



Università
Ca' Foscari
Venezia

Corso di Laurea Magistrale in Chimica e Tecnologie sostenibili

Tesi di Laurea

—

**DETERMINAZIONE DI METOSSIFENOLI
NELLE ACQUE DEL MARE DI ROSS
MEDIANTE HPLC-MS**

Ca' Foscari
Dorsoduro 3246
30123 Venezia

Relatore

Prof. Andrea Gambaro

Correlatori

Dott.ssa Roberta Zangrando

Dott.ssa Elena Barbaro

Laureanda

Anna Grosso

Matricola 828130

Anno Accademico

2013/2014

INDICE

CAPITOLO 1: Scopo	4
CAPITOLO 2: Introduzione	6
2.1 Analiti	7
2.2 Metodi strumentali per la determinazione di metossifenoli	12
2.3 Metodologie pre-analitiche per la determinazione di metossifenoli	14
2.4 Area di studio	16
CAPITOLO 3: Materiali e metodi	19
3.1 Materiali standard di riferimento	20
3.2 Preparazione delle soluzioni standard	20
3.3 Solventi e reagenti.....	21
3.4 Attrezzatura di laboratorio e materiali	22
3.5 Strumentazione e colonne cromatografiche.....	23
3.6 Campionamento.....	24
3.7 Metodo di analisi mediante HPLC-ORBITRAP MS	26
3.8 Metodo di analisi mediante HPLC/MS-MS.....	31
3.9 Preparazione del campione per la determinazione di metossifenoli nelle acque marine.....	35
CAPITOLO 4: Risultati e discussione	38
4.1 Sviluppo della procedura di preparazione del campione.....	39
4.2 Validazione del metodo per la determinazione dei metossifenoli	44
4.3 Valutazione effetto matrice	57
4.4 Analisi dei campioni	60
CAPITOLO 5: Conclusioni	84
APPENDICE: Strumentazione analitica	87
A.1 HPLC/MS-MS.....	88
A.2 HPLC-ORBITRAP MS	90
BIBLIOGRAFIA	93

CAPITOLO 1

SCOPO

I metossifenoli sono composti organici semi-volatili soggetti a trasporto a lungo raggio in atmosfera che derivano principalmente dalla combustione della lignina e vengono utilizzati in atmosfera e nei ghiacci come indicatori di combustione di biomassa e di particolari tipi di legname; vengono studiati perciò per un interesse paleoclimatico.

Le conclusioni ottenute dai risultati di precedenti studi sull'aerosol antartico hanno messo in luce come la presenza di metossifenoli in aree polari e in particolare in Antartide non sia attribuibile esclusivamente al trasporto in atmosfera di particolato derivante da *biomass burning*, ma per questi composti ci siano altre sorgenti locali legate all'ambiente marino.

Lo scopo dunque del presente lavoro di tesi è la determinazione di metossifenoli liberi nella frazione disciolta e particellata di campioni reali di acqua marina prelevati nel Mare di Ross, e lo studio della loro presenza per poterne ipotizzare l'origine. Tale analisi verrà condotta mettendo a punto una procedura pre-analitica e un metodo analitico strumentale impiegando la cromatografia liquida accoppiata alla spettrometria di massa (HPLC-MS).

CAPITOLO 2

INTRODUZIONE

2.1 ANALITI

I metossifenoli (MP) sono composti organici polari e idrosolubili costituiti da un anello fenolico con uno o più sostituenti metossilici (-OCH₃) e in funzione della singola struttura molecolare sono semi-volatili, fotosensibili e reattivi in atmosfera, dove sono stati rilevati sia nel PM₁₀ che nel PM_{2,5}.¹

Un processo di particolare rilevanza nello studio dell'inquinamento atmosferico è rivestito dalla combustione di biomassa che influisce sulla qualità dell'aria, sulla salute umana e sui cambiamenti climatici globali. La biomassa è costituita per il 75% da carboidrati, contenuti nella cellulosa ed emicellulosa, mentre per il restante 25% da lignina. Dalla combustione della cellulosa si origina il levoglucosan che viene utilizzato come tracciante molecolare di *biomass burning*,^{2,3} anche se non fornisce precise informazioni sul tipo di legname che viene bruciato:⁴ conifere, decidue, caducifoglie o erba.

Dalla combustione della lignina invece derivano i metossifenoli. La lignina è un polimero tridimensionale dalla struttura disordinata e molto ramificata, insolubile in acqua e nella maggior parte dei solventi. Si trova nella parete cellulare delle cellule vegetali e, mentre cellulosa ed emicellulosa costituiscono le fibre del legno, la lignina le tiene unite e fornisce sostegno e compattezza alla pianta. È sintetizzata per polimerizzazione deidrogenativa ad opera di enzimi di 3 alcoli: alcol coniferilico, alcol p-cumarilico e alcol sinapilico (figure 2.1 e 2.2):⁵

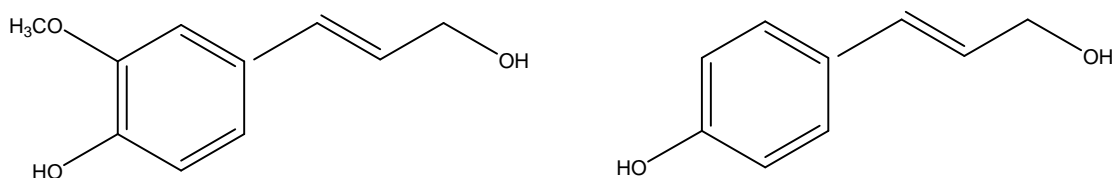


Figura 2.1 Alcol coniferilico e alcol p-cumarilico

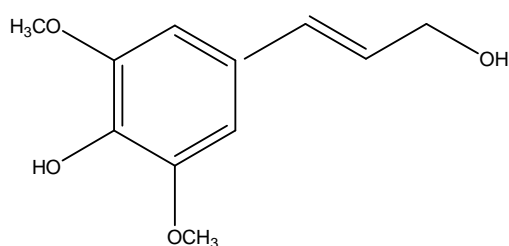


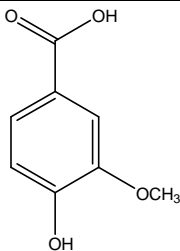
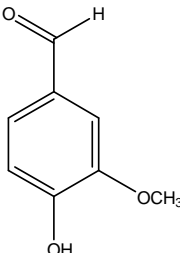
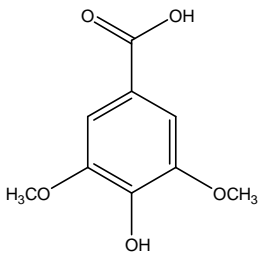
Figura 2.2 Alcol sinapilico

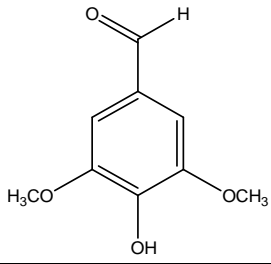
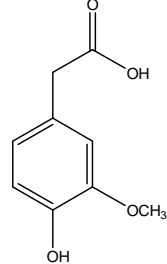
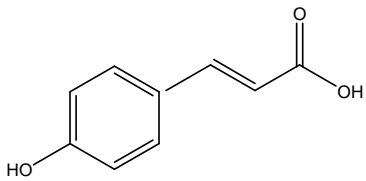
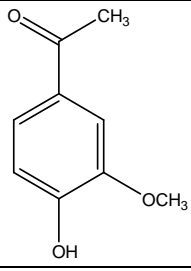
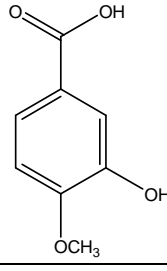
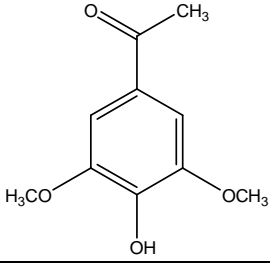
A seconda della quantità relativa dei tre alcoli precursori si distinguono tre tipi di lignina:⁵

- Lignina *softwood*: è costituita principalmente da alcol coniferilico e in misura minore da alcol p-cumarilico; i composti maggiormente presenti nella sua struttura possiedono un solo gruppo metossilico legato all'anello fenolico. Tali caratteristiche si riscontrano nelle Gimnosperme.
- Lignina *hardwood*: è formata maggiormente da alcol coniferilico e alcol sinapilico; i composti presenti hanno uno o due sostituenti metossilici sull'anello fenolico. Appartengono a questa categoria le Angiosperme.
- Lignina erbacea: il precursore più abbondante è l'alcol p-cumarilico presente sottoforma di suoi derivati chiamati nuclei anisilici; di tale classe fanno parte le piante erbacee.

Per ossidazione o pirolisi della lignina si originano i metossifenoli sottoforma di aldeidi, chetoni e acidi.⁶
Si riportano in tabella 2.1 i metossifenoli analizzati nel presente lavoro di tesi:

Tabella 2.1 Nome, PM, formula bruta e di struttura di ogni MP in esame

Composto	Peso molecolare	Formula bruta	Formula di struttura
Acido vanillico VA	168	$C_8H_8O_4$	
Vanillina VAH	152	$C_8H_8O_3$	
Acido siringico SYA	198	$C_9H_{10}O_5$	

Siringaldeide SYAH	182	$C_9H_{10}O_4$	
Acido omovanillico HA	182	$C_9H_{10}O_4$	
Acido p-cumarico PA	164	$C_9H_8O_3$	
Acetovanillone VAC	166	$C_9H_{10}O_3$	
Acido isovanillico IVA	168	$C_8H_8O_4$	
Acetosiringone SYAC	196	$C_{10}H_{12}O_4$	

La combustione della lignina non è però l'unica via di formazione dei metossifenoli, dato che si possono originare anche per via fotochimica,⁷ per degradazione ad opera di batteri e funghi^{8,9} oppure possono essere legati alla presenza del Bacterioplancton o ad altri batteri che si nutrono di fitoplancton.^{10,11}

Da studi di letteratura emerge come la lignina venga degradata dai batteri solo in condizioni aerobiche attraverso la produzione extracellulare di enzimi in grado di demolire le catene polimeriche, soprattutto ad opera di Attinomiceti, tra i quali i più abbondanti sono gli Streptomiceti.¹² Gli organismi maggiormente responsabili della degradazione della lignina sono però i funghi, principalmente *white rot*, *brown rot* e *soft rot fungi*.¹³ I primi sono i più abbondanti e i più efficienti, i secondi sono meno aggressivi in quanto si limitano a demetilare, mentre i *soft rot* sono più lenti.¹⁴

In letteratura gli studi sulla lignina riguardano soprattutto il suo impiego come tracciante di piante vascolari, come indicatore di materiale organico terrestre (TOM) in ambienti acquatici (acque fluviali e marine) e in sedimenti per studi di paleovegetazione e paleoclima.¹⁵

In generale lo studio della degradazione delle lignine avviene per ossidazione mediante CuO ,^{16,17,18} analizzando i metossifenoli prodotti è possibile risalire al tipo di legna da cui derivano.¹⁶ In particolare i fenoli siringici (acido siringico, siringaldeide e acetosiringone) sono sintetizzati solo dalle Angiosperme e sono indicatori di questo tipo di vegetazione, in quanto non sono presenti nelle conifere; i fenoli vanillici (acido vanillico, vanillina e acetovanillone) sono invece comuni sia alle Angiosperme che alle Gimnosperme. I fenoli cinnamici infine (acido p-cumarico e acido ferulico) sono associati prevalentemente ai tessuti erbacei. La somma dei fenoli siringici viene indicata con S ($S = \text{SYA} + \text{SYAH} + \text{SYAC}$), la somma dei vanillici con V ($V = \text{VA} + \text{VAH} + \text{VAC}$) e la somma dei cinnamici con C ($C = \text{PA} + \text{FA}$), mentre la somma di tutti e otto viene definita come Λ_8 ($\Lambda_8 = V + S + C$). Il tipo di pianta bruciata viene ricavato dai rapporti tra queste sommatorie:

- S/V è un indicatore del contributo relativo di Angiosperme e Gimnosperme: valori maggiori di 1 indicano una prevalenza di latifoglie
- C/V è un indicatore del contributo relativo dei tessuti erbacei: maggiore è tale rapporto, maggiore è la loro presenza e minore è quella dei tessuti legnosi

I rapporti invece tra acidi e rispettive aldeidi danno un'indicazione del grado di ossidazione dovuta ad esempio ai batteri:¹⁹ $(\text{Ad}/\text{Al})_v$ indica il rapporto acido vanillico/vanillina, mentre $(\text{Ad}/\text{Al})_s$ il rapporto acido siringico/siringaldeide.

Utilizzando questo approccio, Onstad et al.¹⁷ impiegano i metossifenoli come indicatori di materiale organico particolato (POM) di origine terrigena: a partire da campioni di fiumi e sedimenti marini

costieri degli Stati Uniti ricavano informazioni sulla vegetazione locale, sul grado di degradazione microbica e sul clima. Benner et al.¹⁶ similmente, ma su materiale organico disciolto (DOM) nei fiumi, rilevano una dipendenza dei MP dalla salinità, dalle condizioni meteorologiche e dalla variabilità stagionale. Altri autori^{16,20} hanno condotto uno studio sul DOM negli oceani per verificare la presenza di materiale derivante da piante vascolari e proveniente dalla terraferma attraverso lo scarico dei fiumi, e per indagare l'origine di tale materiale e la sua fotosensibilità. Questi studi hanno dimostrato come la concentrazione maggiore di fenoli derivanti dalla lignina sia maggiore vicino alla costa e in corrispondenza delle foci dei fiumi. Inoltre dallo studio del materiale organico presente nei sedimenti si è visto come la presenza di questi composti decresca all'aumentare della profondità e della distanza dalla costa in accordo con la diminuzione del contributo terrigeno.^{21,22}

La letteratura riporta inoltre studi condotti sulla lignina presente nell'aerosol.²³ In atmosfera i metossifenoli liberi vengono studiati principalmente come traccianti di combustione della lignina,^{24,25} essi vengono emessi in forma gassosa e con il diminuire della temperatura condensano sulla superficie delle particelle; sono soggetti a trasporto a lungo raggio, anche se la loro concentrazione è particolarmente alta vicino alla sorgente di emissione.^{25,26} Dalla loro analisi è possibile individuare il tipo di legname e quindi di pianta che è stata bruciata e dalla quale hanno avuto origine.²⁷

Oltre che in matrici acquose marine e fluviali, piante, aerosol e sedimenti, i metossifenoli sono stati studiati anche in matrici alimentari. Diversi lavori hanno mostrato come essi possano inibire la germinazione di cereali, come segale, orzo, grano e avena,²⁸ o la crescita delle piante, come riso, canna da zucchero e piselli.²⁹ La maggior parte degli studi però si concentra sulle loro proprietà di antiossidanti, dato che sono in grado di inibire la perossidazione dei lipidi nelle cellule³⁰ e di intervenire sui radicali liberi responsabili tra gli altri di cancro e problemi cardiaci.³¹ Sono stati quindi indagati in molti alimenti, soprattutto di origine vegetale, come frutta, verdura,³² miele,³³ olio d'oliva,^{34,35} vino³⁶ e funghi.³⁷

I metossifenoli derivano anche da fonti antropogeniche in quanto trovano utilizzo nell'industria farmaceutica, alimentare, chimica e nella cosmesi.³⁸ I loro derivati vengono usati come antisettici e analgesici, oltre che nella cura di asma e altre patologie respiratorie;³⁹ spesso sono impiegati in profumi, oli essenziali, fragranze e aromi.⁴⁰

2.2 METODI STRUMENTALI PER LA DETERMINAZIONE DI METOSSIFENOLI

I metodi strumentali per la determinazione dei metossifenoli più presenti in letteratura sono quelli cromatografici: inizialmente si utilizzava soprattutto la gascromatografia per la possibilità di accoppiarla ad uno spettrometro di massa e per la maggiore sensibilità,¹⁵ ma negli ultimi anni sono stati messi a punto numerosi metodi che utilizzano la cromatografia liquida ad alte prestazioni (HPLC).⁴¹ Entrambe queste tecniche sono accoppiate a vari rivelatori: la gascromatografia oltre alla spettrometria di massa,⁴² è accoppiata anche a *detector* a ionizzazione di fiamma (FID),^{16,17} mentre la cromatografia liquida utilizza rivelatori a fluorescenza,³⁶ a serie di diodi (DAD)⁴³ e la spettrometria di massa con sorgenti ESI⁴⁴ o APCI.⁴⁵

I metodi in gascromatografia usano colonne capillari (30 m; 0,25 mm di diametro) a base di silice fusa, una fase mobile di metilsilicone (SE-30) e un *detector* a ionizzazione di fiamma, impiegando per la quantificazione l'etilvanillina come standard interno;⁴⁶ altri utilizzano colonne capillari non polari e polari DB-1 DB-1701^{16,17} o HP-5MS^{18,7} sempre con il FID come rivelatore. Sono metodi particolarmente adatti a determinare gli analiti quando sono presenti in matrici complesse, come sedimenti o piante, per la loro sensibilità e riproducibilità.¹⁵

Keil et al.⁴⁷ invece determinano i metossifenoli in matrice acquosa mediante GC-MS, impiegato in modalità di acquisizione SIM e *full scan*, utilizzando colonne DB-5MS e ottenendo limiti di rilevabilità di 2-3 ordini di grandezza inferiori rispetto a quelli raggiunti in GC-FID.⁴⁸ Louchouart et al.⁴⁹ hanno però messo in evidenza come l'utilizzo di una spettrometria di massa tandem in modalità MRM (GC/MS-MS) porti a migliori risultati in termini di sensibilità e selettività rispetto alle modalità SIM e *full scan*, abbassando anche il rumore di fondo e portando a limiti di rilevabilità più bassi.

Una tecnica che si è molto sviluppata negli ultimi anni è la pirolisi-gas cromatografia accoppiata alla spettrometria di massa (Py-GC-MS)⁵⁰ utilizzata per analisi qualitative e semi-quantitative.¹⁵ Il materiale derivante dalla degradazione della lignina ed estratto con varie tecniche viene pirolizzato in presenza di vari catalizzatori, come zeoliti acide o metalli misti ad ossidi,⁵¹ la cromatografia separa i prodotti della pirolisi che poi vengono identificati per confronto del loro spettro di massa con varie librerie.²¹

Utilizzando la tecnica GC è necessario derivatizzare gli analiti per trasformare i gruppi idrossilici e carbossilici nei trimetilsilil derivati.⁴⁶ In letteratura sono riportate due tecniche: la derivatizzazione in vial⁴⁷ e quella in siringa,⁵² che minimizza la quantità di derivatizzante e di campione da utilizzare ottenendo risultati simili; Zhang et al.⁵³ hanno però messo a punto un ulteriore metodo che porta ad un

risparmio in termini di tempo in quanto prevede di iniettare in colonna sia il campione che il derivatizzante contemporaneamente e la derivatizzazione avviene istantaneamente con la vaporizzazione.

La cromatografia liquida ad alte prestazioni inizialmente si è sviluppata di meno soprattutto perché ritenuta meno conveniente rispetto alla gas cromatografia per il possibile accoppiamento con la spettrometria di massa, anche se ha il vantaggio di eliminare lo *step* della derivatizzazione.⁴⁹ Delgado et al.³⁶ utilizzano una cromatografia a fase inversa (precolonna e colonna analitica Nova-Pak C₁₈) accoppiata ad un rivelatore a fluorescenza in serie con un *detector* UV, che hanno permesso la determinazione di composti fenolici nel vino con buona sensibilità e ridotti tempi di analisi.

Lobbes et al.⁴³ utilizzano sempre una cromatografia a fase inversa con colonna e colonna di guardia LICHROSPHER RP C₁₈ e un *detector* a serie di diodi (DAD); lo spettro di assorbimento è misurato nel *range* di lunghezza d'onda $\lambda=230-370$ nm; questo metodo ha buona riproducibilità e precisione ed è stato applicato a campioni acquosi, di sedimento e piante. Edelkraut et al.⁵⁴ utilizzano invece colonne impaccate con Nucleosil 120-C₁₈ e un rivelatore DAD a $\lambda=360$ nm; tale metodo viene impiegato per analisi di *routine* di sistemi acquosi. Charrière et al.⁵⁵ per la determinazione di composti fenolici in sedimenti, piante e acque utilizzano colonne Lichrosorb C₁₈ a fase inversa e un *detector* UV a $\lambda=275$ nm.

In letteratura si trovano anche lavori che accoppiano la cromatografia liquida a fase inversa con la spettrometria di massa: Krimmel et al.⁴⁴ utilizzano colonne Pherisorb ODS 2 RP-18 e la sorgente di ionizzazione ESI in modalità negativa, con un *range* di massa di 50-450 *m/z*, metodo applicato a campioni acquosi; Metzger et al.⁵⁶ impiegano un metodo MALDI-MS per la caratterizzazione delle lignine che offre vantaggi in termini di rapidità e sensibilità.⁴¹ Hoffmann et al.⁴⁵ adottano un metodo HPLC/APCI-MS, mentre linuma et al.⁵⁷ impiegano l'elettroforesi capillare accoppiata alla spettrometria di massa con sorgente ESI (CE/ESI-MS) per l'analisi di metossifenoli nel particolato.

Nel presente lavoro di tesi sono stati utilizzati due differenti metodi strumentali che prevedono l'accoppiamento della cromatografia liquida ad alte prestazioni con la spettrometria di massa: HPLC-ORBITRAP MS e HPLC/MS-MS entrambi con la sorgente ESI utilizzata in modalità negativa.

2.3 METODOLOGIE PRE-ANALITICHE PER LA DETERMINAZIONE DI METOSSIFENOLI

Nella determinazione dei MP in matrici ambientali, la maggior parte dei lavori presenti in letteratura prevede la degradazione della lignina, presente in tessuti vegetali, sedimenti e DOM e successiva separazione dei prodotti di ossidazione mediante due tecniche: un'ossidazione con ossidanti blandi e la termochemolisi.¹⁵

Fino agli anni '70 l'ossidazione blanda veniva condotta su matrici vegetali con nitrobenzene,⁵⁸ ma portava a numerosi sottoprodotti che interferivano con la determinazione degli analiti; per questo motivo tale ossidante è stato sostituito dall'ossido di rame per la prima volta da Hedges et al.⁴⁶ nel 1982 riuscendo a ridurre il rumore di fondo e i sottoprodotti generati; inoltre questo ossidante permetteva di ottenere non solo acidi e aldeidi, ma anche chetoni.¹⁵ La procedura prevede un'ossidazione a 150°C con CuO in condizioni basiche; i prodotti della reazione vengono in seguito acidificati, estratti con etere etilico, seccati, risospesi in piridina e conservati in frigo fino al momento dell'analisi;¹⁷ lo standard interno utilizzato è l'etilvanillina. Goñi et al.⁵⁹ hanno sostituito come solvente di estrazione l'etere con l'acetato di etile per evitare la formazione dei perossidi, sono state ridotte le dimensioni dei reattori e impiegato un sistema di gestione con microonde.

La termochemolisi messa a punto negli anni '90 da Clifford et al.⁶⁰ prevede l'ossidazione della lignina a 600°C con tetrametilammonio idrossido (TMAH): è una tecnica adatta ad analisi di *routine* con un elevato numero di campioni ricchi in carbonio organico, mentre l'ossidazione con ossido di rame meglio si adatta a pochi campioni, soprattutto sedimenti marini.⁵³ Recentemente il TMAH è stato sostituito dal trimetilsolfonio idrossido (TMSH), che permette di lavorare a temperature più basse intorno ai 350°C.⁶¹

Partendo dal lavoro di Hedges et al.⁴⁶ un'altra procedura preparativa prevede la separazione della frazione disciolta da quella particellata mediante filtrazione del campione acquoso con filtri GF/F (0,7 µm); un'aliquota del filtrato viene essiccata e il residuo viene sciolto e posto in una bomba in Teflon insieme ai filtri ai quali si aggiungono gli ossidanti, la soluzione risultante viene scaldata, acidificata ed estratta con etere etilico.^{53,20} Una procedura simile viene anche adottata da Cotrim da Cunha et al.¹⁹ che utilizzano però bombe in PTFE e acetato di etile per estrarre.

