d-SPE). La tecnica è stata nel corso degli anni soggetta a modifiche e adattamenti sia

del solvente usato per l'estrazione, sia della fase d-SPE in modo da adattarla alle diverse matrici e agli analiti di interesse.

Generalmente il protocollo prevede una prima fase di estrazione “*salting-out*” di un campione in ambiente acquoso tramite l'uso di acetonitrile (o altro solvente organico). Nei casi in cui la percentuale di acqua nel campione di partenza non sia sufficiente, è prevista l'aggiunta di acqua in modo da favorire l'estrazione. Durante questa fase vengono aggiunti dei sali (NaCl) per modificare la forza ionica della fase acquosa, per favorire il *salting-out* e per migliorare la separazione di fase tra acqua e solvente organico. Successivamente al solvente organico verrà aggiunto del MgSO₄ per eliminare eventuali tracce residue di acqua. La seconda fase del protocollo, chiamata di pulizia, serve ad eliminare eventuali interferenti che sono stati co-estratti assieme ai composti di interesse. In questa fase possono essere usati diversi reattivi, tra i quali ammina secondaria e primaria (PSA) per rimuovere zuccheri, acidi grassi, acidi organici, lipidi e alcuni pigmenti; materiali adsorbenti come l'ottadecil silice (C₁₈) si è dimostrato efficace nel rimuovere acidi grassi e cere ma va anche ad interferire con i pesticidi più lipofili facendone diminuire il recupero finale; il GCB può essere usato per eliminare clorofille e carotenoidi ma ha anche un'elevata affinità per pesticidi planari.

Il metodo è stato nel corso degli anni standardizzato portando alla nascita di due metodi ufficiali, il primo sviluppato da Lehotay ha portato al metodo ufficializzato dall'AOAC (*Association of Official Agricultural Chemists*) 2007.01 [30], mentre le modifiche apportate da Anastassiades *et al.*, hanno portato al metodo EN 15662 pubblicato nel 2008 [31].

In funzione delle proprietà degli analiti i due metodi sono spesso stati modificati e adattati in modo da permettere di estrarre composti molto polari, acidi o basici. Per tale motivo in alcuni casi, in relazione agli analiti che si vogliono analizzare, il pH della soluzione acquosa va aggiustato in modo da permettere una corretta estrazione degli analiti *target*. Anche la fase di pulizia dell'estratto può risultare problematica ed inficiare con il recupero di alcuni composti in quanto possono interagire con il PSA. Va sottolineato che alcuni pesticidi non possono essere estratti attraverso una tecnica QuEChERS, in quanto essendo altamente polari (con un valore

di K_{ow} inferiore a -2) e quindi presentano un bassissimo partizionamento nella fase organica.

Un protocollo QuEChERS a scala ridotta è stato applicato durante il primo anno di dottorato per lo studio di 88 pesticidi di diversa natura chimica in quattro diverse matrici vegetali. Dopo l'estrazione l'identificazione è stata condotta utilizzando un sistema FM GC×GC-QqQMS (vedi sezione 4.2.1) [32].

Riferimenti bibliografici:

- [1] A. Kabir, R. Mesa, J. Jurmain, K.G. Furton, Fabric phase sorptive extraction explained, *Separations*. 4 (2017). <https://doi.org/10.3390/separations4020021>.
- [2] A. Gałuszka, Z. Migaszewski, J. Namieśnik, The 12 principles of green analytical chemistry and the SIGNIFICANCE mnemonic of green analytical practices, *TrAC Trends in Anal. Chem.* 50 (2013) 78–84. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2013.04.010>.
- [3] S. Armenta, S. Garrigues, M. de la Guardia, Green Analytical Chemistry, *TrAC Trends in Anal. Chem.* 27 (2008) 497–511. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2008.05.003>.
- [4] Janusz. Pawliszyn, Shi. Liu, Sample introduction for capillary gas chromatography with laser desorption and optical fibers, *Anal Chem.* 59 (1987) 1475–1478. <https://doi.org/10.1021/ac00137a024>.
- [5] R. Eisert, J. Pawliszyn, Automated In-Tube Solid-Phase Microextraction Coupled to High-Performance Liquid Chromatography, *Anal Chem.* 69 (1997) 3140–3147. <https://doi.org/10.1021/ac970319a>.
- [6] E. Baltussen, P. Sandra, F. David, C. Cramers, (1999) Stir Bar Sorptive Extraction SBSE , a Novel Extraction Technique for Aqueous Samples: Theory and Principles.
- [7] I. Bruheim, X. Liu, J. Pawliszyn, Thin-Film Microextraction, *Anal Chem.* 75 (2003) 1002–1010. <https://doi.org/10.1021/ac026162q>.
- [8] F. Pena-Pereira, W. Wojnowski, M. Tobiszewski, AGREE—Analytical GREENness Metric Approach and Software, *Anal Chem.* 92 (2020) 10076–10082. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.0c01887>.
- [9] J. Płotka-Wasyłka, W. Wojnowski, Complementary green analytical procedure index (ComplexGAPI) and software. *Green Chem.* 23 (2021) 8657–8665. <https://doi.org/10.1039/D1GC02318G>.
- [10] J. Płotka-Wasyłka, A new tool for the evaluation of the analytical procedure: Green Analytical Procedure Index, *Talanta.* 181 (2018) 204–209. <https://doi.org/10.1016/J.TALANTA.2018.01.013>.
- [11] M.T. Tena, J.D. Carrillo, Multiple solid-phase microextraction: Theory and applications, *TrAC Trends in Anal. Chem.* 26 (2007) 206–214. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2007.01.008>.
- [12] R. Costa, L. Tedone, S. de Grazia, P. Dugo, L. Mondello, Multiple headspace-solid-phase microextraction: An application to quantification of mushroom volatiles, *Anal Chim Acta.* 770 (2013) 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2013.01.041>.
- [13] E. Carasek, E. Cudjoe, J. Pawliszyn, Fast and sensitive method to determine chloroanisoles in cork using an internally cooled solid-phase microextraction fiber, *J Chromatogr A.* 1138 (2007) 10–17. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2006.10.092>.
- [14] A. Spietelun, A. Kloskowski, W. Chrzanowski, J. Namieśnik, Understanding Solid-Phase Microextraction: Key Factors Influencing the Extraction Process and Trends in Improving the Technique, *Chem Rev.* 113 (2013) 1667–1685. <https://doi.org/10.1021/cr300148j>.

- [15] B. Tang, U. Isacson, Analysis of Mono- and Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Using Solid-Phase Microextraction: State-of-the-Art. *Energy & Fuels*. 22 (2008) 1425–1438. <https://doi.org/10.1021/ef7007166>.
- [16] G. Xiong, J.A. Koziel, J. Pawliszyn, Air sampling of aromatic hydrocarbons in the presence of ozone by solid-phase microextraction, *J Chromatogr A*. 1025 (2004) 57–62. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2003.10.078>.
- [17] S. Endo, S.T.J. Droge, K.-U. Goss, Polyparameter Linear Free Energy Models for Polyacrylate Fiber–Water Partition Coefficients to Evaluate the Efficiency of Solid-Phase Microextraction, *Anal Chem*. 83 (2011) 1394–1400. <https://doi.org/10.1021/ac102868e>.
- [18] É.A. Souza-Silva, R. Jiang, A. Rodríguez-Lafuente, E. Gionfriddo, J. Pawliszyn, A critical review of the state of the art of solid-phase microextraction of complex matrices I. Environmental analysis, *TrAC Trends in Anal. Chem*. 71 (2015) 224–235. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2015.04.016>.
- [19] É.A. Souza-Silva, E. Gionfriddo, J. Pawliszyn, A critical review of the state of the art of solid-phase microextraction of complex matrices II. Food analysis, *TrAC Trends in Anal. Chem*. 71 (2015) 236–248. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2015.04.018>.
- [20] É.A. Souza-Silva, N. Reyes-Garcés, G.A. Gómez-Ríos, E. Boyacı, B. Bojko, J. Pawliszyn, A critical review of the state of the art of solid-phase microextraction of complex matrices III. Bioanalytical and clinical applications, *TrAC Trends in Anal. Chem*. 71 (2015) 249–264. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2015.04.017>.
- [21] J.S. Herrington, G.A. Gómez-Ríos, C. Myers, G. Stidsen, D.S. Bell, Hunting molecules in complex matrices with spme arrows: A review, *Separations*. 7 (2020). <https://doi.org/10.3390/separations7010012>.
- [22] A. Ferracane, N. Manousi, P.Q. Tranchida, G.A. Zachariadis, L. Mondello, E. Rosenberg, Exploring the volatile profile of whiskey samples using solid-phase microextraction Arrow and comprehensive two-dimensional gas chromatography-mass spectrometry, *J Chromatogr A*. 1676 (2022) 463241. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2022.463241>.
- [23] L.G. Blomberg, Current aspects of stationary phase immobilization in open tubular column chromatography, *J. Microcolumn Sep*. 2 (1990) 62–68. <https://doi.org/10.1002/mcs.1220020204>.
- [24] S.L. Chong, D. Wang, J.D. Hayes, B.W. Wilhite, A. Malik, Sol–Gel Coating Technology for the Preparation of Solid-Phase Microextraction Fibers of Enhanced Thermal Stability, *Anal Chem*. 69 (1997) 3889–3898. <https://doi.org/10.1021/ac9703360>.
- [25] V. Kazantzi, A. Anthemidis, Fabric sol–gel phase sorptive extraction technique: A review, *Separations*. 4 (2017). <https://doi.org/10.3390/separations4020020>.
- [26] A. Kabir, V. Samanidou, Fabric phase sorptive extraction: A paradigm shift approach in analytical and bioanalytical sample preparation, *Molecules*. 26 (2021). <https://doi.org/10.3390/molecules26040865>.

- [27] N. Manousi, V. Alampanos, A. Ferracane, G. Efstratiadis, A. Kabir, K.G. Furton, P.Q. Tranchida, G.A. Zachariadis, L. Mondello, E. Rosenberg, V.F. Samanidou, Magnet integrated fabric phase sorptive extraction as a stand-alone extraction device for the monitoring of benzoyl urea insecticides in water samples by HPLC-DAD, *J Chromatogr A*. 1672 (2022) 463026. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2022.463026>.
- [28] N. Manousi, A. Ferracane, A. Kabir, K.G. Furton, P.Q. Tranchida, G.A. Zachariadis, L. Mondello, V.F. Samanidou, E. Rosenberg, A monolithic capsule phase microextraction method combined with HPLC-DAD for the monitoring of benzoyl urea insecticides in apple juice samples, *Microchemical J*. 181 (2022) 107768. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2022.107768>.
- [29] N. Manousi, A. Ferracane, A. Kabir, K.G. Furton, P.Q. Tranchida, G.A. Zachariadis, J. Płotka-Wasyłka, L. Mondello, V.F. Samanidou, E. Rosenberg, Green capsule phase microextraction employing hydrophobic monolithic sol-gel octadecyl siloxane platforms for the monitoring of organophosphorus pesticides in environmental water samples, *Sustain Chem Pharm*. 30 (2022) 100892. <https://doi.org/10.1016/j.scp.2022.100892>.
- [30] AOAC Official Method 2007.01 Pesticide Residues in Foods by Acetonitrile Extraction and Partitioning with Magnesium Sulfate Gas Chromatography/Mass Spectrometry and Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry First Action 2007, n.d.
- [31] EN 15662:2008 (2008) Foods of Plant Origin—Determination of Pesticide Residues Using GC-MS and/or LC-MS/MS Following Acetonitrile Extraction and Partitioning and Cleanup by Dispersive SPE, QuEChERS Method, (n.d.).
- [32] A. Ferracane, M. Zoccali, F. Cacciola, T.M.G. Salerno, P.Q. Tranchida, L. Mondello, Determination of multi-pesticide residues in vegetable products using a “reduced-scale” QuEChERS method and flow-modulated comprehensive two-dimensional gas chromatography-triple quadrupole mass spectrometry, *J Chromatogr A*. 1645 (2021) 462126. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2021.462126>.

Capitolo 3.
Cromatografia: aspetti teorici

3.1 Cenni storici e introduzione sulla cromatografia

Con il termine cromatografia si indicano una serie di tecniche accomunate dalla capacità di separare miscele di composti sfruttando la diversa distribuzione dei composti stessi tra due fasi, una fase stazionaria e una mobile. Quest'ultima permette l'eluizione dei composti e il collezionamento e/o diretta identificazione degli stessi. Ciò significa che i composti facenti parte della nostra miscela sono trattenuti in maniera differente dalla fase stazionaria, traducendosi in una diversa velocità di spostamento all'interno del letto separativo. Inoltre, una delle caratteristiche nonché principio fondamentale della tecnica, è che le due fasi, stazionaria e mobile, devono essere immiscibili tra loro. Tale tecnica, deve la sua invenzione al botanico Mikhail Tswett che nel 1906 effettuò la prima separazione cromatografica su colonna di un estratto vegetale [1]. Tswett, sfruttando la diversa distribuzione tra il carbonato di calcio usato per impaccare la colonna (fase stazionaria) e l'etere di petrolio (fase mobile), riuscì a separare la clorofilla dall'estratto vegetale usato come campione. Osservando la natura con cui i diversi composti si separavano in bande colorate, lo stesso Tswett coniò il termine cromatografia, il quale deriva dal greco "*chroma*" (colore) e "*grafos*" (scrittura).

Al giorno d'oggi esistono differenti tecniche cromatografiche (su carta, su strato sottile, su colonna) che possono essere sfruttate per la separazione di composti di natura differente. Le tecniche cromatografiche possono essere classificate in base a:

-
- Stato fisico della fase mobile: cromatografia liquida, cromatografia liquida supercritica e gascromatografia (suddivisibile in cromatografia gas-solido e cromatografia gas-liquido in base alla natura della fase stazionaria);
- Supporto cromatografico: cromatografia su carta, cromatografia su strato sottile e cromatografia su colonna;
- Meccanismo di separazione: adsorbimento, ripartizione, scambio ionico, esclusione dimensionale e affinità.

Nel caso della cromatografia su colonna, quest'ultima può essere direttamente collegata ad un detector per l'identificazione qualitativa e quantitativa dei composti eluiti. In questo caso la separazione cromatografica produrrà un grafico in due dimensioni che prende il nome di cromatogramma, avente sull'asse delle x i tempi in

cui i composti eluiscono dalla colonna (tempo di ritenzione) e sull'asse delle y l'intensità dei composti. I composti verranno rappresentati nel grafico con delle curve gaussiane la cui area sottostante la curva è direttamente proporzionale alla quantità di composto registrata dal detector.

3.2 Principi teorici della cromatografia su colonna

Tutti i processi cromatografici su colonna sono accomunati da una serie di parametri fondamentali di seguito descritti.

Tempo di ritenzione: è il tempo che intercorre tra l'inizio della separazione cromatografica e quello in cui il singolo analita raggiunge l'estremità terminale della colonna. Prendendo in considerazione la gascromatografia si usa esprimere con il termine *hold up time* il tempo impiegato dal gas *carrier* per percorrere tutta la lunghezza della colonna, che equivale al tempo di ritenzione di un analita che non viene assolutamente ritenuto dalla fase stazionaria. L'*hold up time* viene indicato con t_M , invece un analita che viene ritenuto si indica con t_R . Il tempo di ritenzione totale di un composto t_R , sarà la somma di t_M e t'_R . Il valore t'_R rappresenta il tempo che l'analita ha trascorso legato alla fase stazionaria. Il tempo di ritenzione dipende da differenti fattori tra cui: la natura chimica della fase stazionaria con cui è costruita la colonna, l'interazione tra l'analita e la colonna, la temperatura e le condizioni operative in termini di flusso.

Costante di distribuzione: rappresenta il rapporto (e quindi l'affinità) tra l'analita e le due fasi di una colonna. L'equazione 1 esprime la costante di distribuzione (K_c):

$$K_c = [A]_S/[A]_M \text{ Equazione 1}$$

dove $(A)_S$ e $(A)_M$ rappresentano rispettivamente l'attività del soluto nella fase stazionaria e mobile. Tale costante può essere espressa anche come rapporto della concentrazione molare di analita distribuita nelle due fasi cromatografiche. La costante di distribuzione rappresenta il tempo che un analita passa legato alla fase stazionaria e

quindi un composto con un basso valore di K_c eluirà prima rispetto ad un composto con valore di K_c più alto, traducendosi quindi in una diversa velocità di eluizione.

Velocità lineare media: basandosi sul tempo di ritenzione di un composto che non viene ritenuto dalla colonna (t_M) e la lunghezza stessa della colonna (L) è possibile calcolare la velocità lineare media (\bar{u}) della fase mobile tramite l'equazione 2 la quale viene espressa in cm s^{-1} :

$$\bar{u} = \frac{L}{t_M} \text{ Equazione 2}$$

Numero di piatti teorici e altezza del piatto: il parametro che descrive e permette di quantificare l'efficienza di una colonna cromatografica è il numero di piatti teorici (N) ed è rappresentato dall'equazione 3:

$$N = \left(\frac{t_R}{\sigma}\right)^2 = 16 \left(\frac{t_R}{w_b}\right)^2 = 5,54 \left(\frac{t_R}{w_h}\right)^2 \text{ Equazione 3}$$

dove t_R , σ , w_b e w_h rappresentano rispettivamente il tempo di ritenzione, la deviazione standard, l'ampiezza del picco alla base e a metà altezza. Una colonna efficiente è indicata da un alto valore di N .

Un parametro direttamente correlato con N è l'altezza del piatto (H) più correttamente indicato come "altezza equivalente del piatto teorico" (*height equivalent to a theoretical plate* - HETP), che mette in relazione la lunghezza della colonna con il numero di piatti teorici e permette di confrontare l'efficienza di colonne di lunghezza differente, come mostrato dall'equazione 4.

$$H = \frac{L}{N} \text{ Equazione 4}$$

Risoluzione: l'efficienza di una separazione cromatografica può essere misurata anche in termini di risoluzione (R_s), ovvero il grado di separazione tra due picchi che si susseguono nel cromatogramma. La risoluzione viene calcolata attraverso l'equazione 5:

$$R_S = \frac{2 [(t_R)_B - (t_R)_A]}{w_A + w_B} \quad \text{Equazione 5}$$

dove A e B rappresentano due picchi con tempi di eluizione uno successivo all'altro. Più alto sarà il valore di R_S , migliore sarà la separazione tra i due analiti.

Prendendo in esame gli esempi riportati nella Figura 1 è possibile vedere come ci possiamo imbattere in diversi livelli di risoluzione. Nella ricostruzione in basso della figura viene mostrata una situazione di co-eluzione, in cui i due composti eluiscono in modo molto ravvicinato uno con l'altro e non vi è una netta separazione, la risoluzione sarà bassa ed incompleta per questa coppia di analiti e la fase stazionaria della colonna. Nella sezione centrale è possibile vedere come i due analiti sono quasi completamente separati, mentre nella parte in alto gli analiti risultano completamente separati alla base mostrando un'alta risoluzione tra la coppia di composti. L'ottenimento di queste tre diverse risoluzioni può essere dovuto all'uso di diverse fasi stazionarie nelle tre analisi, le quali presentano maggiore o minore ritenzione per uno dei due analiti andando a migliorare la separazione.

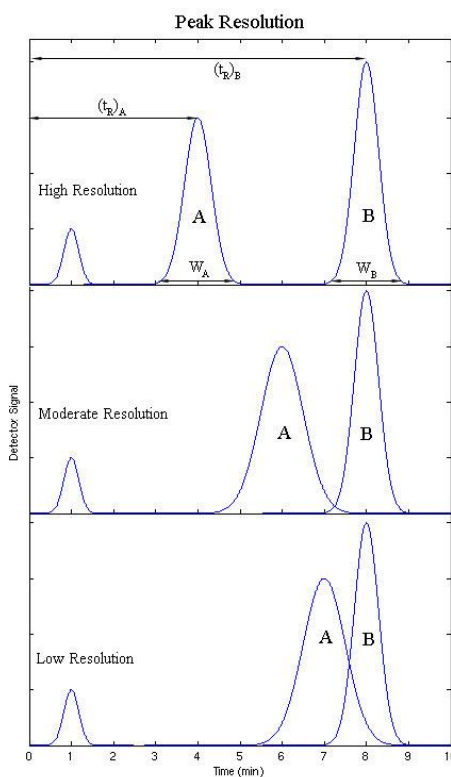


Figura 1. Esempi di risoluzione.

Equazione di Van Deemter: uno degli aspetti che devono essere tenuti in considerazione per una buona separazione cromatografica è l'ampiezza del picco. L'equazione di Van Deemter (Equazione 6) prende in considerazione i tre parametri che possono avere un effetto sul l'allargamento della banda cromatografica nelle colonne impaccate:

$$H = A + \frac{B}{\bar{u}} + C \bar{u} \quad \text{Equazione 6}$$

Il fattore A rappresenta i percorsi multipli: ovvero spiega come le molecole durante l'eluizione seguano percorsi casuali tra le particelle della fase stazionaria. Sono questi percorsi che avendo lunghezze differenti gli uni dagli altri provocheranno l'allargamento della banda del soluto.

Il fattore B/\bar{u} rappresenta la diffusione longitudinale: Gli analiti si diffondono dal centro verso i bordi, provocando anche l'allargamento della banda. Infatti, la concentrazione dell'analita è inferiore ai bordi della banda rispetto al centro. L'effetto di questo fattore diminuisce quando la velocità della fase mobile è elevata.

Il fattore $C\bar{u}$ rappresenta il trasferimento di massa del soluto nelle fasi stazionaria e mobile ed è dovuto dal fatto che l'analita impiega un certo tempo per equilibrarsi tra la fase stazionaria e quella mobile. Si verifica quando la velocità della fase mobile è elevata e l'analita ha una forte affinità per la fase stazionaria, in tal caso l'analita nella fase mobile eluirà più velocemente dell'analita nella fase stazionaria provocando allargamento di banda. Maggiore è la velocità della fase mobile, maggiore sarà l'allargamento.

3.3 Gascromatografia bidimensionale *comprehensive*

Generalmente, la gascromatografia è la tecnica analitica utilizzata per la separazione di composti volatili o volatilizabili, applicata a diversi campi tra cui: petrolchimico, per il monitoraggio dell'inquinamento ambientale, in campo alimentare sia per analisi *target* che *untarget*. Il primo articolo scientifico in cui si fa uso della gascromatografia risale al 1952, in cui James e Martin ottengono l'eluizione e la separazione di acidi grassi a catena corta andando inoltre ad indagare diversi parametri fisici legati alla separazione e dimostrando che la tecnica mostrava una buona

riproducibilità [2]. Dal 1952 ad oggi tale tecnica viene utilizzata per ricerca scientifica e analisi di routine in diversi campi.

A partire dalla sua introduzione commerciale avvenuta nel 1954, la strumentazione gascromatografica ha subito una costante evoluzione permettendo performance sempre migliori; tuttavia, la strumentazione di base è rimasta pressoché invariata. Infatti, tutti i sistemi gascromatografici sono costituiti da un forno a temperatura controllata al cui interno viene alloggiata la colonna che permette di ottenere la separazione degli analiti. Un'estremità della colonna è collegata ad un sistema di iniezione del campione (iniettore) composto da un corpo metallico a temperatura controllata e una camera di iniezione vera e propria costituita da un *liner* in vetro disattivato chimicamente in modo da non contenere siti attivi che possano ritenere gli analiti che vengono al suo interno introdotti attraverso l'uso di una siringa (qualora si tratti di introduzione di campioni allo stato liquido). Attraverso l'iniettore, un sistema termoregolabile, i nostri analiti vengono volatilizzati ed una parte di essa o la sua totalità è introdotta in colonna. L'iniettore è collegato ad una fonte di gas carrier (che può essere costituita da H₂, He, N₂, Ar, CH₄ e non deve presentare affinità chimica sia per gli analiti che per la fase stazionaria) che attraverso l'uso di un regolatore di pressione permette di regolare il flusso interno alla colonna cromatografica ad esso collegata durante tutta la durata dell'analisi. L'estremità terminale della colonna è normalmente collegata ad un rivelatore che permette di monitorare l'eluizione dei composti producendo un cromatogramma (figura 3). Il segnale registrato dal detector (riportato sull'asse delle y) è proporzionale alla quantità di analita eluito nell'esatto momento (riportato sull'asse delle x) permettendone un uso a scopo quantitativo. Colonna cromatografica e iniettore sono alloggiati all'interno di un forno ventilato e termostato. In base alla natura del rivelatore possono essere acquisite informazioni sia di tipo quantitativo che qualitativo (come nel caso dell'uso di spettrometri di massa che permettono di acquisire informazioni sulla frammentazione ionica delle molecole eluite). Uno schema semplificato di un sistema GC è mostrato in figura 4.

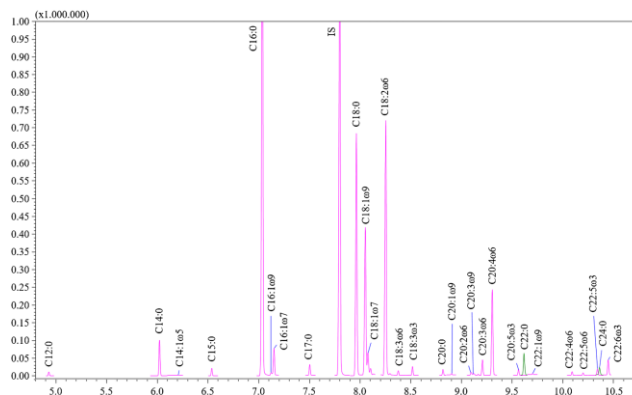


Figura 3. Esempio di cromatogramma GC di una separazione di acidi grassi

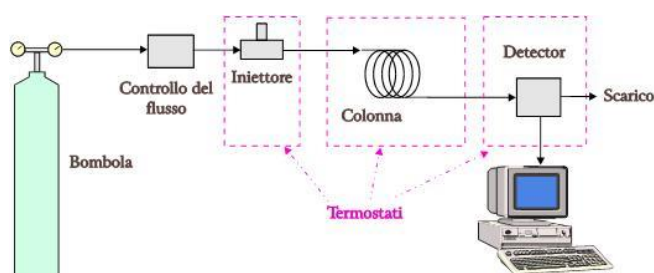


Figura 4. Schema semplificato di un gascromatografo.

Seppur il numero di piatti teorici (e quindi di composti che possono essere separati) è sempre più elevato del numero di molecole realmente presenti nel campione da analizzare, un problema legato all'analisi di campioni complessi attraverso l'uso della gascromatografia è la possibilità di incorrere in co-eluzioni che non permettono la corretta identificazione dei composti e/o l'impossibilità di una eventuale quantificazione. Tale problema è legato alla caratteristica fisica secondo la quale gli analiti vengono separati, ovvero la pressione di vapore che nel caso di composti con valori molto vicini non permette di ottenere una separazione apprezzabile. Per sopperire a tale problema è possibile far uso della gascromatografia bidimensionale *comprehensive* (GC×GC). Tale tecnica, inventata nel 1991 da Phillips [3], consiste nell'ottenere dei tagli continui dell'eluato proveniente dalla prima colonna analitica (¹D) trasferendolo rapidamente in una seconda colonna (²D) con natura chimica della fase stazionaria (o polarità per meglio dire) differente dalla prima. Il trasferimento degli analiti tra le due dimensioni cromatografiche avviene ad opera di un sistema chiamato modulatore. In figura 5 viene riportata una rappresentazione semplificata di un sistema GC×GC.

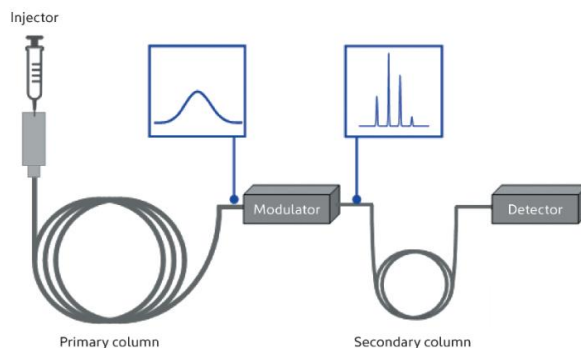


Figura 5. Schema semplificato di un sistema GC×GC.

È opportuno sottolineare che durante tutta la durata dell'analisi gli analiti sono soggetti ad una separazione dovuta a due differenti fattori, nella ¹D sono soggetti a separazione secondo la relazione tra tensione di vapore e temperatura che determina il punto di ebollizione; invece, la separazione ad opera della ²D è dovuta all'attività dei singoli analiti con la fase stazionaria. Le colonne utilizzate come ²D, inoltre, sono molto corte permettendo separazioni rapide a temperatura isoterma (o quasi). La separazione effettuata su due colonne indipendenti l'una dall'altra comporterà che ogni analita presenterà due tempi di ritenzione identificativi, il tempo di ritenzione in prima dimensione e il tempo di ritenzione di seconda dimensione (Figura 6), a differenza di come avviene con l'uso della gascromatografia 1D in cui vi è un solo tempo di ritenzione per analita. Va evidenziato che i profili cromatografici e le separazioni avvenute in ¹D devono essere mantenute quando le molecole subiscono la modulazione ed eluiscono dalla ²D. Tali condizioni, che devono essere rispettate e sono alla base delle separazioni *comprehensive*, sono state descritte nel 1987 da J. C. Giddings [4].

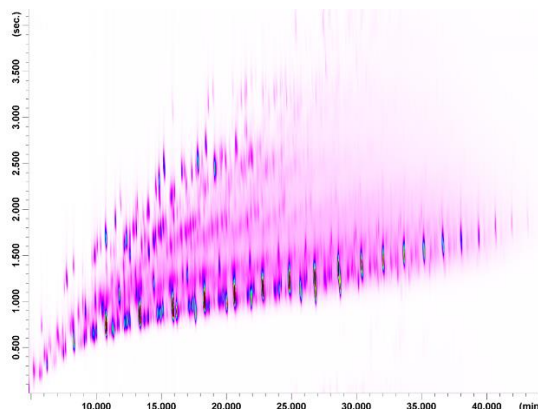


Figura 6. Rappresentazione di un cromatogramma GC×GC di un campione di diesel.

Il cromatogramma bidimensionale mostrato in figura 6 è stato ottenuto usando un modulatore a flusso, una colonna di prima dimensione apolare (SLB-5ms 20 m × 0.18 mm ID × 0.18 d_f μ m) ed una seconda dimensione mediamente polare (SLB-35ms 5.0 m × 0.32 mm × 0.25 d_f μ m ID).

Per quanto riguarda la scelta delle fasi stazionarie tra 1D e 2D non ci sono limiti sull'utilizzo di un set-up apolare × polare o di tipo inverso, la scelta va effettuata esclusivamente tenendo in considerazione la natura chimica dei composti presenti nel campione da analizzare. Ad esempio, nel caso in cui si utilizzi come 2D una fase stazionaria maggiormente polare della prima, gli analiti più polari saranno maggiormente ritenuti (di analiti meno polari) presentando un più lungo tempo di ritenzione in seconda dimensione, permettendo di poter distinguere le singole molecole anche in base alla loro polarità. Tale principio prende il nome di ortogonalità e può essere rappresentato graficamente sostituendo nel plot bidimensionale i tempi di ritenzione nei due assi x e y rispettivamente con volatilità (temperatura di ebollizione) e polarità.

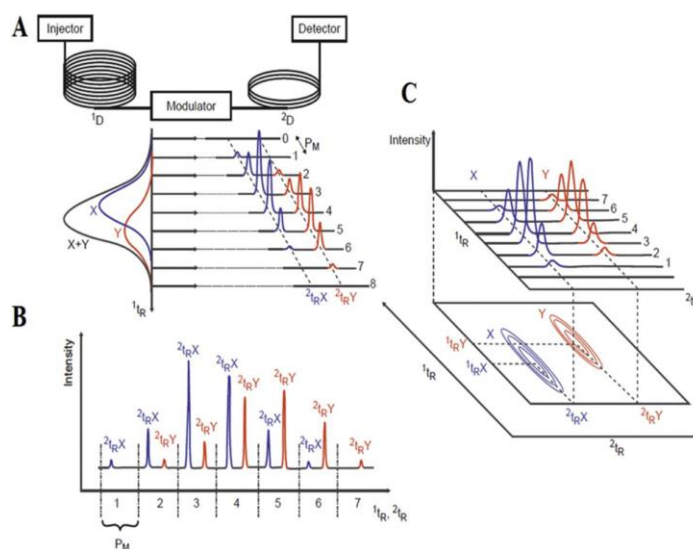


Figura 7. Esempio di ricostruzione di un cromatogramma bidimensionale.

A: Schema di un sistema GC×GC; B: cromatogramma raw non modificato;
C: cromatogramma raw modificato e plot bidimensionale.

Come è possibile notare dalla figura 7, i composti presenti all'interno di una stessa modulazione presentano lo stesso tempo di ritenzione (e quindi simili pressioni di vapore) in prima dimensione e differenti tempi in seconda dimensione. L'eluzione

dalla 1D viene rappresentata sull'asse delle x, mentre la 2D è riportata sull'asse delle y. Le separazioni in seconda dimensione essendo molto veloci (ed in condizioni quasi isoterme) vengono espresse in secondi, invece la separazione oggetto della prima dimensione, seguendo i canoni delle separazioni convenzionali, viene espressa in minuti.

L'uso della gascromatografia bidimensionale *comprehensive* presenta una serie di vantaggi:

- aumento del potere separativo (migliore potere risolutivo) dovuto ad un aumento della *peak capacity* rispetto ad analisi monodimensionali, in GC×GC la *peak capacity* del sistema si ottiene moltiplicando le *peak capacities* di entrambe le colonne analitiche;
- velocità di analisi maggiore, prendendo in considerazione il maggior numero di picchi risolti nello stesso tempo impiegato per un'analisi monodimensionale;
- selettività e ottenimento di un pattern ordinato dei composti nel piano bidimensionale, dovuto alla differente affinità degli analiti con la colonna utilizzata come seconda dimensione, in quanto l'intero campione è soggetto a separazione su due differenti fasi stazionarie. Tale caratteristica può essere sfruttata nel caso di un tentativo di identificazione di composti ignoti e per i quali non si dispone di standard puri per il confronto diretto;
- sensibilità: i due meccanismi separativi differenti hanno anche influenza sul rumore chimico proveniente dal campione, in tal modo il rumore chimico viene allontanato dagli analiti. Inoltre, nel caso dell'uso di modulatori criogenici vi è anche un aumento del rapporto S/N dovuto ad una compressione della banda cromatografica, reiniettata in seconda dimensione, generata dal modulatore stesso.

Volendo indagare sul concetto di dimensionalità del campione introdotto da Giddings e ortogonalità basato sulla differenza tra i diversi meccanismi di interazione analita/fase stazionaria delle due dimensioni è possibile distinguere tre casi [4]. La separazione ortogonale, in cui tutto (o quasi) il piano di separazione è occupato dagli analiti. La separazione con correlazione, in cui gli analiti si distribuiscono al centro del

cromatogramma centrati da due diagonali immaginarie. La separazione con correlazione totale in cui gli analiti si dispongono lungo una diagonale che attraversa il piano bidimensionale. Per ovvie ragioni non esiste un set-up di colonne universale ma, le due dimensioni di separazione (sia in termini di fase stazionaria che di lunghezza delle colonne) vanno individuati caso per caso.

Ciò che distingue un sistema gascromatografico monodimensionale da quello bidimensionale *comprehensive* è la presenza di un'interfaccia, chiamata modulatore, interposta tra le due colonne separative. Il modulatore, che può essere considerato come un iniettore online interno al sistema, ha il compito di campionare e trasferire l'eluato proveniente dalla prima dimensione alla seconda colonna analitica. Il modulatore deve avere la capacità di trasferire l'eluato in modo rapido e costante in testa alla seconda dimensione garantendo che la separazione ottenuta in prima dimensione non venga inficiata da tale processo. Tale processo di trasferimento viene operato in continuo durante tutta la durata della separazione cromatografica. Il tempo che intercorre tra il campionamento di una frazione di eluato, la sua iniezione in testa alla seconda dimensione e l'inizio del campionamento della frazione successiva prende il nome di periodo di modulazione (P_M) ed è solitamente nell'ordine di tempo dei secondi (solitamente compreso tra i 3 e 6 secondi). Idealmente, il cromatogramma monodimensionale proveniente dalla prima dimensione viene tagliato dal modulatore producendo la separazione bidimensionale e l'ottenimento dei plot 2D. Generalmente il periodo di modulazione viene impostato in modo da evitare che inizi una seconda modulazione prima che il precedente trasferimento in seconda dimensione non sia completamente eluito, evitando di produrre un effetto che prende il nome di *wraparound*. In termini di separazione, il *wraparound* non sempre genera nuove coeluzioni per cui può non inficiare sulla separazione cromatografica. Il *wraparound* si verifica quando il tempo di eluizione di un determinato analita è superiore al tempo di modulazione.

Grazie all'uso del modulatore le due colonne possono essere inoltre alloggiare in due forni cromatografici separati, potendo così impostare due programmate di temperatura differenti migliorando la separazione degli analiti. La modulazione stessa può avvenire alla temperatura del primo o del secondo forno.

3.3.1 I Modulatori: introduzione e cenni teorici

A partire dalla sua invenzione nel 1991 diversi modulatori sono stati sviluppati sfruttando diverse proprietà fisiche per ottenere la modulazione dell'eluato. La caratteristica che accomuna tutti i sistemi di modulazione è quella di dover intrappolare, eventualmente focalizzare e re-iniettare, continuamente durante tutta la corsa cromatografica gli analiti tra due colonne con fase stazionaria differente. Senza tale sistema di taglio e reiniezione la separazione bidimensionale non avverrebbe [5]. Una delle condizioni che devono essere rispettate nelle separazioni bidimensionali è quella che la separazione avvenuta in prima dimensione deve essere preservata, per tale motivo l'eluato proveniente dalla prima dimensione deve essere più volte campionato in modo da evitare la coeluzione di composti che sono stati già separati. È importante usare parametri di modulazione in modo da campionare ciascun picco tre o quattro volte [6,7]. Come descritto da Khummueng *et al.* nel 2006, il periodo di modulazione può essere meglio descritto con il termine rapporto di modulazione (*Modulation Ratio - MR*) riportato nell'equazione 7.

$$MR = \frac{w_b}{P_M} \text{ Equazione 7}$$

dove w_b rappresenta la larghezza del picco alla base e P_M il periodo di modulazione [7]. Inoltre, un altro aspetto da tenere in considerazione è la fase della modulazione, descritta come la differenza tra l'apice del picco proveniente dalla prima dimensione e la media della parte campionata dal modulatore. Il grado di fase della modulazione influenza la ricostruzione dei picchi in 2D . Esistono tre differenti situazioni: in fase in cui l'apice del picco in prima dimensione corrisponde con l'apice di una modulazione, fuorifase di 180 gradi in cui ci sono due picchi centrali modulati che mostrano la stessa intensità e altri tipi di modulazioni fuori fase in cui il campionamento è di tipo asimmetrico [8]. Un esempio delle tre differenti situazioni è rappresentato nella figura 8. Sfortunatamente, vista la naturale distribuzione casuale degli analiti non è possibile prevedere né modificare con quale fase verrà modulato un picco e in un'unica corsa cromatografica bidimensionale si avranno molti e differenti casi di campionamento. Per tale motivo per le analisi di tipo quantitativo va utilizzato la somma delle aree delle singole modulazioni [8].

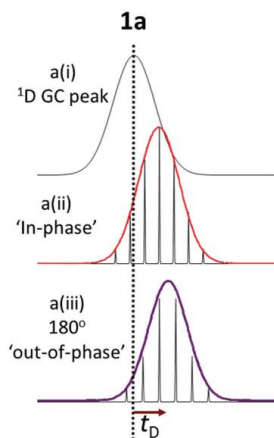


Figura 8. Dall'alto verso il basso: picco non modulato, picco modulato in fase e picco modulato fuori fase di 180°.

Nel corso degli anni differenti modulatori sono stati sviluppati, una classificazione generale può essere effettuata dividendoli in modulatori termici e modulatori a flusso. Questi ultimi vengono suddivisi in *differential flow* che solitamente è un modulatore in cui il trasferimento tra ¹D e ²D è completo ed in cui due flussi di gas carrier indipendenti permettono di generare la modulazione e alimentano le due colonne, e *diverting flow* in cui il trasferimento tra le due colonne analitiche è parziale ed una parte di eluato proveniente dalla prima dimensione non viene modulato ed analizzato [9]. Prendendo in considerazione questo ultimo aspetto i modulatori possono essere divisi in *low duty cycle* (in cui una parte di eluato proveniente dalla prima dimensione non viene modulato ma inviato ad uno scarico) e *high (o unit) duty cycle* (in cui tutto ciò che è stato introdotto in prima dimensione è stato poi modulato) [9,10].

3.3.1.1 Modulatori termici

Con il termine modulatore termico ci si riferisce all'interfaccia che usa una variazione di temperatura per attuare il processo di modulazione. Tutti i modulatori termici sono caratterizzati dal *duty cycle* unitario.

I modulatori termici si dividono in quelli "basati sul riscaldamento" in cui gli analiti vengono focalizzati passivamente in un segmento di colonna solitamente a temperatura ambiente e successivamente sono rimobilizzati tramite il rapido riscaldamento di quel tratto di colonna stessa. Tra questi modulatori troviamo:

- Thermal desorption modulator (TDM): realizzato da Phillips nel 1991, utilizzando un approccio inizialmente chiamato multiplex [11,12], il TDM fu successivamente utilizzato per scopi di ricerca ma non fu mai commercializzato. Il sistema prevedeva che la modulazione venisse condotta su un segmento di 15 centimetri in testa alla colonna 2D posti al di fuori del forno GC (quindi a temperatura ambiente) dove gli analiti venivano focalizzati. Tale segmento di colonna era rivestito da una vernice elettricamente conduttiva che permetteva il veloce riscaldamento del segmento di colonna tramite applicazione di corrente elettrica e il desorbimento termico degli analiti. Il sistema di modulazione del TDM può essere classificato come *dual-stage* e un suo schema e il suo funzionamento sono riportati in figura 9.

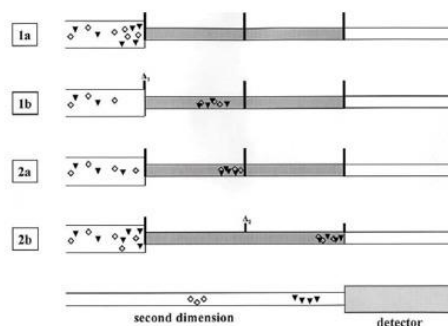


Figura 9. Schema e funzionamento del *thermal desorption modulator*.

- Thermal sweeper modulator: descritto per la prima volta nel 1996 [13] è noto per essere stato il primo modulatore disponibile in commercio ed introdotto da “Zoex Corporation” nella versione definitiva a partire dal 1999. Il suo funzionamento è dovuto alla presenza di un riscaldatore rotante a doppia faccia che permette di riscaldare il capillare di modulazione e rifocalizzare gli analiti in testa alla seconda dimensione. Tale processo che avviene ad una temperatura di 280 °C deve essere abbastanza veloce da evitare fenomeni di *breathrough*. Il problema legato a questo tipo di modulatore è che per funzionare correttamente, deve esserci una differenza di temperatura tra il riscaldatore rotante e il capillare di modulazione di almeno 100 °C. Ovviamente ciò si ripercuote negativamente sul suo uso in quanto va a limitare il range di volatilità dei composti che potrebbero essere analizzati. Uno schema e il funzionamento del *thermal sweeper modulator* sono riportati in figura 10.

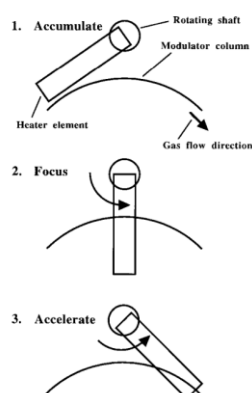


Figura 10. Schema e funzionamento del *thermal sweeper modulator*.

Una seconda classe di modulatori termici è quella che va sotto il nome di modulatori criogenici. In questo caso la focalizzazione degli analiti avviene attraverso l'uso di una trappola criogenica a temperatura nettamente inferiore rispetto a quella del forno cromatografico. Tra i modulatori criogenici presenti in commercio troviamo:

- *Longitudinal modulated cryogenic system* (LMCS): il LMCS fu sviluppato da Kinghorn e Marriott nel 1997 [14]. Il sistema è costituito da una trappola criogenica cilindrica che si muove longitudinalmente ed esternamente al capillare di modulazione permettendo la doppia focalizzazione degli analiti. Il desorbimento invece è dovuto dalla temperatura in cui si trova il forno cromatografico in quel momento. Un problema legato all'uso di questo modulatore è che la rimobilitazione degli analiti spesso risentiva della temperatura del forno al momento della reiniezione specialmente per gli analiti altobollenti. Uno schema è riportato in figura 11.

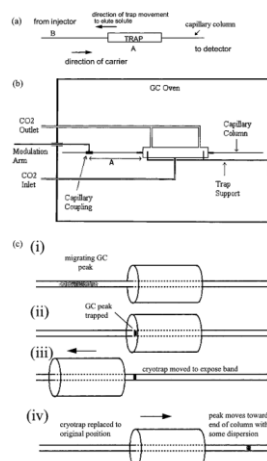


Figura 11. Schema e funzionamento del *longitudinal modulated cryogenic system*.

- Jet-cooled thermal modulator: questo modulatore, comunemente chiamato anche *dual-stage jet modulators* o *quad jet modulator* è stato introdotto da Ledford nel 2000 [15]. Il modulatore è composto da due getti caldi e due getti freddi posti uno di fronte all'altro e che funzionando in modo alternato di attuare la modulazione in due stadi. Uno schema sul funzionamento è presente nella figura 12. Questo modulatore è disponibile in commercio in due configurazioni, una *consumable free* che permette di modulare in un intervallo da C8 a C40 in cui un refrigeratore a circuito chiuso viene usato per generare il getto freddo e una variante che permette di modulare da C4 a C40 che utilizza invece azoto liquido per generare il getto freddo.

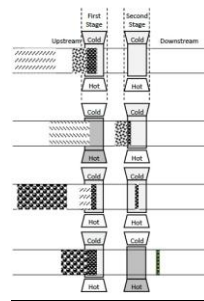


Figura 12. Schema e funzionamento del *jet-cooled thermal modulator*.

- Dual-jet loop modulator: questo modulatore, introdotto sempre da Leadford, può essere visto come una versione semplificata del modulatore visto precedentemente. In questo caso sono presenti un solo getto caldo e freddo e i due stadi di modulazione sono creati dall'avvolgimento in loop del capillare di modulazione stesso che sarà posizionato per due volte (due sezioni differenti del capillare) in concomitanza dei getti caldo e freddo come mostrato in figura 13. Solitamente come capillare di modulazione si utilizza una colonna priva di fase stazionaria anche se nulla vieta di poter usare la parte terminale o la parte iniziale rispettivamente della prima e seconda dimensione. Il getto freddo è diretto verticalmente verso il basso sul capillare di modulazione, ed opera continuamente senza interruzioni generando così due punti freddi. Invece, il getto caldo di azoto gassoso viene attivato ad impulsi regolari e brevi (solitamente nell'intorno dei 350ms) deviando il getto freddo dal capillare di modulazione. Il getto caldo si trova perpendicolarmente a quello freddo e

riscalda rapidamente i punti freddi, rimobilizzando gli analiti intrappolati. Questo modulatore funziona essenzialmente allo stesso modo del modulatore visto precedentemente ed è disponibile in commercio sia nella configurazione *consumable free* sia con l'uso di azoto liquido per generare il getto freddo.

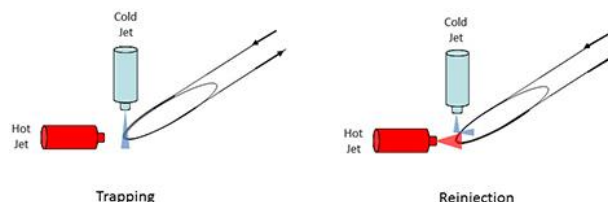


Figura 13. Schema e funzionamento del *dual-jet loop modulator*.

3.3.1.2 Modulatori a flusso

I modulatori a flusso sono caratterizzati da un'interfaccia che prevede l'uso di un gas carrier ausiliario (stesso gas carrier usato all'iniettore) per generare un flusso aggiuntivo permettendo di intrappolare l'eluato proveniente dalla ¹D e reiniettarlo nella ²D. Una classificazione dei modulatori a flusso come precedentemente visto è quella introdotta da Synovec nel 2019, dividendoli in: *differential flow modulators* e *diverting flow modulator*. Un'altra classificazione era stata precedentemente introdotta da Tranchida che ha classificato i modulatori in due sottocategorie [16]: sistemi che prevedono l'uso di valvole "in linea", caratterizzati dalla presenza di una valvola che devia i flussi con collegamento diretto con la prima e la seconda colonna analitica; sistemi di valvole "fuori linea", quelli che derivano dal principio "Deans switch" e si basano quindi sulla manipolazione di differenza di pressione tra le due dimensioni GC.

Di seguito vengono riportati i principali modulatori a flusso secondo l'ordine di comparsa cronologica in pubblicazioni scientifiche e cercando di creare una cronostoria di come è evoluta la gascromatografia *comprehensive* con modulatori a flusso:

- *Low duty cycle flow modulator*: La comparsa del primo modulatore a flusso in una pubblicazione scientifica risale al 1998 quando Bruckner e colleghi pubblicano il lavoro "Comprehensive Two-Dimensional High-Speed Gas Chromatography with Chemometric Analysis" introducendo l'uso di questi modulatori. Il sistema presentato dagli autori, che rientra tra i *differential flow*, prevedeva l'uso di una valvola a diaframma a sei porte posizionata direttamente

all'interno del forno. Due delle porte della valvola erano usate per collegare la prima dimensione che era costituita da una colonna apolare con fase stazionaria di poli(dimetilsilossano) delle dimensioni $4,9\text{ m} \times 530\text{ }\mu\text{m ID} \times 3,0\text{ }\mu\text{m }d_f$ e la seconda dimensione costituita da una fase stazionaria maggiormente polare di glicole polietilenico $0,85\text{ m} \times 180\text{ }\mu\text{m ID} \times 0,15\text{ }\mu\text{m }d_f$. Inoltre, per ridurre i flussi in seconda dimensione è stato applicato uno *split* usando una colonna da $0,5\text{ m} \times 180\text{ }\mu\text{m ID}$. Le altre due porte della valvola erano collegate a una fonte di gas carrier ausiliario per alimentare la seconda dimensione e a una linea di scarico, in modo da poter generare la modulazione.

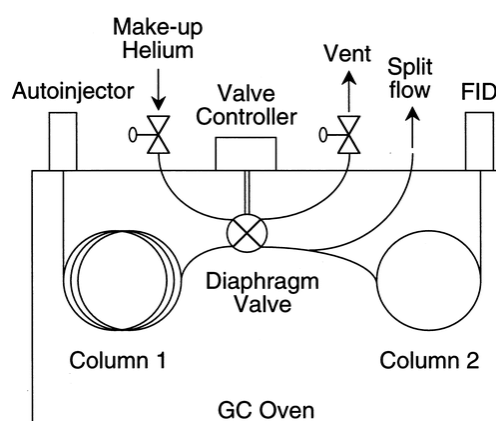


Figura 14. Schema del *low duty cycle flow modulator*.

La modulazione veniva eseguita tramite il controllo della posizione della valvola che permetteva di mettere in connessione la prima dimensione con la seconda dimensione o la linea di scarico permettendo di trasferire l'eluato in una delle due linee. Inoltre, permetteva di alimentare la seconda dimensione durante il periodo di scarico tramite l'uso di una linea di gas carrier ausiliario. Cambiando i tempi di trasferimento tra la seconda dimensione e la linea di scarico veniva modificato il tempo di modulazione e quindi anche il *duty cycle*. In questo specifico lavoro il PM era pari a 500 ms con 50 ms di reiniezione, che si traducono in un *duty cycle* pari a 0,1. Dunque, uno dei problemi legato a questo modulatore è legato alla sensibilità dovuta alla percentuale di eluato trasferito tra le due dimensioni senza tenere conto dell'ulteriore *split* in seconda dimensione. Un ulteriore problema è legato all'uso della valvola interna al forno che permetteva di raggiungere temperature di analisi non superiori a 175

°C [17]. Uno schema del modulatore è riportato in figura 14. Il problema relativo ai limiti massimi di temperatura usando questo modulatore è stato risolto nel 2003 quando lo stesso sistema è stato presentato con una configurazione in cui la valvola era posta esternamente al forno estendendo la temperatura di analisi fino a circa 250 °C [18].

- Loop flow modulator: Introdotta da Seeley, l'uso del *loop* di campionamento nella modulazione a flusso, ha risolto in parte il problema relativo al basso *duty cycle* del modulatore discusso in precedenza. Lo scopo del *loop* è quello di raccogliere l'eluato proveniente dalla ¹D, prima di trasferirlo nella ²D, permettendo quindi un maggiore trasferimento e producendo un miglioramento della sensibilità di rivelamento. Questo modulatore a *loop* era costituito da una valvola a diaframma a sei porte e due posizioni, due delle porte permettevano di collegare il *loop* di campionamento costituito di acciaio inossidabile avente un volume di 20 µL. Un flusso di gas carrier ausiliario collegato ad una porta della valvola permetteva di alimentare continuamente la seconda dimensione analitica quando la valvola era in posizione di riempimento del *loop*, mentre quando la valvola cambiava di posizione il flusso proveniente dalla ¹D permetteva di svuotare l'eluato campionato e reiniettarlo nella seconda dimensione. Durante la fase di eluizione in seconda dimensione, che avveniva a flussi molto elevati, veniva nuovamente campionato l'eluato proveniente dalla prima dimensione e l'eluato in eccesso veniva indirizzato verso una porta di scarico collegata all'uscita del *loop* di campionamento. La parte della valvola e tutte le connessioni con le colonne e il *loop* di campionamento erano posti al di fuori del forno e mantenuti ad una temperatura di 125 °C attraverso un riscaldatore ausiliario. Le due colonne utilizzate nel primo lavoro in cui è stato utilizzato questo modulatore avevano le seguenti caratteristiche: ¹D 10 m × 250 µm ID × 1,4 µm d_f (6% cianopropilfenile, 94% dimetilpolisilossano) e ²D: 5 m × 250 µm ID × 0,25 µm d_f (polietilenglicole) [19]. Uno dei problemi di questo modulatore è anche in questo caso legato alla temperatura massima di esercizio che non permetteva l'analisi di analiti che richiedevano una

temperatura del forno superiore a 200 °C in quanto questi sarebbero riconsolidati nella valvola che si trovava ad una temperatura inferiore. Visti gli alti flussi utilizzati in seconda dimensione, pari a 15 mL min⁻¹, questo modulatore non poteva essere accoppiato con rivelatori di spettrometria di massa, il che costituiva un ulteriore svantaggio. Una soluzione per poter accoppiare questo tipo di modulatore agli spettrometri di massa è quello di applicare uno *split* alla seconda dimensione (sia collegando due detector, sia mandando ad uno scarico parte dell'eluato della seconda dimensione), riducendo la sensibilità di rivelazione degli analiti. Uno schema di questo modulatore in fase di accumulo è riportato in figura 15.

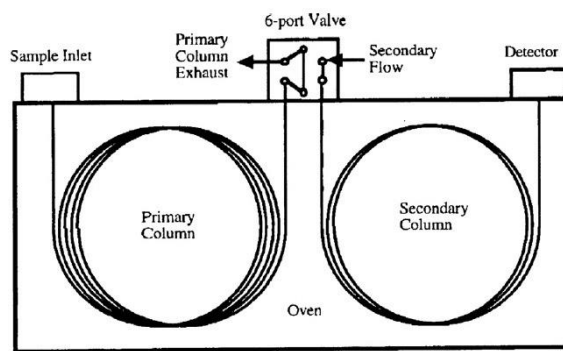


Figura 15. Schema del *loop flow modulator* con posizione della valvola in fase di accumulo.

- *Dual-stage flow modulator*: introdotto da Seeley nel 2006, prende il nome di modulatore a flusso a doppio stadio, ed era costituito da una valvola a tre vie e due posizioni posta esternamente al forno a cui erano collegati un flusso di gas carrier ausiliario e due capillari di silice fusa (senza fase stazionaria). Ciascun capillare a sua volta era collegato internamente al forno ad un raccordo a T. Uno dei raccordi a T era collegato all'uscita della ¹D, mentre l'altro era collegato alla parte iniziale della ²D. Inoltre, un ulteriore capillare in silice fusa (privo di fase stazionaria) metteva in collegamento i due raccordi a T realizzando un loop di campionamento con un volume di 24 µL. Nel lavoro pubblicato da Seeley venivano utilizzate in ¹D una colonna non polare da 15 m × 250 µm ID × 0,50 µm d_f (flusso: 1,0 mL min⁻¹), mentre in seconda dimensione sono state impiegate due colonne polari da 5 m × 250 µm ID, una con un fase stazionaria di polietilenglicole da 0,25 µm e l'altra con fase di

poli(metiltrifluoropropilsilossano) da $0,50\ \mu\text{m}$ [20]. Lo schema del modulatore è mostrato in figura 16.

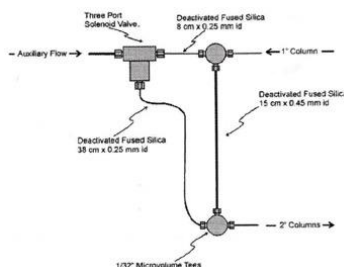


Figura 16. Schema della valvola e connessioni usate nel modulatore *dual-stage flow modulator*.

Il nome del modulatore “*dual stage*” deriva dai due step di funzionamento che si dividono in fase di accumulo in cui il flusso ausiliario di $20\ \text{mL min}^{-1}$ è diretto in modo da alimentare la ^2D , in tal modo il flusso proveniente dalla ^1D può riempire il *loop* di campionamento. Nello step successivo la valvola cambia di posizione, il flusso ausiliario svuoterà il contenuto del *loop* di campionamento in testa alla ^2D . La fase 2, ovvero quella di reiniezione è molto rapida, nell’ordine dei 100 ms; mentre, quella precedente e di riempimento del *loop* è nell’ordine dei s. Uno dei problemi legati a questo modulatore è la relativa complessità nell’ottimizzazione del metodo, dei flussi e dei tempi di modulazione. In generale, durante la fase di accumulo/riempimento del *loop* non si deve eccedere con i tempi di accumulo (che si traducono in volume di eluato accumulato) per non incorrere nel problema del *breakthrough* del *loop*. Inoltre, in fase di reiniezione in ^2D il tempo deve essere abbastanza lungo da permettere il completo svuotamento del *loop*.

A differenza dei modulatori a flusso visti precedentemente, con l’uso di questo modulatore non ci sono restrizioni relative alla temperatura massima di esercizio e quindi all’analisi di analiti altobollenti. Inoltre, tutto l’eluato proveniente dalla prima dimensione veniva modulato e trasferito in seconda dimensione, facendo di questo il primo modulatore a flusso a *duty cycle* unitario. Sullo schema dello stesso tipo di modulatore a flusso, nel 2011, Tranchida sviluppa e propone un modulatore *dual-stage* a flusso differenziale caratterizzato dall’uso di una valvola a tre vie e due posizioni collegata tramite due capillari metallici ad un *wafer chip* a 7 porte posto all’interno del forno

GC. Il sistema proposto, oltre alla ridotta dimensione e robustezza costruttiva rispetto al sistema visto precedentemente, permette il collegamento in parallelo di una o due ²D o eventualmente una linea di scarico (collegata ad una valvola a spillo) senza ulteriori connessioni [21]. Uno schema del sistema sviluppato è riportato in figura 17. Negli esperimenti riportati nella pubblicazione “*A flexible loop-type flow modulator for comprehensive two-dimensional gas chromatography*” venivano utilizzate come ¹D una colonna con diametro interno di 100 μm a differenza delle precedenti applicazioni che vedevano l’uso di colonne con diametro interno convenzionale in ¹D. Inoltre, è stato sviluppato un metodo che prevedeva bassi flussi in prima dimensione (circa 0.5 mL min^{-1}), il che crea delle condizioni di campionamento e modulazione ottimali. Lo svantaggio legato all’uso di una colonna *micro-bore* in ¹D è la limitata *sample capacity*.

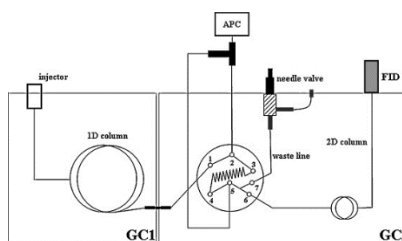


Figura 17. Schema della configurazione FM GC×GC.

- ***Multi-mode modulator***: introdotto da Seeley nel 2018, si basa sul principio di funzionamento del *Deans switch* in cui una valvola viene usata per controllare la pressione tra le due colonne e permettere il trasferimento dell’eluato tra le due dimensioni. I flussi tra le due colonne sono intimamente collegati e la valvola viene usata per deviare il flusso della prima dimensione alternativamente verso la ²D o una linea di scarico. Questo modulatore è caratterizzato da un capillare di giunzione metallico disattivato, collegato sul lato ¹D ad un raccordo a croce e ad un raccordo a T sul lato ²D. Le due dimensioni sono fissate all’interno del capillare di giunzione con un ridotto volume tra di esse. Due capillari metallici collegano i raccordi a un’elettrovalvola, che attraverso un controller di pressione ausiliario regola il flusso di gas *carrier* ausiliario (Fs). La quarta porta del raccordo a croce è collegata a un limitatore di flusso connesso ad un FID con la possibilità di

monitorare ciò che va verso la porta di scarico. Quando la valvola è in posizione normalmente aperta il flusso del gas è direzionato verso il raccordo a T e il flusso proveniente dalla 1^{D} è diretto allo scarico; nel momento in cui la valvola cambia di posizione passando a normalmente chiusa, l'eluato proveniente dalla 1^{D} viene indirizzato nella seconda e può quindi essere sottoposto a nuova separazione e raggiungere il detector. In base alla regolazione dei due flussi dei gas e della distanza tra le colonne 1^{D} e 2^{D} all'interno del capillare di giunzione, il MMM può funzionare come modulatore a basso *duty cycle* (*diverting flow modulator*) o alto *duty cycle* (*differential flow modulator*). Uno schema del MMM è riportato in figura 18.

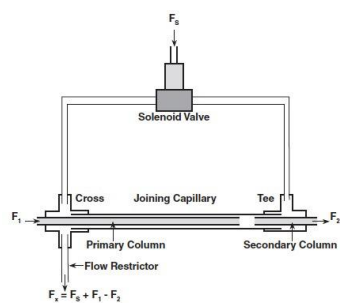


Figura 18. Schema del *multi mode modulator*.

Basato sul MMM, un *diverting flow modulator*, chiamato commercialmente *FLUX Modulator*, riportato in figura 19, è stato sviluppato e commercializzato da LECO. La prima pubblicazione in cui è stato usato questo modulatore è del 2019, in cui Aloisi [22] ottiene la separazione e quantificazione di allergeni presenti in campioni di profumo per il corpo dimostrando le potenzialità del *FLUX Modulator*.

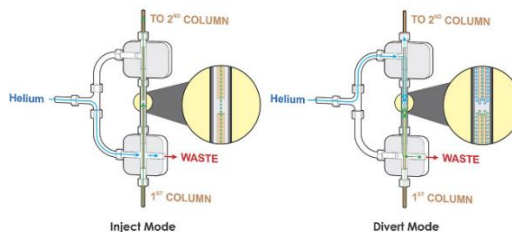


Figura 19. Schema del Flux Modulator. A sinistra durante la fase di reiniezione in second dimensione, a destra durante la fase di scarico.

- Dynamic pressure gradient modulator: nel 2020 Synovex introduce un modulatore in cui 1D e 2D sono direttamente connesse tra loro attraverso l'uso di due porte di un raccordo a T a volume ridotto, la terza porta invece è connessa ad una valvola ad impulsi che genera una pressione ausiliaria in testa alla 2D . Regolando in modo adeguato la pressione all'iniettore, la pressione ausiliaria e i tempi di apertura della valvola è possibile ottenere un'analisi *comprehensive* con *duty cycle* unitario. Quando la valvola è in condizioni di riposo l'eluato proveniente dalla 1D viene trasferito nella 2D , nel momento di apertura della valvola si crea un brevissimo *stop flow* del flusso proveniente dalla 1D mentre in 2D avviene la separazione. Il primo esperimento condotto con questo tipo di modulatore vedeva l'uso di una colonna apolare $10\text{ m} \times 0.18\text{ mm}$, $0.18\text{ }\mu\text{m } d_f$ in 1D e una 2D polare di dimensioni $1\text{ m} \times 0.18\text{ mm}$, $0.10\text{ }\mu\text{m } d_f$. Il periodo di modulazione era 750 ms , con 60 ms in cui la valvola era in posizione di riposo e permetteva il passaggio dell'eluato tra le due dimensioni. Tale sistema permette di generare picchi con un'ampiezza alla base nel range di $20\text{-}180\text{ ms}$. La pressione ausiliaria applicata e il *set-up* di colonne utilizzato generava un flusso in 2D di 22.9 mL min^{-1} [23]. Uno schema del modulatore utilizzato è riportato in figura 20.

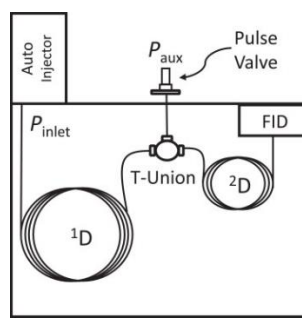


Figura 20. Schema del modulatore *dynamic pressure gradient modulator*.

3.4 I rivelatori, caratteristiche per l'accoppiamento con la GC×GC

Sia che si tratti di una separazione monodimensionale che di una separazione multidimensionale, la parte terminale delle colonne gascromatografiche sono solitamente connesse con un detector. Il rivelatore deve essere altamente sensibile, affidabile, avere una buona linearità in un intervallo di concentrazioni abbastanza grande, e i risultati ottenuti devono essere ripetibili e riproducibili. L'intervallo di

concentrazione di rivelabilità e la sua linearità sono dei fattori importanti specialmente nel caso di analisi di composti in tracce o di campioni altamente complessi nei quali vi è una certa differenza nella concentrazione dei diversi analiti. Uno schema delle diverse sensibilità e intervalli di concentrazione misurabili dei più comuni detector accoppiati alla gascromatografia è riportato in figura 21. Il rivelatore deve essere in grado di fornire informazioni non solo relative al tempo di ritenzione degli analiti e quindi a livello qualitativo ma anche a informazioni di tipo quantitativo.

