



Università
Ca' Foscari
Venezia

Corso di Laurea magistrale in Scienze
Ambientali

Dipartimento di Scienze Ambientali Informatica e Statistica

**TRACCIANTI DI COMBUSTIONE
DI BIOMASSA NEL CONTINENTE
ANTARTICO**

—

Ca' Foscari
Dorsoduro 3246
30123 Venezia

Relatore

Prof. Andrea Gambaro

Correlatori

Dott. Elena Barbaro

Dott. Zangrando Roberta

Dott. Marco Vecchiato

Laureando

Gianni Ravagnan

Matricola 819118

Anno Accademico

2012 / 2013

Indice

Introduzione	6
1) Aerosol atmosferico	8
1.1) <i>Origine del particolato</i>	10
1.2) <i>Composizione chimica del particolato</i>	11
1.2.1) <i>L'aerosol organico</i>	12
1.3) <i>Il destino del particolato in atmosfera</i>	13
1.3.1) <i>Trasporto degli inquinanti a lunga distanza</i>	14
1.3.2) <i>fenomeni di deposizione</i>	17
1.4) <i>Effetti dell'aerosol atmosferico</i>	17
1.5) <i>Combustione di biomassa</i>	18
2) Gli analiti	21
2.1) <i>Levoglicosano</i>	21
2.2) <i>Metossifenoli</i>	23
3) Strumentazione analitica	29
3.1) <i>Cromatografia liquida / spettrometria di massa</i>	29
3.2) <i>Cromatografia liquida</i>	29
3.2.1) <i>High - pressure ion chromatography HPIC o IC</i>	29
3.2.1.1) <i>HPIC™ ICS-5000</i>	31
3.2.2) <i>High Performance Liquid Chromatography (HPLC)</i>	33
3.2.2.1) <i>UHPLC UltiMate 3000</i>	34
3.2.2.2) <i>HPLC Agilent 1100</i>	35
3.3) <i>Spettrometria di massa</i>	36
3.3.1) <i>Sorgenti di ionizzazione</i>	36
3.3.1.1) <i>Electospray Ionization (ESI)</i>	37
3.3.1.2) <i>Atmospheric Pressure Chemical Ionization (APCI)</i>	38
3.3.2) <i>LTQ Orbitrap® XL</i>	40
3.3.3) <i>Triplo quadrupolo API 4000™</i>	45

3.4) Configurazioni strumentali impiegate	47
3.4.1) Analisi del levoglucosano	47
3.4.2) Analisi dei metossifenoli	47
4) Messa a punto del metodo analitico	48
4.1) Spettrometro di massa: sviluppo del metodo	48
4.1.1) Parametri LTQ Orbitrap® XL	49
4.1.2) Parametri Triplo quadrupolo API 4000™	49
4.2) Cromatografo liquido: sviluppo del metodo	50
4.3) Ottimizzazione della sorgente di ionizzazione	50
4.4) Validazione	50
4.4) Quantificazione	52
5) Area di studio e campionamento	56
5.1) Il continente antartico	56
5.1.1) L'aerosol antartico	58
5.2) Campionamento	59
5.2.1) Campionatore ad alto volume Andersen	60
5.2.1.1) Filtri utilizzati e procedure di trasporto, sostituzione e stoccaggio.	61
6) Materiali	66
6.1) Standard di riferimento	66
6.1.1) Levoglucosano	66
6.1.2) Metossifenoli	66
6.2) Solventi e reagenti	67
6.3) Materiali	67
6.4) Strumentazione	68
6.4.1) Preanalitica	68
6.4.2) Analitica	68
6.5) Colonne cromatografiche	68
6.6) Software utilizzati	69

6.6.1) <i>Integrazione dei cromatogrammi</i>	69
6.6.2) <i>Calcolo retrotraiettorie</i>	69
7) Metodologie analitiche	70
7.1) <i>Levoglucosano</i>	70
7.1.1) <i>preparazione delle soluzioni standard</i>	70
7.1.2) <i>Metodo ic-orbitrap MS per la determinazione del levoglucosano</i>	70
7.1.3) <i>Metodo HPLC-MS/MS per la determinazione del levoglucosano</i>	73
7.2) <i>Metossifenoli</i>	75
7.2.1) <i>Preparazione soluzioni standard</i>	75
7.1.2) <i>Metodo HPLC-orbitrap MS per la determinazione dei metossifenoli</i>	76
7.1.3) <i>Metodo HPLC-MS/MS per la determinazione dei metossifenoli</i>	79
8) Procedura pre-analitica	84
8.1) <i>Minimizzazione della contaminazione</i>	84
8.2) <i>Preparazione dei campioni</i>	84
8.3) <i>Procedura pratica di validazione per la determinazione di levoglucosano mannosano galattosano e metossifenoli</i>	87
9) Risultati e conclusioni	89
9.1) <i>Validazione dei metodi messi a punto</i>	89
.1.1.1) <i>Validazione del metodo IC-orbitrapMS</i>	89
9.1.2) <i>validazione metodo HPLC-orbitrap MS per i metossifenoli</i>	93
9.2) <i>Analisi dei dati</i>	97
9.2.1) <i>Determinazione del levoglucosano nell'aerosol antartico.</i>	97
9.2.2) <i>Determinazione dei metossifenoli nell'aerosol antartico</i>	104
9.2.3) <i>confronto tra gli analiti nell'aerosol antartico</i>	116
9.3) <i>Conclusioni</i>	116
Allegato 1) MDL-MQL	119
Allegato 2) Retro traiettorie MZS291110	121
Bibliografia	124
Ringraziamenti	137

Introduzione

Il risultato dell'industrializzazione è da considerarsi un vantaggio, se si pensa al miglioramento che tali tecnologie hanno portato all'umanità, e una minaccia se si pensa all'attuale problema delle emissioni in atmosfera. Indipendentemente dal livello di industrializzazione di ciascuna nazione e dal livello tecnologico per il controllo delle emissioni, l'inquinamento atmosferico, oggi giorno, è considerata una minaccia per l'intero pianeta e i suoi abitanti. Questa concezione di minaccia globale per il pianeta si è tradotta nel 1979 nella Convenzione di Ginevra sull'inquinamento atmosferico transfrontaliero a lunga distanza, firmata da 34 paesi dell'Unione Europea e entrata in vigore nel 1983. La Convenzione è stato il primo strumento legalmente vincolante che ha affrontato il problema dell'inquinamento atmosferico su larga scala.

La diffusione su scala planetaria degli inquinanti atmosferici ha spinto i ricercatori a studiarne i meccanismi di trasporto, soprattutto nei luoghi lontani da sorgenti di emissione come gli ambienti polari, dove è possibile condurre studi sul livello di contaminazione di tali ambienti, sul trasporto a lunga distanza, sul comportamento e destino ambientale degli inquinanti.

Gli scopi principali di questo lavoro di tesi sono: la messa a punto di una tecnica ifenata innovativa per la determinazione quantitativa del levoglucosano, mannosano e galattosano nell'aerosol atmosferico attraverso l'accoppiamento di un cromatografo ionico ad uno spettrometro di massa ad alta risoluzione LTQ Orbitrap[®] XL (IC-orbitrap MS); lo studio della composizione chimica, in particolare della componente organica idrosolubile dell' aerosol atmosferico nelle diverse frazioni dimensionali e la sua variazione temporale nel corso dell'estate australe; ottenere informazioni sulle sorgenti, sull'evoluzione e sul destino dell'aerosol proveniente dai processi di combustione di biomassa utilizzando “*markers*” specifici come il levoglucosano e i metossifenoli.

La tecnica analitica permetterà una completa separazione cromatografica dei 3 stereoisomeri generalmente molto difficile in cromatografia liquida in fase inversa. L'analisi dei campioni condotta per la prima volta con questo tipo di configurazione strumentale, oltre ad un accurata e precisa determinazione degli analiti, ci permetterà di ricavare preziose informazioni sulla caratterizzazione della frazione polare e idrosolubile dell'aerosol atmosferico. Grazie all'alta risoluzione e l'impiego della modalità di acquisizione “*full scan*” si potranno ottenere numerose informazioni quantitative dei composti presenti nel campione, che potranno essere oggetto di studi

futuri. Prima dell'analisi dei campioni reali, la metodologia analitica messa a punto, dovrà essere validata, mediante la stima della linearità tra segnale analitico e concentrazione, i limiti di rilevabilità e di quantificazione strumentale, l'accuratezza, la riproducibilità, e la resa di estrazione della metodologia preanalitica. In seguito la metodologia sarà applicata all'analisi dei campioni di aerosol antartico provenienti dalla campagna di campionamento che ha avuto luogo presso la base Italiana Mario Zucchelli nell'estate australe 2010-2011.

Per quanto riguarda l'analisi dei metossifenoli si è deciso di utilizzare una metodologia analitica già messa a punto dallo stesso gruppo di ricerca (HPLC-orbitrap MS) [Turchet. M 2012], completandone la validazione per i supporti di campionamento utilizzati per l'aerosol antartico. Anche in questo caso l'analisi dei campioni sarà effettuata previa validazione della metodica analitica.

1) Aerosol atmosferico

Con il termine aerosol atmosferico si identifica una miscela di particelle solide e liquide disperse in atmosfera. Spesso il termine particolato atmosferico (PM, *particulate matter*) viene utilizzato impropriamente come sinonimo di aerosol, poiché tale terminologia esclude la componente liquida presente [Marconi, A., 2003].

Una delle caratteristiche più importanti che si analizzano in materia di aerosol atmosferico sono le dimensioni delle particelle che lo compongono. Queste possono essere estremamente variabili, da alcuni nanometri (nm) a decine/centinaia di micrometri (μm). La dimensione è molto importante, perché è direttamente collegato alla capacità delle particelle di restare in sospensione nell'aria per tempi più o meno lunghi. Più piccole saranno le particelle più la loro vita in sospensione in atmosfera sarà lunga, dato che la velocità di sedimentazione è direttamente proporzionale alla dimensione e al peso delle particelle [Colbeck I., 2008].

Oltre alle dimensioni, le particelle in atmosfera si distinguono per forma e composizione. Esse contengono diversi composti chimici organici ed inorganici, sostanze silicee, sabbia, fuliggine, ceneri, polveri, sali, ossidi metallici, prodotti o resti vegetali, e svariati altri. Generalmente la composizione e le dimensioni sono un ottimo indicatore del processo e della fonte di produzione.

Per poter analizzare le caratteristiche fisiche del particolato è utile utilizzare un parametro adimensionale di riferimento che non tenga conto della forma irregolare delle particelle: il diametro aerodinamico D_{ae} . Questo parametro può essere definito come il diametro di una particella sferica di densità unitaria (1 g cm^{-3}) avente la stessa velocità terminale della particella reale, sottoposta a un campo gravitazionale in aria statica, nelle stesse condizioni di temperatura, pressione e umidità relativa. Per le particelle di dimensioni superiori a $0,5 \mu\text{m}$ il diametro aerodinamico può essere calcolato con l'equazione 1:

$$D_{ae} = D_p \sqrt{\frac{\rho_p}{\rho_0}}$$

[1]

in cui D_p rappresenta il diametro di Stokes della particella (μm) e ρ_p e la densità della particella (g cm^{-3}) normalizzata rispetto alla densità di riferimento ρ_0 (1 g cm^{-3}) [Lange, R., et al., 1996].

In letteratura esistono diversi metodi per classificare le particelle, il più utilizzato si basa sulla dimensione delle particelle, soprattutto sul loro diametro aerodinamico equivalente. Tale classificazione è riassunta nella tabella 1.

Tabella 1: Classificazione del particolato atmosferico sulla base del diametro aerodinamico equivalente (Marconi A., 2003).

FRAZIONE	D_{AE} (µm)	FORMAZIONE E COMPOSIZIONE
Ultrafine	0,01 < D _{ae} < 0,1	Deriva da combustione e nucleazione omogenea dei vapori sovra-saturi (SO ₂ , NH ₃ , NO _x).
Fine	0,1 < D _{ae} < 2,5	Si forma per coagulo di particelle ultrafini, nucleazione eterogenea, condensazione di gas su particelle pre-esistenti. Composta da solfati, nitrati, NH ₄ ⁺ , carbonio elementare ed organico, spore fungine, lieviti, batteri.
Grossolana	2,5 < D _{ae} < 100	Prodotta da processi meccanici (erosione, risospensione meccanica o eolica, macinazione). La sedimentazione avviene nell'arco di ore o minuti a causa delle dimensioni. Composta da elementi presenti nel suolo o nei sali marini.

Un altro tipo di classificazione [Marconi, A., 2003] suddivide le particelle in base alla natura e alle dimensioni in quattro classi:

- **Polveri;**
- **Fumi;**
- **Smog o fuliggine;**
- **Nebbie.**

Per fini pratici di campionamento, si utilizza un'altra classificazione, sempre basata sul diametro aerodinamico:

- **TSP** (particelle totali sospese): sono particelle le cui dimensioni sono tali da restare in sospensione per il tempo necessario al campionamento (diametro aerodinamico inferiore a 100 µm) [Colbeck I., 2008];
- **PM₁₀**: frazione di aerosol raccolta da un sistema di campionamento tale per cui le particelle con diametro aero dinamico di 10 µm sono campionate con efficienza del 50% [Colbeck I., 2008];

- **PM_{2,5}**: frazione di aerosol raccolta da un sistema di campionamento il quale permette di campionare particelle con diametro aerodinamico uguale a 2,5 µm con un'efficienza del 50%; rappresentano circa il 60% delle PM₁₀ [Colbeck I., 2008]

Come detto sopra in natura l'aerosol è composto da una miriade di particelle disperse in aria. Pertanto se le particelle hanno tutte lo stesso diametro, si parlerà di aerosol monodisperso. In tutti gli altri casi in cui è presente più di una classe dimensionale, l'aerosol sarà definito polidisperso [Colbeck I., 2008].

1.1) Origine del particolato

La composizione chimica del particolato rispecchia la sua origine, a meno di trasformazioni avvenute in atmosfera. Pertanto, basandosi sulla sorgente di produzione, il particolato può essere classificato in:

- **Primario**, costituito da particelle, sia fini che grossolane, originatesi direttamente da processi meccanici di erosione, dilavamento e rottura di particelle più grandi, da processi di evaporazione dello spray marino in prossimità delle coste, da processi di combustione ed è emesso in atmosfera direttamente nella sua forma finale da sorgenti identificabili. Esso sarà dunque molto concentrato nell'aria immediatamente circostante il suo punto di emissione [Colbeck I., 2008; Brasseur et al., 1999].
- **Secondario**, costituito dagli aerosol, contenenti quasi esclusivamente particelle fini, dal diametro inferiore a 1 µm, che si generano dalla conversione dei gas in particelle solide. Il particolato secondario, infatti, si forma grazie a processi di condensazione di sostanze a bassa tensione di vapore, precedentemente formatesi attraverso evaporazione ad alte temperature, o grazie a reazioni chimiche tra inquinanti primari allo stato gassoso presenti in atmosfera [Colbeck I., 2008; Brasseur et al., 1999].

Concentrandosi sulle fonti di emissione, si possono distinguere, anche in questo caso, due grandi categorie:

- **Sorgenti naturali**: generano particolato dalle forme irregolari e di grosse dimensioni, quali spray marino, sabbie e materiali in consolidati provenienti dalla crosta terrestre grazie all'erosione, materiale organico come pollini e resti vegetali, ceneri vulcaniche o derivanti da incendi boschivi. Sono responsabili di circa il 94% delle emissioni totali.

- **Sorgenti antropiche:** emettono particelle più piccole e di forma regolare. Tali particelle provengono dall'edilizia, dall'agricoltura, dalle emissioni degli autoveicoli, dai processi industriali (raffinerie, processi chimici, operazioni minerarie, cementifici...), o dalla combustione (produzione di energia, riscaldamento, ecc.). Il particolato emesso da tali sorgenti, sebbene sia solo una piccolissima parte (circa 6%) del totale, desta notevoli preoccupazioni dal punto di vista ambientale e sanitario a causa degli svariati composti tossici che contiene [Marconi, A., 2003].

1.2) *Composizione chimica del particolato*

Sebbene la composizione del particolato atmosferico sia molto variabile e dipenda soprattutto dalla tipologia di processo che l'ha generato, sono presenti dei composti chimici preponderanti: solfati, nitrati, ammonio, sale marino, acqua, specie cristalline (silicio, ferro, calcio, alluminio), composti organici e carbonio elementare [Marconi, A., 2003]. Osservando la figura sottostante (Fig.1) si può osservare la percentuale media dei costituenti dell'aerosol in Italia, risultato di un'analisi condotta da Zappoli S et al. (1999) a San Pietro Capofiume in Emilia Romagna.

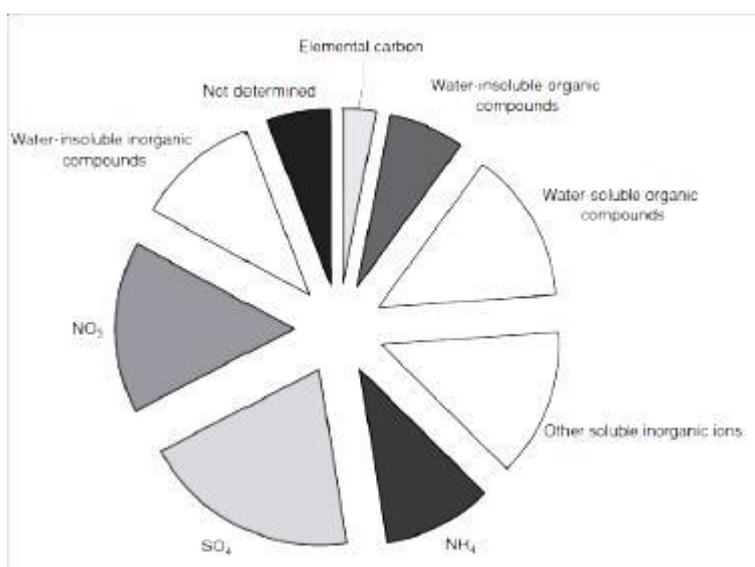


Figura 1: bilancio chimico elementare dei costituenti dell'aerosol in Italia [Colbeck I., 2008].

Anche in questo caso è utile eseguire una distinzione tra il particolato grossolano di origine naturale e quello fine di origine antropica, al fine di capire la distribuzione dei composti chimici in essi contenuti.

Solfati (SO_4^{2-}), ammonio (NH_4^+), carbonio organico (tra cui IPA) e metalli di transizione caratterizzano la frazione fine del particolato, e la loro origine è da attribuirsi a fonti quasi esclusivamente a fonti antropiche.

Nel particolato grossolano, di origine naturale, si possono rintracciare materiali erosi dalla crosta terrestre, particelle organiche di origine biologica (polline, spore, frammenti di piante) e ioni solubili in acqua (Cl^- , NO_3^- , Na^+ , Mg^{2+} e Ca^{2+}) [Marconi, A., 2003; Kanakidou M. et al., 2005].

La composizione chimica del particolato in un determinato luogo non dipende soltanto dal tipo di fonte e dalle condizioni atmosferiche: molte particelle infatti possono subire trasporto a lungo raggio ed essere rilevate in zone anche molto distanti dal luogo in cui hanno avuto origine [Marconi, A., 2003].

1.2.1) L'aerosol organico

L'aerosol organico ha una composizione variabile, dovuta alla moltitudine di composti organici che lo possono comporre, alle sorgenti, alla variabilità temporale ecc... I più importanti sono: idrocarburi lineari e aromatici, acidi organici, aldeidi, composti clorurati e bromurati (PCB, diossine, PBDEs, ecc...), zuccheri e anidro zuccheri [Facchini MV, 2001].

La frazione carbonacea del particolato ambientale consiste di carbone elementare e di vari composti organici. Il carbonio organico, si suddivide in primario se emesso direttamente da sorgenti, oppure secondario se formatosi in seguito a condensazione di composti poco volatili prodotti per foto ossidazione di idrocarburi [Colbeck I., 2008].

La frazione organica dell'aerosol in ambiente urbano generalmente contribuisce al 30-60% del particolato fine totale, portando così ad un significativo impatto sulle proprietà dell'atmosfera. Tale percentuale è molto importante per quanto riguarda la salute degli abitati poiché nel particolato organico sono presenti composti di riconosciuta tossicità. Non solo, una larga frazione (sopra il 95%) di aerosol organico urbano risulta essere associata alle particelle più piccole aventi un diametro inferiore ai 3 μm , portando così ad un aumento delle patologie legate al tratto respiratorio (► paragrafo 1.4) [Barthelmie, R.J., et al., 1997].

1.3) Il destino del particolato in atmosfera

Il parametro più importante per definire la capacità delle particelle di rimanere in sospensione in atmosfera è il diametro aerodinamico. La tabella seguente (Tabella 2) mostra le concentrazioni in atmosfera di PM in funzione del D_{ae} .

Tabella 2: Concentrazione delle particelle in atmosfera in relazione al diametro aerodinamico equivalente

Diametro Equivalente	Concentrazione in atmosfera
$d_{ae} < 1 \mu\text{m}$	$10 < \frac{\text{particelle}}{\text{m}^3} < 10000$
$d_{ae} > 1 \mu\text{m}$	$\frac{\text{particelle}}{\text{m}^3} < 10$
$d_{ae} < 2,5$	> 95% delle particelle totali

Conoscendo la dimensione delle particelle, si possono ottenere informazioni utili sulla loro evoluzione in atmosfera [Marconi, A., 2003].

La figura 2, descrive il destino delle particelle in atmosfera, dalla loro formazione ai vari tipi di rimozione.

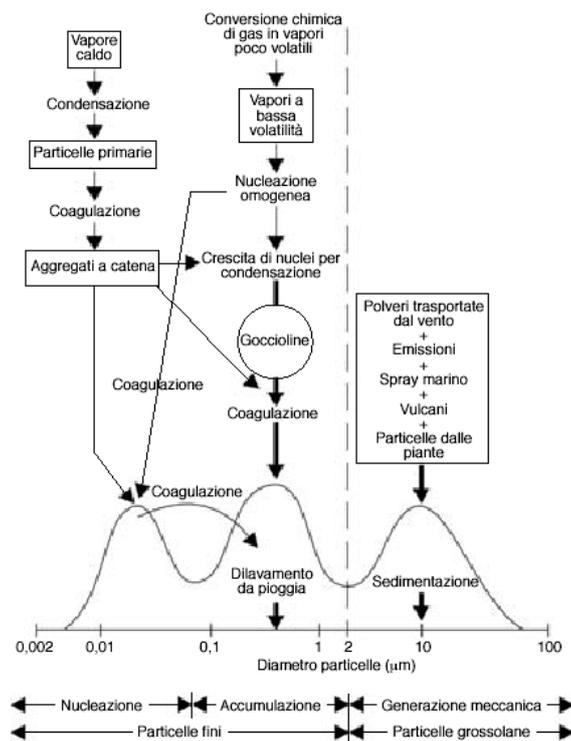


Figura 2: Origine e destino delle particelle in relazione alle loro dimensioni [Marconi, A., 2003].

1.3.1) Trasporto degli inquinanti a lunga distanza

Il vento è la principale forza che governa il trasporto delle particelle atmosferiche a lunga distanza. Studi hanno dimostrato che le particelle con diametro inferiore a 10 μm possono viaggiare per più di 5000 Km, soprattutto sopra le regioni marine [Prospero, 1999]. Tale tesi è stata avvalorata dopo il rinvenimento di particelle provenienti dal deserto del Sahara, lungo le coste dell'Atlantico occidentale [Schutz, L., 1980].

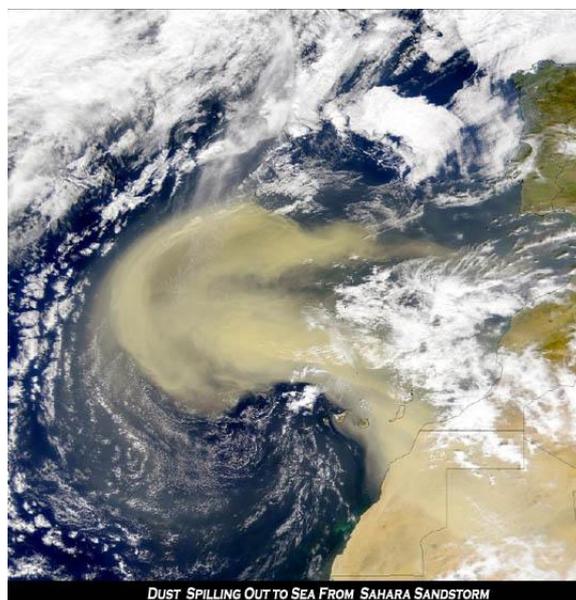


Figura 3: trasporto di sabbia sahariana sopra l'oceano atlantico [sito internet www.centrometeoitaliano.it]

Il trasporto di inquinanti a lunga distanza è influenzato, da numerosi fattori: distribuzione delle terre emerse, presenza di acqua, orografia, meteorologia, animali migratori e trasporto antropogenico (generalmente per fini commerciali). Un altro parametro da tenere in considerazione quando si parla di trasporto a lunga distanza è la temperatura. Alle normali temperature ambientali, molti inquinanti organici presentano una volatilità tale (correlata alla costante di Henry) da consentir loro di evaporare, anche se lentamente, dal sito provvisorio in cui si trovano. Dato che la pressione di vapore di qualsiasi sostanza chimica aumenta esponenzialmente con la temperatura, l'evaporazione e la mobilitazione degli inquinanti avviene soprattutto nelle aree tropicali e subtropicali, per cui queste regioni geografiche difficilmente diventano il deposito finale degli inquinanti. Viceversa, le temperature fredde dell'aria favoriscono la condensazione e l'adsorbimento dei composti gassosi sulle particelle atmosferiche sospese, gran parte delle quali vengono successivamente depositate sulla superficie terrestre. Ciò spiega perché le regioni polari, essendo il recettore dei composti volatilizzati alle medie e basse latitudini, sono molto importanti nello studio dei fenomeni di trasporto e deposizione, anche perché i composti che si depositano in queste regioni sono scarsamente degradati. Questo, se scientificamente è da considerarsi un effetto

interessante, comporta che i composti si mantengono pressoché inalterati e possono essere studiati minimizzando gli errori, dal punto di vista ambientale è sicuramente un aspetto negativo dal momento che questi inquinanti rimangono stabili per molto tempo accumulandosi [Baird C., et al., 2006].

La composizione chimica, e soprattutto la persistenza e la volatilità dei composti, sono fattori da non sottovalutare durante il trasporto. Sostanze con bassa volatilità tenderanno ad essere adsorbite sulla superficie di particelle atmosferiche e, a seconda delle dimensioni, a precipitare a terra. I composti persistenti, che generalmente hanno anche un'elevata volatilità, possono rimanere sospesi in atmosfera per anni, subendo una distribuzione in tutto il globo. Invece, per le sostanze con tempo di vita di alcuni mesi, la concentrazione diventa uniforme nell'emisfero in cui sono state emesse, ma non in quello opposto, poiché l'attraversamento dell'equatore richiederebbe un tempo almeno un anno di permanenza in atmosfera [Franklin, J., 2006].

Il trasporto a lunga distanza (LRT) può essere riassunto nella figura 4.

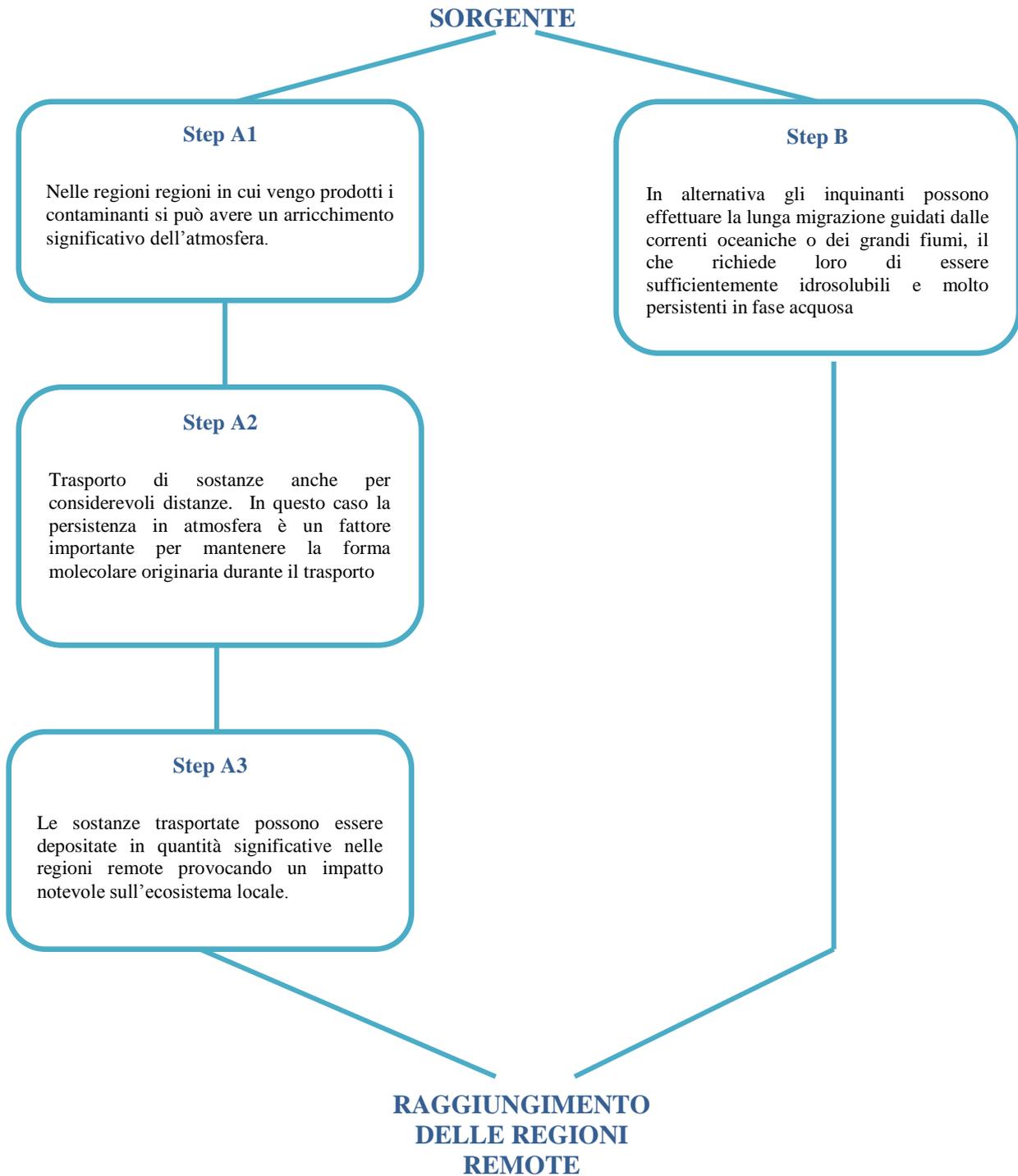


Figura 4: Fasi principali del trasporto a lunga distanza [Wania, F, 2003].

La maggior parte delle attuali tecniche di valutazione del LRT, in particolare quelle che si affidano al calcolo di una caratteristica distanza di viaggio, si sono concentrati sulla fase A2 del processo globale, cercando di valutare quanto il degrado atmosferico e la deposizione siano in grado di limitare la LRT di una sostanza nell'aria [Wania F., 1996].

Due processi possono portare ad un arricchimento in Antartide di sostanze chimiche altamente persistenti e semi-volatili. Il primo è legato alla forte dipendenza della temperatura con la

ripartizione tra la fase gas e la fase condensata, insieme al gradiente di temperatura su scala globale, tramite un processo chiamato “condensazione a freddo” [Wania F., 1996]. L’altro meccanismo di arricchimento è la dipendenza dal clima dei prodotti chimici organici: com’è stato precedentemente illustrato, un composto che viene degradato in ambienti caldi, se raggiunge le regioni fredde vi si potrebbe accumulare [Wania F., 1996].

1.3.2) fenomeni di deposizione

La durata della vita in atmosfera delle particelle è influenzata dalla forza del vento [Raes, F. et al. 2000] e dalle precipitazioni atmosferiche [Hemond, H.F., et al. 2000]

1.4) Effetti dell’aerosol atmosferico

L’aerosol atmosferico influenza numerosi fenomeni quali: la formazione di nubi e nebbie fungendo da nuclei di condensazione, la variazione delle proprietà fisiche dell’atmosfera con effetti sul bilancio energetico terrestre, la trasparenza ottica (effetto Tyndall), la contaminazione di acque e suolo attraverso i processi di deposizione, la catalisi di reazioni chimiche in aria, l’erosione dei materiali (possono provocare danni al patrimonio architettonico) e non meno importanti i danni alla salute degli esseri viventi [Hoppel et al. 1986].

- **Effetti sul clima:** L’entità con cui il particolato atmosferico assorbe e riflette le radiazioni provenienti dal Sole dipende dalla sua dimensione e composizione chimica, nonché dalla lunghezza d’onda della radiazione stessa [Ramanathan, V. et al., 2001]. Un aumento del particolato in atmosfera causerebbe una diminuzione della temperatura terrestre, a causa della riflessione e schermatura della luce solare [Ramanathan, V. et al., 2001]. Per esempio, gli anni immediatamente successivi alle più grandi eruzioni vulcaniche di tipo esplosivo, cioè caratterizzate dall’emissione in atmosfera di un’enorme quantità di particolato, gli inverni sono stati particolarmente rigidi [sito internet: www.nonsoloaria.it].
- **Effetti sull’ecosistema e sulle superfici:** Il particolato atmosferico, attraverso deposizione secca o umida può portare a processi di acidificazione, causati prevalentemente alla formazione di H_2SO_4 e HNO_3 a partire dagli ossidi di zolfo e azoto adsorbiti sulla superficie delle particelle. I processi corrosivi si intensificano con l’aumento dell’umidità in atmosfera [Sanderson, M.G. et al. 2006]. L’accumulo di polvere sulla superficie delle foglie può portare alla formazione di una patina opaca, che funge da schermo per la luce, con una netta

riduzione della fotosintesi [Sandersona, M.G. et al. 2006]. Infine il particolato atmosferico esercita una funzione di abrasione sulle superfici in cui entra in contatto, danneggiando il patrimonio architettonico e archeologico, i circuiti elettronici esterni e le facciate degli edifici [Lipfert, F.W., 1987].

➤ **Effetti sulla salute umana:** Il tossicità di una particella dipende sostanzialmente da due caratteristiche:

- 1) **Composizione chimica**, possono essere presenti composti tossici o corrosivi
- 2) **Dimensioni:** le dimensioni di una particella giocano un ruolo importantissimo riguardo al grado di penetrazione all'interno del corpo umano (Fig. 5).

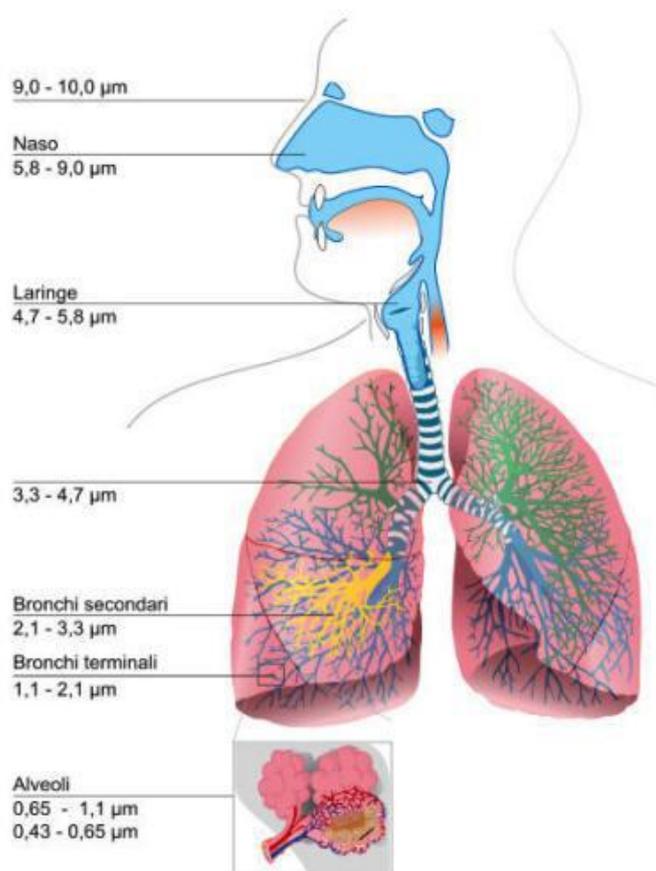


Figura 5: Interazione tra apparato respiratorio e particolato atmosferico in base alla granulometria.

1.5) Combustione di biomassa

Uno dei processi ambientali che immette in atmosfera una grade quantità di materiale particolato è la combustione di biomassa (“*biomass burning*”) la cui composizione riflette le caratteristiche del materiale vegetale combusto (come una sorta di “impronta digitale chimica”). Alcuni composti in

particolare, a causa della loro specificità e resistenza in atmosfera, possono essere utilizzati come traccianti dei processi di combustione.

La composizione della biomassa dipende dalla specie, dal luogo in cui la vegetazione cresce, dalle condizioni di crescita, e dal tipo di tessuto che caratterizza le piante [Simoneit B.R.T., 2002]. In media essa è composta (peso secco) da: cellulosa per il 40 – 50%, emicellulosa per il 20 – 30%, lignina 10 – 25% e il rimanente 5% circa da vari componenti volatili [Pettersen R., et al., 1984; Yang H., et al., 2007].

La cellulosa (Fig. 6), la cui formula bruta è $(C_6H_{10}O_5)_n$, è costituita da una lunga catena polimerica composta di 7000-12000 monomeri di β -Glucosio legati con legami glicosidici; la struttura è insolubile in acqua e forma l'ossatura di sostegno di tutte le biomasse presenti sulla terra [Simoneit B.R.T., 2002].

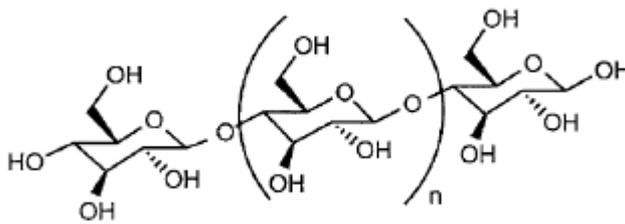


Figura 6: La cellulosa e i suoi monomeri di D-glucosio [Simoneit B.R.T., 2002].

Le emicellulose sono composti polimerici formati da 100-200 monomeri (glucosio, mannosio, galattosio, xilosio, e arabinosio) la cui struttura ramificata diversifica la tipologia di biomassa (arborea o erbacea) [Simoneit B.R.T., 2002].

La lignina è un polimero tridimensionale irregolare, dalla struttura complessa; è un composto di natura fenolica originato dalla polimerizzazione deidrogenativa, per via enzimatica, dei tre principali precursori: alcol p-coumarilico, alcol sinapilico e alcol coniferilico (Fig. 7) [Simoneit B.R.T., 2002].

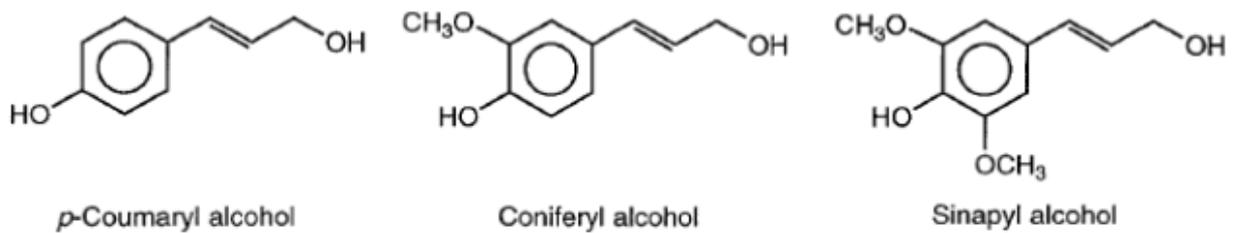


Figura 7: I tre alcoli precursori della lignina: p-coumarilico, coniferilico e sinapilico [Simoneit B.R.T., 2002].

La combustione della biomassa coinvolge complicati processi e reazioni che portano alla rottura delle molecole e alla loro decomposizione in prodotti di combustione. Tali emissioni, però, risentono fortemente della tipologia di biomassa di partenza e delle caratteristiche del processo di combustione [Wardoyo A.Y.P., 2007]. In carenza di ossigeno, non si ha la completa ossidazione della biomassa in anidride carbonica e acqua, ma la formazione di una serie di prodotti, tra cui: monossido di carbonio (CO), idrocarburi poliaromatici (IPA), composti organici volatili (VOC), materiale particolato, ecc.. [Faravelli T., 2006].