La fase di estrazione degli analiti dalla matrice acquosa ha continuato tuttavia a costituire un problema a causa degli interferenti che vengono estratti insieme agli analiti: infatti l'estrazione liquido-liquido (LLE) comporta selettività e riproducibilità scarse e rese basse.¹⁵ Altri metodi estrattivi che sono stati proposti in letteratura sono l'estrazione con resina XAD e l'ultrafiltrazione con membrane.⁴⁸ Il

primo prevede il passaggio del campione attraverso due colonne in serie contenenti resine XAD,⁶² la procedura di pulizia delle resine e degli eluati è però molto lunga, comporta problemi di contaminazione e di quantificazione a causa di rese estrattive basse.⁴⁸ La seconda tecnica utilizza un sistema di ultrafiltrazione con flusso tangenziale mediante membrane di polisolfoni con un *cutoff* di 1000 Dalton che però, pur evitando contaminazioni, non trattengono le molecole a basso peso molecolare.⁶³

Una nuova procedura preparativa messa a punto recentemente è l'estrazione in fase solida (SPE): essa permette di estrarre molti composti organici da matrici acquose, fornisce bianchi procedurali bassi, è rapida, riproducibile e comporta buone rese.⁴⁸ Da uno studio condotto confrontando l'estrazione liquido-liquido ed estrazione in fase solida emerge come l'SPE garantisca rese e precisione maggiori, sia più veloce e permetta una precisione e un'accuratezza migliori nella quantificazione.⁶⁴ Spesso l'estrazione in fase solida è utilizzata come tecnica di preconcentrazione delle lignine disciolte che successivamente subiscono l'ossidazione alcalina con CuO;^{48,53,63} scarsi invece sono gli studi che pongono la loro attenzione sulla determinazione dei metossifenoli liberi.^{47,65} Fra questi Keil et al.⁴⁷ conducono uno studio dettagliato su matrici acquose, operando anche un confronto con le tecniche estrattive presenti in letteratura, in cui sviluppano una procedura SPE per l'estrazione degli analiti, seguita da concentrazione, derivatizzazione e analisi mediante GC-MS. Utilizzano colonne Oasis HLB 200 mg (Waters), per l'eluizione acetato di etile e come standard interno l'acido 3,4-diidrossibenzoico in quanto l'etilvanillina, analogo sintetico della vanillina, è presente nelle acque naturali.

L'obiettivo di questo lavoro di tesi è la determinazione dei metossifenoli liberi presenti nell'acqua di mare mediante HPLC-MS utilizzando una procedura estrattiva semplice e impiegando per la quantificazione il metodo dello standard interno.

2.4 AREA DI STUDIO

Il Mare di Ross è un'ampia baia situata nella costa antartica a sud della Nuova Zelanda al confine tra l'Antartide orientale e occidentale. Confina a ovest con la catena dei Monti Transantartici (TAM, *Trans Antarctic Mountains*) nella Terra Vittoria, a est con la Terra di Marie Byrd, a nord con l'Oceano Pacifico e a sud con la piattaforma del *Ross Ice Shelf*, la più grande presente sulla Terra.⁶⁶ Si estende in un'area di 466.100 km² con una profondità che varia tra i 600 e i 200 metri e contiene un volume d'acqua di 247.500 km³.⁶⁷ Prende il nome da James Clark Ross, un capitano britannico che lo scoprì nel 1841.

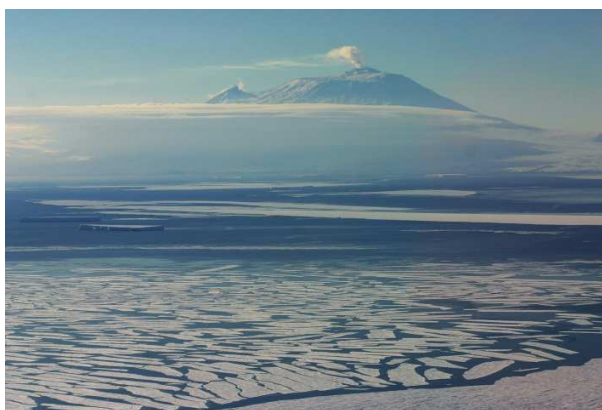


Figura 2.3 Il Mare di Ross

Il Mare di Ross è una delle regioni dell'Oceano del Sud maggiormente studiate nel campo della geologia, biologia marina, oceanografia, glaciologia e sedimentologia: esso è infatti considerato una delle zone con il minor impatto umano presenti sulla Terra e mostra caratteristiche ecologiche incontaminate che non sono osservabili in altri ambienti.⁶⁸

Lo strato di ghiaccio che ricopre il Mare di Ross varia nel corso dell'anno: durante l'inverno esso ricopre l'intera area, ma con la primavera australe diminuisce rapidamente e in estate l'acqua si spinge sempre più a nord fino a congiungersi, a volte, con l'Oceano Pacifico; altrettanto velocemente però da marzo il ghiaccio torna ad espandersi e ad occupare l'intera baia.⁶⁸ Esiste tuttavia un'area, chiamata *polynya*, che non è coperta dai ghiacci: si tratta di una zona d'acqua circondata da ghiaccio marino che si forma grazie all'azione dei venti catabatici che spostano il ghiaccio verso l'esterno lasciando uno spazio di mare aperto. I venti catabatici si originano da masse d'aria fredda create dalla perdita di calore per radiazione superficiale e seguono il profilo dei rilievi del continente antartico.⁶⁹

La circolazione delle masse d'acqua è regolata principalmente dalla batimetria ed è caratterizzata dall'incontro di correnti che differiscono per temperatura, densità e salinità.⁷⁰ In figura 2.4

si riporta una cartina che mostra i principali movimenti delle masse d'acqua nel Mare di Ross negli ultimi cinquant'anni:

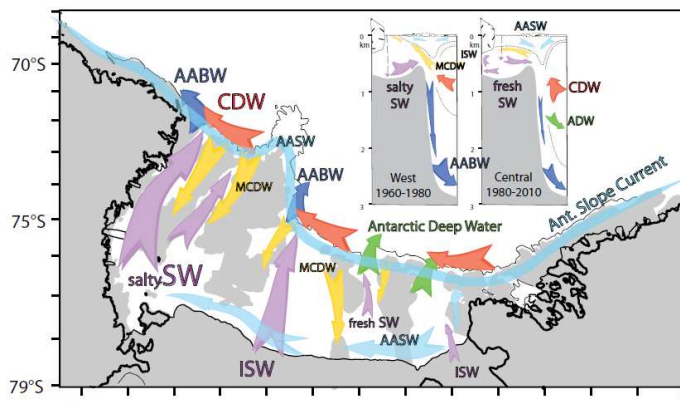


Figura 2.4 Circolazione delle masse d'acqua nel Mare di Ross:
*Antarctic Surface Water (AASW), Shelf Water (SW), Modified Circumpolar Deep Water (MCDW), Circumpolar Deep Water (CDW), New Antarctic Deep Water (ADW) e New Antarctic Bottom Water (AABW)*⁶⁸

Le acque di questo bacino sono tra le più produttive, in termini di produzione primaria, dell'Antartide, si tratta infatti della regione con acque marine più ricche di nutrienti a livello globale.⁷¹ La concentrazione di macronutrienti (nitrati, fosfati e silicati) nelle acque superficiali raramente si impoverisce nella stagione di crescita algale, che può essere eventualmente inibita dalla scarsa disponibilità di ferro, dalla temperatura e dalla luce. L'alta efficienza di trasporto verso l'Oceano meridionale dovuta al trasferimento di fredde masse d'acqua (*Shelf Water* e *Antarctic Surface Water*) all'*Antarctic Bottom Water* (figura 2.4) e l'importanza del Mare di Ross come area di formazione di acque profonde suggeriscono come questa baia giochi un ruolo importante nel ciclo del carbonio dell'Oceano del Sud agendo come principale area regionale per lo stoccaggio della CO₂ oceanica.⁷²

La biomassa fitoplanctonica comincia a crescere verso la fine di ottobre raggiungendo valori molto elevati verso la fine del mese di dicembre. Le specie fitoplanctoniche maggiormente presenti sono la *Phaeocystis antarctica* che si sviluppa tra novembre e dicembre, e le Diatomee che crescono dopo il declino della specie precedente.⁷² Le *Phaeocystis antarctica* sono in grado di svolgere la fotosintesi anche in presenza di scarsa luminosità che caratterizza la primavera antartica e si trovano principalmente nell'area centrale del Mare di Ross meridionale, mentre le Diatomee necessitano di condizioni di irradiazione solare elevata, per questo crescono in estate, soprattutto nelle zone marginali nella parte meridionale della baia.⁷³ Anche i batteri sono molto diffusi nel sistema marino benchè le temperature siano basse, con livelli paragonabili a quelli dell'Oceano Atlantico del nord; nonostante questo costituiscono solo una piccola parte del fitoplancton.⁶⁸



Figura 2.5 Diatomee e *Phaeocystis antarctica*

Nel Mare di Ross vivono più di 400 specie marine, soprattutto pesci e invertebrati; questa ricchezza è dovuta essenzialmente alla varietà di *habitat* presenti, definiti dalla profondità e dalle correnti. Esistono 95 specie di pesci, quelli dominanti sono i “pesci ghiaccio”, chiamati così per il fatto che sono capaci di vivere nelle acque antartiche dove la temperatura oscilla tra -1 e -2°C. Tra questi il *toothfish*, chiamato squalo dell’Antartide per le grandi dimensioni (da adulto arriva a 2 metri di lunghezza per 100 kg di peso) e la voracità, è un predatore estremamente diffuso; gli altri predatori sono i pinguini imperatore, pinguini di Adelia, foche e cetacei. Al vertice della piramide alimentare si trova invece l’orca, seguita dalla foca leopardo; alla base ci sono gli *antarctic* e *crystal krill*, piccoli crostacei che costituiscono lo zooplancton.⁶⁸



Figura 2.6 *Toothfish* e *crystal krill*

Attualmente la distribuzione dei ghiacci nel mare di Ross è in aumento di circa il 5% per decade,⁷² ma l’aumento della temperatura atmosferica e il buco dell’ozono porteranno nei prossimi decenni ad importanti cambiamenti ipotizzabili come una riduzione della concentrazione di ghiaccio, un’intensificazione dei venti con aumento delle dimensioni delle pollinie, una variazione della composizione e della distribuzione del fitoplancton e della produzione primaria con conseguenze sulla catena alimentare che sono difficili da prevedere. In questo delicato ecosistema è sufficiente una piccola variazione per avere importanti conseguenze: ad esempio, negli anni ’70 è stato registrato un aumento di pinguini di Adelia in risposta alla caccia industriale di balene che di fatto aveva ridotto in maniera consistente un loro competitore trofico.⁶⁸

CAPITOLO 3

MATERIALI E METODI

3.1 MATERIALI STANDARD DI RIFERIMENTO

I composti standard dei metossifenoli utilizzati nel presente lavoro di tesi vengono riportati in tabella 3.1:

Tabella 3.1 N° CAS, casa fornitrice e purezza dei composti standard dei metossifenoli nativi e marcati utilizzati

STANDARD	N° CAS	FORNITORE	PUREZZA
Acido vanillico (VA)	121-34-6	Fluka®	≥97%
Vanillina (VAH)	121-33-5	Sigma-Aldrich®	99%
Acido siringico (SYA)	530-57-4	Sigma-Aldrich®	≥95%
Siringaldeide (SYAH)	134-96-3	Fluka®	≥97%
Acido omovanillico (HA)	306-08-1	Sigma-Aldrich®	≥98%
Acido p-cumarico (PA)	501-98-4	Sigma-Aldrich®	≥98%
Acetovanillone (VAC)	498-02-2	Sigma-Aldrich®	≥98%
Acido isovanillico (IVA)	645-08-9	Sigma-Aldrich®	97%
Acetosiringone (SYAC)	2478-38-8	Sigma-Aldrich®	97%
Acido vanillico ¹³ C ₁ (VA*)	121-34-6	Sigma-Aldrich®	99%
Vanillina ¹³ C ₆ (VAH*)	121-33-5	Sigma-Aldrich®	99 atom% ¹³ C

3.2 PREPARAZIONE DELLE SOLUZIONI STANDARD

Le soluzioni madri dei metossifenoli nativi sono state preparate in *clean room* sciogliendo 10 mg circa di ciascun reagente solido in 10 mL di metanolo ottenendo quindi soluzioni alla concentrazione di 1 µg/µL. La stessa procedura è stata utilizzata anche per i due marcati pesando però 5 mg di solido in 5 mL di metanolo.

A partire dalle madri di ciascuno dei MP sono state preparate altre due soluzioni alla concentrazione di 1 ng/µL, una contenente tutti i nativi e l'altra i due marcati, operando perciò una diluizione 1:1000 in acqua. Sono state inoltre preparate ulteriori soluzioni contenenti sia i marcati che i nativi in miscela acqua/metanolo 1:1 alla concentrazione di 25 pg/µL, utilizzate poi in fase di validazione del metodo e nella quantificazione dei campioni come fattori di risposta.

Si riportano in tabella 3.2 le pesate relative ad ogni composto standard utilizzato, le concentrazioni delle soluzioni madri in metanolo e delle soluzioni standard in acqua utilizzate.

Tabella 3.2 Pesì e concentrazioni degli standard e delle soluzioni impiegate

COMPOSTO	PESO (mg)	SOLUZIONE MADRE ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	SOLUZIONE STANDARD ($\text{ng}/\mu\text{L}$)	FATTORE DI RISPOSTA ($\text{pg}/\mu\text{L}$)
VA	10,65	1,065	1,065	26,63
VAH	10,74	1,074	1,074	26,85
SYA	10,57	1,057	1,057	26,43
SYAH	12,24	1,224	1,224	30,60
HA	10,65	1,065	1,065	26,63
PA	10,18	1,018	1,018	25,45
VAC	11,97	1,197	1,197	29,93
IVA	10,73	1,073	1,073	26,83
SYAC	12,20	1,220	1,220	30,50
VA*	5,04	1,008	1,008	25,20
VAH*	5,11	1,022	1,022	25,55

Tutte le soluzioni standard preparate sono state conservate a circa 4°C in frigorifero al fine di mantenere la loro concentrazione nota.

3.3 SOLVENTI E REAGENTI

Sono stati utilizzati i seguenti solventi e reagenti:

- Metanolo *Ultragradient* (Romil Ltd, Cambridge, UK)
- Acetonitrile *Ultragradient* (Romil Ltd, Cambridge, UK)
- Acido formico 98% (Fluka, Sigma Aldrich®, Buchs, Switzerland)
- Detergente per vetreria Contrad® 2000 concentrato (VWR International S.r.l. Milano, Italia)
- Acqua *Ultragradient* (Romil Ltd, Cambridge, UK)
- Acqua ultrapura prodotta dall'impianto di purificazione *Purelab Option R pure water system* accoppiato a *Purelab Ultra Analytic ultra pure water system* (Elga Lab Water, High Wycombe, UK)
- Cloruro di sodio NaCl (N° CAS 7647-14-5, J. T. Baker, Deventer, Holland)

3.4 ATTREZZATURA DI LABORATORIO E MATERIALI

Sono state usate le seguenti attrezzature e materiali:

- Matracci in vetro da 1, 2, 5, 10, 50, 100, 200, 500 e 1000 mL
- Micropipette da 10 µL con capillari in vetro per trasferimento di solventi organici, Transferpettor Brand (Rudolf Brand GMBH + CO, Wertheim-Glashütte, Germania)
- Micropipette da 10, 20, 50, 100, 200, 1000, 5000 e 10000 µL con puntali sterili in polietilene (Eppendorf AG, Hamburg, Germania)
- Vial ambrate in vetro da 2 mL da autocampionatore (Agilent, modello G1329A) (Agilent Technologies, Waldbronn, Germania)
- Vial ambrate in vetro da 2 mL da autocampionatore (Dionex, modello WPS-3000(T)PL RS) e tappi (Thermo Fisher Scientific™, Germania)
- Vial ambrate da stoccaggio in vetro da 2, 4, 7 e 15 mL (Supelco, Bellefonte, USA)
- Tappi in polipropilene *snap cap* con setto in PTFE/silicone, per vial in vetro (Agilent, Waldbronn, Germania)
- Tappi in polipropilene, con rivestimento interno in PTFE, per vial in vetro da stoccaggio (Agilent, Waldbronn, Germania)
- Inserti conici in vetro da 250 µL, con piedi in propilene, per vial in vetro (Agilent, Waldbronn, Germania)
- SPE Oasis HLB 6 cc Vac Cartridge, 200 mg Sorbent per Cartridge, 30 µm Particle Size, 30/pk [WAT106202]
- Filtri in microfibra di vetro GF/F, porosità 0,7 µm, diametro 47 mm (Whatman Maidstone, Kent, UK)
- Bottiglie in polietilene da 2 L
- Microprovette 3810X da 1,5 mL (cod. 0030125177, Eppendorf AG, Hamburg, Germania)
- Filtri siringa in PTFE, diametro 4 mm, porosità 0,2 µm (Phenomenex, Torrance, California, USA)
- Siringhe da 6 mL in polietilene
- Provette in polietilene da centrifuga da 15 mL (Iwaki)
- Pinzette e spatole in acciaio

3.5 STRUMENTAZIONE E COLONNE CROMATOGRAFICHE

Sono stati impiegate le seguenti strumentazioni e colonne cromatografiche:

- UHPLC (*Ultra High Performance Liquid Chromatography*) UltiMate 3000 (Dionex Softron GmbH, Part of Thermo Fisher Scientific Inc., Germering, Germany)
- LTQ Orbitrap XL (Thermo Fisher Scientific, USA Waltham, Massachusetts)
- Agilent 1100 Series HPLC System (Agilent, Waldbronn, Germany)
- API 4000 *Triple Quadrupole Mass Spectrometer* (Applied Biosystem, MSD SCIEX, Toronto, Ontario, Canada)
- Bilancia analitica a 5 cifre, ALT 220-4NM (KERN&Sohn GmbH, Belling, Germany)
- Bagno a ultrasuoni (Ultrasonic FALC, Treviglio, Italia)
- Pompa da vuoto
- Impianto di depurazione dell'acqua Purelab: *Option-R pure water system* accoppiato a *Purelab Ultra Analytic ultra pure water system* (Elga Lab Water, High Wycombe, UK)
- Sistema di filtrazione Advantec, Polysulfone Filter Holder, grade KP47S code 501000
- Visiprep™ Vacuum Manifold, CAS# 57030-U Supelco, standard, 12-port model (Sigma Aldrich, St. Louise, MO, USA)
- Pompa siringa Model "11" plus (Harvard Apparatus Inc., Holliston, Massachusetts, USA)
- Filtro in acciaio HPLC column In line filter, S.S 0,5 µm, porosity x 1.5 (Phenomenex, Torrance, USA)
- Colonna cromatografica XTERRA MS C18, 3,5 µm, 2,1x150 mm, Waters
- Colonna cromatografica Zorbax Extend-C18, 3,5 µm, 4,6x150 mm, Agilent

3.6 CAMPIONAMENTO

I 28 campioni analizzati nel presente lavoro di tesi sono stati raccolti nel Mare di Ross, una baia appartenente al continente antartico nell'Oceano Pacifico meridionale collocata tra la Terra Vittoria e la Terra di Marie Byrd, durante la campagna oceanografica della XXVII spedizione in Antartide (2011/2012) del Programma Nazionale Ricerche in Antartide.

Il campionamento è stato effettuato presso la nave Italica mediante delle rosette formate da 24 bottiglie Niskin da 12 L e una sonda SBE9/11 plus. Il sistema è fornito di sensori che hanno permesso il rilevamento di parametri chimico-fisici quali la fluorescenza, la temperatura, l'ossigeno disciolto, la salinità e la conducibilità ed è in grado di fornirne i profili in tempo reale in funzione della pressione e di chiudere le bottiglie alla profondità desiderata mediante un dispositivo elettromeccanico.



Figura 3.1 Sito di campionamento e campionatore

I campioni di acqua marina utilizzati per la determinazione dei metossifenoli sono stati prelevati nel punto di massima fluorescenza, in quanto essa può fornire una stima della biomassa fitoplanctonica, e filtrati subito *in situ* con filtro in microfibra di vetro GF/F (porosità 0,7 μm e diametro 47 mm) per separare la frazione disciolta e particellata. In 4 punti (E1, E3, D3 e D7, figura 3.2) è stata prelevata anche un'aliquota sopra e una sotto il punto di massima fluorescenza per poter valutare la distribuzione verticale. I filtri ancora umidi sono stati posti in un doppio strato di alluminio, mentre i campioni acquosi sono stati chiusi in bottiglie in polietilene, ed entrambi conservati separatamente a -20°C fino al momento dell'analisi.

Il campionamento, avvenuto nel periodo 26.01.2012 - 08.02.2012, ha previsto la suddivisione dell'area in 5 transetti (A, B, C, D, E); inoltre due campioni (E1 ed E6) sono stati raccolti circa nello stesso punto, ma a distanza di 2 giorni per valutare una possibile variabilità temporale (figura 3.2).

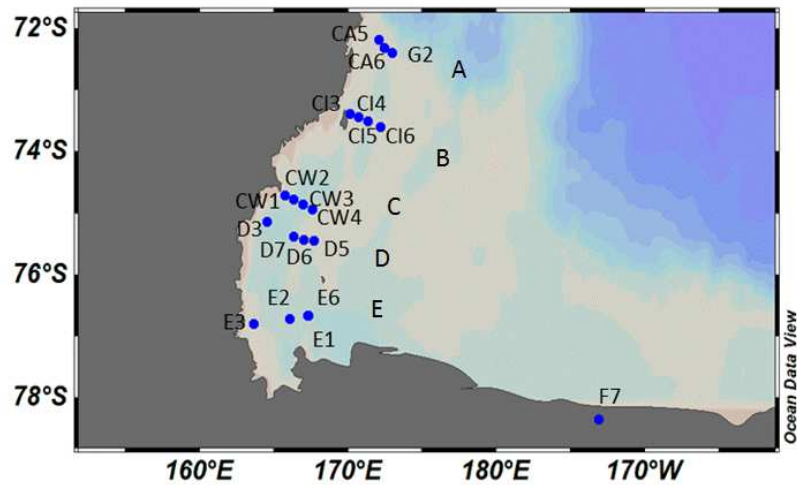


Figura 3.2 Siti di campionamento nel Mare di Ross

Si riportano in tabella 3.3 la profondità, le coordinate, la data, l'ora, il volume filtrato e il transetto di appartenenza di ciascun campione.

Tabella 3.3 Siti di campionamento e loro caratteristiche

Nome campione	Profondità (m)	Coordinate	Data e ora	Volume filtrato (mL)	Transetto
G2	50	72°23,56'S 172°58,20'E	26/01/12 20:44	1800	A
CA5	85	72°10,86'S 172°4,59'E	27/01/12 2:35	1800	
CA6	50	72°18,87'S 172°27,86'E	27/01/12 0:20	1800	
CI3	50	73°22,94'S 170°8,07'E	28/01/12 8:35	1950	B
CI4	50	73°26,18'S 170°41,71'E	28/01/12 10:35	1810	
CI5	38	73°30,04'S 171°19,94'E	28/01/12 12:40	1950	
CI6	48	73°36,24'S 172°12,24'E	28/01/12 15:00	1900	
CW1	29	74°42,85'S 165°43,93'E	1/02/12 1:28	2050	C
CW2	28	74°46,91'S 166°19,42'E	1/02/12 3:05	2075	
CW3	22	74°51,54'S 166°58,52'E	1/02/12 6:15	2000	
CW4	15	74°55,99'S 167°35,54'E	1/02/12 8:25	2075	
D7	2	75°22,66'S 166°19,79'E	1/02/12 23:25	1900	D
	10			1800	
	60			1800	

D5	10	75°26,97'S 167°42,76'E	1/02/12 17:38	2250	D
D6	10	75°25,58'S 166°59,71'E	1/02/12 20:45	1800	
D3	5	75°8,09'S 164°33,36'E	2/02/12 12:33	1925	
	18			1975	
	112			1900	
F7	108	78°20,80'S 173°7,84'W	4/02/12 17:17	2000	-
E1	1,5	76°40,02'S 167°20,16'E	6/02/12 13:30	1900	E
	12			1950	
	70			1950	
E2	29	76°42,69'S 166°2,85'E	6/02/12 16:00	1900	
E3	1	76°48,06'S 163°39,69'E	6/02/12 21:47	1900	
	29			2000	
	70			2000	
E6	20	76°39,94'S 167°18,46'E	8/02/12 10:31	2000	

3.7 METODO DI ANALISI MEDIANTE HPLC-ORBITRAP MS

La determinazione dei metossifenoli è stata condotta mediante HPLC-ORBITRAP MS, la sorgente di ionizzazione ESI è stata impiegata in modalità negativa: ciò porta alla formazione di ioni $[M-H]^-$ le cui masse esatte vengono riportate in tabella 3.4:

Tabella 3.4 Nome, formula chimica e massa esatta monoisotopica dello ione $[M-H]^-$ dei metossifenoli in esame

COMPOSTO	FORMULA CHIMICA	$[M-H]^-$
VA	$C_8H_8O_4$	167,0350
VAH	$C_8H_8O_3$	151,0401
SYA	$C_9H_{10}O_5$	197,0455
SYAH	$C_9H_{10}O_4$	181,0506
HA	$C_9H_{10}O_4$	181,0506
PA	$C_9H_8O_3$	163,0401
VAC	$C_9H_{10}O_3$	165,0557
IVA	$C_8H_8O_4$	167,0350

SYAC	C ₁₀ H ₁₂ O ₄	195,0663
VA*	C ₈ H ₈ O ₄	168,0384
VAH*	C ₈ H ₈ O ₃	157,0604

Il metodo di analisi è stato diviso in due segmenti: nel primo viene utilizzato come analizzatore l'Orbitrap con una risoluzione di 60000, *range* di massa di 100-600 *m/z* e *lock mass* 283,2642 (ione [M-H]⁻ dell'acido stearico), nel secondo si impiega la trappola ionica che esegue il MS/MS in bassa risoluzione con energia di collisione 23 V di tutte le masse degli analiti che sono state inserite in una *parent mass list*:

Tabella 3.5 Lista delle masse di cui la trappola ionica esegue il MS/MS

COMPOSTO	PARENT MASS
VAH	151,0
PA	163,0
VAC	165,0
VA/IVA	167,0
SYAH/HA	181,0
SYAC	195,0
SYA	197,0

L'energia di collisione è stata ricavata per infusione diretta nella sorgente dello spettrometro di massa mediante pompa a siringa utilizzando una soluzione contenente tutti i metossifenoli nativi in acqua ad una concentrazione di circa 1 ng/μL (le concentrazioni sono riportate in tabella 3.2) e al flusso di 10 μL/min. A parte poi sono state iniettate quattro soluzioni contenenti ciascuna un singolo nativo (acido vanillico, acido isovanillico, siringaldeide e acido omovanillico). Poiché le coppie VA e IVA e SYAH e HA hanno la stessa massa (rispettivamente *m/z* 167,0350 e *m/z* 181,0506) e questi composti sono presenti tutti contemporaneamente nella medesima soluzione, non permettono di attribuire in base allo ione generato l'energia di collisione di ciascuno. Di tutti i valori trovati è stata ricavata un'energia di collisione comune a tutti i composti ed è stata applicata alla masse inserite nel secondo segmento in modalità *data dependent*.