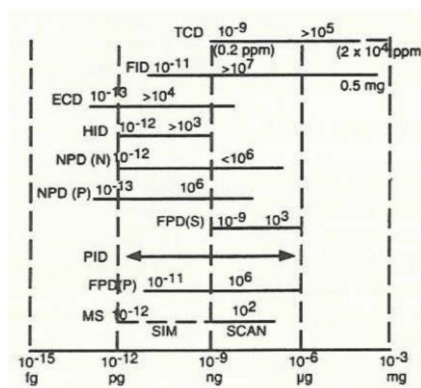


Figura 21. Intervalli di concentrazione e sensibilità di alcuni detector che possono essere usati in GC.

Una principale classificazione dei rivelatori li divide in universali e selettivi. I rivelatori universali permettono di misurare tutti (o quasi) gli analiti volatilizzabili presenti in un campione, c'è da sottolineare che composti aventi la stessa concentrazione possono generare una risposta del rivelatore differente. I rivelatori di tipo selettivo invece rispondono solamente ad alcune componenti della struttura molecolare degli analiti come avviene nel caso dell'uso del rivelatore azoto-fosforo (NPD) che permette di rivelare in modo quali-quantitativo solamente questi due elementi e quindi solamente gli analiti che li contengono. Di seguito saranno discussi il funzionamento del detector a ionizzazione di fiamma (FID) e degli spettrometri di massa a singolo e triplo quadrupolo.

Caratteristica fondamentale dei detector per poter essere accoppiati alla gascromatografia bidimensionale *comprehensive* è la velocità di acquisizione (*sampling rate*), in quanto per generare una buona ricostruzione cromatografica è necessario che un picco sia campionato circa 10-20 volte dal detector. La risposta in termini di frequenza del detector deve essere quindi modulabile in base all'ampiezza alla base del picco cromatografico in quanto se in un'analisi di tipo monodimensionale

ed in condizioni convenzionali l'ampiezza di un picco è nell'ordine dei secondi (10-15 s), nel caso di separazioni bidimensionali *comprehensive*, che possono essere assimilate a delle separazioni di tipo veloce, l'ampiezza dei picchi modulati sarà nell'ordine dei millisecondi (tra 50 e 650 ms circa). È necessario quindi che la frequenza di acquisizione del detector sia variabile e permetta di raggiungere una frequenza tale da acquisire un numero sufficiente di punti per picco e ottenere una corretta ricostruzione del profilo cromatografico. Per poter ottenere un numero di punti per picco tali da poter usare un determinato detector in analisi *comprehensive* la velocità di acquisizione deve poter essere settata tra i 20 e i 100 Hz [24].

3.4.1 Rivelatore a ionizzazione di fiamma

Il rivelatore a ionizzazione di fiamma (FID) è il sistema di rivelamento più comunemente utilizzato in GC per l'analisi di idrocarburi volatili e molti composti contenenti carbonio ed è classificato tra i rivelatori di tipo universale. È uno dei principali rivelatori accoppiati a GC×GC ed ha una velocità di acquisizione che può arrivare a 100 Hz. Possiede un intervallo di linearità per 7 ordini di grandezza e limiti inferiori di rivelamento nell'ordine dei picogrammi o femtogrammi. Una volta che gli analiti sono eluiti dalla colonna, vengono ionizzati da una fiamma idrogeno-aria e a quel punto verrà misurata la corrente di ioni prodotti che varia in proporzione alla concentrazione dell'analita. La corrente misurata viene convertita in tensione, filtrata ed eventualmente amplificata prima di essere trasmessa al sistema di registrazione per la realizzazione del cromatogramma. Uno schema costruttivo di un FID è mostrato in figura 22. La parte terminale della colonna è direttamente collegata al FID e il gas *carrier* (e gli analiti) entrano nella parte inferiore del rivelatore dove viene miscelato con il gas di combustione (H_2) e un eventuale gas di *make-up*. Questa miscela viene quindi combinata con aria e bruciata attraverso un getto metallico che funge anche da anodo (elettrodo positivo), mentre il catodo (elettrodo negativo) è posto al di sopra del getto stesso. Le particelle cariche che si vengono a creare durante il processo di combustione creano una corrente tra gli elettrodi del rivelatore. Le variazioni di conducibilità tra i due elettrodi vengono monitorate continuamente durante tutta la durata dell'analisi permettendo la ricostruzione del cromatogramma. Il FID è composto esternamente da un corpo metallico che viene mantenuto ad alta temperatura

(250-300 °C) per evitare che i gas prodotti dalla combustione possano condensare nel rivelatore danneggiandolo o riducendone le prestazioni.

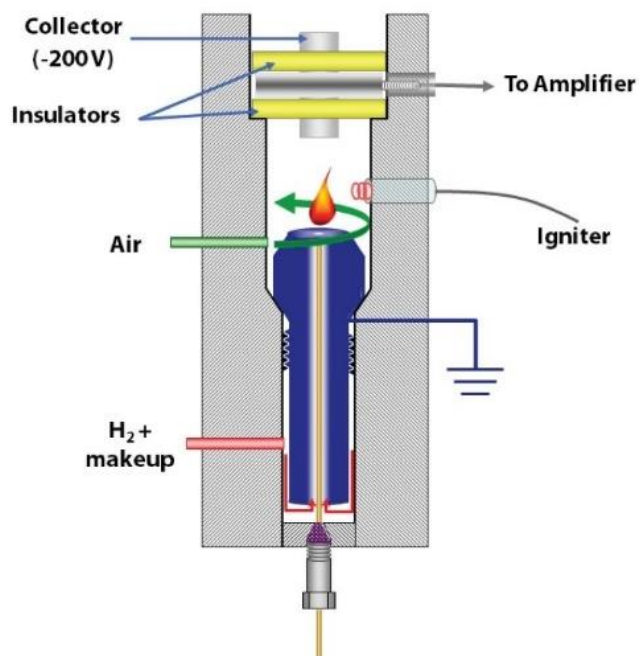


Figura 22. Schema costruttivo del FID.

3.4.2 Spettrometria di massa

Gli spettrometri di massa sono i detector che ci permettono di avere il maggior numero di informazioni relative ad un analita. Possono essere usati oltre che per un'analisi di tipo identificativa, con diversi gradi di accuratezza di massa in base al detector, anche per analisi di tipo quantitativa. Inoltre, accoppiati alla GC×GC, quella della spettrometria di massa (MS) può essere considerata come una terza dimensione separativa. Il primo uso di uno spettrometro di massa accoppiato a GC×GC risale al 1993 quando Frysinger and Gaines nel lavoro dal titolo “*Comprehensive two-dimensional gas chromatography with mass spectrometric detection (GC×GC/MS) applied to the analysis of petroleum*” utilizzano uno spettrometro di massa a singolo quadrupolo per analisi di un campione di diesel [25].

La principale funzione di un qualsiasi sistema MS è quello di generare ioni dagli analiti di partenza, separare gli ioni in base al rapporto massa/carica (m/z) e rivelarli qualitativamente e quantitativamente in base al m/z . I sistemi MS sono collegati ai GC tramite una *transfer line* metallica a temperatura controllata (per

evitare che gli analiti possano ricondensare) che funge da connessione tra la colonna cromatografica e il rivelatore permettendo di isolare lo spettrometro di massa dall'ambiente atmosferico. All'uscita della colonna è posta una sorgente ionica (che può essere a ionizzazione elettronica o ionizzazione chimica) che può operare in condizioni di pressione atmosferica o in condizioni di alto vuoto. È bene specificare che l'analizzatore di massa lavora invece solo in condizioni di alto vuoto. Un sistema di vuoto creato da apposite pompe genera una pressione (depressione) nell'ordine di 10^{-4} torr nella sorgente ionica e di 10^{-8} torr nell'analizzatore di massa. Il sistema viene mantenuto sottovuoto per evitare che gli ioni una volta che si sono formati vadano ad urtare tra di loro portando ad una ulteriore frammentazione che non rispecchierebbe quella del pattern che si è creato nella sorgente ionica. Un ulteriore beneficio del vuoto è quello di proteggere tutte le parti metalliche da possibili ossidazione e corrosione dovute alla presenza di aria o vapore acqueo.

Nel caso dell'uso della ionizzazione elettronica l'analita neutro viene investito da un fascio di elettroni ad alta energia formando un catione radicale (ione molecolare radicale $M^{+\bullet}$) il quale frammenterà immediatamente generando un pattern di ioni generalmente univoco e assolutamente riproducibile. A questo punto gli ioni vengono focalizzati e accelerati in un campo magnetico seguendo percorsi circolari secondo i m/z e registrati dall'analizzatore di massa.

In commercio sono disponibili diversi analizzatori di massa che possono essere divisi in due principali categorie: gli analizzatori a scansione che permettono solo agli ioni di un determinato m/z di giungere al detector in un determinato momento; tra questi troviamo gli strumenti a settore magnetico e quelli a quadrupolo. Invece strumenti come gli analizzatori di massa a tempo di volo (ToF), la trappola ionica o l'orbitrap, trasmettono tutti gli ioni contemporaneamente in un determinato intervallo di masse selezionato.

In figura 23 è riportato a titolo di esempio lo spettro di massa del fenthion ottenuto usando una sorgente a ionizzazione elettronica, il quale è rappresentato da un grafico con in ascissa gli ioni ordinati secondo il rapporto m/z , mentre in ordinata viene riportata l'abbondanza percentuale degli ioni. Lo ione con intensità maggiore, che viene chiamato picco base, può talvolta anche essere lo ione molecolare (MI), al quale viene assegnata un'abbondanza del 100%.

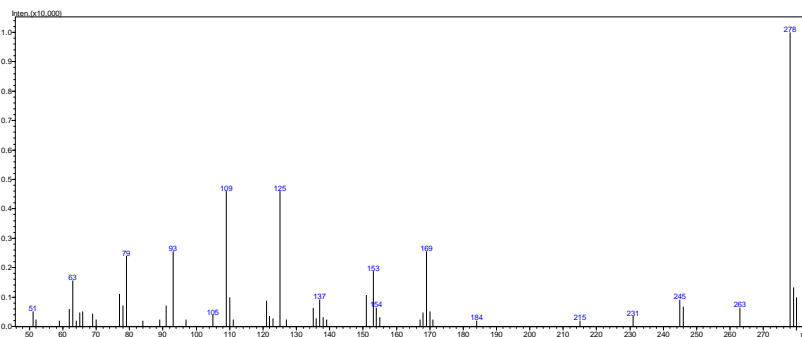


Figura 23. Spettro di massa del fenthion.

L'uso della spettrometria di massa è di notevole aiuto nell'identificazione di composti in miscele incognite in quanto la ionizzazione e frammentazione in sorgente è altamente riproducibile anche nei rapporti tra il picco base e gli altri ioni permettendo la comparazione degli spettri di massa sperimentali con quelli presenti nelle librerie di spettrali. In tal modo usando non solo il tempo di ritenzione dell'analita ma anche lo spettro presente sotto l'area del picco generato dalla corrente ionica totale è possibile aggiungere un ulteriore parametro di identificazione degli analiti. Uno schema generico di uno spettrometro di massa è riportato in figura 24.

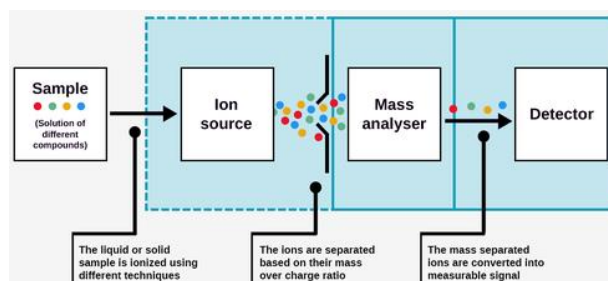


Figura 24. Schema semplificato di uno spettrometro di massa.

3.4.2.1 Spettrometria di massa a singolo quadropolo

Descritto per la prima volta nel 1953 da Paul e Steinwengen [26], l'analizzatore a singolo quadropolo (qMS) è costituito da quattro elettrodi cilindrici o iperboliche posti parallelamente tra loro ai vertici di un quadrato (Figura 25). Gli elettrodi, che vengono comunemente chiamati barre, hanno una lunghezza che varia da 15 a 25 cm e un diametro di 10-20 mm. Le barre opposte sono collegate elettricamente tra loro e si trovano collegate contemporaneamente ad una sorgente di corrente continua (DC) ed una di corrente alternata (RF variabile tra 1 e 4 MHz).

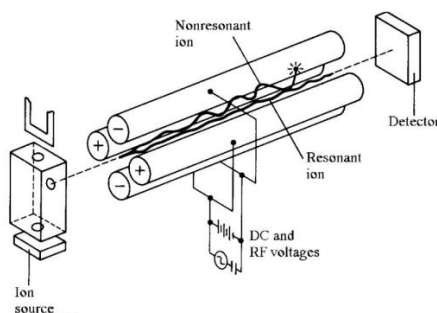


Figura 25. Rappresentazione schematica del quadrupolo.

Una coppia di barre avrà sempre potenziale positivo mentre l'altra coppia presenta potenziale negativo. La RF applicata alle barre di segno negativo ha una fase differente rispetto a quella applicata alle barre positive, tale differenza serve a far variare polarità e voltaggio delle barre a secondo della radiofrequenza applicata. La separazione di massa avviene tramite il movimento oscillante ad alta frequenza che si crea applicando una combinazione di potenziali di corrente continua e di radiofrequenza agli elettrodi [27], la tensione applicata alle barre è tra 102 e 103 V. Quando gli ioni entrano nello spazio tra le barre saranno interessati da un movimento oscillatorio in direzione x e y la cui ampiezza dipende dalla massa dello ione e dalla frequenza del potenziale applicato alle barre. Ioni di segno positivo saranno attirati verso le barre negative e nel momento in cui le barre cambieranno di potenziale da negativo a positivo lo ione sarà invece respinto evitando di scaricarsi sulla barra. A determinati valori di DC e RF, solo gli ioni che rientrano in un determinato range di m/z avranno delle traiettorie stabili e raggiungeranno il detector, gli altri invece saranno eliminati collidendo sulle barre.

Gli analizzatori qMS hanno due modalità operative, la prima detta SCAN è una scansione di tutti gli ioni entro un intervallo di masse stabilito dall'operatore e permette di effettuare analisi *untarget* e di confrontare gli spettri di massa sperimentali con quelli presenti in librerie dedicate ottenendo risultati qualitativi con un margine di errore di identificazione ridotto rispetto ad altri detectors. La seconda modalità è il monitoraggio di ioni selezionati (*selected ions monitoring* SIM), in questo caso il quadrupolo fa passare solo alcuni ioni selezionati in un esatto periodo temporale. Con la tecnica SIM si hanno selettività e sensibilità maggiori rispetto alle acquisizioni in SCAN. Gli analizzatori qMS hanno un range di masse che solitamente va da 25 a 2000 uma. La modalità di acquisizione in SIM può essere utilizzata sia per scopi qualitativi che quantitativi.

3.4.2.2 Spettrometria di massa a triplo quadrupolo

Gli analizzatori di massa a triplo quadrupolo rientrano tra gli analizzatori di massa tandem nello spazio. Negli spettrometri QqQMS, dopo la sorgente di ionizzazione si trovano due analizzatori di massa (quadrupoli Q_1 e Q_3) che sono disposti in serie e separati da una cella di collisione (q). I quadrupoli Q_1 e Q_3 hanno le stesse identiche funzioni viste per lo spettrometro di massa a singolo quadrupolo e possono operare sia in funzione SCAN che SIM indipendentemente uno dall'altro. La cella di collisione invece è solitamente costituita da un esapolo o un octapolo, all'interno della quale vi è un gas neutro, elio o più comunemente argon. La funzione della cella di collisione è quella di frammentare ulteriormente gli ioni provenienti dal Q_1 attraverso la dissociazione indotta da collisione (CID). La collisione tra il gas presente in q aumenta l'energia dello ione (o degli ioni) filtrato dal Q_1 che frammenterà a sua volta. Lo schema di un QqQMS viene riportato in figura 26.

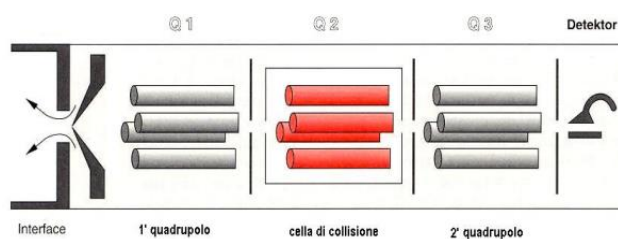


Figura 26. Rappresentazione schematica del triplo quadrupolo.

La struttura costruttiva degli strumenti a triplo quadrupolo permette di effettuare analisi in cinque differenti modalità di acquisizione:

- SCAN (con nel singolo quadrupolo) può essere effettuata usando sia il Q_1 che il Q_3 (quest'ultima è la maggiormente utilizzata e preferita). In quest'ultimo caso Q_1 non è attivo e la scansione degli ioni in un determinato intervallo di m/z viene effettuato in Q_3 . Ovviamente anche la modalità SIM può essere utilizzata negli spettrometri a triplo quadrupolo;
- *Product ion scan*, (scansione degli ioni prodotto) in cui il Q_1 è impostato per far passare un determinato valore m/z (ione precursore), q_2 è impostato su valori scelti dall'operatore per frammentare ulteriormente lo ione precursore mentre il Q_3 è impostato in modalità SCAN in un determinato intervallo di m/z ;

- *Precursor ion scan*, (scansione degli ioni precursore) in cui il Q₁ effettua una SCAN mentre uno specifico m/z è impostato in Q₃. Il CID è attivo andando a frammentare gli ioni che provengono dal Q₁;
- *Neutral loss scan*, (scansione della perdita neutra) Q₁ e Q₃ sono impostati in modalità SCAN, il CID è attivo. Il Q₃ sarà impostato in modo da permettere di effettuare la scansione degli ioni dopo la perdita di una massa neutra preimpostata;
- *Multiple/selected reaction monitoring*, (monitoraggio di reazioni multiple/selezionate) in cui vengono monitorate le transizioni da un m/z specifico (ione precursore) ad uno ione prodotto. Sia Q₁ che Q₃ sono impostati per far passare un determinato valore di m/z , mentre il q₂ è usato per frammentare lo ione precursore.

In figura 27 viene riportata una schematizzazione delle varie modalità di acquisizione che possono essere effettuate usando spettrometri di massa a triplo quadrupolo.

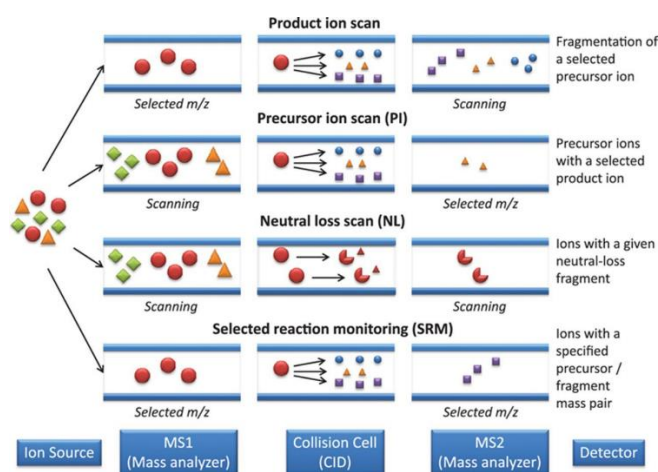


Figura 27. Modalità di acquisizione degli spettrometri a triplo quadrupolo.

3.5 Gascromatografia veloce

Dall'introduzione della GC nel 1952, c'è stato un interesse costante nell'aumentare la velocità di separazione. Sono diverse le ragioni che portano allo sviluppo di metodi analitici veloci, sia dal punto di vista della preparazione del campione che dal punto di vista separativo. Alla base di tutto c'è il concetto che il risparmio di tempo si traduce in risparmio economico e maggior numero di campioni processati per unità di tempo, i quali aumentano la produttività dei laboratori di analisi

portando anche ad un più veloce ammortamento delle spese sostenute per l'acquisto dell'attrezzatura analitica. Laboratori che processano un elevato numero di campioni e analisi dove è richiesta una certa velocità di esecuzione (come nel caso di controlli intermedi di processo o analisi doganali) possono beneficiare di tecniche di determinazioni rapide come quelle fornite dalla gascromatografia veloce. Un ulteriore vantaggio della GC veloce è che consente diverse analisi replicate di un campione nello stesso tempo di una singola separazione GC convenzionale, migliora la precisione e la sensibilità. I principi di base e la teoria del GC veloce erano già stati stabiliti negli anni '60. Da allora sono stati pubblicati molti studi sul background teorico della GC veloce, sullo sviluppo di strumenti adeguati e sulle applicazioni della tecnica. Ad esempio, utilizzando una colonna capillare micro-bore, la rapida separazione GC di nove picchi in meno di 0,7 s era già stata dimostrata più di un decennio fa [28].

Colonne corte con ridotto diametro interno sono utilizzate con successo anche per determinare i principali componenti del gas naturale [29]. Sfortunatamente, questa velocità di separazione non può essere applicata alla stragrande maggioranza delle altre separazioni. Ad esempio, nove picchi in 0,7 s significherebbero che i 209 PCB possono essere separati in ca. 16 sec. In questo momento, tuttavia, la separazione di questi PCB richiede quasi un'ora e più di una colonna analitica. L'ampia varietà di approcci per GC più veloci complica seriamente la situazione per l'analista interessato a ridurre il tempo di esecuzione di una data separazione. Non esiste un unico metodo universale e la questione di quale approccio selezionare non è affatto banale. Nei sottoparagrafi successivi viene fornita una panoramica dei vari metodi disponibili per la GC veloce e verranno discusse le linee guida per la selezione del metodo ottimale per aumentare la velocità di analisi per una data separazione, a partire dalla teoria che descrive il tempo di analisi in GC. Per facilitare questo processo di selezione, viene proposto un sistema per la classificazione dei cromatogrammi. Lo sfruttamento efficace di qualsiasi metodo per GC richiede un'attenta regolazione delle impostazioni strumentali. Tali requisiti saranno affrontati in dettaglio. In particolare, discuteremo cosa si può fare quando si utilizza la strumentazione che è ora disponibile in commercio. Verranno discusse le applicazioni di successo della GC veloce, ma

verranno anche descritte le conseguenze della selezione di un metodo errato o della trascuratezza dei severi requisiti strumentali.

Linee guida per ottenere una separazione più veloce

Per capire quali parametri influenzano la velocità di analisi in GC, occorre dare un'occhiata alle equazioni che esprimono il tempo di analisi in funzione dei vari parametri operativi di un sistema GC. Usando l'equazione dell'altezza del piatto di Golay-Giddings e la relazione del flusso di Hagen-Poiseuille, Cramers e Leclercq [30,31] hanno derivato equazioni pertinenti. Le relazioni esplicite possono essere ottenute solo in condizioni estreme di un rapporto alto o molto basso tra la pressione di ingresso e quella di uscita ($P=p_i/p_o$) e l'influenza della fase stazionaria sull'allargamento della banda cromatografica può essere trascurata. Per condizioni di caduta di pressione elevata, che in pratica prevalgono già a pressioni di ingresso superiori a circa 2 – 3 bar, vale la seguente equazione:

$$t_R = (1 + K)N_{req}^{3/2} \frac{9}{8} \sqrt{3} F(k) \left[\frac{\eta}{p_o D_{m,o}} \right]^{1/2} d_c \quad \text{Equazione 8}$$

dove

$$N_{req} = 16R_s^2 \left[\frac{1+k}{k} \right]^2 \left[\frac{\alpha}{\alpha-1} \right]^2 \quad \text{Equazione 9}$$

dove k è il fattore di ritenzione, $F(k) = \frac{1+6k+11k^2}{96(1+k)^2}$, η la viscosità dinamica, p_o la pressione in uscita, $D_{m,o}$ il coefficiente di diffusione del soluto in fase gassosa alla pressione di uscita e d_c il diametro interno della colonna capillare; α è la ritenzione relativa ($=k_2/k_1$), $R_s = \Delta t_R = 4\sigma_c$ la risoluzione tra una coppia critica di componenti e σ_c la deviazione standard dell'allargamento del picco cromatografico espressa in unità di tempo. Dalle Equazioni 8 e 9, che mostrano esplicitamente i vari parametri che influenzano il tempo di analisi in GC capillare, è evidente che ci sono tre percorsi generali verso un più veloce processo di separazione:

- Ridurre al minimo la risoluzione a un valore appena sufficiente. Al fine di minimizzare N_{req} nell'equazione 8, e quindi minimizzare il tempo di analisi, R_s non dovrebbe mai essere migliore dello stretto necessario e dovrebbero essere separati solo quei picchi che sono veramente importanti. $R_s=1.0$ potrebbe già essere sufficiente per la quantificazione se il grado di accuratezza richiesto non è troppo elevato. $R_s=1.5$ è sufficiente per tutte le analisi, anche quelle che richiedono la massima accuratezza.
- Massimizzare la selettività del sistema cromatografico. La selettività è la capacità di distinguere tra composti. Questo può essere fatto mediante separazione o rivelazione. Selezionare una colonna che offra la massima selettività per le coppie critiche e/o applicare il rivelamento selettivo.
- Implementare un metodo che riduca i tempi di analisi a risoluzione costante. Se il tempo di analisi nella situazione di risoluzione minima accettabile supera ancora il tempo desiderato o consentito, possono essere sfruttate opzioni che riducono il tempo di analisi a risoluzione costante.

Selezione del metodo ottimale per ridurre al minimo il tempo di analisi

Nella tabella 1 sono riportate 18 opzioni per velocizzare una separazione GC. Esistono molti metodi che si tradurranno in una significativa riduzione dei tempi. Inoltre, molto spesso, più di un percorso può essere adottato ottenendo gli stessi risultati. Uno sguardo all'intera gamma di applicazioni mostra che i vari cromatogrammi possono essere classificati in un numero limitato di classi. Si possono distinguere tredici classi cromatografiche GC di base riportate in figura 28, in base ai due gradi di libertà più importanti, il numero di picchi e la differenza del punto di ebollizione tra il primo e l'ultimo picco di eluizione. Dopo aver discusso le varie opzioni per velocizzare le separazioni GC e il sistema per la classificazione dei cromatogrammi, è possibile valutare l'applicabilità di ciascuna opzione per ciascun tipo di cromatogramma. Di seguito, questo processo verrà illustrato per due tipi di cromatogrammi. I cromatogrammi di tipo IV contengono un numero limitato di picchi,

ben separati in condizioni di temperatura programmata ed eluiti in un intervallo di temperatura relativamente ristretto (circa 100°C).

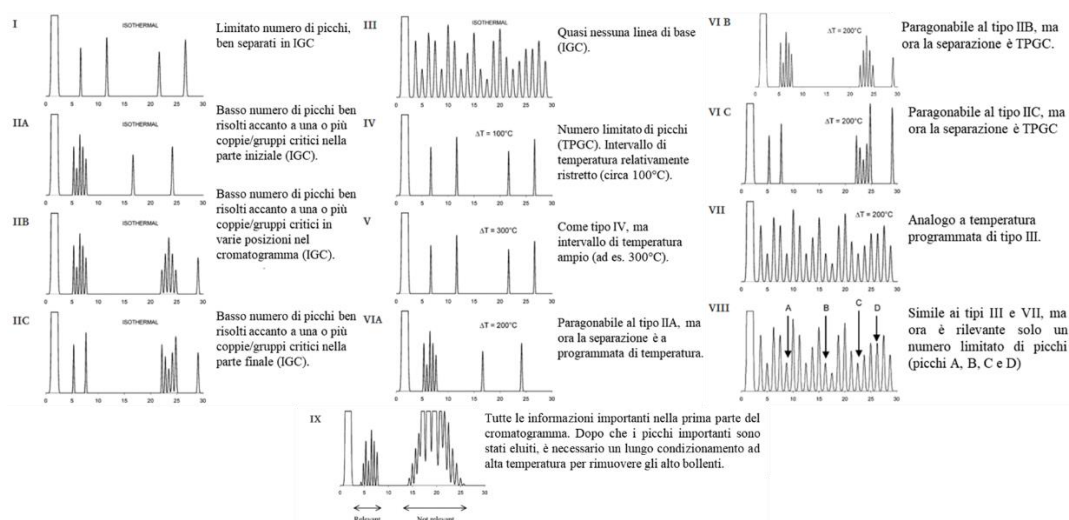


Figura 28. Sistema di classificazione dei cromatogrammi.

Tabella 1 Metodi per velocizzare le separazioni GC.

N	Strategia di incremento della velocità	Guadagno in tempo e aspetti pratici
(I) Ridurre al minimo la risoluzione per ottenere un valore appena sufficiente		
1	Lunghezza della colonna più corta	Il guadagno di tempo è proporzionale alla riduzione della lunghezza in analisi isoterme (IGC). Nelle analisi GC a temperatura programmata (TPGC), il guadagno è inferiore se viene coperto un intervallo di temperatura più ampio, poiché il tempo di esecuzione è ora determinato dal tempo impiegato dal forno per raggiungere la temperatura necessaria per eluire l'ultimo componente. L'accorciamento di una colonna è irreversibile.
2	Velocità lineare superiore a quella ottimale	Il guadagno di tempo è proporzionale all'aumento della velocità in IGC. Il guadagno nelle TPGC è limitato, specialmente se vengono coperte temperature più elevate. Velocità massima limitata dai regolatori di pressione.
3a	Temperatura isoterma più elevata (solo IGC)	Guadagno di circa il doppio per ogni aumento di temperatura di 15 °C (IGC). Tenere presente la temperatura massima di esercizio.
3b	Temperatura iniziale più elevata	Il guadagno in TPGC dipende fortemente dal programma originale e finale.
3c	Temperatura finale più elevata	Guadagni tipici solo di alcuni minuti
4a	Programmata di temperatura più veloce	Guadagno proporzionale all'aumento della velocità (TPGC). Gradienti di temperatura superiori a c 20-40 °C/min. richiedono una strumentazione speciale
4b	Conversione analisi IGC in TPGC	Guadagni sostanziali passando da IGC a TPGC
5	Programmazione pressione/flusso	Guadagno generalmente modesto; richiede il controllo elettronico della pressione/flusso

N	Strategia di incremento della velocità	Guadagno in tempo e aspetti pratici
6	Spessore del film inferiore	Guadagno proporzionale alla riduzione dello spessore del film (colonne a film sottile); guadagni maggiori per colonne a film spesso
(II) Massimizzare la selettività del sistema cromatografico		
7	Utilizzare una fase stazionaria più selettiva o applicare colonne accoppiate	È possibile un guadagno significativo nel tempo di eluizione, ma la selezione della fase può essere noiosa
8	Utilizzare 2D GC	I picchi non risolti possono essere trasferiti alla seconda colonna per un'ulteriore separazione su diverse fasi stazionarie. È possibile un guadagno molto elevato, ma è necessaria una strumentazione più complessa
9	Utilizzare il rivelamento selettivo	Guadagno significativo possibile perché i composti di interesse devono essere separati solo l'uno dall'altro. La separazione dai composti della matrice non è più necessaria. Può essere utilizzato anche in combinazione con altre opzioni
10	Utilizzo della MS	Guadagno significativo possibile, specialmente in combinazione con tecniche di deconvoluzione spettrale. Utilizzabile anche in combinazione con altre opzioni
11	Applicare il backflush	Guadagno tipico, 2-5 volte. Richiede strumentazione speciale
(III) Implementare un metodo che riduca il tempo di analisi a risoluzione costante		
12	Ridurre il diametro interno della colonna	Guadagno proporzionale alla riduzione del diametro della colonna
13	Usa l'idrogeno come gas di trasporto	Guadagno 60% contro He o 100% contro N ₂ ; richiede particolari precauzioni di sicurezza
14	Applicare condizioni di vuoto	Guadagno fino a 6 volte per colonne corte <i>mega-bore</i> . Guadagno per colonne standard trascurabile. Possibile solo con rivelamento MS
15	Applicare condizioni di flusso turbolento	Non è un'opzione praticabile per la pratica quotidiana

Il cromatogramma di tipo IV è chiaramente iper-risolto. Pertanto, il primo passo per ridurre il tempo di esecuzione inizia con accorciare la lunghezza della colonna o eseguire le analisi ad una velocità lineare più elevata. Il cromatogramma mostrato in figura 29 è un buon esempio di separazione più rapida ottenuta accorciando la colonna. Mostra la separazione dell'olio essenziale di Camomilla, che, in condizioni normali, richiede circa 30 min [32]. Altri modi per accelerare una separazione di tipo IV sono l'aumento della temperatura iniziale e/o finale del programma di temperatura, utilizzando una velocità di programmazione più elevata, lavorando con una colonna a film più sottile o applicando la programmazione pressione/flusso.

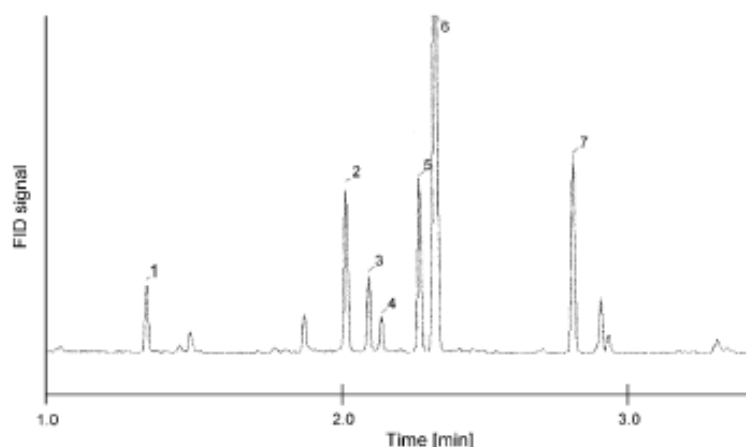


Figura 29. Cromatogramma di un olio essenziale di camomilla su una colonna OV-1701 (5 m × 0,25 mm ID × 0,3 μm). Programma di temperatura: da 100 °C a 250 °C (40 °C min⁻¹). Gas carrier H: 1,4 ml min⁻¹. Iniezione: Split, 230 °C (1:20). Composti: (1) trans-β-farnesene; (2) bisabololo ossido B; (3) α-bisabololo; (4) β-bisabolone ossido A; (5) bisabololo ossido A; (6) camazulene; e, (7) spiroetere.

La riduzione più significativa del tempo di analisi si ottiene usando una programmata di temperatura più rapida, come dimostrato per una miscela di glicole industriale nella figura 30 [33]. Per l'analisi di questo campione con un'analisi GC convenzionale usando una programmata di temperatura di 15 °C min⁻¹ ci sono voluti 9 min.

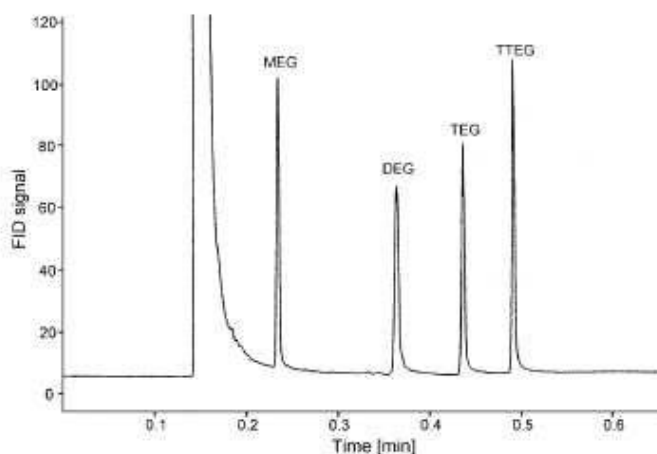


Figura 30. Cromatogramma GC-FID di (MEG) glicole monoetilenico, (DEG) glicole dietilenico, (TEG) glicole trietilenico e (TTEG) glicole tetraetilenico su una colonna RTX-5 (5 m × 0,32 mm DI × 0,25 μm). Programma di temperatura: da 40°C a 100 °C (120°C min⁻¹). Gas carrier He: 45 kPa. Iniezione: split (flusso di split 300 ml min⁻¹).

La maggior parte delle altre opzioni precedentemente riportate e applicabili porterebbero anche ad un tempo di analisi più breve per questa separazione ma, tuttavia, sono più difficili da implementare e pertanto non dovrebbero essere la prima opzione. Una volta sfruttate appieno le varie opzioni per accelerare questa separazione di tipo IV, il cromatogramma finale non è più di tipo IV, ma di tipo VI o VII, a seconda del modo in cui è stata realizzata la riduzione della risoluzione e degli esatti effetti del percorso selezionato sui tempi di eluizione dei vari picchi. Se un cromatogramma di tipo VII (ad es. analisi PCB (figura 31) [34]) deve essere reso più veloce, le opzioni 1-6 sono generalmente inutili.

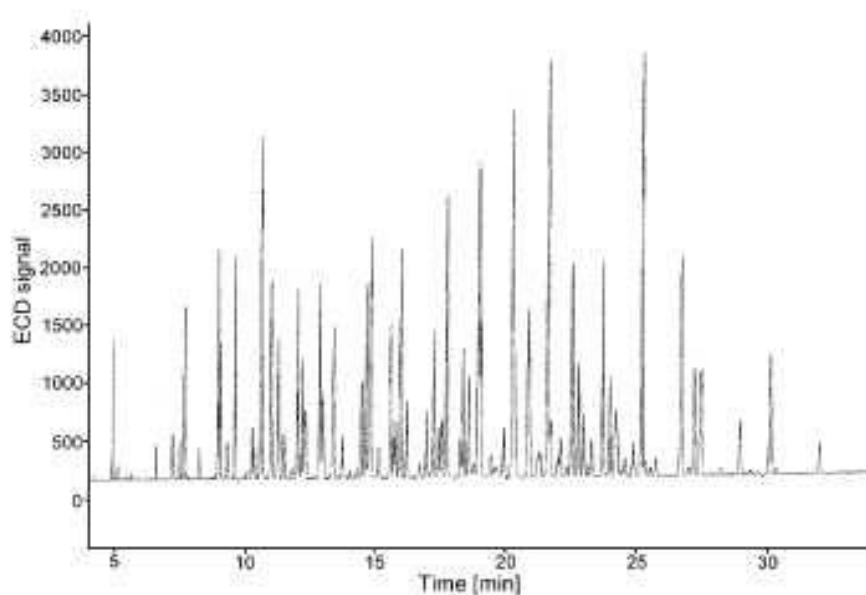


Figura 31. Cromatogramma GC convenzionale di miscela di PCB su colonna HP-5 (30 m × 0,25 mm ID × 0,25 μm). Programma di temperatura: 50°C (1 min, 40°C/min a 150°C; 4°C/min a 270°C (5 min). Gas *carrier* H: 51 kPa. Iniezione: *Splitless*, 1 μl, 250°C. Rivelamento: μ-ECD, 320°C.

Tutto ciò comporterebbe un'inaccettabile perdita di risoluzione. Ciò è dimostrato in figura 32, dove è stata utilizzata una colonna corta di diametro interno normale per analizzare Aroclor 1254 [35]. La riduzione del tempo di analisi può ora essere ottenuta solo utilizzando uno dei metodi a “risoluzione costante” riportati in tabella 1.

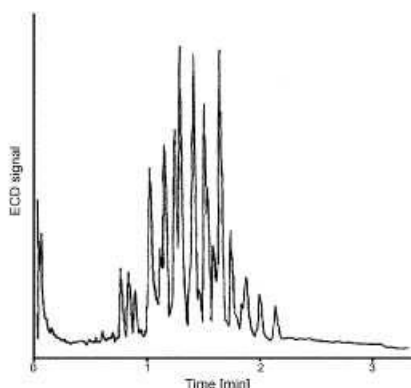


Figura 32. Cromatogramma GC veloce di Aroclor 1254 su colonna DB-1 (3 m \times 0,25 mm DI). Programma di temperatura: 100°C, 12,5°C/min a 150°C. Gas carrier H: 100 cm/s. Iniezione: *Splitless*, 1 μ l, 250°C, seguito da trappola fredda raffreddata da flusso continuo di azoto liquido a -90°C. Rivelamento: ECD, 300°C, 40 Hz.

Opzioni valide sono l'uso di colonne con un diametro interno ridotto o/è l'utilizzo di idrogeno come gas carrier (figura 33) [34]. L'applicazione di una condizione di vuoto in uscita dalla colonna (come nel caso dell'uso di spettrometri di massa) non è un'opzione valida; è attraente solo se il cromatogramma richiede un numero di piatti relativamente basso (<20.000) in modo da poter utilizzare una colonna corta e di diametro largo [30].

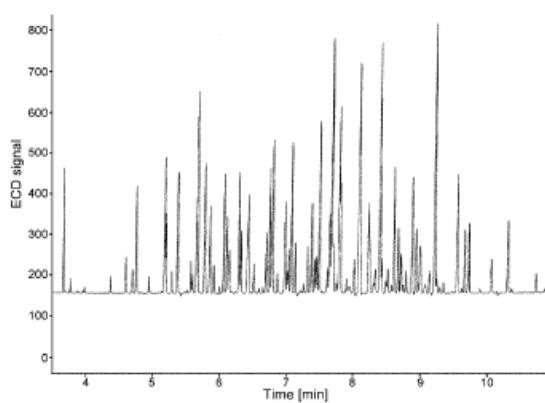


Figura 33. Cromatogramma GC veloce di PCB su colonna HP-5 (10 m \times 0,1 mm ID \times 0,1 μ m). Programma di temperatura: 50°C (1 min), 40°C/min a 150°C, 14,2°C/min a 270°C (1,06 min). Gas carrier H: 177 kPa. Iniezione: *Splitless*, 1 μ l, 250°C. Rivelamento: μ -ECD, 320°C.

L'uso di questa opzione con una colonna di $10\text{ m} \times 0,53\text{ mm ID}$ porta a una separazione molto rapida, ma, sfortunatamente, porta anche a una significativa perdita di risoluzione rispetto alle condizioni normali (figura 34) [36].

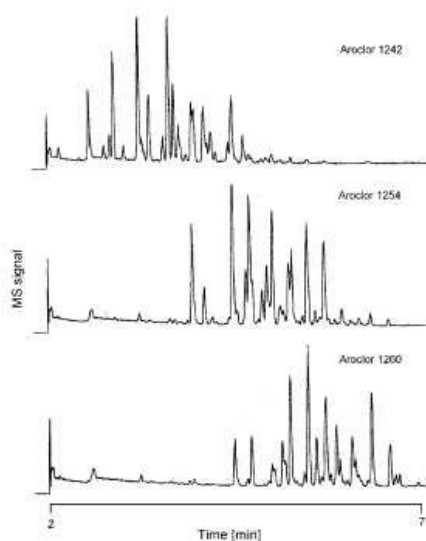


Figura 34. Cromatogrammi GC veloce di Aroclors 1242, 1254 e 1260 su colonna CP-Sil 8 CB ($10\text{ m} \times 0,53\text{ mm ID} \times 0,25\text{ }\mu\text{m}$), collegato con restrizione ($50\text{ cm} \times 0,1\text{ mm ID}$ capillare disattivato) sul lato dell'iniezione. Programma di temperatura: 65°C (1 min.), $20^{\circ}\text{C}/\text{min}$ a 280°C . Gas *carrier* He: 130 kPa. Iniezione: splitless, $1\text{ }\mu\text{l}$, 250°C . Rivelatore: trappola ionica Saturn 2000 MS, 250°C .

Un'altra opzione che non riesce a produrre i risultati desiderati è il flusso turbolento GC, che può essere applicato solo per cromatogrammi in cui un numero limitato di picchi eluisce a bassi fattori di ritenzione [37]. L'uso di una fase stazionaria più selettiva è probabilmente anche di scarso vantaggio per separazioni rapide di PCB. Il cromatogramma non ha quasi nessuna linea di base vuota ed è molto probabile che l'uso di un'altra fase stazionaria si traduca in un numero simile di (altre) co-eluzioni. L'uso del rivelamento tramite spettrometri di massa nel può tornare utile se tutti i picchi vicini contengono frammenti di massa unici e la deconvoluzione spettrale può compensare una perdita di risoluzione cromatografica. Nel caso dell'analisi dei PCB, questa non è un'opzione praticabile, perché i congeneri con numeri identici di cloro non possono essere risolti mediante spettrometria di massa (MS).

Strumentazione analica

Lo scopo della GC veloce è ottenere le informazioni richieste sul campione in un tempo più breve. In questa sezione verranno discusse le conseguenze pratiche dell'attuazione delle strategie citate nel precedente paragrafo. La strumentazione analitica di base è generalmente identica a quelle usate per le analisi GC convenzionali (es. iniettore, forno, detector). Bisogna però far notare che per poter effettuare analisi di tipo veloce il gascromatografo deve essere in grado di rispettare i seguenti requisiti:

- Nella GC veloce, i picchi eluiscono in un lasso di tempo più breve e il detector utilizzato deve poter sostenere un'elevata frequenza di campionamento del (>50 Hz) come, ad esempio, avviene per le analisi gascromatografiche bidimensionali *comprehensive*, in cui la separazione in seconda dimensione può essere per certi aspetti equiparata ad una separazione di tipo veloce in isoterma.
- La scelta del gas carrier può avere un'influenza sostanziale sulla velocità di analisi. Questa influenza dipende dalla caduta di pressione della colonna (p_d). L'idrogeno è chiaramente il miglior gas carrier grazie ai suoi elevati valori del coefficiente di diffusione binario.
- La pressione potrebbe essere un fattore limitante. Ad esempio, l'uso di colonne più corte con diametro interno convenzionale è limitato dalla pressione di ingresso minima richiesta per il funzionamento stabile del sistema del gas di trasporto. Tuttavia, con colonne lunghe e ridotto diametro interno, la pressione massima può diventare una limitazione. La nuova generazione di cromatografi è dotata di unità elettroniche di controllo pressione/flusso con limite di pressione in ingresso fino a 1000–1200 kPa. Queste pressioni sono compatibili con la maggior parte delle colonne *micro-bore*. Ad esempio, una pressione di 1100 kPa è sufficiente per colonne di 50 μm ID fino a una lunghezza di 15 m. Tale colonna genererebbe lo stesso numero di piatti di una colonna 100 m \times 320 μm ID.

- la fase più critica nella GC veloce è l'iniezione. Per evitare l'allargamento del picco, il campione iniettato deve essere possedere una banda molto stretta rispetto all'allargamento totale della banda cromatografica. Il modo più semplice per ottenere una banda iniziale stretta è necessario applicare flussi di *split* elevati ottenendo larghezze di banda nell'ordine dei millisecondi [38]. Uno svantaggio di è legato ai limiti di rivelamento scadenti (LOD). Grazie agli effetti di focalizzazione, anche le tecniche *splitless*, PTV (vaporizzazione a temperatura programmata) e persino l'iniezione in colonna possono essere combinate con la GC veloce.
- La scelta della colonna in questo tipo di analisi, come nelle analisi convenzionali è legata al tipo di applicazione. L'opzione più logica è l'uso di colonne con un ID ridotto. Ovviamente, il loro utilizzo può causare alcuni problemi. Anche il più piccolo volume morto può provocare un significativo *tailing* dei picchi a causa del flusso molto basso (ID <150 µm). Altre limitazioni delle colonne a diametro ridotto sono la loro bassa *sample capacity* e i loro LOD sfavorevoli.
- Una velocità ottimale della programmata di temperatura rende migliore la separazione nel minor tempo possibile. Un cromatogramma contiene solitamente un numero limitato di picchi che coprono un'ampia gamma di punti di ebollizione. Pertanto, la massima velocità di riscaldamento consentita, ed evidentemente anche il tempo di raffreddamento del forno, sono parametri importanti da ottimizzare per incrementare il numero di analisi eseguibili in un arco temporale. In generale, il gradiente di temperatura ottimale si può calcolare attraverso il rapporto 10 °C/tempo [39]. L'ultima generazione di forni per GC consente velocità massime di riscaldamento di 50–100 °C min⁻¹. Velocità più elevate sono difficili da ottenere a causa della maggiore massa termica dei forni standard

In conclusione, si può affermare che il primo passo per aumentare la velocità d'analisi dovrebbe essere sempre quello di ridurre al minimo la risoluzione a un valore appena sufficiente. Come riportato sopra, può essere ottenuto usando una colonna più

corta, una temperatura isoterma/iniziale/finale più elevata, una velocità del gas *carrier* superiore a quella ottimale, una programmata di pressione/flusso, una programmata di temperatura più rapida o uno spessore del film della fase stazionaria inferiore. Il passo successivo è quello di cercare di massimizzare la selettività del sistema cromatografico utilizzando una fase stazionaria più selettiva o applicando il rivelamento selettivo o MS. Infine, se è necessaria un'ulteriore riduzione, possono essere implementati metodi che riducono il tempo di analisi a risoluzione costante (ID colonna più piccolo, idrogeno come gas carrier, condizioni di flusso turbolento). L'opzione selezionata dipende fortemente dall'applicazione di interesse. L'uso della GC veloce è stato a lungo ostacolato dalla mancanza di strumentazione. L'ultima generazione di cromatografi commerciali può essere dotata di unità elettroniche di controllo della pressione operanti fino a circa 12 bar, sufficientemente elevate per colonne da 50 µm ID. Possono eseguire un arresto automatico di sicurezza del gas carrier in caso di improvvisa caduta di pressione, consentendo un uso sicuro dell'idrogeno come gas carrier. Tutti i comuni sistemi di iniezione possono essere utilizzati e qualora si necessitasse di ottenere bande di iniezione più strette è disponibile la focalizzazione criogenica. Sono disponibili colonne da 100 µm ID e c'è un'ampia scelta di fasi stazionarie. L'ultima generazione di forni GC consente di programmare velocità fino a 50–100 °C min⁻¹. Infine, la maggior parte dei sistemi di rivelamento commerciali sono compatibili con i requisiti richiesti dalle separazioni GC veloci.

3.6 Cromatografia liquida ad alte prestazioni

Le tecniche cromatografiche liquide che utilizzano una pressione elevata per forzare la fase mobile attraverso il letto impaccato di piccole particelle sono denominate collettivamente cromatografia liquida ad alte prestazioni (HPLC) [40]. La fase stazionaria è un materiale solido, poroso o tensioattivo sotto forma di piccole particelle o, più comunemente, un liquido viscoso immobilizzato su queste particelle e fissato nel sistema. La fase mobile è un liquido che trasporta la miscela da separare. Uno schema di un sistema HPLC è mostrato schematicamente nella figura 35. L'apparecchiatura è costituita da un sistema di erogazione del solvente ad alta pressione (pompa) che controlla la portata e genera una pressione sufficiente per spingere la fase mobile attraverso la colonna, un autoiniettore del campione, una

colonna di separazione, un forno per il controllo della temperatura della colonna, un rivelatore (spesso un UV o un DAD) un computer per controllare il sistema, immagazzinare e processare i risultati.

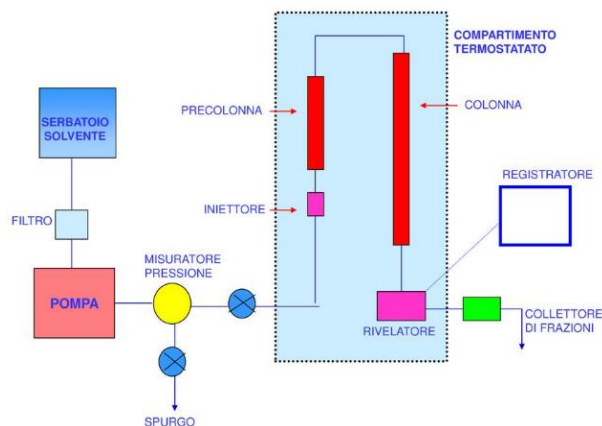


Figura 35. Struttura di un sistema HPLC

Molti sistemi includono una precolonna che protegge la colonna analitica da impurità che possono provenire dal campione. La separazione vera e propria avviene nella colonna, che è impaccata con particelle chimicamente modificate di 3,5-10 μm (spesso silice) che costituiscono la fase stazionaria. Una fase mobile viene pompata attraverso la colonna con la pompa ad alta pressione e gli analiti presenti nel campione iniettato vengono separati. Una corretta scelta delle fasi stazionaria e mobile è essenziale per raggiungere la separazione desiderata in quanto, la separazione delle molecole di analita si basa sulla loro ripartizione differenziale tra queste due fasi non miscibili. La separazione è governata da varie interazioni tra l'analita e le fasi stazionarie e mobili. Queste interazioni includono: interazioni di dispersione (che contribuiscono alle interazioni idrofobiche); interazioni dipolo-dipolo; legame idrogeno; interazioni ioniche (coulombiane); interazioni π - π [41].

La possibilità di estrarre informazioni (sia qualitative che quantitative) su diversi composti importanti in un unico ciclo analitico, rende l'HPLC un potente strumento per il monitoraggio in diversi settori. Sono state sviluppate varie modalità di separazione HPLC per l'analisi di un'ampia gamma di analiti differenti. I meccanismi di separazione variano da adsorbimento, partizionamento, interazione ionica, esclusione dimensionale, ecc. Le modalità LC più comuni includono: cromatografia liquida in fase normale (NP-LC); cromatografia liquida in fase inversa

(RP-LC); cromatografia in fase inversa non acquosa (NARP); cromatografia ad interazione idrofila (HILIC); cromatografia ad esclusione dimensionale (SEC); cromatografia a scambio ionico (IEX); cromatografia a coppia ionica (IPC) (Snyder et al., 2010).

Cromatografia liquida in fase inversa (RP-LC)

La RP-LC è la modalità HPLC dominante per la separazione di miscele di composti organici [41]. Nella RP-LC, la colonna, impaccata con particelle di silice derivatizzata, funge da fase stazionaria di ritenzione non polare. Vengono comunemente impiegate fasi stazionarie come ottadecile (C₁₈), ottile (C₈), fenile-esile (PhC₆) e ciano (CN). La fase mobile binaria è di polarità medio-alta ed è costituita da una fase acquosa, eventualmente leggermente acidificata, e da una componente organica. Acetonitrile e metanolo sono i solventi organici preferiti, ma possono essere utilizzati anche isopropanolo e tetraidrofurano [41]. La RP-LC fornisce la separazione in base all'idrofobicità: ovvero la partizione delle molecole di analita tra la fase stazionaria non polare e la fase mobile polare, portando a una maggiore ritenzione degli analiti meno polari [40,41]. Quando si discute il meccanismo di ritenzione RP-LC, viene comunemente citato il modello di interazione solvofobica di Horváth [42,43]: le molecole di soluto relativamente idrofobe si allineano e aderiscono ai ligandi alchilici idrofobici attaccati alla superficie di silice.

Sistemi di pompaggio, sistemi a gradiente e miscelazione in linea

La pompa HPLC unisce due diverse caratteristiche: deve essere in grado di generare pressioni elevate e deve fornire accuratezza e precisione del flusso alla portata selezionata [40]. Quasi tutti i sistemi di pompaggio HPLC utilizzano una pompa a pistone alternativo poiché questo sistema ha un piccolo volume interno e un'elevata pressione di uscita. Fornisce inoltre portate costanti ed è compatibile con l'eluizione in gradiente [41]. Durante il processo di separazione cromatografica, la composizione della fase mobile può essere mantenuta costante (eluizione isocratica) o alterata (eluizione a gradiente). La risoluzione di campioni complessi contenenti analiti con caratteristiche di ritenzione molto variabili spesso non può essere ottenuta con una composizione di fase mobile costante e quindi di solito si preferisce l'eluizione in

gradiente. Durante l'eluizione in gradiente, la concentrazione di uno dei due solventi aumenta, determinando un aumento della forza di eluizione della fase mobile e una riduzione della ritenzione dell'analita. Ciò previene anche l'allargamento dei picchi e riduce gli effetti di *tailing* dei picchi. I gradienti di fase mobile possono essere classificati in base al numero di componenti di fase mobile (binari, ternari ecc.), alla forma/profilo del gradiente (lineare, curvo, a gradini o segmentato) e alla modalità cromatografica [44]. La miscelazione della fase mobile per applicazioni isocratiche e in gradiente viene effettuata tipicamente tramite miscelazione in linea (miscelazione ad alta pressione dopo la pompa o miscelazione a bassa pressione prima della pompa) [41].

Colonna HPLC e fasi stazionarie

La maggior parte delle colonne HPLC sono realizzate in acciaio inossidabile con lunghezze comprese tra i 50 e i 250 mm e diametri interni tra i 2,0 e i 4,6 mm [40]. Il supporto più comunemente utilizzato per la produzione di impaccamenti è la silice, sia sotto forma di particelle che di monoliti. Le colonne a base di silice forniscono in genere una maggiore efficienza rispetto ad altri materiali di supporto inorganici come zirconia, alumina, titania e carbonio grafitizzato [41]. L'utilizzo di colonne a base di zirconio sta, tuttavia, guadagnando popolarità in quanto mostra un'eccellente stabilità termica ad un ampio intervallo di temperature, rendendolo ideale per separazioni ad alta temperatura [45]. Le particelle di silice hanno un'elevata resistenza meccanica, consentendo la formazione di letti impaccati stabili per lunghi periodi e resistenti a elevate pressioni di esercizio. Le particelle sferiche possono essere sintetizzate con un'ampia scelta di dimensioni dei pori (10, 30, 100 nm), dimensioni delle particelle (1,5, 2,7, 3,5, 5 μm) e in diverse configurazioni delle particelle (totalmente porose, micro-pellicolari, superficialmente porose e particelle di perfusione). La dimensione delle particelle è un fattore primario nel determinare l'efficienza della colonna. Il tipo di particelle e la sua distribuzione granulometrica possono anche influenzare l'efficienza della colonna, presumibilmente influenzando l'omogeneità del letto impaccato [41].

La natura chimica della superficie di silice non modificata influenza fortemente le sue proprietà. La silice idrata è caratterizzata da uno strato superficiale di gruppi silanolo

(–SiOH) e possono essere presenti tre diversi tipi di gruppi silanolo: silanoli liberi (non legati all'idrogeno), silanoli germinali e silanoli associati (vicinali) [40,41]. Questi gruppi silanolicci devono essere presenti affinché la reazione dei silani con la silice formi una fase stazionaria "legata".

Gli impaccamenti cromatografici a fase inversa sono tipicamente realizzati legando covalentemente un organosilano con i silanoli. Gli impaccamenti in fase legata sono tipicamente realizzati tramite una reazione monofunzionale in cui un singolo silano reagente (ad esempio clorodimetil-ottadecilsilano) reagisce con un singolo gruppo silanolo superficiale, per formare una colonna C₁₈ monomericca [41].

La fase stazionaria determina la ritenzione e la selettività della colonna. La ritenzione tipicamente aumenta con il numero di atomi di carbonio del sostituente silanolo. Anche la percentuale di silanoli legati influenza le prestazioni della colonna.

Ottimizzazione della selettività

La selettività è il fattore più potente per ottenere una buona separazione. Per i campioni non ionizzati, la selettività può essere ottimizzata modificando la composizione della fase mobile, la temperatura o la fase stazionaria. Per i campioni che contengono acidi o basi (soluti ionizzabili), anche il pH della fase mobile, la concentrazione del tampone e la concentrazione del reagente della coppia ionica possono essere regolati per migliorare la selettività [41].

In condizioni di eluizione isocratica, la ritenzione dell'analita in funzione della forza del solvente ($\phi = 0,01\% \text{ B}$, dove B è l'eluente più forte in una fase mobile binaria) può essere descritta dalla equazione 10 (Zhu et al., 1996a, 1996b):

$$\log k = \log k_w - S_\phi \quad \text{Equazione 10}$$

Dove k_w rappresenta il valore (estrapolato) di k per $\phi = 0$ (acqua come fase mobile), S è costante per ogni analita. Questa relazione lineare di $\log k$ rispetto a $\% \text{ B}$ (100ϕ) viene usata per dividere i campioni in "regolare" e "irregolare". Un campione comprendente analiti per i quali un aumento della $\% \text{ B}$ porta a cambiamenti significativi nella ritenzione relativa viene definito campione "irregolare". Un campione "irregolare" è caratterizzato da intersezioni delle singole curve [41].

Sfruttando in modo ottimale i cambiamenti relativi nella posizione della banda in funzione della % B, la selettività di separazione può essere migliorata.

Anche la temperatura ha effetto sui valori del fattore di ritenzione (k). Per la maggior parte degli analiti, l'influenza della temperatura sulla ritenzione è data dall'equazione di Van't Hoff [46,47], riportata nell'equazione 11:

$$\log k = A + \frac{B}{T} \quad \text{Equazione 11}$$

dove A è una funzione del rapporto di fase e dell'entropia di ritenzione (ΔS) e B è proporzionale all'entalpia di ritenzione (ΔH). I valori di ΔH sono tipicamente negativi, quindi, la ritenzione diminuisce con l'aumentare della temperatura [48].

3.6.1 Rivelatore spettrofotometrico a serie di diodi

Alcuni rivelatori commerciali utilizzati in LC sono: rivelatori di ultravioletti (UV), rivelatori di fluorescenza, rivelatori elettrochimici, rivelatori di indice di rifrazione (RI) e rivelatori di spettrometria di massa (MS). La scelta del rivelatore dipende dal campione e dallo scopo dell'analisi.

I rivelatori UV sono i rivelatori HPLC più comuni poiché sono robusti, economici, facili da maneggiare e poiché molti soluti assorbono la luce in questa gamma di frequenze trovano uso in diverse applicazioni. Il normale rivelatore UV misura l'assorbanza a una singola lunghezza d'onda alla volta. Per cambiare lunghezza d'onda è necessario spostare il monocromatore, introducendo così i problemi di irriproducibilità meccanica nelle misure. Un rivelatore a serie di diodi (DAD) può misurare più lunghezze d'onda contemporaneamente, e poiché nessuna parte viene spostata per cambiare lunghezza d'onda o per scansionare, non c'è rischio di errori dovuti a problemi. La figura 36 illustra la differenza nella modalità operativa tra un normale rivelatore a singola lunghezza d'onda e un rivelatore a più lunghezze d'onda. Dopo una corsa cromatografica con un DAD, l'operatore può visualizzare un cromatogramma per qualsiasi lunghezza d'onda desiderata (solitamente tra 190 e 400 nm) e, inoltre, è possibile visualizzare gli spettri UV di ciascun picco eluito. I DAD forniscono quindi più informazioni sulla composizione del campione rispetto a quelle fornite da analisi UV. Mentre i rivelatori a lunghezza d'onda singola sono

comunemente usati per l'analisi quantitativa, un DAD può essere utilizzato sia per informazioni quantitative che qualitative dei campioni. L'identificazione del picco viene effettuata confrontando gli spettri UV di uno standard con un picco del campione sovrapponendo i due spettri. I moderni DAD sono adatti a numerosi tipi diversi di applicazioni. I DAD sono spesso utilizzati nel controllo della produzione di farmaci dove è necessario uno screening rapido e l'identificazione di impurità sconosciute. Ciò è dovuto alla possibilità di abbinare uno spettro UV ad alta risoluzione sconosciuto con spettri corrispondenti a componenti noti presenti nelle librerie.

