



Università
Ca' Foscari
Venezia

Dipartimento di Scienze Ambientali,
Informatica e Statistica

*Corso di Laurea magistrale in
Scienze Ambientali*

Tesi di Laurea

—
Ca' Foscari
Dorsoduro 3246
30123 Venezia

**DETERMINAZIONE DI
AMMINOACIDI
NELL'AEROSOL ANTARTICO**

Relatore

Ch. Prof. Andrea Gambaro

Correlatori

Dott.ssa Elena Barbaro

Dott.ssa Roberta Zangrando

Laureando

Serena Pol

Matricola

818953

Anno accademico

2012/2013

Indice

1) <i>Introduzione</i>	6
2) <i>L'aerosol atmosferico</i>	8
2.1) Definizione e caratteristiche	8
2.2) Processi di formazione, trasformazione e rimozione del particolato	12
2.2.1) <i>Processi di formazione</i>	12
2.2.2) <i>Trasporto e permanenza in atmosfera</i>	13
2.2.3) <i>Fenomeni di rimozione</i>	14
2.3) Effetti del particolato atmosferico	15
2.3.1) <i>Effetti sul clima e microclima</i>	15
2.3.2) <i>Effetti sulla visibilità</i>	16
2.3.3) <i>Effetti sugli ecosistemi e sui materiali</i>	16
2.3.4) <i>Effetti sulla salute</i>	16
3) <i>Gli analiti: amminoacidi</i>	18
3.1) Proprietà acido base degli amminoacidi	22
3.2) Proprietà ottiche degli amminoacidi	23
3.3) Amminoacidi nell'aerosol atmosferico	23
4) <i>Lo strumento: cromatografia liquida con detector a spettrometria di massa</i>	27
4.1) High Performance Liquid Chromatography (HPLC)	27
4.2) Spettrometria di massa	29
4.3) L'interfaccia LC/MS e le sorgenti ioniche	30
4.3.1) <i>ElectroSpray Ionisation (ESI)</i>	31
4.4) L'analizzatore e il detector	33
4.4.1) <i>Lo strumento LTQ Orbitrap XL</i>	33
4.4.2) <i>Lo spettrometro di massa API 4000</i>	38

5) <i>Teoria della messa a punto di un metodo analitico</i>	41
5.1) Messa a punto e ottimizzazione del metodo strumentale	41
5.1.1) <i>Messa a punto dello spettrometro di massa</i>	41
5.1.2) <i>Messa a punto del metodo cromatografico</i>	43
5.1.3) <i>Ottimizzazione dei parametri della sorgente</i>	43
5.2) Fase preanalitica	44
5.3) Validazione del metodo	44
5.4) Quantificazione	47
6) <i>Il campionamento</i>	49
6.1) L'area di studio: il continente antartico	49
6.1.1) <i>L'aerosol antartico</i>	51
6.2) Strumento di campionamento	53
6.3) Il prelievo dei campioni di aerosol atmosferico	55
7) <i>Materiali e strumenti utilizzati</i>	57
7.1) Materiali standard di riferimento	57
7.2) Solventi e reagenti	57
7.3) Materiali	57
7.4) Strumentazione	58
7.4.1) <i>Preanalitica</i>	58
7.4.2) <i>Analitica</i>	58
7.5) Colonne cromatografiche	59
7.6) Software	59
8) <i>Metodologie analitiche</i>	60
8.1) Preparazione delle soluzioni standard	60
8.2) Procedura pre-analitica	62
8.2.1) <i>Decontaminazione del materiale di laboratorio</i>	62
8.2.2) <i>Trattamento del campione</i>	63

8.3) Metodo di analisi.....	64
8.3.1) <i>Corsa cromatografica.....</i>	64
8.3.2) <i>Metodo spettrometrico – LTQ Orbitrap XL.....</i>	66
8.3.3) <i>Metodo spettrometrico – API 4000.....</i>	73
8.4) Validazione del metodo pre-analitico.....	79
9) <i>Risultati e discussione</i>	81
9.1) Messa a punto di un metodo analitico per la separazione chirale degli amminoacidi ...	81
9.2) Validazione del metodo HPLC – LTQ Orbitrap XL.....	84
9.3) Analisi di campioni di aerosol antartico con il metodo HPLC – LTQ Orbitrap XL.....	90
9.4) Validazione del metodo HPLC – API 4000	91
9.5) Confronto fra i due metodi strumentali messi a punto	96
9.6) Analisi di campioni di aerosol antartico con il metodo HPLC-API 4000	101
10) <i>Conclusioni</i>	114
11) <i>Elenco degli acronimi utilizzati.....</i>	116
12) <i>Bibliografia</i>	118

1) *Introduzione*

L'atmosfera è un sottile strato gassoso che avvolge la Terra fornendole nutrimento e protezione. Essa infatti contiene numerose sostanze utili alla vita sul nostro pianeta e, grazie alle reazioni fotochimiche che avvengono al suo interno costituisce uno schermo che protegge la Terra dalle radiazioni dannose provenienti dallo spazio e assorbe nonché trattiene la radiazione infrarossa permettendo di mantenere una temperatura stabile e sufficientemente elevata da consentire la vita come oggi la conosciamo. Uno dei componenti più rilevanti dell'atmosfera è il particolato atmosferico, ovvero la miscela di sostanze solide e liquide che si trovano in sospensione all'interno dell'atmosfera. Esso può essere di origine naturale o antropica e può essere trasportato dai venti e dalle correnti d'aria anche a lunga distanza dal luogo in cui viene prodotto. Proprio per questa sua caratteristica esso riveste un ruolo molto importante, in quanto può portare con sé sostanze inquinanti anche in luoghi che normalmente non sono soggetti ad inquinamento di origine antropica. Negli ultimi anni numerosi studi scientifici sono stati dedicati al particolato atmosferico, focalizzando l'attenzione sulla sua composizione negli ambienti estremi, come quelli polari, dove la qualità dell'aria non è influenzata da fonti antropiche locali, ma solo il frutto delle dinamiche di trasporto (Colbeck, 2008). In particolare lo studio dell'aerosol nel continente Antartico assume un ruolo importante poiché questo viene definito l'ambiente incontaminato per eccellenza, grazie alla sua segregazione geografica e all'assenza di sorgenti antropiche di aerosol, se si escludono le poche emissioni derivanti dalle stazioni di ricerca. Questi studi permettono di approfondire i processi di trasporto, trasformazione e rimozione degli inquinanti prodotti dall'uomo.

Nello studio delle dinamiche di trasferimento dei contaminanti a livello globale, risulta fondamentale identificare dei composti chimici che possano essere usati come traccianti per poter identificare le sorgenti naturali o antropiche delle emissioni, quantificando così il contributo antropogenico che si ripercuote sulla salute e sui cambiamenti climatici. Ad esempio gli acidi organici dicarbossilati alifatici (con un numero di carbonio che va da 2 a 10) sono stati identificati come traccianti appropriati per le emissioni dei motori (Kawamura et al., 1987), il colesterolo è il tracciante ideale che descrive l'emissione da parte dell'attività culinaria (Rogge et al., 1991), mentre le anidridi monosaccaridiche, come il levoglucosan, il mannosan e il galactosan sono state considerate degli ottimi traccianti nella combustione della biomassa (Simoneit, 2002) (Turner et al. 2008).

Scopo del presente lavoro di tesi è la messa a punto di un metodo analitico mediante HPLC-MS per la determinazione delle singole forme enantiomeriche di alcuni amminoacidi (alanina, arginina, asparagina, acido aspartico, acido glutammico, glicina, glutammina, istidina, lisina, leucina, isoleucina, metionina, metionin solfone, ornitina, fenilalanina, prolina, idrossiprolina, serina, treonina, triptofano, tirosina, valina) in campioni di particolato atmosferico antartico al fine di utilizzare tali composti come traccianti dell'origine biogenica dell'aerosol nonché per studi sulle dinamiche di trasporto e trasformazione dell'aerosol. Gli amminoacidi sono composti ancora poco studiati in campo ambientale, tuttavia la loro determinazione con metodi sempre più accurati, minimizzando anche la contaminazione del campione, consente di studiarne il comportamento anche in atmosfere poco contaminate e capire come questi composti vengono immessi e reagiscono nell'aria. I vari amminoacidi infatti presentano reattività in atmosfera e tempi di semivita diversi tra loro e proprio per questo la determinazione della loro abbondanza relativa permette di utilizzarli come traccianti e di fare delle considerazioni sull'età e sulla provenienza del particolato all'interno del quale vengono rinvenuti (Scalabrin et al. 2012). Inoltre la possibilità di determinare separatamente gli enantiomeri D e L dei vari amminoacidi, grazie all'utilizzo di una fase stazionaria chirale, consente un loro utilizzo come traccianti di differenti tipologie di attività biologica, soprattutto in ambiente marino. Viene infatti ritenuto da molti studiosi che la presenza di amminoacidi D sia nell'aerosol che nell'acqua di mare sia da imputare all'attività batterica, mentre la presenza di amminoacidi L indichi una prevalenza di attività fitoplanctonica (Wedyan e Preston, 2008; Kuznetsova et al., 2005).

In questo lavoro di tesi verrà dapprima messo a punto un metodo analitico che prevede l'utilizzo della cromatografia liquida ad alte prestazioni accoppiata con un detector a spettrometria di massa ad alta risoluzione. Successivamente verrà effettuata la validazione del metodo stesso e della procedura pre-analitica per verificarne la linearità della risposta, il limite di rilevabilità, la resa e l'accuratezza. Infine il metodo messo a punto e validato potrà essere utilizzato per l'analisi di campioni di aerosol antartico al fine di investigare le dinamiche di trasporto dei micro costituenti dell'atmosfera in un ambiente lontano da sorgenti antropiche. I dati ottenuti verranno analizzati per effettuare delle considerazioni sulle dinamiche di trasporto e sulle sorgenti dell'aerosol campionato.

2) *L'aerosol atmosferico*

2.1) **Definizione e caratteristiche**

L'aerosol atmosferico è una sospensione di particelle solide e liquide, con bassa velocità di deposizione, all'interno di un mezzo gassoso, come l'aria. Le dimensioni (diametro) delle particelle possono variare tra qualche nanometro (nm) e decine/centinaia di micrometri (μm). Tuttavia nel caso di moti turbolenti anche particelle più grandi possono entrare a far parte dell'aerosol. Il termine particolato atmosferico viene spesso utilizzato come sinonimo di aerosol tuttavia non è propriamente corretto in quanto nella sua definizione non si tiene conto della presenza di particelle liquide.

I parametri utilizzati per la classificazione dei vari tipi di aerosol sono le dimensioni, la forma e la composizione. Le dimensioni sono il parametro più importante utilizzato per la classificazione dell'aerosol. Poiché le particelle atmosferiche hanno forma irregolare, il parametro utilizzato per la misura delle loro dimensioni è il diametro aerodinamico equivalente D_{ae} , ovvero il diametro di una particella sferica di densità 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. (Lange et al., 1996)

Sulla base del diametro aerodinamico, il particolato atmosferico viene suddiviso nelle seguenti frazioni:

- **ultrafine** (ultra-sottile): diametro aerodinamico compreso tra 0,01 e 0,1 μm ; generalmente queste particelle sono costituite dai prodotti della nucleazione omogenea dei vapori sovrasaturi (SO_2 , NH_3 , NO_x e prodotti della combustione);
- **fine** (sottile): diametro aerodinamico compreso tra 0,1 e 2,5 μm ; la loro formazione avviene per coagulo di particelle ultrafini e attraverso i processi di conversione gas-particella (processo di nucleazione eterogenea) oppure per condensazione di gas su particelle preesistenti nell'intervallo di accumulazione. I maggiori costituenti di queste particelle nelle aree industrializzate sono i solfati, i nitrati, lo ione ammonio, il carbonio elementare e quello organico; a questi si aggiungono particelle di origine biologica come spore fungine, lieviti, batteri ecc.

- **coarse** (grossolana): diametro aerodinamico compreso tra 2,5 e 100 μm ; essenzialmente prodotte da processi meccanici (erosione, risospensione meccanica o eolica, macinazione), esse contengono elementi presenti nel suolo e nei sali marini; essendo inoltre relativamente grandi esse tendono a sedimentare in tempi di poche ore o minuti, ritrovandosi spesso vicino alle sorgenti di emissione in funzione della loro altezza. (Turner et al., 2008)

In generale si può assumere che le frazioni a dimensioni maggiori degli aerosol sono costituite prevalentemente da materiale carbonatico quindi basico, quelle a dimensioni minori sono in genere acide (aerosol contenente SO_2 , SO_3). (Manahan, 2000).

Un aerosol in cui tutte le particelle hanno la stessa dimensione viene definito monodisperso, tuttavia questo tipo di aerosol non è praticamente mai presente in natura; l'aerosol contenente un vasto range dimensionale viene invece definito polidisperso (Turner et al., 2008).

La distribuzione dimensionale dell'aerosol rispetto al numero di particelle (fig 2.1 a) è caratterizzata dalla presenza di due mode: la moda di accumulazione (che comprende particelle più piccole di 10 nm e i nuclei di Atkeim con diametro tra 10 e 100 nm) e la moda di nucleazione che comprende particelle generate in situ per nucleazione. La presenza di quest'ultima è influenzata dalle condizioni atmosferiche. In questa distribuzione le particelle con diametro maggiore a 0,1 μm sono trascurabili in numero rispetto alle particelle più piccole di 0,1 μm . Se si considera invece la distribuzione dimensionale delle particelle dell'aerosol rispetto alla loro massa o volume il grafico che ne risulta è leggermente diverso (fig, 2.1b), ma sempre caratterizzato dalla presenza di due mode: la moda di accumulazione (da 0,1 a circa 2 μm) e la moda grossolana (da 2 a 50 μm). 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. Le particelle presenti nella moda grossolana vengono di solito prodotte attraverso processi meccanici ad opera di vento o erosione. Molti dei materiali in questa moda sono primari anche se ci possono essere dei solfati e nitrati secondari.

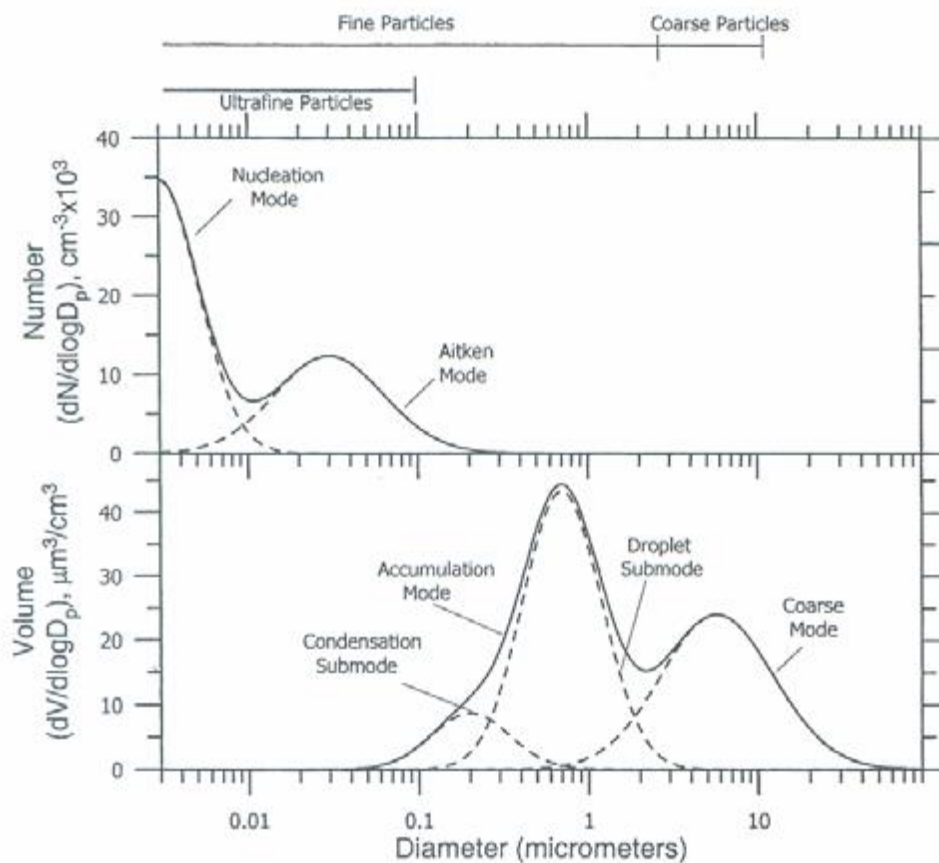


Figura 2.1: Distribuzione numerica e volumetrica delle particelle atmosferica e relative mode.

I composti che costituiscono l'aerosol sono sia organici che inorganici. Tra i composti inorganici troviamo soprattutto nitrati, solfati, ammonio, sali marini, ossidi metallici, ioni idrogeno e acqua. La componente organica invece è composta soprattutto da idrocarburi incombusti derivanti dai motori a scoppio e composti azotati, in particolare n-alcheni, acidi n-alcanoici e composti policiclici aromatici. La frazione organica dell'aerosol in ambiente urbano generalmente contribuisce al 30-60% del particolato fine totale, portando così a un significativo impatto sulle proprietà dell'atmosfera. Oltre ai componenti principali nell'aerosol sono presenti più di 40 elementi in tracce rinvenuti a concentrazioni inferiori a $1 \mu\text{g m}^{-3}$; essi sono: Al, Ca, C, Fe, K, Na, Si > Cu, Pb, Ti, Zn > Sb, Be, Bi, Cd, Co, Cr, Cs, Li, Mn, Ni, Rb, Se, Sr, V. (Mahanan, 2000)

In generale si può affermare che la composizione chimica del particolato dipende dall'area di provenienza e dalla tipologia delle sorgenti di emissione dominanti, cioè dal tipo di insediamenti della zona, e, poiché le particelle possono rimanere sospese nell'aria per parecchi giorni e quindi trasportate anche a grandi distanze, il loro carico in una certa area dipende non solo dalle fonti locali ma anche dalla quota trasportata.

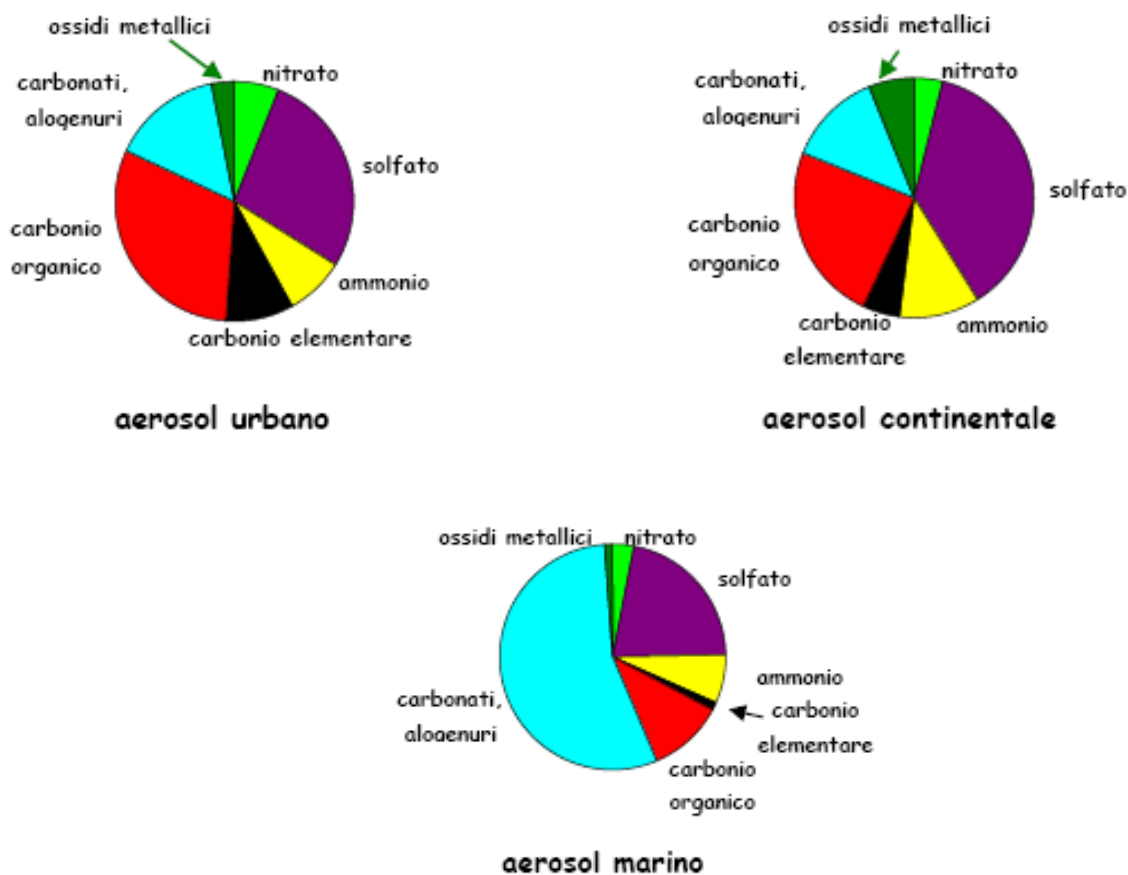


Figura 2.2: Composizione percentuale tipica dell'aerosol in località urbane, continentali rurali e marine (Ministero dell'Ambiente e Tutela del Territorio, 2003 - <http://www.minambiente.it>).

Nella figura 2.2 è illustrata la composizione tipica dell'aerosol in diverse località italiane. Si può notare come la composizione risulti piuttosto simile nelle diverse aree tranne che per la percentuale di carbonio elementare e carbonati (Ministero dell'Ambiente e Tutela del Territorio, 2003).

Le particelle dell'aerosol, una volta formate, subiscono una serie di processi chimici e fisici atmosferici, quali condensazione, evaporazione e coagulazione. Esse possono venir rimosse dall'atmosfera in un tempo più o meno lungo che può andare da alcuni minuti ad alcune settimane per mezzo di deposizioni secche o umide. (Turner et al., 2008)

2.2) Processi di formazione, trasformazione e rimozione del particolato

Il particolato può essere immesso nell'atmosfera tal quale o può formarsi in seguito a svariati processi chimici o fisici. Una volta formato, esso può subire numerosi processi all'interno dell'atmosfera, fino ad arrivare alla sua rimozione. Si distinguono due tipologie di aerosol sulla base dell'origine. Si definisce aerosol primario quello che viene immesso direttamente nell'atmosfera da sorgenti che possono essere sia naturali (erosione del vento, eruzioni vulcaniche, incendi ecc.), sia antropiche (veicoli e mezzi di trasporto, industrie, impianti per la produzione di energia, caldaie per il riscaldamento domestico ecc.). L'aerosol secondario è quello che si forma nell'atmosfera in seguito a reazioni chimiche che coinvolgono diverse sostanze gassose, liquide e solide. Si ritiene che le particelle di aerosol più grossolane siano introdotte nell'ambiente soprattutto a causa di fenomeni naturali, mentre quelle più fini derivino per lo più dalle attività antropiche.

2.2.1) Processi di formazione

I processi fisici di formazione di aerosol consistono soprattutto nella frammentazione di particelle più grandi a formare quello che viene definito aerosol di dispersione costituito da particelle di dimensioni maggiori di 1 μm . Esempi di questo tipo sono la macinazione del carbone, lo spray marino (scoppio di bolle d'aria sulla superficie del mare), il sollevamento di polveri e di materiale organico (pollini, spore. ecc.) ad opera del vento o di veicoli e l'emissione di cenere vulcanica (Mahanan, 2000).

Tra i processi chimici il più importante per la formazione di aerosol è la nucleazione. Un esempio di iniziazione del processo di nucleazione è dato dall'ossidazione di SO_2 a SO_3 , la quale reagendo con l'acqua forma acido solforico. Questo, in presenza di inquinanti basici, può formare sali idrati di calcio o ammonio, i quali in condizioni di bassa umidità perdono l'acqua e formano sali solidi (Mahanan, 2000). Questi sali costituiscono dei nuclei dai quali si possono originare particelle più grandi grazie ai processi di condensazione e coagulazione.

La condensazione è un processo in cui composti chimici semivolatili passano dallo stato gassoso ad uno (liquido o solido) a maggiore densità; ciò avviene quando l'equilibrio termodinamico della specie chimica tra fase gassosa e fase particolata si sposta verso quest'ultima, a causa della variazione delle condizioni. Questo processo coinvolge principalmente le particelle solide con diametro compreso tra 0,1 e 1 μm (Raes et al., 2000).

La coagulazione, invece, coinvolge sia particelle solide che liquide e si verifica per collisione tra due particelle che si muovono per agitazione termica, con formazione di particelle di maggiori dimensioni. Le particelle risultanti dalla coagulazione possono interagire con quelle originate dalla condensazione portando ad un accrescimento ulteriore delle loro dimensioni (Raes et al., 2000).

2.2.2) Trasporto e permanenza in atmosfera

Una volta formatosi l'aerosol atmosferico va incontro ad una serie di processi illustrati schematicamente nella figura 2.3.

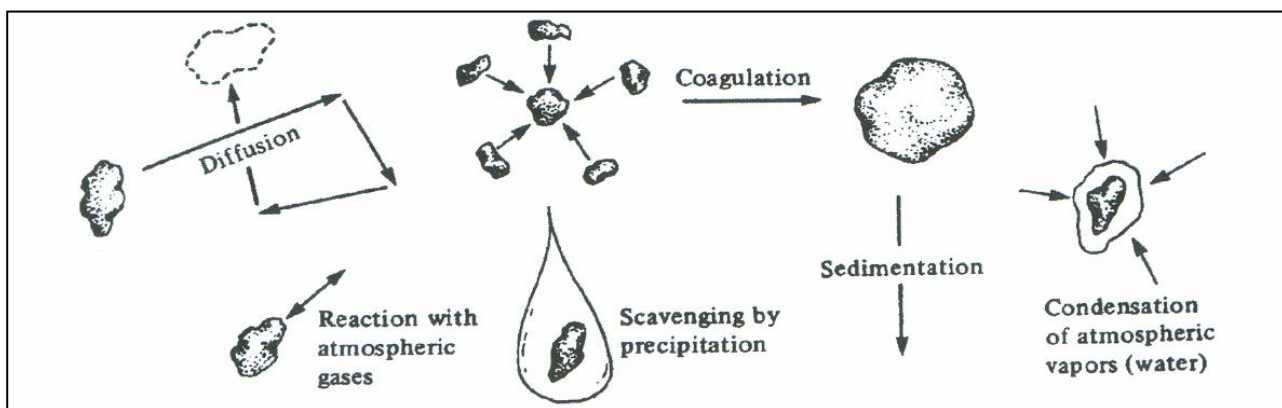


Figura 2.3: Principali processi fisici delle particelle nell'atmosfera (Mahanan, 2000).

La permanenza in atmosfera del particolato è fortemente condizionata dalla natura dei venti, dalle precipitazioni e dalle dimensioni delle particelle. Il trasporto a lunga distanza è governato principalmente dall'azione del vento. Le particelle più fini sono quelle che necessitano di minore energia per essere sollevate e trasportate, quindi sono in grado di compiere distanze maggiori. Si è osservato che particelle con diametro minore di 10 μm sono capaci di coprire distanze superiori ai 5000 km, soprattutto sopra regioni marine. I movimenti delle particelle nell'atmosfera possono avvenire sia in verticale che in orizzontale. I primi avvengono per convezione: processo attraverso il quale gli inquinanti e l'aerosol vengono trasportati negli strati più elevati dell'atmosfera, dove il tempo di permanenza delle particelle è elevato a causa della rarefazione dei gas e dell'assenza di processi di rimozione. Il processo di avvezione invece consiste nello spostamento orizzontale di masse d'aria con caratteristiche fisiche definite e distinguibili dall'aria circostante, all'interno delle quali possono essere inglobate particelle di aerosol (Colbeck, 2008). Un fattore molto importante che influenza il trasporto a lunga distanza è la temperatura dell'aria. Alle alte temperature infatti la tendenza delle sostanze ad evaporare dal sito provvisorio in cui si trovano è maggiore, poiché la pressione di vapore aumenta esponenzialmente con la temperatura. Viceversa le temperature fredde

favoriscono la condensazione e l'adsorbimento dei composti gassosi sulle particelle atmosferiche che vengono successivamente depositate. Pertanto l'evaporazione e la mobilizzazione di sostanze inquinanti avviene soprattutto dalle regioni più calde del pianeta (aree tropicali e subtropicali), mentre le regioni più fredde, come le regioni polari, rappresentano i recettori di questi composti. Questo spiega l'importanza delle regioni polari come area di studio dei fenomeni di trasporto a lunga distanza e deposizione. Inoltre va considerato il fatto che, grazie alle basse temperature, le sostanze depositate non subiscono fenomeni di alterazione. Questo da un lato consente di studiarne la natura minimizzando gli errori, dall'altro però rappresenta un problema nel momento in cui ci si trova di fronte a inquinanti persistenti (Baird C., Cann M., 2006).

Le particelle inoltre costituiscono superfici attive per reazioni chimiche in fase eterogenea portando alla formazione di inquinanti secondari. A causa di reazioni di conversione gas-particella o dell'ossidazione di specie gassose che determina la formazione di composti a bassa tensione di vapore, si può avere la formazione di particelle secondarie o la condensazione di gas sulla superficie di particelle preesistenti. Anche lo sviluppo di reazioni in soluzione all'interno delle nuvole può contribuire notevolmente al cambiamento della composizione chimica e delle proprietà dell'aerosol durante il trasporto.

2.2.3) Fenomeni di rimozione

A seconda della loro natura e delle loro dimensioni, prima o poi le particelle dell'aerosol tendono a subire fenomeni di deposizione. Vi sono due tipi di deposizione: la deposizione secca e la deposizione umida.

La deposizione secca, o sedimentazione, avviene senza l'intervento dell'acqua ed è governata dalla legge di Stokes, la quale però si applica solo a particelle con diametro compreso tra 1 e 10 μm . Essa costituisce uno dei processi di autodepurazione dell'atmosfera, forse uno dei più importanti visto che risulta sempre attivo nel tempo. La deposizione umida o dilavamento, invece, coinvolge l'acqua e comprende tutti i processi che comportano il trasferimento alla superficie terrestre in forma acquosa, come pioggia, neve o nebbia.

Grazie a questi fenomeni nell'aria pulita in genere la concentrazione di particolato si mantiene dell'ordine di 1-1,5 $\mu\text{g m}^{-3}$. Le dimensioni delle particelle condizionano il loro tempo di permanenza in atmosfera e la distanza a cui possono venire trasportate e infine deposte. A tal proposito le particelle con un diametro superiore a 50 μm sedimentano piuttosto velocemente

causando fenomeni di inquinamento su scala molto ristretta, mentre le più piccole possono rimanere in sospensione per molto tempo; alla fine gli urti casuali e la reciproca attrazione le fanno collidere e riunire assieme formando nuove particelle, le quali raggiungono così dimensioni tali da acquistare una velocità di caduta sufficiente a farle depositare al suolo.

2.3) Effetti del particolato atmosferico

Il particolato atmosferico può prendere parte a numerosi processi e di conseguenza influenzare numerosi aspetti della vita sul nostro pianeta. In particolare esso ha delle conseguenze sul bilancio della radiazione solare sulla superficie terrestre, sulla formazione delle nubi, sulla variazione della visibilità e riveste un ruolo importante sull'acidificazione delle precipitazioni con conseguenti danni ai materiali e agli ecosistemi. Ultimo ma non meno importante, il particolato, soprattutto quello di piccole dimensioni può entrare all'interno dell'apparato respiratorio umano con gravi conseguenze sulla salute.

2.3.1) Effetti sul clima e microclima

I composti dell'aerosol atmosferico contribuiscono direttamente e in maniera significativa al bilancio radiativo della superficie terrestre in due modi che possono essere considerati contrastanti tra loro. Alcuni composti presenti nell'aerosol infatti sono in grado di assorbire la radiazione solare ad una certa lunghezza d'onda facendo così diminuire la quantità di radiazione che arriva sulla superficie terrestre (Ramanathan et al., 2001). Un aumento del particolato può comportare quindi un abbassamento della temperatura media. I componenti dell'aerosol però contribuiscono in maniera significativa al trattenimento della radiazione a onde lunghe emessa dalla Terra, mitigando l'effetto di raffreddamento visto sopra. In ogni caso è stato riscontrato che gli anni successivi a eruzioni vulcaniche di tipo esplosivo, con emissione di grandi quantità di particolato, sono stati caratterizzati da inverni più freddi (www.nonsoloaria.it).

Un altro importante contributo del particolato alla regolazione del clima terrestre è dato dall'azione delle particelle come nuclei di condensazione delle nuvole (CCN). I CCN sono particelle che in presenza di vapore acqueo sovrassaturo vengono attivate per formare nuvole e gocce di nebbia. Le particelle di aerosol che agiscono da CCN aumentano la probabilità di formazione delle nuvole e l'origine e la natura dei CCN può influenzare la microstruttura e le proprietà radiative delle nuvole (Jiming, 2005). Le nuvole così formate hanno la duplice capacità di riflettere la radiazione solare, ma anche di trattenere la radiazione infrarossa emessa da terra.

L'aerosol può influenzare anche il microclima soprattutto nelle grandi città. In questi luoghi infatti si ha una massiccia produzione di particolato a causa della concentrazione di attività antropiche. Le particelle così prodotte fungono da nuclei di condensazione aumentando il manifestarsi di nebbie e la copertura nuvolosa. È stato riscontrato che l'aerosol presente su città di grandi dimensioni può ridurre anche più del 15% la quantità di radiazione solare che raggiunge il suolo.

2.3.2) Effetti sulla visibilità

Una delle manifestazioni più evidenti dell'inquinamento atmosferico dovuto alla presenza di particolato è la diminuzione della visibilità. La visibilità è definita come la più grande distanza, in una data direzione, alla quale può essere visto e identificato un oggetto scuro alla luce del giorno, o una fonte di luce non focalizzata nella notte. Questa può essere influenzata dall'assorbimento e dalla riflessione della luce da parte dell'aerosol nell'atmosfera. Le particelle hanno un effetto ottico che dipende dalla propria dimensione (Mahanan, 2000).

2.3.3) Effetti sugli ecosistemi e sui materiali

Attraverso i processi di deposizione secca e umida, l'aerosol atmosferico può comportare danni agli ecosistemi (ai suoli, alle piante) e ai materiali (monumenti, circuiti elettrici, tessuti ecc.). All'interno del particolato, infatti, si possono trovare composti acidi come ad esempio H_2SO_4 e HNO_3 , che possono venire rilasciati nei suoli e sulla superficie delle piante danneggiando irreparabilmente i tessuti vegetali con la loro azione acidificante e ossidante. Inoltre è stato dimostrato che l'aerosol può influenzare negativamente anche la fotosintesi a causa della spessa "crosta" che si forma sulla superficie delle foglie, soprattutto in aree vicino a dove si svolgono processi industriali di macinazione. L'azione dell'aerosol, unita ad un elevato tasso di umidità, danneggia anche i monumenti, gli edifici e i siti archeologici. In primo luogo l'aerosol annerisce i materiali sedimentando su di essi, in secondo luogo agisce da serbatoio di acidi, provocando fenomeni corrosivi (Sanderson et al., 2006).

2.3.4) Effetti sulla salute

In passato si riteneva che l'esposizione a polveri sospese rappresentasse un rischio per la salute solo se associata alla presenza di diossido di zolfo. Oggi è ormai universalmente accettato che l'esposizione al particolato atmosferico, indipendentemente dalla presenza di sostanze inquinanti come SO_2 , è uno dei maggiori fattori di rischio per la salute umana (Department of Health, 1995).

Gli effetti negativi del particolato si manifestano soprattutto nel sistema respiratorio e sono le particelle di dimensioni più piccole quelle che causano i danni maggiori, poiché riescono a penetrare fino nelle parti più interne del sistema respiratorio come gli alveoli. Oltre alle dimensioni, sicuramente anche la composizione del particolato gioca un ruolo rilevante nell'entità dei danni causati. Molti ricercatori sono tutt'oggi impegnati nella ricerca di componenti minori del particolato che sono responsabili degli effetti negativi sulla salute. Particolare attenzione viene rivolta negli ultimi anni alla frazione PM 2,5. Queste particelle infatti possono assorbire sostanze inquinanti dall'aria e trasferirle negli alveoli polmonari, dove risiedono per lungo tempo prima di essere rimosse, dando luogo ad un possibile assorbimento nel sangue con possibile intossicazione o aggravamento di malattie croniche come l'asma, la bronchite e l'enfisema (Harrison et al., 2000)..

Da quanto visto finora si può affermare che l'aerosol influisce su molteplici aspetti dell'ambiente e della salute umana. È quindi necessario approfondire lo studio di questo componente dell'atmosfera e comprenderne a pieno i meccanismi di reazione e di trasporto, nonché operare un continuo monitoraggio della qualità dell'aria, al fine di adottare le opportune misure di prevenzione.

3) *Gli analiti: amminoacidi*

Gli amminoacidi sono molecole organiche che presentano, legati ad un carbonio centrale chiamato carbonio α , sia il gruppo amminico ($-\text{NH}_2$) sia il gruppo carbossilico ($-\text{COOH}$). I vari amminoacidi si differenziano tra loro per la catena laterale, R, legata sempre al carbonio centrale. Questa può essere semplice o complessa e le sue proprietà fisico-chimiche determinano le caratteristiche dell'amminoacido stesso. Di tutti gli amminoacidi presenti, solo 20 sono i costituenti di tutte le proteine. Di questi alcuni sono amminoacidi essenziali nel senso che l'organismo umano non possiede gli enzimi per sintetizzarli e quindi devono essere assunti con la dieta. Essi sono la lisina, la leucina, l'isoleucina, la metionina, la fenilalanina, la treonina, il triptofano, la valina e l'istidina. Oltre ai 20 amminoacidi costituenti le proteine, in natura sono stati scoperti oltre 500 amminoacidi che svolgono ruoli biologici particolari e vengono sintetizzati da piante e animali.