Il tuning è stato effettuato per infusione diretta mediante pompa a siringa direttamente nello spettrometro di massa impiegando soluzioni contenenti ogni analita alla concentrazione di circa 1 ng/μL. Per ogni nativo sono stati ottimizzati i parametri relativi alla sorgente e all'ottica ionica in modo tale da

ottimizzare il segnale; successivamente è stato individuato un tunaggio medio da applicare a tutti i metossifenoli in esame. I valori dei parametri ottimizzati sono riportati tabella 3.6:

Tabella 3.6 Parametri di tunaggio ottimizzati relativi alla sorgente ESI e all'ottica ionica

Temperatura capillare (°C)	275
Temperatura sorgente ESI (°C)	200
Sheath gas	39,00
Auxiliary gas	5,00
Sweep gas	0,00
Polarità	negativa
Source voltage (kV)	3,50
Source current (µA)	100,00
Capillary voltage (V)	-30,00
Tube lens (V)	-58,00
Multipole RF	400,00
Multipole 00 offset (V)	4,50
Lens 0 voltage (V)	4,50
Multipole 0 offset (V)	5,25
Lens 1 voltage (V)	9,00
Gate lens offset (V)	66,00
Multipole 1 offset (V)	6,50
Front lens (V)	5,25

Come standard interno è stato possibile utilizzare solo la vanillina marcata in quanto, come già mostrato in precedenti lavori di tesi,⁷⁴ quando si acquisisce in *full scan* in HRMS usando marcanti isotopicamente ad un solo ¹³C come nel caso dell'acido vanillico, ad alte concentrazioni di nativo si ha l'interferenza dell'isotopomero naturalmente presente nel nativo pari ad un 10% dell'abbondanza isotopica del picco base. Ad esempio, nelle validazioni le concentrazioni di marcato e di nativo aggiunte sono 25 pg/µL, ma il nativo fornisce un contributo di circa 2,5 pg/µL al marcato pari al suo 10% che interferisce con l'abbondanza dello ione generato dal composto marcato. Nelle rette di calibrazione, dove la concentrazione di marcato è costante e pari sempre a 25 pg/µL, tale interferenza è ancora maggiore: nel punto a 250 pg/µL, ad esempio, il contributo dato dal nativo è pari a 25 pg/µL che di fatto fa raddoppiare il picco del marcato.

L'ottimizzazione della separazione cromatografica è stata effettuata scegliendo innanzitutto la colonna cromatografica che permettesse una buona separazione degli analiti e picchi il più stretti possibile.

Inizialmente si è utilizzata una Poroshell 120 SB-C18 2,1x150 mm, 2,7 µm, già usata in un precedente lavoro di tesi,⁷⁴ tuttavia durante la fase di validazione del metodo si sono riscontrati dei problemi di elevata contropressione che superava i 270 bar impedendo la conclusione delle analisi. Questo ripetuto inconveniente ha portato alla valutazione di altre colonne che garantissero comunque buone separazioni, ma portassero a contropressioni minori. Si è testata una ZORBAX SB-Aq Narrow-Bore RR 2,1x150 mm, 3,5 µm, ma tale colonna non separa l'acido vanillico e l'acido isovanillico; si è valutata quindi una XTERRA MS C18 3,5 µm, 2,1x150 mm, 125 Å che invece consente una buona separazione dei due isomeri e picchi stretti. È stata scelta dunque quest'ultima colonna preceduta da un filtro in linea in acciaio (4,6 µm, In line filter, S.S 0,5 µm, porosity x 1.5, Phenomenex).

La corsa cromatografica della durata di 25 minuti è stata condotta ad un flusso di 150 µL/min e un volume di iniezione di 19 µL. Le fasi mobili impiegate sono: A H₂O + acido formico 0,01% e B metanolo/acetonitrile in rapporto 80:20. Una fase mobile leggermente acida ha permesso la neutralizzazione degli analiti acidi e la loro ritenzione senza riduzione della sensibilità del metodo; la presenza dell'acetonitrile ha consentito la separazione dell'acido vanillico e dell'acido isovanillico. Sono state eseguite anche prove con altre miscele di metanolo/acetonitrile in rapporto 70:30 e 60:40 al fine di migliorare la separazione cromatografica dei due isomeri, ma la migliore è risultata essere l'80:20.

Si riporta in tabella 3.7 la descrizione della corsa cromatografica utilizzata:

Tabella 3.7 Corsa cromatografica

Minuti	% B
0	15
2	30
10	50
12	100
18	100
18,1	15
25	15

Con tale metodo è stato possibile separare tutti gli analiti in esame come mostra la figura 3.3:

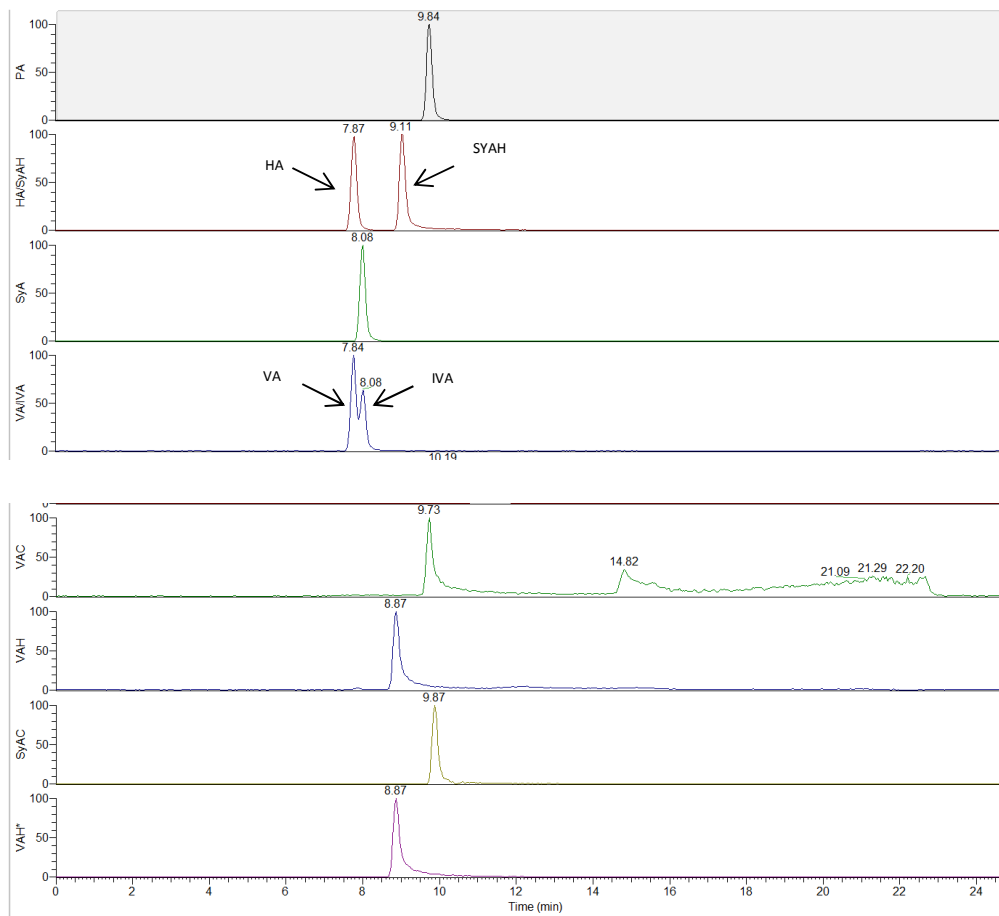


Figura 3.3 Cromatogramma a 50 pg/ μ L in cui si osserva la separazione cromatografica di tutti i metossifenoli in esame

3.8 METODO DI ANALISI MEDIANTE HPLC/MS-MS

La determinazione dei metossifenoli è stata eseguita anche mediante analisi HPLC/ESI(-)/MS-MS a partire da un metodo utilizzato in precedenti lavori di tesi e pubblicato da Zangrando et al.⁷⁵ al quale sono state apportate delle modifiche in seguito a problemi riscontrati nella sua applicazione alle acque naturali.

La sorgente di ionizzazione ESI è stata impiegata in modalità negativa, ciò porta alla formazione di ioni [M-H]⁻; l'acquisizione dei dati è avvenuta in modalità MRM (*Multiple Reaction Monitoring*, monitoraggio di reazioni multiple) con *dwell time* di 50 ms. I quadrupoli Q1 e Q3 sono fissati con risoluzione unitaria a $0,7 \pm 0,1$ unità di ampiezza del picco a metà altezza.

Per individuare e ottimizzare le condizioni operative è stata iniettata nella sorgente ESI per infusione diretta mediante pompa siringa al flusso di 10 $\mu\text{L}/\text{min}$ una soluzione standard alla concentrazione di circa 1 ng/ μL contenente tutti i metossifenoli nativi e marcati. Per ogni analita sono stati individuati gli ioni precursori in Q1 e gli ioni frammento formati nella cella di collisione Q2 e rilevati in Q3. I frammenti più intensi e significativi sono stati scelti per la quantificazione. Sono stati inoltre ottimizzati i parametri della sorgente e dell'analizzatore.

Il metodo di acquisizione così creato da Zangrando et al.⁷⁵ è stato integrato aggiungendo due nuovi analiti, l'acetovanillone e l'acetosiringone, per i quali sono state individuate le transizioni più intense. In tabella 3.8 vengono riportate le condizioni ottimizzate per la sorgente e in tabella 3.9 il rapporto m/z dello ione precursore e dei principali ioni frammento e i parametri spettrometrici ottimizzati:

Tabella 3.8 Parametri di ottimizzazione della sorgente ESI

Metodo di acquisizione MRM	
Polarità	negativa
Ion Source	turbo spray
Temperatura (°C)	650
GSI 1 (psi)	45
GSI 2 (psi)	60
CUR (psi)	25
CAD (psi)	6
IS (V)	-4450

Tabella 3.9 Transizioni monitorate e valori dei parametri ottimizzati relativi alla sorgente ESI
(le transizioni utilizzate per la quantificazione sono in grassetto)

Ione precursore	Q1 (m/z)	Q3 (m/z)	DP (V)	EP (V)	CE (V)	CXP (V)
[VA-H] ⁻ [IVA-H] ⁻	166,9	151,9	-51	-10	-19	-10
		107,8	-51	-10	-28	-9
[VAH-H] ⁻	150,9	135,8	-50	-10	-18	-11
		92,0	-50	-10	-27,5	-6
[SYA-H] ⁻	196,8	181,8	-47	-10	-16	-15
		121,0	-47	-10	-22,7	-8,5
[SYAH-H] ⁻	180,9	165,8	-42	-10	-18	-12
		150,9	-42	-10	-25	-12
[HA-H] ⁻	180,8	151,2	-48	-4	-10,2	-7
		136,9	-48	-4	-10,3	-11
		122,0	-48	-4	-23	-5
[PA-H] ⁻	162,9	119,2	-52	-4	-17	-8
		92,8	-52	-4	-42	-7
[VAC-H] ⁻	164,8	149,8	-46	-10	-19	-10,5
		121,7	-46	-10	-30	-9,5
[SYAC-H] ⁻	194,8	179,9	-53	-8	-18	-13,5
		164,8	-53	-8	-27	-12
[VA*-H] ⁻	167,8	152,7	-51	-10	-19	-12
		107,8	-51	-10	-28	-9
[VAH*-H] ⁻	156,9	141,8	-54	-10	-19	-8
		96,9	-54	-10	-28	-8,8

Rispetto a Zangrando et al.⁷⁵ è stata cambiata la transizione utilizzata per quantificare l'acido p-cumarico: nonostante la più intensa fosse a m/z 162,9>119,2, si è deciso di usare quella a m/z 162,9>92,8 perchè meno rumorosa rispetto all'altra. Inoltre osservando le transizioni dei due nuovi chetoni si è visto che entrambi presentano il frammento a m/z 164,8 e che vengono eluiti allo stesso tempo di ritenzione. Per poter escludere una possibile interferenza dello ione 164,8 derivante da una

frammentazione in sorgente dell'acetosiringone che potrebbe portare a sovrastimare l'acetovanillone, sono state preparate ed iniettate delle soluzioni a 50 e 200 pg/ μ L contenenti i singoli analiti. Dal confronto delle soluzioni alla stessa concentrazione si è visto che quando si ha solo l'acetosiringone, il segnale dell'acetovanillone che deriva esclusivamente dalla frammentazione in sorgente del primo è circa 1/1000 di quello generato dall'acetosiringone. Per questo, essendo il contributo dell'acetosiringone trascurabile nella quantificazione dell'acetovanillone, si è potuta escludere l'interferenza dovuta ad una frammentazione in sorgente; inoltre per la quantificazione dell'acetosiringone non è stata utilizzata la transizione con lo ione 164,8, ma la quella a m/z 194,8>179,9. Infine nei campioni antartici analizzati tale interferenza è da escludere poiché l'acetosiringone non è presente.

Per quanto riguarda il metodo cromatografico si è seguito quello messo a punto da Zangrando et al.⁷⁵ che prevede l'utilizzo di una colonna Zorbax Extend-C₁₈, 4,6 x 150 mm, 3,5 μ m preceduta da un filtro in linea in acciaio (4,6 μ m), e costituita da una fase stazionaria di silice neutra sulla quale sono legate delle catene C₁₈ come mostrato in figura 3.4:

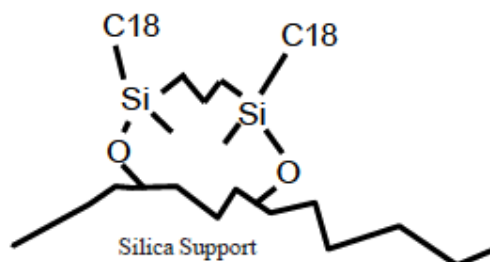


Figura 3.4 Fase stazionaria della colonna Zorbax Extend-C₁₈

Le fasi mobili sono le stesse utilizzate nel metodo HPLC-ORBITRAP MS, quindi A acqua + acido formico allo 0,01% e B metanolo/acetonitrile 80:20 ad un flusso di 500 μ L/min. La corsa cromatografica della durata di 34 minuti è riportata in tabella 3.10:

Tabella 3.10 Corsa cromatografica

Minuti	% B
0	15
2	15
3	30
8	30
16	70
17	100

27	100
29	15
34	15

Visti i bassissimi livelli di metossifenoli presenti nei campioni antartici, il volume di iniezione è stato portato da 100 a 300 μL aumentando la sensibilità e senza fenomeni di *fronting* o *tailing*.

Si riporta in figura 3.5 il cromatogramma con tutti gli analiti:

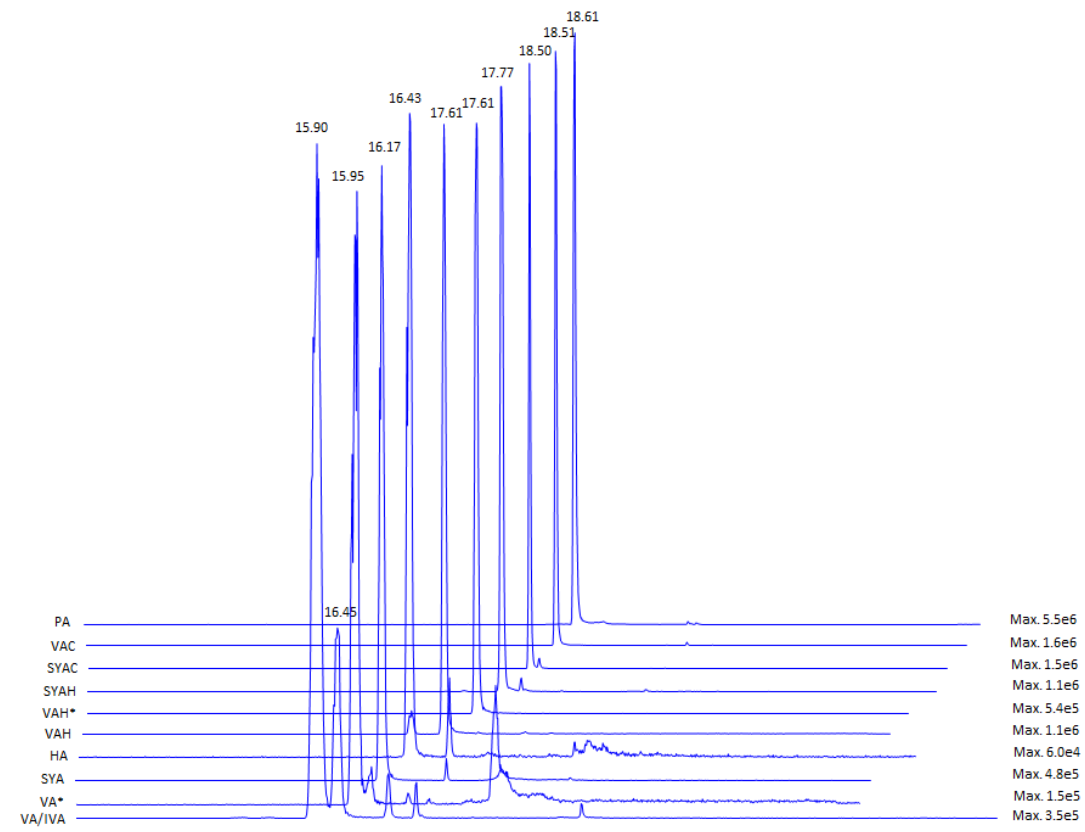


Figura 3.5 Immagine qualitativa dei picchi ottenuti a 25 $\text{pg}/\mu\text{L}$

Come marcanti sono stati utilizzati sia la vanillina che l'acido vanillico entrambi marcanti isotopicamente: la scelta è stata fatta in corso di validazione valutando quale marcato comportasse rese maggiori ed errori percentuali minori.

3.9 PREPARAZIONE DEL CAMPIONE PER LA DETERMINAZIONE DI METOSSIFENOLI NELLE ACQUE MARINE

I metossifenoli nelle acque marine sono determinati sia nella frazione disciolta che in quella particellata, sono quindi necessarie due diverse procedure preparative per le due diverse matrici.

➤ Metossifenoli liberi presenti nella frazione disciolta

La procedura validata prevede di porre in un matraccio da 500 mL il campione acquoso filtrato durante la campagna di campionamento con filtro in microfibra di vetro GF/F (porosità 0,7 μm) e riportato a temperatura ambiente, e di aggiungere 250 μL di marcanti a 1 ng/ μL (250 ng assoluti) e 10 mL di acido formico (2%). Successivamente il campione è estratto utilizzando cartucce SPE OASIS HLB; l'estrazione è articolata in 5 fasi: lavaggio con 5 mL di metanolo, condizionamento con 5 mL di acqua ultrapura acidificata al 2% con acido formico, caricamento dei 500 mL di campione, secondo lavaggio con acqua ultrapura portata a secco ed eluizione con 5 mL di metanolo. L'eluizione viene condotta a pressione atmosferica e lentamente, in modo tale da favorire il distacco degli analiti ritenuti dalla fase stazionaria, mentre le prime quattro fasi sono condotte ad una pressione di circa -0,4/-0,5 bar. L'eluato è raccolto in vial da 7 mL da cui viene prelevata un'aliquota che per motivi cromatografici viene diluita in acqua, 1:1 per l'analisi via HPLC-ORBITRAP MS e 1:4 via HPLC/MS-MS.

Si riporta in figura 3.6 lo schema di tale procedura pre-analitica:

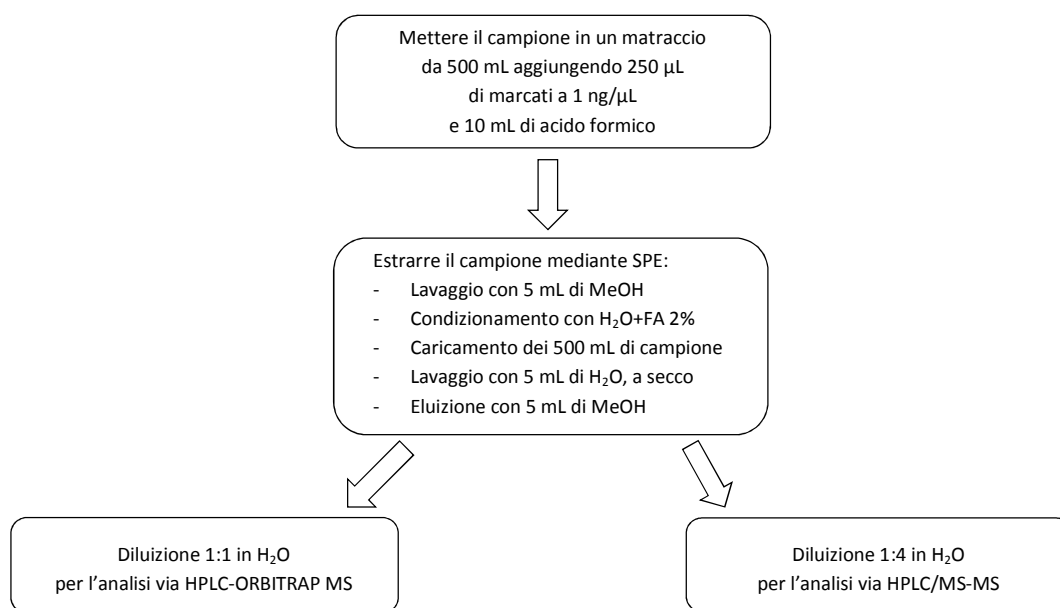


Figura 3.6 Trattamento del campione per la frazione disciolta

Per l'analisi dei campioni mediante HPLC-ORBITRAP MS è stato utilizzato come standard interno la vanillina marcata. Nell'analisi via HPLC/MS-MS, sulla base dei risultati della validazione (paragrafo 4.3), è stato scelto per ogni analita lo standard interno migliore tra i due marchi vanillina e acido vanillico.

Tabella 3.11 Nativi e relativo standard interno scelto per la frazione disciolta

Nativo	Marcato
VA	VAH*
VAH	VAH*
SYA	VAH*
SYAH	VAH*
HA	VAH*
PA	VAH*
VAC	VAH*
IVA	VA*
SYAC	VAH*

➤ **Metossifenoli liberi presenti nella frazione particellata**

Per la frazione particellata invece la procedura prevede la filtrazione del campione acquoso appena raccolto mediante filtri in microfibra di vetro GF/F, precedentemente purificati in muffola a 400°C per 4 ore.

I filtri ancora umidi vengono conservati in un doppio strato di alluminio in cella ad una temperatura di -20°C fino al momento dell'estrazione: una volta riportato a temperatura ambiente, si piega il filtro in quattro e lo si spezzetta in Eppendorf da 1,5 mL precedentemente lavate con metanolo e sonicate con acqua ultrapura per 15 minuti. Al filtro si aggiungono 38 ng assoluti di VAH* e VA*, e 1,5 mL di una miscela 1:1 di acqua ultrapura e metanolo come solventi estraenti. I campioni sono estratti per sonicazione per 30 minuti. Infine si filtra l'estratto su siringa da 6 mL con filtro in PTFE da 0,2 µm direttamente in vial da autocampionatore. Per l'analisi via HPLC/MS-MS è necessaria una diluizione 1:1 in acqua dell'estratto.