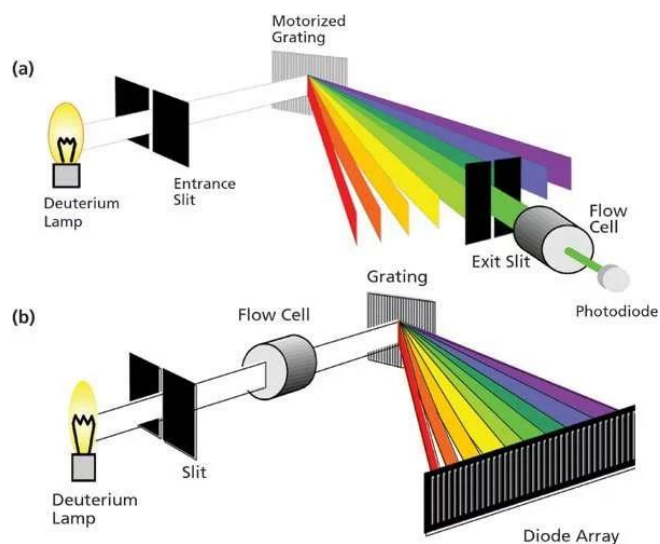


Figura 36. a: rivelatore a singola lunghezza d'onda; b: rivelatore a serie di diodi

Riferimenti bibliografici:

- [1] L.S. Ettre, K.I. Sakodinskii, M. S. Tswett and the discovery of chromatography I: Early work (1899–1903), *Chromatographia*. 35 (1993) 223–231. <https://doi.org/10.1007/BF02269707>.
- [2] A.T. James, A.J.P. Martin, Gas-liquid partition chromatography: the separation and micro-estimation of volatile fatty acids from formic acid to dodecanoic acid, *Biochem. J.* 50 (1952) 679–690. <https://doi.org/10.1042/bj0500679>.
- [3] Z. Liu, J.B. Phillips, Comprehensive Two-Dimensional Gas Chromatography using an On-Column Thermal Modulator Interface, *J Chromatogr Sci.* 29 (1991) 227–231. <https://doi.org/10.1093/chromsci/29.6.227>.
- [4] J.C. Giddings, Concepts and comparisons in multidimensional separation, *J High Resolut Chromatogr.* 10 (1987) 319–323. <https://doi.org/10.1002/jhrc.1240100517>.
- [5] M. Edwards, A. Mostafa, T. Górecki, Modulation in comprehensive two-dimensional gas chromatography: 20 years of innovation, *Anal Bioanal Chem.* 401 (2011) 2335–2349. <https://doi.org/10.1007/s00216-011-5100-6>.
- [6] R.E. Murphy, M.R. Schure, J.P. Foley, Effect of Sampling Rate on Resolution in Comprehensive Two-Dimensional Liquid Chromatography, *Anal Chem.* 70 (1998) 1585–1594. <https://doi.org/10.1021/ac971184b>.
- [7] W. Khummueng, J. Harynuk, P.J. Marriott, Modulation Ratio in Comprehensive Two-dimensional Gas Chromatography, *Anal Chem.* 78 (2006) 4578–4587. <https://doi.org/10.1021/ac052270b>.
- [8] R.C.Y. Ong, P.J. Marriott, A Review of Basic Concepts in Comprehensive Two-Dimensional Gas Chromatography, *J Chromatogr Sci.* 40 (2002) 276–291. <https://doi.org/10.1093/chromsci/40.5.276>.
- [9] H.D. Bahaghighat, C.E. Freye, R.E. Synovec, Recent advances in modulator technology for comprehensive two dimensional gas chromatography, *TrAC Trends in Anal. Chem.* 113 (2019) 379–391. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2018.04.016>.
- [10] J. v. Seeley, N.J. Micyus, S. v. Bandurski, S.K. Seeley, J.D. McCurry, Microfluidic Deans Switch for Comprehensive Two-Dimensional Gas Chromatography, *Anal Chem.* 79 (2007) 1840–1847. <https://doi.org/10.1021/ac061881g>.
- [11] Z. Liu, J.B. Phillips, High-speed gas chromatography using an on-column thermal desorption modulator, *J. Microcolumn Sep.* 1 (1989) 249–256. <https://doi.org/10.1002/mcs.1220010508>.
- [12] Z. Liu, M. Zhang, J.B. Phillips, High-Speed Gas Chromatographic Analysis of a Simulated Process Stream using On-Column Thermal Desorption Modulation for Sample Preconcentration and Introduction, *J Chromatogr Sci.* 28 (1990) 567–571. <https://doi.org/10.1093/chromsci/28.11.567>.
- [13] J.B. Phillips, E.B. Ledford, Thermal modulation: A chemical instrumentation component of potential value in improving portability. *Field Anal. Chem. Technol.* 1

- (1996) 23–29. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1520-6521\(1996\)1:1<23::aid-fact4>3.0.co;2-f](https://doi.org/10.1002/(sici)1520-6521(1996)1:1<23::aid-fact4>3.0.co;2-f).
- [14] P.J. Marriott, R.M. Kinghorn, Longitudinally Modulated Cryogenic System. A Generally Applicable Approach to Solute Trapping and Mobilization in Gas Chromatography, *Anal Chem.* 69 (1997) 2582–2588. <https://doi.org/10.1021/ac961310w>.
- [15] E.B. Ledford, C. Billesbach, Jet-cooled thermal modulator for comprehensive multidimensional gas chromatography, *HRC J High Resolut Chromatogr.* 23 (2000) 202–204. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-4168\(20000301\)23:3<202::AID-JHRC202>3.0.CO;2-5](https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-4168(20000301)23:3<202::AID-JHRC202>3.0.CO;2-5).
- [16] P.Q. Tranchida, G. Purcaro, P. Dugo, L. Mondello, G. Purcaro, Modulators for comprehensive two-dimensional gas chromatography, *TrAC Trends in Anal. Chem.* 30 (2011) 1437–1461. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2011.06.010>.
- [17] C.A. Bruckner, B.J. Prazen, R.E. Synovec, Comprehensive Two-Dimensional High-Speed Gas Chromatography with Chemometric Analysis, *Anal Chem.* 70 (1998) 2796–2804. <https://doi.org/10.1021/ac980164m>.
- [18] A.E. Sinha, B.J. Prazen, C.G. Fraga, R.E. Synovec, Valve-based comprehensive two-dimensional gas chromatography with time-of-flight mass spectrometric detection: instrumentation and figures-of-merit, *J Chromatogr A.* 1019 (2003) 79–87. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2003.08.047>.
- [19] J. v. Seeley, F. Kramp, C.J. Hicks, Comprehensive Two-Dimensional Gas Chromatography via Differential Flow Modulation, *Anal Chem.* 72 (2000) 4346–4352. <https://doi.org/10.1021/ac000249z>.
- [20] John V. Seeley, Nicole J. Micyus, James D. McCurry, Stacy K. Seeley, Comprehensive Two-Dimensional Gas Chromatography With a Simple Fluidic Modulator. *Am. Lab.* 38 (2006).
- [21] P.Q. Tranchida, G. Purcaro, A. Visco, L. Conte, P. Dugo, P. Dawes, L. Mondello, A flexible loop-type flow modulator for comprehensive two-dimensional gas chromatography, *J Chromatogr A.* 1218 (2011) 3140–3145. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2010.11.082>.
- [22] I. Aloisi, B. Giocastro, A. Ferracane, T.M.G. Salerno, M. Zoccali, P.Q. Tranchida, L. Mondello, Preliminary observations on the use of a novel low duty cycle flow modulator for comprehensive two-dimensional gas chromatography, *J Chromatogr A.* 1643 (2021) 462076. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2021.462076>.
- [23] T.J. Trinklein, D. v. Gough, C.G. Warren, G.S. Ochoa, R.E. Synovec, Dynamic pressure gradient modulation for comprehensive two-dimensional gas chromatography, *J Chromatogr A.* 1609 (2020) 460488. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2019.460488>.
- [24] M. Adahchour, J. Beens, R.J.J. Vreuls, U.A.Th. Brinkman, Recent developments in comprehensive two-dimensional gas chromatography (GC×GC), *TrAC Trends in Anal. Chem.* 25 (2006) 438–454. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2006.03.002>.

- [25] G.S. Frysinger, R.B. Gaines, Comprehensive two-dimensional gas chromatography with mass spectrometric detection (GC x GC/MS) applied to the analysis of petroleum, *HRC J High Resolut Chromatogr.* 22 (1999) 251–255. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-4168\(19990501\)22:5<251::AID-JHRC251>3.0.CO;2-V](https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-4168(19990501)22:5<251::AID-JHRC251>3.0.CO;2-V).
- [26] W. Paul, H. Steinwedel, Notizen: Ein neues Massenspektrometer ohne Magnetfeld, *Zeitschrift Für Naturforschung A.* 8 (1953) 448–450. <https://doi.org/10.1515/zna-1953-0710>.
- [27] P.E. Miller, M.B. Denton, The quadrupole mass filter: Basic operating concepts, *J Chem Educ.* 63 (1986) 617. <https://doi.org/10.1021/ed063p617>.
- [28] A. van Es, J. Janssen, C. Cramers, J. Rijks, Sample enrichment in high speed narrow bore capillary gas chromatography. *J High Resolut Chromatogr.* 11 (1988) 852–857. <https://doi.org/10.1002/jhrc.1240111202>.
- [29] High-speed GC Analysis of VOCs: Sample Collection and Inlet Systems. *Environ Sci Technol.* 28 (1994) 369A–376A. <https://doi.org/10.1021/es00057a716>.
- [30] C.A. Cramers, P.A. Leclercq, Considerations on Speed of Separation, Detection, and Identification Limits in Capillary GC and GC/MS, *C R C Crit Rev Anal Chem.* 20 (1988) 117–147. <https://doi.org/10.1080/00078988808048809>.
- [31] P.A. Leclercq, C.A. Cramers, Optimum performance of capillary GC columns as a function of tube diameter and film thickness under various operating conditions. Computer program for calculation of H-ū curves and minimum analysis times, *J High Resolut Chromatogr.* 8 (1985) 764–771. <https://doi.org/10.1002/jhrc.1240081112>.
- [32] C. Bicchi, C. Brunelli, M. Galli, A. Sironi, Conventional inner diameter short capillary columns: an approach to speeding up gas chromatographic analysis of medium complexity samples, *J Chromatogr A.* 931 (2001) 129–140. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)01169-4](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)01169-4).
- [33] M. van Deursen, J. Beens, C.A. Cramers, H.G. Janssen, Possibilities and limitations of fast temperature programming as a route towards fast GC, *HRC J High Resolut Chromatogr.* 22 (1999) 509–513. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-4168\(19990901\)22:9<509::AID-JHRC509>3.0.CO;2-S](https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-4168(19990901)22:9<509::AID-JHRC509>3.0.CO;2-S).
- [34] F. David, D.R. Gere, F. Scanlan, P. Sandra, Instrumentation and applications of fast high-resolution capillary gas chromatography, *J Chromatogr A.* 842 (1999) 309–319. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(98\)01076-0](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(98)01076-0).
- [35] J.S. Alvarado, J. Silzer, F. Lemley, M.D. Erickson, Separation of Polychlorinated biphenyls by Fast Gas Chromatography†, *Anal Commun.* 34 (1997) 381–383. <https://doi.org/10.1039/a706975h>.
- [36] J. de Zeeuw, J. Peene, H.G. Jansen, X. Lou, A simple way to speed up separations by GC-MS using short 0.53 mm columns and vacuum outlet conditions, *HRC J High Resolut Chromatogr.* 23 (2000) 677–680. [https://doi.org/10.1002/1521-4168\(20001201\)23:12<677::AID-JHRC677>3.0.CO;2-L](https://doi.org/10.1002/1521-4168(20001201)23:12<677::AID-JHRC677>3.0.CO;2-L).

- [37] A.J. van Es, J.A. Rijks, C.A. Cramers, M.J.E. Golay, Turbulent flow in capillary gas chromatography—evaluation of a theoretical concept by Golay, *J Chromatogr A*. 517 (1990) 143–159. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)95717-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)95717-6).
- [38] A. van Es, J. Janssen, R. Bally, C. Cramers, J. Rijks, Sample introduction in high speed capillary gas chromatography; input band width and detection limits, *J High Resolut Chromatogr*. 10 (1987) 273–279. <https://doi.org/10.1002/jhrc.1240100512>.
- [39] L.M. Blumberg, M.S. Klee, Method Translation and Retention Time Locking in Partition GC, *Anal Chem*. 70 (1998) 3828–3839. <https://doi.org/10.1021/ac971141v>.
- [40] V.R. Meyer, *Practical High-Performance Liquid Chromatography FIFTH EDITION*, n.d.
- [41] L.R. Snyder, J.J. (Joseph J. Kirkland, *Introduction to modern liquid chromatography*, Wiley, 1979.
- [42] M.T.W. Hearn, B. Grego, High-performance liquid chromatography of amino acids, peptides and proteins, *J Chromatogr A*. 218 (1981) 497–507. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)82075-0](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)82075-0).
- [43] C. Horváth, W. Melander, I. Molnár, Solvophobic interactions in liquid chromatography with nonpolar stationary phases, *J Chromatogr A*. 125 (1976) 129–156. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)93816-0](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)93816-0).
- [44] P. Jandera, Can the theory of gradient liquid chromatography be useful in solving practical problems?, *J Chromatogr A*. 1126 (2006) 195–218. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2006.04.094>.
- [45] F. Cacciola, P. Jandera, L. Mondello, Temperature effects on separation on zirconia columns: Applications to one- and two-dimensional LC separations of phenolic antioxidants, *J Sep Sci*. 30 (2007) 462–474. <https://doi.org/10.1002/jssc.200600387>.
- [46] P.L. Zhu, J.W. Dolan, L.R. Snyder, Combined use of temperature and solvent strength in reversed-phase gradient elution II. Comparing selectivity for different samples and systems, *J Chromatogr A*. 756 (1996) 41–50. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(96\)00722-4](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(96)00722-4).
- [47] P.L. Zhu, L.R. Snyder, J.W. Dolan, N.M. Djordjevic, D.W. Hill, L.C. Sander, T.J. Waeghe, Combined use of temperature and solvent strength in reversed-phase gradient elution I. Predicting separation as a function of temperature and gradient conditions, *J Chromatogr A*. 756 (1996) 21–39. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(96\)00721-2](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(96)00721-2).
- [48] W.S. Hancock, R.C. Chloupek, J.J. Kirkland, L.R. Snyder, Temperature as a variable in reversed-phase high-performance liquid chromatographic separations of peptide and protein samples, *J Chromatogr A*. 686 (1994) 31–43. [https://doi.org/10.1016/0021-9673\(94\)00077-8](https://doi.org/10.1016/0021-9673(94)00077-8).

Capitolo 4.
Sezione sperimentale

4.1 Elucidazione del profilo volatile di campioni di whisky mediante microestrazione in fase solida *Arrow* e gascromatografia bidimensionale *comprehensive* accoppiata a spettrometria di massa

In questo lavoro, un nuovo metodo di preparazione del campione è stato utilizzato per l'estrazione e la preconcentrazione di composti organici volatili (COV) da campioni di whisky prima della loro determinazione mediante gascromatografia bidimensionale *comprehensive* (GC×GC) accoppiata alla spettrometria di massa (MS). L'estrazione dei composti volatili, importanti per le caratteristiche organolettiche dei diversi whisky e per la loro accettazione e gradimento da parte dei consumatori, si basa sull'utilizzo della fibra SPME *Arrow*. Dopo l'ottimizzazione, il metodo è stato confrontato con l'SPME convenzionale per quanto riguarda l'analisi di diversi tipi di whisky (nello specifico sono state valutate le tipologie whisky irlandese, whisky scozzese *single malt* e whisky scozzese *blended*) ed è stato dimostrato che la SPME *Arrow* ha una sensibilità fino a un fattore di sei volte superiore e una migliore ripetibilità di un fattore fino a cinque, a seconda della classe del composto. Un totale di 167 COV, inclusi terpeni, alcoli, esteri, acidi carbossilici, chetoni, sono stati identificati utilizzando la tecnica SPME *Arrow*, mentre un numero significativamente inferiore di composti (126) è stato identificato mediante SPME convenzionale. L'uso della fibra SPME *Arrow* combinata con GC×GC-MS si è dimostrato un potente strumento analitico per l'esplorazione del profilo volatile di campioni complessi, consentendo di identificare differenze in importanti composti aromatici per i tre diversi tipi di whisky studiati.

Questa sezione è stata tradotta e adattata dalla seguente pubblicazione: A. Ferracane, N. Manousi, P. Q. Tranchida, G. A. Zachariadis, L. Mondello, E. Rosenberg. Exploring the volatile profile of whiskey samples using solid-phase microextraction *Arrow* and comprehensive two-dimensional gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr A* 1676 (2022) 463241. Doi:10.1016/j.chroma.2022.463241

4.1.1 Introduzione

Il whisky è un tipo di bevanda alcolica distillata prodotta dalla fermentazione di cereali ed è considerata una delle bevande alcoliche più popolari in tutto il mondo [1]. Per la produzione di whisky, vengono mescolati cereali macinati e/o malto con acqua per produrre un mosto che viene poi ulteriormente fermentato con l'aggiunta di lievito. Successivamente, la miscela risultante viene distillata per produrre un distillato che viene infine conservato in botti [2]. Tipicamente, per il processo di invecchiamento del prodotto finale vengono utilizzate botti di legno di rovere bianco [1]. Il profilo volatile degli alcolici distillati dipende dalle materie prime utilizzate per la loro produzione, dalla loro procedura di fabbricazione (cioè fermentazione, distillazione e conservazione) e dal loro processo di invecchiamento [3]. Il whisky contiene un alto numero di COV che contribuiscono al suo aroma, tra i quali i più abbondanti sono esteri e alcoli. Altri composti che contribuiscono all'aroma generale dei whisky sono aldeidi, chetoni, composti furanici, terpeni e composti solforati [4]. La composizione volatile degli alcolici distillati è direttamente associata alla loro accettazione da parte dei consumatori. Pertanto, la determinazione dei COV nelle bevande alcoliche è molto importante per la valutazione della qualità e sicurezza e per la comprensione delle proprietà sensoriali del prodotto [3,5,6].

La gascromatografia monodimensionale accoppiata a spettrometria di massa (GC-MS) o con un rivelatore olfattometrico sono due tecniche analitiche consolidate per la determinazione di composti aromatici in campioni alimentari complessi [7,8]. Tuttavia, l'applicazione di queste tecniche per l'analisi di campioni alimentari complessi, può comportare una separazione insufficiente con la presenza di diverse coeluzioni degli analiti target [9]. Per superare questi potenziali inconvenienti, è possibile utilizzare la gascromatografia bidimensionale *comprehensive* (GC×GC). I sistemi *comprehensive* accoppiati alla spettrometria di massa costituiscono un potente strumento analitico per la profilazione e il *fingerprinting* di COV di alimenti e bevande [10].

L'uso dei protocolli di microestrazione *green* combinati con GC×GC è considerato un passo importante verso lo sviluppo di metodologie più rispettose dell'ambiente [11]. In questo contesto, la microestrazione in fase solida (SPME), proposta da Pawliszyn all'inizio degli anni '90 [12], è fino ad ora il formato più

esplorato della tecnica di microestrazione accoppiata alla GC [10]. SPME possiede diversi vantaggi, tra cui facilità di automazione, numero ridotto di fasi di preparazione del campione e non utilizzo di solventi [13]. Tuttavia, l'utilizzo delle fibre SPME convenzionali presenta anche alcuni inconvenienti fondamentali associati alla scarsa durabilità meccanica e al basso volume della fase di estrazione [14]. Più recentemente, la SPME *Arrow* è stata proposta come tecnica di preparazione del campione alternativa alla SPME convenzionale. Grazie ai suoi vantaggi intrinseci, la SPME *Arrow* ha già dimostrato di essere una tecnica analitica versatile per la determinazione dei COV in un'ampia varietà di campioni ambientali, alimentari, erboristici e forensi [14], [15], [16], [17]. Finora, la maggior parte delle applicazioni di SPME *Arrow* si sono concentrate sull'analisi di campioni alimentari, tra cui bucce d'uva [18], aceto di riso integrale [5], latte [6], salsa di pesce fermentata con sale coreano [19], salsa di soia [20] e campioni di pesce [21]. Recentemente, le applicazioni di SPME *Arrow* sono state ampliate con successo all'analisi di distillati (es. liquore coreano Soju [3] e liquore cinese Baijiu [22]).

In questo studio, SPME *Arrow* combinata con GC×GC-MS è stata impiegata per la prima volta per l'esplorazione del profilo volatile di campioni di whisky. I principali parametri che influiscono sulle prestazioni del protocollo di microestrazione sono stati studiati e ottimizzati. Dunque, il protocollo qui proposto è stato confrontato con la tecnica SPME convenzionale, per valutare la differenza di questa tecnica in termini di ripetibilità e sensibilità del metodo. La capacità del metodo proposto per la determinazione di molecole che rimangono indeterminate con l'SPME convenzionale è stata anche studiata utilizzando tre diversi tipi di campioni di whisky (cioè, "*blended Scotch whisky*", "*Irish whiskey*" e "*single malt Scotch whisky*").

4.1.2 Parte sperimentale

Reagenti e sostanze chimici

Il metanolo di grado LC-MS CHROMASOLV™ è stato acquistato da Honeywell (Riedel-de Haën GmbH, Seelze, Germania). L'H₃PO₄ concentrato (85%) e il KH₂PO₄ sono stati acquistati da Sigma-Aldrich (Steinheim, Germania). Anche il 3-metil-3-pentanololo (purezza 98,0%) è stato acquistato da Sigma-Aldrich ed è stato utilizzato come standard interno (ISTD). Una soluzione madre (2000 mg L⁻¹)

dell'ISTD è stata preparata in metanolo ed è stata diluita 10 volte per preparare una soluzione di ISTD a una concentrazione di 200 mg L⁻¹. Infine, una miscela di alcani C7–C30 acquistata da Supelco (Bellefonte, PA, USA) è stata impiegata per il calcolo degli indici di ritenzione lineare.

La fibra SPME *Arrow carbon wide range (WR)/polydimethylsiloxane (PDMS)* con un diametro esterno di 1,1 mm e uno spessore di 120 µm è stata acquistata da Restek Corporation (Bellefonte, PA, USA). La fibra SPME convenzionale carboxen (CAR)/PDMS con uno spessore di fase di 75 µm è stata acquistata da Supelco (Bellefonte, PA, USA). Prima dell'estrazione, le fibre SPME *Arrow* e convenzionale sono state pre-condizionate nella porta dell'iniettore del sistema GC in base alle raccomandazioni dei produttori. Tutte le estrazioni sono state eseguite utilizzando un agitatore magnetico IKA® RCT (IKA Labor Technik, Staufen, Germania).

Strumentazione analitica

Le analisi sono state condotte usando un sistema GC×GC–qMS costituito da un gascromatografo GC-2010 Shimadzu dotato di un iniettore *split/splitless* e uno spettrometro di massa a singolo quadrupolo QP2010 Ultra (Shimadzu Corporation, Kyoto, Giappone). La prima dimensione era costituita da una colonna Rtx-5MS 30 m × 0,25 mm ID, 0,25 µm d_f, (Crossbond 5% difenil-95% dimetilpolisilossano) (Restek Corporation, Bellefonte, PA, USA) ed è stata collegata a una colonna capillare non rivestita (1 m × 0,25 mm ID) usata come *loop* di accumulo. Il sistema è stato equipaggiato con un modulatore criogenico con *loop* a doppio stadio (Zoex Corporation, Houston, TX). Infine, il *loop* di accumulo è stato collegato a una colonna Stabilwax®-MS 2 m × 0,15 mm ID, 0,15 µm d_f (Crossbond Carbowax polietilenglicole) (Restek Corporation). Come gas *carrier* è stato usato elio (99,999%) a 61,8 kPa all'inizio dell'analisi (le analisi sono state condotte a velocità lineare costante). La temperatura dell'iniettore è stata impostata a 80 °C e la modalità *split* è stata utilizzata come iniezione con un rapporto di 25:1. La temperatura iniziale del forno era di 40 °C, mantenuta costante per 5 min. Dopo questo intervallo di tempo, la temperatura è stata aumentata a 230 °C utilizzando una rampa di 5 °C min⁻¹ e ulteriormente aumentata a 250 °C utilizzando una rampa di 50 °C min⁻¹. Il tempo totale di analisi è stato di 48,40 min. Sono stati applicati i seguenti parametri di modulazione:

periodo di modulazione pari a 4 s, temperatura del getto caldo: 350 °C e durata del getto caldo: 250 ms. Per quanto riguarda lo MS, i cromatogrammi sono stati acquisiti in modalità scansione con un intervallo di massa di m/z 45–445. La velocità di scansione dell'analizzatore di massa è stata impostata a 20,000 amu s⁻¹ (frequenza di acquisizione spettrale di 33 Hz). È stata usata la modalità di ionizzazione elettronica (70 eV), impostando la temperatura della sorgente di ionizzazione a 200 °C, mentre la temperatura della sorgente era di 250 °C. Il controllo del sistema e la gestione dei dati sono stati eseguiti utilizzando il software “Lab Solution GCMS ver. 4.5.”, mentre i cromatogrammi bidimensionali sono stati generati e processati utilizzando il software “ChromSquare ver. 2.3” (Shimadzu Europa, Duisburg, Germania). L'identificazione dei COV è stata effettuata utilizzando le librerie di massa spettrale “W11N17” (Wiley11-Nist17, Wiley, Hoboken, NJ, USA; Mass Finder 3) e “FFNSC 4.0” (Shimadzu Europa GmbH, Duisburg, Germania). L'uso di indici di ritenzione lineare in GC×GC è stato applicato come già precedentemente studiato da Purcaro [23]. Per quanto riguarda l'uso degli LRI e la corrispondenza degli spettri di massa, sono stati applicati rispettivamente un intervallo di corrispondenza di ± 20 punti e un valore di somiglianza di almeno l'80%.

Campionamento

In questo studio, tre diversi tipi di campioni di whisky, “*blended Scotch whiskey*”, “*Irish whiskey*” e “*single malt Scotch whiskey*”, sono stati acquistati in un supermercato di Vienna (Austria). Prima della loro analisi, tutti i campioni sono stati conservati al buio a temperatura ambiente.

Estrazione dei COV dai campioni di whisky

I campioni di whisky sono stati diluiti con tampone fosfato 25 mmol L⁻¹ (pH 3,3) fino ad ottenere un contenuto finale di etanolo del 12% v/v [24]. Per la procedura SPME *Arrow*, un'aliquota di 35 mL del campione è stata posta in una fiala di vetro da 50 mL. Il campione è stato saturato con NaCl (contenuto totale finale del 30% p/v) e sono stati aggiunti 70 µL della soluzione di ISTD. Successivamente, i campioni sono stati chiusi con tappi in alluminio con setto in gomma siliconica rivestiti in politetrafluoroetilene (PTFE). L'estrazione degli analiti è stata eseguita in 60 minuti a

temperatura ambiente sotto costante agitazione (500 rpm), mentre il desorbimento è avvenuto nella porta di iniezione del GC per 2 minuti. Dopo questo lasso di tempo, la fibra SPME *Arrow* è rimasta nell'iniettore per altri dieci minuti per la pulizia e condizionamento della fibra stessa che era quindi pronta per essere utilizzata per l'estrazione successiva. Le condizioni di estrazione della procedura SPME convenzionale erano uguali a quelle della procedura SPME *Arrow*, in modo da consentire il confronto delle due tecniche.

4.1.3 Risultati e discussioni

Ottimizzazione delle condizioni SPME *Arrow*

Per garantire un'elevata sensibilità di estrazione, i principali parametri che influiscono sulle prestazioni di estrazione del metodo SPME *Arrow* sono stati studiati e ottimizzati utilizzando l'approccio di studiare una variabile alla volta (*one variable at a time* OVAT). A tal proposito, sono stati esaminati indipendentemente l'effetto del tempo di estrazione, della velocità di agitazione e del contenuto di sale sull'efficienza di estrazione. Prima di ogni estrazione, come suggerito da Caldeira *et al.* [24] i campioni di whisky sono stati diluiti a un contenuto di etanolo del 12% v/v e il pH del campione è stato regolato a 3,3. La regolazione del pH del campione prima della procedura SPME può aumentare la sensibilità e la selettività per gli acidi organici, presenti nei campioni di whisky [25]. Un'aliquota di 35 mL del campione di whisky diluito è stata utilizzata per la procedura SPME *Arrow* [24]. Per quanto riguarda la temperatura di estrazione, non è stato impiegato alcun riscaldamento del campione e tutte le estrazioni sono state eseguite a temperatura ambiente dallo spazio di testa del campione per evitare possibili alterazioni ossidative del pattern dei COV e per rappresentare il più fedelmente possibile l'autentico sapore del whisky [9]. La scelta del rivestimento della fibra gioca un ruolo cruciale nello sviluppo di un metodo SPME. La natura chimica e la volatilità degli analiti target nei campioni esaminati è determinata dal tipo di rivestimento utilizzato [26]. In questo lavoro, le fibre semipolari CAR/PDMS sono state utilizzate per l'estrazione dei composti volatili dei campioni di whisky. Questa fibra è stata precedentemente indicata come una scelta appropriata per l'estrazione dei COV da campioni di whisky, mostrando una buona sensibilità nei confronti di idrocarburi, monoterpeni, composti carbonilici, acetati di

alcoli superiori ed esteri isoamilici [24, 26]. Questa fase di estrazione ha mostrato una buona sensibilità per molecole come acidi, esteri e composti non polari e quindi funge da buona opzione per l'estrazione di un'ampia gamma di composti aromatici volatili [27]. Si presume che i rivestimenti in fibra per SPME convenzionale e SPME *Arrow* mostrino proprietà comparabili, indipendentemente dal formato effettivo. Durante l'ottimizzazione del metodo, tutti i test sono stati eseguiti utilizzando lo stesso campione di whisky (cioè *blended Scotch whiskey*). Durante lo studio di ottimizzazione sono stati monitorati sei analiti di diverse classi chimiche e di conseguenza diverse proprietà chimiche (cioè volatilità e polarità). Questi composti includevano due esteri (estere etilico dell'acido ottanoico e estere etilico dell'acido nonanoico), un composto carbonilico (2-nonanone), un acido organico (acido dodecanoico) e due alcol (1-ottanolo e 1-decanolo). A causa della diversa abbondanza degli analiti monitorati, la normalizzazione delle loro aree è stata effettuata dividendo l'area di picco ottenuta nelle condizioni esaminate con la rispettiva area di picco in condizioni ottimali/selezionate.

Ottimizzazione del contenuto di sale

Il contenuto di sale del protocollo di estrazione SPME *Arrow* è stato studiato aggiungendo diverse quantità di cloruro di sodio al campione opportunamente diluito. L'aggiunta di sale può ridurre la solubilità degli analiti nella matrice del campione, consentendo loro di essere assorbiti sulla fibra e ottenendo così una maggiore efficienza di estrazione [28]. In questo lavoro sono state valutate tre diverse concentrazioni di NaCl (0, 15 e 30% p/v). L'estrazione degli analiti è avvenuta in 45 minuti sotto costante agitazione a 500 rpm. Come mostrato in figura 1, la saturazione del campione con NaCl al 30% p/v ha comportato una maggiore efficienza di estrazione per la maggior parte degli analiti (2-nonanone, acido dodecanoico, 1-ottanolo e 1-decanolo). Pertanto, i successivi esperimenti sono stati condotti utilizzando un contenuto di NaCl del 30% p/v.

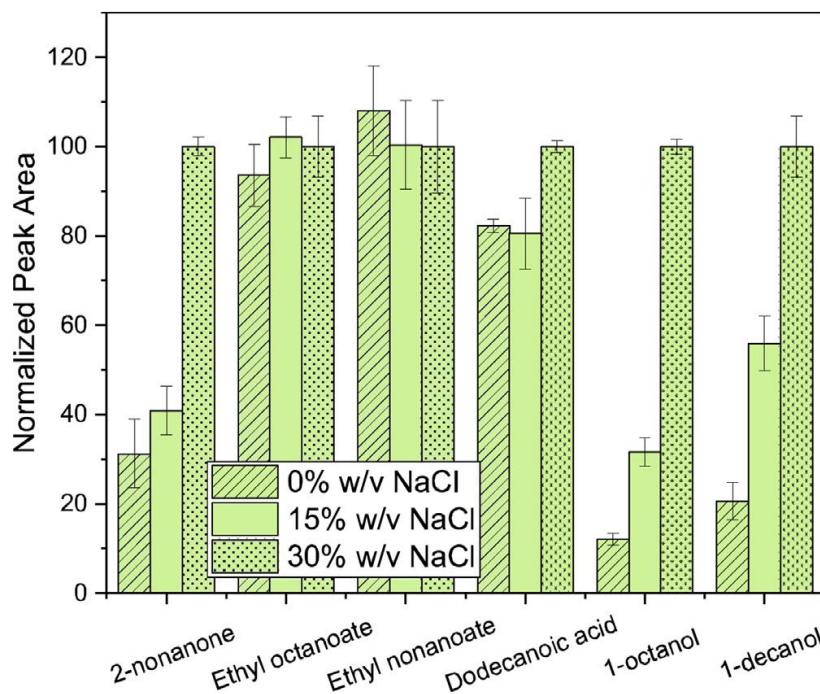


Figura 1. Valutazione di diverse concentrazioni di NaCl (n=3).

Ottimizzazione della velocità di agitazione

Il secondo parametro studiato è stato la velocità di agitazione. A tale scopo sono state valutate tre diverse velocità di agitazione (250 rpm “agitazione debole”, 500 rpm “agitazione media” e 1000 rpm “agitazione intensiva”). L'agitazione del campione può migliorare l'estrazione, specialmente per gli analiti con massa molecolare maggiore [29]. L'estrazione degli analiti target è stata effettuata per 45 min utilizzando un campione contenente il 30% p/v di NaCl. La figura 2 riassume i risultati della valutazione delle diverse velocità di agitazione. Come si può osservare, l'efficienza di estrazione è aumentata aumentando la velocità di agitazione da 250 rpm a 500 rpm. Tuttavia, un ulteriore aumento fino a 1000 rpm ha avuto un impatto negativo sull'efficienza di estrazione. Una probabile spiegazione è che a velocità di agitazione più elevate viene trasferita una quantità significativamente maggiore di etanolo nello spazio di testa e può quindi competere con gli altri COV per i siti di adsorbimento, poiché l'etanolo è presente nel whisky a una concentrazione molto più elevata dei volatili aromatici [30]. Di conseguenza, è stata infine scelta una velocità di agitazione di 500 rpm.

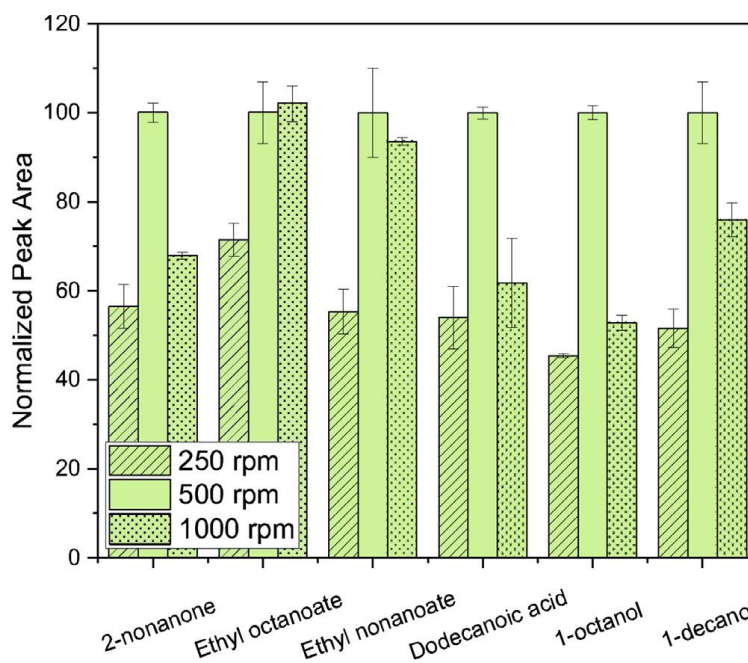


Figura 2. Valutazione delle diverse velocità di agitazione (n=3).

Ottimizzazione del tempo di estrazione

Infine, è stato studiato l'effetto del tempo di estrazione. Analogamente alla SPME convenzionale, è importante trovare il tempo di estrazione ottimale che garantisca l'estrazione della massima quantità di analiti [31]. In questo studio, i tempi di estrazione sono stati studiati tra 15 e 60 min. Come mostrato in figura 3, l'equilibrio è stato ottenuto a 30 minuti per l'estere etilico dell'acido nonanoico ed a 45 minuti per l'1-ottanolo. D'altra parte, un aumento del tempo di estrazione fino a 60 min ha un impatto positivo sull'efficienza di estrazione del 2-nonanone, dell'acido dodecanoico, dell'estere etilico dell'acido ottanoico e dell'1-decanolo. Questa osservazione può essere attribuita alla differenza di volatilità tra gli analiti monitorati. Un aumento del tempo di estrazione può aumentare l'efficienza di estrazione dei composti con alto punto di ebollizione, mentre i composti con punto di ebollizione più basso possono rimanere inalterati poiché raggiungono l'equilibrio già dopo un tempo più breve [32]. Allo stesso modo, è anche noto che il tempo in cui si raggiunge l'equilibrio aumenta con un coefficiente di ripartizione fibra/spazio di testa crescente. Poiché è stata ottenuta un'adeguata sensibilità a 60 minuti, tale tempo è stato selezionato per le successive analisi.

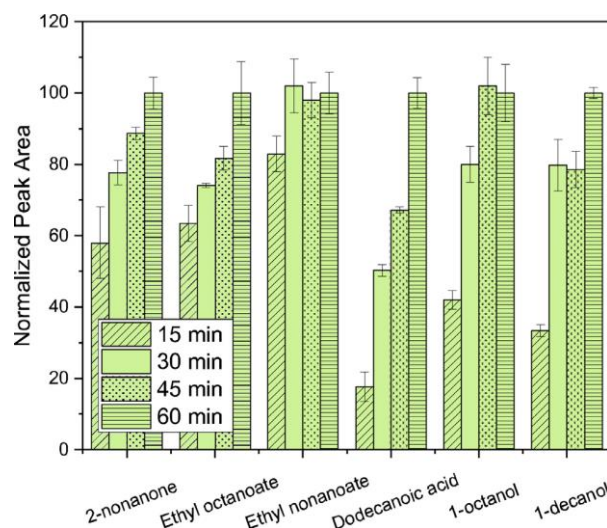


Figura 3. Valutazione dei diversi tempi di estrazione (n=3).

Confronto tra SPME convenzionale e SPME Arrow

La valutazione delle prestazioni dell'SPME convenzionale e dell'SPME *Arrow* è stata effettuata tenendo in considerazione il numero totale di COV identificati nei diversi campioni di whisky, nonché la sensibilità e la precisione delle due tecniche. La tabella 1 presenta i COV che sono stati identificati nei campioni di whisky mediante la SPME *Arrow* e convenzionale. Come si può osservare, sono stati identificati un totale di 167 COV per le tre diverse varietà di whisky utilizzando la SPME *Arrow*, mentre solo 121 COV sono stati identificati quando è stata utilizzata la fibra SPME convenzionale. SPME *Arrow* consente di determinare i composti (ad es. 2-ottale, 3-etossi-3-metil-1-butene, isopentil-butirrato, eptan-2-olo, estere butilico dell'acido esanoico, ecc.) che sono presenti in campioni di whisky, anche se la loro identificazione nelle stesse condizioni sperimentali non è stata possibile quando è stato utilizzato l'SPME convenzionale. In seguito, SPME *Arrow* e SPME convenzionale sono stati confrontati in termini di sensibilità complessiva. A tale scopo, un campione di “*blended Scotch whiskey*” è stato analizzato in tre ripetizioni ed è stato effettuato il confronto delle due tecniche in termini di aree ottenute per i composti selezionati. Come mostrato in figura 4, la sensibilità di determinazione per i COV è considerevolmente maggiore quando il campione viene analizzato con l'uso di fibra SPME *Arrow* per tutte le determinate classi di composti. I fattori di accrescimento sono stati calcolati come rapporto dell'area del picco nella misurazione SPME *Arrow* in relazione alla misurazione SPME convenzionale dei singoli composti. I fattori di

miglioramento individuali sono stati raggruppati e calcolati in base alla classe in modo da essere più rappresentativi. L'utilizzo di SPME *Arrow* ha portato a fattori di miglioramento della sensibilità fino a 6,1. Questi risultati sono in accordo con studi precedenti che riportavano la superiorità di SPME *Arrow* in termini di sensibilità del metodo [6, 33].

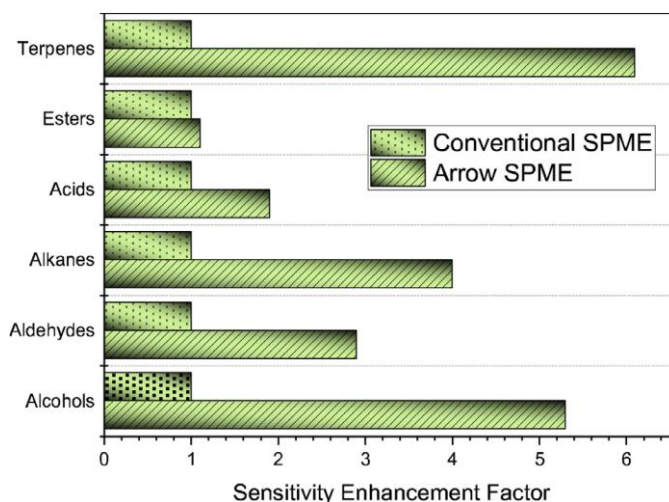


Figura 4. Confronto della sensibilità del metodo tra SPME *Arrow* e SPME convenzionale.

Tabella 1. Studio comparativo tra SPME *Arrow* e convenzionale per l'analisi di campioni di whisky. La tabella riporta i valori dell'area dei picchi per quei picchi che sono stati identificati dai loro spettri di massa e dagli indici di ritenzione.

Nr.	Analita	LRI	Blended Scotch		Irish		Single malt Scotch	
			ARROW	Conv.	ARROW	Conv.	ARROW	Conv.
1	Heptane	700	73034	-	63179	-	-	-
2	3-Ethoxy-3-methyl-1-butene	700	189651	-	971281	-	-	-
3	Ethyl propanoate	708	3682418	644764	28125510	5819773	3519745	634104
4	Propyl acetate	715	408318	-	137905	-	-	-
5	1,1-Diethoxyethane	721	14224188	-	116978703	9099701	17576932	660341
6	3-Methyl-1-butanol	733	256740608	45053251	426900243	59850519	1050679561	120195386
7	Ethyl isobutyrate	752	1661640	-	1203447	136227	-	-
8	Isobutyl acetate	768	7806245	776523	1177424	-	5527551	-
9	Octane	800	213278	-	941190	62249	327235	-
10	Ethyl butanoate	803	9581642	1416587	5927820	742485	13154245	2061469
11	Hexanal	805	847079	220643	2050915	1118996	-	-
12	1,1-Diethoxypropane	805	113351	-	200224	-	-	-
13	1-(1-Ethoxyethoxy)-propane	805	88966	-	371070	-	-	-
14	Butyl acetate	813	118631	-	-	-	-	-
15	1-Ethoxy-3-methyl-but-2-ene	817	220572	-	2891763	367268	-	-
16	Ethyl-2-methylbutanoate	842	1924584	200786	5516170	430786	1595564	158871
17	Furfural	845	970286	275377	458982	177450	2419673	1726130
18	Ethyl-3-methylbutanoate	850	3944547	532723	8322583	663528	3388896	758566
19	1,1-Diethoxy-2-methyl-	851	2522513	235489	2330023	153047	2120634	418175
20	Ethylbenzene	857	175601	-	510481	123485	-	-
21	Isobutyl propionate	863	84585	-	-	-	-	-
22	Amyl acetate	871	646506264	87683226	17662980	1524849	789921174	94097412

Nr.	Analita	LRI	Blended Scotch		Irish		Single malt Scotch	
			ARROW	Conv.	ARROW	Conv.	ARROW	Conv.
23	1-(1-Ethoxyethoxy)butane	872	297147	-	882779	-	259240	73988
24	Styrene	891	70022248	-	-	-	-	-
25	Acetyl valeryl	885	201739	-	394642	-	-	-
26	2-Heptanone	887	541075	-	369344	96283	-	-
27	Ethyl pentanoate	889	2646562	304844	3308238	341939	1415508	188182
28	3-Methyl-1-hexanol	896	624101	-	1253761	-	3079270	169610
29	1,3-Diethoxybutane	904	-	-	-	-	202172	-
30	Heptanal	906	380783	-	825853	107887	669864	420468
31	p-Xylene	907	508578	191952	3396283	672604	-	-
32	Heptan-2-ol	913	-	-	-	-	143433	-
33	Furfuryl ethyl ether	917	1434986	427767	-	-	-	-
34	Ethyl-2-methyl-2-butenolate	938	1711569	226207	1982383	356563	-	-
35	1,1-Diethoxy-2-propanone	941	490305	-	2923117	356778	-	-
36	1,1-Diethoxy-3-methyl-	946	6572391	645396	8770094	721220	1551749	-
37	□-pinene	948	644324	-	-	-	-	-
38	3-Methyl-nonane	951	513950	-	563397	-	-	-
39	2-Methyl-1,3-pentanediol	959	-	-	2262277	185386	-	-
40	1-Heptanol	960	-	-	-	-	1033854	80747
41	Acetaldehyde ethyl-isoamyl-	960	-	-	7819253	637891	1012049	-
42	Benzaldehyde	960	2321991	1204577	2707909	1253642	2392095	1927031
43	1-Octen-3-ol	969	396420	-	2189878	177810	-	-
44	Pentyl propanoate	984	1688544	266241	377336	-	-	-
45	3-Octanone	986	-	-	121816	-	3452251	333375
46	6-Methyl-hept-5-en-2-one	986	117136	-	-	-	-	-
47	2-Pentylfuran	991	2380969	470475	132070	114646	-	-
48	Myrcene	991	68001	-	-	-	-	-
49	Ethyl (E)-4-hexenoate	992	-	-	1541199	252517	-	-
50	2,6-Dimethyl-2,4,6-	993	306259	-	-	-	-	-
51	Isooctanol	995	339480	-	-	-	-	-
52	Decane	1000	-	245865	692199	105565	599152	265470
53	Ethyl hexanoate	1003	369126970	49266562	308637512	27909070	654185383	133071449
54	(S)-2-Octanol	1004	-	-	294376	-	357653	-
55	1-(1-Ethoxyethoxy)-pentane	1004	929777	-	-	-	698921	654919
56	1,1-Diethoxy pentane	1004	366816	-	-	-	6366443	916037
57	Dehydro- <i>cis</i> -linalool oxide	1006	363538	-	78204	-	271163	60941
58	Octanal	1006	440951	83225	-	-	-	-
59	3-Carene	1009	1048031	-	-	-	-	-
60	Hexyl acetate	1012	12306645	2027077	114247	-	14998434	2898160
61	Isopentyl isobutyrate	1014	159020	-	112708	-	-	-
62	Benzofuran	1018	165970	-	-	-	-	-
63	1,2,3-Trimethylbenzene	1020	1154270	761385	1480107	922615	718317	560294
64	2-Ethyl-1-hexanol	1030	-	-	229674	143596	-	-
65	Limonene	1030	765378	438193	1000981	143801	723842	591419
66	2,2,6-Trimethyl-	1035	-	-	190798	-	-	-
67	Ethyl-hex-(2E)-enoate	1041	-	-	126085	-	82612	-
68	<i>p</i> -Cymene	1042	682130	109855	790488	153352	-	-
69	Ethyl-2-furoate	1053	-	-	724476	184940	-	-
70	Isopentyl butyrate	1054	331099	-	205783	-	-	-
71	2-Octenal	1058	100440	-	126316	-	-	-
72	Ethyl-4-methylhexanoate	1068	-	-	45938779	-	-	-
73	1-Octanol	1076	2124966	621420	3743836	783055	11844895	2008432
74	1,1,3-Triethoxypropane	1079	505162	-	525494	-	400875	76961
75	Hexanal diethyl acetal	1088	3415551	724253	6008143	435208	1204467	827439
76	(E)-Hept-4-enoate	1091	153613	-	2501447	434619	325664	64717
77	2-Nonanone	1093	1985618	-	585203	186761	5454688	1612116
78	Propyl hexanoate	1096	108711	-	-	-	-	-
79	Undecane	1100	204490	-	-	-	-	-

Nr.	Analita	LRI	Blended Scotch		Irish		Single malt Scotch	
			ARROW	Conv.	ARROW	Conv.	ARROW	Conv.
80	Ethyl heptanoate	1101	5460882	1577250	16152079	3067650	7388299	2232399
81	Linalool	1101	1374987	-	-	-	6251635	1069449
82	3-Methylbutyl 2-	1104	-	-	111827	-	-	-
83	2-Nonanol	1105	487331	134603	1046514	445572	621552	-
84	Nonanal	1107	908425	445004	1050184	478641	7145584	2796054
85	Heptyl acetate	1114	1234407	396729	-	-	18912350	765960
86	1,1,3-Triethoxybutane	1115	-	-	758691	-	-	-
87	2-Ethyl-1,4-dimethyl-	1119	260604	-	-	-	-	-
88	Methyl octanoate	1125	317363	135217	225873	97083	293265	242326
89	Acetic acid, 2-ethylhexyl	1150	72056	-	-	-	-	-
90	Ethyl benzoate	1160	6420703	4445586	-	-	-	-
91	(E)-2-Nonenal	1163	806573	577159	435423	302040	2808640	1695570
92	Linalool ethyl ether	1166	471401	232367	215001	105868	3243909	363845
93	1-Nonanol	1176	121760	-	1136036	324909	1197768	139854
94	Diethyl butanedioate	1183	897646	217340	1838957	510407	8185114	1452982
95	Butyl hexanoate	1183	516083	-	181521	-	246297	-
96	1,1-Diethoxy-Heptane	1190	391776	212168	572073	237643	1528553	1097424
97	3-Decanone	1190	-	-	-	-	471828	202562
98	(Z)-4-Octanoate	1191	292691	146313	3576155	1424090	579307	232318
99	Octanoic acid	1192	5247366	5046693	243726	227258	367096	367096
100	Dodecane	1200	491936	388723	1194340	765292	1341827	740272
101	Ethyl octanoate	1202	1586412800	1114327809	1137944977	765514793	2529271628	881782120
102	Ethyl-oct-(2Z)-enoate	1203	-	-	106819	-	-	-
103	Decanal	1208	583503	579501	517484	466111	591550	346170
104	Benzenecarboxylic acid	1213	-	-	1580340	996999	7111540	4664672
105	Octyl acetate	1214	5635838	3213238	-	-	7710664	3210691
106	Ethyl 2-methyloctanoate	1218	-	-	524954	306725	-	-
107	1,3-bis-(1,1-Dimethylethyl)-	1249	777128	6233912	3229506	1860017	-	-
108	Ethyl-oct-(2E)-enoate	1250	209798	158193	815996	433043	529670	198640
109	Isopentyl hexanoate	1252	3269618	1834900	803975	383459	4707274	1902631
110	2-Phenylethyl acetate	1259	-	-	-	-	250282814	99953771
111	(Z)-4-Decen-1-ol	1266	-	-	351406	-	-	-
112	Ethyl benzeneacetate	1266	-	-	705516	-	1616740	381081
113	Isopropyl phenylacetate	1273	341228	-	-	-	-	-
114	Citronellyl formate	1275	-	-	-	-	403966	-
115	Methyl 3-phenylpropionate	1276	104823707	67891244	-	-	160716786	-
116	1-Decanol	1278	6837285	4070032	4458914	2376529	31309218	9903634
117	Vitispirane	1286	1200514	817574	2180266	1581599	-	-
118	3-Nonenoate	1290	1161833	782295	2558468	1428374	1132083	450811
119	2-Undecanone	1294	620010	-	212448	106238	6404575	2353697
120	Ethyl nonanoate	1297	19361719	12368239	32324905	20328920	25977921	11187761
121	Tridecane	1300	87079	-	-	-	-	-
122	2-Undecanol	1303	144167	-	-	-	-	-
123	Nonyl acetate	1313	147747	111004	-	-	210016	105678.5
124	Methyl decanoate	1327	574098	416983	428587	305472	769175	301298
125	Beta-methyl-gamma-	1344	-	-	2474887	804813	939055	263066
126	Citronellyl acetate	1350	497000	387769	-	-	-	-
127	Ethyl 3-phenylpropionate	1359	247167	171528	-	-	-	-
128	cis-Geranyl acetate	1361	83142	-	-	-	140122	69264
129	Butyl octanoate	1381	5614739	3879198	976818	839976	9144770	3457942
130	9-Decenoic acid	1386	4127094	3247172	14805595	11169603	24674526	18044741
131	(Z)-4-Decenoate	1389	1703448	1301762	3784060	2978127	-	-
132	1,2-Dihydro-1,1,6-trimethyl-	1396	-	-	192516	186698	-	-
133	Decanoic acid	1398	49808638	25278501	20431211	15686902	137475276	22340012
134	Ethyl decanoate	1399	2113245433	3475267362	1497463092	1520138861	2137248679	1335001224
135	Tetradecane	1400	-	-	365783	387097	-	-
136	Dodecanal	1410	368498	229772	171560	180723	-	-

Nr.	Analita	LRI	Blended Scotch		Irish		Single malt Scotch	
			ARROW	Conv.	ARROW	Conv.	ARROW	Conv.
137	Decyl acetate	1412	4455537	3135322	-	-	4240662	1815455
138	3-Methylbutyl octanoate	1446	36406688	25351152	4781894	4934941	38297774	16545348
139	Ethyl trans-2-decenoate	1447	588635	425400	904613	824999	952380	387768
140	<i>trans</i> -Geranylacetone	1450	134860	-	117608	-	223443	174269
141	(E)- β -Farnesene	1452	108075	-	-	-	-	-
142	Methyl-undeca-(2Z,4Z)-	1470	137982	96899	-	-	-	-
143	1-Dodecanol	1476	1518159	1108395	604838	463566	-	-
144	Ethyl-undec-10-enoate	1485	88516	-	170534	228980	-	-
145	Propyl decanoate	1487	2485987	1482612	2474762	-	3263535	1047891
146	Undecyl methyl ketone	1495	202513	128644	-	-	-	-
147	Ethyl-undecanoate	1498	2792411	1445825	-	-	-	-
148	Tridecanal	1516	211534	-	-	-	218512	93779
149	Isobutyl decanoate	1545	5457541	4464081	738062	631066	-	-
150	3,5- <i>bis</i> -(1,1-Dimethylethyl)-	1555	-	-	802946	516504	-	-
151	(E)-Nerolidol	1561	1512300	842382	-	-	1393231	121172
152	<i>cis</i> -5-Dodecenoic acid	1578	460827	-	-	-	-	-
153	Methyl tridecanoate	1580	-	-	-	-	94013	-
154	Dodecanoic Acid	1581	2418664	2290054	1228875	147996	8903720	2184079
155	Ethyl dodecanoate	1598	588572307	585470244	370531682	309865147	731681168	354099250
156	Lauryl acetate	1610	533326	453090	-	-	606016	263360
157	Tetradecanal	1614	123069	-	-	-	-	-
158	Phenethyl-hexanoate	1643	519570	486864	-	-	-	-
159	Isoamyl decanoate	1644	13653735	13459306	1793787	1149205	-	-
160	Propyl dodecanoate	1680	164735	139418	-	-	-	-
161	Isobutyl laurate	1744	197222	151408	-	-	-	-
162	Farnesyl acetate	1846	248585	-	-	-	-	-
163	Isopentyl dodecanoate	1846	153281	-	-	-	-	-
164	Phenylethyl-octanoate	1848	675037	420758	-	-	430502	117825
165	Ethyl E-11-hexadecenoate	1986	672880	-	-	-	-	-
166	Ethyl 9-hexadecenoate	1986	3340669	1314151	-	-	2275755	1072366
167	Ethyl hexadecanoate	1993	-	-	-	-	1285178	1057578

LRI: indice di ritenzione lineare

*In grassetto: composti più abbondanti

Infine, la ripetibilità delle due tecniche SPME è stata confrontata sulla base dei valori medi di deviazione standard relativa (RSD) delle aree dei composti. I dati sono stati ottenuti dalle analisi in triplicato di un campione di whiskey. La figura 5 presenta i risultati per le due tecniche, raggruppati secondo la classe dei composti chimici. La maggiore precisione e la maggiore sensibilità della fibra SPME Arrow è attribuita alla maggiore quantità di fase assorbente e alla maggiore area superficiale rispetto alla fibra SPME convenzionale [14]. Come si può osservare, l'utilizzo della fibra SPME Arrow porta a risultati più riproducibili rispetto alla fibra SPME convenzionale. Inoltre, consente l'estrazione di un numero maggiore di composti totali, nonché una maggiore sensibilità e riproducibilità.

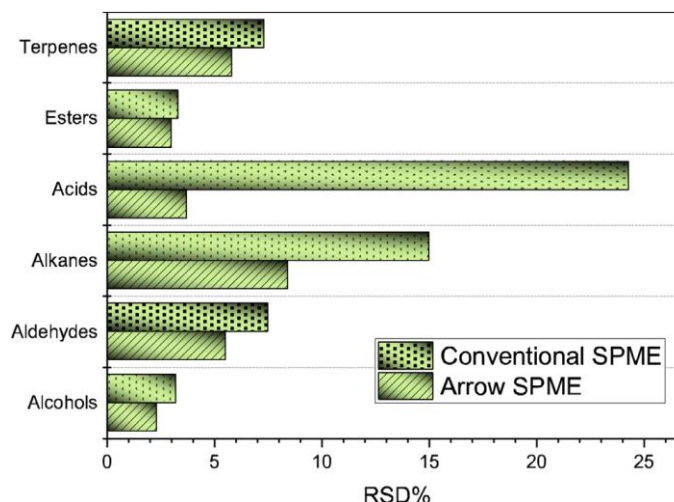


Figura 5. Confronto della ripetibilità del metodo tra SPME *Arrow* e SPME convenzionale per diverse classi di composti chimici.

Uso del SPME *Arrow* per la determinazione dei COV in campioni di whisky

In fine, il metodo ottimizzato SPME *Arrow* è stato impiegato per l'estrazione e la preconcentrazione di COV da diversi tipi di campioni di whisky prima della loro determinazione mediante GC×GC–qMS. I whisky irlandese e whisky scozzese sono tra i tipi di whisky più famosi. Il whisky scozzese è prodotto e maturato in botti di rovere per almeno tre anni in distillerie scozzesi situate in specifiche regioni designate. Questo tipo di whisky comprende cinque categorie distinte, vale a dire, whisky scozzese *single malt*, whisky scozzese *single grain*, whisky scozzese *blended*, whisky scozzese *blended malt* e whisky scozzese *blended grain*.

Il whisky irlandese è un altro tipo di distillato riconosciuto a livello internazionale dall'Indicazione Geografica ed è prodotto da malto d'orzo o da una miscela di altri cereali e orzo non maltati e maltati. In quest'ultimo caso il contenuto minimo di malto d'orzo è del 25% [34]. Molti dei COV che dovrebbero essere determinati nei campioni di whisky sono comuni a whisky diversi ma differiscono analiticamente in termini di quantità relativa [24]. In figura 6 sono mostrate tre espansioni di un cromatogramma rappresentativo di un campione di whisky scozzese di tipologia *blended*. Inoltre, la Tabella 2 riassume i risultati di tutti e tre le tipologie di whiskey analizzate. L'analisi semiquantitativa degli intervalli di concentrazione per i COV in tutti i campioni è stata condotta confrontando l'area del picco di ciascun analita con l'area del picco dello standard interno (3-metil-3-pentanololo). Gli esteri

degli acidi grassi comprendono un gruppo significativo di COV nei campioni di whisky. Questi composti esibiscono un odore gradevole e alcuni di essi hanno un forte impatto sull'odore e, di conseguenza, svolgono un ruolo importante come componenti aromatici dei campioni di whisky. Gli esteri degli acidi grassi a catena corta, inclusi gli esteri etilico, isobutile e 3-metilbutilico, sono costituenti comuni dei campioni di whisky e la loro presenza è associata a un aroma gradevole [35]. Ad esempio, l'acetato di isoamile e l'esanoato di etile sono composti con aromi fruttati, mentre l'acetato di 2-feniletile mostra un aroma floreale [4]. Altri esteri che vengono determinati nei campioni di whisky in quantità significative sono quelli degli acidi ottanoico, decanoico e dodecanoico, mentre l'etil E-11-esadecenoato è un composto comune che si trova principalmente negli scotch whisky [35]. I composti furanici che sono stati rilevati nei campioni di whisky includevano 2-pentilfurano e furfurolo. Il furfural esibisce un aroma tostato descritto come “mandorla cotta/tostata”. Il 2-pentilfurano esibisce un aroma terroso, descritto rispettivamente come “gas/cattivo odore” e “persistente”.

Tra i principali alcoli rilevati nei campioni di whisky, la maggior parte dei COV rilevati (cioè, 3-metil-1-butanololo o alcol isoamilico) mostra un tipo di odore grasso [4]. Nei campioni di whisky è stata inoltre determinata un'ampia gamma di aldeidi con diversi tipi di odore. Tra questi, i composti con sentore vegetale come ad esempio (E)-2-ottanale descritto come “vegetale/cavolo” ed esanale descritto come “verde/vegetativo”; chimico (es. nonanale descritto come “sapone/fresco”), grasso [ad esempio, (E)-2-nonenal descritto come “fritto/tostato/grasso”] e chimico (ad esempio, eptanale descritto come “alga/erba/gomma” e decanale descritto come “erba/limone”) sono stati trovati nei campioni di whisky [4, 36]. Al contrario, la presenza di stirene può essere attribuita alla contaminazione del campione [37]. Le bevande alcoliche sono note per essere buoni agenti estrattori per il polistirene dai materiali di imballaggio [38]. Nel caso attuale, si sospetta che il rivestimento polimerico del tappo a vite sia la fonte della contaminazione osservata.

Tabella 2. Analisi dei campioni di whisky mediante SPME Arrow e GC×GC–qMS riportate come rapporto dell'area dei picchi normalizzato rispetto allo standard interno.