Ad una temperatura superiore ai 300°C la cellulosa subisce la rottura dei legami e tramite successive reazioni viene trasformata in zuccheri anidri, mentre, ad alta temperatura, la lignina è degradata in monomeri vanillici, cumarici e siringici [Simoneit B.R.T., 2002].

Questi particolari composti sono utilizzati come “*markers molecolari*” o traccianti molecolari specifici della combustione. Tra questi un ruolo rilevante nell’identificazione del particolato prodotta dal “biomass burning” sono i matossifenoli e il levoglucosano. [Schauer, J. 2001; Fine, P., et al., 2002].

2) *Gli analiti*

2.1) *Levogluosano*

Il levogluosano (1,6-anidro- β -D-glucopiranosio) (Fig. 8; Tabella 3, principali caratteristiche) è un monosaccaride anidro idrosolubile contenente un gruppo funzionale chetale, prodotto dalla combustione della cellulosa.

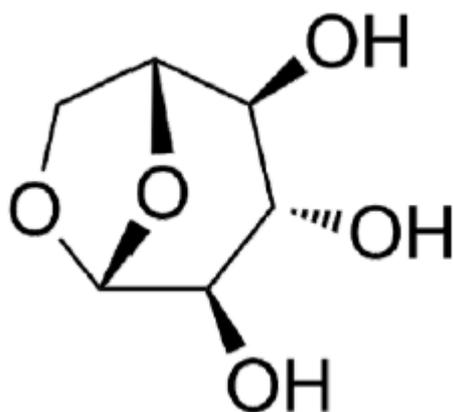


Figura 8: Formula di struttura del 1,6-anidro- β -D-glucopiranosio.

Tabella 3: principali caratteristiche del levogluosano.

PROPRIETÀ	VALORE
PM	162,14
Formula bruta	$C_6H_{10}O_5$
Punto di fusione	173 – 183°C

Quando subisce combustione a temperature superiori a 300°C, la cellulosa è sottoposta a depolimerizzazione in unità glicosidiche producendo un catrame altamente combustibile, il cui maggior componente è il levogluosano [Schkolnik, G, 2009]. Il levogluosano si forma per pirolisi del β -D-glucosio per eliminazione di una molecola d'acqua (eliminazione 1-6) che dà luogo alla formazione di una struttura biciclica. La chiusura dell'anello è indotta dalle elevate temperature e avviene tra il gruppo ossidrilico in posizione C6 e il gruppo OH del carbonio emiacetalico in C1. Nel corso della combustione di biomassa avvengono reazioni analoghe di pirolisi dell'emiacellulosa che danno origine a levogluosano, mannosano (1,6-anidro- β -D-mannopiranosio) e galattosano (1,6-anidro- β -D-galattopiranosio) rispettivamente dalla disidratazione di mannosio e galattosio (figura 9) [Schkolnik, G. et al., 2006].

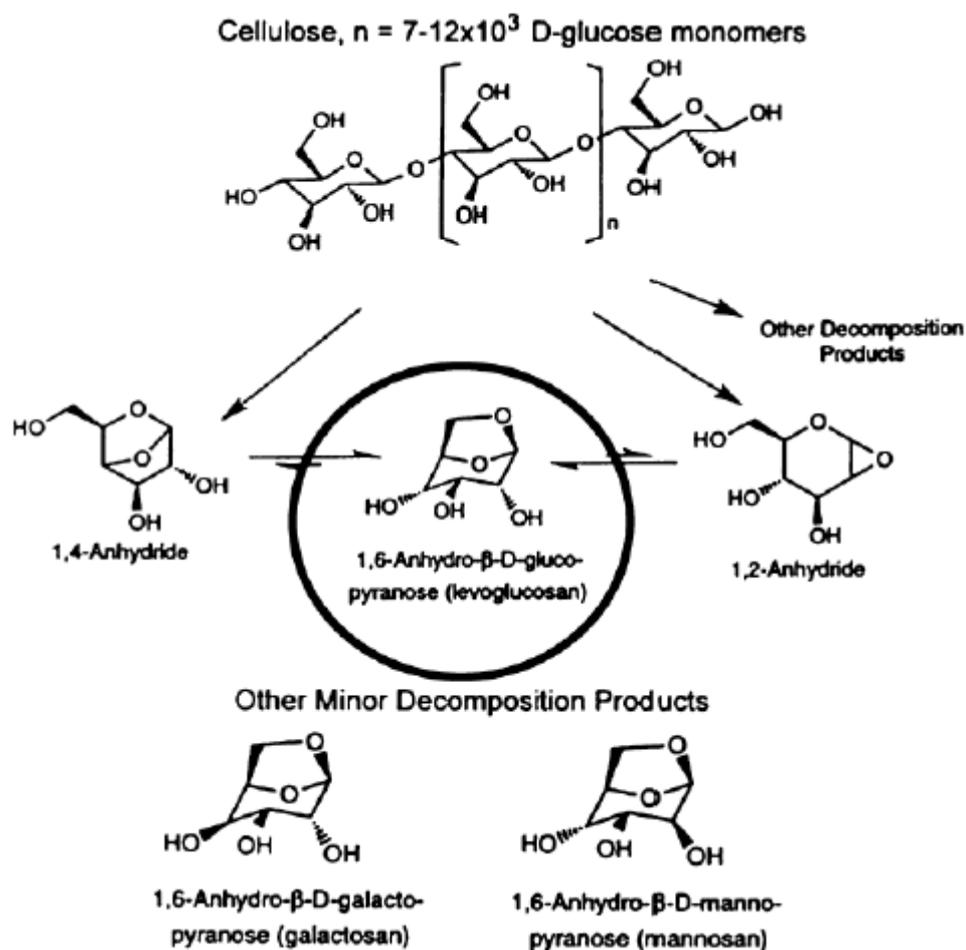


Figura 9: Formazione di levoglucosano per combustione della cellulosa [Schkolnik, G., et al., 2006].

Sebbene parte del levoglucosano venga consumato attraverso reazioni che si verificano durante la combustione stessa, esso è emesso nell'aerosol in gran quantità attraverso il fumo di combustione, andando ad incrementare la frazione organica idrosolubile presente in atmosfera [Dye, C., 2005].

Il levoglucosano è abbastanza stabile in atmosfera, in condizioni acide non da segno di deterioramento anche dopo 10 giorni dall'emissione [Schkolnik, G., et al., 2006], anche se questo valore sembrerebbe, a seguito di ricerche più recenti, sovrastimato [Mochida, M., 2010]. Altri studi rivelano che il levoglucosano è ossidato in fase acquosa da radicali quali $\cdot\text{OH}$, NO_3^- , SO_4^- [Hoffmann, D., 2010]. Benché dagli studi condotti emerga che il levoglucosano non è stabile in atmosfera come pensato precedentemente, l'alta concentrazione a cui è presente nelle emissioni provenienti dalla combustione di biomassa suggerisce che, benché una parte degradi in atmosfera, possa essere utilizzato come "marker" molecolare specifico (tracciante) indicativo del "biomass burning" [Hoffmann, D., et al., 2010]. Infatti è prodotto da incendi, fuochi agricoli, stufe a legna, carta, stoffe naturali, mentre non è prodotto da combustioni di materiali diversi (per esempio combustibili fossili) o dalla biodegradazione e idrolisi della stessa cellulosa [Hoffmann, D., 2010].

Le maggiori concentrazioni di levoglucosano sono presenti nell'aerosol fine in cui si concentra circa il 90% del levoglucosano presente nel PM₁₀ [Lee et al., 2008]

In letteratura esistono numerosissimi lavori sull'utilizzo del levoglucosano come tracciante delle combustioni di biomassa, e, o il rinvenimento di tale composto in aree remote del pianeta, lontano dalle fonti di emissione, evidenzia il suo trasporto a lunga distanza. Il levoglucosano infatti è stato rinvenuto nelle zone polari [Stohl et al., 2007, Fu et al., 2009; Zangrando, R., et Al 2013], nel ghiaccio antartico (4-30 pg mL⁻¹) [Gambaro, et al, 2008] e nella neve della Groenlandia [Kehrwald, N, et al. 2012], in aree remote dell'Oceano Atlantico [Simoneit B.R.T. et al., 2000] e dell'Oceano Pacifico [Mochida, M., 2010]. Queste pubblicazioni riportano la presenza del levoglucosano nelle aree remote e confermano la sua affidabilità come tracciante per il trasporto di aerosol a lunga distanza per lo studio di fenomeni di “*biomass burning*”.

Alcuni ricercatori, recentemente, hanno esaminato la possibilità di utilizzare il rapporto tra le concentrazioni di levoglucosano e mannosano nell'aerosol come “*marker*” per identificare il tipo di biomassa bruciata [Schmidl et al., 2008]. Questo perché le piante erbacee, a parità di quantità di cellulosa e quindi di levoglucosano prodotto, contengono emicellulosa a maggior contenuto di mannosio [Schmidl et al., 2008]. Di conseguenza l'aerosol prodotto dalla loro combustione presenta un rapporto tra le concentrazioni dei due anidro-zuccheri anche 10 volte inferiore rispetto al medesimo rapporto fatto su un aerosol derivante da incendi di foreste. Il mannosano sembra essere presente in quantità elevate nell'aerosol prodotto da combustioni di conifere, con valori anche 5 volte superiori rispetto a quanto riscontrato in quello derivante da alberi decidui [Schmidl et al., 2008]. Il rapporto tra le concentrazioni di levoglucosano/galactosano invece sembra essere utile per distinguere l'aerosol prodotto da combustioni di fogliame ($\approx 1,21-1,46$) o di legname ($\approx 20-50$) [Schmidl et al., 2008].

2.2) Metossifenoli

I metossifenoli sono una classe di composti costituiti da un anello fenolico al quale sono legati uno o più gruppi metossile (-CH₃O). Sono polari, idrosolubili, e presentano una reattività in atmosfera molto variabile a seconda del tipo di molecola [Simpson, C.D.,2005]. Anche la volatilità non è una caratteristica costante, ma varia da molecola a molecola; i composti meno volatili si presentano esclusivamente adesi a matrici o al particolato [Naeher, L.P., 2005]. Generalmente è possibile rintracciarli nel PM₁₀ e, in quantità notevole, nel PM_{2.5} [Simpson, C.D.,2005].

I metossifenoli derivano dalla combustione della lignina. La lignina è composta da tre alcol precursori: alcol cumarilico, alcol coniferilico, alcol sinapilico (Fig. 7). L'abbondanza relativa di questi nelle diverse specie di piante, permette di effettuare la seguente classificazione:

- **“lignina softwood”**: nella struttura prevale l'alcol coniferilico (Fig. 10), mentre l'alcol cumarilico è presente in quantità minore. È quindi caratterizzata da composti principalmente di tipo guaiacilico (ovvero con un solo gruppo metossile nel nucleo benzenico). Questa struttura è tipica delle gimnosperme (conifere).

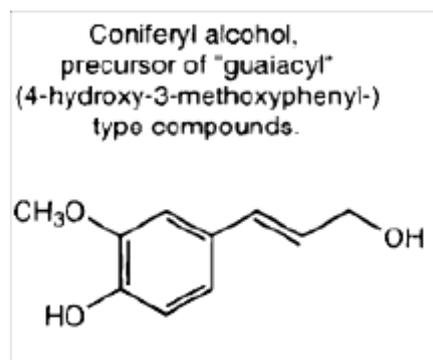


Figura 10: alcol coniferilico [Schauer, J. 2001].

- **lignina “hardwood”**: predominano l'alcol coniferilico e sinapilico (Fig. 11) sull'alcol cumarilico. È caratterizzata da composti sia di tipo guaiacilico che siringilico (aventi cioè due gruppi metossile nell'anello benzenico). Con questa classe si identifica la famiglia delle angiosperme

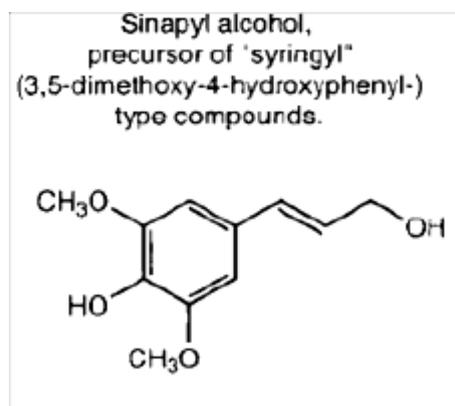


Figura 11: alcol sinapilico [Schauer, J. 2001].

- **lignina erbacea**: contiene quantità significative di derivati di alcool p-cumarilico (Fig. 12), denominati nuclei anisilici. I derivati siringilici e guaiacilici sono presenti in quantità ridotta. Questa struttura è tipica delle monocotiledoni erbacee [Simoneit, B.R.T., 1993].

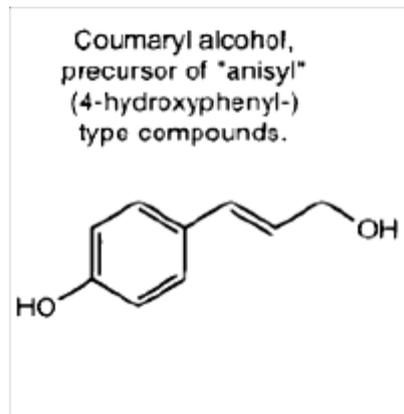
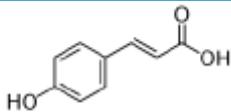
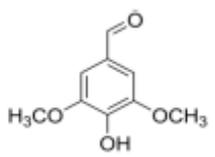
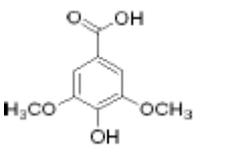
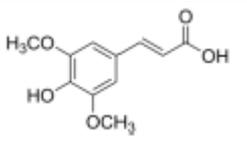
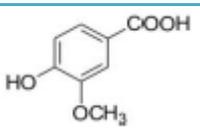
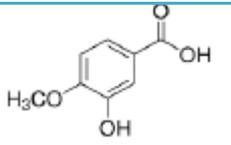
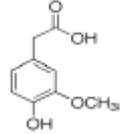
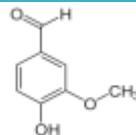
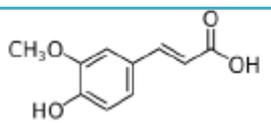


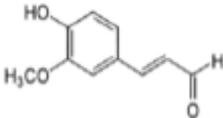
Figura 12: alcol cumarilico [Schauer, J. 2001].

I metossifenoli sono rilasciati in forma gassosa, ma al diminuire della temperatura tendono a condensare sulla superficie delle particelle. Questo suggerisce che la frazione di metossifenoli gassosi rintracciabili nell'aerosol sia composta soprattutto dalle specie più volatili, mentre gli altri sono adesi alla superficie del particolato [Kjällstrand, J.,2000].

In questo lavoro, finalizzato allo studio dei composti sottoposti a trasporto a lunga distanza, sono stati presi in considerazione solo alcune delle decine di metossifenoli presenti nell'aerosol, ovvero quelli caratterizzati da elevati fattori di emissione. Confrontando gli "*Emission Factor*" dei numerosi metossifenoli prodotti da "*biomass burning*" sono stati quindi scelti i più abbondanti [Iinuma, Y.,2007; Hoffmann, D.,2007] (tabella 4).

Tabella 4: metossifenoli oggetto di studio e le loro principali caratteristiche

NOME	SIGLA	PM	FORMULA CHIMICA	STRUTTURA CHIMICA
Anisil-derivato				
Acido p-coumarico	PA	164	$C_9H_8O_3$	
Siringil-derivati				
Siringaldeide	SyAH	182	$C_9H_8O_4$	
Acido siringico	SyA	198	$C_9H_8O_5$	
Acido sinapico	SA	224	$C_{11}H_{12}O_5$	
Guaiacil-derivati				
Acido vanillico	VA	168	$C_8H_8O_4$	
Acido isovanillico	IVA	168	$C_8H_8O_4$	
Acido omovanillico	HVA	182	$C_9H_{10}O_4$	
Vanillina	VAN	152	$C_8H_8O_3$	
Acido Ferulico	FA	194	$C_{10}H_{10}O_4$	

Coniferaldeide	CAH	178	C ₁₀ H ₁₀ O ₃	
----------------	-----	-----	--	---

Questi composti vengono utilizzati come traccianti ambientali di combustione della lignina [Hawthorne, S.B. 1989; Simoneit B.R.T., 2002]. Oltre ad essere traccianti della combustione di biomassa in generale, l'analisi della distribuzione dei metossifenoli nel particolato atmosferico può fornire informazioni riguardo il tipo di piante dalle quali si sono originati. Per esempio, guaiacilnuclei sono potenziali traccianti di generale combustione della lignina, essendo emessi sia dagli hardwood che dai "softwood" [Hawthorne, S.B. 1989]. Mentre l'abbondanza di soli composti siringilici indica invece combustione di Angiosperme, poiché questi derivati sono traccianti esclusivamente degli "hardwood". Pertanto lo studio di questi composti nel particolato atmosferico potrebbe facilitare la comprensione delle sorgenti di emissione e del trasporto a lungo raggio dei composti di combustione.

In letteratura esistono pochi articoli sull'uso dei metossifenoli come traccianti della combustione di biomassa. Hawthorne, S.B. 1989 ha rintracciato tali composti nelle emissioni di stufe e caminetti. Lo stesso autore ha riportato un livello totale di questi composti in un range di 354-3510 ng m⁻³, in campioni (PM₁₀ e fase gassosa) raccolti con filtri in fibra di quarzo nell'inverno 1988-89 a Minneapolis. Schauer et al. (2001) hanno descritto i livelli degli analiti in questione nell'inverno 1995 a San Joaquin Valley, Fresno, Bakersfield e al Kern Wildlife Refuge (California): la somma dei metossifenoli è risultata nell'intervallo tra 0,4 e 876 ng m⁻³, con un picco di concentrazione rilevato durante un incendio boschivo nell'area di Fresno (livello delle polveri sottili: 55 ng m⁻³). Simpson et al. (2005) hanno analizzato campioni raccolti nella città di Seattle, trovando una concentrazione media totale tra 20 e 25 ng m⁻³, valore però non confrontabile con i precedenti studi date le differenze nel campionamento e nelle metodologie di trattamento del campione ed analisi. Kjällstrand J. (2000) ha osservato l'elevata emissione di tali composti (dell'ordine di 1g Kg⁻¹ di biomassa bruciata) durante un incendio boschivo in Scandinavia.

Alcuni studi sono stati condotti sulla stabilità in atmosfera dei metossifenoli. La degradazione atmosferica in fase gassosa dei metossifenoli avviene a seguito di reazioni con il radicale ossidrilico di giorno, e con il radicale nitrato di notte. L'aggiunta del radicale ossidrilico (·OH) provoca demetossilazione e formazione di un radicale fenolico con liberazione di metanolo (Fig. 13) [Coeur-Tourneur, C., 2010].

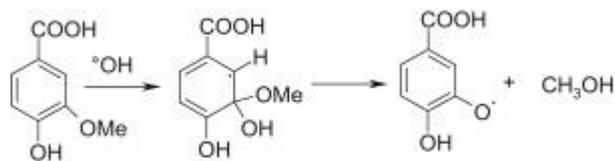


Figura 13: Reazione di demetossilazione dell'acido vanillico [O'Neill, P., 1977]

Coeur-Tourneur, C. (2010), ha valutato il tempo di vita in atmosfera di alcuni metossifenoli a contatto con il radicale ossidrilico. Tale stima ha portato ad un coefficiente di velocità della reazione (primo in letteratura) di $7,5-9,5 \times 10^{-11} \text{ cm}^3/\text{molecole al secondo}$.

L'ozono gioca un ruolo importante solo nella degradazione dei composti contenenti sostituenti insaturi, mentre le molecole contenenti il gruppo funzionale carbonile sembra siano foto dissociate dalla radiazione solare incidente [Coeur-Tourneur, C., 2010].

Concludendo, la reattività dei metossifenoli in atmosfera dipende sia alla presenza del gruppo ossidrilico, sia alla presenza del gruppo metossile, anche se con contributo inferiore. Coeur-Tourneur et al. (2010) hanno infine calcolato il tempo di vita medio in atmosfera, che è risultato essere di 1,7-8,1 ore. Questo suggerisce che probabilmente non tutti i metossifenoli sono adatti all'utilizzo come tracciante molecolare [Coeur-Tourneur C., 2010].

3) *Strumentazione analitica*

3.1) *Cromatografia liquida / spettrometria di massa*

Le analisi condotte nel corso di questo lavoro di tesi sono state eseguite mettendo a punto una tecnica ifenata LC/MS che accoppia un cromatografo liquido, grazie al quale si possono separare gli analiti presenti in una miscela complessa, ad uno spettrometro di massa in grado di analizzare gli ioni prodotti dagli analiti in base al loro rapporto m/z, che funge da rilevatore.

Gli strumenti utilizzati per questo lavoro sono:

- **cromatografo UHPLCTM** (Ultra High Performance Liquid Chromatography) UltiMate 3000 (Thermo Fisher ScientificTM, DionexTM Germania);
- **cromatografo HPI^{CTM}** (high - pressure ion chromatography) Thermo ScientificTM DionexTM ICS-5000 (Thermo Fisher Scientifici^{CTM}, Germania);
- **cromatografo HPLCTM** (High Performance Liquid Chromatography) Agilent 1100 (Agilent, Waldbronn, Germania);
- **spettrometro di massa** ad altissima risoluzione LTQ Orbitrap[®] XL (Thermo Fisher ScientificTM, Germania) con sorgente ESI e APCI;
- **spettrometro di massa** a triplo quadrupolo API 4000TM (Applied Biosystem/MDS SCIEX, Concord, Ontario, Canada) con sorgente ESI.

3.2) *Cromatografia liquida*

3.2.1) *High - pressure ion chromatography HPIC o IC*

La cromatografia ionica (IC) è una tecnica di cromatografia liquida ad elevate prestazioni che utilizza il principio dello scambio ionico per separare specie cariche. I processi di scambio ionico si basano su equilibri di scambio tra ioni in soluzione e ioni con carica di ugual segno presenti sulla superficie di un solido insolubile ad alto peso molecolare [Skoog A.D. et al., 2007].

La fase stazionaria è costituita sostanzialmente da una resina a scambio ionico, ovvero da una matrice polimerica a cui sono legati dei gruppi funzionali scambiatori, capaci di scambiare in modo reversibile i loro controioni con altri ioni aventi cariche dello stesso segno. Le più comuni colonne

per IC sono costituite da riempimenti a granuli pellicolari in cui la superficie di sfere di vetro non porose, di dimensioni relativamente grandi (30-40 μm), o di granuli polimerici, viene rivestita con resina sintetica a scambio ionico. Un secondo tipo di riempimento viene preparato rivestendo micro particelle porose di silice, come quelle utilizzate nella cromatografia di assorbimento, con una sottile pellicola (1-3 μm) di scambiatore. In entrambi i casi si ha una diffusione rapida nella pellicola polimerica con conseguente aumento dell'efficienza, lo svantaggio del primo caso è la ridotta capacità di carico del campione. Gli scambiatori di cationi contengono gruppi acidi solfonici (fortemente cationici) o gruppi acidi carbossilici (debolmente cationici), mentre gli scambiatori di tipo anionico possiedono gruppi ammonio quaternari [Skoog A.D. et al., 2007].

Nella cromatografia a scambio ionico le fasi mobili sono soluzioni acquose che possono contenere piccole quantità di solventi organici disciolti in acqua. Spesso in queste fasi mobili è possibile rinvenire specie ioniche, generalmente sotto forma di soluzione tampone, con le quali è possibile regolare la forza ionica. Tale parametro è molto importante poiché è strettamente legato alla concentrazione ed alla carica degli ioni disciolti nell'eluente, ovvero si traduce nella misura del numero di controioni presenti nella fase mobile moltiplicata per la sua carica. Il numero di controioni presenti stabilisce il delicato equilibrio sui siti attivi dello scambiatore di ioni e permette che lo ione da analizzare sia alternativamente attratto e spostato, durante il suo movimento attraverso la colonna. Se la concentrazione di controioni nella fase mobile è troppo elevata, gli ioni del campione non troveranno alcun sito disponibile e non saranno pertanto ritardati. Al contrario, se la concentrazione di controioni è troppo bassa, gli ioni del campione non verranno eluiti dalla colonna [Skoog A.D. et al., 2007].

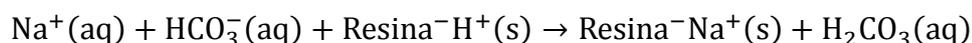
A seconda del tipo di analisi, e delle caratteristiche del rivelatore utilizzato, si possono avere due modalità operative:

- **sistemi a colonna singola:** in questi sistemi si usa una sola colonna riempita con resine a bassa capacità (in genere resine pellicolari). Come fasi mobili si utilizzano soluzioni tampone molto diluite ma, soprattutto, costituite da sali con ioni dotati di bassi valori di conduttanza equivalente. Nonostante ciò, la conduttanza di fondo dovuta all'eluente (soluzione tampone) risulterebbe comunque abbastanza alta, pertanto viene azzerata elettronicamente in modo tale per cui il rivelatore conduttometrico misuri solo quella dello ione da determinare, in uscita dalla colonna[Skoog A.D. et al., 2007]..
- **Sistemi a colonna doppia:** nella tecnica IC-MS, il problema principale è l'introduzione nello spettrometro di massa di specie non neutre, corrosive e poco volatili. Pertanto viene

inserita a valle della colonna cromatografica una seconda colonna chiamata di soppressione o semplicemente soppressore che ha il compito di eliminare o modificare tali composti. Il riempimento di tale colonna varia a seconda del tipo di analisi che si vuole condurre. Nel caso di analisi di cationi, si usa spesso come eluente acido cloridrico, e la colonna di soppressione è una resina a scambio anionico in forma di idrossido che produce acqua come prodotto di soppressione:



Ovviamente i cationi dell'analita non vengono trattenuti da questa seconda colonna. Invece, nel caso di separazione di anioni, il soppressore sarà costituito da una resina acida. Ipotizzando come eluente ioni bicarbonato o carbonato, la reazione di soppressione è la seguente:



Tale accorgimento viene utilizzato anche nel caso si utilizzi rilevatori di conducibilità; in tal caso il problema deriva dal segnale della fase mobile che tenderebbe a sovrastare quello prodotto dagli ioni dell'analita [Skoog A.D. et al., 2007].

3.2.1.1) HPIC™ ICS-5000

Lo strumento utilizzato per l'analisi del levoglucosano e dei suoi isomeri è HPIC™ (high - pressure ion chromatography) Thermo Scientific™ Dionex™ ICS-5000 (Thermo Fisher Scientific™) (Fig. 14).

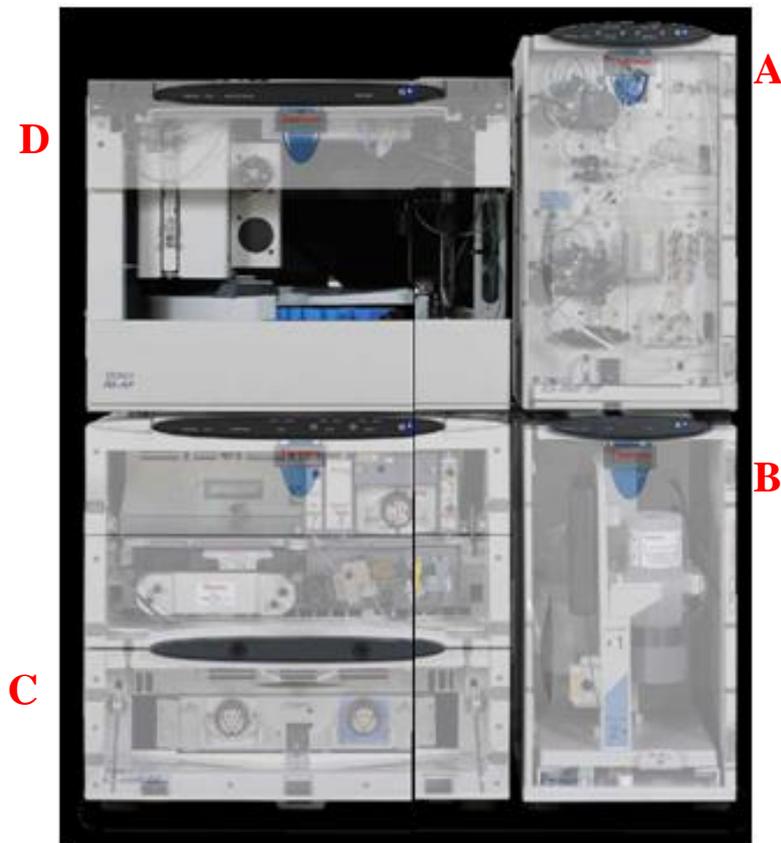


Figura 14: HPIC™ (high - pressure ion chromatography) Thermo Scientific™ Dionex™ ICS-5000 (Thermo Fisher Scientific™) con trasparenze che permettono la visualizzazione dei componenti interni [Thermo Fisher Scientific™ ,2012].

Osservando la figura, si possono individuare le componenti principali del sistema in questione:

- A) **Alloggiamento pompe:** il sistema utilizzato è provvisto di una pompa capillare isocratica e di una pompa analitica binaria che può operare sia in eluizione isocratica che a gradiente..
- B) **Generatore di eluente:** composto da una cartuccia di elettroliti e da una camera elettrostatica che genera l'eluente, partendo dall'acqua prelevata dalla pompa. L' eluizione può avvenire sia in condizioni isocratiche, che in gradiente di concentrazione. La variazione di concentrazione dell'eluente è il risultato combinato della variazione della quantità di elettroliti e della variazione dei potenziali in camera elettrostatica. Come in HPLC tale componente è dotato di degasser per evitare l'insorgere di bolle di bolle d'aria. Nel complesso, tale sistema è in grado di produrre eluenti di elevata purezza (partendo da acqua ultrapura), offrendo una garantendo riproducibilità durante tutta la corsa cromatografica dal momento che si dispone di un eluente sempre novo e fresco visto che viene preparato al momento dell'analisi.
- C) **Detector/Chromatography Module:** corpo centrale del cromatografo ionico, in cui è presente la valvola analitica quaternaria, dotata di internal loop, l'alloggiamento della colonna

cromatografica, il soppressore 2mm ASRS[®] 300 suppressor e il detector a conducibilità che funge da sistema di sicurezza per evitare che composti corrosivi entrino in sorgente API.

D) AS-AP autosampler

3.2.2) High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

La cromatografia liquida è una tecnica separativa che si basa sulla differente ripartizione degli analiti, presenti in una soluzione, tra una fase stazionaria e una fase mobile entro una colonna cromatografica. Questa tecnica consente di separare analiti polari, termolabili o difficilmente volatilizzabili non analizzabili tal quali, senza tecniche di derivatizzazione, tramite gas cromatografia. In base alla diversa affinità degli analiti per la fase stazionaria o la fase mobile essi vengono differentemente ritenuti ed eluiscono in tempi differenti. L'affinità con le fasi della colonna è data dalla diversa polarità e dalle diverse caratteristiche chimiche dei composti della miscela da separare: analiti con poca affinità con la fase stazionaria non vengono trattenuti ed eluiscono quindi velocemente spinti dalla fase mobile; viceversa analiti che presentano maggiore affinità saranno maggiormente trattenuti ed usciranno in tempi più lunghi [Skoog A.D. et al., 2007].

La fase stazionaria è caratterizzata da gruppi funzionali che, grazie anche alla fase mobile scelta, permettono di discriminare tra composti polari/apolari, ionici o neutri. Generalmente la fase stazionaria ha caratteristiche chimiche simili all'analita oggetto di studio, in modo da poter competere con successo nella ritenzione con la fase mobile e ottenere tempi di ritenzione adeguati [Skoog et al., 2007]. Generalmente tale fase è formata da particelle solide impaccate, di granulometria molto fine (tra 1.8 e 10 μm), alloggiata all'interno di una colonna adatta a sopportare le alte pressioni a cui lavora lo strumento (acciaio o peek). Per evitare l'intasamento della colonna causato da eventuale materiale presente nel campione, si inserisce a monte della colonna una colonna di guardia (lunga qualche millimetro e riempita con la stessa fase stazionaria della colonna) oppure filtri meccanici in linea di acciaio (porosità 2 μm) [Skoog et al., 2007].

La fase mobile può essere costituita da un liquido puro o da una miscela di solventi a composizione nota, che viene fatta fluire attraverso la fase stazionaria della colonna cromatografica. Per quanto riguarda l'eluizione questa può essere isocratica, in cui i solventi fluiscono con la stessa composizione durante tutta la corsa cromatografica, oppure a gradiente di polarità, in cui si variano le quantità relative dei solventi nel corso dell'analisi [Skoog et al., 2007].

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

3.2.2.1) UHPLC UltiMate 3000

L'UHPLC™ (Ultra High Performance Liquid Chromatography) UltiMate 3000 (Thermo Fisher Scientific™) (figura 15) è un UHPLC modulare in cui sono presenti le componenti di seguito elencate:



Figura 15: l'UHPLC™ (Ultra High Performance Liquid Chromatography) UltiMate 3000 (Thermo Fisher Scientific™).

- 1) **degasser**, sistema che consente di eliminare eventuali bolle presenti nel solvente le quali potrebbero compromettere l'efficienza cromatografica ed eventualmente il funzionamento dei rivelatori. Funge anche da vassoio per l'alloggiamento delle bottiglie di solvente;
- 2) **alloggiamento delle pompe** Lo strumento è dotato di due pompe: la fase mobile può essere pompata sia da una pompa analitica (RLSC analytics, flusso massimo 5 ml min^{-1}) che da una nano pompa (RSLC nano system flusso massimo $1,5 \text{ } \mu\text{l min}^{-1}$) permettendo di operare una separazione cromatografica anche a flussi molto bassi;
- 3) **vano termostato** in cui è alloggiata la colonna analitica;

4) **auto campionatore**: dotato di vano porta campione refrigerato.

3.2.2.2) HPLC Agilent 1100

Un altro strumento utilizzato in questo lavoro di tesi è HPLC™ (High Performance Liquid Chromatography) Agilent 1100 (Agilent, Waldbronn, Germania) (Fig. 16).



Figura 16: HPLC™ (High Performance Liquid Chromatography) Agilent 1100 (Agilent, Waldbronn, Germania) [Agilent Technologies, 1999]

Le componenti di questo cromatografo liquido sono:

- 1) Serbatoio Solventi;
- 2) alloggiamento pompa binaria e degaser;
- 3) auto campionatore;
- 4) alloggiamento termostato per colonna cromatografica
- 5) detector UV, opzionale non utilizzato in questo lavoro
- 6) pannello di controllo.

3.3) Spettrometria di massa

La spettrometria di massa è una tecnica analitica (qualitativa e quantitativa) che permette identificazione degli ioni ottenuti dalla ionizzazione degli analiti presenti in miscele complesse sulla base del diverso rapporto massa/carica (m/z). Permette inoltre di fornire una misura dell'abbondanza relativa dei singoli ioni, fornendo un'analisi qualitativa.

Le componenti principali di uno spettrometro di massa possono essere schematizzate nel seguente diagramma a blocchi (Fig. 17):

- 1) nella avviene la volatilizzazione e ionizzazione delle molecole;
- 2) analizzatore di massa, che ha il compito di separare gli ioni in base al rapporto massa/carica m/z ;
- 3) detector (o rivelatore), che ha lo scopo di trasformare il fascio di ioni in segnale elettrico, che verrà poi elaborato da alcuni software.

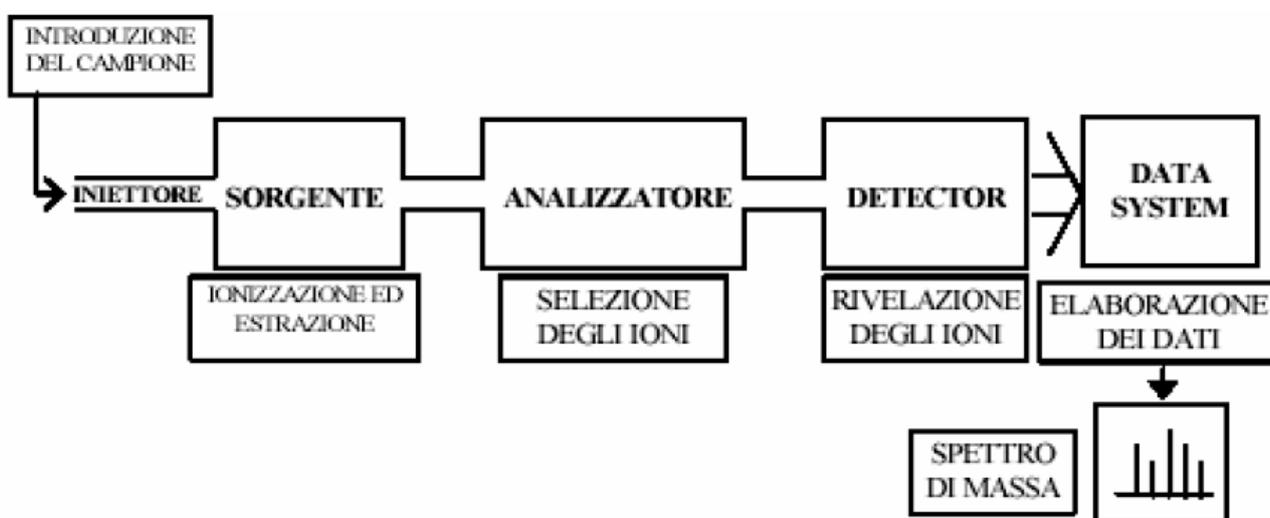


Figura 17: Schema a blocchi delle componenti principali di uno spettrometro di massa.

3.3.1) Sorgenti di ionizzazione

Le tecniche di ionizzazione più diffuse nell'accoppiamento HPLC/MS sono le sorgenti API (Atmospheric Pressure Ionization), nei modelli ESI (Electrospray Ionization) e APCI (Atmospheric Pressure Chemical Ionization); tali sorgenti si definiscono “soft”, poiché provocano una scarsa frammentazione del campione generando ioni molecolari protonati o deprotonati. La sorgente di ionizzazione ha il compito di ionizzare gli analiti, rimuovere completamente l'eluente e costituire un'interfaccia in grado di trasmettere gli ioni all'analizzatore senza perturbarne il vuoto [Skoog A.D. et al., 2007]. Tale compito è particolarmente importante e arduo quando si ha

l'accoppiamento tra uno spettrometro di massa e un cromatografo liquido come l'HPLC o l'HPIC, poichè i componenti che costituiscono lo spettrometro di massa sono mantenuti, mediante delle pompe di aspirazione, in un ambiente a bassissima pressione ($10^{-5} \div 10^{-10}$ torr) [Skoog A.D. et al., 2007].

3.3.1.1) Electospray Ionization (ESI)

L'ESI è una tecnica di ionizzazione che attraverso l' elettro-nebulizzazione converte ioni in soluzione in ioni in fase gassosa. Questo tipo di sorgente è adatta alla ionizzazione di molecole tremolabili o ad alto peso molecolare, e per composti che tendano a formare spontaneamente ioni in soluzione (generalmente composti polari e piccole molecole ma anche proteine, peptidi e polimeri industriali). La ionizzazione elettrospray avviene a pressione atmosferica, mentre la temperatura può essere aumentata, per migliorare l'evaporazione del solvente e la declusterizzazione.

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

La combinazione di potenziale elettrico e flusso di gas genera uno spray di gocce cariche, di diametro di qualche micron (1-60 μm), che è indirizzato un sistema di contro elettrodi, che funge da interfaccia tra la zona a pressione ambiente della sorgente e il vuoto spinto dell'analizzatore.

Durante il tragitto verso l'entrata dell'analizzatore, il diametro delle gocce viene ancora ridotto grazie ad un processo denominato desolvatazione. Tale processo è favorito dall'elevata temperatura della sorgente e dalla presenza di un flusso di gas ausiliario che ha il compito di assistere la nebulizzazione del campione e nell'evaporazione del solvente.

Il processo porta ad un progressivo aumento di densità di carica superficiale, fino al raggiungimento del "limite di Rayleigh", limite in cui la tensione superficiale della goccia non sopporta più la repulsione coulombiana fra le cariche. La goccia si disgrega, per esplosione "colombiana" liberando una miriade di goccioline di dimensione inferiori. Tale meccanismo si ripete fino alla completa evaporazione del solvente, con conseguente formazione di ioni desolvati di carica unitaria o multipla di analita in fase gas. Il processo e le componenti della sorgente sono schematizzate in figura 18.