A seconda del pH del mezzo in cui è immersa, la molecola amminoacidica può essere priva di cariche libere oppure può essere elettricamente neutra nel suo complesso pur presentando cariche positive e negative localizzate (zwitterione) come si può notare dalla figura 3.1.

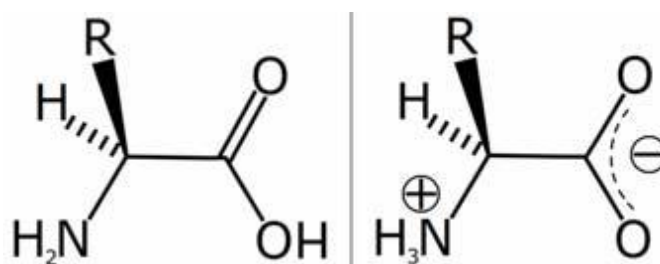
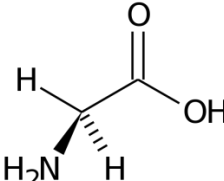
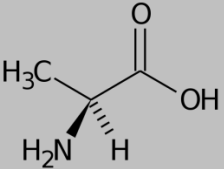
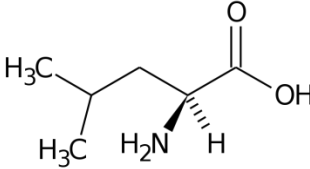
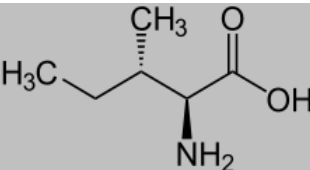
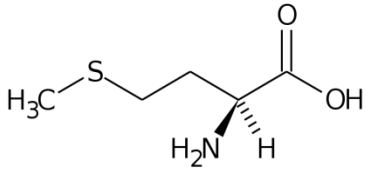
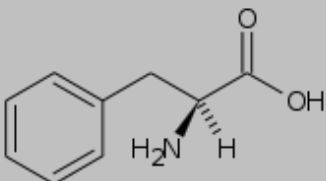
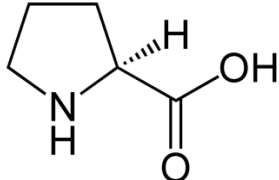


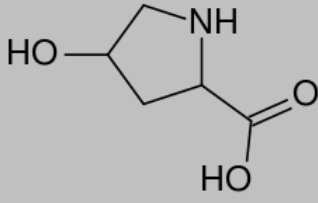
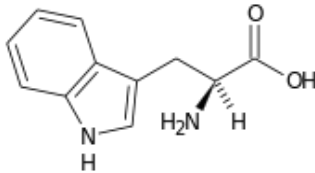
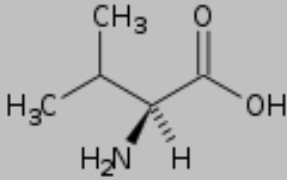
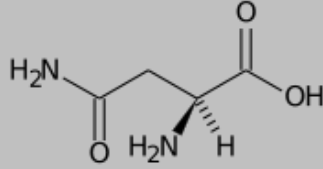
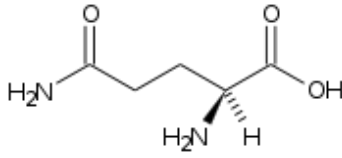
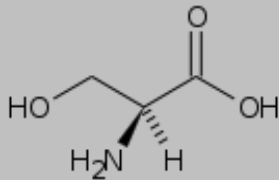
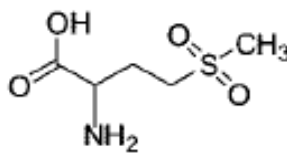
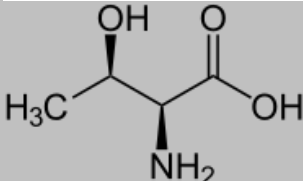
Figura 3.1: Amminoacido nella sua forma non ionizzata e in quella ionizzata (zwitterione).

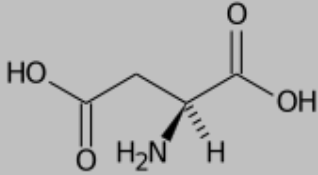
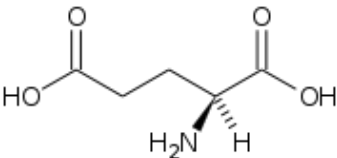
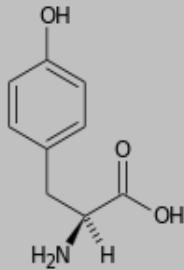
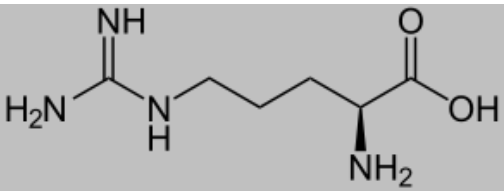
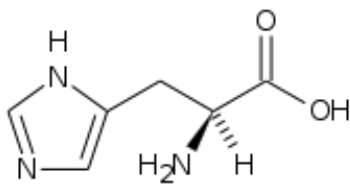
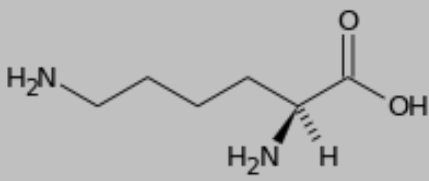
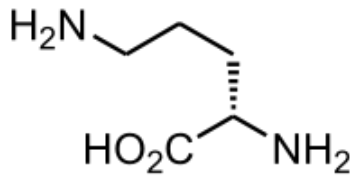
Proprio per il fatto che esistono come zwitterioni, gli amminoacidi hanno molte proprietà che ricordano quelle dei sali: sono infatti solidi cristallini, hanno un alto punto di fusione e sono solubili in acqua, ma non nei solventi organici non polari (Brown e Poon, 2005).

In tabella 3.1 vengono riportati gli amminoacidi analizzati nel presente lavoro di tesi, suddivisi in base alle caratteristiche della catena laterale: non polare, polare ma non ionizzabile, acida e basica. Per ogni analita viene riportato anche il simbolo convenzionale di abbreviazione a tre lettere, il peso molecolare e la formula di struttura.

Tabella 3.1: Amminoacidi analizzati nel presente lavoro di tesi con relativo simbolo, peso molecolare e formula di struttura.

Nome	Simbolo	Peso molecolare	Formula di struttura
catene laterali non polari			
Glicina	Gly	75,07	
Alanina	Ala	89,09	
Leucina	Leu	131,17	
Isoleucina	Ile	131,17	
Metionina	Met	149,21	
Fenilalanina	Phe	165,19	
Prolina	Pro	115,13	

Nome	Simbolo	Peso molecolare	Formula di struttura
Idrossiprolina	Hyp	131,13	
Triptofano	Trp	181,19	
Valina	Val	117,15	
catene laterali polari			
Asparagina	Asn	132,12	
Glutamina	Gln	146,15	
Serina	Ser	105,09	
Metionin solfone	Met SO ₂	181,21	
Treonina	Thr	119,12	

Nome	Simbolo	Peso molecolare	Formula di struttura
acidi			
Acido aspartico	Asp	133,1	
Acido Glutammico	Glu	147,13	
Tirosina	Tyr	181,19	
basi			
Arginina	Arg	174,2	
Istidina	Hys	155,16	
Lisina	Lys	146,19	
Ornitina	Orn	132,16	

3.1) Proprietà acido base degli amminoacidi

Tutti gli amminoacidi risultano essere acidi poliprotici deboli a causa della presenza dei gruppi carbossilico e amminico sul carbonio α . Il valore medio di pK_a del gruppo α -carbossilico di un amminoacido è 2,19. Questo valore, fa sì che questo gruppo carbossilico sia più acido dell'acido acetico ($pK_a = 4,76$), a causa della presenza del vicino gruppo $-NH_3^+$ che ha un effetto induttivo elettrone-attrattore. Anche i gruppi carbossilici della catena laterale risultano essere più acidi dell'acido acetico, tuttavia questo effetto diminuisce con l'aumentare della distanza del gruppo carbossilato dal gruppo ammonico. Il valore medio di pK_a del gruppo α - amminico di un amminoacido è 9,47. Esso è inferiore al valore di pK_a degli ioni ammoniaci primari (10,76), così il gruppo amminico di un amminoacido risulta essere una base più debole di un'ammina alifatica primaria.

Si definisce punto isoelettrico (pI) il valore di pH al quale la maggior parte delle molecole in una soluzione ha carica netta uguale a zero. Ogni amminoacido presenta uno specifico valore di pI. A pH inferiori al pI gli amminoacidi si presentano in forma protonata, mentre per pH superiori al pI essi sono per lo più in forma deprotonata. Sulla base del valore di pI gli amminoacidi vengono classificati in acidi ($pI < 5$), basi ($pI > 9$) o neutri ($5 < pI < 9$). Nella tabella 3.2 vengono riassunte le proprietà acido base degli amminoacidi oggetto di questo lavoro.

Tabella 3.2: Proprietà acido base degli amminoacidi analizzati nel presente lavoro, suddivisi in base al punto isoelettrico.

Nome	pK_a α COOH-	pK_a α -NH ₃ ⁺	punto isoelettrico (pI)
acidi			
Acido aspartico	2,16	9,82	2,98
Acido Glutammico	2,10	9,47	3,08
neutri			
Asparagina	2,02	8,80	5,41
Treonina	2,09	9,10	5,60
Tirosina	2,20	9,11	5,63
Glutammina	2,17	9,13	5,65
Serina	2,21	9,15	5,68
Metionina	2,28	9,21	5,74
Triptofano	2,38	9,39	5,88
Fenilalanina	2,38	9,24	5,91
Valina	2,29	9,72	6,00

Nome	pKa α COOH-	pKa α -NH ₃ ⁺	punto isoelettrico (pI)
Leucina	2,33	9,74	6,04
Isoleucina	2,32	9,76	6,04
Glicina	2,35	9,78	6,06
Alanina	2,35	9,87	6,11
Prolina	2,00	10,60	6,30
Istidina	1,77	9,18	7,64
Idrossiprolina	1,92	9,73	5,74
basici			
Lisina	2,18	8,95	9,74
Arginina	2,01	9,04	10,76
Ornitina	1,71	8,69	9,73

3.2) Proprietà ottiche degli amminoacidi

Con l'eccezione della glicina, tutti gli amminoacidi sono molecole chirali in quanto possiedono uno stereocentro, ovvero un carbonio al quale sono legati quattro gruppi o atomi differenti, e possono esistere come enantiomero L (levogiro) o D (destrogiro).

Quando un unico stereocentro è presente nella molecola si possono distinguere due enantiomeri, L e D. Si definiscono enantiomeri due molecole con le stesse proprietà chimiche e fisiche che posseggono però immagini speculari non sovrapponibili l'una sull'altra.

Gli enantiomeri differiscono solamente per l'attività ottica, ovvero la capacità di ruotare il piano della luce polarizzata. Se il piano della luce polarizzata viene ruotato verso destra, il composto viene detto destrogiro (D), se verso sinistra levogiro (L). Gli amminoacidi naturali sono quasi sempre appartenenti alla serie sterica L. Qualche D-amminoacido è stato trovato in proteine prodotte da organismi che vivono negli abissi marini e nelle pareti cellulari di alcuni batteri, come componenti del peptidoglicano. D-amminoacidi sono presenti anche nel veleno di alcuni animali come molluschi oppure nelle secrezioni mucose di alcune specie anfibie (Martínez-Rodríguez et al., 2010).

3.3) Amminoacidi nell'aerosol atmosferico

Gli amminoacidi sono composti costituenti tutti gli organismi viventi e quindi presenti in tutti i comparti ambientali, compreso l'aerosol atmosferico. Recenti studi hanno dimostrato che l'azoto organico rappresenta il 20-80% dell'azoto totale presente nelle deposizioni secche, nelle precipitazioni e nelle particelle di aerosol (Zhang et al., 2003). Gli amminoacidi sono risultati essere la classe più comune di composti organici azotati rilevati nell'atmosfera (Wedyan et al., 2008).

Nell'aerosol atmosferico della California sono state riscontrate concentrazioni di amminoacidi pari a 3,8-101 pmol m⁻³ (Zhang et al., 2003), nella Laguna di Venezia le concentrazioni risultano maggiori, in media 334 pmol m⁻³ (Barbaro et al., 2011). Gli amminoacidi sono presenti anche in aree dell'Oceano Pacifico nord-occidentale a una concentrazione media di 10,7 pmol m⁻³ (Matsumoto et al., 2005) e dell'Oceano Atlantico Meridionale a 20 pmol m⁻³ (Wedyan e Preston, 2008). È stato inoltre dimostrato che gli amminoacidi totali possono contribuire anche per il 14% della massa totale del PM_{2,5} in California (Zhang et al., 2002).

Gli amminoacidi presenti in atmosfera possono derivare da diverse sorgenti. In ambiente continentale queste possono essere la risospensione di polveri e sabbia dal deserto, pollini, frammenti di materiale vegetale, spore fungine e batteriche. Tuttavia risulta molto difficile identificare esattamente la provenienza degli amminoacidi riscontrati nel particolato (Kristensson et al., 2010). Composti come glicina, fenilalanina, treonina, serina, prolina sono rilasciati durante le eruzioni vulcaniche (Mukhin et al., 1978) e altri composti quali alanina, acido aspartico, glutammina e glicina sono stati rinvenuti nel fumo di sigaretta. Questi dati dimostrano come anche le combustioni di biomassa possano essere considerate una possibile sorgente di amminoacidi in atmosfera (Ge et al., 2011). In ambiente marino o costiero la sorgente più probabile di amminoacidi è la rottura di bolle sulla superficie del mare (spray marino). Queste rilasciano in atmosfera composti presenti soprattutto nel microlayer, lo strato superficiale più ricco in amminoacidi e proteine rispetto alla sottostante acqua sub superficiale. I composti rilasciati derivano soprattutto da fitoplancton (isomeri L) e da batteri (isomeri D) (Wedyan e Preston, 2008). Anche le sorgenti continentali possono contribuire alla presenza di amminoacidi in aree marine, attraverso il trasporto a lunga distanza (Kristensson et al., 2010; Matsumoto et al., 2005).

Il crescente interesse per lo studio degli amminoacidi in atmosfera deriva dal fatto che essi possono svolgere differenti ruoli e influenzare più o meno direttamente diversi processi ecologici e ambientali. Innanzitutto gli amminoacidi liberi o combinati possono essere una fonte di azoto per le piante e per i microorganismi e possono stimolare la crescita della biomassa. Si stima infatti che l'input atmosferico di azoto organico sia comparabile a quello delle specie inorganiche come NO₃⁻ e NH₄⁺ (Matsumoto et al., 2005). Questo può avere diverse sgradevoli conseguenze come l'acidificazione dei terreni e l'eutrofizzazione dei corpi d'acqua. Oltre all'azoto, gli amminoacidi possono fornire alla biomassa anche carbonio organico idrosolubile. Inoltre molti allergeni sono spesso costituiti da materiale proteico, pertanto la presenza di amminoacidi può influenzare anche la salute umana (Mandalakis et al., 2010). Un altro ruolo fondamentale svolto dagli amminoacidi presenti nell'aerosol deriva dalla loro capacità di comportarsi da nuclei di condensazione per le

nubi. Misurando il grado di igroscopicità di 7 amminoacidi, è stata osservata la cristallizzazione dopo evaporazione dell'acqua in glicina, alanina, serina, glutammina e treonina mentre per arginina e asparagina non è stata osservata alcuna transizione di fase (Chan et al., 2005). Inoltre alcuni amminoacidi come la L-leucina sembrano essere in grado di favorire la formazione di microcristalli di ghiaccio (Szyrmer et al., 1997). Gli amminoacidi sono quindi in grado di influenzare il ciclo dell'acqua e il bilancio radiativo del pianeta, nonché la rimozione degli inquinanti.

Gli amminoacidi possono prendere parte a numerose reazioni in atmosfera, tuttavia queste non sono ancora del tutto chiare. Sicuramente, poiché gli amminoacidi sono presenti quasi esclusivamente in forma condensata, le reazioni in fase gassosa sono da escludere. Le trasformazioni chimiche degli amminoacidi in atmosfera possono avvenire per fotoreazione diretta o inversa. Nel primo caso vi è l'assorbimento della luce seguito dalla reazione, nel secondo caso si ha la fototrasformazione di intermedi reattivi seguiti dalla reazione con l'amminoacido. Gli amminoacidi più reattivi sono la metionina e il triptofano. Questi vengono ossidati dall'ozono in fase acquosa e hanno tempi di semivita rispettivamente di 2,1 e 2,48 ore (McGregor et al., 2001). In particolare la metionina presenta una naturale tendenza a subire processi di foto ossidazione, con la formazione di un intermedio, il metionin solfossido (MetSO) prima, e in seguito di metionin solfone (MetSO₂). L'ossidazione della metionina a MetSO è reversibile, mentre la formazione di MetSO₂ risulta un processo irreversibile grazie alla stabilità del prodotto formatosi.

Altri amminoacidi molto reattivi sono istidina e tirosina, che vengono ossidate principalmente da $\cdot\text{OH}$ e O^{2*} . In fase acquosa cisteina e tirosina risultano molto reattive soprattutto con O_3 , ed hanno un tempo di semivita rispettivamente di 6 secondi e 37 minuti. I composti che presentano intermedi reattivi, ovvero la fenilalanina e la leucina, reagiscono principalmente con il radicale ossidrilico e hanno tempi di semivita che vanno dalle 21 alle 80 ore. I composti meno reattivi sono l'acido glutammico e la glicina. Essi hanno tempi di semivita superiori ai 19 giorni e reagiscono con diversi agenti ossidanti atmosferici, tra i quali il radicale ossidrilico, l'ossigeno singoletto e l'ozono. La reattività degli amminoacidi e quindi il tempo di permanenza in atmosfera può tuttavia dipendere da numerosi fattori come il pH e la presenza di altri ossidanti (come $\cdot\text{Br}^{2-}$ e $\cdot\text{Cl}^{2-}$ in aree costiere) (McGregor et al., 2001).

La relazione tra amminoacidi presenti nell'atmosfera e sorgente di emissione risulta complessa e per questo motivo inizialmente gli studiosi erano piuttosto scettici nell'adottare questi come traccianti per identificare una sorgente di emissione. Tuttavia la variabilità nella loro reattività può essere utile per mettere in evidenza il trasporto a lunga distanza e stimare "l'età" dell'aerosol.

Recenti studi hanno dimostrato che si ha una maggiore presenza di glicina nelle frazioni più fini dell'aerosol, ovvero quelle che vengono trasportate ad una distanza maggiore, rispetto alla frazione *coarse*, prodotta in loco. Questo probabilmente è dovuto al fatto che la glicina è l'amminoacido che si degrada meno durante il trasporto (Matsumoto et al., 2005). Oltre al rapporto Gly/amminoacidi liberi (FAA), anche il rapporto tra singoli amminoacidi e i prodotti della loro ossidazione può essere un utile parametro che indica il trasporto a lunga distanza del particolato, tuttavia questa tecnica è di difficile applicazione in quanto non sono sempre identificabili il prodotto e il meccanismo di reazione (McGregor et al., 2001).

Ulteriori informazioni sull'origine degli amminoacidi rinvenuti in particolare nell'aerosol marino possono essere dedotte dalla loro separazione enantiomerica. La composizione dell'aerosol campionato in zone marine riflette infatti quella del microlayer dalla quale si origina che a sua volta dipende dalla composizione della colonna d'acqua sottostante. È noto che i batteri presentano una quantità considerevole di D-amminoacidi nella loro biomassa, in quanto alcuni di questi (alanina, acido aspartico, acido glutammico e serina) sono i componenti del peptidoglicano, il biopolimero che costituisce la parete cellulare. Un tipico rapporto D/L-alanina per la biomassa batterica è compreso tra 0,38 e 1 (McCarthy et al., 1998). Proprio per questo motivo alcuni D-amminoacidi vengono utilizzati per identificare quella che da molti viene chiamata la "firma batterica", ovvero per stabilire l'origine batterica del materiale proteico rinvenuto nell'aerosol atmosferico (McCarthy et al., 1998; Dittmar et al., 2001; Perez et al., 2003). Se gli isomeri D sono indice di provenienza batterica, così gli L-amminoacidi possono essere utilizzati come indice della presenza di fitoplancton e altri produttori primari, poiché questi contengono quasi esclusivamente gli enantiomeri L (Nelson e Cos, 2000; Jorgensen et al., 1999). La formazione di D-amminoacidi nell'acqua di mare può avvenire anche per racemizzazione abiotica degli enantiomeri L, tuttavia questo processo è troppo lento per influenzare significativamente i rapporti D/L riscontrati nell'acqua e nell'aerosol oceanico (Lee et al., 1976; Lee e Bada, 1977).

4) *Lo strumento: cromatografia liquida con detector a spettrometria di massa*

Le analisi in questo lavoro di tesi sono state effettuate utilizzando la tecnica ifenata cromatografia liquida ad alte prestazioni (HPLC) accoppiata con due diversi analizzatori di spettrometria di massa: triplo quadrupolo e orbitrap. La cromatografia liquida accoppiata alla spettrometria di massa è una tecnica molto utilizzata per l'analisi dei composti organici nell'aerosol. L'utilizzo della cromatografia liquida permette di evitare procedure preliminari di derivatizzazione del campione diminuendo il rischio di contaminazione e riducendo i tempi di analisi. Lo spettrometro di massa permette di riconoscere qualitativamente anche composti non cromatograficamente efficacemente risolti, purché non siano isobari (stesso rapporto m/z , ma composizione atomica differente). Questo rende la tecnica molto sensibile e specifica.

4.1) High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

La cromatografia è una tecnica strumentale che permette di separare due o più analiti contenuti in un campione sulla base della loro diversa interazione tra una fase mobile e una fase stazionaria all'interno di una colonna cromatografica, facendoli eluire in tempi differenti. La cromatografia liquida ad alte prestazioni utilizza una fase mobile liquida all'interno della quale gli analiti devono essere solubili. Questa tecnica permette di separare miscele di composti scarsamente volatili, anche ad alto peso molecolare ed eventualmente termolabili, riuscendo a discriminare analiti polari o apolari, ionici o neutri.

La fase stazionaria è costituita da particelle solide impaccate, di granulometria molto fine (tra 1.8 e 10 μm), alloggiata all'interno di una colonna, generalmente in acciaio o in *peek*, adatta a sopportare le alte pressioni a cui lavora lo strumento, che possono raggiungere i 400 bar nei sistemi convenzionali, ma anche i 1000 bar nei nuovi UHPLC. Al fine di evitare il bloccaggio della colonna a causa di eventuale materiale particellato presente nel campione, è usualmente utilizzata una pre-colonna o colonna di guardia, tra l'iniettore e la colonna stessa. L'eventuale pre-colonna, lunga generalmente qualche mm, deve avere la stessa fase stazionaria della colonna.

La fase mobile può essere costituita da un liquido puro o da una miscela di solventi a composizione nota, che viene fatta fluire attraverso la fase stazionaria della colonna cromatografica. Essa opera in

condizioni di alta pressione e a temperature che variano tra 20°C e 80°C. Il sistema di pompaggio provvede alla circolazione della fase mobile all'interno del circuito cromatografico. La velocità del flusso è costante e compresa tra 50 $\mu\text{L min}^{-1}$ e 5 mL min^{-1} , in base al diametro della colonna cromatografica ed al sistema di interfaccia dello spettrometro di massa. L'eluizione della fase mobile può essere isocratica, se durante la corsa cromatografica la composizione della fase mobile rimane costante, o a gradiente, in cui le quantità relative dei solventi variano nel corso dell'analisi.

Il tempo di eluizione dei diversi composti è dato 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 trasportati dalla fase mobile; mentre analiti che presentano maggiore affinità saranno maggiormente trattenuti ed usciranno in tempi più lunghi. Gli analiti così separati vengono distinti sia qualitativamente che quantitativamente da un rivelatore collegato ad un computer che acquisisce ed elabora il dato analitico, restituendo poi un cromatogramma. I rivelatori più comuni sono quelli che rispondono alle proprietà chimico-fisiche della fase mobile (indice di rifrazione) e alle proprietà del soluto (assorbanza, fluorescenza, intensità di corrente ecc). I detector UV-visibile sono quelli maggiormente utilizzati, anche se recentemente gli spettrometri di massa stanno avendo una diffusione sempre maggiore, grazie alle loro caratteristiche di alta sensibilità e selettività.

Durante il presente lavoro sono stati utilizzati due differenti strumenti per la cromatografia liquida: un UHPLC (*Ultra High Performance Liquid Chromatography*) UltiMate 3000 della ditta Thermo Scientific Dionex, interfacciato allo spettrometro di massa LTQ Orbitrap XL (Thermo Fisher Scientific), e un HPLC Agilent Serie 1100 interfacciato ad uno spettrometro di massa a triplo quadrupolo API 4000 (Biosystem/MDS SCIEX).

Il cromatografo UltiMate 3000, illustrato in figura 4.1, è costituito da un serbatoio per i solventi della fase mobile, da un sistema degaser che consente di eliminare eventuali bolle presenti nei solventi, da una pompa ternaria che opera a flussi tra 50 e 1000 $\mu\text{L min}^{-1}$ e da una pompa che lavora a nanoflussi, da un autocampionatore e infine da un vano termostato per l'alloggiamento della colonna cromatografica.

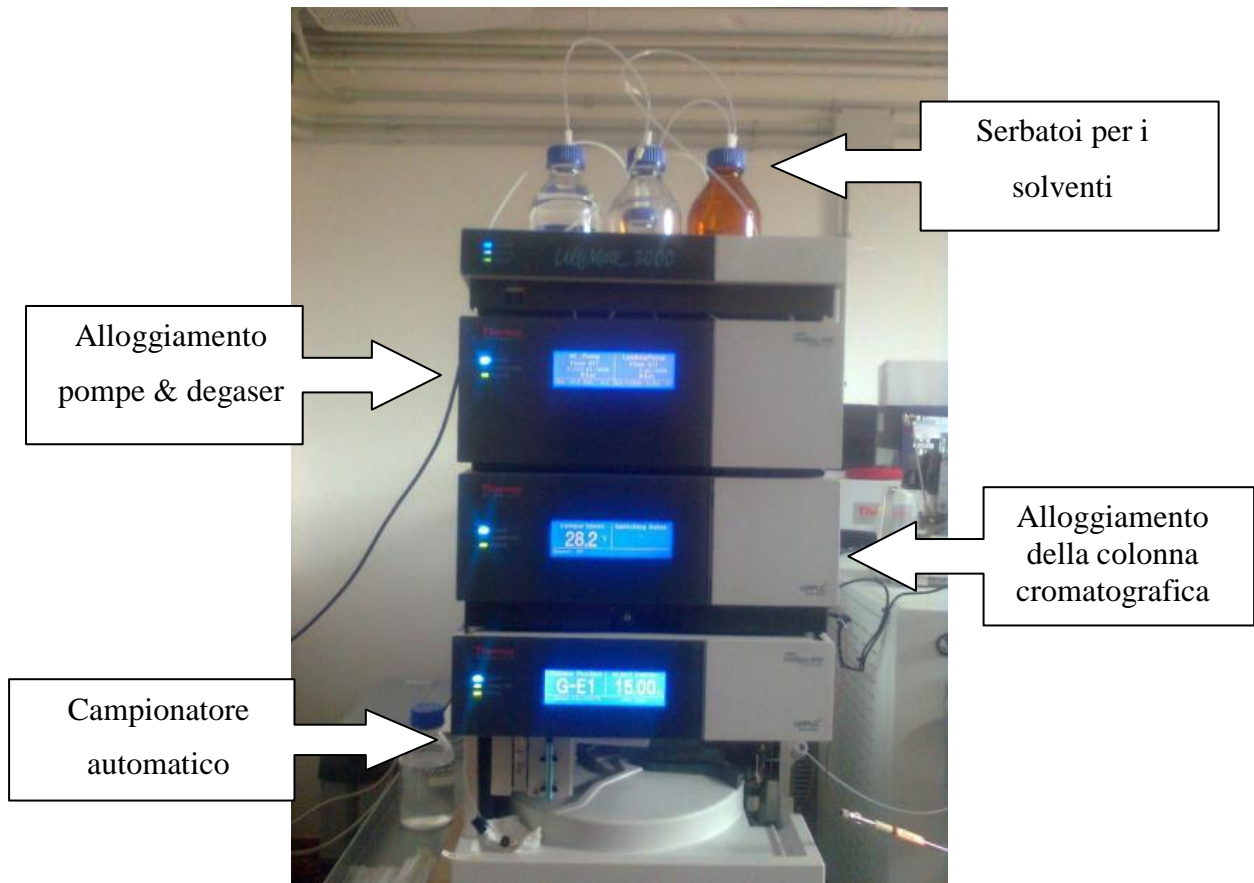


Figura 4.1: Immagine del cromatografo UHPLC UltiMate 3000.

Il cromatografo Agilent serie 1100 presenta delle componenti molto simile (degaser, vano porta colonna, pompa, autocampionatore) all'UHPLC Ultimate 3000 ma non è presente il sistema di pompaggio per nano flussi. Poichè il sistema Agilent 1100 è dotato solo di una pompa binaria può operare a pressioni fino a 400 bar.

4.2) Spettrometria di massa

La spettrometria di massa è una tecnica analitica strumentale che consente di separare ioni contenuti in miscele complesse, precedentemente creati attraverso la ionizzazione e l'eventuale successiva frammentazione degli analiti, in base al loro rapporto massa / carica (m/z). I principali componenti di una spettrometro di massa, schematizzati in figura 4.2, sono:

- la sorgente dove avviene la ionizzazione degli analiti,
- l'analizzatore che separa gli ioni in base al rapporto m/z ,

- il detector che attraverso l'emissione secondaria di elettroni genera un segnale elettrico opportunamente ampliato per produrre lo spettro di massa.

All'interno dello strumento viene garantito il vuoto attraverso un sistema di pompaggio.

Durante questo lavoro di tesi sono stati utilizzati due differenti strumenti per l'analisi degli amminoacidi, anche al fine di confrontare i due metodi strumentali sviluppati. Il primo strumento è uno spettrometro di massa ad alta risoluzione LTQ Orbitrap XL (Thermo Scientific). L'altro è uno spettrometro di massa a triplo quadrupolo Applied Biosystem API 4000 (Biosystem/MDS SCIEX, Concord, Ontario, Canada).

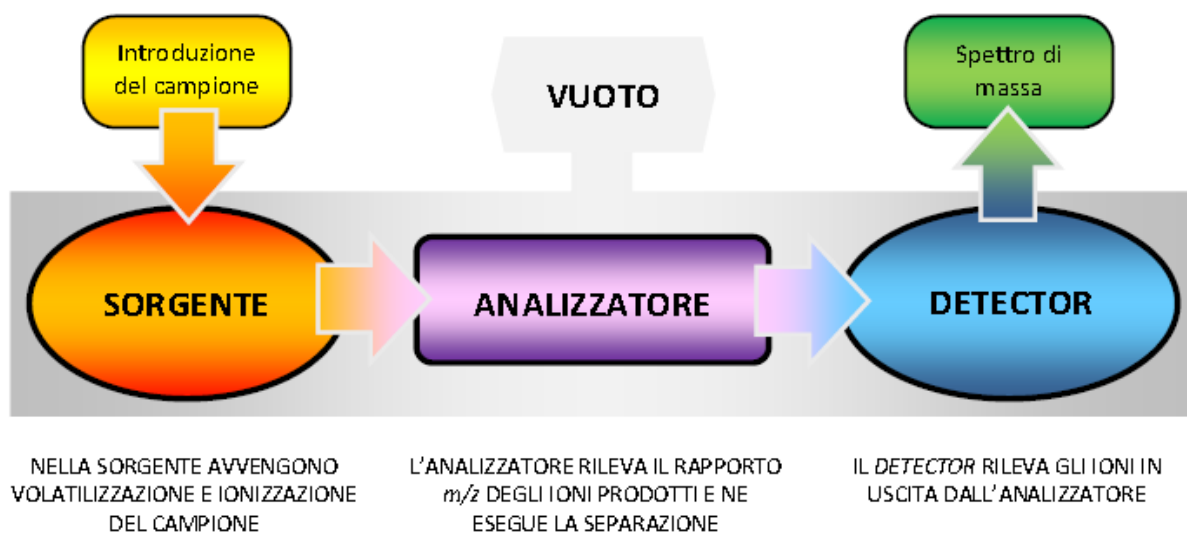


Figura 4.2: Schema generale di uno spettrometro di massa.

4.3) L'interfaccia LC/MS e le sorgenti ioniche

Per molti anni l'accoppiamento di un HPLC con uno spettrometro di massa ha rappresentato un problema a causa della natura dell'eluente utilizzato. In HPLC, infatti, si utilizza come eluente un liquido che può arrivare a flussi anche di 5 ml min^{-1} , mentre lo spettrometro di massa, e in particolare l'analizzatore, lavora a pressioni molto basse dell'ordine di 10^{-5} - 10^{-6} torr. Pertanto l'iniezione diretta dell'eluente all'interno della sorgente di ionizzazione rappresenta un punto critico dell'interfacciamento tra i due strumenti in quanto è richiesto la ionizzazione degli analiti rimuovendo il solvente senza perturbare il vuoto all'interno dello strumento. A partire dagli anni '90 il problema è stato risolto grazie alla diffusione delle cosiddette sorgenti API (*Atmospheric*

Pressure Ionisation). Le più comuni sono la sorgente ESI (*ElectroSpray Ionisation*) e APCI (*Atmospheric Pressure Chemical Ionisation*).

4.3.1) *ElectroSpray Ionisation (ESI)*

Per l'analisi degli amminoacidi in questo lavoro di tesi è stata utilizzata una sorgente ESI. Questi composti infatti sono presenti già in forma ionizzata o facilmente ionizzabile all'interno di una soluzione e la sorgente ESI risulta la più indicata per tali tipologie di analiti.

L'ESI infatti è una tecnica di ionizzazione per elettro-nebulizzazione che si applica con successo a tutti quegli analiti che sono già in forma ionica in soluzione o facilmente ionizzabili. Essa converte ioni in soluzione in ioni in fase gassosa. La soluzione contenente gli analiti già separati in colonna, viene iniettata nella sorgente attraverso un capillare metallico al quale è applicato un potenziale positivo o negativo ($\pm 4000 \div 5000$ V). Coassialmente al capillare è presente un flusso di gas con la funzione di nebulizzare la soluzione in un sottile aerosol all'uscita del capillare. Si forma così uno spray costituito da gocce cariche di diametro di qualche micron (1-60 μm), indirizzate verso l'apertura posta sul controlettrodo costituita da un capillare o da uno *skimmer* (*curtain plate*). La desolvatazione avviene nello spazio compreso tra la punta del capillare e il controlettrodo ed è favorita dalla temperatura della sorgente e dal flusso di un gas ausiliario che, applicato esternamente, ha il compito di assistere il gas coassiale nella nebulizzazione del campione e nell'evaporazione del solvente. La progressiva diminuzione del volume della goccia porta a un aumento di densità di carica superficiale. Questo processo prosegue fino al raggiungimento del "limite di *Rayleigh*", in cui la tensione superficiale della goccia, non è più in grado di sopportare repulsione coulombiana fra le cariche che causa un'esplosione "coulombiana", che porta alla disgregazione delle gocce in goccioline di dimensioni inferiori, come schematizzato in Figura 4.3. Questo meccanismo si ripete a cascata fino a quando tutto il solvente è evaporato, portando alla formazione di ioni desolvati di analita in fase gas, i quali possono avere carica unitaria o multipla.

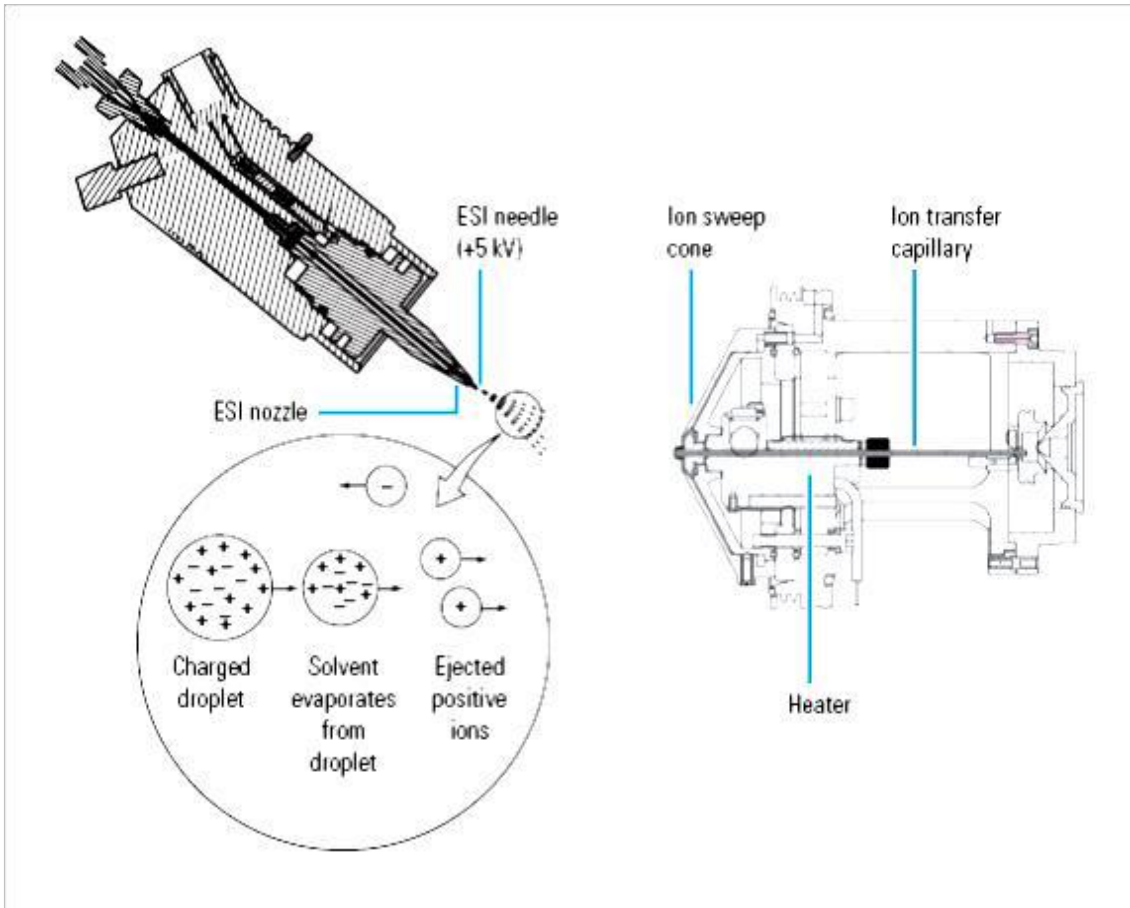


Figura 4.3: Schema del processo di ionizzazione ESI in polarit  positiva.