Analita	Blended Scotch	Irish	Single malt Scotch
Heptane	0.064 ± 0.002	0.123 ± 0.048	0.066 ± 0.002
3-Ethoxy-3-methyl-1-butene	0.032 ± 0.002	0.138 ± 0.028	-
Ethyl propanoate	0.628 ± 0.190	1.126 ± 0.065	0.384 ± 0.024
Propyl acetate	0.069 ± 0.014	0.021 ± 0.005	-
1,1-Diethoxyethane	2.421 ± 0.562	16.835 ± 1.144	1.643 ± 0.384
3-Methyl-1-butanol	43.691 ± 8.662	60.641 ± 10.994	101.135 ± 13.937
Ethyl-isobutyrate	0.033 ± 0.002	-	-
Isobutyl acetate	109.605 ± 4.324	2.557 ± 0.303	128.651 ± 8.109
Octane	0.075 ± 0.020	-	-
Ethyl butanoate	0.669 ± 0.061	1.192 ± 0.166	0.341 ± 0.080
Hexanal	-	-	0.126 ± 0.002
1-(1-Ethoxyethoxy)-propane	0.015 ± 0.004	0.053 ± 0.012	-
1,1-Diethoxy-Propane	0.019 ± 0.004	0.030 ± 0.003	-
Butyl acetate	0.020 ± 0.003	-	-
1-Ethoxy-3-methyl-But-2-ene	-	0.366 ± 0.040	0.093 ± 0.009
Ethyl-2-methylbutanoate	-	0.018 ± 0.002	-
Furfural	0.042 ± 0.004	-	-
Ethyl 3-methylbutanoate	0.327 ± 0.035	0.802 ± 0.140	0.156 ± 0.002
1,1-Diethoxy-2-methyl-propane	0.428 ± 0.037	0.346 ± 0.037	0.207 ± 0.007
Ethylbenzene	0.100 ± 0.013	0.136 ± 0.024	0.095 ± 0.014
Isobutyl propionate	0.014 ± 0.004	-	-
Amyl acetate	62.590 ± 2.991	45.002 ± 3.974	64.357 ± 1.385
1-(1-Ethoxyethoxy)butane	0.050 ± 0.008	0.131 ± 0.020	0.027 ± 0.008
Acetyl valeryl	0.034 ± 0.001	0.059 ± 0.008	-
2-Heptanone	0.092 ± 0.003	0.054 ± 0.006	-
Ethyl pentanoate	0.062 ± 0.010	-	0.701 ± 0.190
Styrene	11.871 ± 0.476	-	-
3-Methyl-1-hexanol	0.105 ± 0.022	0.182 ± 0.023	0.307 ± 0.045
1,3-Diethoxybutane	-	-	0.022 ± 0.008
Heptanal	-	-	0.015 ± 0.005
p-Xylene	0.086 ± 0.009	0.422 ± 0.025	-
Heptan-2-ol	0.020 ± 0.006	-	-
Furfuryl ethyl ether	0.164 ± 0.014	0.079 ± 0.014	0.234 ± 0.035
Ethyl 2-methyl-2-butenolate	0.290 ± 0.006	0.288 ± 0.082	-
1,1-Diethoxy-2-propanone	0.083 ± 0.017	0.452 ± 0.065	-
1,1-Diethoxy-3-methyl-Butane	0.037 ± 0.009	0.417 ± 0.065	-
Alpha-pinene	0.058 ± 0.001	-	-
3-Methyl-nonane	0.155 ± 0.031	0.154 ± 0.024	0.706 ± 0.040
2-Methyl-1.3-pentanediol	-	0.329 ± 0.056	-
1-Heptanol	-	-	0.109 ± 0.072
Acetaldehyde ethyl isoamyl acetal	-	1.194 ± 0.333	0.109 ± 0.095
Benzaldehyde	0.110 ± 0.029	-	-
1-Octen-3-ol	0.067 ± 0.005	0.322 ± 0.012	-
Pentyl propanoate	0.286 ± 0.006	0.056 ± 0.005	-
3-Octanone	-	0.017 ± 0.001	0.348 ± 0.087
6-Methyl-hept-5-en-2-one	0.023 ± 0.013	0.016 ± 0.001	0.023 ± 0.006
2-Pentylfuran	0.405 ± 0.066	0.020 ± 0.003	-
Myrcene	0.062 ± 0.004	0.012 ± 0.003	0.027 ± 0.006
Ethyl (E)-4-hexenoate	-	0.021 ± 0.008	0.008 ± 0.001
2,6-Dimethyl-2,4,6-octatriene	0.052 ± 0.014	-	-
Isooctanol	0.027 ± 0.002	0.017 ± 0.009	-
Decane	0.099 ± 0.002	0.075 ± 0.008	0.066 ± 0.006
Ethyl hexanoate	0.087 ± 0.002	0.025 ± 0.001	0.023 ± 0.008

Analita	Blended Scotch	Irish	Single malt Scotch
(S)-2-Octanol	-	0.045 ± 0.003	0.037 ± 0.015
1-(1-Ethoxyethoxy)-pentane	0.116 ± 0.023	0.120 ± 0.058	-
1,1-Diethoxy-Pentane	0.158 ± 0.028	-	0.069 ± 0.004
Dehydro-cis-linalool oxide	0.080 ± 0.008	0.032 ± 0.008	0.370 ± 0.489
Octanal	-	0.016 ± 0.008	-
3-Carene	0.178 ± 0.043	-	-
Hexyl acetate	2.088 ± 0.140	0.018 ± 0.003	1.445 ± 0.253
Isopentyl Isobutyrate	0.283 ± 0.061	0.170 ± 0.017	-
Benzofuran	17.806 ± 2.443	-	16.057 ± 2.678
1,2,3-trimethyl-Benzene	0.393 ± 0.006	0.427 ± 0.038	0.232 ± 0.019
2-Ethyl-1-hexanol	-	0.074 ± 0.010	-
Limonene	0.091 ± 0.007	-	0.061 ± 0.015
2,2,6-Trimethyl-cyclohexanone	-	-	0.039 ± 0.003
Ethyl-hex-(2E)-enoate	0.927 ± 0.080	2.358 ± 0.248	0.723 ± 0.018
p-Cymene	269.170 ± 21.681	168.624 ± 15.551	250.604 ± 22.265
2-Ethyl-furoate	0.243 ± 0.007	-	-
Isopentyl butyrate	0.952 ± 0.021	0.149 ± 0.048	1.186 ± 0.210
2-Octenal	0.017 ± 0.001	0.019 ± 0.002	-
Ethyl 4-methylhexanoate	-	6.678 ± 0.976	-
1-Octanol	0.360 ± 0.010	0.544 ± 0.060	1.193 ± 0.288
1,1,3-Triethoxy-propane	0.086 ± 0.002	0.082 ± 0.003	0.039 ± 0.001
Hexanal diethyl acetal	0.144 ± 0.006	0.292 ± 0.029	-
(E)-Hept-4-enoate	0.026 ± 0.001	0.364 ± 0.010	0.032 ± 0.003
2-Nonanone	0.337 ± 0.014	0.085 ± 0.006	0.534 ± 0.013
Propyl hexanoate	0.088 ± 0.009	-	-
Undecane	0.034 ± 0.010	-	-
Ethyl heptanoate	0.067 ± 0.025	0.087 ± 0.026	0.148 ± 0.018
Linalool	0.133 ± 0.015	0.148 ± 0.016	0.072 ± 0.013
3-Methylbutyl 2-methylbutanoate	0.153 ± 0.026	0.272 ± 0.026	0.822 ± 0.076
2-Nonanol	0.083 ± 0.019	0.171 ± 0.023	0.062 ± 0.011
Nonanal	0.257 ± 0.019	-	0.132 ± 0.042
Heptyl acetate	0.210 ± 0.025	-	1.681 ± 1.666
1,1,3-triethoxybutane	-	0.117 ± 0.017	-
2-Ethyl-1,4-dimethyl-benzene	0.131 ± 0.012	0.476 ± 0.075	-
Methyl octanoate	0.889 ± 0.022	0.041 ± 0.004	0.037 ± 0.008
Acetic acid, 2-ethylhexyl ester	0.012 ± 0.001	-	-
Ethyl benzoate	0.028 ± 0.005	-	-
(E)-2-Nonenal	0.137 ± 0.002	0.067 ± 0.004	0.283 ± 0.068
Linalool ethyl ether	0.233 ± 0.004	-	0.627 ± 0.126
1-Nonanol	0.021 ± 0.001	0.163 ± 0.027	0.120 ± 0.026
Diethyl butanedioate	1.115 ± 0.104	1.332 ± 0.273	0.154 ± 0.018
Butyl hexanoate	0.018 ± 0.001	-	-
1,1-Diethoxy-Heptane	0.012 ± 0.001	0.009 ± 0.001	-
3-Decanone	-	-	0.047 ± 0.011
(Z)-4-Octanoate	0.049 ± 0.005	0.530 ± 0.047	0.057 ± 0.000
Octanoic acid	0.114 ± 0.004	-	0.043 ± 0.008
Dodecane	0.063 ± 0.005	0.026 ± 0.009	-
Ethyl octanoate	6.179 ± 0.587	0.712 ± 0.091	3.821 ± 0.529
Ethyl-oct-(2Z)-enoate	0.036 ± 0.010	0.122 ± 0.053	0.052 ± 0.002
Decanal	-	0.029 ± 0.003	-
Benzenecarboxylic acid	-	0.102 ± 0.028	0.163 ± 0.031
Octyl acetate	0.956 ± 0.075	-	0.768 ± 0.104
Ethyl 2-methyloctanoate	0.054 ± 0.003	0.032 ± 0.008	0.028 ± 0.006
1,3-bis(1,1-Dimethylethyl)-benzene	0.196 ± 0.014	0.220 ± 0.048	0.071 ± 0.003
Ethyl-oct-(2E)-enoate	3.282 ± 0.095	4.938 ± 0.632	2.593 ± 0.411
Isopentyl hexanoate	0.058 ± 0.002	-	-
2-Phenylethyl acetate	-	-	24.983 ± 3.960
(Z)-4-Decen-1-ol	-	0.052 ± 0.009	-

Analita	Blended Scotch	Irish	Single malt Scotch
Ethyl benzeneacetate	0.044 ± 0.008	-	-
Isopropyl phenylacetate	-	0.116 ± 0.029	-
Citronellyl formate	0.084 ± 0.005	-	-
Methyl 3-phenylpropionate	0.030 ± 0.006	-	-
1-Decanol	1.159 ± 0.061	0.648 ± 0.093	3.142 ± 0.251
Vitispirane	0.204 ± 0.017	0.469 ± 0.073	-
3-Nonenoate	0.197 ± 0.009	0.379 ± 0.049	0.110 ± 0.010
2-Undecanone	0.105 ± 0.001	0.032 ± 0.005	0.657 ± 0.270
Ethyl nonanoate	0.087 ± 0.022	0.079 ± 0.010	-
Tridecane	0.015 ± 0.001	-	-
2-Undecanol	0.024 ± 0.005	-	-
Nonyl acetate	0.025 ± 0.005	-	0.021 ± 0.007
Methyl decanoate	358.434 ± 22.560	224.226 ± 18.354	214.390 ± 23.777
Beta-methyl-gamma-octalactone	1.090 ± 0.120	-	-
Citronellyl acetate	0.078 ± 0.016	-	-
Ethyl 3-phenylpropionate	0.114 ± 0.014	-	-
Cis-Geranyl acetate	-	0.110 ± 0.013	-
Butyl octanoate	1.628 ± 0.238	0.849 ± 0.089	0.759 ± 0.394
9-Decenoic acid	0.701 ± 0.073	2.218 ± 0.077	2.121 ± 2.853
(Z)-4-Decenoate	0.289 ± 0.012	0.568 ± 0.255	-
1,2-Dihydro-1,1,6-trimethyl-naphthalene	0.012 ± 0.001	-	-
Decanoic acid	0.931 ± 0.110	0.105 ± 0.020	-
Ethyl decanoate	8.450 ± 0.632	2.999 ± 0.127	13.740 ± 2.339
Tetradecane	-	0.052 ± 0.006	-
Dodecanal	0.409 ± 0.097	0.362 ± 0.017	0.308 ± 0.021
Decyl acetato	0.756 ± 0.049	-	0.405 ± 0.099
3-Methylbutyl octanoate	-	0.078 ± 0.019	-
Ethyl trans-2-decenoate	-	-	0.226 ± 0.026
trans-Geranylacetone	0.014 ± 0.004	-	0.014 ± 0.002
(E)-Beta-farnesene	0.030 ± 0.005	0.072 ± 0.012	-
Methyl-undeca-(2Z,4Z)-dienoate	0.023 ± 0.005	-	-
1-Dodecanol	0.257 ± 0.029	0.090 ± 0.015	-
Ethyl-undec-10-enoate	0.015 ± 0.003	0.024 ± 0.003	-
Propyl decanoate	0.097 ± 0.011	0.065 ± 0.011	0.076 ± 0.009
Undecyl methyl ketone	0.034 ± 0.001	-	-
Ethyl-undecanoate	0.473 ± 0.021	-	-
Tridecanal	0.036 ± 0.004	-	0.021 ± 0.001
Isobutyl decanoate	2.416 ± 0.301	0.251 ± 0.024	-
3,5-bis(1,1-Dimethylethyl)-phenol	0.449 ± 0.035	0.478 ± 0.125	0.138 ± 0.011
(E)-nerolidol	-	0.031 ± 0.012	-
cis-5-Dodecenoic acid	0.056 ± 0.007	0.031 ± 0.007	-
Methyl tridecanoate	-	-	0.009 ± 0.001
Dodecanoic Acid	0.026 ± 0.008	-	-
Ethyl dodecanoate	0.410 ± 0.034	0.155 ± 0.030	0.879 ± 0.052
Lauryl acetate	0.554 ± 0.020	0.121 ± 0.014	0.464 ± 0.014
Tetradecanal	0.021 ± 0.001	-	-
Phenethyl-hexanoate	0.581 ± 0.091	0.914 ± 0.169	0.114 ± 0.012
Isoamyl decanoate	-	0.104 ± 0.049	0.059 ± 0.003
Propyl dodecanoate	99.991 ± 14.485	52.700 ± 9.882	72.068 ± 2.373
Isobutyl laurate	1.327 ± 0.233	0.163 ± 0.007	0.558 ± 0.148
Farnesyl acetate	0.018 ± 0.001	-	-
Isopentyl dodecanoate	0.084 ± 0.016	0.183 ± 0.027	0.136 ± 0.043
Phenylethyl-octanoate	0.036 ± 0.007	0.131 ± 0.008	0.033 ± 0.007
Ethyl E-11-hexadecenoate	0.028 ± 0.013	-	-
Ethyl 9-hexadecenoate	0.042 ± 0.001	-	-
Ethyl hexadecanoate	-	0.226 ± 0.035	-

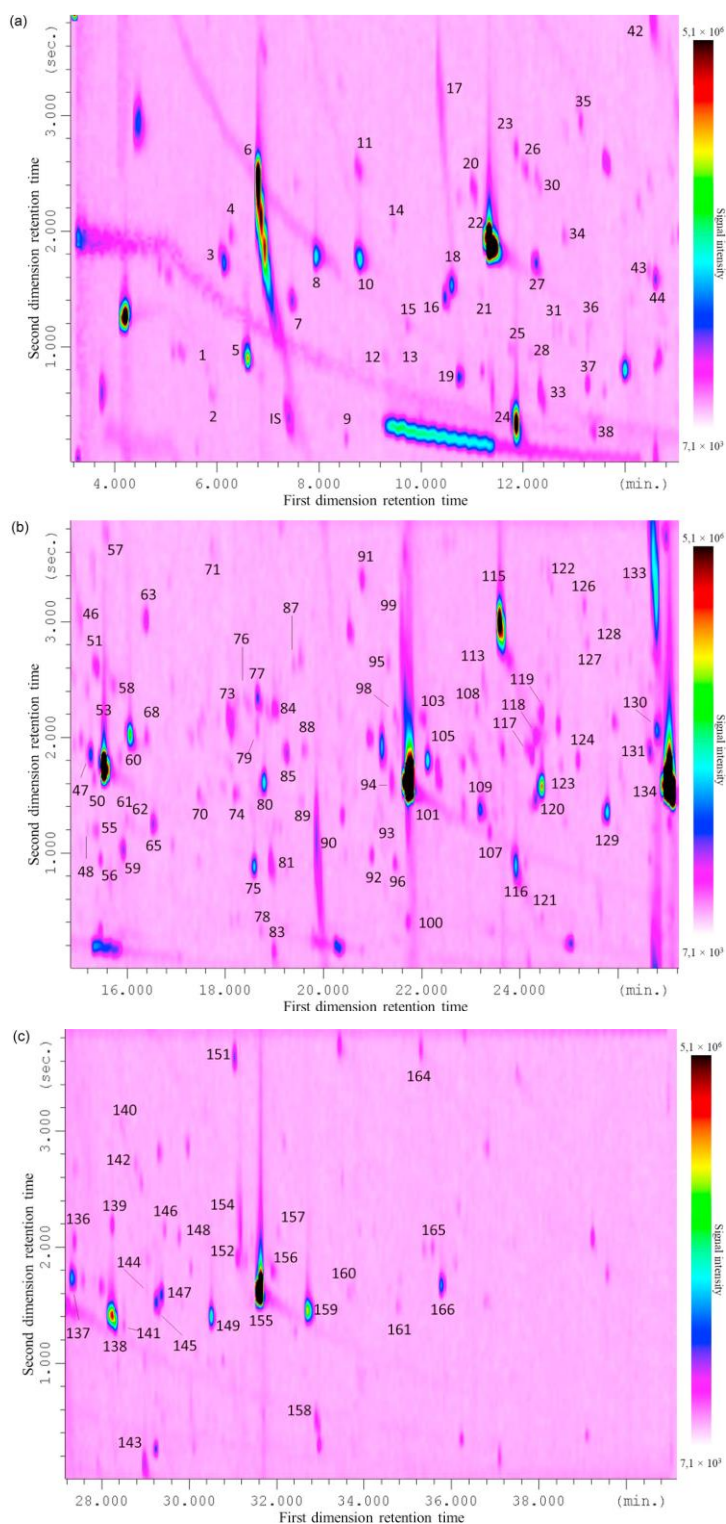


Figura 6. Cromatogramma rappresentativo di un whisky scozzese di tipologia *blended* sottoposto a SPME Arrow GC×GC–MS. Il cromatogramma è stato diviso in tre espansioni (a–c).

La figura 7 mostra tre *spider plot* che forniscono il confronto dell'intensità di dieci COV che sono stati identificati come composti odoranti chiave e che sono stati identificati nei campioni di whisky (cioè, 1,1-dietossietano, 3- metil-1-butanolo, 2-nonanolo, (E)-2-nonenal, estere etilico dell'acido dodecanoico, estere etilico dell'acido ottanoico, estere etilico dell'acido esanoico, estere etilico dell'acido butanoico, estere etilico dell'acido 3-metil-butanoico e 2 -estere etilico dell'acido metil-butanoico) [39–41]. La concentrazione di ciascun composto è stata normalizzata alla concentrazione più alta trovata per il rispettivo composto tra i tre diversi campioni di whisky. La concentrazione relativa di ciascun composto è stata tracciata lungo i raggi di questo diagramma con un intervallo di 0-10, che rappresenta lo 0-100% della concentrazione massima. Come si può osservare, sono state osservate differenze relativamente elevate tra i particolari tipi di whisky che sono stati analizzati in questo studio. Pertanto, SPME *Arrow* potrebbe potenzialmente fungere da tecnica di estrazione semplice ed efficiente per la differenziazione di diversi tipi di campioni di whisky.

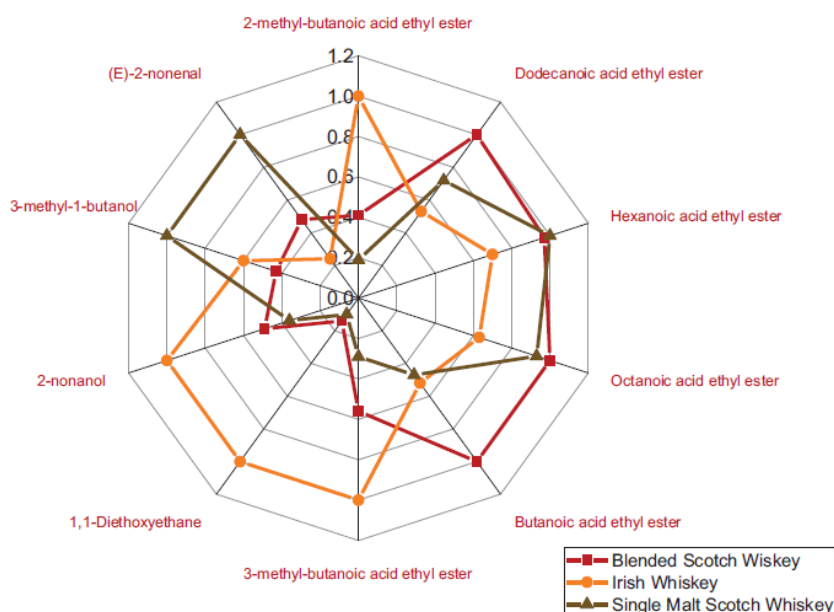


Figura 7. Confronto dei principali COV con caratteristiche aromatiche nei tre diversi campioni di whisky.

4.1.3. Conclusioni

In questo lavoro, la tecnica SPME *Arrow* associata con GC×GC-qMS è stata valutata per la prima volta per il campionamento di COV di diversi tipi di campioni di whisky. I parametri principali che influenzano le prestazioni del protocollo SPME

Arrow sono stati studiati e ottimizzati e il metodo proposto è stato confrontato con la fibra SPME convenzionale. In condizioni ottimali, l'utilizzo delle fibre SPME *Arrow* ha comportato una migliore sensibilità e ripetibilità rispetto alle tradizionali fibre CAR/PDMS. Inoltre, l'utilizzo della tecnica SPME *Arrow* ha consentito il rilevamento di costituenti più volatili rispetto al formato SPME convenzionale. Si può quindi concludere che l'accoppiamento della SPME *Arrow* e GC×GC-MS può fornire informazioni più complete rispetto alle tecniche di preparazione del campione già esistenti, rendendolo più appropriato per la ricerca di molecole in complessi campioni.

Riferimenti bibliografici:

- [1] A. Pawlaczyk, M. Gajek, K. Jozwik, M.I. Szyrkowska, Multielemental analysis of various kinds of whisky, *Molecules*. 24 (2019).
- [2] Y.P. Zhao, X.P. Zheng, P. Song, Z.L. Sun, T.T. Tian, Characterization of volatiles in the six most well-known distilled spirits, *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 71 (2013) 161–169.
- [3] J. Cha, Y.W. Chin, J.Y. Lee, T.W. Kim, H.W. Jang, Analysis of volatile compounds in soju, a korean distilled spirit, by SPME-Arrow-GC/MS, *Foods*. 9 (2020).
- [4] M. Kyrleou, D. Herb, G.O. Reilly, N. Conway, T. Bryan, K.N. Kilcawley, The Impact of Terroir on the Flavour of Single Malt Whisk(e)y New Make Spirit, *Foods*. 10 (2021) 443.
- [5] T.G. Nam, J.Y. Lee, B.K. Kim, N.E. Song, H.W. Jang, Analyzing volatiles in brown rice vinegar by headspace solid-phase microextraction (SPME)–Arrow: Optimizing the extraction conditions and comparisons with conventional SPME, *Int. J. Food Prop.* 22 (2019) 1195–1204.
- [6] N. Manousi, E. Rosenberg, G.A. Zachariadis, Solid-phase microextraction arrow for the sampling of volatile organic compounds in milk samples, *Separations*. 7 (2020) 1–12.
- [7] B. d’Acampora Zellner, P. Dugo, G. Dugo, L. Mondello, Gas chromatography-olfactometry in food flavour analysis, *J. Chromatogr. A*. 1186 (2008) 123–143.
- [8] C. Diez-Simon, R. Mumm, R.D. Hall, Mass spectrometry-based metabolomics of volatiles as a new tool for understanding aroma and flavour chemistry in processed food products, *Metabolomics*. 15 (2019) 1–20.
- [9] G. Dugo, F.A. Franchina, M.R. Scandinaro, I. Bonaccorsi, N. Cicero, P.Q. Tranchida, L. Mondello, Elucidation of the volatile composition of marsala wines by using comprehensive two-dimensional gas chromatography, *Food Chem.* 142 (2014) 262–268.
- [10] J.R.B. de Souza, F.F.G. Dias, J.D. Caliman, F. Augusto, L.W. Hantao, Opportunities for green microextractions in comprehensive two-dimensional gas chromatography / mass spectrometry-based metabolomics – A review, *Anal. Chim. Acta*. 1040 (2018) 1–18.
- [11] F. Stilo, C. Bicchi, A. Robbat, S.E. Reichenbach, C. Cordero, Untargeted approaches in food-omics: The potential of comprehensive two-dimensional gas chromatography/mass spectrometry, *TrAC - Trends Anal. Chem.* 135 (2021) 116162.
- [12] C.L. Arthur, J. Pawliszyn, Solid Phase Microextraction with Thermal Desorption Using Fused Silica Optical Fibers, *Anal. Chem.* 62 (1990) 2145–2148.
- [13] W. Kaziur, A. Salemi, M.A. Jochmann, T.C. Schmidt, Automated determination of picogram-per-liter level of water taste and odor compounds using solid-phase microextraction arrow coupled with gas chromatography-mass spectrometry, *Anal. Bioanal. Chem.* 411 (2019) 2653–2662.

- [14] J.S. Herrington, G.A. Gómez-Ríos, C. Myers, G. Stidsen, D.S. Bell, Hunting molecules in complex matrices with spme arrows: A review, *Separations*. 7 (2020).
- [15] S.J. Kim, J.Y. Lee, Y.S. Choi, J.M. Sung, H.W. Jang, Comparison of different types of SPME arrow sorbents to analyze volatile compounds in *cirsium setidens nakai*, *Foods*. 9 (2020).
- [16] A. Helin, T. Rönkkö, J. Parshintsev, K. Hartonen, B. Schilling, T. Läubli, M.L. Riekkola, Solid phase microextraction Arrow for the sampling of volatile amines in wastewater and atmosphere, *J. Chromatogr. A*. 1426 (2015) 56–63.
- [17] A. Kremser, M.A. Jochmann, T.C. Schmidt, PAL SPME Arrow - Evaluation of a novel solid-phase microextraction device for freely dissolved PAHs in water, *Anal. Bioanal. Chem.* 408 (2016) 943–952.
- [18] I. Šikuten, P. Štambuk, J.K. Konti, E. Maleti, Optimization of SPME-Arrow-GC/MS Method for Determination of Free and Bound Volatile Organic Compounds from Grape Skins, *Molecules*. (2021) 1–16.
- [19] N.E. Song, J.Y. Lee, Y.Y. Lee, J.D. Park, H.W. Jang, Comparison of headspace–SPME and SPME-Arrow–GC–MS methods for the determination of volatile compounds in Korean salt–fermented fish sauce, *Appl. Biol. Chem.* 62 (2019).
- [20] J.Y. Lee, W.S. Kim, Y.Y. Lee, Y.S. Choi, H. Choi, H.W. Jang, Solid-phase microextraction Arrow for the volatile organic compounds in soy sauce, *J. Sep. Sci.* 42 (2019) 2942–2948.
- [21] X.B. Xu, K. Murtada, J. Pawliszyn, Determination of selected volatile terpenes in fish samples via solid phase microextraction arrow coupled with GC-MS, *Talanta*. 221 (2021) 121446.
- [22] X. Zhang, C. Wang, L. Wang, S. Chen, Y. Xu, Optimization and validation of a head space solid-phase microextraction-arrow gas chromatography-mass spectrometry method using central composite design for determination of aroma compounds in Chinese liquor (Baijiu), *J. Chromatogr. A*. 1610 (2020) 460584.
- [23] G. Purcaro, P.Q. Tranchida, R.A. Jacques, E.B. Caramão, S. Moret, L. Conte, P. Dugo, G. Dugo, L. Mondello, Characterization of the yerba mate (*Ilex paraguariensis*) volatile fraction using solid-phase microextraction-comprehensive 2-D GC-MS, *J. Sep. Sci.* 32 (2009) 3755–3763.
- [24] M. Caldeira, F. Rodrigues, R. Perestrelo, J.C. Marques, J.S. Câmara, Comparison of two extraction methods for evaluation of volatile constituents patterns in commercial whiskeys. Elucidation of the main odour-active compounds, *Talanta*. 74 (2007) 78–90.
- [25] A.G.L. Abdullah, N.M. Sulaiman, M.K. Aroua, C.R.C. Hassan, Optimization of headspace sampling using Solid-phase microextraction (SPME) for volatile components in starfruit juice, *Int. J. Food Eng.* 9 (2013) 227–232.
- [26] J.S. Câmara, J.C. Marques, R.M. Perestrelo, F. Rodrigues, L. Oliveira, P. Andrade, M. Caldeira, Comparative study of the whisky aroma profile based on headspace solid phase microextraction using different fibre coatings, *J. Chromatogr. A*. 1150 (2007) 198–207.

- [27] K.L. de Santana, M. de S. Galvão, M.S. de Jesus, J.P. Nogueira, N. Narain, HS-SPME optimization and extraction of volatile compounds from soursop (*Annona muricata* L.) pulp with emphasis on their characteristic impact compounds, *Food Sci. Technol.* 37 (2017) 250–260.
- [28] G. Fitzgerald, K.J. James, K. MacNamara, M.A. Stack, Characterisation of whiskeys using solid-phase microextraction with gas chromatography-mass spectrometry, *J. Chromatogr. A.* 896 (2000) 351–359.
- [29] C.S. Tsoutsi, T.A. Albanis, Optimization of headspace solid-phase microextraction conditions for the determination of organophosphorus insecticides in olive oil, *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 84 (2004) 3–13.
- [30] F. Rodrigues, M. Caldeira, J.S. Câmara, Development of a dynamic headspace solid-phase microextraction procedure coupled to GC-qMSD for evaluation the chemical profile in alcoholic beverages, *Anal. Chim. Acta.* 609 (2008) 82–104.
- [31] E. Rianawati, R. Balasubramanian, Optimization and validation of solid phase micro-extraction (SPME) method for analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in rainwater and stormwater, *Phys. Chem. Earth.* 34 (2009) 857–865.
- [32] C. Dadalı, Y. Elmacı, Optimization of Headspace-Solid Phase Microextraction (HS-SPME) technique for the analysis of volatile compounds of margarine, *J. Food Sci. Technol.* 56 (2019) 4834–4843.
- [33] L.M.F. Barreira, G. Duporté, T. Rönkkö, J. Parshintsev, K. Hartonen, L. Hyrsky, E. Heikkinen, M. Jussila, M. Kulmala, M.L. Riekkola, Field measurements of biogenic volatile organic compounds in the atmosphere using solid-phase microextraction Arrow, *Atmos. Meas. Tech.* 11 (2018) 881–893.
- [34] A.C. Power, C.N. Néill, S. Geoghegan, S. Currivan, M. Deasy, D. Cozzolino, A brief history of whiskey adulteration and the role of spectroscopy combined with chemometrics in the detection of modern whiskey fraud, *Beverages.* 6 (2020) 1–13.
- [35] J.C.R. Demyttenaere, J.I. Sánchez Martínez, R. Verhé, P. Sandra, N. De Kimpe, Analysis of volatiles of malt whisky by solid-phase microextraction and stir bar sorptive extraction, *J. Chromatogr. A.* 985 (2003) 221–232.
- [36] L. Poisson, P. Schieberle, Characterization of the most odor-active compounds in an American Bourbon whisky by application of the aroma extract dilution analysis, *J. Agric. Food Chem.* 56 (2008) 5813–5819.
- [37] Z. Amirshaghghi, Z. Emam Djomeh, A. Oromiehie, Studies of Migration of Styrene Monomer from Polystyrene Packaging into the Food Simulant, *Iran. J. Chem. Eng.* 8 (2011) 43–49.
- [38] H.H. Jeleń, M. Majcher, A. Szwengiel, Key odorants in peated malt whisky and its differentiation from other whisky types using profiling of flavor and volatile compounds, *Lwt.* 107 (2019) 56–63.
- [39] L. Poisson, P. Schieberle, Characterization of the key aroma compounds in an American Bourbon whisky by quantitative measurements, aroma recombination, and omission studies, *J. Agric. Food Chem.* 56 (2008) 5820–5826.
- [40] A. Wanikawa, K. Hosoi, T. Kato, K.I. Nakagawa, Identification of green note

compounds in malt whisky using multidimensional gas chromatography, *Flavour Fragr. J.* 17 (2002) 207–211

4.2 Analisi di prodotti fitosanitari in campioni alimentari e ambientali tramite gascromatografia accoppiata a spettrometria di massa

Nel seguente paragrafo sono riportate le pubblicazioni scientifiche pubblicate durante il triennio di dottorato relative al monitoraggio di prodotti fitosanitari presenti in campioni alimentari e ambientali. Le estrazioni sono state condotte seguendo i principi della *Green Analytical Chemistry*, ovvero la riduzione dei volumi di solvente organico o l'uso di solventi meno dannosi per l'ambiente (attraverso l'uso di tecniche miniaturizzate o di microestrazione) e la riduzione della quantità di campione. La determinazione quali-quantitativa dei prodotti fitosanitari è stata effettuata tramite l'uso di tecniche di gascromatografia accoppiata a spettrometria di massa a singolo e triplo quadrupolo.

4.2.1 Determinazione multiresiduale in prodotti vegetali utilizzando un metodo QuEChERS a "scala ridotta" e gascromatografia bidimensionale *comprehensive* con modulatore a flusso accoppiata a spettrometria di massa a triplo quadrupolo

Lo scopo della presente ricerca è stato lo sviluppo di un metodo analitico per la determinazione multiresiduale (88 analiti *target*) in quattro prodotti vegetali utilizzando un metodo di estrazione QuEChERS a “scala ridotta” e gascromatografia bidimensionale *comprehensive* con modulatore a flusso accoppiata a spettrometria di massa a triplo quadrupolo. In particolare, è stata valutata l'idoneità della modulazione a flusso [con condizioni di flusso di gas di seconda dimensione relativamente elevate (8 mL min⁻¹)] per la determinazione di analiti presenti in tracce come nel caso dei pesticidi. I campioni sono stati preparati secondo la procedura QuEChERS come riportato dal metodo ufficiale dell'Unione Europea, EN 15662:2018. Per tutti i campioni sono stati realizzate le curve di calibrazione in matrice. Le cifre di merito determinate erano il recupero percentuale, la linearità, la precisione, i limiti di rilevabilità (LoD) e i limiti di quantificazione (LoQ).

Questa sezione è stata tradotta e adattata dalla seguente pubblicazione: A. Ferracane; M. Zoccali; F. Cacciola; T.M.G. Salerno; P. Q. Tranchida; L. Mondello. Determination of multi-pesticide residues in vegetable products using a “reduced-scale” QuEChERS method and flow-modulated *comprehensive* two-dimensional gas chromatography-triple quadrupole mass spectrometry. *J Chromatogr A*, 2021-05 | Doi:10.1016/j.chroma.2021.462126

4.2.1.1 Introduzione

Come riportato dall'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS), frutta e verdura sono componenti importanti di una corretta alimentazione. Infatti, il loro ridotto consumo è correlato a cattive condizioni di salute e aumento del rischio di malattie non trasmissibili (NCD). Si stima che nel 2017 circa 3,9 milioni di decessi in tutto il mondo siano attribuibili a un consumo inadeguato di questi alimenti [1]. L'OMS consiglia il consumo di oltre 400 g di frutta e verdura al giorno, insieme a una dieta povera di grassi, zuccheri e sodio, per migliorare la salute generale e ridurre il rischio di alcune malattie non trasmissibili [1]. Frutta e verdura, però, possono contenere anche residui di pesticidi utilizzati durante la loro produzione. Più di 1000 pesticidi vengono utilizzati in tutto il mondo per proteggere le colture da insetti, funghi, erbe infestanti e altri parassiti [2]. Inoltre, l'uso di pesticidi è in costante crescita a causa della popolazione sempre crescente e della rapida urbanizzazione [3].

Secondo l'Organizzazione delle Nazioni Unite per l'alimentazione e l'agricoltura (FAO), nel 2018 e solo considerando le prime dieci nazioni consumatrici di pesticidi, sono state utilizzate 4.871.611 tonnellate di prodotti. Per tale motivo, l'analisi dei residui è fondamentale, fornendo così una misura della qualità degli alimenti ed evitando possibili rischi per la salute umana. Diverse commissioni dei vari paesi del mondo sono responsabili della determinazione dei valori del limite massimo di residui (MRL) per i pesticidi, tra questi troviamo la Commissione dell'Unione europea (UE) [4], la Commissione del *Codex Alimentarius* (CAC) [5] e la sicurezza alimentare e Standard Authority of India (FSSAI) [6].

Nell'ambito dell'analisi dei residui di pesticidi, uno dei passaggi più importanti è rappresentato dal metodo di estrazione. Attualmente viene utilizzata un'ampia gamma di tecniche di estrazione per campioni vegetali, senza un metodo di laboratorio standard generalmente accettato [3]. Le procedure di estrazione seguono un percorso comune che prevede: il rilascio dell'analita dalla matrice, un processo di pulizia in cui devono essere rimosse le interferenze ed eventualmente una fase di concentrazione o cambio del solvente.

Al giorno d'oggi, una delle procedure di estrazione più comuni è rappresentata dal metodo QuEChERS. Dalla sua introduzione nel 2003 [7], l'uso del metodo QuEChERS è in costante aumento [8]. Inizialmente, il metodo QuEChERS è stato

sviluppato per l'estrazione di pesticidi da frutta e verdura, ma ha rapidamente guadagnato popolarità nell'isolamento multi-analita da diversi tipi di campioni [8].

Nel tempo, al fine di migliorare le prestazioni complessive del metodo QuEChERS, sono state apportate diverse modifiche. Tali modifiche hanno portato a due metodi ufficiali: uno basato sull'uso di un tampone citrato [*European Committee for Standardization (CEN) Standard Method EN 15662:2008*] [9], successivamente sostituito da EN 15662:2018 [10], e l'altro basato sull'uso di un tampone acetato (AOAC *Official Method* 2007.01) [11], con una maggiore capacità tampone. Altre modifiche hanno riguardato la combinazione e la quantità di solventi e sali, in base alla natura chimica dei composti da analizzare, portando ad un miglioramento dell'efficienza di estrazione [12], [13], [14]. Un altro miglioramento degno di nota riguarda l'uso di una quantità ridotta di campioni, solventi e materiali assorbenti, che porta a un metodo più rispettoso dell'ambiente [15], [16], [17]. Nel 2017 Zoccali *et al.* hanno sviluppato due procedure su scala ridotta per l'analisi di 35 pesticidi in 4 prodotti vegetali (pomodori, zucchine, peperoni e lattuga) utilizzando circa un terzo del campione, solvente di estrazione e materiale assorbente [18]. I metodi proposti sono stati confrontati con i metodi ufficiali dell'Unione Europea, vale a dire EN 15662:2008 [9], ottenendo risultati comparabili. È interessante notare che il metodo EN 15662:2018 [10], ha introdotto la possibilità di ridimensionare il metodo ufficiale mantenendo la stessa proporzione di campione e reagenti. I metodi QuEChERS a scala ridotta proposti da Zoccali *et al.* sono stati applicati nella presente ricerca.

Oltre all'uso di metodi di preparazione dei campioni maggiormente *green* e più rapidi, c'è anche la tendenza a utilizzare potenti tecniche di separazione e rilevamento. La gascromatografia (GC) accoppiata alla spettrometria di massa (MS) è una delle tecniche analitiche più utilizzate per l'analisi dei pesticidi [19]. La capacità di separazione dei GC può essere ulteriormente migliorata utilizzando la gascromatografia bidimensionale *comprehensive* (GC×GC), una tecnica introdotta nel 1991 da Liu e Philips e oggi piuttosto consolidata [20]. In breve, in GC×GC gli analiti che eluiscono da una prima colonna (¹D) vengono intrappolati e quindi reiniettati, utilizzando un dispositivo chiamato modulatore, su una colonna secondaria (²D) con una diversa selettività [21]. Finora, GC × GC accoppiata con diversi tipi di rivelatori è stata sviluppata principalmente utilizzando modulatori criogenici [22], [23], [24].

Tuttavia, negli ultimi anni, l'uso di un'altra classe di modulatori, ovvero i modulatori a flusso (FM), è gradualmente cresciuto grazie ad alcuni vantaggi come i bassi costi operativi e la semplicità di costruzione [25,26]. Uno svantaggio, rispetto alla modulazione criogenica, è rappresentato dalla mancanza di compressione della banda cromatografica, fattore che porta a limiti di quantificazione (LoQs) più elevati.

L'uso di GC×GC-MS per l'analisi dei pesticidi è stata già precedentemente valutata da altri ricercatori. Ad esempio, il primo documento GC×GC pubblicato che prevedeva l'uso della spettrometria di massa a triplo quadrupolo (QqQMS) era basato sull'uso di un modulatore a flusso e sulla ionizzazione elettronica a fascio molecolare supersonico (SMB), per l'analisi di pesticidi [29]. Nel 2018, lo stesso gruppo di ricerca ha pubblicato un documento incentrato sull'analisi di 12 pesticidi utilizzando ancora un approccio FM GC×GC, con SMB MS [30]. Infine, la modulazione criogenica GC×GC, accoppiata ad MS *time-of-flight*, è stata utilizzata per l'analisi di 423 pesticidi, isomeri e metaboliti in prodotti nutraceutici ottenuti dal tè verde [31].

Nella presente ricerca, sono stati utilizzati un approccio QuEChERS su scala ridotta e FM GC×GC-QqQMS per l'analisi mirata di 88 pesticidi in 4 prodotti vegetali. L'FM utilizzato è un dispositivo di tipo "Deans *switch*", che è stato utilizzato in condizioni di flusso di gas carrier relativamente elevate (0,4 e 8 mL min⁻¹ rispettivamente in ¹D e ²D) [32]. Scopo della ricerca era valutare la fattibilità dell'utilizzo del dispositivo FM per l'analisi di analiti in tracce (≤ 10 ppb).

4.2.1.2. Parte sperimentale

Materiali, solventi e standard

Quattro miscele di standard di pesticidi sono state acquistate da Restek Corporation (Bellefonte, Stati Uniti), descritte dal produttore come "*GC Multiresidue Pesticide Standard #1, #2, #8 e #9*" e contenenti in totale 88 pesticidi (Tabella 1).

Gli standard e i reattivi trifenilfosato (TPP), antracene (An), SupelTM QuE *Citrate Extraction*, SupelTM QuE PSA, SupelTM QuE PSA/ENVI-Carb e l'acetonitrile di grado HPLC (ACN) sono stati acquistati da Merck Life Science (Merck KGaA, Darmstadt, Germania). Le miscele di standard di pesticidi erano preparate ad una concentrazione di 100 µg mL⁻¹ per ogni singolo componente. Le quattro miscele standard di pesticidi

multi-residuo sono state combinate per ottenere una soluzione contenente tutti gli 88 pesticidi a una concentrazione di 25 µg mL⁻¹.

Tabella 1. Elenco dei composti, numeri del picco, parametri MRM [e energie di collisione (eV)], valori EU MRL (µg kg⁻¹), valori R², ripetibilità (CV) a 50 µg kg⁻¹ livello di calibrazione, LoD e LoQ (µg kg⁻¹), per cetriolo e pomodoro.

N	Analita	MRM1	MRM2	Cetriolo					Pomodoro				
				MRL	R ²	CV	LoD	LoQ	MRL	R ²	CV	LoD	LoQ
1	Mevinphos	127>109 (12)	192>127 (12)	10	0.9949	15	1.4	4.7	10	0.9913	14	1.6	5.3
2	Methacrifos	208>180 (8)	240>208 (4)	10	0.9902	10	1.0	3.0	10	0.9967	15	0.5	1.6
3	Chloroneb	206>191 (12)	206>141 (20)	10	0.9656	17	2.2	7.2	10	0.9983	6	1.2	4.1
4	Pentachlorobenzene	250>215 (18)	250>179 (28)	10	0.9802	12	1.7	5.7	10	0.9945	15	0.2	0.7
5	Sulfotepp	322>202 (10)	322>294 (4)	10	0.9827	14	1.8	6.0	10	0.9947	17	0.8	2.7
6	Phorate	260>75 (8)	231>129 (24)	10	0.9855	15	2.3	7.5	10	0.9958	16	1.1	3.6
7	α-BHC	181>145 (16)	219>183 (8)	10	0.9940	7	1.7	5.7	10	0.9923	14	1.4	4.6
8	Hexachlorobenzene	284>249 (24)	284>214 (28)	10	0.9757	14	1.7	5.5	10	0.9903	15	1.1	3.6
9	Pentachlorothioanisole	265>237 (16)	280>237 (26)	10	0.9885	14	1.7	5.8	10	0.9922	19	1.0	3.4
10	β-BHC	181>145 (16)	219>183 (8)	10	0.9862	9	2.2	7.0	10	0.9947	19	2.0	7.8
11	Terbufos	231>129 (26)	231>175 (14)	10	0.9864	14	2.6	8.7	10	0.9945	16	1.7	5.7
12	Lindane	181>145 (16)	219>183 (8)	10	0.9937	8	1.4	4.7	10	0.9921	14	2.9	9.4
13	Diazinon	304>179 (10)	179>122 (24)	10	0.9878	14	2.5	8.4	10	0.9943	15	1.5	4.9
14	Fonofos	137>109 (8)	246>137 (6)	10	0.9894	14	1.8	5.9	10	0.9944	17	1.3	4.5
15	Isazofos	161>119 (10)	257>162 (5)	10	0.9805	13	2.2	7.4	10	0.9961	17	1.6	5.2
16	Disulfoton	153>97 (10)	153>125 (6)	10	0.9808	13	2.0	6.7	10	0.9960	18	1.5	5.1
17	δ-BHC	181>145 (16)	219>183 (8)	10	0.9887	12	3.0	9.4	10	0.9717	15	2.2	7.3
18	Endosulfan ether	241>206 (16)	239>204 (16)	10	0.9864	8	2.6	8.6	10	0.9958	11	0.6	2.1
19	Chlorpyrifos-methyl	286>93 (22)	286>271 (14)	10	0.9909	8	2.0	6.5	1000	0.9900	14	2.7	8.9
20	Tolclofos-methyl	265>250 (14)	265>93 (24)	10	0.9862	11	1.9	6.2	10	0.9938	19	2.5	8.2
21	Parathion-methyl	263>109 (14)	125>47 (12)	10	0.9844	11	1.8	5.9	10	0.9801	17	2.0	6.7
22	Heptachlor	272>237 (20)	274>239 (16)	10	0.9911	13	1.8	6.0	10	0.9905	17	2.7	9.2
23	Fenchlorphos	285>270 (16)	287>272 (18)	10	0.9846	9	2.7	8.9	10	0.9904	15	2.6	8.8
24	Pirimiphos-methyl	290>125 (22)	290>233 (12)	10	0.9887	15	2.5	8.3	10	0.9938	18	2.2	7.5
25	Fenitrothion	277>260 (6)	277>109 (14)	10	0.9810	12	2.6	8.6	10	0.9793	19	2.0	6.6
26	Malathion	173>99 (14)	173>127 (6)	20	0.9894	11	2.6	8.7	20	0.9944	19	2.5	8.4
27	Pentachloroanisole	296>263 (14)	296>246 (30)	10	0.9799	13	2.3	7.8	10	0.9940	15	1.0	3.0
28	Chlorpyrifos	314>258 (14)	197>169 (14)	10	0.9909	9	1.8	6.3	100	0.9932	18	2.7	8.9
29	Fenthion	278>109 (20)	278>169 (14)	10	0.9889	12	2.1	7.0	10	0.9908	14	2.6	8.7
30	Aldrin	263>193 (28)	263>191 (34)	50	0.9919	14	4.7	15	10	0.9920	12	0.8	2.8
31	Parathion	291>109 (14)	139>109 (8)	50	0.9883	11	1.4	4.7	50	0.9964	6	1.9	6.3
32	4,4'-	139>111 (14)	139>75 (26)	10	0.9838	14	2.0	6.6	10	0.9956	17	1.6	5.4
33	Pirimiphos-ethyl	304>168 (12)	318>166 (12)	10	0.9860	14	3.0	9.8	10	0.9980	15	2.6	8.8
34	Bromophos-methyl	331>316 (14)	329>314 (18)	10	0.9894	11	2.0	6.6	10	0.9876	18	2.7	9.0
35	Fenson	141>77 (16)	268>141 (6)	10	0.9900	5	2.1	6.9	10	0.9941	14	2.6	8.8
36	Isodrin	193>157 (20)	193>123 (26)	10	0.9753	13	2.7	9.0	10	0.9934	11	1.0	3.4
37	Chlorfenvinphos	323>267 (16)	267>159 (18)	10	0.9925	8	2.5	8.3	10	0.9909	18	2.6	8.7
38	Heptachlor epoxide	353>263 (14)	355>265 (20)	10	0.9782	14	2.8	9.3	10	0.9950	18	2.1	7.0
39	Bromfenvinfos-methyl	295>109 (16)	297>109 (16)	10	0.9874	13	3.5	11	10	0.9948	19	2.4	8.0
40	Quinalphos	146>118 (10)	157>129 (14)	10	0.9895	9	2.1	7.0	10	0.9933	13	2.5	8.4
41	Bromophos-ethyl	359>303 (16)	303>285 (18)	10	0.9825	13	1.2	4.0	10	0.9917	15	2.6	8.5
42	trans-Chlordane	373>266 (22)	373>264 (28)	10	0.9866	14	2.1	7.0	10	0.9934	15	2.8	9.4
43	Chlorbenside	125>89 (16)	125>99 (18)	10	0.9893	13	2.1	7.0	10	0.9955	16	2.2	7.4
44	2,4'-DDE	246>176 (30)	248>176 (28)	10	0.9802	13	2.6	8.7	10	0.9916	13	1.0	3.6
45	Tetrachlorvinphos	329>109 (20)	331>109 (22)	10	0.9822	15	4.0	15.0	10	0.9816	8	3.5	12.0
46	cis-Chlordane	373>266 (22)	373>264 (28)	10	0.9843	14	2.0	6.8	10	0.9955	15	2.0	6.8
47	Fenamiphos	303>195 (8)	288>260 (6)	20	0.9957	17	3.2	11.0	40	0.9940	15	3.3	11.0

N	Analita	MRM1	MRM2	Cetriolo					Pomodoro				
				MRL	R ²	CV	LoD	LoQ	MRL	R ²	CV	LoD	LoQ
48	α -Endosulfan	195>160 (8)	195>125 (24)	10	0.9939	12	3.0	10.0	10	0.9943	18	2.1	7.0
49	trans-Nonachlor	407>300 (24)	407>335 (16)	10	0.9727	17	2.8	9.3	10	0.9930	14	2.4	8.0
50	Bromfenvinphos	267>159 (14)	323>267 (12)	10	0.9825	10	2.0	7.0	10	0.9896	19	2.6	8.6
51	Iodofenphos	377>362 (22)	377>332 (32)	10	0.9732	9	3.0	9.0	10	0.9826	9	2.9	9.8
52	Prothiofos	267>239 (10)	309>239 (14)	10	0.9728	11	2.0	7.7	10	0.9920	13	2.6	8.5
53	Chlorfenoson	175>111 (12)	175>75 (28)	10	0.9904	5	1.5	5.0	10	0.9922	17	2.9	9.6
54	Profenofos	339>269 (18)	337>267 (14)	10	0.9705	10	1.5	5.2	10000	0.9840	15	1.9	6.5
55	4,4'-DDE	246>176 (30)	318>248 (24)	10	0.9671	14	2.9	9.6	10	0.9941	9	1.2	4.0
56	2,4'-DDD	235>165 (24)	237>165 (28)	10	0.9745	10	2.8	9.3	10	0.9941	13	2.0	6.7
57	Dieldrin	277>241 (8)	263>193 (34)	10	0.9711	13	2.7	9.0	10	0.9955	15	1.5	5.0
58	Ethylan	223>167 (14)	223>179 (22)	10	0.9750	11	2.3	7.6	10	0.9929	10	2.0	6.8
59	Endrin	263>193 (28)	263>191 (30)	10	0.9749	13	3.0	9.0	10	0.9926	19	2.4	7.9
60	Ethion	231>129 (24)	153>97 (14)	10	0.9812	11	3.0	9.0	10	0.9909	17	2.2	7.2
61	β -Endosulfan	195>160 (8)	195>125 (24)	10	0.9487	11	2.3	7.6	10	0.9892	18	2.7	9.0
62	Chlorthiophos	325>269 (14)	269>205 (18)	10	0.9802	11	2.3	7.6	10	0.9916	16	2.6	8.5
63	cis-Nonachlor	407>300 (24)	407>109 (22)	10	0.9944	3	1.8	6.0	10	0.9926	14	2.0	7.0
64	4,4'-DDD	235>165 (24)	237>165 (28)	10	0.9933	5	2.4	8.0	10	0.9876	13	1.0	3.7
65	2,4'-DDT	235>165 (24)	237>165 (28)	10	0.9901	10	3.0	9.8	10	0.9934	17	1.9	6.3
66	Endrin aldehyde	250>215 (26)	345>245 (16)	10	-	-	-	-	10	-	-	-	-
67	Triazophos	161>134 (8)	161>106 (14)	10	0.9915	5	3.0	11	10	0.9874	9	1.3	4.3
68	Sulprofos	156>141 (18)	322>156 (8)	10	0.9746	11	2.8	9.0	10	0.9922	16	2.3	7.5
69	4,4'-Methoxychlor	308>238 (16)	238>223 (12)	10	0.9734	12	2.8	9.3	10	0.9935	14	1.7	5.7
70	Carbophenothion	157>45 (18)	342>157 (14)	10	0.9730	10	2.7	8.8	10	0.9901	20	2.8	9.3
71	Edifenphos	173>109 (10)	310>173 (14)	10	0.9703	16	2.1	9.0	10	0.9839	15	1.7	5.7
72	Endosulfan sulfate	272>237 (18)	387>253 (16)	10	0.9753	13	5.8	19	10	0.9872	14	1.7	5.8
73	4,4'-DDT	235>165 (24)	237>165 (28)	10	0.9823	7	2.6	8.6	10	0.9936	20	1.3	4.2
74	2,4'-Methoxychlor	227>121 (16)	121>78 (22)	10	0.9861	11	2.3	7.0	10	0.9834	18	2.3	7.7
75	Piperonyl butoxide	176>131 (12)	176>117 (20)	10	0.9746	28	2.5	8.2	10	0.9953	14	2.7	9.1
76	Pyridaphenthion	340>199 (8)	199>92 (16)	10	0.9885	4	1.6	5.0	10	0.9933	12	0.2	0.6
77	Endrin ketone	317>245 (20)	315>243 (18)	10	0.9917	10	2.6	8.8	10	0.9929	16	1.3	4.3
78	Phosmet	160>77 (24)	160>133 (14)	50	0.9156	13	6.3	21.0	50	-	-	-	-
79	EPN	169>141 (8)	157>77 (24)	10	0.9912	5	1.3	4.4	10	0.9907	15	1.4	4.8
80	Tetradifon	227>199 (16)	356>159 (18)	10	0.9749	5	3.0	9.8	10	0.9934	18	2.8	9.4
81	Leptophos	377>362 (24)	375>360 (24)	10	-	-	-	-	10	0.9899	5	3.2	10.6
82	Phosalone	182>111 (14)	182>138 (8)	10	0.9780	7	3.0	9.8	10	0.9910	12	0.1	0.3
83	Azinphos-methyl	160>132 (6)	132>77 (14)	50	-	-	-	-	50	-	-	-	-
84	Pyrazophos	221>193 (12)	221>149 (14)	10	0.9825	8	2.8	9.5	10	0.9849	17	2.8	9.4
85	Mirex	272>237 (18)	274>239 (18)	10	0.9860	8	1.4	4.5	10	0.9926	7	1.5	5.0
86	Azinphos-ethyl	132>77 (14)	160>132 (4)	20	0.9692	3	3.4	11.0	20	0.9776	22	2.6	8.9
87	Pyraclufos	194>138 (22)	360>194 (14)	10	-	-	-	-	10	-	-	-	-
88	Coumaphos	362>109 (16)	362>226 (14)	10	0.9692	5	4.7	15.6	10	0.9918	15	4.5	15.0

La soluzione madre di TPP è stata preparata in ACN ad una concentrazione di 53 $\mu\text{g mL}^{-1}$. La soluzione madre An è stata preparata in toluene al livello di 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Tutte le soluzioni sono state preparate e conservate in fiale di vetro scuro a 4°C. Il trifenilfosato è stato utilizzato come standard interno (ISTD) ed è stato aggiunto ai campioni a una concentrazione di 53 $\mu\text{g kg}^{-1}$ prima dell'estrazione. L'antracene è stato utilizzato come standard di controllo qualità (QC) ed è stato aggiunto all'estratto finale prima della fase di concentrazione, a una concentrazione di 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ [10].

Le soluzioni standard di calibrazione sono state preparate in ACN ai seguenti livelli di concentrazione: 5, 10, 25, 50, 100 e 500 $\mu\text{g L}^{-1}$ e in campioni vegetali (calibrazione in matrice) ai seguenti livelli di concentrazione: 10, 25, 50, 100 e 500 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Le soluzioni sono state utilizzate per misurare il recupero degli analiti. Campioni di cetriolo, pomodoro, peperone rosso e lattuga iceberg (da utilizzare per valutare le figure di merito e per la calibrazione in matrice) sono stati precedentemente estratti con il metodo ufficiale QuEChERS e sottoposti ad analisi per confermare l'assenza di pesticidi oggetto di questo studio.

Per omogeneizzare i campioni è stato utilizzato un omogeneizzatore digitale "Ultra-Turrax T 25" (Janke & Kunkel GmbH & Co., IKA Labortechnik, Wilmington, NC, USA).

Per le procedure di estrazione e pulizia sono stati utilizzati QuEChERS commerciali. Supel™ QuE Citrate è stato utilizzato per tutti i tipi di campioni, poiché conteneva 4 g di solfato di magnesio, 1 g di cloruro di sodio, 0,5 g di citrato di sodio dibasico sesquidrato e 1 g di citrato di sodio tribasico diidrato; Supel™ QuE PSA è stato utilizzato per la fase di purificazione di cetrioli e pomodori, come riportato dalla EN 15662:2018 [10], contenendo 150 mg di ammina primaria e secondaria (PSA) e 900 mg di solfato di magnesio; Supel™ QuE PSA/ENVI-Carb è stato utilizzato per la fase di purificazione di peperoni rossi e lattuga iceberg, come riportato dalla EN 15662:2018 [10], contenendo 150 mg di PSA, 900 mg di solfato di magnesio e 45 mg di ENVI-Carb.

Campioni e preparazione dei campioni

Sei campioni per ogni tipo di verdura, sono stati acquistati da rivenditori situati a Messina (Italia). Tutti i campioni analizzati appartengono al gruppo merceologico "alto contenuto di acqua" della linea guida SANTE 2019. La preparazione del campione è stata effettuata seguendo il metodo a scala ridotta sviluppato da Zoccali *et al.* [18], basato sull'approccio QuEChERS tampone citrato, ed estrazione usando ACN (CEN EN 15662:2018) [10]. Brevemente, 3 g di campione vegetale omogeneizzato, triturato con azoto liquido come riportato da Roussev *et al.* [33], sono stati posti in una provetta da centrifuga da 12 mL e drogati con un'adeguata concentrazione di standard (in base al livello di calibrazione) e ISTD. Per l'analisi del campione in bianco

ovviamente sono stati aggiunti solo lo standard ISTD e QC (aggiunto prima della fase di concentrazione). Successivamente, dopo 15 min sono stati aggiunti 3 mL di ACN e la provetta è stata agitata vigorosamente utilizzando un agitatore IKA MS 3 (Werke GmbH & Co. KG-Staufen, Germania) per 30 s a 500 rpm. Successivamente, sono stati aggiunti 1,3 g di MgSO₄, 0,33 g di NaCl, 0,16 g di NaCitrato dibasico sesquidrato e 0,33 g di NaCitrato tribasico disidratato e la provetta è stata nuovamente agitata usando l'agitatore per 60 s a 500 rpm. La provetta è stata centrifugata per 5 minuti a 2400 rcf utilizzando una centrifuga Neya 16R (Neya Centrifuges, Carpi, Italia).

Dallo strato ACN, 1,5 mL sono stati trasferiti in una provetta da centrifuga contenente: Supel™ QuE PSA per il cetriolo e pomodoro (50 mg PSA e 300 mg MgSO₄) e Supel™ QuE PSA/ENVI-Carb per il peperone rosso dolce e la lattuga iceberg (50 mg PSA, 15 mg ENVI-Carb e 300 mg MgSO₄). Le provette sono state agitate a 500 rpm per 30 s e centrifugate per 5 minuti a 2400 rcf. Infine, 1 mL dell'estratto è stato drogato con una concentrazione di 50 µg L⁻¹ di standard QC e ridotto di volume a circa 100 µL sotto un leggero flusso di azoto.

Analisi FM GC×GC-QqQMS

Le analisi FM GC×GC-QqQMS sono state eseguite su un sistema costituito da un gascromatografo GC2010 dotato di un iniettore *split/splitless*, un autocampionatore AOC-20i e uno spettrometro di massa a triplo quadrupolo TQ8040 (Shimadzu Corporation, Kyoto, Giappone). I dati sono stati raccolti utilizzando il software GCMS Solution v.4.52 (Shimadzu); il software ChromSquare v. 2.3 è stato utilizzato per l'elaborazione dei dati GC×GC (Shimadzu). La corrispondenza spettrale di massa è stata eseguita automaticamente utilizzando il software ChromSquare e la libreria di massa Pesticides II Edition (Shimadzu Europe, Duisburg, Germania). La colonna ¹D era una SLB-5 ms 20 m × 0,18 mm ID × 0,18 µm d_f [virtualmente equivalente in polarità a poli(5% difenil/95% metilsilossano)]. La ²D era costituita da una colonna SLB-35 ms 5 m × 0,32 mm ID × 0,25 µm d_f [virtualmente equivalente in polarità al poli(35% difenil/65% dimetilsilossano)] (entrambe le colonne sono state acquistate da Merck Life Science). La modulazione è stata eseguita utilizzando un *wafer chip* a 7 porte dotato di un *loop* di accumulo esterno con dimensioni 20 cm × 0,51 mm ID. Il

sistema FM impiegato è stato sviluppato da Chromaleont e Trajan (Trajan Scientific and Medical, Victoria, Australia).

L'iniezione è stata eseguita in modalità *splitless* ad alta pressione con un volume di 1,5 μL e una pressione di 400 kPa (mantenuta per 0,5 min, e successivamente impostata a 111 kPa), usando He come gas carrier. La temperatura dell'iniettore è stata impostata a 300 °C. I parametri relativi al controllo delle pressioni durante il corso delle analisi permettevano di avere una velocità lineare media ^1D iniziale (ALV) di ca. 20 cm s^{-1} , mentre l'ALV ^2D era di ca. 260 cm s^{-1} . Il sistema è stato utilizzato nella modalità a flusso costante sia in ^1D che in ^2D , rispettivamente pari a 0,4 e 8 mL min^{-1} .

La programmata di temperatura era stata ottimizzata come segue: da 100 °C (1 min) fino a 130 °C a 30 °C min^{-1} , quindi fino a 285 °C a 6 °C min^{-1} ; il periodo di modulazione era di 4,5 s (con un periodo di reiniezione di 0,5 s).

È stata usata la ionizzazione elettronica (70 eV) e le temperature dell'interfaccia e della sorgente ionica erano rispettivamente 250 °C e 220 °C. Come gas di collisione (CID) è stato usato Ar ad una pressione di 200 kPa. La modalità di acquisizione scansione è stata usata in un intervallo di massa di m/z 45–445 e una frequenza di produzione spettrale di 33 Hz per l'identificazione dei composti e dei tempi di ritenzione. Fare riferimento alla tabella 1 per le transizioni MRM e le energie di collisione (CE).

Figure di merito

Le figure di merito sono state misurate seguendo la linea guida SANTE 2019 [34], e il CEN 2018 [10]. Sono stati condotti esperimenti di recupero su pomodori, cetrioli, peperoni rossi e lattuga iceberg a tre diversi livelli di concentrazione (10, 50 e 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$). La precisione *intra-day* è stata valutata al livello di 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$, eseguendo otto repliche ed espressa come CV.

I limiti di rilevamento (LoDs) e LoQs sono stati calcolati moltiplicando la deviazione standard dell'area dell'analita, rispetto al campione bianco fortificato al livello di concentrazione più basso ($n=4$), rispettivamente tre e dieci volte, e quindi dividendo il risultato per la pendenza della curva di calibrazione. La linearità delle rette in matrice è stata testata a sei livelli (5, 10, 25, 50, 100 e 500 $\mu\text{g kg}^{-1}$), eseguendo 4 repliche per ciascun livello.

Il metodo dei minimi quadrati è stato utilizzato per la stima della retta di regressione e per la costruzione delle curve di calibrazione. La calibrazione in matrice è stata utilizzata per la quantificazione assoluta degli analiti.

La stabilità del tempo di ritenzione è stata valutata al livello di concentrazione di $100 \mu\text{g kg}^{-1}$ usando un campione di cetriolo, con un valore CV massimo misurato dello 0,52% (relativo al Mevinphos).

4.2.1.3. Risultati e discussioni

Metodo FM GC×GC-QqQMS

Il metodo FM GC×GC-QqQMS sviluppato è caratterizzato da un tempo di analisi di 27 min. Gli esperimenti sono stati eseguiti utilizzando un loop di modulazione da $40,8 \mu\text{L}$. Il flusso è stato mantenuto costante in entrambe le dimensioni e pari a $0,4 \text{ mL min}^{-1}$ nella ¹D e 8 mL min^{-1} nella ²D (pienamente compatibile con la capacità di pompaggio MS).

Inizialmente, una soluzione standard (alla concentrazione di 1 mg L^{-1}) contenente tutti gli 88 composti è stata iniettata in modalità di scansione per determinare i tempi di ritenzione e gli ioni composti più significativi, successivamente utilizzati per l'ottimizzazione della transizione MRM. In tal modo, come raccomandato dalle linee guida SANTE 2019, ogni analita è stato caratterizzato da quattro parametri: tempo di ritenzione, due transizioni MRM e rapporto tra gli ioni prodotto [34].

Grande attenzione è stata dedicata alla fase di iniezione, al fine di soddisfare i limiti massimi residuali (MRL) riportati dalla Commissione dell'Unione Europea [4]. L'uso combinato delle modalità di iniezione *splitless* e ad alta pressione ha consentito il raggiungimento di LoQ inferiori a $10 \mu\text{g kg}^{-1}$, nella stragrande maggioranza dei casi.

Un'analisi FM GC×GC-QqQMS, acquisita in modalità scansione, degli 88 standard alla concentrazione di 1 mg L^{-1} è riportata in figura 1a-d (quattro espansioni del cromatogramma). Grazie all'elevato potere di separazione del metodo FM GC×GC si sono verificate solo poche coeluizioni, nello specifico i composti 44+45, 46+47, 48+49 e 69+70, tuttavia, grazie all'elevata selettività della tecnica MRM tutti i composti sono stati facilmente identificati.

L'elenco dei composti, insieme a MRL, transizioni usate per quantificare (Q) e delle transizioni di conferma (q), energie di collisione (eV), ripetibilità al livello di

calibrazione di $50 \mu\text{g kg}^{-1}$, LoQ e LoD e valori R^2 sono riportati nelle tabelle 1 (per le matrici cetriolo e pomodoro) e 2 (per peperone rosso e lattuga iceberg).

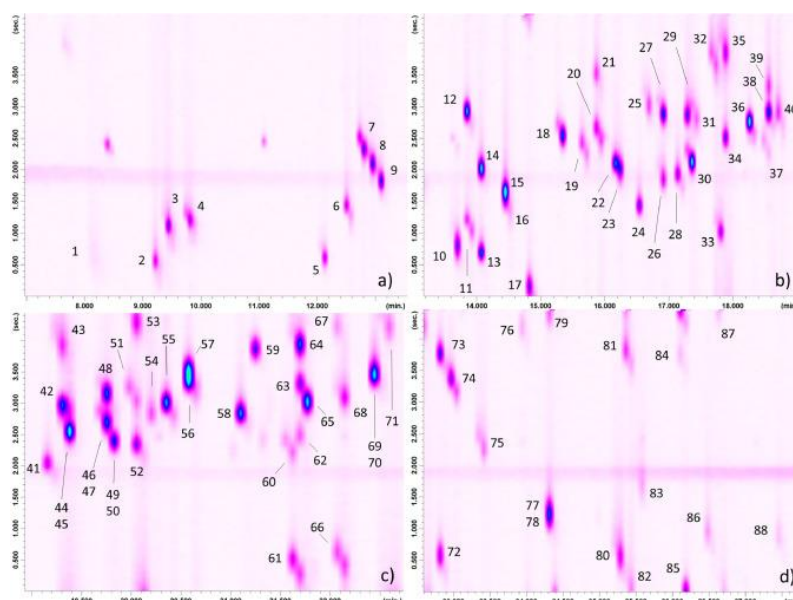


Figura 1. a.d. Espansioni del cromatogramma FM GCxGC-QqQMS relative all'analisi di una soluzione standard al livello di 1 mg L^{-1} . Per l'assegnazione dei picchi, fare riferimento alla Tabella 1.

Tabella 2. Elenco dei composti, numeri del picco, parametri MRM, valori EU MRL ($\mu\text{g kg}^{-1}$), valori R^2 , ripetibilità (CV) a $50 \mu\text{g kg}^{-1}$, LoD e LoQ ($\mu\text{g kg}^{-1}$), per peperoni rossi dolci e lattuga iceberg.

