

UNIVERSITÀ CA' FOSCARI VENEZIA



**DIPARTIMENTO DI SCIENZE MOLECOLARI E NANOSISTEMI
CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN CHIMICA E TECNOLOGIE SOSTENIBILI
TESI DI LAUREA MAGISTRALE**

**SVILUPPO E CONVALIDA DI UN METODO ANALITICO PER
LA DETERMINAZIONE DI UN PRINCIPIO ATTIVO
MEDIANTE CROMATOGRAFIA LIQUIDA**

Relatore: PROF. BEGHETTO Valentina

Correlatore: DR. BALESTRA Graziano

Laureando:

DANESE Filippo

Matricola n°.

862687

ANNO ACCADEMICO 2021-2022

Sommario

RIASSUNTO	
ABSTRACT	
1. INTRODUZIONE.....	
1.1 Biocida	1
1.2 Tipologie di Biocida.....	1
1.3 Disinfettanti.....	2
1.3.1 Livelli di disinfezione	2
1.3.2 Classificazione dei disinfettanti	3
1.4 Legislazione	6
1.5 Generalità	8
1.6 High/Ultra Performance Liquid Chromatography	9
1.6.1 Strumentazione LC.....	12
1.7 Rilevatore DAD.....	14
1.8 Spettrometria di massa	16
1.8.1 Strumentazione LC-TQ.....	17
1.9 Criteri di validazione dei metodi analitici.....	24
2. SCOPO DEL LAVORO DI TESI.....	27
3. PARTE SPERIMENTALE.....	28
3.1 Verifica della solubilità del principio attivo.....	29
3.2 Messa a punto ed ottimizzazione del metodo strumentale LC-DAD.....	29
3.3 Messa a punto ed ottimizzazione del metodo strumentale LC-TQ.....	31
4. RISULTATI E DISCUSSIONE.....	38
4.1 Verifica della solubilità del principio attivo.....	38
4.2 Validazione del metodo strumentale LC-DAD.....	39
4.2.1 Preparazione delle soluzioni usate in fase di validazione.....	39
4.2.2 Valutazione della linearità.....	39
4.2.3 Valutazione della precisione (ripetibilità)	41
4.2.3 Valutazione del fenomeno di carry-over	43
4.2.4 Stima dell'incertezza estesa del misurando	44
4.3 Validazione del metodo strumentale LC-TQ.....	45
4.3.1 Preparazione delle soluzioni usate in fase di validazione.....	45
4.3.2 Valutazione della linearità.....	45
4.3.2 Valutazione della precisione (ripetibilità)	50
4.3.3 Valutazione del fenomeno di carry-over	51
4.3.4 Stima dell'incertezza estesa del misurando	51
5. CONCLUSIONI.....	52
6. BIBLIOGRAFIA	53

RIASSUNTO

Oggi, le malattie infettive rappresentano uno dei problemi sanitari più rilevanti al mondo. La pandemia mondiale causata dal Sars-CoV-2 ha ulteriormente aumentato la pressione per lo sviluppo di nuovi agenti antibatterici che siano efficienti, non tossici e sostenibili dal punto di vista ambientale ed economico. Infatti molte aziende si sono dedicate alla realizzazione di nuovi prodotti per far fronte alla forte domanda di mercato in quanto, almeno nella fase iniziale, i disinfettanti rappresentavano l'unico mezzo (insieme ai dispositivi di protezione individuale) per contrastare il contagio.

Tuttavia, secondo il Regolamento (EU) n. 528 del 2012, tutti i biocidi, tra cui rientrano anche i disinfettanti, prima di essere immessi sul mercato devono ricevere un'autorizzazione; che richiede, tra i vari punti, di identificare la sostanza e caratterizzarla in base alla sua natura.

Il presente lavoro di tesi, svolto presso il laboratorio di Chimicambiente S.r.l., si propone di sviluppare e convalidare un metodo analitico sulla base del documento SANCO/3030/99 rev. 5, per la determinazione di un principio attivo di un disinfettante, della tipologia dei composti dell'ammonio quaternario. A tale scopo sono stati valutati e calcolati alcuni parametri di validazione, tra cui rientrano, la riproducibilità, la precisione, la linearità e il limite di quantificazione (LOQ), la specificità e l'esattezza del metodo.

Tali dati sono stati ottenuti mediante cromatografia liquida accoppiata ad un rilevatore a serie di diodi (LC-DAD) e ad uno spettrometro di massa costituito da una sorgente a ionizzazione elettrospray abbinata ad un analizzatore a doppio quadrupolo dotato di cella di collisione e fotomoltiplicatore (LC-TQ).

ABSTRACT

Today, infectious diseases are one of the most pressing health problems in the world.

The global pandemic caused by Sars-CoV-2 has further increased the pressure for the development of new antibacterial agents that are efficient, non-toxic, and environmentally and economically sustainable. In fact, in order to cope with the strong market demand of disinfectants, that in the initial phase represented the only means to counteract the infection (together with personal protective equipment) many companies have been involved in the development of new products.

However, according to Regulation (EU) n. 528 of 2012, all biocides, which also include disinfectants, must receive an authorization before being placed on the market; which demands, among the requirements, to identify the substance and characterize it according to its nature.

This thesis work, carried out in the laboratory of Chemicambiente S.r.l., aims to develop and validate an analytical method based on the document SANCO/3030/99 rev. 5, for the determination of an active principle of a disinfectant, of the typology of quaternary ammonium compounds. For this purpose, some validation parameters were evaluated and calculated, including reproducibility, precision, linearity and limit of quantification (LOQ), specificity and accuracy of the method.

These data were obtained by liquid chromatography coupled to a diode array detector (LC-DAD) and to a mass spectrometer consisting of an electrospray ionization source combined with a double quadrupole analyzer equipped with a collision cell and photomultiplier (LC-TQ).



1. INTRODUZIONE

Il presente lavoro di tesi è stato svolto nell'ambito di un tirocinio aziendale presso Chimicambiente S.r.l. con la supervisione della Prof. V. Beghetto del Dipartimento di Scienze Molecolari e Nanosistemi dell'Università Ca' Foscari di Venezia.

Le attività svolte hanno riguardato la produzione e l'interpretazione di dati atti allo sviluppo e alla convalida di molteplici metodi analitici inerenti e non al progetto di tesi.

Infatti Chimicambiente S.r.l. è un laboratorio che effettua analisi nel settore ambientale e dei materiali da oltre 15 anni, adeguandosi sempre con estrema rapidità ai cambiamenti del settore ed alle nuove normative in vigore. È in grado di fornire informazioni e consulenze mirate sulle prove eseguite e sui risultati ottenuti, monitorando nel tempo il grado di soddisfazione dei propri clienti. Inoltre il laboratorio è accreditato ACCREDIA n. 0763, in conformità ai requisiti della norma UNI CEI EN ISO/IEC 17025:2005, ed aderisce agli standard ISO 9001 e ISO 14001. Questo aspetto assicura un'elevata qualità nel controllo dell'erogazione di servizi quali analisi chimiche su matrici ambientali e dei materiali, tenendo sotto controllo la conformità legislativa nonché gli impatti ambientali causati dagli stessi.

1.1 Biocida

Il termine biocida si riferisce ad agenti chimici che hanno attività antisettica, disinfettante o conservante. Si utilizzano ampiamente in diversi ambiti, tra cui quello casalingo, ospedaliero o industriale per eliminare il pericolo dato dall'esistenza di alcuni microrganismi patogeni. La disinfezione infatti ha l'obiettivo di ridurre notevolmente la presenza di microrganismi patogeni o indesiderati per prevenire la trasmissione delle malattie.¹

Secondo il Regolamento (UE) 528/2012 un biocida è: "qualsiasi sostanza o miscela nella forma in cui è fornita all'utilizzatore, costituita da, contenenti o capaci di generare uno o più principi attivi, allo scopo di distruggere, eliminare e rendere innocuo, impedire l'azione o esercitare altro effetto di controllo su qualsiasi organismo nocivo, con qualsiasi mezzo diverso dalla mera azione fisica o meccanica".²

1.2 Tipologie di Biocida

A seconda del campo d'impiego i biocidi vengono suddivisi in quattro gruppi che a loro volta costituiscono i 22 tipi di prodotto possibili:

- Gruppo 1 – Disinfettanti: per l'igiene umana o veterinaria, per la disinfezione di superfici, materiali, attrezzature e mobilio anche nel settore alimentare e dell'acqua potabile.
- Gruppo 2 – Preservanti: per prevenire lo sviluppo di microrganismi in vari prodotti, proteggere oggetti in legno dall'azione di organismi, come i tarli, in grado di danneggiarlo, evitare che tessuti, prodotti in cuoio, gomma o muratura si rovinino a causa della crescita di batteri o alghe, conservare i liquidi di raffreddamento di varie attrezzature.
- Gruppo 3 – Controllo degli animali nocivi: rodenticidi, avicidi, molluschi, pescicidi, insetticidi, acaricidi e altri prodotti destinati al controllo di animali nocivi al fine di evitare ad esempio perdite economiche legate al consumo di alimenti ed alla riduzione della conservabilità, sia contaminazioni dovute alla diffusione di germi e miceti e/o alla deposizione di uova, feci, urine, direttamente sui cibi, sulle superfici di lavoro, i recipienti o le attrezzature.
- Gruppo 4 – Altri biocidi: prodotti antincrostazione adoperati nelle imbarcazioni, oppure fluidi usati nell'imbalsamazione e nella tassidermia per la disinfezione e la preservazione di cadaveri umani o di animali o di loro parti.²

1.3 Disinfettanti

I disinfettanti comprendono un vasto gruppo di sostanze che hanno lo scopo di distruggere, eliminare, diminuire, impedire l'azione di batteri, virus, spore e, in alcuni casi, alghe o altri microorganismi. Per tali caratteristiche sono utilizzati per la disinfezione di ambienti, superfici e oggetti di varia natura, ed usati nei settori medico-chirurgico e industriale, nella produzione alimentare e nell'allevamento (per la disinfezione di stalle e di mezzi di trasporto per animali).³

I fattori che influenzano l'efficacia della disinfezione includono la pulizia preventiva dell'oggetto, la carica organica ed inorganica presente, il tipo e livello di contaminazione microbica, la concentrazione e il tempo di esposizione al germicida; la natura fisica dell'oggetto, la temperatura e il pH del processo di disinfezione.⁴

Questi inoltre non vanno confusi con i detergenti, i quali hanno il solo scopo di rimuovere lo sporco, diminuendo la tensione presente tra la superficie e lo sporco. Comunemente, per esplicitare la loro funzione al meglio sostanze detergenti e disinfettanti vengono adoperate consecutivamente. A differenza dei disinfettanti, i detergenti non sono soggetti a una procedura di autorizzazione per la produzione e la messa in commercio.⁵

1.3.1 Livelli di disinfezione

La disinfezione, a seconda dell'efficacia antimicrobica del prodotto, è classificata in tre livelli: basso, intermedio e alto (Figura 1).

I disinfettanti di basso livello, tra i quali i sali di ammonio quaternario, possono uccidere la maggior parte dei batteri in forma vegetativa, oltre che alcuni funghi e virus.

I disinfettanti di livello intermedio, come cloro e derivati, agiscono sui micobatteri, batteri vegetativi, la maggior parte dei virus e dei funghi, ma non necessariamente sulle spore batteriche.

Infine con la disinfezione di alto livello, che avviene adoperando ad esempio il perossido di idrogeno al 6-10%, vengono colpiti tutti i microorganismi ad eccezione di un certo numero di spore batteriche.⁶ Invece, il processo che si prefigge di distruggere su un substrato o in un determinato ambiente tutte le forme di vita, spore comprese è definito sterilizzazione.



Figura 1: piramide dei processi antimicrobici.

1.3.2 Classificazione dei disinfettanti

I disinfettanti possono essere suddivisi in diverse tipologie a seconda del principio attivo che li costituiscono:

- **Alcoli:** con tale termine si fa riferimento principalmente all'alcol etilico ed isopropilico, capaci entrambi di esplicare una funzione battericida, piuttosto che batteriostatica, tramite denaturazione, disidratazione ed estrazione di lipidi di membrana. Per migliorarne l'attività risulta preferibile diluire l'alcol in acqua a concentrazioni in volume comprese tra il 60% e il 90% per facilitarne l'assorbimento nella cellula, mentre la loro azione diminuisce drasticamente se diluiti al di sotto del 50%. Inoltre gli alcoli essendo infiammabili predispongono l'utilizzatore a dei rischi, e l'esposizione per tempi prolungati è complicata dalla loro veloce evaporazione.⁷
- **Derivati del fenolo:** il loro precursore è il fenolo, composto organico aromatico che, dato il suo odore pungente e soprattutto il suo effetto tossico, è stato sostituito da suoi derivati. Tra i più comuni ci sono l'orto-fenilfenolo e l'orto-benzil-para-clorofenolo con proprietà antimicrobiche nettamente superiori. Tali composti causano la morte batterica per inattivazione dei sistemi enzimatici essenziali e fuoriuscita di metaboliti dalla parete cellulare.⁸
- **Composti biguanidici:** rientra in questa categoria la clorexidina, disinfettante ad ampio spettro e antisettico ampiamente utilizzato in campo medico, *Figura 2*.

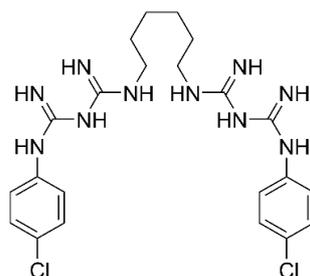


Figura 2: struttura molecolare della clorexidina.

A basse concentrazioni ha azione batteriostatica, determinando alterazioni di membrana con perdita dei componenti citoplasmatici, invece ad alte concentrazioni ha azione battericida, attraverso la denaturazione delle proteine citoplasmatiche. L'efficacia del composto, oltre che dalla concentrazione, è dipendente dal pH, i cui valori devono essere tra 5 e 7.⁹

- Composti dell'ammonio quaternario (QACs): sono una classe ben nota di agenti antimicrobici caratterizzati da un ampio spettro di attività e durata nel tempo grazie alla loro persistenza sulle superfici trattate. Vengono comunemente inseriti nei prodotti per la pulizia domestica, nei conservanti alimentari, nei prodotti sanitari e nei materiali biomedici.

Come evidenziato in *Figura 2*, sono tensioattivi cationici costituiti da quattro gruppi alchilici, arilici o eterociclici legati ad un atomo di azoto centrale, e da un controione carico negativamente, come un atomo di cloro o bromo.

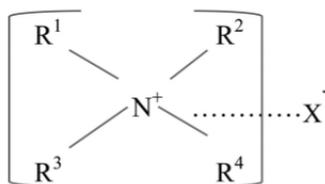


Figura 3: struttura base dei composti contenenti un ammonio quaternario.

Per quanto riguarda il meccanismo d'azione, illustrato in *Figura 4*, è generalmente accettato che l'azoto carico positivamente, riesca ad interagire elettrostaticamente con la superficie della membrana batterica carica negativamente penetrandola; tale fenomeno viene promosso dall'affinità della lunga catena lipofila con la membrana cellulare causando gradualmente la morte cellulare. Pertanto, l'efficienza antimicrobica del QACs dipende oltre che dalla presenza di una catena idrofoba, strutturalmente simile al doppio strato della membrana, anche da una o più teste polari capaci di interagire con gli acidi fosfolipidici.

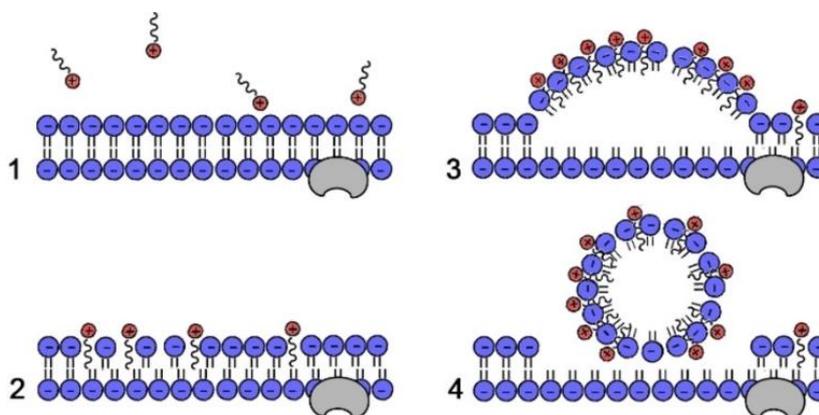


Figura 4: meccanismo generale di azione dei QACs in cui le membrane fosfolipidiche sono indicate in blu mentre i sali di ammonio quaternario in rosso.

Infatti a seconda del numero di cariche positive presenti, possono essere suddivisi in Mono, Bis (Gemini) e Tris-QACs, *Figura 5*.

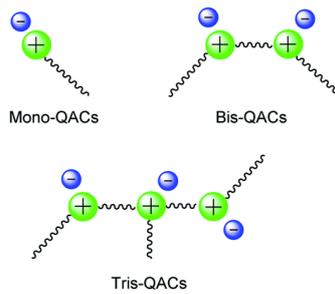


Figura 5: classificazione generale dei QACs.

Nonostante la possibilità di modulare le proprietà dei QACs intervenendo direttamente sulla loro struttura chimica, l'utilizzo di questi composti comporta anche degli svantaggi tra cui l'elevata tossicità e lo sviluppo di resistenza batterica.

Tuttavia, i bis-QACs sono in generale più efficaci, meno tossici e inducono a fenomeni di resistenza batterica minori rispetto ai mono-QACs disponibili in commercio, tra cui il benzalconio cloruro, e ai tris-QACs.¹⁰⁻¹²

- Agenti ossidanti: tra questi rientrano il perossido di idrogeno, l'acido peracetico e il permanganato di potassio. Causano la morte cellulare per ossidazione e precipitazione prima delle proteine di membrana e poi di quelle citoplasmatiche.
- Aldeidi: agiscono denaturando le proteine tramite alchilazione dei gruppi polari. Il rappresentante più importante è la formaldeide per il vantaggioso rapporto costo/beneficio anche se negli ultimi anni è meno usata per l'azione caustica su cute e mucose, per la permanenza di residui nell'ambiente e per la sospetta cancerogenicità.¹³
- Alogeni: vengono suddivisi a seconda dell'alogeno utilizzato, tra i più comuni ci sono i composti a base di cloro e iodio.

Il cloro è in grado di legare chimicamente il protoplasma batterico formando cloroammine le quali o agiscono direttamente sui batteri oppure in acqua idrolizzano a dare la specie battericida HOCl.¹⁴

Lo iodio invece è in grado di interagire con i doppi legami fosfolipidici presenti nelle pareti cellulari provocandone la rottura e la conseguente perdita di materiale intracellulare, inoltre alogenando le proteine cellulari ne causa la precipitazione.¹³

- Metalli e derivati: i composti a base di argento sono tra i più noti ed usati per le loro proprietà battericide ma si possono anche adoperare il rame, lo zinco, il ferro, il piombo, l'alluminio e l'oro. Sebbene il meccanismo d'azione dell'argento non sia noto con certezza, si ritiene che i suoi atomi riescano a legare i gruppi tiolo (-SH) degli enzimi disattivandoli.¹⁵ Altre teorie, invece, ipotizzano che gli ioni Ag⁺ riescano a denaturare le catene di DNA andando a scindere i legami idrogeno tra basi azotate dei filamenti antiparalleli.¹⁶

1.4 Legislazione

Il 22 maggio 2012 l'Europa ha adottato il Regolamento n. 528 del Parlamento europeo e del Consiglio relativo alla messa a disposizione sul mercato e all'uso dei biocidi.

Tale Regolamento, oltre ad abrogare la direttiva sui biocidi 98/8/CE, è volto a migliorare la libera circolazione dei biocidi all'interno dell'Unione, assicurando nel contempo un livello elevato di tutela sia della salute umana e animale sia dell'ambiente.

Nello specifico tutti i biocidi, prima di poter essere immessi sul mercato, richiedono un'autorizzazione, della durata massima di dieci anni, che viene rilasciata dall'Autorità competente dello Stato membro, mentre le sostanze attive contenute in essi, devono essere preventivamente approvate dall'Unione Europea.

Successivamente l'autorizzazione può essere estesa ad altri Stati membri per riconoscimento reciproco.

Esistono, tuttavia, alcune eccezioni a tale prassi. Ad esempio, i biocidi commercializzati prima della data di entrata in vigore della Direttiva 98/8/CE (14 maggio 2000) possono essere resi disponibili sul mercato e utilizzati nel rispetto delle normative nazionali, in attesa della decisione finale sull'approvazione del principio attivo e fino a tre anni dopo. Inoltre, anche i prodotti contenenti nuovi principi attivi ancora in fase di valutazione possono essere immessi sul mercato sulla base di autorizzazioni provvisorie.

Al momento dell'autorizzazione per i biocidi devono valere le seguenti condizioni:

- I principi attivi contenuti nel biocida devono rispettare tutte le condizioni previste per loro ed essere approvati per la tipologia di prodotto pertinente;
- se correttamente impiegati ai fini previsti essi siano sufficientemente efficaci e non abbiano effetti inaccettabili sugli organismi bersaglio, sulla salute umana e animale o sull'ambiente.
- Si devono determinare l'identità chimica, la quantità e l'equivalenza tecnica dei principi attivi nel biocida e, se del caso, le impurezze e le sostanze non attive significative e pertinenti dal punto di vista tossicologico ed ecotossicologico.
- le proprietà fisiche e chimiche del biocida sono state determinate e giudicate accettabili per garantire un uso e un trasporto adeguati del prodotto;
- è necessario rispettare i limiti massimi di residui sui prodotti alimentari, se previsti.
- in caso di impiego di nanomateriali il rischio per la salute umana, la salute animale e l'ambiente è stato valutato in modo distinto.