Le sorgenti ESI utilizzate nelle due strumentazioni di spettrometria di massa impiegate in questo lavoro di tesi hanno caratteristiche strutturali leggermente diverse che incidono in maniera diversa sull'efficienza di ionizzazione.

Il *probe* che contiene l'ago nella sorgente H-ESI dello strumento LTQ Orbitrap XL (figura 4.3)   posto a 60° rispetto all'asse del capillare di trasferimento (*ion transfer capillary*). L'*ion sweep cone* costituisce una barriera meccanica che ha la funzione di proteggere il capillare di trasferimento dalle gocce di dimensioni maggiori e dal particolato. Gli ioni passano poi attraverso l'*ion transfer capillary* nel detector di massa.

Il *probe* nella sorgente Turbo VTM, montata sullo spettrometro di massa API 4000, invece   posto a 90° rispetto al *curtain plate* e questa particolare configurazione permette agli ioni di carica opposta a quelli di interesse di venire attratti dalla carica opposta posta sulle piastre dell'orifizio di entrata dell'analizzatore e alle particelle neutre di cadere dritte nel condotto di scarico. Inoltre sono montati due getti "*turbo heaters*" che immettono in sorgente gas riscaldato, con angolazione di 45°, allo scopo di accelerare l'evaporazione del solvente.

4.4) L'analizzatore e il detector

4.4.1) Lo strumento LTQ Orbitrap XL

Oltre alla sorgente ionica, già descritta in precedenza, lo spettrometro di massa LTQ Orbitrap XL si compone di diverse parti schematizzate in figura 4.4. Si distinguono quindi la zona d'interfaccia e di focalizzazione degli ioni (1), la trappola ionica lineare (2), la *C-Trap*, un dispositivo intermedio di stoccaggio degli ioni richiesto per trasferire gli ioni in brevi impulsi (3), l'analizzatore Orbitrap il cui segnale viene elaborato con la trasformata di Fourier (4) e una cella di collisione per esperimenti di frammentazione HCD ad alta energia (5).

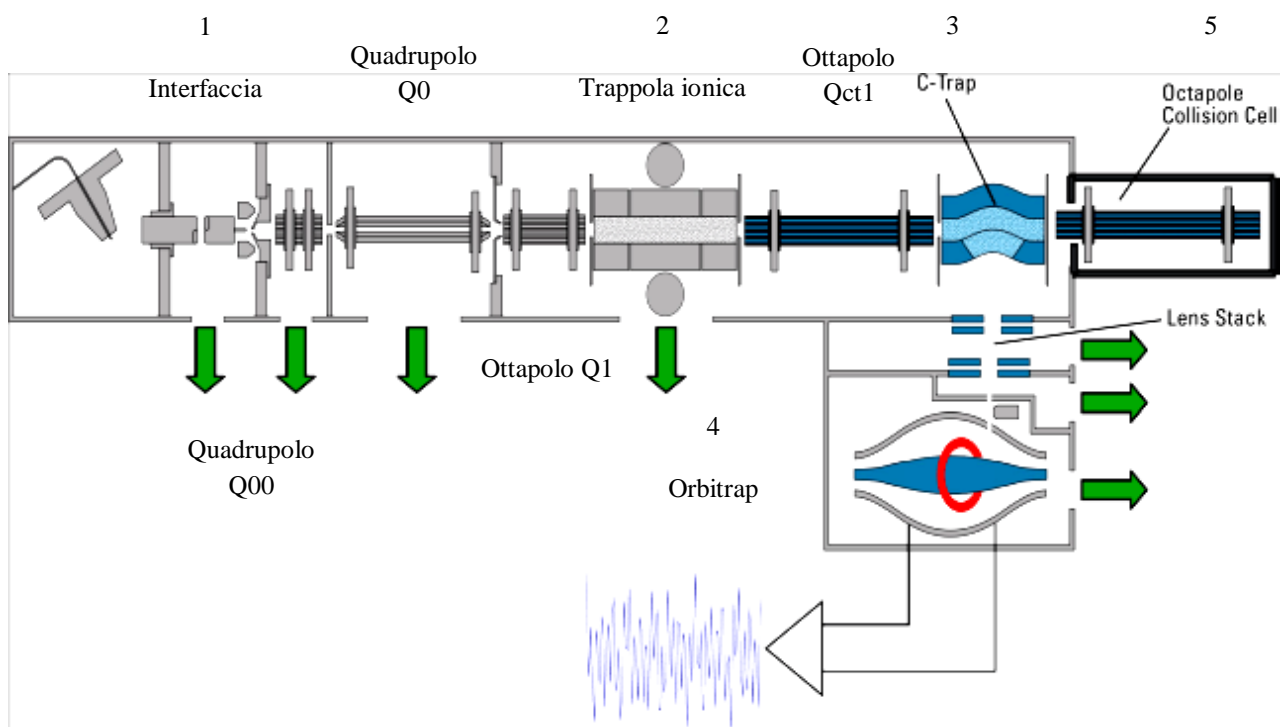


Figura 4.4: Schema dello strumento LTQ Orbitrap XL.

Come si nota nella figura 4.4, lo strumento LTQ Orbitrap XL è definito come uno spettrometro di massa “ibrido”, in quanto sono presenti due diversi analizzatore di massa.

Lo strumento LTQ Orbitrap XL può lavorare in modalità *full scan* utilizzando la trappola ionica a bassa risoluzione oppure la trappola orbitalica ad alta risoluzione. Studi di frammentazione possono essere condotti con la trappola ionica oppure con la cella di collisione HCD mentre gli esperimenti di MS^n possono essere realizzati unicamente impiegando la trappola ionica.

Gli ioni frammento ottenuti dalle frammentazioni condotte nella trappola ionica possono essere rilevati mediante gli elettromoltiplicatori della trappola ionica oppure inviati all'orbitrap e rilevati in alta risoluzione; mentre gli ioni frammento ottenuti dalla cella di collisione possono essere rivelati solo dall'orbitrap in alta risoluzione.

In questo lavoro di tesi è stata utilizzata unicamente la modalità di scansione *full scan* con la trappola orbitalica ad alta risoluzione.

L'ottica ionica nella strumentazione LTQ Orbitrap XL

L'ottica ionica è costituita da tutti gli elementi che permettono agli ioni di passare dalla sorgente alla trappola ionica. I costituenti principali sono: l'*ion sweep cone*, lo *spray cone* (posto immediatamente dietro l'*ion sweep cone*), sul quale è direttamente connesso l'*ion transfer capillary* (capillare metallico riscaldato) che costituisce il mezzo attraverso il quale gli ioni attratti dal *capillary voltage* ad esso applicato e aspirati da una differenza di pressione, rispetto alla camera di ionizzazione, entrano nella prima regione a pressione ridotta (2 Torr) dello spettrometro di massa. All'interfaccia dello strumento è applicato un flusso di gas aggiuntivo (*Sweep gas*) in uscita dal retro dello *sweep cone* che aiuta nella declusterizzazione degli ioni e nella riduzione degli addotti. All'uscita del capillare sono poste le *tube lens* che focalizzano gli ioni verso l'apertura dello *skimmer*. Il parametro *tube lens* riveste una grande importanza nell'intensità con cui sarà rivelata una specie ionica e dipende dal range di m/z che si vuole investigare. Valori bassi di *tube lens* sono ottimali per range di m/z bassi e viceversa tale parametro deve essere incrementato se si vogliono analizzare range m/z più elevati.

A questo punto gli ioni prodotti dalla sorgente (ioni precursori) passano ad un sistema costituito da 2 quadrupoli, Q00 e Q0, e un ottapolo Q1 in serie che ha la funzione di focalizzarli, accelerarli e convogliarli lungo zone dello strumento a depressione crescente fino alla trappola ionica lineare (Thermo Fisher Scientific™, 2008).

La trappola ionica

La trappola ionica è un analizzatore di massa che può lavorare indipendentemente. Essa infatti può immagazzinare, isolare e frammentare gli ioni, rilevandoli mediante i suoi detector CEM (*channel electron multiplier*). il principio di funzionamento di una trappola ionica consiste nel variare i voltaggi di corrente continua e radiofrequenza al fine di espellere sequenzialmente gli ioni in base al loro rapporto m/z . In alternativa, variando solo il voltaggio di radiofrequenza, l'analizzatore può

prima espellere tutti gli ioni, eccetto alcuni ioni precursori e poi sfruttando le collisioni con le molecole d'elio o N₂ (buffer gas) in essa contenuto, frammentarle ottenendo così gli ioni prodotto, espulsi poi come visto prima, per ottenere uno spettro di massa. Con la trappola ionica lineare è possibile effettuare analisi di massa in più fasi MSⁿ (con n che va da 1 a 10 e rappresenta il numero di fasi di selezione di massa).

L'analizzatore Orbitrap

Il cuore dello strumento è l'analizzatore di massa orbitrap. Esso è costituito da un elettrodo interno a forma di fuso e da un elettrodo esterno a forma di campana (fig. 4.5). Gli ioni sono mantenuti all'interno della trappola mediante campi elettrici.

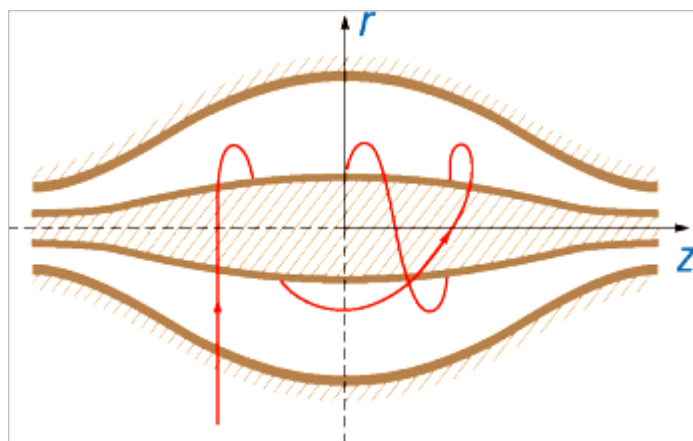


Figura 4.5: Rappresentazione di traiettoria ionica stabile nell'analizzatore orbitrap.

Ioni con traiettoria stabile ruotano attorno all'elettrodo centrale con oscillazioni armoniche lungo il suo asse. La frequenza ω di queste è proporzionale al rapporto massa su carica attraverso la costante strumentale k.

$$\omega = \sqrt{\frac{K}{m/z}} \quad \text{equazione 4.1}$$

Le due metà dell'elettrodo esterno rilevano la corrente immagine prodotta dall'oscillazione degli ioni. Poi mediante una *Fast Fourier Transformation* (FFT, Trasformata di Fourier) della corrente immagine si ottengono le frequenze di oscillazione assiale e quindi, mediante l'equazione 4.1, il rapporto massa su carica degli ioni.

Prima di raggiungere l'orbitrap gli elettroni passano attraverso un ottapolo RF (Oct1) sotto vuoto e raggiungono una trappola lineare curva contenente gas chiamata *C-Trap*. Il gas ha la funzione di dissipare l'energia cinetica degli ioni "raffreddandoli" e focalizzarli lungo l'asse curvo della trappola. A questo punto i voltaggi applicati alle estremità della *C-Trap* sono aumentati al fine di "schiacciare" gli ioni in uno stretto fascio lungo il suo asse. Successivamente il potenziale di radiofrequenza applicato alle barre curve della *C-Trap* è spento e agli elettrodi sono applicati dei voltaggi pulsati che estraggono gli ioni spingendoli all'entrata dall'orbitrap. Questo sistema fa sì che gli ioni entrino nell'orbitrap sotto forma di pacchetti di ioni lunghi solo qualche millimetro.

Una volta entrati nell'orbitrap i pacchetti di ioni iniziano a compiere un'oscillazione assiale coerente. Inoltre essi, per effetto dell'aumento del potenziale applicato all'elettrodo centrale, subiscono una contrazione del raggio della nube ionica, come mostrato in figura 4.6.

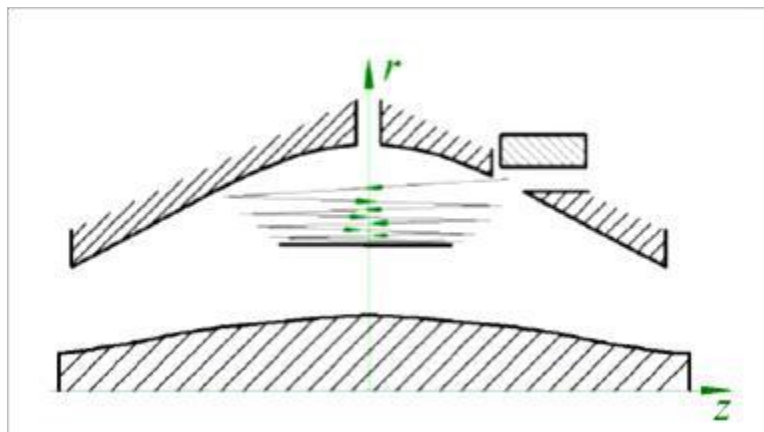


Figura 4.6: Principio di "schiacciamento" degli ioni all'interno dell'Orbitrap che avviene con l'aumento della forza del campo elettrico applicato.

All'interno dell'orbitrap, una traiettoria stabile è composta da oscillazione lungo l'asse z , rotazioni attorno all'elettrodo centrale e vibrazioni lungo l'asse radiale. Tuttavia di questi parametri solo la frequenza delle oscillazioni lungo l'asse z è totalmente indipendente dai parametri ionici iniziali (energia e raggio iniziale). Pertanto gli ioni rimangono in fase lungo l'asse z per molte oscillazioni, mentre nella direzione radiale essi defasano molto più velocemente (nell'ordine di 50-100 oscillazioni), andando a formare un anello attorno all'elettrodo centrale con gli ioni uniformemente distribuiti lungo la sua circonferenza (fig. 4.7). Nel frattempo le oscillazioni lungo l'asse centrale continuano e quindi lo spessore dell'anello di ioni rimarrà piccolo rispetto all'ampiezza dell'oscillazione assiale.

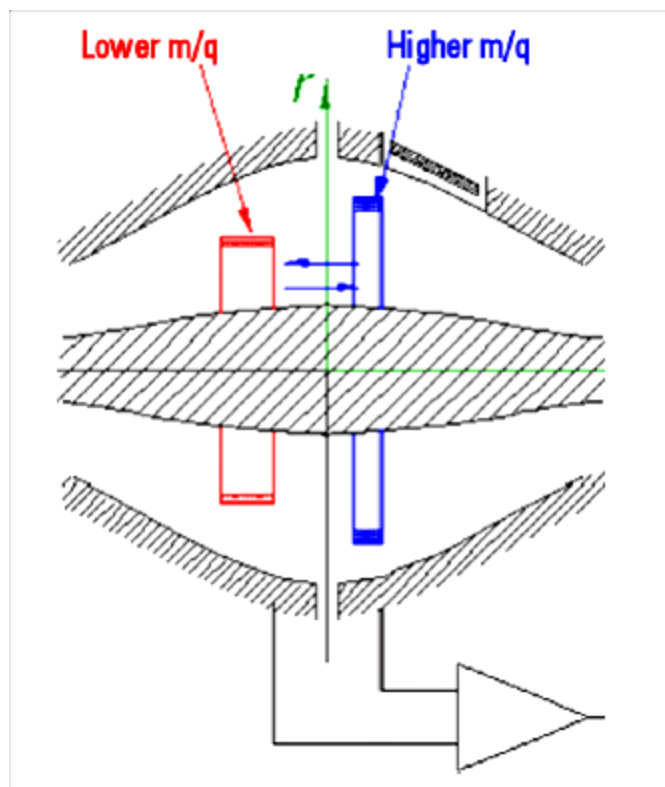


Figura 4.7: Forma approssimata dei pacchetti ionici di diverso m/z in seguito alla stabilizzazione dei potenziali.

L'elettrodo esterno è suddiviso in due parti a partire da $z=0$ che corrisponde al centro dell'elettrodo. Muovendosi da una metà all'altra dell'elettrodo esterno, tale anello di ioni indurrà una corrente immagine su ciascuna metà dell'elettrodo esterno, tali correnti opposte saranno amplificate in modo differenziale, si otterrà un segnale che sarà sottoposto a conversione analogico – digitale e poi processato mediante l'algoritmo della trasformata di Fourier veloce (Thermo Fisher Scientific™, 2008).

I punti di forza dello strumento LTQ Orbitrap XL, che fanno sì che esso rappresenti un passo in avanti rispetto ai tradizionali spettrometri di massa, sono rappresentati dall'alta risoluzione e dall'elevata accuratezza di massa.

La risoluzione è la capacità di uno strumento di differenziare le masse, la cui espressione è riportata nell'equazione 4.2.

$$R = \frac{m}{\Delta m} \quad \text{Equazione 4.2}$$

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 XL può lavorare a diversi valori di risoluzione (7.500, 15.000, 30.000, 60.000) fino ad un massimo di 100.000 ad un valore m/z di 400 (Perry H., R., 2008).

L'accuratezza di massa invece è la capacità di uno strumento di separare i picchi adiacenti e dipende dalla risoluzione (Perry, 2008). La stima dell'accuratezza di massa riportata nell'equazione 4.3 viene espressa come il valore dell'errore sulla massa misurata, in parti per milione (ppm).

$$e_m = \frac{m_a - m_t}{m_t} \quad \text{Equazione 4.3}$$

dove m_a corrisponde alla massa accurata misurata strumentalmente mentre m_t equivale alla 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),

4.4.2) Lo spettrometro di massa API 4000

Lo spettrometro di massa Applied Biosystem API 4000 (Biosystem/MDS SCIEX, Concord, Ontario, Canada) presenta un analizzatore a triplo quadrupolo (QQQ) dove un primo analizzatore quadrupolare (Q1) e un terzo quadrupolo analizzatore (Q3) lavorano come filtri di massa quadrupolari a risoluzione unitaria mentre il secondo quadrupolo (Q2) lavora come cella di collisione (figura 4.8).

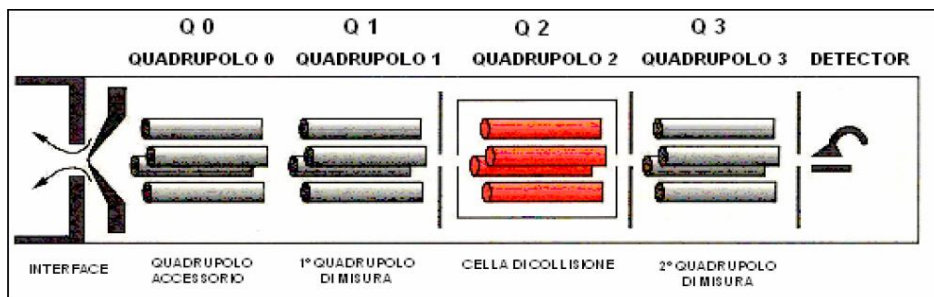


Figura 4.8: Schema a blocchi di uno spettrometro di massa con analizzatore a triplo quadrupolo.

Prima di Q1 è posto un ulteriore quadrupolo, chiamato Q0, con l'unica funzione di focalizzare gli ioni entranti in Q1. All'interno della cella di collisione viene pompato un gas inerte (azoto o argon) a pressione relativamente elevata (pressione massima di 8×10^{-3} torr). Gli ioni vengono a trovarsi in una regione con un'alta concentrazione di molecole con le quali collidono e vengono così frammentati. Questo processo prende il nome di dissociazione attivata da collisione (CAD – *collisionally activated dissociation*). In questo modo vengono generati i cosiddetti ioni prodotto che vengono poi selezionati nel Q3. La cella di collisione può essere attivata o meno a seconda della modalità di utilizzo dello strumento scelta.

Le modalità di utilizzo di un triplo quadrupolo sono infatti molteplici, ma in questo lavoro di tesi è stata impiegata solo la modalità *multiple reaction monitoring*, in quanto risulta più selettiva e sensibile a scopi quantitativi.

In tale modalità di indagine si ha selezione degli ioni precursori nel primo quadrupolo, mentre nel terzo avviene la selezione degli ioni prodotto generati dalla frammentazione dello ione precursore avvenuta in Q2.

La spettrometria di massa *tandem* trova importanti applicazioni di tipo qualitativo nello studio strutturale delle molecole, ma vede utilissima applicazione soprattutto dal punto di vista quantitativo. L'utilità delle tecniche MS/MS in analisi quantitativa rispetto al metodo SIM è correlata al maggior effetto di riduzione del rumore di fondo rispetto a quanto sia ridotto il segnale (nel caso in cui il rumore di fondo sia di natura chimica).

Il rivelatore dello spettrometro di massa a triplo quadrupolo è costituito da un elettromoltiplicatore CEM (*channel electron multiplier*), composto da un dispositivo a dinodo continuo. Questo tipo di rivelatore ha una struttura cilindrica curva e opera secondo il processo fisico dell'emissione secondaria di elettroni. Quando uno ione collide contro la superficie del CEM, si ha il rilascio di numerosi elettroni, i cui ripetuti urti con le pareti interne del cono producono l'emissione di altri elettroni. Gli elettroni così prodotti sono accelerati verso l'uscita del canale, dove il segnale elettrico

è raccolto e convertito in un segnale digitale che fornisce il conteggio degli ioni in relazione alla loro massa.

5) *Teoria della messa a punto di un metodo analitico*

La messa a punto di un metodo analitico è un processo decisionale che si svolge in diversi passaggi. Sono molti infatti i fattori che influenzano le prestazioni del metodo, sia a livello procedurale, sia a livello strumentale. È molto importante prima di iniziare avere ben chiari quali sono gli obiettivi dell'analisi e la tecnica strumentale da utilizzare. Poi, attraverso la raccolta di informazioni e dati pregressi, occorre valutare la procedura pre-analitica, le condizioni sperimentali più idonee e se possibile ricercare qualche informazione sulle concentrazioni tipiche dell'analita nell'ambiente che si intende indagare.

Di seguito verranno descritte le fasi previste per la messa a punto di un metodo mediante HPLC-MS per l'indagine di composti in matrici ambientali. Una prima fase prevede la messa a punto dei parametri relativi all'analizzatore dello spettrometro di massa, dopodiché si passa alla definizione della miglior separazione cromatografica degli analiti, infine si esegue l'ottimizzazione dei parametri della sorgente ionica. Una volta messo a punto, il metodo è pronto per essere utilizzato per la validazione della procedura preanalitica. Solo a questo punto sarà possibile procedere con l'analisi dei campioni reali.

5.1) Messa a punto e ottimizzazione del metodo strumentale

5.1.1) Messa a punto dello spettrometro di massa

Obiettivo di questa fase è fare in modo che lo spettrometro di massa riveli gli analiti in uscita dal cromatografo. Per ottenere ciò si iniettano singolarmente per infusione diretta nella sorgente le soluzioni standard degli analiti che si intendono utilizzare ad una concentrazione di $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ e ad un flusso di $10 \mu\text{L min}^{-1}$.

LTQ Orbitrap XL

La messa a punto di un metodo in spettrometria di massa che utilizzi la strumentazione LTQ Orbitrap XL prevede dapprima la valutazione della polarità di ionizzazione (positiva o negativa) più adatta in base alla maggiore intensità del segnale ottenuto.

Successivamente per ciascun parametro strumentale relativo all'ottica ionica verrà individuato il valore che rende massima l'intensità del segnale.

I parametri che vengono valutati e ottimizzati sono:

- *Capillary voltage*: potenziale del capillare di trasferimento degli ioni;
- *Capillary temperature*: temperatura 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*;

Nel presente lavoro di tesi è stata utilizzata la modalità *full scan* in trappola orbitalica, pertanto è stato necessario impostare solo il range di massa da analizzare e la risoluzione con il quale si vuol far operare l'orbitrap che dovrà opportunamente essere scelta anche in base alla cromatografia sviluppata. Una volta sviluppata la parte cromatografica dovranno anche essere individuate le *lock mass* che permetteranno una calibrazione in continuo dell'analisi per ottenere accuratezze di massa sempre inferiori ai 5 ppm.

Triplo quadrupolo API 4000.

La messa a punto di un metodo in spettrometria di massa nel quale si utilizzi il triplo quadrupolo come analizzatore di massa prevede come prima fase la selezione della modalità di ionizzazione (positiva o negativa). Successivamente viene effettuata una prima scansione in modalità *full scan* con il Q1 al fine di individuare i principali ioni molecolari e pseudomolecolari (ioni precursori), che si formano in seguito alla ionizzazione dell'analita per protonazione, deprotonazione o alla formazione di addotti carichi positivamente o negativamente. In questa prima fase vengono anche ottimizzati quei parametri strumentali che controllano i potenziali relativi agli ioni precursori. In particolare vengono ottimizzati i valori di *declustering potential* (DP), che controlla il voltaggio all'orifizio e la "declusterizzazione" degli ioni tra *skimmer* e orifizio, e di *entrance potential* (EP), parametro che guida e focalizza gli ioni in Q0.

Una volta individuato lo ione precursore si procede alla sua frammentazione in cella di collisione. Mediante la modalità *product ion scan* si individuano i frammenti più intensi e significativi che saranno poi utilizzati come ioni prodotti per l'impostazione del metodo MRM.

Per ciascun ione prodotto sono quindi ottimizzati i valori di *collision energy* (CE), parametro che controlla l'energia di collisione fornita allo ione precursore all'ingresso della cella di collisione, e i valori di *cell exit potential* (CXP), ovvero il potenziale applicato all'uscita della cella di collisione, da cui dipendono focalizzazione e accelerazione degli ioni prodotto.

Tale ottimizzazione consiste nell'individuazione dei valori di voltaggio che rendono massima l'intensità del segnale per ciascun ione precursore o ione prodotto.

5.1.2) Messa a punto del metodo cromatografico

La costruzione del metodo cromatografico si effettua attraverso l'iniezione di soluzioni standard degli analiti da separare. Le fasi del lavoro prevedono inizialmente la scelta della fase stazionaria, delle dimensioni della colonna cromatografica da utilizzare e delle condizioni generali della corsa cromatografica (tipo di solventi, velocità di flusso ecc.). Si procede poi con l'ottimizzazione della composizione della fase mobile, valutando se effettuare un'eluizione isocratica o a gradiente. Lo scopo di questa fase è quello di ottenere una buona separazione dei picchi in un tempo di analisi accettabile. I parametri utilizzati per confrontare le varie eluizioni sono la risoluzione e l'efficienza. Il primo termine indica la separazione dei picchi, il secondo l'ampiezza degli stessi. L'eluizione ideale restituisce un cromatogramma caratterizzato da picchi ben separati, stretti e ad intensità elevata.

5.1.3) Ottimizzazione dei parametri della sorgente

Una volta individuata la corsa cromatografica, l'ultimo componente strumentale da ottimizzare è la sorgente ionica, che viene ottimizzata in maniera diversa a seconda dello strumento utilizzato.

L'ottimizzazione della sorgente H-ESI dello strumento LTQ Orbitrap XL prevede l'infusione post colonna di una soluzione standard dell'analita da ottimizzare mentre l'HPLC lavora senza colonna alla composizione della fase mobile alla quale eluiscono gli analiti. Vengono quindi selezionati i valori che danno la maggiore intensità del segnale relativamente ai parametri di temperatura, di flussi dei gas (*Sheat gas*, *Auxiliary gas* e *Sweep gas*) e IS (*ion spray voltage*, potenziale imposto all'ago).

I parametri relativi alla sorgente Turbo V™ nello spettrometro API 4000 vengono invece ottimizzati mediante la tecnica *flow injection analysis* (FIA), dove il sistema HPLC viene accoppiato allo spettrometro di massa senza la colonna cromatografica utilizzando la composizione della fase mobile alla quale eluiscono gli analiti oggetto dell'ottimizzazione.

È necessario quindi determinare i valori opportuni di parametri quali temperatura, flussi di gas (Gas 1 e Gas 2) e IS (*ion spray voltage*, potenziale imposto all'ago della sorgente ESI).

5.2) Fase preanalitica

La fase preanalitica si compone di tutti quei passaggi atti a rendere il campione idoneo ad essere iniettato nello strumento. Essa prevede una prima fase di estrazione, una successiva concentrazione e infine la purificazione dell'estratto. L'estrazione è una fase molto importante in quanto permette di trasferire l'analita dalla matrice ambientale ad una matrice più idonea ad essere analizzata. Esistono diversi tipi di estrazione in base alle matrici coinvolte (solido/liquido, liquido/liquido), le quali possono essere effettuate mediante *Soxhlet*, ultrasuoni, microonde o a temperature e pressioni elevate. La concentrazione permette di aumentare la quantità di analiti rispetto alla quantità di matrice. Infine la purificazione ha lo scopo di eliminare eventuali sostanze interferenti e viene solitamente eseguita mediante cromatografia su colonna o filtrazione. Nel presente lavoro di tesi la procedura pre-analitica prevede le sole fasi di estrazione e filtrazione, mentre non è prevista la fase di purificazione per evitare la contaminazione del campione.

5.3) Validazione del metodo

La validazione è definita come “la conferma attraverso esame e l'apporto di evidenza oggettiva che i requisiti particolari per l'utilizzazione prevista sono soddisfatti” (ISO/IEC 17025, 2005). Ha lo scopo di dimostrare che la metodologia messa a punto è adatta ad essere applicata per lo scopo richiesto. I parametri che permettono di definire la validità del metodo sono:

- **Selettività del metodo:** la capacità di identificare e quantificare l'analita senza ambiguità anche in presenza di interferenti. Questa proprietà si riferisce a un metodo che produce più risposte (metodo separativo).
- **Limite di rilevabilità strumentale (LOD - limit of detection):** viene definito come la concentrazione alla quale il rapporto segnale/rumore strumentale è uguale a 3. Tale valore viene ottenuto utilizzando una soluzione standard la cui concentrazione è prossima al limite di rilevabilità.

- **Limite di quantificazione strumentale (LOQ - limit of quantification):** viene definito come la concentrazione alla quale il rapporto segnale/rumore strumentale è uguale a 10.
- **Limite di rilevabilità procedurale (MDL – method detection limit):** la più bassa concentrazione di analita che può essere rilevata nelle condizioni sperimentali del metodo, ma non necessariamente determinata in modo quantitativo. Il MDL può essere definito, con riferimento ad un livello di fiducia del 95%, come la concentrazione di analita che produce un segnale pari al segnale generato dal bianco S_B , sommato il triplo dello scarto quadratico medio determinato sul segnale del bianco. (equazione 5.1)

$$\text{MDL} = S_B + 3 \sigma_B \quad \text{Equazione 5.1}$$

dove σ_B è la deviazione standard del valore del bianco.

Nel caso in cui il valore del bianco venga sottratto al valore del campione quantificato, il MDL viene definito come $3 \sigma_B$

- **Limite di quantificazione procedurale (MQL – method quantification limit):** la più bassa concentrazione analitica che può essere determinata quantitativamente, con accettabile precisione ed esattezza, nelle condizioni sperimentali del metodo. Il MQL può essere definito come la concentrazione di analita che produce un segnale pari a quello prodotto dal bianco S_B , sommato 10 volte lo scarto quadratico medio del segnale del bianco (equazione 5.2):

$$\text{MQL} = S_B + 10 \sigma_B \quad \text{Equazione 5.2}$$

Sottraendo il segnale del bianco al campione il LOQ diventa uguale a $10 \sigma_B$. Sotto a tale limite i valori di esattezza e di precisione associati al risultato quantitativo della prova non sono accettabili.

- **Intervallo di linearità:** la linearità di un metodo analitico è la sua abilità di dare risultati direttamente proporzionali alla concentrazione degli analiti nei campioni, all'interno di un determinato campo di validità. La proporzionalità, ottenibile anche attraverso trasformazioni matematiche, è verificata attraverso il calcolo del coefficiente di correlazione della curva di calibrazione, la quale può essere eseguita con aggiunte standard alla matrice da analizzare oppure per mezzo di soluzioni standard (contenenti solo solvente, analita e analita marcato). Generalmente sono accettati coefficienti di correlazione pari almeno a 0.99.

- **Accuratezza della misura:** grado di concordanza tra il valore medio della concentrazione di analita e un valore di riferimento accettato (errore della misura). I dati di accuratezza sono accettabili solo quando si trovano entro il 10% dal valore bersaglio (2002/657/CE)
- **Precisione della misura:** esprime la concordanza tra risultati di prove indipendenti e viene definita attraverso tre parametri:
 - *Ripetibilità* : concordanza tra risultati di prova indipendenti, ottenuti con lo stesso metodo su materiali identici, all'interno dello stesso laboratorio, dallo stesso operatore, usando la stessa apparecchiatura e in intervalli di tempo brevi (stessa serie analitica).
 - *Precisione intermedia:* concordanza tra risultati di prova indipendenti, ottenuti con lo stesso metodo su materiali identici, all'interno dello stesso laboratorio, dallo stesso operatore, usando la stessa apparecchiatura e in intervalli di tempo lunghi (diverse serie analitiche, con eventuale cambiamento del lotto dei reattivi e dei materiali di consumo).
 - *Riproducibilità:* concordanza tra risultati di prova, ottenuti con lo stesso metodo su materiali identici, all'interno di laboratori diversi, da operatori diversi, usando apparecchiature diverse e in intervalli di tempo diversi.
- **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. Questo parametro indica 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.

Per lo svolgimento di prove di validazione si utilizza di norma un materiale certificato relativo alla matrice campionata. Tuttavia per il particolato atmosferico, a causa della variabilità della sua composizione e delle concentrazioni di sostanze presenti, non esistono in commercio dei materiali certificati per la determinazione di amminoacidi. Per ovviare a questo si utilizzano gli stessi filtri utilizzati per il campionamento, pretrattati allo stesso modo, ai quali vengono aggiunte quantità note di soluzioni standard di D e L-amminoacidi.

5.4) Quantificazione

La quantificazione permette di rapportare il segnale dello strumento alla quantità o alla concentrazione di analita presente nel campione. Esistono diversi metodi di quantificazione: la quantificazione attraverso la retta di calibrazione esterna, il metodo delle aggiunte e il metodo dello standard interno. Il metodo scelto per le analisi in questo lavoro è quello dello standard interno. Il metodo si basa sul confronto tra l'area del picco cromatografico dell'analita considerato con quella del picco dello standard interno, secondo la relazione descritta dall'equazione 5.3:

$$A_n : C_n = A_m : C_m \quad \text{Equazione 5.3}$$

con:

A_n = area del picco cromatografico dell'analita;

C_n = concentrazione dell'analita;

A_m = area del picco cromatografico dello standard interno;

C_m = concentrazione dello standard interno.

Lo standard interno è una sostanza che viene aggiunta in quantità nota al campione all'inizio della procedura di preparazione e ne segue tutte le fasi permettendo di quantificare senza tener conto della resa di estrazione. Si tratta di un composto stabile nel tempo, con struttura oppure comportamento chimico-fisico o cromatografico simile a quelli dell'analita da determinare. Se possibile è preferibile utilizzare come standard interno lo stesso composto oggetto dell'analisi nella sua forma marcata isotopicamente. In questo modo si ha la certezza che le due sostanze avranno lo stesso comportamento cromatografico. Un altro vantaggio dato dall'utilizzo dello standard interno è l'eliminazione dell'effetto matrice: un effetto di interferenza, positiva o negativa, dovuta alla dipendenza dell'intensità del segnale dell'analita dalla particolare composizione chimica della matrice in cui si trova.

La quantificazione con lo standard interno utilizza una curva di calibrazione nella quale il rapporto tra la concentrazione dell'analita e dello standard interno viene messo in relazione con il rapporto tra le aree dei loro picchi. La curva viene costruita attraverso l'iniezione di soluzioni standard contenenti tutti gli analiti a concentrazioni crescenti e gli standard marcati a concentrazione costante.

La curva di calibrazione andrebbe iniettata prima e dopo ogni set di analisi. Poiché questo comporta un spreco di denaro e allunga di molto i tempi delle analisi, è possibile utilizzare il cosiddetto “campione controllo qualità” nel quale vengono aggiunti tutti gli analiti e gli standard interni a concentrazione nota. Questo campione viene iniettato prima, durante e dopo ogni set di analisi e attraverso di esso si calcola il fattore di risposta strumentale (FR) (equazione 5.4).

$$FR = \frac{A_i C_m}{A_m C_i} \quad \text{Equazione 5.4}$$

in cui C_i rappresenta la concentrazione (nota) dell'analita e A_i l'area dell'analita, mentre C_m e A_m rappresentano rispettivamente la concentrazione e l'area dello standard interno.