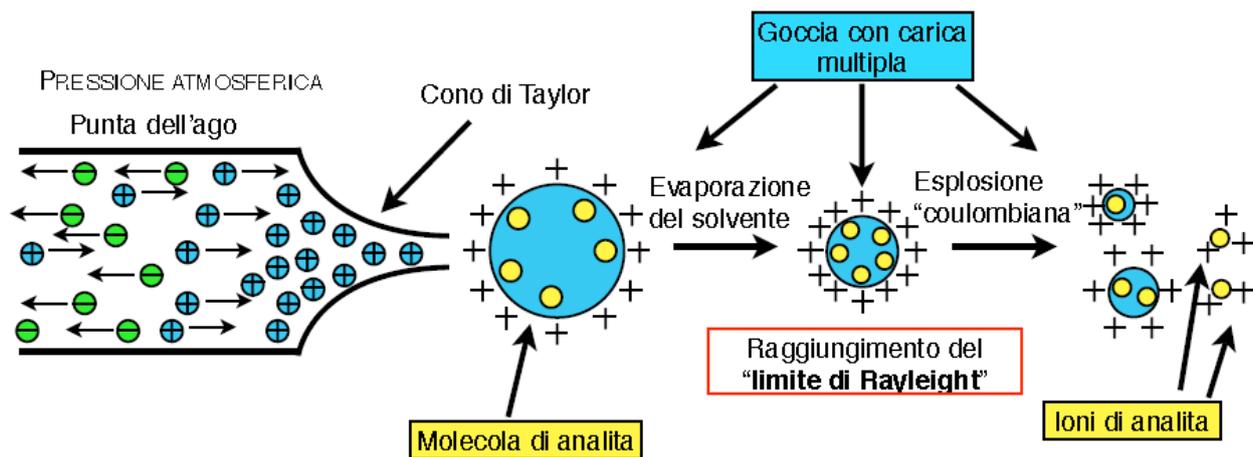


Figura 18: Schema delle componenti della sorgente e del processo di ionizzazione ESI in polarità positiva [Thermo Fisher Scientific™, 2008].

3.3.1.2) Atmospheric Pressure Chemical Ionization (APCI)

La tecnica di ionizzazione Atmospheric Pressure Chemical Ionization (APCI), può essere applicata per la ionizzazione di composti di piccole dimensioni, caratterizzati da una certa volatilità e bassa o media polarità. Il tutto è rappresentato in figura 19.

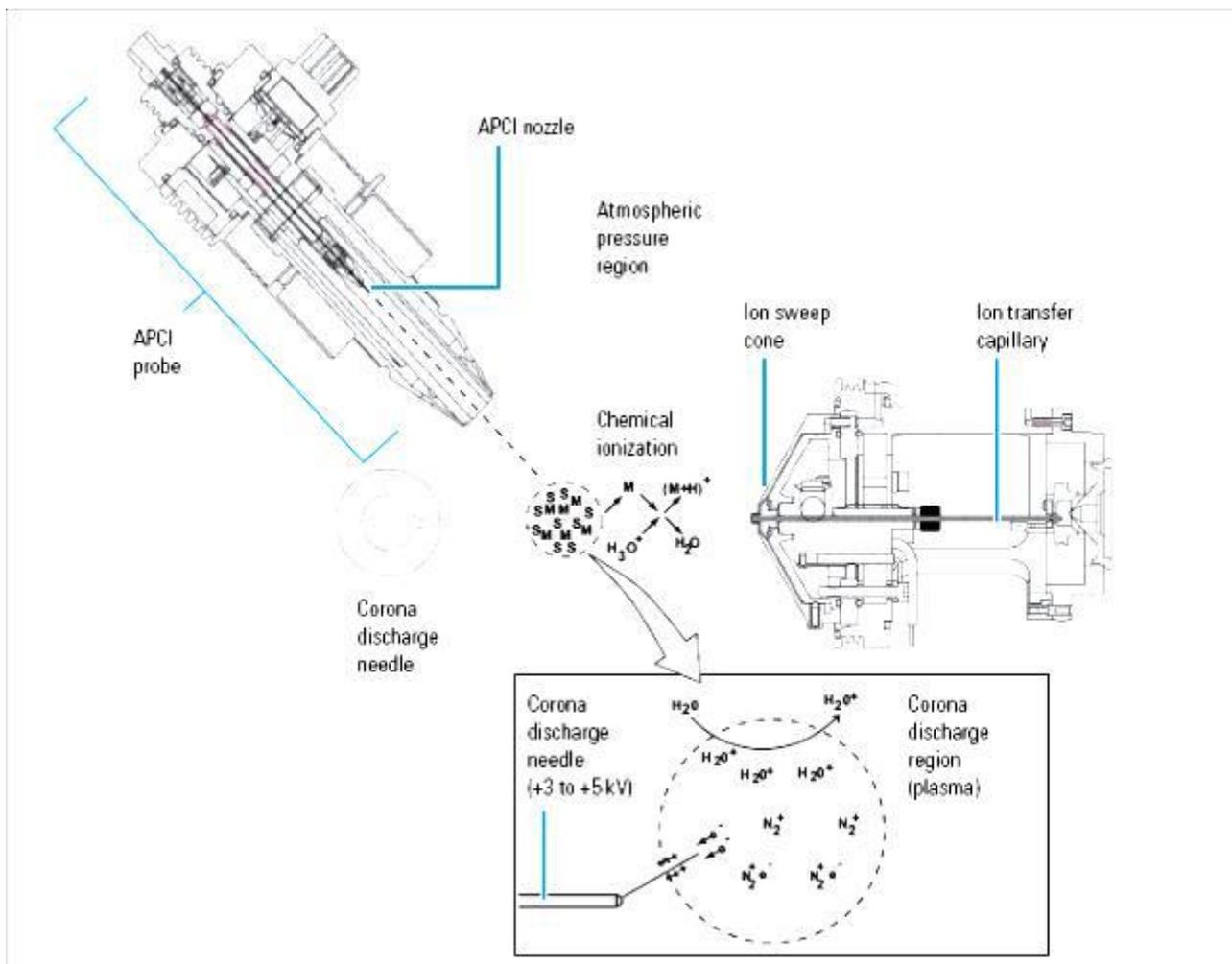


Figura 19: Processo di ionizzazione APCI in polarit  positiva [Thermo Fisher Scientific™,2008]

L'introduzione della soluzione da analizzare   condotta mediante un nebulizzatore pneumatico. La soluzione   convertita in spray all'interno di una camicia tubolare riscaldata ad alta temperatura. Gli analiti vaporizzati sono poi sottoposti a ionizzazione a pressione atmosferica. La ionizzazione delle molecole di gas (N_2), le quali provengono dal flusso di gas,   permessa dalla carica a corona applicata all'ago (figura 19). Gli ioni cos  prodotti reagiscono con le molecole di solvente vaporizzato, formando nuovi ioni in fase gassosa che, a loro volta, reagiscono con le molecole dell'analita in fase vapore portando alla ionizzazione dell'analita stesso. La formazione di ioni negativi   favorita dalla presenza di basi forti in fase gas, mentre quella di ioni positivi   legata alla presenza di acidi forti. La sorgente APCI   generalmente usata con una velocit  di flusso che varia tra 50 e $2000 \mu\text{L min}^{-1}$ [Thermo Fisher Scientific™,2008].

3.3.2) LTQ Orbitrap[®] XL

Lo strumento utilizzato per le analisi di entrambe le classi di analiti oggetto di studio è lo spettrometro di massa ad alta risoluzione LTQ Orbitrap[®] XL (Thermo Fisher Scientific[™]) (Fig. 20).



Figura 20: fotografia strumento LTQ Orbitrap XL [Thermo Fisher Scientific[™], 2008].

Le componenti principali di tale strumento, sono schematizzate nella figura 21.

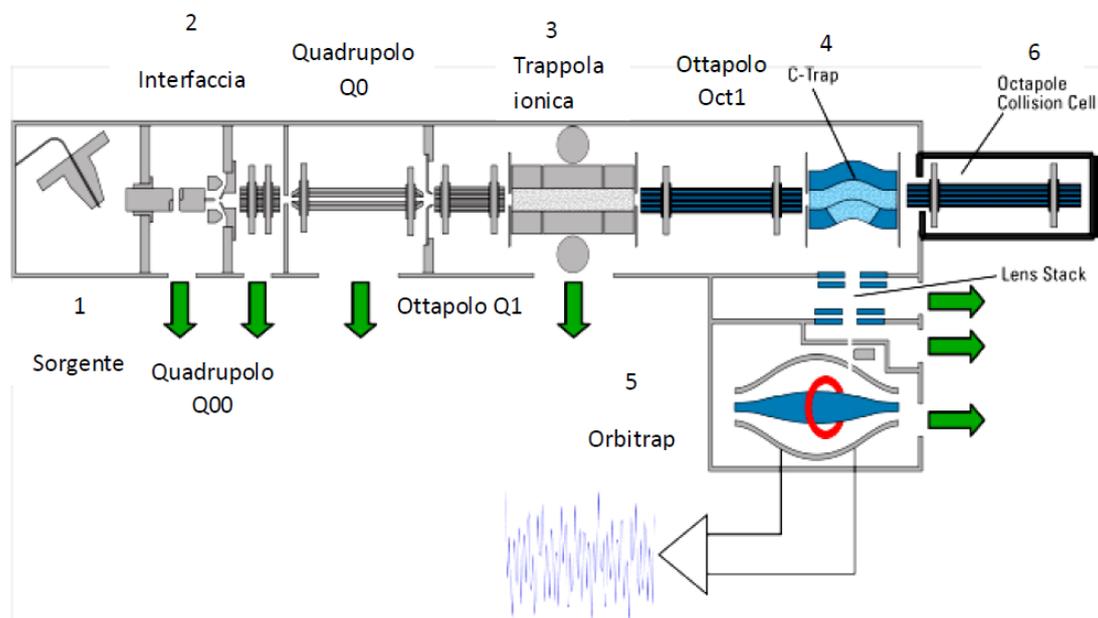


Figura 21: vista schematica dello strumento LTQ Orbitrap XL [Thermo Fisher Scientific[™], 2008].

I numeri riportati nella figura si riferiscono a:

- 1) sorgente ionica;
- 2) zona d'interfaccia e di focalizzazione degli ioni;
- 3) la trappola ionica (selezione e frammentazione degli ioni);
- 4) C-trap: dispositivo intermedio di stoccaggio degli ioni richiesto per iniezione degli ioni in brevi impulsi;
- 5) l'analizzatore Orbitrap per l'analisi ad alta risoluzione in trasformata di Fourier;
- 6) cella di collisione per esperimenti di frammentazione HCD ad alta energia.

Come si può notare dal precedente schema, lo strumento LTQ Orbitrap XL è definito uno spettrometro di massa “ibrido” a causa della presenza di più analizzatori di massa: trappola ionica, Orbitrap e dalla cella di collisione HCD. Questo si traduce in diverse modalità operative a seconda delle componenti “accese o spente” e delle modalità in cui operano le componenti attive. In modalità “*Full scan*” (utilizzata in questo lavoro di tesi) si analizzano tutti gli ioni prodotti dalla sorgente all'interno di un intervallo di masse prefissato. La modalità può essere effettuata utilizzando la trappola ionica (bassa risoluzione) o l'analizzatore Orbitrap (alta risoluzione, utilizzata in questo lavoro). Un'altra modalità in cui si può operare è il MS/MS, facendo collidere gli ioni con molecole di gas inerte in trappola ionica e analizzando i frammenti in bassa risoluzione, tramite detector della trappola ionica, o in alta risoluzione tramite l'Orbitrap. La frammentazione può avvenire anche nella HDC (Higher Energy Collisional Dissociation) con successive analisi in alta risoluzione tramite l'Orbitrap (i frammenti prodotti in HCD vengono analizzati solo tramite Orbitrap).

Il principale vantaggio nell'utilizzo di uno strumento come LTQ Orbitrap XL risiede nell'alta risoluzione e accuratezza dell'analisi delle diverse masse.

Si definisce potere risolvete, la capacità di uno spettrometro di differenziare le masse, nel caso dell'Orbitrap l'espressione è la seguente (2):

$$R = \frac{m}{\Delta m} \quad [2]$$

dove m è la massa del picco e Δm è l'ampiezza del picco alla metà della sua altezza (FWHM: Full Width at Half Maximum peak height). L'LTQ Orbitrap può lavorare a diversi valori di risoluzione (7500, 15000, 30000, 60000) fino ad un massimo di 100000 ad un valore m/z di 400 [Perry H., R., 2008].

Un altro parametro importante è l'accuratezza di massa, che dipende direttamente dalla capacità di uno strumento di separare i picchi adiacenti, e quindi dalla risoluzione [Richard H. P. 2008]. La

stima dell'accuratezza di massa è espressa mediante il valore dell'errore sulla massa misurata, espressa in parti per milione (ppm), è determinato dalla funzione (3):

$$e_m = \frac{m_a - m_t}{m_t}$$

[3]

dove m_a = massa accurata misurata strumentalmente; m_t = massa esatta teorica [Wung, M., G., 2005].

La capacità di misurare la massa di un composto con un'accuratezza adeguata determina direttamente la possibilità di ottenere la sua composizione elementare. Perché ciò sia possibile lo strumento deve essere scrupolosamente calibrato: la calibrazione esterna è effettuata al massimo ogni 48 ore mediante l'infusione diretta di una miscela di composti noti (caffaina, tetrapeptide MRFA e Ultramark 1621), in un range di massa da 50 a 2000 m/z e consente di ottenere un'accuratezza di massa di 5 ppm. Una migliore accuratezza, fino a 2 ppm, si può ottenere utilizzando una calibrazione interna impiegando uno ione di riferimento a massa nota, derivante da una molecola (presente in miscele di solventi, o un eventuale interferente, contaminante o da specie introdotte volutamente) detta "lock mass", di cui si conosce con precisione analitica la massa esatta. [Makarov, Scigelova, 2010]

L'analizzatore di massa Orbitrap (Fig.22) è costituito da un elettrodo centrale a forma di fuso attorno al quale ruotano gli ioni, posto all'interno di un secondo elettrodo a forma di campana. Gli ioni sono mantenuti all'interno dell'analizzatore grazie all'azione di campi elettrici.

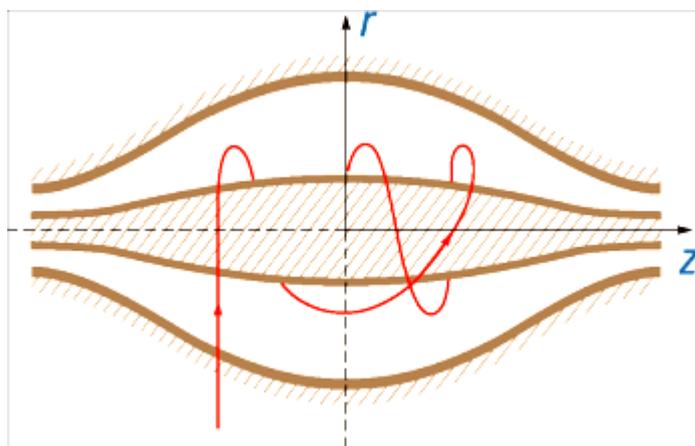


Figura 22: Vista schematica dell'analizzatore Orbitrap ed esempio di traiettoria ionica stabile [Thermo Fisher Scientific™, 2008].

All'interno dell'analizzatore, gli ioni con traiettoria stabile (freccia rossa nella figura 22), descrivono delle oscillazione armoniche lungo l'asse z dell'elettrodo centrale, la cui frequenza ω è proporzionale (tramite una costante K) al rapporto massa su carica (m/z) (4).

$$\omega = \sqrt{\frac{K}{m/z}}$$

[4]

L'oscillazione degli ioni sopra descritta genera una corrente immagine, rilevata dall'elettrodo esterno. Analizzando tale corrente tramite una Fast “*Fourier Transformation*” (FTT, Trasformata di Fourier veloce) si ottiene le frequenze di oscillazione dei vari ioni e di conseguenza, tramite la 4, il rapporto m/z.

Prima di entrare nell'analizzatore orbitrap, gli ioni percorrono un ottapolo RF (Oct1) e raggiungono una trappola lineare curva contenente gas chiamata C-Trap che ha il compito di diminuirne l'energia (“raffreddarli”, tramite dissipazione dell'energia mediante collisione con le molecole di gas) ed indirizzarli all'interno dell'analizzatore. I voltaggi applicati agli elettrodi della C-Trap creano una barriera di potenziale lungo il suo asse, permettendo la concentrazione degli ioni in stretto fascio (“schiacciamento”) che viene poi focalizzato, mediante delle lenti, fino all'entrata dell'Orbitrap. Tale sistema crea di pacchetti di ioni di ugual rapporto massa su carica, lunghi solo qualche millimetro, che entrano mediante un'apposita apertura nell'analizzatore (Fig. 23).

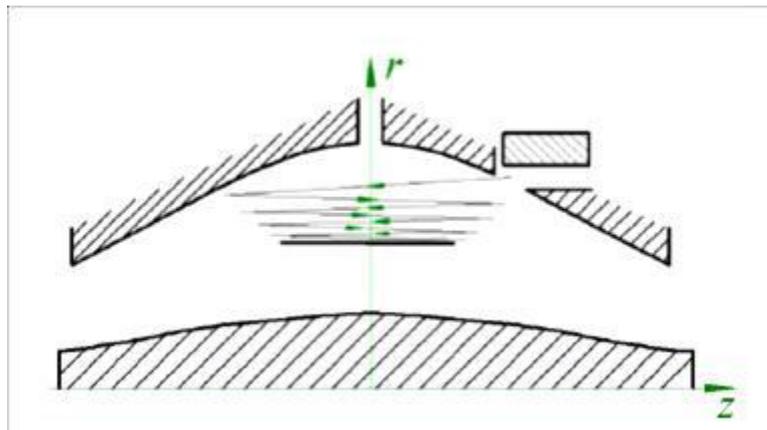


Figura 23: Principio di “schiacciamento” degli ioni all’interno dell’Orbitrap che avviene con l’aumento della forza del campo elettrico applicato [Thermo Fisher Scientific™, 2008].

Osservando la figura 23 si può notare come gli ioni, che vengono iniettati ad una certa distanza dall'equatore dell'Orbitrap, compiano un'oscillazione assiale coerente. L'applicazione di potenziali elettrici all'elettrodo centrale dell'Orbitrap impedisce non solo la collisione degli elettroni con l'elettrodo stesso, ma favorisce lo “schiacciamento” di questi, contraendo il raggio della nube ionica e permettendo l'entrata di ulteriori ioni (generalmente caratterizzati da un rapporto m/z maggiore) nell'analizzatore.

Quando tutti i pacchetti di ioni sono entrati, il potenziale dell'elettrodo interno viene mantenuto stabile e costante al fine di permettere una corretta rilevazione delle correnti immagine senza incorrere in variazioni di massa.

Come visto nelle figure 22 e 23 gli ioni compiono traiettorie stabili all'interno dell'Orbitrap, combinando oscillazioni lungo l'asse z con rotazione attorno all'elettrodo centrale e vibrazioni nella direzione radiale.

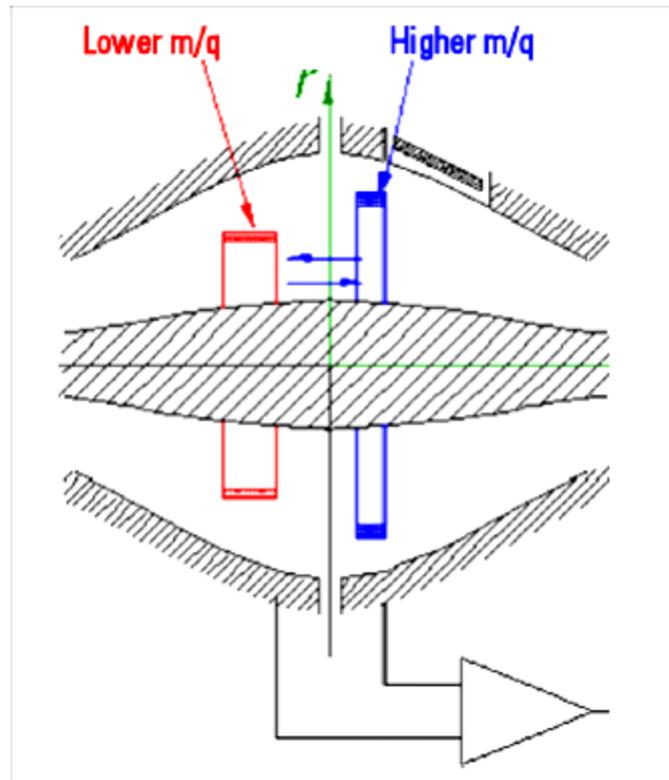


Figura 24: Forma approssimata dei pacchetti ionici di diverso m/z in seguito alla stabilizzazione dei potenziali [Thermo Fisher Scientific™, 2008].

Per ogni valore di m/z solo il valore di frequenza delle oscillazioni assiali è completamente indipendente dai parametri ionici iniziali, mentre i valori di frequenza rotazionali e radiale mostrano forti dipendenze dal raggio iniziale e dall'energia. Quindi, ioni con lo stesso m/z continuano ad oscillare lungo l'asse z insieme rimanendo in fase per molte migliaia di oscillazioni. Invece, le frequenze di moto radiale e rotazionale varieranno leggermente in base a piccole differenze dei parametri iniziali. Di conseguenza, nella direzione radiale gli ioni defasano con una velocità di ordini di grandezza superiore a quella nella direzione assiale, in un processo che avviene in un periodo di sole 50-100 oscillazioni. In seguito a questo, i pacchetti di un dato m/z assumono la forma di un anello con gli ioni uniformemente distribuiti lungo la sua circonferenza.

A causa della diffusione angolare e radiale, le frequenze radiali e rotazionali non possono apparire in uno spettro di massa misurato. Intanto, le oscillazioni assiali persisteranno e lo spessore dell'anello di ioni rimarrà piccolo in confronto all'ampiezza assiale. L'elettrodo esterno è diviso in due parti a $z = 0$, muovendosi da una metà all'altra dell'elettrodo esterno, tale anello di ioni indurrà una corrente immagine su ciascuna metà dell'elettrodo esterno. Queste correnti opposte saranno amplificate in modo differenziale ottenendo un segnale che sarà sottoposto a conversione analogico/digitale e poi processato mediante l'algoritmo della trasformata di Fourier veloce [Thermo Fisher Scientific™,2008].

3.3.3) Triplo quadrupolo API 4000™



Figura 25: API 4000™ (Applied Biosystem/MDS SCIEX, Concord, Ontario, Canada)[Applied Biosystem, 2010].

Lo spettrometro di massa a triplo quadrupolo è composto da tre quadrupoli in linea (in altri spettrometri a triplo quadrupolo, le componenti possono essere orientate in maniera diversa): due analizzatori quadrupolari (Q1 e Q3) e la cella di collisione (Q2), posta fra loro come illustrato nella figura seguente (Fig. 26).

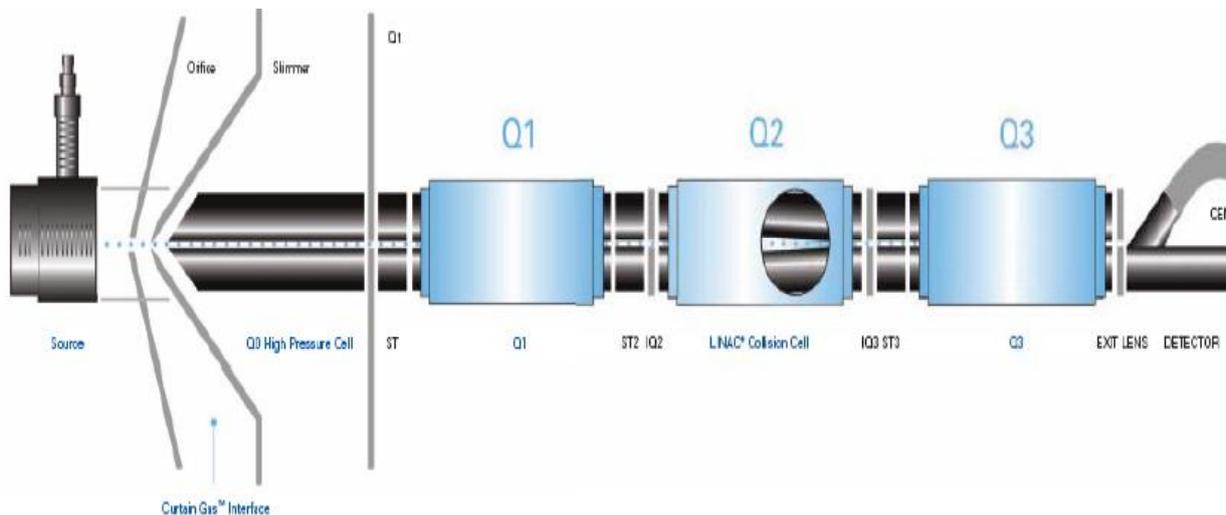


Figura 26: schema della distribuzione delle componenti dell' API 4000™ (Applied Biosystem/MDS SCIEX, Concord, Ontario, Canada)[Applied Biosystem, 2010]

Un ulteriore quadrupolo, chiamato Q0, è disposto anteriormente alla sequenza dei tre quadrupoli e ha l'unico compito di focalizzare l'entrata degli ioni al Q1.

Q1 e Q3 si comportano come filtri di massa, operando risoluzione unitaria (ampiezza di picco di $0,7 \pm 0,1$ a 50% dell'altezza del picco) invece Q2 costituisce la cella di collisione, dove a causa dell'elevata pressione (pressione massima di 8×10^{-3} torr) dovuta all'introduzione di gas (N_2 o Ar) si ha la frammentazione degli ioni precursori selezionati al Q1 in ioni frammento che saranno analizzati al Q3. L'uso della tecnica MS/MS in analisi quantitativa rispetto al metodo SIM è caratterizzata dalla riduzione del rumore di fondo, maggiore sensibilità e selettività.

Lo strumento presenta una notevole versatilità di utilizzo, con la possibilità di adottare diverse modalità operative di analisi, decidendo se utilizzare un solo quadrupolo oppure utilizzare tutti e tre i quadrupoli. In questo lavoro di tesi lo strumento è impiegato in modalità multiple reaction monitoring (MRM): selezione degli ioni di interesse in Q1, frammentazione dello ione in Q2, e selezione di alcuni ioni figli al Q3. Data l'elevata selettività e sensibilità ottenuta, l'MRM è la tecnica più usata per analisi quantitative (Fig.27).

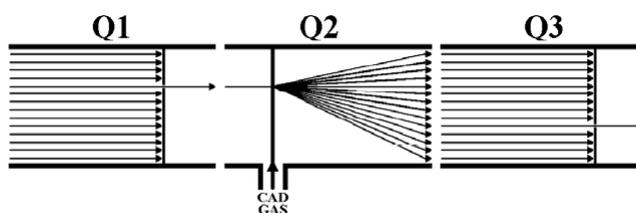


Figura 27: Multiple reaction monitoring.

3.4) Configurazioni strumentali impiegate

3.4.1) Analisi del levoglucosano

- **IC-orbitrap MS:** HPICTM ICS-5000 (Thermo Fisher), accoppiato tramite sorgente APCI (Atmospheric Pressure Chemical Ionization) allo spettrometro di massa ad altissima risoluzione LTQ Orbitrap® XL (Thermo Fisher);
- **HPLC-MS/MS:** HPLCTM Agilent 1100 (Agilent) accoppiato tramite sorgente ESI (Electro Spray Ionization) allo spettrometro di massa a triplo quadrupolo API 4000TM (Applied Biosystem).

3.4.2) Analisi dei metossifenoli

- **HPLC-orbitrap MS:** UHPLCTM UltiMate 3000 (Thermo Fisher), accoppiato tramite sorgente ESI (Electro Spray Ionization) allo spettrometro di massa ad altissima risoluzione LTQ Orbitrap® XL (Thermo Fisher);
- **HPLC-MS/MS:** HPLCTM Agilent 1100 (Agilent) accoppiato tramite sorgente ESI (Electro Spray Ionization) allo spettrometro di massa a triplo quadrupolo API 4000TM (Applied Biosystem).

4) Messa a punto del metodo analitico

Nello sviluppo di un metodo analitico strumentale LC/MS si seguono una sua serie di fasi durante le quali si presta particolare attenzione alla massimizzazione dell'efficienza del metodo stesso.

- 1) messa a punto delle condizioni strumentali dello spettrometro di massa, concentrandosi soprattutto sul tuning dell'ottica ionica e sui parametri operativi dell'analizzatore di massa;
- 2) sviluppo del metodo cromatografico, al fine di ottenere la migliore separazione degli analiti oggetto di studio, agendo sulle caratteristiche delle due fasi (fase stazionaria: utilizzo di colonne diverse; fase mobile: variazione nella composizione e nei gradienti dei solventi durante la corsa cromatografica) e sul flusso di eluizione;
- 3) Ottimizzazione dei parametri strumentali della sorgente di ionizzazione, agendo sui valori dei potenziali e sul flusso di gas applicati.

Una volta ottenuto il metodo strumentale ottimizzato si procede alla messa a punto e convalida della procedura pre-analitica, ovvero tutte quelle operazioni necessarie per l'estrazione e la purificazione degli analiti dal supporto di campionamento o dalla matrice. Al pari del metodo strumentale anche la procedura pre-analitica deve essere ottimizzata al meglio per evitare fenomeni di contaminazione, alterazione e perdita di analita che andrebbero ad invalidare l'intero metodo sperimentale.

Con la tecnica strumentale e la procedura pre-analitica ottimizzata e validata sarà possibile effettuare l'analisi dei campioni reali.

4.1) Spettrometro di massa: sviluppo del metodo

La procedura di tuning dello spettrometro di massa consiste nell'infusione diretta (tramite siringa; in alcuni casi è possibile utilizzare la pressione esercitata dal flusso della fase mobile per l'infusione diretta tramite un connettore a "T") di una soluzione standard dell'analita in esame e la ricerca dei migliori valori di voltaggio (parametri strumentali) legati ai diversi componenti dell'ottica ionica e dell'analizzatore di massa, al fine di ottenere la maggior intensità del segnale analitico. Successivamente, sempre basandosi sulla maggior intensità del segnale si definisce la

polarità di ionizzazione (in positivo o in negativo) più adatta per l'analisi dei composti oggetto di studio.

4.1.1) Parametri LTQ Orbitrap® XL

I principali parametri da aggiustare prima dell'analisi tramite LTQ Orbitrap XL sono:

- Capillary voltage: potenziale del capillare di trasferimento degli ioni;
- Tube lens: potenziale della lente presente nell'interfaccia che focalizza gli ioni verso l'apertura dello skimmer;
- Multipole Rf: potenziale a radiofrequenza applicato all'ottica ionica;
- Front lens, Lens 0, Lens 1: potenziali lenti focalizzatrici dell'ottica ionica;
- Multipole 00: potenziale del primo quadrupolo;
- Multipole 0: potenziale secondo quadrupolo
- Gate lens: potenziale a radiofrequenza dell'ottapolo Oct1;
- Multipole 1 offset;
- CID: potenziale cella di collisione, se attiva.

[Thermo Fisher Scientific™ ,2008; Thermo Fisher Scientific™ ,2009].

4.1.2) Parametri Triplo quadrupolo API 4000™

Alcuni parametri relativi al Triplo quadrupolo API 4000™:

- DP (Declustering Potential): potenziale applicato all'interfaccia che attira gli ioni verso l'orifizio di entrata dell'analizzatore;
- EP (Extraction Potential): potenziale applicato per incanalare gli ioni all'interno dell'analizzatore, verso il primo quadrupolo;
- CE (Collision Energy): energia di collisione, modificando questo parametro è possibile influenzare la frammentazione degli ioni.
- CXP (Collision Cell Exit Potential): energia di transizione, potenziale applicato all'uscita della cella di collisione, permette la focalizzazione degli ioni nel passaggio dal secondo al terzo quadrupolo;
- CAD (Collision Gas): controlla la pressione dell'azoto all'interno della cella di collisione.

[Sutthivaiyakit P., 2005]

4.2) Cromatografo liquido: sviluppo del metodo

Lo sviluppo del metodo di separazione cromatografica consiste nella scelta della colonna cromatografica (in base all'interazione tra gli analiti da separare e la componente della fase stazionaria) e della fase mobile da utilizzare. L'eluizione può essere svolta sia isocraticamente (mantenendo costante la composizione della fase mobile durante la corsa cromatografica) che in gradiente al fine di ottenere la migliore separazione fra i costituenti della miscela analizzata. Generalmente, nel metodo con il quale si analizzeranno i campioni reali sono impiegati tutti quei requisiti che portano alla maggior risoluzione ed efficienza. Questi parametri si riassumono nella separazione e nell'ampiezza del picco: picchi ben separati, stretti ed intensità elevata rappresentano la condizione ideale [Skoog A.D. et al., 2007]. Anche la durata della corsa cromatografica è un parametro da definire durante la stesura del metodo cromatografico: generalmente si imposta il tempo più breve che permette l'analisi di un maggior numero di campioni, nonché l'utilizzo di minori quantità di solventi [Coerner P., et al., 2011].

4.3) Ottimizzazione della sorgente di ionizzazione

Una volta ottenuta la migliore separazione cromatografica occorre ottimizzare i parametri strumentali relativi alla sorgente di ionizzazione ESI o APCI nelle condizioni di eluizione degli analiti studiati. I parametri da ottimizzare sono i seguenti: flussi di gas in sorgente, voltaggio di ionizzazione applicato all'ago (ESI), voltaggio della scarica a corona per le sorgenti APCI e temperatura [Sutthivaiyakit P., 2005; Thermo Fisher Scientific™ ,2008; Thermo Fisher Scientific™ ,2009].

4.4) Validazione

Dopo aver impostato tutti i parametri strumentali bisogna eseguire la validazione del metodo analitico. Si definisce validazione del metodo “la conferma attraverso esame e l'apporto di evidenza oggettiva che i requisiti particolari per l'utilizzazione prevista sono soddisfatti” [ISO/IEC 17025, 2005]. Tramite la validazione si dimostra che la metodologia messa a punto è adeguata allo scopo dell'analisi che si vuole eseguire. I parametri che si analizzano per validare un metodo sono:

- **Linearità della risposta:** capacità del metodo di fornire risposte direttamente proporzionali alla concentrazione di analita. Si valuta tramite il coefficiente di correlazione R^2 della retta di taratura, costruita iniettando soluzioni a concentrazione nota e crescente di analita. Il coefficiente di correlazione per validare il metodo deve superare il 99%.
- **Limite di rilevabilità (LOD):** si definisce come la minor concentrazione alla quale si può ottenere una risposta strumentale significativamente superiore al segnale generato dal bianco, ovvero la minor concentrazione di analita rilevabile dallo strumento. Matematicamente si calcola come la concentrazione che dà un segnale pari al segnale medio di n misure replicate del bianco (S_B) più tre volte la deviazione standard di tali misure (σ_B) (5):

$$LOD = S_B + 3\sigma_B \quad [5]$$

- **Limite di quantificazione (LOQ):** definita come la minor concentrazione di analita quantificabile nelle condizioni sperimentali del metodo che genera una risposta sufficientemente accurata e precisa. Si calcola come la concentrazione di analita che genera un segnale pari a dieci volte la deviazione standard del bianco sommato al segnale prodotto dal bianco stesso [ISTISAN, 2004] (6):

$$LOQ = S_B + 10\sigma_B \quad [6]$$

- **Resa:** quantità di analita che può essere determinata rispetto alla quantità totale effettiva presente nel campione, prima di tutta la procedura pre-analitica; la resa (R%), o recupero, è calcolata come percentuale del rapporto tra il valore sperimentale osservato (x) e il valore vero (μ) (7):

$$R\% = \frac{x}{\mu} 100 \quad [7]$$

- **Accuratezza:** indica la concordanza tra i valori sperimentali (x) ed il valore vero (μ), quindi è la misura della capacità del metodo di fornire valori di concentrazione dell'analita prossimi a quelli reali. Si misura come Errore relativo % tra il valore osservato (x) e il valore vero (μ) (8):

$$E\% = \frac{x - \mu}{\mu} 100 \quad [8]$$

➤ **Precisione:** misura della concordanza tra i risultati di prove indipendenti. È espressa in termini di:

- *Ripetibilità:* concordanza tra misure effettuate dallo stesso operatore nelle stesse condizioni sperimentali, nello stesso laboratorio. Può essere espressa come coefficiente di variazione percentuale (CV%) tra i dati medi (\bar{x}) e la loro deviazione standard (9):

$$CV\% = \frac{\sigma}{\bar{x}} 100$$

[9]

- *Riproducibilità:* concordanza tra misure effettuate con le stesse procedure ma da operatori diversi, in laboratori diversi nel corso di lunghi intervalli di tempo [Skoog, A. D., 2007; Lin Guo, 2011];
 - *Incertezza:* stima, associata al risultato di una misura, che caratterizza la dispersione dei valori attribuibili all'analita, entro la quale si suppone cadere il valore vero da misurare;
- **Robustezza:** capacità di un metodo di non essere influenzato significativamente, per effetto di variazioni deliberatamente introdotte. Tramite questo parametro si può affermare se il metodo (preciso e accurato) può essere utilizzato di routine in laboratorio, in diverse condizioni ambientali, con lotti di reagenti diversi, strumentazione di diversa classe.

4.4) Quantificazione

In questo studio essa è condotta con la metodologia detta “dello standard interno”, ovvero si aggiunge ai campioni una quantità nota di una molecola che può essere lo stesso composto oggetto di studio nella sua forma marcata isotopicamente (se l'isotopo non è presente in natura) oppure una sostanza diversa, ma con caratteristiche cromatografiche, di spettrometria di massa e proprietà chimico-fisiche simili. Il vantaggio principale dell'utilizzo di questa metodologia consiste nella correzione simultanea e automatica di eventuali imprecisioni ed errori dovuti sia allo strumento, sia alla fase di preparazione degli standard che nel corso della preparazione pre-analitica dei campioni.

La figura 28 illustra la procedura sperimentale utilizzata per la calibrazione della strumentazione, nelle analisi quantitative, utilizzando una quantità nota di analita Q_{SIS}'' assieme a una quantità nota di standard $Q_{a,i}''$ [Boyd, R.B., et al 2008].

Calibration - Internal Standard (IS) Method

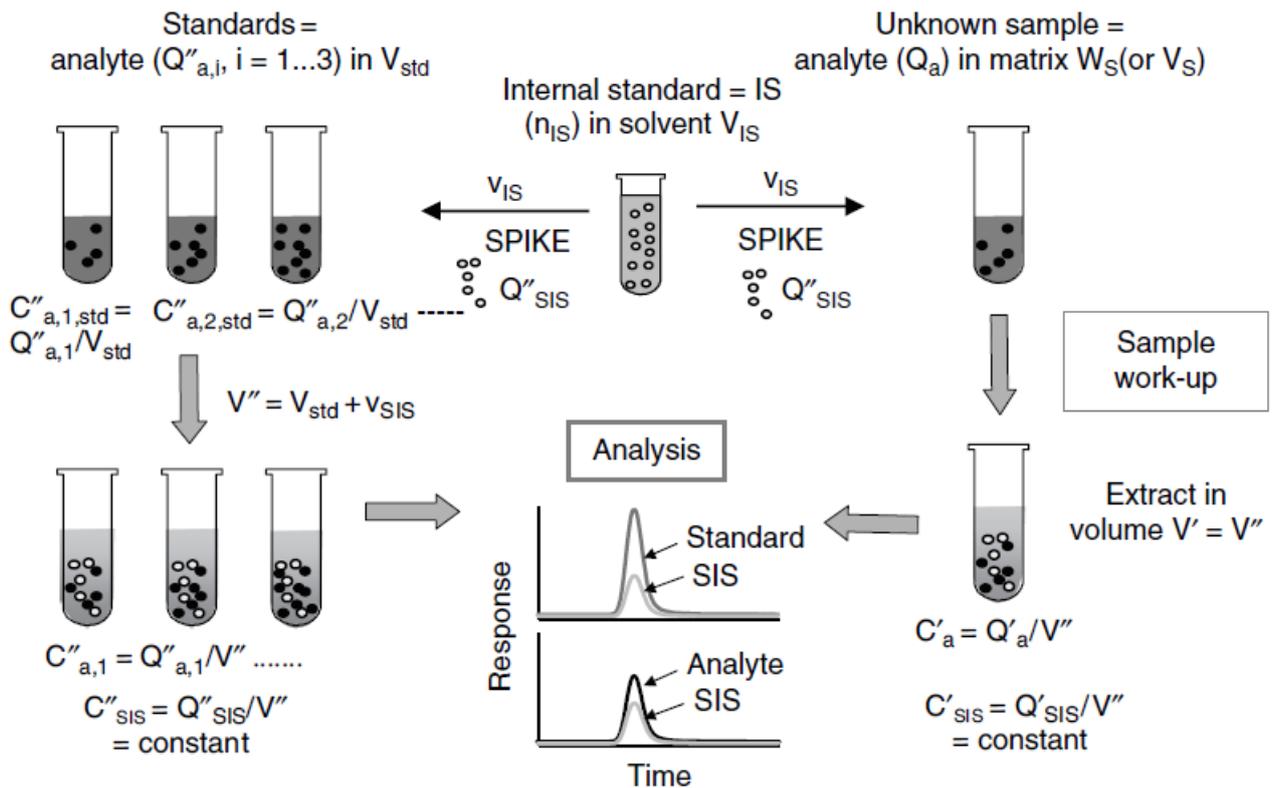


Figura 28: procedura sperimentale utilizzata per la calibrazione della strumentazione [Boyd, R.B., et al 2008].

