



Università
Ca'Foscari
Venezia

Dipartimento di Scienze Molecolari e Nanosistemi

Corso di Laurea Magistrale in Chimica e tecnologie sostenibili

LM-54 (Scienze chimiche)

Tesi di Laurea Magistrale

**Determinazione del Levoglucosan in una
carota di ghiaccio: sviluppo del metodo e
trend temporale**

❖ ***Relatore***

Prof. Andrea Gambaro

❖ ***Laureanda***

Beatrice Falliero

❖ ***Correlatore***

Dott. Matteo Feltracco

❖ ***Matricola***

883061

ANNO ACCADEMICO 2021/2022

INDICE

SCOPO	5
1. INTRODUZIONE	7
1.1 CONTINUOS FLOW ANALYSIS-CFA	9
1.2 L'ANALITA: IL LEVOGLUCOSAN.....	11
2. UHPLC	13
2.1 DEFINIZIONE E SVILUPPO	13
2.2 DALL'HPLC ALL'UHPLC/UPLC.....	15
2.3 CROMATOGRAFIA A FASE INVERSA	17
2.4 RIVELATORI	18
3. ACCOPPIAMENTO LC/MS-MS	19
3.1 LA SPETTROMETRIA DI MASSA E LO SPETTROMETRO	19
3.2 LA SORGENTE	20
3.3 L'ANALIZZATORE.....	22
3.4 IL DETECTOR.....	24
4. IL SISTEMA IN CONTINUO: CFA-FLC-MS/MS	25
4.1 DETTAGLI DEL SISTEMA DI ANALISI IN FLUSSO CONTINUO (CFA)	
25	
4.2 LA CROMATOGRAFIA LIQUIDA RAPIDA (FLC-FAST LIQUID	
CHROMATOGRAPHY)	29
5. SVILUPPO DEL METODO ANALITICO	31
5.1 PARTE TEORICA DEL METODO ANALITICO	31

5.1.1	METODO STRUMENTALE	31
5.1.2	METODO CROMATOGRAFICO	31
5.1.3	PARAMETRI CROMATOGRAFICI.....	32
5.2	VALIDAZIONE DEL METODO ANALITICO	35
6.	CAMPIONAMENTO	37
6.1	SITO DI CAMPIONAMENTO.....	37
6.2	SISTEMA DI CAMPIONAMENTO	38
7.	PROCEDURA SPERIMENTALE.....	39
7.1	MATERIALI	39
7.2	LA METODOLOGIA ANALITICA CFA-FLC-MS/MS.....	40
7.3	SVILUPPO DEL METODO MRM	40
8.	RISULTATI E DISCUSSIONE.....	43
8.1	MESSA A PUNTO DEL METODO.....	43
8.1.1	SVILUPPO DEL METODO CROMATOGRAFICO.....	43
8.1.2	OTTIMIZZAZIONE DELLA SORGENTE ESI	52
8.2	RISPOSTA STRUMENTALE	55
8.2.1	LINEARITÀ.....	55
8.2.2	LIMITE DI RILEVABILITÀ E QUANTIFICAZIONE STRUMENTALI	
	56	
8.3	QUANTIFICAZIONE LEVOGLUCOSAN	57
8.4	IONI MAGGIORI.....	59
9.	CONCLUSIONI.....	63
10.	BIBLIOGRAFIA	65

SCOPO

L'obiettivo principale del seguente progetto di tesi è quello della messa a punto di un nuovo e più performante metodo analitico volto alla determinazione del levoglucosan, un anidrozucchero derivante dalla combustione di biomassa, in una carota di ghiaccio prelevata da un ghiacciaio delle Alpi austriache. Le carote di ghiaccio sono archivi climatici molto importanti che permettono la raccolta di informazioni della frazione disciolta e particellata custodita all'interno del ghiaccio. La determinazione di composti organici nel ghiaccio polare ed alpino è una sfida analitica considerato che sono spesso presenti alle concentrazioni di tracce e ultratracce in queste matrici. Risultano inoltre carenti le informazioni sul loro comportamento post-deposizionale ed i processi di degradazione.

Il levoglucosan deriva unicamente dalla degradazione durante la combustione della cellulosa e quindi si presta ad essere un tracciante chimico specifico della combustione di biomassa.

La metodologia analitica sviluppata nel presente lavoro di tesi è stata messa a punto utilizzando la cromatografia liquida collegata ad un triplo quadrupolo (HPLC-MS/MS) a sua volta accoppiata con un sistema di analisi in continuo "Continuous Flow Analysis" (CFA).

L'obiettivo specifico è quello di ottenere un metodo semi-continuo che permetta l'analisi ogni 30 secondi del levoglucosan in una carota di ghiaccio in scioglimento continuo. Questo lavoro si è focalizzato sull'ottimizzazione del processo cromatografico che possa fungere da collegamento e sincronizzatore tra lo scioglimento in continuo della carota di ghiaccio e l'analisi strumentale in spettrometria di massa.

Questo sistema semi-continuo permette di ottenere dati analitici ad elevata risoluzione spaziale nella carota di ghiaccio e conseguentemente una più accurata evoluzione temporale. Dal punto di vista analitico la metodologia sviluppata consente di minimizzare la contaminazione riducendo gli step procedurali pre-analitici, aumentare l'accuratezza e ridurre i tempi di analisi.

1. INTRODUZIONE

Le carote di ghiaccio (Fig.1.1) sono uno dei pochi archivi climatici capaci di dare una descrizione riguardo la composizione chimica dell'atmosfera e per questo risultano oggi molto importanti come oggetto di studio per il monitoraggio del cambiamento climatico.

Le analisi che si possono eseguire sulle carote di ghiaccio sono molteplici (Petit et al. 1999) e ciò incrementa l'interesse allo studio di questi archivi naturali, permettendo non solo di ricostruire il clima del passato, ma anche di comprendere meglio i meccanismi e le interazioni fra le diverse componenti del sistema climatico.

I ghiacciai e le calotte di ghiaccio consistono di strati di neve che lentamente si compatta sotto il proprio peso; questi vengono deformati, assottigliati, ma nella parte centrale delle calotte di ghiaccio, nelle quali i movimenti orizzontali sono quasi nulli, l'età dei livelli di ghiaccio aumenta progressivamente con l'aumento della profondità.

Le carote di ghiaccio contengono in genere numerose impurità che vengono utilizzate come traccianti chimici per indicare una sorgente o un processo ambientale o climatico. Una grande parte della letteratura relativa al paleoclima fa riferimento alla determinazione di specifiche impurezze inorganiche come: particelle di polvere insolubili, carbone nero, solfati, nitrati, ioni principali, elementi in traccia, isotopi, poiché sono marcatori di sorgenti di emissione oppure di determinati processi ambientali (Barbaro et al. 2022). Per esempio, la composizione isotopica delle carote fornisce informazioni fondamentali sulla temperatura di formazione della precipitazione nevosa del passato (Dansgaard, 1964; Johnsen et al., 1989). In particolare, le temperature del passato vengono ricavate studiando il rapporto tra isotopi pesanti dell'ossigeno, come ^{18}O e ^{16}O (Ruffell, 1999).

Nelle carote di ghiaccio troviamo bolle d'aria molto piccole ma molto importanti per lo studio del clima del passato (paleoclima). In queste bolle si intrappolano sostanze gassose come metano (CH_4), biossido di carbonio (CO_2) ed altri gas serra. Questo tipo di gas sono in grado di assorbire parte della radiazione infrarossa e di emetterla sotto forma di calore nell'atmosfera. Essi risultano essere i principali responsabili del riscaldamento globale, poiché generano appunto l'effetto serra, ed essendo fortemente correlati con la temperatura permettono la caratterizzazione dell'atmosfera passata e dunque lo studio del relativo clima.

Nel 1998, Michael E.M., Raymond B. e Malcom H., grazie all'analisi di una serie di dati paleoclimatici provenienti dagli anelli degli alberi, dalle carote di ghiaccio e dai coralli, ottennero un grafico a forma di mazza da hockey ("hockey stick") che ricostruiva le temperature dell'emisfero settentrionale fino a 1000 anni fa e mostrava come la temperatura media globale iniziò a salire drasticamente a partire dal ventesimo secolo. Lo studio dimostrò come il riscaldamento globale fosse causato principalmente dall'uomo e divenne argomento centrale di dibattito (Mann., 2021).



Figura 1.1. Carota di ghiaccio

L'ultimo milione di anni è scandito da una serie di grandi cambiamenti glaciali-interglaciali con cicli che durano circa 100.000 anni (Imbrie et al., 1992).

Due progetti di carotaggio del ghiaccio molto noti, che hanno fornito importanti informazioni sul clima del passato sono, quello che ha portato alla trivellazione presso la stazione russa di Vostok nell'Antartide orientale ed il progetto EPICA (Progetto Europeo di Carotaggio in Antartide) a Dome C e presso la stazione Kohnen. La carota estratta a Dome C, lunga 3259 metri, ha fornito i risultati sul clima fino a 800 mila anni fa. I dati ottenuti hanno mostrato il ripetersi di otto cicli glaciali ed interglaciali dipendenti da cause naturali. In questi cicli i valori della temperatura e della concentrazione di anidride carbonica (variabili fondamentali per la descrizione della crisi climatica) appaiono strettamente correlati tra di loro e mostrano un andamento periodico nel tempo (Lüthi et al., 2008).

Negli ultimi anni, la comunità scientifica si è concentrata sullo sviluppo ed il miglioramento di nuovi sistemi analitici, per misurare i livelli di concentrazione di marcatori chimici in campioni provenienti da archivi ambientali con una risoluzione temporale molto più elevata rispetto al passato.

I metodi analitici che si stanno via via sviluppando devono essere in grado di determinare la composizione chimica dei diversi strati di ghiaccio compressi negli anni, per riuscire così ad ottenere la massima risoluzione temporale possibile con un elevato livello di affidabilità, visto che i sistemi di analisi sono “distruttivi” e l’archivio climatico è analizzabile una sola volta.

A partire dagli inizi degli anni '90 l’analisi delle carote di ghiaccio si è via via evoluta, partendo dalle analisi su campioni discreti per arrivare ad analisi su campioni fusi in continuo, garantendo una minore contaminazione vista la ridotta gestione e preparazione del campione, ed anche un notevole ampliamento per quel che riguarda la risoluzione spaziale e temporale dell’analisi (Barbaro et al., 2022).

1.1 CONTINUOUS FLOW ANALYSIS-CFA

Le tecniche per lo scioglimento continuo del ghiaccio, note collettivamente come analisi a flusso continuo (Continuous Flow Analysis-CFA), si sono sviluppate rapidamente a partire dagli inizi degli anni '90.

Il progetto originale nacque all'Università di Berna (Sigg et al., 1994) ed oggi la CFA viene applicata per misurazioni continue di parametri fisici e chimici, per la determinazione di: impurità sia solubili che insolubili, isotopi stabili dell'acqua, gas nell'aria intrappolata all’interno del ghiaccio, acidità e conducibilità nelle carote di ghiaccio.

Nel corso degli anni i sistemi sono diventati via via più compatti, versatili e trasportabili. L’utilizzo, ad esempio di velocità di fusione differenziate per separare l’acqua esterna della carota, più contaminata, dal flusso di acqua interna più pulita, ha ridotto la contaminazione dei campioni (Spolaor et al., 2013).

L’acqua di fusione dello strato esterno è potenzialmente più contaminata poiché è più esposta al contatto con i fluidi di perforazione o dei tecnici in campo. Al contrario, il rischio di contaminazione del nucleo interno della carota viene notevolmente ridotto grazie all’utilizzo di materiali e/o rivestimenti di elevata purezza nella testa di fusione (Spolaor et al., 2013).

Fino ad oggi la CFA è stata principalmente accoppiata con tecniche analitiche come la spettrometria di massa al plasma induttivamente accoppiato (ICP-MS) (Knüsel et al., 2003), conduttimetri, contatori di particelle, ecc (Federer et al., 2008). Alcuni ricercatori hanno sviluppato anche un metodo per accoppiare la cromatografia ionica rapida (FIC) ad un sistema di fusione per la determinazione continua e quantitativa degli ioni maggiori presenti nel ghiaccio (Traversi et al., 2002).

In questo lavoro è stata utilizzata la cromatografia liquida rapida ad alte prestazioni accoppiata con la spettrometria di massa tandem (FLC-MS/MS). Il sistema è stato collegato con il sistema di analisi in continuo (CFA) mettendo a punto il metodo per la determinazione di un composto organico, il levoglucosan, in una carota di ghiaccio proveniente da un ghiacciaio austriaco. Sebbene simile alla FIC, questo set up strumentale possiede il vantaggio di essere utilizzato, grazie all'ottimizzazione dei parametri cromatografici e di spettrometria di massa, per determinare qualsiasi composto organico; invece, la FIC risulta limitata alla determinazione degli ioni.

Precedentemente a questo studio, la tecnica analitica in oggetto è stata utilizzata da Barbaro et al. (2022) per la determinazione in carote di ghiaccio alpine, di due composti fenolici: l'acido vanillico (VA) e l'acido siringico (SYA), prodotti di combustione della lignina, utili indicatori del tipo di vegetazione bruciata.

Nella figura sottostante (Fig.1.2) viene illustrato uno schema generale del sistema d'analisi in oggetto, successivamente, al capitolo 4, descriveremo in maggior dettaglio il set up strumentale del nostro sistema in continuo.

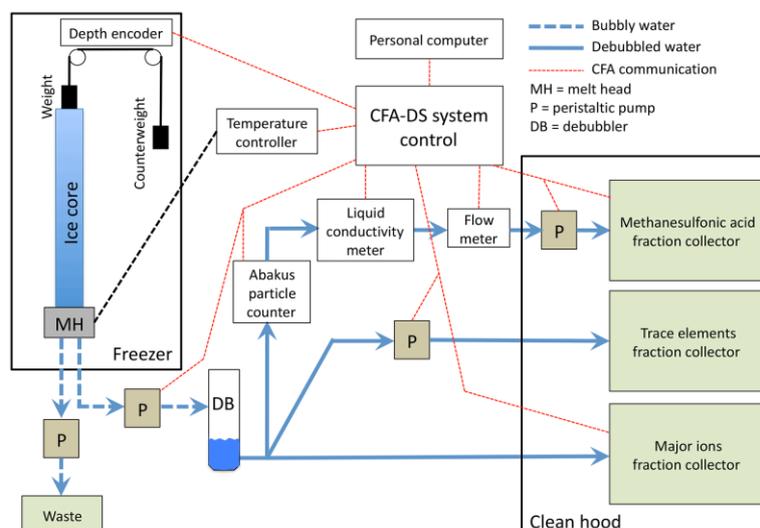


Figura 1.2. Schema generale di un sistema CFA (Winski et al., 2019)

1.2 L'ANALITA: IL LEVOGLUCOSAN

Il levoglucosan (1,6-anidro- β -D-glucopiranosio) (Fig. 1.3) è un monosaccaride anidro, prodotto esclusivamente dalla pirolisi della cellulosa e dell'emicellulosa a temperature maggiori di 300°C (Simoneit et al., 1999; Simoneit, 2002; Gambaro et al., 2008; Hoffmann et al., 2010). Il levoglucosan può essere rilasciato anche da incendi boschivi o erbacei, combustione di residui dall'agricoltura e riscaldamento residenziale (Fig.1.4). La combustione di combustibili fossili, la biodegradazione e l'idrolisi della cellulosa o altri processi naturali non risultano produrre levoglucosano (Elias et al., 2001), perciò esso risulta un marcatore estremamente specifico per l'individuazione di incendi in archivi ambientali.

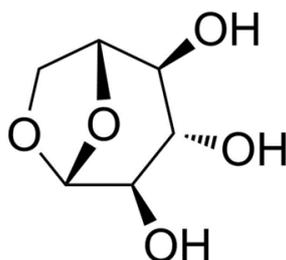


Figura 1.3. Levoglucosan (1,6-anidro- β -D-glucopiranosio)

L'applicabilità di qualsiasi tracciante chimico dipende fortemente dalla sua stabilità (reattività chimica nel mezzo). Precedenti studi di ricerca hanno evidenziato come il levoglucosan possa rimanere stabile in atmosfera per circa 10 giorni senza subire una degradazione significativa (Fraser et al., 2000).

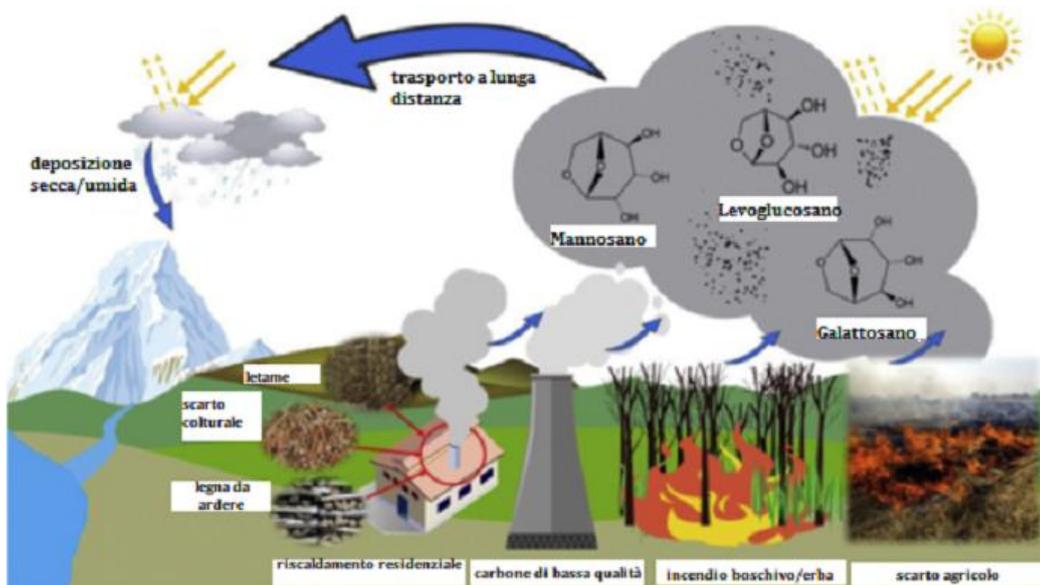


Figura 1.4. Sorgenti del levoglucosan, meccanismo di trasporto e deposizione atmosferica sulla superficie terrestre (Bhattarai et al., 2019)

Il levoglucosan può essere rilevato anche a grande distanza dalla fonte di emissione, come le zone artiche (Zennaro et al., 2014) ed antartiche (Gambaro et al., 2008; Kehrwald et al., 2012). È solitamente il più abbondante composto prodotto dagli incendi presente nella frazione fine del particolato, seguito da mannosan (1,6-anidro- β -D-mannopiranosio) e galattosan (1,6-anidro- β -D-galattopiranosio), i suoi due isomeri (Gambaro et al., 2008; Hoffmann et al., 2010).