Una volta calcolato il fattore di risposta, la concentrazione dell'analita nei campioni reali, C_n , si ricava con l'equazione 5.5:

$$C_n = \frac{A_n C_m}{A_m FR} \quad \text{Equazione 5.5}$$

Il principale vantaggio derivante dall'utilizzo dello standard interno è il controllo sulla stabilità del segnale strumentale.

6) Il campionamento

6.1) L'area di studio: il continente antartico

L'area oggetto di studio in questo lavoro di tesi è il continente antartico: il continente più meridionale della Terra, regione di grande interesse per gli studi di tipo ambientale, in quanto sito incontaminato per eccellenza, e archivio paleoclimatico del pianeta. Situato nell'emisfero australe, a sud del Circolo Polare Antartico e quasi centrato sul Polo Sud geografico, è circondato dall'Oceano Antartico. Con una superficie complessiva di circa 14 milioni di km² è il quarto continente in ordine di grandezza, dopo Asia, Africa e America. Il 98% del suo territorio è completamente coperto da ghiacci con uno spessore medio di 1600 m. Inoltre esso presenta la più elevata media altimetrica sul livello del mare di tutti i continenti.



Figura 6.1: Cartina geografica dell'Antartide.

Il continente antartico è il continente più freddo, più ventoso e più arido del pianeta, tanto che viene classificato come un deserto. Nonostante ciò sul continente è localizzato l'80% delle riserve d'acqua dolce mondiali, che si trovano sotto forma di ghiaccio (Campbell e Claridge, 1987).

Il clima di una località è la somma di fattori geoastronomici (latitudine, longitudine, altezza sul livello del mare) e di fattori locali (caratteristiche geomorfologiche, presenza di corpi idrici, copertura vegetale del suolo, etc.). Il clima dell'Antartide conferma questa affermazione; sul continente i raggi del Sole arrivano con una forte inclinazione rispetto alla verticale ed hanno, quindi, minor potere calorico. Inoltre, considerando che il continente presenta rilievi montuosi che superano i 4.000 m e che è coperto permanentemente da una spessa coltre di ghiaccio il quale riflette la radiazione incidente, si può concludere che l'Antartide è la regione meno riscaldata dai raggi del Sole. Questi fattori associati alla lunga notte polare, durante il quale il continente non riceve la radiazione solare, fanno sì che quello antartico sia il clima più freddo del pianeta. Durante l'estate australe si registrano temperature dell'aria in superficie molto basse che variano dagli 0° C della fascia costiera ai -32° C delle zone più interne e più elevate del continente. Durante l'inverno l'intervallo si allarga fra i -20° C delle zone costiere e i -70° C dell'interno. In Antartide e più precisamente nei pressi della stazione russa di Vostok, è stata misurata nel luglio 1983 la temperatura più bassa della Terra: -89.6 °C.

A causa dei bassissimi valori della temperatura, l'atmosfera antartica è sostanzialmente secca. Il valore medio delle precipitazioni si aggira intorno a 130 mm annui, con il massimo di oltre 500 mm annui registrato nella Penisola Antartica ed il minimo di 50 mm annui all'interno del continente.

Un'altra caratteristica importante del clima antartico sono i venti. Al centro del continente, l'atmosfera è stratificata e stabile ed i venti sono, in genere, deboli con velocità attorno ai 15 km/h durante tutto l'anno. L'aria fredda e più densa di quella delle zone circostanti tende a scendere dall'interno del continente verso la costa, dando origine ai ben noti venti catabatici. Questi venti raggiungono velocità molto elevate, anche superiori a 300 km/h, ai piedi dei dislivelli che caratterizzano la regione tra il plateau centrale e le regioni costiere (Bargagli, 2008). In figura 6.2 viene mostrata la circolazione superficiale dei venti antartici dominanti.

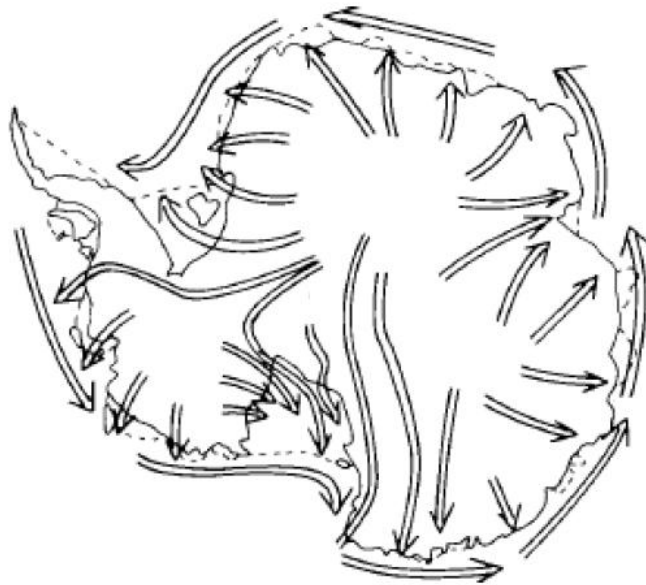


Figura 6.2: Direzione dei venti dominanti sulla superficie del continente antartico (Campbell e Claridge, 1987).

L'Antartide, assieme ai suoi ghiacci, ha un importante compito nell'equilibrio climatico-ambientale del pianeta, visto che ogni variazione della calotta si ripercuote sull'equilibrio termico planetario, sulla circolazione oceanica e atmosferica nonché sul livello del mare.

6.1.1) L'aerosol antartico

L'Antartide viene considerato una zona remota a causa della segregazione geografica e delle ridotte emissioni antropiche. Esso infatti dista circa 1.000 km dall'America del Sud, circa 3.800 km dall'Africa e circa 2.500 km da Australia e Nuova Zelanda. Inoltre il continente antartico non è abitato se si escludono le basi scientifiche di ricerca. Queste caratteristiche lo rendono adatto a studi sulla concentrazione atmosferica “di fondo” dell'aerosol (Colbeck, 2008). L'aerosol “di fondo” è caratterizzato da basse concentrazioni di sostanze di origine antropica, derivate dal trasporto, in quanto l'aerosol primario deriva esclusivamente da fonti naturali. Il trasporto a lunga distanza inoltre tende a far prevalere la frazione fine. Oltre a questo la circolazione anticiclonica attorno al continente e l'elevata altitudine media sfavoriscono il trasporto di particolato nelle aree interne isolandole così da numerose sorgenti di contaminazione (Cunningham e Zoller, 1981). Questi fattori fanno sì che l'Antartide sia caratterizzato da un'atmosfera “pulita” con masse d'aria che hanno perso il loro originale contenuto di aerosol. L'aerosol antartico dunque presenta concentrazioni di inquinanti molto basse, spesso paragonabili al limite di rilevabilità degli strumenti.

Le sorgenti naturali di aerosol in Antartide sono costituite prevalentemente da spray marino (sali e materiale biogenico), dalle eruzioni vulcaniche del monte Erebus e da distacco di materiale dalla crosta terrestre (Bargagli, 2008). L'aerosol di provenienza crostale e i sali marini contribuiscono per una piccola percentuale alla massa totale dell'aerosol estivo (rispettivamente 3% e 2%), mentre la componente marina si rivela significativa nella stagione invernale, arrivando a costituire il 30-40% della massa totale. La composizione chimica dell'aerosol vede la prevalenza dei solfati (95% durante l'estate e 65% durante l'inverno antartico); altri elementi abbondanti sono sodio e alluminio (Cunningham e Zoller, 1981). È stata riscontrata anche la presenza di composti carbonacei che possono essere utilizzati come traccianti per il trasporto a lunga distanza, data la scarsa presenza di sorgenti locali. Le concentrazioni maggiori di questi composti si osservano durante l'estate. La variazione stagionale delle concentrazioni è da imputare soprattutto a variazioni del trasporto a lunga distanza (Cunningham e Zoller, 1981).

6.2) Strumento di campionamento

Il prelievo dei campioni è avvenuto utilizzando un campionatore per aerosol ad alto volume TE 5000, Tisch Environmental Inc., per il campionamento di composti organici illustrato in figura 6.3. Questo strumento permette il campionamento sia del particolato, sia dei composti organici in forma gassosa.



Figura 6.3: TE 5000 High Volume Air Sampler per microinquinanti organici.

Il campionatore è costruito esternamente in alluminio anodizzato anticorrosivo®, un materiale che non subisce fenomeni di corrosione. La struttura dello strumento vede la presenza di un tetto per proteggerlo dalle precipitazioni, dotato di aperture per il passaggio dell'aria. Il cuore dello strumento si compone di due parti. Nella parte superiore si trova il contenitore per la raccolta dei campioni (*sampling head*, Fig. 6.4a), mentre nella parte inferiore si trovano la pompa di aspirazione, il flussimetro, il manometro (*magnehelic gauge*) e un temporizzatore. Il contenitore per i campioni comprende la testa in cui è alloggiato un filtro tondo in fibra di quarzo (Fig. 6.4b) e un bicchiere di vetro sottostante, all'interno del quale è inserito il PUF (*polyurethane foam*) per i composti gassosi (Fig. 6.4c). Le due parti dello strumento sono collegate tra loro da un tubo. Il campionamento avviene per aspirazione dell'aria da parte di una pompa, progettata per diminuire al massimo la contaminazione dei campioni.

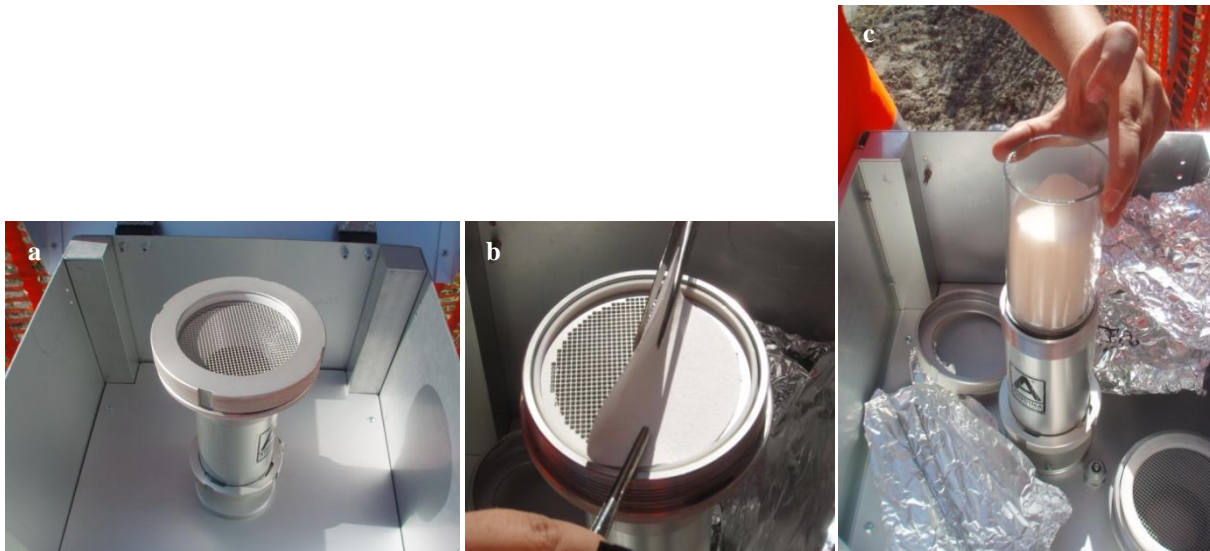


Figura 6.4: Alcuni componenti del campionatore per microinquinanti organici ad alto volume: testa di campionamento (a), filtro in fibra di quarzo (b) e bicchiere con PUF (c).

Per poter garantire un flusso d'aria di aspirazione quantitativamente noto e corretto, occorre tarare e regolare periodicamente il campionatore. Le operazioni di calibrazione vengono eseguite all'inizio e al termine del periodo di campionamento al fine di regolare e misurare accuratamente il flusso di aspirazione della pompa, che servirà poi nel calcolo dei m^3 di aria campionata.

6.3) Il prelievo dei campioni di aerosol atmosferico.

I campioni di aerosol atmosferico analizzati in questo lavoro di tesi sono stati prelevati presso Nave Italica durante la campagna oceanografica della XXVII Spedizione italiana in Antartide (2011/12) del Programma Nazionale Ricerche in Antartide, svoltasi dal 13/1/2012 al 19/2/2012.

Il 13 gennaio la nave Italica è partita dal porto di Lyttelton in Nuova Zelanda e attraversando il *Southern Ocean* è giunta il 24 gennaio presso la stazione italiana di ricerca Mario Zucchelli (MZS), seguendo il percorso illustrato in figura 6.5.

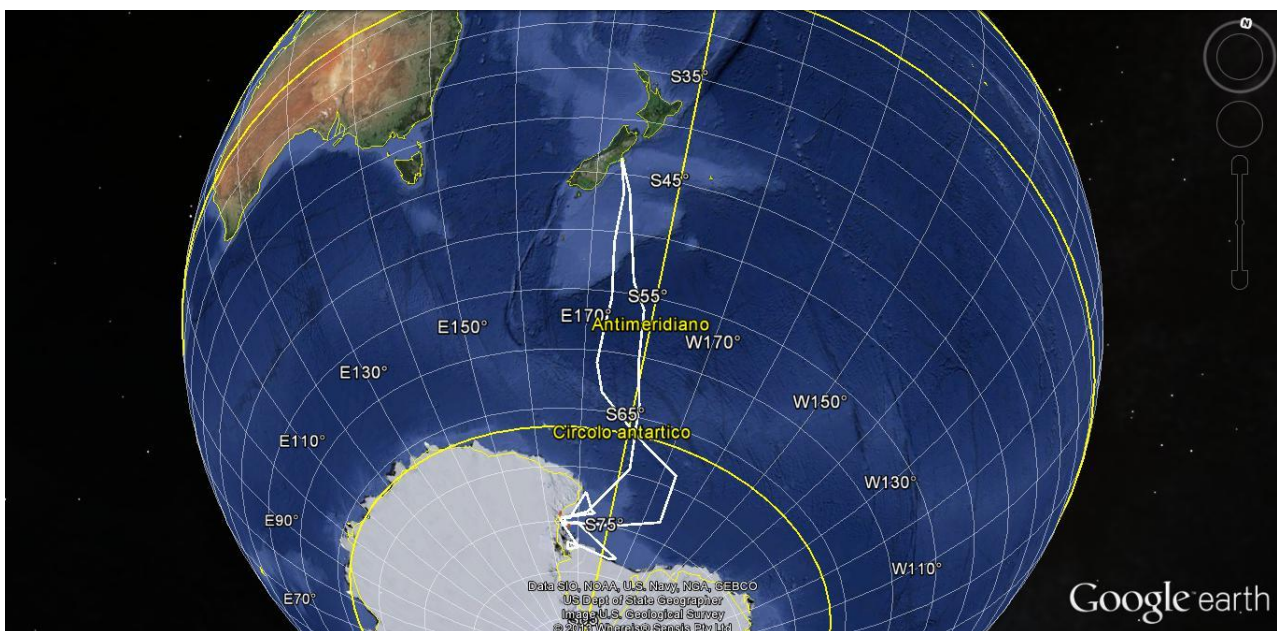


Figura 6.5: Rotta della N/R Italica durante la XXVII spedizione italiana in Antartide.

Successivamente la nave ha compiuto una crociera oceanografica all'interno del mare di Ross con una sosta intermedia alla base MZS (30-31 gennaio) per concludersi sempre a MZS il 10 febbraio. Il viaggio di ritorno verso la Nuova Zelanda si è svolto dal 12 al 19 febbraio.

Il campionamento dell'aerosol atmosferico è iniziato appena la nave ha lasciato il porto di Lyttelton e ha previsto campionamenti della durata di 5 giorni, preceduti sempre da un bianco di campo. I bianchi di campo sono dei filtri che subiscono la stessa procedura dei campioni, ma che non hanno effettivamente campionato: essi vengono portati sul luogo di campionamento, montati sulla testa del campionatore, ma quest'ultimo non viene acceso. L'utilizzo dei bianchi di campo permette di quantificare la contaminazione che può derivare dalle operazioni di trattamento dei campioni. In tabella 6.1 sono riportati nome, data di carico e data di ritiro dei campioni prelevati durante la

spedizione. Nel presente lavoro vengono presi in esame solo i filtri, poiché i composti analizzati si ritrovano nella fase particolato e non in fase gassosa.

Tabella 6.1: Denominazione, data di carico e data di ritiro dei campioni prelevati durante la XXVII spedizione della M/N Itlica. I campioni contrassegnati dalla lettera B sono i bianchi di campo.

nome campione	data e ora locale carico	data e ora locale ritiro
AP/27S/ANDATA/BP1	13/1/12 14:30	13/1/12 14:35
AP/27S/ANDATA/CP1	13/1/12 15:00	19/1/12 1:30
AP/27S/ANDATA/BP2	19/1/12 9:30	19/1/12 9:35
AP/27S/ANDATA/CP2	19/1/12 10:29	23/1/12 21:00
AP/27S/SS5860/09/BP3	25/1/12 20:25	25/1/12 20:30
AP/27S/SS5860/09/CP3	25/1/12 20:40	30/1/12 0:30
AP/27S/SS0104/09/BP4	30/1/12 9:03	30/1/12 9:10
AP/27S/SS01064/09/BP5	31/1/12 20:57	31/1/12 21:00
AP/27S/SS0104/09/CP4	31/1/12 23:02	7/2/12 6:20
AP/27S/ST0104/07/BP6	8/2/12 1:10	8/2/12 1:15
AP/27S/ST0104/07/CP5	8/2/12 1:26	10/2/12 7:00
AP/27S/SS0103/09/BP7	12/2/12 20:30	12/2/12 20:35
AP/27S/RITORNO/CP6	12/2/12 20:40	18/2/12 18:23
AP/27S/RITORNO/BP8	18/2/12 16:39	18/2/12 16:45
AP/27S/RITORNO/CP7	18/2/12 16:49	20/2/12 2:50

Il campionatore è stato equipaggiato con un anemometro configurato in modo da spegnere il motore del campionatore quando il vento proveniva da poppa per evitare contaminazioni provenienti dallo scarico della nave. Inoltre i motori del campionatore sono stati spenti ogni volta che la nave era ferma per evitare eventuali contaminazioni derivanti dalle operazioni di carico e scarico e dal movimento dei verricelli.

7) *Materiali e strumenti utilizzati*

7.1) **Materiali standard di riferimento**

Per la preparazione delle soluzioni di standard sono stati utilizzati i composti solidi ad elevato grado di purezza. I composti nativi L-alanina, L-arginina, L-asparagina, L-acido aspartico, L-glutammina, L-acido glutammico, trans-4-idrossi-L-prolina, L-istidina, L-leucina, L-isoleucina, L-lisina, L-metionina, L-ornitina, L-prolina, L-fenilalanina, L-serina, L-treonina, L-triptofano, L-tirosina, L-valina, glicina, D leucina, D arginina, Trans-4-idrossi-D-prolina, D ornitina, D acido glutamico, D tirosina, L-methionine sulfone (MetSO₂) sono stati foriniti da Sigma Aldrich; mentre D istidina, D triptofano, D valina, D serina, D treonina, D fenilanlanina, D alanina , D glutamina, D metionina, D isoleucina, D asparagina, D lisina, D acido aspartico sono stati forniti da Alfa Aesar. Gli standard marcati isotopicamente L-[¹³C₃] alanina, L-[¹³C₄] acido aspartico, L-[¹³C₅] acido glutammico, L-[¹³C₆] arginina con purezza del 98% sono stati ottenuti da SigmaeAldrich mentre L-[¹³C₁] leucina, L-[¹³C₁] fenilalanina, L-[¹³C₁] prolina e L-[¹³C₁] valina con grado di purezza > 98% sono stati forniti da Cambridge Isotope Laboratories Inc. (Andover, MA).

7.2) **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).
- Gas idrogeno, grado ricerche (SIAD, Bergamo, Italia).

7.3) **Materiali**

- Beute da 50 ml (Vetrotecnica, Padova, Italia).
- Filtri in fibra di quarzo (QFF), porosità 1 μm, diametro 10 cm, modello To-13, certificati ISO 9001 (SKC Inc., Eighty Four, Pennsylvania, USA).

- 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..

7.4) Strumentazione

7.4.1) 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).

7.4.2) Analitica

- Siringa Model "11" (Harvard Apparatus Inc., Holliston, MA, USA).
- Cromatografo UHPLC[™] (*Ultra High Performance Liquid Chromatography*) UltiMate 3000 (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).

7.5) Colonne cromatografiche

- Chirobiotic TAG da 250 mm x4.6 mm di diametro (Advanced Separation Technologies Inc, USA)

7.6) Software

- LC Quan (Thermo Fisher Scientific[™], Germania)
- Analyst (Applied Biosystem/MDS SCIEX, Concord, Ontario, Canada)
- HYSPLIT (NOAA)
- Microsoft Office Excel
- Google earth v. 7.1.1.1888.

8) Metodologie analitiche

8.1) Preparazione delle soluzioni standard

Poiché non erano disponibili in commercio soluzioni standard di amminoacidi contenenti tutti gli analiti oggetto dello studio nelle due forme enantiomeriche, è stato necessario preparare le soluzioni standard a partire dal composto solido. Sono stati quindi pesati circa 10 mg di ciascun amminoacido, portando a volume in un matraccio da 2 mL, in modo da ottenere le soluzioni madri ad una concentrazione di circa 5 mg mL^{-1} (tabella 8.1). La maggior parte degli amminoacidi sono stati diluiti in acido cloridrico a 0,1 M, tranne la glutammina, l'asparagina, l'idrossiprolina e il metionin solfone che invece sono stati diluiti in acqua ultrapura a causa della loro maggiore stabilità in tale mezzo. In seguito sono state preparate due soluzioni: una diluita in acido cloridrico 0,1 M contenente tutti gli amminoacidi stabili in ambiente acido e l'altra diluita in acqua ultrapura contenente glutammina, asparagina, idrossiprolina e il metionin solfone. Entrambe le soluzioni sono state preparate prelevando $50 \mu\text{L}$ da ogni soluzione madre e portando a volume in un matraccio da 10 mL, ottenendo una concentrazione di circa $30 \mu\text{g mL}^{-1}$. Tali soluzioni sono state ulteriormente diluite 1 a 10 ottenendo così delle soluzioni con una concentrazione di circa $3 \mu\text{g mL}^{-1}$. Queste ultime soluzioni, denominate R (tabella 8.1) sono state utilizzate come soluzioni standard per la procedura di validazione del metodo e per la preparazione della soluzione per il calcolo del fattore di risposta.

La stessa procedura è stata seguita per la preparazione della soluzione di standard marcati isotopicamente che sono stati tutti diluiti in acido cloridrico 0,1 M, ottenendo, dopo le dovute diluizioni, la soluzione chiamata M (tabella 8.1), utilizzata anch'essa nella validazione e per la preparazione della soluzione per il calcolo del fattore di risposta.

Tutte le soluzioni standard sono state preparate in una *clean room* al fine di evitare ogni possibile contaminazione.

Tabella 8.1: Valori delle concentrazioni delle soluzioni madri dei vari amminoacidi, delle soluzioni a 30 µg mL⁻¹, delle soluzioni per la validazione e per la preparazione del fattore di risposta.

	MADRI mg mL ⁻¹	MIX 30 µg mL ⁻¹ µg mL ⁻¹	MIX R/M µg mL ⁻¹	nella validazione ng mL ⁻¹	nel FR ng mL ⁻¹
NATIVI		MIX 30 µg mL⁻¹ in HCl	MIX R in HCl		
L-Ala	7	35	3	50	49
L-Asp	5	27	3	39	39
L-Ile	5	25	2	36	35
L-Met	7	35	3	49	49
L-Ser	8	40	4	57	57
L-Tyr	5	25	2	36	35
L-Arg	6	28	3	40	40
L-Pro	6	30	3	43	43
L-Thr	6	28	3	40	40
L-Val	7	34	3	48	48
L-Glu	8	38	4	55	54
L-Gly	8	40	4	57	57
L-Leu	5	24	2	35	35
L-Lys	5	24	2	34	34
L-Phe	5	24	2	34	34
L-Hys	5	25	3	36	36
L Trp	6	28	3	39	39
D-Ser	5	25	3	36	36
D-Val	5	27	3	38	38
D-Phe	5	24	2	34	34
D-Trp	15	75	8	107	107
D-Ala	7	36	4	51	51
D-Arg	5	27	3	38	38
D-Glu	5	25	3	36	36
D-Orn	7	37	4	52	52
D-Ile	5	24	2	34	34
L-Orn	5	25	3	36	36
D-Met	5	24	2	34	33
D-Leu	6	29	3	42	42
D-Asp	6	32	3	46	45
D-Thr	5	27	3	38	38
D-Lys	5	25	3	36	36
D-Tyr	5	26	3	37	37
D-Hys	6	30	3	43	43

	MADRI mg mL ⁻¹	MIX 30 µg mL ⁻¹ µg mL ⁻¹	MIX R/M µg mL ⁻¹	nella validazione ng mL ⁻¹	nel FR ng mL ⁻¹
NATIVI		MIX 30 µg mL⁻¹ in H₂O	MIX R in H₂O		
L Asn	5	25	3	36	36
L Gln	9	43	4	61	60
4-L-Hyp	7	33	3	46	46
L MetSO ₂	7	33	3	46	46
D-Asn	6	28	3	40	40
D-Gln	5	24	2	34	34
D-Hyp	5	23	2	33	32
MARCATI		MIX 30 µg mL⁻¹ in HCl	MIX M		
¹³ C L Asp	6	28	3	39	39
¹³ C L Glu	6	30	3	43	43
¹³ C L Arg	2	21	2	29	29
¹³ C L Phe	4	20	2	29	29
¹³ C L Ala	6	27	3	39	39
¹³ C L-leu	6	29	3	41	41
¹³ C L-Pro	6	30	3	43	43
¹³ C L-Val	6	28	3	40	40

8.2) Procedura pre-analitica

La procedura pre-analitica di trattamento dei campioni utilizzata in questo lavoro permette di utilizzare gli stessi campioni per analizzare anche altri analiti, come i traccianti di combustione della biomassa, oggetto di altri studi, al fine di poter ottenere da uno stesso set di campioni il maggior numero di informazioni.

8.2.1) Decontaminazione del materiale di laboratorio

Poiché gli ambienti estremi come l'Antartide sono caratterizzati da concentrazioni molto basse e i composti presi in esame sono dei microcostituenti dell'aerosol, è necessario mettere in atto una procedura di decontaminazione di tutta l'attrezzatura utilizzata, soprattutto quella che verrà a contatto diretto con i filtri o con gli estratti. È molto importante prestare particolare attenzione in questa fase del lavoro poiché una minima contaminazione dei campioni potrebbe falsare i risultati delle analisi.

Procedure di decontaminazione diverse vengono effettuate per i diversi materiali da laboratorio. La vetreria viene lasciata a bagno in una soluzione di Contrad[®] per 24 ore, dopodiché viene abbondantemente sciacquata e decontaminata con metanolo ultra gradient. Inoltre vengono effettuati due cicli di pulizia in bagno a ultrasuoni della durata di 14 minuti ciascuno con acqua ultrapura. Il materiale metallico (pinzette, forbici, spatole) viene sciacquato con acqua ultrapura, decontaminato con metanolo ultra gradient e lasciato asciugare. Infine i filtri in PTFE da 0.45 µm vengono attivati con metanolo ultragradient e sciacquati con acqua ultrapura.

8.2.2) Trattamento del campione

La procedura di trattamento del campione utilizzata in questo lavoro per la determinazione degli amminoacidi è una procedura già esistente, normalmente utilizzata per l'estrazione del levoglucosano (Bourcier L., 2010). Essa si compone di diverse fasi. Inizialmente il filtro viene spezzettato utilizzando delle pinzette metalliche e inserito all'interno di una beuta da 50 mL. Sul filtro ancora asciutto vengono aggiunti 100 µL della soluzione M di standard interni marcati isotopicamente (tabella 8.1). Dopodiché viene effettuata una prima estrazione in bagno a ultrasuoni della durata di 14 minuti, aggiungendo 5 mL di acqua ultrapura. L'estratto viene raccolto in un'altra beuta e il filtro subisce una seconda estrazione in bagno a ultrasuoni con 2 mL di acqua ultrapura della durata di 14 minuti. L'estratto ottenuto viene unito al precedente, avendo cura di strizzare bene i pezzetti di filtro con una spatola ricurva in modo da far fuoriuscire la maggior quantità di estratto possibile. Infine il liquido così ottenuto viene filtrato direttamente nelle *vial* utilizzando delle siringhe in vetro da 10 mL a cui sono stati applicati dei filtri in PTFE di 10 mL di diametro con pori da 0,45 µm.

Per evitare ogni possibile contaminazione ambientale tutta la procedura si svolge sotto cappa a flusso laminare. Inoltre durante l'estrazione in bagno a ultrasuoni viene aggiunto del ghiaccio nel bagno per evitare che la temperatura dei campioni si alzi troppo causando la degradazione dei composti. Tutta la procedura pre-analitica è schematizzata in figura 8.1

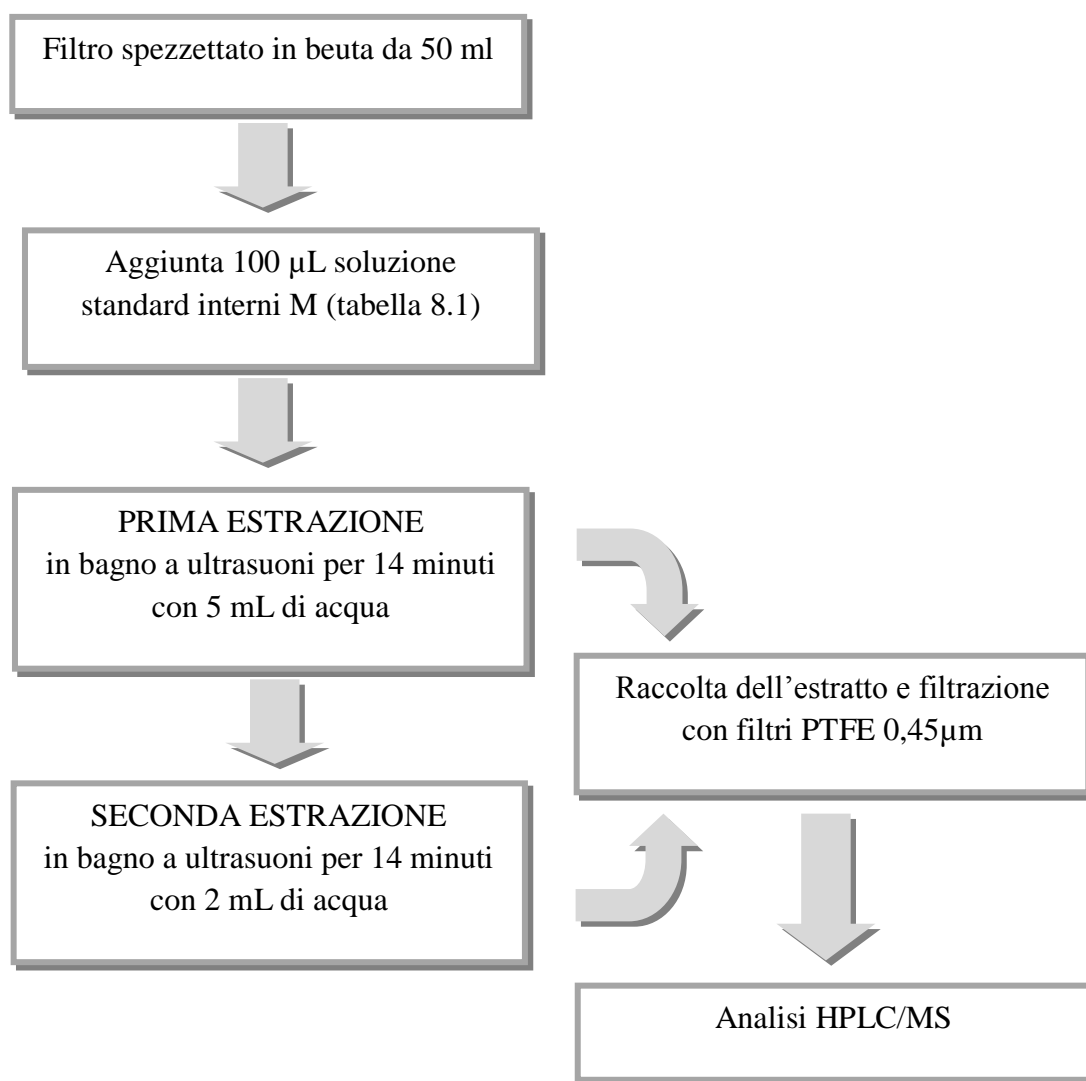


Figura 8.1: Schema della procedura pre-analitica di trattamento del campione.

8.3) Metodo di analisi

8.3.1) Corsa cromatografica

Per la separazione cromatografica è stata utilizzata una colonna cromatografica da 250 mm x 4.6 mm I.D. (Chirobiotic TAG, Advanced Separation Technologies Inc, USA). Questa colonna la cui struttura viene riportata in figura 8.2, è costituita da un glicopeptide macrociclico (teicoplanina aglicone) legato tramite legami covalenti ad un supporto di silice. Questa macromolecola presenta dei siti di legame chirali che formano dei diastereoisomeri temporanei con i due enantiomeri degli analiti, i quali presentano temporaneamente delle caratteristiche chimico fisiche diverse, venendo eluiti in tempi diversi e permettendo così la loro separazione cromatografica (Advanced Separation Technologies Inc., 2004). Si è osservato che gli enantiomeri D presentano maggiore ritenzione degli

enantiomeri L, poiché l'antibiotico che costituisce la fase stazionaria ha un'affinità maggiore per gli enantiomeri D.

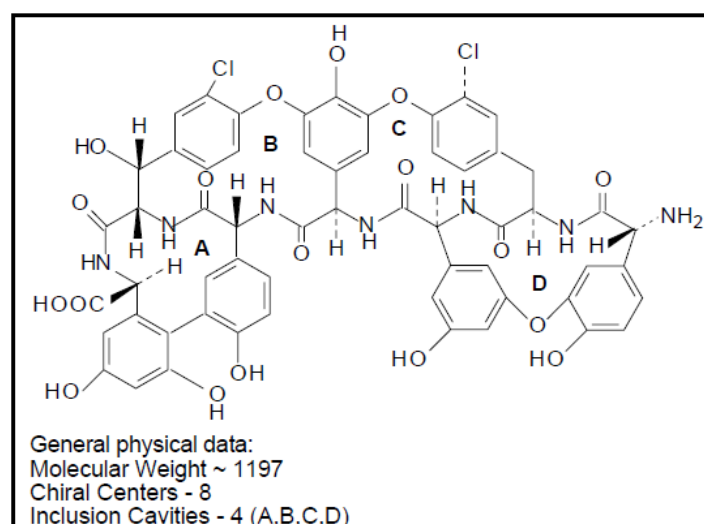


Figura 8.2: Struttura del glicopeptide macrociclico teicoplanina aglicone che costituisce la fase stazionaria della colonna Chirobiotic TAG.

La corsa cromatografica è riportata in tabella 8.2. Si tratta di un'eluizione a gradiente in cui la composizione della fase mobile varia nel corso dell'analisi. A tal proposito sono state utilizzate due diverse fasi mobili: la fase A è composta da acqua ultrapura acidificata con lo 0,1% di acido formico, mentre la fase B è composta da metanolo ultragradiante anch'esso acidificato con 0,1% di acido formico. Il flusso è di $150 \mu\text{L min}^{-1}$, mentre il volume di iniezione è di $10 \mu\text{L}$. La durata totale della corsa è di 35 minuti. Prima di giungere a questi valori sono state provate diverse composizioni delle fasi mobili e diverse ripartizioni delle percentuali delle due fasi mobili durante l'eluizione a gradiente, fino a ottenere la migliore separazione possibile per tutti i composti.

Tabella 8.2: Corsa cromatografica impiegata per l'analisi chirale degli amminoacidi.

TEMPO	H ₂ O + 0,1% FA	MeOH + 0,1% FA
minuti	(fase A)	(fase B)
0	70	30
15	70	30
20	0	100
25	0	100
27	70	30
35	70	30

8.3.2) Metodo spettrometrico – LTQ Orbitrap XL

Il primo metodo messo a punto per la determinazione degli amminoacidi prevede l'utilizzo dello spettrometro di massa LTQ Orbitrap XL. La sorgente di ionizzazione ESI è stata impiegata in modalità positiva, con la formazione di ioni $[M+H]^+$. I valori di m/z analizzati sono riportati in tabella 8.3. L'analisi viene effettuata in *full scan* nel range di masse 60-400 m/z , utilizzando come analizzatore la trappola orbitale ad una risoluzione di 60.000 (FWHM, a m/z 400; 0.5 s *scan cycle time*). Come *lock mass* è stata utilizzata quella del D-isooctil-ftalato (391,2845).

Tabella 8.3: Nome, formula chimica e massa esatta dello ione $[M+H]^+$ degli amminoacidi oggetto del presente lavoro.