In questo caso lo standard e lo standard interno sono analizzati insieme nella stessa corsa cromatografica (in questo esempio fittizio i due coeluiscono, suggerendo che lo standard interno sia un isotopo marcato e quindi un spettrometro di massa come rivelatore). La quantificazione avviene sfruttando il segnale analitico del composto nativo, dello standard interno (SIS) e la concentrazione nota di quest'ultimo, secondo la relazione (10) [Boyd, R.B., et al 2008].:

$$Q''_{SIS} : Q''_a = R''_{SIS} : R''_a \quad [10]$$

con:

R''_a = area del picco cromatografico dell'analita;

Q''_a = concentrazione dell'analita;

R''_{SIS} = area del picco cromatografico dello standard interno marcato;

Q''_{SIS} = concentrazione dello standard interno marcato;

[Boyd, R.B., et al 2008].

Risolvendo la 10 si ottiene:

$$\frac{R_A''}{R_{SIS}''} = FR \frac{Q_A''}{Q_{SIS}''} \quad [11]$$

Il fattore risposta strumentale (FR o B'') ottenuto dalla 11 rappresenta il coefficiente angolare della retta di taratura (fatta dopo la messa a punto del metodo) ovvero la legge di proporzionalità diretta tra la concentrazione dell'analita e la risposta strumentale (Fig.29).

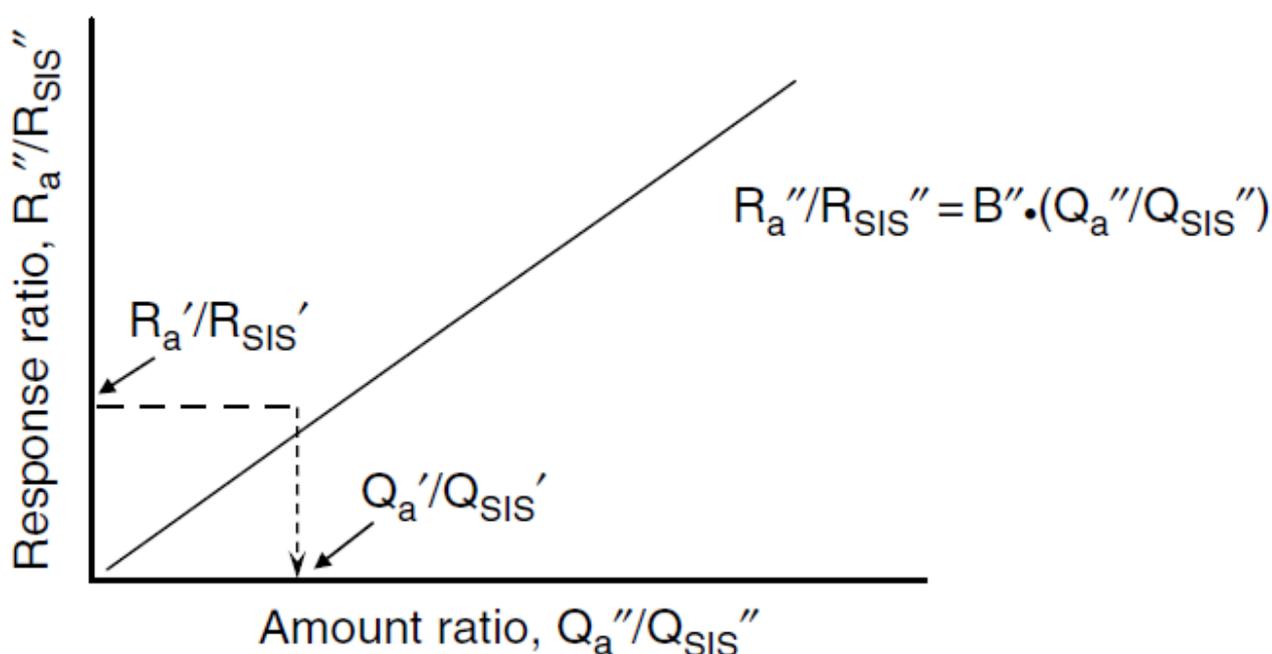


Figura 29:Rappresentazione grafica della relazione 11: calibrazione e quantificazione con il metodo dello standard interno. (nell'immagine) B''o FR rappresenta il coefficiente angolare della retta [Boyd, R.B., et al 2008].

Pertanto la procedura completa di quantificazione prevede la costruzione della retta di calibrazione prima di ogni set di analisi, in modo da annullare le inevitabili fluttuazioni del segnale analitico. Tale procedura è però lunga e dispendiosa, per questo motivo la quantificazione del campione viene effettuata tramite la tecnica del "Continuing Calibration Verification Standards" (CCVS) che prevede l'analisi di un campione, denominato appunto "campione di controllo qualità", prima di ogni analisi, in modo tale da annullare le fluttuazioni strumentali casuali che possono verificarsi. Tale campione è costituito da una serie di standard a concentrazione nota da cui si ricava FR. Conoscendo il fattore di risposta si può procedere alla quantificazione degli analiti nel campione (Q_x)(12) [Boyd, R.B., et al 2008]:

$$Q_x = \frac{R_A''}{R_{SIS}''} \frac{Q_{SIS}''}{FR} \quad [12]$$

La tecnica del CCVS garantisce la stabilità della linearità tra segnale e concentrazione, minimizzando i tempi e i costi delle analisi dal momento che, prima di ogni analisi, si dovrebbero reiniettare tutti i punti (generalmente da 10 a 20) che costituiscono la retta di calibrazione [Boyd, R.B., et al 2008]

5) Area di studio e campionamento

5.1) Il continente antartico

Questo lavoro di tesi ha come oggetto lo studio di campioni di aerosol provenienti dal continente antartico. La scelta di tale locazione è dovuta alla limitata possibilità di contaminazione per la quasi assenza di sorgenti interne (è un continente disabitato, le uniche fonti di inquinamento atmosferico locali sono le basi di ricerca scientifica) e pertanto è un laboratorio privilegiato nello studio del trasporto di sostanze a lunga distanza. Ciò rende il continente antartico adatto a studi sulla concentrazione atmosferica “di fondo” dell’aerosol atmosferico [Colbeck, I., 2008].



Figura 30: Rappresentazione del continente antartico [Holton J.R., 2002].

Il continente antartico presenta le temperature al suolo più basse del pianeta, infatti lungo la costa si riscontrano mediamente valori attorno agli 0°C durante l'estate antartica mentre precipitano fino a -18°C , -29°C durante l'inverno. L'entroterra Antartico risulta più freddo rispetto alla costa, con temperature medie di -40°C in estate e -68°C durante l'inverno [Sito internet: www.scar.org] Fattori importanti che contribuiscono a mantenere basse le temperature del continente sono: la lunga notte polare (179 giorni ai poli geografici), l'inclinazione della radiazione solare durante la stagione estiva, la copertura di ghiaccio permanente che impedisce l'assorbimento della maggior parte della radiazione incidente e l'elevata altitudine media sul livello del mare (2500 m) [Sito internet: www.scar.org; Bargagli, R., 2005.].

L'Antartide si distingue anche per la circolazione e intensità del vento: è infatti il continente che detiene il record mondiale riguardo l'intensità del vento. La sua superficie è sferzata da venti catabatici, generati da masse d'aria fredda create dalla perdita di calore per radiazione superficiale, che una volta innescati seguono il profilo topografico e orografico del continente. Tali venti possono divenire particolarmente intensi alla base dei dislivelli che caratterizzano l'area tra il plateau centrale e le regioni costiere [Campbell, I.,B. et al., 1987] (Fig.31).

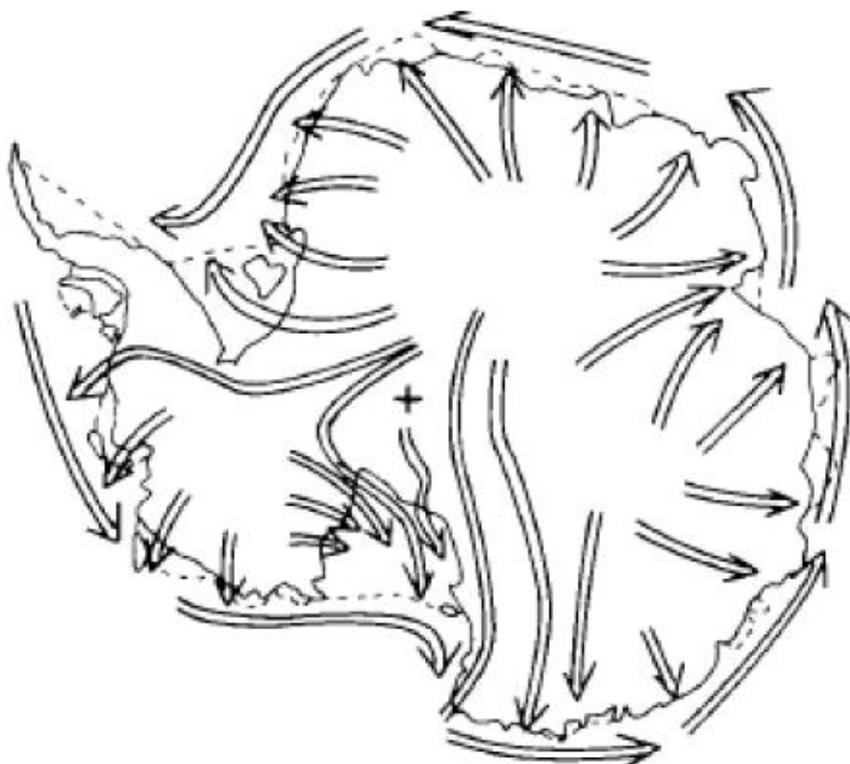


Figura 31:Rappresentazione della circolazione dei catabatici principali sulla superficie antartica e lungo la costa [Campbell, I.,B. et al., 1987]

Sebbene in Antartide sia presente l'80% della quantità d'acqua dolce mondiale, essa è immobilizzata sotto forma di ghiaccio, pertanto il continente si presenta molto arido, caratterizzato

da un basso tasso di precipitazioni (meno di 130 mm annui) dovuto alla ridottissima di umidità presente [Campbell, I.,B., et al., 1987].

5.1.1) L'aerosol antartico

L'aerosol antartico si presenta con concentrazioni molto basse, spesso vicino al limite di rilevabilità. La circolazione anticiclonica dei venti attorno al continente (Fig. 32) e l'elevata altitudine media dello stesso favoriscono il trasporto dell'aerosol nell'entroterra, isolandolo da possibili fonti di contaminazione [Cunningham, W.,C., et al., 1981].

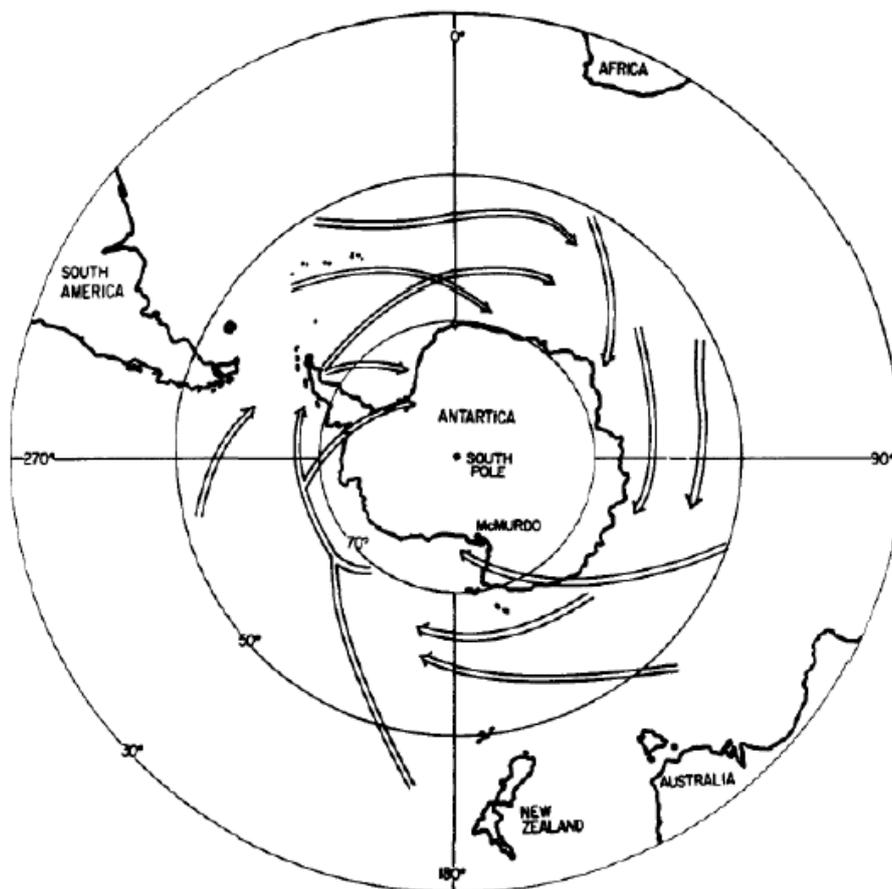


Figura 32: circolazione anticiclonica dei venti attorno al continente antartico [Cunningham, W.,C., et al., 1981].

In Antartide esistono limitate sorgenti di aerosol primario quali: lo spray marino (particelle di sale marino e particelle marine di origine biogenica), il particolato di origine crostale e le eruzioni vulcaniche del monte Erebus (vulcano attivo alto 3.794 m s.l.m., situato sull'isola di Ross) [Bargagli, R., 2008].

Queste sorgenti sembrano influenzare limitatamente la composizione chimica del particolato. La componente crostale e lo spray marino rispettivamente incidono solo per il 3% e per il 2% sulla

composizione dell'aerosol antartico nel periodo estivo. Tale contributo percentuale, soprattutto quello di origine marina, aumenta notevolmente (30-40%) nella stagione invernale [Cunningham, W.,C., et al., 1981].

La componente carbonacea dell'aerosol, a causa dell'assenza di fonti autoctone nel continente antartico, viene utilizzata come tracciante nei processi di trasporto a lunga distanza. La sua concentrazione non è costante, si ha il massimo nell'estate australe (ottobre), mentre i valori minimi si osservano nel mese di aprile [Colbeck, I., 2008].

Diversi studi hanno dimostrato che la variazione stagionale della composizione dell'aerosol antartico è esclusivamente dovuta a cambiamenti nel trasporto a lunga distanza dalle zone in cui sono localizzate le fonti, piuttosto che da cambiamenti a livello locale. Tale conclusione è avvalorata dalla scarsità delle fonti autoctone sul continente antartico e dall'entità dei cambiamenti meteorologici tra una stagione e l'altra [Cunningham, W.,C., et al., 1981].

Infine l'utilizzo del continente antartico come recettore di particolato esogeno, non contaminato da fonti locali è convalidato da studi condotti da Mazzera et al., (2001), i cui risultati hanno affermato che il contributo delle emissioni delle stazioni di ricerca (riscaldamento, produzione di corrente e trasporti) può interferire in minima parte con le misurazioni, ma non influisce sul bilancio complessivo dell'aerosol a livello continentale.

5.2) Campionamento

I campioni analizzati in questo lavoro di tesi provengono dalla XXVI spedizione italiana in Antartide, avvenuta nell'estate australe 2010-2011. L'attività di campionamento è finalizzata allo studio delle sorgenti e dei processi di trasferimento dell'aerosol atmosferico antartico [sito internet: www.italiantartide.it/spedizioni/xxvi/].

Il campionamento è avvenuto nella baia di Terranova (Fig. 33), presso la stazione scientifica italiana Mario Zucchelli (74° 41' 42" S, 164° 07' 23" E), fondata nel 1985 e operativa da ottobre a febbraio 2010. La stazione di campionamento è denominata Campo Faraglione ed è situata ad un'altitudine di 57 m s.l.m. alle seguenti coordinate geografiche: 74° 42' 56.3" S, 164° 06' 52" E. La scelta di tale posizione è avvenuta dopo studi sulla circolazione dei venti catabatici nell'area [sito internet: www.italiantartide.it/spedizioni/xxvi/].

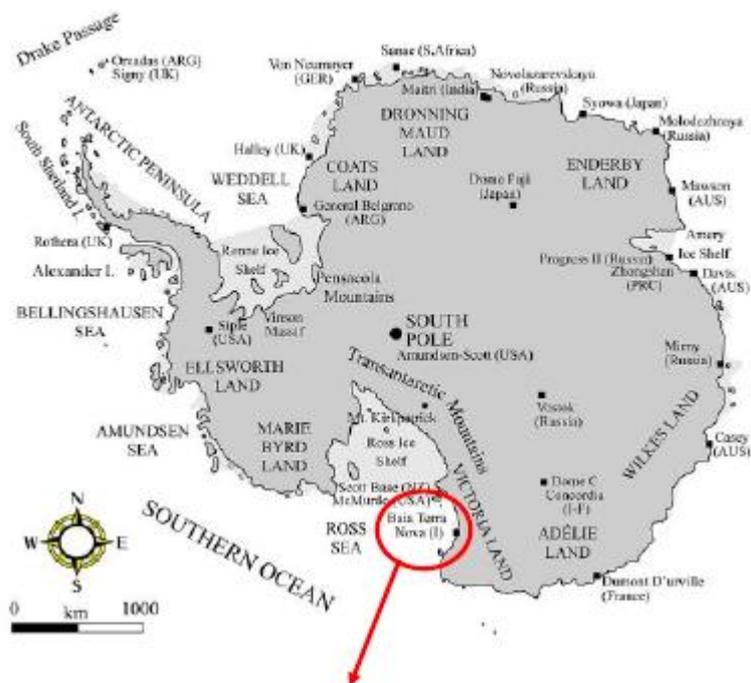


Figura 33:mappa dell'antartide con localizzazione della stazione italiana Mario Zucchelli.

5.2.1) Campionatore ad alto volume Andersen

Per il campionamento è stato utilizzato un impattore a cascata multistadio Andersen (TE-6000 Series, Tisch Environmental Inc.) (Fig.34), capace di suddividere l'aerosol in 6 frazioni dimensionali.



Figura 34: impattore a cascata multistadio Andersen (TE-6000 Series, Tisch Environmental Inc.)

Con questo tipo di campionatore, il flusso d'aria viene attirato all'interno dello strumento e mantenuto costante attraverso una pompa aspirante. La testa del campionatore effettua una prima selezione, permettendo l'entrata della sola frazione con diametro aerodinamico inferiore a $10,2 \mu\text{m}$. La successiva selezione delle classi dimensionali avviene quando il flusso colpisce la superficie di raccolta, dotata di filtro, dei vari stadi degli impattori. Le particelle più fini, a causa della variazione della loro direzione tangenziale, riescono deviare il loro moto inerziale e pertanto passeranno allo stadio successivo. Viceversa le particelle con diametro più grande si muoveranno, secondo la loro traiettoria iniziale, verso la superficie di impatto dove verranno raccolte sul filtro precedentemente posto.

5.2.1.1) Filtri utilizzati e procedure di trasporto, sostituzione e stoccaggio.

Questo tipo di campionatore utilizza 5 supporti in fibra di quarzo dotati di 10 scanalature (supporti scanalati) (Filtros Anoaia, Barcellona, Spagna) (Fig.35 a) montati sulle diverse piastre che formano le superfici di impatto del corpo dell'impattore; a valle è collocato un filtro in fibra di quarzo (back) (Fig.35 b) che per filtrazione raccoglie la frazione dimensionale minore di $0,49 \mu\text{m}$ non trattenute dagli stadi precedenti.



Figura 35: a) supporti Scanalati, in fibra di quarzo; b) filtri Back in fibra di quarzo.

Le frazioni dimensionali raccolte nei diversi stadi sono riassunte nella tabella 5.

Tabella 5. Tipologia e caratteristiche dei filtri utilizzati per il campionamento

Tipo di supporto	Stadio	Frazione dimensionale raccolta
Scanalato	1	10.0 – 7.2 μm
Scanalato	2	7.2 – 3.0 μm
Scanalato	3	3.0 – 1.5 μm
Scanalato	4	1.5- 0.95 μm
Scanalato	5	0.95 – 0.49 μm
Back	6	< 0.49 μm

Prima dell'utilizzo i filtri sono trattati in muffola a 400°C per 4 ore, per poi essere avvolti in fogli di alluminio (doppio strato), questo garantisce un adeguata protezione dalla contaminazione. Una volta montati i filtri nel campionatore si può avviare la procedura di campionamento, avendo precedentemente tarato il campionatore. Visto che l'area di campionamento è situata in un ambiente caratterizzato da bassi livelli di aerosol in atmosfera, al fine di ottenere concentrazioni rilevabili dagli strumenti, i filtri sono stati sostituiti con la frequenza di 10 giorni un flusso medio di 1.21 m³ min⁻¹. Nel corso della campagna di campionamento sono stati effettuati i bianchi di campo, ossia filtri che hanno subito tutte le procedure dei filtri per i campioni reali tranne l'esposizione dovuta all'accensione del campionatore.

I filtri dopo il campionamento sono stati avvolti in alluminio e conservati ad una temperatura di -20°C fino al momento dell'analisi, al fine di minimizzare le possibilità di degradazione microbica e di contaminazione. La tabella 6 riporta il riassunto dei campioni raccolti.

Tabella 6: riassunto campioni raccolti, il bianco si riferisce ai filtri che hanno subito tutte le procedure dei filtri per i campioni reali tranne l'esposizione dovuta all'accensione del campionatore. Con essi valuta e si rimuove il rumore di fondo dovuto alla procedura.

Nome del campione	Tipologia	Periodo di campionamento	Ore di campionamento	m ³ campionati
Bianchi				
MZSSCANB291110	Scanalato	29/11/2010	-	-
MZSbiancoBK291110	Back	29/11/2010	-	-
MZSSCANB091210	Scanalato	09/12/2010	-	-
MZSbiancoBK091210	Back	09/12/2010	-	-
MZSSCANB080111	Scanalato	08/01/2011	-	-
MZSbiancoBK080111	Back	08/01/2011	-	-
MZSSCANB180111	Scanalato	18/01/2011	-	-
MZSbiancoBK180111	Back	18/01/2011	-	-
Campioni				
MZS291110ST1	Scanalato Stadio 1	29/11/2010 09/12/2010	241,65	17108,82
MZS291110ST2	Scanalato Stadio2	29/11/2010 09/12/2010	241,65	17108,82
MZS291110ST3	Scanalato Stadio3	29/11/2010 09/12/2010	241,65	17108,82
MZS291110ST4	Scanalato Stadio4	29/11/2010 09/12/2010	241,65	17108,82
MZS291110ST5	Scanalato Stadio5	29/11/2010 09/12/2010	241,65	17108,82
MZSBack291110	Back Stadio 6	29/11/2010 09/12/2010	241,65	17108,82
MZS091210ST1	Scanalato Stadio 1	09/12/2010 19/12/2012	241,65	17108,82
MZS091210ST2	Scanalato Stadio2	09/12/2010 19/12/2012	241,65	17108,82
MZS091210ST3	Scanalato Stadio3	09/12/2010 19/12/2012	241,65	17108,82
MZS091210ST4	Scanalato	09/12/2010	241,65	17108,82

	Stadio4	19/12/2011		
MZS091210ST5	Scanalato Stadio5	09/12/2010 19/12/2011	241,65	17108,82
MZSBack091210	Back Stadio 6	09/12/2010 19/12/2011	241,65	17108,82
MZS191210ST1	Scanalato Stadio 1	19/12/2012 29/01/2011	240,98	17061,384
MZS191210ST2	Scanalato Stadio2	19/12/2012 29/01/2011	240,98	17061,384
MZS191210ST3	Scanalato Stadio3	19/12/2011 29/01/2011	240,98	17061,384
MZS191210ST4	Scanalato Stadio4	19/12/2011 29/01/2011	240,98	17061,384
MZS191210ST5	Scanalato Stadio5	19/12/2012 29/01/2011	240,98	17061,384
MZSBack191210	Back Stadio 6	19/12/2011 29/01/2011	240,98	17061,384
MZS291210ST1	Scanalato Stadio 1	29/01/2011 08/01/2011	241,05	17066,34
MZS291210ST2	Scanalato Stadio2	29/01/2011 08/01/2011	241,05	17066,34
MZS291210ST3	Scanalato Stadio3	29/01/2011 08/01/2011	241,05	17066,34
MZS291210ST4	Scanalato Stadio4	29/01/2011 08/01/2011	241,05	17066,34
MZS291210ST5	Scanalato Stadio5	29/01/2011 08/01/2011	241,05	17066,34
MZSBack291210	Back Stadio 6	29/01/2011 08/01/2011	241,05	17066,34
MZS080111ST1	Scanalato Stadio 1	08/01/2011 18/01/2011	245,12	17354,496
MZS080111ST2	Scanalato Stadio2	08/01/2011 18/01/2011	245,12	17354,496

MZS080111ST3	Scanalato Stadio3	08/01/2011 18/01/2011	245,12	17354,496
MZS080111ST4	Scanalato Stadio4	08/01/2011 18/01/2011	245,12	17354,496
MZS080111ST5	Scanalato Stadio5	08/01/2011 18/01/2011	245,12	17354,496
MZSBack080111	Back Stadio 6	08/01/2011 18/01/2011	245,12	17354,496

6) Materiali

6.1) Standard di riferimento

6.1.1) Levoglucosano

➤ NATIVI

- Levoglucosano (1,6-anidro-β-D-glucopiranosio) (CAS n.: 498-07-7, purezza 99%, Sigma-Aldrich[®]).
- Mannosano (1,6-anidro-β-D-mannopiranosio) (CAS n.:14168-65-1, purezza 99%, Molekula[®])
- Galattosano (1,6-anidro-β-D-galattopiranosio) (CAS n.:644-76-8, purezza 99%, Molekula[®])

➤ MARCATI

- Levoglucosano ¹³C₆ (CAS n.: 498-07-7, purezza 98%, CIL[®]).

6.1.2) Metossifenoli

➤ NATIVI

- Acido Siringico (CAS n.:530-57-4, purezza ≥ 95%, Sigma-Aldrich[®]).
- Acido Isovanillico (CAS n.:645-08-9, purezza 97%, Sigma-Aldrich[®]).
- Siringaldeide (CAS n.:134-96-3, purezza ≥ 97%, Fluka[®]).
- Acido Omovanillico (CAS n.:306-08-1, purezza ≥ 98%, SigmaAldrich[®]).
- Acido Ferulico (CAS n.:537-98-4, purezza ≥ 99%, Fluka[®]).
- Vanillina (CAS n.:121-33-5 , purezza 99% Sigma-Aldrich[®]).
- Acido p-cumarico (CAS n.:501-98-4, purezza ≥ 98%, Sigma-Aldrich[®]).
- Coniferaldeide (CAS n.:458-36-6, purezza 98%, SigmaAldrich[®]).
- Acido Sinapico (CAS n.:530-59-6, purezza ≥ 98%, Sigma-Aldrich[®]).
- Acido Vanillico (CAS n.:121-34-6, purezza ≥ 97%, Fluka[®]).

➤ MARCATI

- Vanillina ¹³C₆ (CAS n.:121-33-5, purezza 99%, Sigma-Aldrich[®]).
- Acido Vanillico ¹³C₆ (CAS n.:121-34-6, purezza 99%, Sigma-Aldrich[®]).

6.2) Solventi e reagenti

I reagenti utilizzati sono:

- Detergente per vetreria Contrad® 2000 conc. (VWR International s.r.l. Milano, Italia).
- Acqua ultrapura (18,2 MΩ cm, 0,01 TOC).
- Metanolo Ultragradient (Romil LTD, Cambridge, UK, Cas n.: 000067-56-1).
- Acido cloridrico 37% (Romil LTD, Cambridge, UK, Cas n.:7647-01-0)
- Acido formico (CH₂O₂) (98%) (Fluka, Sigma Aldrich®, Buchs, Switzerland Cas.: 64-18-6).
- Acetonitrile Ultragradient (Romil LTD, Cambridge, UK),
- Ammoniaca (Romil LTD, Cambridge, UK).

6.3) Materiali

- Beute da 50 ml (Vetrotecnica, Padova, Italia).
- Filtri in fibra di quarzo back 203x254 mm(Filtros Anovia, Barcellona, Spagna).
- Supporti in fibra di quarzo scanalati a 10 scanalature 150x143mm (Filtros Anovia, Barcellona, Spagna).
- Siringhe in vetro da 10 mL Fortuna® Optima® (Poulten & Graf GmbH, Wertheim, Germania).
- Filtri in PTFE, Ø 25 mm, 0,45 µm (National Scientific Company, Rockwood, Tennessee, USA).
- Micropipette da 10, 20, 100, 200, 1000 µL, con puntali sterili in polietilene (Eppendorf AG, Hamburg, Germania).
- Pinzette e forbici in metallo.
- Nastro sigillante in teflon.
- Foglio carta alluminio.
- Vial in vetro da 2 mL, per autocampionatore e tappi (Agilent, Waldbronn, Germania).
- Vial in vetro da 2 mL, per auto campionatore orbitrap e tappi (Thermo Fisher Scientific™, Germania).
- Vial ambrate in vetro da 2, 4, 7 ml da stoccaggio (Supelco, Bellefonte, USA).
- Tappi in polipropilene snap cap con setto in PTFE/silicone, per vial in vetro (Agilent, Waldbronn, Germania).
- Tappi in polipropilene, con rivestimento interno in PTFE, per vial in vetro per stoccaggio (Agilent, Waldbronn, Germania).
- Comune vetreria da laboratorio: pipette pasteur, matracci, becker, ecc..

6.4) *Strumentazione*

6.4.1) *Preanalitica*

- Bagno a ultrasuoni (Ultrasonic FALC).
- Bilancia analitica a 5 cifre KERN ALT 220-4NM (KERN & Sohn GmbH, Belingen, Germania).
- Impianto di depurazione dell'acqua Purelab: Option-R pure water system accoppiato a Purelab Ultra Analytic ultra pure water system (Elga Lab Water, High Wycombe, UK).
- Siringa Model "11" (Harvard Apparatus Inc., Holliston, MA, USA).

6.4.2) *Analitica*

- Cromatografo UHPLC™ (Ultra High Performance Liquid Chromatography) UltiMate 3000 (Thermo Fisher Scientific™, Germania).
- Cromatografo HPIC™ (high - pressure ion chromatography) Thermo Scientific™ Dionex™ ICS-5000 (Thermo Fisher Scientific™, Germania).
- Cromatografo HPLC™ (High Performance Liquid Chromatography) Agilent 1100 (Agilent, Waldbronn, Germania).
- Spettrometro di massa ad altissima risoluzione LTQ Orbitrap® XL (Thermo Fisher Scientific™, Germania).
- Spettrometro di massa a triplo quadrupolo API 4000™ (Applied Biosystem/MDS SCIEX, Concord, Ontario, Canada).

6.5) *Colonne cromatografiche*

- Dionex Carbopac™ PA10 (250x2mm).
- Agilent Zorbax SB-Aq (150 mm x 2.1 mm, 3.5 µm).
- Filtro in acciaio HPLC column In-line filter, S.S 0.5µm Porosity x 1.5mm (Phenomenex, Torrance, USA).
- Agilent Poroshell 120 SB-C18 (2.1x150mm 2.7 µm).
- Agilent Zorbax Extend-C18, 4,6 x 150 mm (Ø 3,5 µm).

6.6) Software utilizzati

6.6.1) Integrazione dei cromatogrammi

- LC Quan (Thermo Fisher Scientific™, Germania).
- Analyst (Applied Biosystem/MDS SCIEX, Concord, Ontario, Canada).

6.6.2) Calcolo retrotraiettorie

- HYSPLIT (*Hybrid Single Particle Lagrangian Integrated Trajectory Model*) del National Oceanic and Atmospheric Administration (NOAA).
- Google Earth

7) Metodologie analitiche

7.1) Levoglucosano

7.1.1) preparazione delle soluzioni standard

Le soluzioni standard di levoglucosano utilizzate per le analisi sono riportate nella tabella 7.

Tabella 7: Concentrazioni delle soluzioni standard e dei fattori di risposta per il levoglucosano, mannosano e galattosano

Composto	Soluzione standard (pg μl^{-1})	Fattore di risposta (pg μl^{-1})
Nativi		
Levoglucosano	5	109
Mannosano	6	126
Galattosano	6	138
Marcati		
Levoglucosano $^{13}\text{C}_6$	1499	100

7.1.2) Metodo ic-orbitrap MS per la determinazione del levoglucosano

Si tratta di una metodologia analitica innovativa, sviluppata in questo lavoro di tesi, al fine di ottenere una completa separazione cromatografica fra levoglucosano mannosano e galattosano mediante cromatografia ionica.

La separazione cromatografica è avvenuta tramite colonna Dionex Carbopac TM PA10 (250x2mm) dotata di colonna di guardia Dionex CarbopacTM PA10 (50x2mm). Il vano in cui è posta la colonna è termostato per tutto il tempo dell'analisi a 30°C.

L'eluizione avviene ad un flusso di 250 ml min⁻¹ tramite una fase mobile composta da una soluzione a concentrazione variabile di idrossido di sodio in acqua. Il volume di iniezione è di 25 µl. L'intera corsa cromatografica è descritta nella tabella 8.

Tabella 8: corsa cromatografica per la determinazione del levoglucosano.

MINUTI	[idrossido di sodio]mM
0	10
4	10
9	65
19	65
22	15
25	10

Il flusso di eluente in uscita dalla colonna cromatografica passa attraverso il soppressore ionico (modello 2mm ASRS[®] suppressor) che ha lo scopo di eliminare l'idrossido di sodio presente nell'eluente. Successivamente entra nella sorgente APCI dello spettrometro di massa che operando in polarità negativa porta alla formazione degli ioni [M-H]⁻.

L'acquisizione, utilizzando l'Orbitrap è avvenuta in full scan, nel range di massa 60-600 m/z. con risoluzione 100000. Come "lock mass" si è scelta quella a m/z 255.2329 relativa allo ione [M-H]⁻ dell'acido palmitico dal momento che è sempre presente nell'intervallo di massa selezionato. Le masse esatte relative al levoglucosano, mannosano e galattosano sono riportate nella tabella 9.

Tabella 9: massa dello ione [M-H]⁻ relativa al levoglucosano

Composto	[M-H] ⁻
Nativi	
Levoglucosano	161,0464
Mannosano	161,0464
Galattosano	161,0464
Marcati	
Levoglucosano ¹³ C ₆	167,0667

I parametri ottimizzati di ionizzazione della sorgente APCI e alcuni dell'ottica ionica sono riportati nella tabella 10.

Tabella 10: Condizioni ottimizzate per la sorgente APCI e per l'ottica ionica

	TUNAGGIO LEVOGLUCOSANO
T° sorgente	300°C
Polarità	Negativa
Sheat Gas	25
Auxilry Gas	5
Source Corrent (µa)	9
Capillary Voltage (V)	-45
Tube lens (V)	-95
Multipole RF	400
Lens 0 (V)	4.5
Multipole 00 (V)	4.5
Multipole 0 (V)	5
Lens 1 voltage (V)	11
Gate lens (V)	78
Multipole 1 offset (V)	5,5
Front lens (V)	5

Utilizzando tale metodo è possibile separare i tre isomeri del levoglucosano, ovvero il mannosano e il galactosano, come mostra il cromatogramma in figura 36.

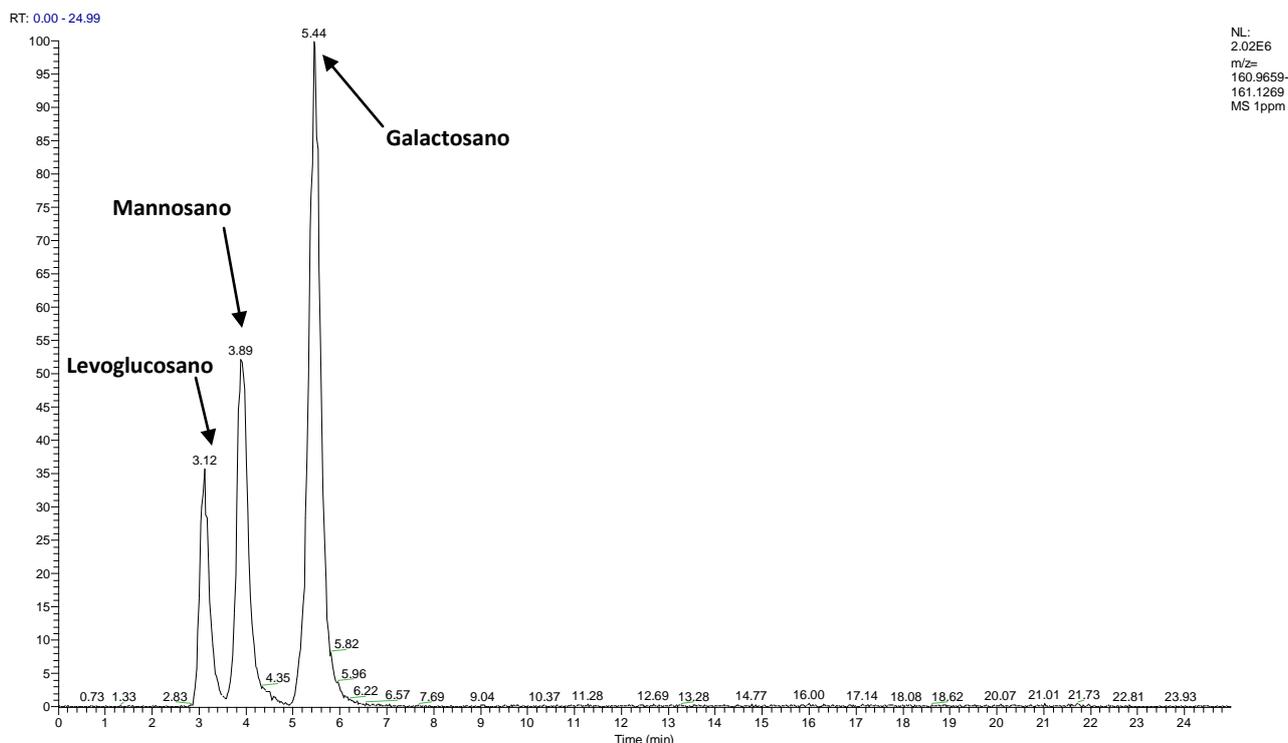


Figura 36: Cromatogramma a 1 ppm in cui si osserva la separazione dei tre isomeri del levoglucosano ovvero mannosano e galactosano.

7.1.3) Metodo HPLC-MS/MS per la determinazione del levoglucosano

Per l'analisi del Levoglucosano è stato utilizzato il metodo messo a punto e pubblicato precedentemente [Perrone M.G. et al 2012].

L'analisi cromatografica viene condotta iniettando 10 μl di campione in due colonne Zorbax SB-Aq (150 mm x 2.1 mm, 3.5 μm , Agilent), ad un flusso di eluizione pari a 80 $\mu\text{l min}^{-1}$. La fase mobile binaria è composta da: A) acqua e B) aceto nitrile. L'intera corsa cromatografica (tabella 11) dura 60 minuti (la metà circa utilizzati per il condizionamento delle colonne) [Perrone M.G. et al 2012].

Tabella 11: corsa cromatografica per la determinazione del levoglucosano [Perrone M.G. et al 2012].

MINUTI	% A	%B
0-12	100	0
12-17	0	100
17-22	0	100
22-27	100	0
27-60	100	0

Lo spettrometro di massa, che funge da detector è accoppiato al cromatografo: la ionizzazione avviene mediante una sorgente ESI, che opera in polarità negativa. L'acquisizione avviene in modalità MRM monitorando le transizioni riportate in tabella 12 assieme ai parametri strumentali impiegati

Tabella 12 Parametri spettrometrici ottimizzati per ogni transizione; evidenziata la transizione utilizzata per la quantificazione (grassetto) [Perrone M.G. et al 2012].

NOME	Q1 [M-H] ⁻ (m/z)	Q3 (m/z)	CE (V)	CXP (V)
Nativi				
Levoglucosano	160.70	128,70	-12,90	-23,00
		112,90	-14,00	-20,00
		100,90	-14,00	-15,00
		87,00	-23,00	-14,90
		84,90	-23,00	-11,70
		71,20	-17,00	-7,00
Marcati				
Levoglucosano ¹³ C ₆	167.00	117,80	-13,60	-19,07
		105,00	-14,00	-15,00
		89,00	-20,24	-14,13
		73,90	-19,62	-11,21

I parametri ottimizzato della sorgente ESI sono descritti nella tabella 13.