Si riporta in figura 3.7 lo schema di tale trattamento del campione:

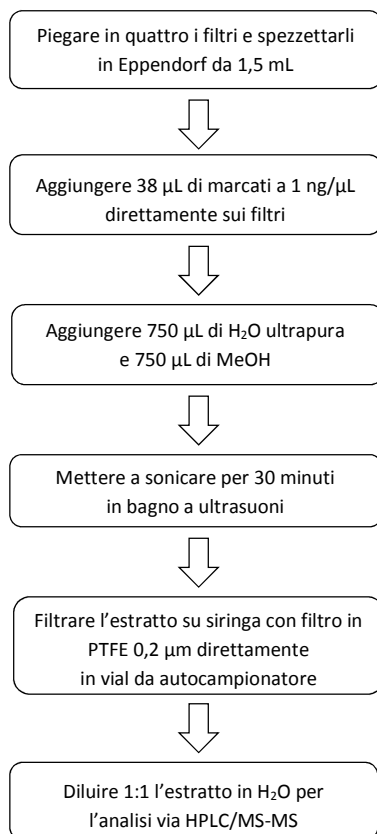


Figura 3.7 Trattamento del campione per la frazione particellata

Per la frazione particellata si riportano in tabella 3.12 i marcanti scelti per la quantificazione di ogni metossifenolo in esame via HPLC/MS-MS:

Tabella 3.12 Nativi e relativo standard interno per la frazione particellata

Nativo	Marcato
VA	VA*
VAH	VAH*
SYA	VA*
SYAH	VAH*
HA	VA
PA	VA*
VAC	VA*
IVA	VA*
SYAC	VA*

mentre nell'analisi via HPLC-ORBITRAP MS è stata utilizzata la vanillina marcata.

CAPITOLO 4

RISULTATI E DISCUSSIONE

4.1 SVILUPPO DELLA PROCEDURA DI PREPARAZIONE DEL CAMPIONE

Nel presente lavoro di tesi lo sviluppo della procedura preparativa per la determinazione dei metossifenoli nelle acque del Mare di Ross è iniziato dalla verifica della presenza di tali composti nelle acque marine antartiche, dalla possibilità di utilizzare l'acqua della laguna di Venezia come matrice per la validazione della metodologia analitica, vista la limitata disponibilità di acqua antartica, e dalla possibilità di analizzare direttamente l'acqua marina evitando la preparazione del campione. Per tali motivi sono stati preparati due campioni di prova: il primo di acqua antartica e il secondo di acqua di laguna. Al fine di eliminare il particolato, sono stati entrambi filtrati con filtri in PTFE aventi porosità 0,45 μm e successivamente con filtri a porosità minore, 0,2 μm . Ad una aliquota di 1 mL sono stati poi aggiunti 10 ng assoluti di VAH* e VA*, e analizzati via HPLC-ORBITRAP MS.

Nel campione di acqua di laguna si ha una soppressione del segnale dovuta ad effetto matrice; per superare tale problema è stata fatta una diluizione 1:10 in acqua ultrapura (figura 4.1), che ha permesso di verificare la presenza di alcuni metossifenoli, principalmente acido vanillico e vanillina. Anche nel campione antartico analizzato tal quale è stata rilevata la presenza di entrambi gli analiti (figura 4.2), tuttavia in entrambi i casi il rapporto segnale/rumore è risultato essere troppo basso.

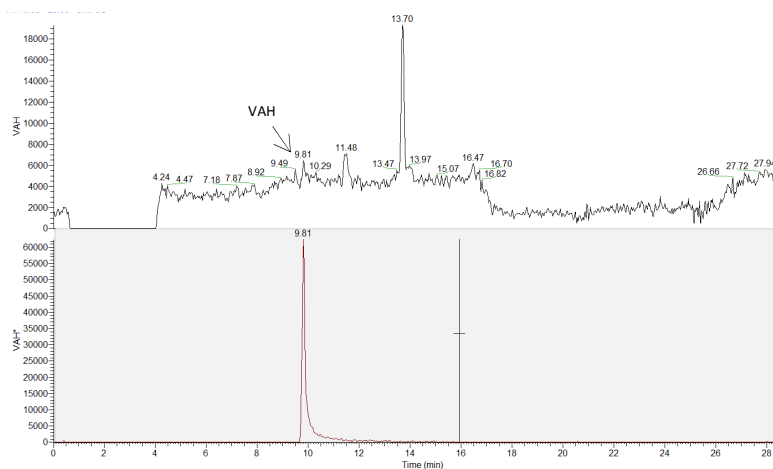


Figura 4.1 Cromatogrammi della vanillina e della vanillina marcata in un campione di acqua di laguna diluito 1:10 in H₂O: è possibile notare l'alto rumore di fondo e la presenza della vanillina

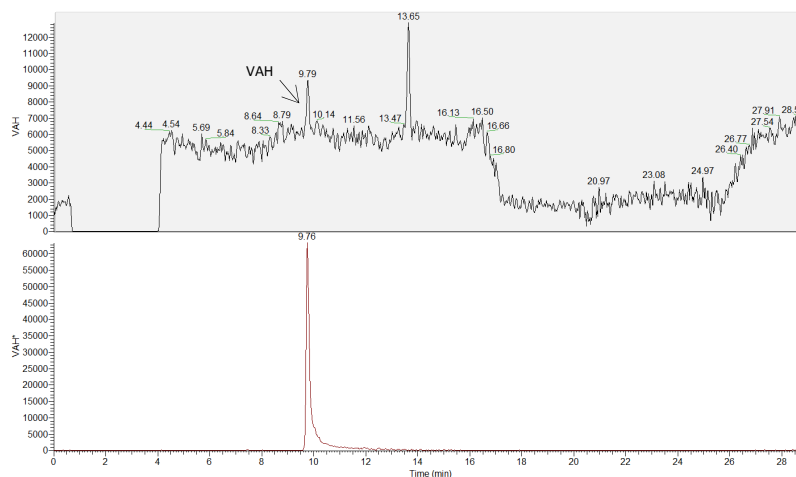


Figura 4.2 Cromatogrammi della vanillina e della vanillina marcata in un campione di acqua antartica: si può osservare come il rumore di fondo sia addirittura superiore a quello del campione di laguna e come anche in questo sia presente la vanillina

È stato necessario dunque preconcentrare i campioni non solo per incrementare l'intensità del segnale, ma anche per purificare la matrice e diminuire il rumore di fondo, mediante un'estrazione in fase solida chiamata *solid phase extraction* (SPE). Si tratta di una metodologia preanalitica che consente non solo di estrarre gli analiti dalla matrice in cui si trovano per portarli in una più idonea all'analisi, ma anche di concentrare i composti ricercati e di purificare la matrice, eliminando ad esempio i sali che potrebbero generare fenomeni di soppressione ionica. Si utilizza una fase stazionaria solida impaccata in colonne che presenta affinità per l'analita, che viene così trattenuto e poi eluito con un opportuno solvente. Durante la fase di caricamento e successivo lavaggio della fase stazionaria possono essere eliminati tutti quei composti presenti nella matrice ma che, diversamente dagli analiti, non presentano affinità per la fase stazionaria.

Come solvente di eluizione è stato scelto il metanolo e come cartucce le SPE Oasis HLB (*hydrophilic-lipophilic balance*) da 6 cc, 200 mg di fase stazionaria. Sono state scelte queste cartucce in quanto sono già state utilizzate in altri lavori di tesi^{76,77} e hanno permesso di estrarre e concentrare diversi analiti come l'acido domoico nelle acque marine, microcistine e nodularina nelle acque dolci, permettendo lo sviluppo di una metodologia preanalitica comune a più classi di composti.

Inizialmente è stato valutato di quanto fosse necessario concentrare i campioni per poter quantificare accuratamente gli analiti presenti, quindi è stato scelto il volume di campione iniziale. La prima prova è stata una concentrazione 1:10: sono stati preparati un campione per la quantificazione degli analiti e un campione per la valutazione della resa utilizzando acqua di laguna. Al primo, in un matraccio da 50 mL contenente acqua filtrata, sono stati aggiunti 100 ng assoluti di VAH* e VA*, e 1 mL di acido formico (2%), mentre al campione per la stima della resa sono stati aggiunti 100 ng assoluti di

standard di metossifenoli nativi, 1 mL di acido formico (2%) e alla fine della procedura SPE 100 ng assoluti di VAH* e VA*.

La procedura di estrazione SPE è articolata in 5 fasi: lavaggio con 5 mL di metanolo, condizionamento con 5 mL di acqua ultrapura acidificata al 2% con acido formico, caricamento dei 50 mL di campione, lavaggio con 5 mL di acqua ultrapura, a secco ed eluizione con 5 mL di metanolo. L'eluato è stato raccolto in vial da 7 mL da cui è stata prelevata un'aliquota che è stata poi trasferita in vial da 2 mL da autocampionatore.

Sia del campione che della resa sono state analizzate, al fine di stabilire il solvente ottimale per ottenere le migliori condizioni cromatografiche, un'aliquota tal quale in 100% metanolo, una diluita 70:30 in acqua, un'altra diluita 1:1 sempre in acqua e un'altra ancora diluita 1:10. Nel primo caso si è osservato un *fronting* e un allargamento dei picchi dovuto al fatto che il campione una volta iniettato inizia ad essere eluito prima che arrivi il solvente organico in colonna (figura 4.3); nel secondo caso si hanno picchi scodati, nonostante la quantità di metanolo sia stata ridotta (figura 4.4), è stato perciò necessario diluire ulteriormente l'eluato. Sia con la diluizione 1:1 (figura 4.5) che 1:10 (figura 4.6) si è ottenuta una buona qualità cromatografica, ma una diluizione 1:10 di fatto annulla la preconcentrazione, pur eliminando la matrice e riducendo il rumore di fondo. Tali prove hanno portato a decidere che una diluizione 1:1 sia sufficiente per avere dei picchi cromatografici stretti ed esenti da fenomeni di *fronting* e *tailing*.

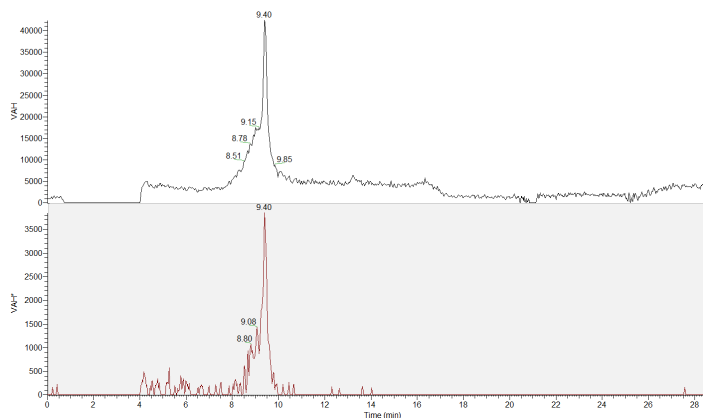


Figura 4.3 Cromatogramma della resa dopo concentrazione 1:10 mediante SPE in 100% MeOH

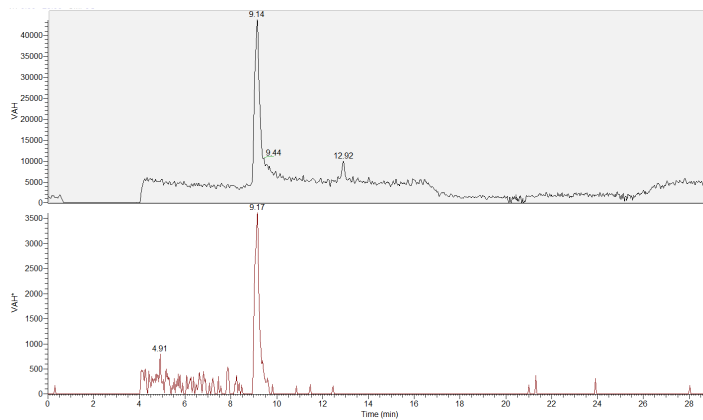


Figura 4.4 Cromatogramma della resina diluita 70:30 in H₂O

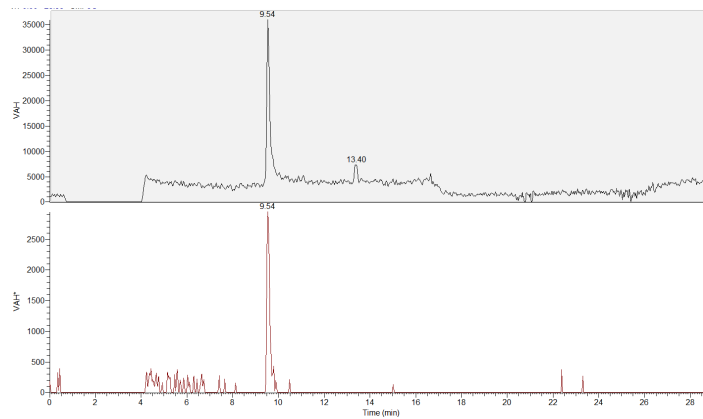


Figura 4.5 Cromatogramma della resina diluita 1:1 in H₂O

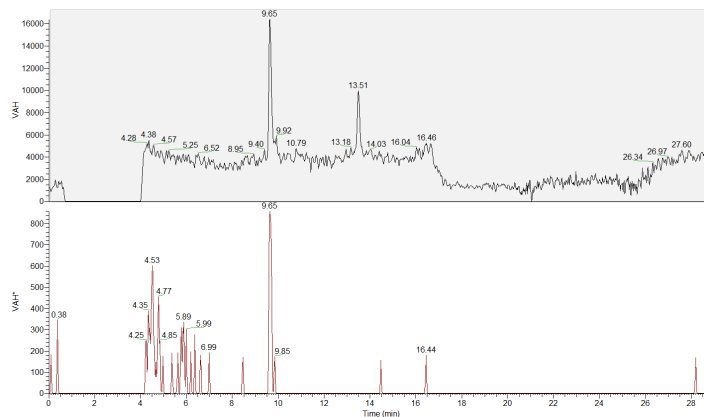


Figura 4.6 Cromatogramma della resina diluita 1:10 in H₂O

Il campione di acqua di laguna è stato considerato una matrice appropriata per effettuare la validazione del metodo in quanto non ci sono interferenze del segnale e le concentrazioni dei metossifenoli presenti sono sufficientemente basse.

Poiché la diluizione in acqua per motivi cromatografici dimezza di fatto la preconcentrazione effettuata via SPE (1:10) e considerate inoltre le piccole concentrazioni che ci si aspetta di trovare nei campioni

antartici si è deciso di preconcentrare 1:100 a partire da 500 mL di campione. Per verificare tale necessità sono stati utilizzati alcuni dei campioni (CI5_38m, E3_29m, D3_18m, CI3_50m, F7_108m, E1_12m) che erano già stati preconcentrati 1:100 da Barbaro⁷⁷ per la determinazione dell'acido domoico. Ad una aliquota nota di questi campioni sono stati aggiunti 10 ng assoluti di vanillina e acido vanillico marcati isotopicamente, e acqua ultrapura in modo tale da avere una diluizione 1:1 in acqua. In figura 4.7, si nota come il segnale analitico sia maggiore rispetto ad una preconcentrazione 1:10 e il rumore di fondo sia stato abbattuto: una preconcentrazione 1:100 risulta essere dunque necessaria al fine di poter analizzare i campioni antartici.

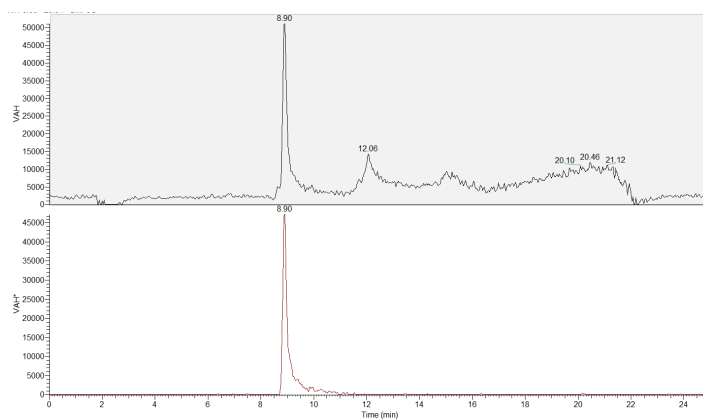


Figura 4.7 Cromatogramma del campione concentrato 1:100

Un volume di campione di partenza di 500 mL sul quale applicare la procedura preanalitica per la determinazione dei metossifenoli nella frazione disciolta è paragonabile e in alcuni casi inferiore rispetto a lavori simili presenti in letteratura. Keil et al.^{42,47} partono da un volume compreso tra 0,6 L e 2,4 L sul quale operano una estrazione in fase solida, mentre Louchouart et al.⁴⁸ operano con un volume variabile tra 1-50 L di campione acquoso.

Dall'analisi di questi 6 campioni, unita alla validazione fatta successivamente, è stato possibile osservare come la procedura preparativa applicata per l'analisi dell'acido domoico nella frazione disciolta sia adatta anche alla determinazione dei metossifenoli. Questo è sicuramente un vantaggio in quanto applicare la stessa metodologia analitica ad un campione per la determinazione di più analiti permette un risparmio economico e in termini di tempo, e consente di utilizzare quantità minori di campioni, preziosi e disponibili spesso in misura ridotta, come quelli antartici. Per questa stessa ragione sono stati analizzati anche dei campioni della frazione particellata già estratti da Barbaro⁷⁷ per verificare la presenza di metossifenoli e l'applicabilità della procedura pre-analitica.

4.2 VALIDAZIONE DEL METODO PER LA DETERMINAZIONE DEI METOSSIFENOLI

La validazione del metodo è stata condotta mediante la stima della resa, dell'esattezza, della precisione, del bianco procedurale, del limite di rilevabilità e di quantificazione procedurali (MDL, *method detection limit* e MQL, *method quantification limit*) e strumentali (LOD e LOQ) e della linearità della risposta strumentale. La quantificazione è stata effettuata mediante il metodo dello standard interno che è stato aggiunto all'inizio della procedura pre-analitica permettendo di eliminare errori compiuti dall'operatore ed eventuali fluttuazioni del segnale strumentale. Come standard interno sono stati utilizzati l'acido vanillico e la vanillina marcati isotopicamente per l'analisi via HPLC/MS-MS; per l'HPLC-ORBITRAP MS è stata utilizzata invece la vanillina marcata. I risultati sono stati poi corretti attraverso il fattore di risposta strumentale ottenuto da una soluzione contenente sia gli analiti che i marcati in concentrazione nota presenti in una miscela di metanolo e acqua in rapporto 1:1 per l'analisi via HPLC-ORBITRAP MS, 1:4 via HPLC/MS-MS.

- VALIDAZIONE DEL METODO, HPLC-ORBITRAP MS

La linearità della risposta strumentale è la capacità di un metodo strumentale di fornire risposte direttamente proporzionali alla concentrazione di analita; si valuta attraverso il coefficiente di correlazione della curva R^2 ottenuta da soluzioni a concentrazione nota e crescente di analita. Tale coefficiente deve essere almeno pari a 0,99. Nel presente lavoro di tesi la linearità è stata stimata mediante la costruzione di rette di calibrazione ottenute iniettando soluzioni in acqua e metanolo 1:1 contenenti i nativi alle concentrazioni di 0,1 pg/ μ L, 0,5 pg/ μ L, 1 pg/ μ L, 5 pg/ μ L, 10 pg/ μ L, 25 pg/ μ L, 50 pg/ μ L, 100 pg/ μ L, 200 pg/ μ L, 300 pg/ μ L e 500 pg/ μ L e i marcati alla concentrazione costante di 25 pg/ μ L. Tali rette di taratura sono state costruite riportando il rapporto dell'area del picco cromatografico dell'analita e del marcato contro il rapporto delle rispettive concentrazioni. Si tratta di rette di calibrazione sintetiche in quanto preparate nei solventi puri metanolo e acqua. Le concentrazioni sono riportate in tabella 3.2.

Si riporta a titolo di esempio in figura 4.8 la retta di calibrazione ottenuta per la vanillina e di seguito in tabella 4.1 i valori di pendenza, intercetta, R^2 e intervallo di linearità per tutti gli analiti in esame.

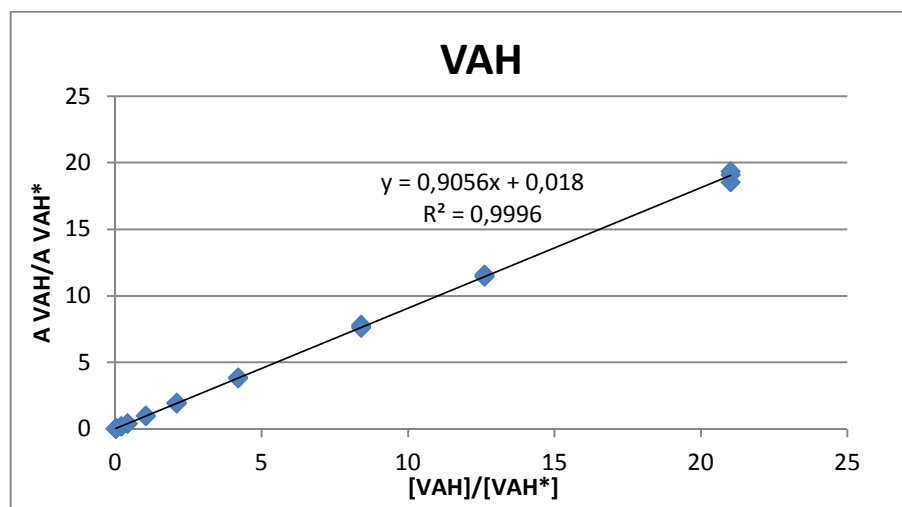


Figura 4.8 Retta di calibrazione sintetica della vanillina via HPLC-ORBITRAP MS

Tabella 4.1 Coefficiente angolare, intercetta, coefficiente di correlazione e intervallo di linearità (max e min)

Nativi	m	q	R ²	min (pg/μL)	max (pg/μL)
VA	0,3269	0,0024	0,9998	0,5	533
VAH	0,9056	0,018	0,9996	0,5	537
SYA	0,6276	-0,0576	0,9995	0,5	529
SYAH	0,5923	0,0385	0,9993	0,6	612
HA	0,596	0,0173	0,9995	0,5	320
PA	3,1006	0,5074	0,9991	0,1	509
VAC	0,2543	-0,0107	0,9999	1	599
IVA	0,2349	-0,0064	0,9996	0,5	537
SYAC	0,2898	-0,0185	0,9996	0,6	610

Per verificare la ripetibilità della misura strumentale (concordanza tra misure effettuate dallo stesso operatore nelle medesime condizioni sperimentali e nello stesso laboratorio) sono state effettuate tre repliche per ogni concentrazione e i coefficienti di variazione percentuale (CV%) sono risultati sempre inferiori al 10%.

Sono stati calcolati i limiti di rilevabilità (LOD) e di quantificazione (LOQ) strumentali per ogni analita. Il LOD (S/N=3) si definisce come la più bassa concentrazione di analita alla quale si ottiene una risposta strumentale significativamente superiore al segnale del bianco, ovvero la minima rilevabile dallo strumento nelle condizioni sperimentali di lavoro. Il LOQ (S/N=10) invece è la minima concentrazione di analita necessaria per poterlo quantificare con precisione e accuratezza adeguate. I valori di LOD e LOQ in pg assoluti vengono riportati in tabella 4.2:

Tabella 4.2 LOD e LOQ in pg assoluti per ciascuno dei metossifenoli in esame

Nativi	LOD (pg ass)	LOQ (pg ass)
VA	6	19
VAH	7	23
SYA	4	15
SYAH	5	17
HA	4	12
PA	0,9	3
VAC	14	47
IVA	10	34
SYAC	9	29

I limiti di rilevabilità strumentali ottenuti (LOD=0,9-14 pg assoluti, cioè 0,3-4,5 nM) sono paragonabili o leggermente inferiori a quelli più bassi presenti in letteratura: Keil et al.⁴⁷ riportano un LOD medio di 1 pg assoluto, mentre Lobbes et al.⁴³ di 10 nM.

➤ Frazione disciolta

La validazione del metodo per la determinazione dei metossifenoli nella frazione disciolta, non essendo disponibile un materiale certificato, è stata condotta mediante l'aggiunta di *spike* di nativi e marcati ad una concentrazione nota seguendo la procedura descritta nel paragrafo 3.9 e utilizzando l'acqua di laguna filtrata come matrice.

Per valutare la resa, ovvero la quantità di analita che viene determinata rispetto a quella realmente presente nel campione prima di tutta la procedura pre-analitica, sono stati aggiunti 250 ng assoluti di standard di metossifenoli nativi prima della procedura, e 250 ng assoluti di marcati al termine dell'estrazione SPE direttamente nelle vial di eluizione. Per stimare l'esattezza, cioè il grado di accordo tra il valore sperimentale e un valore accettato come vero, espresso come errore %, sono stati aggiunti 250 ng assoluti sia di metossifenoli nativi che di marcati all'inizio della procedura. Infine i bianchi, necessari ad escludere eventuali contaminazioni, sono stati ottenuti aggiungendo solo 250 ng assoluti di marcati; i valori ottenuti sono stati poi sottratti a quelli delle rese e delle esattezze.