N	Analita	Peperone rosso					Iceberg				
		MRL	R^2	CV	LoD	LoQ	MRL	R^2	CV	LoD	LoQ
1	Mevinphos	10	0.9985	8	2.6	8.8	10	0.9849	12	0.6	2.2
2	Methacrifos	10	0.9987	3	2.0	7.0	10	0.9886	7	1.4	4.7
3	Chloroneb	10	0.9892	20	1.8	6.0	10	0.9920	8	1.7	5.7
4	Pentachlorobenzene	10	0.9962	6	0.4	1.2	10	0.9959	3	0.2	0.7
5	Sulfotepp	10	0.9999	3	0.6	2.0	10	0.9939	9	1.9	6.3
6	Phorate	10	0.9975	3	1.0	3.7	10	0.9913	6	2.5	7.8
7	α -BHC	10	0.9970	4	2.0	6.7	10	0.9805	3	0.4	1.2
8	Hexachlorobenzene	10	0.9968	4	1.7	5.7	10	0.9968	4	1.3	4.4
9	Pentachlorothioanisole	10	0.9980	3	0.9	3.2	10	0.9934	4	1.4	4.6
10	β -BHC	10	0.9995	3	1.0	3.8	10	0.9816	12	0.2	0.9
11	Terbufos	10	0.9996	3	0.5	1.8	10	0.9911	6	2.0	7.0
12	Lindane	10	0.9937	5	3.0	9.7	10	0.9773	9	0.3	1.1
13	Diazinon	50	0.9994	3	0.8	2.6	10	0.9917	7	2.0	6.8
14	Fonofos	10	0.9989	3	1.0	3.3	10	0.9939	7	2.0	7.4
15	Isazophos	10	0.9984	4	2.4	8.0	10	0.9859	17	2.0	8.0
16	Disulfoton	10	0.9996	4	1.2	4.0	100	0.9936	7	2.2	7.2
17	δ -BHC	10	0.9739	12	1.4	4.7	10	0.9703	16	2.0	6.0
18	Endosulfan ether	10	0.9988	11	0.7	2.4	10	0.9941	14	1.5	4.8
19	Chlorpyrifos-methyl	1000	0.9867	5	2.0	6.4	10	0.9611	11	2.7	9.2
20	Tolclofos-methyl	10	0.9981	2	1.0	4.0	10	0.9710	9	3.2	10.0
21	Parathion-methyl	10	0.9832	12	2.3	7.8	10	0.9810	14	1.6	5.3
22	Heptachlor	10	0.9986	4	1.5	5.0	10	0.9839	12	2.1	7.0

N	Analita	Peperone rosso					Iceberg				
		MRL	R ²	CV	LoD	LoQ	MRL	R ²	CV	LoD	LoQ
23	Fenchlorphos	10	0.9883	5	1.7	5.6	10	0.9737	10	1.7	4.7
24	Pirimiphos-methyl	10	0.9995	2	1.0	3.7	10	0.9831	8	2.2	7.2
25	Fenitrothion	10	0.9828	10	2.7	9.1	10	0.9884	16	0.7	2.2
26	Malathion	20	0.9824	6	3.3	11.0	500	0.9887	19	1.2	4.1
27	Pentachloroanisole	10	0.9975	3	1.1	3.6	10	0.9934	4	1.3	4.5
28	Chlorpyrifos	10	0.9994	5	0.9	3.0	10	0.9739	9	2.3	7.6
29	Fenthion	10	0.9947	3	1.1	3.7	10	0.9856	16	0.3	1.0
30	Aldrin	10	0.9992	1	1.6	5.5	10	0.9932	4	1.6	5.4
31	Parathion	50	0.9989	7	1.8	6.2	50	0.9728	7	1.7	5.8
32	4,4'-Dichlorobenzophenone	10	0.9991	3	0.6	2.0	10	0.9949	6	2.0	7.0
33	Pirimiphos-ethyl	10	0.9998	3	1.0	3.5	10	0.9914	6	2.4	8.0
34	Bromophos-methyl	10	0.9635	5	2.3	7.7	10	0.9722	14	0.4	1.2
35	Fenson	10	0.9992	3	1.0	3.2	10	0.9783	13	0.2	0.7
36	Isodrin	10	0.9993	3	1.3	4.4	10	0.998	4	1.2	4.0
37	Chlorfenvinphos	10	0.9803	12	3.0	9.9	10	0.9904	8	0.3	0.9
38	Heptachlor epoxide	10	0.9528	18	0.6	2.0	10	0.9860	15	2.8	9.4
39	Bromfenvinfos-methyl	10	-	-	-	-	10	0.9768	12	1.9	6.5
40	Quinalphos	10	0.9990	5	1.2	4.0	10	0.9868	15	0.6	1.7
41	Bromophos-ethyl	10	0.9965	2	1.8	6.0	10	0.9804	7	1.1	3.6
42	trans-Chlordane	10	0.9987	2	2.3	7.8	10	0.9911	9	1.6	5.3
43	Chlorbenside	10	0.9996	2	1.7	5.6	10	0.9950	6	1.7	5.8
44	2,4'-DDE	10	0.9994	2	1.4	4.8	10	0.9952	5	1.4	4.5
45	Tetrachlorvinphos	10	0.9849	7	0.9	2.6	10	-	-	-	-
46	cis-Chlordane	10	0.9976	5	2.4	7.8	10	0.9906	9	2.8	9.2
47	Fenamiphos	40	-	-	-	-	20	0.9927	15	0.5	1.8
48	α -Endosulfan	10	0.9990	5	2.8	9.4	10	0.9881	8	2.9	9.6
49	trans-Nonachlor	10	0.9711	11	1.7	5.6	10	0.9830	12	0.4	1.3
50	Bromfenvinphos	10	-	-	-	-	10	0.9914	10	0.7	2.4
51	Iodofenphos	10	0.9904	7	3.2	10.6	10	0.9849	16	0.5	1.8
52	Prothiofos	10	-	-	-	-	10	0.9706	18	0.5	1.8
53	Chlorfenson	10	0.9661	17	2.0	7.0	10	0.9832	14	0.5	1.8
54	Profenofos	10	-	-	-	-	10	-	-	-	-
55	4,4'-DDE	10	0.9994	4	2.0	6.6	10	0.9976	7	1.4	4.7
56	2,4'-DDD	10	0.9994	2	2.1	7.2	10	0.9894	7	2.6	8.7
57	Dieldrin	10	0.9997	3	1.3	4.4	10	0.9929	4	1.8	6.0
58	Ethylan	10	-	-	-	-	10	0.9911	13	2.4	8.0
59	Endrin	10	0.9995	2	1.6	5.3	10	0.9888	8	1.7	5.7
60	Ethion	10	0.9971	2	1.6	5.4	10	0.9887	16	0.4	1.4
61	β -Endosulfan	10	0.9919	6	2.8	9.0	10	0.9891	18	1.1	3.6
62	Chlorthiophos	10	0.9987	3	1.4	4.7	10	0.9664	7	1.1	3.6
63	cis-Nonachlor	10	0.9914	6	1.6	5.2	10	0.9801	9	0.2	0.9
64	4,4'-DDD	10	0.9978	4	1.0	3.5	10	0.9805	10	0.4	1.2
65	2,4'-DDT	10	0.9785	18	3.0	9.8	10	0.9863	12	0.4	1.5
66	Endrin aldehide	10	-	-	-	-	10	-	-	-	-
67	Triazophos	10	0.9958	6	2.7	9.0	10	0.9899	13	1.5	5.1
68	Sulprofos	10	0.9967	10	1.3	4.2	10	0.9695	8	2.6	8.7
69	4,4'-Methoxychlor olefin	10	0.9994	3	1.4	4.8	10	0.9956	3	1.5	5.1
70	Carbophenothion	10	0.9986	3	2.0	6.6	10	0.9845	17	0.5	2.0
71	Edifenphos	10	-	-	-	-	10	-	-	-	-
72	Endosulfan sulfate	10	0.9817	3	0.6	2.0	10	-	-	-	-
73	4,4'-DDT	10	0.9825	19	2.8	9.4	10	0.9832	11	0.6	2.1
74	2,4'-Methoxychlor	10	0.9967	10	2.0	6.3	10	0.9826	15	0.5	1.8
75	Piperonyl butoxide	10	0.9991	2	0.9	3.2	10	0.9919	5	2.5	8.3
76	Pyridaphenthion	10	0.9933	5	2.9	9.5	10	0.9883	13	4.6	15.0
77	Endrin ketone	10	-	-	-	-	10	-	-	-	-
78	Phosmet	50	0.9943	20	2.0	6.7	50	-	-	-	-

N	Analita	Peperone rosso					Iceberg				
		MRL	R ²	CV	LoD	LoQ	MRL	R ²	CV	LoD	LoQ
79	EPN	10	0.9918	10	1.0	3.7	10	0.9663	6	3.2	10.0
80	Tetradifon	10	0.9997	3	1.3	4.5	10	0.9691	4	2.1	7.1
81	Leptophos	10	-	-	-	-	10	-	-	-	-
82	Phosalone	10	-	-	-	-	10	-	-	-	-
83	Azinphos-methyl	50	-	-	-	-	10	-	-	-	-
84	Pyrazophos	10	0.9982	3	1.4	4.5	10	0.9676	15	5.0	17.0
85	Mirex	10	0.9985	6	1.8	6.0	10	0.9784	13	0.4	1.4
86	Azinphos-ethyl	20	0.9883	8	3.6	12.0	10	-	-	-	-
87	Pyraclufos	10	-	-	-	-	10	-	-	-	-
88	Coumaphos	10	0.9807	6	3.0	9.6	10	-	-	-	-

Figure di merito

Le figure di merito considerate per la validazione del metodo sono state: LoQ, LoD, linearità, recupero e ripetibilità.

Dopo la costruzione delle curve di calibrazione in matrice, il recupero è stato calcolato a tre livelli di concentrazione, ovvero 10, 50 e 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$ per tutte le matrici (i valori di recupero medi sono riportati in tabella 3). Prendendo in considerazione la matrice cetriolo, non sono stati rilevati quattro composti: leptofos, endrin aldeide, azinfos-metile e pyraclofos. Per quanto riguarda i restanti 84 composti: a livello di 10 $\mu\text{g kg}^{-1}$ è stato calcolato un valore medio di recupero del 97%. Al livello di 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$, il recupero medio è stato del 127%; infine, al livello di 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$ il valore medio era del 97%. Per quanto riguarda i valori di recupero, e considerando la CEN 15662 [10], i pesticidi con un recupero medio (risultato dei tre livelli) compreso tra il 70 e il 120% sono riportati in grassetto in tabella 3. Nel caso della matrice cetriolo, 74 pesticidi (88% dei pesticidi rilevati) sono stati caratterizzati da un recupero nell'intervallo 81-118%.

Tabella 3. Elenco dei composti, numeri del picco, % di recupero a 10, 50 e 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$, CV e recupero medio (in valori in grassetto rientrano nell'intervallo tra 70 e 120%).

N	Analita	Cetriolo	Pomodoro	Peperone rosso	Iceberg
		Avr.	Avr.	Avr.	Avr.
1	Mevinphos	86	81	114	105
2	Methacrifos	136	82	99	98
3	Chloroneb	97	88	93	96
4	Pentachlorobenzene	103	109	93	108
5	Sulfotepp	106	73	102	98
6	Phorate	104	77	102	104
7	α -BHC	102	63	112	93
8	Hexachlorobenzene	87	99	101	98
9	Pentachlorothioanisole	105	78	95	95

N	Analita	Cetriolo	Pomodoro	Peperone rosso	Iceberg
		Avr.	Avr.	Avr.	Avr.
10	β -BHC	104	68	103	105
11	Terbufos	107	72	104	98
12	Lindane	103	104	122	107
13	Diazinon	105	91	104	100
14	Fonofos	105	105	104	99
15	Isazophos	105	77	102	108
16	Disulfoton	100	73	104	101
17	δ -BHC	106	73	104	104
18	Endosulfan ether	105	110	85	102
19	Chlorpyrifos-methyl	99	85	102	101
20	Tolclofos-methyl	106	91	93	105
21	Parathion-methyl	100	74	103	107
22	Heptachlor	107	98	98	134
23	Fenchlorphos	105	86	101	101
24	Pirimiphos-methyl	102	88	97	107
25	Fenitrothion	102	79	103	105
26	Malathion	81	72	103	106
27	Pentachloroanisole	106	81	112	93
28	Chlorpyrifos	104	99	101	108
29	Fenthion	107	87	93	106
30	Aldrin	105	72	100	99
31	Parathion	104	79	98	105
32	4,4'-Dichlorobenzophenone	106	82	101	98
33	Pirimiphos-ethyl	104	75	102	101
34	Bromophos-methyl	104	92	100	103
35	Fenson	102	85	101	104
36	Isodrin	105	102	100	105
37	Chlorfenvinphos	93	79	98	105
38	Heptachlor epoxide	117	80	90	137
39	Bromfenvinfos-methyl	126	116	-	108
40	Quinalphos	104	86	94	108
41	Bromophos-ethyl	110	96	97	95
42	trans-Chlordane	107	77	87	115
43	Chlorbenside	107	81	102	101
44	2,4'-DDE	100	77	104	108
45	Tetrachlorvinphos	129	90*	144	-
46	cis-Chlordane	107	91	84	117
47	Fenamiphos	92	109	-	108
48	α -Endosulfan	94	82	100	97
49	trans-Nonachlor	102	94	135	102
50	Bromfenvinphos	96	80	-	107
51	Iodofenphos	106	81	98	100*
52	Prothiofos	106	88	-	109
53	Chlorfenson	99	78	94	104
54	Profenofos	101	108	-	-
55	4,4'-DDE	111	84	103	97
56	2,4'-DDD	105	76	102	97
57	Dieldrin	106	85	104	100
58	Ethylan	105	93	-	113
59	Endrin	104	83	94	96
60	Ethion	106	78	96	110
61	β -Endosulfan	144	77	92	107
62	Chlorthiophos	104	89	95	104
63	cis-Nonachlor	108	82	101	105
64	4,4'-DDD	129	82	91	108
65	2,4'-DDT	111	116	96	107
66	Endrin aldehyde	-	-	-	-

N	Analita	Cetriolo	Pomodoro	Peperone rosso	Iceberg
		Avr.	Avr.	Avr.	Avr.
67	Triazophos	97*	92	93	82
68	Sulprofos	103	88	100	109
69	4,4'-Methoxychlor olefin	110	79	104	106
70	Carbophenothion	108	82	93	110
71	Edifenphos	128	114	-	-
72	Endosulfan sulfate	121	97	108	-
73	4,4'-DDT	85	115	105	107
74	2,4'-Methoxychlor	108	75	99	108
75	Piperonyl butoxide	117	80	105	100
76	Pyridaphenthion	168	107	108*	113
77	Endrin ketone	96	114	-	-
78	Phosmet	140	-	159	-
79	EPN	99	80	98	116
80	Tetradifon	104	83	101	98
81	Leptophos	-	106*	-	-
82	Phosalone	114	89	-	-
83	Azinphos-methyl	-	-	-	-
84	Pyrazophos	113	106	117*	99
85	Mirex	112	82	101	102
86	Azinphos-ethyl	118	68	145	-
87	Pyraclufos	-	-	-	-
88	Coumaphos	123	67	151	-

Considerando i pomodori, anche in questo caso, non sono stati rilevati quattro composti, di cui tre uguali ai campioni di cetriolo, ovvero: endrin aldeide, azinfos-metile, pyraclofos, oltre al fosmet. Per quanto riguarda i restanti 84 composti, il recupero medio al livello di $10 \mu\text{g kg}^{-1}$ è stato del 93%. Al livello di $50 \mu\text{g kg}^{-1}$, il valore medio era del 77%; mentre al livello di $100 \mu\text{g kg}^{-1}$ il valore medio era del 92%. Un totale di 80 pesticidi (95% dei pesticidi rilevati) è stato caratterizzato da un recupero compreso tra il 72 e il 116%.

Entrambe le matrici, cetrioli e pomodori, sono state oggetto di passaggio di pulizia dell'estratto utilizzando la procedura Supel™ QuE PSA, mentre i peperoni rossi e la lattuga iceberg la fase di pulizia è stata eseguita usando Supel™ QuE PSA/ENVI-Carb. Per quanto riguarda i peperoni rossi, non sono stati rilevati tredici composti, tra cui ancora endrin aldeide, azinfos-metile e pyraclofos; inoltre, non sono stati rilevati i seguenti pesticidi: bromfenvinfos-metil, fenamiphos, etilan, bromfenvinfos, prothiofos, profenofos, edifenphos, endrin chetone, fosalone e leptofos. Per quanto riguarda gli altri 75 pesticidi, il recupero medio è stato del 102% al livello di $10 \mu\text{g kg}^{-1}$; al livello di $50 \mu\text{g kg}^{-1}$, il recupero medio era del 106%; infine considerando il livello di $100 \mu\text{g kg}^{-1}$, il recupero medio è stato del 101%. Un totale di 69 pesticidi

(92% dei pesticidi rilevati) è stato caratterizzato da un recupero compreso tra l'84 e il 117%.

Infine, per quanto riguarda la lattuga iceberg, non sono stati rilevati tredici componenti, tra cui ancora endrin aldeide, azinfos-metile e pyraclofos; inoltre, non sono stati rilevati i seguenti pesticidi: endosulfan solfato, tetraclorvinfos, azinphos-ethyl, cumaphos, phosmet, profenofos, edifenphos, endrin chetone, fosalone e leptofos. È interessante notare che anche profenofos, edifenphos, endrin chetone, fosalone e leptofos non sono stati rilevati nella matrice del peperone rosso. Il recupero medio al livello di $10 \mu\text{g kg}^{-1}$ è stato del 116%, mentre al livello di $50 \mu\text{g kg}^{-1}$ il recupero medio è stato del 96%; infine, considerando il livello di $100 \mu\text{g kg}^{-1}$, il recupero medio è stato del 101%. In quest'ultimo caso un totale di 73 pesticidi (97% dei pesticidi rilevati) è stato caratterizzato da un recupero compreso tra l'82 e il 117%.

Per quanto riguarda i pesticidi non rilevati, per riassumere: l'endrin aldeide, l'azinfos-metile e il pyraclofos non sono stati rilevati in nessuna matrice. Inoltre, il leptofos non è stato rilevato nel cetriolo, mentre il fosmet non è stato rilevato nei pomodori. Per quanto riguarda i peperoni rossi e la lattuga, a parte i tre pesticidi già menzionati, anche profenofos, edifenphos, endrin chetone, fosalone e leptofos sono rimasti inosservati. Inoltre, nei peperoni rossi non sono stati rilevati bromfenvinfos-metil, fenamifos, etilan, bromfenvinfos e protiofos, mentre nella lattuga non sono stati rilevati endosulfan solfato, tetraclorvinfos, azinfos-etile, cumafos e fosmet. La mancanza di rilevamento di molti più pesticidi nei peperoni rossi e nella lattuga (rispetto agli altri due tipi di campione) può essere correlata all'uso GCB durante la fase di pulizia dell'estratto. Ad esempio, Schenck e Howard-King hanno segnalato problemi di eluizione per alcuni pesticidi aromatici, come il leptofos e il bromofos-etile, che si sono legati fortemente durante la fase di pulizia dell'estrazione in fase solida utilizzando GCB. Tali problemi di eluizione possono essere aggirati utilizzando volumi abbastanza grandi di solventi come toluene o acetonitrile/toluene [35]. Nel 2003, Anastassiades e Lehotay hanno pubblicato un documento incentrato sull'uso del PSA e del GCB come eccellenti materiali di pulizia per la rimozione di una varietà di composti della matrice; tuttavia, il GCB lega anche pesticidi planari, come il cumaphos [36]. Nel 2004 Nakazawa *et al.* ha utilizzato il GCB per la fase di pulizia, riportando l'adsorbimento di questo materiale dei composti fosalone, pyraclofos, azinphos-metile

e altri, riducendo così drasticamente i recuperi [37]. Infine, Mol e collaboratori hanno riportato l'adsorbimento di diversi pesticidi sul GCB, vale a dire azinfos-metile, azinfos-etile, fenamifos, fosalone e altri [38].

I valori di LoD ottenuti sono sempre stati al di sotto degli MRL della normativa europea ad eccezione di [4]: triazofos, bromfenvinfos-metile, tetraclorvinfos, cumafos ed endosulfan solfato nel cetriolo; leptophos, tetraclorvinfos e cumafos nei pomodori; iodofenfos nei peperoni rossi; pyridaphenthion e pyrazophos nella lattuga.

La linearità è stata misurata utilizzando rette di calibrazione in matrice per ciascun campione e valutata con il test di adattamento di Mandel ($F_{\text{calc}} < F_{\text{tab}}$) nell'intervallo 10–500 $\mu\text{g kg}^{-1}$ per tutti i composti. Va notato che in un caso l'MRL era superiore al punto di calibrazione più alto, in particolare per il profenofos nei pomodori. Le curve di calibrazione sono state caratterizzate da coefficienti di regressione (R^2) compresi tra 0,9156 (fosmet) e 0,9957 (fenamifos) per il cetriolo, da 0,9717 (δ -lindano) a 0,9983 (cloroneb) per i pomodori, da 0,9528 (eptacloro epossido) a 0,9999 (sulfotepp) per i peperoni rossi e da 0,9611 (cloropirifos-metile) a 0,9980 (isodrin) per la lattuga iceberg.

La ripetibilità è stata calcolata al livello di 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$ analizzando le matrici otto volte consecutive. I valori di CV variavano da 3 (cis-nonachlor e azinfos-ethyl) a 28% (piperonil butossido) per il cetriolo, da 5 (leptophos) a 22% (azinfos-ethyl) per i pomodori, da 1 (aldrin) a 20% (chloroneb e phosmet) per i peperoni rossi e da 3 (pentaclorobenzene, α -BHC e 4,4'-metossicloro olefina) al 19% (malathion) per la lattuga.

Campioni reali

Il metodo sviluppato su scala ridotta QuEChERS FM GC×GC-QqQMS è stato utilizzato per l'analisi di 79 pesticidi nel cetriolo, 81 nei pomodori, 74 nel peperone dolce e 73 nella lattuga, usando cinque campioni per ogni tipo di verdura. Sono state eseguite tre repliche per ciascun campione. Nessuno dei campioni analizzati presentava un livello di contaminazione superiore al LoD.

4.2.1.4. Conclusioni

Il metodo QuEChERS su scala ridotta FM GC×GC-QqQMS si è rivelato adatto per la determinazione di pesticidi in quattro diversi ortaggi. Come riportato in precedenza, il metodo QuEChERS su scala ridotta è più ecologico ed economico rispetto al metodo QuEChERS ufficiale. Inoltre, la combinazione di FM GC×GC e QqQMS si è rivelata uno strumento selettivo e sensibile. Infatti, nonostante l'uso di un flusso di gas di seconda dimensione relativamente alto (8 mL min^{-1}), il metodo ha prodotto limiti di rilevamento a livello di ppb per la maggior parte degli analiti. Inoltre, GC×GC ha offerto la separazione soddisfacente di quasi tutti gli analiti (80 su 88) in un tempo di esecuzione di 27 min. A tale riguardo, la maggiore capacità di picco di GC×GC riduce la possibilità di errori di quantificazione dovuti alla coeluizione rispetto al GC monodimensionale.

Riferimenti bibliografici:

- [1] WHO. Increasing fruit and vegetable consumption to reduce the risk of noncommunicable diseases. e-Library of Evidence for Nutrition Actions (eLENA). https://www.who.int/elena/titles/fruit_vegetables_ncds/en/, 2019 (accessed 01 September 2020).
- [2] V. Philippe, A. Neveen, A. Marwa, A.A. Basel, Occurrence of pesticide residues in fruits and vegetables for the Eastern Mediterranean Region and potential impact on public health, *Food Control* 119 (2021) 107457.
- [3] S.T. Narendran, S.N. Meyyanathan, B. Babu, Review of pesticide residue analysis in fruits and vegetables. Pre-treatment, extraction and detection techniques, *Food Res. Int.* 133 (2020) 109141.
- [4] Commission, E. (2008). No. Regulation 149/2008 of 29 January 2008 amending Regulation (EC) No 396/2005 of the European Parliament and of the Council by establishing Annexes II, III and IV setting maximum residue levels for products covered by Annex I thereto. *OJ L*, 58 (1.3).
- [5] Codex. Codex Alimentarius Commission: Procedural manual. Twenty-fourth edition, World Health Organization food and agricultural organization of the united nations, Rome, 2015.
- [6] FSSAI. (2011). Food Safety and Standards (Contaminants, Toxins and Residues) Regulation. In (Vol. 2018). Food Safety and Standards Authority of India.
- [7] M. Anastassiades, S.J. Lehotay, D. Štajnbaher, F.J. Schenck, Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and “dispersive solid-phase extraction” for the determination of pesticide residues in produce, *J. AOAC Int.* 86 (2003) 412–431.
- [8] R. Perestrelo, P. Silva, P. Porto-Figueira, J.A.M. Pereira, C. Silva, S. Medina, J.S. Câmara, QuEChERS - Fundamentals, relevant improvements, applications and future trends, *Anal. Chim. Acta* 1070 (2019) 1-28.
- [9] European Committee for Standardization (CEN) Standard Method EN 15662 (2008) Food of plant origin. Determination of pesticide residues using GC–MS and/or LC–MS/MS following acetonitrile extraction/partitioning and clean-up by dispersive SPE. QuEChERS method, (www.cen.eu).
- [10] European Committee for Standardization (CEN) Standard Method EN 15662 (2018) Food of plant origin. Multimethod for the determination of pesticide residues using GC- and LC-based analysis following acetonitrile extraction/partitioning and clean-up by dispersive SPE - Modular QuEChERS-method. (www.cen.eu).
- [11] S.J. Lehotay, Determination of pesticide residues in foods by acetonitrile extraction and partitioning with magnesium sulfate: collaborative study. *J. AOAC Int.* 90 (2007) 485–520.
- [12] P. Kaczyński, B. Łozowicka, One-step QuEChERS-based approach to extraction and cleanup in multiresidue analysis of sulfonylurea herbicides in cereals by liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Food Anal. Method.* 10 (2017) 147-160.

- [13] M.F. Abdel-Ghany, L.A. Hussein, N.F. El Azab, A.H. El-Khatib, M.W. Linscheid, Simultaneous determination of eight neonicotinoid insecticide residues and two primary metabolites in cucumbers and soil by liquid chromatography-tandem mass spectrometry coupled with QuEChERS, *J. Chromatogr. B* 1031 (2016) 15-28.
- [14] J. Zhou, J.-J. Xu, J.-M. Cong, Z.-X. Cai, J.-S. Zhang, J.-L. Wang, Y.-P. Ren, Optimization for quick, easy, cheap, effective, rugged and safe extraction of mycotoxins and veterinary drugs by response surface methodology for application to egg and milk, *J. Chromatogr. A* 1532 (2018) 20-29.
- [15] H. Dong, K. Xiao, Y. Xian, Y. Wu, L. Zhu, A novel approach for simultaneous analysis of perchlorate (ClO₄⁻) and bromate (BrO₃⁻) in fruits and vegetables using modified QuEChERS combined with ultrahigh performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Food Chem.* 270 (2019) 196-203.
- [16] Y. Shin, J. Lee, J. Lee, J. Lee, E. Kim, K.-H. Liu, H.S. Lee, J.-H. Kim, Validation of a multiresidue analysis method for 379 pesticides in human serum using liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *J. Agric. Food Chem.* 66 (2018) 3550-3560.
- [17] F. Jesús, R. Hladki, N. Gérez, N. Besil, S. Niell, G. Fernández, H. Heinzen, M.V. Cesio, Miniaturized QuEChERS based methodology for multiresidue determination of pesticides in odonate nymphs as ecosystem biomonitors, *Talanta* 178 (2018) 410-418.
- [18] M. Zoccali, G. Purcaro, A. Schepis, P.Q. Tranchida, L. Mondello, Miniaturization of the QuEChERS method in the fast gas chromatography-tandem mass spectrometry analysis of pesticide residues in vegetables, *Food Anal. Method.* 10 (2017) 2636–2645.
- [19] Y. Nolvachai, C. Kulsing, P.J. Marriott, Pesticides analysis: Advantages of increased dimensionality in gas chromatography and mass spectrometry, *Crit. Rev. Env. Contr.* 45 (2015) 2135-2173.
- [20] Z. Liu, J.B. Phillips, Comprehensive two-dimensional gas chromatography using an on-column thermal modulator interface, *J. Chromatogr. Sci.* 29 (1991) 227-331.
- [21] P.Q. Tranchida, L. Mondello, Comprehensive 2D gas chromatography, in: P.Q. Tranchida, L. Mondello (Eds.), *Hyphenations of capillary chromatography with mass spectrometry*, Elsevier, Amsterdam, Netherlands, 2020, pp. 183-222.
- [22] S. Dasgupta, K. Banerjee, S.H. Patil, M. Ghaste, K.N. Dhumal, P.G. Adsule, Optimization of two-dimensional gas chromatography time-of-flight mass spectrometry for separation and estimation of the residues of 160 pesticides and 25 persistent organic pollutants in grape and wine, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 3881-3889.
- [23] N. Ochiai, T. Ieda, K. Sasamoto, Y. Takazawa, S. Hashimoto, A. Fushimi, K. Tanabe, Stir bar sorptive extraction and comprehensive two-dimensional gas chromatography coupled to high-resolution time-of-flight mass spectrometry for ultra-trace analysis of organochlorine pesticides in river water, *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 6851-6860.

- [24] E. Engel, J. Ratel, P. Blinet, S. Chin, G. Rose, P.J. Marriott, Benchmarking of candidate detectors for multiresidue analysis of pesticides by comprehensive two-dimensional gas chromatography, *J. Chromatogr. A* 1311 (2013) 140-148.
- [25] I. Aloisi, T. Schena, B. Giocastro, M. Zoccali, P.Q. Tranchida, L. Mondello, Towards the determination of an equivalent standard column set between cryogenic and flow-modulated comprehensive two-dimensional gas chromatography, *Anal. Chim. Acta* 1105 (2020) 231-236.
- [26] P.Q. Tranchida, F.A. Franchina, M. Zoccali, I. Bonaccorsi, F. Cacciola, L. Mondello, A direct sensitivity comparison between flow-modulated comprehensive 2D and 1DGC in untargeted and targeted MS-based experiments, *J. Sep. Sci.* 36 (2013) 2746-2752.
- [27] H.D. Bahaghighat, C.E. Freye, R.E. Synovec, Recent advances in modulator technology for comprehensive two dimensional gas chromatography, *TrAC Trend. Anal. Chem.* 113 (2019) 379-391.
- [28] M.S.S. Amaral, Y. Nolvachai, P.J. Marriott, Comprehensive two-dimensional gas chromatography advances in technology and applications: biennial update, *Anal. Chem.* 92 (2020) 85-104.
- [29] M. Poliak, A.B. Fialkov, A. Amirav, Pulsed flow modulation two-dimensional comprehensive gas chromatography-tandem mass spectrometry with supersonic molecular beams, *J. Chromatogr. A* 1210 (2008) 108-114.
- [30] U. Keshet, P. Goldshlag, A. Amirav, Pesticide analysis by pulsed flow modulation GCxGC-MS with Cold EI an alternative to GC-MS-MS, *Anal. Bioanal. Chem.* 410 (2018) 5507–5519.
- [31] W. Jia, X. Chu, F. Zhang, Multiresidue pesticide analysis in nutraceuticals from green tea extracts by comprehensive two-dimensional gas chromatography with time-of-flight mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1395 (2015) 160-166.
- [32] P.Q. Tranchida, F.A. Franchina, P. Dugo, L. Mondello, Use of greatly-reduced gas flows in flow-modulated comprehensive two-dimensional gas chromatography-mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1359 (2014) 271-276.
- [33] M. Roussev, S.J. Lehotay, J. Pollaehne, Cryogenic sample processing with liquid nitrogen for effective and efficient monitoring of pesticide residues in foods and feeds, *J. Agric. Food Chem.* 67 (2019) 9203–9209.
- [34] SANTE 2019, Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticide residues and analysis in food and feed. SANTE/12682/2019.
- [35] F.J. Schenck, V. Howard-King, Rapid solid phase extraction cleanup for pesticide residues in fresh fruits and vegetables, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 63 (1999) 277-281.
- [36] M. Anastassiades, S.J. Lehotay, Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and “dispersive solid-phase extraction” for the determination of pesticide residues in produce, *J. AOAC Int.* 86 (2003) 412-431.

- [37] E. Ueno, H. Oshima, I. Saito, H. Matsumoto, Y. Yoshimura, H. Nakazawa, Multiresidue analysis of pesticides in vegetables and fruits by gas chromatography/mass spectrometry after gel permeation chromatography and graphitized carbon column cleanup, *J. AOAC Int.* 87 (2004) 1003-1015.
- [38] H.G.J. Mol, A. Rooseboom, R. van Dam, M. Roding, K. Arondeus, S. Sunarto, Modification and re-validation of the ethyl acetate-based multi-residue method for pesticides in produce, *Anal. Bioanal. Chem.* 389 (2007) 1715–1754.

4.2.2 Uso della tecnica CPME con fase sol-gel ottadecil silossano per il monitoraggio di pesticidi organofosforici in campioni di acqua ambientale

In questo studio di ricerca, è stato presentato un nuovo metodo di microestrazione (microestazione in fase capsula CPME) per l'estrazione e la preconcentrazione di pesticidi organofosforici (OPP) da campioni di acqua ambientale. L'assorbente monolitico sol-gel ottadecil silossano (sol-gel C₁₈) incapsulato all'interno di capsule porose di polipropilene è stato sintetizzato, caratterizzato e valutato per la sua efficienza verso l'adsorbimento dei pesticidi organofosforici selezionati. L'identificazione è stata condotta attraverso l'uso di un gascromatografo accoppiato a spettrometro di massa (GC-MS). Il metodo è stato ottimizzato per garantire un'elevata sensibilità ed è stato completamente validato. I limiti di rilevamento del metodo CPME GC-MS per gli OPP erano tra 0,02 e 0,15 ng mL⁻¹. Le deviazioni standard relatiintra-gve erano tra 1,5 e 8,7% per lo studio *intra-day* e 5,4–9,6% per lo studio *inter-day*, dimostrando una buona precisione. Inoltre, è stata ottenuta una buona accuratezza del metodo, poiché i recuperi relativi erano compresi nell'intervallo 92,6–107,0% e 90,8–107,6% rispettivamente per le analisi *intra-day* e *inter-day* (c=5,00 e 20,0 ng mL⁻¹). Lo studio sul riutilizzo dei sistemi CPME ha mostrato che potrebbe essere riutilizzato per almeno 25 cicli di adsorbimento/desorbimento. Il protocollo finale è stato utilizzato per analizzare quattro diversi tipi di campioni d'acqua (acqua di lago, acqua di fiume, acqua di stagno e acqua di rubinetto).

Questa sezione è stata tradotta e adattata dalla seguente pubblicazione: N. Manousi, A. Ferracane, A. Kabir, K. G. Furton, P. Q. Tranchida, G. A. Zachariadis, J. Plotka-Wasyłka, L. Mondello, V. F. Samanidou, E. Rosenberg. Green capsule phase microextraction employing hydrophobic monolithic sol-gel octadecyl siloxane platforms for the monitoring of organophosphorus pesticides in environmental water samples. *Sustain Chem.* Volume 30, December 2022, 100892. Doi:10.1016/j.scp.2022.100892

4.2.2.1 Introduzione

I pesticidi organofosforici (OPP) comprendono una classe ampia e diversificata di composti utilizzati per controllare i parassiti e aumentare la produzione delle colture [1,2]. L'esposizione degli esseri umani agli OPP può causare seri problemi di salute e può portare a effetti neurotossici distinti, a seconda del tipo di pesticida, della dose e della frequenza di esposizione [3]. Il meccanismo d'azione degli OPP nel corpo umano prevede l'inibizione dell'acetilcolinesterasi causandone l'accumulo e portando a disturbi dei recettori dell'acetilcolina e dell'acetilcolina [1]. Inoltre, i singoli OPP possono esibire effetti cancerogeni, teratogeni, mutageni e citotossici [4]. Questi composti sono tra gli insetticidi più utilizzati [5]. La presenza di OPP nei fiumi, nel suolo, nell'aria, nelle piante e nelle acque sotterranee rimane una preoccupazione per la salute pubblica, a causa della loro tossicità e del loro uso diffuso [3]. In particolare, per i sistemi idrici ambientali, gli OPP possono rappresentare una minaccia sia per gli animali che per l'uomo [6]. Pertanto, lo sviluppo di metodologie sensibili e accurate per il monitoraggio di questi pesticidi in campioni ambientali è di fondamentale importanza.

La cromatografia liquida ad alte prestazioni (HPLC) [7], l'elettroforesi capillare [8] e la gascromatografia (GC) [1,9]; possono essere impiegato per monitorare i livelli di OPP nei campioni di acqua ambientale. Tra queste tecniche strumentali, la GC accoppiata a vari sistemi di rilevamento tra cui rivelatore di azoto fosforo (NPD) [10], rivelatore a cattura di elettroni (ECD) [11], rivelatore a ionizzazione di fiamma (FID) [12], rivelatore termoionico di fiamma (FTD) [9] e spettrometri di massa (MS) [9] costituiscono le principali strategie analitiche per il monitoraggio di questi pesticidi. Per consentire la determinazione cromatografica degli OPP, la preparazione del campione è necessaria per fornire una pulizia e una preconcentrazione sufficienti c Estrazione in fase solida (SPE) [7, 14, 15] ed estrazione liquido-liquido (LLE) [7, 14] sono tra i metodi più comunemente utilizzati. Tuttavia, LLE è considerata una tecnica che richiede molto tempo e elevate quantità di solventi pericolosi per l'uomo e per l'ambiente. Allo stesso modo, SPE richiede il pretrattamento del campione e l'eluizione può essere un passaggio noioso e lungo, in particolare con campioni che hanno un'elevata frazione di materia sospesa [16].

A seguito dello sviluppo dei principi della *Green Analytical Chemistry* (GAC), la comunità scientifica ha compiuto grandi sforzi per sviluppare metodi di preparazione dei campioni più ecologici [17, 18]. Di conseguenza, sono state proposte e impiegate con successo diverse tecniche miniaturizzate per la preconcentrazione e l'estrazione di OPP. I paradigmi tipici di queste tecniche includono la microestrazione a goccia singola (SDME) [19], la microestrazione liquido-liquido dispersivo (DLLME) [20], l'estrazione in fase solida con punta di pipetta [21], microestrazione in fase solida (SPME) [22], estrazione dispersiva in fase solida (d-SPE) [12], estrazione assorbente con stir bar (SBSE) [1], estrazione QuEChERS [23], estrazione magnetica in fase solida (MSPE) [4, 24] ed estrazione assorbente in fase tessuto (FPSE) [13]. Allo stesso tempo, sono stati introdotti vari nuovi materiali per l'estrazione di inquinanti da campioni complessi [25, 26]. Nelle suddette tecniche, l'estrazione avviene o aggiungendo direttamente il sorbente nel campione (es. MSPE, d-SPE) o dopo l'immobilizzazione del sorbente in opportuni substrati (es. FPSE).

La CPME è una tecnica di estrazione/preconcentrazione che mira a semplificare la procedura di preparazione del campione di campioni alimentari, biologici e ambientali complessi. CPME utilizza capsule appositamente progettate che includono tre parti: (a) una membrana microporosa permeabile in polipropilene, (b) un magnete di forma cilindrica e (c) un assorbente sol-gel [27]. A causa della porosità intrinseca delle membrane, i dispositivi CPME integrano un meccanismo di filtrazione e, quindi, questa tecnica può essere utilizzata direttamente per analizzare matrici complesse senza pretrattamento. Allo stesso tempo, il dispositivo integra un meccanismo di agitazione, con conseguente rapida cinetica di estrazione. Di conseguenza, CPME supera le potenziali perdite degli analiti target durante il pretrattamento del campione poiché elimina ulteriori fasi esterne di preparazione del campione o la potenziale contaminazione del campione dovuta all'aggiunta di magneti esterni [28]. Una caratteristica vantaggiosa del CPME è l'utilizzo di un assorbente sol-gel monolitico. La tecnologia sol-gel comprende un veicolo efficiente per la preparazione di assorbenti polimerici ibridi inorganici-organici avanzati caratterizzati da elevata stabilità chimica e termica, area superficiale notevolmente elevata nonché selettività e porosità regolabili [29, 30]. Utilizzando la tecnologia sol-gel, è possibile preparare un'ampia varietà di fasi assorbenti, inclusi assorbenti multimodali non polari,

polari, mediamente polari, caricati negativamente o positivamente, zwitterionici per fabbricare capsule di microestrazione rivestite, con conseguente aumento della selettività verso un'ampia gamma di analiti target con diverse proprietà chimiche [31, 32]. Finora, il CPME si è rivelato un ottimo strumento analitico per il monitoraggio di vari inquinanti ambientali, come gli idrocarburi policiclici aromatici [33], i composti basici e acidi [34] e gli erbicidi triazinici in acqua [35].

Lo scopo di questo lavoro è stato lo sviluppo di un metodo CPME efficiente accoppiato con GC-MS per l'estrazione e la preconcentrazione simultanee di sei OPP rappresentativi (chlorpyrifos, disulfoton, ethoprophos, fenclorfos, parathion-methyl e prothiofos) dall'acqua ambientale. Dispositivi CPME rivestiti con diversi sol-gel sono stati valutati per le loro prestazioni per trovare la fase di assorbimento più efficiente al fine di trovare il miglior compromesso per gli OPP studiati. Successivamente, sono stati ottimizzati i fattori principali (cioè tempo di estrazione, volume del campione, contenuto di sale, velocità di agitazione, eluente, modalità di eluizione, volume di eluente e tempo di desorbimento). Dopo l'ottimizzazione e la convalida, il metodo proposto è stato utilizzato per analizzare l'acqua di rubinetto, stagno, lago e fiume.

4.2.2.2 Parte sperimentale

Reagenti, prodotti chimici e campioni

I solventi acetonitrile e metanolo di grado LC-MS sono stati acquistati da Honeywell (Charlotte, North Carolina, USA), mentre acetone di grado HPLC e toluene di grado GC-MS sono stati acquistati da Merck (Darmstadt, Germania). L'acqua ultrapura è stata prodotta usando un sistema di purificazione Milli-Q system Plus (Millipore, Bedford, MA, USA). Il NaCl di grado reagente è stato acquistato da Merck (Darmstadt, Germania). Gli standard clorpirifos ($\geq 98,0\%$), disulfotone ($\geq 98,0\%$), etoprofos ($\geq 95,0\%$), fenclorfos ($\geq 98,0\%$), paration-metile ($\geq 98,0\%$) e protiofos ($\geq 98,0\%$) sono stati acquistati da Supelco (Bellefonte, PA, USA). Una soluzione madre di ciascun analita (1000 mg L^{-1}) è stata preparata in esano:acetone (9:1, v/v) e mantenuta a $4 \text{ }^\circ\text{C}$ in provette ambrate. Giornalmente, gli standard di lavoro sono stati preparati attraverso diluizioni seriali in acetone a un intervallo di concentrazione tra $0,05$ e 1000 ng mL^{-1} .

Gli elementi costitutivi dei dispositivi CPME ovvero le membrane capillari in polipropilene poroso (la cui dimensione nominale dei pori è $0,2 \mu\text{m}$), sono state acquistate da 3M Inc. (St. Paul, MN, USA). I magneti di forma cilindrica ($1/4" \times 1/16"$) sono stati acquistati da K&G Magnetics Incorporated (Pipersville, PA, USA). I reattivi tetrametil ortosilicato (TMOS), poli(tetraidrofurano) (PTHF) e glicole polietilenico 300 (PEG 300) sono stati acquistati da Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA). I solventi isopropanolo, cloruro di metilene, metanolo, HCl e NH_4OH sono stati acquistati da Fisher Scientific (Milwaukee, WI, USA). Il poli(dimetilsilossano) (PDMS), il poli(caprolattone)-poli(dimetilsilossano)-poli(caprolattone) (PCAP-PDMS-PCAP) e l'ottadeciltrimetossisilano (C_{18}) sono stati acquistati da Gelest, Inc. (Morrisville, PA, USA). Un termosigillatore a impulsi da tavolo (Uline Corp, Pleasant Prairie, WI, USA) è stato utilizzato per sigillare a caldo le estremità dei dispositivi CPME.

La metodologia CPME GC-MS è stata utilizzata per l'analisi di diversi campioni di acqua. Tutti i campioni sono stati collezionati nel distretto comunale di Vienna, Austria, in fiale di vetro ambrato senza spazio di testa. Fino alla loro analisi, tutti i campioni sono stati conservati a $4 \text{ }^\circ\text{C}$ [36, 37]. Non sono state necessarie fasi di pretrattamento del campione (ad es. filtrazione) prima della procedura di microestrazione.

Strumentazione analitica

Un gascromatografo GC-2010 e uno spettrometro di massa (MS) QP2010 Plus prodotti da Shimadzu (Kyoto, Giappone) ed equipaggiati con una colonna Rtx-5MS ($30 \text{ m} \times 0,25 \text{ mm}$, $0,25 \mu\text{m}$) (Restek Corporation, Bellefonte, PA, USA) sono stati utilizzati in questo studio. Come fase mobile è stato usato elio (grado di purezza 99,999%) e le analisi sono state eseguite a flusso costante pari a $1,05 \text{ mL min}^{-1}$. È stata utilizzata una modalità di iniezione ad alta pressione *splitless* eseguita a 300 kPa per 0,50 minuti utilizzando un volume di iniezione di $3 \mu\text{L}$, alla temperatura di 300°C . La temperatura iniziale del forno era di $80 \text{ }^\circ\text{C}$ (mantenuta costante per 2 min), aumentata a $280 \text{ }^\circ\text{C}$ con un gradiente di $8 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$ e infine aumentata a $350 \text{ }^\circ\text{C}$ con un gradiente di $50 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$. Le temperature della sorgente di ionizzazione e dell'interfaccia erano rispettivamente di $220 \text{ }^\circ\text{C}$ e $250 \text{ }^\circ\text{C}$. La quantificazione è stata condotta nella modalità

di *selected ion monitoring* (SIM) per garantire una buona sensibilità e selettività. A tale scopo, per ogni analita uno ione selezionato è stato utilizzato per quantificare i composti e due ioni sono stati utilizzati come riferimento di conferma tenendo conto della loro abbondanza e dei rapporti tra i tre ioni. I valori m/z selezionati per gli OPP sono riportati nella tabella 1, insieme ai loro tempi di ritenzione.

Per la caratterizzazione del sol-gel C₁₈ sono stati utilizzati un microscopio elettronico a scansione Philips XL30 dotato di un rilevatore EDAX, uno spettrometro FTIR Agilent Cary 670, un diffrattometro RIGAKU modello SmartLab II e un analizzatore di superficie ad assorbimento dinamico Flowsorb III di Micrometrics Instrument Corporation.

Tabella 1. Tempo di ritenzione, ioni quantificatore e qualificatore degli analiti *target*

Analita	Tempo di ritenzione	Ione target	Ioni di riferimento
Chlorpyrifos	19.47	97	197
Disulfoton	17.17	88	60
Ethoprophos	14.76	158	97
Fenchlorphos	18.63	285	125
Parathion-methyl	18.31	109	60
Prothiophos	21.55	113	309

Preparazione delle capsule di microestrazione

I dispositivi CPME sono stati creati utilizzando una gelificazione *in situ* di soluzioni sol in cui le capsule di microestrazione sono state mantenute sommerse durante la transizione di fase, da sol liquido a gel solido. Il processo complessivo di fabbricazione del dispositivo CPME prevede diverse fasi sequenziali: (a) preparazione di membrane capillari in polipropilene poroso per la fabbricazione del dispositivo; (b) preparazione e progettazione di soluzioni sol; (c) realizzazione *in situ* del rivestimento sulla parete porosa in polipropilene e del letto monolitico all'interno del lume; e (d) invecchiamento/condizionamento/pulizia dei dispositivi CPME. Sono stati preparati sette assorbenti per studiarne l'efficienza nell'estrazione di pesticidi organofosforici selezionati. Gli assorbenti sol-gel includono: (1) PTHF sol-gel; (2) PDMS sol-gel; (3) poli(dimetildifenilsilossano) sol-gel (PDMDPS sol-gel); (4) sol-gel poli(caprolattone)-poli(dimetilsilossano)-poli(caprolattone) (sol-gel PCAP-PDMS-

PCAP); (5) sol-gel PEG 300; (6) sol-gel Carbowax 20 M (sol-gel CW 20 M); (7) sol-gel C₁₈. Tutti i dispositivi CPME sono stati realizzati con una lunghezza di 3 cm.

La progettazione della soluzione sol per la preparazione del rivestimento sol-gel e/o del letto monolitico è il compito più importante e impegnativo nel processo di fabbricazione del dispositivo CPME con l'obiettivo di avere un'elevata efficienza e ridurre al minimo i tempi di preparazione del campione, con la minor manipolazione possibile del campione. In quanto tale, il processo di preparazione della soluzione sol è stato semplificato utilizzando lo stesso rapporto molare tra i reagenti per le diverse soluzioni sol. Il rapporto molare tra TMOS, metil trimetossisilano, polimero, solvente, acido cloridrico e acqua è stato mantenuto rispettivamente a 1:1:0,2:30:0,04:8. I reagenti sono stati aggiunti in sequenza a un recipiente di reazione da 50 mL con vortex dopo l'aggiunta di ciascun ingrediente. Quindi, la soluzione sol è rimasta per 12 ore a temperatura ambiente per consentire l'idrolisi del precursore sol-gel. Successivamente, è stato aggiunto idrossido di ammonio 1 M in un rapporto molare a 1:0,18 (TMOS: idrossido di ammonio) sotto costante agitazione. Venti unità capsule sono state quindi immerse nella soluzione che è stata sonicata e la trasformazione della soluzione in gel solido è avvenuta entro un'ora. Durante il passaggio di fase si è formata una rete solida nei pori delle pareti della membrana capillare, mentre all'interno del lume delle membrane capillari è stato creato un letto monolitico. Le capsule sono state quindi invecchiate e condizionate per 24 ore a 50°C. Le capsule sono state lavate con diclorometano:metanolo (50:50 v/v) per 30 minuti sotto irradiazione ultrasonica. Durante il processo di irradiazione ultrasonica, il letto monolitico assorbente sol-gel viene schiantato in microparticelle, portando a una significativa espansione della superficie complessiva. Prima del loro utilizzo per esperimenti analitici, tutte le capsule sono state asciugate per 2 ore a 50°C.

Procedura di estrazione CPME

Prima della procedura di microestrazione, i dispositivi CPME sol-gel C₁₈ sono stati collocati in una provetta Eppendorf contenente 2 mL di metanolo per un tempo di 5 minuti per rimuovere potenziali residui del processo di sintesi sol-gel e per attivare la superficie del sorbente. Successivamente le capsule sono state risciacquate con H₂O ultrapura per la rimozione di tracce di solventi organici che potrebbero potenzialmente ostacolare l'adsorbimento dei OPP. Inizialmente, 20 mL di campione sono stati posti

in una fiala e l'estrazione è avvenuta in un tempo di 60 minuti sotto agitazione a 500 rpm. Il dispositivo CPME è stato prelevato dalla fiala, pulito con H₂O e asciugato accuratamente utilizzando un tessuto (privo di pelucchi). Il desorbimento degli analiti è avvenuto in provette Eppendorf usando un volume di 250 µL di acetone. Non è stata richiesta alcuna agitazione durante la fase di eluizione, la quale è stata completata in 1 minuto. L'acetone è stato quindi filtrato utilizzando filtri in PTFE (0,22 µm) e analizzato mediante GC-MS. Le capsule usate sono state quindi lavate per immersione in 2 mL di metanolo per 5 min. Il dispositivo CPME sol-gel C₁₈ pulito è stato lasciato asciugare a temperatura ambiente e sono stati riposti in fiale sigillate ermetiche per la conservazione fino alla successiva applicazione.

4.2.2.3. Risultati e discussioni

Caratterizzazione di dispositivi CPME rivestiti

Il dispositivo CPME con fase assorbente sol-gel C₁₈ è stato caratterizzato mediante microscopia elettronica a scansione (SEM), isoterma di adsorbimento Brunauer-Emmett-Teller (BET), spettroscopia infrarossa in trasformata di Fourier (FT-IR) e analisi di diffrazione dei raggi X (XRD). Lo studio di caratterizzazione è stato condotto per comprendere la composizione e la struttura del sorbente qui utilizzato.

Caratterizzazione del sol-gel C₁₈ mediante FT-IR

La composizione funzionale del sorbente e dei suoi elementi costitutivi è stata valutata utilizzando la spettrometria FT-IR. Lo spettro di C₁₈-TMOS mostra bande caratteristiche a 2920 cm⁻¹ e 2846 cm⁻¹ che corrispondono allo *stretching* C–H [38]. La banda a 1190 cm⁻¹ corrisponde alla flessione asimmetrica dei legami C–H. La banda a 1075 cm⁻¹ corrisponde ai legami Si–O–C. Lo spettro del sol-gel ottadecil silossano rivela molte caratteristiche presentate sia nello spettro del C₁₈-TMOS che in quello del TMOS o comuni a entrambi, suggerendo l'integrazione di entrambi i precursori sol-gel nella rete del sol-gel assorbente.

Caratterizzazione del sol-gel C₁₈ mediante SEM

Le immagini SEM della superficie della membrana capillare in polipropilene poroso, prima e dopo il rivestimento assorbente sol-gel, sono presentate in figura 1, entrambe con ingrandimento $\times 1000$. Le membrane capillari in polipropilene sono porose con una dimensione nominale dei pori di $0,2 \mu\text{m}$. L'immagine SEM della superficie prima della procedura di rivestimento mostra l'apertura dei pori quasi uniformemente distribuiti sulla superficie. L'immagine SEM che rappresenta la superficie della membrana capillare rivestita con sol-gel C₁₈ è molto diversa da quella non rivestita, con uno strato distinto del rivestimento assorbente. Tuttavia, i pori sulla superficie rimangono intatti, sebbene l'apertura dei pori sembri ridotta. La membrana capillare in polipropilene ha pareti spesse di $450 \mu\text{m}$. La soluzione sol può permeare senza alcuna difficoltà attraverso le pareti durante il processo di rivestimento e trasformarsi in un gel polimerico all'interno dei canali porosi. Di conseguenza, le pareti spesse del dispositivo CPME si comportano come un disco di estrazione in fase solida.

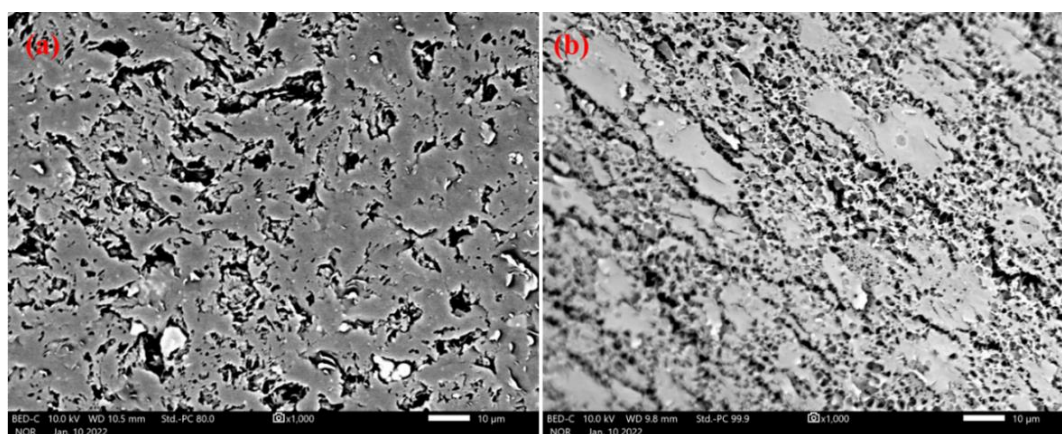


Figura 1. Immagini SEM con ingrandimento 1.000 x della superficie della membrana capillare in polipropilene prima del rivestimento adsorbente sol-gel (a) e dopo il rivestimento adsorbente sol-gel (b)

Caratterizzazione del sol-gel C₁₈ BET

Sono state effettuate misurazioni relative alla larghezza media dei pori, il volume dei pori e l'area superficiale specifica del sol-gel C₁₈. A scopo di confronto, le stesse caratterizzazioni sono state eseguite su un sorbente C₁₈ commerciale. I dati sull'isoterma di adsorbimento dell'azoto BET ottenuti per il sol-gel C₁₈ e il C₁₈ commerciale sono nettamente diversi. Il sol-gel C₁₈ ha un'area superficiale specifica di $\sim 650 \text{ cm}^2/\text{g}$, mentre l'area superficiale specifica per il sorbente C₁₈ commerciale è

di $\sim 346 \text{ cm}^2/\text{g}$. Il sorbente sol-gel C_{18} è stato creato dalla policondensazione di TMOS idrolizzato con ottadecil trimetossisilano. Il processo di sintesi sol-gel consente di modificare il rapporto molare tra il precursore funzionale ($\text{C}_{18}\text{-TMS}$) e il precursore di rete (TMOS) che può essere sfruttato per ottenere un maggiore carico di carbonio nel sorbente sintetizzato. Poiché gli assorbenti C_{18} commerciali utilizzano particelle di silice sferica come sottostrato per legare le parti C_{18} sulle loro superfici, i carichi di carbonio sugli assorbenti C_{18} commerciali sono limitati e principalmente determinati dalla dimensione della particella di silice del substrato. Il volume dei pori del sol-gel C_{18} è risultato pari a $0,43 \text{ cm}^3/\text{g}$ rispetto a $0,72 \text{ cm}^3/\text{g}$ per il C_{18} commerciale. La larghezza media dei pori per il sol-gel C_{18} è stata calcolata come $26,9 \text{ \AA}$, mentre la larghezza media dei pori per il C_{18} commerciale era $83,7 \text{ \AA}$.

Ottimizzazione della procedura CPME

I parametri sperimentali che possono influenzare il metodo CPME sono stati studiati e ottimizzati. Il primo passaggio ha riguardato, lo studio di diversi dispositivi CPME (cioè diversi assorbenti sol-gel e diverse dimensioni) per l'estrazione degli OPP dai campioni di acqua ambientale. Successivamente, sono state studiate individualmente le fasi di adsorbimento e desorbimento mediante l'approccio una variabile alla volta (OVAT).

Selezione del dispositivo CPME in sol-gel più appropriato

Sono stati valutati i sette dispositivi CPME precedentemente riportati la cui lunghezza delle capsule era di 3 cm. Le capsule sono state inizialmente testate nelle seguenti condizioni sperimentali: contenuto di sale: 0% p/v NaCl, tempo di estrazione: 30 min, volume del campione: 20 mL, velocità di agitazione: 500 rpm, eluente: acetone, volume dell'eluente: 1 mL, tempo di desorbimento: 5 min. La tabella 2 presenta i risultati dell'indagine sui diversi sorbenti sol-gel. Il Sol-gel C_{18} ha mostrato le migliori prestazioni di adsorbimento tenendo conto di tutti gli analiti esaminati. Come già riportato in letteratura il C_{18} è un potente assorbente per l'estrazione di OPP da campioni di acqua [4, 7, 10].

Tabella 2. Valutazione di diversi supporti CPME rivestiti sol-gel.

Sol-gel ¹	Recupero di estrazione (%)					
	Chlorpyrifos	Disulfoton	Ethoprophos	Fenclorphos	Parathion-	Prothiophos
C ₁₈	50.0 ²	39.0	26.1	49.4	15.2	39.0
Carbowax 20 M	37.4	25.6	6.6	39.3	8.1	33.8
PTHF	49.5	39.3	17.7	48.3	8.0	44.9
PDMS	49.7	39.2	17.9	48.4	7.9	44.7
PDMDPS	44.1	29.7	10.9	42.0	6.7	36.3
PCAP-PDMS-PCAP	48.8	41.0	10.2	47.5	11.5	44.3
PEG 300	48.3	42.1	23.8	45.4	14.3	41.6

¹C₁₈: ottadecil, PTHF: poli(tetraidrofurano), PDMS: poli(dimetilsilossano), PDMDPS: poli(dimetildifenilsilossano), PCAP-PDMS-PCAP: poli(caprolattone)-poli(dimetilsilossano)-poli(caprolattone), PEG 300: polietilene glicole 300

²Le lettere in grassetto indicano il più alto recupero di estrazione che è stato osservato

Il passaggio successivo ha previsto lo studio di due diverse dimensioni di dispositivi CPME incapsulati con sol-gel C₁₈ (1 cm e 3 cm). Le capsule di microestrazione da 3 cm hanno mostrato prestazioni di estrazione più elevate, a causa del maggiore carico di assorbente.

Ottimizzazione delle condizioni di adsorbimento

L'ottimizzazione delle condizioni di adsorbimento è stata condotta nelle stesse condizioni sperimentali dei precedenti esperimenti usando un dispositivo CPME assorbente sol-gel: C₁₈ con una lunghezza di 3 cm, e variando solamente i singoli parametri da ottimizzare.

L'applicazione di stimoli esterni, quali ad esempio, agitazione, scuotimento o sonicazione, può migliorare la diffusione degli analiti target e comportare tempi di estrazione inferiori e un migliore recupero [33]. Sono state studiate quattro diverse velocità di agitazione tra 0 e 1000 rpm. La figura 3 mostra l'effetto della velocità di agitazione sul recupero dell'estrazione. È interessante notare che senza agitazione costante, sono stati ottenuti recuperi di estrazione trascurabili per tutti gli analiti target.

Un aumento della velocità di agitazione fino a 500 rpm ha avuto un impatto positivo sulla procedura CPME. Inoltre, i recuperi di estrazione di tutti gli analiti sono rimasti costanti fino a una velocità di agitazione di 1000 rpm.

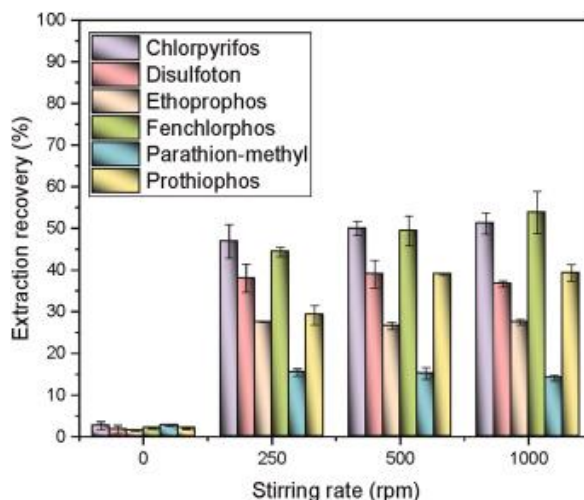


Figura 2. Valutazione dell'effetto di diverse velocità di agitazione.

Il successivo parametro ottimizzato è stato il volume del campione, esaminato nell'intervallo 10-50 mL. Sono stati ottenuti recuperi più elevati quando sono stati utilizzati 10 mL di campione d'acqua. Tuttavia, per quanto riguarda l'arricchimento del campione, l'operazione con una maggiore quantità di campione (ad es. 20 mL o 50 mL) potrebbe comportare PF più elevati e, quindi, una maggiore sensibilità del metodo. Pertanto, come compromesso tra i valori di ER% e PF, sono stati eseguiti ulteriori esperimenti utilizzando 20 mL di campione.

Anche il tempo di estrazione è un fattore importante quando si usano tecniche di estrazione basate sull'equilibrio come nel caso della CPME, poiché è necessario trovare un intervallo di tempo sufficiente affinché tutti gli analiti raggiungano l'equilibrio [33]. Durante l'indagine sul tempo di estrazione, sono stati esaminati cinque diversi intervalli di tempo compresi tra 15 e 75 minuti. La maggior parte degli analiti ha raggiunto un equilibrio a 60 min. Solo per il paration-metile il recupero è stato migliorato per un tempo di estrazione fino a 75 min. Tuttavia, poiché è stata ottenuta un'adeguata sensibilità per tutti gli analiti e per evitare il prolungamento del tempo di estrazione e per garantire la rapidità del metodo, è stato scelto un tempo di estrazione di 60 minuti.

Infine, è stato studiato come la modifica della forza ionica del campione d'acqua può influenzare l'estrazione degli analiti presi in esame. Pertanto, sono state valutate diverse quantità di cloruro di sodio comprese tra (0 e 20% p/v). L'aggiunta di sale può avere un effetto positivo (portando ad una diminuzione della solubilità degli

analiti e favorendo così la loro interazione con l'adsorbente, noto come effetto di *salting out*) o un effetto negativo (aumentando la densità del campione acquoso e abbassando il trasferimento di massa degli analiti target) nel processo di microestrazione [35]. Un aumento della forza ionica fino al 5% p/v non ha avuto un impatto sull'efficienza dell'estrazione per gli analiti *target*. Tuttavia, un aumento del contenuto di NaCl fino al 10% p/v ha avuto un impatto negativo per clorpirifos, fenclorfos e protiofos. Inoltre, al 20% p/v di NaCl, le prestazioni di estrazione per la maggior parte degli analiti erano significativamente ridotte. Come compromesso per tutti gli OPP, i successivi esperimenti sono stati condotti senza aggiunta di sale.

Ottimizzazione delle condizioni di desorbimento

Dopo l'ottimizzazione della fase di adsorbimento, è stato studiato l'effetto dei principali parametri che influenzano l'eluizione (eluente, modalità di eluizione, quantità di eluente e tempo di desorbimento). L'effetto dell'eluente è stato esaminato valutando le prestazioni di quattro diversi solventi, ovvero acetone, metanolo, acetonitrile e toluene. Un eluente appropriato deve fornire un efficace desorbimento degli analiti e il migliore recupero [13]. Come mostrato in figura 3, risultati simili sono stati ottenuti per la maggior parte degli analiti usando acetone, metanolo e acetonitrile. Tuttavia, l'acetone ha mostrato prestazioni migliori rispetto agli altri solventi per protiofos, ed è anche caratterizzato da una bassa tossicità. Pertanto, l'acetone è stato scelto come eluente.

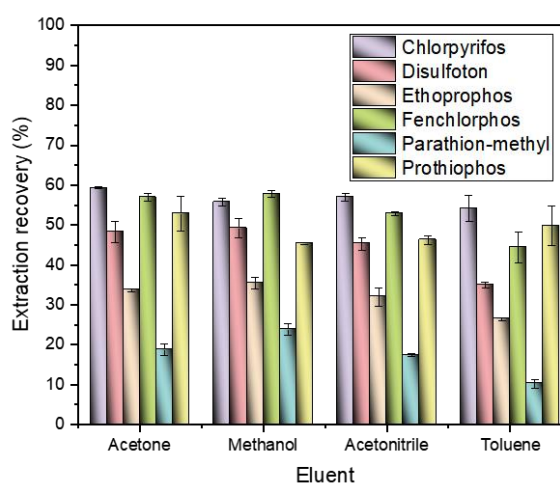


Figura 3. Valutazione di diversi eluenti.

Di conseguenza, è stata studiata la modalità di eluizione. Poiché il dispositivo CPME contiene un'asta magnetica, il dispositivo può girare quando viene utilizzato un agitatore magnetico. È stata studiata la necessità di agitazione durante il processo di eluizione per garantire un desorbimento sufficiente degli analiti e sono state valutate due diverse modalità di eluizione (cioè con e senza agitazione). Come si può osservare dalla figura 4, l'agitazione non era richiesta durante l'eluizione degli analiti target. Ciò è probabilmente dovuto alla morfologia spugnosa e alla porosità intrinseca e ai sorbenti sol-gel che consentono la diffusione dell'eluente durante il processo di desorbimento, superando così la necessità di qualsiasi stimolo energetico esterno durante questa fase [39].

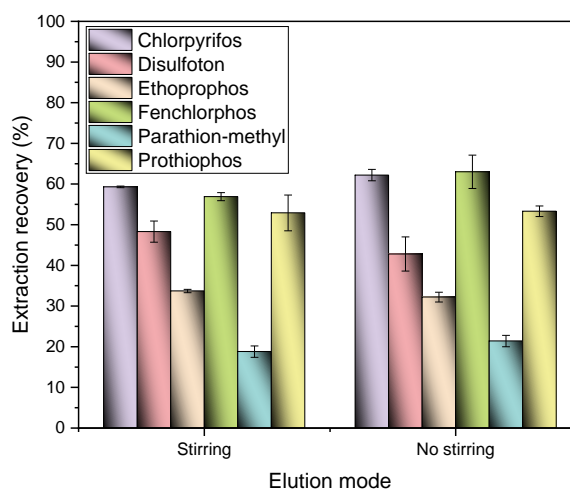


Figura 4. Valutazione dell'effetto dell'agitazione durante la fase di eluizione

Il tempo di desorbimento è un altro fattore importante che deve essere studiato durante l'ottimizzazione del protocollo CPME per trovare l'intervallo di tempo ottimale necessario affinché il sistema di eluizione elimini in modo esaustivo gli analiti adsorbiti e per garantire un'elevata produttività del campione [39]. In questo studio, il tempo di desorbimento è stato studiato nell'intervallo 1-15 min. Un intervallo di tempo di 1 min è stato sufficiente per il desorbimento della maggior parte degli OPP adsorbiti ed è stato scelto per ulteriori esperimenti. Solo per il clorpirifos è stato osservato un leggero aumento dell'efficienza di estrazione aumentando il tempo di desorbimento a 5 min. Tuttavia, al fine di aumentare la produttività del campione e un protocollo di preparazione rapida del campione, è stato infine scelto un tempo di desorbimento di 1 minuto.