Tabella 13: Condizioni ottimizzate per la sorgente ESI [Perrone M.G. et al 2012].

Scan Type	MRM
Polarity	Negativa
T (°C)	300
GS1 (psi)	45
GS2 (psi)	50
CUR (psi)	35
CAD (psi)	6
IS (V)	-4500
DP (V)	-54,00
EP (V)	-4

La cromatografia in fase inversa difficilmente riesce a separare efficacemente tutti e tre gli isomeri, solo il levoglucosano dal galattosano come evidenziato nella figura 37 a. Fortunatamente il mannosano non provoca interferenze nella transizione utilizzata per la quantificazione del

levoglucosano permettendone la determinazione senza sovrastime. (Fig 37 b,c) [Perrone M.G. et al 2012].

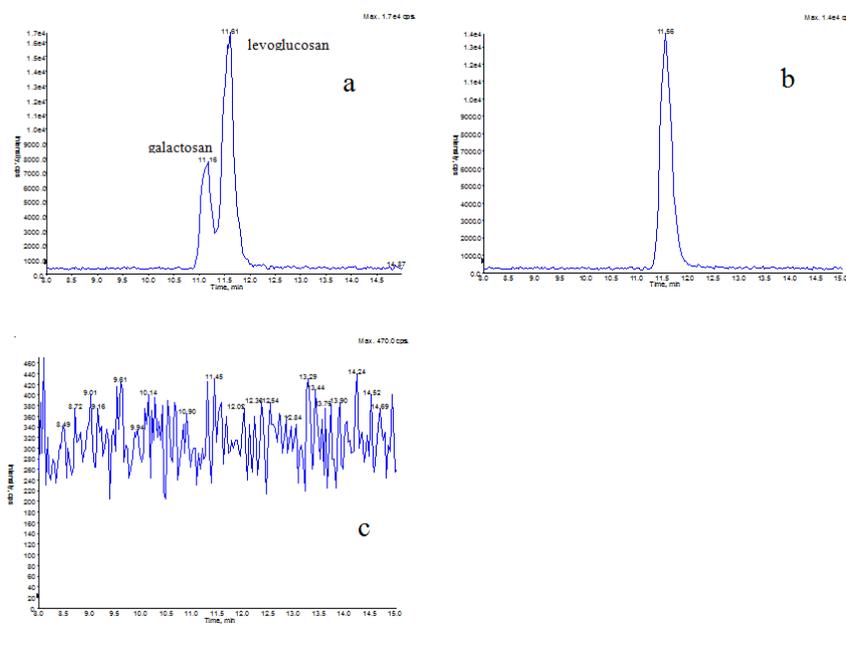


Figura 37: a) picchi del levoglucosano e del galactosano; b) picco del Levoglucosano $^{13}\text{C}_6$; c) mannosano non separato, che non produce interferenza [Perrone M.G. et al 2012].

7.2) Metossifenoli

7.2.1) Preparazione soluzioni standard

Le soluzioni standard (nativi e composti marcati isotopicamente utilizzati come standard interno) sono state ottenute sciogliendo circa 10 mg di composto solido in 10 ml di metanolo [Turchet, M., 2012].

Nella tabella sottostante (Tabella 14) sono riportate le pesate e le concentrazioni di ogni composto nella soluzione standard madre, nello standard utilizzato per lo sviluppo del metodo strumentale, per la preparazione della soluzione per il calcolo del fattore di risposta impiegato nella convalida del metodo e nella quantificazione dei campioni.

Tabella 14: valori delle concentrazioni delle soluzione madri dei vari metossifenoli, delle soluzioni standard e del fattore di risposta (l'acido vanillico marcato non compare in quanto la validazione è stata fatta solo con vanillina marcata [Turchet, M., 2012]).

Composto	Peso (mg)	Soluzione madre ($\mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}$)	Soluzione standard ($\mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}$)	Fattore di risposta ($\mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}$)
Nativi				
Ac.Siringico	11,6	12	12	0,04
Ac.Isovanillico	10,2	1	1	0,01
Siringaldeide	11,7	12	12	0,04
Ac.Omovanillico	11,1	11	11	0,04
Ac.Ferulico	10,1	10	10	0,01
Vanillina	10,1	10	10	0,04
Ac. <i>p</i> -cumarico	11,7	12	12	0,04
Coniferaldeide	10,6	11	11	0,01
Ac.Vanillico	10	1	1	0,07
Marcati				
Vanillina $^{13}\text{C}_6$	10,3	10	10	0,01
Ac. Vanillico $^{13}\text{C}_1$	10,1	10	10	-

7.1.2) Metodo HPLC-orbitrap MS per la determinazione dei metossifenoli

Il seguente metodo di analisi è stato sviluppato ed utilizzato in studi precedenti che sono in corso di pubblicazione [Turchet, M., 2012], ed è stato implementato in questo lavoro di tesi.

La separazione cromatografica è condotta con una colonna Poroshell 120 SB-C18 (2.1x150mm 2.7 μm), cui viene applicato un filtro in linea in acciaio. Le fasi mobili impiegate sono A: Acqua + Acido Formico 0.01% (l'utilizzo di un solvente leggermente acido ha permesso di neutralizzare gli analiti, permettendone la ritenzione, senza provocare una diminuzione significativa dell'intensità del segnale strumentale), B: MeOH/ACN 80:20%. Il flusso dell'eluente è 200 $\mu\text{l min}^{-1}$ e il volume d'iniezione del campione è 19 μl [Turchet, M., 2012]. La tabella Tabella 15 descrive la corsa cromatografica di 29 minuti.

Tabella 15: : corsa cromatografica per la determinazione dei metossifenoli [Turchet, M., 2012].

MINUTI	% A	%B
0	85	15
2	85	15
3	70	30
12	55	45
14	0	100
22	0	100
24	85	15
29	85	15

Gli analiti separati cromato graficamente sono rilevati mediante spettrometria di massa ad alta risoluzione tramite LTQ Orbitrap XL. Il cromatogramma è riportato in figura 38.

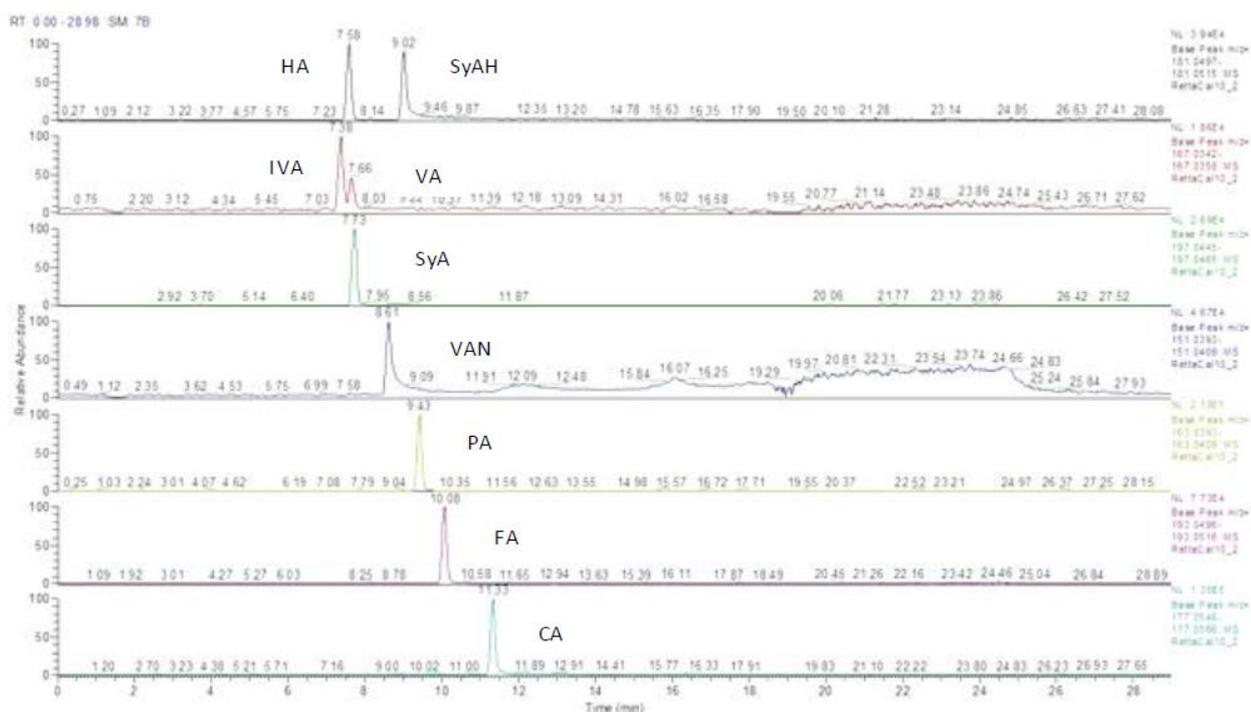


Figura 38: cromatogrammi relativi ai metossifenoli presi in analisi [Turchet, M., 2012].

Il flusso dell'eluente entra nella sorgente ESI dello spettrometro di massa dove avviene la ionizzazione in polarità negativa che porta alla formazione di ioni $[M-H]^-$. Le informazioni relative agli analiti e agli ioni prodotti sono riportati nella tabella 16.

L'acquisizione dei dati è avvenuta in modalità full scan, nel range di massa 100-300 m/z, utilizzando come analizzatore l'Orbitap ad una risoluzione di 60000. La *lock mass* è stata fissata a m/z 283.2642 riguardante lo ione [M-H]⁻ dell'acido stearico [Turchet, M., 2012].

Tabella 16: nome, formula chimica, massa esatta monoisotopica e massa dello ione [M-H]⁻ dei metossifenoli [Turchet, M., 2012].

NOME	FORMULA CHIMICA	MASSA ESATTA MONO ISOTOPICA	[M-H] ⁻
Nativi			
Acido p-coumarico	C ₉ H ₈ O ₃	164,0468	163,0401
Siringaldeide	C ₉ H ₈ O ₄	182,0579	181,0506
Acido siringico	C ₉ H ₁₀ O ₅	198,0528	197,0455
Acido vanillico	C ₈ H ₈ O ₄	168,0423	167,0350
Acido isovanillico	C ₈ H ₈ O ₄	168,0423	167,0350
Acido omovanillico	C ₉ H ₁₀ O ₄	182,0579	181,0506
Vanillina	C ₈ H ₈ O ₃	152,0473	151,0401
Acido Ferulico	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	194,0579	193,0506
Coniferaldeide	C ₉ H ₁₀ O ₄	178,0630	177,0557
Marcati			
Vanillina ¹³ C ₆	C ₈ H ₈ O ₃	158,0890	157,0810
Ac. Vanillico ¹³ C	C ₈ H ₈ O ₄	169,0660	197,9860

Il tunaggio sia della sorgente sia dell'ottica ionica è stato condotto, per infusione diretta delle soluzioni standard (Tabella 14), utilizzando la pompa a siringa integrata nell'hardware dello spettrometro di massa ad un flusso di 10 µl min⁻¹. Il tunaggio è stato effettuato per tutti i composti, per ciascuno sono state valutate le condizioni migliori al fine di ottenere la massima sensibilità, in seguito si è scelto un tunaggio che potesse essere utilizzato per tutti gli analiti. Dal confronto si è deciso di applicare quello dell'acido vanillico, con una finestra di tunaggio per l'analisi dell'acido p-cumarico [Turchet, M., 2012]. I parametri relativi al tunaggio della sorgente sono elencati nella tabella 17.

Tabella 17 valori dei diversi parametri individuati per l'ottimizzazione della sorgente ESI per i metossifenoli [Turchet, M., 2012].

	TUNAGGIO ACIDO VANILLICO	TUNAGGIO ACIDO P-CUMARICO
T° sorgente	200°C	200°C
Polarità	Negativa	Negativa
Sheat Gas	30	39
Sweep Gas flow rate	0	0
Auxilry Gas flow rate	10	5
Spray voltage (KV)	3,5	3,5
Capillary voltage (V)	-9	-19
T° capillary	275°C	275°C
Tube lens (V)	-47,97	-47,97

7.1.3) Metodo HPLC-MS/MS per la determinazione dei metossifenoli

La seguente metodologia di analisi è stata messa a punto, utilizzata in studi precedenti ed è presente in letteratura scientifica [Zangrando R. et al, 2013]. Pertanto anche in questo caso si riporteranno le caratteristiche principali.

Questa metodologia prevede l'utilizzo della colonna cromatografica rispetto Agilent Zorbax Extend-C18, 4,6 x 150 mm (d 3,5 µm), dotata di una fase stazionaria costituita da gruppi C₁₈ legati ad un supporto di silice neutra.

È utilizzata una fase mobile identica a quella usata per il metodo HPLC-orbitrap MS (A: Acido Formico 0.01% in acqua; B: MeOH/ACN 80:20%) ad un flusso di 500 µl min⁻¹. Il volume di iniezione del campione è di 100µl, e il programma della corsa cromatografica è riportato nella tabella 18 [Zangrando et al. 2013].

Tabella 18: corsa cromatografica per la determinazione dei metossifenoli [Zangrando et al 2013].

MINUTI	% A	%B
0	85	15
2	85	15
3	70	30
8	70	30
16	30	70
17	0	100
27	0	100
29	85	15
34	85	15

In questo caso come rilevatore è stato utilizzato uno spettrometro di massa a triplo quadrupolo API 4000. Il flusso di eluente entra in una sorgente ESI, operante in polarità negativa, in cui si ha la ionizzazione degli analiti. Gli ioni prodotti sono poi analizzati nel triplo quadrupolo operante in modalità MRM (► paragrafo 3.3.3). Le opportune condizioni operative per ogni analita studiato sono state identificate infondendo una soluzione standard per iniezione diretta (flusso di 10 $\mu\text{l min}^{-1}$) mediante una pompa siringa Model “11” (Harvard Apparatus Inc., Holliston, MA, USA).

Per ogni analita sono stati individuati gli ioni precursori al Q1, le diverse frammentazioni ottenuti nella cella di collisione Q2 ed infine rilevate al Q3, scegliendo per la quantificazione quelle più intense e significative. La tabella 19 riassume le masse di ogni composto, il rapporto massa/carica (m/z) dello ione precursore e dei principali frammenti, e i parametri ottimizzati (paragrafo 4.2.1). La transizione impiegata per la quantificazione è evidenziata in grassetto [Zangrando et al. 2013].

Tabella 19 Parametri spettrometrici ottimizzati per ogni metossifenolo; evidenziata la transizione utilizzata per la quantificazione [Zangrando et al. 2013].

NOME	PM	Q1 [M-H] ⁻ (m/z)	Q3 (m/z)	DP (V)	EP (V)	CE (V)	CXP (V)
Nativi							
Acido p-coumarico	164	162,9	119,2	-52	-4	-17	-8
			92,8	-52	-4	-42	-7
Siringaldeide	182	180,9	165,8	-42	-10	-18	-12
			150,9	-42	-10	-25	-12
Acido siringico	198	196,8	181,8	-47	-10	-16	-15
			121,0	-47	-10	-22,7	-8,5
Acido sinapico	224	222,9	163,9	-52	-10	-19	-15
			148,9	-52	-10	-27	-12
Acido vanillico Acido isovanillico	168	166,9	151,9	-51	-10	-19	-10
			107,8	-51	-10	-28	-9
			91,0	-51	-10	-25	-6
Acido omovanillico	182	180,8	151,2	-48	-4	-10,2	-7
			122,0	-48	-4	-23	-5
Vanillina	152	150,9	135,8	-50	-10	-18	-11
			92,0	-50	-10	-27,5	-6
Acido Ferulico	194	193	177,9	-42	-10	-18	-11
			133,8	-42	-10	-21	-12
Coniferaldeide	178	176,9	161,9	-41	-10	-19,3	-12,5
			133,8	-41	-10	-28,1	-9
Marcati							
Vanillina ¹³ C ₆	158	156,9	141,8	-54	-10	-19	-8
			96,9	-54	-10	-28	-8,8
Ac. Vanillico ¹³ C	169	167,8	152,7	-51	-10	-19	-12
			107,8	-51	-10	-28	-9

I parametri ottimizzati della sorgente ESI sono riportati nella tabella 20.

Tabella 20: Condizioni ottimizzate per la sorgente ESI [Zangrando et al. 2013].

Scan Type	MRM
Polarity	Negativa
Ion Source	Turbo Spray
T (°C)	650
GSI1 (psi)	45
GSI2 (psi)	60
CUR (psi)	25
CAD (psi)	6
IS (V)	-4450

L'immagine del cromatogramma (Fig. 39) mostra la separazione cromatografica ottenuta.

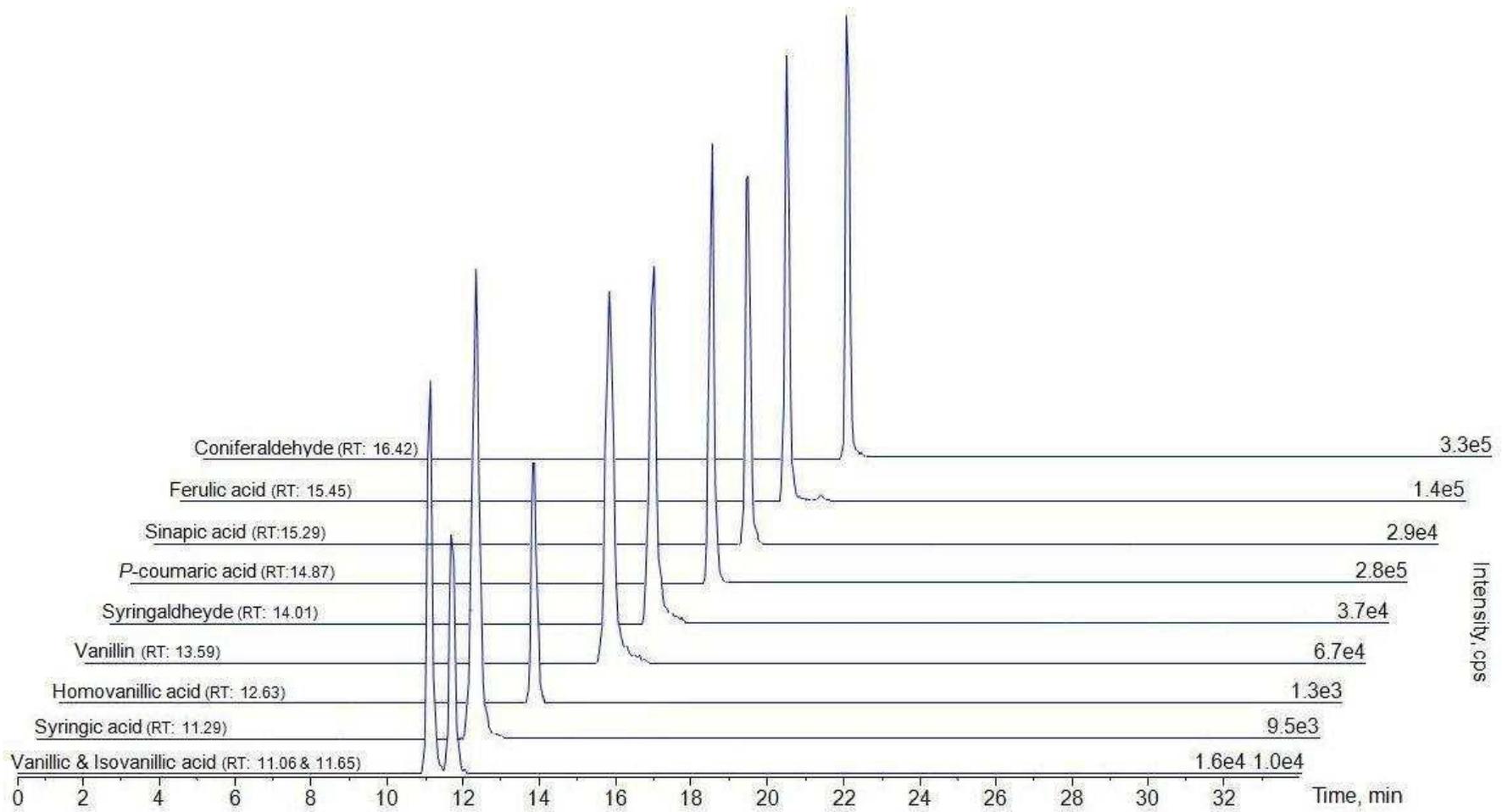


Figura 39: separazione cromatografica dei metossifenoli [Zangrando et al. 2013].

8) Procedura pre-analitica

Lo sviluppo di una metodologia preanalitica prevede l'individuazione delle condizioni di preparazione più adatte ed efficaci per il trasferimento degli analiti in esame dalla matrice ad una soluzione iniettabile in uno strumento analitico. Poiché lo scopo del lavoro è quello di ottenere una quantificazione accurata e precisa dei composti presi in esame, la preparazione dei campioni è forse la fase più delicata di tutto il procedimento analitico, data l'alta probabilità di perdita di analita e contaminazione.

8.1) Minimizzazione della contaminazione

Per limitare i problemi dovuti alla contaminazione è stata eseguita una attenta procedura di pulizia del materiale di laboratorio.

La vetreria di laboratorio viene lasciata in un bagno di acqua e sapone Contrad[®] per 24 ore e successivamente sciacquata abbondantemente con acqua ultrapura e poi decontaminata con MeOH. Per eliminare eventuali residui organici è stata inoltre sottoposta a due cicli da 14' in bagno a ultrasuoni con acqua ultrapura. Il materiale metallico (pinzette, forbici, spatole), prima di ogni operazione è lavato con acqua ultrapura, decontaminato con metanolo e fatto asciugare.

Per quanto riguarda i filtri in PTFE da 0.45 μm , prima della filtrazione del campione devono essere decontaminati con un solvente organico (metanolo) e sciacquati con abbondante acqua ultrapura per rimuovere eventuali residui organici.

Poiché il levoglucosano e i metossifenoli sono composti ubiquitari, al fine di minimizzare la contaminazione ambientale, la procedura pre-analitica è stata condotta all'interno di un banco a flusso laminare, rivestito in acciaio inox.

8.2) Preparazione dei campioni

Uno degli scopi di questo lavoro di tesi è la determinazione di un gran numero di analiti nello stesso campione, applicando la stessa procedura pre-analitica in modo da ridurre sensibilmente i

tempi di preparazione del campione e massimizzare le informazioni ottenibili di ciascuno. Per questo motivo si è adottata la procedura esistente per l'estrazione del levoglucosano [Perrone M.G. et al, 2012] impiegandola anche per l'estrazione dei metossifenoli, [Zanrando et al. 2013; Turchet M. 2013]

I campioni sono stati estratti in acqua ultrapura due volte per quattordici minuti e gli estratti riuniti sono filtrati tramite un filtro in PTFE Ø 25 mm da 0,45 µm (attivato con MeOH e lavato con acqua ultrapura) per eliminarne il materiale particolato residuo e tracce del filtro impiegato come supporto di campionamento. Gli estratti sono analizzati in LC/MS. Questa procedura è stata impiegata per la preparazione dei campioni sia nella determinazione del levoglucosano che per i metossifenoli, ed è riassunta in figura 40.



Figura 40: schema della procedura pre-analitica applicata per la determinazione di metossifenoli e levoglucosano.

La fase principale della procedura è l'introduzione degli standard (Tabella 21), poiché una quantità errata comprometterebbe tutta l'analisi.

Tabella 21: aggiunte standard interno.

Standard interno	Aggiunte	
	Supporti scanalati	Supporti Back
Metossifenoli* [tabella 7]	70 µl	300 µl
Levoglicosano* [3,98 ng µl ⁻¹]	140 µl	500 µl

8.3) Procedura pratica di validazione per la determinazione di levoglicosano mannosano galattosano e metossifenoli

Il metodo analitico, messo a punto per l'analisi del levoglicosano e dei metossifenoli, deve essere validato analizzando la linearità della risposta strumentale attraverso la costruzione della retta di calibrazione, il calcolo del LOD e dell' LOQ, della resa (o recupero) e dell'accuratezza ed infine preparando i bianchi procedurali. Tale operazione viene eseguita applicando la procedura di estrazione su filtri non esposti, suddivisi nel modo seguente:

- 4 beute per i bianchi (B1-B2-B3-B4);
- 4 beute per la valutazione dell'accuratezza (A1-A2-A3-A4);
- 4 beute per la valutazione del recupero (R1-R2-R3-R4).

Dal momento che si tratta di filtri non esposti, dovranno essere aggiunti sia i composti nativi che gli standard secondo le modalità evidenziate dalla tabella seguente (Tabella 22).

Tabella 22: descrizione delle aggiunte delle miscele di composti nativi e marcati.

Beute	Aggiunte
BIANCHI B1-B2-B3-B4	<p>Ai filtri spezzettati nelle beute sono stati aggiunti:</p> <ul style="list-style-type: none"> ➤ 1 ml (scanalati) o 600 µl (back) di miscela di standard marcati di levoglicosano [Tabella 7]; ➤ 70 µl (scanalati) o 300 µl (back) di miscela di standard marcati di metossifenoli [Tabella 14].
ACCURATEZZE A1-A2-A3-A4	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Ai filtri spezzettati nelle beute sono stati aggiunti: ➤ 140 µl (scanalati) o 600 µl (back) di miscela di standard nativi di levoglicosano [Tabella 7]; ➤ 70 µl (scanalati) o 300 µl (back) di miscela di standard nativi di metossifenoli [Tabella 14];

	<ul style="list-style-type: none"> ➤ 1 ml (scanalati) o 600 µl (back)di miscela di standard marcati di levoglucosano [Tabella 7]; ➤ 70 µl (scanalati) o 300 µl (back)di miscela di standard marcati di metossifenoli [Tabella 14].
<p style="text-align: center;">RESE R1-R2-R3-R4</p>	<p>Ai filtri spezzettati nelle beute sono stati aggiunti:</p> <ul style="list-style-type: none"> ➤ 140 µl (scanalati) o 600 µl (back)di miscela di standard nativi di levoglucosano [Tabella 7]; ➤ 70 µl (scanalati) o 300 µl (back)di miscela di standard nativi di metossifenoli [Tabella 14]. <p>Solo al termine della procedura pre-analitica sono stati aggiunti:</p> <ul style="list-style-type: none"> ➤ 1 ml (scanalati) o 600 µl (back)di miscela di standard marcati di levoglucosano [Tabella 7]; ➤ 70 µl (scanalati) o 300 µl (back)di miscela di standard marcati di metossifenoli [Tabella 14].

9) Risultati e conclusioni

9.1) Validazione dei metodi messi a punto

.1.1.1) Validazione del metodo IC-orbitrapMS

Il levoglucosano viene generalmente determinato mediante tecniche analitiche come GC/MS previa derivatizzazione [Elias, V. O. et al 2001; Bergauff M. A., et al. 2009; García, C. D. et al 2005; Simoneit, B.R.T., et al.2000]. Orasche, J. et al (2011) ha proposto un metodo innovativo in cui ha accoppiato il gas cromatografo ad uno spettrometro di massa con tecnologia TOF “*Time Of Flight*” (GC-TOF-MS). Sempre più spesso, però, molti autori si sono avvalsi della tecniche che prevedono l'accoppiamento della cromatografia liquida HPLC con la spettrometria di massa. In letteratura si possono trovare molti articoli riguardanti l'analisi del levoglucosano mediante l'accoppiamento di un HPLC a differenti analizzatori di massa. Ne sono esempio: Gambaro et al (2008) che ha usato come spettrometro di massa un triplo quadrupolo Api 4000; Schkolnik, G., et al (2006) che ha condotto le analisi usando una trappola ionica; e ;Dye, C. er al. (2005) hanno accoppiato il cromatografo liquido ad uno spettrometro di massa con tecnologia TOF. Questo approccio ha l'indubbio vantaggio di evitare la derivatizzazione degli analiti, benché difficilmente si osservi una completa separazione cromatografica fra levoglucosano, mannosano e galattosano; che invece è raggiungibile mediante cromatografia ionica. La strumentazione normalmente utilizzata in cromatografia ionica prevede l'impiego di un detector amperometrico pulsato (HPAEC-PAD) [Lee, J. J et al 2008; Caseiro, A., et al 2007; Engling, G. et al 2006; Piazzalunga A. et al 2010]. Recentemente alla cromatografia ionica si è affiancata la spettrometria di massa che garantisce sensibilità e selettività evitando problemi di interferenza dovuti alla coeluizione fra gli analiti cercati ed altri zuccheri (arabitololo e mannitololo)[Piazzalunga A. et al 2010]. In letteratura si possono trovare alcuni tipi di interfacciamento IC/MS per quanto riguarda l'analisi del levoglucosano. Saarnio, K et. al (2010) ha proposto l'accoppiamento tra il cromatografo ionico Dionex ICS-3000 con lo spettrometro di massa a singolo quadrupolo Dionex MSQ; Cavalli, S. et al (2004) tramite l'IC ionex ICS-5000 RFIC e lo spettrometro di massa a bassa risoluzione (singolo quadrupolo) MSQ Enhanced Low Mass Option (ELMO); Schkolnik, G. (2006) et al. hanno proposto l'accoppiamento del cromatografo a scambio ionico IEC-HPLC ad uno spettrometro di massa a trappola ionica.

A nostra conoscenza, in questo lavoro di tesi, per la prima volta viene proposto l'interfacciamento tra il cromatografo ionico e lo spettrometro di massa con rilevatore orbitrap.

In generale l'interfacciamento tra il cromatografo ionico e lo spettrometro di massa è problematico, in quanto:

- Si è in presenza di una fase mobile altamente corrosiva (NaOH) che se immessa nello spettrometro di massa potrebbe danneggiare le parti che compongono lo strumento, provocandone la rottura oltre a provocare fenomeni di soppressione ionica.
- Viene utilizzato un soppressore, che ha il compito di eliminare la soda dal flusso di eluizione in uscita dalla colonna evitando il danneggiamento dello spettrometro di massa, ma spesso lavora a pressioni incompatibili con la sorgente di ionizzazione.
- L'utilizzo di una sorgente ESI, genera delle contropressioni non supportate dal soppressore ionico a causa dell'ago attraverso il quale avviene la nebulizzazione e la ionizzazione.

Per risolvere l'ultimo problema si è deciso di adottare una sorgente APCI dotata di un ago più corto riducendo così la contropressione dell'elettrodo.

I vantaggi di questo metodo analitico sono:

- Separazione cromatografica fra i tre isomeri.
- Analisi in alta risoluzione con un rilevatore altamente specifico.
- Acquisizione dei dati in modalità “*full scan*” che fornisce la possibilità di post elaborazione dei dati ottenuti nella ricerca di composti idrofilici separati nella colonna cromatografica anziché nella prima parte dell'eluizione.

Per effettuare la separazione cromatografica è stata scelta una colonna Dionex Carbopac TM PA10 (250x2mm) specifica per la separazione di monosaccaridi, disaccaridi e oligosaccaridi mediante eluizione isocratica [Thermo Fisher Scientific™,2010].

Trattandosi di una tecnica analitica nuova, devono essere valutati la linearità del segnale, i limiti di rilevabilità e di quantificazione strumentali, resa, accuratezza e ripetibilità.

La quantificazione dei campioni è stata effettuata impiegando il metodo dello standard interno, utilizzando come standard il levoglucosano $^{13}\text{C}_6$ marcato isotopicamente, confrontando l'area del picco del composto nativo con l'area dello standard interno. Il risultato è stato corretto per ogni composto utilizzando il fattore di risposta strumentale, valutato per ogni analita, e ottenuto

preparando una soluzione standard contenente sia gli standard nativi che lo standard usato come standard interno.

Per costruire la retta di calibrazione si sono preparate e iniettate soluzioni contenenti i tre isomeri nativi alle concentrazioni di, 10, 20, 50, 100, 200, 500, 800, 1000 $\text{pg } \mu\text{L}^{-1}$ anelle quali è presente anche lo standard interno (Levogluosano $^{13}\text{C}_6$) alla concentrazione costante di $149 \text{ pg } \mu\text{L}^{-1}$. Infine sono state costruite le rette riportando il rapporto tra la concentrazione del composto nativo (C_n) e quella dello standard interno (C_m) in ascissa, e con il rapporto tra l'area del composto nativo (A_n) e quella del composto marcato isotopicamente (A_m) in ordinata. A titolo di esempio è riportata la retta di calibrazione del levogluosano (Fig. 41), i valori di pendenza, intercetta e coefficiente di correlazione R^2 risultano essere superiori a 0,99 per tutti gli anidro zuccheri (tabella 23).

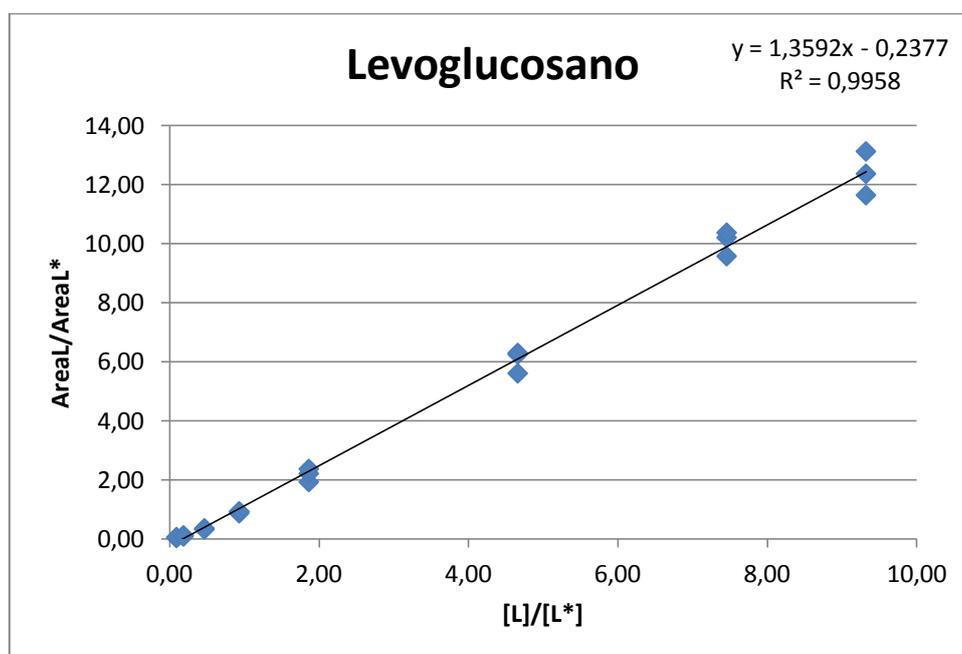


Figura 41:retta di taratura del levogluosano.

Tabella 23: Coefficiente angolare, intercetta e coefficiente di correlazione ottenuti della retta di calibrazione di levogluosano, mannosano e galactosano.

Composti	Pendenza	Intercetta	R2
Levogluosano	1,3592	- 0,2377	0,9958
Mannosan	2,2157	- 0,5453	0,9972
Galactosan	4,074	- 0,5844	0,9993

La procedura di validazione è stata effettuata su filtri nuovi, opportunamente trattati in muffola a 400°C per 4 ore per evitare che essi siano stati contaminati durante la produzione o il trasporto. La procedura è stata condotta effettuando 3 repliche, valutando i bianchi procedurali, le accuratezze e le

rese di estrazione. Si sono utilizzati sia i composti nativi che gli standard marcati secondo le modalità descritte in tabella 22. I risultati sono riportati nella tabella 24.

Tabella 24: risultati della validazione

Composti	Errore medio (%)	CV% errore	Resa (%)	CV% resa
Levoglucosano	-3	5	85	6
Mannosan	-9	10	86	5
Galactosan	-7	4	84	10

I risultati sono confrontabili con quelli pubblicati in letteratura. Infatti mediante GC/MS, Ma, Y., et al (2010) riportano valori di “*recovery*” di 92.3 ± 2.8 % per il levoglucosano, $92.8 \pm 3.7\%$ per il mannosano e $91.7 \pm 6.4\%$ per il galactosano. Caseiro, A., et al (2009), mediante la tecnica HPAEC-PAD hanno pubblicato valori di resa nei “*range*” di 95%-108% per i tre isomeri. Buoni sono anche i valori dell’errore relativo percentuale correlati all’accuratezza poiché i valori sono compresi tra il 3% e il 7%. La ripetibilità del metodo è assicurata da valori bassi di CV% ($\leq 10\%$).

I limiti di rilevabilità e di quantificazione strumentali (tabella 25) sono stati calcolati valutando il rapporto segnale rumore: 3 volte il rapporto S/N per il LOD e 10 volte il medesimo rapporto per il calcolo del LOQ [Bliesner, D.M. 2006].

Tabella 25: limite di rilevabilità strumentale (LOD) e quello di quantificazione (LOQ) levoglucosano, mannosano e galactosano.

Composti	LOD Pg ass ($\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$)	LOQ Pg ass ($\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$)
Levoglucosano	1250 (50)	4167 (167)
Mannosano	243 (10)	781 (31)
Galactosano	31 (1)	104 (4)

Dal confronto dei limiti di rilevabilità e di quantificazione della metodologia messa a punto con i valori rinvenuti in letteratura ci si è resi conto che questa nuova metodologia presenta dei valori di LOD e LOQ troppo alti per l’analisi di campioni di aerosol antartico. In letteratura sono riportati metodi caratterizzati da bassissimi limiti di rilevabilità, come Gambaro et al (2008) che ha ottenuto tramite HPLC/ESI/MS triplo quadrupolo, un limite di rilevabilità per il levoglucosano pari a $0,003 \text{ pg } \mu\text{L}^{-1}$. Utilizzando una tecnica di cromatografia a scambio anionico con detector amperometrico (HPAEC-PAD), Schkolnik, G et al (2005), ha ottenuto un limite di rilevabilità per il levoglucosano di $500 \text{ pg } \mu\text{L}^{-1}$, superiore a quello ottenuto in questo lavoro.

Altri autori, utilizzando la tecnica di derivatizzazione degli analiti e la successiva analisi in gas cromatografia accoppiata alla spettrometria di massa hanno calcolato i seguenti LOD: 29 pg assoluti per il levoglucosano, 68 pg assoluti per il mannosano e 34 pg assoluti per il galattosano [Ching-Lin Hsu, et al 2007]; 60 pg μL^{-1} per il levoglucosano [Gao, S. et al, 2003].

Il metodo sviluppato presenta notevoli vantaggi, purtroppo il suo limite è dovuto agli alti limiti di rilevabilità e quantificazione. In seguito ad un'indagine preliminare si è dimostrato molto utile nell'analisi di alcuni campioni di prova di origine urbana, ma ha rivelato i suoi limiti una volta applicato a campioni di origine antartica, caratterizzati da livelli di concentrazione bassissimi. Dallo stesso gruppo di ricerca è stato sviluppato un metodo HPLC-MS/MS [Perrone, M.,G., et al 2012] che, benché non riesca a separare cromatograficamente levoglucosano e mannosano, permette con successo la determinazione del levoglucosano a livelli riscontrati nelle aree polari. Esempi ne sono gli studi condotti in articolo da Zangrando, R. et al (2013). I dettagli del metodo sono riportati in letteratura [Perrone, M.,G., et al 2012] ma per i nostri scopi è importante considerare il basso limite di rilevabilità del levoglucosano, 2,87 pg assoluti a fronte dei 1250 pg assoluti rilevati dal metodo IC-orbitap MS. Il motivi dei degli alti limiti di rilevabilità ottenuti sono da imputare all'utilizzo della sorgente APCI anziché di una più performante sorgente ESI. Quest'ultima si dimostra in genere più efficiente nella ionizzazione del levoglucosano [Gambaro A. et al. 2008]. La sorgente ESI non è stata utilizzata a causa dei seri problemi di contro pressione riscontrati, tali da impedire il corretto funzionamento del soppressore ionico e quindi l'eliminazione della NaOH dall'eluente con conseguente rischio di danneggiare l'LTQ Orbitrap XL. Questo problema è stato sollevato ed è imminente l'immissione nel mercato di soppressori ionici di nuova generazione capaci di sopportare contropressioni maggiori. Pertanto vi è quindi la prospettiva di una soluzione al problema che veda questo accoppiamento utilizzabile non solo per analisi di campioni di origine urbana. Vista la presente discussione, i campioni antartici trattati in questo lavoro saranno analizzati tramite il metodo HPLC-MS/MS.

9.1.2) validazione metodo HPLC-orbitrap MS per i metossifenoli

Lo sviluppo del metodo per la determinazione dei metossifenoli mediante HPLC-orbitrap MS è iniziato con il lavoro della tesi di Turchet M. (2012) che ha verificato la linearità della risposta e la resa, accuratezza, ripetibilità della metodologia analitica per i filtri ($\varnothing 102$ mm) applicabili ai campionatori ad alto volume TE 5000, (Tisch Environmental Inc.). Poiché in questo lavoro di tesi sono stati utilizzati supporti di campionamento diversi, la validazione è stata implementata, validando la metodologia anche per i supporti scanalati e i filtri back.