COMPOSTO	FORMULA CHIMICA	$[M+H]^+$
NATIVI		
Alanina	$C_3H_7NO_2$	90,055
Arginina	$C_6H_{14}N_4O_2$	175,119
Acido aspartico	$C_4H_7NO_4$	134,0448
Asparagina	$C_4H_8N_2O_3$	133,0608
Glicina	$C_2H_5NO_2$	76,0393
Glutammina	$C_5H_{10}N_2O_3$	147,0764
Acido glutammico	$C_5H_9NO_4$	148,0604
Istidina	$C_6H_9N_3O_2$	156,0768
Leucina/Isoleucina	$C_6H_{13}NO_2$	132,1019
Lisina	$C_6H_{14}N_2O_2$	147,1128
Metionina	$C_5H_{11}NO_2S$	150,0583
Ornitina	$C_5H_{12}N_2O_2$	133,0972
Fenilalanina	$C_9H_{11}NO_2$	166,0863
Prolina	$C_5H_9NO_2$	116,0706
Idrossiprolina	$C_5H_9NO_3$	132,0655
Serina	$C_3H_7NO_3$	106,0499
Treonina	$C_4H_9NO_3$	120,0655
Tirosina	$C_9H_{11}NO_3$	182,0812
Triptofano	$C_{11}H_{12}N_2O_2$	205,0972
Valina	$C_5H_{11}NO_2$	118,0863
Metionin solfone	$C_5H_{11}NO_4S$	182,0482

COMPOSTO	FORMULA CHIMICA	[M+H] ⁺
MARCATI		
¹³ C Acido aspartico	C ₄ H ₇ NO ₄	138,0588
¹³ C Acido glutammico	C ₅ H ₉ NO ₄	153,0772
¹³ C Arginina	C ₆ H ₁₄ N ₄ O ₂	181,1391
¹³ C Fenilalanina	C ₉ H ₁₁ NO ₂	169,0969
¹³ C Alanina	C ₃ H ₇ NO ₂	93,065

Dopo aver individuato per ciascun analita i parametri ottimali dell'ottica ionica, secondo la procedura descritta nel paragrafo 5.1.1, i parametri mediani (tabella 8.4) sono stati inseriti nel metodo finale di analisi.

Tabella 8.4: Parametri dell'ottica ionica ottimizzati.

TUNAGGIO OTTICA IONICA	
IS (kV)	4
Capillary V (V)	5
Capillary T (V)	275
Tube lens (V)	40
Multipole 00 (V)	-4
Lens 0 (V)	-4,3
Multipole 0 (V)	-5,5
Lens 1 (V)	-9
Gate lens (V)	-40
Multipole 1 (V)	-7
Multipole rf (V)	400
Front lens (V)	-6,5

Infine è stata effettuata l'ottimizzazione della sorgente H-ESI, come descritto nel paragrafo 5.1.3 ottenendo i parametri finali riportati in tabella 9.5.

Tabella 8.5: Parametri ottimizzati per la sorgente H-ESI dello strumento LTQ Orbitrap XL per l'analisi chirale degli amminoacidi.

PARAMETRO	VALORE
T(°C)	350
Polarità	positiva
Sheet Gas (arb unit)	50
Aux gas (arb unit)	15

Nelle figure 8.3-8.6 vengono riportati i cromatogrammi relativi ad ogni amminoacido (circa 50 ng mL⁻¹) ottenuti con il metodo appena descritto, in cui si nota la separazione enantiomerica degli analiti. Il metodo cromatografico messo a punto non è in grado di separare la L-leucina dalla L-isoleucina nè tanto meno la D-leucina dalla D-isoleucina (Fig. 8.4), pertanto i due analiti dovranno essere quantificati come somma di leucina più isoleucina, denominata Leu/Ile

RT: 0.00 - 34.99 SM: 7B

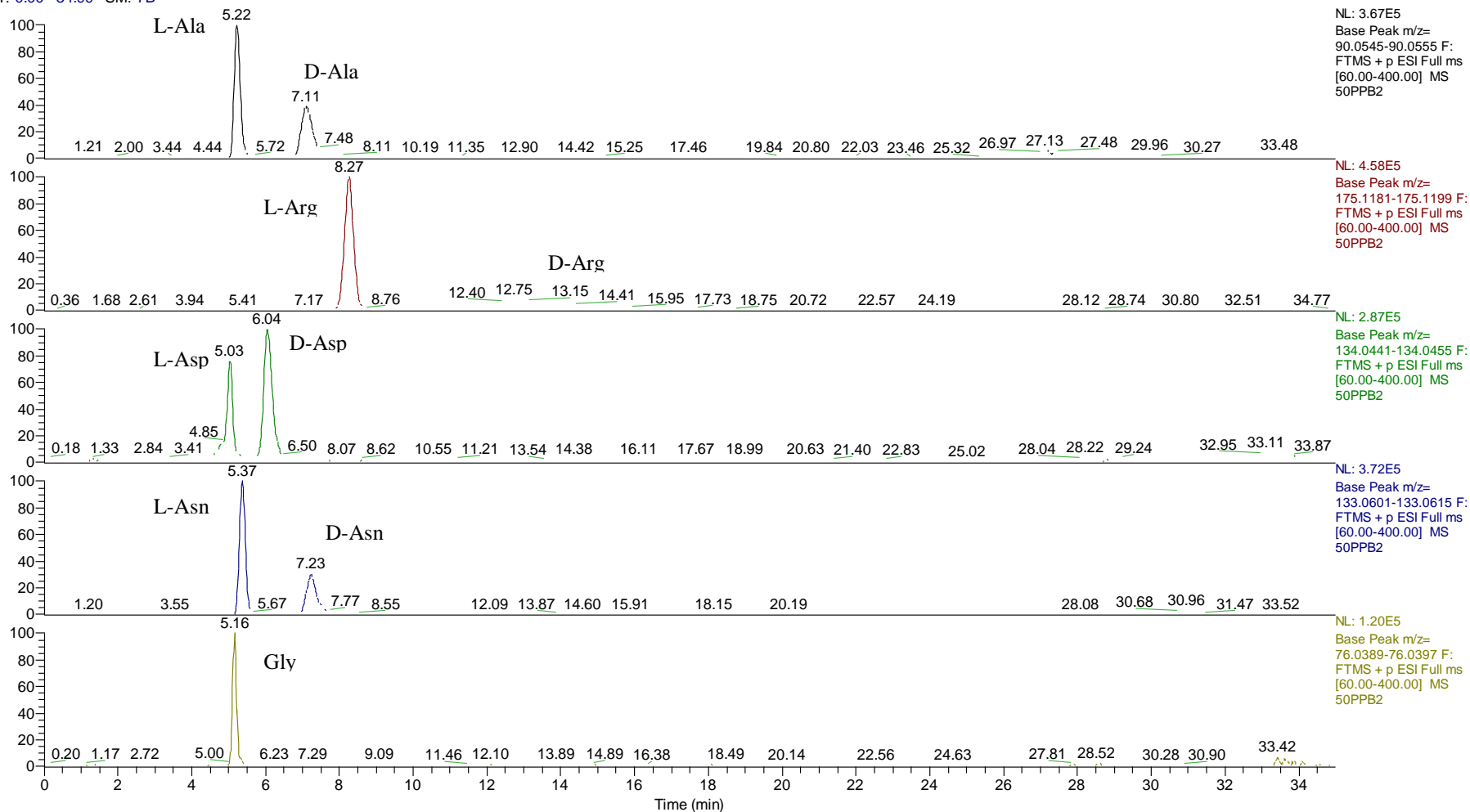


Figura 8.3: Cromatogrammi dei composti alanina, arginina, acido aspartico, asparagina e glicina relativi al punto della retta di calibrazione 50 ng mL^{-1} ottenuto con il metodo HPLC-LTQ Orbitrap XL.

RT: 0.00 - 34.99 SM: 7B

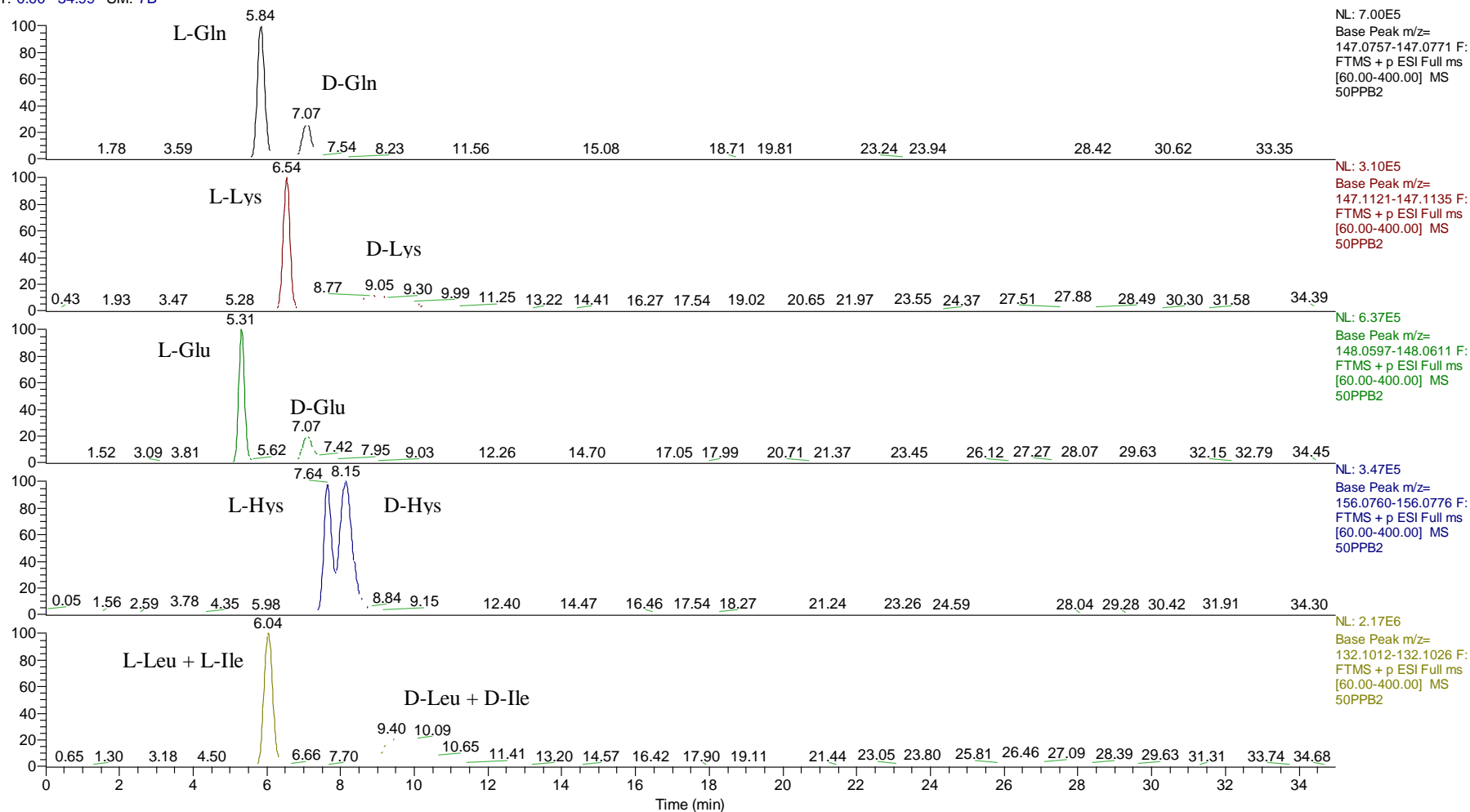


Figura 8.4: Cromatogrammi dei composti glutammina, lisina, acido glutammico, istidina e leucina/isoleucina relativi al punto della retta di calibrazione 50 ng mL^{-1} ottenuto con il metodo HPLC-LTQ Orbitrap XL.

RT: 0.00 - 34.99 SM: 7B

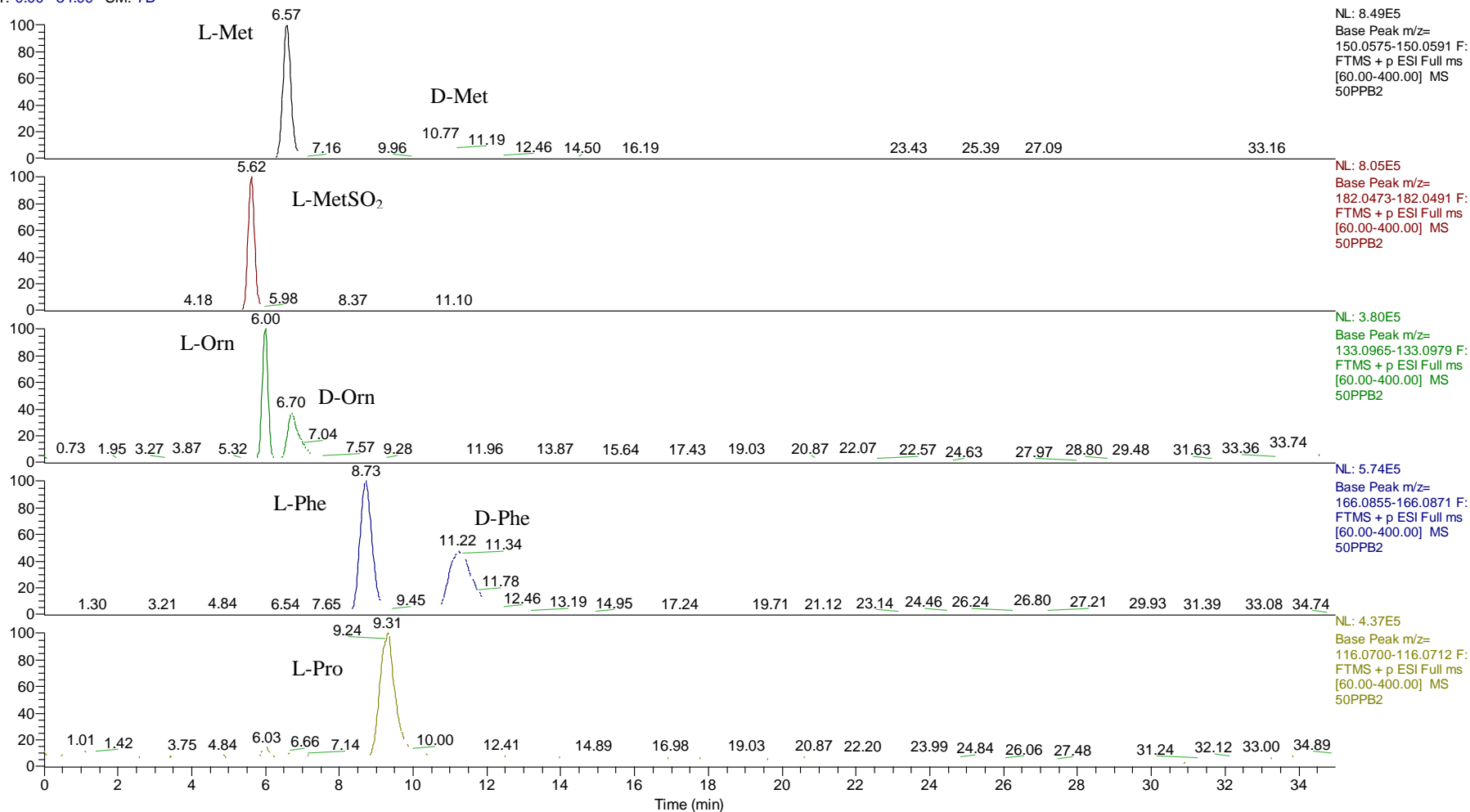


Figura 8.5: Cromatogrammi dei composti metionina, metionina solfone, ornitina, fenilalanina e prolina relativi al punto della retta di calibrazione 50 ng mL⁻¹ ottenuto con il metodo HPLC-LTQ Orbitrap XL.

RT: 0.00 - 34.99 SM:

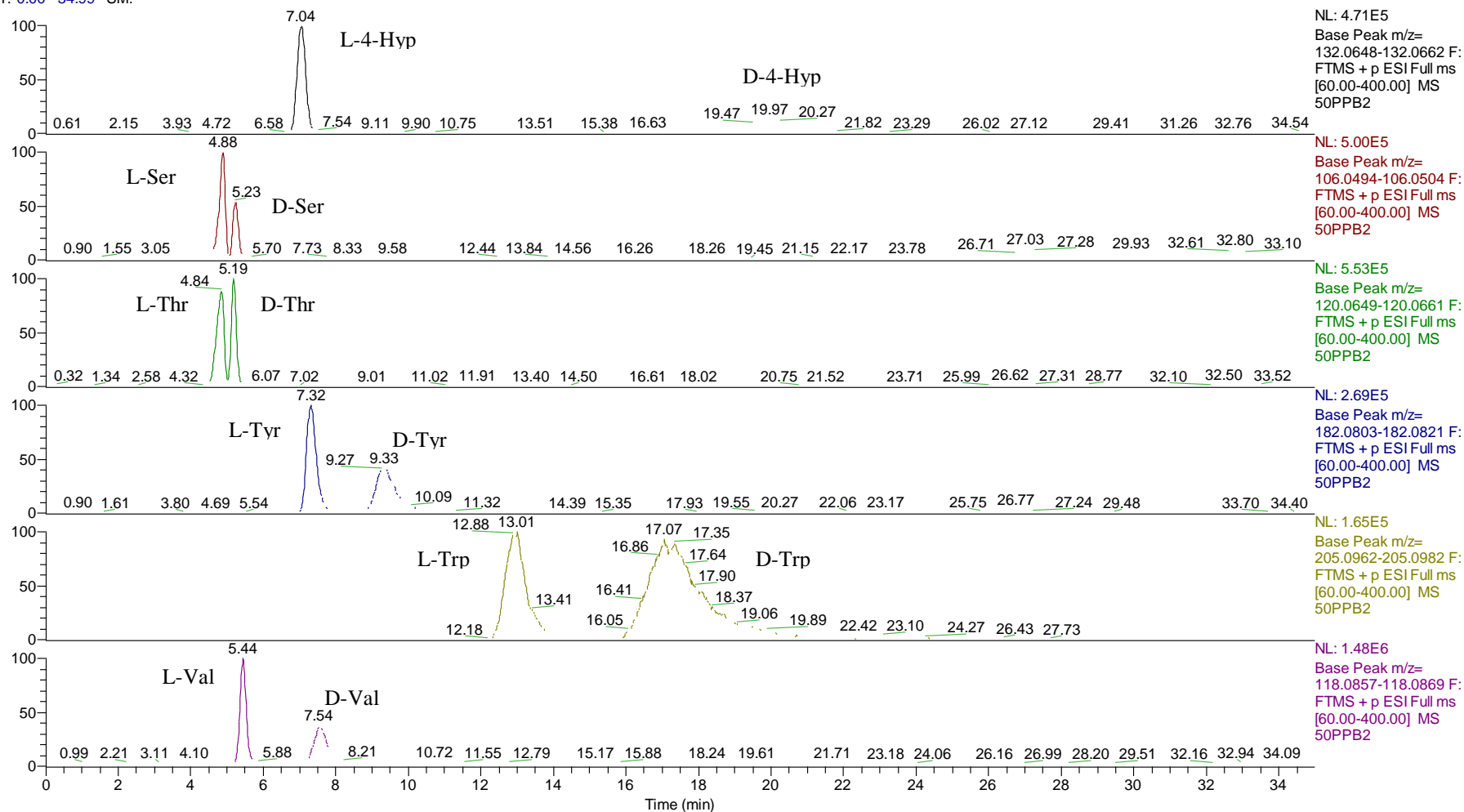


Figura 8.6: Cromatogrammi dei composti 4-idrossiprolina, serina, treonina, tirosina, triptofano e valina relativi al punto della retta di calibrazione 50 ng mL^{-1} ottenuto con il metodo HPLC-LTQ Orbitrap XL.

8.3.3) Metodo spettrometrico – API 4000

Il secondo metodo utilizzato per la determinazione degli amminoacidi prevede l'utilizzo dello spettrometro di massa a triplo quadrupolo API 4000. La sorgente di ionizzazione utilizzata è sempre una sorgente ESI in modalità positiva. La modalità di acquisizione utilizzata è la MRM con *dwell time/transition* di 100 ms. I quadrupoli Q1 e Q3 sono fissati con risoluzione unitaria a $0,7 \pm 0,1$ unità di ampiezza del picco a metà altezza.

Si riportano in 8.6 i valori relativi all'ottimizzazione della sorgente mentre in tabella 8.7 vengono riportate le transizioni monitorate per ciascun analita e i relativi parametri strumentali.

Tabella 8.6: Condizioni strumentali impiegate nell'analisi.

Scan Type	MRM
Polarity	+
Ion source	Turbo spray
Temperatura (°C)	500,00
GS1 (psi)	22,00
GS2 (psi)	70,00
CUR (psi)	30,00
CAD (psi)	4,00
IS (V)	5450,00
EP (V)	10,00

Tabella 8.7: Transizioni monitorate e valori dei parametri dipendenti dal composto ottimizzati nella messa a punto del metodo analitico. Gli ioni evidenziati sono quelli impiegati nella quantificazione.

Ione genitore	Q1 (m/z)	Q3 (m/z)	DP (V)	CE (V)	CXP (V)
NATIVI					
[Ala+H] ⁺	90,0	44,2	32	17	7
[Arg+H] ⁺	175,1	116,0	53	21	21
		70,2	53	33	13
[Asn+H] ⁺	132,9	87,2	35	13	8
		73,9	35	22	7

Ione genitore	Q1 (m/z)	Q3 (m/z)	DP (V)	CE (V)	CXP (V)
[Asp+H] ⁺	134,0	88,1	34	15	16
		73,9	34	21	13
[Gln+H] ⁺	147,0	130,0	38	15	11
		84,0	38	22	7
[Glu+H] ⁺	148,2	129,9	40	14	23
		84,1	40	24	16
[Gly+H] ⁺	75,8	75,8	33	6	6
		30,0	33	17	4
[Hyp+H] ⁺	132,0	86,1	47	21	7
		68,1	47	31	6
[Hys+H] ⁺	156,0	110,1	46	20	20
		83,2	46	36	15
[Leu/Ile+H] ⁺	132,1	86,1	41	15	16
		69,2	41	26	13
[Lys+H] ⁺	147,2	130,0	32	15	23
		84,1	32	24	15
[Met+H] ⁺	150,0	104,0	39	15	19
		133,0	39	15	23
[Orn+H] ⁺	133,1	116,3	45	12	15
		70,2	45	24	11
[Phe+H] ⁺	166,1	120,1	43	18	22
		102,9	43	38	19
[Pro+H] ⁺	116,0	70,1	42	24	13
[Ser+H] ⁺	106,0	88,0	34	15	16
		60,2	34	17	10
[Thr+H] ⁺	120,1	102,9	78	26	18
		77,0	78	36	14
[Trp+H] ⁺	205,1	188,1	53	15	17
		146,1	53	24	13
[Val+H] ⁺	118,1	72,1	35,0	16,8	12,8
		55,1	35,0	30,0	9,5
[MetSO ₂ +H] ⁺	181,8	165,0	62,0	20,3	9,2
		135,0	62,0	18,0	7,5
MARCATI					
[Ala+H] ⁺ *	93,0	46,2	37	19	8
[Arg+H] ⁺ *	180,8	74,0	55	21	7
		121,1	55	21	11
[Asp+H] ⁺ *	138,0	91,1	42	15	10
		75,9	42	22	7
[Glu+H] ⁺ *	153,0	134,9	39	13	12

Ione genitore	Q1 (m/z)	Q3 (m/z)	DP (V)	CE (V)	CXP (V)
		106,0	39	19	10
[Leu+H]⁺*	132,9	86,1	45	16	7
		44,1	45	31	8
[Phe+H]⁺*	167,0	121,1	51	19	11
		104,0	51	38	10
[Pro+H]⁺*	117,2	70,2	40	24	6
		68,1	40	41	6
[Val+H]⁺*	119,0	72,0	45	18	6
		55,0	45	29	5

La transizione più intensa viene utilizzato per la quantificazione (riportato in grassetto in tabella 8.7), mentre il meno intenso ha lo scopo di fungere da ione di conferma per l'analisi qualitativa, confrontando i tempi di ritenzione e il rapporto tra le intensità delle due transizioni.

Nelle figure 8.7-8.11 vengono riportati i cromatogrammi per ogni analita ottenuti con questo metodo in cui la concentrazione degli analiti risulta intorno ai 50 µg mL⁻¹. Oltre a non poter separare la leucina dalla isoleucina, come visto precedentemente, con questo metodo non è possibile determinare separatamente la glutammina e la lisina in quanto hanno le stesse transizioni e coeluiscono.

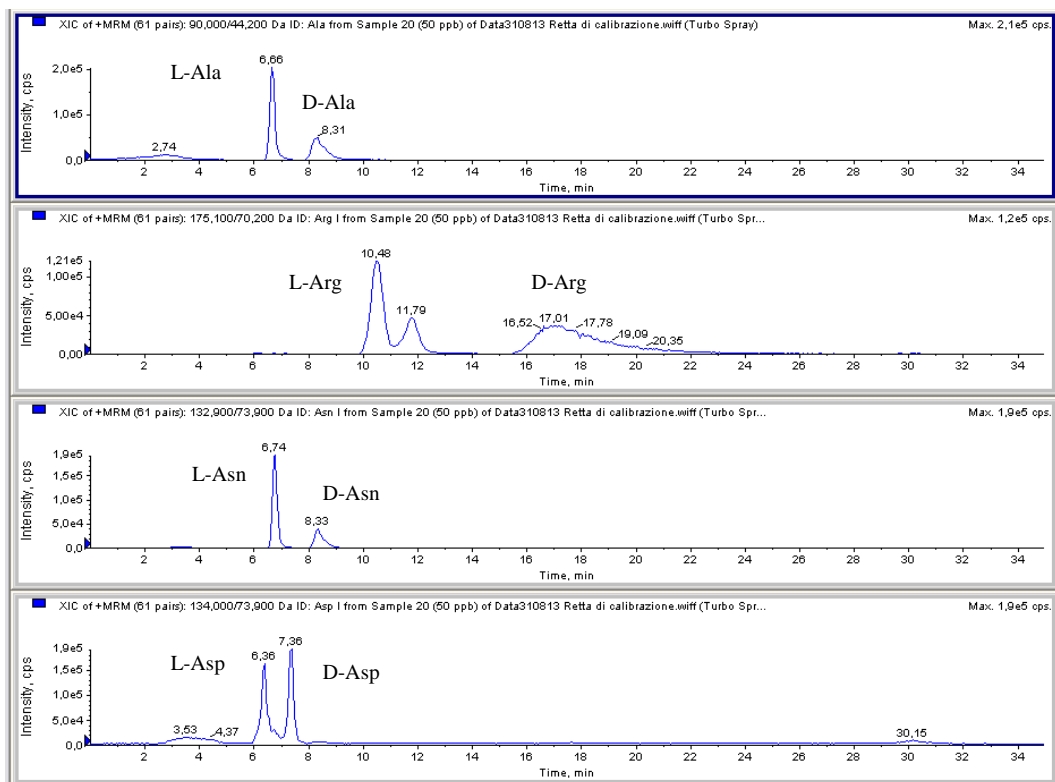


Figura 8.7: Cromatogrammi dei composti alanina, arginina, asparagina e acido aspartico relativi al punto della retta di calibrazione 50 ng mL^{-1} ottenuto con il metodo HPLC-API 4000.

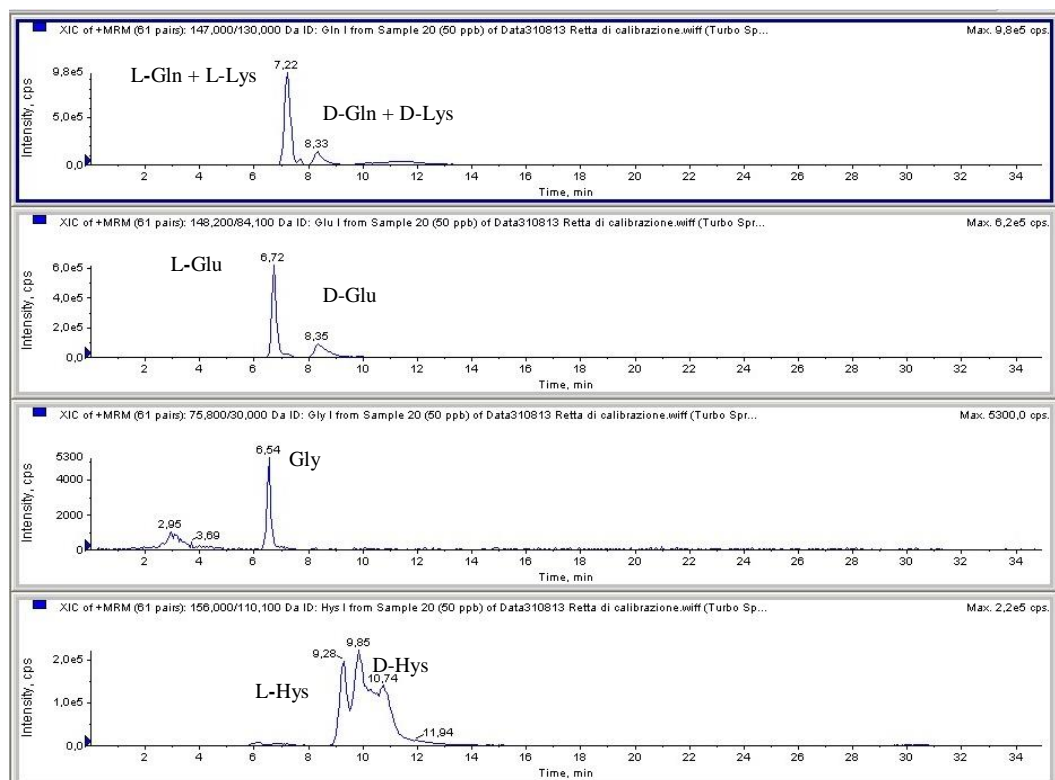


Figura 8.8: Cromatogrammi dei composti glutamina&lisina, acido glutammico, glicina e istidina relativi al punto della retta di calibrazione 50 ng mL^{-1} ottenuto con il metodo HPLC-API 4000.

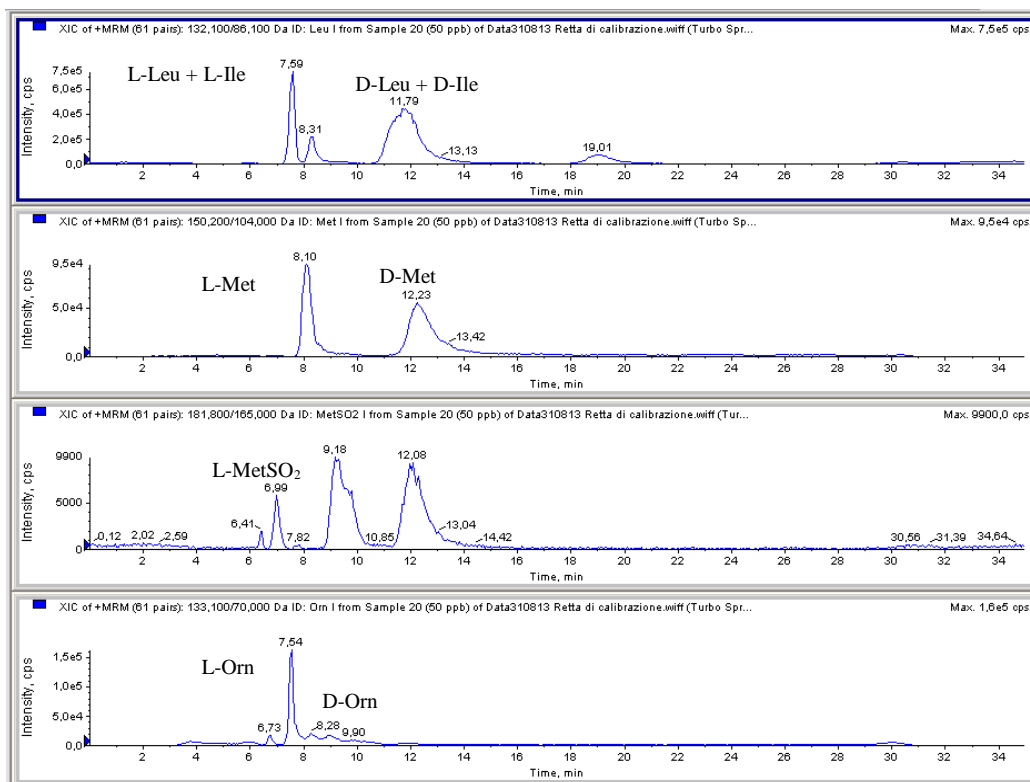


Figura 8.9: Cromatogrammi dei composti leucina/isoleucina, metionina, metionin solfone e ornitina relativi al punto della retta di calibrazione 50 ng mL⁻¹ ottenuto con il metodo HPLC-API 4000.

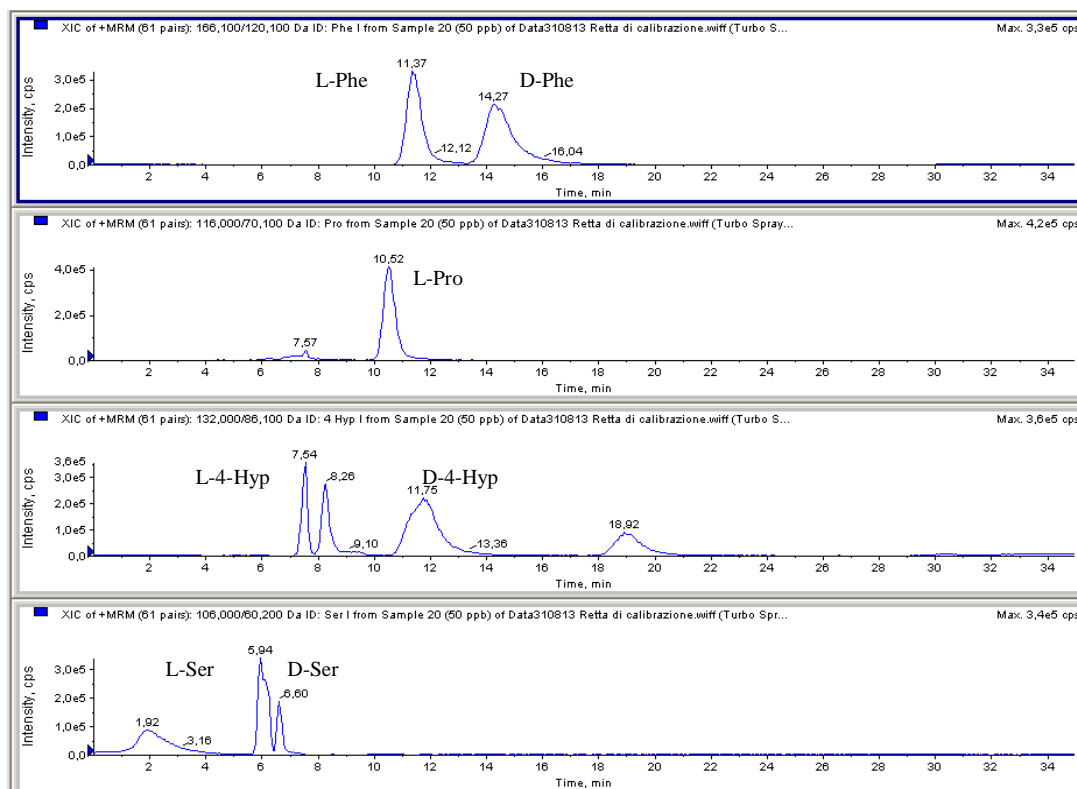


Figura 8.10: Cromatogrammi dei composti fenilalanina, prolina, 4-idrossiprolina e serina relativi al punto della retta di calibrazione 50 ng mL⁻¹ ottenuto con il metodo HPLC-API 4000.

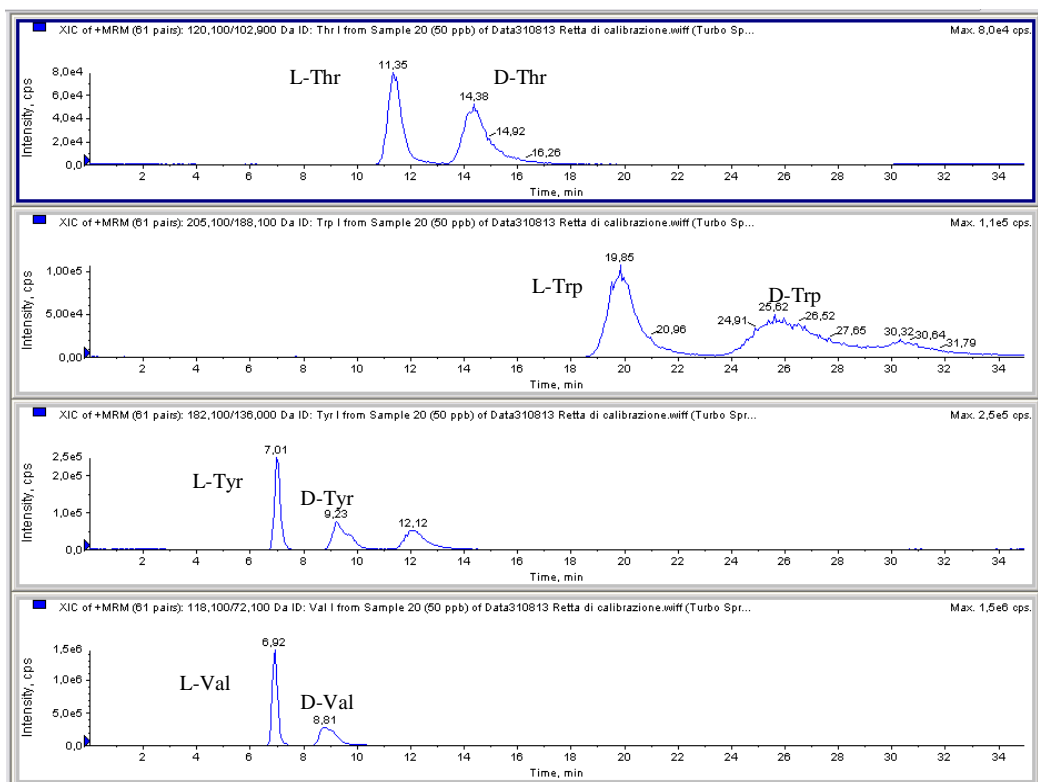


Figura 8.11: Cromatogrammi dei composti treonina, triptofano, tirosina e valina relativi al punto della retta di calibrazione 50 ng mL^{-1} ottenuto con il metodo HPLC-API 4000.