Inoltre si tiene conto anche dei seguenti fattori: delle peggiori condizioni realistiche di uso del biocida, delle possibili modalità di uso degli articoli trattati con il biocida o che lo contengono, delle conseguenze derivanti dall'uso e dallo smaltimento del biocida e degli effetti cumulativi e di quelli sinergici.

Invece l'approvazione di un principio attivo specifica, ove opportuno, le seguenti condizioni:

- il grado minimo di purezza del principio attivo;
- la natura e il tenore massimo di talune impurezze;
- il tipo di prodotto;
- le modalità e il settore d'uso;
- la designazione delle categorie di utilizzatori;
- la caratterizzazione dell'identità chimica per quanto riguarda gli stereoisomeri;
- altre condizioni particolari sulla base della valutazione delle informazioni relative a quel principio attivo;
- la data di approvazione del principio attivo e la scadenza dell'approvazione.²

L'applicazione del Regolamento europeo, in materia di biocidi, avviene tramite l'Agenzia Europea delle sostanze chimiche (*European Chemicals Agency, ECHA*) con sede a Helsinki.

Fra le autorità di regolamentazione, è quella che si occupa di assistere le società affinché si conformino alla legislazione, promuovendo l'uso sicuro delle sostanze chimiche, fornendo informazioni sulle sostanze chimiche e occupandosi delle sostanze preoccupanti.¹⁷

Tuttavia, l'attuazione completa del Regolamento 528/2012, comporterà tempi piuttosto lunghi durante i quali gli Stati membri, in caso di carenze legislative, potranno applicare la propria legislazione nazionale. In realtà, in alcuni Stati, la produzione e la commercializzazione dei biocidi non necessitano di conformità o approvazione in quanto non è stata sviluppata una regolamentazione apposita. In Italia, invece, il 6 ottobre 1998 il Presidente della Repubblica emanò il D.P.R. n. 392 che disciplina il procedimento di autorizzazione alla produzione e all'immissione in commercio di presidi medico-chirurgici, gruppo generico comprendente tra le varie categorie anche i disinfettanti e le sostanze poste in commercio come germicide o battericide.¹⁸ Due anni dopo, il 25 febbraio 2000, venne emanato il decreto legislativo n. 174 in materia di immissione sul mercato dei biocidi per attuare la direttiva europea 98/8/CE.¹⁹

Dunque, l'Italia è in una fase transitoria, in cui il Regolamento europeo del 2012 è quello attualmente valido, mentre nei casi non previsti si fa riferimento al D.P.R. n. 392/1998 se il prodotto rientra tra i presidi medico-chirurgici o al D.Lvo n. 174/2000 se invece ricade nei biocidi.

1.5 Generalità

Sebbene in letteratura ci siano molti studi che coinvolgono i composti dell'ammonio quaternario (QACs), i loro processi analitici sono ancora soggetti a problematiche.²⁰ Ci sono vari motivi che rendono difficile l'analisi di questi composti.

In primo luogo, a causa della loro natura anfifilica sono composti fortemente predisposti a legarsi o adsorbirsi a vari substrati,²¹ quindi la concentrazione in forma libera di questi composti può essere piuttosto bassa. Per questo motivo qualsiasi metodo venga sviluppato necessita di una sensibilità sufficiente oppure di una fase di estrazione atta a massimizzare i QACs nella loro forma libera.

Il secondo motivo è l'elevata perdita di principio attivo che si verifica a causa dell'uso di materiale di laboratorio in una tipica fase di preparazione del campione, con conseguente errore di quantificazione.

Il terzo motivo è il possibile fenomeno di carry-over durante l'analisi strumentale dovuto all'adsorbimento dei QACs, tramite interazioni di tipo secondario, in varie parti dello strumento tra cui: la colonna, l'iniettore, il loop di iniezione ed altre parti ancora.²²

Numerosi metodi sono stati sviluppati e utilizzati per l'analisi dei QACs, i primi metodi si basavano sulla titolazione potenziometrica e sulla spettrofotometria; tuttavia, questi metodi trovano impiego solo per determinare la concentrazione totale dei QACs, senza speciazione dei vari omologhi.^{22,23}

Al giorno d'oggi, gli approcci basati sulla cromatografia liquida accoppiata alla spettrometria di massa (LC-MS) hanno ampiamente sostituito i metodi classici.^{24,25}

Ad esempio, a causa della natura cationica dei composti dell'ammonio quaternario, l'LC-MS con ionizzazione elettrospray a ioni positivi permette di raggiungere buone prestazioni in termini di risultati analitici.

Uno sviluppo recente ed innovativo di tale tecnica è rappresentato dalla cromatografia liquida ad ultra prestazioni abbinata alla spettrometria di massa a triplo quadrupolo (LC-TQ) in quanto è possibile aumentare ulteriormente oltre che la velocità di analisi anche la sensibilità e la selettività.¹¹ Nonostante i numerosi aspetti positivi, tale tecnica esige un investimento economico iniziale superiore rispetto ad altre apparecchiature analitiche e di personale altamente qualificato capace di studiare, ad esempio, il fenomeno del carry-over e l'effetto matrice, che potrebbero inficiare l'analisi.

1.6 High/Ultra Performance Liquid Chromatography

La cromatografia liquida ad alta prestazione, *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC), è una tecnica analitica in grado di separare i singoli composti da una miscela complessa, permettendo di eseguire analisi sia qualitative sia quantitative.

Si tratta di una tecnica cromatografica che sfrutta il passaggio di una fase mobile attraverso una fase stazionaria posta all'interno di una colonna cromatografica.

La fase mobile è costituita da un fluido contenente le molecole da separare, mentre la fase stazionaria è formata da un solido o da un liquido opportunamente supportati.²⁶

Esistono cinque metodi con cui la fase stazionaria può trattenere l'analita:

- adsorbimento: l'analita forma dei legami deboli (forze di Van Der Waals: legame dipolo-dipolo) con la fase stazionaria;
- ripartizione: particolare propensione dell'analita verso l'eluente o verso il liquido che costituisce la fase stazionaria;
- esclusione: sfrutta il principio dell'ingombro sterico dell'analita, in base alle diverse dimensioni delle molecole, alcune saranno trattenute, altre passeranno facilmente attraverso la colonna;
- scambio ionico: si formano delle interazioni di tipo ionico tra l'analita e gli ioni presenti nelle resine di scambio ionico costituenti la fase stazionaria;
- Affinità: un primo stadio prevede l'uso di reazioni biochimiche che legano le molecole di analita nella fase stazionaria, successivamente l'intervento dell'eluente rompe i legami formatosi tra le molecole e la fase stazionaria ottenendo la separazione.

Alla fine della colonna è applicato un rilevatore e un calcolatore che permettono un'analisi in continuo dell'eluato all'uscita della colonna e quindi di poter quantificare e/o identificare le sostanze iniettate tramite il cromatogramma ottenuto.

Quest'ultimo è il segnale analitico, ovvero la rappresentazione grafica in cui viene riportato il tempo in funzione del segnale.

L'analisi qualitativa si basa sui tempi di ritenzione, ovvero il tempo che trascorre dall'iniezione della sostanza in colonna fino all'ottenimento di un picco rappresentativo. Infatti tale parametro è caratteristico per ogni analita a parità di condizioni operative.

Invece, le informazioni quantitative, derivano dall'area sottostante al picco cromatografico, che si deve convertire in concentrazione tramite tre diverse tecniche di quantificazione: curva di calibrazione interna, curva di calibrazione esterna e standard interno.

Esistono diversi parametri fondamentali che si occupano di definire la qualità del cromatogramma. Tali parametri sono:

- Costante di distribuzione (K_C) = $\frac{C_S}{C_M} = \frac{\text{Conc. dell'analita in ogni istante nella fase stazionaria}}{\text{Conc. dell'analita in ogni istante nella fase mobile}}$

La costante di distribuzione è una grandezza termodinamica che dipende dalla natura delle fasi; fornisce indicazioni sulla affinità di una miscela rispetto alla fase stazionaria: maggiore è il valore di K_C , maggiore sarà l'affinità;

- Fattore di ritenzione (K) = $\frac{t'_R}{t_M} = \frac{t_R - t_M}{t_M} = \frac{\text{tempo di ritenzione corretto}}{\text{tempo morto}}$

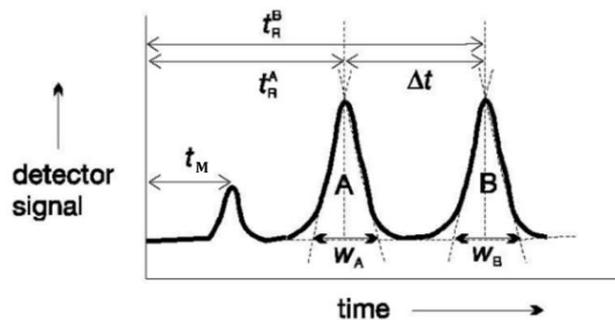


Figura 6: schema tipico di un cromatogramma.²⁷

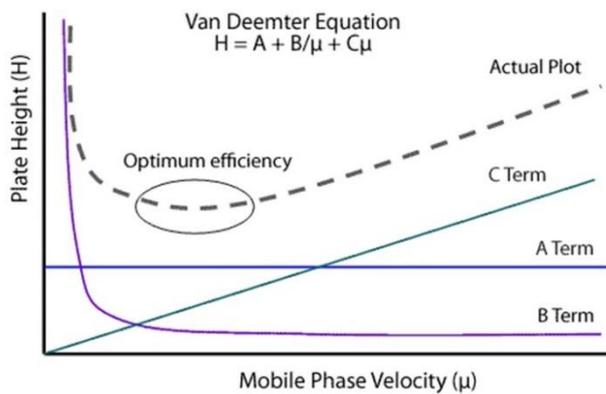
Il fattore di ritenzione è un parametro termodinamico e cinetico; misura il tempo di permanenza dell'analita d'interesse in una fase stazionaria rispetto al tempo di permanenza nella fase mobile. I parametri che incidono sul fattore di ritenzione sono le fasi e la temperatura. Per il calcolo del fattore di ritenzione, oltre al tempo di ritenzione, si deve tener conto del tempo morto, ossia il tempo di migrazione di una sostanza non trattenuta all'interno della colonna.

$$\text{Fattore di selettività } (\alpha) = \frac{K_B}{K_A} = \frac{t_{R(B)} - t_M}{t_{R(A)} - t_M}$$

La selettività è definita come il rapporto tra i fattori di ritenzione, ed è una misura della distanza tra i massimi di due picchi. Se $\alpha = 1$, i due picchi possiedono lo stesso tempo di ritenzione e coeluiscono.

- Efficienza (N) = $16 \cdot \left(\frac{t_R}{W_b}\right)^2 = 5,54 \cdot \left(\frac{t_R}{W_{1/2}}\right)^2 = \frac{L}{H} = \frac{\text{lunghezza della colonna}}{\text{altezza di un piatto teorico}}$

L'efficienza della colonna permette di confrontare le prestazioni di colonne diverse. È espressa come numero di piatti teorici, N. Le colonne con un alto numero di piatti sono più efficienti. Una colonna con N elevato genera un picco più stretto a un dato tempo di ritenzione rispetto a una colonna con un valore N inferiore. L'efficienza della colonna è direttamente proporzionale alla sua lunghezza ed inversamente proporzionale alle dimensioni delle particelle della fase stazionaria. Inoltre, in accordo con l'equazione di Van Deemter, l'efficienza della colonna è correlata all'altezza equivalente a un piatto teorico (HETP) la quale dipende dai parametri di flusso e cinetici che determinano l'ampliamento del picco:



$$HETP = A + \frac{B}{u} + Cu$$

Figura 7: grafico dell'equazione Van Deemter.²⁸

In particolare A è il coefficiente di diffusione turbolenta, B è il coefficiente di diffusione longitudinale, C è la resistenza al coefficiente di trasferimento di massa mentre u è la velocità della fase mobile. La forma dell'equazione di Van Deemter è tale per cui l'HETP raggiunge un valore minimo a una determinata velocità del flusso. A questa portata, il potere risolutivo della colonna è massimizzato, sebbene in pratica il tempo di eluizione sia probabilmente impraticabile. La velocità ottimale della fase mobile u, corrispondente al minimo del diagramma di Van Deemter, risulta essere:

$$u = \sqrt{\frac{B}{C}}$$

- Risoluzione (R_s) = $\frac{1}{4}\sqrt{N} \cdot \left(\frac{\alpha-1}{\alpha}\right) \cdot \left(\frac{k}{1+k}\right) = \frac{2\Delta t}{W_A+W_B}$

La risoluzione è la capacità di una colonna di separare i picchi di interesse, matematicamente tiene conto di: efficienza (N), selettività (α) e ritenzione (k).

Una risoluzione pari a 1 è il valore minimo per ottenere una separazione misurabile e una quantificazione adeguata. In genere affinché i metodi siano validi sono necessari valori pari o superiori a 1,7.^{29,30}

1.6.1 Strumentazione LC

Le componenti principali che costituiscono un'apparecchiatura per HPLC sono:

- modulo solventi: vengono alloggiati le varie soluzioni, organiche ed acquose, che possono essere utilizzate singolarmente o in miscela;
- modulo pompe: generano pressioni fino a centinaia di bar e mantengono un flusso stabile tra 0,1 e 10 ml/min;
- modulo iniezione: costituito da una valvola a più vie e da un circuito a volume fisso, o loop, nel quale si inserisce il campione;
- modulo colonne: alloggiamento dove vengono collocate una o più colonne cromatografiche ed eventuali precolonne con fornello termostatico; la lunghezza delle colonne è solitamente compresa tra 10 e 30 cm, il diametro interno tra 1,7 e 4,6 mm mentre il diametro delle particelle del riempimento varia tra 3,5 e 10 µm;
- modulo rivelatore: rileva gli analiti di interesse secondo le caratteristiche specifiche.
- Modulo analisi dati: computer dotato di un software (ad esempio OpenLab o MassHunter) per la gestione e l'elaborazione dei dati, e nei sistemi moderni anche la diagnostica strumentale.

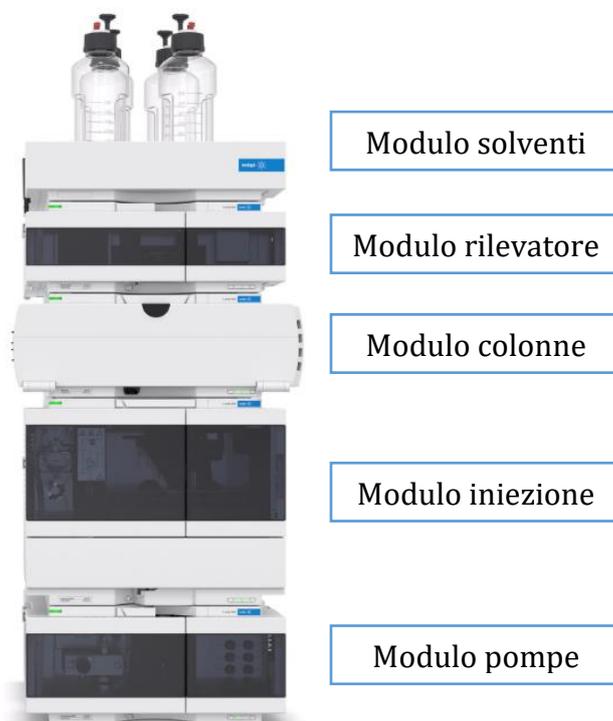


Figura 8: Agilent 1260 Infinity II LC/DAD WR System.³¹

La tecnologia *Ultra Performance Liquid Chromatography* (UPLC™) è basata sui principi classici cromatografici, tuttavia a differenza dell'HPLC, opera con:

- Colonne più corte e piccole dal diametro interno compreso tra 0,75 e 1,8 mm;
- fasi stazionarie costituite da particelle microporose inferiori ai 2 µm;
- Pressioni che possono raggiungere i 1300 bar;

Un esempio di colonna utilizzata per la tecnica UPLC è formata da particelle ibride da 1,7 micron costituite da etil silicene con strutture a ponti etano, e risultano resistenti alle alte pressioni, in grado di operare in un ampio range di pH compreso tra 1 e 12 e arrivare a temperature superiori gli 80 °C.³²

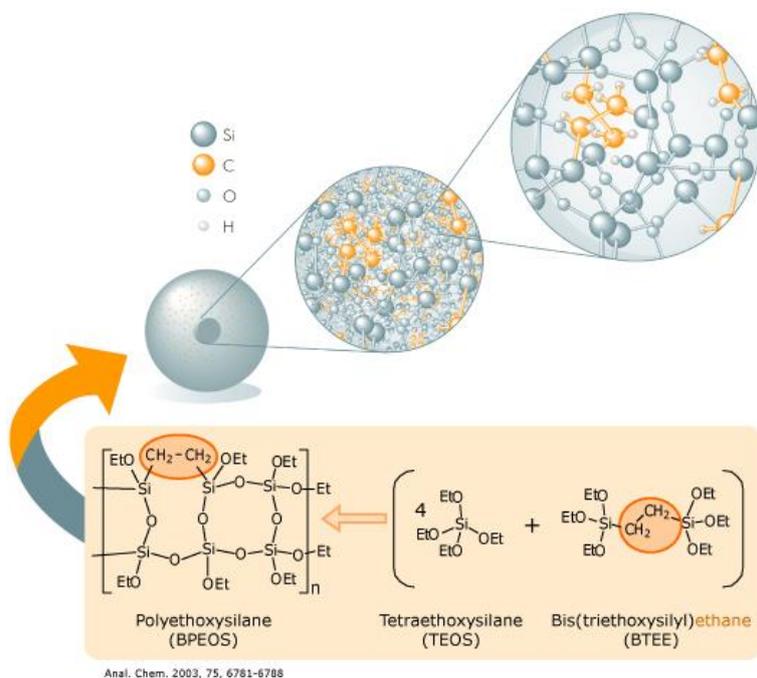


Figura 9: struttura di una particella presente all'interno di una colonna utilizzata per UPLC.³³

1.7 Rilevatore DAD

Il rilevatore a serie di diodi (DAD), *diode-array detection*, è tra i più adoperati in cromatografia liquida; il suo funzionamento si basa sull'assorbimento, da parte dell'analita d'interesse, di specifiche lunghezze d'onda che cadono nel range tra il vicino ultravioletto (200-350 nm) e il visibile (350-700 nm).

la registrazione simultanea dello spettro in funzione di più lunghezze d'onda avviene tramite dei fotodiodi collocati in una striscia, piuttosto che eseguire delle scansioni, *Figura 10*.

Così facendo si ottengono dei grafici tridimensionali in funzione dell'assorbanza, della lunghezza d'onda e del tempo, oppure mappe di assorbanza (tempo contro lunghezza d'onda), oltre ai classici spettri UV e cromatogrammi.²⁹

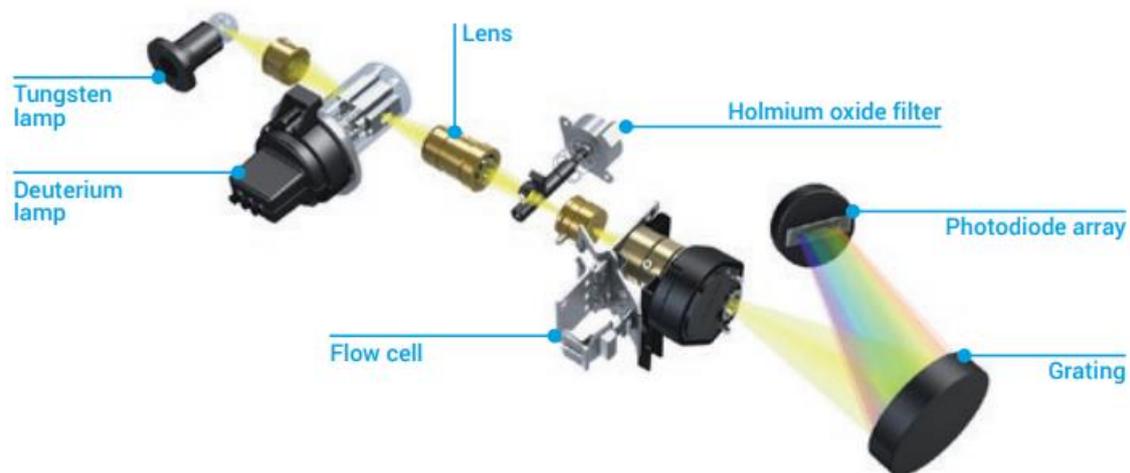


Figura 10: diagramma schematico delle principali componenti di un rilevatore Agilent 1260 DAD WR.³¹

L'area del picco ottenuta dal cromatogramma viene poi correlata alla concentrazione dell'analita attraverso la legge di Lambert-Beer; secondo cui l'assorbanza A di una radiazione elettromagnetica monocromatica a lunghezza d'onda λ da parte di una soluzione che contiene N specie chimiche capaci di assorbire a quella lunghezza d'onda è proporzionale alla somma pesata delle loro concentrazioni:

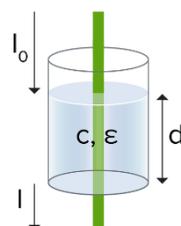


Figura 11: fenomeno dell'assorbimento della radiazione ad opera di un mezzo.

$$A_\lambda = -\log \frac{I}{I_0} = d \sum_{i=1}^N \varepsilon_i^\lambda c_i$$

I	intensità della radiazione elettromagnetica monocromatica trasmessa
I_0	intensità della radiazione elettromagnetica monocromatica incidente
A	assorbanza (adimensionale)
d	cammino ottico (cm)
ε_i^λ	coefficiente di estinzione o coefficiente di assorbimento molare della specie i alla lunghezza d'onda λ (cm ² /mol)
c_i	concentrazione molare della specie i (mol/L)

Il cammino ottico e' lo spessore di soluzione attraversato dalla radiazione.

Il coefficiente di assorbimento molare e' una caratteristica della specie assorbente e dipende dalla lunghezza d'onda. Esso e' in relazione con la probabilità della transizione per la data specie assorbente alla data lunghezza d'onda dei fotoni incidenti.