Turchet M. (2012) valutò la linearità della risposta, osservando i coefficienti di correlazione R^2 maggiori di 0,99 per tutti gli analiti. La quantificazione è stata effettuata tramite il metodo dello standard interno, utilizzando la vanillina marcata isotopicamente

Dal momento che Turchet, M. (2012) ha validato il metodo solo per i filtri tondi, parte del lavoro si è concentrato nell'estendere la validazione del suddetto metodo anche ai supporti scanalati e back. I risultati sono riportati nella tabella 26.

Tabella 26 riassunto della validazione dei metossifenoli con la tecnica HPLC-orbitrap MS

Composto	Bianco medio (ng ass)	STD_b (ng ass)	Resa (%)	CV% resa	Errore (%)	CV% errore
Filtri scanalati						
Ac.Vanillico	1,4	0,8	40	10	-3	8
Ac. Isovanillico	0,29	0,07	42	3	-1	8
Ac. Omovanillico	0,15	0,04	36	9	-3	7
Coniferilaldeide	0,22	0,06	34	11	-13	2
Ac.p-Cumarico	0,24	0,06	43	12	-4	7
Siringaldeide	1,0	0,3	38	11	-4	9
Vanillina	3,1	0,7	45	11	3	8
Ac.Ferulico	0,11	0,02	37	20	-7	6
Ac.Sinapico	0	0	1	139	-96	146
Ac.Siringico	0,08	0,04	36	11	-5	8
Filtri back						
Ac.Vanillico	0,96	0,03	67	2	-8	6
Ac. Isovanillico	0,13	0,02	71	5	1	1
Ac. Omovanillico	0,09	0,01	71	4	-2	4
Coniferilaldeide	0,13	0,01	65	3	-13	4
Ac.p-Cumarico	0,21	0,04	70	1	-4	4
Siringaldeide	0,3	0,02	71	1	1	5
Vanillina	1,7	0,2	72	2	1	4
Ac.Ferulico	0,06	0,01	103	4	4	4
Ac.Sinapico	0	0	217	81	224	49
Ac.Siringico	0,025	0,005	73	5	1	4

La convalida del metodo per i supporti scanalati e i filtri back ha evidenziato che l'acido sinapico non può essere validato a causa dell'elevato errore percentuale connesso alla sua quantificazione.

Sono stati ottenuti errori percentuali compresi tra l'1 e il 15%, il che conferma la validazione del metodo per i diversi composti. Per quanto riguarda la percentuale di resa, si può notare che i filtri back presentano rese di estrazione molto superiori rispetto ai supporti scanalati. Generalmente nei filtri back le rese sono tutte superiori al 65%, paragonabili a quelle ottenute da Simpson, C.D. et al (2005) (65-100%), Parchintsev J.(2010) (80%) e Hoffmann D. (2007) (fra il 70 e il 104%). Tale risultato è confermato anche dalla validazione di Turchet, M. (2012), effettuata con filtri tondi che ha prodotto rese superiori al 70% con un errore medio percentuale compreso tra 0,5 e 8. Le rese di estrazione inferiori dei supporti scanalati rispetto ai back si riscontra anche osservando il lavoro di validazione dei metossifenoli col metodo HPLC-MS/MS pubblicato da Zangrando R. et al. (2013) (► paragrafo 7.3.1). Questo può essere spiegato osservando le caratteristiche dei vari supporti. I filtri back sono estremamente simili, per caratteristiche dei materiali e metodologia con cui trattengono il particolato, ai filtri tondi. Basti pensare che essendo posti all'ultimo stadio del campionatore, l'aria fluisce attraverso i loro pori come avviene nei filtri tondi. Pertanto le caratteristiche strutturali delle due tipologie di filtro sono sostanzialmente simili. I supporti scanalati, sono differenti in termini di modalità di cattura di particolato rispetto ai filtri back e tondi, poichè avviene per impatto. L'aria non attraversa i pori del supporto ma compie un percorso tortuoso passando tra le scanalature dalla testa del campionatore. Le particelle, le cui dimensioni non le consentono di compiere tale percorso, si depositeranno sulla superficie del supporto. Infine, la ripetibilità del metodo è garantita da un CV% basso in tutti gli analiti.

Per la determinazione dei metossifenoli, i campioni, sono stati analizzati impiegando le tecniche analitiche validate: HPLC-orbitrap MS [Turchet M. 2012] e HPLC-MS/MS [Zangrando et al. 2013]. Benché siano entrambe convalidate, ovvero rispettano i requisiti di resa, accuratezza, precisione, e linearità della risposta nella determinazione degli analiti in causa, differiscono per i limiti di rilevabilità e di quantificazione strumentali (tabella 27). Per il metodo HPLC-orbitrap MS sono stati ricalcolati LOD e LOQ, poiché quelli riportati da Turchet M. (2012) risultavano errati.

Tabella 27: Confronto tra gli LOD e LOQ relativi alla tecnica HPLC-orbitrap MS di cui è stato ricalcolato il rapporto segnale rumore rispetto a quello calcolato da Turchet M. (2012) poiché risultante errato e la tecnica HPLC-MS/MS di Zangrando et al. (2013).

STRUMENTI COMPOSTI	HPLC-orbitrap MS		HPLC-MS/MS	
	LOD pg ass (pg μl^{-1})	LOQ pg ass (pg μl^{-1})	LOD pg ass (pg μl^{-1})	LOQ pg ass (pg μl^{-1})
Acido vanillico	5 (0,3)	16 (0,8)	11 (0,1)	39 (0,4)
Acido isovanillico	-	-	61 (0,6)	204 (2,0)
Acido omovanillico	1 (0,05)	5 (0,3)	43 (0,4)	143 (1,4)
Acido sirigico	10 (0,5)	32 (1,7)	8 (0,08)	26 (0,3)
Acido ferulico	1 (0,05)	4 (0,2)	2 (0,02)	7 (0,07)
Acido p-cumarico	2 (0,1)	8 (0,4)	7 (0,07)	24 (0,2)
Coniferilaldeide	6 (0,3)	19 (1)	2 (0,02)	7 (0,07)
Siringaldeide	1 (0,05)	5 (0,3)	5 (0,05)	16 (0,2)

In letteratura, i migliori valori di LOQ sono pubblicati da Orasche J. et al. (2011), che riporta: 47 pg ass per l'acido vanillico, 25 pg ass per l'acido sirigico e 88 pg ass. per la siringaldeide. I valori riportati in questo studio sono confrontabili con quelli del metodo HPLC-MS/MS e, se non fosse per il minor volume di iniezione, anche il metodo HPLC-orbitrap MS si dimostrerebbe competitivo. Benché il metodo HPLC-orbitrap MS mostri LOD e LOQ strumentali in termini di picogrammi assoluti più favorevoli, a causa del volume di iniezione inferiore, 19 μl contro i 100 μl iniettati con il metodo HPLC-MS/MS, quest'ultimo metodo risulta più sensibile. Questo perché nel metodo HPLC-orbitrap MS è utilizzata una colonna cromatografica di diametro 2,1 mm ad un flusso di 200 $\mu\text{l min}^{-1}$. Una colonna di diametro superiore (4,6 mm) non sarebbe utilizzabile data la non sufficiente efficienza della sorgente ESI dell'orbitrap a flussi di 200 $\mu\text{l min}^{-1}$. Analizzando i valori di LOD e LOQ in termini di pg μl^{-1} si nota che questi in alcuni casi si discostano di poco fra i due metodi, ma poiché i valori di concentrazione nei campioni antartici sono spesso vicini al limite di quantificazione, anche una piccola variazione nella sensibilità può fare la differenza.

I campioni sono stati analizzati impiegando entrambe le metodologie analitiche, in fase di integrazione dei cromatogrammi, ci si è resi conto che nel metodo HPLC-MS/MS i picchi degli analiti presenti nell'eluente erano ben distinti dal rumore di fondo, con intensità superiori al LOQ, il che si traduce in una quantificazione affidabile degli analiti. Nel caso del metodo HPLC-orbitrap MS, gli stessi analiti presentavano picchi cromatografici meno distinti (spesso perturbati dal rumore di fondo), poiché presentava un'intensità simile al LOD. La quantificazione però portava a valori

spesso sottostimati degli analiti. Alla luce di queste considerazioni, si è pertanto deciso di quantificare i soli dati provenienti dall'analisi in HPLC-MS/MS.

9.2) *Analisi dei dati*

9.2.1) *Determinazione del levoglucosano nell'aerosol antartico.*

I livelli di levoglucosano rilevati nell'area costiera antartica prossima alla base italiana Mario Zucchelli nel particolato atmosferico di diametro aerodinamico minore di 0,49 μm variano in un intervallo fra 114 e 3,8 pg m^{-3} , con un valore medio di 7,3 pg m^{-3} .

In letteratura, numerosissimi sono gli autori che riportano le concentrazioni ambientali del levoglucosano, limitandosi ad ambienti di “*background*” (marino, costiere, continentale ecc..). Puxbaum, H. et al (2007) hanno rinvenuto concentrazioni di fondo per l'ambiente marittimo delle Azzorre (Portogallo) di 6,6 ng m^{-3} in inverno (luglio 2002- luglio 2004) e 2,0 ng m^{-3} in estate (luglio 2002- luglio 2004). Nella zona rurale costiera (Aviero, Portogallo) il levoglucosano era presente a livelli di 1290 ng m^{-3} in inverno (luglio 2002- luglio 2004) e 31,5 ng m^{-3} in estate (luglio 2002- luglio 2004); mentre nella zona rurale continentale (K-Putza, Ungheria) si sono rinvenuti 635 ng m^{-3} in inverno (luglio 2002- luglio 2004) e 21,1 ng m^{-3} in estate (luglio 2002- luglio 2004) [Puxbaum, H. et al 2007]. Per quanto riguarda i valori di “*background*” continentale di levoglucosano: Puy de Dome (Francia) 18,3 ng m^{-3} in inverno (ottobre 2002- ottobre 2004) e 7,1 ng m^{-3} in estate (ottobre 2002- ottobre 2004) [Puxbaum, H. et al 2007], 11,7 ng m^{-3} in inverno (ottobre 2005- aprile 2007) e 4,0 ng m^{-3} in estate (ottobre 2005- aprile 2007) [Bourcier L., et al 2010]; Sonnblick (Austria) con 12,4 ng m^{-3} in inverno (ottobre 2002- ottobre 2004) e 10,2 ng m^{-3} in estate (ottobre 2002- ottobre 2004). Per quanto riguarda il “*background*” alpino (Alpe San Colombano), il valore di fondo si aggira attorno ai 10 ng m^{-3} in inverno e ai 6 ng m^{-3} in estate [Perrone, M., G., et al 2012]. La concentrazione di levoglucosano nel “*background*” oceanico è stata riportata da Mochida, M., et al (2003) per l'oceano Pacifico di 14-15 ng m^{-3} (15 marzo- 25 aprile 2001) e da Simoneit, B. R., (2000) per l'oceano Atlantico di 0,046 – 0,15 ng m^{-3} (novembre 1985). Nel mare del Giappone la concentrazione ambientale è di 29 ng m^{-3} (15 marzo- 25 aprile 2001), mentre nel mare ad est della Cina è di 1529 ng m^{-3} (15 marzo- 25 aprile 2001) [Mochida, M., et al 2003]. Alle Maldive, la concentrazione di fondo di levoglucosano, monitorata dal 30 agosto al 21 gennaio 2004 presentava un valore medio di 5,55 ng m^{-3} [Stone E.A. et al, 2007].

Per quanto riguarda le zone remote del pianeta, le concentrazioni sono notevolmente minori, in linea con quelle rinvenute in questo lavoro di tesi. Nella zona artica si riportano concentrazioni di levoglucosano pari a $0,32 \text{ ng m}^{-3}$ (marzo- dicembre 2006) a Summit (Groenlandia) [von Schneidemesser, E. et al 2009]; $0,147 \text{ ng m}^{-3}$ (19 febbraio- 10 giugno 1991) ad Alert (Canada) [Fu, P. Q. et al. 2009]; $0,2 \text{ ng m}^{-3}$ (25-28 luglio 2004) a Zeppelin (Ny Ålesund, Norvegia) [Stohl, A. et al. 2007]; $2,1$ e $3,3 \text{ ng m}^{-3}$ (27 aprile – 5 maggio 2006) in condizioni di combustione di biomassa a Zeppelin (Ny Ålesund, Norvegia) [Stohl, A. et al. 2006]; $0,065 \text{ ng m}^{-3}$ (19 aprile – 14 settembre 2010) a Gruvebadet (Ny Ålesund, Norvegia) [Zangrando, R., et al., 2013]. In questo lavoro sul particolato atmosferico con diametro aerodinamico minore di $0,49 \mu\text{m}$ (escludendo il primo campione) è stata determinata una concentrazione media di $6,9 \text{ pg m}^{-3}$, un ordine di grandezza inferiore rispetto ai livelli riscontrati in artico [Zangrando, R., et al., 2013]

L'andamento stagionale del levoglucosano è visibile nella figura 42 e riassunto nella tabella 28.

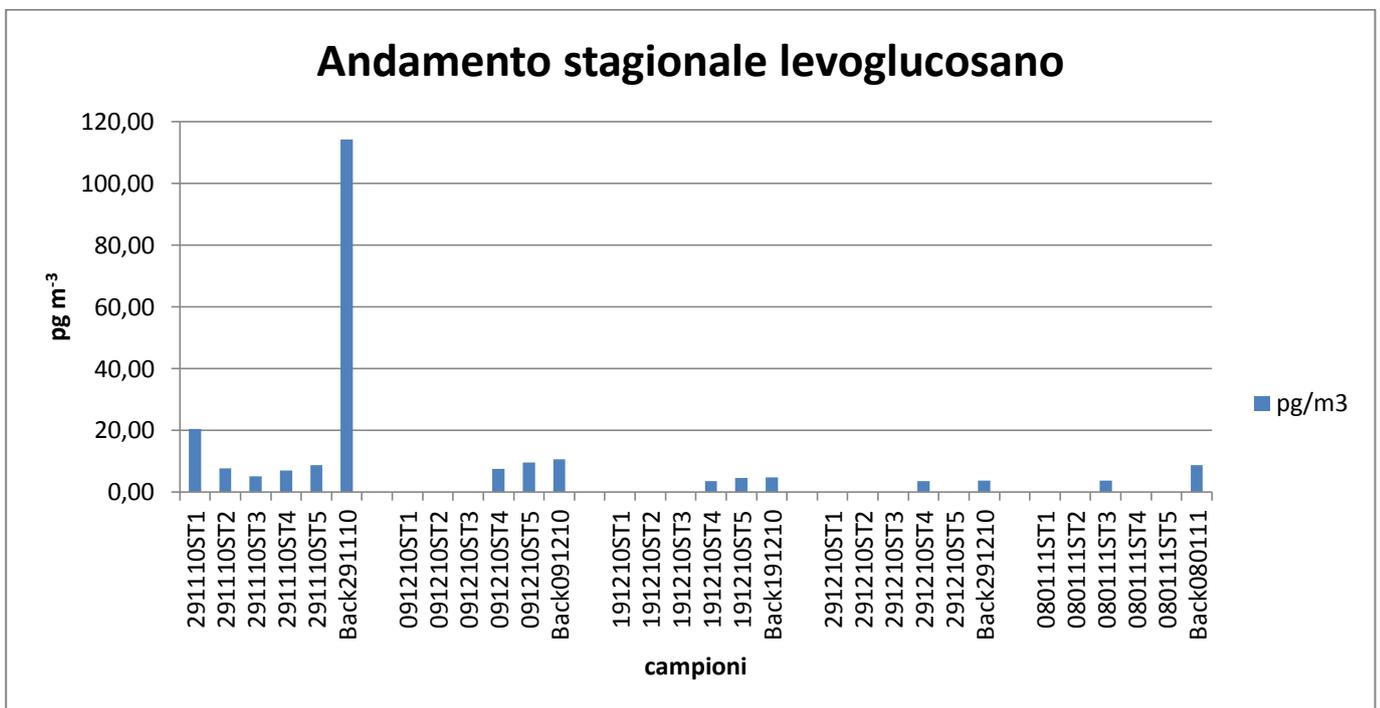


Figura 42: Andamento stagionale del levoglucosano

Tabella 28: concentrazione levoglucosano nei campioni

campione	stadio	Levoglucosano pg m⁻³
291110	1	20,4
	2	7,7
	3	5,
	4	7
	5	8,6
	Back	114,2
091210	1	BDL
	2	BDL
	3	BDL
	4	7,5
	5	9,5
	Back	10,6
191210	1	BDL
	2	BDL
	3	BDL
	4	3,5
	5	4,6
	Back	4,7
291210	1	BDL
	2	BDL
	3	BDL
	4	3,6
	5	BDL
	Back	3,8
080111	1	BDL
	2	BDL
	3	3,6
	4	BDL
	5	BDL

	Back	8,7
--	------	-----

Dalla figura 42 e dalla tabella 28 si può notare come il primo campione sia molto diverso dagli altri. In esso è presente levoglucosano ad una notevole concentrazione in tutti gli stadi (concentrazione totale di 162,9 pg m^{-3} contro un valore medio negli altri campioni di 15,0 pg m^{-3}). Vista la notevole differenza tra il primo e gli altri campioni, prima di effettuare un'analisi sulle caratteristiche ambientali dell'area studiata, si è valutato se il campione 291110 non avesse subito una contaminazione ad opera dell'attività della limitrofa stazione di ricerca. Il luogo di campionamento, Campo Faraglione, per motivi logistici di approvvigionamento di energia elettrica è posizionato nelle vicinanze della stazione di ricerca italiana Mario Zucchelli. Nella scelta della posizione del campo di campionamento si è valutata la direzione dei venti dominanti al fine di posizionare il sito di campionamento sopravento rispetto ai plessi della stazione, così che le emissioni provenienti da essa non contaminassero l'aerosol raccolto. Ciò nonostante, valutando le retro traiettorie relative alle masse d'aria che sono giunte al sito di campionamento, nei giorni relativi alla raccolta del primo campione ci si è resi conto, che alcune masse d'aria hanno sorvolato la stazione MZS prima di giungere a Campo Faraglione. Per valutare la provenienza delle masse d'aria nel periodo 29/11/10 – 9/12/10, si è utilizzato il modello HYSPLIT (*Hybrid Single Particle Lagrangian Integrated Trajectory Model*) del National Oceanic and Atmospheric Administration (NOAA). Tramite questo modello si sono ottenute le retro traiettorie (30 ore) delle masse d'aria ad un'altezza di 50 metri sul livello del mare per i 10 giorni di campionamento relativi alla raccolta del campione 1 (Allegato 2, compresi tutti i parametri utilizzati). La prova di una possibile contaminazione del primo campione è visibile nella figura 43 relativa al giorno 29/11/10 e figura 44 relativa al giorno 7/12/11.

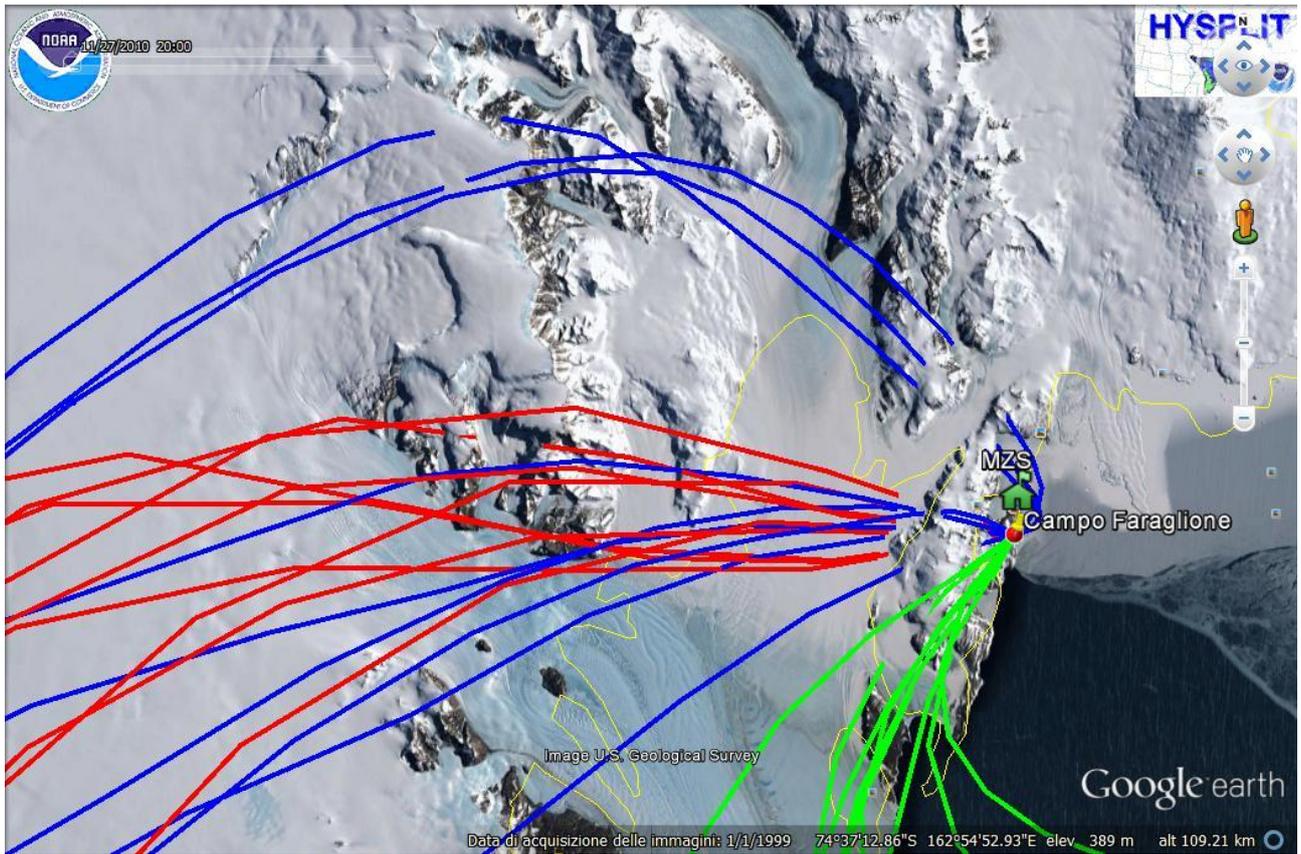


Figura 43: retro traiettoria a 30 ore, Ensemble, del giorno 29/11/10 a 50 m s.l.m. tramite database (GDAS1) calcolate con HYSPLIT MODEL del NOAA. si noti come la massa d'aria evidenziata in blu sorvoli la stazione Mario Zucchelli prima di giungere nell'area di campionamento.

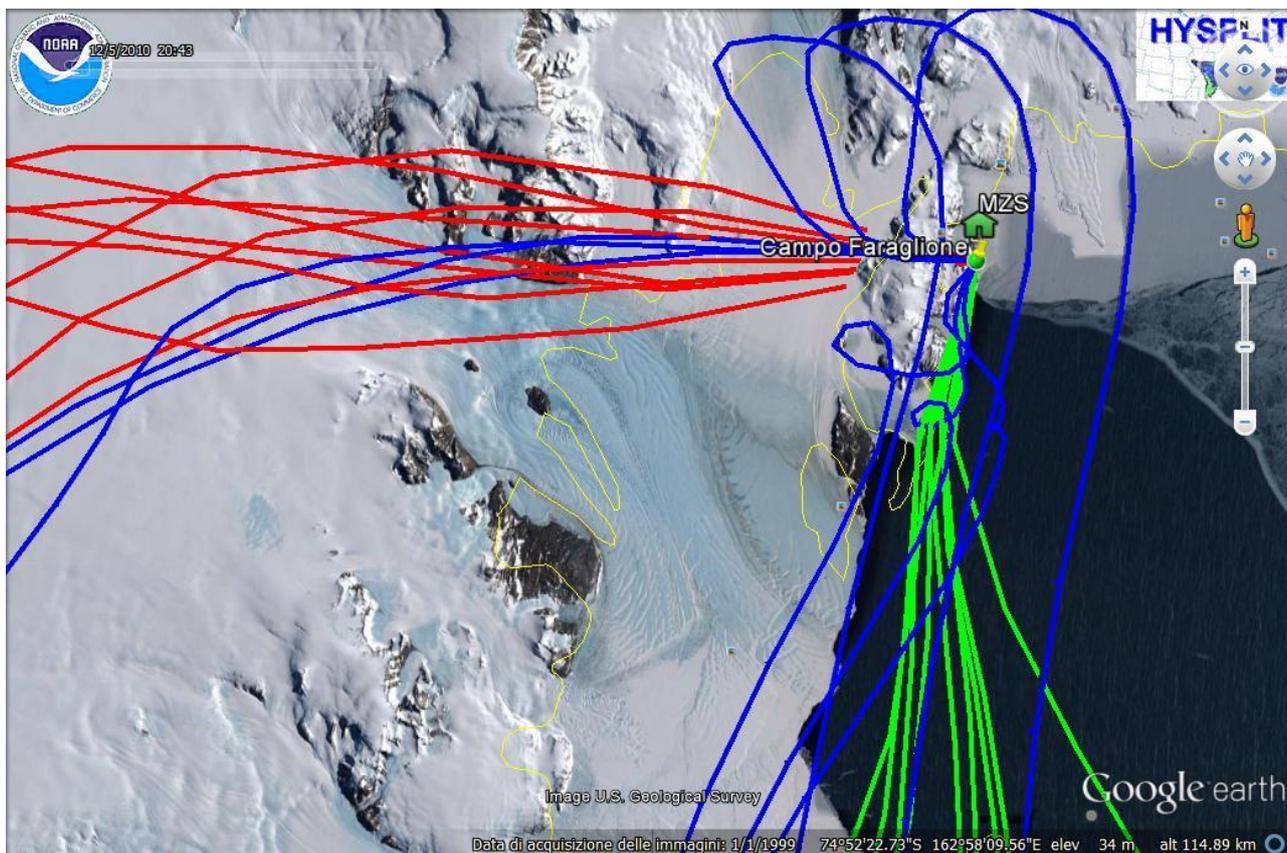


Figura 44: retro traiettoria a 30 ore, Ensemble, del giorno 07/12/10 a 50 m s.l.m. tramite database (GDAS1) calcolate con HYSPLIT MODEL del NOAA. Si noti come la massa d'aria evidenziata in blu circoli attorno alla la stazione Mario Zucchelli prima di giungere nell'area di campionamento.

Come si può notare dalla figura 42, la presenza del levoglucosano è rilevabile sia nella frazione grossolana come in quella fine ($<0,49\mu\text{m}$), generalmente legata al trasporto a lunga distanza. Quest' ultima presenta un valore anomalo di concentrazione dell'analita, con un livello di $114,2\text{ pg m}^{-3}$, rispetto al valore medio registrato per la frazione fine ($<0,49\mu\text{m}$) negli altri campioni di $6,9\text{ pg m}^{-3}$. Un caso simile è stato riscontrato in un lavoro condotto Zangrando R. et al (2013), in cui un campione presentava una concentrazione molto elevata di levoglucosano (435 pg m^{-3}), rispetto agli altri che componevano la campagna artica (media di 13 pg m^{-3}), poiché raccolto nel momento in cui era evidente la presenza di una fonte di contaminazione locale, ovvero un evento di combustione di biomassa provocato intenzionalmente nel corso di un'esercitazione antincendio.

Il levoglucosano è rilevato sempre nella frazione $< 0,49\ \mu\text{m}$ (concentrazione media $6,9\text{ pg m}^{-3}$) e nelle frazioni con diametro aerodinamico $< 1,5\ \mu\text{m}$ (Fig.45).

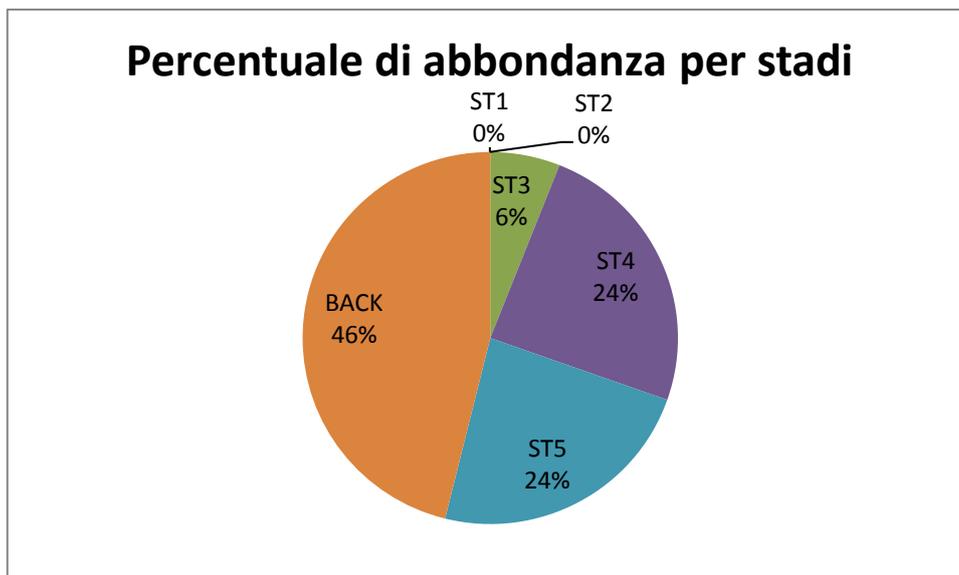


Figura 45: percentuale di abbondanza dei levoglucosano nei vari stadi del campionatore Andersen (senza 291110 poiché contaminato),

Analizzando la ripartizione del levoglucosano nelle diverse classi dimensionali si nota come il 46% sia associato alla frazione ultrafine ($<0.49 \mu\text{m}$). Queste osservazioni sono state confrontate con i dati di letteratura in cui si riporta che il levoglucosano è associato alla frazione fine dell'aerosol [Agarwal S., et al. 2010; Schkolnik, G. et al. 2005; Kleeman, M. J. Et al. 2008; Herckes, P. et al. 2006]. I dati ottenuti concordano con quanto osservato da Zangrando R. et al. (2013) in articolo in cui il levoglucosano per il 98% è associato nelle frazioni $<1,5\mu\text{m}$. La presenza di levoglucosano nella frazione ultrafine, può essere utilizzata come conferma della sua emissione esclusivamente da pirolisi della cellulosa [Louchouart P., (2009)], e di conseguenza la presenza di levoglucosano nelle particelle ultrafini è testimonianza di combustione di biomassa [Kleeman, M. J. 1999; Hedberg, E., 2002; Agarwal S. et al. (2010)] Tutto il levoglucosano analizzato è infatti contenuto in particelle con diametro aerodinamico inferiore ai $3,00 \mu\text{m}$. Agarwal S. et al. (2010), riporta una percentuale di analita nel $\text{PM}_{2,5}$ pari al 94% del totale. I dati ottenuti concordano con quanto pubblicato da Zangrando, R., et al., (2013) nell'analisi di campioni artici: l'84% del levoglucosano totale è associato all'aerosol ultrafine ($<0.49 \mu\text{m}$), mentre il 98% associato al $\text{PM}_{1,5}$. Il rinvenimento di levoglucosano, oltre che nella frazione ultrafine, negli stadi 3 e 4 ($3 - 0,95 \mu\text{m}$) può indicare l'adsorbimento del levoglucosano su particelle atmosferiche di dimensioni superiori [Claeys M., et al. 2010].

9.2.2) *Determinazione dei metossifenoli nell'aerosol antartico*

Analizzando i dati riportati in tabella 29 si può osservare la presenza dell'acido omovanillico e dell'acido p-cumarico a livelli significativamente superiori a $0,10 \text{ pg m}^{-3}$ in tutti i campioni, sia nella frazione grossolana che nella frazione fine dell'aerosol. Tutti gli altri analiti osservabili sono localizzati nella sola frazione fine di alcuni campioni con concentrazioni comprese tra lo $0,01 \text{ pg m}^{-3}$ del campione 191210 dell'acido ferulico nel campione back191210, e lo $0,26 \text{ pg m}^{-3}$ dell'acido vanillico nel campione back291110. Desti particolare attenzione il campione 291110 poiché in esso sono quantificabili diversi analiti spesso assenti o al di sotto del limite di quantificazione negli altri campioni.

Tabella 29: livelli dei metossifenoli nei campioni antartici rilevati mediante HPLC-MS/MS.

campione	stadio	Ac. Vanillico pg m⁻³	Ac. Siringico pg m⁻³	Ac. Omovanillico pg m⁻³	Ac. p- cumarico pg m⁻³	Siringaldeide pg m⁻³	Ac. Ferulico pg m⁻³	Coniferilaldeide pg m⁻³	AC.isovanillico pg m⁻³
291110	1	BDL	BDL	0,20	0,15	BDL	0,17	BDL	BDL
	2	BDL	BDL	0,19	0,16	BDL	0,15	BDL	BDL
	3	BDL	BDL	0,16	0,14	BDL	0,06	BDL	BDL
	4	BDL	BDL	0,16	0,12	BDL	0,05	BDL	BDL
	5	BDL	BDL	0,17	0,11	BDL	-	BDL	BDL
	Back	0,26	0,04	0,27	0,17	0,14	0,17	0,10	-
091210	1	BDL	BDL	0,06	0,10	BDL	BDL	BDL	BDL
	2	BDL	BDL	0,13	0,12	BDL	BDL	BDL	BDL
	3	BDL	BDL	0,10	0,13	BDL	BDL	BDL	BDL
	4	BDL	BDL	0,25	0,20	BDL	BDL	BDL	BDL
	5	BDL	BDL	0,16	0,13	BDL	BDL	BDL	BDL
	Back	BDL	BDL	0,14	0,15	0,06	BDL	BDL	BDL
191210	1	BDL	BDL	0,09	0,14	BDL	BDL	BDL	BDL
	2	BDL	BDL	0,15	0,13	BDL	BDL	BDL	BDL
	3	BDL	BDL	0,21	0,19	BDL	BDL	BDL	BDL
	4	BDL	BDL	0,22	0,23	BDL	BDL	BDL	BDL
	5	BDL	BDL	0,08	0,06	BDL	BDL	BDL	BDL

	Back	BDL	BDL	0,13	0,08	BDL	0,01	BDL	BDL
291210	1	BDL	BDL	0,06	0,07	BDL	BDL	BDL	BDL
	2	BDL	BDL	0,13	0,11	BDL	BDL	BDL	BDL
	3	BDL	BDL	0,20	0,17	BDL	BDL	BDL	BDL
	4	BDL	BDL	0,22	0,14	BDL	BDL	BDL	BDL
	5	BDL	BDL	0,18	0,13	BDL	BDL	BDL	BDL
	Back	BDL	BDL	0,06	0,10	BDL	BDL	BDL	BDL
080111	1	BDL	BDL	0,11	0,10	BDL	BDL	BDL	BDL
	2	BDL	BDL	0,17	0,12	BDL	BDL	BDL	BDL
	3	BDL	BDL	0,18	0,19	BDL	BDL	BDL	BDL
	4	BDL	BDL	0,27	0,17	BDL	BDL	BDL	BDL
	5	BDL	BDL	0,21	0,09	BDL	BDL	BDL	BDL
	Back	BDL	BDL	0,10	0,07	BDL	BDL	BDL	BDL

Generalmente questi analiti vengono determinati in aree influenzate da combustione di biomassa, quali le zone soggette a incendi boschivi [Ward, T. J., et al. 2011] e le zone residenziali [Simpson, C.D. 2005; Dutton, S. J. 2009; Dutton, S. J. 2010; Bari A., 2010]. A Dettenhausen (Germania), in autunno e inverno sono state riscontrate concentrazioni di metossifenoli in un intervallo di 10 - 61 000 pg m^{-3} per la siringaldeide e 20-5210 pg m^{-3} per la coniferilaldeide [Bari A., 2010]. Valori simili dei due analiti sono stati riscontrati nella città di Seattle (USA), rispettivamente con concentrazioni fra gli 80 pg m^{-3} e i 1520 pg m^{-3} e 100-1160 pg m^{-3} [Simpson, C.D. 2005]. Durante la stagione degli incendi, in Missuola (Montana, USA) si sono raggiunte concentrazioni di siringaldeide tra i 30 e i 4030 pg m^{-3} e di coniferilaldeide tra i 30 e i 12560 pg m^{-3} [Ward, T. J., et al. 2006] mentre a Libby (Montana USA) nell'inverno tra il 2003 e il 2004 si riscontrate le seguenti concentrazioni: $55500 \pm 12400 \text{ pg m}^{-3}$ per l'acido vanillico, $9900 \pm 2300 \text{ pg m}^{-3}$ per l'acido omovanillico, $5800 \pm 2700 \text{ pg m}^{-3}$ per la siringaldeide e $1400 \pm 400 \text{ pg m}^{-3}$ per l'acido siringico [Ward, T. J., et al. 2011]. Ripetendo lo stesso studio nell' inverno 2008-2009 si sono trovati valori per l' acido vanillico, l'acido omovanillico e la siringaldeide rispettivamente di $68400 \pm 36500 \text{ pg m}^{-3}$, $11400 \pm 7200 \text{ pg m}^{-3}$ e $500 \pm 500 \text{ pg m}^{-3}$, mentre la siringaldeide presentava valori al di sotto del limite di quantificazione [Ward, T. J., et al. 2011]. Sempre durante la stagione degli incendi in Rondonia (Brasile) invece, sono stati misurati in media $22,1 \text{ ng m}^{-3}$ di acido vanillico [Graham B., 2002]. Prodotti di combustione della lignina sono stati misurati da Hawthorne et al. (1992) nel PM_{10} a Minneapolis (USA), in concentrazioni medie di $354\text{-}3510 \text{ ng m}^{-3}$. Studi che coinvolgono osservazioni annuali sull'andamento della concentrazione dei metossifenoli in atmosfera al variare delle stagioni, hanno evidenziato un massimo durante i mesi invernali, mentre i valori minimi si riscontravano in estate. A Denver (Colorado USA) la somma delle concentrazioni di vanillina, acido vanillico, coniferilaldeide e siringaldeide, ha prodotto il valore massimo in inverno, precisamente in dicembre con un valore mediano di 11290 pg m^{-3} , mentre i valori minimi si sono registrati nei mesi estivi di giugno luglio e agosto (concentrazioni mediane = 270, 20, e 110 pg m^{-3}) [Dutton, S. J. 2010]. Stessi risultati sono stati ottenuti da He, J. et al (2010) nell'autunno del 2006 a Singapore, dove la somma delle concentrazioni di acido vanillico, acido omovanillico e siringaldeide aumentava man mano che ci si avvicinava ai mesi invernali: $950 \pm 120 \text{ pg m}^{-3}$ in agosto, $1310 \pm 310 \text{ pg m}^{-3}$ a settembre, $6400 \pm 9280 \text{ pg m}^{-3}$ ad ottobre ed infine $2270 \pm 900 \text{ pg m}^{-3}$ nel mese di novembre. Per quanto riguarda l'analisi dei metossifenoli in ambienti polari, in letteratura è stato riportato solo lo studio condotto in artico a Ny Ålesund nelle isole Svalbard ($78^{\circ} 55' 07'' \text{ N}$, $11^{\circ} 53' 30'' \text{ E}$, 50 m asl) [Zangrando, R., et al 2013], nell'estate boreale del 2010. Le concentrazioni riportate sono state divise in base alla classe dimensionale del particolato: 14 pg m^{-3} medi per la frazione grossolana (10 - $4,9 \mu\text{m}$, supporti scanalati) e solo 6 pg m^{-3} per la frazione fine.

Comparando i valori riportati da Zangrando, R., et al (2013) per l'Artico, con i livelli rinvenuti in Antartide, si può osservare come questi ultimi siano inferiori, infatti il valore medio totale nella frazione "coarse" (10-0,49 μ m) è di 1,66 pg m⁻³ mentre nella frazione fine (< 0,49 μ m) è di 0,41 pg m⁻³.

La figura 46 riporta la quantità totale di analiti in percentuale relativa riferita all'intera campagna di campionamento.