Ciascuna prova è stata ripetuta 5 volte per verificare la ripetibilità della procedura pre-analitica. I valori di bianco ottenuti in ng assoluti, la resa percentuale e l'errore percentuale con i relativi coefficienti di variazione percentuali vengono riportati in tabella 4.3:

Tabella 4.3 Valori di bianco in ng assoluti, resa ed errore percentuali nella frazione disciolta

Nativi	Bianchi (ng ass)	Resa %	CV%	Errore %	CV%
VA	113±2	93	4	-1	6
VAH	68±3	99	1	7	6
SYA	35±2	97	2	5	3
SYAH	19±2	100	1	3	4
HA	105±2	108	1	4	5
PA	11,4±0,9	88	1	-6	4
VAC	-	-	-	-	-
IVA	33±2	103	2	6	6
SYAC	11±1	100	2	7	3

Dalla precedente tabella è possibile osservare come le rese percentuali medie siano tutte superiori all'80% e l'errore % medio sia sempre entro il 10%; i coefficienti di variazione percentuale sono sempre minori al 10% dimostrando una buona ripetibilità. Per questi motivi si possono considerare validati tutti gli analiti in esame, tranne l'acetovanillone: l'errore percentuale infatti risulta essere molto elevato e negativo per questo analita.

Le rese ottenute sono comprese tra l'88 e il 108% e sono confrontabili con i risultati di analoghe procedure di estrazione in fase solida presenti in letteratura: Keil et al.⁴⁷ ottengono rese nel *range* 72-101%. Dalla preconcentrazione di MP in soluzione e successiva ossidazione Zhang et al.⁵³ ottengono rese nell'intervallo 81-98%, mentre Louchouart et al.⁴⁸ preconcentrano lignine disciolte che successivamente ossidano ricavando rese fra il 74-102%.

Per la stima del bianco procedurale dal quale poi ricavare i limiti di rilevabilità e di quantificazione procedurali per i campioni antartici, non è stato possibile utilizzare i bianchi di validazione preparati con acqua di laguna in quanto troppo concentrati rispetto all'acqua antartica che è invece la matrice dei campioni. Per questo motivo sono state cercate altre matrici: in un primo momento è stata preparata un'acqua sintetica utilizzando acqua ultrapura con l'aggiunta di sale marino in modo da avere una salinità di circa il 33‰; con questa matrice sono stati preparati 5 bianchi con la stessa procedura vista per quelli di validazione. Dalle analisi però sono risultati contaminati da acido vanillico e vanillina, naturalmente presenti nell'acqua di mare e a maggior ragione nel sale marino. Pertanto è stata preparata un'altra matrice sintetica usando però NaCl ultrapuro: anche in questo caso, seppure in misura minore rispetto alla prova precedente, i 5 bianchi sono risultati contaminati. Si è giunti alla conclusione che il sale rappresenta in ogni caso una fonte di contaminazione che deve perciò essere eliminata.

Il problema della contaminazione dei bianchi è stato riportato anche in letteratura: ad esempio Shakya et al.²³ hanno trovato tracce di vanillina nei bianchi ottenuti mediante ossidazione con CuO seguita da analisi in GC-MS, mentre Louchouart et al.⁴⁸ hanno rilevato la presenza di vanillina e acido vanillico anche utilizzando una procedura preparativa che prevede l'uso dell'estrazione in fase solida SPE, seguita sempre da analisi in GC-MS.

Si è passati poi alla valutazione di altre possibili matrici acquose: si è valutata l'acqua ultrapura fornita da Romil, ma un'analisi di un'aliquota tal quale ha evidenziato la presenza di tracce di vanillina e acido vanillico; anche l'acqua prodotta in *clean room* (acqua ultrapura prodotta dall'impianto di purificazione *Purelab Option R pure water system* accoppiato a *Purelab Ultra Analytic ultra pure water system*) non può essere utilizzata, anche se presenta concentrazioni di metossifenoli ancora minori. Tali concentrazioni di per sé non costituiscono un problema (sono trascurabili), ad esempio se l'acqua viene usata per effettuare le diluizioni, ma diventano un problema nel momento in cui si va a preconcentrare mediante SPE come prevede la procedura validata. Per ovviare a tutti questi problemi di contaminazione si è deciso di purificare l'acqua prodotta in *clean room* all'interno della *clean room* prelevandola direttamente dal rubinetto e usando le stesse cartucce SPE utilizzate per la preconcentrazione. Dopo aver lavato le colonne con 5 mL di metanolo e condizionato con 10 mL di acqua acidificata al 2% con acido formico, è stata filtrata l'acqua (1 L per cartuccia) e raccolta per poi essere utilizzata per la preparazione dei bianchi con la stessa procedura vista per la validazione, aggiungendo però 150 ng assoluti di marcanti.

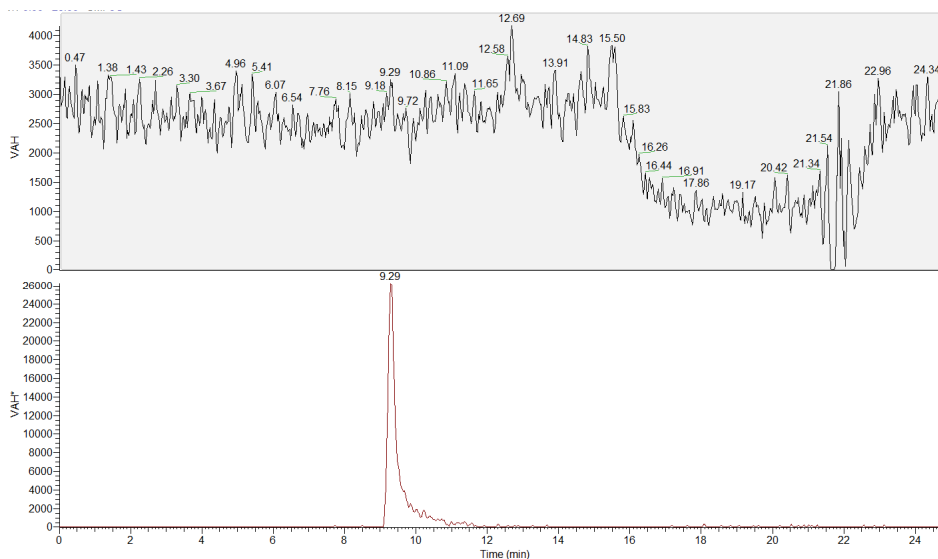
Tabella 4.4 Concentrazioni di acido vanillico e vanillina in ng assoluti nei bianchi procedurali preparati con tre matrici diverse dove si vede la riduzione progressiva della contaminazione

BIANCHI PROCEDURALI con sale marino	
VA	11,9±0,6
VAH	181±5
BIANCHI PROCEDURALI con NaCl	
VA	8,8±0,7
VAH	122±8
BIANCHI PROCEDURALI purificati	
VA	2,3±0,4
VAH	0,89±0,06

I bianchi procedurali così ottenuti sono stati utilizzati per calcolare l'MDL e l'MQL (calcolati come 3 e 10 volte la deviazione standard del bianco procedurale), e sottratti ai campioni per poter escludere la contaminazione dovuta alla procedura di preparazione dei campioni stessi. In tabella 4.5 si riportano i bianchi medi, l'MDL e l'MQL e in figura 4.9 il cromatogramma di un bianco procedurale:

Tabella 4.5 Bianchi procedurali, MDL e MQL nella frazione disciolta in ng assoluti

Nativi	Bianchi procedurali (ng ass)	MDL (ng ass)	MQL (ng ass)
VA	2,3±0,4	1	4
VAH	0,89±0,06	0,2	0,6
SYA	0,5±0,1	0,3	1
SYAH	0,68±0,08	0,2	0,8
HA	2,0±0,2	0,5	2
PA	0,09±0,01	0,02	0,06
VAC	-	-	-
IVA	2,0±0,2	0,7	2
SYAC	1,2±0,3	0,8	3



4.9 Cromatogramma di un bianco procedurale

Confrontando gli MDL ottenuti (0,04-2 fg/μL) con altri presenti in letteratura (MDL=3-15 pg/μL GC-MS in modalità di acquisizione *full scan* e MDL=0,5-1,5 pg/μL GC-MS in modalità MRM)⁴⁹ è possibile notare come siano più bassi di tre ordini di grandezza.

➤ Frazione particellata

Come nella frazione disciolta, anche nella frazione particellata il metodo è stato validato attraverso la stima di resa, esattezza, precisione, bianco procedurale, limiti di rilevabilità e di quantificazione procedurali (MDL e MQL).

A causa della mancanza di un materiale certificato sono stati aggiunti degli *spike* di metossifenoli nativi e marcati allo stesso tipo di filtri GF/F (porosità 0,7 µm) usati per la filtrazione dei campioni antartici, precedentemente puliti riscaldandoli a 400°C per 4 ore in muffola. È stata seguita la stessa procedura descritta nel paragrafo 3.9 facendo le seguenti aggiunte di nativi e marcati:

- per i campioni preparati per la valutazione delle rese 38 ng assoluti di standard di metossifenoli nativi prima della procedura di estrazione direttamente sui filtri spezzettati, e 38 ng assoluti di marcati al termine della filtrazione direttamente in vial da autocampionatore
- per la valutazione dell'esattezza 38 ng assoluti sia di nativi che di marcati entrambi aggiunti prima dell'estrazione
- per i bianchi 38 ng assoluti solo di marcati all'inizio della procedura

Ogni prova è stata ripetuta 5 volte al fine di valutare la ripetibilità. I valori di resa ed errore percentuali con i relativi CV% vengono riportati in tabella 4.6:

Tabella 4.6 Resa e errore percentuali nella frazione particellata

Nativi	Resa %	CV%	Errore %	CV%
VA	73	4	-2	4
VAH	76	4	6	1
SYA	72	4	3	2
SYAH	81	4	7	1
HA	72	4	2	2
PA	65	4	-6	2
VAC	72	4	3	2
IVA	72	5	4	3
SYAC	72	3	1	4

Dalla precedente tabella è possibile notare come siano stati validati tutti i metossifenoli in esame: la resa media è del 72% e l'errore, così come i coefficienti di variazione percentuale, è sempre entro il 10%.

Dalle deviazioni standard dei bianchi procedurali sono stati anche ricavati i limiti di rilevabilità e di quantificazione procedurali che vengono riportati in tabella 4.7:

Tabella 4.7 Bianchi procedurali, MDL e MQL nella frazione particellata in ng assoluti

Nativi	Bianchi procedurali (ng ass)	MDL (ng ass)	MQL (ng ass)
VA	0,34±0,06	0,2	0,6
VAH	0,10±0,02	0,07	0,2
SYA	0,02±0,02	0,05	0,2
SYAH	0,02±0,02	0,07	0,2
HA	0,04±0,02	0,08	0,3
PA	0,007±0,002	0,01	0,02
VAC	0,18±0,06	0,2	0,6
IVA	0,22±0,03	0,1	0,3
SYAC	0,03±0,03	0,08	0,3

- VALIDAZIONE DEL METODO, HPLC/MS-MS

Anche con questa strumentazione analitica la validazione è stata condotta in primo luogo attraverso la stima della linearità della risposta strumentale. Per motivi cromatografici i punti della retta sintetica preparata come la retta iniettata via HPLC-ORBITRAP MS sono stati diluiti 1:4 in acqua. Aspettandosi una migliore sensibilità, sono stati preparati inoltre altri 3 punti a concentrazioni inferiori. Le rette di calibrazione sintetiche sono state costruite iniettando soluzioni aventi concentrazioni di nativi 0,005 pg/μL, 0,01 pg/μL, 0,05 pg/μL, 0,1 pg/μL, 0,25 pg/μL, 0,5 pg/μL, 2,5 pg/μL, 5 pg/μL, 12,5 pg/μL, 25 pg/μL, 50 pg/μL, 100 pg/μL, 150 pg/μL e 250 pg/μL, e di standard marcati 12,5 pg/μL. Per alcuni analiti sono riportate due rette sintetiche: una con la vanillina marcata e una con l'acido vanillico marcato in quanto nelle due matrici sono stati validati con marcati diversi (vedi tabelle 3.11 e 3.12). Si riporta in figura 4.10 la retta di taratura della vanillina a titolo di esempio, in tabella 4.8 pendenza, intercetta, coefficiente di correlazione e intervallo di linearità delle rette riferite all'acido vanillico marcato come standard interno e in tabella 4.9 i medesimi parametri, ma rispetto alla vanillina marcata.

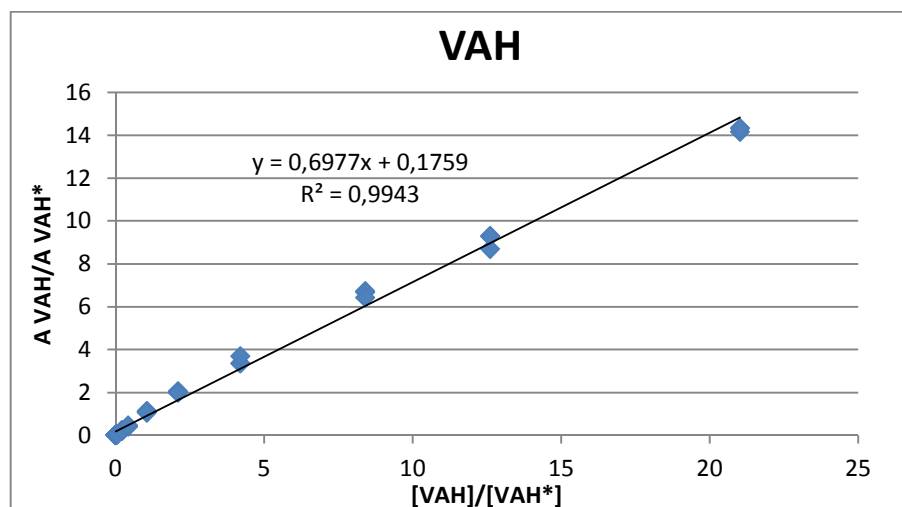


Figura 4.10 Retta di calibrazione sintetica della vanillina via HPLC/MS-MS

Tabella 4.8 Pendenza, intercetta, R² e intervallo di linearità con VA*

Nativi	m	q	R ²	min (pg/μL)	max (pg/μL)
VA	1,3216	0,0213	0,998	0,005	27
SYA	0,9749	0,0398	0,99	0,05	26
HA	0,1494	0,0018	0,9984	0,005	27
PA	1,1767	0,0296	0,9916	0,01	25
VAC	1,6726	0,002	0,9977	0,006	30
IVA	0,3493	0,0067	0,9934	0,01	27
SYAC	1,3054	-0,0021	0,9974	0,01	31

Tabella 4.9 Pendenza, intercetta, R² e intervallo di linearità con VAH*

Nativi	m	q	R ²	min (pg/μL)	max (pg/μL)
VA	0,5045	0,0507	0,991	0,005	266
VAH	0,6977	0,1759	0,9943	0,005	269
SYA	0,3962	0,0726	0,9976	0,05	264
SYAH	0,5569	0,2118	0,9904	0,01	306
HA	0,0535	0,0071	0,9984	0,005	266
PA	0,492	0,0207	0,9922	0,01	51
VAC	0,639	0,0458	0,9938	0,006	120
SYAC	0,4899	0,0417	0,9945	0,01	122

Per verificare la ripetibilità strumentale, le misure sono state eseguite tre volte per ogni punto a diversa concentrazione e i CV% sono risultati sempre inferiori al 10%.

Dai cromatogrammi delle rette di calibrazione sono stati calcolati i limiti di rilevabilità LOD e di quantificazione LOQ strumentali (definiti come la concentrazione di nativo alla quale si ottiene un rapporto segnale/rumore rispettivamente di 3 e 10):

Tabella 4.10 LOD e LOQ di ogni nativo in pg assoluti per HPLC/MS-MS e HPLC-ORBITRAP MS

Nativi	LOD (pg ass) (HPLC/MS-MS)	LOD (pg ass) (HPLC- ORBITRAP MS)	LOQ (pg ass) HPLC/MS-MS	LOQ (pg ass) (HPLC- ORBITRAP MS)
VA	0,7	6	2	19
VAH	0,4	7	1	23
SYA	16	4	53	15
SYAH	2	5	8	17
HA	1	4	4	12
PA	2	0,9	6	3
VAC	1	14	3	47
IVA	3	10	10	34
SYAC	2	9	8	29

Confrontando i limiti di rilevabilità strumentali ottenuti con i due strumenti impiegati, è possibile notare come l'utilizzo della spettrometria di massa tandem abbia permesso, per la maggior parte degli analiti e in particolare per acido vanillico, vanillina e acetovanillone presenti nei campioni antartici, di ottenere un LOD inferiore di un ordine di grandezza rispetto all'analisi in alta risoluzione.

➤ Frazione disciolta

La procedura di preparazione del campione per la frazione disciolta è la stessa vista utilizzando l'HPLC-ORBITRAP MS, con la sola differenza della diluizione che per motivi cromatografici è stata effettuata 1:4 in acqua.

Avendo a disposizione due marcanti, VAH* e VA*, per ogni analita è stato scelto il miglior standard interno sulla base dell'esattezza stimata per la quantificazione. Per tutti i metossifenoli validati, tranne l'acido isovanillico, l'esattezza (stimata in termini di errore relativo percentuale) si è rivelata migliore usando la vanillina marcata che porta ad errori inferiori al 10%. In termini di resa i risultati migliori sono stati ottenuti impiegando sempre la vanillina marcata (resa media 95% contro il 73% con l'acido vanillico marcato).

Si riportano in tabella 4.11 la scelta dello standard interno per ogni analita, i valori di bianco in ng assoluti, la resa e l'errore percentuali e i coefficienti di variazione:

Tabella 4.11 Valori di bianco in ng assoluti, resa ed errore percentuali nella frazione disciolta

Nativi	Marcato	Bianchi (ng ass)	Resa %	CV%	Errore %	CV%
VA	VAH*	148±5	90	4	-3	8
VAH	VAH*	70,5±0,7	99	3	-0,4	4
SYA	VAH*	50,5±0,7	102	3	1	5
SYAH	VAH*	8,6±0,3	88	2	-4	10
HA	VAH*	68,5±0,5	92	3	-5	3
PA	VAH*	3,2±0,7	85	1	-7	3
VAC	VAH*	18±1	108	1	3	2
IVA	VA*	53±1	96	2	7	2
SYAC	VAH*	2,69±0,07	96	2	-4	3

La tabella precedente mostra come le rese siano tutte superiori all'85% e gli errori percentuali entro il 10%, così come i coefficienti di variazione percentuale.

Si può notare come l'acetovanillone sia stato validato (la sua esattezza presenta un errore relativo percentuale del 3%), cosa che invece non è stata ottenuta con il metodo di analisi in alta risoluzione; questo è sicuramente un vantaggio perché ha permesso di quantificare questo analita, presente nei campioni antartici.

I bianchi procedurali preparati utilizzando l'acqua della *clean room* purificata come spiegato nella sezione frazione disciolta del metodo HPLC-ORBITRAP MS (p. 48), sono stati diluiti 1:4 in acqua e iniettati, e da essi sono stati calcolati i limiti di rilevabilità e di quantificazione procedurali MDL e MQL (calcolati come 3 e 10 volte la deviazione standard del bianco procedurale).

Si riportano in tabella 4.12 i valori di bianco procedurale, l'MDL e l'MQL in ng assoluti:

Tabella 4.12 Bianchi procedurali, MDL e MQL nella frazione disciolta in ng assoluti

Nativi	Marcato	Bianchi procedurali (ng ass)	MDL (ng ass)	MQL (ng ass)
VA	VAH*	1,90±0,05	0,1	0,5
VAH	VAH*	8,7±0,7	2	7
SYA	VAH*	0,15±0,05	0,1	0,5
SYAH	VAH*	0,51±0,06	0,2	0,6
HA	VAH*	0,46±0,05	0,1	0,5
PA	VAH*	0,065±0,002	0,006	0,02
VAC	VAH*	2,01±0,07	0,2	0,7
IVA	VA*	0,28±0,07	0,2	0,7
SYAC	VAH*	0,05±0,02	0,05	0,2

➤ Frazione particellata

La validazione nella frazione particellata è stata eseguita come la validazione per l'HPLC-ORBITRAP MS, ma per motivi cromatografici le soluzioni sono state diluite 1:4 in acqua. Le concentrazioni sia di marcati che di nativi sono di circa 12,5 pg/μL; dai bianchi procedurali sono stati ottenuti i limiti di rilevabilità e di quantificazione procedurali.

Come nella frazione disciolta, anche in questo caso per ogni analita è stato scelto il miglior standard interno seguendo gli stessi criteri di valutazione: per tutti i metossifenoli validati, eccetto vanillina e siringaldeide, l'acido vanillico marcato porta a rese di circa il 72% ed errori entro il 10% risultando essere il miglior standard interno, mentre per queste due aldeidi è la vanillina marcata con errori rispettivamente del 3% e dell'1%.

Si riportano in tabella 4.13, le rese, gli errori percentuali e i relativi coefficienti di variazione percentuali, mentre in tabella 4.14 i valori dei bianchi procedurali e i limiti di rilevabilità e quantificazione procedurali in ng assoluti:

Tabella 4.13 Resa ed errore percentuali nella frazione particellata

Nativi	Marcato	Resa %	CV%	Errore %	CV%
VA	VA*	78	9	7	4
VAH	VAH*	70	7	3	8
SYA	VA*	70	7	1	5
SYAH	VAH*	72	6	1	4
HA	VA*	75	8	1	2
PA	VA*	66	4	-7	6
VAC	VA*	70	8	-3	3
IVA	VA*	74	5	3	3
SYAC	VA*	67	6	-4	3

Dalla tabella precedente è possibile notare come la resa media sia del 72% e l'errore e il CV% siano inferiori al 10% dimostrando una buona ripetibilità della procedura pre-analitica.

Tabella 4.14 Bianchi procedurali, MDL e MQL nella frazione particellata in ng assoluti

Nativi	Marcato	Bianchi procedurali (ng ass)	MDL (ng ass)	MQL (ng ass)
VA	VA*	0,53±0,05	0,2	0,5
VAH	VAH*	0,30±0,03	0,08	0,3
SYA	VA*	0,04±0,02	0,06	0,2
SYAH	VAH*	0,035±0,005	0,01	0,05
HA	VA*	0,12±0,01	0,02	0,05
PA	VA*	0,033±0,004	0,01	0,04
VAC	VA*	0,083±0,002	0,01	0,02
IVA	VA*	0,07±0,01	0,04	0,1
SYAC	VA*	0,02±0,01	0,02	0,08

4.3 VALUTAZIONE EFFETTO MATRICE

Quando si analizzano dei campioni reali mediante cromatografia liquida accoppiata alla spettrometria di massa (HPLC/MS) spesso ci si trova di fronte a fenomeni di aumento o di soppressione del segnale analitico dovuti all'“effetto matrice”.⁷⁸ Infatti nella matrice reale oltre agli analiti di interesse, possono essere presenti anche altre sostanze più o meno polari, ionizzabili o volatili che una volta in sorgente interferiscono con la ionizzazione dell'analita studiato aumentando o sopprimendo l'intensità del segnale.

Per valutare o limitare tale effetto sono impiegate varie tecniche, tra cui l'utilizzo dello standard interno e la preparazione degli standard direttamente nella matrice reale anziché in quella sintetica (solventi puri).

Un metodo qualitativo⁷⁹ per valutare l'effetto matrice comporta il confronto della pendenza della retta di calibrazione costruita in matrice rispetto a quella della sintetica, entrambe ottenute riportando l'area del picco del nativo contro la sua concentrazione: se il coefficiente angolare delle rette in matrice è maggiore di quello della retta sintetica si ha un accrescimento, in caso contrario si verifica invece una soppressione del segnale analitico; la pendenza è infatti indice della sensibilità del metodo. Inoltre, per verificare la capacità dello standard interno di limitare l'effetto matrice è possibile eseguire un confronto tra le rette costruite come appena descritto e quelle ottenute riportando i rapporti tra le aree dei nativi e dei marcati contro i rispettivi rapporti delle concentrazioni.

Per valutare l'effetto matrice dei campioni preparati per la validazione sono state costruite due rette di calibrazione in matrice:

- una retta nella matrice della frazione disciolta ottenuta utilizzando acqua di laguna filtrata seguendo la stessa procedura vista per la validazione del metodo senza aggiungere standard né di nativi né di marcati;
- una retta nella matrice della frazione particellata ricavata dall'estrazione dei filtri GF/F, precedentemente muffolati, seguendo la procedura riportata nel paragrafo 3.9 senza l'aggiunta di standard.

- HPLC-ORBITRAP MS

La retta di calibrazione nella matrice della frazione disciolta è stata ottenuta utilizzando la matrice ottenuta al termine dell'estrazione SPE dell'acqua di laguna preparando delle soluzioni 1:1 in

acqua e metanolo ad una concentrazione di nativi di 0,1 pg/μL, 0,5 pg/μL, 1 pg/μL, 5 pg/μL, 10 pg/μL, 50 pg/μL, 100 pg/μL, 200 pg/μL, 300 pg/μL e 500 pg/μL e di marcati VA* e VAH* di 25 pg/μL.