Il levoglucosan viene rilasciato in atmosfera in quantità comprese tra 40 e 1200 mg per ogni kg di biomassa combusta (Simoneit et al., 1999); si deposita sulla superficie terrestre tramite deposizione secca ed umida e può essere intrappolato e preservato negli strati dei ghiacciai e nelle calotte di ghiaccio (McConnell et al., 2007; Stohl et al., 2007; Gambaro et al., 2008; Kehrwald et al., 2012; Zennaro et al., 2014).

Gli incendi boschivi sono un problema serio in tutto il mondo e contribuiscono direttamente al rilascio di prodotti tipici della combustione di biomassa negli aerosol ambientali, incluso il levoglucosan (Wang et al., 2017; Pio et al., 2008).

Le alte concentrazioni di levoglucosan nelle emissioni provenienti dalla combustione di biomassa e la relativa stabilità atmosferica rendono quindi questo composto un ottimo tracciante ambientale, sfruttabile per l'individuazione e la ricostruzione dell'attività incendiaria (Fraser et al., 2000; Hennigan et al., 2010; Hoffmann et al., 2010; Holmes et al., 2007; Kehrwald et al., 2012).

2. UHPLC

2.1 DEFINIZIONE E SVILUPPO

La cromatografia liquida è basata essenzialmente sul passaggio degli elementi costituenti una miscela tra due fasi non miscibili, così da poter essere separati sfruttando l'equilibrio di affinità. Il campione viene quindi sciolto nella fase mobile, in questo caso una fase liquida, e viene fatto scorrere su di una fase stazionaria contenuta all'interno di una colonna. I costituenti il campione, interagendo con la fase stazionaria in tempi differenti, vengono separati durante un certo intervallo di tempo detto "tempo di eluizione" ed infine rilevati singolarmente all'uscita della colonna. Il segnale che si ottiene dal rivelatore in funzione del tempo costituisce il "cromatogramma".

Questa tecnica permette quindi la separazione di miscele di composti che siano solubili nella fase liquida utilizzata, e riesce a discriminare analiti polari o apolari, neutri o ionici.

La cromatografia liquida fu introdotta nel 1906 utilizzando colonne di vetro con lunghezza compresa tra 50 e 500 cm ed un diametro tra 1 e 5 cm. L'impaccamento era costituito da particelle solide costituenti la fase stazionaria, su cui si adsorbiva il liquido da analizzare. Per ottenere le velocità di flusso di regime (circa 1 mL min^{-1}) si utilizzavano dimensioni delle particelle di solido tra i 150 e 200 μm , ma in ogni caso le separazioni richiedevano tempi molto lunghi. Per migliorare la separazione si tentò di applicare una pressione in grado di aumentare il flusso, ma ciò diminuiva il numero dei piatti teorici (N). Secondo la teoria classica l'efficienza della colonna viene valutata tramite l'altezza del piatto teorico (H) ed il numero di piatti (N), più è piccola l'altezza e maggiore sarà l'efficacia di separazione visto che ci sarà un maggior numero di piatti.

Questi due parametri sono relazionati alla lunghezza della colonna (L) secondo la seguente relazione:

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

Successivamente lo studio venne implementato attraverso la teoria cinetica, cioè andando a considerare la velocità e continuando ad utilizzare il modello dei piatti teorici. La teoria cinetica ci descrive le forme e l'allargamento delle bande cromatografiche in termini quantitativi basati su una

migrazione casuale delle molecole attraverso la colonna. In sintesi, l'efficienza della colonna cromatografica può essere misurata con una certa approssimazione tramite questa espressione:

$$H = A + \frac{B}{\bar{v}} + C\bar{v}$$

oppure in maniera più dettagliata mediante l'equazione:

$$H = A + \frac{B}{\bar{v}} + C_S \bar{v} + C_M \bar{v}$$

dove \bar{v} rappresenta la velocità lineare della fase mobile, A è la costante che descrive la distanza che percorre la particella nella fase mobile prima che la sua velocità venga alterata dall'impaccamento, B sta per la diffusione longitudinale e C_S e C_M sono rispettivamente i coefficienti di trasferimento di massa della fase stazionaria e mobile. Visto che i coefficienti di diffusione sono dipendenti dalle dimensioni molecolari, avremmo che la larghezza del picco dipenderà anche dalla massa molare relativa, masse molari ridotte favoriranno l'efficienza della colonna (Kellner et al., 2003).

L'evoluzione della cromatografia liquida si ebbe a partire dalla metà degli anni '60 quando il professor Horvath che lavorò precedentemente su colonne tubulari aperte a strato poroso per la gas cromatografia, decise di utilizzare per la cromatografia liquida delle piccole perline di vetro con uno strato poroso sulla superficie per facilitare l'interazione tra la fase liquida e la superficie. Le colonne impacchettate con queste perline sviluppavano una importante resistenza al flusso della fase liquida ed il professore arrivò a costruire uno strumento adatto a sviluppare un flusso continuo di liquido attraverso la colonna (Knox et al, 1975). Questa fu l'origine della "High Performance Liquid Chromatography" ("Cromatografia liquida ad alte prestazioni") - HPLC, termine introdotto nel 1970. Più tardi, nel 2001, Horvath definì il significato della parola "performance" come un "insieme di parametri di efficienza" (Fig.2.1).

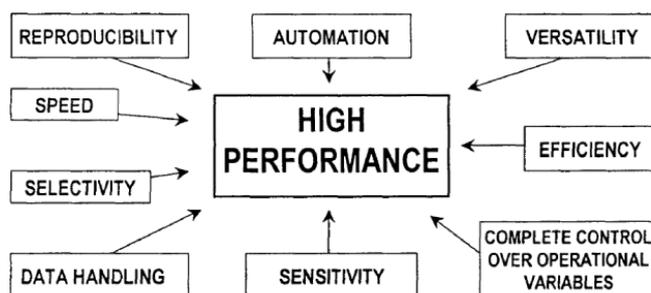


Figura 2.1. Parametri che definiscono il termine “*High Performance*” (Cramers et al., 1961)

Dagli anni ‘60 si sviluppò quindi la tecnologia che permise l’utilizzo di impaccamenti con particelle di diametro compreso tra 3-10 μm , la quale richiedeva delle pressioni di pompaggio molto più elevate rispetto a quelle utilizzate nelle tecnologie precedenti. Oggi, con il termine *cromatografia liquida ad alte prestazioni* si fa riferimento a quest’ultima tecnologia, per differenziarla dalla cromatografia su colonna iniziale, più semplice e meno performante. Tuttavia, la prima cromatografia su colonna viene ancora utilizzata per scopi preparativi (Skoog et al., 2004)¹.

I tipi di cromatografia liquida ad alta prestazione sono in genere classificati in base al tipo di fase stazionaria utilizzata o al meccanismo di separazione. Essi comprendono:

- Cromatografia di ripartizione o cromatografia liquido-liquido (LLC)
- Cromatografia di adsorbimento o cromatografia liquido-solido (LSC)
- Cromatografia a scambio ionico o cromatografia ionica (IC)
- Cromatografia ad esclusione dimensionale
- Cromatografia di affinità
- Cromatografia chirale

2.2 DALL’HPLC ALL’UHPLC/UPLC

La cromatografia liquida ad alte prestazioni (HPLC), è oggi una delle tecniche di separazione cromatografica più diffuse, moderne, potenti e versatili che vengono abitualmente utilizzate per separare, identificare e quantificare i componenti di complesse miscele. Le colonne normalmente utilizzate possiedono un diametro compreso tra i 2 e i 5 mm, una lunghezza variabile da 10 a 30 cm e con impaccamenti di 3 o 10 μm , fornendo in genere da 40000 a 60000 piatti teorici per metro. Negli

ultimi anni sono state introdotte microcolonne con diametri interni da 1 a 4.6 mm e lunghezze da 3 a 7.5 cm, impaccate con particelle di 3 o 5 μm contenenti fino a 100000 piatti teorici per metro, capaci quindi di consumare meno solvente e rendere l'analisi ancora più veloce.

L'impaccamento più comune nella cromatografia liquida è a base di silice, le particelle sono comunemente rivestite da sottili film organici legati chimicamente o fisicamente alla superficie (Skoog et al., 2004)².

L'Ultra-Performance Liquid Chromatography" ovvero la cromatografia ad altissime prestazioni (UPLC) è una tecnica cromatografica liquida avanzata che offre un tempo di analisi significativamente breve e l'utilizzo di una piccola quantità di solvente/i come fase mobile (Nováková et al., 2006). Offre un'efficienza di separazione e una risoluzione delle miscele di analiti molto migliori.

L'UHPLC e l'UPLC sono essenzialmente le stesse tecniche e non devono essere confuse come tecniche diverse. L'UHPLC è stata lanciata e registrata nel 2004 dalla Waters (Milford, MA, USA) sulla base di particelle porose inferiori a 2 μm (Nahar et al., 2019)¹.

La caratteristica principale degli strumenti UHPLC/UPLC sono le particelle usate nell'impaccamento della colonna, aventi un diametro inferiore a 2 μm rispetto alle particelle con diametro compreso tra 2.5 e 10 μm presenti nei sistemi HPLC convenzionali. Le particelle più piccole (< 2 μm) richiedono una pressione maggiore per funzionare e, di conseguenza, i sistemi UHPLC o UPLC devono essere in grado di sopportare pressioni più elevate (circa 1000 bar) rispetto ai sistemi HPLC che arrivano fino ai 250-300 bar. Operando quindi con particelle più piccole nell'impaccamento della colonna e con pressioni più elevate si ottengono risoluzioni maggiori, picchi più stretti ed una significativa riduzione dei tempi di ritenzione.

La dimensione della colonna è solitamente di 50–100 mm di lunghezza con un diametro interno di 2.1 mm. Lavorando con sistemi UHPLC, il tempo di esecuzione può essere ridotto fino a tre-nove volte rispetto a quello dei sistemi LC più semplici che utilizzano colonne con particelle rispettivamente da 3 e 5 μm (Nahar et al., 2019)².

2.3 CROMATOGRAFIA A FASE INVERSA

Il tipo di cromatografia liquida più utilizzato è la *cromatografia di ripartizione* in cui la fase stazionaria è rappresentata da un secondo liquido immiscibile con quello della fase mobile. La cromatografia di ripartizione può essere suddivisa in *cromatografia liquido-liquido* oppure in *cromatografia a fase legata*, ciò che le distingue è il modo in cui la fase stazionaria è legata sulle particelle costituenti l'impaccamento. Nella prima, il liquido è trattenuto grazie a forze di adsorbimento fisico mentre nella seconda, tramite legami chimici. Oggi possiamo dire che prevalgono i metodi cromatografici a fase legata vista la maggiore stabilità.

In base al livello di polarità della fase mobile e della fase stazionaria possiamo distinguere due tipologie di cromatografia di ripartizione: la *cromatografia a fase normale* e quella a *fase inversa* (Tab.1).

Tabella 1. Caratteristiche della cromatografia a fase normale ed inversa

Cromatografia	Fase stazionaria	Fase mobile
Fase normale	Polare	Apolare
Fase inversa	Apolare	Polare

Nella cromatografia a fase normale l'analita meno polare sarà quello eluito per primo e quindi aumentando la polarità della fase mobile si avrà una diminuzione del tempo di eluizione; al contrario nella cromatografia a fase inversa l'analita più polare sarà eluito per primo ed aumentando la polarità della fase mobile aumenterà anche il tempo di eluizione.

La grande maggioranza delle separazioni HPLC vengono oggi condotte con impaccamenti a fase inversa basati su ottil- o ottadecil- silossani (Skoog et al., 2004)³.

In questo lavoro di tesi, per la determinazione del levoglucosan, è stato utilizzato un sistema cromatografico a fase inversa equipaggiato con due colonne *Synergi™ 2.5 µm Hydro-RP 100 Å, 30 x 2 mm* con fase stazionaria C18 con capping polare ed un supporto solido in silice porosa (Fig.2.2).

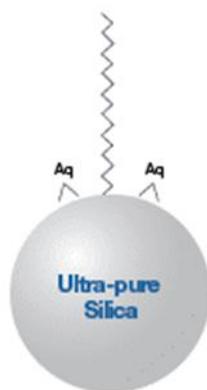


Figura 2.2. Fase stazionaria e supporto solido della colonna *Synergi™ 2.5 μm Hydro-RP*

2.4 RIVELATORI

I rivelatori per HPLC devono essere piccoli e compatibili con il flusso di liquido utilizzato. Quelli utilizzati maggiormente in cromatografia liquida si basano sulle misure di assorbanza nella regione dell'UV-VIS, sul mercato sono disponibili diversi fotometri e spettrofotometri costruiti ad hoc.

Attualmente è sempre più diffuso l'utilizzo della cromatografia liquida accoppiata con la spettrometria di massa.

Il principale vantaggio nell'utilizzo di uno spettrometro di massa come rivelatore, rispetto ad altri tipi di rilevazione cromatografica (spettrometro UV, fluorimetro, etc), sta nella sensibilità e nella specificità della risposta, visto che ogni analita viene rivelato in base al rapporto massa/carica (m/z) degli ioni generati (Ardrey, 2003). Grazie all'accoppiamento con la spettrometria di massa si ottiene un'elevata selettività poiché i picchi non risolti possono essere isolati monitorando un'unica massa selezionata.

3. ACCOPPIAMENTO LC/MS-MS

3.1 LA SPETTROMETRIA DI MASSA E LO SPETTROMETRO

La spettrometria di massa viene applicata in campo analitico in molti studi sia qualitativi che quantitativi. Le sue applicazioni permettono di ottenere la composizione qualitativa e quantitativa di certe miscele complesse, di determinare la composizione elementare ed i rapporti isotopici degli analiti studiati e persino di descrivere la composizione di superfici solide.

Lo spettrometro di massa è costituito da tre componenti fondamentali che sono alloggiati in una zona ad alto vuoto e sono:

- La sorgente: produce gli ioni gassosi dell'analita;
- L'analizzatore: separa gli ioni in base al rapporto m/z ;
- Il detector/rivelatore: raccoglie gli ioni generando un impulso quantificabile e registrabile.

Nella figura sottostante viene riportato uno schema delle componenti costituenti lo spettrometro di massa (Fig.3.1).

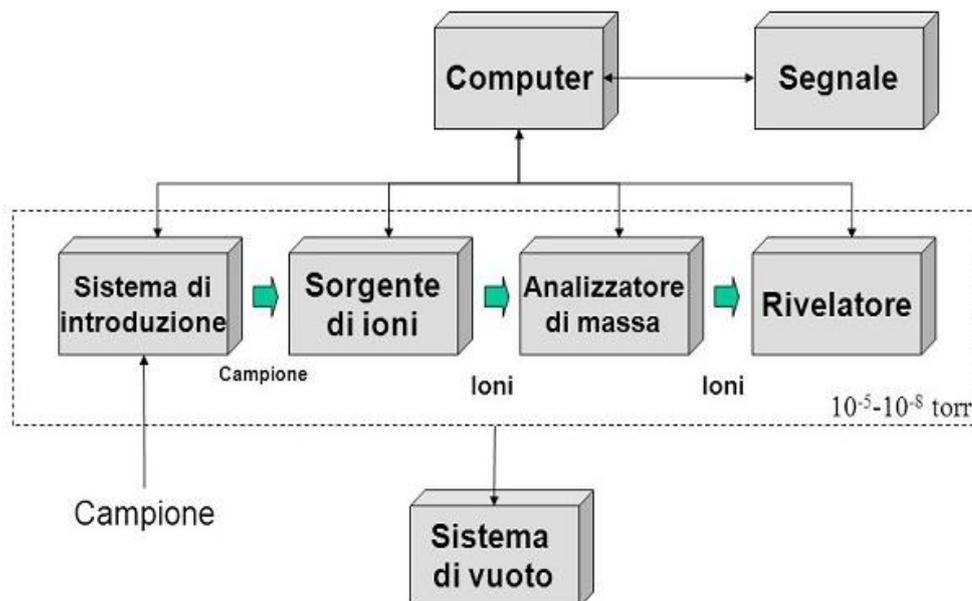


Figura 3.1. Diagramma a blocchi di uno spettrometro di massa

Per questo progetto di tesi è stato utilizzato uno spettrometro di massa a triplo quadrupolo API 4000 (Applied Biosystem/MSD SCIEX, Concord, Ontario, Canada) con sorgente elettrospray (ESI) Turbo V™.

3.2 LA SORGENTE

Per accoppiare la cromatografia liquida con lo spettrometro di massa avremo bisogno di una adeguata sorgente che oltre a volatilizzare, frammentare, ionizzare gli analiti li faccia passare dalla zona ad alta pressione della cromatografia in quella a bassa pressione dell'analizzatore.

Il sistema più diffuso per realizzare l'accoppiamento LC/MS è quello che permette di fare un salto intermedio alla pressione ed ottenere le così dette sorgenti a *ionizzazione a pressione atmosferica (API)*.

Le API si dividono in tre gruppi: ESI (Elettrospray Ionization), APPI (Atmospheric Pressure PhotoIonization), APCI (Atmospheric Pressure Chemical Ionization). Queste sono tutte sorgenti soft che permettono di ottenere ioni molecolari, e vengono usate in base all'analita da analizzare.

Per questo progetto è stata utilizzata la sorgente ESI (Fig.3.2), del tipo Turbo V™ (Fig.3.3), dotata di un capillare posto perpendicolarmente rispetto all'ingresso del cono *curtain plate*. Questa disposizione favorisce l'eliminazione degli ioni neutri che tenderanno a non essere attratti dal potenziale dei piatti. Sono poi presenti altre due piastre, dette *orifice plate* e *skimmer cone*, dotate di fori al centro sempre più piccoli, con lo scopo di mantenere il vuoto e convogliare gli ioni all'analizzatore.