Se la soluzione contiene una sola specie in grado di dare assorbimento, la legge di Lambert-Beer diventa:

$$A_\lambda = \varepsilon^\lambda dc$$

L'assorbimento è tanto maggiore quanto maggiore è la probabilità che un fotone incontri una molecola della specie assorbente; tale probabilità è proporzionale alla lunghezza del percorso che il fotone compie all'interno della soluzione (d) e alla concentrazione della specie assorbente (c). Inoltre, a parità di cammino ottico e concentrazione, l'assorbimento è proporzionale alla probabilità della transizione implicata e quindi è proporzionale a ε^λ .

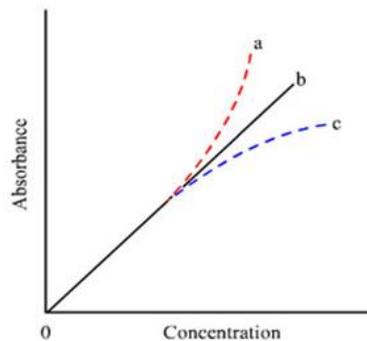


Figura 12: deviazioni alla legge di Lambert-Beer.

La legge di Lambert-Beer non sempre e' verificata. Cause di deviazione dalla linearità possono essere concentrazioni troppo elevate, per cui le interazioni soluto-solvente, soluto-soluto e legami idrogeno influenzano l'intorno dell'analita, o scarsa monocromaticità della radiazione generata dallo spettrofotometro, che è legata al coefficiente di assorbimento molare.^{34,35}

1.8 Spettrometria di massa

La spettrometria di massa (MS) è una tecnica analitica capace di quantificare e identificare i singoli composti in una miscela complessa tramite formazione, separazione e rilevazione degli ioni in base al loro rapporto di massa su carica (m/z).

Le componenti principali che costituiscono uno spettrometro di massa sono:

- Sorgente: ha la funzione di volatilizzare, frammentare e ionizzare l'analita; a seconda della forza di frammentazione vengono suddivise in sorgenti hard (impatto elettronico) oppure sorgenti soft (ionizzazione chimica, elettrospray, FAB, MALDI);
- Analizzatore: ha il compito di selezionare e distinguere gli ioni in funzione del loro rapporto m/z ;
- Detector: consente di trasformare e amplificare il segnale rendendo possibile la rilevazione degli ioni separati nell'analizzatore.

Tra le tre componenti principali sono posti dei sistemi di trasferimento, dette lenti focalizzatrici, in modo da conservare nella totalità tutti gli ioni prodotti dalla sorgente e non influenzare il segnale analitico.

Inoltre la strumentazione lavora ad alto vuoto (10^{-5} – 10^{-6} torr) per non alterare gli ioni tramite ulteriori frammentazioni o perdita di carica, ed ottenere uno spettro che in questo modo risulta caratteristico dell'analita d'interesse.

Il segnale analitico che si ottiene è lo spettro di massa in cui viene riportata l'intensità relativa degli ioni in funzione del loro rapporto massa/carica.

Lo spettro di massa è unico di ogni composto in quanto direttamente correlato alla sua struttura chimica. Dunque, risulta possibile la rapida identificazione di composti attraverso il confronto, effettuato da un calcolatore, dello spettro incognito con raccolte di spettri noti, dette librerie, nelle stesse condizioni di ionizzazione. Oltre alle librerie, l'analisi qualitativa viene effettuata identificando lo ione molecolare ossia lo ione con il maggior valore di m/z ottenuto per ionizzazione della molecola da analizzare tramite protonazione, deprotonazione, cationizzazione o perdita di un elettrone. Nel caso di sorgenti soft, lo ione molecolare permette di risalire al peso molecolare del composto incognito. Lo ione più abbondante è invece definito picco base e solitamente è caratteristico della molecola, inoltre la sua intensità viene spesso normalizzata a 100 indipendentemente dal suo valore assoluto e gli altri ioni vengono rapportati ad esso. Infine l'individuazione delle frammentazioni specifiche, che rappresentano le perdite caratteristiche di massa, permettono la ricostruzione della struttura molecolare del composto.³⁶

1.8.1 Strumentazione LC-TQ

Nel corrente lavoro di tesi, considerate le caratteristiche chimico-fisiche dei QACs come riportato nel paragrafo 1.5, è stato adoperato un cromatografo liquido (LC) in linea con uno spettrometro di massa costituito da una sorgente a ionizzazione elettrospray (ESI) abbinata ad un analizzatore a doppio quadrupolo dotato di cella di collisione e fotomoltiplicatore (TQ), *Figura 13*.

In questo modo è possibile unire i vantaggi offerti da una tecnica separativa come la cromatografia liquida con le performance di rilevazione della spettrometria di massa.

Tale strumentazione permette in toto, utilizzando tecniche di desorbimento, di analizzare molecole termolabili, polari e in un intervallo di massa compreso tra 40 e 3000 Da.



Figura 13: Agilent 6470 Triple Quadrupole LC/MS System.³¹

Questo tipo di strumentazione utilizza la sorgente ESI la quale si basa sulla nebulizzazione di un liquido a pressione atmosferica e sulla successiva generazione degli ioni molecolari dalle goccioline ottenute.

Lo spray viene prodotto applicando un forte campo elettrico (10^6 V/m) a pressione ambiente a una soluzione contenente l'analita che deve possedere siti ionizzabili (positivi o negativi).

Per gli analiti che non sono in grado di ionizzarsi in soluzione, e quindi che non sono presenti come specie cariche, è necessario far ricorso ad altre tipologie di sorgenti come ad esempio la ionizzazione chimica a pressione atmosferica (APCI).³⁷

La fase eluente, proveniente dal modulo colonne, viene convogliata in un capillare in acciaio inossidabile al quale viene applicato un campo elettrico.

Quest'ultimo si ottiene applicando un'elevata differenza di potenziale (2-6 kV) tra il capillare metallico e il contro-elettrodo, ossia il capillare riscaldato tra 100-300 °C posto all'interfaccia tra pressione atmosferica ed alto vuoto.

Il campo elettrico ha la funzione di indurre uno spostamento delle cariche verso la superficie della goccia che fuoriesce dall'estremità del capillare generando il cono di Taylor, Figura 14. Segue l'espulsione dal cono di un aerosol di goccioline altamente cariche che diminuiscono progressivamente di dimensione tramite evaporazione del solvente.³⁸

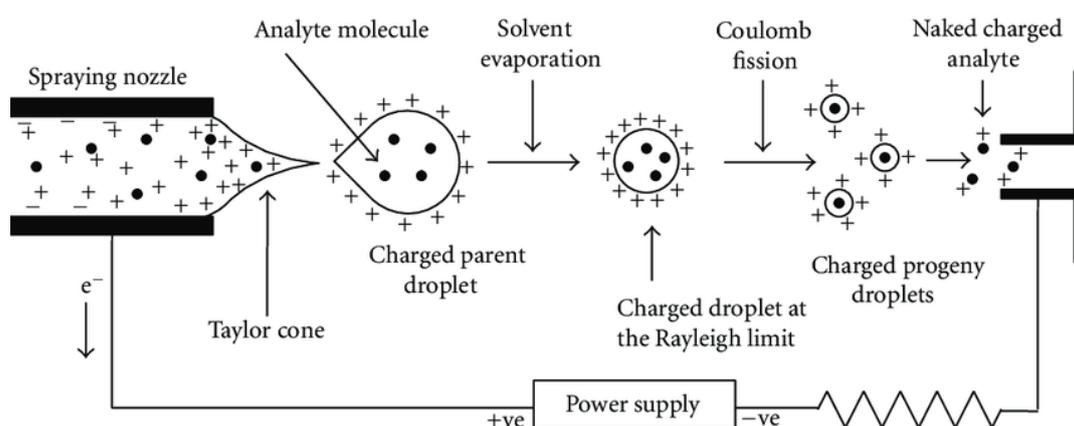


Figura 14: Rappresentazione schematica del processo di ionizzazione elettrospray.³⁹

Le gocce che si staccano dal cono di Taylor vengono dette di prima generazione e hanno un diametro di circa 1,5 μm e possono contenere circa 60'000 cariche ciascuna.

A causa della presenza del campo elettrico il processo si ripete a cascata con la formazione di gocce caratterizzate da un minor contenuto di solvente ma una maggior densità di carica, finché la repulsione elettrostatica tra cariche dello stesso segno produce, tramite esplosione di Coulomb, l'espulsione degli ioni molecolari desolvatati dalla superficie delle gocce.

Il tempo che intercorre tra la formazione della prima goccia all'uscita del capillare e l'espulsione degli ioni desolvatati è minore al millisecondo.

In aggiunta lo strumento utilizzato nel seguente progetto di tesi è implementato con la tecnologia *Jet Stream*, sviluppata dai ricercatori dell'azienda *Agilent Technologies*, la quale, tramite un flusso d'azoto riscaldato ad alta pressione, parallelo ed ortogonale al capillare metallico assiste la nebulizzazione e desolvatazione e direziona lo spray ottenuto verso l'analizzatore di massa.

In questo modo è possibile, favorendo la formazione degli ioni e allontanando le molecole neutre, aumentare notevolmente il rapporto segnale-rumore e dunque la sensibilità.

Inoltre tramite questa tecnica la ionizzazione avviene fornendo o togliendo protoni alla molecola, a seconda che si lavori in modalità positiva (ESI⁺) o negativa (ESI⁻), quindi risulta utile l'introduzione nella sorgente anche di piccole quantità di acidi, ad esempio formico, acetico o peracetico o di basi come l'ammoniaca.

Infine questo tipo di sorgente è in grado di generare ioni multicarica nel caso di biomolecole, come le proteine, o più in generale di molecole ad alto peso molecolare con più siti ionizzabili. In questo caso tramite la deconvoluzione degli spettri di massa, eseguita anche in modo automatico da appositi algoritmi, è possibile convertire uno spettro in cui viene riportata l'intensità in funzione del rapporto m/z in uno spettro in cui l'intensità è funzione solamente della massa.⁴⁰

In questo modo è possibile l'utilizzo di analizzatori standard tra cui il quadrupolo, capace di operare su range di m/z compresi tra 10 e 2000.

Tale analizzatore, rappresenta il cuore dello strumento ed è in grado di selezionare ioni aventi diverso rapporto m/z sfruttando la loro diversa stabilità all'interno di un campo elettrico quadrupolare a radiofrequenza.

Tra le caratteristiche più importanti dell'analizzatore a quadrupolo ci sono la trasmissione ionica e la risoluzione di massa (R). La trasmissione ionica quantifica la capacità dell'analizzatore di far arrivare al rivelatore tutti gli ioni di interesse analitico, mentre la risoluzione di massa permette la separazione di due ioni con masse vicine. In particolare, considerati due ioni di rapporto m/z pari a M ed M+ΔM, la risoluzione viene definita come segue:

$$R = \frac{M}{\Delta M}$$

Inoltre i due metodi più comunemente adoperati per la determinazione della risoluzione fanno riferimento, come rappresentato in *Figura 15*, uno alla larghezza del picco e l'altro alla valle esistente tra due picchi.

Nel primo caso il valore della risoluzione è dato dalla larghezza del picco misurata a una specifica frazione della sua altezza, ad esempio 0,5%, 5%, 10% o 50% ossia la larghezza a metà altezza. Invece nel secondo caso R è definita come l'intervallo racchiuso tra due picchi di uguale intensità con l'altezza della valle (il punto di minimo) tra essi inferiore ad una specifica frazione dell'altezza del picco. Valori tipici sono 2%, 10% o 50%.

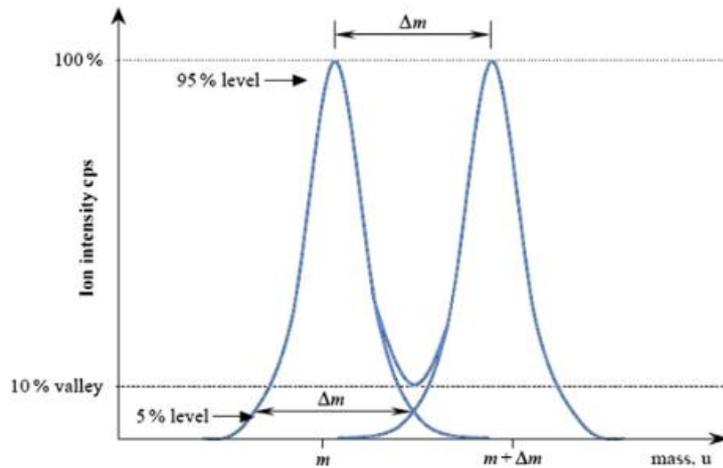


Figura 15: rappresentazione della definizione di risoluzione.⁴¹

Gli analizzatori comunemente si considerano a bassa risoluzione se R è inferiore a 5000 oppure ad alta risoluzione se R è superiore a 5000.⁴²

Come illustrato in *Figura 16*, tale analizzatore è costituito da quattro barre parallele di acciaio, molibdeno o ceramica rivestite in oro, della lunghezza di 15-20 centimetri e dal diametro massimo di 1 centimetro, sebbene possano avere sezione iperbolica.

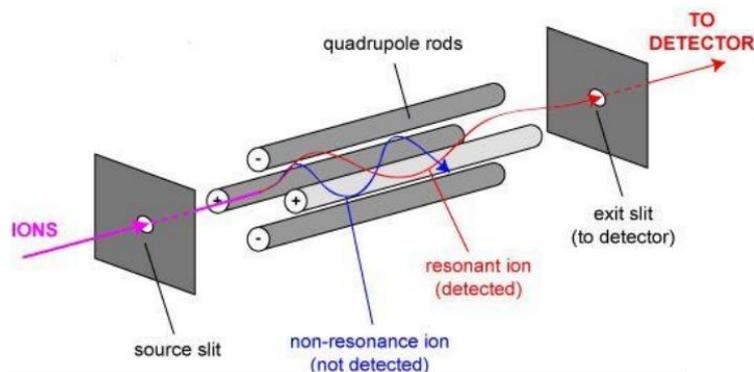


Figura 16: rappresentazione schematica dell'analizzatore quadrupolare.

Alle barre viene applicato un potenziale a corrente continua (U), e le barre diametralmente opposte hanno la tensione dello stesso segno. Con lo scopo di far invertire di segno le barre viene sovrapposto anche un potenziale alternato a radiofrequenza (V) variabile nel tempo.

Il campo elettrico risultante forza gli ioni a percorrere una traiettoria a spirale che li conduce al rivelatore. Tuttavia regolando i potenziali U e V solo alcuni ioni con determinati rapporti m/z avranno una traiettoria stabile che li confina nello spazio compreso tra le barre metalliche. Viceversa, gli altri ioni, collidendo contro una delle barre, perdono la carica e non raggiungono il rivelatore.

Quindi il quadrupolo a radiofrequenza consente la selezione di un particolare ione, oppure la scansione delle m/z variando con continuità il campo elettrico, e per questo motivo viene anche chiamato analizzatore a filtro di massa.³⁶

Una tipologia di analizzatore quadrupolare particolarmente usata è il cosiddetto triplo quadrupolo (TQ), *Figura 17*, così chiamato perché costituito da quadrupoli in serie che permettono di condurre analisi differenti da quelle che si possono ottenere con un singolo quadrupolo. L'impiego del TQ rispetto al quadrupolo singolo conduce a dei vantaggi in termini di selettività, sensibilità, specificità, precisione e riproducibilità.^{43,44}

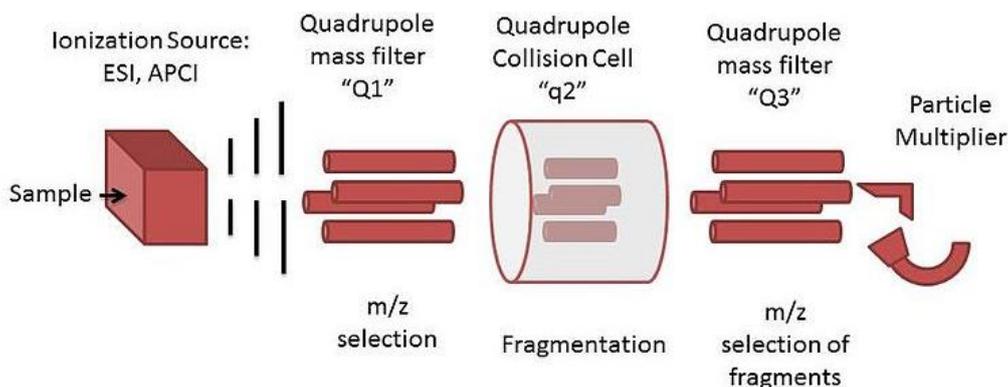


Figura 17: schema di uno spettrometro di massa a triplo quadrupolo.

Quando non si desidera frammentare la molecola che si sta analizzando i quadrupoli che costituiscono nel loro insieme l'analizzatore agiscono in maniera sincrona mandando direttamente gli ioni in uscita dalla sorgente al rivelatore in base al loro rapporto massa/carica; se invece si desidera frammentare lo ione molecolare che si sta analizzando, lo ione selezionato dal primo quadrupolo, entra all'interno della cella di collisione costituita da un quadrupolo (come nello strumento sopra citato) ed all'interno della quale viene immesso un gas (N_2 o Ar), e per collisione con il gas stesso, viene frammentato. I frammenti figli (*product ions*) così ottenuti in uscita dalla cella di collisione, vengono direzionati e analizzati dal terzo quadrupolo e rilevati al detector. In questo modo si avrà uno spettro caratteristico che rappresenta i prodotti di frammentazione dello ione selezionato.

Il triplo quadrupolo può lavorare in diverse modalità che consentono di ottenere informazioni sempre più specifiche dell'analita target.

Le modalità maggiormente adoperate sono:

- **SCAN**: è adoperato quando si analizza per la prima volta un'analita o una miscela di analiti e si vuole mettere a punto un nuovo metodo analitico.

In questa configurazione l'analizzatore trasmette sequenzialmente al detector tutte le masse, formate nella sorgente, in un range selezionato dall'operatore ottenendo, istante per istante, l'intero spettro di massa di ciò che viene eluito.

L'abbondanza relativa dei vari ioni in ogni scansione viene sommata e riportata in sequenza in un cromatogramma di corrente ionica totale (TIC), il cui profilo è simile a quello ottenuto da un qualsiasi rivelatore cromatografico.

È possibile utilizzare la modalità SCAN sul primo o sul terzo quadrupolo ma non sul secondo dal momento che si tratta di una cella di collisione.

- **Single Ion Recording (SIR)**: in questa modalità il primo quadrupolo lavora in modalità *Selected Ion Monitoring* (SIM) quindi analizza uno o più ioni di particolari rapporti massa/carica mentre il secondo e il terzo quadrupolo lavorano in trasmissione totale come fossero delle lenti focalizzatrici. Essendo che l'analizzatore dedica alla particolare massa selezionata un tempo totale notevolmente superiore rispetto a quanto avviene per la stessa in modalità SCAN, è possibile conseguire un incremento sia della sensibilità che della selettività, a discapito del numero di informazioni ricavabili. Tutto ciò rende questa modalità di analisi indicata nella rivelazione e soprattutto nella quantificazione di sostanze presenti anche in tracce.
- **Daughter Ion Scan**: questa configurazione permette di ottenere lo spettro di massa a partire da un singolo frammento iniziale. Ciò è possibile tramite la selezione di uno ione di rapporto m/z fissato nel primo quadrupolo che lavora in modalità SIM e la sua successiva frammentazione nella cella di collisione tramite collisione con un gas. Infine il terzo quadrupolo, operando in modalità SCAN, invia al detector tutte le masse ottenute. In questo modo è possibile, dall'analisi dei frammenti, avere informazioni sull'identità della molecola (impronta digitale della molecola, *fingerprint*)
- **Parent Ion Scan**: a differenza della modalità precedente in questo caso il primo quadrupolo lavora in scansione, la cella di collisione è accesa e il terzo quadrupolo analizza in modalità SIM. Questo significa analizzare uno specifico frammento che può essere presente in più frammenti della molecola iniziale, quindi si riesce a studiare famiglie di molecole che hanno quel frammento caratteristico come ad esempio un gruppo funzionale ionizzabile.
- **Neutral Loss Scan**: in questa modalità la cella di collisione rimane accesa ed entrambi i quadrupoli lavorano in scansione, ma il terzo quadrupolo considera solo un Δm rispetto alla scansione iniziale. In questo modo si analizzano facilmente classi di molecole che al loro interno hanno uno specifico gruppo neutro, ossia che hanno in comune una parte della struttura.

- **Multiple Reaction Monitoring (MRM):** il primo quadrupolo lavora in modalità SIM quindi seleziona uno ione che viene trasferito alla cella che ne produce i frammenti; il terzo quadrupolo lavora di nuovo in modalità SIM. Questa modalità può essere considerata come un'evoluzione di una normale modalità SIM, perché risulta ancora più specifica. Questo comporta che da un punto di vista quantitativo si abbatte il rumore di fondo e la tecnica diventa molto più selettiva. Questa è la modalità con cui il triplo quadrupolo dà le massime performance quantitative ed è attualmente lo strumento nel mercato con il più basso limite di rilevabilità.

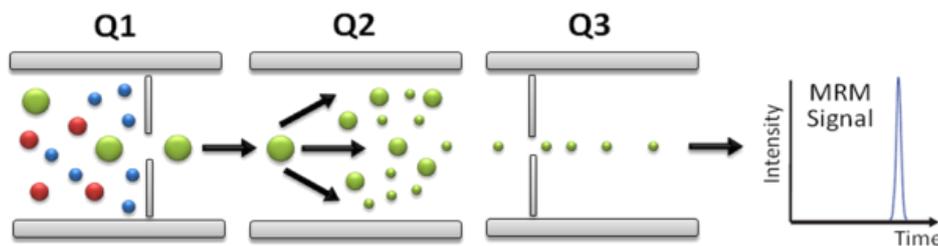


Figura 18: rappresentazione schematica della modalità MRM in uno strumento a triplo quadrupolo.