Infine, è stata studiata la quantità di acetone. A tale scopo, durante la fase di eluizione sono state studiate aliquote in un range tra 250 e 1500 μL . La quantità del solvente di desorbimento è associata alla capacità di arricchimento del metodo e, pertanto, l'utilizzo di piccole quantità di eluente può fornire una maggiore sensibilità del metodo. Inoltre, l'uso di una bassa quantità di solvente è conforme alla GAC per quanto riguarda la riduzione del consumo di sostanze chimiche pericolose. In questo caso, è stato ottenuto un recupero sufficiente utilizzando una piccola quantità di acetone (figura 5). Solo per il clorpirifos, l'ER% è stato migliorato utilizzando una quantità di solvente maggiore (1500 μL). Tuttavia, tenendo conto dei requisiti del GAC, l'eluizione dei OPP è stata condotta utilizzando 250 μL di eluente.

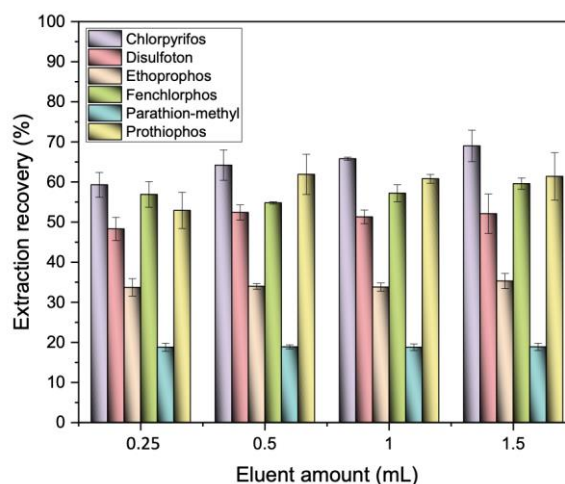


Figura 5. Valutazione del volume di eluente

Figure di merito

La convalida del metodo CPME GC-MS è stata condotta in termini di linearità, accuratezza, precisione, LOD e LOQ. Per studiare la linearità del metodo, le curve di calibrazione sono state costruite in matrice. Successivamente, l'area del picco di ciascun analita è stata tracciata rispetto alla concentrazione nel campione ed è stata utilizzata l'analisi di regressione lineare dei minimi quadrati per calcolare le intercette, le pendenze e i coefficienti di determinazione per tutti gli OPP [40]. Come LOQ per ciascun composto è stato considerato il punto più basso della curva di calibrazione che corrispondeva a un rapporto S/N superiore a 10, mentre i LOD sono stati calcolati dividendo il S/N per 3.3.

Di conseguenza, l'accuratezza del metodo CPME GC-MS è stata valutata analizzando campioni di acqua drogati a due livelli ($c=5,00 \text{ ng mL}^{-1}$ e $20,0 \text{ ng mL}^{-1}$). L'accuratezza *intra-day* è stata valutata eseguendo misurazioni ripetute ($n=5$) dei campioni drogati nello stesso giorno, mentre l'accuratezza *inter-day* è stata valutata eseguendo un'analisi triplicata dei campioni drogati in quattro giorni consecutivi ($n=3 \times 4$). L'attendibilità del metodo è stata espressa in termini di recuperi relativi (RR%) in base all'equazione 1.

$$RR\% = \frac{C_f - C_b}{C_a} \times 100 \text{ Equazione 1}$$

dove C_f , C_b e C_a corrispondono rispettivamente alla concentrazione del pesticida misurata dopo l'aggiunta di una quantità nota di analita, alla concentrazione iniziale nel campione reale e alla concentrazione nominale aggiunta ai campioni.

Il fattore di preconcentrazione (PF) del metodo proposto è stato calcolato confrontando il volume iniziale del campione con il volume finale dopo l'eluizione [41]. Il fattore di miglioramento (EF) è stato calcolato come rapporto tra la pendenza di calibrazione in solvente e quella in matrice soggetta a procedura di microestrazione, mentre il recupero di estrazione (ER%) è stato calcolato in base all'equazione 2. Le figure di merito del metodo proposto sono riportate nella tabella 3.

$$ER\% = \frac{PF}{EF} \times 100 \text{ Equazione 2}$$

Tabella 3. Validazione del metodo CPME GC-MS

Analita	Analisi della regressione	R ²	Linearità (ng mL ⁻¹)	LOD (ng mL ⁻¹)	LOQ (ng mL ⁻¹)	ER%	EF
Chlorpyrifos	$y = 11696x + 5981.8$	0.9982	0.20-100.0	0.06	0.20	59.3	47
Disulfoton	$y = 32847x - 41670$	0.9912	0.05-50.0	0.02	0.05	48.3	39
Ethoprophos	$y = 8734.8x + 9309.8$	0.9985	0.20-50.0	0.06	0.20	33.7	27
Fenclorophos	$y = 23013x + 14285$	0.9969	0.05-50.0	0.02	0.05	56.9	46
Parathion-methyl	$y = 5819.1x - 1159.3$	0.9996	0.50-100.0	0.15	0.50	18.8	15
Prothiophos	$y = 9119.1x + 33918$	0.9982	0.20-100.0	0.06	0.20	52.9	42

I risultati per la valutazione della precisione e accuratezza del metodo sono riportati nella tabella 4.

Tabella 4. Valutazione della precisione e accuratezza del metodo

Analita	Aggiunta (ng mL ⁻¹)	Intra-Day (n=5)			Inter-Day (n=3 ×4)			Riproducibilità capsula-capsula (n=6)
		Misurata	RSD%	RR%	Misurata	RSD%	RR%	RSD%
Chlorpyrifos	5.00	4.86 ± 0.27	5.6	97.2	4.69 ± 0.42	9.0	93.8	2.1
	20.0	19.3 ± 0.7	3.6	96.5	20.4 ± 1.1	5.4	102.0	
Disulfoton	5.00	4.73 ± 0.41	8.7	94.6	5.38 ± 0.45	8.4	107.6	3.2
	20.0	19.3 ± 1.2	6.2	96.5	19.8 ± 1.9	9.6	99.0	
Ethoprophos	5.00	5.35 ± 0.35	6.5	107.0	4.54 ± 0.34	7.5	90.8	2.7
	20.0	20.5 ± 1.4	6.8	102.5	20.3 ± 1.6	7.9	101.5	
Fenclorophos	5.00	4.63 ± 0.28	6.0	92.6	4.54 ± 0.38	8.4	90.8	1.1
	20.0	20.1 ± 0.3	1.5	100.5	20.2 ± 0.4	2.0	101.0	
Parathion- methyl	5.00	4.90 ± 0.40	8.2	98.0	4.77 ± 0.34	7.1	95.4	0.9
	20.0	19.6 ± 1.5	7.7	98.0	19.7 ± 1.6	8.1	98.5	
Prothiophos	5.00	5.28 ± 0.25	4.7	105.6	4.58 ± 0.43	9.4	91.6	2.3
	20.0	20.7 ± 1.1	5.3	103.5	19.1 ± 1.3	6.8	95.5	

In una fase finale del lavoro è stata misurata anche la riproducibilità da capsula a capsula utilizzando sei diverse CPME con sol-gel C₁₈. I dispositivi CPME sono stati utilizzati per l'estrazione di OPP da campioni di acqua deionizzata drogata alla concentrazione di 5,00 ng mL⁻¹ con tutti gli analiti presi in esame. Come mostrato nella tabella 4, le RSD erano superiori al 3,2%, indicando una buona riproducibilità da capsula a capsula.

Riutilizzabilità delle capsule sol-gel C18

Durante la valutazione delle prestazioni delle capsule di microestrazione è stata infine esaminata la loro potenziale riutilizzabilità. A tale scopo, è stato utilizzato un unico dispositivo CPME per 25 cicli continui di adsorbimento/eluizione degli analiti da un campione di acqua di rubinetto drogata con gli OPP presi in esame. La riutilizzabilità è stata valutata prendendo in considerazione il valore RR% derivato dalla performance iniziale della capsula rivestita di sol-gel C₁₈ e la performance dopo cicli di microestrazione consecutivi. Pertanto, è stata fissata una soglia ≥10% di perdita di prestazioni. Poiché non è stata osservata alcuna riduzione importante delle

prestazioni dopo cicli continui di adsorbimento/eluizione, si può concludere che le capsule sono riutilizzabili per almeno 25 volte.

Oltre ai parametri delle prestazioni analitiche, è stata confrontata anche la natura ecologica delle procedure selezionate mediante l'applicazione dell'indice ComplexGAPI [42]. Questo strumento consente la valutazione dei diversi metodi analitici secondo i principi della GAC. Dal pittogramma GAPI in figura 6, si può concludere che la sintesi delle capsule mostra un'elevata resa del processo e una ridotta produzione di rifiuti, mentre mostra anche un basso fattore E, a sostegno dell'economia verde. Inoltre, tra i vantaggi della tecnica possono essere considerati anche il ridotto consumo di sostanze chimiche e la ridotta produzione di rifiuti poiché viene utilizzata la microestrazione.

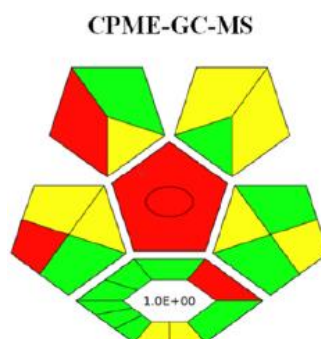


Figura 6. ComplexGAPI del metodo CPME GC-MS

Analisi di campioni reali

Il protocollo ottimizzato è stato infine impiegato per la determinazione di OPP in campioni di acqua reale. I cromatogrammi di un campione di acqua drogata e di un bianco sono mostrati in figura 7. Per la valutazione della potenziale applicabilità del metodo in diversi tipi di campioni d'acqua, sono state preparate e analizzate soluzioni drogate a due livelli di concentrazione di diversi campioni di acqua ($c=5,00$ e $20,0$ ng mL⁻¹). La tabella 5 presenta i risultati ottenuti per i campioni reali. Gli OPP non sono stati rilevati nei campioni reali. Pertanto, o non c'erano residui di questi composti nei campioni o le loro concentrazioni erano inferiori rispetto ai rispettivi valori LOD. I valori RR% per tutti gli analiti sono risultati essere all'interno dell'intervallo 80-120%. Il valore medio 99,0% dimostra che non esiste alcun effetto matrice significativo tra le matrici esaminate. Pertanto, lo schema analitico proposto può essere utilizzato per

Riferimenti bibliografici:

- [1] C. Hu, M. He, B. Chen, B. Hu. A sol-gel polydimethylsiloxane/polythiophene coated stir bar sorptive extraction combined with gas chromatography-flame photometric detection for the determination of organophosphorus pesticides in environmental water samples. *J. Chromatogr. A*, 1275 (2013), pp. 25-31,
- [2] I. Mangas, J. Estevez, E. Vilanova, T.C.C. França. New insights on molecular interactions of organophosphorus pesticides with esterases. *Toxicology*, 376 (2017), pp. 30-43.
- [3] T. Čadež, D. Kolić, G. Šinko, Z. Kovarik. Assessment of four organophosphorus pesticides as inhibitors of human acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase. *Sci. Rep.*, 11 (2021), pp. 1-11.
- [4] J. Xie, T. Liu, G. Song, Y. Hu, C. Deng. Simultaneous analysis of organophosphorus pesticides in water by magnetic solid-phase extraction coupled with GC-MS. *Chromatographia*, 76 (2013), pp. 535-540.
- [5] B.K. Singh, A. Walker. Microbial degradation of organophosphorus compounds. *FEMS Microbiol. Rev.*, 30 (2006), pp. 428-471.
- [6] Y. Gao, Q. Pan. Analysis of organophosphorus pesticides by HPLC using magnetic SPE with nitrogen-doped reduced graphene oxide/Fe₃O₄ nanocomposite as the adsorbent. *LC-GC Eur.*, 33 (2020), pp. 438-447
- [7] D. Harshit, K. Charmy, P. Nrupesh. Organophosphorus pesticides determination by novel HPLC and spectrophotometric method. *Food Chem.*, 230 (2017), pp. 448-453.
- [8] L. Li, S. Zhou, L. Jin, C. Zhang, W. Liu. Enantiomeric separation of organophosphorus pesticides by high-performance liquid chromatography, gas chromatography and capillary electrophoresis and their applications to environmental fate and toxicity assays. *J. Chromatogr., B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, 878 (2010), pp. 1264-1276.
- [9] D. Lambropoulou, T. Sakellarides, T. Albanis. Determination of organophosphorus insecticides in natural waters using SPE-disks and SPME followed by GC/FTD and GC/MS. *Fresenius' J. Anal. Chem.*, 368 (2000), pp. 616-623.
- [10] E. Ballesteros, M.J. Parrado. Continuous solid-phase extraction and gas chromatographic determination of organophosphorus pesticides in natural and drinking waters *J. Chromatogr. A*, 1029 (2004), pp. 267-273.
- [11] J. Oliva, A. Barba, N. Vela, F. Melendreras, S. Navarro. Multiresidue method for the rapid determination of organophosphorus insecticides in grapes, must and wine. *J. Chromatogr. A*, 882 (2000), pp. 213-220,
- [12] A. Amiri, R. Tayeb, A. Abdar, F. Narenji Sani Synthesis of a zinc-based metal-organic framework with histamine as an organic linker for the dispersive solid-phase extraction of organophosphorus pesticides in water and fruit juice samples. *J. Chromatogr. A*, 1597 (2019), pp. 39-45.
- [13] R. Kaur, R. Kaur, S. Rani, A.K. Malik, A. Kabir, K.G. Furton. Application of fabric phase sorptive extraction with gas chromatography and mass spectrometry for

the determination of organophosphorus pesticides in selected vegetable samples. *J. Separ. Sci.*, 42 (2019), pp. 862-870.

[14] N.M. Brito, S. Navickiene, L. Polese, E.F.G. Jardim, R.B. Abakerli, M.L. Ribeiro. Determination of pesticide residues in coconut water by liquid - liquid extraction and gas chromatography with electron-capture plus thermionic specific detection and solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *J. Chromatogr. A*, 957 (2002), pp. 201-209.

[15] A.M. Gillespie, S.M. Walters. Rapid clean-up of fat extracts for organophosphorus pesticide residue determination using C18 solid-phase extraction cartridges. *Anal. Chim. Acta*, 245 (1991), pp. 259-265,

[16] F. Ahmadi, Y. Assadi, S.M.R.M. Hosseini, M. Rezaee. Determination of organophosphorus pesticides in water samples by single drop microextraction and gas chromatography-flame photometric detector. *J. Chromatogr. A*, 1101 (2006), pp. 307-312.

[17] P.T. Anastas. Green Chemistry and the role of analytical methodology development. *Crit. Rev. Anal. Chem.*, 29 (1999), pp. 167-175.

[18] S. Armenta, S. Garrigues, M. de la Guardia. The role of green extraction techniques in Green Analytical Chemistry. *TrAC, Trends Anal. Chem.* (2015).

[19] A. de S. Pinheiro, G.O. da Rocha, J.B. De Andrade. A SDME/GC-MS methodology for determination of organophosphate and pyrethroid pesticides in water. *Microchem. J.*, 99 (2011), pp. 303-308.

[20] J.I. Cacho, N. Campillo, P. Viñas, M. Hernández-Córdoba. In situ ionic liquid dispersive liquid-liquid microextraction coupled to gas chromatography-mass spectrometry for the determination of organophosphorus pesticides. *J. Chromatogr. A*, 1559 (2018), pp. 95-101.

[21] A. Esrafil, M. Ghambarian, M. Tajik, M. Baharfar, M. Tabibpour. Polydopamine-functionalized carbon nanotubes for pipette-tip micro-solid phase extraction of malathion and parathion from environmental samples. *ChemistrySelect*, 5 (2020), pp. 2966-2971.

[22] K. Delińska, K. Yavir, A. Kloskowski. Head-space SPME for the analysis of organophosphorus insecticides by novel silica IL-based fibers in real samples. *Molecules*, 27 (2022), p. 4688.

[23] D.B. Alcântara, T.S.M. Fernandes, H.O. Nascimento, A.F. Lopes, M.G.G. Menezes, A.C.A. Lima, T.V. Carvalho, P. Grinberg, M.A.L. Milhome, A.H.B. Oliveira, H. Becker, G.J. Zocolo, R.F. Nascimento. Diagnostic detection systems and QuEChERS methods for multiclass pesticide analyses in different types of fruits: an overview from the last decade. *Food Chem.*, 298 (2019), Article 124958.

[24] L. Liu, M. Yang, M. He, T. Liu, F. Chen, Y. Li, X. Feng, Y. Zhang, F. Zhang. Magnetic solid phase extraction sorbents using methyl-parathion and quinalphos dual-template imprinted polymers coupled with GC-MS for class-selective extraction of twelve organophosphorus pesticides. *Microchim. Acta*, 187 (2020).

- [25] J. Li, Zhuo Wang, Q. Wang, L. Guo, C. Wang, Zhi Wang, S. Zhang, Q. Wu. Construction of hypercrosslinked polymers for high-performance solid phase microextraction of phthalate esters from water samples. *J. Chromatogr. A*, 1641 (2021), Article 461972.
- [26] M. Xu, J. Wang, L. Zhang, Q. Wang, W. Liu, Y. An, L. Hao, C. Wang, Z. Wang, Q. Wu. Construction of hydrophilic hypercrosslinked polymer based on natural kaempferol for highly effective extraction of 5-nitroimidazoles in environmental water, honey and fish samples. *J. Hazard Mater.*, 429 (2022), Article 128288.
- [27] N. Manousi, A. Kabir, K.G. Furton, V.F. Samanidou, C.K. Zacharis. Exploiting the capsule phase microextraction features in bioanalysis: extraction of ibuprofen from urine samples. *Microchem. J.*, 172 (2022), Article 106934.
- [28] D.E. Georgiadis, A. Tsalbouris, A. Kabir, K.G. Furton, V. Samanidou. Novel capsule phase microextraction in combination with high performance liquid chromatography with diode array detection for rapid monitoring of sulfonamide drugs in milk. *J. Separ. Sci.*, 42 (2019), pp. 1440-1450.
- [29] E. Lazaridou, A. Kabir, K.G. Furton, A. Anthemidis. A novel glass fiber coated with sol-gel poly-diphenylsiloxane sorbent for the on-line determination of toxic metals using flow injection column preconcentration platform coupled with flame atomic absorption spectrometry. *Molecules*, 26 (2020), p. 9.
- [30] N.P. Kalogiouri, A. Kabir, B. Olayanju, K.G. Furton, V.F. Samanidou. Development of highly hydrophobic fabric phase sorptive extraction membranes and exploring their applications for the rapid determination of tocopherols in edible oils analyzed by high pressure liquid chromatography-diode array detection. *J. Chromatogr. A*, 1664 (2021), Article 462785.
- [31] V. Samanidou, D.E. Georgiadis, A. Kabir, K.G. Furton. Capsule phase microextraction: the total and ultimate sample preparation approach. *J. Chromatogr. Separ. Tech.* (2018).
- [32] H.İ. Ulusoy, K. Köseoğlu, A. Kabir, S. Ulusoy, M. Locatelli. Fabric phase sorptive extraction followed by HPLC-PDA detection for the monitoring of pirimicarb and fenitrothion pesticide residues. *Microchim. Acta*, 187 (2020), p. 337.
- [33] N. Manousi, A. Kabir, K.G. Furton, E. Rosenberg, G.A. Zachariadis. Capsule phase microextraction of selected polycyclic aromatic hydrocarbons from water samples prior to their determination by gas chromatography-mass spectrometry. *Microchem. J.*, 106210 (2021).
- [34] J. Carles, F. Borrull, K.G. Furton, A. Kabir, N. Fontanals, R. Maria. Selective monitoring of acidic and basic compounds in environmental water by capsule phase microextraction using sol-gel mixed-mode sorbents followed by liquid chromatography-mass spectrometry in tandem. *J. Chromatogr. A*, 1625 (2020), Article 461295.
- [35] N. Manousi, V. Alampanos, I. Priovolos, A. Kabir, K.G. Furton, E. Rosenberg, G.A. Zachariadis, V.F. Samanidou. Designing a moderately hydrophobic sol-gel monolithic Carbowax 20 M sorbent for the capsule phase microextraction of triazine

herbicides from water samples prior to HPLC analysis. *Talanta*, 234 (2021), Article 122710.

[36] M. Roldán-Pijuán, R. Lucena, S. Cárdenas, M. Valcárcel, A. Kabir, K.G. Furton. Stir fabric phase sorptive extraction for the determination of triazine herbicides in environmental waters by liquid chromatography. *J. Chromatogr. A*, 1376 (2015), pp. 35-45.

[37] P. Zohrabi, M. Shamsipur, M. Hashemi, B. Hashemi. Liquid-phase microextraction of organophosphorus pesticides using supramolecular solvent as a carrier for ferrofluid. *Talanta*, 160 (2016), pp. 340-346.

[38] E. Einati, A. Mottel, A. Inberg, A. Shacham-Diamand. Electrochemical studies of self-assembled monolayers using impedance spectroscopy. *Electrochim. Acta*, 54 (2009), pp. 6063-6069

[39] A. Kabir, V. Samanidou. Fabric phase sorptive extraction: a paradigm shift approach in analytical and bioanalytical sample preparation. *Molecules*, 26 (2021), p. 865.

[40] Rigkos, G., Alampanos, V., Kabir, A., Furton, K.G., Roje, Ž., Vrčec, I.V., Panderi, I., Samanidou, V., 2020. An improved fabric-phase sorptive extraction protocol for the determination of seven parabens in human urine by HPLC–DAD. *Biomed. Chromatogr.* 1–11. <https://doi.org/10.1002/bmc.4974>

[41] Ulusoy, H.İ., Köseoğlu, K., Kabir, A., Ulusoy, S., Locatelli, M., 2020. Fabric phase sorptive extraction followed by HPLC-PDA detection for the monitoring of pirimicarb and fenitrothion pesticide residues. *Microchim. Acta* 187, 337. <https://doi.org/10.1007/s00604-020-04306-7>

[42] J. Płotka-Wasyłka, W. Wojnowski. Complementary green analytical procedure index (ComplexGAPI) and software. *Green Chem.*, 23 (2021), pp. 8657-8665.

4.3 Analisi di prodotti fitosanitari in campioni alimentari e ambientali tramite cromatografia liquida ad alte prestazioni

I seguenti sottoparagrafi riportano le pubblicazioni relative ad analisi di prodotti fitosanitari a base di benzoilurea, in campioni alimentari e ambientali, la cui determinazione è stata effettuata attraverso l'uso di cromatografia liquida ad alte prestazioni accoppiata a rivelatore spettrofotometrico a serie di diodi. Le estrazioni sono state condotte attraverso due diverse tecniche di microestrazione in fase solida grazie alle quali è stato possibile ottenere elevati fattori di preconcentramento degli analiti dal campione di partenza. L'uso di tali tecniche ha quindi permesso di ottenere buoni risultati in termini di limiti di rilevabilità.

4.3.1 MI-FPSE come dispositivo di estrazione per il monitoraggio di insetticidi a base di benzoilurea in campioni d'acqua mediante HPLC-DAD

Gli insetticidi a base di benzoilurea sono una classe di prodotti fitosanitari utilizzati in agricoltura per l'inibizione della sintesi della chitina nei parassiti. Questi composti sono persistenti nei campioni ambientali e quindi il loro monitoraggio è necessario per evitare effetti dannosi per la salute umana e l'ambiente. L'estrazione mediante MI-FPSE è una tecnica di preparazione del campione che combina l'agitazione del campione e l'estrazione dell'analita in un unico dispositivo. Nel presente studio, la tecnica MI-FPSE è stata impiegata per la prima volta per l'estrazione e la preconcentrazione di insetticidi a base di benzoilurea (diflubenzuron, triflumuron, hexaflumuron, lufenuron e chlorfluazuron) da campioni di acqua ambientale prima della loro determinazione mediante HPLC-DAD. I principali fattori che influenzano le prestazioni della metodologia proposta sono stati studiati e ottimizzati ed il metodo MI-FPSE HPLC-DAD è stato validato. Infine, il metodo è stato impiegato per l'analisi di campioni di acqua di rubinetto, minerale, di fiume e di lago. Per permettere una migliore comprensione del grado di inquinamento prodotto ed evidenziare quali siano le componenti *green* del metodo proposto, è stato realizzato l'indice ComplexGAPI del metodo ottimizzato.

Questa sezione è stata tradotta e adattata dalla seguente pubblicazione: N. Manousi, V. Alampanos, A. Ferracane, G. Efstratiadis, A. Kabir, K. G. Furton, P. Q. Tranchida, G. A. Zachariadis, L. Mondello, E. Rosenberg, V. F. Samanidou. Magnet integrated fabric phase sorptive extraction as a stand-alone extraction device for the monitoring of benzoyl urea insecticides in water samples by HPLC-DAD. J Chromatogr A 1672 (2022) 463026. Doi:10.1016/j.chroma.2022.463026

4.3.1.1 Introduzione

Gli insetticidi a base di benzoilurea comprendono una classe di derivati dell'urea ampiamente utilizzati in agricoltura come regolatori della crescita degli insetti dovuta alla loro capacità di inibire la sintesi della chitina nei parassiti e alla loro capacità di bloccare il processo di muta [1,2]. Questi composti possono interferire con la normale attività del sistema endocrino degli insetti, controllandone lo sviluppo, la riproduzione e la metamorfosi [3,4]. L'uso diffuso dei pesticidi a base di benzoilurea può essere attribuito alla loro elevata selettività, la loro elevata attività biologica, le loro elevate prestazioni e la loro bassa tossicità acuta per i mammiferi, mentre esibiscono attività insetticida ad ampio spettro [5]. Inoltre, a causa del loro diverso meccanismo d'azione rispetto ad altri insetticidi, gli insetticidi a base di benzoilurea sono utilizzati nei programmi di gestione integrata dei parassiti (IPM) [6]. Questi composti sono altamente persistenti nell'ambiente e possono finire nelle acque superficiali con conseguenti danni alle colture o nell'acqua potabile [1]. Nonostante la loro bassa tossicità per i mammiferi, gli insetticidi a base di benzoilurea possono causare danni alla salute umana. Ad esempio, è stato scoperto che il diflubenzuron può causare danni negli epatociti umani [3]. Pertanto, è importante sviluppare metodologie sensibili e accurate per la determinazione degli insetticidi a base di benzoilurea in campioni ambientali e di acqua potabile.

Tecniche HPLC e GC sono ampiamente utilizzate per il monitoraggio degli insetticidi a base di benzoilurea [1]. Tuttavia, questi composti sono caratterizzati da instabilità termica, alta polarità e bassa volatilità ed è tipicamente richiesta una fase di derivatizzazione prima della loro determinazione mediante GC [5]. Pertanto, l'HPLC si mostra come tecnica d'elezione poiché offre il vantaggio della determinazione diretta dell'analita. Tra i diversi sistemi di rivelazione utilizzati per la rivelazione e la determinazione di questa classe di insetticidi ci sono il rivelatore di raggi ultravioletti (UV), il rivelatore spettrofotometrico a serie di diodi (DAD) e i rivelatori di spettrometria di massa (MS) [1]. Una sfida significativa nella determinazione dei pesticidi nei campioni ambientali è la bassa concentrazione degli analiti target [7]. Tipicamente, questi pesticidi sono rinvenuti nell'intervallo di concentrazione di $\mu\text{g L}^{-1}$ in campioni di acqua reale [1]. Pertanto, è necessaria una fase di preparazione del campione prima della determinazione strumentale che permetta una sufficiente

preconcentrazione degli analiti [8]. L'estrazione in fase solida (SPE) e l'estrazione liquido-liquido (LLE) sono due tecniche convenzionali che sono state impiegate per l'estrazione di insetticidi a base di benzoilurea da campioni di acqua, suolo e cibo [1]. Tuttavia, entrambe le tecniche sono caratterizzate da un elevato consumo di solventi organici (LLE) o sono composte da diverse fasi soggette a errori nonché dispendiose in termini di tempo (SPE) [4]. Dal momento dell'introduzione dei principi della *Green Analytical Chemistry* (GAC) [9], lo sviluppo di metodologie miniaturizzate, efficienti e rispettose dell'ambiente sono in prima linea nella ricerca in chimica analitica [4]. Esempi tipici di tecniche di microestrazione e miniaturizzazione che sono state impiegate nell'analisi ambientale includono la microestrazione in fase solida (SPME) [10], la microestrazione dispersiva liquido-liquido (DLLME) [11], l'estrazione in fase solida dispersiva (d-SPE) [2], estrazione magnetica in fase solida (MSPE) [12], estrazione tramite l'uso di SBSE [13] ed FPSE [14].

FPSE è un esempio di tecnica miniaturizzata di preparazione del campione che utilizza assorbenti ibridi organici-inorganici derivati da sol-gel legati chimicamente a un substrato di tessuto. La membrana FPSE mostra flessibilità e permeabilità e grazie all'elevato potere assorbente permette di ottenere un'elevata efficienza di estrazione. La FPSE si è dimostrata una potente tecnica analitica per la bioanalisi, l'analisi di alimenti e campioni ambientali [14], [15], [16]. Grazie al suo letto di assorbimento aperto e alla geometria planare, può essere utilizzata in modalità di estrazione basata sull'equilibrio campione-FPSE quando viene eseguita l'estrazione per immersione diretta. Poiché la velocità con cui viene raggiunto l'equilibrio dipende direttamente dai criteri cinetici del processo di estrazione, l'implementazione di energia esterna quale l'agitazione può accelerare il processo di estrazione favorendo la diffusione dell'analita [17]. Al fine di integrare l'agitazione e l'estrazione in un unico dispositivo di preparazione del campione è stato sviluppato il sistema di estrazione MI-FPSE [18]. La tecnica MI-FPSE prevede che due membrane FPSE siano unite a formare un *sandwich* al cui interno viene integrato un agitatore magnetico metallico, ottenendo un dispositivo di estrazione che mostra un'elevata semplicità di utilizzo e può essere utilizzato per lo sviluppo di metodologie semplici, rapide, rispettose dell'ambiente ed economiche. Sebbene MI-FPSE abbia dimostrato di essere uno strumento efficiente

nella bioanalisi, l'esplorazione dell'applicabilità di questa tecnica nell'analisi ambientale non era stata ancora oggetto di studio prima di questa pubblicazione.

Nel presente studio, MI-FPSE accoppiata a determinazione tramite HPLC-DAD è stata impiegata per la prima volta per il monitoraggio di insetticidi a base di benzoilurea (diflubenzuron, triflumuron, hexaflumuron, lufenuron e chlorfluazuron) in campioni di acqua ambientale. Dopo la selezione della membrana sol-gel MI-FPSE più efficiente, i principali parametri che influenzano le prestazioni di estrazione sono stati studiati e ottimizzati a fondo. Di conseguenza, il metodo proposto è stato convalidato e impiegato con successo per la determinazione degli analiti target in acque minerali, di rubinetto, fluviali e lacustri.

4.3.1.2 Parte sperimentale

Sostanze chimiche e reagenti

I dispositivi FPSE e MI-FPSE utilizzati nel presente studio sono stati preparati presso il Dipartimento di Chimica e Biochimica della “*Florida International University*”, Miami, Florida. Il substrato utilizzato per il rivestimento assorbente sol-gel CW 20M (CW 20M) era costituito da cotone non sbiancato acquistato da JoAnn Fabric, Miami, Florida, USA. Il polimero CW 20M, l'idrossido di sodio, l'acido cloridrico, l'acido trifluoroacetico, l'acetone, il metanolo, il cloruro di metilene e l'idrossido di ammonio sono stati acquistati da Fisher Scientific (Milwaukee, WI, USA). Il precursore sol-gel metil trimetossisilano è stato acquistato da Gelest Inc. (Morrisville, PA, USA). Il metanolo di grado HPLC (MeOH) è stato acquistato da Fischer Scientific (Steinheim, Regno Unito) e l'acetonitrile di grado HPLC (ACN) è stato acquistato da Honeywell (Charlotte, Carolina del Nord, USA). Durante lo studio è stata utilizzata acqua ad alta purezza prodotta da un sistema di purificazione B30 (Adrona SIA, Riga, Lettonia). Il cloruro di sodio di grado reagente ACS è stato acquistato da Merck (Merck KGaA, Darmstadt, Germania).

Gli standard diflubenzuron, triflumuron ed esaflumuron sono stati acquistati da Supelco (Bellefonte, PA, USA), mentre lufenuron e chlorfluazuron sono stati acquistati da Riedel-de Haën (Honeywell, Charlotte, North Carolina, USA). Le soluzioni madre dei pesticidi a base di benzoilurea sono state preparate in acetonitrile ad una concentrazione di 100 mg L⁻¹. Le soluzioni madre dei singoli standard sono state

conservate ad una temperatura di 4°C. Le diluizioni di lavoro contenenti tutti gli analiti target sono state preparate giornalmente mediante diluizione seriale dalle soluzioni madre in acetonitrile.

Strumentazione analitica

La determinazione degli insetticidi a base di benzoilurea è stata eseguita utilizzando un HPLC-DAD Shimadzu a gradiente quaternario a bassa pressione (Kyoto, Giappone), composto da una pompa LC-10ADVP, un'unità di degasaggio DGU-10B, un sistema di miscelazione FCV-10ALVP, un Controller di sistema SCL-10ALVP e un rivelatore di serie di diodi SPD-M10AVP. Il sistema HPLC-DAD era dotato di una valvola di iniezione Rheodyne 7725i (Rheodyne, Cotati, CA, USA) dotata di un *loop* da 20 µl. Il controllo del sistema e la gestione dei dati sono stati eseguiti utilizzando il software Lab Solutions-LC. Come fase stazionaria è stata utilizzata una colonna Kinetex C₁₈ 100A (5,0 µm, 2,1 × 50 mm) (Phenomenex, California, USA). La fase mobile era costituita da H₂O (solvente A) e ACN (solvente B) con un flusso di 0,7 mL min⁻¹. I pesticidi a base di benzoilurea sono stati separati utilizzando un'eluizione di tipo a gradiente con un tempo totale di analisi di 10,0 min. La composizione iniziale della fase mobile era 65:35 (A:B, v/v) ed è stata mantenuta costante per 1,5 min. Quindi, la composizione è cambiata a 45:55 (A:B, v/v) a 2,0 minuti ed è stata mantenuta costante per 6,5 minuti. A 7,5 minuti la composizione della fase mobile è tornata alla composizione iniziale, ed è stata mantenuta fino a 10,00 minuti per l'equilibrio della colonna. La temperatura della colonna è stata mantenuta a 40 °C e il volume di iniezione è stato di 20 µL. Un cromatogramma di un campione d'acqua a cui sono stati aggiunti i pesticidi oggetto della ricerca (c=5,00 ng mL⁻¹) e sottoposto alla procedura MI-FPSE è mostrato nella figura 1. I tempi di ritenzione degli analiti target erano 1,83 min per diflubenzuron, 3,54 min per triflumuron, 4,61 min per esaflumuron, 5,19 min per lufenuron e 5,80 min per clorfluazuron. La determinazione degli analiti target è stata eseguita a 260 nm.

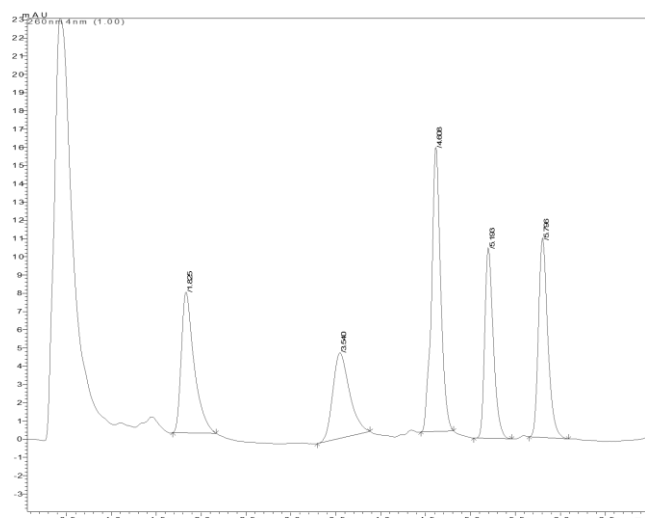


Figura 1. Cromatogramma di un campione di acqua drogato con i cinque composti oggetto di ricerca.

Preparazione dei dispositivi MI-FPSE

La progettazione e lo sviluppo di membrane rivestite con materiale sol-gel assorbente per la realizzazione delle FPSE implicano diversi passaggi sequenziali: (a) selezione del substrato di tessuto tenendo in considerazione la matrice del campione e le proprietà fisico-chimiche degli analiti target; (b) pulizia e attivazione superficiale del substrato del tessuto per massimizzare il carico assorbente durante il rivestimento con il sol-gel; (c) progettazione e ottimizzazione della formulazione della soluzione “sol” per ottenere il rivestimento assorbente richiesto con l'obiettivo di massimizzare le interazioni intermolecolari tra l'assorbente sol-gel e gli analiti target; (d) ottimizzazione del processo di rivestimento assorbente sol-gel; (e) trattamento post-gelificazione delle membrane FPSE rivestite con assorbente sol-gel per ottenere un dispositivo di estrazione robusto.

Come substrato del tessuto è stato scelto cotone non sbiancato, che presenta le caratteristiche di essere un tessuto idrofilo e permeabile. Poiché il dispositivo FPSE con magnete integrato richiede almeno due strati, sono stati preparati due pezzi di substrati in tessuto successivamente rivestiti con il sol-gel. Il processo di pulizia e attivazione della superficie è stato eseguito come precedentemente descritto in letteratura [20]. La soluzione sol per il rivestimento assorbente sol-gel CW 20M sul substrato di tessuto di cotone è stata preparata aggiungendo in sequenza il precursore sol-gel, il polimero organico, acetonitrile, cloruro di metilene, acido trifluoroacetico e

acqua deionizzata con un rapporto molare 1:0.48:3.26:3.74:1.25:3, in un recipiente di reazione in vetro borosilicato da 50 mL. La soluzione è stata agitata su vortex per 3 minuti dopo l'aggiunta di ciascuno degli ingredienti, partendo da CW 20M. La soluzione sol risultante è stata infine agitata su vortice per 5 minuti e sonicata per 10 minuti. Successivamente, un pezzo del tessuto pretrattato è stato immerso nella soluzione sol. Il secondo pezzo di tessuto è stato anche immerso in un'altra soluzione sol preparata in condizioni identiche. I substrati in tessuto sono stati rivestiti con il sol-gel CW 20M per 8 ore a temperatura ambiente. Successivamente, le membrane FPSE rivestite con sol-gel CW 20M sono state rimosse dai recipienti di reazione, essiccate all'aria per 2 ore e infine sottoposte a condizionamento termico a 50°C sotto flusso continuo di azoto gassoso per 24 ore. Le membrane FPSE sono state quindi risciacquate con una miscela di metanolo:cloruro di metilene (50:50 v/v) e sonicate per 30 minuti. Le membrane FPSE sono state quindi asciugate in aria per 1 ora e sono state sottoposte ad un altro ciclo di condizionamento termico a 50 °C per 24 ore in condizioni identiche. Le membrane sono state poi stirate per ottenere superfici prive di pieghe. Le membrane FPSE rivestite con sol-gel CW 20M sono state quindi impilate l'una sull'altra, sono stati disegnati dei cerchi di 1" di diametro sulla membrana superiore usando una matita e cucite da un'estremità all'altra del cerchio in modo da avere una tasca larga 4 mm al centro del disco circolare. I cerchi sono stati quindi tagliati in dischi individuali. Successivamente, un'asta magnetica cilindrica (1" × 1/16") è stata introdotta nel disco FPSE attraverso la tasca cucita per creare il dispositivo MI-FPSE.

Campioni e pretrattamento dei campioni

In questo studio sono stati analizzati diversi campioni ambientali e di acqua potabile (acqua di rubinetto, acqua minerale, acqua di fiume e acqua di lago). L'acqua potabile è stata raccolta a Salonicco, in Grecia. L'acqua del fiume è stata raccolta in Grecia settentrionale e l'acqua del lago è stata raccolta Grecia occidentale. Tutti i campioni sono stati raccolti in bottiglie di vetro ambrato senza lasciare spazio di testa. La conservazione dei campioni è stata effettuata al buio a 4 °C. I campioni sono stati analizzati tal quale senza alcuna filtrazione prima dell'applicazione del protocollo MI-FPSE.

Procedura di estrazione MI-FPSE

Prima del suo utilizzo, la membrana sol-gel CW 20M MI-FPSE è stata immersa in 2 mL di MeOH:ACN (50:50, v/v) per 5 minuti per rimuovere potenziali impurità dalla sintesi e attivare la fase assorbente. Successivamente, la membrana FPSE è stata risciacquata più volte con acqua deionizzata per rimuovere potenziali tracce di dei solventi organici che potrebbero ostacolare l'estrazione degli analiti target.

Per l'estrazione degli insetticidi a base di benzoilurea, un'aliquota di 100 mL di campione è stata posta in una fiala di vetro da 200 mL e una membrana sol-gel CW 20M MI-FPSE attivata è stata immersa nella fiala di vetro. La soluzione del campione è stata trasferita su un agitatore magnetico (Heidolph Instruments GmbH & CO, Schwabach, Germania) e l'adsorbimento degli analiti target è stato ottenuto sotto agitazione a 800 rpm per 40 minuti. Dopo questo intervallo di tempo, la membrana MI-FPSE è stata estratta dalla fiala e risciacquata con acqua deionizzata. Per l'eluizione degli insetticidi adsorbiti, la membrana MI-FPSE è stata immersa per 2 minuti in 1 mL di MeOH. Successivamente, è stata rimossa e l'eluente è stato filtrato utilizzando filtri in politetrafluoroetilene da 0,22 µm (Frisenette ApS, Knebel, Danimarca). L'eluente è stato completamente evaporato sotto un flusso di azoto e successivamente ricostituito in 100 µl di MeOH e analizzato mediante HPLC-DAD.

Le membrane MI-FPSE dopo il loro utilizzo sono state lavate per immersione in 2 mL di MeOH:ACN (50:50 v/v) per 5 min. Dopo l'essiccazione all'aria, le membrane MI-FPSE pulite sono state conservate in fiale sigillate ermetiche fino al successivo utilizzo.

4.3.1.3. Risultati e discussioni

Caratterizzazione del sol-gel CW 20M

Il dispositivo di estrazione è stato caratterizzato utilizzando la microscopia elettronica a scansione (SEM) e la spettroscopia a infrarossi trasformati di Fourier (FT-IR) per far luce rispettivamente sulla sua morfologia superficiale e sulla sua composizione funzionale.

Caratterizzazione mediante SEM

Le immagini di microscopia elettronica a scansione delle membrane FPSE rivestite con sol-gel CW 20M a diversi ingrandimenti sono presentate in figura 2 (a-d). Poiché FPSE è in grado di combinare il principio di estrazione esaustiva di SPE (caratterizzata da una tecnica di preparazione del campione a flusso continuo) e il principio di estrazione di equilibrio di SPME (caratterizzata da trasferimento di massa al sorbente a diretto contatto con il campione o presente nello spazio di testa del campione racchiuso in un contenitore), è importante che la permeabilità del tessuto rimanga intatta dopo il rivestimento assorbente sol-gel. Queste caratteristiche combinate, dovute alla presenza di pori, distinguono FPSE da altre tecniche di microestrazione poiché la maggior parte non presenta questa caratteristica. Inoltre, il processo di rivestimento assorbente sol-gel è un processo di rivestimento chimico controllabile con precisione, che, a differenza dei processi di rivestimento fisici classici utilizzati nella maggior parte delle tecniche di microestrazione, tra cui SPME e microestrazione a film sottile, garantisce un'elevata riproducibilità del rivestimento e un rivestimento superficiale uniforme. La figura 2(a) rappresenta la superficie del tessuto prima del rivestimento sol-gel CW 20M, con un grado di ingrandimento 100×. Le membrane FPSE rivestite con sol-gel CW 20M a 100 × e 500 × di ingrandimento sono presentate in figura 2 (b, d). Le immagini rivelano che i pori passanti vengono mantenuti anche dopo il rivestimento sol-gel CW 20M. La superficie del tessuto non rivestito con ingrandimenti 500x presentato in Fig figura (c) e mostra la singola microfibrilla. La soluzione di sol può permeare liberamente attraverso le microfibrille e forma un rivestimento sottile legato chimicamente sulla superficie. Come si può vedere da queste immagini, l'unica differenza tra il tessuto di cellulosa non rivestito e la membrana FPSE rivestita con sol-gel CW 20M è il colore della superficie che supporta l'uniformità del rivestimento sulle singole microfibrille dei fili di cellulosa utilizzati nel processo di tessitura del tessuto.

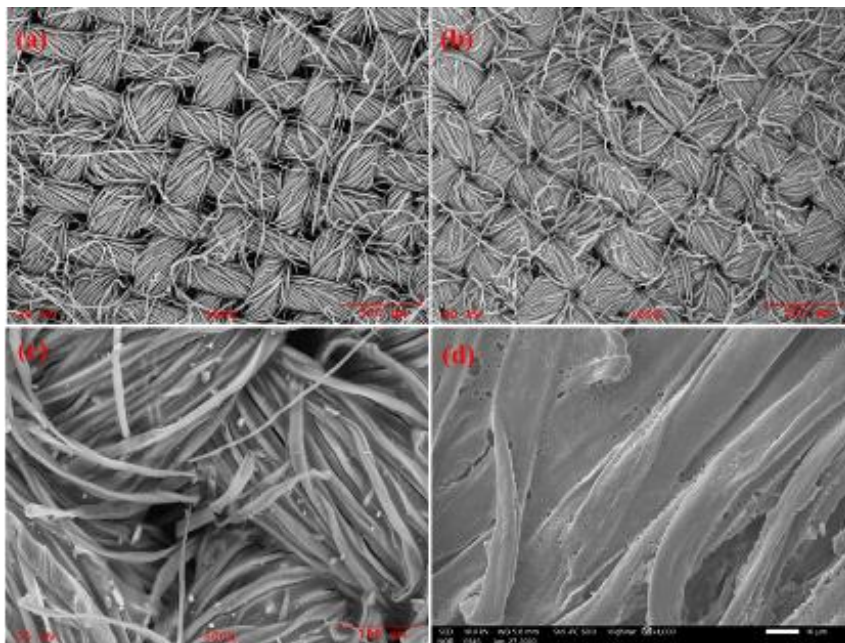


Figura 2. Immagini SEM di (a) tessuto non rivestito (ingrandimento 100×); (b) FPSE rivestita sol-gel CW20M (ingrandimento 100×); (c) FPSE rivestita sol-gel CW20M (ingrandimento 500×); (d) FPSE rivestita sol-gel CW20M (ingrandimento 1000×).

Caratterizzazione mediante FT-IR

Gli spettri FT-IR del tessuto non rivestito e della membrana FPSE rivestita con sol-gel CW 20M sono riportati in figura 3 (a, b). Le bande caratteristiche negli spettri del tessuto non rivestito presentati in figura 3 (a) includono 3333 cm^{-1} e 1024 cm^{-1} che corrispondono rispettivamente allo stiramento OH e alla flessione dell'OH. Il picco osservato a 2899 cm^{-1} corrisponde alla vibrazione di allungamento CH della cellulosa. I picchi a 1429 cm^{-1} e 1367 cm^{-1} rappresentano le vibrazioni di stretching CH e i gruppi CO presenti nell'anello aromatico dell'emicellulosa e della lignina. Il picco acuto a 900 cm^{-1} può essere attribuito allo stretching O-C-O [21]. Diverse bande come la vibrazione di allungamento antisimmetrico di Si-O-Si a $\sim 1035\text{ cm}^{-1}$, la vibrazione di deformazione simmetrica di Si-CH₃ a $\sim 1273\text{ cm}^{-1}$ e la vibrazione del gruppo metilico a $\sim 774\text{ cm}^{-1}$ compaiono nella membrana FPSE rivestita con sol-gel CW 20M e indicano l'inclusione del precursore e del polimero nel sorbente sol-gel CW 20M legato chimicamente al substrato del tessuto.

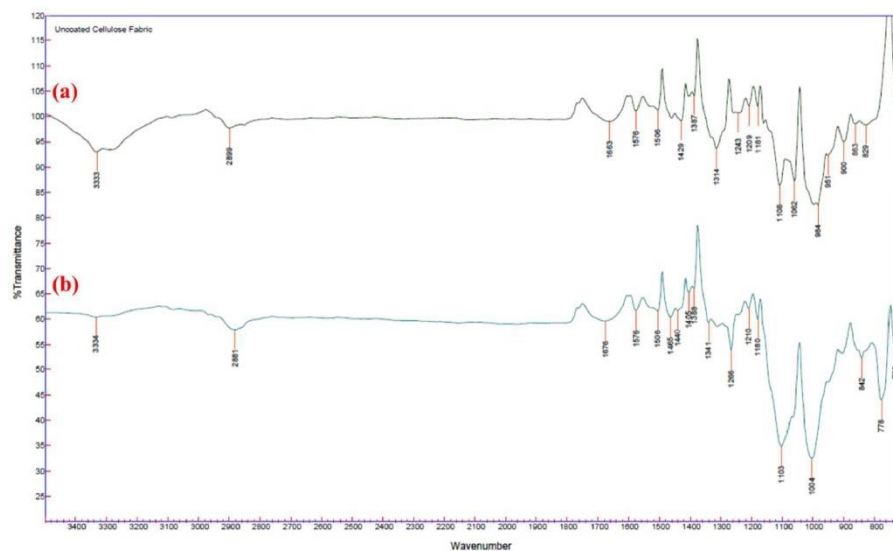


Figura 3. Spettro FT-IR di (a) tessuto non rivestito; (b) membrana di estrazione adsorbente rivestita sol-gel CW 20M.

Meccanismo di estrazione nel dispositivo MI-FPSE

Il meccanismo di estrazione in FPSE è prevalentemente per adsorbimento, in cui gli analiti interagiscono con la membrana FPSE tramite diverse interazioni intermolecolari (dispersione di London, legame idrogeno, interazione pi-pi, interazione dipolo-dipolo). Sol-gel CW 20M è un buon candidato per l'estrazione di analiti polari e non polari grazie ai diversi meccanismi di interazione intermolecolare. Gli analiti oggetto di questa ricerca, i pesticidi a base di benzoilurea, sono di polarità moderata o non polari e possiedono donatori e accettori di legami idrogeno. Di conseguenza, il sol-gel CW 20M è un buon candidato per l'estrazione di questi composti grazie alla loro capacità di formare legami idrogeno e altre interazioni intermolecolari. Il substrato di tessuto di cellulosa, con i suoi numerosi gruppi funzionali idrossilici di superficie, integra anche la selettività complessiva e l'affinità estrattiva della membrana FPSE rivestita con sol-gel CW20M per gli analiti target. La geometria piatta del dispositivo imita un disco SPE e i due strati di membrane FPSE rivestite con assorbente sol-gel aumentano la probabilità di interazione tra la superficie assorbente e gli analiti attraverso diverse interazioni intermolecolari.

Ottimizzazione delle condizioni MI-FPSE

Per trovare le condizioni ottimali di MI-FPSE per l'estrazione degli insetticidi oggetto di studio, i principali parametri che influenzano la procedura di adsorbimento e desorbimento sono stati accuratamente studiati e ottimizzati. È stato utilizzato l'approccio OVAT (*one variable at a time*, una variabile alla volta). Pertanto, ciascuna variabile (materiale di rivestimento sol-gel, tempo di estrazione, velocità di agitazione, volume del campione, contenuto di sale, tipo e volume dell'eluente, tempo di eluizione) è stata esaminata indipendentemente, mentre le altre variabili sono state mantenute costanti. La tabella 1 riassume le condizioni sperimentali iniziali, l'intervallo di indagine e le condizioni ottimali e selezionate dopo per la procedura MI-FPSE.

Tabella 1. Parametri iniziali e selezionati/ottimali per il protocollo MI-FPSE

Parametro	Valore iniziale	Parametri di indagine	Valore selezionato/ottimali
Sol-gel sorbent	-	PTHF and CW 20M	CW 20M
Volume di campione	20 mL	10-150 mL	100 mL
Tempo di estrazione	40 min	20-60 min	40 min
Agitazione	400 rpm	0-1000 rpm	800 rpm
Contenuto di sale	0 % p/v NaCl	0-20 % p/v NaCl	0 % p/v NaCl
Eluente	Methanol	Metanolo, Acetonitrile, Methoanolo:Acetonitrile 50:50 v/v	Metanolo
Volume di eluente	1 mL	0.5-2 mL	1 mL
Modalità di eluizione	Agitazione	Agitazione /No agitazione	No agitazione
Tempo di eluizione	10 min	2-15 min	2 min

Selezione dell'assorbente sol-gel

In questo studio, due diverse membrane MI-FPSE rivestite con sol-gel con substrato di cellulosa e polarità variabili, ovvero sol-gel CW 20M (polare) e sol-gel PTHF (mediamente polare) sono state valutate per le loro prestazioni nell'estrazione dei pesticidi a base di benzoilurea dai campioni di acqua. Viste le polarità degli analiti non sono state valutate altre membrane. Prendendo in considerazione le strutture chimiche degli analiti oggetto di questa ricerca è possibile vedere come possiedono 2 donatori di legami idrogeno e da 4 a 11 accettori di legami, a seconda del singolo

composto. Il blocco costitutivo del poli(tetraidrofurano) possiede un accettore di legame idrogeno, mentre nessun accettore di legame idrogeno è presente in ciascuna unità di tetraidrofurano. D'altra parte, il glicole etilenico, l'elemento costitutivo del CW 20M, possiede due donatori di legami idrogeno e due accettori di legami idrogeno. Si può ipotizzare che la presenza del gruppo metilico e degli abbondanti donatori e accettori di legami idrogeno nel sol-gel CW 20M abbia svolto un ruolo chiave nel processo di estrazione tramite la dispersione di London e le interazioni di legame idrogeno. Pertanto, la membrana sol-gel CW 20M è stata scelta per l'estrazione degli insetticidi a base di benzoilurea dai campioni di acqua.

Ottimizzazione delle condizioni di adsorbimento

Il primo parametro ottimizzato è stato quello relativo al tempo di adsorbimento, indagando quattro diversi intervalli compresi tra 20 min e 60 min osservando che per tutti gli analiti l'equilibrio è stato raggiunto a 40 min e il prolungamento del tempo di estrazione fino a 60 min non ha apportato alcun beneficio in termini di efficienza di estrazione.

Successivamente è stato preso in considerazione il volume del campione, il quale è un fattore critico poiché direttamente associato alla sensibilità del metodo. In questo caso, l'effetto del volume di campione è stato studiato tra 10 mL e 150 mL. Sono stati osservati recuperi di estrazione stabili utilizzando un volume di campione fino a 100 mL, mentre un ulteriore aumento fino a 150 mL ha comportato una ridotta efficienza di estrazione per tutti i composti oggetto di studio.

L'applicazione di energia esterna al sistema (ad es. agitazione magnetica, scuotimenti orbitali e ultrasuoni) è un fattore che può favorire la diffusione degli analiti con conseguente riduzione del tempo di preparazione del campione e maggiore efficienza di estrazione [17]. Per trovare la velocità di agitazione ottimale, sono stati esaminati quattro diversi valori (0 rpm, 400 rpm, 800 rpm e 1000 rpm). Analizzando i risultati è stato osservato che tra 400 rpm e 1000 rpm si manteneva un'efficienza di estrazione stabile. Si è deciso pertanto, di selezionare una velocità di agitazione intermedia di 800 rpm come valore per gli esperimenti successivi. È importante sottolineare che in totale assenza di agitazione del campione (cioè 0 rpm) sono stati osservati valori di recupero dell'estrazione trascurabili.

L'ultima fase nello studio dei parametri di adsorbimento ha previsto lo studio relativo all'effetto dell'aggiunta di sale al campione. A tale scopo l'estrazione è avvenuta in presenza di concentrazioni variabili di cloruro di sodio comprese tra 0 % p/v e 20 % p/v. L'aggiunta di sale ad un campione acquoso può comportare il cosiddetto effetto *salting out* attraverso la riduzione della solubilità degli analiti ed una maggiore interazione tra questi e la fase di assorbimento. Tuttavia, potrebbero verificarsi anche fenomeni avversi poiché è noto che l'aggiunta di sale aumenta la viscosità della soluzione ostacolando così il trasferimento di massa dei composti desiderati [22]. In questo caso, è stato osservato un aumento del recupero di estrazione solo per il clorfluazuron aumentando il contenuto di NaCl dallo 0% p/v al 5% p/v, osservando invece per diflubenzuron e triflumuron una leggera diminuzione. Aumentando il contenuto di NaCl al 10% p/v, il recupero dell'estrazione di clorfluazuron, diflubenzuron e triflumuron è rimasto costante, infine è stata osservata una diminuzione per tutti gli analiti con una concentrazione di NaCl del 20% p/v. Prendendo in considerazione tutti gli analiti studiati, i successivi esperimenti sono stati condotti senza regolare la forza ionica della soluzione.

Ottimizzazione della fase di desorbimento

Dopo la selezione delle condizioni ottimali di adsorbimento, è stata ottimizzata la fase di desorbimento degli analiti dalla membrana FPSE. Inizialmente sono stati esaminati il tipo di solvente e la modalità di eluizione. Sono stati esaminati due diversi solventi (metanolo e acetonitrile) e una miscela di solventi (metanolo:acetonitrile 50:50 v/v). Recuperi di estrazione simili sono stati ottenuti in tutti e tre i casi. Tuttavia, il metanolo è considerato un solvente più ecologico rispetto all'acetonitrile in base alla guida relativa alla selezione dei solventi redatta da Pfizer [23]. Pertanto, al fine di soddisfare i requisiti della GAC in merito alla selezione di sostanze chimiche più ecologiche, il metanolo è stato scelto come eluente per il protocollo MI-FPSE proposto [9].

Successivamente, è stato studiato se durante la fase di eluizione è necessaria o meno un'agitazione esterna. Gli stessi recuperi di estrazione sono stati ottenuti con e senza agitazione e quindi in ulteriori esperimenti non è stata impiegata alcuna agitazione durante la fase di desorbimento.

È stato anche studiato il tempo necessario per il desorbimento degli analiti adsorbiti. A questo scopo, l'effetto del tempo di desorbimento è stato studiato tra 2 min e 15 min. Come mostrato in figura 4, un intervallo di tempo di 2 minuti è stato sufficiente per il desorbimento degli insetticidi a base di benzoilurea.

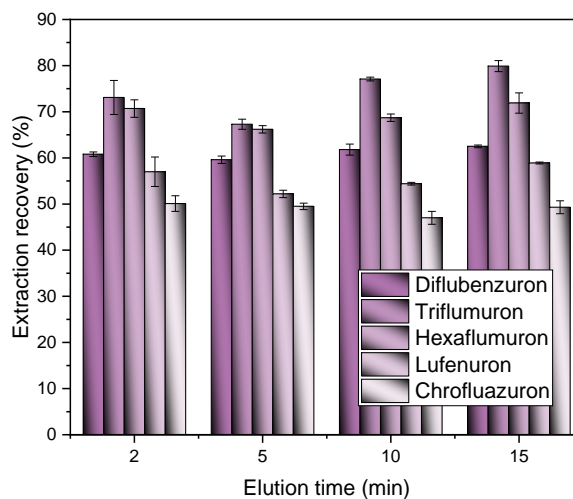


Figura 4. Ottimizzazione del tempo di eluizione.

Infine, sono state valutate diverse quantità di metanolo (cioè 0,5 mL, 1,0 mL e 2,0 mL). In generale, la quantità del solvente di desorbimento deve essere sufficiente per fornire un desorbimento completo dei composti adsorbiti. Allo stesso tempo, la quantità di eluente deve essere la più bassa possibile per soddisfare i requisiti della GAC per quanto riguarda la riduzione al minimo dell'uso di sostanze chimiche pericolose [9]. Un aumento della quantità di metanolo da 0,5 mL a 1,0 mL ha portato a un miglioramento del recupero dell'estrazione per tutti gli analiti. Tuttavia, un ulteriore aumento a 2,0 mL non ha fornito alcun beneficio aggiuntivo in termini di recupero dell'estrazione. Gli esperimenti sono stati condotti utilizzando 1,0 mL di metanolo. Per ottenere un fattore di preconcentrazione ancora più elevato, l'estratto è stato evaporato sotto un flusso di azoto ed è stato ricostituito in un volume di solvente inferiore. Questo passaggio è stato possibile poiché non sono state osservate perdite per evaporazione per i pesticidi a base di benzoilurea.

Performance analitica del metodo MI-FPSE HPLC-DAD

Il metodo MI-FPSE HPLC-DAD proposto è stato validato in termini di linearità, accuratezza, precisione, LOD e LOQ. Per la valutazione della linearità, sono state preparate soluzioni di acqua deionizzata a cui sono stati addizionati gli analiti

oggetti di studio a diversi livelli di concentrazione nell'intervallo 0,20-10,0 ng mL⁻¹. Le curve di calibrazione per ciascun analita sono state costruite tracciando l'area del picco rispetto alla concentrazione dell'analita nella rispettiva soluzione. L'analisi di regressione lineare dei minimi quadrati è stata impiegata per calcolare i coefficienti di determinazione, le pendenze e le intercette per tutti i pesticidi. Il punto più basso della curva di calibrazione è stato fissato come valore di LOQ per ciascun analita e che corrispondeva a un rapporto segnale-rumore di 10. Inoltre, i valori LOD sono stati ottenuti dividendo i valori LOQ per 3.

Il fattore di preconcentrazione del metodo è stato valutato dividendo il volume iniziale (100 mL) e il volume finale (100 µL) del campione. In questo caso il fattore di preconcentrazione è risultato pari a 1000. Il fattore di potenziamento (EF) del protocollo del metodo è stato calcolato confrontando la pendenza della curva di calibrazione per le soluzioni che sono state sottoposte al processo MI-FPSE e la pendenza della curva di calibrazione delle soluzioni acquose degli standard. Il recupero di estrazione (ER%) del metodo è stato calcolato confrontando il fattore di potenziamento (EF) ottenuto e il fattore di preconcentrazione teorico di ciascun insetticida. Le figure di merito del metodo sono riportate in tabella 2.

Tabella 2. Figure di merito del metodo MI-FPSE HPLC-DAD

Analita	Regressione lineare	R ²	Intervallo di linearità (ng mL ⁻¹)	LOD (ng mL ⁻¹)	LOQ (ng mL ⁻¹)	ER%	EF
Diflubenzuron	$y = 26247x + 1143.3$	0.9993	0.20-10.0	0.06	0.20	60.8	608
Triflumuron	$y = 33660x - 9945.4$	0.9979	0.20-10.0	0.06	0.20	73.1	731
Hexaflumuron	$y = 35183x + 142.12$	0.9914	0.20-10.0	0.06	0.20	70.7	707
Lufenuron	$y = 24895x - 12327$	0.9940	0.20-10.0	0.06	0.20	57.0	570
Chlorfluazuron	$y = 15857x - 3776.5$	0.9949	0.20-10.0	0.06	0.20	50.1	501

Successivamente è stato effettuato lo studio su precisione e accuratezza del metodo i cui risultati sono riportati nella tabella 3. A tale scopo sono state utilizzate soluzioni acquose drogate con gli analiti a una concentrazione di 2,00 ng mL⁻¹. La precisione del metodo è stata valutata in termini di deviazione standard relativa (RSD) per le misurazioni ripetute. L'accuratezza del metodo è stata valutata in termini di

recupero relativo (RR%) confrontando la concentrazione media rilevata e la concentrazione nominale del campione d'acqua. Come si può osservare dai valori riportati in tabella, il metodo MI-FPSE HPLC-DAD ha mostrato una buona accuratezza e precisione. Inoltre, è stata valutata la ripetibilità di due diversi lotti di membrane sol-gel CW 20M MI-FPSE. Per tutti gli analiti, i valori RSD dei recuperi di estrazione ottenuti tra i due diversi lotti in condizioni ottimali di preparazione del campione erano inferiori al 6%.

Tabella 3. Accuratezza e precisione intraday e interday del metodo

Analita	Quantità aggiunta (ng mL ⁻¹)	Intra-Day (n=3)			Inter-Day (n=4 ×3)		
		Misurata (ng mL ⁻¹)	RSD%	RR%	Misurata (ng mL ⁻¹)	RSD%	RR%
Diflubenzuron	2.00	2.13 ± 0.03	1.4	106.5	1.95 ± 0.16	8.2	97.5
Triflumuron	2.00	1.88 ± 0.09	4.8	94.0	2.15 ± 0.17	7.9	107.5
Hexaflumuron	2.00	1.96 ± 0.12	6.1	98.0	2.03 ± 0.16	7.9	101.5
Lufenuron	2.00	2.14 ± 0.12	5.6	107.0	2.18 ± 0.17	7.8	109.0
Chlorfluazuron	2.00	2.07 ± 0.11	5.3	103.5	2.09 ± 0.13	6.2	104.5

Riutilizzabilità della membrana MI-FPSE

Per la valutazione relativa alle prestazioni della membrana sol-gel CW 20M MI-FPSE, è stata valutata la sua riutilizzabilità. A tale scopo, la stessa membrana MI-FPSE è stata impiegata per una serie di cicli consecutivi di estrazione ed eluizione degli insetticidi da un campione di acqua drogata alla concentrazione di 2,00 µg mL⁻¹. Come criterio di perdita di performance è stata fissata una diminuzione superiore al 10% della performance iniziale, in termini di recupero relativo. I risultati dello studio di riutilizzabilità hanno evidenziato che dopo 10 cicli di estrazione consecutivi i relativi recuperi sono risultati tra il 95,5% per diflubenzuron e il 91,9% per lufenuron. Pertanto, la membrana sol-gel CW 20M MI-FPSE può essere utilizzata per l'estrazione di insetticidi a base di benzoilurea da campioni di acqua per almeno 10 volte.

Valutazione del carattere green della procedura sviluppata

Per valutare le caratteristiche *green* del metodo sviluppato, è stato utilizzato il software ComplexGAPI [24]. Il pittogramma ComplexGAPI generato per la procedura sviluppata è presentato in figura 5.