La sorgente ESI permette lo studio di composti ionici polari ed opera a basse velocità di flusso (fino a 0.6 – 0.7 mL min⁻¹). Il processo di ionizzazione consiste sia nella nebulizzazione del flusso di liquido in un aerosol di goccioline cariche, sia nella ionizzazione vera e propria delle goccioline previa desolvatazione.

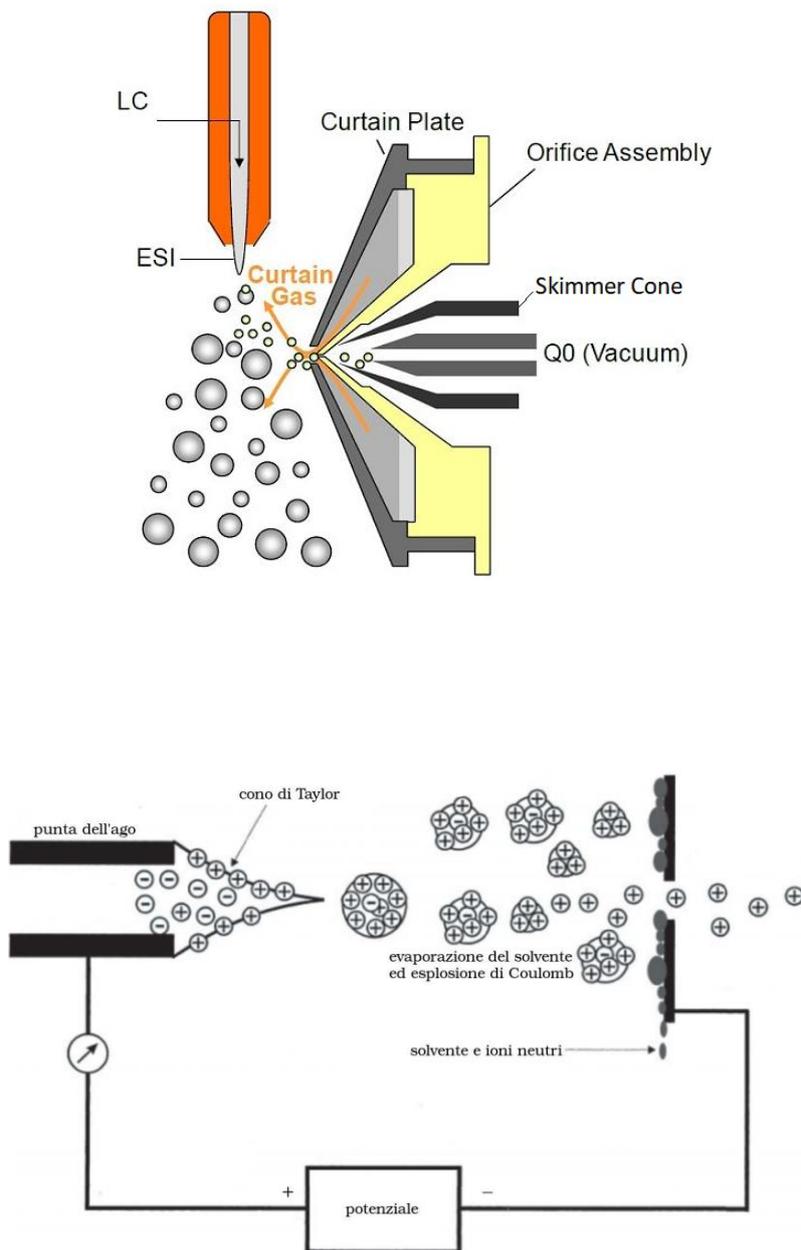


Figura 3.2. Sorgente ESI (*sopra*) e meccanismo di desolvatazione (*sotto*)

La soluzione liquida in uscita dalla colonna cromatografica attraversa un capillare in cui viene caricata da un potenziale elettrico (formando il cosiddetto "cono di Taylor") e nebulizzata mediante un gas ausiliario. Quest'ultimo permette la desolvatazione delle goccioline così che, grazie anche all'elevata temperatura della sorgente, si viene a creare un aumento della densità di carica superficiale sino al raggiungimento del *limite di Rayleigh* con l'esplosione di Coulomb. A questo punto, il potenziale opposto applicato al *curtain plate* attira lo spray di goccioline cariche e permette agli ioni carichi di

entrare nell'analizzatore. Questo meccanismo si ripete a cascata portando alla formazione di ioni desolvatati in fase gassosa, con carica unitaria o multipla.

Nella sorgente utilizzata troviamo poi due getti “*turbo heaters*”, con angolo di 45°, che immettono nella sorgente gas riscaldato così da accelerare l'evaporazione del solvente. Questi due getti assicurano corrette condizioni di lavoro fino ad un flusso di 2 mL min⁻¹, contro il valore massimo raggiungibile che sarebbe di 10 µL min⁻¹.

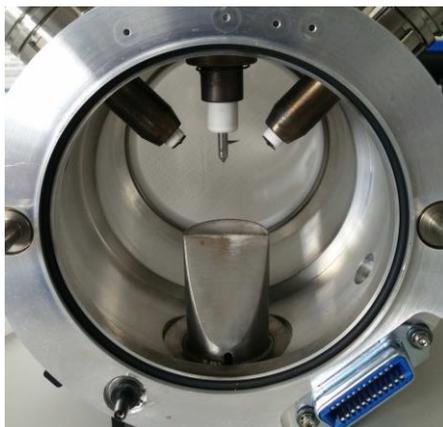


Figura 3.3. Sorgente Turbo VTM

3.3 L'ANALIZZATORE

Lo spettrometro di massa utilizzato è costituito da un analizzatore “a triplo quadrupolo” (Fig.3.4). Subito dopo il sistema di piastre è installato un quadrupolo (Q0) che funge esclusivamente da focalizzatore per gli ioni. Q1 e Q3 fungono da filtri di massa, mentre interposta a questi ultimi è presente la cella di collisione Q2. Quest'ultima è riempita con un gas neutro (N₂) che per collisione permette la frammentazione degli ioni.

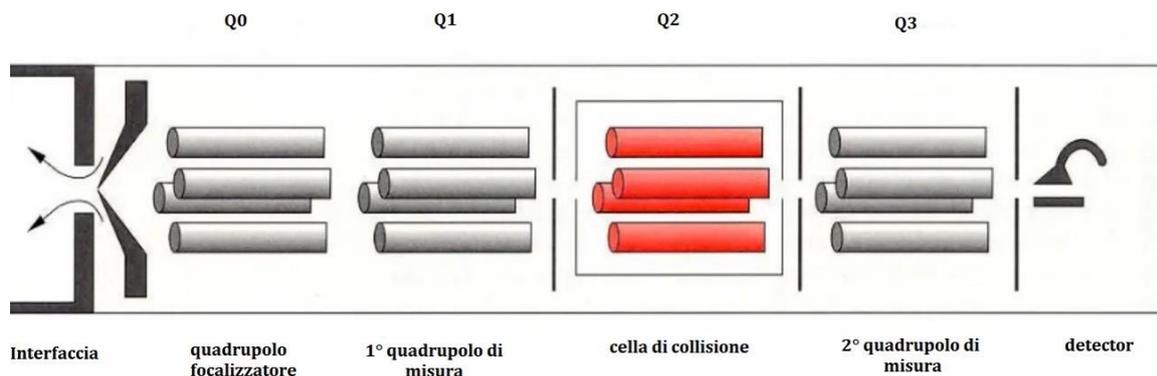


Figura 3.4. Analizzatore a triplo quadrupolo

Questo tipo di sistema costituisce la così detta spettrometria di massa “tandem” (MS/MS), particolarmente utilizzata nei processi di quantificazione. Il triplo quadrupolo può lavorare in diverse modalità:

- ***Full scan***: Q1 attua una scansione di tutti i rapporti m/z presenti; Q2 e Q3 vengono spenti.
- ***SIM (Single Ion Monitoring)***: Q1 seleziona uno specifico ione con determinato rapporto m/z .
- ***Product/Parent/Precursor ion scan***: il quadrupolo Q1 seleziona in modalità SIM uno ione che viene poi frammentato in Q2. I frammenti generati vengono analizzati da Q3 in modalità full scan.
- ***(MRM) Multiple Reaction Monitoring***: Q1 seleziona gli ioni di interesse in modalità SIM; anche il Q3 lavora in SIM isolando solo certi ioni prodotti dalla frammentazione dello ione in Q2. Questa è la metodologia più utilizzata in chimica analitica quantitativa viste le potenti caratteristiche di selettività e sensibilità.
- ***Neutral loss scan***: entrambi i quadrupoli Q1 e Q3 lavorano in scansione, ma tra i due è mantenuta una differenza fissa del rapporto m/z ; consente di esplorare con il primo quadrupolo (Q1 in scansione) quegli ioni precursori che nella scissione possono produrre frammenti ionici con masse diverse per perdita dello stesso frammento neutro. In questo modo è possibile individuare facilmente classi di molecole che abbiano in comune una parte di struttura.

3.4 IL DETECTOR

Un sistema di lenti focalizzatrici permette di convogliare gli ioni in uscita dal Q3 verso il detector. Al giorno d'oggi i detector più utilizzati in spettrometria di massa sono gli elettromoltiplicatori (EM). Gli ioni provenienti dall'analizzatore vengono accelerati e grazie alla collisione con dei dinodi (elettrodi) posti in serie, a potenziale via via crescente, si ha la moltiplicazione degli elettroni. Esistono due tipi di elettromoltiplicatori: l'elettromoltiplicatore a serie discreta di dinodi e quello a dinodo continuo ricurvo (Fig.3.5).

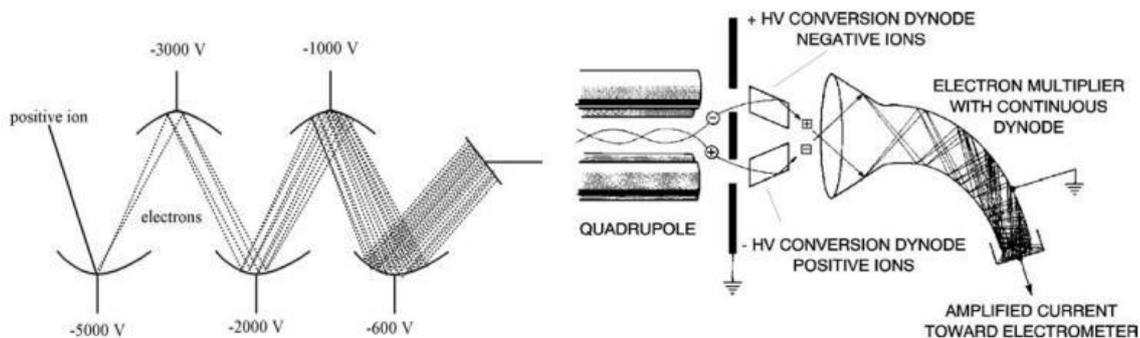


Figura 3.5. Elettromoltiplicatore a serie discreta di dinodi (*a sinistra*); Elettromoltiplicatore a dinodo continuo ricurvo (*a destra*)

In questo lavoro di tesi è stato utilizzato uno spettrometro di massa equipaggiato con un elettromoltiplicatore a dinodo continuo ricurvo che possiede un potere di amplificazione maggiore. Grazie alla presenza di un gradiente di potenziale, gli ioni sono indirizzati all'uscita del cono, qui il segnale elettrico viene tradotto in segnale digitale fornendo il conteggio degli ioni in relazione alla loro massa.

4. IL SISTEMA IN CONTINUO: CFA-FLC-MS/MS

4.1 DETTAGLI DEL SISTEMA DI ANALISI IN FLUSSO CONTINUO (CFA)

In questo lavoro di tesi è stato accoppiato il sistema in continuo CFA con il sistema cromatografico UHPLC. Il sistema d'analisi in continuo è costituito essenzialmente da due macrocostituenti: il sistema di fusione (*melter*) e la parte adibita alla distribuzione del campione.

Il sistema di fusione (*melter*) monta una testa di fusione a base quadrata in alluminio anodizzato (dimensione esterna di 32x32 mm² e dimensione interna di 21x21 mm²) (Fig.4.1) scelta in seguito a specifici test condotti con diversi modelli di teste di fusione. L'alluminio anodizzato garantisce stabilità chimica oltre ad avere ottime proprietà termiche ad un costo contenuto. Sulla testa di fusione possiamo vedere i quattro fori disposti sulla parte più esterna, che fanno passare la sezione di carota più esterna verso il fraction collector per l'analisi isotopica in discontinuo; ed il foro centrale attraverso il quale passa invece il core interno della carota che fluisce via via a tutto il sistema di distribuzione.



Figura 4.1. Testa di fusione del melter

I campioni di carota di ghiaccio hanno una sezione quadrata e vengono caricati in guide acriliche sulla testa del melter così da mantenere il campione in posizione verticale e fare in modo di evitare un possibile mescolamento del ghiaccio fuso del core con quello più esterno. Sulla parte superiore della carota viene appoggiato un peso per garantire una fusione omogenea del blocco di ghiaccio. Questo peso è a sua volta collegato ad una cordicina che è legata ad un sensore di posizione (*Draw wire*) che funge da trasduttore elaborando un segnale elettrico capace di informare sulla posizione lineare e sulla velocità di flusso della carota.

In tutto il sistema (Fig.4.2) sono stati utilizzati tubi in PFA (perfluoroalcoxi) ad alta purezza e raccordi a bassa pressione. L'unità di fusione è termostata tra 30 °C e 33 °C grazie ad un riscaldatore elettrico accoppiato ad un sensore di temperatura PT100, alloggiato in un congelatore verticale mantenuto a -20 °C. Il ghiaccio è stato sciolto con una velocità costante di 3 cm min⁻¹ regolando la temperatura della testa di fusione tramite un termoregolatore elettronico.

La linea di fusione passa attraverso una valvola di commutazione a bassa pressione a dieci vie (Cheminert, Vici) per consentire una commutazione rapida alla linea di campionamento durante l'analisi della carota di ghiaccio, oppure all'acqua ultrapura, utilizzata durante la fase di lavaggio o nel caso si verificassero problematiche di intasamento dovute a impurità. La valvola di commutazione è stata utilizzata anche per caricare gli standard di calibrazione prima e dopo l'analisi della carota di ghiaccio.

La prima pompa peristaltica (Ismatec ISM942) è impostata a 3.4 mL min⁻¹ per prelevare il campione dalla testa di fusione e convogliarlo su tre diverse linee. La prima linea, con portata di circa 14 mL min⁻¹ è diretta verso il primo campionatore (*fraction collector*) adibito all'analisi isotopica; la seconda linea, con flusso di 4.9 mL min⁻¹ porta al secondo campionatore per l'analisi degli ioni maggiori e degli elementi in traccia; a questo campionatore arriva anche parte della terza linea che, dopo aver superato il debubbler (V interno 200 µL) che ne rimuove le eventuali bolle d'aria, passa grazie ad una seconda pompa peristaltica nel manifold che splitta il flusso in due direzioni. Una di queste viene portata con flusso di 1.39 mL min⁻¹, dalla seconda pompa peristaltica, al secondo campionatore, l'altra viene iniettata nel sistema FLC-MS/MS.

La linea che entra nel sistema cromatografico passa prima in un secondo debubbler (V interno 100 µL) per garantire la completa assenza di bolle, una volta superato il debubbler il campione viene reindirizzato alla seconda pompa peristaltica. Le bolle di aria sono presenti all'interno del ghiaccio oppure si possono formare quando del ghiaccio rimane bloccato nel portacampioni durante lo

scioglimento. La valvola di commutazione è molto importante proprio perché permette un rapido scambio tra il campione e l'acqua ultrapura (UPW) garantendo l'eliminazione delle eventuali bolle d'aria.

Nello schema riportato in figura 4.2 si può vedere l'abakus ovvero il contatore laser di particelle che funziona per estinzione ottica, capace di rilevare particelle di differenti dimensioni, con limite inferiore e superiore di rilevabilità pari rispettivamente a 1 μm e 80 μm (nel nostro caso). Il vantaggio dell'abakus è che risulta essere un sistema molto semplice e facilmente accoppiabile con la CFA. Esso può anche essere accoppiato con il "counter counter", un altro contatore di particelle per le analisi in discreto; a volte si vanno a comparare i risultati ottenuti con l'abakus e con il counter counter che dovrebbero dare risultati complementari.

Lungo tutto il sistema sono posizionati una serie di conduttimetri, essenzialmente delle celle che misurano la conducibilità nel ghiaccio fuso. Questi vengono utilizzati per due scopi: la misurazione del delay tra uno strumento e l'altro, utile a capire se nel sistema si verifica un evento anomalo (es: bolle d'aria o impurezze che intasano i tubi) e la deduzione della profondità della colonna.