I rivelatori più comuni nella spettrometria di massa sono i moltiplicatori di elettroni. Tra questi, una soluzione particolare prevede un dinodo di conversione e un Channeltron. Il primo è una superficie metallica concava localizzata ad angolo retto rispetto al fascio di ioni che giungono dall'analizzatore, ed è posta ad un potenziale compreso tra 1 e 20 kV. In questo modo quando uno ione la impatta viene convertito in elettroni e accelerato verso il Channeltron. Quest'ultimo amplifica gli elettroni che impattano sulla sua superficie interna per produrre un segnale elettrico. Inoltre grazie alla sua forma ad imbuto gli elettroni non percorrono molto spazio prima di colpirlo ancora, causando l'emissione di nuovi elettroni. In questo modo, tramite un meccanismo a cascata si riesce ad ottenere una forte amplificazione del segnale che viene poi digitalizzato ed elaborato infine dal calcolatore dello spettrometro per la presentazione dello spettro di massa.³⁶

1.9 Criteri di validazione dei metodi analitici

Per i principi attivi a uso biocida, l'Allegato II Titolo 1 del Regolamento (UE) 528/2012, noto come *Biocidal Products Regulation* (BPR), impone di soddisfare una serie di requisiti in materia di identità, così da identificare la sostanza e caratterizzarla in base alla sua natura. Dunque, oltre a quelle informazioni che è possibile acquisire dalla letteratura scientifica, dagli inventari e dalle banche dati (preferibilmente istituzionali), risultano necessari dei dati sperimentali spettrali. Occorrono pertanto metodi d'analisi affidabili per identificare e quantificare non solo il(i) costituente(i) attivo(i), ma anche gli eventuali additivi e le impurezze che vengono suddivise in rilevanti (<1 g/kg di biocida) o significative (≥ 1 g/kg di biocida).²

Mentre il Regolamento (CE) 1907/2006, noto come REACH, si limita a chiedere che i metodi analitici siano descritti in maniera sufficientemente esauriente da consentirne l'applicazione, al contrario il BPR esige la validazione, quale conclusione logica del processo che ha portato allo sviluppo del metodo.⁴⁵ La validazione serve a garantire l'adeguatezza della procedura di laboratorio sviluppata e del sistema di misura impiegato per la determinazione dell'analita d'interesse in una specifica matrice. Validare, dunque, equivale a dimostrare che il metodo d'analisi è adatto allo scopo dichiarato, verificando che esso soddisfi specifici requisiti di prestazione, permettendone l'integrità e la riproducibilità del dato .

La normativa che regola il processo di validazione di un metodo analitico, mediante una serie di esperimenti e misurazioni precisamente definiti nell'ambito di un laboratorio di prova o di taratura, ha il codice di riferimento ISO/IEC 17025/2018 ed integra la precedente ISO 9001/2015. Il nucleo della norma parla di requisiti gestionali e tecnici. I primi riguardano l'organizzazione, il sistema qualità, il controllo della documentazione, delle registrazioni e delle attività di prova e/o taratura non-conformi, il riesame delle richieste, le offerte e i contratti, il subappalto delle prove e delle tarature, l'approvvigionamento di servizi e di forniture, il servizio al cliente e i reclami, il miglioramento e le azioni correttive e preventive, le verifiche ispettive interne e i riesami da parte della direzione.

Per quando riguarda invece i requisiti tecnici, vengono presi in esame tutti i fattori che possono incidere sulla correttezza e l'affidabilità delle prove eseguite, quindi il personale, il luogo di lavoro e le condizioni ambientali, i metodi di prova e la loro validazione, le apparecchiature, la riferibilità delle misure, il campionamento, la manipolazione degli oggetti sottoposti a prova o taratura, l'assicurazione della qualità dei risultati e la loro presentazione.

In Italia, l'Ente Unico nazionale di accreditamento designato dal governo italiano, in applicazione del Regolamento europeo 765/2008 è Accredia.

Tale associazione verifica l'applicazione e il rispetto dei parametri previsti della norma ISO 17025/2018 da parte del laboratorio.

Inoltre tramite un accordo internazionale, i sistemi di accreditamento dei diversi Paesi si possono riconoscere l'un l'altro e in questo modo, un qualsiasi laboratorio italiano che viene accreditato da Accredia lo diventa anche per tutti i Paesi aderenti all'accordo.⁴⁶

Sulla base del documento SANCO/3030/99 rev. 5, i parametri di validazione da considerare sono:

- Specificità: è la capacità della procedura analitica di determinare l'analita in presenza di più componenti eventualmente presenti e che potrebbero dare interferenze;
- Linearità: l'abilità del metodo di produrre una correlazione accettabile tra il responso strumentale misurato e la concentrazione dell'analita nel campione;
- Recupero (*recovery*): la quantità, espressa come percentuale, di analita effettivamente recuperata dopo la sua aggiunta (*spike*) ad un campione di prova appropriato che non contiene alcun livello rilevabile dell'analita o un livello rilevabile noto;
- Precisione: la concordanza tra i risultati ottenuti da test indipendenti nelle condizioni prescritte;
- Ripetibilità: la concordanza tra i risultati dei test indipendenti eseguiti con lo stesso metodo sul medesimo materiale di prova nello stesso laboratorio e dallo stesso operatore che utilizza la stessa strumentazione in brevi intervalli di tempo (un giorno o una corsa analitica);
- Limite di quantificazione (*Limit Of Quantification, LOQ*): viene definito come la concentrazione più bassa testata, alla quale si ottengono un recupero e una precisione accettabili.

I criteri di accettabilità per i diversi parametri di validazione differiscono a seconda che l'analita sia un costituente attivo o un'impurezza, oltre che in base alla matrice esaminata.

Qualora il metodo d'analisi non sia altamente specifico, per l'identificazione iniziale del principio attivo e delle sue impurezze servono dati spettrali aggiuntivi, quali spettri di massa o di risonanza magnetica nucleare.

La norma definisce tra i metodi altamente specifici l'HPLC-MS/MS con almeno due transizioni o una transizione con numerosi frammenti caratteristici della sostanza, mentre l'HPLC-DAD risulta specifico.⁴⁷

Dunque, in ottemperanza al documento SANCO/3030/99 rev. 5, durante il corrente lavoro di tesi, sono state svolte le seguenti attività di validazione del metodo:

- identificazione del principio attivo attraverso la sua determinazione alla strumentazione HPLC-TQ;
- valutazione della linearità eseguita con determinazioni in doppio con almeno 3 o più concentrazioni che devono superare il limite inferiore e superiore del 20% rispetto la concentrazione nominale del principio attivo;
- valutazione della precisione tramite la determinazione di minimo 5 campioni indipendenti (pesati singolarmente) alla stessa concentrazione;
- valutazione della specificità: le impurezze devono contribuire a meno del 3% dell'area del picco cromatografico relativo alla specie attiva target.

In aggiunta sono state eseguite delle ulteriori prove da intendere come delle estensioni alla validazione del metodo:

- valutazione del fenomeno di carry-over;
- determinazione del valore del limite di quantificazione (*Limit Of Quantification*, LOQ);
- determinazione del valore del limite di rivelabilità (*Limit Of Detection*, LOD);
- stima dell'incertezza del misurando;

2. SCOPO DEL LAVORO DI TESI

Questa tesi si propone di sviluppare e convalidare un metodo analitico per la determinazione di un principio attivo da brevettare, ad uso disinfettante, della tipologia dei composti dell'ammonio quaternario.

Dal momento che il rispetto delle condizioni imposte dal Regolamento (UE) 528/2012 risulta indispensabile alla messa a disposizione sul mercato e all'uso di tale biocida sono state confrontate due tecniche analitiche per la messa a punto del metodo e il raggiungimento dei requisiti normativi.

In particolare, considerando le caratteristiche chimico-fisiche dei QACs e gli studi presenti in letteratura, sono state valutate le performance qualitative e quantitative di due strumentazioni analitiche, prodotte da *Agilent Technologies*, ossia:

- 1260 Infinity II LC/DAD WR System;
- 6470 Triple Quadrupole LC/MS System.

Il principio attivo è stato scelto come modello per ottimizzare il metodo in vista dell'utilizzo della formulato finale ancora in fase di sviluppo e l'intero studio è stato condotto presso Chimicambiente S.r.l. ed ha quindi tenuto conto delle esigenze interne del laboratorio.

3. PARTE SPERIMENTALE

Materiali:

- Principio attivo (PA) proveniente da tre diversi batch di sintesi;



Figura 19: Aspetto fisico del principio attivo ad uso disinfettante.

- Acetonitrile (AcCN): Honeywell, purezza $\geq 99,9\%$;
- Metanolo (MeOH): Carlo Erba, purezza $\geq 99,9\%$;
- Acqua (H₂O): Carlo Erba, purezza $\geq 99,9\%$;
- Acido formico (FA): Sigma-Aldrich, 98-100%;
- Acido acetico (HAc): PanReac AppliChem; $\geq 99,7\%$.

3.1 Verifica della solubilità del principio attivo

Procedura sperimentale:

In sei matracci da 10 mL sono stati pesati 10 mg di PA tramite bilancia analitica e portati a volume con: acetonitrile, metanolo, acqua, metanolo al 40% (v/v) in acqua, acido formico allo 0,1% (v/v) in acqua, acido acetico allo 0,1% (v/v) in acqua. Dopo una vigorosa agitazione è stata valutata visivamente la solubilità del PA nelle varie soluzioni.

3.2 Messa a punto ed ottimizzazione del metodo strumentale LC-DAD

Il sistema cromatografico utilizzato per l'analisi del PA è un Agilent HPLC 1260 Infinity II, equipaggiato con pompa quaternaria (G7111B), autocampionatore (G7129A), compartimento multi-colonna termostata (G7116A) e un rivelatore DAD WR (G7115A). Nell'analisi LC-DAD sono state ottimizzate sia le condizioni di cromatografia liquida che di rilevazione UV-Vis.

La separazione dei composti è avvenuta utilizzando una colonna a fase inversa ZORBAX SB-Aq (5 μm - 3·250 mm) dell'Agilent. La fase mobile è composta dalla fase A acqua e dalla soluzione B di acido formico allo 0,1% (v/v) in metanolo. Sia il flusso della fase mobile che la temperatura del vano colonne sono stati mantenuti costanti rispettivamente a 1,2 mL/min e 25 °C.

Il volume d'iniezione scelto è pari a 20 μL e il gradiente di eluizione viene riportato in *Tabella 1* e in *Figura 21*.

Tabella 1: gradiente di eluizione.

Tempo [min]	Fase A [%]	Fase B [%]
0	65	35
0,5	65	35
18	10	90
18,5	10	90
20	65	35
24	65	35

Durata della corsa cromatografica:
25 minuti

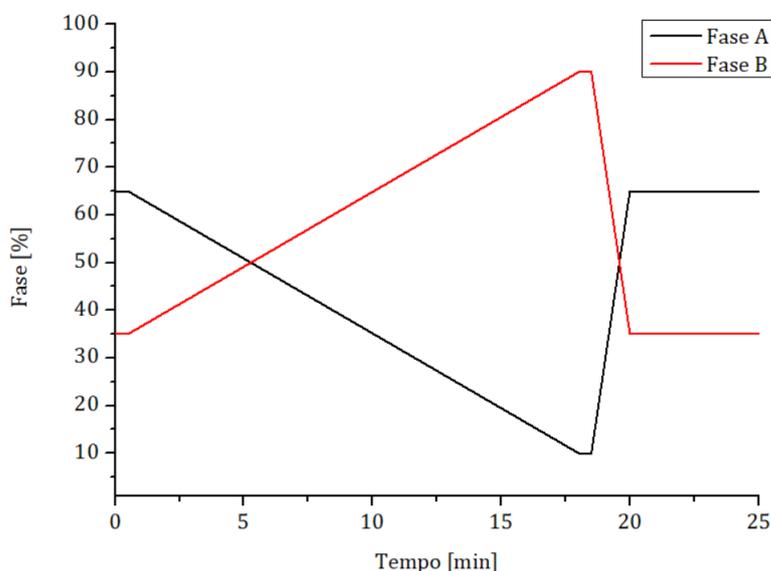


Figura 20: grafico del gradiente di eluizione.

Il principio attivo è stato rilevato tramite la registrazione degli assorbimenti alle lunghezze d'onda comprese tra i 200 e 350 nm in fase di ottimizzazione e a 260 nm in fase di validazione.

Tale scelta ha permesso di massimizzare la risposta strumentale e dunque la sensibilità del metodo. La quantificazione delle diverse analisi è avvenuta tramite il software Agilent OpenLAB Data Analysis.

Di seguito, in *Figura 21*, si riporta a titolo di esempio il cromatogramma ottenuto dallo studio di una soluzione di PA a 200 mg/L in metanolo tramite il metodo strumentale sopra descritto.

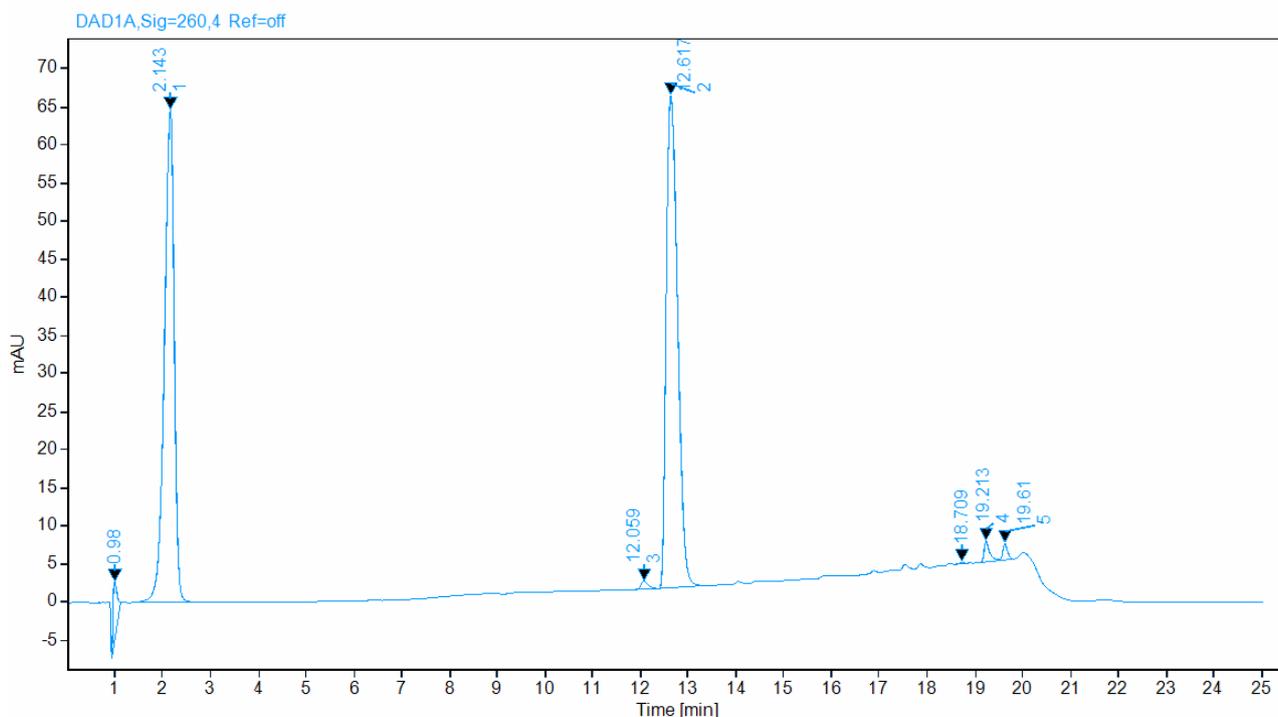


Figura 21: cromatogramma di una soluzione di PA a 200 mg/L in metanolo tramite metodo LC-DAD.

Come si può notare dalla *Figura 21*, il cromatogramma è caratterizzato da cinque assorbimenti distinguibili dalla linea di fondo i quali vengono riassunti in *Tabella 2* con i relativi tempi di ritenzione.

Tabella 2: Assorbimenti apprezzabili nel cromatogramma.

Picco cromatografico	Tempo di ritenzione
1	2,143 min
2	12,617 min
3	12,059 min
4	19,213 min
5	19,610 min

Tali picchi cromatografici possono essere ricondotti al principio attivo oppure a dei suoi prodotti di degradazione dovuti a delle condizioni di stoccaggio non idonee.

In alternativa alcuni assorbimenti potrebbero essere dovuti alla formazione di sottoprodotti, o alla presenza di impurezze, nello step di sintesi antecedente l'analisi strumentale.

3.3 Messa a punto ed ottimizzazione del metodo strumentale LC-TQ

Lo strumento adoperato per la determinazione del PA è il cromatografo liquido dell'Agilent 1290 Infinity II, dotato di pompa ad alta velocità (G7120A), autocampionatore (G7167B) e vano multi-colonna termostato (G7116B).

Il lavoro di ottimizzazione cromatografica per la separazione dei composti ha condotto all'utilizzo della colonna Agilent a fase inversa Poroshell 120 EC-C18 (1,9 μm - 2,1·50 mm) e di una fase mobile composta dalla soluzione A di acido formico allo 0,5% (v/v) in acqua e dalla soluzione B di acido formico allo 0,5% (v/v) in metanolo.

Il flusso impiegato per l'analisi, costante a 0,5 ml/min, e' un compromesso che tiene conto sia della risoluzione cromatografica che della presenza, a valle del sistema UPLC, di uno spettrometro di massa con sorgente ESI.

Il volume di iniezione scelto è di 10 μL e il gradiente di eluizione viene specificato in *Tabella 3* e in *Figura 22*.

Tabella 3: gradiente di eluizione.

Tempo [min]	Fase A [%]	Fase B [%]
0	60	40
0,5	60	40
10	10	90
10,5	10	90
11	60	40

Durata della corsa cromatografica:
13 minuti

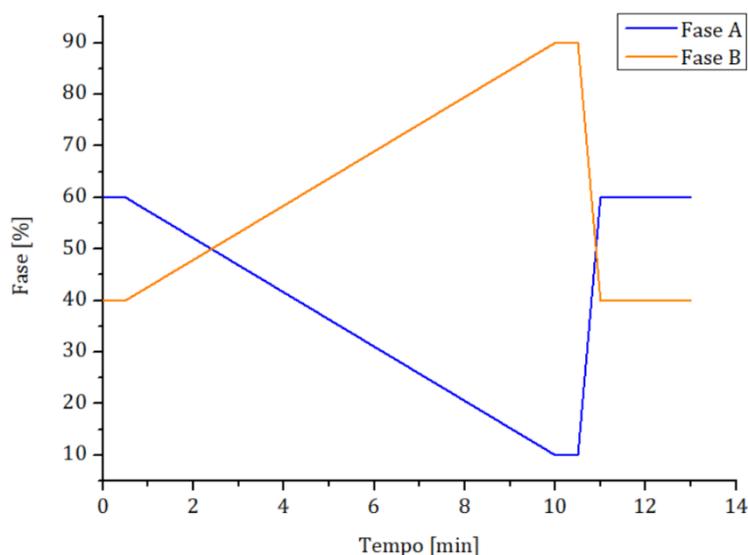


Figura 22: grafico del gradiente di eluizione.

Il sistema cromatografico è stato accoppiato ad uno spettrometro di massa Agilent 6470 triplo quadrupolo. La sorgente ionica, implementata con la tecnologia Agilent Jet Stream, è in grado di migliorare la generazione e la desolvatazione degli ioni tramite azoto surriscaldato, potenziando la qualità del segnale e riducendo il rumore di fondo.

I parametri adoperati per la sorgente ionica vengono descritti in *Tabella 4*.

Tabella 4: parametri strumentali della sorgente ionica Agilent Jet Stream.

Parametro	Valore
Flusso N ₂ (Sheath Gas)	12 L/min 375 °C
Flusso N ₂	8 L/min 250 °C
Pressione nebulizzazione	25 psi
Voltaggio ago	2 kV
Voltaggio capillare	3 kV

La sorgente è stata impiegata in modalità positiva (AJS ESI⁺) per la ionizzazione di tutti gli analiti considerati, per i quali si ha la formazione di specie ioniche del tipo [M-H]⁺.

La quantificazione del principio attivo è stata effettuata attraverso il software Agilent MassHunter Quantitative Analysis 10.1.

Invece, per quanto attiene all'ottimizzazione della spettrometria di massa, lo step iniziale ha previsto la rilevazione delle masse ottenute dalla sorgente operando in modalità **SCAN**, impostando il range di m/z tra 100 e 1000, il *fragmentor voltage* a 128 V e il *cell accelerator voltage* a 5 V. In *Figura 23* si riportano i TIC e gli spettri di massa (al minuto 8,474) acquisiti iniettando tre soluzioni indipendenti di PA proveniente dai tre batch di sintesi.