8.4) Validazione del metodo pre-analitico

Il metodo analitico appena messo a punto deve essere validato valutando la linearità della risposta, il LOD e il LOQ, il bianco procedurale, la resa e l'errore percentuale.

La linearità della risposta viene valutata costruendo una retta di calibrazione mediante soluzioni di standard nativi e marcati isotopicamente a concentrazioni crescenti nell'intervallo 5-500 ng mL⁻¹ per il metodo HPLC-LTQ Orbitrap XL e 0,01-500 ng mL⁻¹ per il metodo HPLC-API 4000.

La linearità della risposta strumentale viene valutata costruendo una curva che individua la relazione tra il rapporto della concentrazione degli amminoacidi nativi con quelli marcati contro il rapporto fra le aree dei picchi cromatografici relativi agli analiti nativi e marcati.

Viene quindi calcolato il coefficiente di correlazione R^2 che deve essere superiore a 0,99 affinché la risposta si possa considerare lineare.

Il limite di rilevabilità strumentale (LOD) viene determinato calcolando il rapporto segnale/rumore (S/N) che consiste nel rapporto tra l'area del picco alla concentrazione più bassa disponibile (di solito 5 ng mL⁻¹) e l'area del rumore di fondo del cromatogramma. Il LOD è quella concentrazione alla quale il rapporto S/N risulta uguale a 3. Un rapporto S/N uguale a 10 corrisponde al limite di quantificazione strumentale (LOQ).

Bianco procedurale, resa ed errore percentuale vengono valutati utilizzando dei filtri in fibra di quarzo puliti, pretrattati allo stesso modo dei filtri utilizzati per il campionamento (posti in muffola a 400°C per 4 ore). I filtri subiscono la stessa procedura pre-analitica utilizzata per i campioni, riportata nel capitolo 8.2, con l'aggiunta però degli standard nativi ai filtri bianchi.

Nella procedura di validazione sono stati valutati 5 bianchi procedurali nei quali sono stati aggiunti solo gli standard marcati, 5 repliche alle quali sono stati aggiunti 100 µL di soluzione R in HCl e in H₂O (tabella 8.1) e 100 µL di soluzione M (tabella 8.1), necessari per la stima dell'errore percentuale (accuratezza), e infine 5 repliche alle quali sono stati aggiunti 100 µL di soluzione R in HCl e in H₂O (tabella 8.1) ai filtri asciutti appena spezzettati, mentre 100 µL di soluzione M di standard interni sono stati aggiunti alla fine del processo di estrazione per valutare le rese di estrazione.

La soluzione utilizzata per il calcolo del fattore di risposta necessario per la quantificazione viene preparata diluendo 71 µL di soluzione R in HCl (tabella 8.1), 71 µL di soluzione R in H₂O (tabella 8.1) e 71 µL di soluzione di standard interni M (tabella 8.1) in 5 mL di acqua ultrapura.

I “campioni artificiali” così preparati vengono analizzati e quantificati utilizzando la procedura descritta nel paragrafo 8.2, quindi si procede al calcolo della resa e dell'errore percentuale, dopo aver sottratto l'eventuale valore del bianco procedurale (se rilevato).

Il calcolo delle rese avviene attraverso l'equazione 8.1:

$$RESA \% = \frac{VALORE\ QUANTIFICATO}{VALORE\ VERO} \cdot 100 \quad \text{Equazione 8.1}$$

Poiché lo standard marcato è inserito dopo l'estrazione, esso viene quantificati senza subire le perdite dovute a tale procedura. Conoscendo quindi la concentrazione dell'analita nel campione artificiale si riesce a calcolare la percentuale di recupero.

Il calcolo dell'errore % avviene attraverso l'equazione 8.2:

$$ERRORE \% = \frac{VALORE\ QUANTIFICATO - VALORE\ VERO}{VALORE\ VERO} \cdot 100 \quad \text{Equazione 8.2}$$

In questo caso lo standard marcato è inserito prima dell'estrazione e subisce tutti i processi e quindi le stesse possibili perdite dell'analita (campione artificiale), permettendo la quantificazione dell'errore. Un errore è definito accettabile se inferiore al 10 % (2002/657/CE).

9) *Risultati e discussione*

9.1) Messa a punto di un metodo analitico per la separazione chirale degli amminoacidi

Il metodo messo a punto permette la separazione cromatografica degli enantiomeri D e L degli amminoacidi oggetto di questo lavoro di tesi (alanina, arginina, asparagina, acido aspartico, acido glutammico, glicina, glutammina, istidina, lisina, leucina, isoleucina, metionina, metionin solfone, ornitina, fenilalanina, prolina, idrossiprolina, serina, treonina, triptofano, tirosina, valina).

La separazione cromatografica degli enantiomeri può essere condotta principalmente in due modalità. Il primo approccio consiste nell'utilizzo di una cromatografia a fase inversa previa derivatizzazione degli analiti con reagenti chirali. Tuttavia questa procedura presenta numerosi svantaggi tra cui l'instabilità dei composti derivatizzati, interferenze strumentali, inadeguatezza e basso grado di purezza dei reagenti nonché procedure di preparazione del campione lunghe e complesse con conseguente rischio di contaminazione, soprattutto a basse concentrazioni (Godel et al., 1992). In alternativa la separazione enantiomerica diretta degli amminoacidi può essere fatta con diverse tecniche tra cui la cromatografia chirale a scambio di legami (CLEC) o l'utilizzo di fasi stazionarie chirali (CSP) basate su α -ciclodestrine o teicoplanina (Remelli et al., 1997). In ogni caso l'analisi quantitativa degli amminoacidi con queste tecniche separative deve prevedere la separazione dell'enantiomero di interesse dal resto degli amminoacidi presenti nel campione. Mentre le altre fasi stazionarie richiedono una fase mobile non volatile, le fasi stazionarie basate sugli antibiotici come la teicoplanina, nonostante presentino una selettività minore rispetto alle altre fasi stazionarie chirali, possono essere utilizzate con fasi mobili volatili e quindi essere accoppiate a quei detector che richiedono la volatilizzazione del solvente, (Petritis et al., 2001).

Uno studio condotto da Petritis et al. (2002) confronta diversi detector comunemente utilizzati per la separazione chirale tramite cromatografia liquida degli amminoacidi non derivatizzati. I risultati dimostrano che la spettrometria di massa tandem può essere considerata tra i detector che danno i risultati migliori, soprattutto in termini di limite di rilevabilità, linearità, specificità e la possibilità di applicazione a matrici complesse, come quelle ambientali. Si può quindi affermare che l'accoppiamento tra cromatografia liquida utilizzando fasi stazionarie basate su polipeptidi macrociclici come la teicoplanina e la spettrometria di massa rappresentano una valida alternativa

alla derivatizzazione per la separazione enantiomerica degli amminoacidi. Infatti le lacune ancora presenti nel metodo cromatografico vengono ampiamente rimpiazzate dall'alta specificità della spettrometria di massa, soprattutto lavorando in tandem (MS-MS) o con strumenti ad alta risoluzione. Questa tecnica infatti permette di determinare separatamente quei composti che co-eluiscono purché abbiano masse differenti o producano dopo frammentazione ioni di masse diverse.

Alla luce di quanto detto sopra, per questo lavoro di tesi è stato scelto di utilizzare la fase stazionaria chirale Chirobiotic TAG (Advanced Separation Technologies Inc, USA) basata sull'antibiotico teicoplanina aglicone. Essa presenta, assieme alla Chirobiotic T, basata sulla teicoplanina, un'alta risoluzione per un gran numero di amminoacidi α , β , γ e ciclici. Inoltre, a differenza della Chirobiotic T, essa presenta una selettività notevole per quei composti che contengono zolfo come i solfossidi e i solfoni. (Advanced Separation Technologies Inc., 2004).

Una volta stabilita la fase stazionaria, sono state condotte alcune prove sulla composizione della fase mobile, al fine di individuare le condizioni che permettessero una separazione chirale efficace di tutti gli analiti oggetto dello studio. La scelta dei componenti della fase mobile (metanolo e acqua) è stata dettata dalle indicazioni fornite dal produttore della colonna cromatografica: il metanolo viene infatti consigliato come il solvente organico d'eccellenza per la separazione cromatografica con questo tipo di fase stazionaria, poiché è quello che dà la risposta migliore in termini di selettività (Advanced Separation Technologies Inc., 2004). Sono stati testati diversi rapporti percentuali tra le due fasi mobili fino a raggiungere la migliore separazione cromatografica per tutti gli analiti. Le percentuali di metanolo testate sono state 10%, 20%, 30% 40% e 100%. Il rapporto 30:70 metanolo acqua ha prodotto la migliore separazione dei picchi e pertanto è stato scelto per la corsa cromatografica. Si è scelto inoltre di acidificare entrambe le fasi mobili con acido formico. La selettività e la risoluzione della fase stazionaria infatti variano con il pH. L'utilizzo di un acido organico debole come l'acido formico viene consigliato poiché favorisce la ionizzazione in positivo ed è da preferire all'utilizzo di un tampone in quanto i sali potrebbero dare fenomeni di soppressione del segnale in sorgente. A tal proposito sono state provate due diverse concentrazioni di acido formico, lo 0,1% e lo 0,2%. La percentuale di acido formico che dà i risultati migliori è lo 0,1%..

Nonostante gli analiti vengano eluiti in isocratica con una composizione di fase mobile 70:30 acqua:metanolo entrambi acidificati all'0.1% di acido formico è stato scelto di introdurre un gradiente per portare la colonna ad un 100% di fase organica e favorire una pulizia da sostanze con minore polarità che potrebbero rimanere in colonna alterandone la delicata struttura chirale. In

questo modo durante ogni corsa viene operata una fase di pulizia e di rigenerazione della fase stazionaria seguita poi da una fase di condizionamento necessaria per riportare la fase stazionaria nelle condizioni ritenute per gli analiti di interesse.

L'accoppiamento di un metodo cromatografico che consente la separazione chirale di un gran numero di amminoacidi, senza ricorrere alla derivatizzazione, e di rivelatori molto selettivi e ad alta risoluzione consente di ottenere uno dei metodi di analisi più all'avanguardia per la determinazione degli enantiomeri degli amminoacidi nell'aerosol di ambienti incontaminati. Le caratteristiche del metodo messo a punto fanno sì che esso sia innovativo rispetto ai metodi presenti in letteratura, soprattutto per il numero di analiti che è possibile determinare con limiti di rilevabilità molto inferiori rispetto a quanto precedentemente fatto.

9.2) Validazione del metodo HPLC – LTQ Orbitrap XL

Il metodo strumentale è stato valutato mediante la stima della linearità della risposta strumentale e dei limiti di rilevabilità (LOD) e di quantificazione (MDL) strumentali.

Utilizzando il metodo dello standard interno, la linearità è stata valutata attraverso la costruzione di una curva di calibrazione nella quale il rapporto tra la concentrazione dell'analita e dello standard interno viene messo in relazione con il rapporto tra le aree dei loro picchi. Poiché non erano disponibili per tutti gli analiti i corrispondenti composti marcati isotopicamente, è stato scelto un composto marcato per la quantificazione di ogni analita sulla base dell'affinità chimica e della similarità nel comportamento cromatografico e in quello in spettrometria di massa. La curva viene costruita attraverso l'iniezione di soluzioni standard contenenti tutti gli analiti a concentrazioni crescenti e gli standard marcati a concentrazione costante (circa 40 ng mL⁻¹).

Per ciascun analita sono state iniettate soluzioni standard a concentrazioni variabili tra 5 ng mL⁻¹ e 500 ng mL⁻¹ replicando le iniezioni per ciascun punto tre volte al fine di verificare la ripetibilità nell'iniezione. Tutti gli analiti hanno dimostrato valori di R² superiori al 0,98 nel range di concentrazione analizzato, ad eccezione della D-metionina la cui risposta risulta lineare fino alla diluizione 94 ng mL⁻¹, e della glicina, la cui risposta risulta lineare fino alla diluizione 80 ng mL⁻¹. Viene riportata a titolo di esempio la curva di calibrazione della L- alanina (Fig. 9.1).

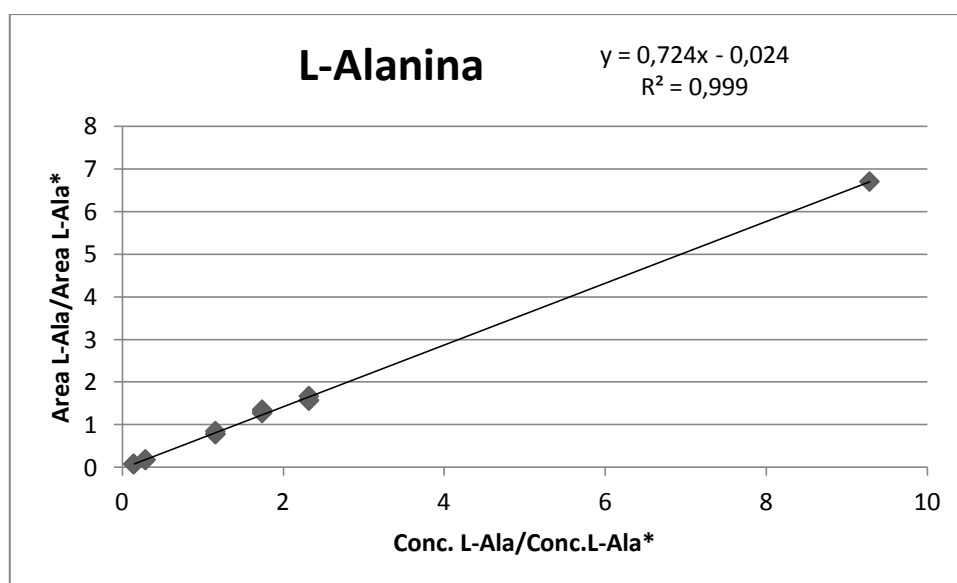


Figura 9.1: Curva di calibrazione della L-Alanina.

In tabella 9.1 vengono riportati i valori di coefficiente angolare, intercetta, coefficiente di correlazione R^2 e il range di linearità per ogni composto oggetto del lavoro. Viene inoltre riportato per ogni amminoacido il composto marcato utilizzato per la costruzione della curva.

Tabella 9.1: Valori di pendenza, intercetta, coefficiente di correlazione, range di linearità e standard marcato utilizzato per gli amminoacidi analizzati con il metodo HPLC-LTQ Orbitrap XL.

COMPOSTO	MARCATO	PENDENZA	INTERCETTA	R^2	RANGE DI LINEARITÀ	
					min (ng mL ⁻¹)	max (ng mL ⁻¹)
L-Ala	L-Ala*	1,0665	-0,0643	0,9993	9	557
D-Ala	L-Ala*	0,7072	-0,0447	0,9987	9	575
L-Arg	L-Arg*	3,4218	-0,4352	0,9992	7	447
D-Arg	L-Arg*	2,3196	-0,2967	0,9993	7	426
L-Asn	L-Glu*	1,1547	-0,162	0,9972	6	400
D-Asn	L-Glu*	0,6666	-0,1739	0,9931	7	446
L-Asp	L-Glu*	0,5219	0,0307	0,9934	7	436
D-Asp	L-Glu*	0,7899	0,0558	0,9956	8	512
L-Gln	L-Ala*	2,244	-0,4085	0,9986	11	680
D-Gln	L-Ala*	1,4349	-0,2007	0,9987	6	382
L-Glu	L-Glu*	1,164	-0,1473	0,9983	10	610
D-Glu	L-Glu*	0,9079	-0,1457	0,998	6	404
L-Hyp	L-Glu*	1,3669	-0,0364	0,9983	8	520
D-Hyp	L-Glu*	1,7538	-0,3888	0,9883	6	364
L-Hys	L-Glu*	1,2311	-0,0659	0,9991	6	407
D-Hys	L-Glu*	1,989	-0,3438	0,996	8	485
L-Leu/L-Ile	L-Arg*	6,0001	3,7207	0,9879	12	790
D-Leu/D-Ile	L-Arg*	6,9319	0,1475	0,9992	13	851
L-Lys	L-Glu*	0,7837	0,0927	0,9929	6	382
D-Lys	L-Glu*	0,8781	-0,1939	0,9931	6	406
L-Met	L-Arg*	4,1895	-0,4424	0,9961	9	104
D-Met	L-Ala*	2,7412	-0,3466	0,9941	6	94
L-Orn	L-Arg*	1,3439	0,6806	0,9866	6	406
L-Phe	L-Arg*	5,8282	0,1526	0,9988	6	386
D-Phe	L-Arg*	6,1728	-0,3281	0,9995	6	383
L-Pro	L-Glu*	2,4606	-0,2617	0,9969	8	482
L-Ser	L-Arg*	1,4158	0,6066	0,9985	10	637
D-Ser	L-Arg*	1,1006	0,2182	0,9931	6	400
L-Thr	L-Glu*	1,6404	-0,1513	0,9969	7	450
D-Thr	L-Glu*	1,1725	-0,0289	0,9987	7	428
L-Trp	L-Ala*	3,0926	-0,9464	0,9884	7	440
D-Trp	L-Ala*	2,3266	-1,7736	0,9921	19	1200
L-Tyr	L-Arg*	2,0901	-0,0098	0,9978	6	398

COMPOSTO	MARCATO	PENDENZA	INTERCETTA	R ²	RANGE DI LINEARITÀ	
D-Tyr	L-Ala*	1,9442	-0,5282	0,9923	7	417
L-Val	L-Ala*	4,419	-0,083	0,9979	8	538
D-Val	L-Ala*	4,084	-0,4206	0,9971	7	426
Gly	L-Arg*	0,1346	-0,0064	0,9927	10	80
MetSO ₂	L-Glu*	1,9899	-0,2625	0,9985	8	520

A partire dal rapporto segnale/rumore è stato possibile calcolare il limite di rilevabilità strumentale (LOD). Quest'ultimo è pari alla concentrazione alla quale il rapporto segnale/rumore è uguale a 3. In tabella 9.2 vengono riportati i rapporti segnale rumore per ogni analita, la concentrazione alla quale sono stati calcolati, il LOD e il LOQ che ne derivano espressi in picogrammi assoluti (volume di iniezione 10 µL).

Tabella 9.2: Rapporto S/N, concentrazione alla quale è stato calcolato, LOD e LOQ per ogni amminoacido analizzato.

COMPOSTO	S/N	CONCENTRAZIONE (ng mL ⁻¹)	LOD (pg)	LOQ (pg)
L Ala	20	9	13	45
D Ala	6	9	49	162
L Arg	15	7	14	47
D Arg	6	13	67	222
L Asn	13	6	15	50
D Asn	12	14	36	119
L Asp	6	7	34	113
D Asp	6	8	41	136
L Gln	38	11	8	28
D Gln	9	6	20	68
L Glu	38	10	8	25
D Glu	8	6	24	79
L Hyp	19	8	13	44
D Hyp	15	11	23	76
L Hys	14	6	14	45
D Hys	10	8	24	79
L Leu/L-Ile	38	12	10	33
D Leu/D-Ile	7	13	60	200
L Lys	36	6	5	18
D Lys	7	13	52	173
L Met	42	9	6	21
D Met	5	6	35	118
L Orn	14	6	14	45

COMPOSTO	S/N	CONCENTRAZIONE (ng mL ⁻¹)	LOD (pg)	LOQ (pg)
D Orn	8	18	74	245
L Phe	44	6	4	14
D Phe	17	6	11	35
L Pro	4	8	65	215
L Ser	25	10	12	40
D Ser	6	6	30	100
L Thr	48	7	4	15
D Thr	40	7	5	17
L Trp	16	7	13	43
D Trp	14	19	40	134
L TYR	16	6	12	39
D Tyr	9	7	22	72
L Val	10	8	26	88
D Val	4	7	50	166
Gly	10	10	30	101
MetSO₂	23	8	11	36

I limiti di rilevabilità strumentali del metodo oscillano dai 4 pg assoluti iniettati della L-Phe ai 67 pg assoluti iniettati della D-Arg. In generale si osserva che gli enantiomeri L hanno dei limiti di rilevabilità strumentali inferiori rispetto ai corrispondenti enantiomeri D. Questo è riconducibile alle caratteristiche della separazione cromatografica: infatti, poiché la fase stazionaria ha una maggiore affinità per gli enantiomeri D, essi tendono a formare dei picchi più larghi.

La validazione del metodo pre-analitico invece è stata condotta mediante la stima dell'accuratezza, della precisione, dei bianchi procedurali e della resa di estrazione.

Le prove di validazione della procedura pre-analitica sono state effettuate con le modalità descritte nel paragrafo 8.4. Di seguito (tabella 9.3) vengono riportati per ogni analita i valori di resa percentuale e gli errori percentuali con i relativi CV% per la valutazione della ripetibilità. Vengono inoltre riportati per ogni analita gli standard marcati con cui è stata effettuata la quantificazione. I bianchi procedurali risultavano essere sempre inferiori ai limiti di rilevabilità strumentali.

Tabella 9.3: Risultati della prova di validazione della procedura pre-analitica per il metodo HPLC-LTQ Orbitrap XL.

COMPOSTO	MARCATO UTILIZZATO	RESA %	CV%	ERRORE %	CV%
L-Ala	L-Ala*	60	12	8	8
D-Ala	L-Ala*	40	6	6	5
L-Arg	L-Arg*	52	6	-0,5	9
D-Arg	L-Arg*	47	10	-6	7
L-Asn	L-Glu*	65	7	-1	7
D-Asn	L-Glu*	50	9	-7	13
L-Asp	L-Glu*	62	7	3	8
D-Asp	L-Glu*	62	9	7	4
L-Gln	L-Ala*	60	4	8	8
D-Gln	L-Ala*	49	5	2	9
L-Glu	L-Glu*	57	9	6	7
D-Glu	L-Glu*	60	4	-2	9
L-Hyp	L-Glu*	59	10	4	7
D-Hyp	L-Glu*	60	11	-4	6
L-Hys	L-Glu*	52	12	-2	4
D-Hys	L-Glu*	52	12	6	7
L-Leu/L-Ile	L-Arg*	55	9	6	9
D-Leu/D-Ile	L-Arg*	55	4	-1	8
L-Lys	L-Glu*	47	0,4	-9	4
D-Lys	L-Glu*	49	8	-5	7
L-Met	L-Arg*	43	8	-1	8
D-Met	L-Ala*	53	4	6	9
L-Orn	L-Arg*	49	2	-1	8
D-Orn	L-Ala*	41	30	-33	46
L-Phe	L-Arg*	55	8	2	7
D-Phe	L-Arg*	52	10	-5	9
L-Pro	L-Glu*	56	9	6	8
L-Ser	L-Arg*	39	6	0,4	8
D-Ser	L-Arg*	53	5	3	9
L-Thr	L-Glu*	53	11	2	6
D-Thr	L-Glu*	59	13	9	8
L-Trp	L-Ala*	48	7	-1	3
D-Trp	L-Ala*	50	15	-5	6
L-Tyr	L-Arg*	45	11	-7	10
D-Tyr	L-Ala*	53	5	10	7
L-Val	L-Ala*	60	5	10	11
D-Val	L-Ala*	47	7	1	9
Gly	L-Arg*	54	5	1	7
MetSO ₂	L-Glu*	54	2	-3	3

La procedura pre-analitica porta a rese di estrazione che variano tra il 39% della L-serina e il 65% della L-asparagina.

I dati riportati in tabella 9.3 sottolineano come la quantificazione dei due enantiomeri dei vari amminoacidi oggetto di questo studio risulta sempre accurata con errori percentuali inferiori al +/- 10% e una ripetibilità testata su 5 prove ripetute e valutata come coefficiente di variazione percentuale inferiore al 10%. L'unica eccezione risulta essere la D-ornitina per la quale viene determinato un errore % del -33% con un CV% del 46%. Tale analita non può essere quindi quantificato con questa procedura.

9.3) Analisi di campioni di aerosol antartico con il metodo HPLC – LTQ Orbitrap XL

I campioni di aerosol antartico prelevati durante la XXVII spedizione presso la N/R Itlica sono stati analizzati con il metodo HPLC-LTQ Orbitrap XL messo a punto in questo lavoro di tesi. I risultati non sono stati soddisfacenti in quanto nessun composto è stato rilevato a concentrazioni superiori al LOQ.

A differenza dei bianchi procedurali, i quali erano risultati sempre inferiori ai LOD, nei bianchi di campo prelevati durante la campagna antartica è stato possibile determinare un limite di rilevabilità procedurale per alcuni analiti (tabella 9.4).

Tabella 9.4: Valori di bianco medio, MDL e MQL di alcuni composti rilevati con il metodo HPLC-Orbitrap espressi in nanogrammi assoluti.

	L-Ala	L-Leu/Ile	L-Orn	L-Ser
BIANCO MEDIO	30	16	56	80
MDL	38	17	72	70
MQL	126	56	241	235

I risultati ottenuti hanno permesso di affermare che i limiti di rilevabilità di questo metodo sono troppo alti per le basse concentrazioni che caratterizzano l'ambiente antartico, pertanto si rende necessario mettere a punto un altro metodo analitico. Si è deciso quindi di accoppiare il metodo cromatografico chirale con un metodo in spettrometria di massa con analizzatore a triplo quadrupolo API 4000, messo a punto da Barbaro et al. (2011) e riportato nel paragrafo 9.3.3.

9.4) Validazione del metodo HPLC – API 4000

Nonostante la procedura pre-analitica sia già stata validata con il metodo HPLC-LTQ Orbitrap XL, anche questo metodo necessita di essere validato per verificare la linearità del segnale strumentale, i limiti di rilevabilità (LOD) e quantificazione (LOQ) strumentali.

È stata quindi valutata la linearità della risposta con la stessa procedura descritta nel paragrafo 9.2. Tuttavia in questo caso, considerata la maggiore sensibilità dello strumento, si è scelto di partire da una concentrazione più bassa utilizzando 13 soluzioni a diversa concentrazione in un range variabile tra $0,01 \text{ ng mL}^{-1}$ e 500 ng mL^{-1} . Anche per questo metodo è stato scelto per ogni analita un composto marcato isotopicamente da utilizzare come standard interno per la costruzione della curva e per la successiva quantificazione. Viene riportata come esempio la curva di calibrazione relativa alla L-alanina la cui risposta strumentale risulta lineare in tutto l'intervallo indagato (Fig. 9.2).

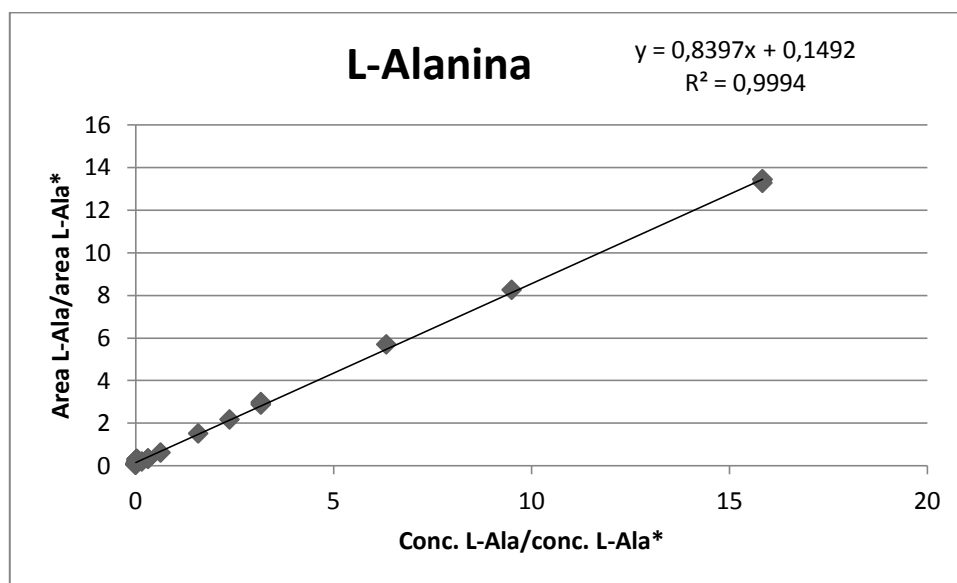


Figura 9.2: Curva di calibrazione della L-Alanina.

Non tutti i composti analizzati hanno dato una risposta lineare nell'intero intervallo di concentrazioni stabilito. Mentre la non linearità alle basse concentrazioni è da imputare al fatto che le quantificazioni risultano prossime ai LOD, i problemi riscontrati con le alte concentrazioni sono da attribuire ad un sovraccarico della fase stazionaria o della sorgente di ionizzazione. È dimostrato infatti che alle alte concentrazioni la curva di calibrazione mostra un plateau dovuto ad un effetto di "saturazione" della sorgente dato dall'eccesso di goccioline di spray presenti (Zook et al., 1997). In tabella 9.5 vengono riportati i valori di coefficiente angolare, intercetta, coefficiente di correlazione

R² e il range effettivo di linearità per ogni analita oggetto del lavoro. Viene inoltre riportato per ogni analita lo standard marcato utilizzato per la costruzione della curva.

Tabella 9.5: Valori di pendenza, intercetta, coefficiente di correlazione, range di linearità e standard marcato utilizzato per gli amminoacidi analizzati allo spettrometro di massa a triplo quadrupolo.

COMPOSTO	MARCATO	PENDENZA	INTERCETTA	R ²	RANGE DI LINEARITÀ	
					min (ng mL ⁻¹)	max (ng mL ⁻¹)
L-Ala	L-Ala*	1,1902	-0,1758	0,9994	0,02	871
D-Ala	L-Ala*	5,8201	-0,4639	0,9903	0,9	899
L-Arg	L-Arg*	0,1532	-0,0195	0,999	0,01	279
D-Arg	L-Arg*	0,1345	-0,026	0,9966	7	266
L-Asn	L-Val*	7,438	-0,2082	0,9924	0,01	625
D-Asn	L-Val*	11,8262	-0,0124	0,9986	0,1	28
L-Asp	L-Asp*	1,7653	-0,1497	0,9983	0,3	681
D-Asp	L-Asp*	1,7516	-0,1031	0,9891	0,2	320
L-Glu	L-Glu*	0,4644	-0,231	0,9825	0,02	954
D-Glu	L-Glu*	0,6162	-0,0423	0,9937	1	63
L-Hyp	L-Leu*	2,9112	-0,0487	0,9862	8	81
D-Hyp	L-Leu*	1,8644	0,0203	0,9969	0,1	569
L-Hys	L-Pro*	3,1659	-0,1427	0,9844	0,06	127
D-Hys	L-Pro*	1,3786	-0,0516	0,9968	0,02	152
L-Leu/L-Ile	L-Leu*	1,1676	-0,2797	0,9861	0,02	740
D-Leu/D-Ile	L-Leu*	0,3785	-0,0597	0,9959	0,03	798
L-Met	L-Leu*	5,8328	-0,5661	0,9852	0,4	864
D-Met	L-Leu*	5,8552	-0,6074	0,9853	0,9	589
L-Orn	L-Arg*	0,2698	0,069	0,9697	0,01	254
L-Phe	L-Phe*	1,2912	-0,1282	0,9949	0,06	121
D-Phe	L-Phe*	1,1893	-0,0974	0,9925	0,06	120
L-Pro	L-Pro*	1,476	-0,1856	0,9974	0,02	753
L-Ser	L-Phe*	4,2909	-0,4643	0,9886	0,02	199
D-Ser	L-Phe*	6,9578	-0,3424	0,9897	0,1	125
L-Thr	L-Arg*	0,2447	-0,0092	0,998	0,01	141
D-Thr	L-Arg*	0,2258	-0,002	0,9979	0,01	134
L-Trp	L-Arg*	0,0977	-0,0028	0,9941	0,1	138
D-Trp	L-Arg*	0,178	0,0181	0,9962	0,2	188
L-Tyr	L-Phe*	5,0451	-0,0939	0,992	0,06	125
D-Tyr	L-Phe*	6,6518	-0,1077	0,9916	0,1	130
L-Val	L-Val*	1,0474	-0,1366	0,9912	0,02	168
D-Val	L-Val*	1,2578	-0,0616	0,9938	0,1	133
Gly	L-Ala*	0,9476	-0,2408	0,9993	0,1	1000
MetSO ₂	L-Leu*	7,9923	-0,0394	0,9935	0,2	122

Sono stati quindi calcolati i LOD e i LOQ, valutando la concentrazione della soluzione standard il cui rapporto S/N strumentale sia rispettivamente uguale a 3 e a 10 (tabella 9.6).

Tabella 9.6: Rapporto segnale rumore, concentrazione alla quale è stato calcolato, LOD e LOQ per ogni amminoacido analizzato con il metodo HPLC-API4000

COMPOSTO	S/N	CONCENTRAZIONE (ng ml ⁻¹)	LOD (pg)	LOQ (pg)
L-Ala	3,7	0,02	0,1	0,5
D-Ala	6,8	0,9	4	13
L-Arg	7,7	0,01	0,05	0,2
D-Arg	3,9	7	51	171
L-Asn	3,9	0,01	0,1	0,3
D-Asn	2,7	0,07	0,8	3
L-Asp	10	0,3	0,8	3
D-Asp	6,6	0,2	0,7	2
L-Glu	14,4	0,02	0,04	0,1
D-Glu	2,6	0,6	7	24
L-Hyp	22	8	11	37
D-Hyp	1,8	0,01	0,2	0,6
L-Hys	7,6	0,01	0,05	0,2
D-Hys	3,4	0,02	0,1	0,5
L-Leu/L-Ile	6,7	0,02	0,1	0,4
D-Leu/D-Ile	12,7	0,03	0,06	0,2
L-Met	14,7	0,3	0,7	2
D-Met	2,2	0,6	8	27
L-Orn	3,7	0,01	0,1	0,3
L-Phe	17,7	0,07	0,1	0,3
D-Phe	4,3	0,06	0,4	1
L-Pro	6	0,02	0,08	0,3
L-Ser	15,5	0,02	0,04	0,1
D-Ser	3,4	0,1	1	4
L-Thr	8,8	0,01	0,05	0,2
D-Thr	4,6	0,01	0,09	0,3
L-Trp	15,9	0,07	0,1	0,4
D-Trp	4,7	0,02	0,1	0,4
L-Tyr	2,6	0,01	0,1	0,5
D-Tyr	3,7	0,1	1	4
L-Val	14,4	0,02	0,04	0,1
D-Val	6,3	0,1	0,6	2
Gly	3,8	0,1	0,8	3
MetSO2	3,1	0,2	2	5

I valori de limite di rilevabilità strumentali variano tra i 0,04 pg assoluti iniettati per la L-valina e 51 pg iniettati per la D-arginina. A differenza del metodo precedente si osserva poca differenza tra gli enantiomeri D e L.

La procedura di validazione descritta nel paragrafo 8.4 è stata analizzata con il metodo HPLC – API 4000 per la stima dei bianchi procedurali medi, delle rese di estrazione, delle accuratezze e della ripetibilità della procedura ed è riportata in tabella 9.7. Sono inoltre riportati gli standard marcati isotopicamente usati per la quantificazione.

Tabella 9.7: Risultati della prova di validazione della procedura pre- analitica per il metodo HPLC-API 4000.

COMPOSTO	MARCATO UTILIZZATO	BIANCO MEDIO (ng ass)	RESA %	CV%	ERRORE %	CV%
L-Ala	L-Ala*	102	51	10	-10	2
D-Ala	L-Ala*	12	62	7	4	3
L-Arg	L-Arg*	20	62	8	-2	9
D-Arg	L-Arg*	1,2	78	2	0,7	1
L-Asn	L-Val*	10	70	9	3	7
D-Asn	L-Val*	8	67	2	-4	9
L-Asp	L-Asp*	90	50	8	-7	6
D-Asp	L-Asp*	92	41	8	2	13
L-Glu	L-Glu*	50	58	7	-6	2
D-Glu	L-Glu*	10	57	9	-1	6
L-Hyp	L-Leu*	20	70	9	7	13
D-Hyp	L-Leu*	0,6	74	7	-5	10
L-Hys	L-Pro*	48	66	9	6	1
D-Hys	L-Pro*	42	49	7	-8	8
L-Leu/L-Ile	L-Leu*	30	60	5	-7	6
D-Leu/D-Ile	L-Leu*	12	59	5	-13	6
L-Met	L-Leu*	5	61	11	-2	8
D-Met	L-Leu*	3,4	65	9	-9	3
L-Orn	L-Arg*	202	43	13	2	14
D-Orn	L-Arg*	414	159	30	277	14
L-Phe	L-Phe*	20,2	63	5	-3	4
D-Phe	L-Phe*	0,3	70	4	7	9
L-Pro	L-Pro*	28	61	9	-4	3
L-Ser	L-Phe*	374	38	17	-2	8
D-Ser	L-Phe*	250	56	15	6	13
L-Thr	L-Arg*	26	65	6	-1	5
D-Thr	L-Arg*	1,4	72	6	5	6
L-Trp	L-Arg*	1,8	63	10	5	6

COMPOSTO	MARCATO UTILIZZATO	BIANCO MEDIO (ng ass)	RESA %	CV%	ERRORE %	CV%
D-Trp	L-Arg*	1,2	65	10	-0,2	9
L-Tyr	L-Phe*	34	66	13	8	10
D-Tyr	L-Phe*	1,4	67	9	7	10
L-Val	L-Val*	46	61	6	-6	2
D-Val	L-Val*	6	64	10	-5	5
Gly	L-Ala*	130	71	11	3	4
MetSO2	L-Leu*	26	58	8	-5	8

Con questo tipo di strumentazione è possibile calcolare i MDL e i MQL poiché lo strumento rivela un rumore di fondo che è possibile integrare in corrispondenza del tempo di ritenzione dell'analita. Con l'analizzatore orbitrap, l'elevata accuratezza di massa permetteva di eliminare il rumore di fondo non permettendo il calcolo di tali limiti. Le rese di estrazione variano tra il 38 % della L-serina e il 78% della D-arginina.