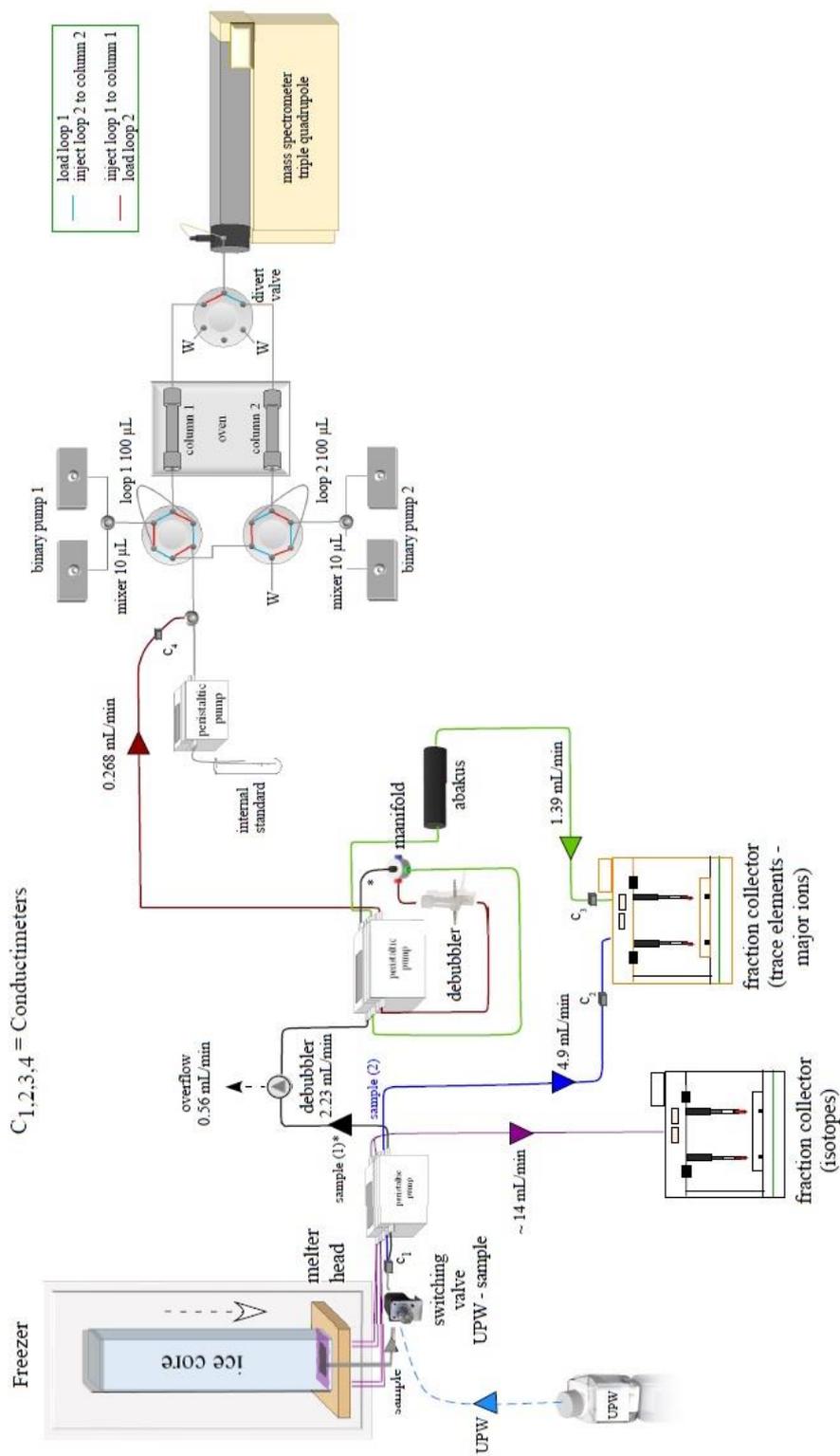


Figura 4.2. Schema del sistema di analisi in flusso continuo (CFA) accoppiato con il sistema cromatografico liquido rapido ifenato con lo spettrometro di massa (FLC-MS/MS)

4.2 LA CROMATOGRAFIA LIQUIDA RAPIDA (FLC-FAST LIQUID CHROMATOGRAPHY)

Nel presente lavoro di tesi è stato utilizzato il cromatografo liquido Dionex UltiMate™ 3000 (Thermo Scientific) (Fig.4.3), un sistema costituito dai seguenti componenti:

- Rack per solventi: 6 linee disponibili (2x3).
- 2 pompe: ad alta pressione, del tipo DGP-3600RS, Thermo Fisher Scientific. Pompe equipaggiate con miscelatori da 10 µL con un innovativo design di miscelazione (Spin Flow) con basso ritardo del gradiente, per ottenere delle separazioni rapide.
- Iniettore: due valvole a sei vie per caricare ed iniettare il campione ogni 30 secondi, equipaggiate con un loop da 100 µL.
- Pannello di controllo.
- Vano contenente le due colonne cromatografiche ed il forno per mantenere le due colonne alla temperatura selezionata.



Figura 4.3. Cromatografo liquido Dionex UltiMate™ 3000

Una terza pompa peristaltica dedicata al sistema UHPLC permette di caricare in continuo, con una portata di $260 \pm 14 \mu\text{L min}^{-1}$, l'acqua scongelata della carota di ghiaccio nel sistema FLC. Questo flusso è stato ottimizzato per garantire il completo riempimento dei loop. Viene poi aggiunta continuamente, insieme al flusso del campione, una soluzione di standard interno (IS) ovvero di

levoglucosan marcato isotopicamente. Questa aggiunta avviene per mezzo di un connettore a T connesso alla terza pompa peristaltica con tubi Tygon di portata pari a $16.9 \pm 0.1 \mu\text{L min}^{-1}$.

È stata utilizzata la quantificazione tramite lo standard interno così da correggere le eventuali fluttuazioni casuali e riconoscere l'effetto matrice.

Le due valvole a sei vie caricano ed iniettano i campioni ogni 30 secondi, quando il primo loop (100 μL) si trova nella posizione di iniezione (linee rosse a destra nella figura 4.2), si ha l'eluizione dell'analita nella prima colonna e la valvola di deviazione invia l'eluente allo spettrometro di massa. Nel mentre, il secondo loop (100 μL) viene caricato tramite il flusso di campione proveniente dall'unità di fusione.

Passati 30 secondi, le due valvole di iniezione e la valvola di deviazione si scambiano, così durante il caricamento del primo loop avviene la separazione nella seconda colonna, intanto la prima colonna si ripulisce e si ristabilizza. Queste due fasi si ripetono per tutta la durata della sessione di fusione delle sezioni di carota di ghiaccio analizzata.

A monte del sistema cromatografico è installato un filtro on-line da 0.2 μm posizionato prima del primo loop con il compito di rimuovere l'eventuale presenza di particolato presente nella carota di ghiaccio.

Gli analiti sono stati eluiti utilizzando una eluizione a gradiente con acqua HiPerSolv Chromanorm per HPLC (VWR) come eluente A e acetonitrile HiPerSolv Chromanorm (VWR) come eluente B.

5. SVILUPPO DEL METODO ANALITICO

5.1 PARTE TEORICA DEL METODO ANALITICO

Nella scelta del metodo analitico da utilizzare, bisogna per prima cosa definire quali sono gli obiettivi dell'analisi e scegliere quindi la tecnica analitica strumentale più adeguata. In seguito, si procede con la definizione della procedura di trasformazione/preparazione del campione da analizzare e delle condizioni operative ottimali dello strumento. A questo scopo vengono utilizzate diverse informazioni tratte dalla bibliografia relativa a studi precedenti e simili al nostro.

Una volta che gli obiettivi sono stati delineati e fissati si procede all'acquisto dei materiali, reagenti e solventi necessari.

In questo caso specifico, l'applicazione del nostro metodo analitico ha un grande vantaggio, permette di eliminare la fase di preparazione/lavorazione ed eventuale preconcentrazione del campione.

5.1.1 METODO STRUMENTALE

L'obiettivo della presente tesi è lo sviluppo di un metodo strumentale per la determinazione in continuo del levoglucosan. Il settaggio strumentale relativo al filtro di massa è stato messo a punto in precedenza da Gambaro et al, (2008). È stata scelta la più adeguata sorgente di ionizzazione in base alle caratteristiche dell'analita in esame e successivamente è stato individuato lo ione precursore utilizzando la modalità *full scan* in Q1. Sono poi stati ottimizzati il potenziale DP (*declustering potential*) ed il potenziale EP (*entrance potential*).

5.1.2 METODO CROMATOGRAFICO

Lo sviluppo del metodo cromatografico parte dalla scelta della colonna. Questa verrà scelta in base alla migliore capacità di separazione dei picchi cromatografici, che dipende dal tipo di fasi stazionaria e mobile scelte. Nel nostro studio è stato utilizzato un sistema cromatografico a fase inversa, quindi con fase stazionaria apolare (organica) e fase mobile polare (acqua). Solitamente una corsa cromatografica inizia con l'eluizione a gradiente, seguito da una fase di pulizia ed una di equilibratura.

Con l'obiettivo di aumentare al massimo il segnale del picco interessato, viene ottimizzata la temperatura delle colonne, la velocità del flusso e, in seguito, anche i parametri della sorgente: il Gas1, il Gas2, la temperatura e l'IS (*ion spray voltage*) ovvero il potenziale che viene imposto all'ago nella sorgente ESI.

5.1.3 PARAMETRI CROMATOGRAFICI

Con l'obiettivo di ottenere il migliore segnale cromatografico vengono valutati alcuni parametri molto importanti e caratteristici dei picchi. L'allargamento di un picco cromatografico è relazionato all'efficienza di separazione o *efficienza della colonna*. Quest'ultima è determinata, secondo la teoria classica, dal numero di piatti teorici (N) e dalla loro altezza (H):

$$N = a \left(\frac{t_R}{w} \right)^2 \quad H = \frac{L}{N} = \frac{\sigma_L^2}{L}$$

Dove: a = costante dipendente dal metodo utilizzato per determinare w (Tab.2)

w = larghezza del picco ad una certa altezza

t_R = tempo di ritenzione del picco

L = lunghezza colonna

σ_L² = varianza del picco (in unità di lunghezza)

Tabella 2. Valori di “a” in base al metodo applicato per determinare w

Metodo	a
Larghezza picco a metà altezza	5.54
Larghezza picco al 4.4% dell'altezza	25
Tangenziale (c.a 13.5%)	16

Siccome i tempi di ritenzione e le larghezze dei picchi si misurano in secondi o minuti, risulta più conveniente esprimere la varianza in unità di tempo (σ_t); questa la si ottiene dividendo la σ_L per la velocità lineare media del soluto (v):

$$v = \frac{L}{t_r}$$

$$\sigma_t = \frac{\sigma_L}{v} = \frac{\sigma_L t_r}{L}$$

Per i picchi gaussiani la larghezza della base del picco (w) risulta:

$$w = 4\sigma_t$$

quindi:

$$\sigma_t = \frac{w}{4}$$

A questo punto le espressioni relative all'altezza del piatto teorico (H) e ad il numero dei piatti (N) possono essere così riformulate:

$$H = \frac{\sigma_t^2 L}{t_r^2} = \frac{w^2 L}{16 t_r^2}$$

$$N = 16 \left(\frac{t_r}{w} \right)^2$$

In questo modo è quindi possibile determinare il numero dei piatti teorici direttamente dal cromatogramma misurando il tempo di ritenzione e l'ampiezza alla base del picco, anche se spesso si ottengono risultati migliori utilizzando al posto della larghezza di base del picco la larghezza a metà altezza ($b_{1/2}$). Minore è l'altezza di ciascun piatto teorico (maggiore sarà il numero degli N) e maggiore sarà l'efficienza della colonna e quindi la risoluzione che si può ottenere.

Altro parametro da considerare è l'asimmetria del picco (fattore di asimmetria), ovvero:

$$A_s = \frac{B}{A}$$

dove A rappresenta la larghezza della parte ascendente del picco e B la larghezza della parte discendente del picco, misurate entrambe al 10% dell'altezza (Fig.5.1).

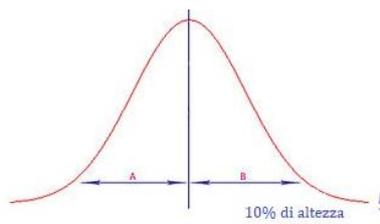


Figura 5.1. Asimmetria del picco

In pratica, la forma di un picco di solito non è mai ideale, si ottengono spesso picchi distorti. Il “fronting” ed il “tailing” (Fig.5.2) sono fenomeni molto comuni. Il primo deriva spesso da un sovraccarico di campione e quindi è possibile evitarlo/ridurlo cercando di caricare meno campione oppure scegliendo una colonna con un diametro interno maggiore. Il tailing invece è spesso causato da un eccessivo legame con la fase stazionaria; quindi, bisognerebbe cercare di ridurre l'adsorbimento su quest'ultima.



Figura 5.2. Fenomeni di “fronting” (a sinistra) e “tailing” (a destra)

Nel caso in cui il fattore di asimmetria non risulti compreso tra 0.9 e 1.2 i risultati del picco sono considerati inaffidabili.

Molto importante in cromatografia è la risoluzione, ovvero la separazione tra due picchi adiacenti, definita dalla seguente espressione:

$$R_s = \frac{\sqrt{N}}{4} \left(\frac{\alpha-1}{\alpha} \right) \left(\frac{k}{k+1} \right)$$

k = fattore di ritenzione medio tra i due picchi

α = selettività.

Nel caso in cui il fattore di asimmetria cada nel range 0.9-1.2 allora possiamo considerare i picchi come gaussiani e calcolare la risoluzione (R_s) mediante la seguente espressione:

$$R_s = \frac{t_r^B - t_r^A}{w_b}$$

t_r^B = tempo di ritenzione del picco B

t_r^A = tempo di ritenzione del picco A

w_b = larghezza media dei picchi alla base

Ai fini di ottenere una separazione quantitativa, il valore della R_s non deve risultare inferiore a 0.8 poiché comporterebbe una sovrapposizione dei picchi pari a circa il 2 %. I valori ottimali sono quelli compresi tra 1-1.5 che portano ad una sovrapposizione dei picchi dello 0.3 % circa, e quindi possono essere considerati sufficientemente “risolti”.

5.2 VALIDAZIONE DEL METODO ANALITICO

I parametri presi in considerazione in questo lavoro per la valutazione del metodo analitico sono:

- selettività: capacità del metodo analitico di determinare l’analita di interesse in modo univoco; indica in che misura la determinazione di un elemento è affetta da interferenze da parte di altri analiti o componenti della matrice;
- sensibilità: pendenza della curva di calibrazione in corrispondenza della concentrazione a cui si sta lavorando;
- limite di rilevabilità e limite di quantificazione strumentale (LOD_s e LOQ_s): minima concentrazione di analita rilevata o quantificata dallo strumento. Vengono calcolati sulla base del segnale generato da soluzioni standard degli analiti, corrispondono a tre volte (LOD) e a dieci volte (LOQ) il rapporto tra l’area del rumore di fondo nel cromatogramma e l’area del picco dell’analita moltiplicati per la concentrazione dell’analita;
- linearità di risposta: capacità di un metodo analitico di determinare in maniera direttamente proporzionale la presenza di un analita, in relazione alla sua quantità nel campione. Per

verificarla, si prova, a diversi intervalli di concentrazione comprendenti il valore teorico, che i valori di risposta ottenuti per l'analita non siano troppo lontani dalla retta tracciata utilizzando tutti i livelli di concentrazione. Tale intervallo si definisce "intervallo di linearità" e solo all'interno del valore minimo e massimo di concentrazione è garantita la linearità della risposta. La proporzionalità viene in particolare verificata attraverso il calcolo del coefficiente di correlazione R^2 della curva di calibrazione. In questo lavoro di tesi è stata effettuata per mezzo di soluzioni standard. Generalmente sono accettati coefficienti di correlazione pari ad almeno 0.99.

6. CAMPIONAMENTO

6.1 SITO DI CAMPIONAMENTO

La carota di ghiaccio analizzata in questo progetto di tesi è stata prelevata dal ghiacciaio sommitale Weißseespitze (WSS, 3500 m) (Fig.6.1) che costituisce il punto più alto del ghiacciaio Gepatschferner nelle Alpi austriache. La vetta del Weißseespitze presenta una geometria a cupola molto particolare e poco frequente nelle Alpi, con uno spartiacque principale che scorre da una sezione priva di ghiaccio a est verso la scogliera sul lato occidentale. Lo spessore del ghiaccio attorno allo spartiacque varia da 6 a 12 m, misurato con un radar GSSI SIR 4000 GPR (500 MHz). Sulla base di modelli di elevazione digitale, il dislivello totale della superficie dal 1969 supera i 10 m.

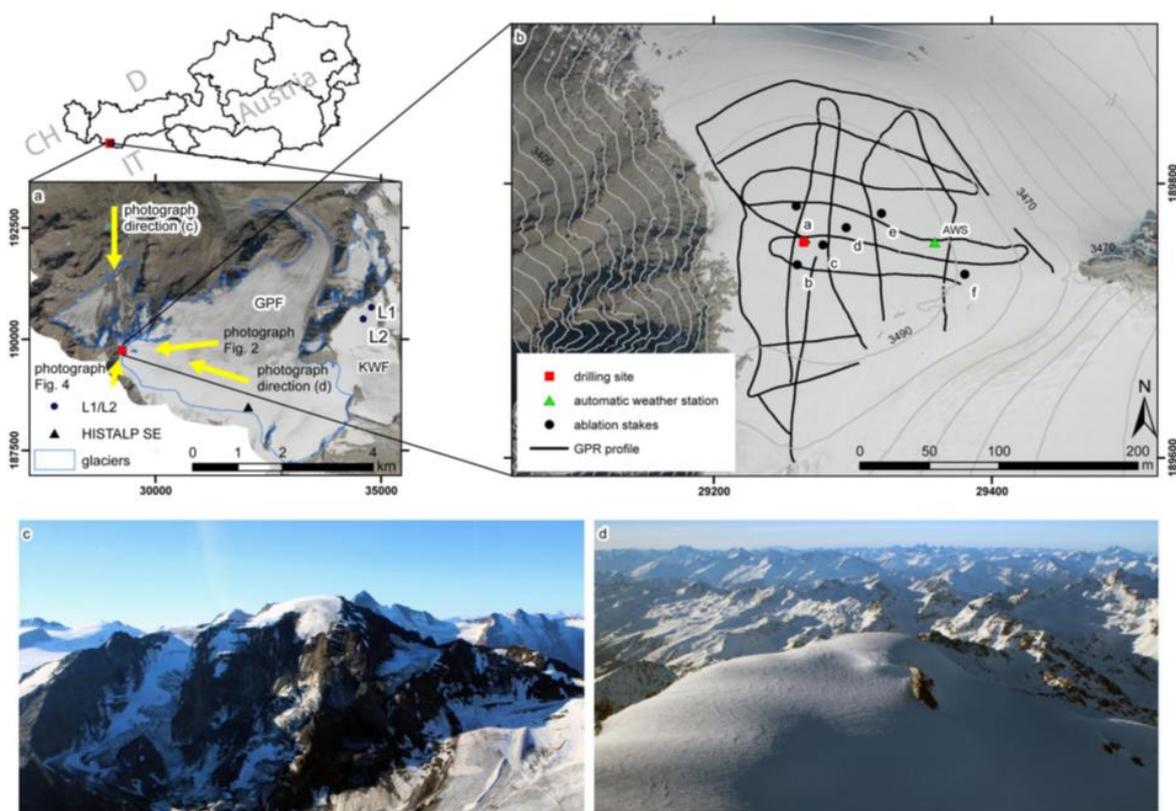


Figura 6.1. a) sito di perforazione presso il ghiacciaio sommitale Weißseespitze (quadrato rosso) facente parte del ghiacciaio Gepatschferner (GPF); (c)-(d) foto da nord e da est della calotta glaciale sommitale a Weißseespitze (direzioni evidenziate dalle frecce gialle in (a)) (Pascal et al., 2020)

La carota di ghiaccio è stata perforata nel marzo 2019, assieme ad un'altra carota parallela, a 11 m di profondità fino al substrato roccioso (Pascal et al., 2020).