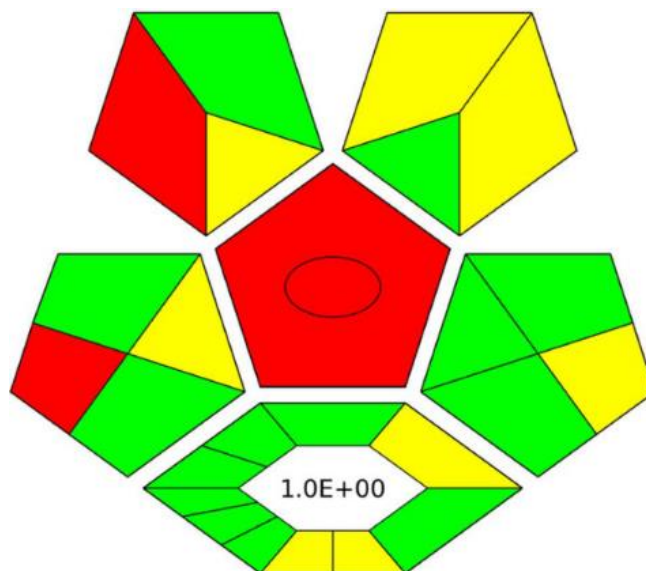


Figura 5. ComplexGAPI del metodo MI-FPSE HPLC-DAD

Considerando la produzione della membrana MI-FPSE, si può concludere che la sintesi avviene secondo i principi della *Green Chemistry*. La resa del processo è elevata e non vengono generati molti rifiuti. La procedura supporta anche la *green economy* ed è caratterizzata da un basso fattore E. Il punto critico è l'applicazione dell'acetonitrile, che in futuro potrebbe essere sostituito con solventi meno inquinanti.

Tenendo conto della parte analitica, si tratta di un'estrazione su microscala, che non richiede un grande volume di solventi molto tossici. Per riassumere, la metodologia può essere considerata *eco-friendly* con prospettive di miglioramenti futuri.

Confronto del metodo MI-FPSE HPLC-DAD con altri studi

Un confronto del metodo MI-FPSE HPLC-DAD qui sviluppato con altri protocolli di microestrazione e di estrazione miniaturizzata utilizzati per la determinazione di campioni di benzoilurea è riportato nella tabella 4.

Tabella 4. Comparazione del metodo MI-FPSE HPLC-DAD proposto con altri metodi per la determinazione di pesticidi a base di benzoilurea nei campioni di acqua

Metodo di preparazione [Ref.]	Analiti	Detector	Volume di campione (mL)	RSD%	EF	LODs (ng mL ⁻¹)
d-SPE [2]	Diflubenzuron, triflumuron, hexaflumuron, teflubenzuron	HPLC-UV	50	<7.1	N.A. ³	0.10–0.23
Monolithic fiber SPME [10]	Hexaflumuron, teflubenzuron, lufenuron, flufenoxuron and chlorfluazuron	HPLC-DAD	20	<7.49 (intra-day) <9.59 (inter-day)	53-138	0.026–0.075
MSPE [23]	Diflubenzuron, triflumuron, hexaflumuron, teflubenzuron, lufenuron, flufenoxuron and chlorfluazuron	HPLC-DAD	8	<7.53	N.A.	0.75-1.5
DLLME [5]	Diflubenzuron, flufenoxuron, triflumuron, and chlorfluazuron	HPLC-UV	10	<6.5	N.A.	0.24-0.82
DLLME [11]	Triflumuron, hexaflumuron, Teflubenzuron, flufenoxuron and chlorfluazuron	HPLC-DAD	10	<4.9	261-302	0.05-0.15
MI-FPSE	Diflubenzuron, triflumuron, hexaflumuron, lufenuron and chlorfluazuron	HPLC-DAD	100 mL	<6.1 (intra-day) <8.3 (inter-day)	501-731	0.06

Analisi di campioni reali

Il metodo MI-FPSE HPLC-DAD sviluppato è stato utilizzato infine per la determinazione di pesticidi a base di benzoilurea in diversi campioni di acqua potabile e ambientale (acqua minerale, acqua di rubinetto, acqua di fiume e acqua di lago), come mostrato nella tabella 5 l'accuratezza della determinazione analitica è stata valutata analizzando soluzioni drogate ($c=2,00$ ng mL⁻¹) per ciascuna matrice. Come si può osservare, i valori RR% per tutti gli insetticidi sono risultati compresi nell'intervallo 81,5-107,0%, mostrando una buona accuratezza.

Tabella 5. Analisi dei campioni reali

Analita	Aggiunta (ng mL ⁻¹)	Acqua di rubinetto		Acqua minerale		Acqua di lago		Acqua di fiume	
		Misurata (ng mL ⁻¹)	RR %	Misurata (ng mL ⁻¹)	RR %	Misurata (ng mL ⁻¹)	RR%	Misurata (ng mL ⁻¹)	RR%
Diflubenzuron	0	<LOD	-	<LOD	-	<LOD	-	<LOD	-
	2.00	2.07±0.10	103.4	2.11±0.03	105.5	1.79±0.08	89.7	2.01±0.11	100.6
Triflumuron	0	<LOD	-	<LOD	-	<LOD	-	<LOD	-
	2.00	1.63±0.07	81.5	2.14 ± 0.04	107.1	1.65±0.11	82.7	1.98±0.08	99.1
Hexaflumuron	0	<LOD	-	<LOD	-	<LOD	-	<LOD	-
	2.00	1.83±0.05	91.3	1.81±0.08	90.5	1.65±0.03	82.6	1.98±0.15	98.8
Lufenuron	0	<LOD	-	<LOD	-	<LOD	-	<LOD	-
	2.00	1.75±0.04	87.7	1.89±0.02	94.4	2.13±0.04	106.5	1.92±0.10	96.1
Chlorfluazuron	0	<LOD	-	<LOD	-	<LOD	-	<LOD	-
	2.00	1.68±0.07	83.8	1.89±0.03	94.3	1.84±0.02	91.8	2.04 ± 0.07	102.1

4.3.1.4. Conclusioni

In questo studio è stata valutata per la prima volta l'applicabilità di dispositivi MI-FPSE nell'analisi ambientale. Le membrane MI-FPSE rivestite con sol-gel CW 20M sono state impiegate con successo per l'estrazione e la preconcentrazione di pesticidi a base di benzoilurea da campioni ambientali e di acqua potabile. La fase di assorbimento altamente efficiente, le sue caratteristiche geometriche e l'integrazione del meccanismo di agitazione hanno consentito l'utilizzo di alti volumi di campione con conseguenti fattori di *enhancement* elevati per gli analiti *target*. Il metodo MI-FPSE ha mostrato una buona accuratezza e precisione, un'ampio intervallo di linearità e bassi valori di LOD e LOQ. Inoltre, la membrana MI-FPSE rivestita con sol-gel CW 20M è risultata riutilizzabile per almeno 10 volte. Pertanto, MI-FPSE potrebbe potenzialmente fungere da strumento altamente versatile per la determinazione degli inquinanti nei campioni ambientali.

Riferimenti bibliografici:

- [1] H. Berrada, G. Font, J.C. Moltó. Determination of urea pesticide residues in vegetable, soil, and water samples. *Crit. Rev. Anal. Chem.*, 33 (2003), pp. 19-41.
- [2] X. Liu, C. Wang, Z. Wang, Q. Wu, Z. Wang. Nanoporous carbon derived from a metal organic framework as a new kind of adsorbent for dispersive solid phase extraction of benzoylurea insecticides. *Microchim. Acta.*, 182 (2015), pp.
- [3] L. Chen, J.F. Chen, Y. Guo, J. Li, Y. Yang, L. Xu, F. Fu. Study on the simultaneous determination of seven benzoylurea pesticides in Oolong tea and their leaching characteristics during infusing process by HPLC-MS/MS. *Food Chem*, 143 (2014), pp. 405-410.
- [4] M. Yang, P. Zhang, L. Hu, R. Lu, W. Zhou, S. Zhang, H. Gao. Ionic liquid-assisted liquid-phase microextraction based on the solidification of floating organic droplets combined with high performance liquid chromatography for the determination of benzoylurea insecticide in fruit juice. *J. Chromatogr. A.*, 1360 (2014), pp. 47-56.
- [5] Q. Zhou, G. Wang, G. Xie. Dispersive liquid-phase microextraction in combination with HPLC for the enrichment and rapid determination of benzoylurea pesticides in environmental water samples. *J. Sep. Sci.*, 36 (2013), pp. 2323-2329.
- [6] F. Matsumura. Studies on the action mechanism of benzoylurea insecticides to inhibit the process of chitin synthesis in insects: A review on the status of research activities in the past, the present and the future prospects, *Pestic Biochem. Physiol.*, 97 (2010), pp. 133-139.
- [7] N. Manousi, A. Kabir, G.A. Zachariadis. Recent advances in the extraction of triazine herbicides from water samples. *J. Sep. Sci.* (2021).
- [8] I. Domínguez, R. Romero González, F.J. Arrebola Liébanas, J.L. Martínez Vidal, A. Garrido Frenich. Automated and semi-automated extraction methods for GC-MS determination of pesticides in environmental samples. *Trends Environ. Anal. Chem.*, 12 (2016), pp. 1-12.
- [9] S. Armenta, S. Garrigues, M. de la Guardia. Green Analytical Chemistry. *TrAC - Trends Anal. Chem.*, 27 (2008), pp. 497-511.
- [10] M. Mei, X. Huang, K. Liao, D. Yuan. Sensitive monitoring of benzoylurea insecticides in water and juice samples treated with multiple monolithic fiber solid-phase microextraction and liquid chromatographic analysis. *Anal. Chim. Acta.*, 860 (2015), pp. 29-36.
- [11] J. Zhang, M. Li, M. Yang, B. Peng, Y. Li, W. Zhou, H. Gao, R. Lu. Magnetic retrieval of ionic liquids: Fast dispersive liquid-liquid microextraction for the determination of benzoylurea insecticides in environmental water samples. *J. Chromatogr. A.*, 1254 (2012), pp. 23-29.
- [12] X. Yang, K. Qiao, Y. Ye, M. Yang, J. Li, H. Gao, S. Zhang, W. Zhou, R. Lu. Facile synthesis of multifunctional attapulgite/Fe₃O₄/polyaniline nanocomposites for magnetic dispersive solid phase extraction of benzoylurea insecticides in environmental water samples. *Anal. Chim. Acta.*, 934 (2016), pp. 114-121.

- [13] C. Margoum, C. Guillemain, X. Yang, M. Coquery. Stir bar sorptive extraction coupled to liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the determination of pesticides in water samples: Method validation and measurement uncertainty. *Talanta*, 116 (2013), pp. 1-7.
- [14] R. Kaur, R. Kaur, S. Rani, A.K. Malik, A. Kabir, K.G. Furton. Application of fabric phase sorptive extraction with gas chromatography and mass spectrometry for the determination of organophosphorus pesticides in selected vegetable samples. *J. Sep. Sci.*, 42 (2019), pp. 862-870.
- [15] A. Tartaglia, A. Kabir, F. D'Ambrosio, P. Ramundo, S. Ulusoy, H.I. Ulusoy, G.M. Merone, F. Savini, C. D'Ovidio, U. De Grazia, K.G. Furton, M. Locatelli. Fast off-line FPSE-HPLC-PDA determination of six NSAIDs in saliva samples. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, 1144 (2020), Article 122082.
- [16] E. Agadellis, A. Tartaglia, M. Locatelli, A. Kabir, K.G. Furton, V. Samanidou. Mixed-mode fabric phase sorptive extraction of multiple tetracycline residues from milk samples prior to high performance liquid chromatography-ultraviolet analysis. *Microchem. J.*, 159 (2020), Article 105437.
- [17] A. Kabir, V. Samanidou. Fabric Phase Sorptive Extraction: A Paradigm Shift Approach in Analytical and Bioanalytical Sample Preparation. *Molecules*, 26 (2021), p. 865.
- [18] V. Alampanos, A. Kabir, K. Furton, V. Samanidou. Magnet integrated fabric phase sorptive extraction of selected endocrine disrupting chemicals from human urine followed by high-performance liquid chromatography – photodiode array analysis. *J. Chromatogr. A.*, 1654 (2021), Article 462459,
- [19] M. Roldán-Pijuán, R. Lucena, S. Cárdenas, M. Valcárcel, A. Kabir, K.G. Furton. Stir fabric phase sorptive extraction for the determination of triazine herbicides in environmental waters by liquid chromatography. *J. Chromatogr. A.*, 1376 (2015), pp. 35-45.
- [20] A. Kabir, R. Mesa, J. Jurmain, K.G. Furton. Fabric phase sorptive extraction explained. *Separations*, 4 (2017), p. 21.
- [21] V.M. Moo-Huchin, E. Pérez-Pacheco, C.R. Ríos-Soberanis, L.A. Bello-Pérez, J.M. Cervantes-Uc, M.A.A. Dzul-Cervantes, R.J. Estrada-León. Extraction and characterization of natural cellulosic fiber from jipijapa (*Carludovica palmata*). *Chiang Mai J. Sci.*, 46 (2019), pp. 579-591.
- [22] A. Amiri, M. Baghayeri, M. Sedighi. Magnetic solid-phase extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons using a graphene oxide/Fe₃O₄@polystyrene nanocomposite. *Microchim. Acta.*, 185 (2018).
- [23] D.R. Joshi, N. Adhikari. An Overview on Common Organic Solvents and Their Toxicity. *J. Pharm. Res. Int.*, 28 (2019), pp. 1-18.
- [24] J. Płotka-Wasyłka, W. Wojnowski. Complementary green analytical procedure index (ComplexGAPI) and software. *Green Chem.*, 23 (2021), pp. 8657-8665.
- [25] J. Płotka-Wasyłka. A new tool for the evaluation of the analytical procedure: Green Analytical Procedure Index. *Talanta*, 181 (2018), pp. 204-209.

- [26] M. Niu, Z. Li, S. Zhang, W. He, J. Li, R. Lu, H. Gao, A. Zeng, W. Zhou. Hybridization of Metal-Organic Frameworks with attapulgite for magnetic solid phase extraction and determination of benzoylurea insecticides in environmental water samples. *Microchem. J.*, 159 (2020), Article 105392.
- [27] J. Fan, Z. Liu, J. Li, W. Zhou, H. Gao, S. Zhang, R. Lu. PEG-modified magnetic Schiff base network-materials for the magnetic solid phase extraction of benzoylurea pesticides from environmental water samples. *J. Chromatogr. A.*, 1619 (2020), Article 460950.
- [28] C. Capello, U. Fischer, K. Hungerbühler. What is a green solvent? A comprehensive framework for the environmental assessment of solvents. *Green Chem.*, 9 (2007), pp. 927-993.

4.3.2 Protocollo CPME accoppiato a HPLC-DAD per il monitoraggio di insetticidi a base di benzoilurea in campioni di succo di mela

I succhi di frutta possono contenere residui nocivi di pesticidi che possono portare a rischi ecologici e per la salute del consumatore. Pertanto, è fondamentale sviluppare metodi sensibili e accurati per il monitoraggio dei pesticidi in questi prodotti alimentari. Nel presente studio, è stato sviluppato un protocollo di microestrazione semplice e sensibile combinato con cromatografia liquida e rivelatore spettrofotometrico a serie di diodi (HPLC-DAD) per il monitoraggio dei pesticidi a base di benzoilurea (clorfluazuron, diflubenzuron, hexaflumuron, lufenuron, e triflumuron) nei succhi di mela. Tra le diverse fasi assorbenti che sono state prese in esame, le capsule monolitiche sol-gel poli(caprolattone)-poli(dimetilsilossano)-poli(caprolattone) hanno mostrato la massima efficienza di estrazione. Le fasi di adsorbimento e desorbimento del metodo CPME sono state ottimizzate e il metodo proposto è stato validato. In condizioni ottimali, i limiti di rilevamento per tutti gli analiti erano compresi tra 0,15 e 0,30 ng mL⁻¹. Inoltre, il protocollo proposto ha mostrato una buona linearità, accuratezza e precisione. I recuperi relativi del metodo variavano tra il 90% e il 108% e le deviazioni standard relative erano <8% e 9% rispettivamente per la precisione *intra-day* e *inter-day*. L'indice ComplexGAPI è stato utilizzato per valutare il potenziale *green* del metodo proposto. Infine, il metodo proposto è stato impiegato nell'analisi di un'ampia varietà di campioni di succo di mela disponibili in commercio.

Questa sezione è stata tradotta e adattata dalla seguente pubblicazione: N. Manousi, A. Ferracane, A. Kabir, K. G. Furton, P. Q. Tranchida, G. A. Zachariadis, L. Mondello, V. F. Samanidou, E. Rosenberg. A monolithic capsule phase microextraction method combined with HPLC-DAD for the monitoring of benzoyl urea insecticides in apple juice samples. *Microchemical J.* 181 (2022) 107768. Doi:10.1016/j.microc.2022.107768

4.3.2.1. Introduzione

I succhi di frutta sono ampiamente consumati nella dieta umana visti i loro effetti benefici per la salute [1]. Questi prodotti contengono più ingredienti tra cui, acqua, acidi organici (ad es. acido citrico, acido malico), zuccheri (ad es. saccarosio, fruttosio e glucosio), vitamine (ad es. vitamina C) e minerali (ad es. Na, K, Ca, Mg) [2], [3]. Un'ampia varietà di frutta e verdura può essere trasformata per produrre succhi, ottenendo prodotti con diverse proprietà organolettiche e valori nutrizionali [1], [2]. A causa della crescente domanda di produzione di frutta, viene utilizzato un gran numero di pesticidi sintetici per proteggere le produzioni [4]. Le mele appartengono ai frutti più consumati al mondo e possono essere consumati freschi o utilizzati per preparare una varietà di prodotti, come il succo di mela. I pesticidi possono penetrare nella buccia delle mele e possono finire nella frutta fresca o nei prodotti finali [5]. Sebbene i pesticidi possano aiutare i produttori alimentari ad aumentare la produttività delle colture e la qualità dei prodotti, la loro errata applicazione può causare residui nocivi che comportano rischi ecologici e per la salute [6], [7]. Al fine di ridurre questi rischi e garantire la sicurezza alimentare, molti paesi hanno implementato standard rigorosi per monitorare i residui di pesticidi nei prodotti alimentari [4]. Poiché il succo di mela è ampiamente consumato in tutto il mondo, è fondamentale sviluppare metodologie analitiche per il monitoraggio dei residui di pesticidi al fine di valutarne la qualità [8].

I pesticidi a base di benzoilurea comprendono una classe di composti chimici che esibiscono attività insetticida, erbicida o acaricida e la loro modalità d'azione comporta l'inibizione della sintesi della chitina nella cuticola degli insetti [9]. I pesticidi a base di benzoilurea sono ampiamente utilizzati in agricoltura per le loro proprietà, tra cui l'elevata selettività e la buona attività biologica [10]. Questi insetticidi sono in grado di entrare nell'ambiente acquatico attraverso il deflusso e possono continuare ad accumularsi nell'ambiente [11]. Sebbene i pesticidi a base di benzoilurea mostrino una bassa tossicità per i mammiferi, l'esposizione cronica attraverso il consumo di cibo può portare a effetti tossici a lungo termine [9]. Pertanto, lo sviluppo di protocolli sensibili, rapidi e selettivi per il monitoraggio dei loro livelli nella frutta e nei prodotti a base di frutta è in prima linea nella ricerca nell'analisi dei residui di pesticidi. La gascromatografia (GC) e la cromatografia liquida ad alte prestazioni

(HPLC) sono le due principali tecniche analitiche per la determinazione dei pesticidi nelle matrici alimentari. Tra questi, l'HPLC accoppiato a vari sistemi di rilevamento è tipicamente impiegato nella determinazione di pesticidi a base di benzoilurea, a causa della loro bassa volatilità e della loro alta polarità [9].

Tipicamente, la preparazione del campione è necessaria prima della quantificazione strumentale dei pesticidi a base di benzoilurea nei campioni alimentari. L'estrazione in fase solida (SPE) e l'estrazione liquido-liquido (LLE) sono le principali tecniche di preparazione del campione utilizzate per il monitoraggio di questi analiti target. Tuttavia, questi approcci convenzionali soffrono di vari inconvenienti fondamentali, tra cui più passaggi che richiedono tempo e un maggiore consumo di sostanze chimiche pericolose [11]. A seguito dell'introduzione dei termini e dei principi della *Green Analytical Chemistry* (GAC) [12], vengono sviluppate nuove tecnologie di preparazione dei campioni caratterizzate da una maggiore compatibilità ambientale, convenienza economica e miniaturizzazione [11]. Di conseguenza, sono emerse varie nuove tecniche di estrazione e microestrazione miniaturizzate. Esempi tipici di alcuni approcci di preparazione del campione già consolidati per l'analisi dei residui di pesticidi includono la SPME [13], la SBSE [14], la LPME [15], la d-SPE [15], mentre la MSPE [16], la FPSE [17] e la CPME [18] possono essere annoverate tra le più recenti sviluppi.

La CPME è una tecnica di preparazione del campione introdotta di recente che si basa sull'estrazione guidata dall'equilibrio [19]. L'estrazione degli analiti avviene mediante capsule di microestrazione costituite da assorbenti sol-gel. Le capsule sono composte da due tubi singoli che si uniscono per ottenere dispositivi singoli. Il sol-gel assorbente può essere rivestito con fibre di cotone o creato in situ all'interno del lume dei tubi porosi in polipropilene. Quest'ultimo approccio, porta a una fase di assorbimento monolitica sol-gel altamente efficiente, caratterizzata da semplicità di fabbricazione e possibilità di preparare un'ampia gamma di assorbenti [18], [20]. La seconda provetta del dispositivo CPME contiene un magnete cilindrico e, di conseguenza, la capsula di microestrazione incorpora il meccanismo di agitazione del campione. È interessante notare che la membrana tubolare in polipropilene dei dispositivi CPME è porosa con un diametro medio dei pori di 0,2 μm , che funge da membrana di filtrazione e, quindi, protegge il sorbente nel lume del dispositivo CPME

dalla contaminazione macroscopica [21]. Pertanto, CPME è una tecnica importante per l'analisi di campioni di elevata complessità [19]. Finora, l'utilizzo del CPME è stato proposto per il monitoraggio di inquinanti ambientali inclusi erbicidi triazinici [18], prodotti per la cura della persona [19] e idrocarburi policiclici aromatici [22] in campioni di acqua potabile e ambientale. Tuttavia, le applicazioni di questo metodo nell'analisi degli alimenti sono limitate. Samanidou *et al.* [23] hanno riportato lo sviluppo di un metodo CPME per il monitoraggio dei farmaci sulfamidici nei campioni di latte. In questo studio, è stato sviluppato un metodo CPME semplice e sensibile combinato con il rilevamento HPLC-DAD per la determinazione di cinque pesticidi a base di benzoilurea in campioni di succo di mela, con l'obiettivo di espandere le applicazioni di questa tecnica nell'analisi degli alimenti. A tale scopo, sono state studiate le prestazioni di diversi dispositivi CPME monolitici rivestiti in sol-gel. Dopo aver selezionato la fase di assorbimento più appropriata, sono stati studiati e ottimizzati a fondo i parametri principali che potrebbero influenzare le prestazioni del protocollo. Dopo la sua ottimizzazione, il metodo CPME HPLC-DAD proposto è stato validato e impiegato nell'analisi di campioni di succo di mela commerciale.

4.3.2.2. Parte sperimentale

Sostanze chimiche, reagenti e campioni

I solventi metanolo (MeOH) e acetonitrile (ACN) grado HPLC sono stati acquistati da Honeywell (Charlotte, North Carolina, USA). Il cloruro di sodio (grado reagente) è stato acquistato da Merck (Darmstadt, Germania). Chlorfluazuron (99,4%) e lufenuron (99,8%) sono stati acquistati da Riedel-de Haën (Honeywell, Charlotte, North Carolina, USA), mentre exaflumuron ($\geq 98\%$), triflumuron ($\geq 98\%$) e diflubenzuron ($\geq 98\%$) sono stati acquistati da Supelco (Bellefonte, PA, USA). Per ogni pesticida è stata preparata una soluzione madre (100 mg L^{-1} in ACN) e conservata a $4 \text{ }^\circ\text{C}$. Le soluzioni di lavoro contenenti tutti gli analiti venivano preparate quotidianamente in ACN dalle soluzioni stock.

Sei campioni di succo di mela disponibili in commercio (chiamati come *Apple Juice* 1–6) sono stati acquistati in mercati locali di Vienna, in Austria. Nessuna fase di pretrattamento del campione (ad es. filtrazione, centrifugazione ecc.) è stata impiegata prima del protocollo CPME.

Per la fabbricazione dei dispositivi di microestrazione sono state utilizzate membrane capillari porose Accurel® (3 M Inc., St. Paul, MN, USA). Aste magnetiche (1/4"×1/16") di forma cilindrica sono state acquistate da K&J Magnetics Inc. (Pipersville, PA, USA). Isopropanolo (IPA), cloruro di metilene (DCM), MeOH, NH₄OH e HCl sono stati acquistati da Fisher Scientific (Milwaukee, WI, USA). Il tetrametil ortosilicato (TMOS) e il metiltrimetossisilano (MTMS) sono stati acquistati da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Il polimero poli(caprolattone)-poli(dimetilsilossano)-poli(caprolattone) (PCAP-PDMS-PCAP) è stato ottenuto da Gelest Inc. (Morrisville, PA, USA).

Strumentazione e parametri cromatografici

In questo studio è stato utilizzato un sistema HPLC-DAD Shimadzu (Kyoto, Giappone) composto da due pompe LC20-AD, un autocampionatore SIL-20A, un forno a colonna CTO-20AC e un'unità di degasaggio DGU-20A3. Come sistema di rilevamento è stato utilizzato un DAD SPD-M20A e la quantificazione degli insetticidi a base di benzoilurea è stata condotta a 260 nm.

La separazione degli insetticidi a base di benzoilurea è stata ottenuta utilizzando una colonna Kinetex C₁₈ 100A (2,6 µm, 4,6 mm × 30 mm) (Phenomenex, California, USA). La temperatura della colonna era di 40 °C. La fase mobile era una miscela di H₂O e ACN con un flusso di 1,0 mL min⁻¹. L'eluizione degli analiti target è stata eseguita in modalità gradiente utilizzando una composizione iniziale di 65:35 (H₂O:ACN, v/v) che è rimasta costante per 2,00 min. Successivamente, la composizione della fase mobile è cambiata a 45:55 (H₂O:ACN, v/v) a 4,00 min, seguita da un'ulteriore modifica a 35:65 (H₂O:ACN, v/v) a 6,50 min. Quindi, la composizione è stata mantenuta costante fino a 9,00 min ed è tornata alle condizioni iniziali a 10,00 min per il condizionamento della colonna. Il sistema è stato lasciato equilibrare per l'iniezione successiva fino a 12,00 min. In queste condizioni si sono ottenuti i seguenti tempi di ritenzione: diflubenzuron: 3,93 min, triflumuron: 5,31 min, esaflumuron: 6,32 min, lufenuron: 7,16 min e clorfluazuron: 7,87 min.

Per la procedura CPME è stato utilizzato un agitatore magnetico Heidolph Instruments GmbH & CO (Schwabach, Germania). Per la caratterizzazione dei

sorbenti CPME, un microscopio elettronico a scansione JEOL JSM 5900LV dotato di un rivelatore EDS-UTW (JEOL USA, Inc., 166 Peabody, MA, USA) e uno spettrometro a infrarossi a trasformata di Fourier Cary 670 (Agilent 164 Technologies, Santa Clara, 165 CA, USA).

Preparazione del dispositivo CPME

I dispositivi CPME con magnete incorporato e assorbente sol-gel PCAP-PDMS-PCAP incapsulato sono stati creati utilizzando una procedura semplice composta da diversi passaggi tra cui: (a) fabbricazione e pulizia delle membrane porose in polipropilene; (b) preparazione della soluzione sol per creare il rivestimento superficiale e il letto monolitico; (c) creazione simultanea di rivestimento superficiale e letto monolitico di sol-gel PCAP-PDMS-PCAP; d) invecchiamento, condizionamento e pulizia dei dispositivi CPME.

A causa dell'ampio volume disponibile del campione, i dispositivi CPME sono stati preparati con una lunghezza di 3 cm. In primo luogo, le membrane porose in polipropilene S6/2 Accurel® sono state tagliate in pezzi di 3 cm di lunghezza. Le membrane capillari porose sono state pulite con DCM per 30 minuti e attraverso l'applicazione di sonicazione e asciugate all'aria. Un magnete cilindrico (1/4" × 1/16") è stato utilizzato in ciascuno dei dispositivi CPME. Il magnete è stato inserito in una capsula di polipropilene vuota e questa capsula è stata fusa insieme ad un'altra capsula vuota mediante termosaldatura ad impulso. In quanto tali, entrambe le capsule erano collegate l'una all'altra. I dispositivi CPME erano quindi pronti per il processo di rivestimento.

La soluzione sol per il sorbente sol-gel PCAP-PDMS-PCAP è stata preparata mediante l'aggiunta sequenziale di TMOS, MTMS, polimero, isopropanolo, acido cloridrico e H₂O deionizzata con un rapporto molare: 1:1:0,2:30:0,04:8, in un contenitore di reazione da 50 mL. La miscela è stata mantenuta per 12 ore a temperatura ambiente in modo che potesse procedere l'idrolisi acida dei precursori sol-gel. Successivamente, la soluzione ottenuta è stata centrifugata e la frazione surnatante è stata trasferita in un recipiente di reazione di vetro. Successivamente, NH₄OH (1 mol L⁻¹) è stato aggiunto goccia a goccia alla soluzione con un rapporto molare tra TMOS e NH₄OH di 1:0,10

con agitazione continua. 30 unità dei dispositivi CPME sono state immerse nella soluzione sol e quindi il recipiente di reazione è stato sottoposto a ultrasuoni per 5 minuti per la rimozione dell'aria. La gelificazione della soluzione è avvenuta in 1 ora nelle condizioni di reazione imposte. La soluzione sol formava un solido letto monolitico entro il lume delle capsule e una rete a maglia sulla superficie delle capsule porose di polipropilene e all'interno dei pori delle sue spesse pareti. I dispositivi CPME sono stati quindi sottoposti a condizionamento termico per 24 ore (50 °C). I dispositivi CPME sono stati successivamente puliti e risciacquati con una miscela di MeOH:DCM (50:50 v/v) applicando sonicazione per 30 min. Il letto monolitico dei sorbenti sol-gel si disintegra in microparticelle fini durante la sonicazione. I dispositivi CPME sono stati quindi essiccati (50 °C) in un forno e utilizzati per la preparazione del campione.

Procedura CPME

Il dispositivo CPME è stato inizialmente attivato per immersione in 2 mL di MeOH: ACN (50:50, v/v) per 5 minuti e successivamente è stato immerso in 2 mL di acqua Milli-Q per eliminare tracce di solvente organico. Per l'adsorbimento degli insetticidi a base di benzoilurea, il campione di succo di mela ($V=20$ mL) è stato trasferito in una fiala di vetro da 40 mL e la microcapsula è stata posta all'interno della fiala di vetro. L'estrazione è stata eseguita sotto costante agitazione a 800 rpm per 50 minuti, seguita dalla rimozione della capsula di microestrazione dalla soluzione campione. Il dispositivo CPME è stato risciacquato con acqua Milli-Q e asciugato con carta di cellulosa. L'eluizione dei pesticidi a base di benzoilurea è stata eseguita immergendo la capsula in una provetta Eppendorf contenente MeOH ($V=200$ μ L). La provetta Eppendorf è stata sottoposta a miscelazione tramite l'uso di un vortex per 10 s, l'eluizione è stata completata in 2 minuti e l'estratto metanologico è stato quindi filtrato. Infine, un volume di 10 μ L è stato analizzato mediante HPLC-DAD. Dopo ogni ciclo completo di adsorbimento/eluizione, il mezzo sol-gel PCAP-PDMS-PCAP CPME è stato pulito utilizzando una miscela di MeOH:ACN (50:50 v/v), asciugato e conservato fino al successivo utilizzo.

4.3.2.3. Risultati e discussioni

Caratterizzazione del dispositivo CPME sol-gel PCAP-PDMS-PCAP

I dispositivi CPME sol-gel PCAP-PDMS-PCAP qui sviluppati sono stati caratterizzati utilizzando la microscopia elettronica a scansione (SEM) e la spettroscopia a infrarossi trasformata di Fourier (FT-IR).

Caratterizzazione tramite SEM

Le immagini SEM fanno luce sulla struttura microscopica del substrato e sui sorbenti sol-gel. Le immagini SEM hanno fornito anche informazioni sulla distribuzione del sorbente sol-gel all'interno del lume dei tubi capillari di propilene poroso e all'interno delle pareti spesse spugnose. Le immagini SEM hanno rivelato una dimensione dei pori pari a 0,2 μm , sufficientemente grandi da consentire alla soluzione di sol di permeare attraverso di esso ed entrare all'interno del lume del capillare. La soluzione sol permea facilmente attraverso i pori ed entra nel lume grazie alla sua bassa viscosità. Poiché la viscosità della soluzione sol continua ad aumentare durante la formazione del gel, viene intrappolata e si trasforma in un letto monolitico solido all'interno del lume. La soluzione sol all'interno delle pareti spesse del capillare di polipropilene forma delle microparticelle. Le immagini mostrano che le particelle sono distribuite uniformemente all'interno dei pori del tubo capillare in polipropilene. Il letto monolitico sol-gel creato all'interno del lume del capillare viene frantumato in particelle fini mediante ultrasuoni durante l'elaborazione post-rivestimento.

Caratterizzazione tramite FT-IR

La spettroscopia FT-IR è stata usata per far luce sulla composizione funzionale delle materie prime e del sorbente sol-gel finale. Il sorbente sol-gel PCAP-PDMS-PCAP è stato preparato dal copolimero PCAP-PDMS-PCAP e precursore sol-gel tetrametilortosilicato. Le principali caratteristiche spettrali nello spettro FT-IR del polimero PCAP-PDMS-PCAP includono bande di assorbimento a 1723 cm^{-1} , 1471 cm^{-1} , 1366 cm^{-1} , 1294 cm^{-1} , 1242 cm^{-1} , 1187 cm^{-1} , 961 cm^{-1} e 731 cm^{-1} che corrispondono rispettivamente a *stretching* C=O, deformazione a forbice del C-H, deformazione simmetrica del C-H, *stretching* C-O e C-C, *stretching* asimmetrico C-O-C, *stretching* simmetrico C-O-C e vibrazioni oscillanti CH₂. Le principali bande di

assorbimento corrispondenti al blocco PDMS nel polimero includono le bande di assorbimento a 2944 cm^{-1} a causa dell'allungamento asimmetrico CH₃ in Si-CH₃, la banda a 1016 cm^{-1} che a causa dell'allungamento O-CO-O, la banda a 794 cm^{-1} a causa al *rocking* -CH₃ e allo *stretching* Si-C in S-CH₃ [24], [25].

Lo spettro FT-IR del tetrametilortosilicato include bande di assorbimento a 2947 cm^{-1} , 2845 cm^{-1} , 1461 cm^{-1} , 1192 cm^{-1} , 1076 cm^{-1} e 817 cm^{-1} che possono essere assegnate ad allungamento asimmetrico del C-H, allungamento asimmetrico C-H, flessione asimmetrica C-H, oscillazione piana del gruppo metossi, allungamento simmetrico Si-O-Si e vibrazione oscillante CH₂. Un'analisi dello spettro FT-IR del copolimero PCAP-PDMS-PCAP nella rete sol-gel mostra che possiede molte caratteristiche che appaiono negli spettri del precursore e del copolimero il che indica la riuscita integrazione.

Ottimizzazione delle condizioni CPME

Per l'ottimizzazione del protocollo di preparazione del campione, sono stati inizialmente esaminati diversi dispositivi CPME monolitici rivestiti in sol-gel. Successivamente sono state studiate le fasi di adsorbimento e desorbimento della procedura di estrazione. L'ottimizzazione del metodo è stata effettuata utilizzando l'approccio di modificare una variabile alla volta (OVAT) mantenendo le altre costanti. Pertanto, ogni parametro che potrebbe potenzialmente influenzare le prestazioni di estrazione (volume del campione, volume di eluizione, tempo di estrazione, tempo di desorbimento, aggiunta di sale, tipo e quantità di eluente e velocità di agitazione) è stato individualmente valutato e ottimizzato.

Valutazione di diversi dispositivi CPME rivestiti in sol-gel

Nel presente studio sono stati valutati per le loro prestazioni nell'estrazione dei pesticidi di benzoilurea da campioni di succo di mela otto diversi dispositivi CPME rivestiti in sol-gel monolitici. Nello specifico sono stati valutati i sol-gel: octadecyl (C18), poly(dimetilsilossano) (PDMS), PCAP-PDMS-PCAP, poli(dimetildifenilsilossano) (PDMDPS), Carbowax 20 M (CW 20 M), poli(glicole etilenico) 300 (PEG 300), poli(tetraidrofurano) (PTHF) e All-Interactions-Combined (AIC). Sol-gel AIC è una fase di estrazione che è stata sviluppata per migliorare le

interazioni intermolecolari (ad esempio, interazione dipolo-dipolo, accettore e donatore di legami idrogeno, interazione di impilamento π - π e dispersione di London) tra gli analiti target e il dispositivo CPME. I dispositivi CPME rivestiti con assorbente sol-gel sono stati utilizzati per l'estrazione di pesticidi a base di benzoilurea ($c=50,0$ ng mL⁻¹) da 10 mL di campione di succo di mela. L'adsorbimento degli analiti target è avvenuto per 30 minuti sotto costante agitazione a 800 rpm, mentre l'eluizione è stata eseguita mediante l'aggiunta di 1 mL di ACN per 10 minuti. La massima efficienza di estrazione è stata ottenuta utilizzando il dispositivo CPME rivestito sol-gel PCAP-PDMS-PCAP. Questo assorbente sol-gel si è dimostrato appropriato per l'estrazione di vari composti da matrici complesse, inclusi farmaci antidepressivi dal siero del sangue [26] e idrocarburi policiclici aromatici da campioni di acqua [22].

Successivamente è stato studiato l'effetto delle dimensioni del dispositivo CPME. Le capsule di dimensioni, 1 cm, 2 cm e 3 cm sono state esaminate per le loro prestazioni per l'adsorbimento dei pesticidi di benzoilurea da campioni di succo di frutta. La massima efficienza di adsorbimento per l'estrazione di un volume campione di 20 mL di succo è stata ottenuta utilizzando capsule CPME di 3 cm. Ciò può essere attribuito alla maggiore quantità di assorbente sol-gel per queste capsule.

Ottimizzazione della velocità di agitazione

La velocità di agitazione gioca un ruolo importante nei processi di microestrazione, poiché una velocità di agitazione adeguata può favorire l'efficienza dell'estrazione e ridurre il tempo necessario per raggiungere l'equilibrio termodinamico e accelerare il trasferimento di massa [10]. In questo studio, la velocità di agitazione è stata studiata tra 0 e 1400 rpm. Le efficienze di estrazione più elevate sono state osservate a 800 rpm, mentre un ulteriore aumento della velocità di agitazione fino a 1400 rpm ha avuto effetti negativi per i composti lufenuron e clorfluazuron. Va evidenziato che in assenza di agitazione del campione si sono ottenuti valori di recupero dell'estrazione trascurabili indicando che l'agitazione è un fattore importante per questa tecnica di estrazione.

Ottimizzazione del contenuto di sale

L'aggiunta di sale può aumentare l'efficienza di estrazione degli analiti target diminuendo la loro solubilità e quindi favorendo la loro interazione con la fase di assorbimento [27]. Tuttavia, potrebbero verificarsi fenomeni avversi se la solubilità del composto non viene influenzata, a causa delle potenziali interazioni tra il sale e gli analiti target [28]. In questo caso, sono state aggiunte diverse quantità di NaCl (cioè, 0% p/v, 5% p/v, 10% p/v e 15% p/v) in 10 mL di campione. L'efficienza di estrazione del diflubenzuron non è stata influenzata dall'aggiunta di sale, mentre ha avuto un impatto negativo sull'efficienza di estrazione degli altri analiti. Questa osservazione può essere attribuita alla già elevata concentrazione di elettroliti dei campioni di succo. Osservazioni simili per i pesticidi a base di benzoilurea sono state riportate in altri lavori [28]. Pertanto, gli esperimenti successivi sono stati condotti senza l'aggiunta di sale.

Ottimizzazione del tipo e della quantità di eluente

Al fine di garantire un desorbimento sufficiente dei pesticidi a base di benzoilurea adsorbiti dal dispositivo CPME, sono stati valutati diversi solventi di eluizione e miscele di solventi (MeOH, ACN e MeOH:ACN 50:50 v/v) e diverse quantità di eluente (0,20 mL, 0,75 mL e 1,00 mL). Sulla base dei requisiti dei principi GAC [12], la sostituzione di sostanze chimiche pericolose con sostanze meno tossiche e la riduzione complessiva del consumo di solventi organici è uno dei punti di forza verso lo sviluppo di protocolli più ecologici.

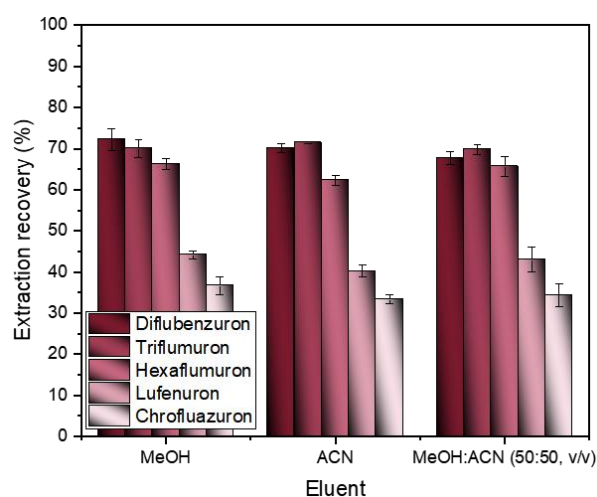


Figura 1. Valutazione di diversi tipi di solvente

Come mostrato in figura 1, sono state ottenute efficienze di estrazione simili con i tre solventi di eluizione esaminati. Secondo la guida alla selezione dei solventi redatta da Pfizer [29], il MeOH è considerato più ecologico rispetto all'ACN. Pertanto, il MeOH è stato impiegato nell'eluizione degli analiti target. Successivamente, l'ottimizzazione della quantità di eluente è stata eseguita nelle stesse condizioni sperimentali. I valori di recupero di estrazione erano simili quando sono state utilizzate diverse quantità di solvente di eluizione (tra 0,20 mL e 1,00 mL). In questo quadro, è stata scelta un'aliquota di 0,20 mL di MeOH per il desorbimento degli analiti target per garantire un consumo minimo di solvente organico.

Ottimizzazione del volume del campione

Il volume del campione è un fattore critico che influisce sul metodo CPME poiché è direttamente associato al fattore di miglioramento del protocollo di estrazione e quindi alla sensibilità del metodo. In questo studio, il volume del campione è stato studiato tra 5 e 50 mL. Come mostrato nella figura 2, l'efficienza di estrazione era la stessa sia per 5 mL che per 10 mL di campione di succo, mentre è stata osservata una leggera diminuzione per diflubenzuron, triflumuron ed esaflumuron aumentando il volume del campione fino a 20 mL.

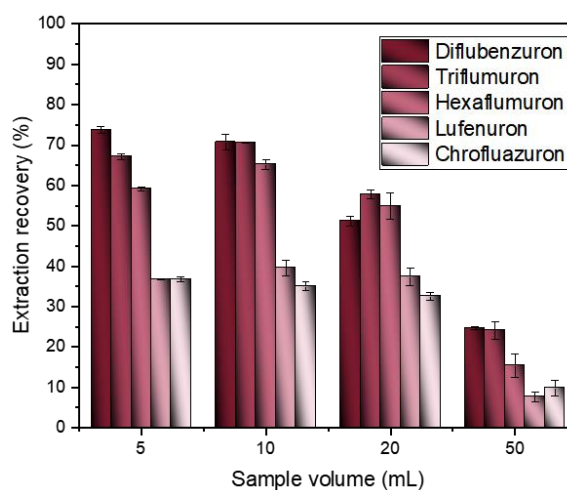


Figura 2. Valutazione del volume di campione

Inoltre, un ulteriore aumento fino a 50 mL ha comportato una riduzione dell'efficienza di estrazione di tutti gli analiti. Tuttavia, in termini di fattore di miglioramento, l'utilizzo di 20 mL di campione può comportare una maggiore

sensibilità rispetto all'utilizzo di 10 mL di campione. Per tale motivo, gli ulteriori esperimenti sono stati condotti con un volume di campione di 20 mL.

Ottimizzazione del tempo di adsorbimento e del tempo di desorbimento

Gli ultimi parametri valutati sono stati i tempi di adsorbimento e desorbimento degli analiti dalle CPME. La CPME è una tecnica di estrazione basata sull'equilibrio ed è necessario trovare il tempo di adsorbimento ottimale in cui è possibile ottenere l'equilibrio per tutti gli analiti. Questo intervallo di tempo è correlato alla costante di distribuzione dell'analita tra il campione acquoso e il materiale assorbente, alla superficie della fase di assorbimento, nonché al coefficiente di diffusione dell'analita. Pertanto, diversi analiti target possono raggiungere l'equilibrio in tempi diversi [30]. In questo studio, il tempo di adsorbimento è stato studiato tra 10 e 80 min. Come mostrato in figura 3, l'equilibrio è stato raggiunto a 50 minuti di estrazione e, quindi, questo tempo di adsorbimento è stato scelto per ulteriori esperimenti.

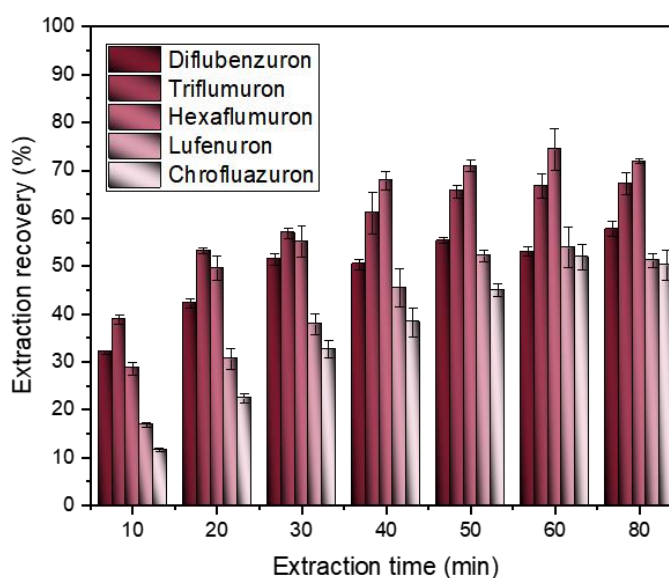


Figura 3. Valutazione del tempo di estrazione

Allo stesso modo, il tempo di desorbimento degli analiti è stato studiato con tempi tra 2 e 15 minuti. Esaminando i risultati ottenuti si può concludere che 2 minuti erano sufficienti per l'eluizione dei pesticidi a base di benzoilurea adsorbiti e un ulteriore aumento di questo tempo fino a 15 minuti non ha fornito alcun beneficio aggiuntivo.

Prestazioni analitiche del metodo CPME HPLC-DAD

Dopo lo sviluppo del metodo, il protocollo CPME HPLC-DAD proposto è stato validato per la valutazione della sua precisione, accuratezza, linearità, limiti di rilevamento (LOD) e limiti di quantificazione (LOQ). La tabella 1 presenta le figure di merito del metodo. La linearità del metodo è stata studiata nell'intervallo 1,0-100,0 ng mL⁻¹ per diflubenzuron e nell'intervallo 0,50-50,0 ng mL⁻¹ per gli altri analiti. Le curve di calibrazione sono state costruite tracciando l'area del picco corrispondente per ciascun analita rispetto alla sua concentrazione. La pendenza, l'intercetta e il coefficiente di determinazione di ciascuna curva di calibrazione sono stati calcolati utilizzando l'analisi di regressione lineare dei minimi quadrati.

Tabella 1. Figure di merito del metodo

Analita	Regressione lineare	R ²	Intervallo di linearità	LOD (ng mL ⁻¹)	LOQ (ng mL ⁻¹)	ER%	EF
Diflubenzuron	$y = 256.0x + 661.5.3$	0.9990	1.00-100.0	0.30	1.00	55.3	55.3
Chlorfluazuron	$y = 285.3x + 446.1$	0.9907	0.50-50.0	0.15	0.50	47.0	47.0
Hexaflumuron	$y = 473.0x - 131.2$	0.9999	0.50-50.0	0.15	0.50	70.9	70.9
Lufenuron	$y = 334.3x - 141.3$	0.9980	0.50-50.0	0.15	0.50	52.1	52.1
Triflumuron	$y = 374.0x + 507.3$	0.9972	0.50-50.0	0.15	0.50	65.5	65.5

Successivamente sono stati calcolati i fattori di potenziamento (EF) e i recuperi di estrazione (ER%) per ciascun pesticida a base di benzoilurea. I valori EF di ciascun analita sono stati ottenuti dividendo la pendenza della curva di calibrazione ottenuta dopo il protocollo CPME per la pendenza della curva di calibrazione ottenuta tramite l'analisi di soluzioni standard. I valori ER% di ciascun analita sono stati ottenuti confrontando i valori EF con i fattori di preconcentrazione teorici. In questo caso, i fattori di preconcentrazione teorici erano pari a 100. I valori di LOQ corrispondevano ai punti più bassi delle curve di calibrazione per ciascun analita, e presentavano un rapporto segnale/rumore superiore a 10. Allo stesso modo, i valori LOD per i pesticidi a base di benzoilurea sono stati calcolati dividendo i LOQ di ciascun pesticida per 3.3. L'accuratezza del metodo è stata valutata calcolando il recupero relativo (RR%) dei campioni di succo di mela drogato con i cinque pesticidi presi in esame. A tale scopo, la concentrazione media calcolata per ciascun analita è stata confrontata con la

concentrazione aggiunta. La precisione del metodo CPME HPLC-DAD è stata espressa in termini di valori di deviazione standard relativa (RSD) ottenuti da misurazioni ripetute di soluzioni drogate. L'accuratezza e la precisione *intra-day* sono state studiate eseguendo cinque misurazioni ripetute nello stesso giorno, mentre l'accuratezza e la precisione *inter-day* sono state studiate eseguendo analisi triplicate in quattro giorni diversi. La tabella 2 riassume i risultati per la precisione e l'accuratezza del metodo sviluppato in questo lavoro di ricerca.

Tabella 2. Precisione e accuratezza del metodo

Analita	Aggiunta (ng mL ⁻¹)	Intra-Day (n=5)			Inter-Day (n=4 × 3)		
		Misurata (ng mL ⁻¹)	RSD%	RR%	Misurata (ng mL ⁻¹)	RSD%	RR%
Diflubenzuron	5.00	5.3 ± 0.3	7.1	105.5	4.6 ± 0.4	8.6	91.3
	10.00	9.6 ± 0.6	6.5	96.0	10.2 ± 0.9	8.5	101.7
	50.00	50.6 ± 3.6	6.3	101.2	53.5 ± 3.6	6.8	107.0
Triflumuron	5.00	5.3 ± 0.3	3.6	106.8	4.5 ± 0.2	5.0	89.8
	10.00	9.5 ± 0.8	8.0	95.4	10.8 ± 0.3	3.0	108.2
	50.00	53.3 ± 1.9	5.9	106.6	53.3 ± 4.2	7.8	106.5
Hexaflumuron	5.00	5.1 ± 0.2	7.4	102.8	4.8 ± 0.3	6.7	96.3
	10.00	9.9 ± 0.5	5.3	99.2	9.8 ± 0.6	5.7	97.7
	50.00	46.5 ± 3.4	3.5	93.1	49.6 ± 2.2	4.4	99.2
Lufenuron	5.00	4.9 ± 0.3	4.8	98.9	5.0 ± 0.4	8.7	99.2
	10.00	10.2 ± 0.8	7.5	102.4	9.6 ± 0.9	9.1	96.0
	50.00	46.1 ± 2.2	5.8	92.3	47.5 ± 3.5	7.3	95.0
Chlorfluazuron	5.00	4.8 ± 0.3	6.4	96.1	5.3 ± 0.4	7.2	106.7
	10.00	10.8 ± 0.6	5.5	107.5	9.5 ± 0.8	8.6	95.4
	50.00	46.0 ± 2.9	5.8	92.1	49.0 ± 4.1	8.5	98.1

Riutilizzabilità del dispositivo CPME

Visto che si ritiene che la fabbricazione di dispositivi di estrazione riutilizzabili sia un aspetto importante per lo sviluppo di protocolli di preparazione dei campioni rispettosi dell'ambiente [31], è stata valutata la riusabilità dei dispositivi CPME. I campioni di succhi di frutta sono matrici complesse che contengono un'ampia varietà di composti inclusi acidi organici e zuccheri [2]. Questi composti potrebbero interferire con la determinazione degli analiti o potrebbero ridurre le prestazioni dopo il loro utilizzo iniziale. Per lo studio di riutilizzabilità, lo stesso dispositivo CPME è stato utilizzato per eseguire dieci cicli continui di adsorbimento e desorbimento degli analiti target da campioni di succo di mela drogato che contenevano insetticidi a base

di benzoilurea a una concentrazione di $20,0 \text{ ng mL}^{-1}$. Come criterio per la perdita di funzionalità è stata stabilita una perdita di prestazioni $\geq 10\%$. Non è stata osservata alcuna significativa perdita di funzionalità dopo 10 tempi di adsorbimento/desorbimento consecutivi, a dimostrazione del fatto che il dispositivo sol-gel PCAP-PDMS-PCAP CPME può essere utilizzato per l'estrazione degli analiti dai succhi di frutta per almeno 10 volte.

Valutazione del potenziale green del metodo CPME HPLC-DAD

Il potenziale *green* dello schema qui proposto è stato valutato utilizzando l'indice ComplexGAPI. Questo indice consente una valutazione completa della procedura considerando i reagenti, le procedure e la strumentazione in un protocollo specifico, nonché i processi prima dell'analisi [34], [35]. Come mostrato in figura 4, il metodo proposto soddisfa diversi requisiti dell'indice (evidenziati dal colore verde). In primo luogo, durante la preparazione del mezzo CPME si ottiene un'elevata resa di processo e si genera una bassa quantità di rifiuti. I consumi energetici e i rischi professionali durante la fase di preparazione sono bassi. Allo stesso tempo, il percorso sintetico è caratterizzato da un basso fattore E, favorendo così la *green economy*. Per quanto riguarda la fase di preparazione del campione, viene utilizzata la microestrazione che riduce il consumo di sostanze chimiche pericolose e i rifiuti generati, aumentando così il carattere *green* del metodo. Si può concludere che il protocollo proposto può essere considerato rispettoso dell'ambiente. Le direzioni future verso il miglioramento del carattere ecologico del metodo proposto potrebbero includere la sostituzione dei solventi organici con sostanze chimiche più ecologiche come solventi eutettici profondi (DES), DES naturali e biosolventi [36]. Un'altra direzione futura verso la riduzione dell'impatto ambientale del protocollo proposto include la sostituzione dell'HPLC con la cromatografia liquida ad altissime prestazioni (UHPLC), che può ridurre efficacemente il consumo di solventi organici [37].

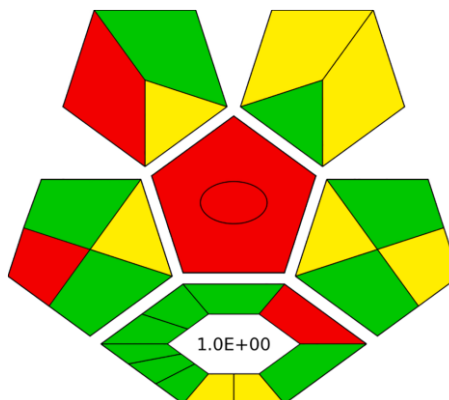


Figura 4. ComplexGAPI per la valutazione dell'eco-compatibilità del metodo

Analisi di campioni reali

Infine, lo schema proposto è stato impiegato nella determinazione dei pesticidi a base di benzoilurea in campioni di succo di mela commerciale. Sono stati analizzati anche campioni drogati a una concentrazione di $10,0 \text{ ng mL}^{-1}$ ($n=3$) per valutare l'accuratezza di ciascuna determinazione. Non sono stati riscontrati campioni positivi ai composti oggetto di questo studio, mentre i valori di recupero erano nell'intervallo 81-108 % mostrando una soddisfacente affidabilità del metodo. Un cromatogramma rappresentativo di un campione di succo di mela bianco e drogato ($c=10,0 \text{ ng mL}^{-1}$) sottoposto al protocollo CPME è presentato in figura 5.

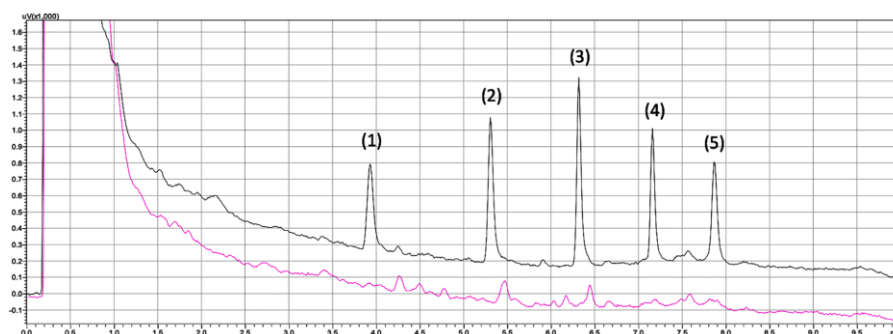


Figura 5. Cromatogramma rappresentativo della separazione dei composti oggetto di questo studio

4.3.2.4. Conclusioni

In questo lavoro è stato sviluppato un metodo CPME HPLC-DAD semplice e sensibile per la determinazione dei pesticidi a base di benzoilurea nei succhi di mela. I dispositivi monolitici sol-gel PCAP-PDMS-PCAP CPME sono stati impiegati come

fasi di assorbimento a causa della loro elevata efficienza di estrazione verso gli insetticidi a base di benzilurea nei campioni di succo. Il protocollo qui sviluppato ha mostrato buone caratteristiche prestazionali, nonché semplicità di gestione. Il nuovo schema analitico è stato utilizzato con successo per l'analisi di campioni di succo di mela disponibili in commercio. Tenendo conto della preparazione dei dispositivi CPME e dei parametri analitici, il metodo proposto presenta aspetti in accordo con la *Green Chemistry*.

Riferimenti bibliografici:

- [1] Z. Meng, Q. Li, J. Cong, Y. Huang, D. Wang, C. Pan, S. Fan, Y. Zhang. Rapid screening of 350 pesticide residues in vegetable and fruit juices by multi-plug filtration cleanup method combined with gas chromatography-electrostatic field orbitrap high resolution mass spectrometry. *Foods* 10 (2021) 1651.
- [2] G. Tyagi, D.K. Jangir, P. Singh, R. Mehrotra, R. Ganesan, E.S.R. Gopal. Rapid determination of main constituents of packed juices by reverse phase-high performance liquid chromatography: an insight in to commercial fruit drinks. *J. Food Sci. Technol.* 51 (2014) 476–484.
- [3] A. Dehelean, D.A. Magdas. Analysis of mineral and heavy metal content of some commercial fruit juices by inductively coupled plasma mass spectrometry, *Sci. World J.* 2013 (2013) 1–6.
- [4] F.Q. Tu, M. Yang. Determination of pesticides in apples by high-performance liquid chromatography-mass spectrometry (HPLC–MS) with high-resolution multiple reaction monitoring, *Anal. Lett.* 55 (2022) 438–448.
- [5] V.-M. Lenche, P.-I. Biljana, M. Aleksandar. Determination of some pesticide residues in apple juice by high-performance liquid chromatography. *J. Agric. Food Environ. Sci. JAFES.* 73 (2019) 30–37.
- [6] V.C. Fernandes, V.F. Domingues, N. Mateus, C. Delerue-Matos. Determination of pesticides in fruit and fruit juices by chromatographic methods. An overview, *J. Chromatogr. Sci.* 49 (2011) 715–730.
- [7] S. Topuz, G. Özhan, B. Alpertunga. Simultaneous determination of various pesticides in fruit juices by HPLC-DAD, *Food Control.* 16 (2005) 87–92.
- [8] K. Włodarska, K. Pawlak-Lemańska, T. Górecki, E. Sikorska. Factors influencing consumers' perceptions of food: a study of apple juice using sensory and visual attention methods, *Foods* 8 (2019) 545.
- [9] M. Brutti, C. Blasco, Y. Picó. Determination of benzoylurea insecticides in food by pressurized liquid extraction and LC-MS, *J. Sep. Sci.* 33 (2010) 1–10.
- [10] J. Zhou, R. Liu, G. Song, M. Zhang. Determination of carbamate and benzoylurea insecticides in peach juice drink by floated organic drop microextraction-high performance liquid chromatography, *Anal. Lett.* 42 (2009) 1805–1819.
- [11] X. Liu, M. Chen, Z. Meng, H. Qian, S. Zhang, R. Lu, H. Gao, W. Zhou. Extraction of benzoylurea pesticides from tea and fruit juices using deep eutectic solvents. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 1140 (2020) 121995.
- [12] S. Armenta, S. Garrigues, M. de la Guardia. Green analytical chemistry, *TrAC - Trends Anal. Chem.* 27 (2008) 497–511.
- [13] P. Jõul, M. Vaher, M. Kuhtinskaja. Carbon aerogel-based solid-phase microextraction coating for the analysis of organophosphorus pesticides, *Anal. Methods* 13 (2021) 69–76,
- [14] M.A. Farajzadeh, S.M. Sorouraddin, M.R.A. Mogaddam. Liquid phase microextraction of pesticides: a review on current methods, *Microchim. Acta* 181 (2014) 829–851.

- [15] L.B. Abdulra'uf, G.H. Tan. Review of SBSE technique for the analysis of pesticide residues in fruits and vegetables, *Chromatographia* 77 (1-2) (2014) 15–24.
- [16] S. Alam, N. Srivastava, N. Iqbal, M.K. Saini, J. Kumar. Magnetic Solid-Phase Extraction (MSPE) using magnetite-based core-shell nanoparticles with silica network (SiO₂) coupled with GC-MS/MS analysis for determination of multiclass pesticides in water. *J. AOAC Int.* 104 (3) (2021) 633–644.
- [17] H.İ. Ulusoy, K. Köseoğlu, A. Kabir, S. Ulusoy, M. Locatelli. Fabric phase sorptive extraction followed by HPLC-PDA detection for the monitoring of pirimicarb and fenitrothion pesticide residues. *Microchim. Acta* 187 (2020) 337.
- [18] N. Manousi, V. Alampanos, I. Priovolos, A. Kabir, K.G. Furton, E. Rosenberg, G. A. Zachariadis, V.F. Samanidou. Designing a moderately hydrophobic sol-gel monolithic Carbowax 20 M sorbent for the capsule phase microextraction of triazine herbicides from water samples prior to HPLC analysis. *Talanta* 234 (2021), 122710
- [19] S.S. Lakade, F. Borrull, K.G. Furton, A. Kabir, R.M. Marcé, N. Fontanals. Novel capsule phase microextraction in combination with liquid chromatography-tandem mass spectrometry for determining personal care products in environmental water. *Anal. Bioanal. Chem.* 410 (2018) 2991–3001.
- [20] J.C. Nadal, F. Borrull, K.G. Furton, A. Kabir, N. Fontanals, R.M. Marcé. Selective monitoring of acidic and basic compounds in environmental water by capsule phase microextraction using sol-gel mixed-mode sorbents followed by liquid chromatography-mass spectrometry in tandem. *J. Chromatogr. A.* 1625 (2020), 461295
- [21] N. Manousi, A. Kabir, K.G. Furton, V.F. Samanidou, C.K. Zacharis. Exploiting the capsule phase microextraction features in bioanalysis: extraction of ibuprofen from urine samples, *Microchem. J.* 172 (2022), 106934.
- [22] N. Manousi, A. Kabir, K.G. Furton, E. Rosenberg, G.A. Zachariadis. Capsule phase microextraction of selected polycyclic aromatic hydrocarbons from water samples prior to their determination by gas chromatography-mass spectrometry. *Microchem. J.* 166 (2021), 106210,
- [23] D.E. Georgiadis, A. Tsalbouris, A. Kabir, K.G. Furton, V. Samanidou. Novel capsule phase microextraction in combination with high performance liquid chromatography with diode array detection for rapid monitoring of sulfonamide drugs in milk. *J. Sep. Sci.* 42 (2019) 1440–1450.
- [24] D. Verma, K. Katti, D. Katti. Experimental investigation of interfaces in hydroxyapatite/polyacrylic acid/polycaprolactone composites using photoacoustic FTIR spectroscopy. *J. Biomed. Mater. Res. - Part A.* 77 (2006) 59–66.
- [25] L.M. Johnson, L. Gao, C.W. Shields, M. Smith, K. Efimenko, K. Cushing, J. Genzer, G.P. López. Elastomeric microparticles for acoustic mediated bioseparations, *J. Nanobiotechnol.* 11 (2013) 1–8.
- [26] E. Zilfidou, A. Kabir, K.G. Furton, V. Samanidou. An improved fabric phase sorptive extraction method for the determination of five selected antidepressant drug residues in human blood serum prior to high performance liquid chromatography with

- diode array detection. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 1125 (2019) 121720.
- [27] M. Niu, Z. Li, W. He, W. Zhou, R. Lu, J. Li, H. Gao, S. Zhang, C. Pan. Attapulgite modified magnetic metal-organic frameworks for magnetic solid phase extraction and determinations of benzoylurea insecticides in tea infusions, *Food Chem.* 317 (2020), 126425.
- [28] P.P. Vázquez, A.R. Mughari, M.M. Galera. Solid-phase microextraction for the determination of benzoylureas in orange juice using liquid chromatography combined with post-column photochemically induced fluorimetry derivatization and fluorescence detection, *J. Sep. Sci.* 31 (2008) 56–63.
- [29] D.R. Joshi, N. Adhikari. An Overview on Common Organic Solvents and Their Toxicity, *J. Pharm. Res. Int.* 28 (2019) 1–18.
- [30] X. Ruan, L. Xing, J. Peng, S. Li, Y. Song, Q. Sun. A simplified fabric phase sorptive extraction method for the determination of amphetamine drugs in water samples using liquid chromatography-mass spectrometry, *RSC Adv.* 10 (2020) 10854–10866.
- [31] E. Gionfriddo. Development of alternative green sample preparation techniques, *Separations* 7 (2020) 31
- [32] M. Mei, X. Huang, K. Liao, D. Yuan, Sensitive monitoring of benzoylurea insecticides in water and juice samples treated with multiple monolithic fiber solidphase microextraction and liquid chromatographic analysis, *Anal. Chim. Acta* 860 (2015) 29–36.
- [33] M. Yang, P. Zhang, L. Hu, R. Lu, W. Zhou, S. Zhang, H. Gao, Ionic liquid-assisted liquid-phase microextraction based on the solidification of floating organic droplets combined with high performance liquid chromatography for the determination of benzoylurea insecticide in fruit juice, *J. Chromatogr. A.* 1360 (2014) 47–56.
- [34] J. Płotka-Wasyłka, W. Wojnowski, Complementary green analytical procedure index (ComplexGAPI) and software, *Green Chem.* 23 (2021) 8657–8665.
- [35] J. Płotka-Wasyłka, A new tool for the evaluation of the analytical procedure: green analytical procedure index, *Talanta* 181 (2018) 204–209.
- [36] M. Vian, C. Breil, L. Vernes, E. Chaabani, F. Chemat, Green solvents for sample preparation in analytical chemistry, *Curr. Opin. Green Sustain. Chem.* 5 (2017) 44–48.
- [37] J. Cielecka-Piontek, P. Zalewski, A. Jelińska, P. Garbacki, UHPLC: The greening face of liquid chromatography, *Chromatographia* 76 (2013) 1429–1437.