La retta nella matrice della frazione particellata è stata preparata usando la miscela acqua/metanolo 1:1 ottenuta dall'estrazione e filtrazione dei filtri GF/F aggiungendo le seguenti concentrazioni di metossifenoli nativi: 0,1 pg/μL, 0,5 pg/μL, 1 pg/μL, 5 pg/μL, 10 pg/μL, 25 pg/μL, 50 pg/μL, 100 pg/μL, 200 pg/μL, 300 pg/μL e 500 pg/μL, e marcati in concentrazione 25 pg/μL.

Per tutti i metossifenoli in esame sono state costruite e confrontate le rette nelle due matrici di analisi con quella sintetica riscontrando un accrescimento del segnale analitico; confrontando poi queste rette con quelle ottenute riportando i rapporti tra i nativi e i marcati è stato possibile notare come lo standard interno limiti l'effetto matrice e come nel caso della vanillina la correzione sia ottimale poiché è stato utilizzato lo stesso analita, diverso solo perché marcato isotopicamente.

Si riportano in figura 4.11 e 4.12, a titolo di esempio, le rette in matrice e la retta sintetica per la valutazione qualitativa dell'effetto matrice per acido vanillico e vanillina.

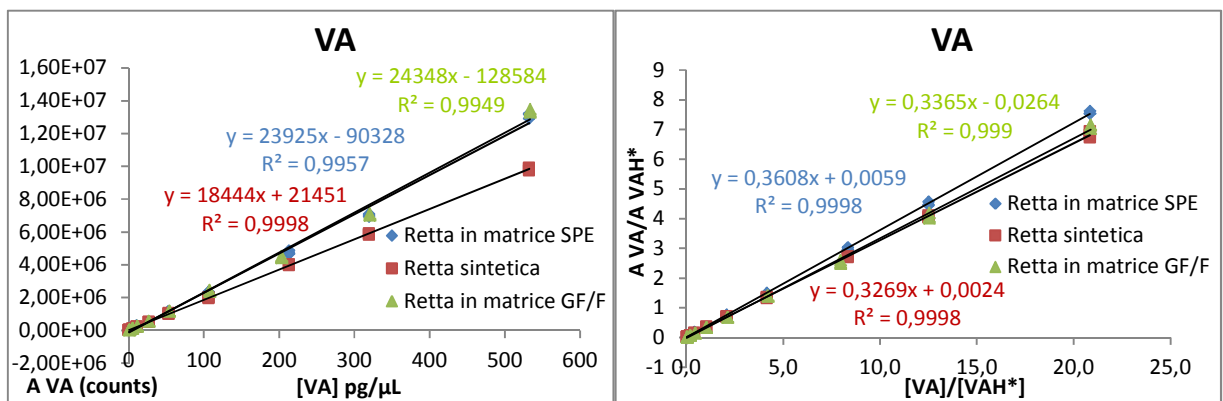


Figura 4.11 Valutazione qualitativa dell'effetto matrice per l'acido vanillico

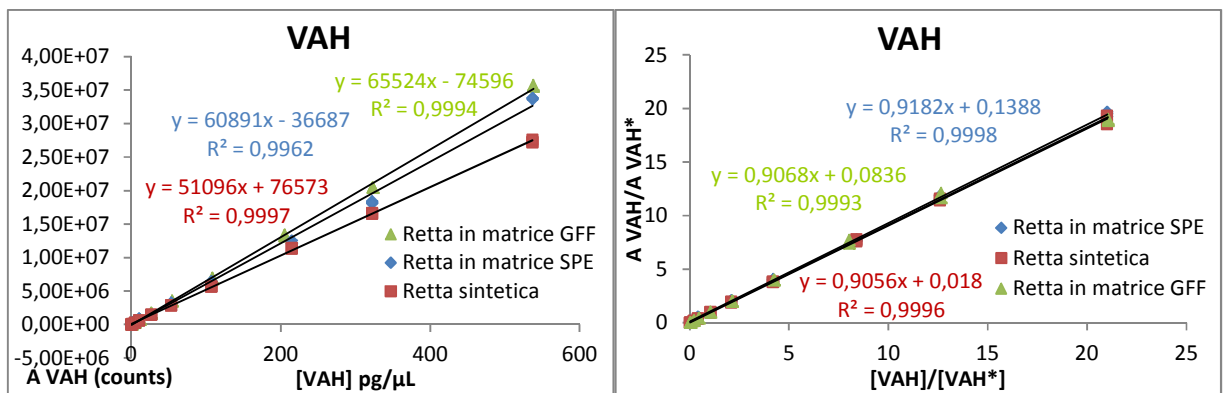


Figura 4.12 Valutazione qualitativa dell'effetto matrice per la vanillina

- HPLC/MS-MS

Le rette di calibrazione in matrice sono state preparate come per l'analisi via HPLC-ORBITRAP MS, ma con una diluizione 1:4 in acqua prevista dal metodo cromatografico.

Per la retta nella matrice della frazione disciolta sono state preparate soluzioni alla concentrazione di nativi di 0,05 pg/μL, 0,25 pg/μL, 0,5 pg/μL, 2,5 pg/μL, 5 pg/μL, 25 pg/μL, 50 pg/μL, 100 pg/μL, 150 pg/μL e 250 pg/μL, e di marcati VA* e VAH* di 12,5 pg/μL. Per la retta in matrice della frazione particellata le concentrazioni di marcati VA* e VAH* sono sempre di 12,5 pg/μL, mentre per i nativi di 0,05 pg/μL, 0,25 pg/μL, 0,5 pg/μL, 2,5 pg/μL, 5 pg/μL, 12,5 pg/μL, 25 pg/μL, 50 pg/μL, 100 pg/μL, 150 pg/μL e 250 pg/μL.

Come per il metodo in alta risoluzione, è stata fatta una valutazione qualitativa che ha mostrato che quando si usa lo standard interno l'effetto matrice viene ridotto e che quando viene utilizzato lo standard del nativo marcato isotopicamente come nel caso di acido vanillico e vanillina la correzione risulta ottimale. Si riportano in figura 4.13 e 4.14 le rette in matrice e la retta sintetica per l'acido vanillico rispettivamente della frazione particellata e disciolta.

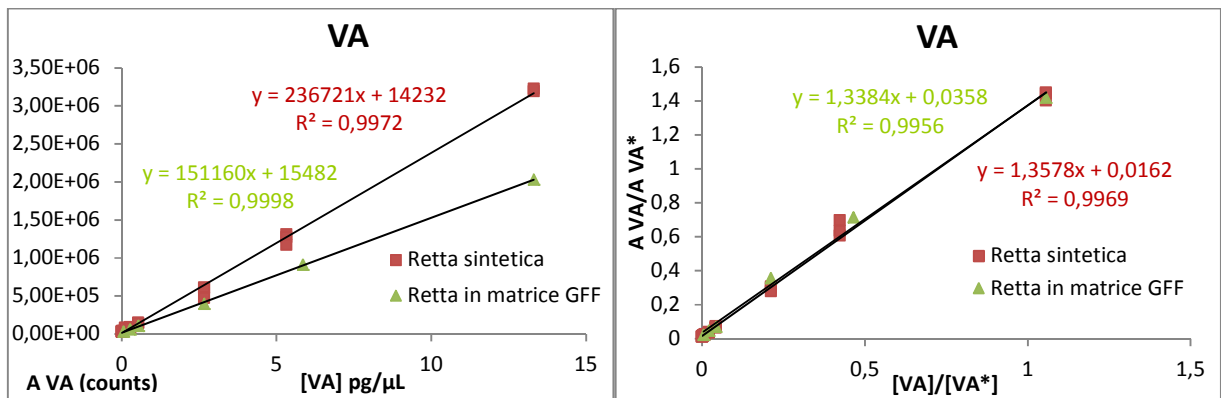


Figura 4.13 Valutazione qualitativa dell'effetto matrice nella frazione particellata per l'acido vanillico

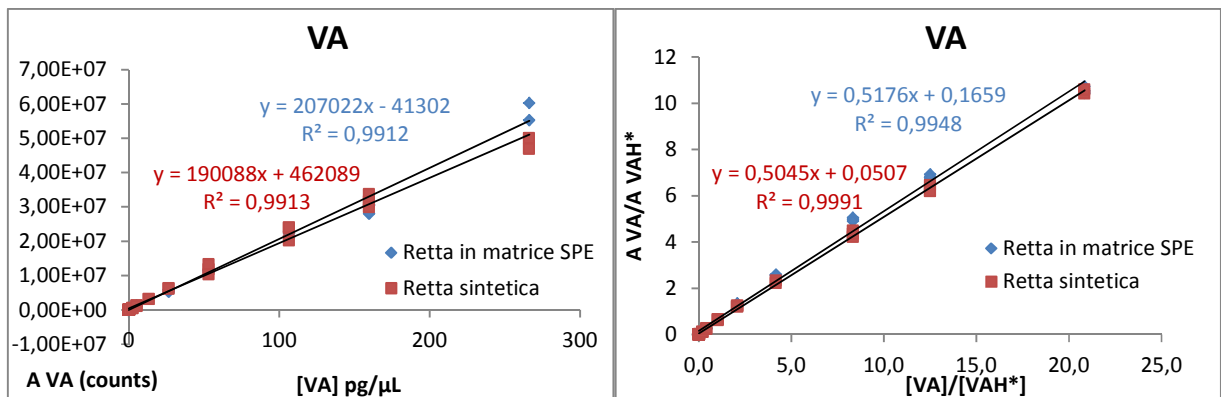


Figura 4.14 Valutazione qualitativa dell'effetto matrice nella frazione disciolta per l'acido vanillico

4.4 ANALISI DEI CAMPIONI

La procedura pre-analitica per la determinazione di metossifenoli validata nel presente lavoro di tesi è stata applicata a 28 campioni prelevati nel Mare di Ross nel periodo compreso tra il 26.01.2012 e l'08.02.2012. In un primo momento l'analisi è stata condotta mediante HPLC-ORBITRAP MS, ma le basse concentrazioni di acido vanillico e il fatto che l'acetovanillone, presente nei campioni, non fosse stato validato nella frazione disciolta impedendone la quantificazione, hanno reso necessaria l'analisi anche attraverso HPLC/MS-MS per avere dati più completi da poter meglio interpretare.

In figura 4.15 è possibile notare come l'acido vanillico sia presente nel campione D3_112m al tempo di ritenzione di 7,93 minuti, ma come sia difficile poterlo quantificare (LOD=6 pg assoluti, LOQ=19 pg assoluti); la figura 4.16 invece mostra la maggiore sensibilità dell'analisi mediante HPLC/MS-MS che consente la quantificazione dell'analita (LOD=0,7 pg assoluti, LOQ=2 pg assoluti), come discusso precedentemente (paragrafo 4.2).

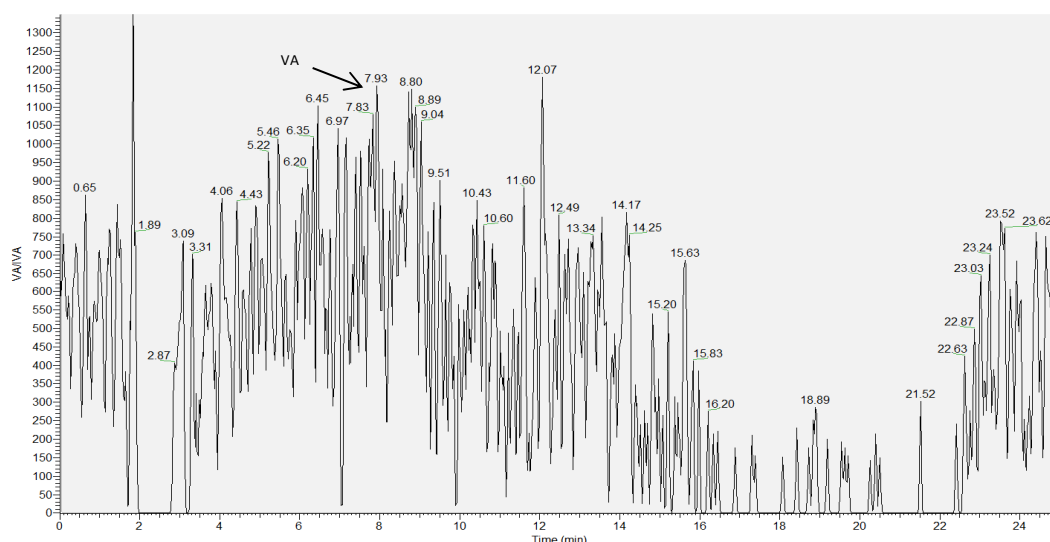


Figura 4.15 Cromatogramma del campione D3_112m con VA mediante HPLC-ORBITRAP MS

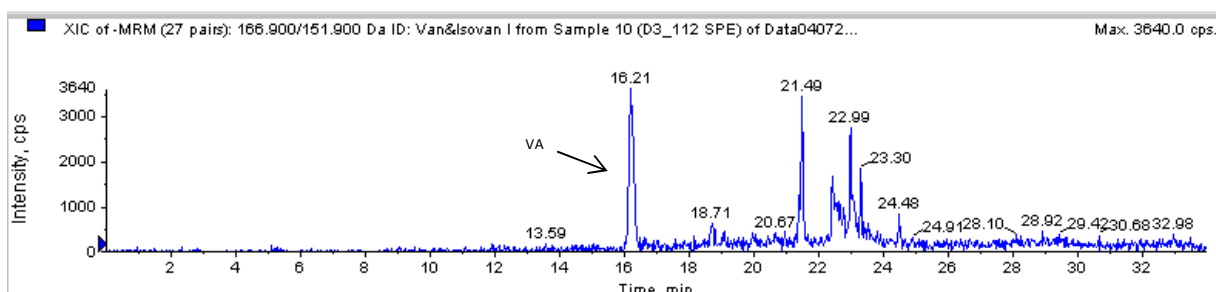


Figura 4.16 Cromatogramma del campione D3_112m con VA mediante HPLC/MS-MS

- **HPLC-ORBITRAP MS**

L'analisi di tutti i campioni in alta risoluzione ha evidenziato la presenza principalmente di due analiti, vanillina e acido vanillico, e tracce di acido p-cumarico. Tuttavia non è stato possibile effettuare la quantificazione dei due acidi in quanto i valori sono inferiori al limite di quantificazione (LOQ). Per questo motivo si riportano in tabella 4.15 le concentrazioni della sola vanillina nella frazione disciolta D, particellata P e totale TOT (ottenuta sommando le due precedenti) espresse in ng/L:

Tabella 4.15 Concentrazioni di vanillina in ng/L per tutti i campioni raccolti

Campioni	Transetto	VAH D (ng/L)	VAH P (ng/L)	VAH TOT (ng/L)
CA5_85m	A	218	0,89	219
CA6_50m		390	0,59	391
G2_50m		120	0,97	121
CI3_50m	B	70	1,70	71
CI4_50m		85	0,95	86
CI5_38m		107	1,83	109
CI6_48m		337	0,60	337
CW1_29m	C	81	2,15	83
CW2_28m		162	1,44	163
CW3_22m		53	2,38	56
CW4_15m		191	0,50	192
D3_5m	D	153	6,48	160
D3_18m		81	2,99	84
D3_112m		102	0,06	102
D7_2m		828	4,51	833
D7_10m		438	1,33	440
D7_60m		83	0,57	83
D6_10m		432	0,63	433
D5_10m		185	2,17	187
E3_1m	E	164	1,41	166
E3_29m		254	2,72	256
E3_70m		160	0,17	161
E2_29m		63	0,26	63
E1_1_5m		96	1,07	97
E1_12m		77	2,11	79
E1_70m		96	0,26	96
E6_20m		152	0,47	153
F7_108m	-	93	0,09	93

Il confronto dei dati ottenuti con quelli presenti in letteratura, la distribuzione spaziale degli analiti e le correlazioni con i parametri chimico-fisici sono stati effettuati con le concentrazioni ottenute mediante HPLC/MS-MS, che ha permesso maggiore sensibilità e sicurezza nei risultati ottenuti.

- **HPLC/MS-MS**

• **RISULTATI**

L'analisi mediante cromatografia liquida accoppiata alla spettrometria di massa tandem ha evidenziato la presenza di vanillina, acido vanillico, acetovanillone e acido p-cumarico in 28 campioni antartici nella frazione disciolta, particellata e totale. La presenza degli altri analiti non è stata osservata. Le concentrazioni ottenute sono espresse in ng/L e sono riportate nelle seguenti tabelle (tabella 4.16, 4.17, 4.18) distinguendo le tre frazioni; gli analiti presenti a livelli di concentrazione inferiori al limite di rilevabilità sono stati indicati come BDL (*below detection limit*).

➤ **Frazione disciolta**

Nella frazione disciolta è la vanillina l'analita presente a concentrazioni più elevate con un *range* di 52,3-859,2 ng/L e un valore medio di 191,4 ng/L. Questi valori sono due ordini di grandezza superiori rispetto all'acido vanillico e all'acetovanillone, e tre ordini di grandezza rispetto all'acido p-cumarico. Si è osservato inoltre che dal punto di vista analitico le concentrazioni di vanillina non differiscono per più del 10% rispetto a quelle ottenute mediante HPLC-ORBITRAP MS, indice di un buon accordo fra le misure sperimentali.

È stato inoltre possibile quantificare con precisione e accuratezza adeguate l'acido vanillico presente a concentrazioni comprese nell'intervallo 2,0-47,1 ng/L con un valore medio di 6,9 ng/L, l'acetovanillone osservando concentrazioni tra 0,6 e 69,8 ng/L (valore medio 10,0 ng/L) e l'acido p-cumarico ad un livello medio di 0,4 ng/L (*range* di concentrazione 0,1-1,0 ng/L). Quest'ultimo però nella stazione di campionamento F7_108m è presente ad una concentrazione di 32,6 ng/L, valore di 2 ordini di grandezza superiore rispetto a quella degli altri campioni.

Tabella 4.16 Concentrazioni di acido vanillico, vanillina, acetovanillone e acido p-cumarico in ng/L nella frazione disciolta

Campioni	Transetto	VA (ng/L)	VAH (ng/L)	VAC (ng/L)	PA (ng/L)
CA5_85m	A	5,1	197,4	2,1	0,4
CA6_50m		5,4	372,0	19,4	0,3
G2_50m		2,9	116,9	1,2	0,2
CI3_50m	B	2,0	56,6	BDL	0,2
CI4_50m		2,2	72,2	BDL	0,1
CI5_38m		3,0	127,4	1,3	0,2
CI6_48m		5,3	351,5	10,7	0,1
CW1_29m	C	2,4	75,7	BDL	0,4
CW2_28m		5,8	164,7	2,7	0,5
CW3_22m		2,4	52,3	BDL	0,2
CW4_15m		3,7	197,4	4,3	0,3
D3_5m	D	11,8	151,0	2,4	0,6
D3_18m		3,3	68,4	BDL	0,3
D3_112m		3,2	102,2	BDL	0,2
D7_2m		47,1	859,2	69,8	0,2
D7_10m		26,0	527,1	24,1	0,4
D7_60m		2,5	81,1	BDL	0,8
D6_10m		6,3	422,8	7,7	0,3
D5_10m		5,7	181,2	4,4	0,3
E3_1m	E	6,6	154,0	3,5	0,8
E3_29m		7,1	267,5	12,0	1,0
E3_70m		5,8	167,1	2,3	0,6
E2_29m		5,0	73,6	BDL	0,3
E1_1_5m		4,6	101,8	BDL	0,2
E1_12m		3,6	83,3	BDL	0,3
E1_70m		4,5	102,8	0,6	0,2
E6_20m		3,7	135,8	2,2	0,7
F7_108m	-	6,4	96,8	BDL	32,6

➤ Frazione particellata

Nella frazione particellata le concentrazioni di metossifenoli rilevate sono notevolmente più basse rispetto alla frazione disciolta e spesso sono risultate inferiori al limite di rilevabilità (BDL). Anche in questa frazione la vanillina è l'analita predominante con un *range* di concentrazione fra 0,04-3,44 ng/L (valore medio 1,01 ng/L). Gli altri analiti sono presenti in tracce.

Tabella 4.17 Concentrazioni di acido vanillico, vanillina, acetovanillone e acido p-cumarico in ng/L nella frazione particellata

Campioni	Transetto	VA (ng/L)	VAH (ng/L)	VAC (ng/L)	PA (ng/L)
CA5_85m	A	0,16	0,26	0,05	BDL
CA6_50m		0,94	0,23	0,03	BDL
G2_50m		0,31	0,36	0,05	BDL
CI3_50m	B	0,14	1,41	0,19	BDL
CI4_50m		0,25	0,35	0,05	0,03
CI5_38m		BDL	2,25	0,07	BDL
CI6_48m		BDL	0,19	BDL	BDL
CW1_29m	C	BDL	2,25	0,02	BDL
CW2_28m		BDL	1,65	0,03	BDL
CW3_22m		BDL	2,40	0,04	BDL
CW4_15m		BDL	0,21	BDL	0,02
D3_5m	D	0,17	0,50	0,09	0,17
D3_18m		BDL	3,44	0,15	BDL
D3_112m		BDL	0,13	0,02	BDL
D7_2m		0,17	0,20	0,05	0,03
D7_10m		BDL	1,46	0,02	BDL
D7_60m		-	-	-	-
D6_10m		0,12	0,40	0,07	0,02
D5_10m		BDL	2,74	0,17	0,01
E3_1m	E	BDL	0,13	0,06	0,18
E3_29m		BDL	3,08	0,08	BDL
E3_70m		0,09	0,12	0,03	BDL
E2_29m		0,21	0,21	0,01	BDL
E1_1_5m		0,23	0,29	0,04	0,23
E1_12m		BDL	2,40	0,05	BDL
E1_70m		BDL	0,20	0,03	BDL
E6_20m		BDL	0,28	BDL	0,01
F7_108m	-	BDL	0,04	BDL	BDL

➤ Frazione totale

La frazione totale, ottenuta sommando la frazione disciolta e quella particellata, rispecchia molto le concentrazioni osservate per la frazione disciolta. L'acido vanillico è presente in un *range* di concentrazione di 2,2-47,3 ng/L (valore medio 7,0 ng/L), la vanillina è stata osservata a concentrazioni nell'intervallo 58,0-859,4 ng/L (valore medio 192,4 ng/L), l'acetovanillone presenta livelli compresi fra

0,01-69,9 ng/L (valore medio 6,6 ng/L) e l'acido p-cumarico è stato rilevato nel *range* di concentrazione di 0,1-1 ng/L (valore medio 0,4 ng/L).

Tabella 4.18 Concentrazioni totali di acido vanillico, vanillina, acetovanillone e acido p-cumarico in ng/L

Campioni	Transetto	VA (ng/L)	VAH (ng/L)	VAC (ng/L)	PA (ng/L)
CA5_85m	A	5,3	197,7	2,2	0,4
CA6_50m		6,3	372,2	19,5	0,3
G2_50m		3,2	117,2	1,2	0,2
CI3_50m	B	2,2	58,0	0,2	0,2
CI4_50m		2,5	72,5	0,1	0,1
CI5_38m		3,0	129,7	1,4	0,2
CI6_48m		5,3	351,7	10,7	0,1
CW1_29m	C	2,4	77,9	0,02	0,4
CW2_28m		5,8	166,4	2,7	0,5
CW3_22m		2,4	54,7	0,04	0,2
CW4_15m		3,7	197,6	4,3	0,3
D3_5m	D	12,0	151,5	2,5	0,8
D3_18m		3,3	71,8	0,1	0,3
D3_112m		3,2	102,3	0,02	0,2
D7_2m		47,3	859,4	69,9	0,3
D7_10m		26,0	528,6	24,2	0,4
D7_60m		2,5	81,1	BDL	0,8
D6_10m		6,4	423,2	7,8	0,3
D5_10m		5,7	183,9	4,6	0,3
E3_1m	E	6,6	154,1	3,6	1,0
E3_29m		7,1	270,6	12,1	1,0
E3_70m		5,9	167,2	2,3	0,6
E2_29m		5,2	73,9	0,01	0,3
E1_1_5m		4,8	102,1	0,04	0,4
E1_12m		3,6	85,7	0,05	0,3
E1_70m		4,5	103,0	0,6	0,2
E6_20m		3,7	136,1	2,2	0,7
F7_108m	-	6,4	96,9	BDL	32,6

- **DISCUSSIONE DEI DATI**

Per poter meglio interpretare i dati ottenuti per l'acido vanillico, la vanillina e l'acetovanillone, sono state elaborate delle distribuzioni spaziali delle loro concentrazioni nelle tre frazioni (D=disciolta, P=particellata e tot=totale) utilizzando il software *Ocean Data View* con un'interpolazione dei dati *gridding* DIVA.

Per l'acido p-cumarico è stata considerata solo la frazione totale in quanto la maggior parte delle concentrazioni in quella particellata sono inferiori al limite di rilevabilità; inoltre non è stato inserito il campione F7_108m perché, avendo una concentrazione di tale analita di 2 ordini di grandezza superiore agli altri, impedisce una distribuzione spaziale corretta nell'area dei 5 transetti. Sono stati considerati 20 campioni, escludendo gli 8 non prelevati al massimo di fluorescenza.