6.2 SISTEMA DI CAMPIONAMENTO

Le carote di ghiaccio vengono estratte per mezzo del così detto “carotaggio”, ovvero la procedura di campionamento che permette di prelevare una porzione di ghiaccio cilindrica fino alla profondità desiderata. Una volta estratto, il campione viene trattato con la massima cura in modo da evitarne il più possibile la contaminazione, riposto nelle celle frigo e conservato sino al momento delle analisi. La carota di ghiaccio per il nostro lavoro di tesi è stata campionata grazie ad un innovativo sistema di perforazione detto FELICS (Fast Electromechanical Lightweight Ice Coring System), ovvero una sorta di “trapano” elettromeccanico la cui descrizione dettagliata è riportata nel seguente riferimento bibliografico (Ginot et al., 2002). L'obiettivo per cui esso venne sviluppato era principalmente di garantire una facilità d'uso ed un peso ridotto, visto che tutto il materiale deve essere trasportato al sito di perforazione; un secondo obiettivo era rappresentato dal limitare la durata della perforazione e quindi la riduzione del tempo da trascorrere, da parte dei ricercatori, alle elevate altitudini. FELICS consente una profondità di perforazione pari a 200 m ed estrae carote di ghiaccio di 78 mm di diametro.

Le carote di ghiaccio, una volta prelevate, sono state imballate in loco in contenitori isolanti e trasportate tramite celle frigorifere (-20 °C) all'istituto di fisica ambientale dell'Università di Heidelberg e poi quest'anno sono arrivate al dipartimento di scienze ambientali dell'Università Cà Foscari.

7. PROCEDURA SPERIMENTALE

7.1 MATERIALI

In questo lavoro di tesi sono state utilizzate delle soluzioni standard di levoglucosan e levoglucosan marcato. Queste sono state preparate a partire da delle soluzioni madri ad elevata purezza, conservate in congelatore in opportuni contenitori al riparo dalla luce, per diluizione con acqua ultrapura. Nella tabella seguente (Tab.3) vengono riportate le informazioni dettagliate delle soluzioni madri (standard) utilizzate.

Tabella 3. Informazioni dettagliate sugli standard utilizzati

Standard	n° CAS	Fornitore	Purezza
Levoglucosan	498-07-7	Molekula	99%
Levoglucosan (¹³ C ₆)	NA	Cambridge Isotope Laboratories Inc.	98%

I solventi che sono stati impiegati per lo svolgimento delle diverse operazioni sperimentali sono: acqua ultrapura (18.2 MΩ-cm, 1 ppb TOC) prodotta utilizzando il sistema Purelab Ultra (Elga®, High Wycombe, UK) presente all'Università di Venezia, metanolo ultragradiente per HPLC fornito dalla VWR (Milano, IT), acetonitrile ultragradiente per HPLC sempre fornito da VWR (Milano, IT) e ammoniaca di purezza 99% acquistata da Sigma Aldrich (Steinheim, Germany).

Le colonne impiegate nella separazione cromatografica sono del tipo *Synergi*TM 2.5 μm *Hydro-RP* 100 Å, 30 x 2 mm con fase stazionaria C18 con capping polare ed un supporto solido in silice completamente porosa.

Per la preparazione delle soluzioni standard sono state utilizzate vial da 50 mL e micropipette Eppendorf munite dei rispettivi puntali.

7.2 LA METODOLOGIA ANALITICA CFA-FLC-MS/MS

La carota di ghiaccio è stata tagliata in una cella frigorifera a -20 °C, in diverse sezioni di lunghezza variabile denominate “bag”. Ciascuna “bag” è stata poi caricata di volta in volta nel frigorifero del melter, pronta per essere fusa ed analizzata dal sistema in continuo.

Per raccogliere le varie frazioni disciolte in uscita dal sistema d’analisi sono state preparate 500 vials da 15 mL per l’analisi degli ioni maggiori ed altre 500 per l’analisi dei metalli in traccia. Le vials adibite a raccogliere le frazioni disciolte per l’analisi degli ioni maggiori sono state lavate con acqua ultrapura, sonicate e poi messe ad asciugare sotto la cappa a flusso laminare in clean room organica classe 100; le vial per gli elementi in traccia sono state lavate con acqua ultrapura per agitazione manuale e riposte anch’esse ad asciugare in clean room inorganica classe 100.

Prima di ogni fusione è stato fatto un test con una soluzione standard di levoglucosan ad una concentrazione di 1 ng mL⁻¹ in modo da tenere conto, nel momento della quantificazione, delle condizioni sperimentali che possono variare di giorno in giorno.

7.3 SVILUPPO DEL METODO MRM

Lo sviluppo del metodo in spettrometria di massa con analizzatore a triplo quadrupolo è stato condotto in precedenza da Gambaro et al., (2008). Riassumendo, le analisi sono state condotte utilizzando una sorgente di ionizzazione elettrospray (ESI) in modalità negativa e i dati sono stati raccolti in modalità di acquisizione MRM (*multiple reaction monitoring*); l’acquisizione dei dati è avvenuta con dwell time di 50 ms per ogni transizione.

Nella tabella 4 vengono riportati nel dettaglio i parametri e le condizioni strumentali utilizzate.

Tabella 4. Parametri e condizioni strumentali

Parametro	Valore
Curtain gas (psi)	35
Nebulizer gas (psi)	45
Auxiliary gas (psi)	50
Source temperature (°C)	400
Collision gas (psi)	6
Ionization voltage (V)	-4500
Declustering potential (V)	-54
Entrance potential (V)	-4

In tabella 5 si riportano le transizioni monitorate per il levoglucosan e lo standard interno utilizzato (Levoglucosan $^{13}\text{C}_6$) - con i relativi parametri di collision energy (CE) e cell exit potential (CXP), due parametri ottimizzati per ciascuna transizione.

Sono state monitorate tre transizioni per lo standard nativo e due per il marcato e le transizioni più intense (161/101 e 167/105) sono state utilizzate per quantificare l'analita mentre le altre vengono usate per confermarne l'identità.

Tabella 5. Transizioni MRM e parametri CE e CXP

	Q1 m/z	Q3 m/z	CE (V)	CXP (V)
Levoglucosan	161	113	-14	-20
		101	-16	-16
		71	-17	-7
Levoglucosan $^{13}\text{C}_6$	167	118	-13	-19
		105	-14	-15

8. RISULTATI E DISCUSSIONE

8.1 MESSA A PUNTO DEL METODO

8.1.1 SVILUPPO DEL METODO CROMATOGRAFICO

Lo sviluppo del metodo cromatografico rappresenta l'aspetto fondamentale da ottimizzare per l'analisi del levoglucosano con il sistema definito Fast Liquid Chromatography (FLC). In figura 8.1 viene riportato uno schema del sistema FLC-MS/MS in cui un cromatografo Thermo Scientific Dionex UltiMate 3000 Rapid Separation LC viene accoppiato con uno spettrometro di massa a triplo quadrupolo. Il campione (la carota di ghiaccio fusa) arriva al sistema FLC mediante una pompa peristaltica che continuamente carica i loop di iniezione con un flusso di $260 \pm 14 \mu\text{L min}^{-1}$. Questo flusso è stato ottimizzato al fine di riempire continuamente i loop. La soluzione di standard interno viene aggiunta continuamente mediante una connessione T che viene alimentata tramite una seconda peristaltica con un flusso di $14.5 \pm 0.2 \mu\text{L min}^{-1}$. Lo standard interno permette la correzione delle fluttuazioni strumentali durante l'analisi. Due colonne (Fig.8.1) vengono impiegate per condurre l'analisi in semi-continuo e queste vengono alloggiare in un forno colonne che permette di modulare la temperatura. Due valvole di iniezione con due loop da $100 \mu\text{L}$ vengono usate per caricare ed iniettare il campione e queste girano ogni 30 secondi. Quando il primo loop ($100 \mu\text{L}$) è nella posizione di iniezione (linea rossa in Figura 8.1), avviene l'eluizione dell'analita nella prima colonna e la divert valve, posizionata prima dello spettrometro di massa, manda l'eluente alla massa. Mentre avviene l'eluizione della prima colonna, il secondo loop ($100 \mu\text{L}$) si sta caricando con il flusso proveniente dal melter.

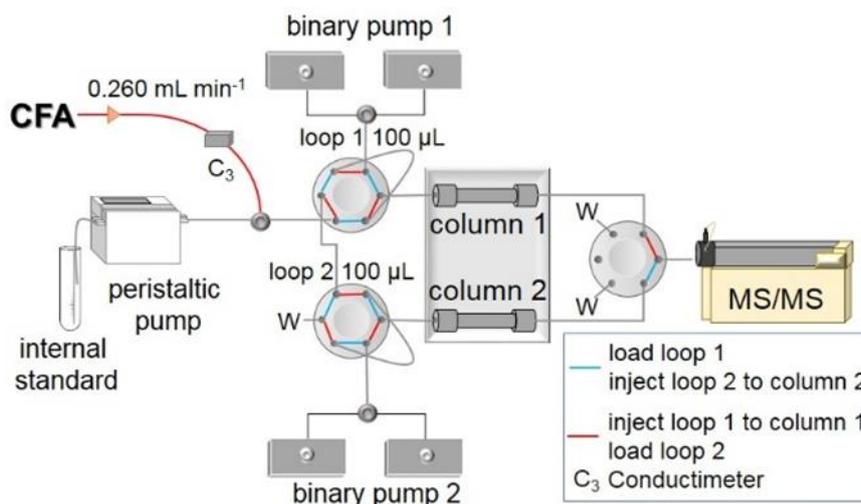


Figura 8.1. Schema del sistema FLC-MS/MS

Per l'ottimizzazione del metodo cromatografico sono state utilizzate delle soluzioni standard a 1 ng mL^{-1} di levoglucosan marcato isotopicamente e di levoglucosan, preparate in una clean room organica di classe 100 al fine di evitare la contaminazione atmosferica.

Sono state testate alcune fasi stazionarie ed inizialmente sono state utilizzate due colonne *Agilent Zorbax Sb-Aq* ($150 \text{ mm} \times 2.1 \text{ mm}$, $3.5 \mu\text{m}$).

È stata utilizzata un'eluizione a gradiente, valutando l'impiego di acqua, metanolo ed acetonitrile come fasi mobili. La prima prova è stata eseguita con concentrazione al 100% di metanolo nella fase mobile e la seconda con l'acetonitrile al posto del metanolo, sempre al 100% di concentrazione. Come si può vedere dai cromatogrammi ottenuti (Fig.8.4 a-b) con questo tipo di colonne, per entrambe le fasi mobili utilizzate appare un forte rumore di fondo e dei picchi per nulla riproducibili. Sono stati calcolati l'altezza dei piatti teorici (H) con relativa deviazione standard, ed il numero di questi ultimi (N) ottenendo i seguenti risultati: un valore di H media di 0.10 ± 0.04 e un valore di N di 1500. I risultati ottenuti mettono in evidenza l'inadeguatezza di queste colonne; si è proceduto con altre colonne cromatografiche.

Sono state quindi testate, le *Synergi™ 2.5 µm Hydro-RP 100 Å*, $30 \times 2 \text{ mm}$, in quanto questa fase stazionaria era già stata impiegata da Gambaro et al. (2008). Sono stati valutati diversi eluenti quali metanolo, acetonitrile e metanolo con l'aggiunta di acido formico. In seguito al primo test, eseguito con standard ad 1 ng mL^{-1} e con una concentrazione di metanolo al 50% e poi di acetonitrile (al 50%)

nella fase mobile, i cromatogrammi (Fig.8.4 c-d) hanno mostrato dei picchi allargati ed un segnale non sufficientemente intenso. Abbiamo quindi deciso di aumentare la concentrazione delle soluzioni standard a 10 ng mL⁻¹ così da visualizzare meglio il segnale e permettere una migliore ottimizzazione. Il primo cromatogramma ottenuto in questo secondo test (Fig.8.4 e), con concentrazione della fase organica del 100% di acetonitrile ha mostrato un segnale più intenso e meno allargato rispetto a quello ottenuto con il 50% di acetonitrile nel primo test. Il secondo cromatogramma (Fig.8.4 f), registrato con il 100% di metanolo +0.01% acido formico, ha dato invece un segnale non riproducibile.

Nella tabella seguente (Tab.6) vengono riportati i parametri di picco ottenuti nei due test.

Tabella 6. Parametri di picco e relativa deviazione standard ottenuti con i due test (a 1 e a 10 ng mL⁻¹) sulle colonne *Synergi*TM 2.5 μm *Hydro-RP 100 Å*, 30 x 2 mm

% fase B	[Levo] ng mL ⁻¹	Altezza picco media (cps)	Larghezza picco media (min)	Asimmetria picco media
50% MeOH	1	8.2E+03±	4.3E-01±	1.6
		5.5E+02	3.9E-02	±1.8
50% AcN	1	3.2E+03	3.5E-01±	1.4
		±3.6E+02	1.7E-02	±1.2
100% AcN	10	7.0E+03±	2.7E-01±	1.3
		1.4E+03	3.0E-02	±1.0

Dai cromatogrammi riportati in Fig.8.4 e-f si può notare anche una certa differenza, nell'utilizzo nella fase mobile, tra l'acetonitrile ed il metanolo: con il primo si è registrato a 10 ng mL⁻¹ un segnale sufficientemente intenso, riproducibile, con una larghezza ed una asimmetria accettabili; con il secondo invece si sono ottenuti dei picchi troppo allargati e asimmetrici nel test ad 1 ng mL⁻¹ e non riproducibili in quello a 10 ng mL⁻¹. Per questo motivo abbiamo scelto di utilizzare come eluente organico nella fase mobile l'acetonitrile.

Una volta stabilito che le colonne più adeguate sono le *Synergi*TM 2.5 μm *Hydro-RP 100 Å*, 30 x 2 mm, e selezionato l'acetonitrile come migliore fase organica, sono state eseguite le ottimizzazioni per quanto riguarda le fasi mobili. Sono state usate l'acqua come fase A e l'acetonitrile come fase B. Abbiamo eseguito delle prove partendo da diverse concentrazioni di componente organica (% B),

ovvero: 0%, 2%, 5%, 10%, 20%. Per la prima prova è stato impostato il seguente programma di eluizione: 0-0.4 min 0 % B, 0.4-0.5 min da 0% B a 100 % B, 0.5-0.7 min 100 % B, 0.7-1 min 0 %B. Il periodo fino a 0.4 min è necessario per eluire il composto in esame, il periodo in cui la %B sale al 100% serve come periodo di pulizia, mentre l'ultimo periodo (detto di equilibratura) con %B pari alle condizioni iniziali è necessario per riportare la colonna alle condizioni ottimali per l'iniezione successiva. Sono poi stati impostati gli stessi tempi per i gradienti nelle altre prove.

I cromatogrammi ottenuti dai diversi test (Fig.8.2) ci mostrano come i picchi evolvono al modificarsi del gradiente di eluizione.

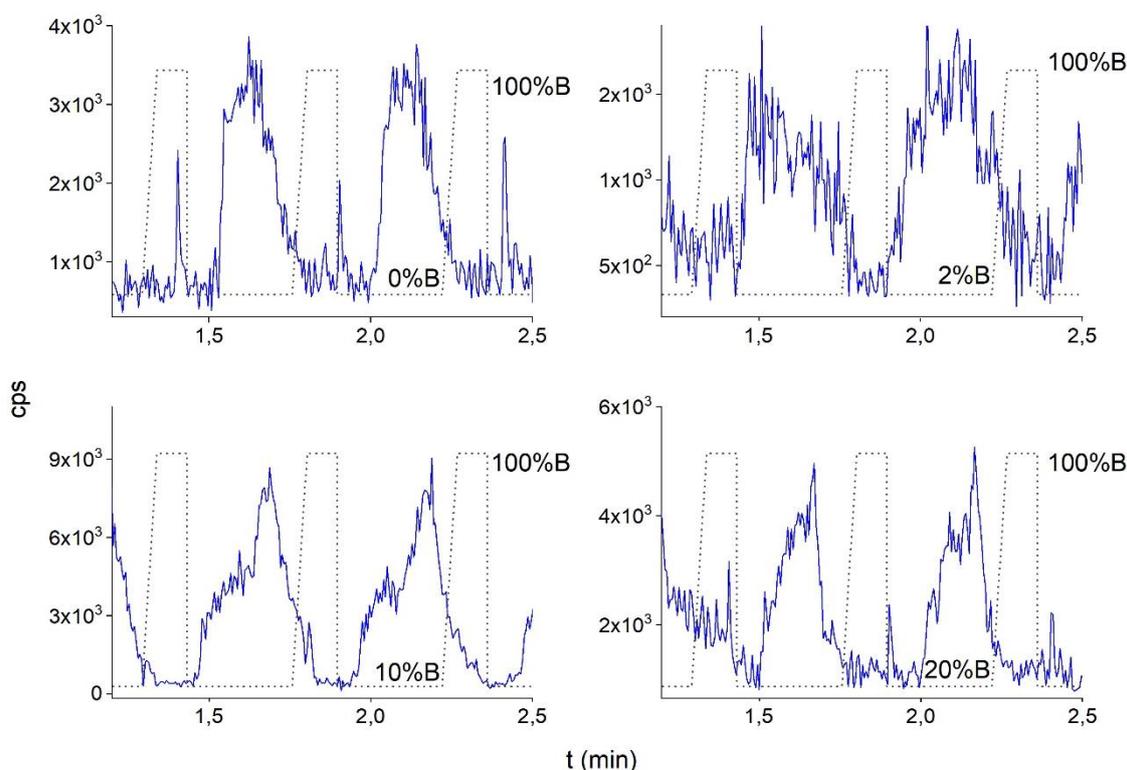


Figura 8.2. Prove di gradiente a %B variabile, con relativi cromatogrammi ottenuti

Possiamo osservare che i picchi ottenuti con questi gradienti risultano piuttosto spancati, in ciascuna eluizione viene persa una parte dell'analita.