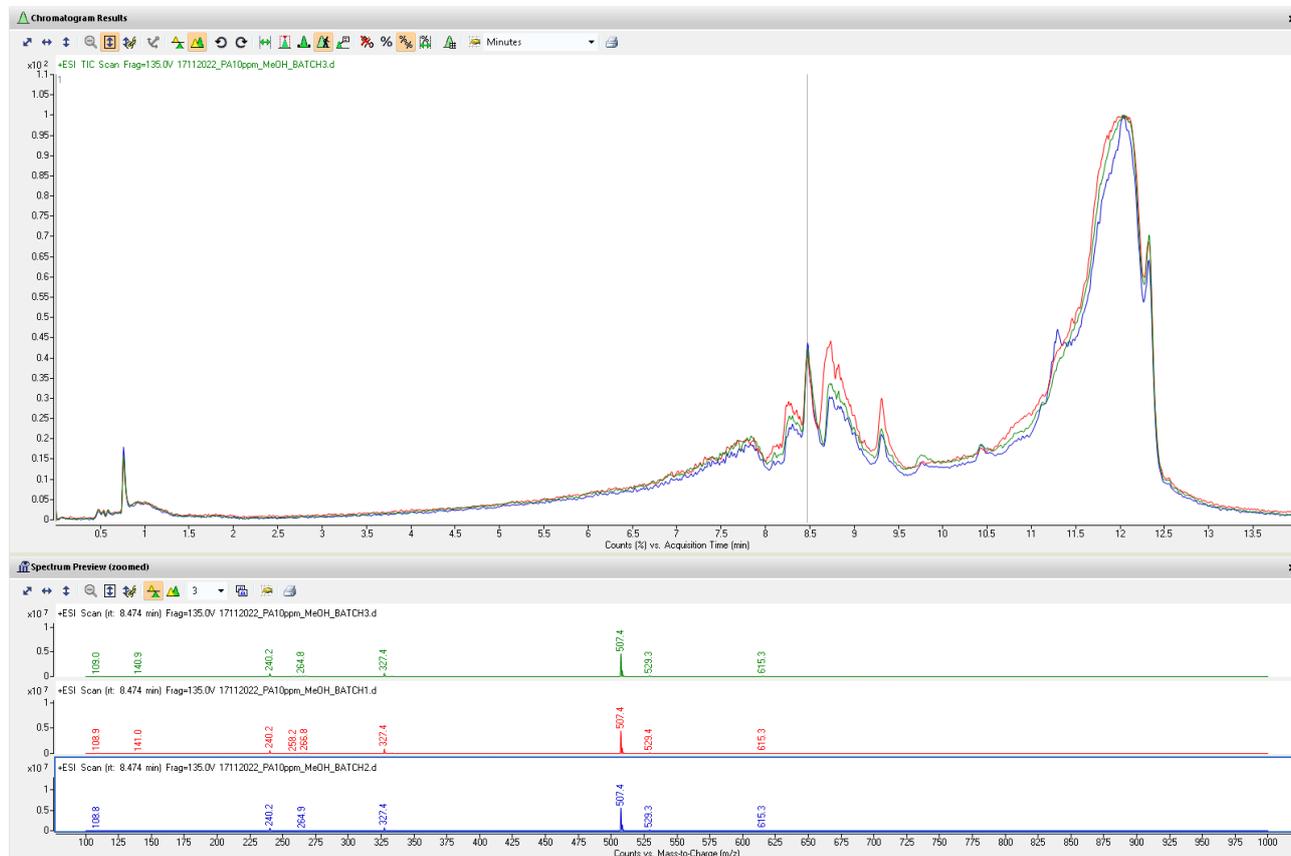
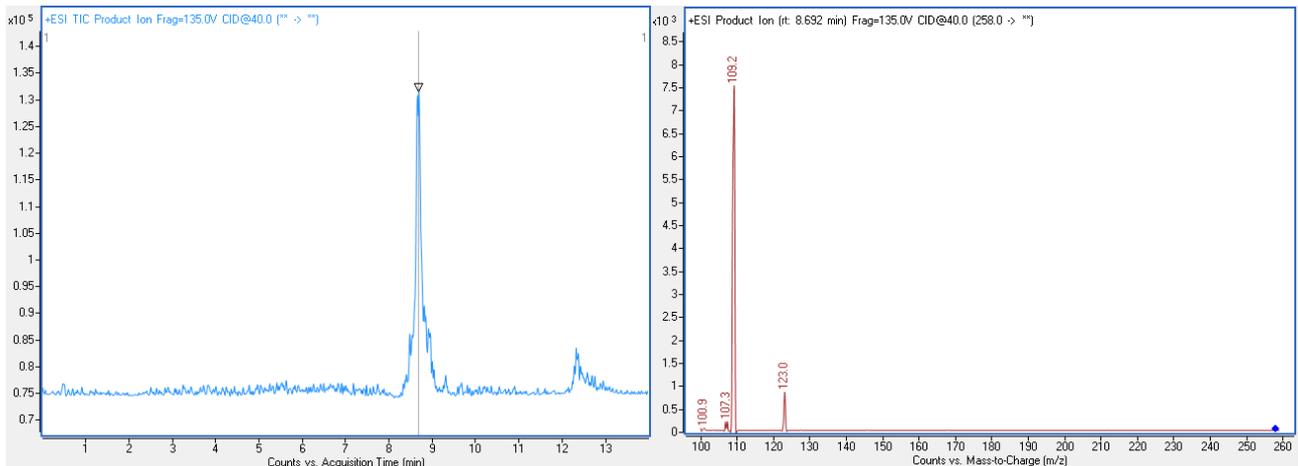


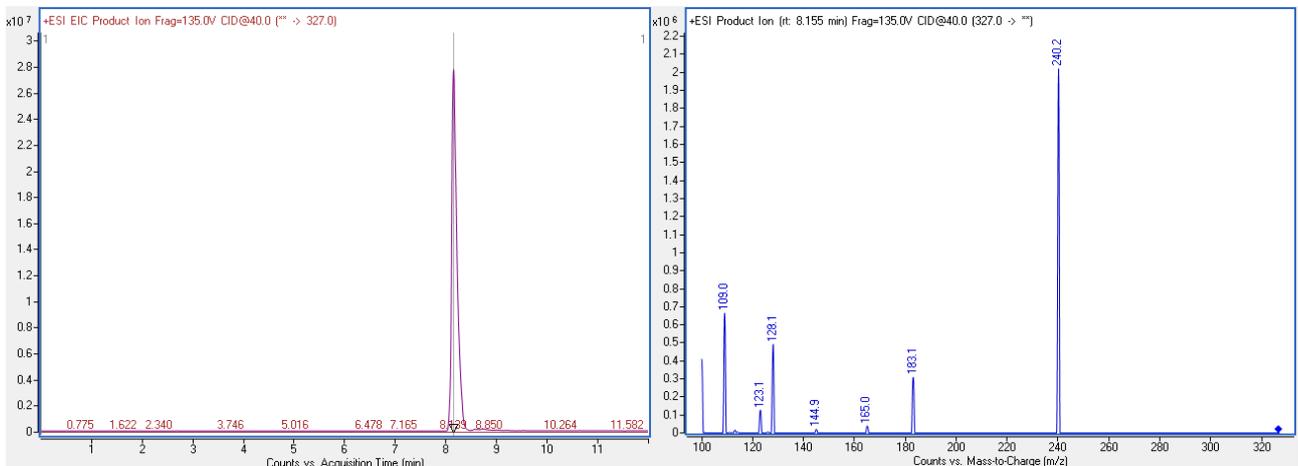
Figura 23: TIC e spettri di massa delle soluzioni di PA (provenienti dai tre batch di sintesi) a 10 mg/L in metanolo.

Dall'analisi qualitativa degli spettri di massa è emerso che i tre diversi batch di sintesi si equivalgono sia in termini di masse prodotte che nell'assenza di impurezze. Successivamente le masse più intense e significative, dette *precursor ion* o ioni genitori, sono state frammentate in modalità *Daughter Ion Scan*, e i relativi frammenti figli (*product ion*) ottenuti vengono riportati negli spettri di massa sottostanti.

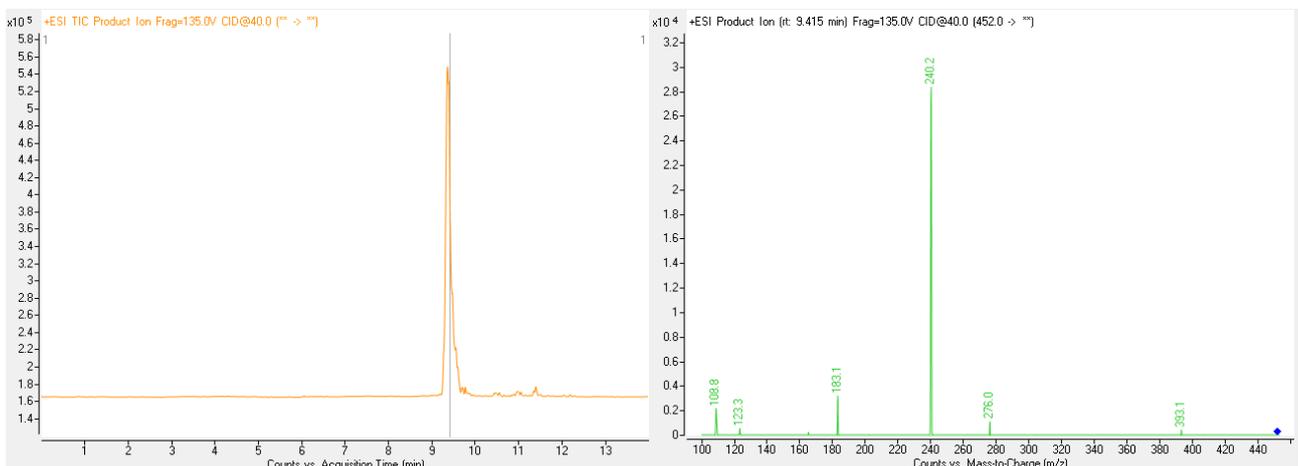
Frammentazione ione 258



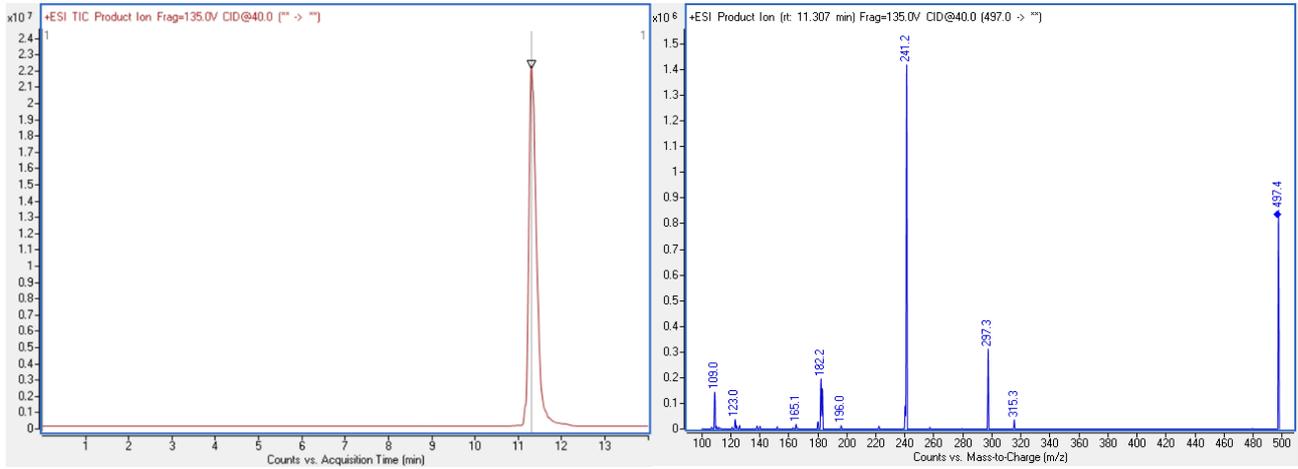
Frammentazione ione 327



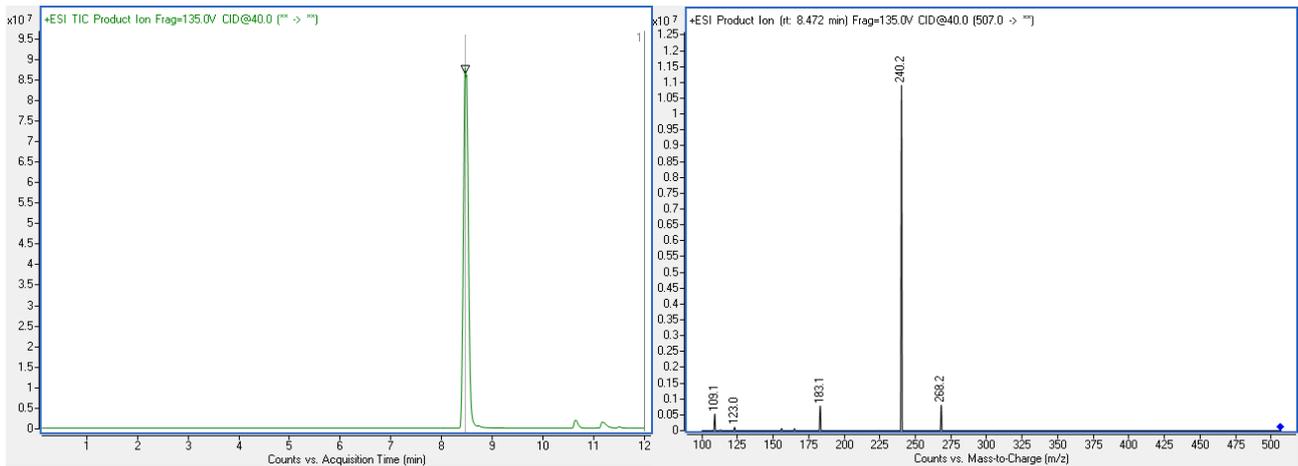
Frammentazione ione 452



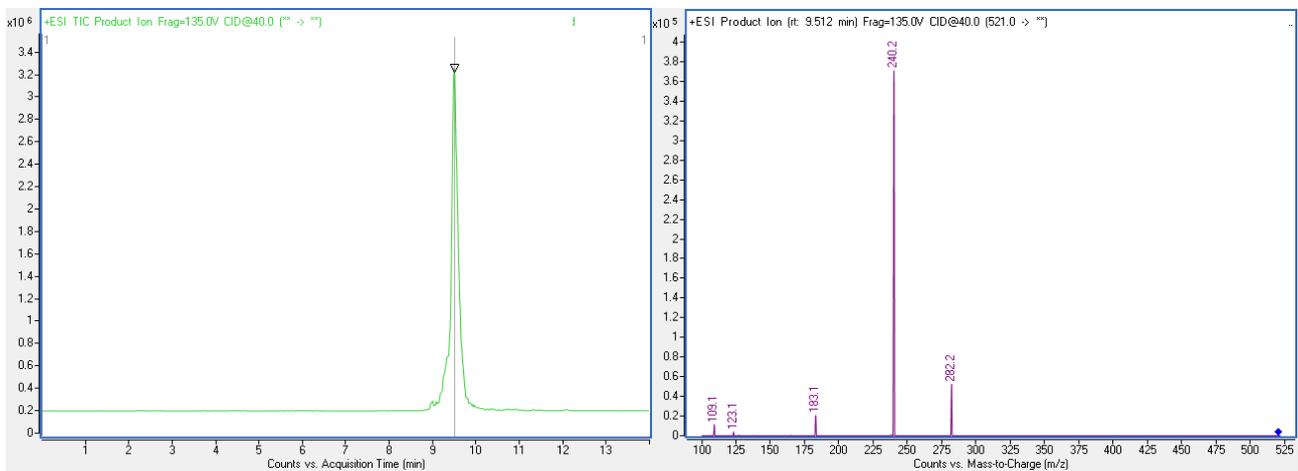
Frammentazione ione 497



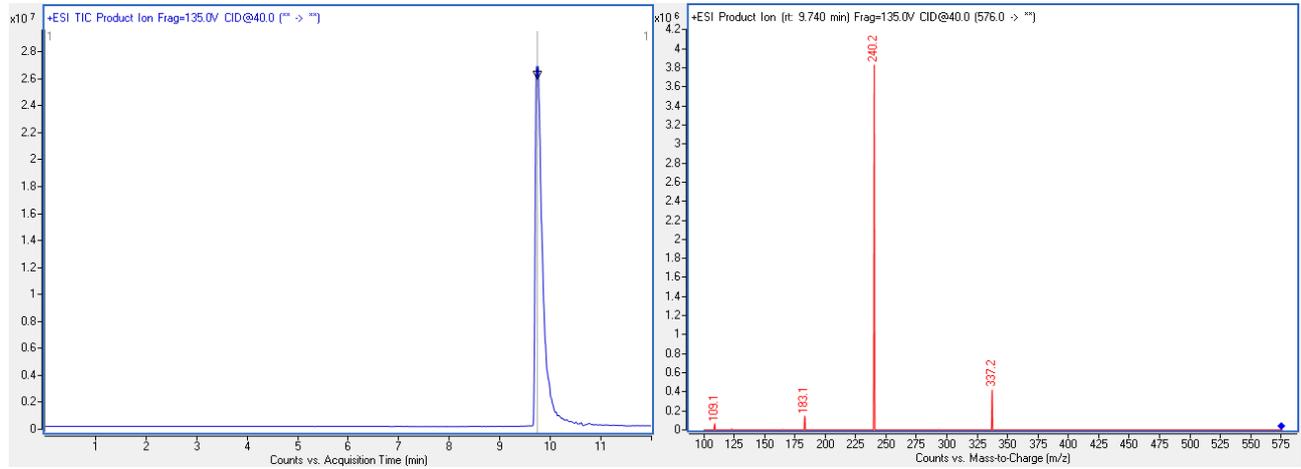
Frammentazione ione 507



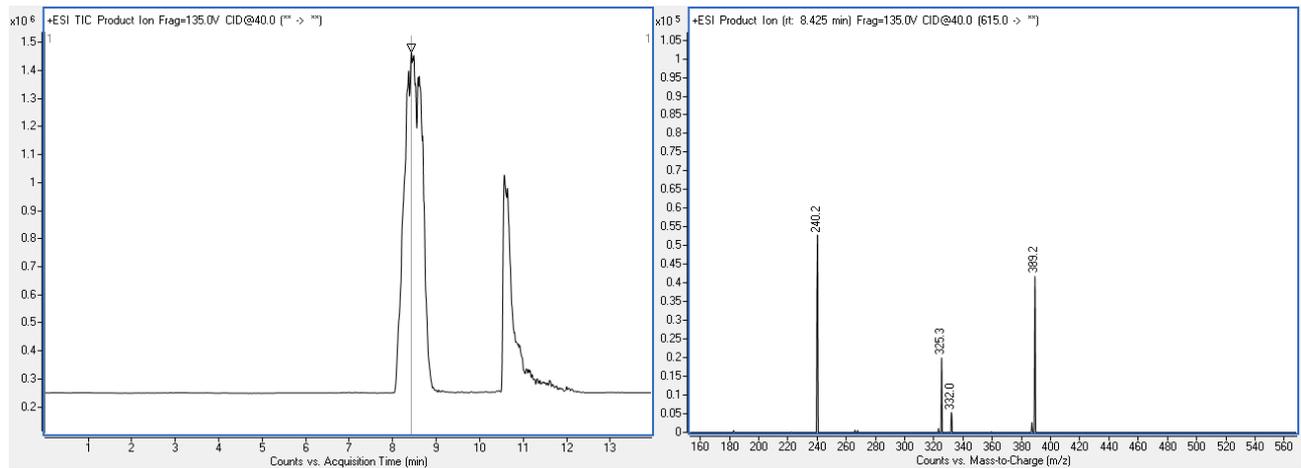
Frammentazione ione 521



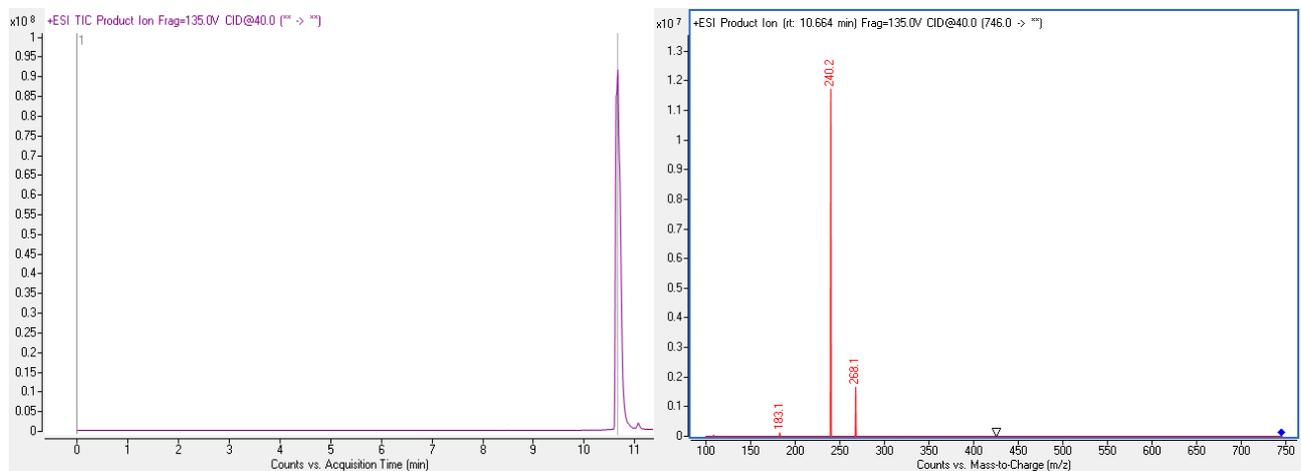
Frammentazione ione 576



Frammentazione ione 615



Frammentazione ione 746



Quindi, per ciascun ione genitore è stato sviluppato un metodo **Multiple Reaction Monitoring (MRM)**, ottimizzando ogni singola transizione ottenuta dalla modalità *Daughter Ion Scan* in termini di fragmentor voltage ed energia di collisione tramite il software MassHunter Optimizer e andando a selezionare i frammenti più intensi e significativi .

Infine le informazioni così raccolte sono state impiegate per la generazione di un unico **Dynamic MRM (dMRM)** ad alto grado di selettività e sensibilità e i cui parametri di acquisizione vengono riassunti in *Tabella 5*.