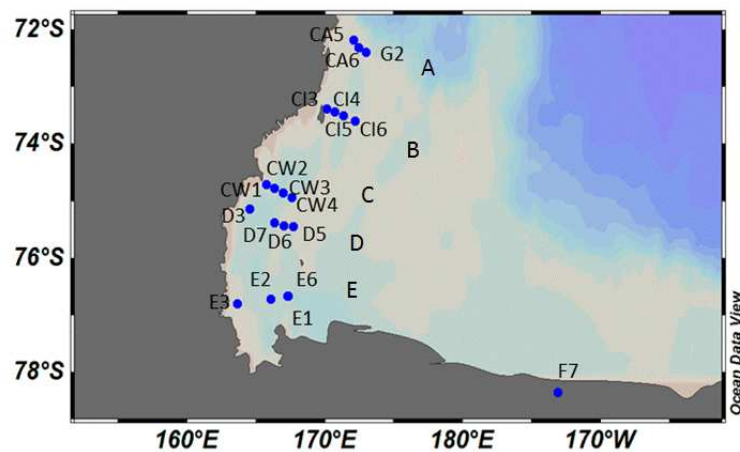
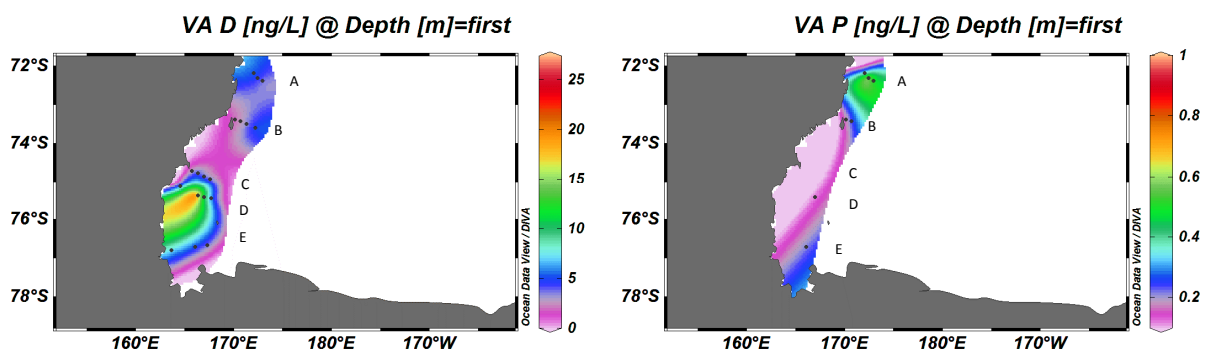


Figura 4.17 Siti di campionamento e transetti nel Mare di Ross

Si riportano di seguito le distribuzioni spaziali di acido vanillico (figura 4.18), vanillina (figura 4.19), acetovanillone (figura 4.20) e acido p-cumarico (figura 4.21):



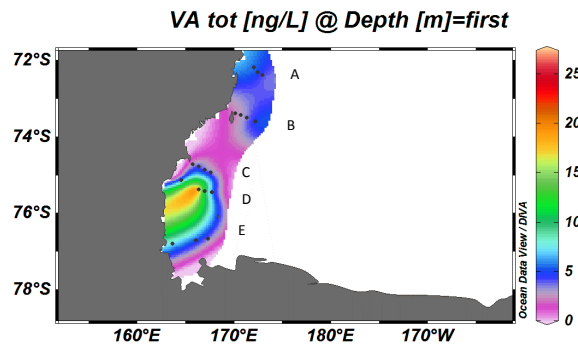


Figura 4.18 Distribuzione spaziale di acido vanillico in ng/L nel Mare di Ross

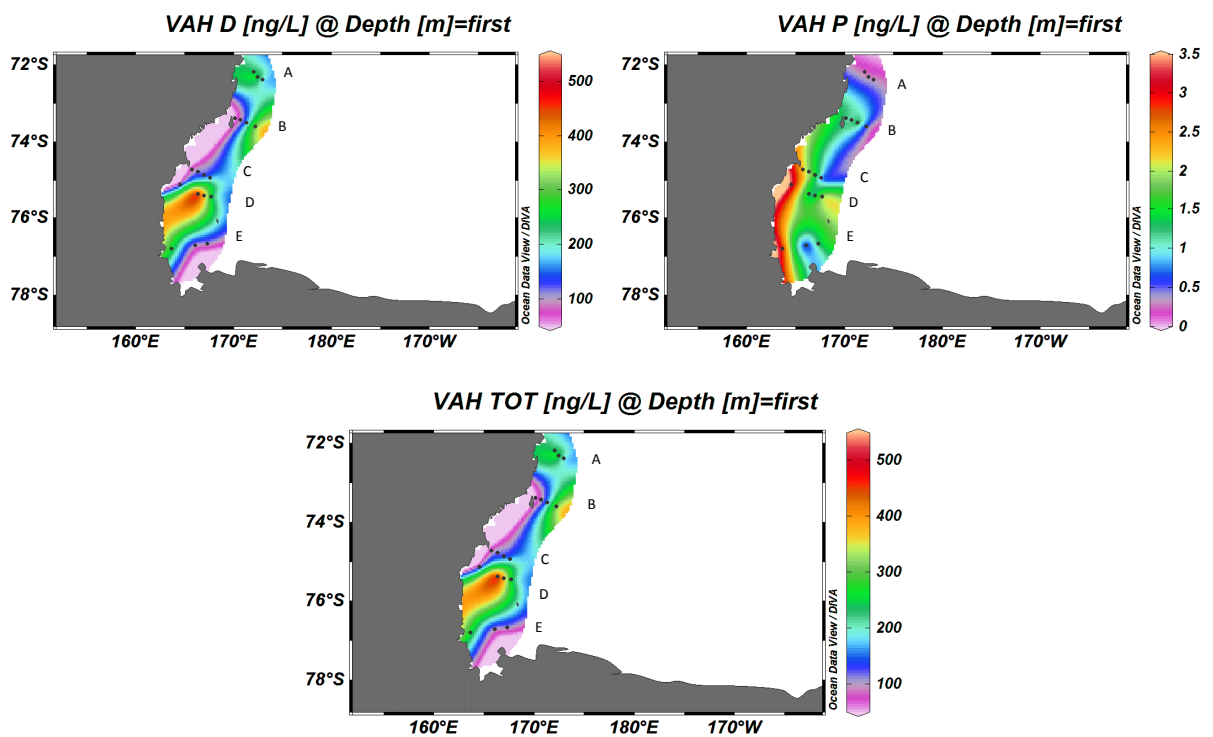
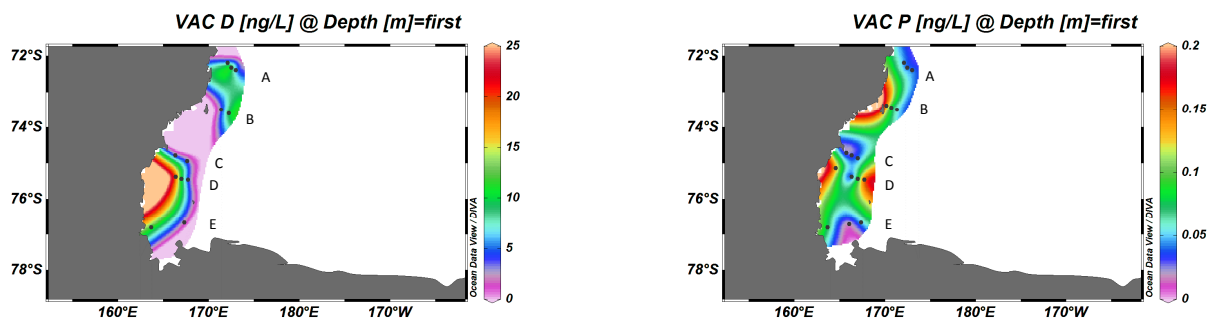


Figura 4.19 Distribuzione spaziale di vanillina in ng/L nel Mare di Ross



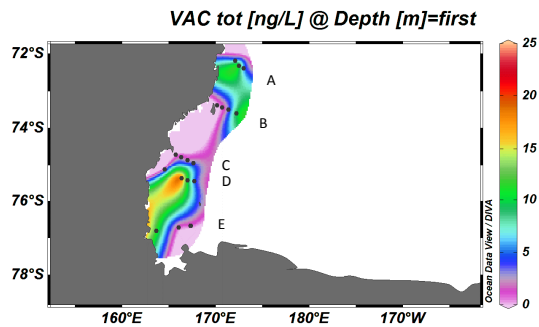


Figura 4.20 Distribuzione spaziale di acetovanillone in ng/L nel Mare di Ross

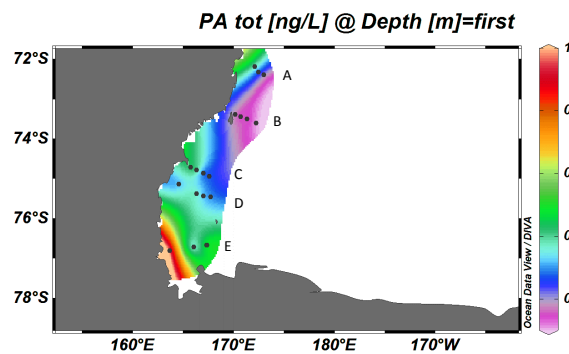


Figure 4.21 Distribuzione spaziale di acido p-cumarico in ng/L nel Mare di Ross

Come precedentemente riportato, la maggior parte degli studi di letteratura considera i MP dei prodotti di combustione o ossidazione della lignina;¹⁵ in quest'ultimo caso vengono analizzati nel materiale organico disciolto (DOM) di fiumi e oceani.^{16,18} Tale ossidazione può avvenire in natura per via fotochimica⁷ oppure microbiologica ad opera di batteri e funghi.^{8,9}

Dalle mappe è possibile osservare come le concentrazioni maggiori di metossifenoli si trovino vicino alla costa e in particolare nei transetti D ed E, mentre più ci si spinge verso il mare aperto e verso i transetti A e B più esse diminuiscono. Questo andamento è particolarmente evidente nella frazione disciolta che presenta anche i livelli più elevati di analiti e contribuisce maggiormente alla frazione totale. I tre fenoli vanillici nella frazione disciolta e totale presentano una distribuzione simile, mentre l'acido p-cumarico risulta maggiormente presente in un'area sempre costiera, ma più a sud rispetto agli altri tre analiti: questo può far pensare ad una sorgente diversa. Per i fenoli vanillici la frazione particellata sembra invece avere un andamento diverso rispetto alla disciolta: questo fa supporre che esse abbiano due differenti origini.

Si riportano in tabella 4.19 i parametri chimico-fisici relativi ad ogni campione: profondità di campionamento, fluorescenza, pH, temperatura, ossigeno disciolto e salinità.

Tabella 4.19 Parametri chimico-fisici relativi ai siti di campionamento

Campioni	Transetto	Profondità (m)	Fluorescenza (µg/L)	pH	Temperatura (°C)	O ₂ disciolto (mg/L)	Salinità (psu)
CA5_85m	A	-85	0,1148	8,13	-1,0374	9,61655	34,1937
CA6_50m		-50	0,1793	8,07	-1,1204	10,00989	34,1588
G2_50m		-50	0,1513	8,22	-1,1240	10,51692	34,0181
CI3_50m	B	-50	0,0889	8,11	-1,4017	9,44554	34,2549
CI4_50m		-50	0,0754	8,17	-0,9555	10,79609	33,8449
CI5_38m		-38	0,1158	8,12	-1,1513	10,50643	34,1853
CI6_48m		-48	0,0988	8,16	-1,2027	10,40086	34,2458
CW1_29m	C	-29	0,8165	8,26	0,2905	11,83618	34,4468
CW2_28m		-28	1,1946	8,17	-0,5011	11,84738	34,3515
CW3_22m		-22	1,0521	8,19	-0,3393	11,76516	34,4519
CW4_15m		-15	0,1242	8,33	-1,1677	11,52204	33,0498
D3_5m	D	-5	0,2459	7,65	-0,4755	11,80547	34,2003
D3_18m		-18	1,1268	8,18	-0,5564	11,78454	34,2145
D3_112m		-112	0,0146	7,89	-1,9002	9,55027	34,6488
D7_2m		-2	0,8823	7,85	-0,8026	12,28466	33,3025
D7_10m		-10	1,1187	7,85	-0,7195	12,26001	33,3781
D7_60m		-60	0,0311	7,79	-1,8603	9,63376	34,6236
D6_10m		-10	-	7,81	-	-	-
D5_10m		-10	0,6221	8,20	-0,9488	12,26812	33,0526
E3_1m		E	-1	0,0529	8,17	-1,1154	12,20127
E3_29m	-29		0,886	8,29	-0,6067	12,22970	33,3653
E3_70m	-70		0,0429	8,11	-1,1009	11,68450	34,2531
E2_29m	-29		0,3144	7,94	-1,4137	11,33016	34,0556
E1_1_5m	-1,5		0,218	7,86	-0,7276	11,78551	33,0865
E1_12m	-12		0,5949	8,30	0,1407	11,69517	33,6082
E1_70m	-70		0,0223	8,18	-1,5848	8,82857	34,5120
E6_20m	-20		-	8,32	-	-	-
F7_108m	-	-108	1,4496	8,21	-0,4533	11,12203	34,1333

Dall'analisi dei parametri chimico-fisici, per i quali sono state elaborate le distribuzioni spaziali, analogamente a quanto effettuato per gli analiti, è emersa una stretta correlazione tra i metossifenoli rilevati, la fluorescenza e l'ossigeno disciolto.

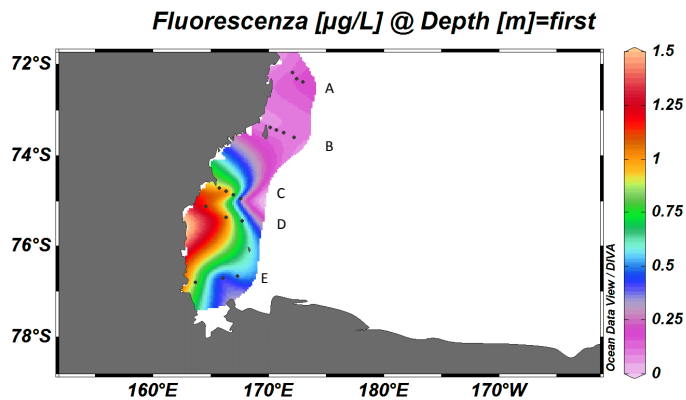


Figura 4.22 Distribuzione spaziale della fluorescenza in $\mu\text{g/L}$ nel Mare di Ross

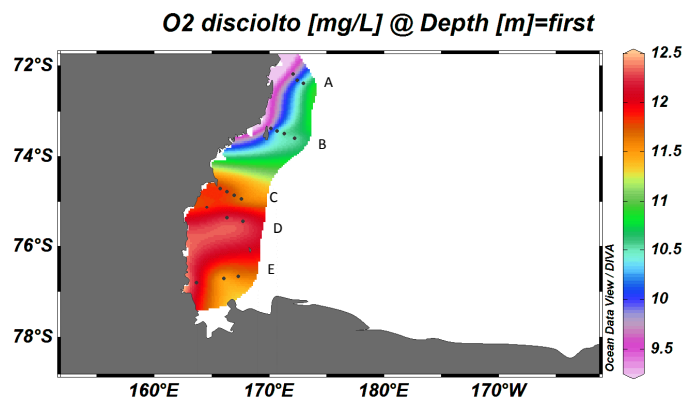


Figura 4.23 Distribuzione spaziale dell'ossigeno disciolto in mg/L nel Mare di Ross

La fluorescenza è un indice della presenza di biomassa correlata alla produzione primaria, mentre la quantità di ossigeno disciolto dipende dall'attività biologica, dalla salinità e dalla temperatura e deriva essenzialmente dall'atmosfera e dall'attività fotosintetica. Come mostrato in figura 4.22 e 4.23 i livelli maggiori di questi due parametri si trovano proprio dove le concentrazioni di vanillina, acido vanillico, acetovanillone e acido p-cumarico sono maggiori. Questo potrebbe indicare una fonte locale di metossifenoli.

Il punto di campionamento F7_108m è stato prelevato in un sito lontano dagli altri (figura 4.24), presenta il valore di fluorescenza più alto fra tutti i campioni ($1,4496 \mu\text{g/L}$, mentre il valore medio è di $0,4475 \mu\text{g/L}$) e una concentrazione elevata di acido p-cumarico pari a $32,6 \text{ ng/L}$ contro un valore medio decisamente inferiore (circa $0,4 \text{ ng/L}$). Una concentrazione così elevata potrebbe indicare una sorgente locale di acido p-cumarico. La letteratura suggerisce una possibile spiegazione a questa anomalia: Seyedsayamdost et al.⁸⁰ hanno studiato la particolare simbiosi esistente tra un'alga, *Emiliana huxleyi*, e dei batteri appartenenti alla classe dei Roseobatteri. L'alga fornisce nutrienti e superficie di colonizzazione ai batteri che a loro volta favoriscono la crescita algale e contribuiscono all'eliminazione di

parassiti. Questa microalga marina, appartenente alla specie dei coccolitofori, è ubiquitaria, è in grado di vivere anche nelle zone polari e produce acido p-cumarico come prodotto di decomposizione. La presenza di questo analita potrebbe essere dunque legata ad una fioritura locale di *Emiliana huxleyi*.

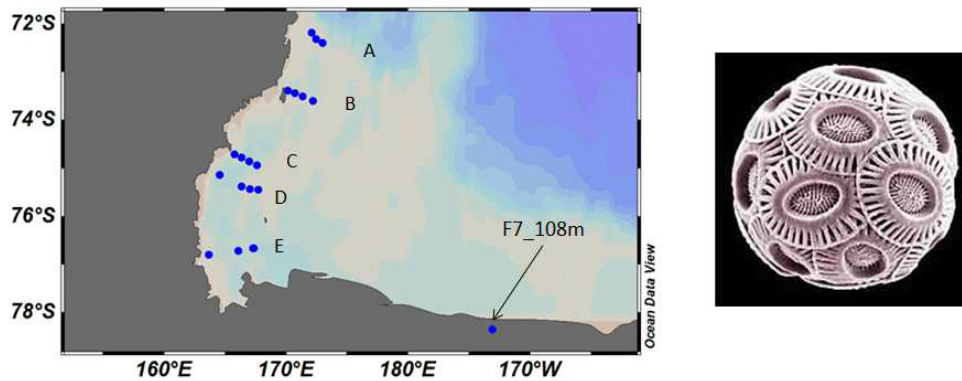


Figura 4.24 Stazione di campionamento F7_108m e l'*Emiliana huxleyi*, microalga produttrice di acido p-cumarico

La salinità presenta invece una distribuzione opposta a quella degli analiti (figura 4.25): dove i tre fenoli vanillici e l'acido p-cumarico sono più abbondanti si riscontra una salinità di 33,5 psu contro valori più alti intorno a 34,5 psu registrati vicino ai transetti A e B. In letteratura si trovano andamenti analoghi: Benner et al.¹⁶ nel loro studio sugli zuccheri e i prodotti di degradazione della lignina nelle acque del fiume Mississippi e in quelle vicine alla foce nel Golfo del Messico hanno rilevato una diminuzione della concentrazione di fenoli prodotti per ossidazione della lignina all'aumentare della salinità in diverse campagne di campionamento tra il luglio del 1990 e il luglio del 1993. Anche Moran et al.⁸¹ nel loro lavoro effettuato su campioni acquosi delle coste del sud degli Stati Uniti hanno riscontrato una significativa correlazione in negativo tra la salinità e la presenza di lignine.

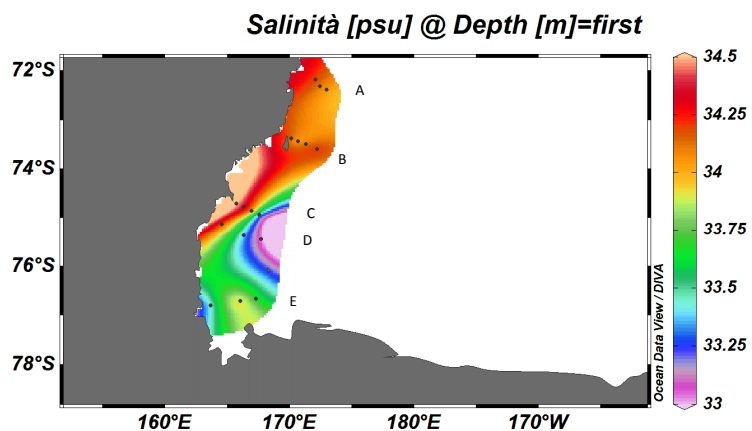


Figura 4.25 Distribuzione spaziale della salinità in psu (Practical Salinity Units) nel Mare di Ross

Inoltre è possibile osservare come i campioni raccolti nei transetti D ed E nella Baia Terranova e nella parte meridionale del Mare di Ross, caratterizzati dai livelli maggiori di metossifenoli e da minore salinità, si trovino vicino ad una pollinia che costituisce una notevole sorgente di materiale organico.⁸²

La distribuzione dei fenoli vanillici è strettamente correlata in negativo alla salinità come già evidenziato in figura 4.25, ma è legata anche alla profondità: infatti, le concentrazioni maggiori di acido vanillico, vanillina e acetovanillone si trovano per la frazione disciolta nei primi 20 metri (figura 4.26), mentre per la frazione particellata si distribuiscono nei primi 50 metri (figura 4.27).

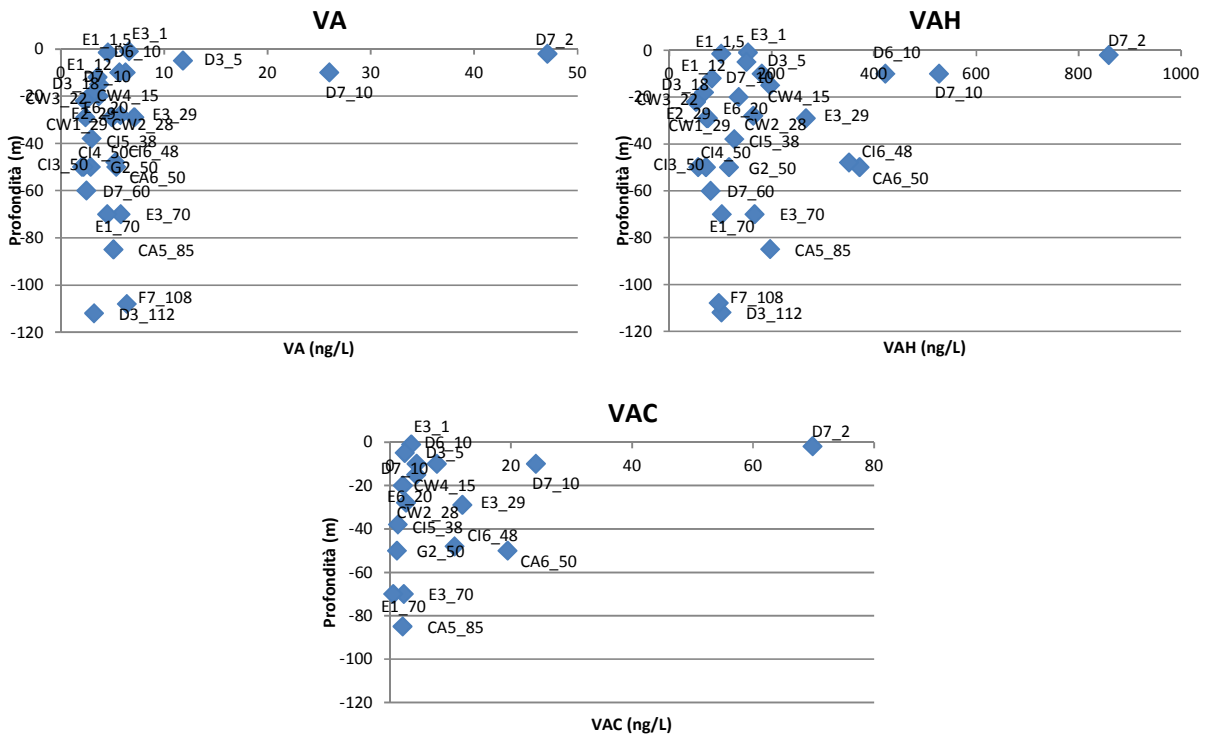
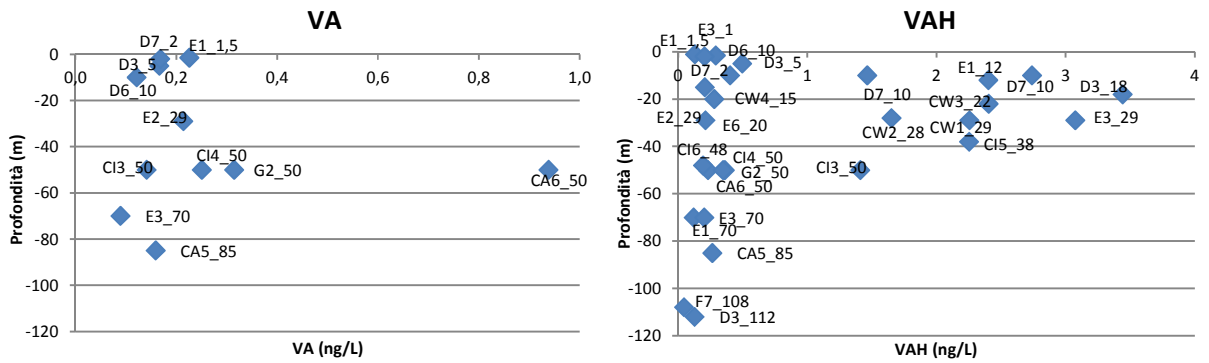


Figura 4.26 Andamento di acido vanillico, vanillina e acetovanillone nella frazione disciolta rispetto alla profondità



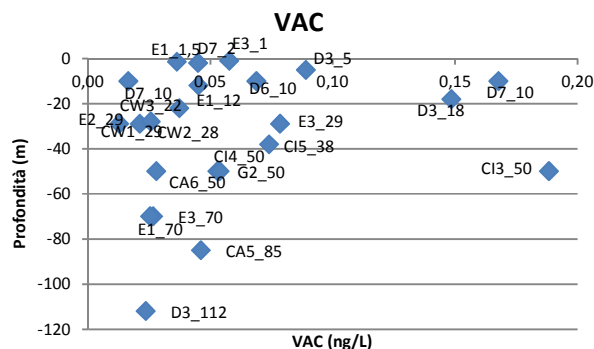


Figura 4.27 Andamento di acido vanillico, vanillina e acetovanillone nella frazione particellata rispetto alla profondità

Quando è stato possibile, sono state valutate le distribuzioni verticali degli analiti nello stesso punto di campionamento (le analisi sono state condotte su campioni prelevati a 3 profondità: un punto al livello massimo di fluorescenza, gli altri due ad una profondità maggiore e minore). Le concentrazioni più elevate di vanillina e acetovanillone nella frazione particellata sono state rilevate al massimo di fluorescenza per tutti i siti di campionamento analizzati (figura 4.28), indicando come questi composti siano presenti in maggiore concentrazione dove è maggiore la presenza di biomassa.