La procedura pre-analitica presenta valori di accuratezza compresi tra -13% (D Leu/Ile) e l' 8% (L-Tyr) ad eccezione della D-ornitina che, come già riscontrato con la strumentazione LTQ Orbitrap XL, non viene validata in quanto presenta un errore percentuale del 277%.

9.5) Confronto fra i due metodi strumentali messi a punto

Confrontando i due metodi messi a punto in questo lavoro di tesi nei quali vengono utilizzati due diversi tipi di analizzatori di massa, la principale differenza riscontrabile risiede nei limiti di rilevabilità. Nonostante venga utilizzata lo stesso metodo cromatografico, i LOD ottenuti con lo spettrometro di massa a triplo quadrupolo API 4000 sono sensibilmente più bassi rispetto a quelli ottenuti con lo spettrometro di massa LTQ Orbitrap XL. Questa differenza per alcuni composti risulta essere anche di un ordine di grandezza, come si può notare dal grafico in figura 9.3 in cui viene riportato un confronto tra i limiti di rilevabilità dei due metodi strumentali.

Confrontando i LOD ottenuti durante questo lavoro e quelli di alcuni metodi pubblicati in letteratura, il metodo HPLC – API 4000 sviluppato in questo lavoro di tesi presenta dei limiti di rilevabilità compresi tra 0,04 pg assoluti (L-Glu) e 51 pg assoluti (D-Arg) che risultano confrontabili con i migliori LOD pubblicati in letteratura da Barbaro et al. (2011) per l'analisi degli amminoacidi, nonostante in quest'ultimo metodo non venga operata una separazione chirale degli analiti. Altri metodi che prevedono la separazione chirale degli amminoacidi con fasi stazionarie chirali presentano limiti di rilevabilità sensibilmente più alti come ad esempio il metodo messo a punto da Petritis et al. (2001) con valori di LOD compresi tra 50 e 1200 pg.

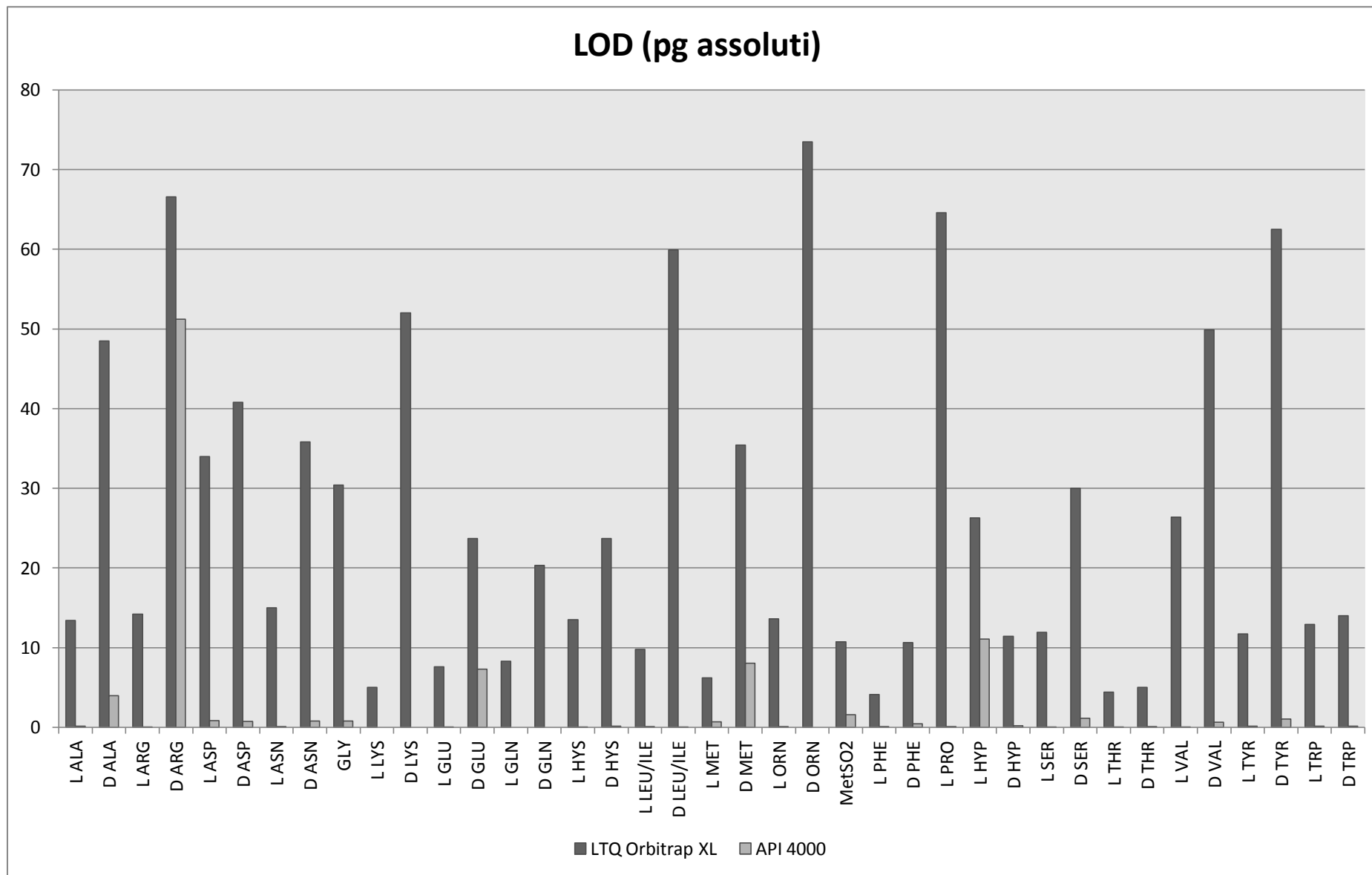


Figura 9.3: Confronto tra i LOD espressi in pg assoluti (10 μ L iniettati) dei due metodi analitici messi a punto in questo lavoro di tesi.

La maggiore sensibilità dello spettrometro API 4000 rispetto allo strumento LTQ Orbitrap XL può essere giustificata dalla maggiore efficienza di ionizzazione della sorgente ionica. Essa dipende dalla configurazione della sorgente di ionizzazione ESI dell'API 4000 (vedi paragrafo 4.3.1), che evita l'ingresso di ioni di carica opposta e di particelle neutre. Inoltre i due getti di gas riscaldato "turbo heaters" permettono un'evaporazione più efficace del solvente. Questa caratteristica è fondamentale in quanto l'eluizione degli amminoacidi nel metodo messo a punto avviene con un 70% di fase acquosa, richiedendo quindi una notevole quantità di gas e un'elevata temperatura per riuscire ad eliminare efficacemente il solvente di eluizione.

L'utilizzo di uno strumento più sensibile giustifica anche i risultati ottenuti dal confronto tra le analisi della procedura pre-analitica fatte con i due tipi di strumentazione. Confrontando le rese di estrazione infatti, si riscontra che per la maggior parte degli analiti si ha un recupero leggermente maggiore con lo spettrometro di massa a triplo quadrupolo, come illustrato dai grafici in figura 9.4 e 9.5. Le concentrazioni utilizzate per la validazione del metodo sono state opportunamente scelte per simulare le concentrazioni rilevabili nei campioni di aerosol antartico e quindi risultano molto basse, vicine ai LOD del metodo che impiega la trappola orbitalica. Nel metodo che utilizza il triplo quadrupolo, i picchi cromatografici risultano più facilmente integrabili rispetto a quelli del metodo in orbitrap che invece si avvicinano al rumore strumentale.

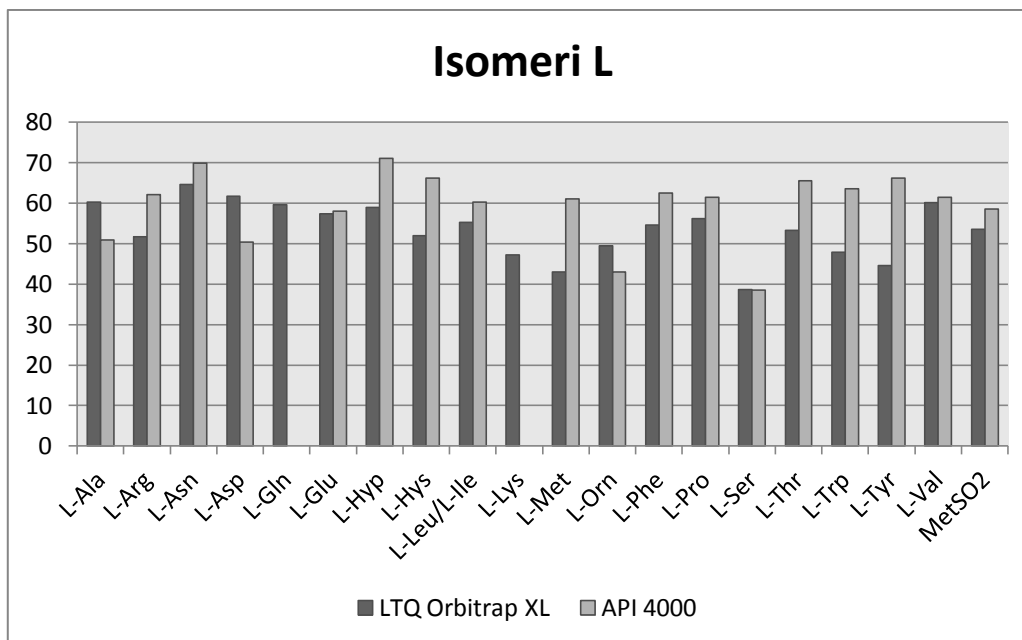


Figura 9.4: Confronto tra le rese % ottenute con i due metodi HPLC-LTQ Orbitrap XL e HPLC-API 4000 per gli isomeri L.

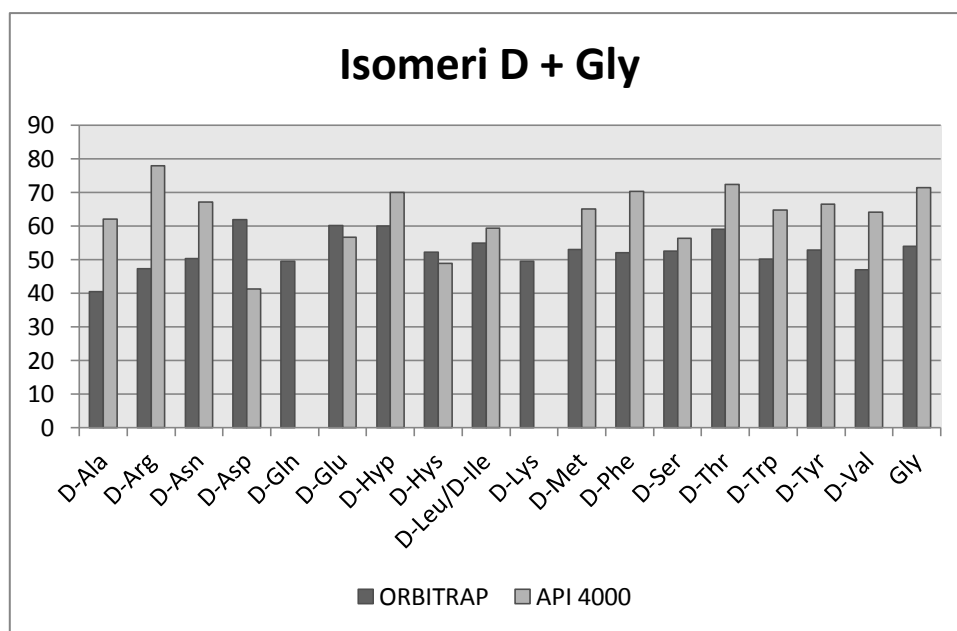


Figura 9.5: Confronto tra le rese % ottenute con i due metodi HPLC-LTQ Orbitrap XL e HPLC-API 4000 per gli isomeri D e per la Glicina.

Infine un ulteriore vantaggio offerto dall'utilizzo dello spettrometro di massa API 4000 consiste nel poter utilizzare come standard marcati isotopicamente anche quei composti che presentano un solo atomo di ^{13}C . Questi composti (nel nostro caso la ^{13}C Leucina, la ^{13}C Fenilalanina, la ^{13}C Prolina e la ^{13}C Valina) non possono essere usati con lo spettrometro di massa LTQ Orbitrap XL, in quanto

potrebbero interferire con la quantificazione. Lavorando in *full scan*, infatti, l'abbondanza isotopica naturale dell'analita nativo da quantificare potrebbe falsare il risultato delle analisi poiché verrebbe quantificata come standard interno. Il triplo quadrupolo, invece, determinando i composti attraverso le transizioni evita questo problema. Utilizzando un maggior numero di standard interni, soprattutto in casi come questo dove il numero degli analiti è considerevolmente alto, è possibile una quantificazione più precisa poiché si può scegliere lo standard interno che presenta le caratteristiche più simili al composto nativo che si intende determinare.

L'uso del relativo standard marcato isotopicamente per quantificare l'analita nativo inoltre è preferibile in quanto permette di eliminare l'effetto matrice, cosa che non è possibile se viene usato un altro standard interno.

9.6) Analisi di campioni di aerosol antartico con il metodo HPLC-API 4000

I campioni di aerosol atmosferico prelevati durante la XXVII spedizione antartica italiana presso la N/R Itlica sono stati analizzati con il nuovo metodo messo a punto che vede l'accoppiamento del metodo cromatografico chirale con lo spettrometro di massa a triplo quadrupolo API 4000. Nonostante tale strumentazione presenti LOD inferiori al metodo utilizzato in precedenza, le concentrazioni di molti analiti nei campioni antartici si sono dimostrate inferiori a tali limiti. In questo metodo l'analisi quantitativa dei campioni ha permesso di ottenere dei MDL e MQL relativi alla quantificazione di un bianco procedurale che si è dimostrato in questo caso superiore al LOD. In tabella 9.8 sono riportati i valori del bianco di campo medio e i corrispondenti valori di MDL e MQL per ogni analita.

Tabella 9.8: Valori di bianco di campo medio, MDL e MQL per i composti analizzati con il metodo HPLC-Triplo quadrupolo espressi in nanogrammi assoluti.

COMPOSTO	BIANCO MEDIO	MDL	MQL
L-Ala	150	44	150
D-Ala	30	22	74
L-Arg	3,6	2	6,6
D-Arg	3,8	3,2	10,4
L-Asn	10	6	19
D-Asn	16	6	22
L-Asp	42	30	102
D-Asp	102	50	170
L-Glu	24,8	5,6	18,4
D-Glu	12	8	26
L-Hyp	0,26	0,54	1,78
D-Hyp	1,2	1,4	4,6
L-Hys	50	16	54
D-Hys	8	10	32
L-Leu/Ile	76	32	104
D-Leu/Ile	3,4	5,8	19,4
L-Met	2,4	3,2	10,8
D-Met	8	10	32
L-Orn	250	58	190
L-Phe	5,4	2,8	9,6
D-Phe	6,2	5,8	19,4
L-Pro	14,8	3,8	12,6

COMPOSTO	BIANCO MEDIO	MDL	MLQ
L-Ser	170	138	462
D-Ser	98	84	278
L-Thr	10	5	18
D-Thr	2	1	19
L-Trp	2,6	5	16,6
D-Trp	1,4	1,2	4
L-Tyr	24	16	50
D-Tyr	6	8	26
L-Val	58	12	44
D-Val	5,8	3	10
Gly	88	50	164
MetSO2	8	14	50

I risultati dell'analisi quantitativa dei campioni sono illustrati in tabella 9.9, in cui viene riportata la concentrazione di ogni analita espressa in fmol m^{-3} di aria campionata e i volumi di aria campionata per ciascun campione. Nei campioni sono state determinate concentrazioni superiori al MQL di L-arginina, L-acido glutammico, L-fenilalanina e L-prolina e glicina.

Tabella 9.9: Concentrazioni espresse in fmol per m^3 di aria campionato rinvenute nei campioni di aerosol antartico..

	DATA E ORA carico ritiro	L-Arg	L-Glu	L-Phe	L-Pro	Gly	VOLUME DI ARIA CAMPIONATO (m^3)
CP1	13/1/12 15:00 19/1/12 1:30	251	398	148	384	4647	510,9603
CP2	19/1/12 10:29 23/1/12 21:00	50	93	<MQL	<MQL	1030	1386,381
CP3	25/1/12 20:40 30/1/12 0:30	140	148	74	138	1193	927,3014
CP4	31/1/12 23:02 7/2/12 6:20	87	148	50	59	666	1602,002
CP5	8/2/12 1:26 10/2/12 7:00	118	<MQL	<MQL	<MQL	1763	481,8192
CP6	12/2/12 20:40 18/2/12 18:23	39	<MQL	<MQL	81	1166	2154,059
CP7	18/2/12 16:49 20/2/12 2:50	133	291	128	236	2948	519,7305
MEDIA		117	216	100	179	1916	

Le concentrazioni medie di amminoacidi rinvenute nei campioni antartici oscillano tra 100 e 1916 fmol m^{-3} . Esse sono leggermente superiori rispetto a quelle dell'aerosol campionato in Artico nel quale si ritrovano concentrazioni medie di 78 fmol m^{-3} (Scalabrin et al., 2012). Nell'aerosol

oceanico di altre aree remote del pianeta sono state rinvenute concentrazioni superiori. Nel nordest dell'Oceano Pacifico queste si attestano sui 10 pmol m^{-3} (Matsumoto et al., 2005), mentre nell'Atlantico nord occidentale si ritrovano concentrazioni di 3 pmol m^{-3} (Gorzelska e Galloway, 1990). Le concentrazioni di amminoacidi aumentano se l'aerosol viene campionato in aree nelle quali vi è un contributo più o meno forte del trasporto a lunga distanza da sorgenti terrestri. Wedyan e Preston (2008) riportano concentrazioni di 200 pmol m^{-3} nell'aerosol campionato durante una traversata dell'Oceano Atlantico, Barbaro et al. (2011) rilevano concentrazioni medie di 334 pmol/m^{-3} nella laguna di Venezia, Mandalakis et al. (2010) di 172 pmol m^{-3} vicino all'isola di Creta, Mace et al. (2003) riscontrano concentrazioni da 15 a 160 pmol m^{-3} sull'isola di Tasmania (Australia) e da 30 a 800 pmol m^{-3} in una zona costiera della Turchia (Erdenli). Infine Zhang e Anastasio (2003) rinvencono concentrazioni da $2,8 \pm 1,3 \text{ nmol m}^{-3}$ nel $\text{PM}_{2,5}$ campionato nel Sud della California. I dati derivanti da questo confronto fanno supporre che le sorgenti terrestri sono quelle che contribuiscono maggiormente alla presenza di amminoacidi nell'aerosol, tuttavia anche lo spray marino può essere considerato una sorgente di amminoacidi importante.

L'analisi delle abbondanze relative di amminoacidi illustrata nel grafico di figura 9.6 mostra che il composto rinvenuto a concentrazione maggiore è la glicina (76%). Questo composto da solo copre i tre quarti del totale di amminoacidi rinvenuti.

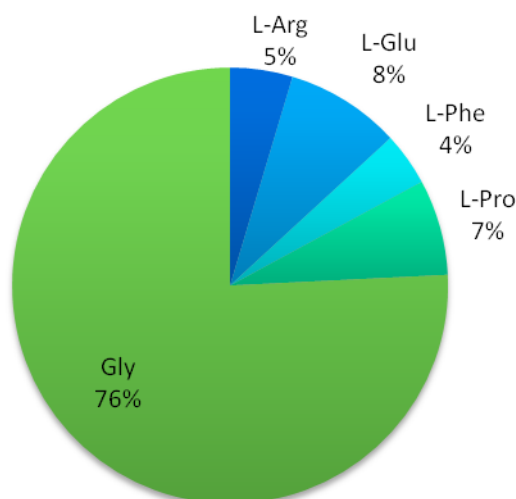


Figura 9.6: Abbondanze percentuali medie degli amminoacidi rinvenuti nei campioni di aerosol antartico.

I risultati ottenuti sono abbastanza simili rispetto a quelli riportati in letteratura. Da notare è la maggiore abbondanza relativa della glicina che comunque viene rilevato spesso a concentrazioni elevate nell'aerosol (Scalabrin et al., 2011, Matsumoto et al., 2005, Wedyan e Preston, 2008).

Questo dato può essere giustificato dalla bassa reattività della glicina (tempo di semivita di 19 giorni). Quanto rilevato potrebbe essere un indice della provenienza dell'aerosol dal trasporto a lunga distanza piuttosto che da sorgenti locali, dato confermato dalla presenza dell'acido glutammico (8%) il cui tempo di semivita è di 450 ore in atmosfera (Mc Gregor e Anastasio, 2001). I due analiti presentano nei campioni analizzati nel presente lavoro di tesi un coefficiente di correlazione R^2 di 0,9433, come si vede dalla figura 9.7. Questo è un'ulteriore conferma del fatto che le concentrazioni di glicina e acido glutammico nei campioni sono rappresentative di una stessa sorgente comune e tali composti rappresentano dei buoni traccianti del trasporto a lunga distanza.

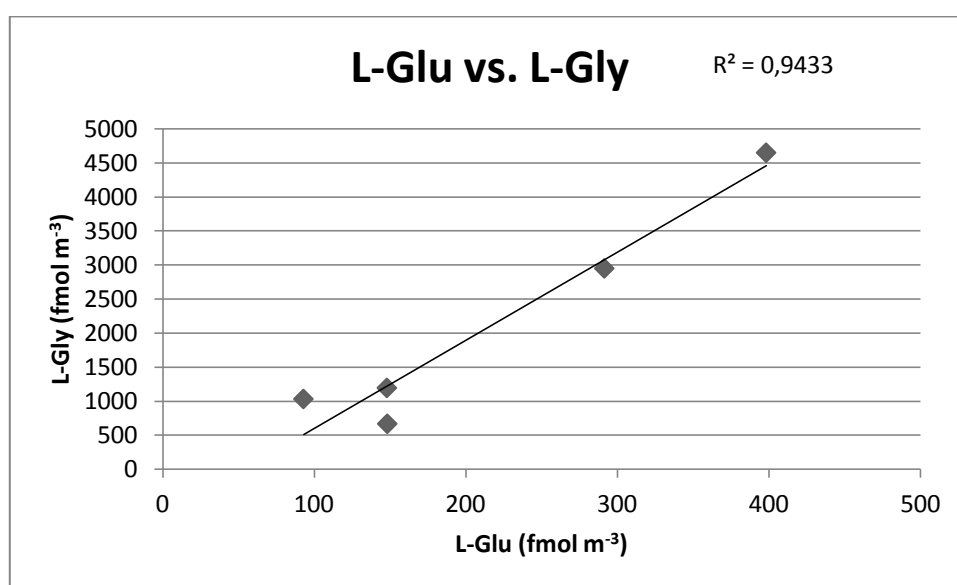


Figura 9.7: Correlazione tra le concentrazioni di glicina e acido glutammico nei diversi campioni.)

Nei campioni di aerosol analizzati non è stato ritrovato nessun amminoacido nella forma isomerica D. Molti studi condotti sulla determinazione dei rapporti enantiomerici degli amminoacidi nell'aerosol marino attribuiscono il ritrovamento di isomeri D alla presenza di materiale proteico di origine batterica (Wedyan e Preston, 2008, Kuznetsova et al., 2005). I composti D maggiormente riscontrati in letteratura sono il D-acido aspartico, il D-acido glutammico, la D-serina e la D-alanina (Wedyan e Preston, 2008; Dittmar et al., 2001). Questi sono alcuni dei composti che caratterizzano il peptidoglicano: il polimero che costituisce la parete cellulare dei batteri. Per questo motivo la loro presenza, soprattutto nell'acqua di mare, ma anche nell'aerosol (dato che è dimostrato che la composizione dell'aerosol marino riflette quella dell'acqua sottostante), viene definita come la "firma batterica" (Wedyan e Preston, 2008). Generalmente comunque i rapporti D/L sono sempre a favore dell'isomero L. Wedyan e Preston (2008) hanno riscontrato che nell'acqua sub superficiale

dell'oceano Atlantico i D-amminoacidi contribuiscono per un massimo del 25% sugli amminoacidi totali, mentre nell'aerosol queste percentuali erano considerevolmente più basse. Sulla base di queste considerazioni si può supporre che la quantificazione degli enantiomeri D nei campioni di aerosol antartico analizzati in questo lavoro non sia possibile in quanto le concentrazioni si trovano sotto al LOD, dato che già le concentrazioni degli enantiomeri L sono molto vicine a tale limite. Molti autori attribuiscono la prevalenza degli isomeri L sui D alla presenza di una maggior quantità di materiale fitoplanctonico nell'acqua (Wedyan e Preston, 2008, Kuznetsova et al., 2005). Questa ipotesi potrebbe essere considerata valida anche per i campioni analizzati in questo lavoro. A supporto di ciò, uno studio condotto sulla stima della produzione primaria nelle acque dell'oceano Antartico dimostra che nell'area del fronte polare il tasso di produzione primaria è incredibilmente uno dei più alti di tutta l'area indagata con un valore annuo stimato di circa $83,42 \text{ g C m}^{-2}$ (Wefer e Fischer, 1991). Si pensa che un valore così elevato sia dato dal contributo di alcune aree, tra cui anche il mare di Ross in cui è stato stimato un tasso di produzione primaria di $1 \text{ g C m}^{-2} \text{ d}^{-2}$ (El Sayed et al., 1983; Wilson et al.1986). L'abbondanza di fitoplancton in queste aree viene confermata anche dall'elevata concentrazione di clorofilla rilevata da sensori satellitari (fig. 9.8; Strutton et al., 2012).

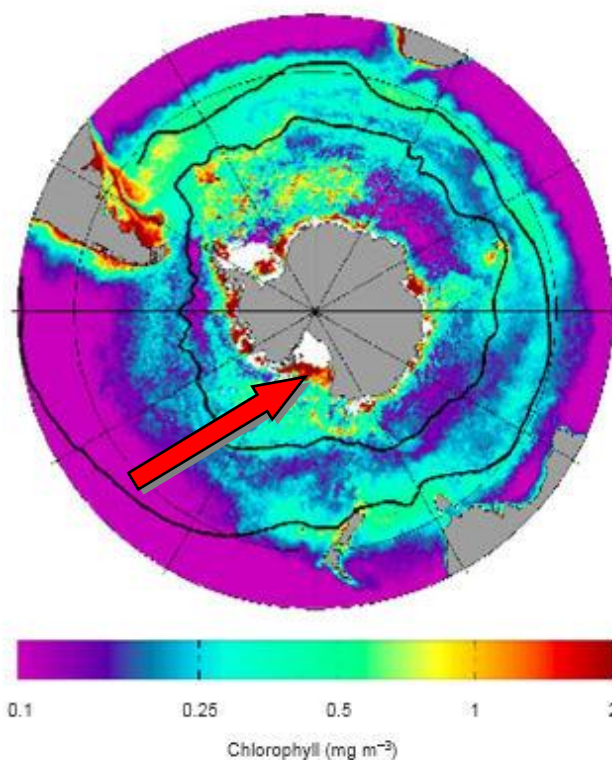


Figura 9.8: Concentrazione di clorofilla nel mese di gennaio nell'Oceano Antartico rilevata dal sensore satellitare ad alto campo di visione (SeaWiFS). La freccia indica la localizzazione del mare di Ross. (Strutton et al., 2012).

Il grafico di figura 9.9 mostra il confronto tra le concentrazioni dei singoli amminoacidi rinvenute nei diversi campioni espresse in fmol m^{-3} di aria. Vengono riportati anche qui i volumi effettivi di aria campionata. Le concentrazioni della glicina vengono mostrate in un grafico separato in figura 9.10 poiché differiscono molto dalle concentrazioni degli altri composti. Dalla figura 9.9 si nota immediatamente che i campioni CP1 e CP7 sono quelli nei quali sono state riscontrate le concentrazioni maggiori, i campioni CP2, CP5 e CP6 presentano valori molto bassi e la presenza di solo alcuni composti, infine i campioni CP3 e CP4 presentano valori di concentrazioni intermedi. Anche la glicina, rappresentata in figura 9.10, segue un andamento simile agli altri composti nei diversi campioni.

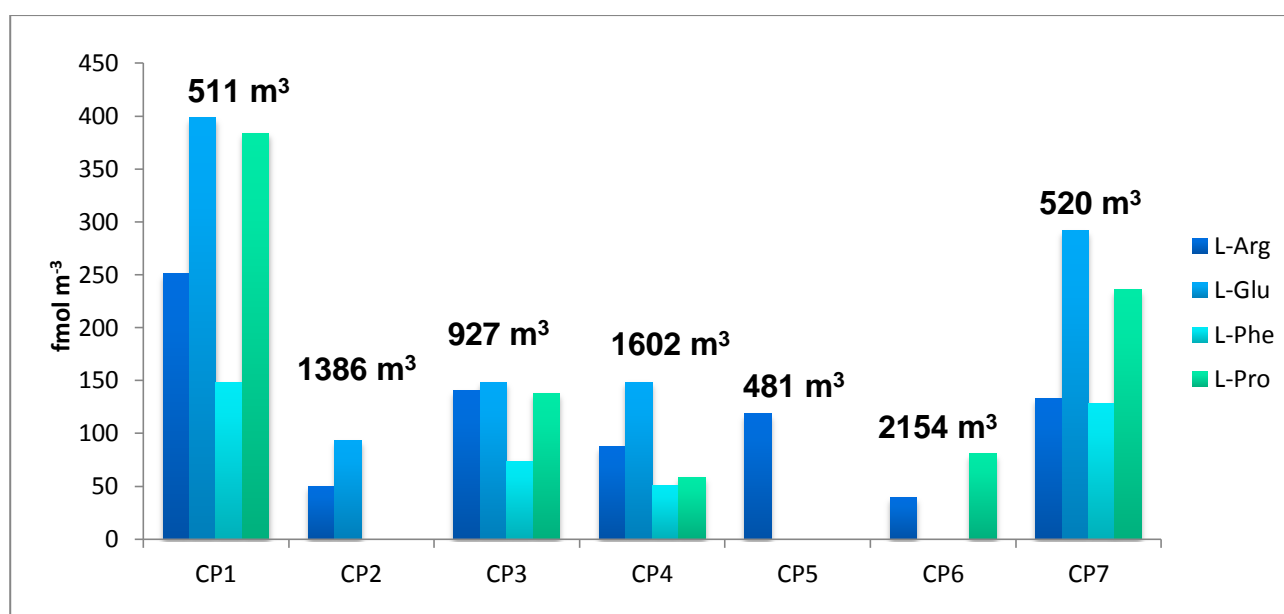


Figura 9.9: Confronto tra le concentrazioni degli amminoacidi rinvenuti nei campioni di aerosol antartico in fmol m^{-3} .

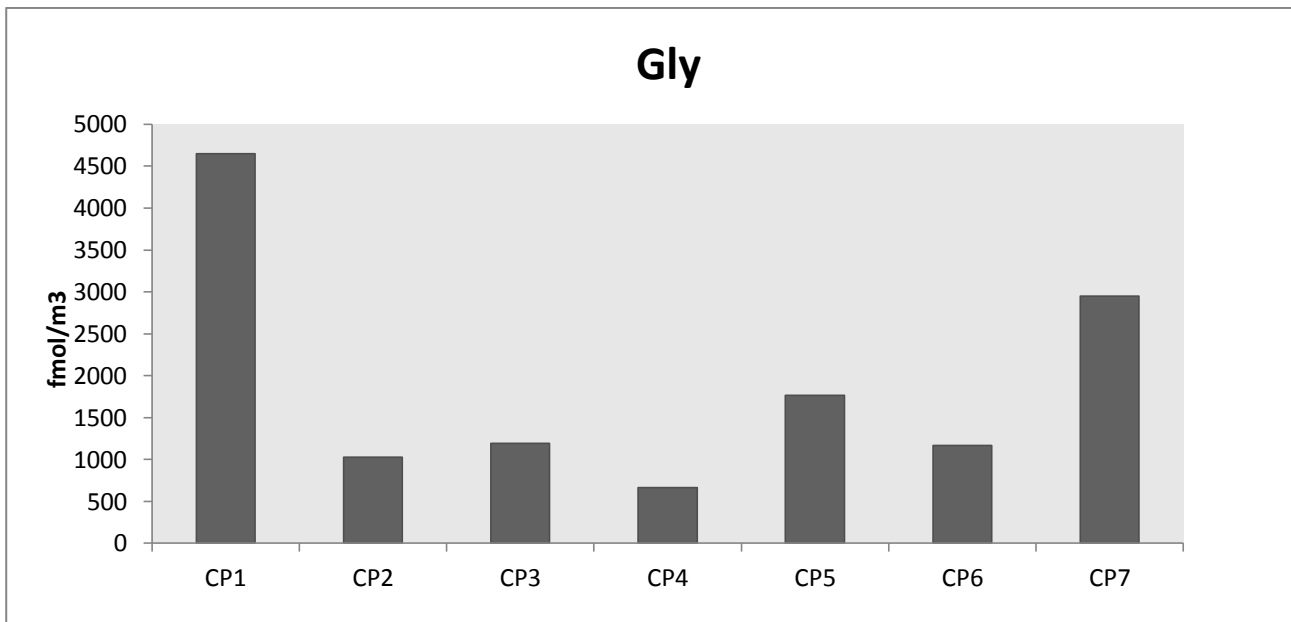


Figura 9.10: Concentrazioni di Glicina rinvenute nei campioni di aerosol antartico espresse in fmol m^{-3} .

Al fine di investigare il diverso andamento degli amminoacidi individuati in questo lavoro è stata condotta un'analisi delle retro traiettorie con il modello HYSPLIT del NOAA. Ogni campione corrisponde ad un tratto ben definito della rotta percorsa dalla nave durante la spedizione e quindi alle caratteristiche particolari del luogo in cui essa si trovava al momento del campionamento. Le condizioni meteorologiche inoltre possono influenzare significativamente il tipo e la quantità degli analiti campionati.

Il campione CP1 e il campione CP7 sono quelli che presentano in generale la maggiore concentrazione di tutti gli analiti. Questi due campioni sono stati prelevati rispettivamente durante la prima parte del viaggio di andata e l'ultima parte del viaggio di ritorno da e verso la Nuova Zelanda, come si può notare dalle figure 9.11 e 9.12 dove sono mostrate anche le retro traiettorie calcolate con il modello HYSPLIT del NOAA.

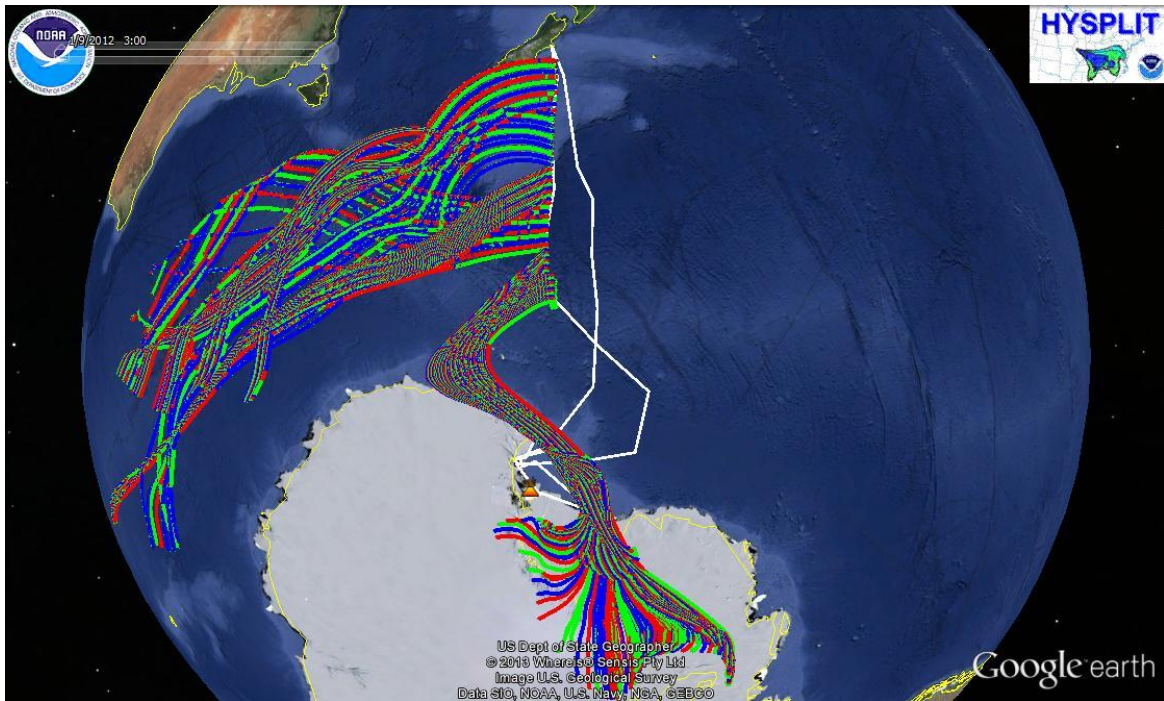


Figura 9.11: Retro traiettorie relative al campione CP1 (13-19/01/2012) calcolate con il modello HYSPLIT del NOAA.
 In bianco è segnalato il percorso effettuato dalla nave.