Tabella 5: parametri ottimizzati del metodo unico dMRM per la determinazione del principio attivo.

dMRM Ottimizzato				
Massa	Precursor Ion	Product Ion	Energia di collisione	$t_r \pm \Delta t_r$
257	258	109	40 eV	(6,93 ± 1) min
		123	24 eV	
326	327	128	32 eV	(6,03 ± 1) min
		183	32 eV	
		240	24 eV	
451	452	123	40 eV	(7,01 ± 1) min
		183	36 eV	
496	497	182	48 eV	(10,43 ± 1) min
		241	36 eV	
		297	44 eV	
506	507	109	52 eV	(6,31 ± 1) min
		183	44 eV	
520	521	240	28 eV	(6,69 ± 1) min
		282	20 eV	
575	576	240	28 eV	(6,98 ± 1) min
		337	52 eV	
614	615	240	56 eV	(6,29 ± 1) min
		389	36 eV	
745	746	240	56 eV	(10,29 ± 1) min
		268	36 eV	

Tale metodo permette di aumentare ulteriormente le performance quantitative dello strumento attraverso il raggruppamento di più *MRM* in finestre legate ai tempi di ritenzione piuttosto che in segmenti temporali.

In questo modo, gli analiti vengono monitorati solo mentre eluiscono dall'UPLC migliorandone la rilevazione.

Di seguito in *Figura 24* si riporta a titolo di esempio il **Total Ion Chromatogram (TIC)**, con le rispettive transizioni di ogni ione genitore, risultante dallo studio del PA tramite il metodo ottimizzato dMRM. Tale cromatogramma viene ottenuto riportando la somma delle intensità di tutti i frammenti in funzione del tempo di uscita degli spettri di massa.

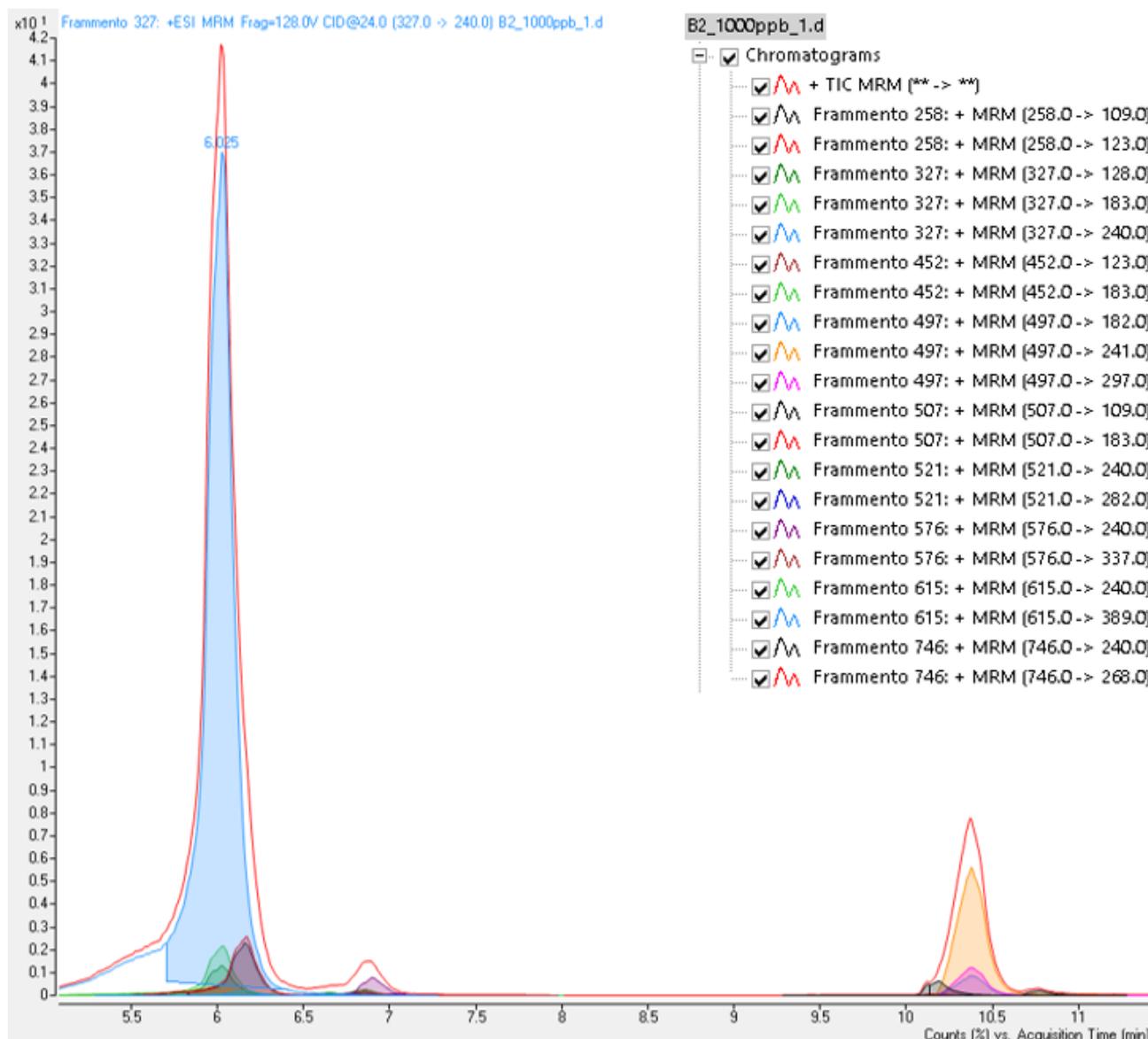


Figura 24: TIC ottenuto da una soluzione di PA (batch 2) a 1000 µg/mL in metanolo.

4. RISULTATI E DISCUSSIONE

4.1 Verifica della solubilità del principio attivo

I risultati ottenuti dalle prove di solubilità del principio attivo nei vari solventi e soluzioni vengono riportati in *Figura 25* e riassunti in *Tabella 6*.



Figura 25: soluzioni di PA (batch 2) a 1000 µg/mL.

Tabella 6: solubilità del PA nei vari solventi/soluzioni

Solventi/Soluzioni		Solubilità
1	AcCN	insolubile
2	MeOH	solubile
3	H ₂ O	insolubile, formazione di schiuma
4	MeOH 40% (v/v) in H ₂ O	solubile
5	FA 0,1% (v/v) in H ₂ O	insolubile, formazione di schiuma
6	HAc 0,1% (v/v) in H ₂ O	insolubile, formazione di schiuma

Dunque il PA si solubilizza in metanolo puro e nella soluzione di metanolo al 40% (v/v) in acqua; viceversa in tutti gli altri casi risulta insolubile, anche con l'ausilio di un sonicatore. Inoltre si noti come in acqua e nelle soluzioni acquose acidificate, l'introduzione del principio attivo, conduca alla formazione di schiuma dovuta alla natura anfifilica dei composti dell'ammonio quaternario.

I risultati ottenuti dalle diverse prove di solubilità sono stati adoperati come punto di partenza per l'identificazione delle migliori fasi mobili per le successive analisi sperimentali.

4.2 Validazione del metodo strumentale LC-DAD

La validazione del metodo è stata eseguita mediante la valutazione della linearità e della precisione (ripetibilità).

Oltre ai parametri di validazione sono stati anche determinati i limiti di rilevabilità (LOD) e quantificazione (LOQ), valutato il fenomeno di carry-over e stimata l'incertezza estesa dei misurandi.

4.2.1 Preparazione delle soluzioni usate in fase di validazione

Procedura sperimentale:

È stata preparata una soluzione madre a 1000 mg/L di PA, proveniente dal batch 2, pesando 10 mg di PA in un matraccio da 10 mL e portando a volume con metanolo. In seguito dalla soluzione madre, tramite diluizioni, sono state preparate delle soluzioni a (200, 100, 50, 20) mg/L come riassunto in *Tabella 7*.

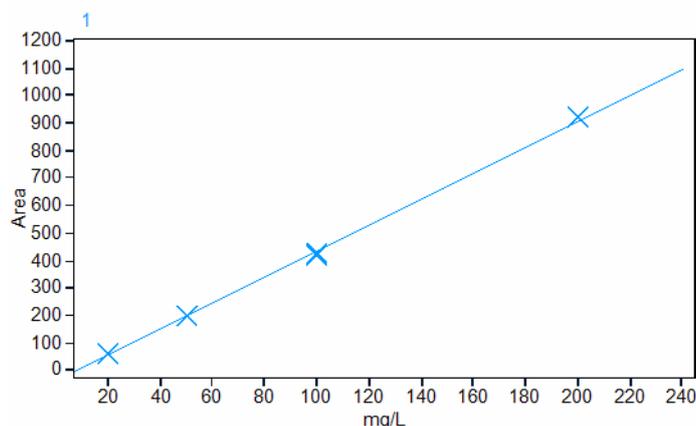
Tabella 7: Preparazione delle soluzioni di PA (batch 2) a diverse concentrazioni in metanolo.

Livello	Concentrazione	Composizione	Volume finale
madre	1000 mg/L	10 mg(PA) + 10 mL(MeOH)	10 mL
1	200 mg/L	200 µL(madre) + 800 µL(MeOH)	1 mL
2	100 mg/L	100 µL(madre) + 900 µL(MeOH)	1 mL
3	50 mg/L	50 µL(madre) + 950 µL(MeOH)	1 mL
4	20 mg/L	20 µL(madre) + 980 µL(MeOH)	1 mL

4.2.2 Valutazione della linearità

La valutazione della linearità è stata eseguita con determinazioni in doppio (due campioni pesati singolarmente) di quattro concentrazioni come riportato in *Tabella 7*.

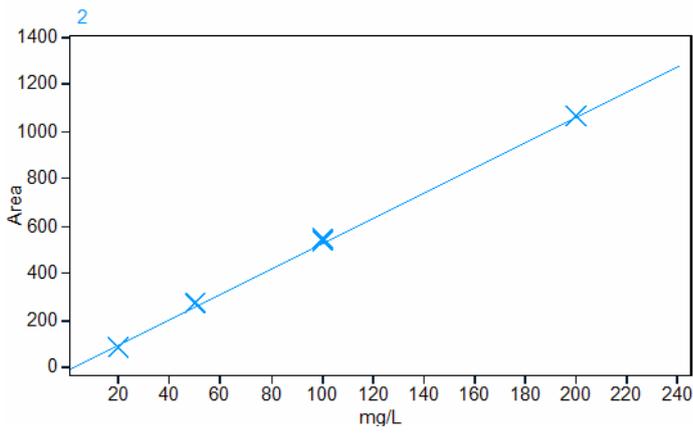
L'equazioni delle rette di taratura con i rispettivi coefficienti R^2 dei cinque composti, apprezzabili in *Figura 21*, vengono di seguito elencate.



Composto 1 ($t_R = 2,143$ min)

$$y = 4,7119x - 30,7344$$

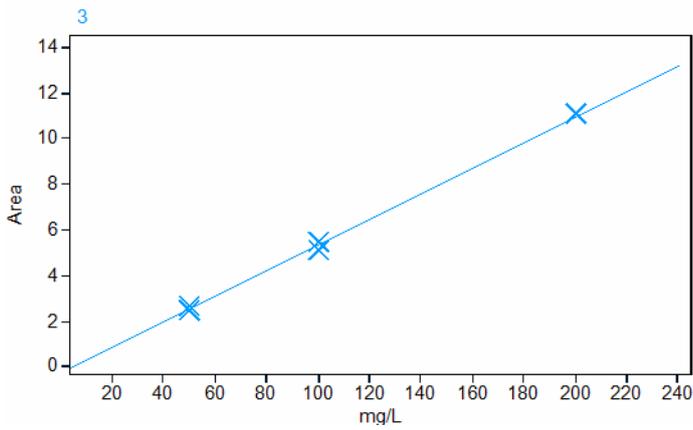
$$R^2 = 0,99803$$



Composto 2 ($t_R = 12,617$ min)

$$y = 5,3445x - 1,8830$$

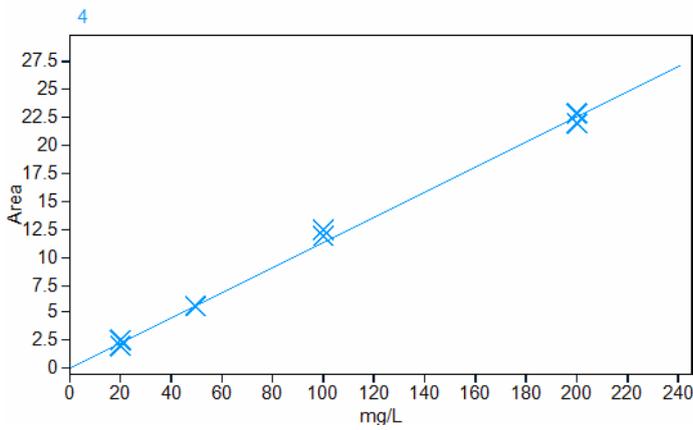
$$R^2 = 0,99934$$



Composto 3 ($t_R = 12,059$ min)

$$y = 0,0558x - 0,1749$$

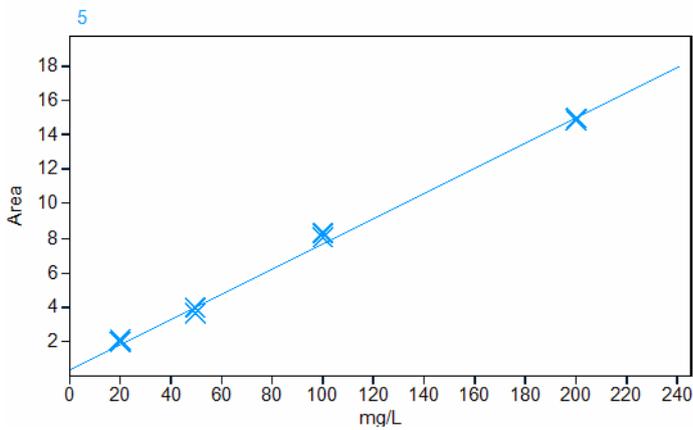
$$R^2 = 0,99886$$



Composto 4 ($t_R = 19,213$ min)

$$y = 0,1124x + 0,1729$$

$$R^2 = 0,99652$$



Composto 5 ($t_R = 19,610$ min)

$$y = 0,0737x + 0,3851$$

$$R^2 = 0,99634$$

Dall'analisi delle equazioni delle rette di taratura si osserva che il metodo sviluppato permette di correlare in maniera efficace responso strumentale e concentrazione del principio attivo nel campione. Inoltre i valori del LOD e del LOQ dei cinque composti calcolati sul rapporto segnale/rumore ($LOD \Rightarrow S/N \geq 3$; $LOQ \Rightarrow S/N \geq 10$) sono risultati entrambi di 20 mg/L per il primo e secondo composto, rispettivamente di 20 mg/L e 50 mg/L per il quarto e quinto composto, mentre di 50 mg/L e 100 mg/L per il terzo composto. In *Tabella 8* vengono riassunti i risultati ottenuti per i valori dei limiti di rilevazione e quantificazione dei vari composti.

Tabella 8: LOD e LOQ dei vari composti in funzione dei rapporti S/N.

Composto	LOD [mg/L]	LOQ [mg/L]
1	20	20
2	20	20
3	50	100
4	20	50
5	20	50

4.2.3 Valutazione della precisione (ripetibilità)

La valutazione della precisione del metodo è avvenuta preparando cinque soluzioni indipendenti di principio attivo in metanolo alla concentrazione di 200 mg/L. I dati raccolti dall'analisi strumentale vengono riportati in *Tabella 9*.

Tabella 9: Concentrazioni in mg/L ottenute dallo strumento LC-DAD dalle diverse prove di ripetibilità.

Composto	Prova 1 [mg/L]	Prova 2 [mg/L]	Prova 3 [mg/L]	Prova 4 [mg/L]	Prova 5 [mg/L]
1	200,798	202,379	202,317	202,415	202,314
2	197,606	198,992	199,022	199,047	198,986
3	197,505	201,516	200,733	199,672	196,991
4	186,323	190,150	195,514	189,267	188,226
5	195,706	196,732	201,246	197,660	191,065

L'elaborazione dei dati ha previsto il calcolo del valor medio delle concentrazioni (\bar{C}) e della deviazione standard (σ) per ogni composto al fine di determinare la deviazione standard relativa percentuale ($\%RSD$), *Equazione 1*.

$$\%RSD = \frac{\sigma}{\bar{C}} = \frac{\sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (c_i - \bar{C})^2}}{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n c_i}$$

Equazione 1: Formula della deviazione standard relativa percentuale (%RSD).

Il rapporto tra la %RSD e l'equazione di Horwitz permette di ottenere il valore Horrat (H_r), esplicitato nell'Equazione 2, che è il parametro di riferimento per la precisione di un metodo intra-laboratorio preso in considerazione nel documento (EU) SANCO/3030/99 rev. 5.

$$H_r = \frac{\%RSD}{\%RSD_r} = \frac{\%RSD}{0,67 \cdot 2^{(1-0,5 \log(\bar{c}))}}$$

Equazione 2: formula del valore di Horrat.

In particolare se:

$H_r \leq 1$ il metodo analitico ha una ripetibilità accettabile;

$1 < H_r \leq 2$ la ripetibilità è accettabile in caso di ulteriori spiegazioni;

$H_r > 2$, non è accettato.⁴⁷

Di seguito, in *Tabella 10*, si riportano i vari parametri ottenuti per il calcolo del valore di Horrat.

Tabella 10: valori calcoli di \bar{C} , σ , %RSD, %RSD_r e H_r per i vari composti.

Composto	\bar{C} [mg/L]	σ	%RSD	%RSD _r	H_r
1	202,044	0,698	0,346	0,604	0,573
2	198,731	0,629	0,317		0,525
3	199,283	1,978	0,997		1,651
4	189,896	3,449	1,816		3,007
5	196,482	3,677	1,872		3,099

Dunque solamente i composti uno e due, ossia i più intensi in termini di aree cromatografiche, conducono a dei valori di Horrat accettabili e di conseguenza a delle precisioni adeguate alla validazione del metodo LC-DAD.

4.2.3 Valutazione del fenomeno di carry-over

Il fenomeno del carry-over deve essere studiato attentamente e minimizzato durante lo sviluppo di un metodo, specie se l'analita in esame ha la predisposizione ad adsorbirsi a vari substrati, tra cui anche le parti dello strumento. Durante la validazione il carry-over è stato valutato iniettando tre campioni bianchi (metanolo puro) dopo il punto curva a più alta concentrazione di principio attivo, ossia a 200 mg/L.

In *Figura 26* si riporta il cromatogramma ottenuto del primo campione bianco.

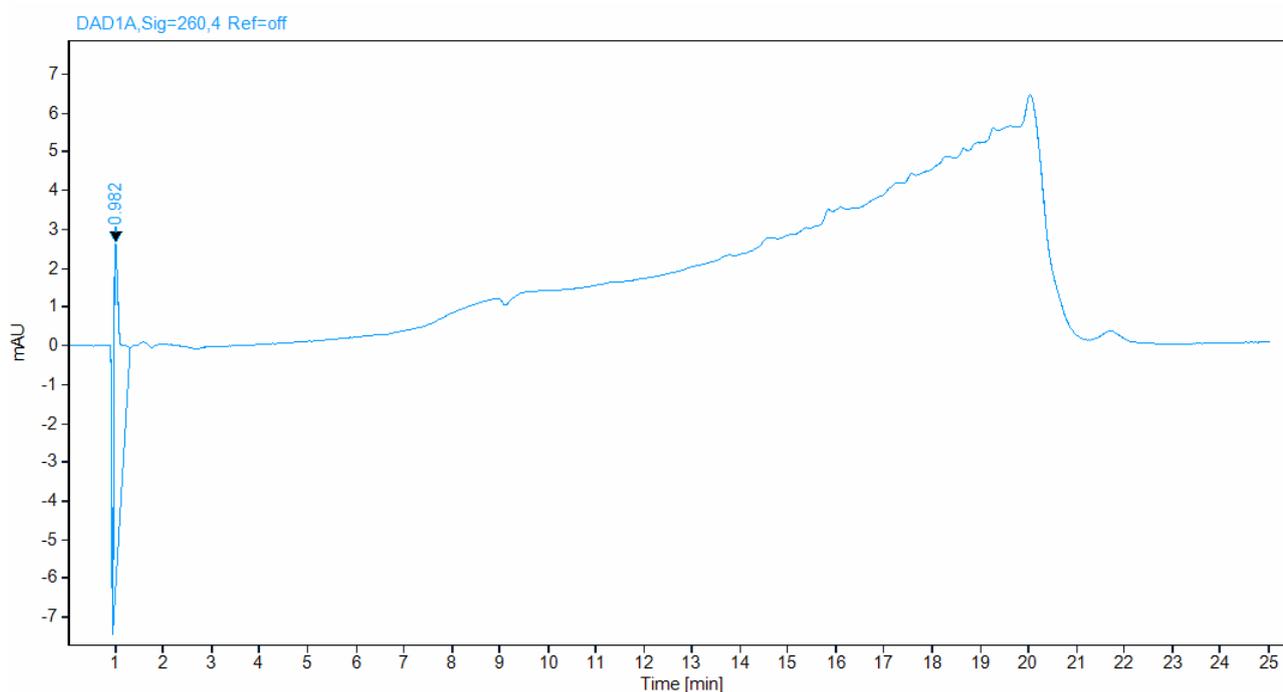


Figura 26: cromatogramma del primo bianco solvente dopo il punto calibrante a 200 mg/L di principio attivo.

Come si evince dal cromatogramma nessuno dei composti d'interesse è stato rilevato a dimostrazione che il metodo LC-DAD sviluppato non è soggetto a fenomeni di carry-over e che il gradiente di eluizione del metodo permette di ricondizionare al meglio la colonna preparandola per la corsa successiva.

4.2.4 Stima dell'incertezza estesa del misurando

La stima dell'incertezza estesa dei misurandi (U_c) è stata eseguita sommando algebricamente i vari contributi d'incertezza relativa attinenti la ripetibilità del laboratorio, la taratura strumentale, l'attrezzatura della preparativa (bilancia analitica, vetreria e pipette), del recupero e moltiplicando il risultato ottenuto per il parametro T-Student.