4.4 Determinazione di acidi grassi in campioni di sangue umano e integratori alimentari tramite preparazione automatizzata del campione e GC-MS veloce

La presente ricerca è focalizzata sull'ottimizzazione di una preparazione automatizzata del campione e di un metodo rapido di gascromatografia accoppiato a spettrometria di massa (GC-MS) per l'analisi degli esteri metilici degli acidi grassi (FAME) in campioni di sangue e integratori alimentari, con l'obiettivo primario di riduzione del tempo di analisi. Lo spettrometro di massa è stato utilizzato con il metodo di acquisizione misto di scansione/monitoraggio di ioni selezionati (SIM), consentendo così l'ottenimento al tempo stesso di dati qualitativi e quantitativi (altamente sensibili). La separazione dei FAME è stata ottenuta in circa 11 minuti utilizzando una colonna a *microbore* di dimensioni $15\text{ m} \times 0,10\text{ mm ID} \times 0,10\text{ }\mu\text{m } d_f$ con una fase stazionaria di polietilenglicole. La novità della ricerca consiste nel ridurre i tempi di analisi utilizzando il metodo GC-MS veloce qui presentato con maggiore affidabilità e sensibilità di identificazione in un'unica corsa cromatografica. Per quanto riguarda le figure di merito, sono stati determinate linearità, accuratezza e limiti di rilevabilità (LoD) e quantificazione (LoQ). Nello specifico, i coefficienti di regressione erano compresi tra 0,9901 e 0,9996; i LoD variavano da 0,05 a 1,02 $\mu\text{g g}^{-1}$ per il metodo di analisi del sangue e da 0,05 a 0,26 mg g^{-1} nel caso delle analisi relative agli integratori alimentari. Per quanto riguarda i LoQ, i valori erano compresi negli intervalli di 0,15–3,39 $\mu\text{g g}^{-1}$ e 0,15–0,86 mg g^{-1} rispettivamente per i metodi di analisi del sangue e degli integratori alimentari. L'accuratezza è stata valutata analizzando materiali di riferimento certificati.

Questa sezione è stata tradotta e adattata dalla seguente pubblicazione: A. Ferracane, I. Aloisi, M. Galletta, M. Zoccali, P. Q. Tranchida, G. Micalizzi, L. Mondello. Automated sample preparation and fast GC-MS determination of fatty acids in blood samples and dietary supplements. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* doi: 0.1007/s00216-022-04379-8

4.4.1 Introduzione

Numerosi studi hanno dimostrato l'importanza di un corretto equilibrio degli acidi grassi nell'organismo umano [1,2,3,4,5]. Il monitoraggio degli acidi grassi, attraverso analisi lipidiche avanzate, consente di instaurare possibili fenomeni di disregolazione e, di conseguenza, di intervenire con trattamenti individuali personalizzati al fine di ripristinare un corretto equilibrio degli acidi grassi. A questo proposito, gli acidi grassi polinsaturi $\omega 3$ a catena lunga (PUFA) come l'acido eicosapentaenoico (EPA, C20:5 $\omega 3$) e l'acido docosaesaenoico (DHA, C22:6 $\omega 3$) hanno dimostrato di esibire effetti antinfiammatori benefici in molteplici malattie infiammatorie [6,7]. Inoltre, contribuiscono a mantenere bassi i livelli di trigliceridi nel sangue e di esteri del colesterolo [4,8,9]. L'attività biologica degli acidi grassi è dettata dalla posizione del doppio legame lungo la catena carboniosa; l'importanza della famiglia $\omega 3$ è da attribuire non solo ad EPA e DHA, ma anche ad altri PUFA come l'acido α -linolenico (ALA, C18:3 $\omega 3$) particolarmente abbondante negli oli vegetali, l'acido stearidonico (SA, C18:4 $\omega 3$), e acido docosapentaenoico (DPA, C22:5 $\omega 3$).

In relazione agli enfatizzati benefici degli $\omega 3$ per la salute, c'è stato un grande aumento nel mercato al dettaglio di cibi fortificati, così come una varietà di integratori alimentari contenenti principalmente EPA e DHA [9]. L'assunzione giornaliera totale raccomandata di EPA e DHA dipende dall'età: 1,5 g nella fascia 1–8 anni, 2,0 g nella fascia 9–13 anni, 2,5 g nella fascia 14–18 anni e fino a 3,0 g per gli adulti [10]. Generalmente, un aumento dell'apporto alimentare di $\omega 3$ corrisponde ad un aumento proporzionale dei livelli di $\omega 3$ nei globuli rossi umani e questo comportamento determina tipicamente una riduzione di acidi grassi $\omega 6$, in particolare acido linoleico (LA, C18:2 $\omega 6$) e acido arachidonico (AA, C20 :4 $\omega 6$). Come riportato in letteratura [11,12], l'incorporazione di $\omega 3$ nelle cellule immunitarie umane raggiunge il suo picco entro 4 settimane dall'inizio dell'assunzione con la dieta e, pertanto, il contenuto lipidico delle cellule è fortemente influenzato dalla dieta. Probabilmente, l'assunzione con la dieta induce dopo 4 settimane importanti cambiamenti nell'attività di membrana; pertanto, l'effetto dell'approccio nutraceutico diventa evidente come evidenziato dalle ricerche cliniche [12]. Tuttavia, nonostante il grande consumo e gli effetti benefici consolidati degli integratori alimentari e degli alimenti fortificati,

diversi studi di ricerca hanno rivelato che la loro etichettatura potrebbe non riflettere il reale contenuto di acidi grassi $\omega 3$ [13].

Il contenuto lipidico può essere valutato utilizzando diverse tecniche di separazione come la cromatografia liquida ad alte prestazioni (HPLC) e la gascromatografia (GC) accoppiata alla spettrometria di massa (MS). La composizione lipidica totale, in termini di acidi grassi, è comunemente studiata utilizzando tecniche GC. Per rendere gli acidi grassi contenuti nei lipidi (ad es. trigliceridi) separabili attraverso GC, è necessaria una procedura di derivatizzazione, dopo l'estrazione dei lipidi [14]. Di solito vengono impiegati protocolli di metilazione, che portano alla formazione di esteri metilici degli acidi grassi (FAME). In letteratura sono stati descritti una serie di agenti derivatizzanti per l'analisi dei FAME nel sangue intero [15,16,17,18]. In uno studio precedente, è stato dimostrato che una procedura di derivatizzazione diretta a doppio stadio era adatta per la profilazione degli acidi grassi di fluidi biologici come sangue intero, siero e plasma, campionati su una scheda di carta tramite la raccolta di poche gocce di sangue (DBS) [14]. La separazione FAME GC era stata eseguita su una colonna convenzionale da 30 m, utilizzando un MS per l'identificazione, mentre la quantificazione è stata effettuata su un altro strumento GC, dotato di un rivelatore a ionizzazione di fiamma (FID). Nonostante il fatto che le metodologie sviluppate si siano rivelate idonee per l'indagine in campioni biologici, l'intero flusso di lavoro analitico è risultato troppo lento in relazione al numero potenzialmente elevato di campioni studiati nei laboratori clinici. In diretta relazione con tale ricerca, l'obiettivo del presente lavoro era la riduzione significativa del tempo di analisi e, quindi, un aumento della produttività mediante l'ottimizzazione di un metodo GC-MS veloce con acquisizione contemporaneamente in modalità scansione/monitoraggio di ioni selezionati (SIM). Tale approccio ha consentito l'identificazione dei composti di interesse utilizzando gli spettri di massa (acquisizione scan) e la quantificazione monitorando solo specifici frammenti ioni (acquisizione SIM). La rapida separazione dei FAME (circa 11 min) è stata eseguita su una colonna *microbore* di 15 m con fase stazionaria di polietilene glicole, ottenendo un guadagno di velocità di un fattore pari a 6 rispetto al metodo precedente. La novità della ricerca consiste nel ridurre i tempi di analisi utilizzando il nuovo metodo con maggiore affidabilità e sensibilità di identificazione in un'unica corsa cromatografica. Lo stesso

flusso di lavoro analitico è stato utilizzato anche per verificare il contenuto di acidi grassi negli integratori alimentari. Sono state valutate varie figure di merito come linearità, limiti di rilevamento (LoD) e quantificazione (LoQ) e accuratezza.

4.4.2 Parte sperimentale

Standard e prodotti chimici

L'accuratezza delle metodologie sviluppate è stata determinata utilizzando materiali di riferimento certificati NIST (CRM). In dettaglio, NIST-1950 "*Metabolites in human plasma*" e NIST-3275 "*Omega-3 and Omega-6 fatty acids in fish oil*" (Parte 3275-1, Parte 3275-2 e Parte 3275-3) sono stati acquistati da Merck Life Science (Darmstadt, Germania). Tutti i solventi, i reagenti e i materiali standard sono stati acquistati da Merck Life Science. Standard "Supelco 37 Component FAME Mix", metil miristato (Me.C14:0, $\geq 99\%$), metil palmitato (Me.C16:0, $\geq 99,0\%$), metil stearato (Me.C18:0, $99,0\%$), oleato di metile (Me.C18:1 ω 9, $99,0\%$), metil arachidonato (Me.C20:4 ω 6, $\geq 99,0\%$), metil all-cis-5,8,11,14,17-eicosapentaenoato (Me.C20:5 ω 3, $\geq 98,5\%$) e all-cis-4,7,10,13,16,19-metil 4,7,10,13,16,19-docosaesaenoato (Me.C22:6 ω 3, $\geq 98,5\%$) sono stati utilizzati per la costruzione delle curve di calibrazione. Come standard interno (IS) è stato utilizzato acido stearico marcato isotopicamente (C18:0_{d35} $\geq 98,0\%$). Per la procedura di derivatizzazione, sono state utilizzate soluzioni metanoliche di trifluoruro di boro (BF₃) (14%) e di metossido di sodio (CH₃ONa, 0,5% p/v). Per estrarre i FAME, è stato utilizzato n-eptano (per HPLC $\geq 99\%$). Un supporto denominato "903 Whatman Protein saver card" (Merck Life Science) è stato utilizzato per il campionamento delle gocce di sangue. Nel nostro studio, abbiamo utilizzato campioni di sangue essiccato da nove donatori informati, raccogliendo alcune gocce di sangue prelevato con una lancetta pungì dito dal donatore. Sono stati prelevati campioni di sangue da nove individui (uomini e donne) in una fascia di età adulta (da 30 a 60 anni). Per quanto riguarda gli integratori alimentari, sono stati acquistati 11 campioni presso una farmacia locale (Messina, Italia). Dieci dei prodotti analizzati dichiarano in etichetta come origine del prodotto olio di pesce (es. acciughe, sgombri, sardine, tonno). Un campione è stato contrassegnato come integratore di olio vegetale. Gli integratori alimentari sono stati acquistati in formulazioni softgel (n=3), capsule (n=6) e liquide (n=2).

Preparazione del campione per l'analisi del sangue

Per preparare le soluzioni standard è stata utilizzata una bilancia analitica certificata (AX204 Mettler Toledo, Milano, Italia; $d = 0,1$ mg). Nello specifico, 10 mg di IS (C18:0_{d35}) sono stati pesati e trasferiti in un matraccio tarato da 10 mL e portato a volume usando n-eptano. Venticinque microlitri di soluzione IS (1000 mg L⁻¹) sono stati prelevati e depositati su un supporto DBS contenente 50 mg di sangue. La derivatizzazione a doppio stadio è stata effettuata aggiungendo 500 µL di CH₃ONa in metanolo (0,5% p/v); la miscela di reazione è stata riscaldata per 15 minuti a 95 °C. Dopo, 500 µL di soluzione metanolica BF₃ sono stati aggiunti alla miscela di reazione che è stata nuovamente riscaldata per 15 minuti a 95 °C. Infine, alla miscela di reazione sono stati aggiunti 350 µL di n-eptano e 300 µL di soluzione acquosa satura di NaCl; il campione è stato agitato su a 2000 rpm per 100 s. Dopo la separazione gravitazionale (tempo di attesa 2 min), lo strato eptanico (superiore) contenente i FAME è stato iniettato nella strumentazione GC-MS [14].

Calibrazione, quantificazione e accuratezza (sul sangue)

La quantificazione dei FAME è stata eseguita utilizzando il metodo dello standard interno (IS). Per la costruzione delle curve di calibrazione è stato utilizzato il “Supelco 37 Component FAME Mix”. Per i componenti non presenti nella miscela standard “Supelco-37” è stata utilizzata la curva di calibrazione del composto chimicamente più simile. Le curve di calibrazione sono state costruite considerando la quantità assoluta (µg) di ogni FAME riportata nel certificato di analisi del CRM Supelco-37 divisa per la quantità di sangue (0,05 g). Dodici miscele a diversi livelli di concentrazione sono state preparate mediante diluizioni seriali (sono state eseguite a ciascun livello cinque repliche di analisi). I livelli di concentrazione variavano da un valore massimo di 1800 µg g⁻¹ per C16:0 a un valore minimo di 0,2 µg g⁻¹ per C15:0. Tutte le miscele di calibrazione sono state drogate con un volume fisso (25 µL) di soluzione IS deuterata (1000 mg L⁻¹). Ciascuna miscela è stata derivatizzata seguendo la procedura sopra descritta. I valori di LoD e il LoQ sono stati determinati al livello di concentrazione più basso, eseguendo 10 analisi replicate e attraverso le seguenti equazioni:

$$\text{LoD}=3\times s'o \quad \text{LoQ}=10\times s'o$$

dove s'ò rappresenta il rapporto tra la deviazione standard delle misurazioni replicate e la radice quadrata del numero di misurazioni. L'accuratezza del metodo sviluppato è stata valutata analizzando i "*Metabolites in human plasma*" NIST-1950 e confrontando i risultati sperimentali con valori certificati (confidenza del 95% circa) e di riferimento (valore non certificato ma che rappresenta la migliore stima del valore reale) [19].

Preparazione del campione per l'analisi degli integratori alimentari

Per la quantificazione degli acidi grassi negli integratori alimentari, 100 mg di IS sono stati pesati direttamente in un matraccio tarato da 10 mL e solubilizzati in n-eptano. La derivatizzazione dei lipidi è stata effettuata come segue: 10 mg di integratore alimentare sono stati drogati con 50 µL di soluzione IS (C18:0_{d35}, 10.000 mg L⁻¹); come agenti derivatizzanti sono stati utilizzati 500 µl di soluzione metanolica CH₃ONa (0,5% p/v) e 500 µl di BF₃ in metanolo (14%). Entrambi gli stadi di derivatizzazione sono stati effettuati riscaldando la miscela a 95 °C per 15 minuti come sopra descritto. Per estrarre i derivati FAME, alla miscela sono stati aggiunti 500 µL di n-eptano. Infine, per facilitare la separazione di fase sono stati aggiunti 100 µL di soluzione acquosa di NaCl alla miscela; la miscela è stata agitata su vortex a 2000 rpm per 100 s e lasciata separare per 2 min. Lo strato di n-eptano contenente FAME è stato sottoposto ad analisi.

Calibrazione, quantificazione e accuratezza (degli integratori alimentari)

La linearità del metodo è stata valutata mediante la costruzione di curve di calibrazione. Per gli acidi grassi più abbondanti, le soluzioni standard di FAME sono state preparate come segue: 100 mg di Me.C14:0, Me.C16:0, Me.C18:0, Me.C18:1ω9, Me.C20:4ω6, Me.C20:5ω3 e Me.C22:6ω3 è stato pesato utilizzando una bilancia analitica e diluito in un matraccio tarato, utilizzando 10 mL di n-eptano. Per gli acidi grassi a un livello di concentrazione inferiore è stata utilizzata la miscela di standard Supelco 37. Tutte le miscele di lavoro sono state drogate con un volume fisso (50 µL) di soluzione IS deuterata. I parametri LoD e LoQ sono stati determinati come descritto in precedenza per l'analisi del sangue. L'accuratezza del metodo analitico (espressa in termini di recupero) è stata valutata analizzando il campione NIST-3275 "Omega-3 and Omega-6 fatty acids in fish oil" [20].

Automatizzazione della derivatizzazione dei campioni

Tutte le procedure fin qui descritte sono state eseguite attraverso l'utilizzo di una *workstation* AOC-6000 (Shimadzu, Duisburg, Germania). A questo proposito, la preparazione delle miscele di calibrazione a diversi livelli di concentrazione, la procedura di derivatizzazione a doppio stadio e l'iniezione dello strato eptanico contenente i FAME sono state completamente automatizzate. La piattaforma robotica utilizzata in questo lavoro di ricerca era dotata di un braccio meccanico in grado di cambiare utensile automaticamente e di due stazioni contenenti un totale di 6 siringhe per: l'aggiunta della soluzione IS (siringa da 100 μL), agenti derivatizzanti (siringa da 500 μL), solvente di estrazione (siringa da 500 μL) e iniezione del campione (siringa da 10 μL). Inoltre, la stazione preparativa robotica era dotata di un miscelatore vortex e di un forno. Le impostazioni dei parametri AOC-6000 sono state gestite dal software GCMS Solution (versione 4.50, Shimadzu). Tutti i campioni, comprese le miscele di lavoro, sono stati preparati autonomamente in triplicato.

Analisi GC-MS veloce SCAN/SIM

Le analisi GC-MS sono state eseguite su un sistema costituito da un gascromatografo GC-2030 NEXIS (Shimadzu) accoppiato a uno spettrometro di massa a triplo quadrupolo (TQ8050 NX, Shimadzu). Lo strumento era dotato di un iniettore *split/splitless* (280°C) e di una stazione di preparazione multifunzionale AOC-6000. La separazione degli analiti è stata eseguita su una colonna capillare Supelcowax-10 (100% polietilene glicole) 15 m \times 0,10 mm ID \times 0,10 μm d_f (Merck Life Science). LA programmata di temperatura era la seguente: da 70 a 280 °C (mantenuta costante per 0,5 min) a 20 °C min^{-1} . L'elio è stato utilizzato come gas carrier e le analisi sono state condotte a velocità lineare costante di 50 cm s^{-1} (pressione iniziale: 591,5 kPa). I volumi di iniezione e i rapporti di *split* erano i seguenti: 0,5 μL *split* 1:10 per campioni di sangue e 0,2 μL *split* 1:800 per integratori alimentari.

Il sistema MS a triplo quadrupolo è stato utilizzato simultaneamente in modalità scansione/SIM. L'acquisizione in modalità *scan* è stata eseguita monitorando tutti gli ioni frammento entro l'intervallo di massa di 45–550 m/z (frequenza di acquisizione: 10 Hz). Invece, l'acquisizione SIM è stata effettuata selezionando tre ioni frammenti per ciascun analita. Lo ione più intenso è stato utilizzato per la

quantificazione, mentre gli altri due ioni sono stati utilizzati per confermare l'identità del composto. Le temperature dell'interfaccia e della sorgente MS erano rispettivamente di 250 °C e 220 °C. Per l'identificazione dei composti attraverso il riconoscimento tramite somiglianza spettrale è stata utilizzata una libreria di spettri di massa dedicata, ovvero LIPIDS GC-MS *Library* (versione 1.0, Shimadzu). Nel caso di spettri di massa indistinguibili come composti isomerici (isomeri configurazionali o posizionali), l'assegnazione corretta dei picchi è stata ottenuta mediante l'iniezione di standard analitici puri.

4.4.3 Risultati e discussioni

Analisi GC-MS veloce per la delucidazione degli acidi grassi nel sangue

Come accennato in precedenza, all'analisi dei campioni DBS è stata applicata una procedura automatizzata di preparazione del campione. Il tempo necessario per la preparazione di un singolo campione è stato di circa 35 min. In ricerche precedenti [14], il tempo di analisi, utilizzando una colonna convenzionale (30 m × 0,25 mm ID × 0,20 μm d_f) è di circa 60 min; tuttavia, la preparazione del campione può avvenire contemporaneamente alla corsa GC, "eliminando" così il tempo di preparazione del campione in caso di analisi multiple.

Con l'obiettivo di ridurre il tempo di analisi, è stato sviluppato un metodo GC-MS veloce basato sull'uso di una colonna *microbore* (15 m × 0,10 mm ID × 0,10 μm d_f), un programma di temperatura veloce e un'alta velocità lineare del gas *carrier*. La relazione tra velocità lineare del gas ed efficienza della colonna è stata definita attraverso la costruzione di una curva di Golay, riportata in figura 1, analizzando l'acido miristoleico (C14:1ω5) ad una temperatura di 160 °C, e a velocità lineari del gas comprese tra 20 e 60 cm s⁻¹ (a intervalli di 5 cm s⁻¹). L'altezza minima equivalente a un piatto teorico (HETP_{min} = 0,108 mm) è stata ottenuta a una velocità del gas *carrier* di 35 cm s⁻¹, fornendo un'efficienza della colonna di ca. 140.500 piatti teorici (N). Nel presente studio è stata utilizzata una velocità lineare di 50 cm s⁻¹, fornendo circa il 70% dell'efficienza massima della colonna (circa 98.000 N) e garantendo la separazione sufficiente dei composti. È stato applicato un gradiente di temperatura di 20 °C min⁻¹, equivalente a 10 °C/tempo morto [21].

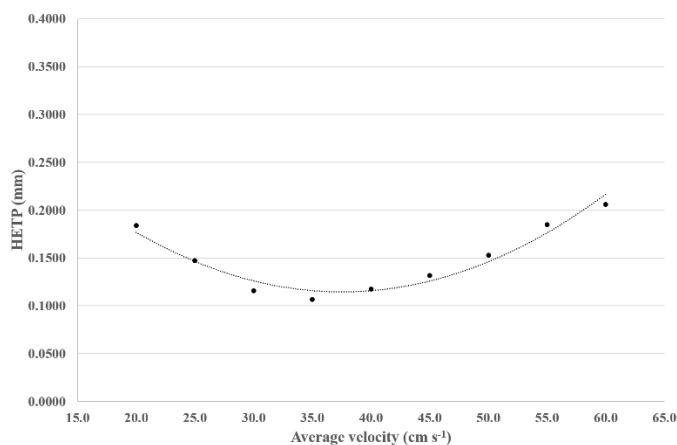


Figura 1. Curva di Golay costruita analizzando C14:1ω5.

Il cromatogramma in modalità di acquisizione SIM del campione di plasma umano certificato è mostrato in figura 2: la separazione cromatografica, ottenuta in circa 11 min, può essere considerata soddisfacente. La larghezza media della base del picco era di circa 2 s; le frequenze di acquisizione (10 Hz per la modalità scansione e 20 Hz per la modalità SIM) del metodo sviluppato sono state più che sufficienti per l'identificazione e la quantificazione, considerando che sono necessari almeno 10 punti dati per picco per un'adeguata ricostruzione [22].

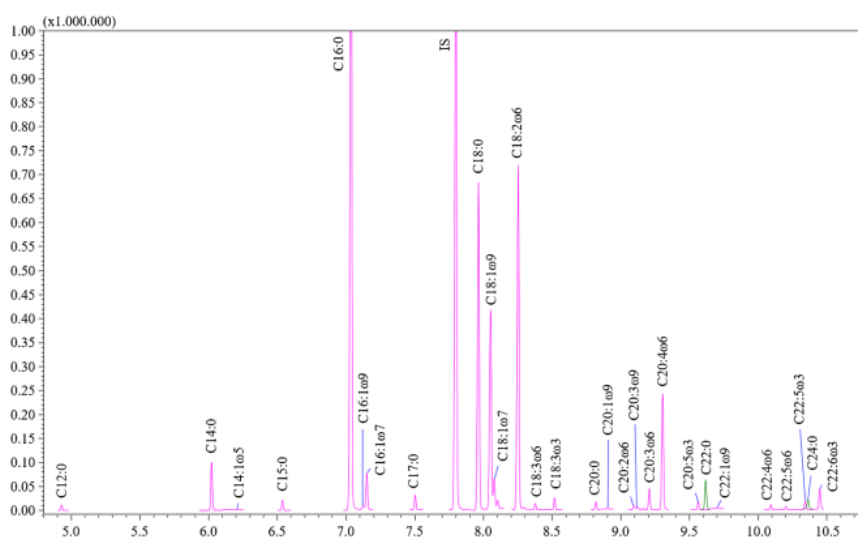


Figura 2. Cromatogramma SIM GC–MS veloce relativo a un campione di plasma umano certificato.

Il metodo di scan/SIM ha ovviamente consentito di ottenere sia informazioni spettrali complete che risposte ioniche specifiche altamente sensibili legate agli analiti oggetto

di questo studio. Nel caso di FAME presenti in tracce, quindi caratterizzati da bassi rapporti segnale-rumore e spettri di massa di scarsa qualità (in ogni caso sono state considerate solo similarità spettrali di massa $\geq 85\%$), i dati della SIM possono essere utili anche allo scopo di assegnazione del picco. Tale fattore è particolarmente utile quando vengono utilizzate colonne *microbore* a causa della ridotta capacità della colonna stessa (*sample capacity*) [23].

Per quanto riguarda le figure di merito del metodo, per ciascun FAME contenuto nel campione di plasma umano sono stati studiati il range di calibrazione e i coefficienti di determinazione (R^2). Tutte le curve di calibrazione sono state caratterizzate da una linearità soddisfacente con valori di R^2 compresi tra 0,9901 per C18:2 ω 6 e 0,9993 per C14:1 ω 5. I LoD e LoQ (Tabella 1) hanno mostrato valori più bassi per gli acidi grassi saturi (SFA), come C16:0 (LoD: 0,05 $\mu\text{g g}^{-1}$, LoQ: 0,15 $\mu\text{g g}^{-1}$). LoD e LoQ più elevati sono stati osservati per gli acidi grassi monosaturi (MUFA) e PUFA. In generale, i LoD variavano da 0,05 a 1,02 $\mu\text{g g}^{-1}$, mentre i LoQ variavano da 0,15 a 3,39 $\mu\text{g g}^{-1}$. Tutti i valori delle figure di merito sono riportati in tabella 1.

Tabella 1. Elenco dei FAME rilevati nel campione di plasma umano certificato NIST-1950, ioni quantificatore (Q) e qualificatore (q1 e q2) e coefficiente di determinazione (R^2). Intervallo di calibrazione, valori LoD e LoQ sono espressi in $\mu\text{g g}^{-1}$.

FAME	Q	q1	q2	R^2	Linearity range	LoD	LoQ
Lauric acid (C12:0)	74	87	55	0.9983	40 - 0.4	0.12	0.41
Myristic acid (C14:0)	74	87	55	0.9952	80 - 0.8	0.08	0.28
Myristoleic acid (C14:1 ω 5)	55	74	69	0.9993	40 - 2	0.42	1.40
Pentadecanoic acid (C15:0)	74	87	55	0.9975	20 - 0.2	0.08	0.26
Palmitic acid (C16:0)	74	87	55	0.9929	1800 - 300	0.05	0.15
Palmitoleic acid (C16:1 ω 9)	55	69	74	0.9951	40 - 2	0.65	2.17
Palmitoleic acid (C16:1 ω 7)	55	69	74	0.9965	200 - 10	0.65	2.17
Heptadecanoic acid (C17:0)	74	87	55	0.9983	20 - 0.4	0.13	0.44
Stearic acid (C18:0)	74	87	55	0.9970	600 - 40	0.05	0.16
Oleic acid (C18:1 ω 9)	55	69	83	0.9979	900 - 60	0.12	0.40
<i>cis</i> -Vaccenic acid (C18:1 ω 7)	55	69	83	0.9922	120 - 1	0.12	0.40
Linoleic acid (C18:2 ω 6)	67	81	95	0.9901	1200 - 200	0.80	2.66
γ -Linolenic acid (C18:3 ω 6)	79	67	80	0.9972	40 - 2	0.86	2.87
α -Linolenic acid (C18:3 ω 3)	79	67	93	0.9953	40 - 2	0.63	2.11
Arachidic acid (C20:0)	74	87	55	0.9974	40 - 0.4	0.10	0.35
Gondoic acid (C20:1 ω 9)	55	69	97	0.9947	40 - 2	0.63	2.10
homo- γ -Linolenic acid (C20:2 ω 6)	67	81	95	0.9958	40 - 2	0.70	2.35

FAME	Q	q1	q2	R ²	Linearity range	LoD	LoQ
Mead acid (C20:3 ω 9)	79	67	80	0.9973	40 - 2	0.62	2.07
dihomo- γ -Linolenic acid (C20:3 ω 6)	79	67	80	0.9960	300 - 20	0.62	2.07
Arachidonic acid (C20:4 ω 6)	79	91	80	0.9985	400 - 40	0.72	2.38
Eicosapentaenoic acid (C20:5 ω 3)	79	91	67	0.9931	40 - 2	1.02	3.39
Behenic acid (C22:0)	74	87	55	0.9979	80 - 2	0.44	1.46
Erucic acid (C22:1 ω 9)	55	69	83	0.9972	40 - 2	0.56	1.87
Adrenic acid (C22:4 ω 6)	79	91	67	0.9970	100 - 2	0.59	1.97
Docosapentaenoic acid (C22:5 ω 6)	79	91	67	0.9970	100 - 2	0.59	1.97
Docosapentaenoic acid (C22:5 ω 3)	79	91	67	0.9970	100 - 2	0.59	1.97
Lignoceric acid (C24:0)	74	87	55	0.9979	40 - 0.8	0.44	1.45
Docosahexaenoic acid (C22:6 ω 3)	79	91	67	0.9970	100 - 2	0.59	1.97

I risultati di accuratezza espressi in termini di percentuale di recupero (%) sono invece riassunti nella Tabella 2. Fatta eccezione per C17:0 e C18:3 ω 6, tutti i FAME variavano da un valore minimo di recupero del 76,6% (C20:0) a un valore massimo del 119,7% (C22:5 ω 3). Inoltre, i valori di recupero di C17:0 (128,9%) e C18:3 ω 6 (141,0%) erano troppo alti per essere considerati accettabili. Rispetto a C18:3 ω 6, Benner *et al.* riportano livelli di concentrazione simili a quelli ottenuti nella presente ricerca [24, 25]. Tuttavia, il valore di concentrazione per C17:0 non è stato riportato; quindi, non è stato possibile un confronto con altri studi analitici. Infine, un campione in bianco (DBS senza la presenza di sangue) è stato sottoposto a derivatizzazione e analisi. Come riportato in un precedente manoscritto [14], l'analisi ha rivelato la presenza di bassi livelli di C14:0, C16:0, C16:1 ω 9, C18:0, C18:1 ω 9 e C18:2 ω 6 che non hanno influito sui valori di recupero come mostrato nella tabella 2.

Tabella 2. Valutazione dell'accuratezza espressa in termini di recupero percentuale (%). I valori certificati, di riferimento e non dichiarati sono espressi in $\mu\text{g g}^{-1}$.

FAME	Experimental	NIST SRM-1950	Recovery %
Certified Values			
C12:0	1.67 \pm 0.2	1.86 \pm 0.11	89.5
C16:0	589.59 \pm 29.0	594 \pm 19	99.3
C16:1 ω 7	60.93 \pm 4.8	53.5 \pm 6.4	113.9
C18:0	197.38 \pm 13.5	179 \pm 12	110.3
C18:1 ω 9	495.17 \pm 22.8	447 \pm 43	110.8
C18:2 ω 6	774.25 \pm 28.2	780 \pm 39	99.3
C18:3 ω 3	17.23 \pm 1.2	14.9 \pm 1	115.6
C22:0	16.95 \pm 1.5	15.9 \pm 1.5	106.6

FAME	Experimental	NIST SRM-1950	Recovery %
Reference Values			
C14:0	18.33 ± 1.5	17.9 ± 3.8	102.4
C14:1 ω 5	1.27 ± 0.3	1.57 ± 0.03	81.0
C15:0	1.02 ± 0.5	1.08 ± 0.01	94.4
C17:0	6.06 ± 0.5	4.7 ± 0.2	128.9
C18:1 ω 7	36.96 ± 1.4	37.70 ± 0.90	98.0
C18:3 ω 6	15.36 ± 0.8	10.9 ± 2.3	141.0
C20:0	4.22 ± 0.6	5.5 ± 0.2	76.6
C20:1 ω 9	3.92 ± 0.2	3.5 ± 0.1	111.9
C20:2 ω 6	5.90 ± 0.9	5.7 ± 0.2	103.5
C20:3 ω 6	47.88 ± 3.3	41.80 ± 1.1	114.5
C20:4 ω 6	312.29 ± 17.7	293 ± 54	106.6
C20:5 ω 3	12.17 ± 1.2	11.4 ± 0.1	106.8
C22:1 ω 9	1.28 ± 0.1	1.10 ± 0.40	116.1
C22:4 ω 6	6.79 ± 1.7	8.3 ± 0.2	81.9
C22:5 ω 6	5.79 ± 1.1	6.3 ± 0.1	91.9
C22:5 ω 3	14.96 ± 0.4	12.5 ± 0.2	119.7
C24:0	13.36 ± 0.5	16.8 ± 0.9	79.5
C22:6 ω 3	41.78 ± 3.5	37.9 ± 6.8	110.2
Undeclared Values			
C16:1 ω 9	7.42 ± 0.1	-	-
C20:3 ω 9	9.36 ± 1.3	-	-

Impatto degli integratori alimentari sulla composizione degli acidi grassi nel sangue

Al consumo di acidi grassi ω 3 sono attribuiti una serie di benefici per la salute, in particolare in relazione al cuore e alla circolazione sanguigna [10]. Di conseguenza, uno degli obiettivi della presente ricerca era quello di utilizzare il metodo sviluppato per studiare gli effetti degli integratori alimentari di ω 3 sulla composizione ematica di acidi grassi dei pazienti, dopo brevi e lunghi periodi di consumo. In tale contesto, sono stati analizzati campioni di sangue collezionati su DBS di pazienti volontari, che hanno dichiarato di consumare integratori alimentari di ω 3. In dettaglio, tre diversi gruppi di pazienti sono stati oggetto di ricerca: nessuna assunzione, 1 mese e 4 mesi di assunzione di integratori alimentari di ω 3. Il profilo dei 9 campioni analizzati, espresso in termini di percentuale relativa (%), famiglie degli acidi grassi (SFA, MUFA, PUFA, ω 6 e ω 3) e rapporti tra acidi grassi specifici, è illustrato nella Tabella 3. Tali valori percentuali sono stati estrapolati considerando i valori quantitativi assoluti espressi in $\mu\text{g g}^{-1}$ ottenuti con il metodo IS. Come previsto, sono state osservate differenze rilevanti tra i tre gruppi di pazienti. Infatti, i livelli di ω 3 erano molto più alti dopo 1 e

4 mesi di integrazione, variando dal 5,71 al 9,28% con un valore medio di $6,51 \pm 1,37\%$. Nel caso del gruppo di pazienti senza assunzione, il contenuto di $\omega 3$ era significativamente inferiore (2,77–3,67%), registrando un valore medio di $3,12 \pm 0,48\%$.

Tabella 3. Livelli di FAME in pazienti caratterizzati da: nessuna assunzione, 1 mese e 4 mesi di assunzione di integratori alimentari di $\omega 3$ FA. Le quantità sono espresse in percentuale (%). I composti sono anche raggruppati nelle famiglie SFA, MUFA, PUFA, $\omega 3$ e $\omega 6$ e in rapporti specifici.

FAME	No intake			1 month intake			4 months intake		
	DBS 1	DBS 2	DBS 3	DBS 4	DBS 5	DBS 6	DBS 7	DBS 8	DBS 9
C12:0	0.09	0.11	0.09	0.07	0.10	0.10	0.08	0.10	0.08
C14:0	0.46	0.86	0.29	0.23	0.30	0.37	0.23	0.31	0.29
C14:1 ω 5	0.09	0.14	0.10	0.12	0.12	0.13	0.10	0.12	0.09
C15:0	0.15	0.21	0.17	0.07	0.11	0.15	0.17	0.11	0.14
C16:0	24.63	24.27	26.61	24.05	23.70	25.61	26.01	25.21	22.69
C16:1 ω 9	0.76	0.82	0.83	0.37	0.57	0.51	0.64	0.46	0.51
C16:1 ω 7	0.84	2.03	0.95	1.20	0.81	0.54	0.66	1.03	0.86
C17:0	0.29	0.34	0.34	0.21	0.32	0.37	0.40	0.36	0.30
C18:0	13.40	10.92	10.53	12.15	15.08	13.49	12.33	13.22	10.79
C18:1 ω 9	21.95	27.77	26.90	24.05	24.45	21.15	27.12	23.78	22.86
C18:1 ω 7	0.97	1.21	2.76	2.63	2.28	2.04	2.08	1.82	2.21
C18:2 ω 6	21.85	18.37	19.72	19.01	16.35	19.21	17.40	19.40	20.17
C18:3 ω 6	0.19	0.39	0.22	0.20	0.08	0.15	0.16	0.20	0.21
C18:3 ω 3	0.19	0.27	0.16	0.17	0.21	0.21	0.14	0.13	0.21
C20:0	0.09	0.07	0.13	0.09	0.17	0.10	0.14	0.15	0.10
C20:1 ω 9	0.19	0.31	0.37	0.18	0.23	0.21	0.24	0.28	0.21
C20:2 ω 6	0.21	0.11	0.21	0.07	0.14	0.10	0.10	0.12	0.12
C20:3 ω 9	0.12	0.19	0.07	0.06	0.09	0.07	0.05	0.07	0.05
C20:3 ω 6	1.38	1.68	1.00	0.52	0.61	0.68	0.48	0.51	0.62
C20:4 ω 6	7.10	5.95	4.69	7.65	6.62	7.43	4.56	4.68	7.19
C20:5 ω 3	0.32	0.29	0.35	0.63	1.43	1.19	1.23	1.37	2.60
C22:0	0.26	0.23	0.22	0.33	0.39	0.35	0.32	0.53	0.34
C22:1 ω 9	0.19	0.20	0.15	0.16	0.21	0.19	0.17	0.17	0.15
C22:4 ω 6	0.52	0.37	0.37	0.35	0.34	0.42	0.29	0.53	0.24
C22:5 ω 6	0.40	0.36	0.36	0.32	0.33	0.39	0.32	0.45	0.22
C22:5 ω 3	1.48	1.11	0.99	1.74	1.86	1.78	2.34	2.15	2.82
C24:0	0.18	0.16	0.14	0.19	0.31	0.30	0.15	0.37	0.27
C22:6 ω 3	1.67	1.26	1.27	3.17	2.80	2.77	2.08	2.38	3.65
SFAs 36.52-41.90 [16]	39.55	37.16	38.52	37.39	40.48	40.83	39.83	40.36	35.00
MUFAs 24.62-31.22 [16]	25.01	32.48	32.07	28.72	28.67	24.76	31.01	27.65	26.89
PUFAs	35.45	30.36	29.42	33.88	30.85	34.40	29.16	31.99	38.11

FAME	No intake			1 month intake			4 months intake		
	DBS 1	DBS 2	DBS 3	DBS 4	DBS 5	DBS 6	DBS 7	DBS 8	DBS 9
29.29-36.45 [16]									
ω6 25.73-32.63 [16]	31.66	27.24	26.58	28.12	24.46	28.38	23.32	25.89	28.78
ω3 <4 <i>undesirable</i> [4] 4-8 <i>intermediate</i> [4] >8 <i>desirable</i> [4]	3.67	2.93	2.77	5.71	6.30	5.95	5.79	6.03	9.28
ω6/ω3 3.5-5.5 [26]	8.62	9.29	9.59	4.93	3.88	4.77	4.03	4.30	3.10
C18:0/C18:1ω9 <0.7 <i>hyperactivity</i> [26] >1.3 <i>hypoactivity</i> [26]	0.61	0.39	0.39	0.51	0.62	0.64	0.45	0.56	0.47
C16:0/C16:1ω7 <45 <i>hyperactivity</i> [26] >132 <i>hypoactivity</i> [26]	29.19	11.98	27.88	20.05	29.16	47.63	39.61	24.52	26.34
C18:2ω6/C20:3ω6 <5 <i>hyperactivity</i> [26] >8 <i>hypoactivity</i> [26]	15.87	10.96	19.64	36.34	26.91	28.05	36.21	37.95	32.42
C20:4ω6/C20:3ω6 <6 <i>hypoactivity</i> [26] >9 <i>hyperactivity</i> [26]	5.16	3.55	4.67	14.62	10.89	10.85	9.49	9.15	11.56
C20:4ω6/C20:5ω3 1.5 <i>ideal</i> [28] 3 <i>good</i> [28] 10 <i>poor</i> [28] >15 <i>diseased</i> [28]	21.94	20.54	13.32	12.18	4.62	6.25	3.71	3.42	2.77

Come riportato da Calder, l'incorporazione di $\omega 3$ nei globuli umani era evidente dopo 1 mese di assunzione con la dieta [11]. D'altra parte, i livelli di $\omega 3$ nei pazienti che non assumono integratori alimentari non erano conformi ai livelli target cardioprotettivi suggeriti da W.S. Harris nel 2007 [4]. Vale la pena ricordare che l'assunzione di $\omega 3$ ha influito anche sul rapporto $\omega 6/\omega 3$: la presenza di valori superiori al range ottimale indica una condizione proinfiammatoria [26]. Rispetto ai range ottimali, tutti i pazienti con trattamenti personalizzati hanno evidenziato rapporti $\omega 6/\omega 3$ in accordo con i valori indicati (3,50–5,50). Valori di rapporto più elevati (8,62–9,59) sono stati osservati in pazienti senza integrazione di $\omega 3$ nella propria dieta. Altre considerazioni possono essere fatte sul contenuto di acido di *mead* (C20:3 $\omega 9$), che è

risultato basso nei pazienti con trattamenti personalizzati. L'accumulo di acido di *mead* nel sangue indica una carenza di acidi grassi essenziali ed è utilizzato come indicatore della carenza di PUFA [27]. In condizioni normali, i processi enzimatici di desaturazione e allungamento convertono gli acidi linoleico e α -linolenico in altri acidi grassi a catena lunga. Nel caso di carenza di acidi grassi essenziali, gli enzimi desaturasi ed elongasi agiscono sull'acido oleico determinando la produzione di un altro ω 9, come l'acido di *mead*. Sulla base di tale considerazione, l'assunzione di integratori alimentari di ω 3 ha consentito l'aumento dei livelli di acidi grassi essenziali nel sangue. Ultimo ma non meno importante, il rapporto C20:4 ω 6/C20:5 ω 3, indicato da Barry Sears come *gold standard test* per il monitoraggio dei livelli di eicosanoidi [28], in quanto subisce un notevole miglioramento nei pazienti che assumono integratori alimentari di ω 3, soprattutto dopo 4 mesi di assunzione. Infatti, i loro rapporti C20:4 ω 6/C20:5 ω 3 indicavano che i livelli di eicosanoidi erano in equilibrio e, di conseguenza, i pazienti si trovavano nella zona del benessere Omega Rx.

Analisi GC-MS veloce di integratori alimentari

Il consumo crescente di integratori alimentari ω 3 ha agito da stimolante per vari analisti per verificare che l'etichettatura rifletta il contenuto reale dei prodotti venduti. Ad esempio, Chee *et al.* hanno scoperto che due delle nove capsule di olio di pesce analizzate avevano un contenuto di EPA e DHA inferiore all'80% dei valori dichiarati [29]. Inoltre, Strigley *et al.* hanno valutato 46 integratori di olio di pesce disponibili in commercio e il contenuto di EPA e DHA rientrava nel \pm 20% delle loro dichiarazioni di etichetta, inoltre, l'80% dei prodotti esaminati, mentre la quotazione rimanente non rifletteva le dichiarazioni di etichetta [13]. Tali studi indicano chiaramente che è necessario il monitoraggio degli integratori alimentari di acidi grassi. Nel 1997, l'agenzia *Food and Drug Administration* (FDA) ha stabilito raccomandazioni di sicurezza sull'assunzione di EPA e DHA. In particolare, l'assunzione giornaliera totale di EPA più DHA da fonti alimentari e integratori alimentari convenzionali non doveva superare i 3 g/giorno perché quantità maggiori potevano allungare il tempo di sanguinamento, aumentare il colesterolo lipoproteico a bassa densità e influenzare negativamente il controllo glicemico nelle persone con tipo 2 diabete [13]. Tuttavia, tali raccomandazioni sono state riviste nel 2014 dalla FDA

stabilendo che l'ingestione di meno o uguale a 5 g/giorno di EPA e DHA da integratori alimentari non aumentava il potenziale di effetti avversi se usati secondo l'etichettatura del prodotto [30]. Un tale fattore significa che il monitoraggio del contenuto effettivo di EPA e DHA negli integratori alimentari è diventato più rilevante in relazione ai suggerimenti della FDA.

Alla luce delle considerazioni di cui sopra, è stato deciso di estendere la procedura di preparazione del campione e il metodo GC-MS veloce scan/SIM agli integratori alimentari. Per quanto riguarda la fase di preparazione del campione, sono state apportate modifiche minori rispetto ai campioni DBS. In dettaglio, il volume di n-eptano è stato aumentato a 500 μL per estrarre e solubilizzare meglio la maggiore quantità di derivati FAME. Dopo, poiché il volume massimo della fiala dell'autocampionatore utilizzato per la procedura di derivatizzazione automatizzata era di 2 mL, il volume della soluzione satura di NaCl è stato ridotto a 100 μL . Questa modifica non ha influito sulla separazione gravitazionale del sistema bifasico (metanolo ed eptano), probabilmente a causa della minore complessità degli integratori alimentari rispetto al sangue intero. Dal lato GC-MS, e considerando la variabilità della concentrazione da campione a campione degli integratori alimentari, sono stati utilizzati due intervalli di calibrazione (basso e alto) per alcuni acidi grassi, come riportato nella tabella 4. Gli ioni usati per quantificare e confermare gli analiti oggetto di studio sono elencati nella tabella 4.

Tabella 4. Elenco dei FAME rilevati negli oli di pesce NIST-3275, ioni quantificatore (Q) e qualificatore (q1 e q2) e coefficiente di determinazione (R^2). Intervallo di calibrazione, valori LoD e LoQ sono espressi in mg g^{-1} .

FAME	Q	q1	q2	R^2	Linearity Range	LoD	LoQ
C12:0	74	87	55	0.9931	20.0 - 0.5	0.06	0.21
C14:0	74	87	55	0.9969	(low) 20.0 - 1.0	0.06	0.19
				0.9961	(high) 350 - 20		
C14:1 ω 5	55	74	69	0.9932	10.0 - 0.25	0.12	0.42
C15:0	74	87	55	0.9987	10.0 - 0.25	0.04	0.13
C16:0	74	87	55	0.9995	(low) 30.0 - 1.50	0.05	0.18
				0.9976	(high) 310 - 15.5		
C16:1 ω 7	55	69	74	0.9996	10.0 - 0.50	0.11	0.37
C16:2 ω 4	67	81	95	0.9997	20.0 - 1.0	0.07	0.22
C17:0	74	87	55	0.9996	10.0 - 0.25	0.05	0.17

FAME	Q	q1	q2	R ²	Linearity Range	LoD	LoQ
C16:3 ω 4	79	67	93	0.9987	10.0 - 0.25	0.10	0.34
C18:0	74	87	55	0.9996	(low) 20.0 - 1.0	0.05	0.15
				0.9993	(high) 300 - 15.0		
C18:1 ω 9	55	69	83	0.9999	(low) 30.0 - 1.50	0.12	0.41
				0.9961	(high) 300.0 - 15.0		
C18:1 ω 7	55	69	83	0.9999	(low) 30.0 - 1.50	0.12	0.41
				0.9961	(high) 300.0 - 15.0		
C18:2 ω 6	67	81	95	0.9997	20.0 - 1.0	0.07	0.22
C18:3 ω 6	79	67	80	0.9987	10.0 - 0.25	0.07	0.22
C18:3 ω 3	79	67	93	0.9990	10.0 - 0.50	0.08	0.28
C18:4 ω 3	79	67	93	0.9990	10.0 - 0.50	0.08	0.28
C18:4 ω 1	79	67	93	0.9990	10.0 - 0.50	0.08	0.28
C20:0	74	87	55	0.9975	20.0 - 0.5	0.05	0.17
C20:1 ω 11	55	69	97	0.9992	10.0 - 0.25	0.10	0.35
C20:1 ω 9	55	69	97	0.9992	10.0 - 0.25	0.10	0.35
C20:1 ω 7	55	69	97	0.9992	10.0 - 0.25	0.10	0.35
C20:2 ω 6	67	81	95	0.9992	10.0 - 0.50	0.13	0.42
C20:3 ω 6	79	67	80	0.9980	10.0 - 0.50	0.26	0.86
C20:4 ω 6	79	91	80	0.9969	20.0 - 0.5	0.17	0.56
C20:4 ω 3	79	91	80	0.9969	20.0 - 0.5	0.17	0.56
C20:5 ω 3	79	91	67	0.9963	430 - 20	0.25	0.84
C22:0	74	87	55	0.9970	20.0 - 0.5	0.05	0.18
C22:1 ω 11	55	69	83	0.9943	10.0 - 0.50	0.09	0.30
C22:1 ω 9	55	69	83	0.9943	10.0 - 0.50	0.09	0.30
C22:1 ω 7	55	69	83	0.9943	10.0 - 0.50	0.09	0.30
				0.9973	(low) 8.5 - 0.40		
C21:5 ω 3	79	91	67	0.9963	(high) 430 - 20	0.25	0.84
C22:4 ω 6	79	91	67	0.9993	10.0 - 0.50	0.16	0.53
C22:5 ω 6	79	91	67	0.9993	10.0 - 0.50	0.16	0.53
C22:4 ω 3	79	91	67	0.9993	10.0 - 0.50	0.16	0.53
C22:5 ω 3	79	91	67	0.9957	430 - 20	0.16	0.53
C24:0	74	87	55	0.9966	20.0 - 0.5	0.06	0.19
C22:6 ω 3	79	91	67	0.9957	430 - 20	0.16	0.53

Per i composti più abbondanti, la linearità è stata valutata attraverso l'uso di standard puri di FAME. Per quanto riguarda i componenti meno abbondanti, le curve di calibrazione sono state costruite diluendo la miscela standard utilizzata per la calibrazione degli acidi grassi del sangue. Il livello di concentrazione più basso è stato utilizzato per determinare i valori LoD e LoQ (tabella 4). Per quanto riguarda la determinazione dell'accuratezza, sono stati utilizzati campioni di olio di pesce

certificati. In figura 2 sono riportati tre cromatogrammi GC-MS veloce in modalità di acquisizione SIM.

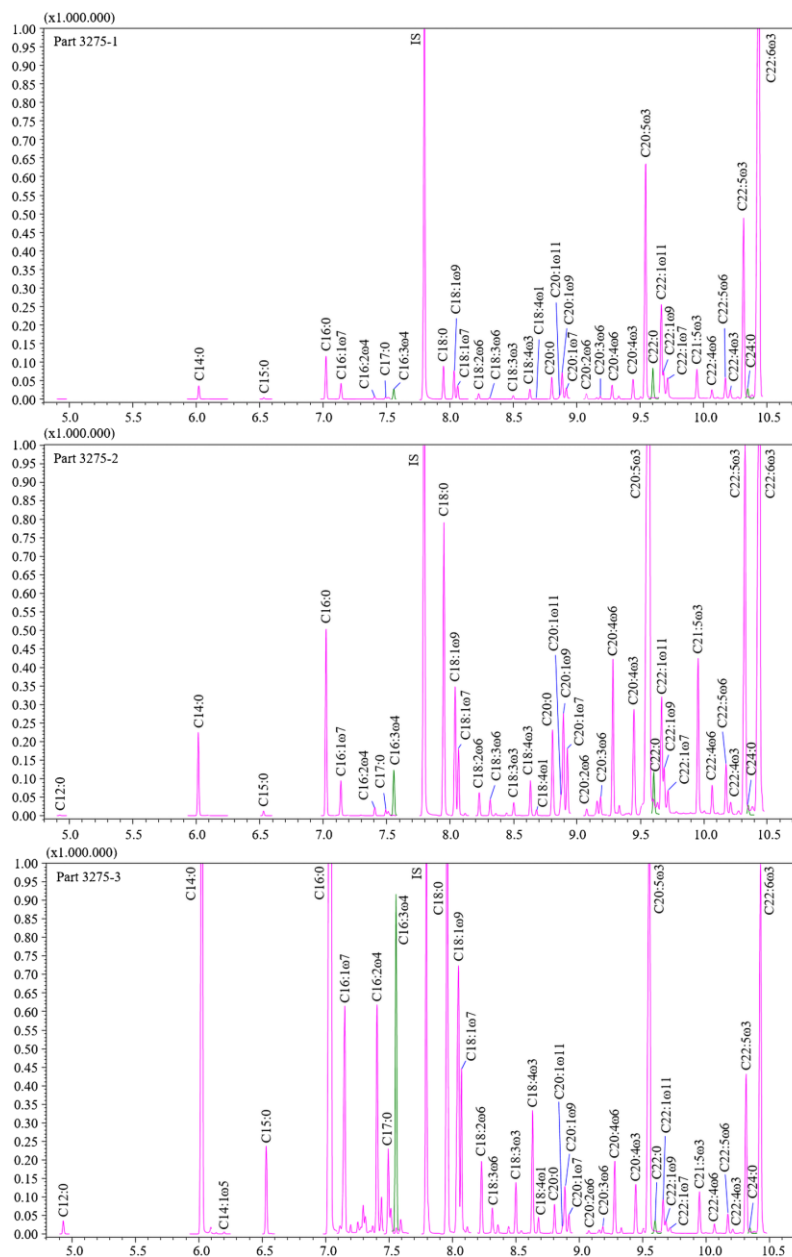


Figura 2. Cromatogrammi GC-MS in modalità SIM di FAME in oli di pesce certificati NIST-3275. Dall'alto in basso: campioni parte 3275–1, parte 3275–2 e parte 3275–3.

Gli acidi palmitico e stearico erano i più abbondanti nella famiglia SFA, con valori di recupero compresi tra 81,1 e 102,4% nei tre oli di pesce certificati. Per quanto riguarda i MUFA più abbondanti, i recuperi di acidi oleico e cis-vaccenico (C18:1 ω 7) sono stati compresi tra l'80 e il 120% (min. 92,9% e max. 108,8%). Nel caso dell'acido palmitoleico (C16:1 ω 7), i valori di recupero sono stati rispettivamente del 103,7%,

102,5% e 75,5% nella parte 1, parte 2 e parte 3 degli standard certificati. Per quanto riguarda i PUFA ω_6 , le analisi hanno indicato che i valori degli acidi linoleico e arachidonico rientravano tutti nell'intervallo dei valori della frazione di massa coperti dall'incertezza estesa, con recuperi compresi tra 98,0 e 106,0%. Valori di recupero più elevati sono stati ottenuti per l'acido γ -linolenico (C18:3 ω_6) (min. 113,8% e max. 138,4%). Infine, i dati di quantificazione relativi agli ω_3 , come EPA e DHA, sono risultati coerenti con quelli certificati: i valori di recupero variavano rispettivamente dal 105,4 al 116,9% e dall'87,7 al 115,7%. Nel caso di quasi tutti gli altri derivati FAME, l'intero processo analitico ha mostrato la sua idoneità per la profilazione qualitativa e quantitativa degli acidi grassi negli integratori alimentari. È da sottolineare come invece è stata misurata una chiara discrepanza per quanto riguarda gli acidi arachidico (C20:0) e gondoico (C20:1 ω_9). I loro recuperi (eccessivamente elevati) potrebbero indicare la presenza di composti coeluiti che portano ad interferenza, anche se i segnali SIM escludevano tale ipotesi confermando l'assenza di possibili coeluzioni. Risultati simili sono stati ottenuti anche da Srigle *et al.* [13].

Il protocollo analitico sviluppato è stato utilizzato per valutare il profilo degli acidi grassi in alcuni integratori alimentari disponibili in commercio e per verificare che il reale contenuto di acidi grassi, come EPA e DHA, rispettasse le dichiarazioni dell'etichetta. È stato riscontrato che nove dei prodotti analizzati avevano un contenuto EPA compreso tra l'80 e il 120% delle loro dichiarazioni sull'etichetta. Tuttavia, il contenuto di EPA di due campioni è risultato superiore del 54% e del 40% rispetto alla loro etichettatura. Nel caso del contenuto di DHA, tutti gli integratori analizzati in questo studio di ricerca corrispondevano alle quantità dichiarate sulle etichette.

I risultati ottenuti erano in accordo con quelli delle ricerche pubblicate, in cui oltre l'80% degli integratori alimentari ω_3 aveva quantità di EPA e DHA che erano entro $\pm 20\%$ dei loro valori riportati sulle etichette [13,31]. Il monitoraggio è stato esteso anche alla famiglia ω_3 PUFA. Anche in questi casi, dalle analisi è emerso che ω_3 totali erano conformi a quelli dichiarati. In dettaglio, tre dei campioni analizzati hanno registrato un contenuto totale di ω_3 entro $\pm 10\%$ dei valori dichiarati (min. 91%–max. 105%), mentre altri tre campioni erano entro $\pm 20\%$ (min. 86%– massimo 111%).

4.4.4 Conclusioni

In questo studio è stata sviluppata una metodologia rapida e affidabile che garantisce l'idoneità per lo *screening* qualitativo e quantitativo di acidi grassi nei campioni di DBS. La strategia analitica prevedeva l'uso di una workstation robotica che, in modo completamente automatico, consentiva la derivatizzazione, l'estrazione di derivati FAME e l'iniezione in un sistema GC-MS. L'acquisizione del segnale è stata eseguita in modalità simultanea *scan/SIM*. Il metodo qui descritto ha migliorato significativamente la produttività del laboratorio consentendo non solo un netto miglioramento in termini di tempo necessario per ottenere i risultati analitici, ma anche una riduzione del costo per analisi. Il flusso di lavoro analitico, con lievi modifiche, si è rivelato idoneo anche per la determinazione della composizione degli integratori alimentari di $\omega 3$. Le analisi hanno mostrato che oltre l'80% degli integratori alimentari di $\omega 3$ disponibili in commercio aveva un contenuto di EPA entro $\pm 20\%$ delle dichiarazioni in etichetta, mentre nel caso del DHA, tutti gli integratori analizzati corrispondevano alle quantità dichiarate sulle etichette.

Riferimenti bibliografici:

- [1] Block RC, Harris WS, Reid KJ, Sands SA, Spertus JA. EPA and DHA in blood cell membranes from acute coronary syndrome patients and controls. *Atherosclerosis*. 2008;197(2):821-8.
- [2] Block RC, Harris WS, Reid KJ, Spertus JA. Omega-6 and trans fatty acids in blood cell membranes: A risk factor for acute coronary syndromes? *Am Heart J*. 2008;156(6):1117-23.
- [3] Harris WS. The omega-6/omega-3 ratio and cardiovascular disease risk: uses and abuses. *Curr. Atheroscler Rep*. 2006;8(6):453-9.
- [4] Harris WS. Omega-3 fatty acids and cardiovascular disease: a case for omega-3 index as a new risk factor. *Pharmacol Res*. 2007;55(3):217-23.
- [5] Külzow N, Witte AV, Kerti L, Grittner U, Schuchardt JP, Hahn A, et al. Impact of Omega-3 Fatty Acid Supplementation on Memory Functions in Healthy Older Adults. *J Alzheimers Dis*. 2016;51(3):713-25.
- [6] Sijben JW, Calder PC. Differential immunomodulation with long-chain n-3 PUFA in health and chronic disease. *Proc Nutr Soc*. 2007;66(2):237-59.
- [7] Chapkin RS, McMurray DN, Lupton JR. Colon cancer, fatty acids and anti-inflammatory compounds. *Curr Opin Gastroenterol*. 2007;23(1).
- [8] Rigano F, Arena P, Mangraviti D, Donnarumma D, Dugo P, Donato P, et al. Identification of high-value generating molecules from the wastes of tuna fishery industry by liquid chromatography and gas chromatography hyphenated techniques with automated sample preparation. *J Sep Sci*. 2021;44(8):1571-80.
- [9] Shahidi F. *Nutraceutical and Specialty Lipids and their Co-Products*. 1st ed. Boca Raton, FL: CRC Press; 2006.
- [10] Shahidi F. Omega-3 Fatty Acids in Health and Disease. In: Hernandez EM, Hosokawa M, editors. *Omega-3 Oils - Applications in Functional Foods*. Urbana, Illinois: AOCS Press; 2011. p. 1-29.
- [11] Calder PC. Immunomodulation by omega-3 fatty acids. *Prostaglandins Leukot Essent Fat Acids*. 2007;77(5):327-35.
- [12] Yaqoob P, Pala HS, Cortina-Borja M, Newsholme EA and Calder PC. Encapsulated fish oil enriched in α -tocopherol alters plasma phospholipid and mononuclear cell fatty acid compositions but not mononuclear cell functions. *Eur. J. Clin. Invest*. 2000; 30: 260-274.
- [13] Srigley CT, Rader JI. Content and Composition of Fatty Acids in Marine Oil Omega-3 Supplements. *J Agric Food Chem*. 2014;62(29):7268-78.
- [14] Micalizzi G, Ragosta E, Farnetti S, Dugo P, Tranchida PQ, Mondello L, et al. Rapid and miniaturized qualitative and quantitative gas chromatography profiling of human blood total fatty acids. *Anal Bioanal Chem*. 2020;412(10):2327-37.
- [15] El-Hamdy AH, Christie W. Preparation of methyl esters of fatty acids with trimethylsulphonium hydroxid an appraisal. *J Chromatogr A*. 1993;630:438-41.
- [16] Galli C, Risé P, Ghezzi S, Marangoni F. Fast Determination of Fatty Acids in Whole Blood Collected from Fingertips: Application to the Assessment of Fatty Acid

Patterns (and Various Indexes) in Population Studies. *World Rev Nutr Diet.* 2009;100:35-45.

[17] Lepage G, Roy CC. Direct transesterification of all classes of lipids in a one-step reaction. *J Lipid Res.* 1986;27(1):114-20.

[18] Rizzo AM, Montorfano G, Negroni M, Adorni L, Berselli P, Corsetto P, et al. A rapid method for determining arachidonic:eicosapentaenoic acid ratios in whole blood lipids: correlation with erythrocyte membrane ratios and validation in a large Italian population of various ages and pathologies. *Lipids Health Dis.* 2010;9:7.

[19] Certificate of Analysis, Standard Reference Material 1950 Metabolites in Human Plasma (accessed October 06, 2021). Available from: https://www-s.nist.gov/srmors/view_cert.cfm?srm=1950.

[20] Certificate of Analysis, Standard Reference Material 3275 Omega-3 and Omega-6 fatty acids in fish oil (accessed October 06, 2021). Available from: <https://www-s.nist.gov/srmors/quickSearch.cfm?srm=3275>.

[21] Blumberg L.M. and Klee M.S. Optimal heating rate in gas chromatography. *J Microcolumn Sep.* 2000;12:508–14.

[22] Leclercq PA, Novak J. Open Tubular Column. In: *Quantitative Analysis by Gas Chromatography*, 2nd ed. Marcel Dekker Inc., New York; 1987. pp. 247–317.

[23] Mondello L, Tranchida PQ, Dugo P, Dugo G. Rapid, Micro-Scale Preparation and Very Fast Gas Chromatographic Separation of Cod Liver Oil Fatty Acid Methyl Esters. *J Pharm Biomed Anal.* 2006;5(41):1566–1570.

[24] Benner BA Jr, Schantz MM, Powers CD, Schleicher RL, Camara JE, Sharpless KE, et al. Standard reference material (SRM) 2378 fatty acids in frozen human serum. Certification of a clinical SRM based on endogenous supplementation of polyunsaturated fatty acids. *Anal Bioanal Chem.* 2018;410:2321–9.

[25] Schantz MM, Powers CD, Schleicher RL, Betz JM, Wise SA. Interlaboratory analytical comparison of fatty acid concentrations in serum or plasma. *Clin Chim Acta.* 2016;462:148–52.

[26] Ferreri C, Chatgililoglu C. *Membrane Lipidomics for personalized health*. 1st ed. Ltd: United Kingdom: John Wiley & Sons; 2015.

[27] Guillou H, Zadravec D, Martin PGP, Jacobsson A. The key roles of elongases and desaturases in mammalian fatty acid metabolism: Insights from transgenic mice. *Prog Lipid Res.* 2010;49(2):186-99.

[28] Sears B. *The Omega RX Zone: The Miracle of the New High-Dose Fish Oil*. United Kingdom: Harper Collins Publishers Ltd.; 2003.

[29] Chee KM, Gong JX, Rees DM, Meydani M, Ausman L, Johnson J, et al. Fatty acid content of marine oil capsules. *Lipids.* 1990;25(9):523-8.

[30] US Food and Drug Administration, *Petition for a Health Claim for Eicosapentaenoic Acid and Docosahexaenoic Acid and Reduction of Blood Pressure in the General Population*. 2019.

[31] Ackman RG, Ratnayake WMN, Macpherson EJ. EPA and DHA contents of encapsulated fish oil products. *J Am Oil Chem Soc.* 1989;66(8):1162-4.

La borsa di dottorato è stata cofinanziata con risorse del Programma Operativo Nazionale Ricerca e Innovazione 2014-2020 (CCI 2014IT16M2OP005), Fondo Sociale Europeo, Azione I.1 “Dottorati Innovativi con caratterizzazione Industriale”



UNIONE EUROPEA
Fondo Sociale Europeo



*Ministero dell'Università
e della Ricerca*