Guardando invece il cromatogramma ottenuto con un gradiente di eluizione che inizia col 5% di acetonitrile (Fig.8.3) si osservano dei picchi molto più definiti, intensi, e che escono tutti bene prima della fase di lavaggio e l'inizio dell'eluizione successiva.

Questo risultato è ragionevole, infatti, il levoglucosan mostra molta affinità per i composti organici, e quindi partendo da una concentrazione bassa (5%) di acetonitrile l'analita riesce a legarsi maggiormente alla fase stazionaria permettendo di ottenere un picco più gaussiano.

Abbiamo quindi scelto di tenere come migliore gradiente di eluizione proprio quest'ultimo.

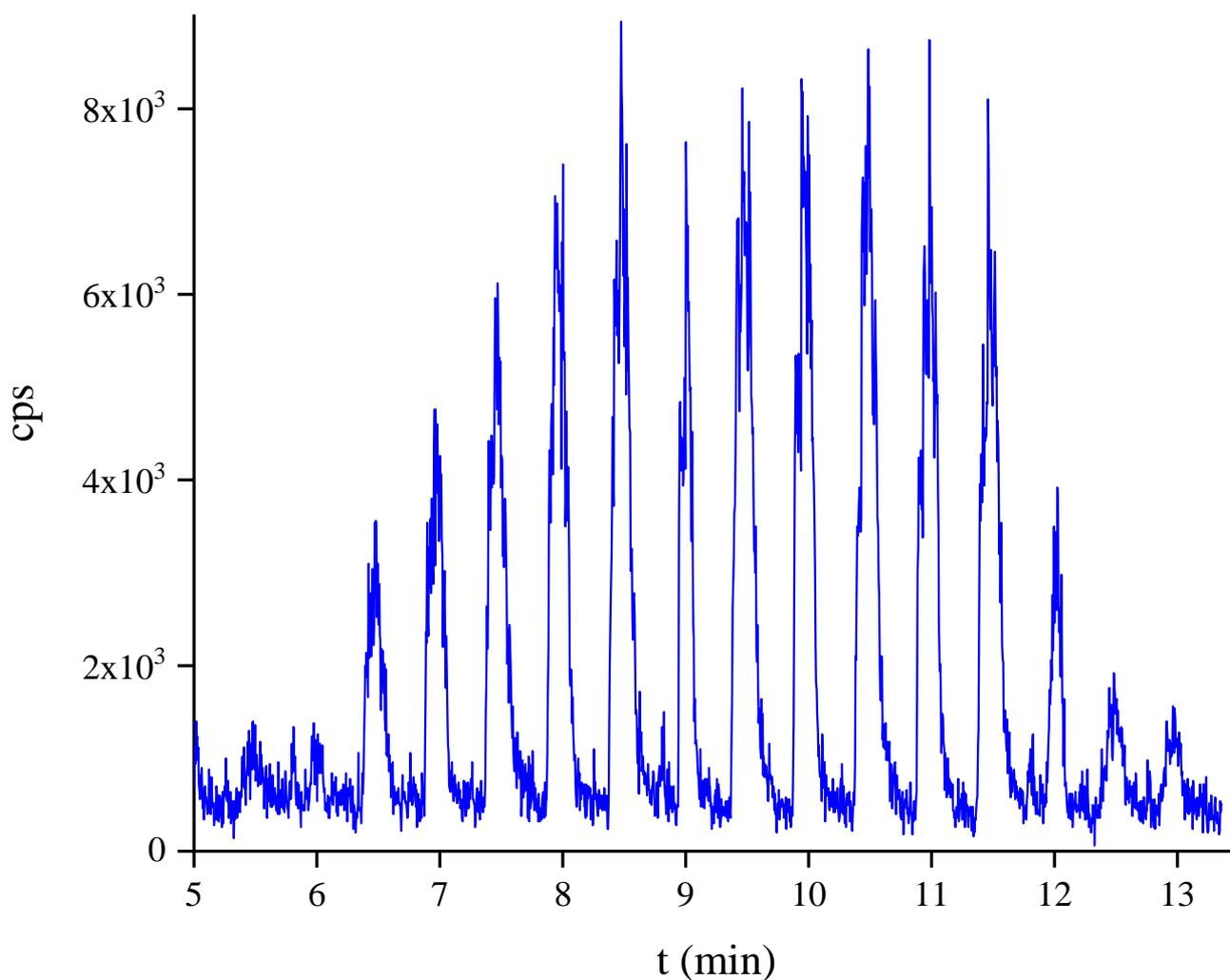


Figura 8.3. Cromatogramma relativo ad iniezioni di uno standard a 1 ng mL^{-1} con le condizioni ottimali individuate nello studio

Una volta scelto di utilizzare le colonne di tipo Synergi™2.5 µm Hydro-RP, e ottimizzate le condizioni relative alle fasi mobili e al gradiente da usare, è stata ottimizzata la velocità del flusso di eluizione dell'analita.

Abbiamo testato tre velocità: 500 µL min⁻¹, 600 µL min⁻¹ e 700 µL min⁻¹ e si è ottenuto il cromatogramma rappresentato in (Fig.8.4 g) che mostra i 3 blocchi di picchi ottenuti alle differenti velocità di flusso con gradiente 5%-100% acetonitrile. Nelle figure 8.4 h-i-l vengono raffigurati i 3 blocchi di picchi in maggiore dettaglio.

Nella tabella seguente (Tab.7) riportiamo i parametri relativi ai picchi cromatografici ottenuti alla tre differenti velocità di flusso.

Tabella 7. Valori dei parametri dei picchi cromatografici ottenuti alle diverse velocità di flusso, con le colonne Synergi™2.5 µm Hydro-RP e acetonitrile come componente organica nella fase mobile

Vel.flusso (µL min ⁻¹)	Area picco (counts)	Altezza picco (cps)	Larghezza picco (min)	Larghezza a metà altezza (min)	Asimmetria picco	RT (min)
500	3.59E+04	2.77E+03	0.33	0.228	0.94	1.29
	3.97E+04	3.04E+03	0.341	0.246	0.98	1.79
	1.91E+05	7.42E+03	0.38	0.102	2.4	2.2
	3.08E+04	2.72E+03	0.319	0.207	1.07	2.79
	6.00E+04	4.64E+03	0.385	0.226	1.53	3.27
	4.14E+04	3.36E+03	0.347	0.219	0.937	3.8
600	2.12E+04	2.27E+03	0.297	0.167	1.21	10
	3.52E+04	3.17E+03	0.314	0.202	1.78	10.5
	3.28E+04	3.21E+03	0.347	0.179	0.944	11
	2.35E+04	2.36E+03	0.297	0.185	1.19	11.5
	3.64E+04	3.53E+03	0.297	0.187	0.835	12.1
	3.73E+04	3.04E+03	0.341	0.194	0.635	12.6
700	2.11E+04	2.47E+03	0.231	0.147	1.14	18.4
	3.89E+04	3.10E+03	0.281	0.18	1.25	18.9
	3.66E+04	4.29E+03	0.281	0.137	1.03	19.4
	1.80E+04	1.95E+03	0.264	0.161	0.996	19.9
	2.69E+04	2.86E+03	0.264	0.165	1.01	20.4
	3.11E+04	3.05E+03	0.292	0.183	1.29	20.9

Osservando i valori delle larghezze medie dei picchi riportate in (Tab.8) si è dedotto che la velocità di flusso a 700 µL min⁻¹ è quella migliore, infatti, i picchi sono risultati meno allargati.

Tabella 8. Larghezze di picco medie e deviazioni standard ottenute alle diverse velocità di flusso

Vel.flusso ($\mu\text{L min}^{-1}$)	Larghezza media picco (min)	RSD%
500	0.35 ± 0.03	8
600	0.31 ± 0.02	7
700	0.27 ± 0.03	10

Dal cromatogramma ottenuto alla velocità di flusso pari a $700 \mu\text{L min}^{-1}$ abbiamo calcolato l'altezza dei piatti teorici (H) con relativa deviazione standard ed il numero di questi ultimi (N) ottenendo un valore di H media di 0.001 ± 0.002 e un valore di N di 21428.

Confrontando il numero dei piatti teorici riportati a inizio paragrafo, ottenuti con le colonne *Agilent Zorbax Sb-Aq*, con il numero di piatti teorici appena evidenziati, si può notare un netto aumento. Possiamo quindi confermare che il tipo di colonne cromatografiche scelte sono più adatte alla nostra analisi, garantendo una migliore separazione cromatografica.

Visto che l'asimmetria dei picchi (alla velocità di flusso $700 \mu\text{L min}^{-1}$) è risultata compresa nel range 0.9-1.2 possiamo considerare i picchi come gaussiani e pertanto calcolare la risoluzione (R_s) con la formula descritta in precedenza al paragrafo 5.1.3:

$$R_s = \frac{t_r^B - t_r^A}{w_b} = \frac{19,42 - 18,91}{0,3} = 1,7$$

La risoluzione ottenuta è superiore a 1 e quindi i picchi sono considerati sufficientemente "risolti".

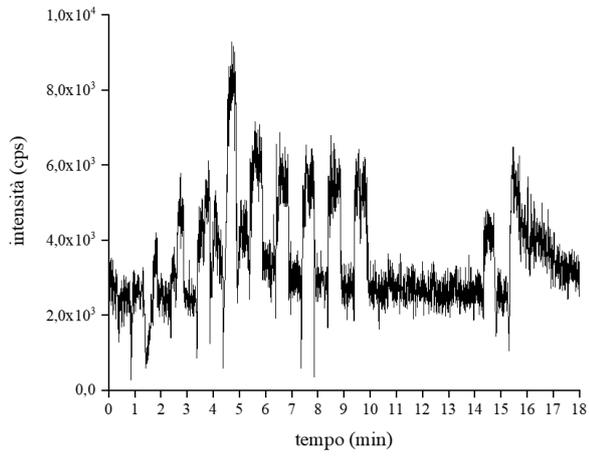
Nei cromatogrammi ottenuti è osservabile un leggero fenomeno di "tailing".

Per la colonna Synergi™, ottimizzata con flusso a $700 \mu\text{L min}^{-1}$, sono stati poi eseguiti dei test per impostare la migliore temperatura di lavoro del forno al fine di migliorare ulteriormente la separazione cromatografica. Di seguito (Tab.9) vengono riportate le larghezze medie relative ai picchi ottenuti alle tre diverse temperature testate, ovvero: 50°C , 60°C e 70°C .

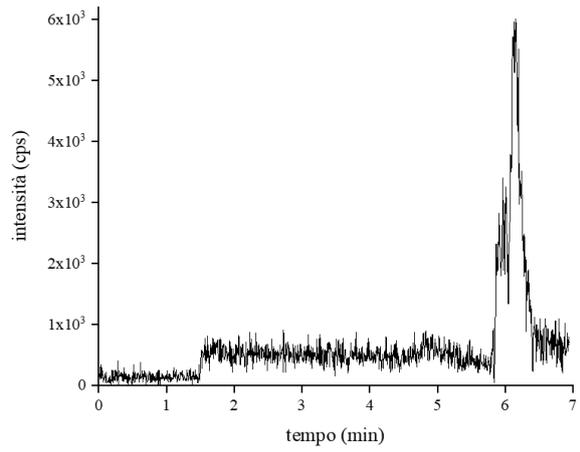
Tabella 9. Larghezze medie e deviazione standard dei picchi alle tre diverse T di colonna

T colonne (°C)	Larghezza media picco (min)	RSD%
50	0.26±0.01	3.3
60	0.24±0.01	4.8
70	0.24±0.01	2.4

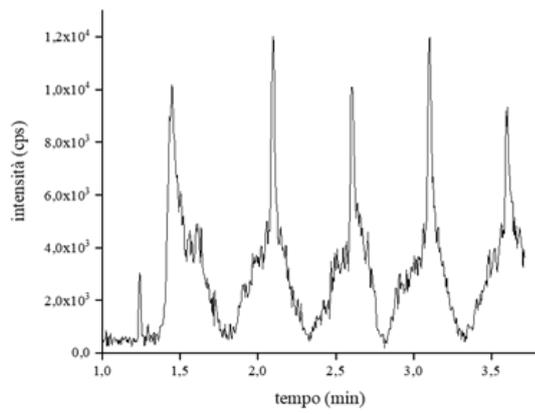
Dalle larghezze di picco ottenute abbiamo scelto di impostare la temperatura delle colonne a 70 °C.



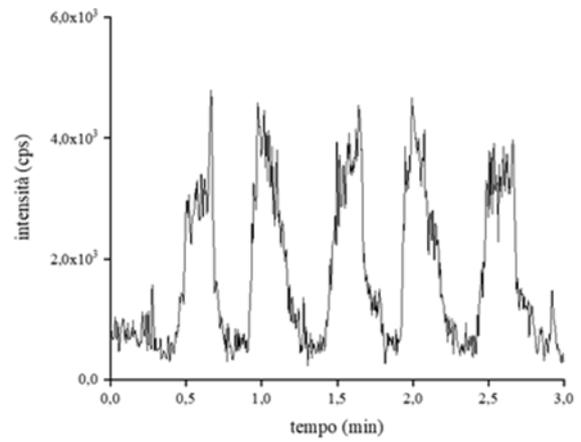
a)



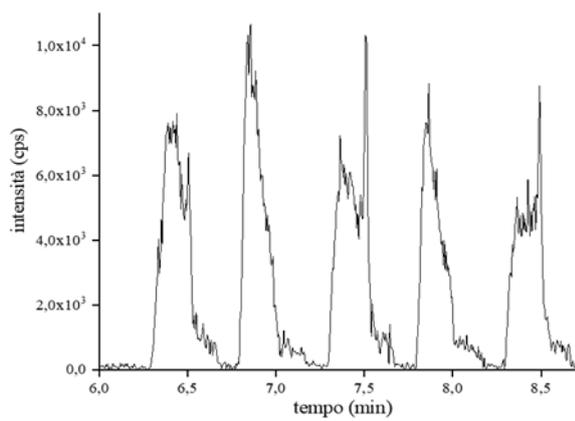
b)



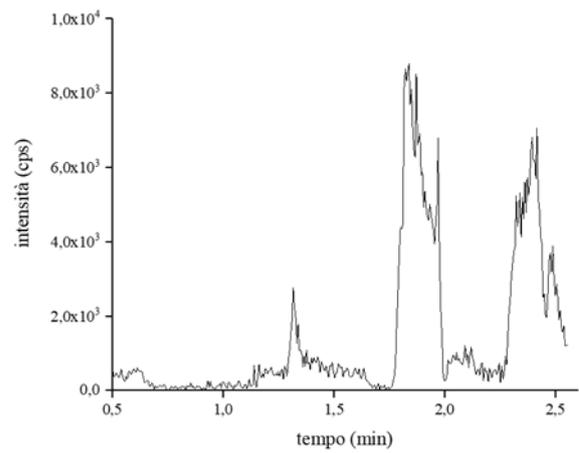
c)



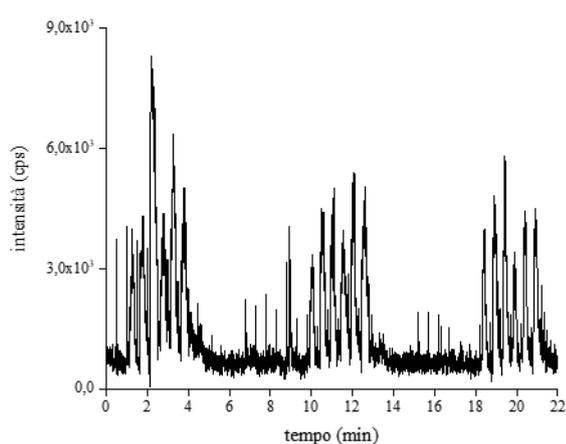
d)



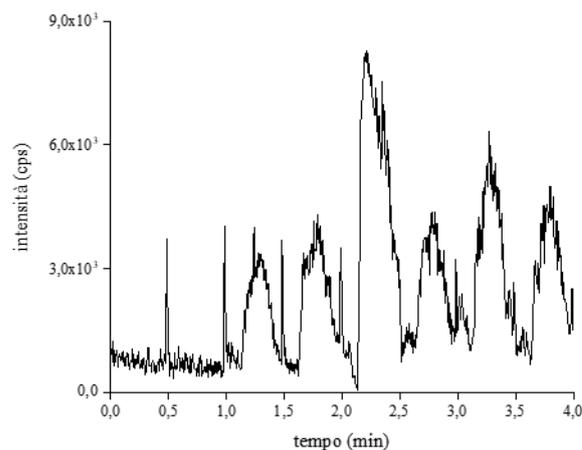
e)



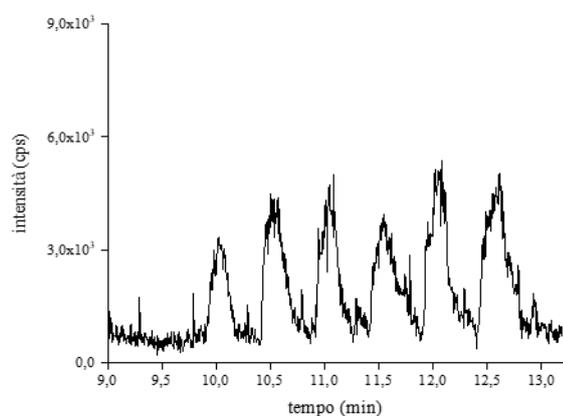
f)



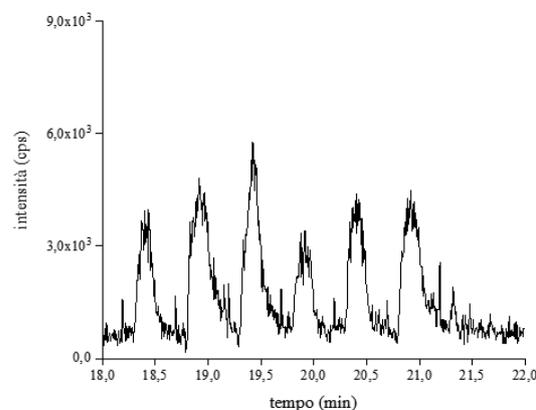
g)



h)



i)



l)

Figura 8.4. Prove dello sviluppo del metodo cromatografico con diverse condizioni e tipo di colonne

8.1.2 OTTIMIZZAZIONE DELLA SORGENTE ESI

Per migliorare la ionizzazione nella sorgente ed ottenere quindi un segnale migliore, è stato usato un reattivo post colonna attraverso l'uso di una pompa in modo da caricare nella sorgente un flusso di ammoniaca al 7% in metanolo con velocità di $70 \mu\text{L min}^{-1}$. L'ammoniaca, comportandosi da base debole, permette di facilitare la deprotonazione del levoglucosano; il metanolo è invece il solvente che permette la migliore ionizzazione nella sorgente ESI.