La distribuzione T-Student è un modello teorico utilizzato per approssimare il valore della media di una popolazione distribuita normalmente quando la dimensione del campione è piccola ($n < 30$) e la deviazione standard è sconosciuta.⁴⁸

In *Tabella 11* si riportano i valori di U_c ottenuti dei misurandi per ogni singolo composto.

Tabella 11: Incertezza estesa dei misurandi dei composti del metodo LC-DAD.

Composto	\bar{C} [mg/L]	U_c [μ g/L]	U_c [%]
1	202,044	$\pm 4,922$	$\pm 2,436$
2	198,731	$\pm 4,780$	$\pm 2,405$
3	199,283	$\pm 7,164$	$\pm 3,595$
4	189,896	$\pm 10,741$	$\pm 5,653$
5	196,482	$\pm 11,405$	$\pm 5,804$

Come si evince dai dati i composti 1 e 2 risultano i meno affetti da errore durante la loro determinazione, al contrario i composti 4 e 5 hanno un'incertezza estesa percentuale relativa al valor medio delle prove di ripetibilità oltre il 5%.

4.3 Validazione del metodo strumentale LC-TQ

I parametri di validazione ed extra-validazione presi in esame per il metodo strumentale LC-TQ sono gli stessi indagati per il metodo LC-DAD.

4.3.1 Preparazione delle soluzioni usate in fase di validazione

Procedura sperimentale:

È stata preparata una soluzione madre 1 di PA, da ogni batch, alla concentrazione di 1000 mg/L in metanolo. Tale soluzione è stata ottenuta pesando 10 mg di principio attivo in un matraccio da 10 mL e portando a volume con metanolo. Da questa soluzione, tramite diluizione 1:100, è stata ottenuta la madre 2 a 10 mg/L in metanolo la quale è stata utilizzata per preparazione delle soluzioni a (2000, 1000, 500) ng/mL. Da quest'ultime tre soluzioni, per diluizione 1:10, si sono ottenuti ulteriori tre punti di calibrazione rispettivamente a (200, 100, 50) ng/mL.

In *Tabella 12* vengono riportate le diluizioni effettuate al raggiungimento delle sei soluzioni calibranti di principio attivo per il metodo LC-TQ.

Tabella 12: Preparazione delle soluzioni di PA a diverse concentrazioni in metanolo.

Livello	Concentrazione	Composizione	Volume finale
madre 1	1000 mg/L	10 mg(PA) + 10 mL(MeOH)	10 mL
madre 2	10 mg/L	10 μ L(madre 1) + 990 μ L(MeOH)	1 mL
1	2000 μ g/L	200 μ L(madre 2) + 800 μ L(MeOH)	1 mL
2	1000 μ g/L	100 μ L(madre 2) + 900 μ L(MeOH)	1 mL
3	500 μ g/L	50 μ L(madre 2) + 950 μ L(MeOH)	1 mL
4	200 μ g/L	100 μ L(1) + 900 μ L(MeOH)	1 mL
5	100 μ g/L	100 μ L(2) + 900 μ L(MeOH)	1 mL
6	50 μ g/L	100 μ L(3) + 900 μ L(MeOH)	1 mL

4.3.2 Valutazione della linearità

La valutazione della linearità è stata eseguita con determinazioni in doppio, due campioni pesati singolarmente da ogni batch di sintesi, di sei concentrazioni distinte come riportato in *Tabella 12*.

Di seguito si riportano le rette di taratura, con le rispettive equazioni e coefficienti R^2 , ottenute dallo studio del PA (batch2) tramite il metodo strumentale dMRM ottimizzato.

Linearità massa 257

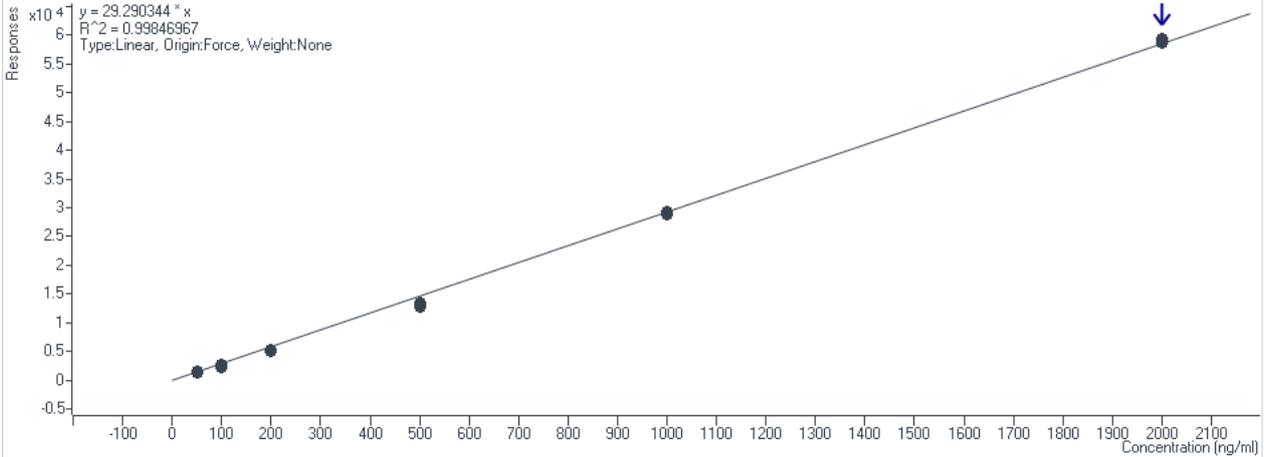
Calibration Curve



Type: Linear Origin: Force Weight: None ISTD QC CC

Frammento 258 - 6 Levels, 6 Levels Used, 12 Points, 12 Points Used, 0 QCs

$y = 29.290344 \cdot x$
 $R^2 = 0.99846967$
Type: Linear, Origin: Force, Weight: None



Linearità massa 326

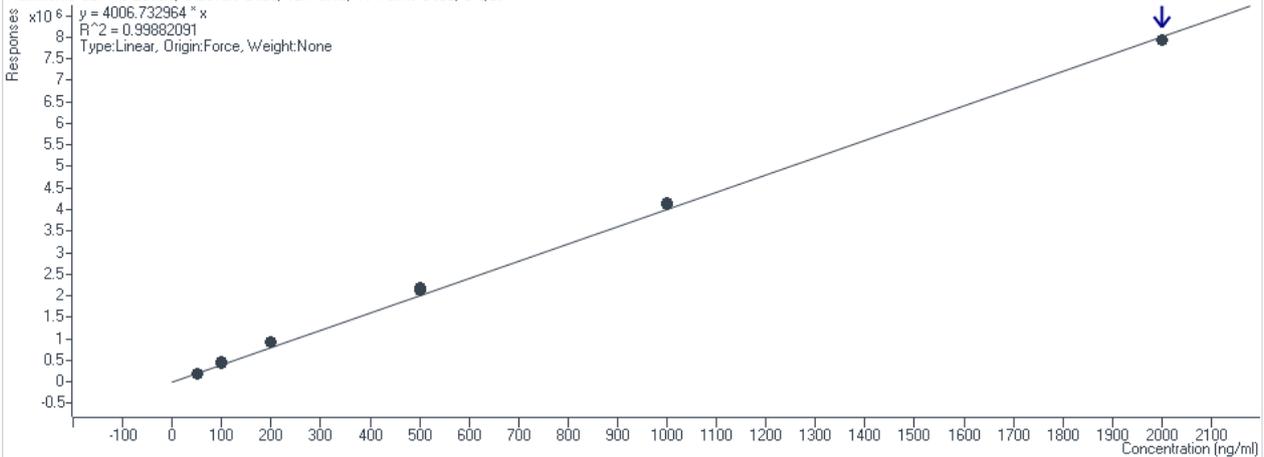
Calibration Curve



Type: Linear Origin: Force Weight: None ISTD QC CC

Frammento 327 - 6 Levels, 6 Levels Used, 12 Points, 11 Points Used, 0 QCs

$y = 4006.732964 \cdot x$
 $R^2 = 0.99882091$
Type: Linear, Origin: Force, Weight: None



Linearità massa 451

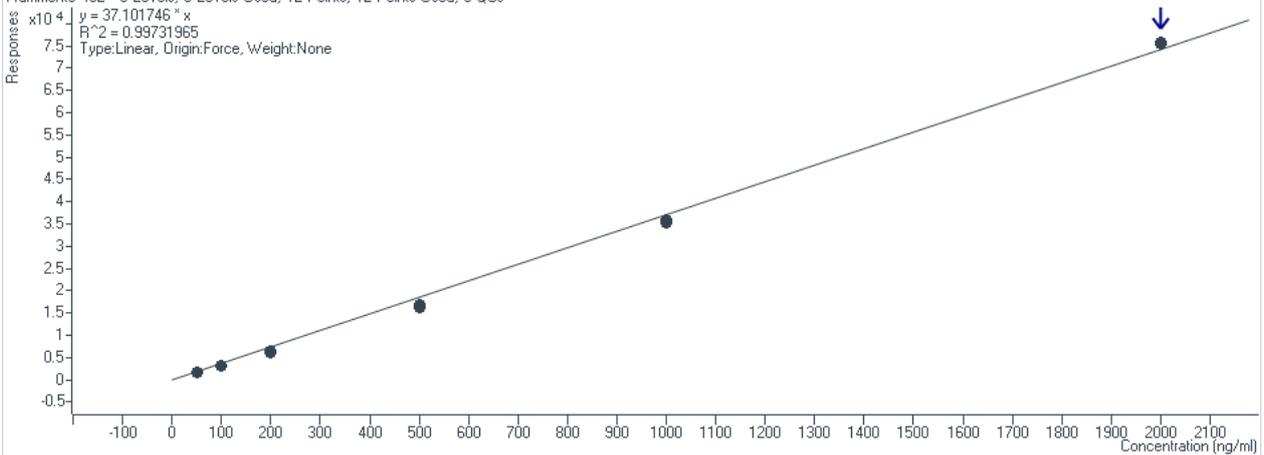
Calibration Curve



Type: Linear Origin: Force Weight: None ISTD QC CC

Frammento 452 - 6 Levels, 6 Levels Used, 12 Points, 12 Points Used, 0 QCs

$y = 37.101746 \cdot x$
 $R^2 = 0.99731965$
Type: Linear, Origin: Force, Weight: None



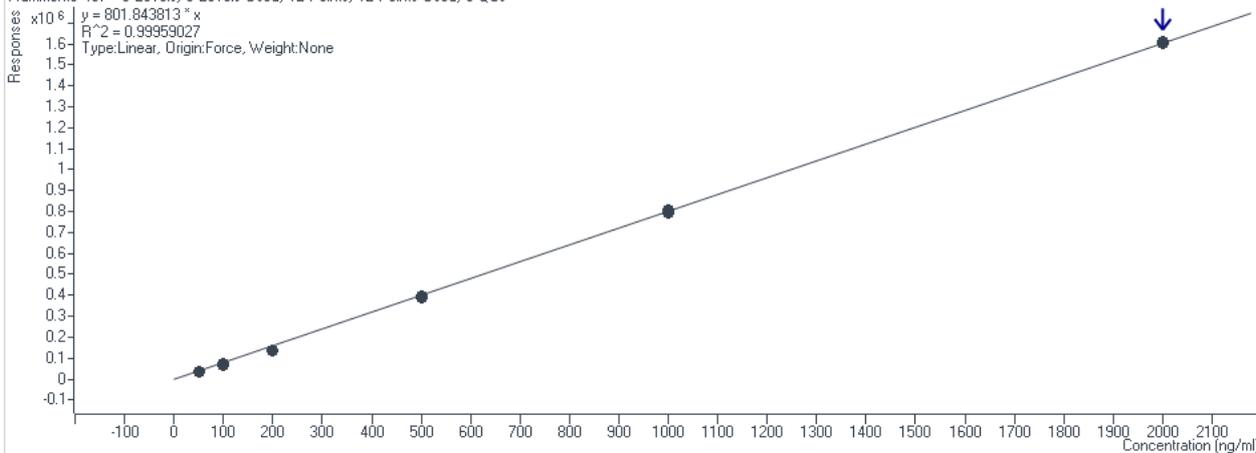
Linearità massa 496

Calibration Curve

Type: Linear Origin: Force Weight: None ISTD QC CC

Frammento 497 - 6 Levels, 6 Levels Used, 12 Points, 12 Points Used, 0 QCs

$y = 801.843813 * x$
 $R^2 = 0.99959027$
Type: Linear, Origin: Force, Weight: None



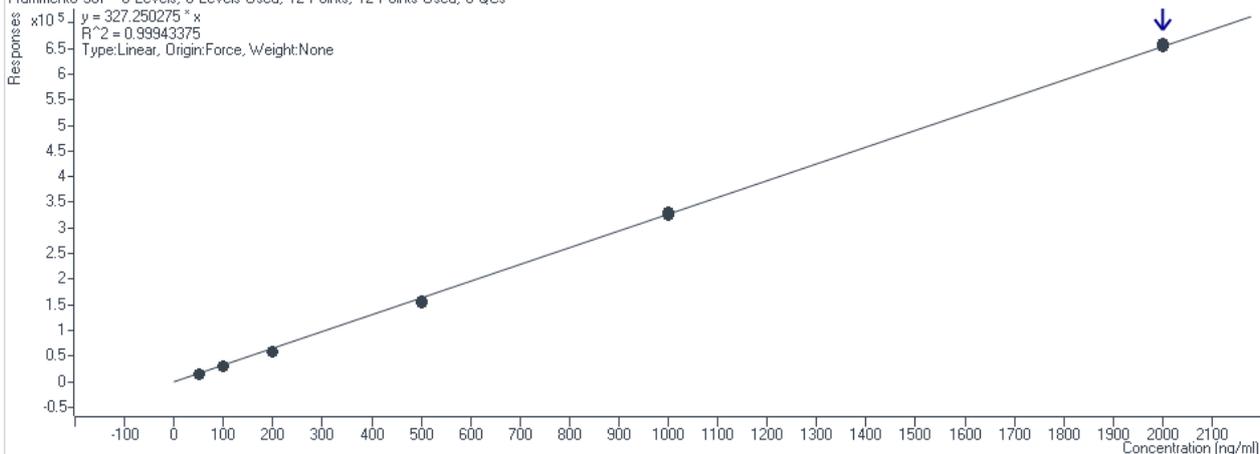
Linearità massa 506

Calibration Curve

Type: Linear Origin: Force Weight: None ISTD QC CC

Frammento 507 - 6 Levels, 6 Levels Used, 12 Points, 12 Points Used, 0 QCs

$y = 327.250275 * x$
 $R^2 = 0.99943375$
Type: Linear, Origin: Force, Weight: None



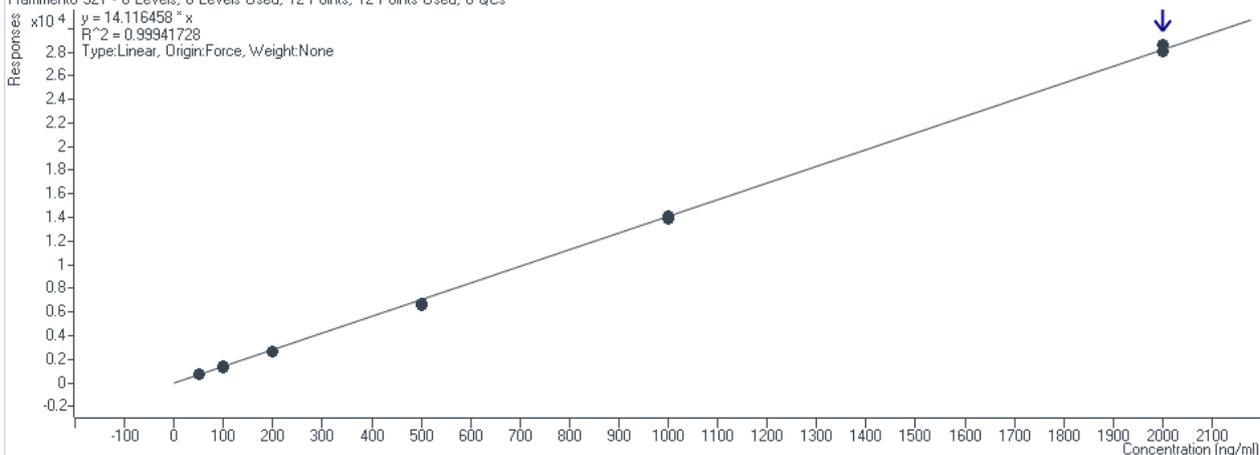
Linearità massa 520

Calibration Curve

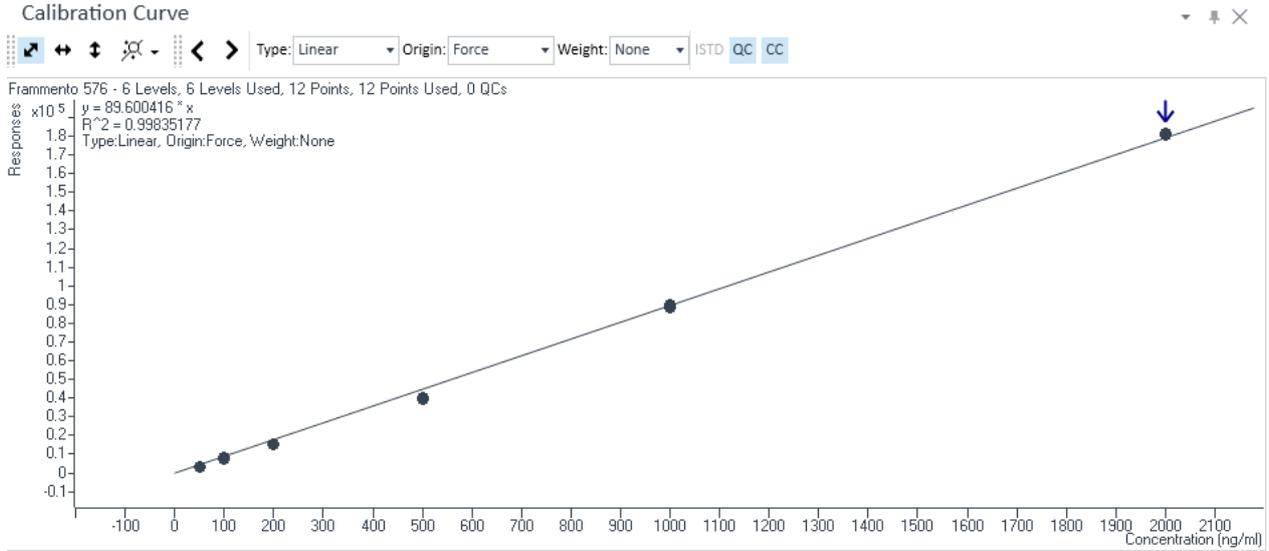
Type: Linear Origin: Force Weight: None ISTD QC CC

Frammento 521 - 6 Levels, 6 Levels Used, 12 Points, 12 Points Used, 0 QCs

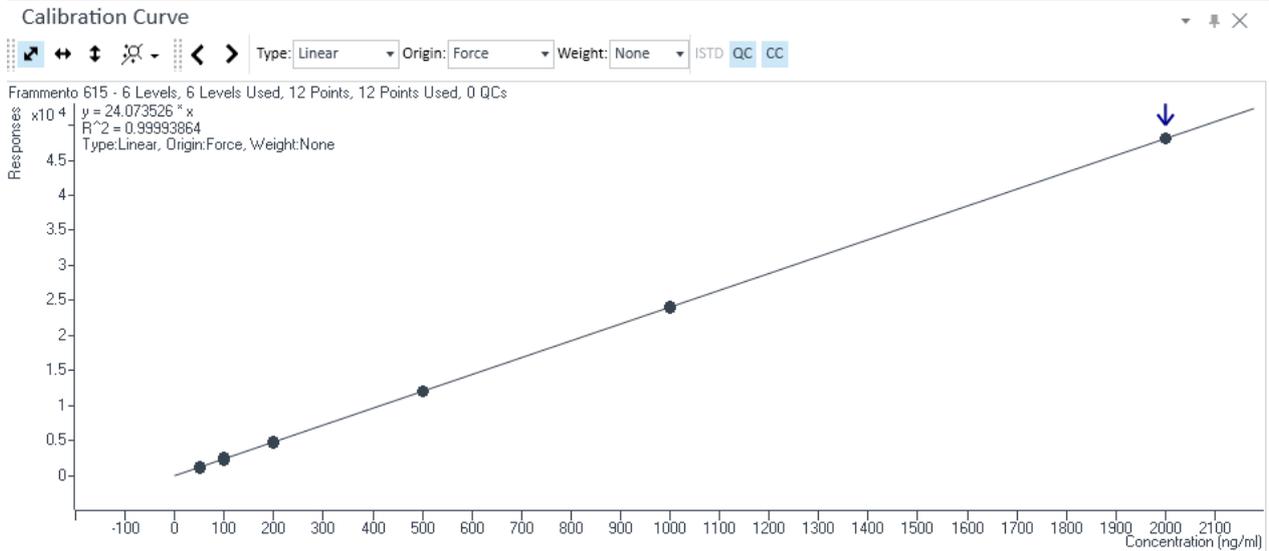
$y = 14.116458 * x$
 $R^2 = 0.99941728$
Type: Linear, Origin: Force, Weight: None



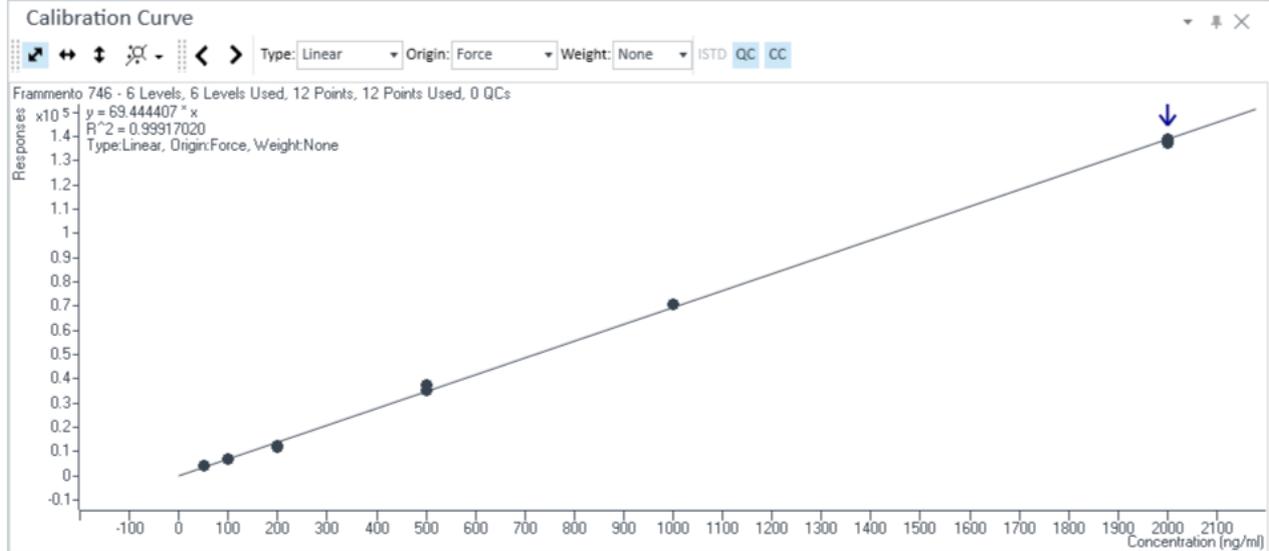
Linearità massa 575



Linearità massa 614



Linearità massa 745



Dall'analisi delle equazioni delle rette di taratura e rispettivi R^2 si osserva che il metodo dMRM permette di relazionare in maniera ottimale il responso strumentale con la concentrazione del principio attivo in soluzione per ogni ione studiato.