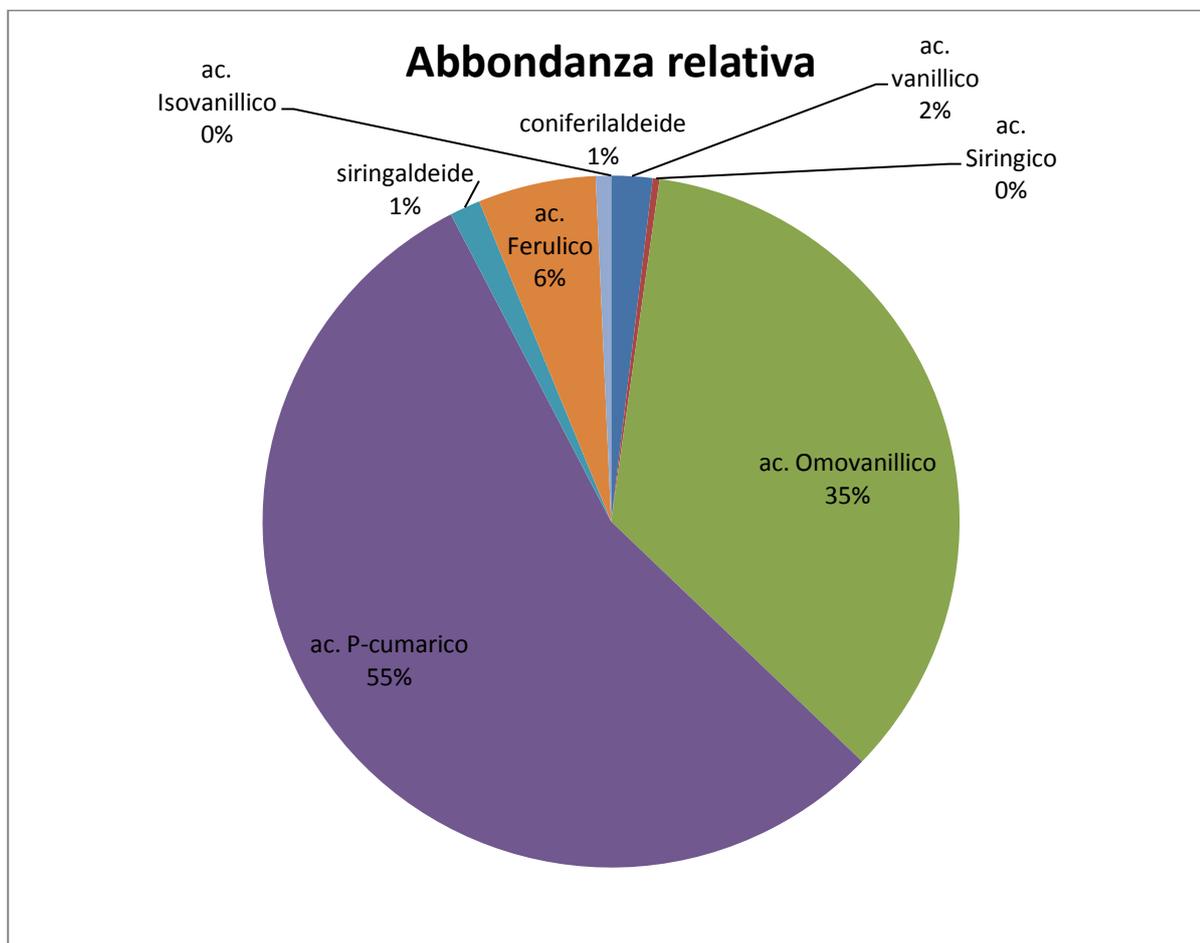


Figura 46: abbondanza relativa dei metossifenoli nelle sei frazioni di tutti i campioni.

Si osserva che l'acido p-cumarico e omovanillico sono i metossifenoli presenti in quantità maggiori, rispettivamente per il 55% e il 35%, il rimanente è rappresentato dall'acido ferulico (6%) mentre acido vanillico, siringaldeide e coniferilaldeide completano il rimanente 4%.

L'abbondanza dell'acido p-coumarico può derivare dal fatto che esso è esente da gruppi -OCH₃ in grado di influenzare la reattività in atmosfera, il che lo rende uno dei composti fenolici meno reattivi e quindi più stabili, mentre per gli altri analiti si ipotizza una loro degradazione durante il trasporto [Coeur-Tourneur, C., et al., 2010].

La figura 47 mostra la distribuzione dei metossifenoli tra i campioni, suddividendoli nelle classi dimensionali.

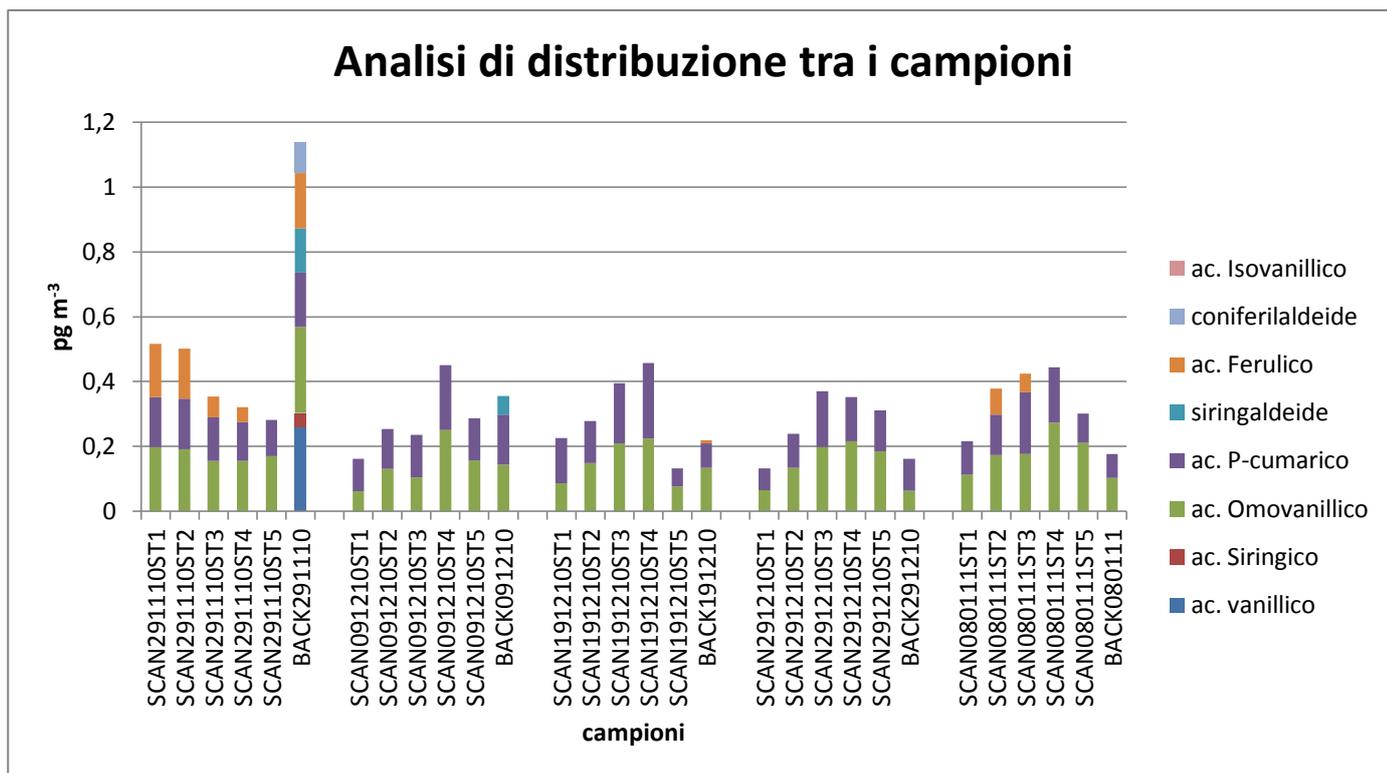


Figura 47: distribuzione dei metossifenoli tra i campioni.

I campioni si presentano simili tra di loro, a parte il primo (291110) caratterizzato da concentrazioni elevate nei primi due stadi, nonché dalla presenza di tutti gli analiti in notevole quantità nella frazione ultrafine. Per quanto riguarda gli altri campioni, l'acido p-cumarico e l'acido omoanillico sono presenti in tutte le frazioni dimensionali di tutti i campioni. La presenza ubiquitaria di acido omoanillico e p-cumarico è stata già riscontrata da Zangrando, R., et al (2013) in Artico. La figura 48 riporta grafici di acido omoanillico e p-cumarico, dal quale si osserva un andamento simile dei due analiti. Si potrebbe ipotizzare quindi che probabilmente anche il loro destino atmosferico, sia simile.

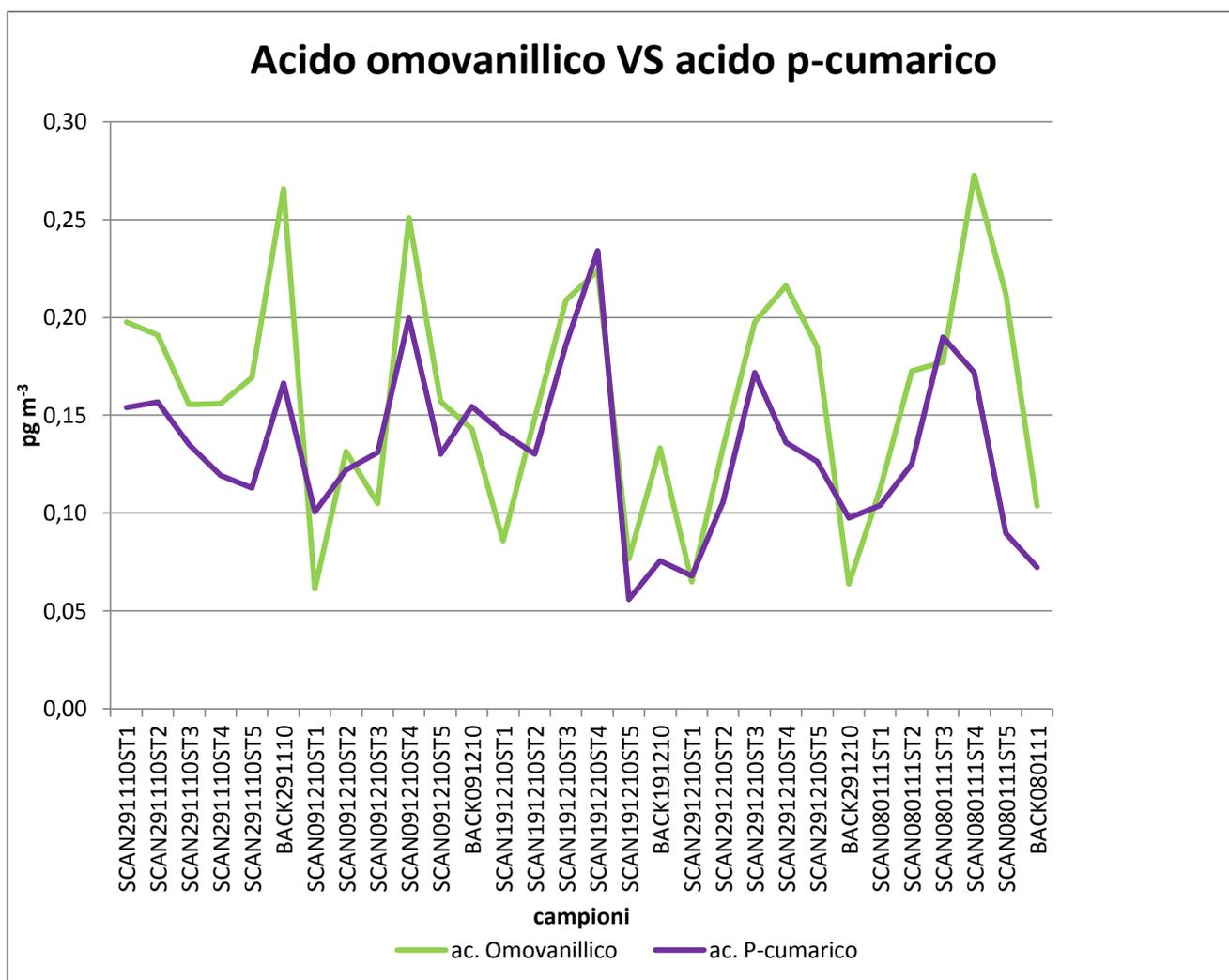


Figura 48 Confronto tra il “trend” stagionale dell’acido p-coumarico e dell’acido omo vanillico in tutte le frazioni di tutti i campioni.

Per quanto riguarda il primo campione, MZS291110, le assunzioni fatte precedentemente per il levoglucosano, sull’avvenuta contaminazione da parte della stazione di ricerca si possono estendere anche al caso dei metossifenoli. Infatti, osservando il grafico 47, si vede come in generale i metossifenoli siano quasi equamente distribuiti nei vari tagli dimensionali tranne che nel campione del 29/11/2010 in cui si nota la presenza di acido ferulico anche nella frazione grossolana e la presenza nella frazione fine (<0,49µm) di alti livelli di concentrazione compresa la presenza di acido vanillico, acido siringico, siringaldeide e coniferilaldeide solo in quel campione. Questo fa supporre che essi provengano da una fonte locale, dal momento che in tutti gli altri campioni sono presenti solo acido p-cumarico, acido omo vanillico e tracce di acido ferulico.

Utili si mostrano alcuni rimandi di letteratura a supporto di quando sarà esposto successivamente.

Su base dimensionale l'aerosol è tradizionalmente classificato in due frazioni principali: la frazione fine, “*Fine particles*”, con $D_a < 2,5 \mu\text{m}$, e la frazione grossolana, “*Coarse particles*”, con $D_a > 2,5 \mu\text{m}$ [Colbek I., 2008]. Nella frazione grossolana, si identificano le particelle primarie, che derivano da emissione diretta in atmosfera e sono prodotte principalmente per via meccanica (sia da fonti naturali che antropiche). Date le dimensioni, le particelle costituenti la frazione grossolana tendono a sedimentare in tempi dell'ordine dei minuti o delle ore a brevi distanze dalla sorgente di emissione [Colbek I. 2008]. Pertanto il rinvenimento di frazione grossolana in zone remote è sinonimo di produzione locale di aerosol.

La frazione fine e ultrafine può il risultato del trasporto di aerosol a lunga distanza. Secondo Colbeck, I., (2008) la distribuzione della massa o del volume opposta al diametro della particella (Fig.57) è dominata da due mode: la moda di accumulazione (da 0,1 a circa 2 μm) e la moda grossolana (da 2 a 50 μm).

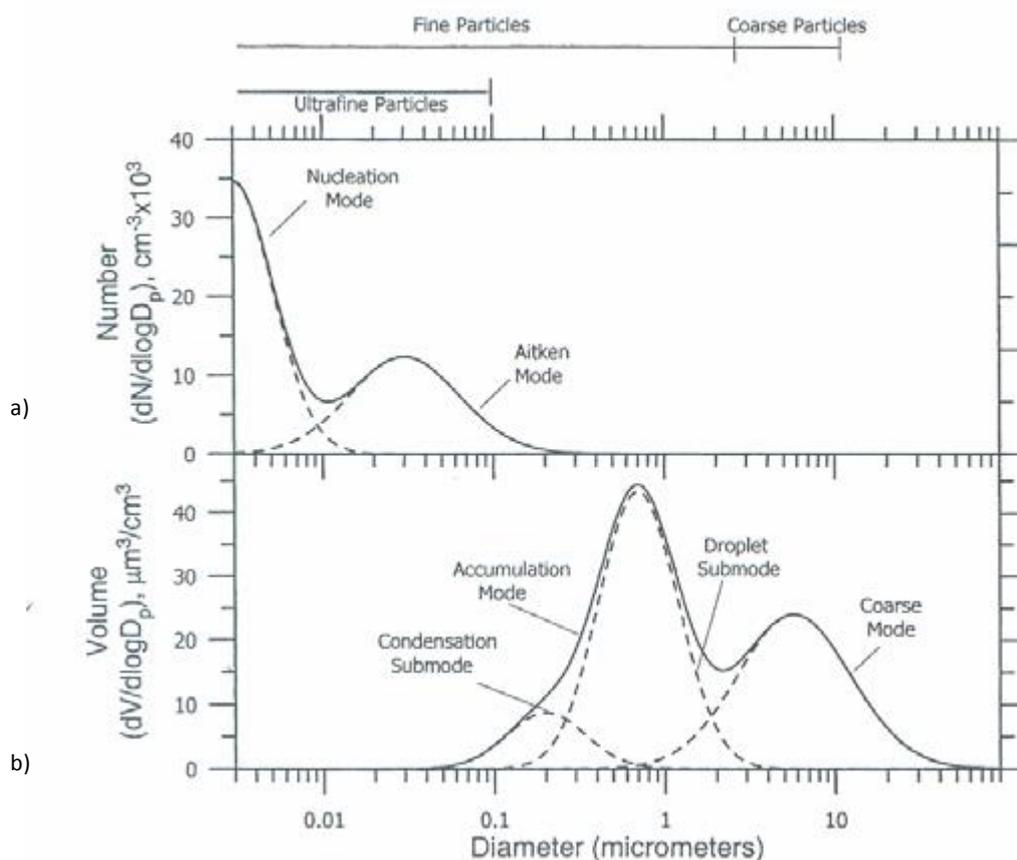


Figura 49: Distribuzione numerica e volumetrica delle particelle atmosferica e relative mode [Colbeck, I., 2008]

Le particelle della moda di accumulazione sono il risultato dell'emissione primaria, della condensazione della fase gassosa di composti organici, solfati e nitrati e della coagulazione di

piccole particelle. La moda di accumulazione consiste in due sub-mode sovrapposte: quella di condensazione e quella di gocciolamento. La prima è il risultato delle emissioni primarie e della crescita di piccole particelle per coagulazione e condensazione di vapore. La seconda è la moda di nucleazione che comprende particelle generate in situ da processi che coinvolgono la condensazione di vapore caldo o per conversione da gas a particella. Queste sono presenti in numero molto alto, e proprio per questa elevata densità, esse sono soggette a rapida coagulazione e/o condensazione di vapori entrando così nella moda di accumulazione. Le particelle della moda di accumulazione hanno generalmente un tempo di vita atmosferico di una o due settimane e quindi sono coinvolte in trasporti a lungo raggio [Seinfeld J.H. 2006].

Le emissioni provenienti da “*biomass burning*” contribuiscono alla frazione fine dell’aerosol [Agarwal S., et al. 2010; Schkolnik, G. et al. 2005; Kleeman, M. J. Et al. 2008; Herckes, P. et al. 2006]. Le osservazioni fatte dei livelli di concentrazione con ripartizione tra i vari tagli dimensionali e tempi di vita dell’aerosol atmosferico risultano molto interessanti:

- La presenza di levoglucosano e metossifenoli è associata all’immissione di particelle fini e ultrafini. In accordo con la letteratura [Agarwal S., et al. 2010; Schkolnik, G. et al. 2005; Kleeman, M. J. Et al. 2008; Herckes, P. et al. 2006; Iinuma, Y. 2009] questo è testimoniato dall’alta concentrazione di questi analiti nella frazione $<0,49\mu\text{m}$ del campione 29/11/10.
- In generale si osserva una concentrazione dei metossifenoli negli campioni (escluso il 29/11/2010) e distribuita fra i vari tagli dimensionali. Questo è spiegabile considerando che i metossifenoli vengono inizialmente rilasciati in forma gassosa, ma al diminuire della temperatura tendono a condensare sulla superficie delle particelle [Kjällstrand, J.,2000]. Durante il viaggio, la lunga permanenza all’interno del continente antartico, l’aerosol subisce una serie di modificazioni, tra cui la coagulazione e la coalescenza che porta alla formazione di particelle con diametro aerodinamico maggiore di $0,49\mu\text{m}$, che successivamente saranno rinvenuti negli stadi 3 e 4 ($3 - 0,95 \mu\text{m}$) del campionatore. Come affermato da Herckes, P. et al. (2002) e Hawthorne, S. B et al. (1992) rinvenimento di elevate concentrazioni di analiti nella frazione “coarse” dell’aerosol è dovuto al fenomeno di evaporazione e ricondensazione degli analiti durante il trasporto Traducendosi in una ridistribuzione dei composti nelle varie classi dimensionali che compongono la frazione grossolana [Hawthorne, S. B et al. 1992]

Le differenze fra i livelli di metossifenoli osservati nel primo campione e gli altri della campagna antartica è chiara dal confronto fra le figure 50 e 51 nei diversi tagli dimensionali e si prestano ad alcune interessanti osservazioni

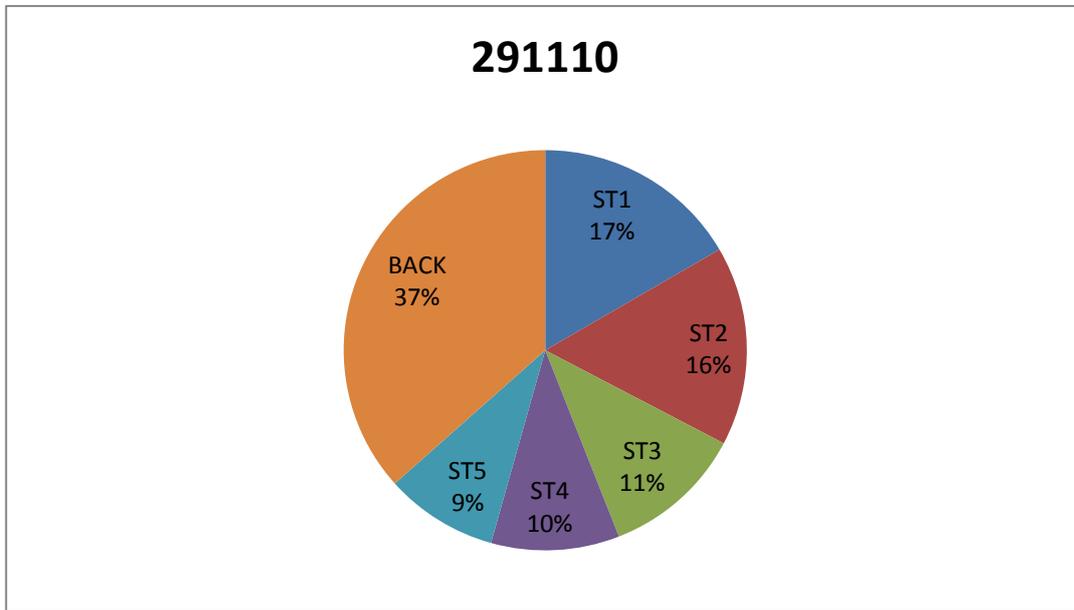


Figura 50: ripartizione delle quantità totali di metossifenoli per frazione dimensionali nel campione MZS291110.

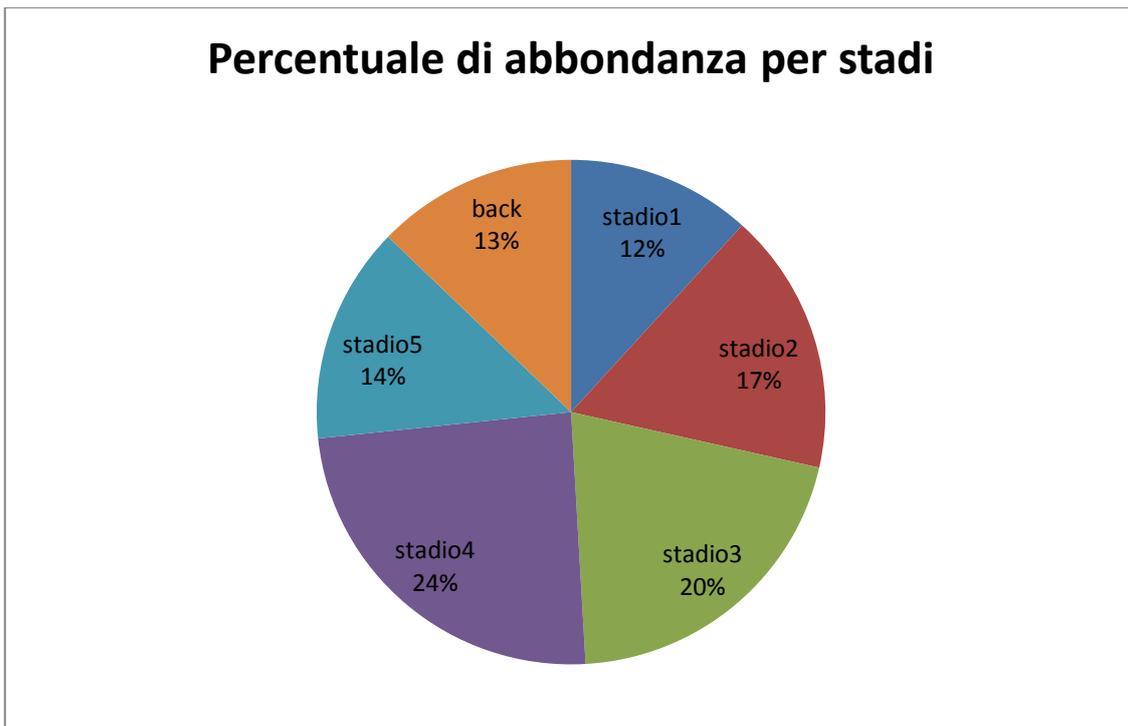


Figura 51: percentuale di abbondanza dei metossifenoli nei vari stadi del campionatore Andersen (senza mzs291110 poiché contaminato).

In figura 50 è rappresentata la distribuzione della concentrazione totale dei metossifenoli nel campione 291110, mentre in figura 51 si può osservare la media nei rimanenti campioni, della concentrazione totale di metossifenoli rilevata nei diversi stadi. Mentre nel campione 291110 lo stadio back rappresenta il 37%, negli altri questo in media contribuisce per il 13%. Considerando gli stadi 1 e 2 dove è raccolto il particolato più grossolano i metossifenoli si presentano con abbondanze simili. La grande differenza è osservata nella frazione 0,49 e 3 μm che nel campione 29/11/2010 raccoglie il 30% mentre comprendendo lo stadio back si arriva al 67% del totale. Negli altri campioni le frazioni sottili fra 0,49 e 3 μm sono caratterizzate da concentrazioni maggiori (58%) e raggiungono, comprendendo la frazione ultrafine <0,49 μm , l'87% del totale. Questa osservazione è particolarmente importante in quanto ci fa comprendere come il campione raccolto dal 29/11/2010 sia soggetto a due contributi, uno di natura long range e l'altro di natura locale che si possono distinguere osservando l'andamento generale della concentrazione e la presenza dei diversi composti nei vari tagli dimensionali. Nella frazione indicatrice del trasporto long range si ha un aerosol invecchiato in cui c'è stato il tempo per la ridistribuzione degli analiti pertanto è la frazione più grossolana. Mentre il peso della sorgente di contaminazione locale è particolarmente incisivo sui livelli osservati nella frazione ultrafine (<0,49 μm), in cui si osservano non solo acido p-coumarico e omovanillico presenti in tutte le frazioni dell'aerosol, ma anche in tutti gli altri analiti. Questi ultimi infatti, qualora fossero stabili durante il trasporto long range (in generale Coeur-Tourneur, C., et al. (2010) stima un tempo di vita di 1,7-8,1 giorni) sarebbero osservabili anche negli altri tagli dimensionali, cosa che non accade, si possono osservare esclusivamente nella frazione fine del particolato <0,49 μm , che diventa rappresentativa pertanto della contaminazione dovuta a biomass burning a livello locale.

A questo punto risulta interessante confrontare i dati ottenuti dall'analisi dei campioni studiati in questo lavoro di tesi di provenienza antartica con quelli artici (Fig 52)[Zangrando R. et al 2013].

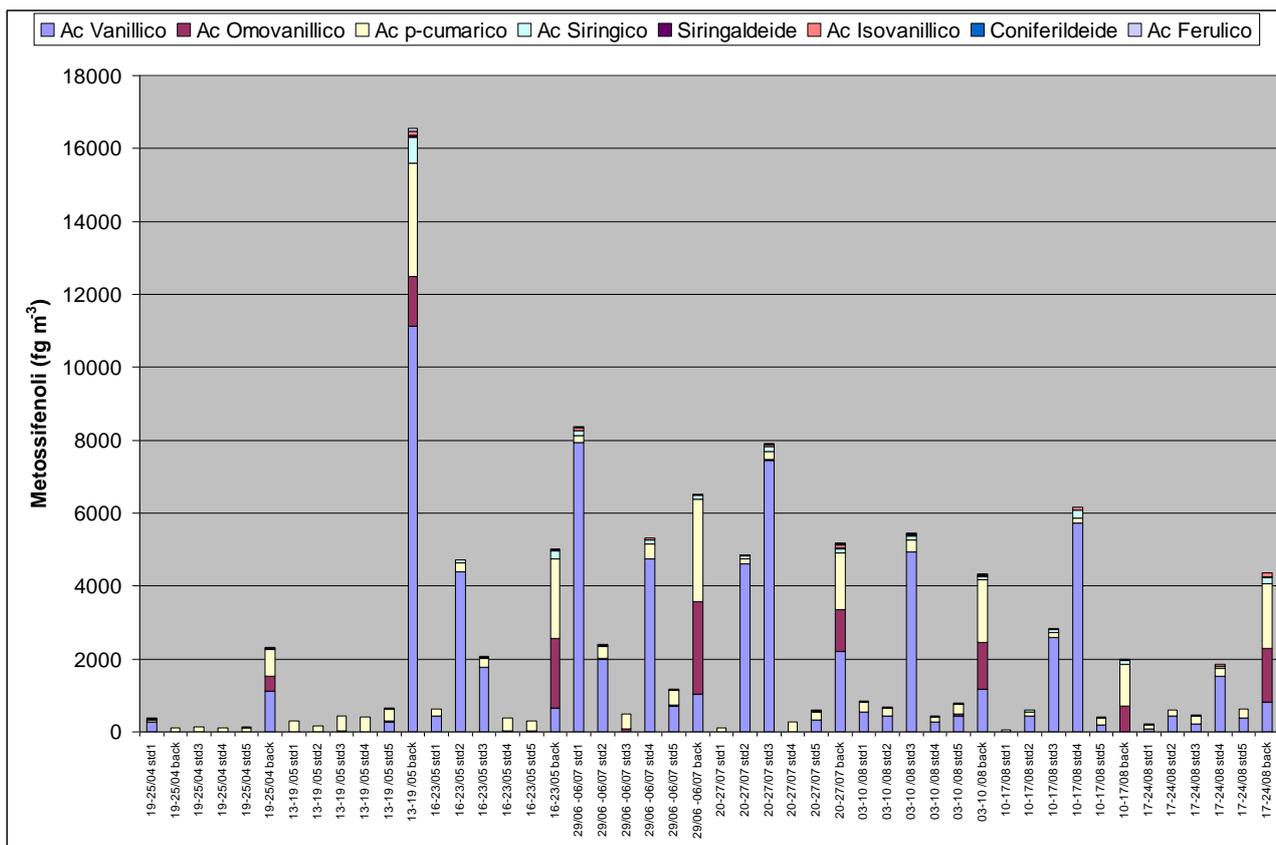


Figura 52: studio condotto in artico [Zangrando, R., et al 2013], precisamente a Ny Ålesund nelle isole Svalbard ($78^{\circ} 55' 07''$ N, $11^{\circ} 53' 30''$ E, 50 m asl), nell'estate boreale del 2010.

Prima di tutto i livelli di concentrazione atmosferica sono inferiori, come pure i valori medi (escluso il campione 29/11/10) di metossifenoli che variano fra $0,29 \text{ pg m}^{-3}$ e $0,32 \text{ pg m}^{-3}$ mentre in artico la concentrazione media totale è compresa in un intervallo fra 3 e 24 pg m^{-3} . Nei campioni antartici (Fig 47) si osserva la presenza quasi esclusivamente di acido p-cumarico e acido omovanillico, mentre in artico oltre a questi citati, che rappresentano nella frazione fine ($<0,49\mu\text{m}$) in media il 38,6% e il 27% rispettivamente, si osserva anche una buona percentuale 28,4% di acido vanillico (Fig 52). Questa differenza potrebbe risiedere nella diversa tassonomia della vegetazione nei due emisferi, oltre che dalla presenza di piante autoctone delle isole Svalbard [Gjaerevoll, O., et al. 1999] che potrebbero fornire un contributo soprattutto nelle frazioni grossolane dell'aerosol, al contrario dell'antartide in cui la vegetazione è assente. Nella frazione sottile ($<0,49\mu\text{m}$), soggetta al trasporto a lunga distanza, la presenza di acido vanillico in artico e la sua completa assenza in antartide potrebbe essere imputata inoltre, alla distanza maggiore fra la zona d'origine dell'aerosol e il sito di campionamento e al lungo tempo di permanenza nelle masse d'aria nel continente antartico che potrebbero portare ad una completa degradazione dell'analita.

Per quanto riguarda l'utilizzo dei metossifenoli come traccianti di combustione di biomassa, si possono fare delle considerazioni riguardo l'acido p-cumarico e l'acido omovanillico. La lignina

erbacea contiene quantità significative di derivati di alcool p-cumarilico pertanto i derivati della combustione siringilici e guaiacilici sono presenti in quantità ridotta rispetto all'acido p-cumarico [Simoneit, B.R.T., 1993]. Il rinvenimento di una notevole quantità di acido p-cumarico nei campione suggerisce che esso sia prodotto dalla combustione di monocotiledoni erbacee [Simoneit, B.R.T., 1993]. L'acido omovanillico, essendo un guaiacil-derivato, può essere prodotto dalla combustione di lignina "hardwood" ma principalmente da lignina "softwood" [Simoneit, B.R.T., 1993]. In parte può essere anche prodotto dalla combustione di lignina erbacea, dato confermato dall'elevata presenza di acido p-cumarico. Nel campione 091210, è presente, nella frazione ultrafine, la siringaldeide, un siringil-derivato, associato alla combustione di alberi decidui [Oros D., 2001], che negli altri campioni, però, è assente. Confrontando i dati ottenuti con quelli artici di Zangrando, R., et al (2013) si è quasi giunti alla medesima conclusione: la preponderante presenza di acido omovanillico e p-cumarico nei campioni suggerisce la combustione di lignina erbacea e "softwood", ovvero di un mix composto da erba e conifere.

9.2.3) confronto tra gli analiti nell'aerosol antartico

Dalla discussione è emerso un comportamento in atmosfera differente tra il levoglucosano e i metossifenoli. Il levoglucosano è presente in tutti i campioni nella frazione ultrafine ($D_{ac} < 0,49 \mu m$), il che suggerisce che venga emesso già associato a questa classe dimensionale. I metossifenoli a causa della loro volatilità subiscono una ridistribuzione in tutti le classi dimensionali, tramite processi di condensazione e rivolatizzazione, giustificando la loro presenza nella frazione "coarse" dell'aerosol [Hawthorne, S. B et al. 1992]. Per quanto riguarda la quantità totale rinvenuta, il levoglucosano è presente nei campioni antartici ad una concentrazione nettamente superiore rispetto ai metossifenoli, suggerendo che quest'ultimo sia emesso in quantità maggiori durante la combustione di biomassa e che abbia un tasso di degradazione in atmosfera minore rispetto ai metossifenoli [Hoffmann, D., et al., 2010]. Combinando le informazioni ottenute dai due analiti, si è identificato che la sorgente di emissione è il "biomass burning" e, come dall'analisi dei metossifenoli si può ipotizzare che i vegetali combusti coinvolgono erba e piante di tipo "softwood" [Simoneit, B.R.T., 1993; Oros D., 2001; Zangrando R. et al. 2013].

9.3) Conclusioni

In questo lavoro di tesi è stata messa a punto una metodologia analitica del tutto innovativa per la determinazione del levoglucosano, mannosano e galactosano nell'aerosol atmosferico.

L'accoppiamento del cromatografo ionico allo spettrometro di massa ad alta risoluzione LTQ Orbitrap XL, nell'ambito delle tecniche ifenate è un interfacciamento inedito e di grande interesse poiché, oltre a permettere la completa separazione dei tre stereoisomeri (levoglucosano, mannosano e galattosano) consente tramite un'analisi in alta risoluzione estremamente selettiva e una modalità di acquisizione che permette una post-elaborazione dei dati.

Il problema principale nell'accoppiamento è il limite tecnico-strumentale dovuto alla bassa pressione di esercizio del soppressore ionico, a causa del quale si è dovuti ripiegare su una sorgente APCI, rispetto ad una più efficiente sorgente ESI, che permette di operare a contropressioni minori, compatibili con il soppressore ionico. Questo lavoro è da considerarsi preliminare, in quanto la modalità di accoppiamento fra questi strumenti sono tuttora in fase di miglioramento. In un futuro il metodo verrà sicuramente implementato, al fine di migliorarne la ionizzazione dell'analita e di conseguenza aumentare la sensibilità del metodo. La bassa sensibilità è stata la causa che ha portato all'impossibilità di applicare il metodo per la determinazione di campioni antartici, caratterizzati da concentrazioni molto basse. Attualmente la tecnica IC-orbitrap MS messa a punto in questo lavoro è comunque valida per ambienti in cui si pensa di avere elevate concentrazioni degli analiti in esame, come i "background urbani". Il metodo è stato convalidato ed è caratterizzato da rese superiori all'80 %, accuratezze (esprese in termini di errore percentuale inferiore) a 10% e buona riproducibilità (CV% <10%). È stato applicato quindi un metodo HPLC-MS/MS caratterizzato da una sensibilità maggiore, già utilizzato con successo nell'analisi di campioni artici [Perrone M.G. et al.2012]

Per l'analisi dei metossifenoli, si è partiti da un metodo HPLC-orbitrap MS precedentemente messo a punto in un altro lavoro di tesi [Turchet M. 2012], si è proceduto ad integrare la validazione per i supporti di campionamento (scanalati e back) utilizzati per la raccolta dei campioni antartici studiati. Il metodo è stato validato ed è caratterizzato da una buona resa, accuratezza e ripetibilità. In questo caso i campioni antartici sono stati analizzati, ma non è stato possibile quantificarli in quanto le concentrazioni antartiche sono a livelli prossimi al LOD o inferiori. È stato applicato quindi un metodo HPLC-MS/MS sviluppato e applicato per l'analisi di campioni di origine artica [Zangrando R. et al.2013] dallo stesso gruppo di ricerca che ha portato alla quantificazione dei campioni.

Benché entrambi i metodi LC-orbitrap MS non siano stati utilizzati per la quantificazione dei campioni antartici, essi rappresentano un importante punto di partenza per l'individuazione di nuovi "markers" molecolari.

Per quanto riguarda i campioni provenienti dalla stazione italiana Mario Zucchelli in Antartide, l'analisi dei dati ha portato a diverse considerazioni dal punto di vista ambientale.

Innanzitutto, osservando la diversità del primo campione rispetto agli altri della campagna sono sorti dubbi riguardo la sua possibile contaminazione, e solo mediante l'analisi delle retro traiettorie si è osservata l'evidenza di una massa d'aria che ha sorvolato la stazione di ricerca prima di giungere al sito di campionamento.

Quasi tutto il levoglucosano nei campioni, in accordo con i dati di letteratura, è associato al PM₃ ovvero agli stadi 3,4,5 e back del campionatore, tra questi, la frazione ultrafine (<0,49 μm) detiene quasi la totalità della concentrazione di analita, con un valore medio di 6,9 pg m⁻³ rispetto ad una concentrazione media in tutti i campioni (considerando tutti i tagli dimensionali) di 7,2 pg m⁻³. Dagli studi riportati in letteratura, è emerso come il levoglucosano sia sottoposto a fenomeni di degradazione in atmosfera [Hoffmann D., et al., 2010], ciò nonostante in virtù delle grandi concentrazioni a cui è immesso in ambiente è utile come tracciante di “*biomass burning*” nel trasporto a lunga distanza rendendolo determinabile in zone remote del pianeta come l'antartide o l'artico.

I metossifenoli mostrano un comportamento diverso, si osserva una distribuzione degli analiti in quasi tutte le classi dimensionali dell'aerosol. Nella frazione “coarse” (da 10 μm a 0,49μm) si ha una concentrazione media di analita di 1,7 pg m⁻³ contro gli 0,4 pg m⁻³ associati all'aerosol con diametro aerodinamico inferiore a 0,49μm. Questo è interpretato dal comportamento di questi composti in atmosfera: essi vengono inizialmente rilasciati sotto forma gassosa per poi condensarsi sulla superficie delle particelle [Kjällstrand, J.,2000], ed essendo composti volatili sono soggetti a fenomeni di volatilizzazione e ricondensazione che porta alla loro distribuzione nelle differenti classi dimensionali. La presenza dell'acido p-cumarico e l'acido omonillico, indicatori della combustione di erba e conifere rispettivamente, è stata osservata in tutti i campioni, al contrario l'assenza di quasi tutti gli altri analiti ricercati suggerisce che siano da considerarsi come i composti più stabili in atmosfera fra quelli ricercati. La determinazione di metossifenoli in campioni antartici soggetti e non soggetti a fenomeni di biomass burning hanno permesso di compiere interessanti osservazioni sulla loro stabilità e comportamento in atmosfera.