Sono stati poi ottimizzati i seguenti parametri relativi alla sorgente: la pressione del gas di nebulizzazione e del gas ausiliario (GS1 e GS2), il potenziale applicato all'ago della sorgente (IS), la

temperatura (T), i gas in controcorrente in uscita dallo skimmer cone (CUR), la pressione del gas di collisione in Q2 (CAD). La modalità utilizzata per questa operazione è la *flow injection analysis (FIA)* che consiste nell'introduzione diretta di una soluzione standard a concentrazione nota, utilizzando il cromatografo senza le colonne montate e con una percentuale di fase mobile corrispondente al tempo di ritenzione dell'analita in esame.

Nella tabella seguente (Tab.10) sono riportati i parametri finali impostati per la sorgente; nel grafico sottostante (Fig.8.5) accompagnato dalla relativa tabella (Tab.11) si può vedere il confronto delle aree dei picchi ottenute alle diverse temperature testate per la sorgente.

Tabella 10. Parametri sorgente ESI

Parametro	Valore
CAD	6 psi
CUR	40 psi
GS1	50 psi
GS2	60 psi
IS	-4500 eV
Temperatura	600 °C

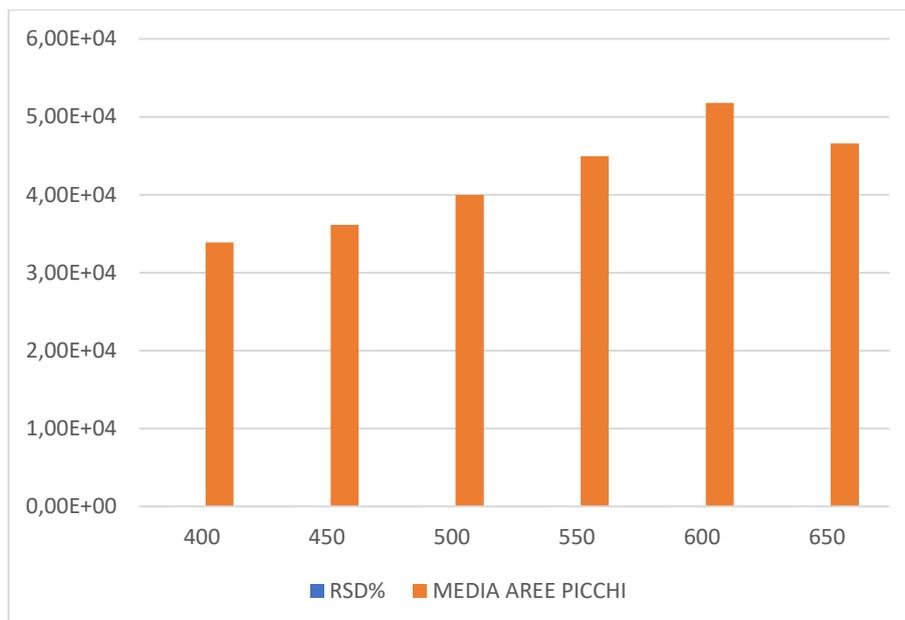


Figura 8.5. Istogramma delle diverse aree di picco ottenute alle diverse T della sorgente

Tabella 11. Valori relativi alla media delle aree dei picchi e RSD% ottenuti alle diverse T di sorgente

T (°C)	RSD%	Media aree picchi
400	15	3.4E+04
450	7	3.6E+04
500	10	4.0E+04
550	2	4.5E+04
600	13	5.2E+04
650	11	4.7E+04

Come si può vedere dai risultati si è ottenuto un migliore segnale lavorando con il forno a 600 °C, è quindi stata impostata proprio questa temperatura.

8.2 RISPOSTA STRUMENTALE

8.2.1 LINEARITÀ

La linearità della risposta per l'analita in esame è stata ottenuta mediante curva di calibrazione individuando il rapporto della concentrazione analita/standard interno contro il rapporto area analita/area standard interno. Lo standard interno utilizzato è il levoglucosan marcato isotopicamente. La curva (Fig.8.6) è stata ottenuta iniettando una serie di soluzioni standard di levoglucosan e levoglucosan marcato preparate in acqua ultrapura, aventi le seguenti concentrazioni crescenti di levoglucosan: 100 pg mL⁻¹, 200 pg mL⁻¹, 500 pg mL⁻¹, 1 ng mL⁻¹, 2 ng mL⁻¹, 5 ng mL⁻¹, 10 ng mL⁻¹, 20 ng mL⁻¹, 50 ng mL⁻¹.

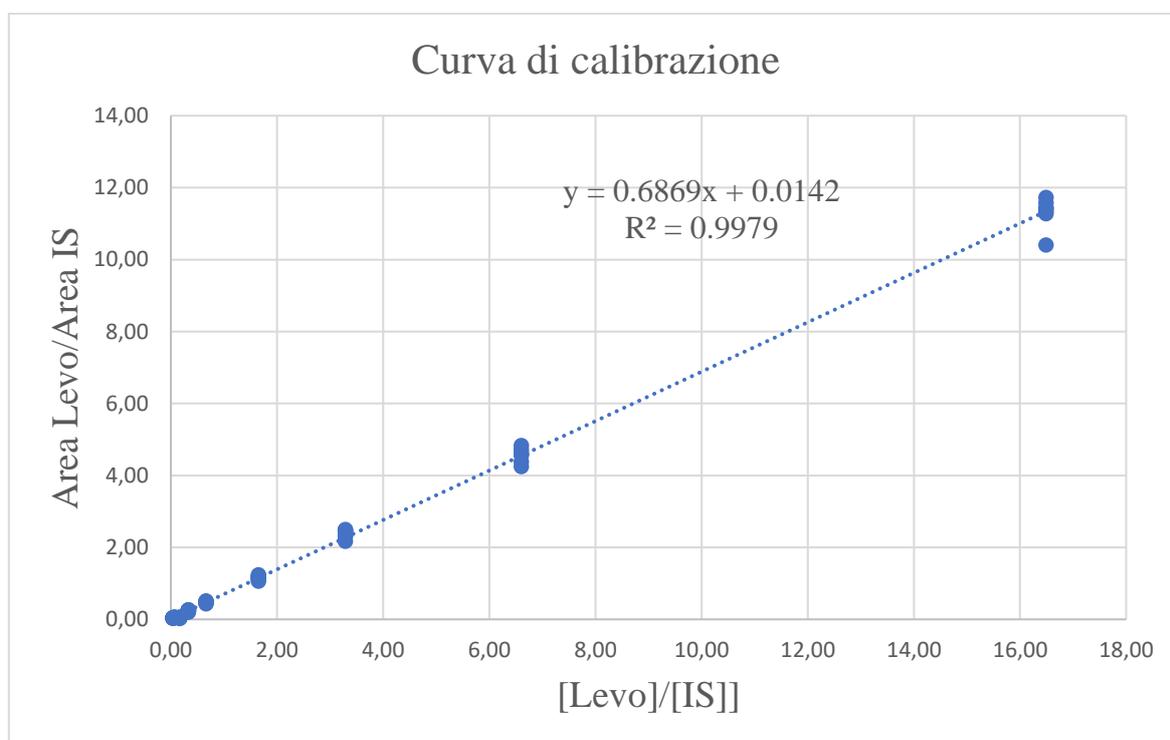


Figura 8.6. Curva di calibrazione

Si è ottenuto un ottimo valore del coefficiente di regressione lineare (R^2), maggiore di 0.99, che ci ha confermato la linearità della risposta. Abbiamo poi calcolato per ogni standard il coefficiente di variazione percentuale (CV%) (Tab.12) sulle diverse aree di picco ottenute per il levoglucosan, così da avere una indicazione sulla precisione della misura.

Tabella 12. Coefficiente di variazione percentuale (CV%) ottenuto per ciascuno standard

Standard	CV%
100 pg mL ⁻¹	14
200 pg mL ⁻¹	7.8
500 pg mL ⁻¹	9.8
1 ng mL ⁻¹	9.6
2 ng mL ⁻¹	6.6
5 ng mL ⁻¹	8.9
10 ng mL ⁻¹	6.4
20 ng mL ⁻¹	5.5
50 ng mL ⁻¹	5.3

Il CV% è risultato sempre inferiore a 10 tranne che per lo standard a 100 pg mL⁻¹; il che è ragionevole in quanto essendo quello meno concentrato fornisce una risposta strumentale meno precisa.

8.2.2 LIMITE DI RILEVABILITÀ E QUANTIFICAZIONE STRUMENTALI

Il limite di rilevabilità (LOD) e di quantificazione (LOQ) strumentali sono definiti come la concentrazione di una soluzione standard il cui rapporto segnale/rumore è uguale rispettivamente a 3 (LOD) e a 10 (LOQ) (Bliesner, 2006). Essi sono stati calcolati a partire dal punto più basso della curva di calibrazione (cioè dalla concentrazione minore), utilizzando il rapporto segnale/rumore ricavato con il software Analyst.

I valori di LOD e LOQ sono rispettivamente 0.06±0.03 e 0.2±0.1 ng mL⁻¹.

Rispetto allo studio di Gambaro et al. (2008) per la determinazione del levoglucosan eseguita con tecnica HPLC/(-)ESI-MS/MS, che riporta un valore di LOD pari a 3 pg mL⁻¹, abbiamo ottenuto con questo strumento in continuo e con un cromatografo UHPLC un LOD leggermente più alto.

8.3 QUANTIFICAZIONE LEVOGLUCOSAN

Il nostro metodo ottimizzato e validato è stato utilizzato per la determinazione della concentrazione del levoglucosan nella carota di ghiaccio campionata a Weißseespitz. Per la quantificazione del levoglucosan è stato utilizzato il metodo del fattore di risposta mediante l'utilizzo dello standard ad 1 ng mL^{-1} iniettato ogni giorno prima dello scioglimento della prima "bag". Il fattore di risposta (RF) è calcolato mediante la seguente espressione:

$$\text{RF} = \frac{A_{\text{levo}}}{A_{\text{IS}}} \times \frac{C_{\text{IS}}}{C_{\text{levo nello std.}}}$$

Trovato il fattore di risposta si ottiene la concentrazione del levoglucosan nel campione nel seguente modo:

$$C_{\text{levo}} = \frac{A_{\text{levo}}}{A_{\text{IS}}} \times \frac{C_{\text{IS}}}{\text{RF}}$$

Il nostro sistema d'analisi ha permesso, grazie all'elaborazione dei dati, di determinare la concentrazione di levoglucosan relativa alle diverse profondità della carota di ghiaccio (Fig.8.7).

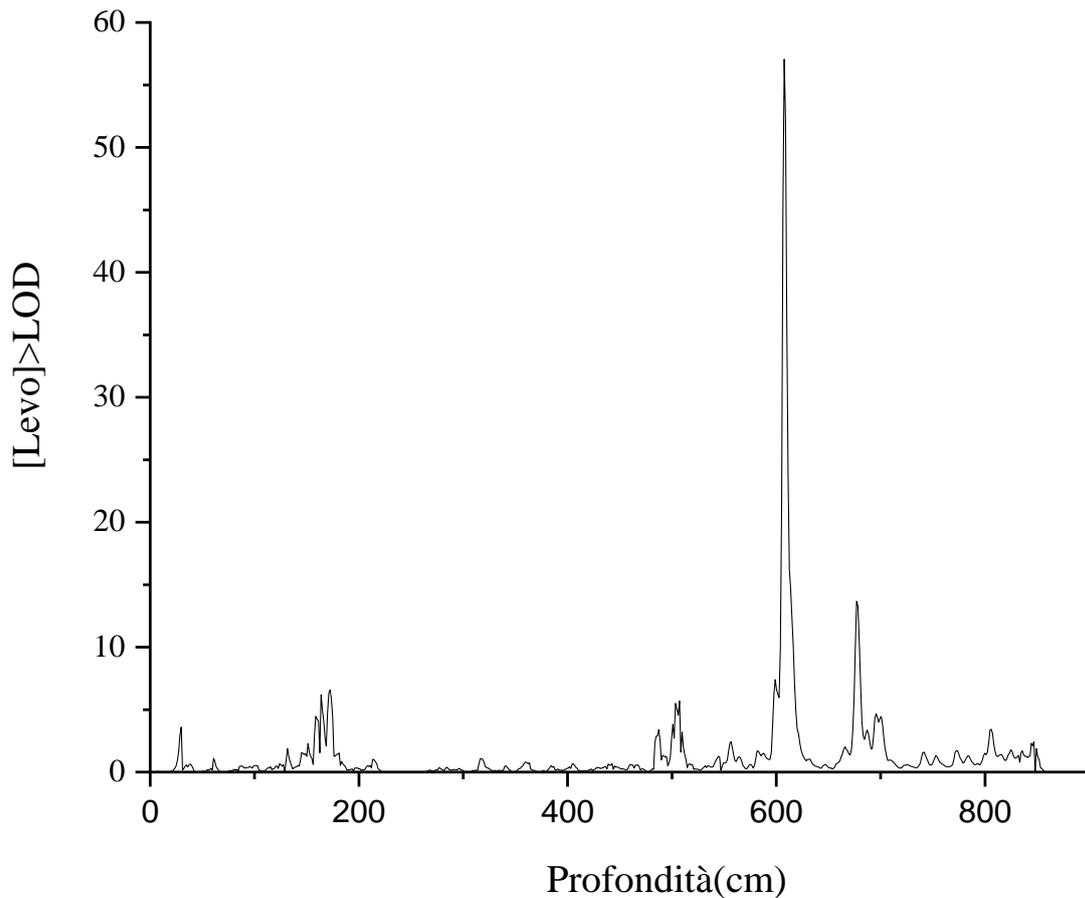


Figura 8.7. Grafico relativo alla concentrazione di levoglucosan alle diverse profondità

La concentrazione minima rilevata (>LOD) è stata di 0.67 ng mL^{-1} a 21 cm di profondità; invece, la concentrazione massima è risultata di 57 ng mL^{-1} a 607 cm di profondità. Come si vede dal grafico in figura 8.7, sono stati registrati dei picchi di concentrazione i cui dettagli sono riassunti nella tabella seguente (Tab.14).

Tabella 14. Valori di concentrazione media e deviazione standard del levoglucosan nei picchi registrati

Range di profondità (cm)	Concentrazione media levoglucosan (ng mL^{-1})
27-30	2.7 ± 1.0
157-175	4.4 ± 1.5

485-489	2.9±0.3
500-511	3.7±1.5
596-621	17±17
675-680	10±3.2
694-702	4.3±0.3
804-809	2.9±0.6

Abbiamo quindi trovato, grazie alla nostra analisi, nel ghiacciaio austriaco Weißseespitze, importanti tracce dell'analita a differenti livelli di profondità. Come detto in precedenza, essendo quest'ultimo un importante e specifico marcatore della combustione di biomassa, possiamo dedurre che negli anni passati, in differenti momenti, si siano verificate delle combustioni tali da trasportare e depositare il levoglucosan in queste zone.

8.4 IONI MAGGIORI

Grazie al campionamento in discreto ottenuto tramite il fraction collector sono stati analizzati da altri ricercatori i seguenti ioni maggiori: Cl^- , Br^- , NO_3^- , NH_4^+ , Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , MSA, SO_4^{2-} .

La determinazione degli anioni è stata fatta tramite cromatografo ionico (ThermoScientific™ Dionex™ ICS-5000, Waltham, US) dotato di una colonna a scambio anionico (Dionex Ion PacAS11 2 × 250 mm) ed una colonna di guardia più corta (Dionex Ion PacAG11 2 × 50 mm). La fase mobile utilizzata è l'idrossido di sodio. Il cromatografo è stato accoppiato ad uno spettrometro di massa a singolo quadrupolo (MSQPlus™, Thermo Scientific™) in modalità SIM con sorgente ESI operante in modalità negativa ad una temperatura di 500 °C.

Per l'analisi cationica sono state utilizzate altre due colonne disposte in un secondo scompartimento dello stesso cromatografo, ovvero la colonna capillare a scambio cationico (Dionex IonPac CS19-4 μm , 0.4×250 mm) e una colonna di guardia (Dionex IonPacCG19-4 μm , 0,4 × 50 mm). La fase mobile utilizzata è stato l'acido metansolfonico (MSA). La rivelazione avviene per via conduttimetrica.

Il trend ottenuto dall'analisi degli ioni maggiori (Fig.8.8) ha portato alla luce delle evidenze particolari e molto importanti, che ci hanno permesso di formulare alcune ipotesi.