Inoltre i valori del LOD e del LOQ calcolati sul rapporto segnale/rumore ($LOD \Rightarrow S/N \geq 3$; $LOQ \Rightarrow S/N \geq 10$) sono pari rispettivamente a 50 $\mu\text{g/L}$ e 100 $\mu\text{g/L}$ per gli ioni 258 e 746, mentre risultano di 50 $\mu\text{g/L}$ per tutte le altre masse. In *Tabella 13* vengono riportati i valori ottenuti dei limiti di rilevazione e quantificazione per ogni singolo ione.

Tabella 13: LOD e LOQ dei vari ioni in funzione del rapporto S/N.

Massa	Ione Precursore	LOD	LOQ
257	258	50 $\mu\text{g/L}$	100 $\mu\text{g/L}$
326	327	50 $\mu\text{g/L}$	50 $\mu\text{g/L}$
451	452	50 $\mu\text{g/L}$	50 $\mu\text{g/L}$
496	497	50 $\mu\text{g/L}$	50 $\mu\text{g/L}$
506	507	50 $\mu\text{g/L}$	50 $\mu\text{g/L}$
520	521	50 $\mu\text{g/L}$	50 $\mu\text{g/L}$
575	576	50 $\mu\text{g/L}$	50 $\mu\text{g/L}$
614	615	50 $\mu\text{g/L}$	50 $\mu\text{g/L}$
745	746	50 $\mu\text{g/L}$	100 $\mu\text{g/L}$

I valori ottenuti per il limite di rilevabilità e il limite di quantificazione sono risultati i medesimi per tutti e tre i batch di sintesi del principio attivo; tuttavia l'equazioni delle rette di taratura e i rispettivi coefficienti R^2 (sempre $\geq 0,98$ come richiesto da norma) differiscono in funzione del batch di sintesi. Tale evidenza sperimentale suggerisce che la sintesi del principio attivo sia avvenuta con successo, considerando la rilevazione delle stesse masse caratteristiche, ma con selettività e rese diverse.

4.3.2 Valutazione della precisione (ripetibilità)

La valutazione della precisione del metodo è avvenuta preparando cinque soluzioni indipendenti di principio attivo (batch 2) in metanolo alla concentrazione di 1000 µg/L.

I dati raccolti dall'analisi strumentale vengono riportati in *Tabella 14*.

Tabella 14: Concentrazioni in µg/L ottenute dalle diverse prove di ripetibilità.

Massa	Prova 1 [µg/L]	Prova 2 [µg/L]	Prova 3 [µg/L]	Prova 4 [µg/L]	Prova 5 [µg/L]
257	997,067	1003,291	1005,131	996,323	1003,953
326	1007,907	1007,313	1007,819	1010,063	1011,383
451	965,552	967,132	960,315	965,157	958,889
496	1011,88	1008,447	1009,378	1012,312	1008,924
506	1012,754	1015,999	1013,998	1016,737	1013,619
520	1004,036	1004,091	999,083	1002,198	1003,639
575	999,522	999,148	1000,792	1000,497	998,021
614	1004,485	999,769	999,431	1007,906	1005,595
745	971,194	971,925	973,488	971,356	974,103

Come visto in precedenza per il metodo strumentale LC-DAD, l'accettabilità o meno della ripetibilità del metodo dMRM è avvenuta in funzione del valore di Horrat.

Di seguito, in *Tabella 15*, si riportano i vari parametri ottenuti per il calcolo del valore di Horrat.

Tabella 15: valori calcoli di \bar{C} , σ , %RSD, %RSD_r e Hr per le varie masse alla concentrazione di 1000 µg/L.

Massa	\bar{C} [µg/L]	σ	%RSD	%RSD_r	H_r
257	1001,153	4,131	0,413	0,474	0,871
326	1008,897	1,746	0,173		0,365
451	963,409	3,589	0,372		0,786
496	1010,188	1,779	0,176		0,372
506	1014,621	1,677	0,165		0,349
520	1002,609	2,115	0,211		0,445
575	999,596	1,110	0,111		0,234
614	1003,437	3,716	0,370		0,781
745	972,413	1,309	0,135		0,284

Le prove di ripetibilità condotte per tutti gli ioni presi in esame dal metodo dMRM conducono a dei valori di Horrat minori a uno e quindi accettabili in termini di precisione per la validazione del metodo.

4.3.3 Valutazione del fenomeno di carry-over

Come specificato in precedenza lo studio della presenza o meno del fenomeno di carry-over è avvenuta iniettando tre campioni bianchi (metanolo puro) dopo il punto curva a più alta concentrazione di principio attivo, ossia a 2000 µg/L.

Come riportato dalle principali linee guida di validazione dei metodi strumentali, il carry-over nel bianco dopo il campione a più alta concentrazione non deve essere maggiore del 20% rispetto il valore del LOQ.

Dalle prove effettuate è emerso che solo nel primo bianco solvente di tre sono state rilevate due masse, nello specifico la 496 e la 745. Tuttavia le abbondanze registrate oltre a non superare del 20% il valore del LOQ sono pure risultate inferiori al valore del LOD e dunque è possibile affermare che il metodo dMRM proposto non è soggetto a fenomeni di carry-over che potrebbero inficiare l'accuratezza e la precisione dell'analisi.

Infine si noti come tale evidenza sperimentale permetta di forzare per l'origine l'equazioni delle rette di taratura delle singole masse.

4.3.4 Stima dell'incertezza estesa del misurando

La stima dell'incertezza estesa dei misurandi (U_c), data dalla somma algebrica dei vari contributi d'incertezza relativa moltiplicata per il parametro T-Student, ha condotto ai risultati riassunti in *Tabella 16*.

Tabella 16: Incertezza estesa calcolata singolarmente per ogni massa del metodo LC-TQ.

Massa	\bar{C} [µg/L]	U_c [µg/L]	U_c [%]
257	1001,153	± 25,198	± 2,517
326	1008,897	± 23,094	± 2,289
451	963,409	± 23,768	± 2,467
496	1010,188	± 23,141	± 2,291
506	1014,621	± 23,180	± 2,285
520	1002,609	± 23,195	± 2,313
575	999,596	± 22,583	± 2,259
614	1003,437	± 24,730	± 2,465
745	972,413	± 22,064	± 2,269

La massima incertezza estesa calcolata per il metodo dMRM è di ± 25,198 µg/L per la massa 257 mentre la minima è di ± 22,064 µg/L per la massa 745.

5. CONCLUSIONI

I composti dell'ammonio quaternario (QACs) rappresentano una classe di agenti antimicrobici estremamente versatile grazie alla possibilità di modularne le proprietà intervenendo direttamente sulla loro struttura chimica.

Nello svolgimento di questa tesi sperimentale sono stati sviluppati e ottimizzati due metodi analitici per la determinazione di un principio attivo da brevettare appartenente alla tipologia dei QACs.

Nello specifico, per raggiungere i requisiti normativi imposti dal Regolamento (UE) 528/2012, sono state confrontate le potenzialità analitiche delle strumentazioni 1260 Infinity II LC/DAD WR System e 6470 Triple Quadrupole LC/MS System, prodotte da *Agilent Technologies*.

Dalle diverse attività di validazione svolte, basate sul documento SANCO/3030/99 rev. 5, è emerso che solo il metodo dMRM, ad alto grado di selettività e sensibilità, può essere validato in termini di linearità, precisione, ripetibilità e specificità.

Infine, dai risultati ottenuti dalle prove di extra-validazione, si evince come entrambi i metodi siano esenti da fenomeni di carry-over e che, come atteso, la strumentazione LC-TQ permetta di raggiungere performance quantitative nettamente superiori e nella metà dei tempi, rispetto alla strumentazione LC-DAD. Infatti il limite di rilevabilità varia rispettivamente da 50 µg/L a 20 mg/L.

Concludendo, possibili studi futuri potrebbero riguardare la valutazione del recupero ad un campione di prova appropriato, fornendo ulteriore robustezza ai metodi strumentali sviluppati.

6. BIBLIOGRAFIA

- (1) Russell, A. Denver, James R. Furr, and Jean-Yves Maillard. Microbial Susceptibility and Resistance to Biocides. ASM News-American Society for Microbiology 1997, pp 481–487.
- (2) Regolamento (UE) n. 528/2012 del Parlamento europeo e del Consiglio, del 22 maggio 2012, relativo alla messa a disposizione sul mercato e all'uso dei biocidi. Testo rilevante ai fini del SEE. *Gazzetta ufficiale dell'Unione Europea* 123.
- (3) Istituto Superiore Di Sanità. <https://www.issalute.it/index.php/la-salute-dalla-a-alla-z>.
- (4) William A. Rutala; David J. Weber; Healthcare. Guideline for Disinfection and Sterilization in Healthcare Facilities. 2008, 163.
- (5) M.L., M.; Nascetti, S.; F., M.; S., G.; Resi, D.; Pompa, M.; Salcuni, P.; D., G.; E., S.; G., C.; R., B.; R., P.; G., S.; Ippolito, G.; V, P.; M., V.; Pavan, A.; F., B.; C.M., M.; L, F. *ANNALI DI IGIENE MEDICINA PREVENTIVA E DI COMUNITA'*; 2009; Vol. 21.
- (6) Carlone, N.; Pompei, R. *Microbiologia Farmaceutica*, II edizione.; EdiSES, 2013.
- (7) Ali Y, Dolan MJ, Fendler EJ, Larson EL. *Disinfection, Sterilization, and Preservation*, 5th ed.; Block SS, 2001; Vol. Alcohols.
- (8) Prindle RF. *Disinfection, Sterilization, and Preservation*; Block SS, 1983; Vol. Phenolic compounds.
- (9) Basso, M.; Bordini, G.; Bianchi, F.; Prosper, L.; Testori, T. Utilizzo di collutori preoperativi contro il virus SARS-CoV-2 (COVID-19): revisione della letteratura e raccomandazioni cliniche. 16.
- (10) Gerba, C. P. Quaternary Ammonium Biocides: Efficacy in Application. *Appl Environ Microbiol* 2015, 81 (2), 464–469. <https://doi.org/10.1128/AEM.02633-14>.
- (11) Shaoying Liu, Zuntao Zheng, Fanglin Wei, Yiping Ren, Wenjun Gui, Huiming Wu, and Guonian Zhu. Simultaneous Determination of Seven Neonicotinoid Pesticide Residues in Food by Ultrapformance Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* 2010, 58 (6), 3271–3278.
- (12) Morandini, A.; Spadati, E.; Leonetti, B.; Sole, R.; Gatto, V.; Rizzolio, F.; Beghetto, V. Sustainable Triazine-Derived Quaternary Ammonium Salts as Antimicrobial Agents. *RSC Adv.* 2021, 11 (45), 28092–28096. <https://doi.org/10.1039/D1RA03455C>.
- (13) Massimo Cardini; Morena Piumi; Roberto Seghedoni; Enrico Stefani. LA SANIFICAZIONE NELL'INDUSTRIA ALIMENTARE E NEGLI ALLEVAMENTI. *Dipartimento di Sanità Pubblica Informo* 46.
- (14) Chang SL. *Destruction of Micro-Organisms*; Journal of the America Water Works Association, 1944; Vol. 36.
- (15) Chen, X.; Schluesener, H. J. Nanosilver: A Nanoproduct in Medical Application. *Toxicology Letters* 2008, 176 (1), 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2007.10.004>.
- (16) U. Klueh, V. Wagner, S. Kelly, A. Johnson, J.D. Bryers. Efficacy of Silver-Coated Fabric to Prevent Bacterial Colonization and Subsequent Device-Based Biofilm Formation. *Journal of Biomedical Materials Research* 2000, 53, 621–631.
- (17) European Chemicals Agency (ECHA) - <https://echa.europa.eu/it/home>.
- (18) D.P.R. n. 392 Del 6 Ottobre 1998.
- (19) D.Lgs. n. 174 Del 25 Febbraio 2000.
- (20) Olkowska, E.; Polkowska, Ż.; Namieśnik, J. Analytical Procedures for the Determination of Surfactants in Environmental Samples. *Talanta* 2012, 88, 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2011.10.034>.
- (21) Sütterlin, H.; Alexy, R.; Coker, A.; Kümmerer, K. Mixtures of Quaternary Ammonium Compounds and Anionic Organic Compounds in the Aquatic Environment: Elimination and Biodegradability in the Closed Bottle Test Monitored by LC–MS/MS. *Chemosphere* 2008, 72 (3), 479–484. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.03.008>.

- (22) Nollet L.M.L. *Handbook of Water Analysis*, 2nd ed.; CRC Press: Boca Raton, 2007.
- (23) Hultgren, S.; Larsson, N.; Nilsson, B. F.; Jönsson, J. Å. Ion-Pair Hollow-Fiber Liquid-Phase Microextraction of the Quaternary Ammonium Surfactant Dicoctadecylammonium Chloride. *Anal Bioanal Chem* 2009, 393 (3), 929–937. <https://doi.org/10.1007/s00216-008-2524-8>.
- (24) Ferrer, I.; Furlong, E. T. Accelerated Solvent Extraction Followed by On-Line Solid-Phase Extraction Coupled to Ion Trap LC/MS/MS for Analysis of Benzalkonium Chlorides in Sediment Samples. *Anal. Chem.* 2002, 74 (6), 1275–1280. <https://doi.org/10.1021/ac010969l>.
- (25) González, S.; Barceló, D.; Petrovic, M. Advanced Liquid Chromatography-Mass Spectrometry (LC-MS) Methods Applied to Wastewater Removal and the Fate of Surfactants in the Environment. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 2007, 26 (2), 116–124. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2006.12.003>.
- (26) Wilson K.; Walker J. *Metodologia Biochimica*, 5th Edizione Italiana.; Raffaello Cortina, 2000.
- (27) Wiley-VCH; Weinheim Kellner. *Analytical Chemistry*; 2006; Vol. Fig-21-07.
- (28) <https://www.restek.com/it/libreria-tecnica/articoli/how-do-small-particle-size-columns-increase-sample-throughput/>.
- (29) D.A. Skoog, J.J. Leary. *Chimica Analitica Strumentale*; Edises, 1995.
- (30) van Deemter JJ, Zuiderweg FJ and Klinkenberg A. Longitudinal Diffusion and Resistance to Mass Transfer as Causes of Non Ideality in Chromatography. *Chem. Eng. Sci* 1956, 5, 271–289.
- (31) Sito Web Agilent. Accessibile: <https://www.agilent.com>.
- (32) Wyndham, K. D.; O’Gara, J. E.; Walter, T. H.; Glose, K. H.; Lawrence, N. L.; Alden, B. A.; Izzo, G. S.; Hudalla, C. J.; Iraneta, P. C. Characterization and Evaluation of C₁₈ HPLC Stationary Phases Based on Ethyl-Bridged Hybrid Organic/Inorganic Particles. *Anal. Chem.* 2003, 75 (24), 6781–6788. <https://doi.org/10.1021/ac034767w>.
- (33) Sito Web Waters. Accessibile: <https://www.waters.com/nextgen/it/it/products/columns/uplc-columns-category.html>.
- (34) Mäntele, W.; Deniz, E. UV–VIS Absorption Spectroscopy: Lambert-Beer Reloaded. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 2017, 173, 965–968. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2016.09.037>.
- (35) Dong, M. W.; Wysocki, J. PERSPECTIVES IN MODERN HPLC. 10.
- (36) Introduction to Mass Spectrometry: Instrumentation, Applications and Strategies for Data Interpretation. *Choice Reviews Online* 2008, 45 (08), 4396.
- (37) Doerge, D. R.; Churchwell, M. I.; Holder, C. L.; Rowe, L.; Bajic, S. Detection and Confirmation of β -Agonists in Bovine Retina Using LC/APCI-MS. *Anal. Chem.* 1996, 68 (11), 1918–1923. <https://doi.org/10.1021/ac951174f>.
- (38) Kebarle, P.; Tang, L. From Ions in Solution to Ions in the Gas Phase - the Mechanism of Electrospray Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* 1993, 65 (22), 972A-986A. <https://doi.org/10.1021/ac00070a001>.
- (39) Banerjee, S.; Mazumdar, S. Electrospray Ionization Mass Spectrometry: A Technique to Access the Information beyond the Molecular Weight of the Analyte. *International Journal of Analytical Chemistry* 2012, 2012, 1–40. <https://doi.org/10.1155/2012/282574>.
- (40) Mann, Matthias.; Meng, C. Kai.; Fenn, J. B. Interpreting Mass Spectra of Multiply Charged Ions. *Anal. Chem.* 1989, 61 (15), 1702–1708. <https://doi.org/10.1021/ac00190a023>.
- (41) Georgiou, C. A. Chapter 3 – Elemental and Isotopic Mass Spectrometry. 113.
- (42) IUPAC. Compendium of Chemical Terminology. *the “Gold Book.” Blackwell Scientific Publications Oxford* 1997.

- (43) Hail, M. E.; Berberich, D. W.; Yost, R. A. Gas Chromatographic Sample Introduction into the Collision Cell of a Triple Quadrupole Mass Spectrometer for Mass-Selection of Reactant Ions for Charge Exchange and Chemical Ionization. *Anal. Chem.* 1989, 61 (17), 1874–1879. <https://doi.org/10.1021/ac00192a019>.
- (44) Peng, Y.; Cheng, T.; Dong, L.; Zhang, Y.; Chen, X.; Jiang, J.; Zhang, J.; Guo, X.; Guo, M.; Chang, J.; Wang, Q. Quantification of 2'-Deoxy-2'- β -Fluoro-4'-Azidocytidine in Rat and Dog Plasma Using Liquid Chromatography-Quadrupole Time-of-Flight and Liquid Chromatography-Triple Quadrupole Mass Spectrometry: Application to Bioavailability and Pharmacokinetic Studies. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2014, 98, 379–386. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2014.06.019>.
- (45) *Regolamento (CE) n. 1907/2006 Del Parlamento Europeo e Del Consiglio Concernente La Registrazione, La Valutazione, l'autorizzazione e La Restrizione Delle Sostanze Chimiche (REACH), Che Istituisce Un'agenzia Europea per Le Sostanze Chimiche, Che Modifica La Direttiva 1999/45/CE e Che Abroga Il Regolamento (CEE) n. 793/93 Del Consiglio e Il Regolamento (CE) n. 1488/94 Della Commissione, Nonché La Direttiva 76/769/CEE Del Consiglio e Le Direttive Della Commissione 91/155/CEE, 93/67/CEE, 93/105/CE e 2000/21/CE; 2006.*
- (46) Sito Accredia. Accessibile: <https://www.accredia.it/>.
- (47) EUROPEAN COMMISSION; Directorate General Health and Consumer Protection. *SANCO/3030/99 Rev.5. Technical Active Substance and Plant Protection Products: Guidance for Generating and Reporting Methods of Analysis in Support of Pre- and Post-Registration Data Requirements for Annex (Section 4) of Regulation (EU) No 283/2013 and Annex (Section 5) of Regulation (EU) No 284/2013.; 2019.*
- (48) *ISO 8466-1 Water Quality - Calibration and Evaluation of Analytical Methods and Estimation of Performance Characteristics; 1990; p 8.*

RINGRAZIAMENTI

A conclusione di questo elaborato, desidero menzionare tutte le persone, senza le quali questo lavoro di tesi non esisterebbe nemmeno. In primis, un ringraziamento speciale al mio relatore Prof. Beghetto Valentina per la professionalità dimostrata nel seguirmi con disponibilità in ogni fase del presente lavoro. Un ringraziamento speciale va anche al mio correlatore Dr. Balestra Graziano per la sua immensa pazienza e per le conoscenze trasmesse durante tutto il percorso. Desidero ringraziare anche tutti i compagni di laboratorio che ho incontrato in questo meraviglioso percorso e che mi hanno sempre aiutato e spronato. Infine, dedico questa tesi a me stesso, ai miei sacrifici e alla mia tenacia che mi hanno permesso di arrivare fin qui.