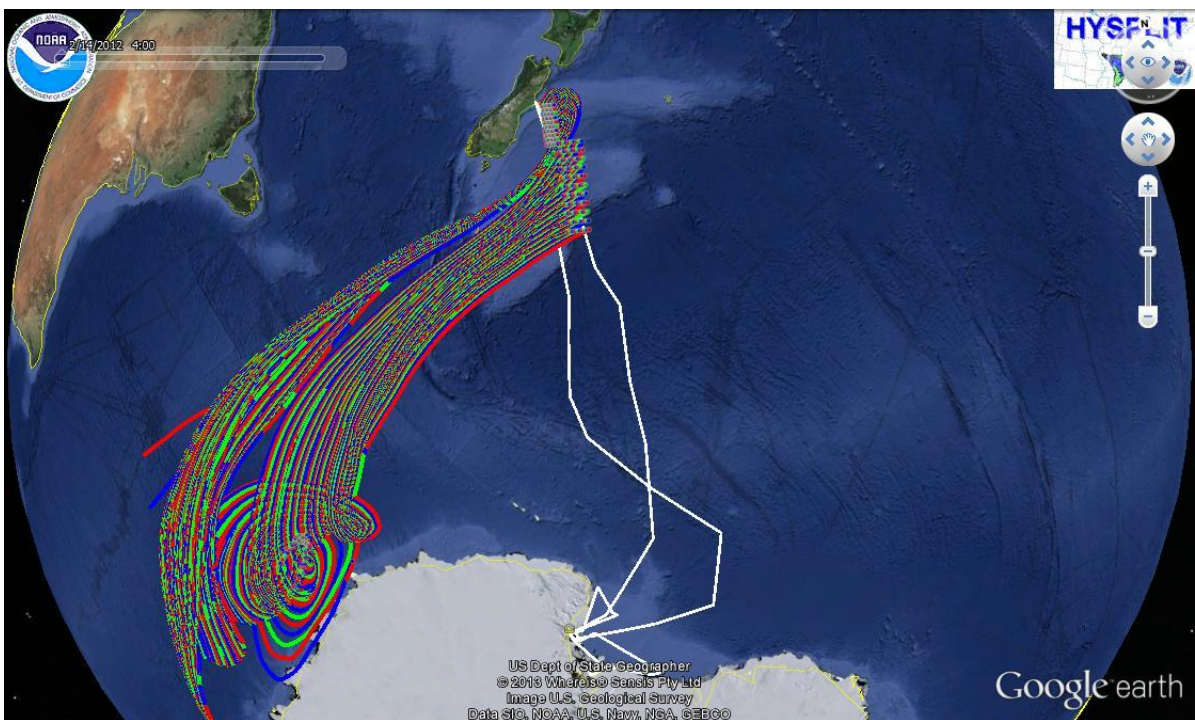


Figura 9.12: Retro traiettorie relative al campione CP7 (18-19/02/2012) calcolate con i modelli HYSPLIT del NOAA.
 In bianco è segnalato il percorso effettuato dalla nave.

Le retro traiettorie sono molto simili per i due campioni e le masse d'aria provengono generalmente da Ovest interessando soprattutto zone marine (tranne per gli ultimi giorni di campionamento del campione CP1, per cui le masse d'aria provengono dal continente Antartico).

Concentrazioni di amminoacidi più elevate rispetto agli altri campioni possono essere giustificate attraverso diverse ipotesi.

Il fattore temperatura potrebbe giocare un ruolo fondamentale: nel grafico di figura 9.13 viene mostrato l'andamento della temperatura media giornaliera dell'aria durante tutta la crociera oceanografica. I campioni CP1 e CP7 sono stati prelevati quando la temperatura dell'aria era elevata, trovandosi la nave a latitudini più temperate. Questo fattore potrebbe giustificare le concentrazioni più alte di amminoacidi, in quanto a temperature più elevate sia i processi metabolici sia le reazioni chimiche in atmosfera avvengono più velocemente e si ha una maggiore produzione di aerosol. Inoltre i suddetti campioni sono probabilmente quelli maggiormente influenzati da sorgenti di origine continentale localizzate in Nuova Zelanda, le quali potrebbero costituire una fonte importate di amminoacidi, anche se l'analisi delle retro traiettorie non supporta tale ipotesi.

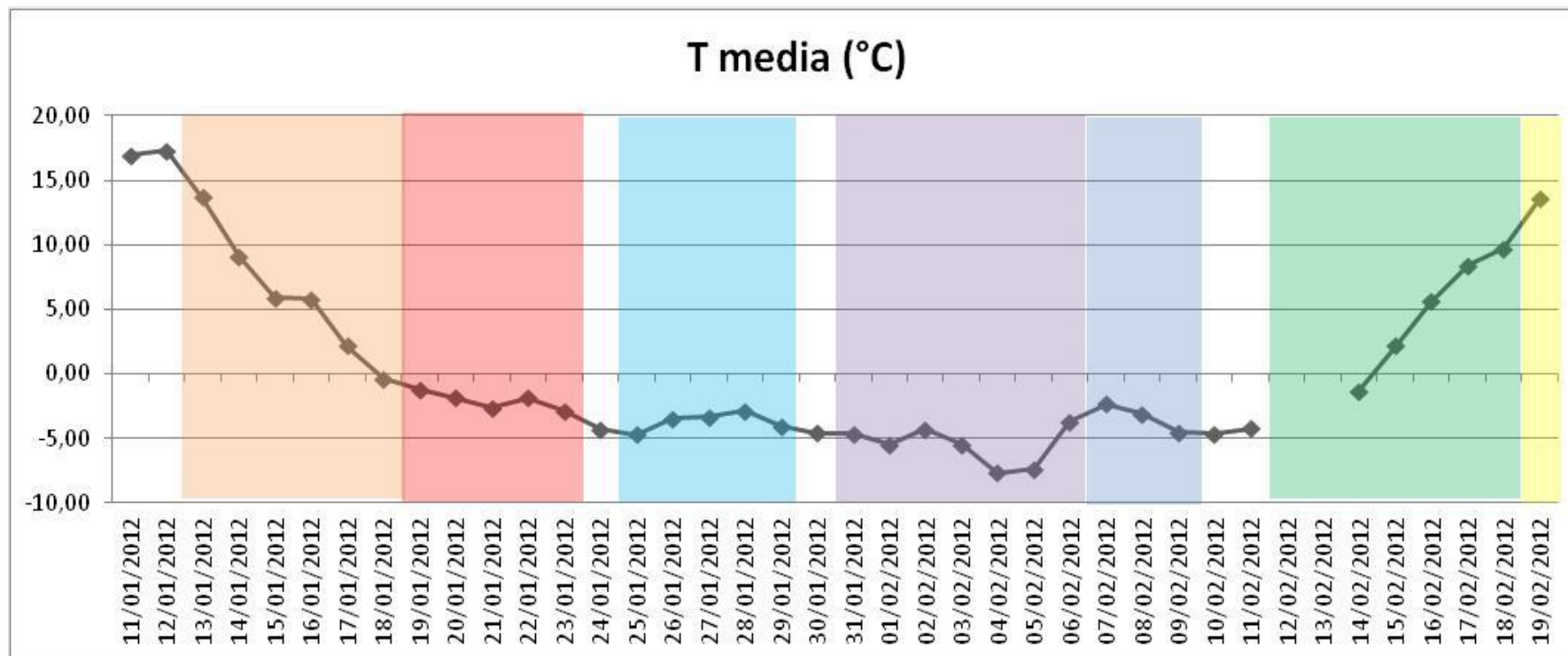


Figura 9.13: Andamento della temperatura media giornaliera durante la crociera oceanografica della M/N Italica (XXVII spedizione). Le diverse aree del grafico sono colorate sulla base del campione di appartenenza: CP1 arancione, CP2 rosso, CP3 azzurro, CP4 viola, CP5 blu, CP6 verde, CP7 giallo.

Il campione CP1 è quello che presenta le concentrazioni di amminoacidi più alte in assoluto. Durante il viaggio di andata, come riportato dal “Rapporto sulla Campagna Antartica - Estate Australe 2011-2012” (<http://www.italiantartide.it>), sono state incontrate condizioni meteorologiche particolarmente sfavorevoli con venti oltre i 30 nodi e raffiche che arrivano a 60-65 nodi. Questo fattore ha sicuramente influenzato il campionamento sollevando una grande quantità di spray marino che ha contribuito alle concentrazioni relativamente elevate rinvenute.

Anche il campione CP2 e il campione CP6 sono stati prelevati durante i viaggi di andata e ritorno, ma in zone dove la temperatura dell'aria (vedi grafico in figura 9.13) era più bassa e questo può aver contribuito al minore apporto di amminoacidi nell'aerosol. In particolare il campione CP2 è stato prelevato durante l'attraversamento di un pack di ghiaccio che ha impedito il sollevamento di spray marino. Gli analiti rinvenuti a concentrazioni più elevate in questo campione sono infatti la glicina e l'acido glutammico, derivanti probabilmente dal trasporto a lunga distanza (vedi figure 9.9 e 9.10).

Le retro traiettorie registrate durante due giorni di campionamento relativi ai campioni CP3 (29 gennaio) e CP4 (3 febbraio) sono illustrate nelle figure 9.14 e 9.15. Le masse d'aria che interessano questi due campioni provengono generalmente dall'interno del continente o dallo stesso mare di Ross, compiendo un giro all'interno. L'analogia delle traiettorie può spiegare la somiglianza in termini di concentrazioni e rapporti tra gli analiti di questi due campioni. Una caratteristica rilevante nei campioni CP3 e CP4 è la presenza della fenilalanina che è uno degli amminoacidi rilasciati durante le eruzioni vulcaniche (Mukhin et al., 1978). Una possibile sorgente di questo composto potrebbe essere attribuita al Monte Erebus, il vulcano attivo che si trova nella piana ghiacciata che caratterizza la zona più interna del Mare di Ross. Dallo studio delle retro traiettorie si nota che effettivamente alcune di queste intersecano il vulcano la cui localizzazione è mostrata nelle figure 9.14 e 9.15.

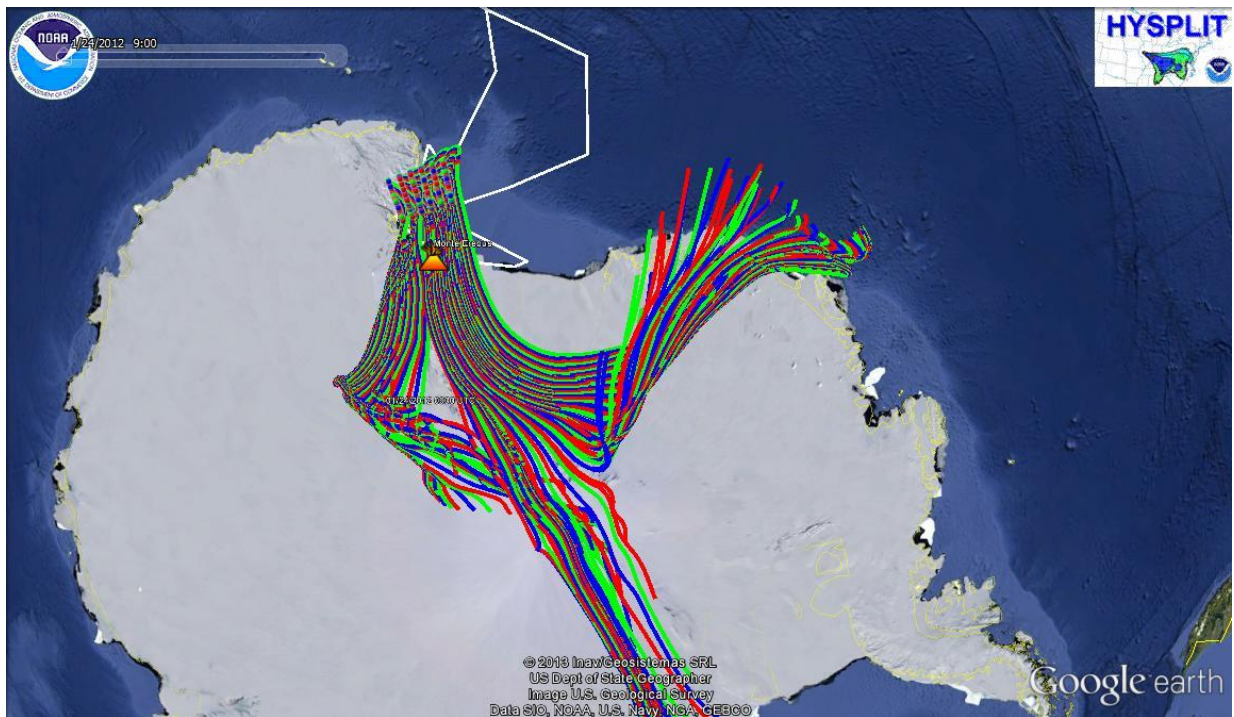


Figura 9.14: Retro traiettorie relative ad un giorno di campionamento del campione CP3 (29 gennaio 2012) calcolate con il modello HYSPLIT del NOAA. Viene evidenziata la posizione del monte Erebus. In bianco è segnalato il percorso effettuato dalla nave.

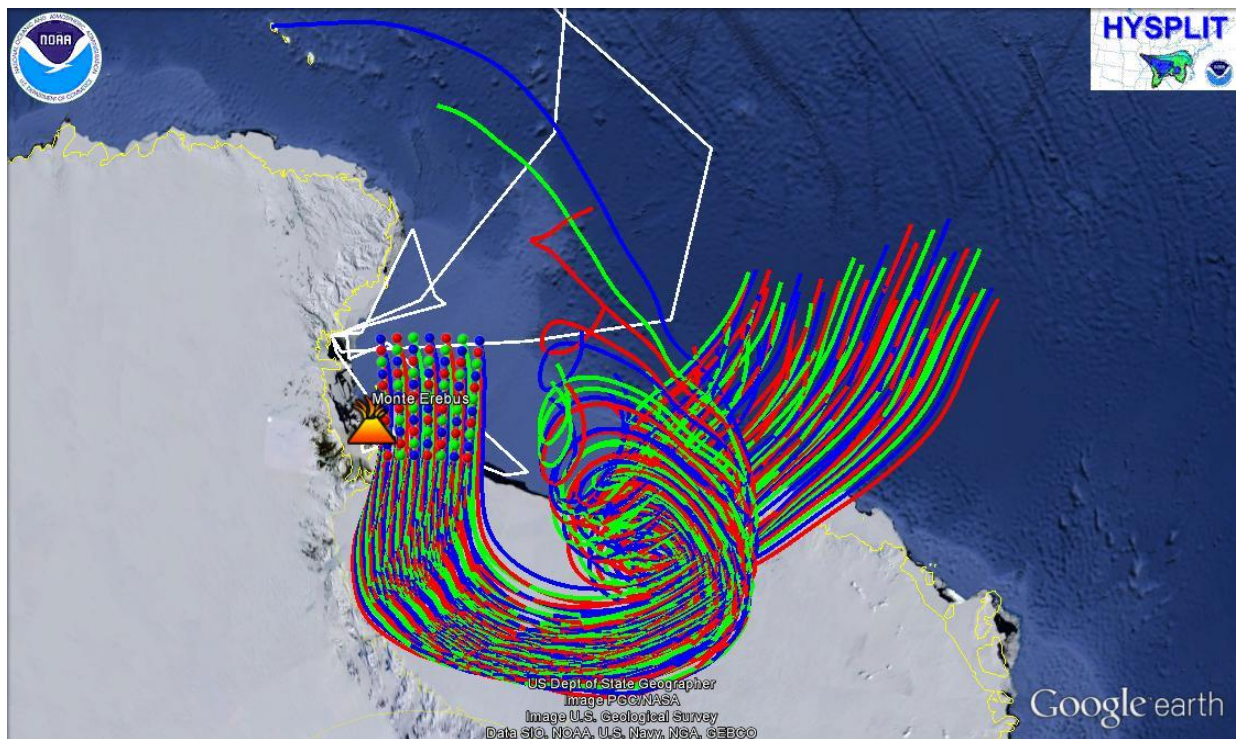


Figura 9.15: retro traiettorie relative ad un giorno di campionamento del campione CP4 (3 febbraio 2012) calcolate con il modello HYSPLIT del NOAA. Viene evidenziata la posizione del monte Erebus. In bianco è segnalato il percorso effettuato dalla nave.

Anche le retro traiettorie relative ad un giorno di campionamento (8 febbraio) del campione CP5, illustrate in figura 9.16, mostrano che le masse d'aria provengono dall'interno del continente antartico, tuttavia non è stata riscontrata in questo campione la fenilalanina, probabilmente perché tale campione è quello che presenta il volume di campionamento più basso (481 m^3 ; vedi figura 9.9), quindi non è stata campionata una quantità sufficiente di analita, tale da permetterne la quantificazione al di sopra del LOQ. Inoltre ciò che differenzia questo campione dagli altri prelevati alle stesse latitudini (e quindi in condizioni meteorologiche simili), è la maggior concentrazione di glicina e l'assenza della maggior parte degli altri analiti. Questo potrebbe essere indice di aerosol proveniente da trasporto a lunga distanza piuttosto che da sorgenti locali.

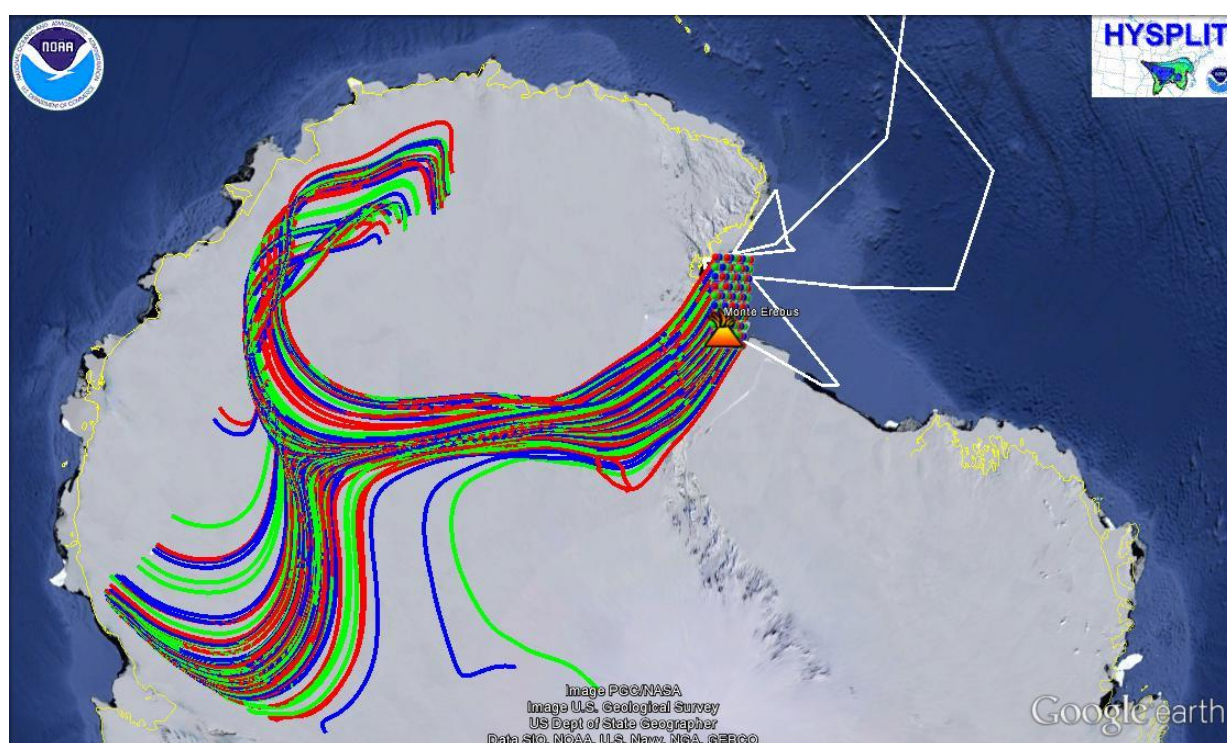


Figura 9.16: retro traiettorie relative ad un giorno di campionamento del campione CP5 (8 febbraio 2012) calcolate con il modello HYSPLIT del NOAA. Viene evidenziata la posizione del monte Erebus. In bianco è segnalato il percorso effettuato dalla nave.

I risultati presentati finora dimostrano come sia possibile l'utilizzo degli amminoacidi nell'aerosol come traccianti dell'attività biologica e più in generale come sia possibile a partire da questi composti effettuare delle considerazioni sulla provenienza e sull'età dell'aerosol campionato.

10) *Conclusioni*

In questo lavoro di tesi è stato messo a punto un metodo analitico per la determinazione degli enantiomeri D e L degli amminoacidi nell'aerosol atmosferico. Il metodo è stato applicato a campioni di aerosol antartico.

La separazione cromatografica degli analiti avviene attraverso l'utilizzo di una fase stazionaria chirale che non prevede la derivatizzazione dei composti. Questo rappresenta un fattore innovativo, poiché generalmente la separazione enantiomerica degli amminoacidi nell'aerosol viene effettuata attraverso la derivatizzazione degli analiti, procedura che comporta alcuni svantaggi tra cui una più complicata procedura di preparazione del campione, la quale rappresenta un potenziale rischio di contaminazione.

Il metodo cromatografico messo a punto è stato accoppiato dapprima ad un metodo che prevede l'utilizzo come detector di uno spettrometro di massa con trappola orbitalica. Successivamente sono stati validati il metodo strumentale e la procedura pre-analitica con la determinazione di resa, accuratezza e precisione. Nonostante venga usato uno strumento che lavora ad alta risoluzione, il metodo messo a punto non si è rivelato abbastanza sensibile da poter essere applicato all'analisi dei campioni di aerosol provenienti dall'Antartide. I limiti di rilevabilità del metodo, infatti, si attestano su valori da 4 (L-Phe) a 66 pg assoluti (D-Arg), valori ancora troppo alti per un ambiente incontaminato e quindi caratterizzato da concentrazioni di composti organici nell'aerosol estremamente basse.

Si è deciso quindi di accoppiare il metodo cromatografico ad un metodo che prevede l'utilizzo dello spettrometro di massa a triplo quadrupolo API 4000. Anche per questo metodo è stata effettuata la validazione della procedura pre-analitica. Il secondo metodo si è rivelato essere molto più sensibile rispetto al precedente con valori del limite di rilevabilità tra 0,04 (L-Val) e 51 pg assoluti (D-Arg). Per alcuni composti la differenza tra i limiti di rilevabilità dei due metodi arriva ad un ordine di grandezza. Pertanto la separazione enantiomerica degli amminoacidi accoppiata con l'utilizzo di uno strumento molto sensibile rappresentano un metodo innovativo rispetto ai metodi analitici generalmente utilizzati per la caratterizzazione dell'aerosol.

Il metodo HPLC-API 4000, assieme alla procedura pre-analitica validata, sono stati quindi utilizzati per l'analisi dei campioni di aerosol prelevati durante la XXVII spedizione italiana della N/R Italia

in Antartide. Le concentrazioni per la maggior parte degli amminoacidi indagati in questo lavoro di tesi sono risultate inferiori ai MDL. Soltanto la glicina, l'acido glutammico, la prolina, la fenilalanina e l'arginina presentavano concentrazioni al di sopra del MQL. La glicina è il composto che presenta le concentrazioni maggiori: con una media di 1916 fmol m^{-3} , essa rappresenta il 76% degli amminoacidi quantificati. Questo è in accordo con i dati riportati in letteratura che vedono la glicina come il composto rilevato a concentrazioni maggiori, essendo tra gli amminoacidi il meno reattivo in atmosfera. Inoltre per quanto riguarda la separazione enantiomerica degli amminoacidi, è stata riscontrata la presenza dei soli isomeri L che suggerisce la provenienza dell'aerosol campionato dallo spray marino e in particolare dall'attività fitoplanctonica, piuttosto che da attività batterica. Infine per ogni campione sono state analizzate le retro traiettorie e sulla base degli amminoacidi rilevati, sono state fatte delle ipotesi sulle sorgenti dell'aerosol campionato.

Tale lavoro di tesi rappresenta un punto di partenza per una caratterizzazione più approfondita dell'aerosol antartico. La metodologia pre-analitica utilizzata permette la determinazione di altri composti organici come il levoglucosan e i metossifenoli, consentendo di utilizzare lo stesso campione per un'analisi più approfondita dell'aerosol e la comprensione delle sorgenti di questi composti in aree remote. Lo svantaggio derivante da ciò è il fatto che con questa procedura di estrazione vengono analizzati solamente gli amminoacidi liberi o disciolti, mentre dai lavori riportati in letteratura le concentrazioni di amminoacidi maggiori si riscontrano nella fase particolata e nella frazione idrolizzabile. Un altro possibile sviluppo di questo lavoro è la possibilità di confrontare la composizione in amminoacidi dell'aerosol con la composizione di altre matrici ambientali, come ad esempio l'acqua sub-superficiale o il microlayer, in modo da verificare con maggiore certezza la provenienza dell'aerosol campionato.

11) *Elenco degli acronimi utilizzati*

APCI Atmospheric Pressure Chemical Ionization

API Atmospheric Pressure ionization

CAD Collisionally Activated Dissociation

CCN Cloud Condensation Nuclei

CE Collision Energy

CEM Channel Electron Multiplier

CLEC Chiral Ligand Exchange Chromatography

CSP Chiral Stationary Phase

CXP Cell Exit Potential

DP Declustering Potential

EP Entrance Potential

ESI Electro Spray Ionization

FAA Free Amino Acids

FFT Fast Fourier Transform

FIA Flow Injection Analysis

FR Fattore di Risposta

FWHM Full Width at Half Maximum peak height

HCD High Collision Dissociation

HPLC High Performance Liquid Chromatography

IS	Ion Spray Voltage
LOD	Limit Of Detection
LOQ	Limit Of Quantification
MDL	Method Detection Limit
MQL	Method Quantification Limit
MS	Mass Spectrometry
PM 2,5	Particulate matter 2,5 µm
PTFE	PoliTetraFluoroEtilene
PUF	Polyurethane Foam
QFF	Quartz Fiber Filter
RF	Radio Frequency
SIM	Single Ion Monitoring
TOC	Total Organic Carbon
UHPLC	Ultra High Performance Liquid Chromatography
UV	Ultra Violet

12) *Bibliografia*

Advanced Separation Technologies Inc. (2004). *Chirobiotic handbook*. 5th Edition

Baird, C., & Cann, M. C. (2006). *Chimica ambientale*. Zanichelli.

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(28), 5050-5057.

Bargagli, R. (2008). Environmental contamination in Antarctic ecosystems. *Science of the Total Environment*, 400(1), 212-226.

Bourcier, L., Sellegri, K., Masson, O., Zangrando, R., Barbante, C., Gambaro, A., ... & Laj, P. (2010). Experimental evidence of biomass burning as a source of atmospheric ¹³⁷Cs, puy de Dôme (1465 m asl), France. *Atmospheric Environment*, 44(19), 2280-2286.

Buiarelli, F., Gallo, V., Di Filippo, P., Pomata, D., & Riccardi, C. (2013). Development of a method for the analysis of underivatized amino acids by liquid chromatography/tandem mass spectrometry: application on Standard Reference Material 1649a (urban dust). *Talanta*.

Campbell, I. B., & Claridge, G. G. C. (1987). *Antarctica: soils, weathering processes and environment* (Vol. 368). Amsterdam: Elsevier.

Chan, M. N., Choi, M. Y., Ng, N. L., & Chan, C. K. (2005). Hygroscopicity of water-soluble organic compounds in atmospheric aerosols: Amino acids and biomass burning derived organic species. *Environmental science & technology*, 39(6), 1555-1562.

Colbeck, I. (Ed.). (2008). *Environmental chemistry of aerosols*. Blackwell Pub..

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

Decisione della Commissione (2002/657/EC) del 12 Agosto 2002 che attua la Direttiva 96/23/EC del Consiglio relative al rendimento dei metodi analitici e all'interpretazione dei risultati, *Gazzetta ufficiale della Comunità europea* L221, Brussels, Belgium, pp. 8–36.

- Department of Health (1995). Committee on the Medical Effects of Air Pollution. *Nonbiological particles and health*. London, HMSO 1995.
- Dittmar, T., Fitznar, H. P., & Kattner, G. (2001). Origin and biogeochemical cycling of organic nitrogen in the eastern Arctic Ocean as evident from D-and L-amino acids. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 65(22), 4103-4114.
- Ge, X., Wexler, A. S., & Clegg, S. L. (2011). Atmospheric amines—Part I. A review. *Atmospheric Environment*, 45(3), 524-546.
- Godel, H., Seitz, P., & Verhoef, M. (1992). Automated amino acid analysis using combined OPA and FMOC-Cl precolumn derivatization. *LC GC Int*, 5, 44-49.
- Gorzelska, K., & Galloway, J. N. (1990). Amine nitrogen in the atmospheric environment over the North Atlantic Ocean. *Global Biogeochemical Cycles*, 4(3), 309-333.
- Harrison, R. M., & Yin, J. (2000). Particulate matter in the atmosphere: which particle properties are important for its effects on health?. *Science of the Total Environment*, 249(1), 85-101.
- Jørgensen, N. O., Tranvik, L. J., & Berg, G. M. (1999). Occurrence and bacterial cycling of dissolved nitrogen in the Gulf of Riga, the Baltic Sea. *Marine Ecology Progress Series*, 191, 1-18.
- Karunakaran-Datt, A., & Kennepohl, P. (2009). Redox photochemistry of methionine by sulfur K-edge X-ray absorption spectroscopy: Potential implications for cataract formation. *Journal of the American Chemical Society*, 131(10), 3577-3582.
- Kawamura, K., & Kaplan, I. R. (1987). Motor exhaust emissions as a primary source for dicarboxylic acids in Los Angeles ambient air. *Environmental Science & Technology*, 21(1), 105-110.
- Kristensson, A., Rosenørn, T., & Bilde, M. (2009). Cloud droplet activation of amino acid aerosol particles. *The Journal of Physical Chemistry A*, 114(1), 379-386.
- Kuznetsova, M., Lee, C., & Aller, J. (2005). Characterization of the proteinaceous matter in marine aerosols. *Marine Chemistry*, 96(3), 359-377.
- Lange R., Fissan H., Schmidt –Ott A. (1996). Determination of equivalent diameters of agglomerates. *J. Aerosol Sci.* 27 (1), 417.
- Lee, C. (1976). Amino acids in modern and fossil woods. *Nature*, 259, 183-186.

- Lee, C., & Bada, J. L. (1977). Dissolved amino acids in the equatorial Pacific, the Sargasso Sea, and Biscayne Bay. *Limnol. Oceanogr*, 22(3), 502-510.
- Mace, K. A., Duce, R. A., & Tindale, N. W. (2003). Organic nitrogen in rain and aerosol at Cape Grim, Tasmania, Australia. *Journal of geophysical research*, 108(D11), 4338.
- Mace, K. A., Kubilay, N., & Duce, R. A. (2003). Organic nitrogen in rain and aerosol in the eastern Mediterranean atmosphere: An association with atmospheric dust. *Journal of geophysical research*, 108(D10), 4320.
- Makarov, A., & Scigelova, M. (2010). Coupling liquid chromatography to Orbitrap mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1217(25), 3938-3945.
- Mandalakis, M., Apostolaki, M., & Stephanou, E. G. (2010). Trace analysis of free and combined amino acids in atmospheric aerosols by gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1217(1), 143-150.
- Manisali, I., Chen, D. D., & Schneider, B. B. (2006). Electrospray ionization source geometry for mass spectrometry: past, present, and future. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 25(3), 243-256.
- Marconi, A. (2003). Materiale particellare aerodisperso: definizioni, effetti sanitari, misura e sintesi delle indagini ambientali effettuate a Roma. *ANNALI-ISTITUTO SUPERIORE DI SANITA*, 39(3), 329-342.
- Martínez-Rodríguez, S., Martínez-Gómez, A. I., Rodríguez-Vico, F., Clemente-Jiménez, J. M., Heras-Vázquez, L., & Javier, F. (2010). Natural Occurrence and Industrial Applications of d-Amino Acids: An Overview. *Chemistry & biodiversity*, 7(6), 1531-1548.
- Matsumoto, K., & Uematsu, M. (2005). Free amino acids in marine aerosols over the western North Pacific Ocean. *Atmospheric Environment* (39), 2163–2170.
- McCarthy, M. D., Hedges, J. I., & Benner, R. (1998). Major bacterial contribution to marine dissolved organic nitrogen. *Science*, 281(5374), 231-234.
- McGregor, K. G., & Anastasio, C. (2001). Chemistry of fog waters in California's Central Valley: 2. Photochemical transformations of amino acids and alkyl amines. *Atmospheric Environment*, 35(6), 1091-1104.

Mukhin, L. M., Bondarev, V. B., & Safonova, E. N. (1978). The role of volcanic processes in the evolution of organic compounds on the primitive Earth. *Modern Geology*, 6(3), 119-122.

Nelson, D. L., Lehninger, A. L., & Cox, M. M. (2008). *Lehninger principles of biochemistry*. Macmillan.

Pérez, M. T., Pausz, C., & Herndl, G. J. (2003). Major shift in bacterioplankton utilization of enantiomeric amino acids between surface waters and the ocean's interior. *Limnology and oceanography*, 48(2), 755-763.

Perry, R. H., Cooks, R. G., & Noll, R. J. (2008). Orbitrap mass spectrometry: instrumentation, ion motion and applications. *Mass spectrometry reviews*, 27(6), 661-699.

Petritis, K., Elfakir, C., & Dreux, M. (2002). A comparative study of commercial liquid chromatographic detectors for the analysis of underivatized amino acids. *Journal of Chromatography A*, 961(1), 9-21.

Petritis, K., Valleix, A., Elfakir, C., & Dreux, M. (2001). Simultaneous analysis of underivatized chiral amino acids by liquid chromatography–ionspray tandem mass spectrometry using a teicoplanin chiral stationary phase. *Journal of Chromatography A*, 913(1), 331-340.

Raes, F., Dingenen, R. V., 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(25), 4215-4240.

Ramanathan, V. C. P. J. K. J. T. R. D., Crutzen, P. J., Kiehl, J. T., & Rosenfeld, D. (2001). Aerosols, climate, and the hydrological cycle. *science*, 294(5549), 2119-2124

Remelli, M., Fornasari, P., & Pulidori, F. (1997). Study of retention, efficiency and selectivity in chiral ligand-exchange chromatography with a dynamically coated stationary phase. *Journal of Chromatography A*, 761(1), 79-89.

Rogge, W. F., Hildemann, L. M., Mazurek, M. A., Cass, G. R., & Simoneit, B. R. (1991). Sources of fine organic aerosol. 1. Charbroilers and meat cooking operations. *Environmental Science & Technology*, 25(6), 1112-1125.

S. E. Manahan, Environmental Chemistry, *Lewis Pub. Boca Raton, FLA*, 2000, VII Ed.

Sanderson 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., Zangrando, R., Barbaro, E., Kehrwald, N. M., Gabrieli, J., Barbante, C., & Gambaro, A. (2012). Amino acids in Arctic aerosols. *Atmospheric Chemistry and Physics*, 12(21), 10453-10463.
- Simoneit, B. R. (2002). Biomass burning—a review of organic tracers for smoke from incomplete combustion. *Applied Geochemistry*, 17(3), 129-162.
- Strutton, P. G., Hobart, T., Lovenduski, N. S., Mongin, M., & Matear, R. (2012). Quantification of southern ocean phytoplankton biomass and primary productivity via satellite observations and biogeochemical models. *CCAMLR Science*, 19, 00-00.
- Sun, J., & Ariya, P. A. (2006). Atmospheric organic and bio-aerosols as cloud condensation nuclei (CCN): A review. *Atmospheric Environment*, 40(5), 795-820.
- Szyrmer, W., & Zawadzki, I. (1997). Biogenic and anthropogenic sources of ice-forming nuclei: A review. *Bulletin of the American Meteorological Society*, 78(2), 209-228.
- Thermo Fisher Scientific™ (2008). LTQ Orbitrap XL™ Hardware Manual. Revision B – 1225830.
- Turner J., Colbeck I., Lazaridis M. (2008). Environmental chemistry of aerosols, *Colbeck*.
- Wang, Y., & Gu, M. (2010). The concept of spectral accuracy for MS. *Analytical chemistry*, 82(17), 7055-7062.
- Wedyan, M. A., & Preston, M. R. (2008). The coupling of surface seawater organic nitrogen and the marine aerosol as inferred from enantiomer-specific amino acid analysis. *Atmospheric Environment*, 42(37), 8698-8705.
- Wefer, G., & Fischer, G. (1991). Annual primary production and export flux in the Southern Ocean from sediment trap data. *Marine Chemistry*, 35(1), 597-613.
- William H. Brown, Thomas Poon (2005). Introduzione alla chimica organica, *Edisses*
- Wilson, D. L., Smith, W. O., & Nelson, D. M. (1986). Phytoplankton bloom dynamics of the western Ross Sea ice edge—I. Primary productivity and species-specific production. *Deep Sea Research Part A. Oceanographic Research Papers*, 33(10), 1375-1387.
- Zhang, Q., & Anastasio, C. (2003). Free and combined amino compounds in atmospheric fine particles (PM_{2.5}) and fog waters from Northern California. *Atmospheric Environment*, 37(16), 2247-2258.

Zhang, Q., & Anastasio, C. (2003). Free and combined amino compounds in atmospheric fine particles (PM_{2.5}) and fog waters from Northern California. *Atmospheric Environment*, 37(16), 2247-2258.

Zhang, Q., Anastasio, C., & Jimenez-Cruz, M. (2002). Water-soluble organic nitrogen in atmospheric fine particles (PM_{2.5}) from northern California. *Journal of Geophysical research*, 107(D11), 4112.

Zook, D. R., & Bruins, A. P. (1997). On cluster ions, ion transmission, and linear dynamic range limitations in electrospray (ionspray) mass spectrometry. *International journal of mass spectrometry and ion processes*, 162(1), 129-147.

Siti internet consultati

<http://www.italiantartide.it>

<http://www.minambiente.it>

<http://www.nonsoloaria.it>