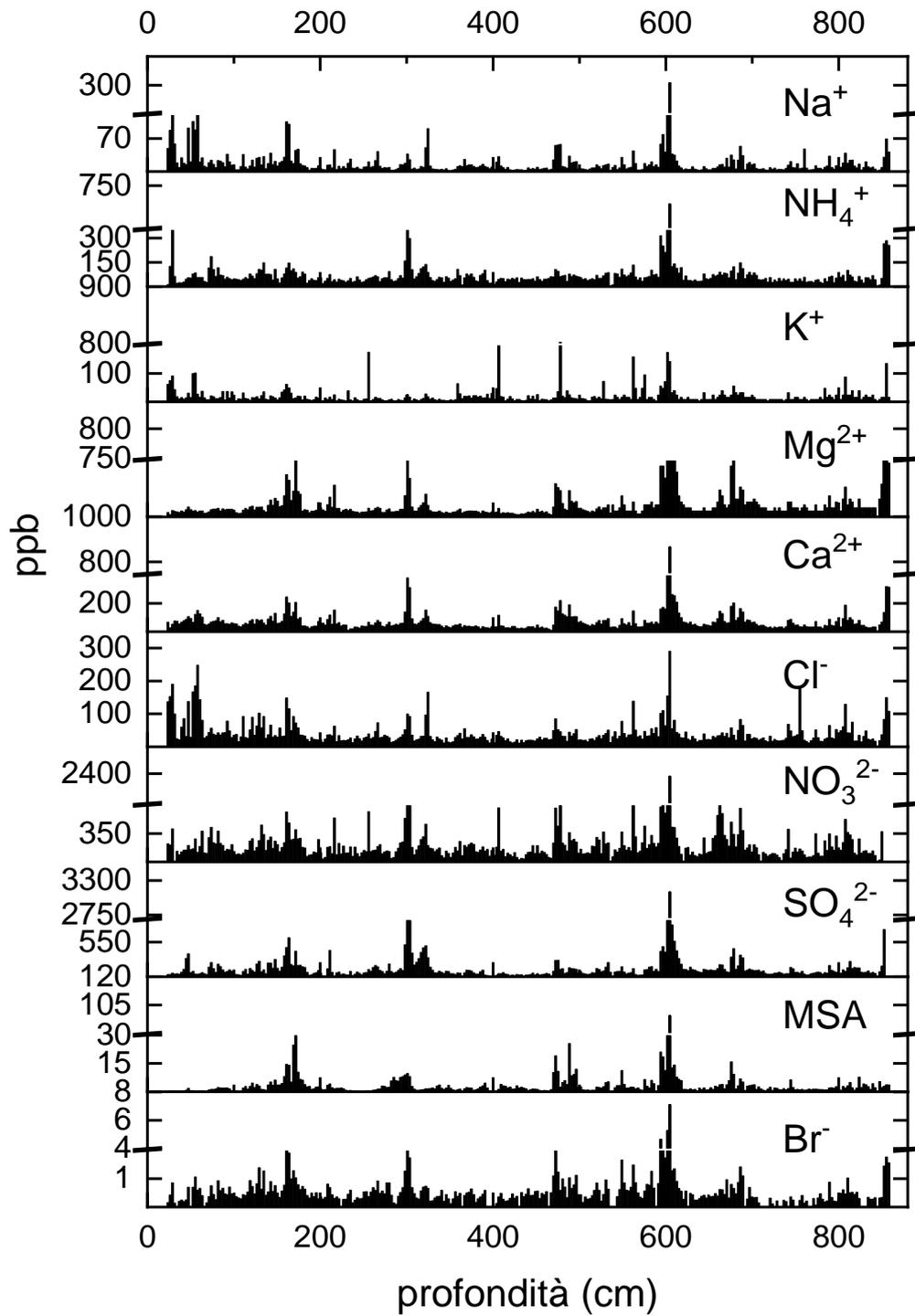


Figura 7.8. Trend ioni maggiori nella carota di ghiaccio analizzata

Abbiamo notato che il picco molto accentuato del levoglucosan a circa 600 cm di profondità (Fig.8.7) è accompagnato dalla presenza di picchi molto intensi relativi a vari ioni oltre ai tipici indicatori della combustione come il solfato ed il potassio.

La forte presenza anche di questi ioni insoliti (Fig.8.8) ha portato alla formulazione di due ipotesi principali. Secondo una prima ipotesi potrebbe essersi verificata una percolazione del ghiacciaio fuso accompagnata da un successivo ricongelamento che ha portato tutte le particelle, depositate lì per motivi ancora ignoti, a concentrarsi tutte assieme. La seconda ipotesi suggerisce invece un trasporto di particelle a lungo raggio da tante sorgenti in uno stesso momento.

Tra i vari picchi che accompagnano il levoglucosan, è emerso anche un picco molto particolare relativo all'acido metansolfonico (MSA). Quest'ultimo è risultato da alcuni studi bibliografici come marker molto preciso della fioritura di fitoplancton; quindi, questa evidenza sarà spunto per studi successivi affinché si possa capire quale evento si sia verificato nel passato.

Sebbene i dati ottenuti siano ancora preliminari, dal punto di vista ambientale rappresentano un interessante punto di partenza per ulteriori verifiche e interpretazioni. Ulteriori sviluppi nei risultati si potranno ottenere da studi più approfonditi sulla datazione della carota di ghiaccio e sull'analisi isotopica.

9. CONCLUSIONI

Il presente lavoro di tesi ha permesso lo sviluppo di un metodo analitico molto particolare e mai utilizzato sino ad ora per la determinazione di uno specifico marcatore della combustione di biomassa, il levoglucosan, nella carota di ghiaccio Weißseespitze (WSS, 3500 m) campionata nel ghiacciaio Gepatschferner sulle Alpi austriache.

Nello sviluppo del metodo cromatografico sono state scelte le migliori colonne per il nostro analita (*Synergi™ 2.5 µm Hydro-RP 100 Å, 30 x 2 mm*) ed è stato selezionato il migliore eluente organico (acetonitrile) da introdurre nella fase mobile assieme all'acqua; abbiamo valutato il migliore gradiente da utilizzare (5%-100% acetonitrile), la velocità del flusso di eluizione ($700 \mu\text{L min}^{-1}$), la temperatura del forno ($70 \text{ }^\circ\text{C}$). Successivamente sono stati ottimizzati i parametri della sorgente ESI operante con temperatura pari a $600 \text{ }^\circ\text{C}$.

Il limite di rilevabilità strumentale (LOD) è risultato pari a 0.06 ng mL^{-1} , leggermente superiore rispetto a quello ottenuto da Gambaro et al., (2008) ($\text{LOD} = 3 \text{ pg mL}^{-1}$) utilizzando il sistema HPLC-ESI-MS/MS.

La linearità della risposta strumentale è stata valutata mediante curva di calibrazione con concentrazione degli standard nel range compreso tra 100 pg mL^{-1} e 50 ng mL^{-1} , ed è stato ottenuto un $R^2 > 0.99$. Per ogni livello di concentrazione è stata valutata la precisione della misura mediante il CV% che è risultato sempre inferiore al 10% tranne per lo standard a minore concentrazione.

Il nostro sistema in continuo (CFA-FLC-MS/MS) è stato applicato per la determinazione della concentrazione di levoglucosan su diverse sezioni della carota di ghiaccio campionata. La concentrazione di levoglucosan è risultata nel range dei ng mL^{-1} , in particolare quella minima rilevata ($>\text{LOD}$) è risultata di 0.67 ng mL^{-1} e quella massima di 57 ng mL^{-1} .

Grazie alla tecnologia del sistema utilizzato è stato possibile relazionare le quantità di levoglucosan rilevate, alle differenti profondità della carota, ottenendo dei risultati molto utili e importanti per la ricostruzione, dell'attività incendiaria degli anni passati.

Osservando il trend degli ioni maggiori, ottenuto dall'analisi svolta da altri ricercatori, è stata osservata la presenza, in concomitanza con il picco maggiore del levoglucosan, di ioni insoliti come traccianti della combustione di biomassa.

Questa evidenza ci ha condotto a due ipotesi: un possibile scioglimento del ghiaccio accompagnato da un ricongelamento successivo che ha portato alla concentrazione delle particelle depositate nelle vicinanze; un trasporto di particelle a lungo raggio da più sorgenti in uno stesso momento.

Nei prossimi anni, grazie a studi più approfonditi dal punto di vista ambientale, sarà possibile ottenere dei risultati più precisi e dettagliati.

Concludendo, il sistema d'analisi in continuo CFA-FLC-MS/MS ha permesso la determinazione del nostro analita in tracce nella carota, la minimizzazione della contaminazione grazie all'eliminazione di vari passaggi preparativi, una notevole riduzione del tempo di analisi, la possibilità di eseguire più analisi da un unico scioglimento grazie ai diversi fraction collector ed una maggiore risoluzione verticale del dato analitico rispetto all'analisi in discreto.

10. BIBLIOGRAFIA

- Ardrey, R., (2003). *Liquid chromatography - mass spectrometry: an introduction*. New York: J.Wiley pp.276.
- Barbaro, E., Feltracco, M., Spagnesi, A., Dallo, F., Gabrieli, J., de Blasi, F., Zannoni, D., Cairns, W. R. L., Gambaro, A., & Barbante, C., (2022). Fast Liquid Chromatography Coupled with Tandem Mass Spectrometry for the Analysis of Vanillic and Syringic Acids in Ice Cores. *Analytical Chemistry*, 94(13), pp. 5344–5351.
- Bhattarai, H., Saikawa, E., Wan, X., Zhu, H., Ram, K., Gao, S., Kang, S., Zhang, Q., Zhang, Y., Wu, G., Wang, X., Kawamura, K., Fu, P., Cong, Z., (2019). Levoglucosan as a tracer of biomass burning: Recent progress and perspectives. *Atmospheric Research*, 220, 20-33.
- Bliesner, D., (2006). *Validating chromatographic methods: A Practical Guide*, J.Wiley, pp.304.
- Bohleber, P., Schwikowski, M., Stocker-Waldhuber, M., Fischer, A., (2020). New glacier evidence for ice-free summits during the life of the Tyrolean Iceman. *Sci. Rep.* 10, 20513.
- Cramers, C., Keulemans, A., McNair, H. (1961). Techniques of gas chromatography, in Heftmann, E., *Chromatography*, New York: Reinhold, pp.299-323.
- Dansgaard, W., (1964). Stable isotopes in precipitation. *Tellus*, 16(4), pp.436-468.
- Elias, V., Simoneit, B., Cordeiro, R., Turcq, B., (2001). Evaluating levoglucosan as an indicator of biomass burning in Carajas, Amazonia: A comparison to the charcoal record. *Geochim. Cosmochim. Acta*, 65(2), pp.267-272.
- Federer, U., Kaufmann, P.; Hutterli, M., Schüpbach, S., Stocker, T., (2008). *Continuous Flow Analysis of Total Organic Carbon in Polar Ice Cores*. *Environ. Sci. Technol.* 42 (21), 8039–8043.

- Fraser, M., Lakshmanan, K., (2000). Using levoglucosan as a molecular marker for the long-range transport of biomass combustion aerosols. *Environ. Sci. Technol.*, 34(21), pp. 4560-4564.

- Gambaro, A., Zangrando, R., Gabrielli, P., Barbante, C., Cescon, P., (2008). Direct determination of levoglucosan at the picogram per milliliter level in Antarctic ice by high-performance liquid chromatography/electrospray ionization triple quadrupole mass spectrometry. *Anal. Chem.*, 80(5), pp. 1649-1655.

- Ginot, P., Stampfli, F., Stampfli, D., Schwikowski M., Gaggeler, H.W. (2002). FELICS, a new ice core drilling system for high-altitude glaciers. *Mem. Natl Inst. Polar Res., Spec.*, 56, pp.38–48.

- Hennigan, C., Sullivan, A., Collett, J., Robinson, A., (2010). Levoglucosan stability in biomass burning particles exposed to hydroxyl radicals. *Geophys. Res. Lett.*, 37(9).

- Hoffmann, D., Tilgner, A., Iinuma, Y., Herrmann, H., (2010). Atmospheric Stability of Levoglucosan: A Detailed Laboratory and Modeling Study. *Environ. Sci. Technol.* 44(2), pp. 694-699.

- Holmes, B., Petrucci, G., (2007). Oligomerization of levoglucosan by Fenton chemistry in proxies of biomass burning aerosols. *J. Atmos. Chem.* 58(2), pp.151-166.

- Imbrie, J., Boyle, E., Clemens, S.C., Duffy, A., Howard, W., Kukla, G., Kutzbach, J., Martinson, D.G., McIntyre, A., Mix, A.C., Molfino, B., Morley, J., Peterson, L, Pisias, N., Prell, W., Raymo, M., Shackleton, N., Toggweiler J., (1992). On the structure and origin of major glacial cycles. 1. Linear responses to Milankovich forcing. *Paleoceanography*, 7(6), pp.701–738.

- Johnsen, S., Dansgaard, W., White, J., (1989). The origin of Arctic precipitation under present and glacial conditions. *Tellus B: Chem. and Phis.Met.*, 41(4), pp.452-468.

- Kehrwald, N., Zangrando, R., Gabrielli, P., Jaffrezo, J., Boutron, C., Barbante, C., Gambaro, A., (2012). Levoglucosan as a specific marker of fire events in Greenland snow. *Tellus B: Chem. Phys. Meteorol.*, 64(1), p.18196.

- Kellner, R., Mermet, J.M., Otto, M., Widmer, H.M. *Chimica Analitica*, Napoli, Edises (2003). I Ed., 5, 172,179,201.

- Knox, J., Pryde, A., (1975). Performance and selected applications of a new range of chemically bonded packing materials in high-performance liquid chromatography. *J. of Chromatography A*, 112, pp.171-188.

- Knüsel, S.; Piguet, D. E.; Schwikowski, M.; Gäggeler, H. W., (2003). Accuracy of Continuous Ice-Core Trace-Element Analysis by Inductively Coupled Plasma Sector Field Mass Spectrometry. *Environ. Sci. Technol.*, 37(10), 2267–2273.

- Lüthi, D., Le Floch, M., Bereiter, B., Blunier, T., Barnola, J., Siegenthaler, U., Raynaud, D., Jouzel, J., Fischer, H., Kawamura, K., Stocker, T., (2008). High-resolution carbon dioxide concentration record 650,000–800,000 years before present. *Nature*, 453(7119), pp.379–382.

- Mann, M., (2021). Beyond the hockey stick: Climate lessons from the Common Era. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 118(39), pp. 1-9.

- McConnell, J., Edwards, R., Kok, G., Flanner, M., Zender, C., Saltzman, E., Banta, J., Pasteris, D., Carter, M., Kahl, J., (2007). 20th-century industrial black carbon emissions altered arctic climate forcing. *Science*, 317(5843), pp.1381-1384.

- Nahar, L., Sarker, S., (2019). Guest editorial: UPLC in phytochemical analysis. *Trends in Phytochem Res.*, 3(1),1-2.¹

- Nahar, L., Onder, A., Sarker, S., (2019). A review on the recent advances in HPLC, UHPLC and UPLC analyses of naturally occurring cannabinoids (2010–2019). *Phytochem. Anal.*, 31(4), pp.413-457.²

- Nováková, L., Matysová, L., Solich, P. Advantages of application of UPLC in pharmaceutical analysis. (2006). *Talanta*, 68 (3), pp. 908-918.

- Petit, J., Basile, I., Leruyet, A., Raynaud, D., Lorius, C., Jouzel, J., Stievenard, M., Lipenkov, V., Barkov, N., Kudryashov, B., Davis, M., Saltzman, E., Kotlyakov, V., (1997). Four climate cycles in Vostok ice core. *Nature*, 387(6631), pp.359–360.

- Petit, J., Jouze, J., Raynaud, D., Barkov N. Barnola, J., Basile, I., Bender, M., Chappellaz, J., Davis, G., Delaygue M., Delmotte, V., Kotlyakov, M., Legrand, V., Lipenkov J., Lorius, C., Pépin, L., Ritz C., Salzman, E., Stievenard, M., (1999). Climate and atmospheric history of the past 420,000 years from the Vostok ice core, Antarctica. *Nature*, 399(6735), pp. 429-436.

- Pio, C., Legrand, M., Alves, C., Oliveira, T., Afonso, J., Caseiro, A., Puxbaum, H., Sánchez-Ochoa, A., Gelencsér, A., (2008). *Chemical composition of atmospheric aerosols during the 2003 summer intense forest fire period. Atmos. Environ.*, 42(32), pp. 7530-7543.

- Ruffell, A., (1999). Paleoclimatology. Reconstructing climates of the Quaternary. *Cretaceous Research*. 20(5), pp.660-661.

- Sigg, A., Fuhrer, K., Anklin, M., Staffelbach, T., Zurmuehle, D., (1994). A continuous analysis technique for trace species in ice cores. *Environmental Science & Technology*, 28(2), pp.204-209.

- Simoneit, B., Schauer, J., Nolte, C., Oros, D., Elias, V., Fraser, M., Rogge, W., Cass, G., (1999). Levoglucosan, a tracer for cellulose in biomass burning and atmospheric particle. *Atmos. Environ.*, 33(2), pp. 173-182.

- Simoneit, B., (2002). Biomass burning - A review of organic tracers for smoke from incomplete combustion. *Appl. Geochem.*, 17(3), pp.129-162.

- Skoog, D., West, D., Holler, F., Crouch, S. *Fundamentals of analytical chemistry*. Belmont, Calif. Brooks/Cole (2004). VIII Ed., 32, 973³, 974¹, 978², 983².

- Spolaor, A., Vallelonga, P., Gabrieli, J., Roman, M., Barbante, C., (2013). Continuous flow analysis method for determination of soluble iron and aluminium in ice cores. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 405(2-3), pp.767-774.

- Stohl, A., Berg, T., Burkhardt, J., Fjaeraa, A., Forster, C., and co-authors., (2007). Arctic smoke record high air pollution levels in the European Arctic due to agricultural fires in Eastern Europe in spring 2006. *Atmos. Chem. Phys.*, 7(2), pp.511-534.

- Traversi, R., Becagli, S., Castellano, E., Migliori, A., Severi, M., Udisti, R., (2002). High-resolution fast ion chromatography (FIC) measurements of chloride, nitrate and sulphate along the EPICA Dome C ice core. *Ann. Glaciol.*, 35, pp. 291–298.

- Wang, X., Thai, P., Mallet, M., Desservettaz, M., Hawker, D., Keywood, M., Miljevic, B., Paton-Walsh, C., Gallen, M., Mueller, J., (2017). Emissions of selected semi-volatile organic chemicals from forest and savannah fires. *Environ. Sci. Technol.*, 51(3), pp.1293–1302.

- Winski, D., Fudge, T., Ferris, D., Osterberg, E., Fegyveresi, J., Cole-Dai, J., Thundercloud, Z., Cox, T., Kreutz, K., Ortman, N., Buizert, C., Epifanio, J., Brook, E., Beaudette, R., Severinghaus, J., Sowers, T., Steig, E. J., Kahle, E., Jones, T., Morris, V., Aydin, M., Nicewonger, M., Casey, K., Alley, R., Waddington, E., Iverson, N., Dunbar, N., Bay, R., Souney, J., Sigl, M. and McConnell, J., (2019). The SP19 chronology for the South Pole Ice Core – Part 1: volcanic matching and annual layer counting. *Clim. of the Past*, 15(5), pp.1793–1808.

- Zennaro, P., Kehrwald, N., McConnell, J., Schüpbach, S., Maselli, O., Marlon, J., Vallelonga, P., Leuenberger, D., Zangrando, R., Spolaor, A., Borrotti, M., Barbaro, E., Gambaro, A., Barbante, C., (2014). Fire in ice: two millennia of boreal forest fire history from the Greenland NEEM ice core. *Climate of the Past*. 10, pp.1905-1924.