Allegato 1) MDL-MQL

I limiti di rilevabilità MDL e di quantificazione MQL procedurali, vengono calcolati a partire dai bianchi di campo tramite le seguenti relazioni:

$$MDL = STD_b * 3$$

$$MQL = STD_b * 10$$

Per il levoglucosano, tramite analisi con metodologia HPLC-MS/MS sono:

Composto	Bianco medio (ng ass)	STD_b (ng ass)	MDL (ng ass)	MQL (ng ass)
Filtri scanalati				
Levoglucosano	8	3	9	30
Filtri back				
Levoglucosano	5	3	9	30

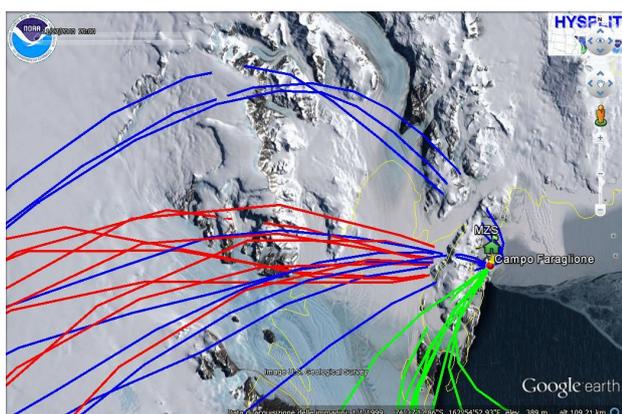
Per i metossifenoli, tramite analisi con metodologia IC-orbitrap MS sono:

Composto	Bianco medio (pg ass)	STD_b (pg ass)	MDL (pg ass)	MQL (pg ass)
Filtri scanalati				
Ac. Vanillico	3 10 ²	3 10 ²	9 10 ²	3 10 ³
Ac. Isovanillico	7 10 ²	5 10 ²	1 10 ³	5 10 ³
Ac. Omovanillico	1,3 10 ²	0,5 10 ²	1,3 10 ²	4,6 10 ³
Coniferilaldeide	1 10 ²	2 10 ²	6 10 ²	2 10 ³
Ac.p-Cumarico	50	10	40	130
Siringaldeide	1,9 10 ²	0,6 10 ²	1,7 10 ²	5,9 10 ²
Vanillina	5 10 ²	3 10 ²	9 10 ²	3 10 ³
Ac.Ferulico	1,1 10 ³	0,2 10 ³	0,6 10 ³	2,1 10 ³
Ac.Siringico	1,5 10 ²	1,4 10 ²	4,2 10 ²	1,2 10 ³
Filtri back				
Ac. Vanillico	1,2 10 ²	30	84	280
Ac. Isovanillico	1,3 10 ²	9,8 10 ²	29,2 10 ²	97,4 10 ²
Ac. Omovanillico	1,4 10 ²	1,5 10 ²	4,4 10 ²	14 10 ²
Coniferilaldeide	7 10 ²	40	120	400
Ac.p-Cumarico	2 10 ²	0,01	8,8	29
Siringaldeide	1,7 10 ²	70	200	690
Vanillina	3,5 10 ²	3 10 ²	9 10 ²	29,3 10 ²
Ac.Ferulico	2,1 10 ²	1,3 10 ²	4,4 10 ²	13,1 10 ²
Ac.Siringico	1 10 ²	50	130	450

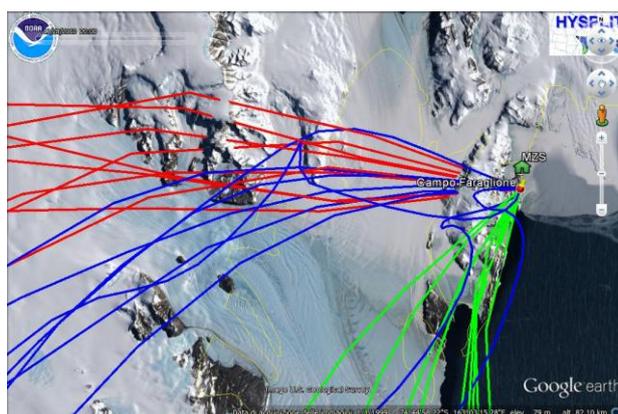
Allegato 2) Retro traiettorie MZS291110

Le retro traiettorie del campione MZS291110 sono state calcolate con il modello HYSPLIT (*Hybrid Single Particle Lagrangian Integrated Trajectory Model*) del National Oceanic and Atmospheric Administration (NOAA).

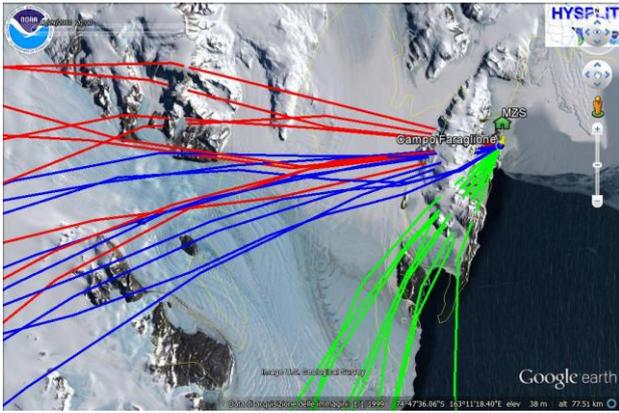
- **Database:** GDAS1 (database locale, con una buona risoluzione);
- **Modalità:** ensemble;
- **Direzione traiettoria:** retro traiettoria;
- **Movimento verticale:** model vertical velocity;
- **Date di inizio:** ogni giorno dal 29/11/10 al 9/12/10;
- **Durata traiettoria:** 30 ore;
- **Altezza:** 50 m s.l.m.;
- **Output:** file .ktmz compatibile con google earth (maffiore risoluzione rispetto ad un file in .gif o .jpg).



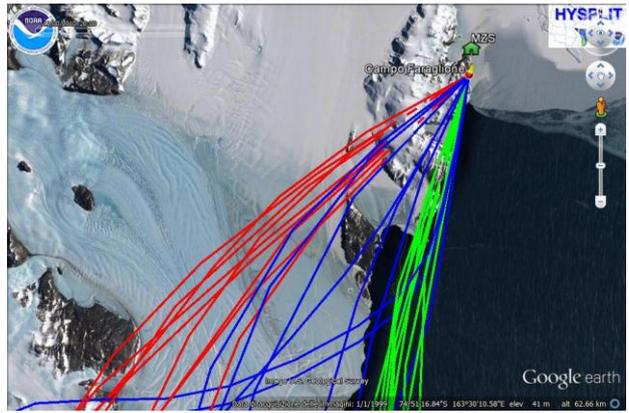
29/11/10



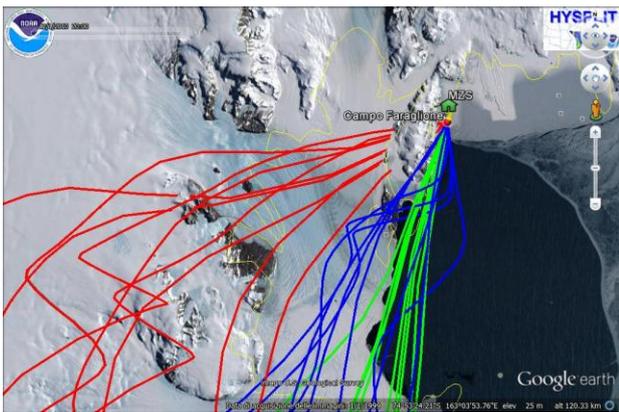
30/11/10



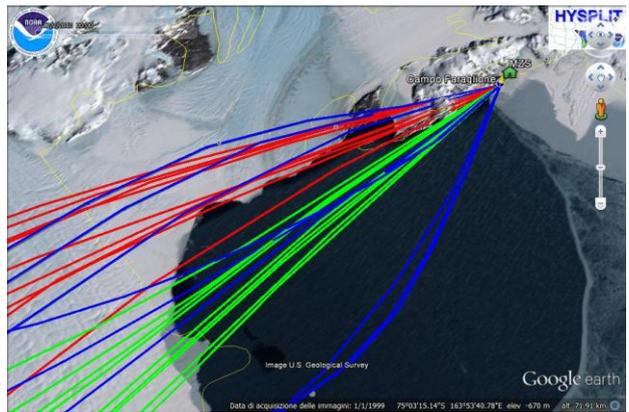
01/12/10



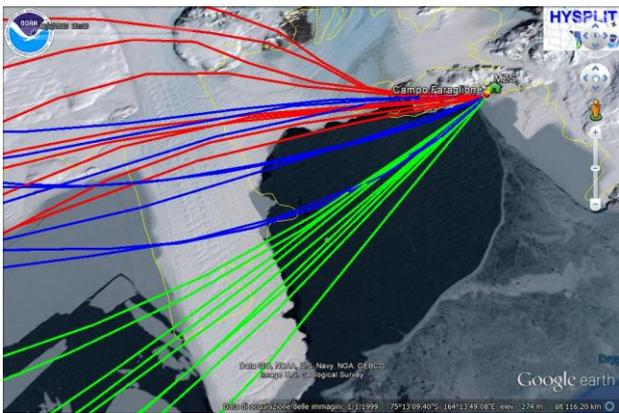
02/12/10



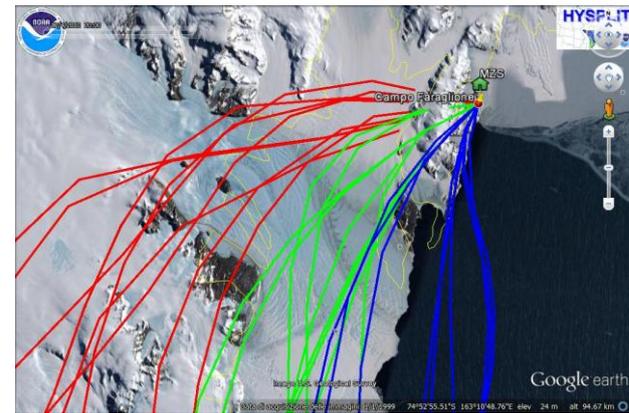
03/12/10



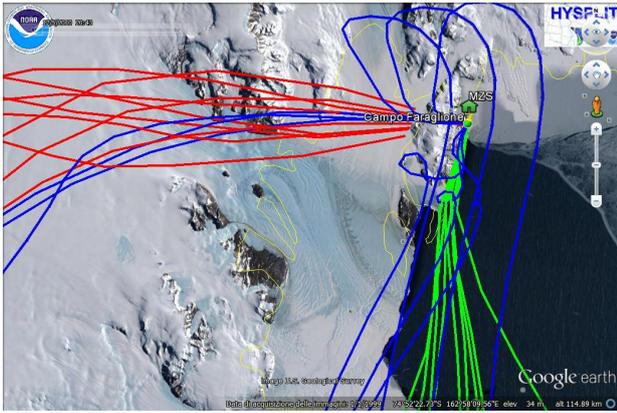
04/12/10



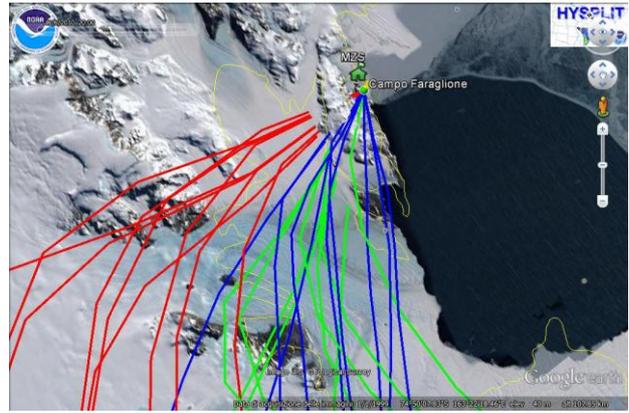
05/12/10



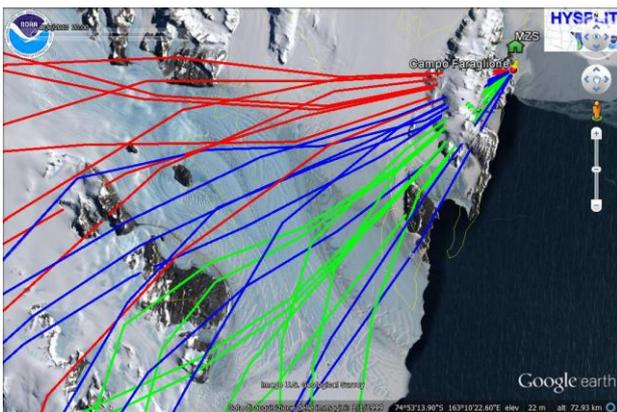
06/12/10



07/12/10



08/12/10



09/12/10

Si può notare come il campionatore sia situato sopravvento rispetto alla stazione di ricerca, in modo da evitare che le emissioni di quest'ultima contaminino i campioni. Purtroppo in alcuni casi questo può avvenire a causa di un'anomala circolazione delle masse d'aria.

Bibliografia

Agarwal S., Okuzawa G., Kawamura K., **2010**. *Size distributions of dicarboxylic acids, ketoacids, sugars, WSOC, OC, EC and inorganic ions in atmospheric particles over Northern Japan: implication for long-range transport*. *Atmospheric chemistry and physics* 10, 2010: 5839–5858.

Agilent Technologies, **1999**. *Agilent 1100 Series HPLC Value System User's Guide*.

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

Apffel, J., A., Jr., Bertsch, J., L, Werlich, H., M., **1996**. *Orthogonal ion sampling for electrospray LC/MS*. Numero brevetto 5495108, HP.

Applied Biosystem, **2010**. *API 4000™ LC/MS/MS Hardware Manual*.

Applied Biosystem, **2012**. *Sorgente ionica Turbo V™, guida all'operatore*.

Baird C., Cann M., **2006**. *Chimica ambientale, seconda edizione*. Zanichelli.

Bliesner, D.M., **2006**. *Validation Chromatographic Methods*. Wiley Interscience, Hoboken, New Jersey.

Barbaro E., Zangrando R., Moret I., Barbante C., Cescon P., Gambaro A. **2011**. *Free amino acids in atmospheric particulate matter of Venice, Italy*. *Atmospheric Environment* 45, 2011: 5050-5057.

Bargagli, R., **2005**. *Antarctic ecosystems. Environmental contamination, climate change, and human impact*. Springer.

Bargagli, R., **2008** *Environmental contamination in Antarctic ecosystems*. *Science of the Total Environment* 400, 212-226.

- Bari A., Baumbach G, Kuch B., Scheffknecht G. **2010**. *Temporal variation and impact of wood smoke pollution on a residential area in southern Germany*. Atmospheric Environment 44, 2010: 3823-3832.
- Barthelmie, R.J., Pryor, S.C, **1997**. *Secondary organic aerosols: formation potential and ambient data*. The Science of the Total Environment, 205, 168.
- Bergauff M. A., Ward T. J, Noonan C. W., Palmer C. P., **2009**. *The effect of a woodstove changeout on ambient levels of PM_{2.5} and chemical tracers for woodsmoke in Libby, Montana*. Atmospheric Environment, Volume 43, Issue 18, June 2009, Pages 2938–2943.
- Bourcier L., Sellegri K., Masson O., Zangrando R., Barbante C., Gambaro A., Pichon J. M., Boulon J., Laj P. **2010**. *Experimental evidence of biomass burning as a source of atmospheric ¹³⁷Cs, puy de Dôme (1465 m a.s.l.), France*. Atmospheric Environment 44, 2280-2286
- Boyd, R.B., Basic, C., Bethem, A.R., **2008**. *Trace Quantitative Analysis by Mass Spectrometry*. John Wiley & Sons, Ltd, The Atrium, Southern Gate, Chichester, West Sussex PO19 8SQ, England.
- Brasseur, G., Orlando, J., Tyndall, G., **1999**. *Atmospheric Chemistry and Global Change. Topics in Environmental Chemistry*. Oxford University Press, New York, 654 pp.
- Campbell, I.B., Claridge, G.,G.,C., **1987**. *Antarctica: soils, weathering processes and environment. Vol. 16. Elsevier Ltd*.
- Caseiro, A., Marr, I. L., Claeys, M., Kasper-Giebl, A., Puxbaum, H., Pio, C. A. **2007**. *Determination of saccharides in atmospheric aerosol using anion-exchange high-performance liquid chromatography and pulsed-amperometric detection*. Journal of Chromatography A, 1171(1), 37-45.
- Caseiro, A., Bauer, H., Schmidl, C., Pio, C. A, Puxbaum, H., **2009**. *Wood burning impact on PM₁₀ in three Austrian regions*. Atmospheric Environment 43 2186–2195.
- Caseiro, A., Oliveira, C. **2012**. *Variations in wood burning organic marker concentrations in the atmospheres of four European cities*. Journal of Environmental Monitoring, 14(8), 2261-2269.
- Cavalli, S., Herrmann, H., Höfler, F., **2004**. *IC-MS Determination*. LC• GC Europe, 17(3), 160-165.

Ching-Lin Hsu, Chin-Yuan Cheng, Chung-Te Lee, Wang-Hsien Ding, **2007**. *Derivatization procedures and determination of levoglucosan and related monosaccharide anhydrides in atmospheric aerosols by gas chromatography–mass spectrometry*. *Talanta* 72 (2007) 199–205.

Claeys M., Kourtchev I., Pashynska V., Vas G., Vermeulen R., Wang W., Cafmeyer J., Chi X., Artaxo P., Andreae M. O. Maenhaut W., **2010**. *Atmos. Chem. Phys.*, 2010, 10, 9319–9331.

Colbeck, I., **2008**. *Environmental Chemistry of Aerosols*. Blackwell Publishing Ltd.

Coerner P., McGinley, M., **2011**. *25-Hydroxyvitamin D2/D3 Analysis in human plasma using LC-MS*. *Current trends in mass spectrometry*, 8-11.

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

Cunningham, W.,C., Zoller, W.,H., **1981**. *The chemical composition of remote area aerosols*. *Journal of Aerosol Science* 12 (4), 367-384.

Dye, C., Yttri, K., E., **2005**. *Determination of Monosaccharide Anhydrides in Atmospheric Aerosols by Use of High-Performance Liquid Chromatography Combined with High-Resolution Mass Spectrometry*. *Analytical Chemistry* 77, 1853-1858.

Dutton, S. J.; Williams, D. E.; Garcia, J. K.; Vedal, S.; Hannigan, M. P., **2009**. *PM(2.5) characterization for time series studies: Organic molecular marker speciation methods and observations from daily measurements in Denver*. *Atmos. Environ.* 2009, 43 (12), 2018–2030.

Dutton, S. J.; Rajagopalan, B.; Vedal, S.; Hannigan, M. P., **2010** *Temporal patterns in daily measurements of inorganic and organic speciated PM(2.5) in Denver*. *Atmos. Environ.* 2010, 44 (7), 987–998.

Elias, V. O., Simoneit, B. R., Cordeiro, R. C., Turcq, B. **2001**. *Evaluating levoglucosan as an indicator of biomass burning in Carajas, Amazonia: A comparison to the charcoal record*. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 65(2), 267-272.

Engling, G.; Carrico, C. M.; Kreidenweis, S. M.; Collett, J. L., Jr.; Day, D. E.; Malm, W. C.; Lincoln, E.; Hao, W. M.; Iinuma, Y.; Herrmann, H., **2006**. *Determination of levoglucosan in*

biomass combustion aerosol by high-performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection. Atmos. Environ., 40, S299-S311.

Facchini MV, **2001**. *La composizione del particolato dipende dall'area di provenienza e dalla tipologia di sorgente di emissione.*

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

Fellin, V., **2010**. *Studio di composti organici idrosolubili in aerosol antartico.* Tesi di laurea magistrale.

Fine, P., Cass, G., Simonei, B.R.T., **2002**. *Chemical characterization of fine particle emissions from fireplace combustion of woods grown in the southern united states.* Environmental Science Technology 36, 2665–2675.

Franklin, J., **2006**. *Long-Range Transport of Chemicals in the Environment.* Chlor.

Fu, P. Q., Kawamura, K., & Barrie, L., **2009**. *Photochemical and other sources of organic compounds in the Canadian high arctic aerosol pollution during winter-spring.* Environmental Science & Technology , 43, 286-292.

Gambaro, A., Zangrando, R., Gabrielli, P., Barbante, C., Cescon, P., **2008**. *Direct Determination of Levoglucosan at the Picogram per Milliliter Level in Antarctic Ice by High-Performance Liquid Chromatography/Electrospray Ionization Triple Quadrupole Mass Spectrometry.* Analytical Chemistry 80, 1649-1655.

Gao, S.; Hegg, D. A.; Hobbs, P. V.; Kirchstetter, T. W.; Magi, B. I.; Sadilek, M. J. Geophys. Res. **2003**. *Particle size characteristics of levoglucosan in ambient aerosols from rice straw burning.* Atmospheric Environment, Volume 42, Issue 35, November 2003, Pages 8300–8308.

García, C. D., Engling, G., Herckes, P., Collett, J. L., Henry, C. S. **2005**. *Determination of levoglucosan from smoke samples using microchip capillary electrophoresis with pulsed amperometric detection.* Environmental science & technology, 39(2), 618-623.

Gjaerevoll, O., Rønning, O. I. Flowers of Svalbard **1999**. Tapir Publishers: Trondheim, Norway, 1999

Graham B., Mayol-Bracero O.L., Guyon P., et al. **2002**. *Water-soluble organic compounds in biomass burning aerosols over Amazonia*. Journal of geophysical research 107, 2002: doi:10.1029/2001JD000336.

Hang, N. R., Yu, S., Tiller, P., Yeh, S., Mahan, E. and Emary, W. B. **2009**. *Quantitation of small molecules using high-resolution accurate mass spectrometers – a different approach for analysis of biological samples*. Rapid Commun. Mass Spectrom., 23: 1085–1094. doi: 10.1002/rcm.3975

Hawthorne, S.B., Krieger, M.S., Miller, D.J., Mathiason, M.B., **1989**. *Collection and Quantitation of Methoxylated Phenol Tracers for Atmospheric Pollution from Residential Wood Stoves*. Environmental Science Technology 23, 470-475.

Hawthorne S., Miller D.J., Langenfeld J., Krieger M.S. **1992**. *PM-10 high-volume collection and quantitation of semi- and nonvolatile phenols, methoxylated phenols, alkanes, and polycyclic aromatic hydrocarbons from winter urban air and their relationship to wood smoke emissions*. Environmental science technology 26, 1992: 2251–2262.

He, J.; Zielinska, B.; Balasubramanian, R. **2010**. *Composition of semivolatile organic compounds in the urban atmosphere of Singapore: Influence of biomass burning*. Atmos. Chem. Phys. 2010, 10 (23), 11401–11413.

Hedberg E., A. Kristensson, M. Ohlsson, C. Johansson, P.- A. Johansson, E. Swietlicki, V. Vesely, U. Wideqvist and R. Westerholm, Atmos. Environ., **2002**, 36, 4823–4837

Hemond, H.F., Fechner-Levy, E.J., **2000**. *Chemical fate and transport in the environment*. Academic Press.

Herckes, P.; Engling, G.; Kreidenweis, S. M.; Collett, J. L. **2006**. *Particle size distributions of organic aerosol constituents during the 2002 Yosemite Aerosol Characterization Study*. Environ. Sci. Technol. 2006, 40 (15), 4554–4562

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

Hoffmann, D., Tilgner, A., Iinuma, Y., & Herrmann, H., **2010**. *Atmospheric stability of Levoglucosan: A detailed Laboratory and Modeling Study*. Environ. Sci. Technol , 44, p. 694-699.

Holton, J.R., **2002**. *Encyclopedia of Atmospheric Sciences*. Elsevier Science Ltd.

Hoppel, W.A., Fitzgerald J.W., Larson, R.E., **1990**. *Aerosol size distributions and optical properties found in the marine boundary layer over the Atlantic Ocean*. J. Geophys. Res. 95, 3695.

Hoppel, W.A., Frick, F.M., Larson, R.E., **1986**. *Effect of non-precipitating clouds on the aerosol size distribution*. Aerosol Sci & Technol. 20, 1.

Kleeman, M. J., Schauer J. J., Cass, G. R., Environ **1999**. Sci. Technol., , 33, 3516–3523

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

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

ISO/IEC 17025, 5.4.5.1, **2005**. *Requisiti generali per la competenza dei laboratori di prova e taratura*.

ISTISAN, **2004**. *Trattamento dei dati inferiori al limite di rilevabilità nel calcolo dei risultati analitici*. Menichini E., Viviano G, et al., Istituto Superiore della Sanità.

Lange, R., Fissan, H., Schmidt-Ott, A., **1996**. *Determination of equivalent diameters of agglomerates*. J. Aerosol Sci. 27 (1), 417.

Lazzarin R. M., Minchio F., Noro M. *Utilizzo delle biomasse nel riscaldamento civile e industriale: spetti energetici, tecnologici ed ambientali*. Dipartimento di tecnica e gestione dei sistemi industriali, università di Padova.

Lee, J. J., Engling, G., Lung, S.-C. C., Lee, K.-Y., **2008**. *Particle size characteristics of levoglucosan in ambient aerosols from rice straw burning*. *Atmospheric Environment*, 42, 8300–8308

Lin Guo, Hanzhi Wu, Hao Yue, Shuhai Lin, Yongquan Lai, Zongwei Cai., **2011**. *A novel and specific method for the determination of aristolochic acid-derived*. *Journal of Chromatography B*, 152-158.

Lipfert, F.W., **1987**. *Effect of acidic deposition on the atmospheric deterioration of materials mater*. *Performance* 26, 12.

Louchouart P., Kuo J., Wade T.L., Schantz M., **2010** *Determination of levoglucosan and its isomers in size fractions of aerosol standard reference materials*. *Atmospheric Environment* 43, 2009: 5630-5636.

Kanakidou M. et al., **2005** *Organic aerosol and global climate modelling: a review*. *Atmospheric Chemistry and Physics* 5, 1053-1123.

Kehrwald, N., Zangrando, R., Gabrielli, P., Jaffrezo, J. L., Boutron, C., Barbante, C., Gambaro, A. **2012**. *Levoglucosan as a specific marker of fire events in Greenland snow*. *Tellus B*, 64.

Kjällstrand, J., Ramnas, O., Petersson, G., **2000**. *Methoxyphenols from burning of Scandinavian forest plant materials*. *Chemosphere* 41, 735-741.

Ma, Y., Hays, M., D., Geron ,C., D, Walker ,J., T., Gatari Gichuru, M., J.,**2010**. *Technical Note: Fast two-dimensional GC-MS with thermal extraction for anhydro-sugars in fine aerosols*. *Atmos. Chem. Phys.*, 10, 4331–4341.

Kleeman, M. J.; Riddle, S. G.; Jakober, C. A., **2008**. *Size distribution of particle-phase molecular markers during a severe winter pollution episode*. *Environ. Sci. Technol.* 2008, 42 (17), 6469–6475.

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

Manisali,I., Chen D.D.Y, Schneider B.B. **2006**. *Electrospray ionization source geometry for mass spectrometry: past, present, and future*. Volume 25, Issue 3, March 2006, Pages 243–256.

Marconi, A., **2003**. *Materiale particellare aerodisperso: definizioni, effetti sanitari, misura e sintesi delle indagini ambientali effettuate a Roma*. Ann Ist Super Sanità, 39 (3), 329.

Mazzera, D.,M., Lowenthal D.,H., Chow, J.,C., Watson, J.,G. **2001**. *Source of PM10 and sulfate aerosol at McMurdo station, Antarctica*. Chemosphere 45, 347-356.

Mochida, M.; Kawamura, K.; Umemoto, N.; Kobayashi, M.; Matsunaga, S.; Lim, H. J.; Turpin, B. J.; Bates, T. S.; Simoneit, B. R. T. **2003**. *Spatial distributions of oxygenated organic compounds (dicarboxylic acids, fatty acids, and levoglucosan) in marine aerosols over the western Pacific and off the coast of East Asia: Continental outflow of organic aerosols during the ACE-Asia campaign*. J. Geophys. Res. 2003, 108 (D23), No. 2002JD003249.

Mochida, M., Kawamura, K., Fu, P., Takemura, T., **2010**. *Seasonal variation of levoglucosan in aerosols over the western North Pacific and its assessment as a biomass-burning tracer*. Atmospheric Environment 44, 3511-3518.

Naeher, L.P., Smith, K.R., et al.,**2005**. *Critical review of the health effect of wood smoke*.

O'Neill, P., Schulte-Frohlinde, D., Steenken, S., **1977**. *Formation of radical cations and zwitterions versus demethoxylation in the reaction of OH with a series of methoxylated benzenes and benzoic acids*. Faraday Discussions of the Chemical Society 63, 141-148.

Orasche, J., Schnelle-Kreis, J., Abbaszade, G., Zimmermann, R., **2011**. *Technical Note: In-situ derivatization thermal desorption GC-TOFMS for direct analysis of particle-bound non-polar and polar organic species*. Atmospheric Chemistry and Physics 2011, 11, (17), 8977-8993.

Oros D., Simoneir B.R.T., **2001**. *Identification and emission factors of molecular tracers in organic aerosols from biomass burning Part 2. Deciduous trees*. Applied Geochemistry 16, 2001: 1545-1565.

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

Perrone, M.,G., Larsen, B.,R., Ferrero, L., Sangiorgi, G., De Gennaro, G., Udisti, R., Zangrando, R., Gambaro, A., Bolzacchini, E, **2012**. *Sources of high PM_{2.5} concentrations in Milan, Northern Italy: Molecular marker data and CMB modeling*. Science of the Total Environment 414, 343–355.

Perry, R. H., Cooks, R. G. and Noll, R. J. **2008**. *Orbitrap mass spectrometry: Instrumentation, ion motion and applications*. Mass Spectrom. Rev., 27: 661–699. doi: 10.1002/mas.20186

Petterson R., et al., **1984** The chemical composition of wood. Chemistry of Solid Wood, Chapter 2, 57-126.

Piazzalunga A.,Fermo P, Bernardoni V., Vecchi R., Valli G., De Gregorio M. A. **2010**. *Simplified method for levoglucosan quantification in wintertime atmospheric particulate matter by high performance anion-exchange chromatography coupled with pulsed amperometric detection (visibile solo abstract)*. Volume 90, Issue 12, 2010.

Prospero, J. M., **1999**. *Long-range transport of mineral dust in the global atmosphere:Impact of African dust on the environment of the southeastern United States*. 96, p. 3396–3403.

Puxbaum, H.; Caseiro, A.; Sanchez-Ochoa, A.; Kasper-Giebl, A.; Claeys, M.; Gelencser, A.; Legrand, M.; Preunkert, S.; Pio, C; **2007**. *Levoglucosan levels at background sites in Europe for assessing the impact of biomass combustion on the European aerosol background*. J. Geophys. Res. 2007, 112 (D23), 11.

Raes, F., Van Dingenen, R., Vignati, E., Wilson, J., Putaud, J.,P., Seinfeld, J.,H., Adams, P., **2000**. *Formation and cycling of aerosols in the global troposphere*. Atmospheric Environment 34, 4215-4240.

Rahaman, Q., Nettesheim, P., Smith, K.R., Seth, P.K., Selkirk, J., **2001**. *International conference on environmental and occupational lunge disease*. Environ. Health Perspect, 109, 425.

Ramanathan, V., Crutzen, P.J., Kiehl, J.T, Rosenfeld, D., **2001**. *Aerosol, Climate and the Hydrological Cycle*. Science, 294, 2119.

Rossi, S., **2011**. *Caratterizzazione chimica dell'aerosol artico: composti organici idrosolubili e loro origine*. Tesi di laurea magistrale.

Saarnio, K., Teinilä, K., Aurela, M., Timonen, H., & Hillamo, R. 2010. *High-performance anion-exchange chromatography–mass spectrometry method for determination of levoglucosan,*

mannosan, and galactosan in atmospheric fine particulate matter. Analytical and bioanalytical chemistry, 398(5), 2253-2264.

Sandersona, M.G., Collinsa, W.J., Johnsona, C.E., Derwentb, R.G., **2006.** *Present and future acid deposition to ecosystems: The effect of climate change.* Atmospheric Environment 40, 1275.

Scalabrin, E. **2011.** *Studio di composti organici idrosolubili nell'aerosol artico.* Tesi di laurea magistrale.

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

Schkolnik, G.; Falkovich, A. H.; Rudich, Y.; Maenhaut, W.; Artaxo, P. Environ., **2005.** *New Analytical Method for the Determination of Levoglucosan, Polyhydroxy Compounds, and 2-Methylerythritol and Its Application to Smoke and Rainwater Samples.* Sci. Technol. 2005, 39, 2744-2752.

Schkolnik, G., Rudich, Y., **2006.** *Detection and quantification of levoglucosan in atmospheric aerosols: a review.* Analytical and Bioanalytical Chemistry 385, 26-33.

Schmidl, C., Bauer, H., Dattler, A., Hitzenberger, R., Weissenboeck, G., Marr, I. L., et al., **2008.** *Chemical characterisation of particle emissions from burning leaves.* Atmospheric Environment , 42, 9070-9079.

Schmidl, C., Marr, I. L., Caseiro, A., Kotianová, P., Berner, A., Bauer, H., et al., **2008.** *Chemical characterization of fine particle emissions from wood stove combustion of common woods growing in mid-European Alpine regions.* Atmospheric Environment , 42 (1), 126-141.

Schutz, L., **1980.** *Longe range transport of desert dust qith special emphasy on the Sahara.* 3Annals of the New York Academy of Sciences, 338, 515.

Seinfeld, J.H., Pandis, S.N., **2006.** *Atmospheric Chemistry and Physics, Wiley.*

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

Simoneit, B. R., Elias, O. V.. **2000**. *Organic tracers from biomass burning in atmospheric particulate matter over the ocean*. Marine Chemistry , 69, p. 301-312.

Simoneit B.R.T., **2002**. *Biomass burning — a review of organic tracers for smoke from incomplete combustion*. Applied Geochemistry 17, 129-162.

Simpson, C.D., Paulsen, M., Dills, R., Liu, S., Kalman, D., **2005**. *Determination of Methoxyphenols in Ambient Atmospheric Particulate Matter: Tracers for Wood Combustion*. Environmental science technology 39, 631-637.

Sito internet. www.centrometeoitaliano.it 11/4/2013.

sito internet: www.italiantartide.it/spedizioni/xxvi/. Rapporto sulla Campagna Antartica Estate Australe 2010-2011. 02/08/1013

sito internet: www.nonsoloaria.it 11/4/2013.

Sito internet: www.scar.org. SCAR, Scientific Committee on Antarctic Research. 1/08/13

Skoog, A. D., Holler, F. J., & Crouch, R. S., **2007**. *Chimica analitica strumentale (II ed.)*. Edises, Napoli.

Stohl, A.; Andrews, E.; Burkhardt, J. F.; Forster, C.; Herber, A.; Hoch, S. W.; Kowal, D.; Lunder, C.; Mefford, T.; Ogren, J. A.; Sharma, S.; Spichtinger, N.; Stebel, K.; Stone, R.; Strom, J.; Torseth, K.; Wehrli, C.; Yttri, K. E. **2006**. *Pan-Arctic enhancements of light absorbing aerosol concentrations due to North American boreal forest fires during summer 2004*. J. Geophys. Res.: Atmos. 2006, 111 (D22), No. D22214

Stohl, A., Berg, T., Burkhardt, J., Fjæraa, A., Forster, C., Herber, A., et al. **2007**. *Arctic smoke e record high air pollution levels in the European Arctic due to agricultural fires in Eastern Europe in spring 2006*. Atmospheric Chemistry and Physics , 7, 511-534.

Stone, E. A.; Lough, G. C.; Schauer, J. J.; Praveen, P. S.; Corrigan, C. E.; Ramanathan, V. **2007**. *Understanding the origin of black carbon in the atmospheric brown cloud over the Indian Ocean*. J. Geophys. Res. 2007, 112 (D22), No. 2006JD008118.

Sutthivaiyakit P., Achatz S., Lintelmann, J, **2005**. *LC-MS/MS method for the confirmatory determination of aromatic amines and its application in textile analysis*. Analytical and bioanalytical chemistry 381, 268–276.

Thermo Fisher Scientific™, **2008**. *LTQ Orbitrap XL™ Hardware Manual*. Revision B – 1225830.

Thermo Fisher Scientific™, **2009**. *LTQ Orbitrap XL™ Getting Started Tune Plus 2.5.5*. Revision B – 1225841

Thermo Fisher Scientific™, **2010**. *Product Manual for Dionex CarboPac™ MA 1, PA1, PA10 and PA100 Columns*.

Thermo Fisher Scientific™, **2011**. *UHPLC⁺ focused: Systèmes de chromatographie liquide UltiMate 3000*.

Thermo Fisher Scientific™, **2012**. *Dionex ICS-5000+ Ion Chromatography System Operator's Manual*. Document No. 065446, Revision 01.

Turchet, M., **2012**. *Determinazione di composti organici nell'aerosol atmosferico mediante LC-MS ad alta risoluzione*. Tesi di laurea magistrale.

Von Schneidmesser, E.; Schauer, J. J.; Hagler, G. S. W.; Bergin, M. H. **2009**. *Concentrations and sources of carbonaceous aerosol in the atmosphere of Summit, Greenland*. Atmos. Environ. 2009, 43 (27), 4155–4162

Wang L. J. Schnute W. C. **2012**. *Applications of Capillary Ion Chromatography Mass Spectrometry to Metabolomics Research*. Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA, USA

Wania, F, **2003**. *Assessing the Potential of Persistent Organic Chemicals for Long-Range Transport and Accumulation in Polar Regions*. Environmental science technology 37, 1344-1351.

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

Ward, T. J.; Palmer, C. P.; Bergauff, M.; Jayanty, R. K. M.; Noonan, C. W., **2011**. *Organic/elemental carbon and woodsmoke tracer concentrations following a community wide woodstove changeout program*. Atmos. Environ. 2011, 45 (31), 5554–5560

Wardoyo A.Y.P., **2007**. “*Biomass burning: particle emissions, characteristics and airborne measurements*”. Final work.

Wung, M., G., **2005** *The concept of spectral accuracy for MS*. Anal. Chem. 82, 7055-7062).

Yang H., Yan R., Chen H. et al., **2007**. *Characteristics of hemicellulose, cellulose and lignin pyrolysis*. Fuel 86, 1781–1788.

Zangrando R., Gambaro A., De Pieri S., Gabrielli J., Barbaro E., Barbante C. **2011**. *Acrylamide determination in atmospheric particulate matter by High Performance Liquid Chromatography/Mass Spectrometry*. International Journal of Environmental Analytical Chemistry (Accepted Manuscript), 2011

Zangrando, R., Barbaro, E., Zennaro, P., Rossi, S., Kehrwald, M. N., Gabrieli, J., Barbante, C., Gambaro, A. **2013**. *Molecular Markers of Biomass Burning in Arctic Aerosols*. Environmental Science & Technology 2013 47 (15), 8565-8574.

Zappoli S., Andracchio, A., Fuzzi, S., Facchini, M.C., Gelencsér, A., Kiss, G., Krivácsy, Z., Molnár, Á., Mészáros, E, Hansson, H.C., Rosman K., Zebühr, Y., **1999**. *Inorganic, organic and macromolecular components of fine aerosol in different areas of Europe in relation to their water solubility*. Atmospheric Environment 33, pp 2733–2743.

Ringraziamenti

Si ringraziano:



Università
Ca' Foscari
Venezia

L' **Università Cà Foscari** di Venezia per avermi fornito le conoscenze necessarie e i costosissimi strumenti per la stesura della tesi.

Il professor **Andrea Gambaro** per avermi seguito ed aiutato nel lavoro e nella stesura della tesi.

Elena Barbaro e **Roberta Zangrando** per avermi seguito giorno dopo giorno nel periodo di internato e tesi; oltre al lavoro di correzione durante la stesura dell'elaborato.

Il **dipartimento di Scienze ambientali, Informatica e Statistica**, soprattutto la sezione di **chimica analitica** quindi chi non ho citato è compreso.

I miei controrelatori: professor **Bruno Pavoni** e professor **Giancarlo Rampazzo** per gli utili consigli che mi hanno dato nel colloquio intermedio che hanno contribuito alla stesura delle conclusioni



La **XXVI spedizione italiana in Antartide** per aver raccolto i campioni di oggetto di questo lavoro di tesi.

Un grazie con la g maiuscola a **Serena Pol** per avermi sopportato nel nervosismo da tesi, aiutato con il lavoro nonostante fosse in tesi anche lei presso lo stesso laboratorio e per avermi incoraggiato nei momenti in cui volevo mollare.

Grazie alla **Mamma**, a **Papà** e a **Gugiula** per quello che hanno fatto in tutti questi anni, e che continueranno a fare in futuro.

Se ho dimenticato qualcuno, mi perdoni, ringrazio anche lui.