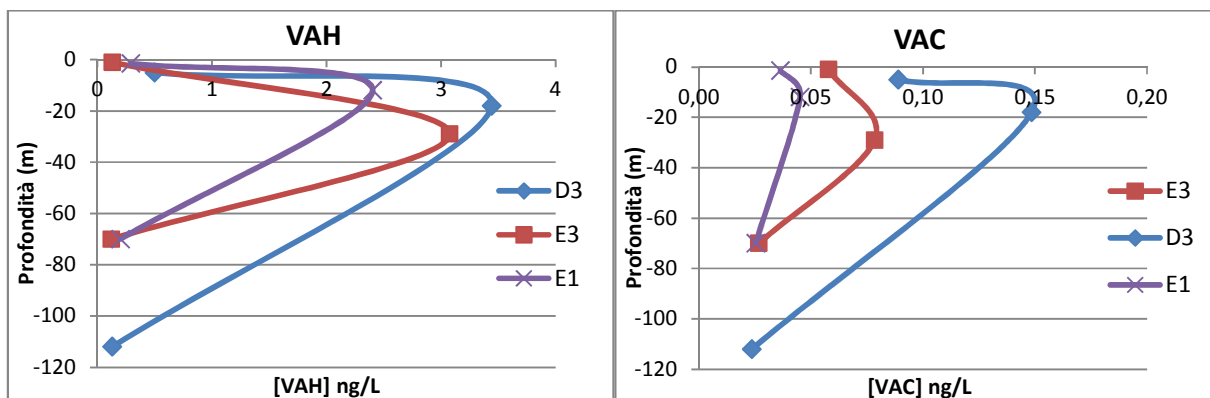


Figura 4.28 Distribuzione verticale delle concentrazioni di VAH e VAC nella frazione particellata espresse in ng/L

Lo stesso studio è stato condotto anche sulla frazione disciolta. In figura 4.29 è possibile notare come l'andamento di VA e VAH sia lo stesso considerando il medesimo sito di campionamento e come l'acetovanillone, rilevato solo nel profilo E3 (nei tre punti necessari a descrivere il profilo), sia in accordo con l'andamento dei due analiti. Si può inoltre osservare come nella frazione disciolta le concentrazioni maggiori siano presenti nella porzione superiore della colonna d'acqua, tranne che per il campione E3 che segue l'andamento della frazione particellata (concentrazione massima al massimo di fluorescenza). Nel sito E3 sono state rilevate anche le concentrazioni maggiori di acido p-cumarico per il quale si può notare lo stesso andamento osservato per la frazione particellata. Questa osservazione si accorda con i dati di letteratura⁸⁰ in cui è riportata la simbiosi e l'influenza nel ciclo vitale del *Phaeobacter gallaeciensis*

con la microalga *Emiliana huxleyi* che porta alla secrezione da parte di quest'ultima di acido p-cumarico. Nello stesso transetto, nel sito E1, si osserva la massima concentrazione di PA in corrispondenza del massimo di fluorescenza, mentre l'andamento nei siti D3 e D7 è più difficilmente interpretabile.

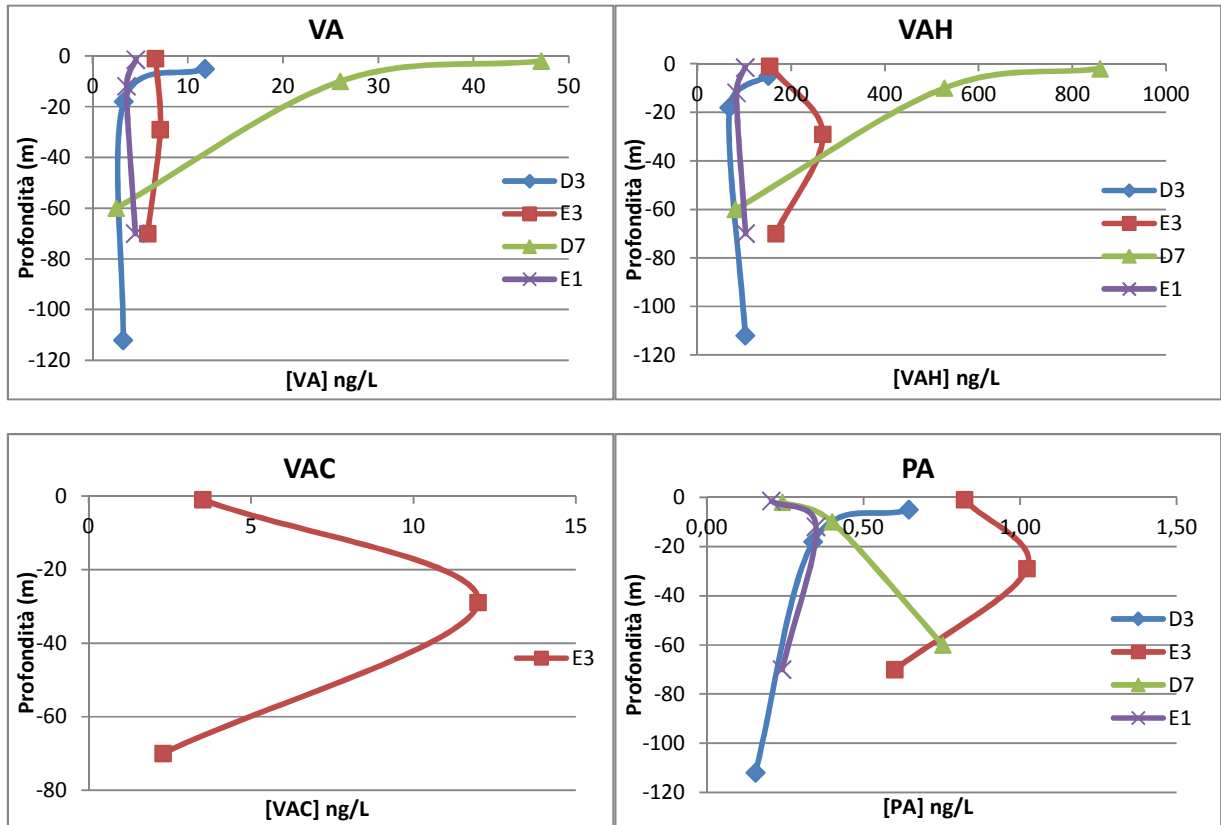


Figura 4.29 Distribuzione verticale delle concentrazioni di VA, VAH, VAC e PA nella frazione disciolta espresse in ng/L

Anche il pH (figura 4.30), seppur variabile in un piccolo intervallo tra 7,81 e 8,33, presenta i valori più bassi e vicini alla neutralità in corrispondenza dell'area a maggior concentrazione di MP.

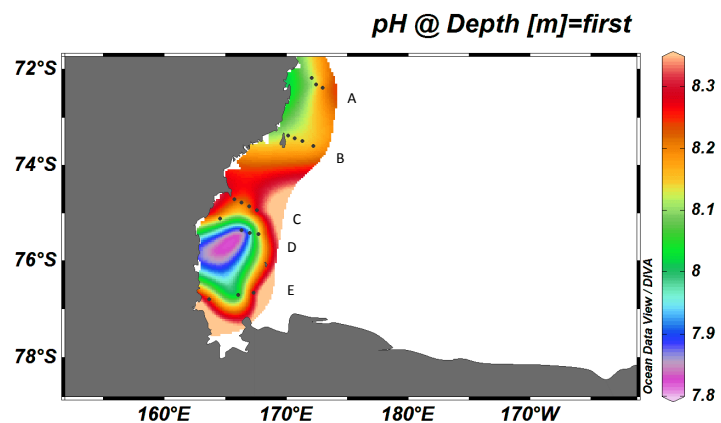


Figura 4.30 Distribuzione spaziale del pH nel Mare di Ross

Per quanto riguarda la temperatura (figura 4.31), la sua influenza sulle concentrazioni di metossifenoli risulta essere meno chiara.

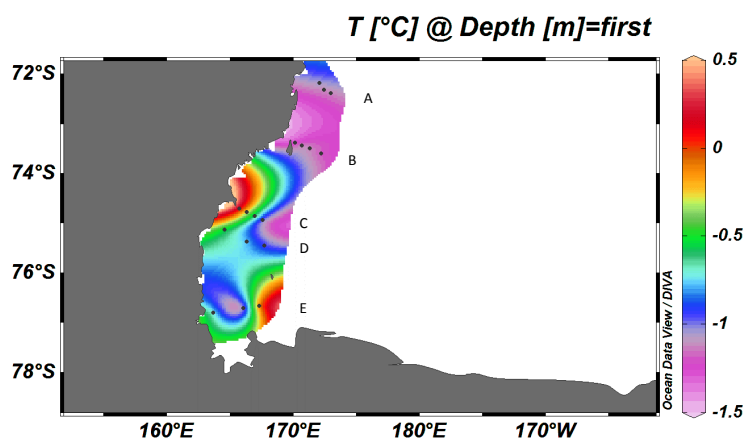


Figura 4.31 Distribuzione spaziale della temperatura in °C nel Mare di Ross

Il rapporto acido vanillico/vanillina $(Ad/Al)_v$ è un indicatore diagenetico di ossidazione biologica, nonostante sia stato dimostrato che la luce solare possa provocare una pesante variazione di tale rapporto portando a lignine altamente ossidate.⁷

Nella frazione disciolta per tutti i campioni i rapporti acido/aldeide sono risultati essere molto inferiori ad 1 con un valore medio di 0,04. In quella particellata, quando è stato possibile calcolarli (in molti casi la concentrazione di acido vanillico è inferiore al limite di rilevabilità), tali rapporti sono almeno di un ordine di grandezza superiori (valore medio 0,94) e in due campioni maggiori di 1. Nella frazione totale si riscontra invece un andamento del tutto simile alla disciolta, la quale contribuisce in maniera preponderante alla prima. Da questi dati si può dedurre la presenza di un'ossidazione maggiore nella frazione particellata, mentre in quella disciolta essa risulta essere molto scarsa. In tabella 4.20 sono riportati i valori di $(Ad/Al)_v$ nelle tre frazioni:

Tabella 4.20 $(Ad/Al)_v$ nella frazione disciolta, particellata e totale

Campioni	Transetto	$(Ad/Al)_{v,D}$	$(Ad/Al)_{v,P}$	$(Ad/Al)_{v,TOT}$
CA5_85m	A	0,03	0,60	0,03
CA6_50m		0,01	4,05	0,02
G2_50m		0,02	0,87	0,03
CI3_50m	B	0,04	0,10	0,04
CI4_50m		0,03	0,72	0,03
CI5_38m		0,02	-	0,02
CI6_48m		0,02	-	0,02
CW1_29m	C	0,03	-	0,03

CW2_28m		0,04	-	0,03	
CW3_22m		0,05	-	0,04	
CW4_15m		0,02	-	0,02	
D3_5m	D	0,08	0,33	0,08	
D3_18m		0,05	-	0,05	
D3_112m		0,03	-	0,03	
D7_2m		0,05	0,82	0,06	
D7_10m		0,05	-	0,05	
D7_60m		0,03	-	0,03	
D6_10m		0,01	0,30	0,02	
D5_10m		0,03	-	0,03	
E3_1m		E	0,04	-	0,04
E3_29m			0,03	-	0,03
E3_70m	0,03		0,73	0,04	
E2_29m	0,07		1,00	0,07	
E1_1_5m	0,04		0,78	0,05	
E1_12m	0,04		-	0,04	
E1_70m	0,04		-	0,04	
E6_20m	0,03		-	0,03	
F7_108m	-	0,07	-	0,07	

Dalla distribuzione spaziale di $(Ad/AI)_{v,D}$ (figura 4.32) si osserva come i valori più alti di tale rapporto si registrino dove la concentrazione dei fenoli vanillici nella frazione disciolta è maggiore (trasetti D ed E).

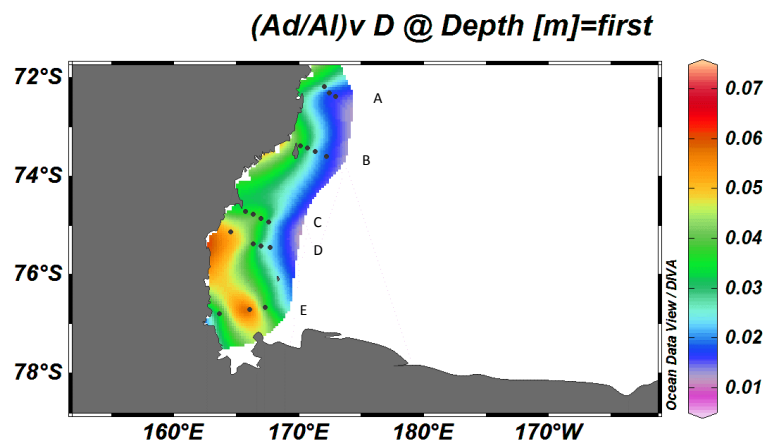


Figura 4.32 Distribuzione spaziale del rapporto acido vanillico/vanillina nella frazione disciolta

Studi di letteratura su aerosol,²³ sedimenti,⁸³ matrici vegetali⁸⁴ e acque⁸⁵ affermano che valori di $(Ad/AI)_{v,D}$ superiori a 0,5 non dipendano solo da fotoossidazione, ma derivino da ossidazione batterica di tessuti vegetali o da degradazioni fungine.

Per poter ottenere un'interpretazione più completa dei dati, soprattutto per quanto riguarda la correlazione tra gli analiti e avere un'indicazione sulle possibili sorgenti, è stata condotta un'analisi statistica dei dati.

La matrice dei dati sulla quale è stata condotta l'analisi contiene come variabili le concentrazioni di acido vanillico, vanillina e acetovanillone nella frazione disciolta e particellata, e la concentrazione di acido p-cumarico nella frazione disciolta, e come oggetti tutti i campioni prelevati al massimo di fluorescenza, in modo analogo a quanto fatto per le distribuzioni spaziali. È stato escluso il campione F7_108m e i dati mancanti sono stati sostituiti con il LOD. Su questa matrice, una volta autoscalata, è stata eseguita una *cluster analysis* e un'analisi fattoriale.

La *cluster analysis* è una tecnica multivariata che permette di individuare dei gruppi in ordine crescente di similarità senza possedere alcuna informazione a priori; si tratta di un metodo di raggruppamento che necessita della definizione di una metrica, di solito la distanza euclidea, sulla base della quale viene definito un ordine di raggruppamento fra gli oggetti. Il risultato è un grafico chiamato dendrogramma nel quale, ad una certa distanza, è possibile individuare i gruppi.

L'analisi fattoriale invece è una tecnica di analisi multivariata che trasforma le variabili originali in nuove variabili chiamate componenti principali o fattori attraverso una loro combinazione lineare; esse sono tra loro ortogonali e in ordine decrescente di varianza. Lo scopo è quello di ridurre il numero di variabili e di conseguenza la dimensionalità del sistema. Il risultato è un grafico che plotta i fattori significativi ruotando gli assi in modo da facilitare l'associazione tra variabili e fattori stessi.

Si riporta in tabella 4.21 la matrice dei dati sulla quale è stata eseguita l'analisi statistica:

Tabella 4.21 Matrice dei dati sulla quale è stata eseguita l'analisi statistica; le concentrazioni riportate sono espresse in ng/L

Campioni	profondità (m)	Transetto	VA D	VAH D	VAC D	PA D	VA P	VAH P	VAC P
CA5_85m	-85	A	5,1	197,4	2,1	0,4	0,16	0,26	0,05
CA6_50m	-50		5,4	372,0	19,4	0,3	0,94	0,23	0,03
G2_50m	-50		2,9	116,9	1,2	0,2	0,31	0,36	0,05
CI3_50m	-50	B	2,0	56,6	LOD	0,2	0,14	1,41	0,19
CI4_50m	-50		2,2	72,2	LOD	0,1	0,25	0,35	0,05
CI5_38m	-38		3,0	127,4	1,3	0,2	LOD	2,25	0,07
CI6_48m	-48		5,3	351,5	10,7	0,1	LOD	0,19	LOD
CW1_29m	-29	C	2,4	75,7	LOD	0,4	LOD	2,25	0,02
CW2_28m	-28		5,8	164,7	2,7	0,5	LOD	1,65	0,03
CW3_22m	-22		2,4	52,3	LOD	0,2	LOD	2,40	0,04
CW4_15m	-15		3,7	197,4	4,3	0,3	LOD	0,21	LOD

D3_18m	-18	D	3,3	68,4	LOD	0,3	LOD	3,44	0,15
D7_10m	-10		26,0	527,1	24,1	0,4	LOD	1,46	0,02
D6_10m	-10		6,3	422,8	7,7	0,3	0,12	0,40	0,07
D5_10m	-10		5,7	181,2	4,4	0,3	LOD	2,74	0,17
E3_29m	-29	E	7,1	267,5	12,0	1,0	LOD	3,08	0,08
E2_29m	-29		5,0	73,6	LOD	0,3	0,21	0,21	0,01
E1_12m	-12		3,6	83,3	LOD	0,3	LOD	2,40	0,05
E6_20m	-20		3,7	135,8	2,2	0,7	LOD	0,28	LOD

Dall'analisi effettuata sulla matrice autoscalata dei dati si è ottenuto un dendrogramma (figura 4.33) che mostra la presenza di 3 *cluster*. Il *cluster A* si forma ad una distanza euclidea bassa, indice di elevata correlazione, e raggruppa i tre fenoli vanillici presenti nella frazione disciolta: acetovanillone, vanillina e acido vanillico; è possibile osservare anche come i primi due si uniscano prima, segno di una maggiore correlazione. Il *cluster B* raggruppa invece acetovanillone e vanillina presenti nella frazione particellata; l'acido vanillico invece forma con l'acido p-cumarico il terzo *cluster C*.

La *cluster analysis* conferma quindi quanto ipotizzato mediante le distribuzioni spaziali: i fenoli vanillici e l'acido p-cumarico, appartenenti a due gruppi diversi, hanno probabilmente due sorgenti diverse, così come la frazione disciolta e quella particellata. Questa analisi ha però mostrato una certa "diversità" dell'acido vanillico rispetto ad acetovanillone e vanillina in entrambe le frazioni che può essere dovuta al fatto che derivi dall'ossidazione dell'aldeide.

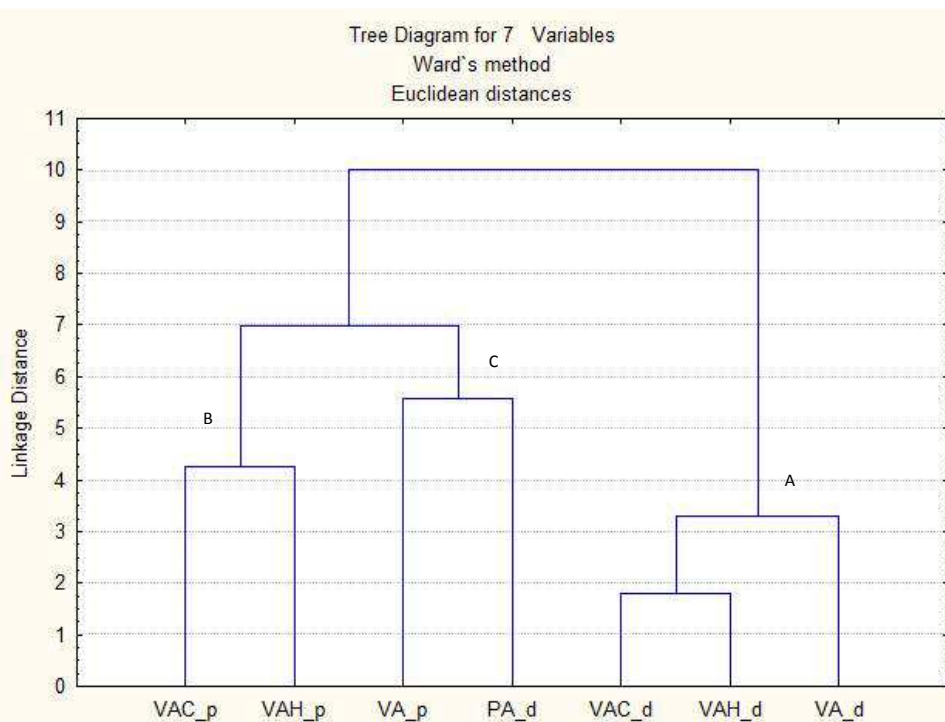


Figura 4.33 Dendrogramma relativo alla *cluster analysis*

Per avere ulteriore conferma di queste osservazioni è stata eseguita anche un'analisi fattoriale: il primo fattore spiega da solo il 42,7% della varianza, mentre i contributi degli altri sono inferiori. L'analisi statistica è stata condotta considerando 4 componenti principali che riescono a spiegare il 91,7% della varianza totale (tabella 4.22).

Tabella 4.22 Parametri di *output* dell'analisi fattoriale

	Eigenvalue	% Total - Variance	Cumulative - Eigenvalue	Cumulative - %
1	2,991476	42,73537	2,991476	42,73537
2	1,509990	21,57129	4,501466	64,30666
3	1,051551	15,02215	5,553017	79,32881
4	0,868471	12,40673	6,421488	91,73555

Dal *plot* dei primi due fattori e del quarto (figura 4.34) è possibile osservare come i tre fenoli vanillici della frazione disciolta stiano vicini nel gruppo A, mentre quelli della frazione particellata e l'acido p-cumarico abbiano un andamento completamente diverso: questo conferma quanto evidenziato dalla *cluster analysis* riguardo la diversa origine dell'acido p-cumarico dai vanillici e la diversa sorgente per la frazione disciolta e particellata.

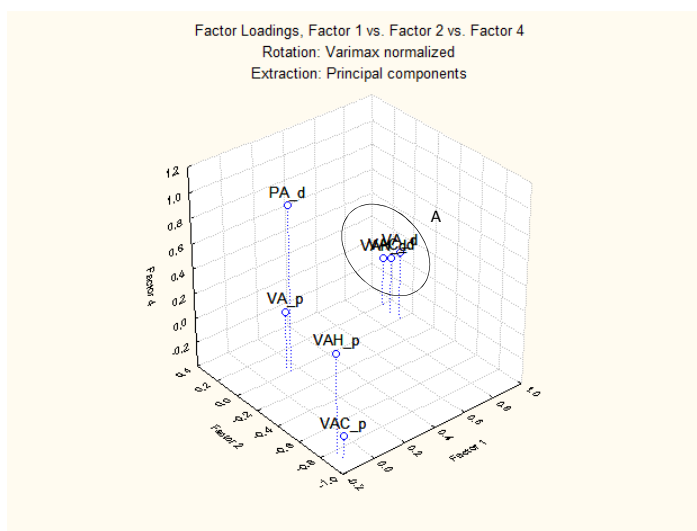


Figura 4.34 *Loading plot* dei fattori 1, 2 e 4

Plottando invece i primi tre fattori (figura 4.35) si può notare come sia il terzo fattore che differenzia l'acido vanillico dagli altri vanillici della frazione disciolta e come si possano trovare gli stessi 3 gruppi individuati mediante la *cluster analysis*.

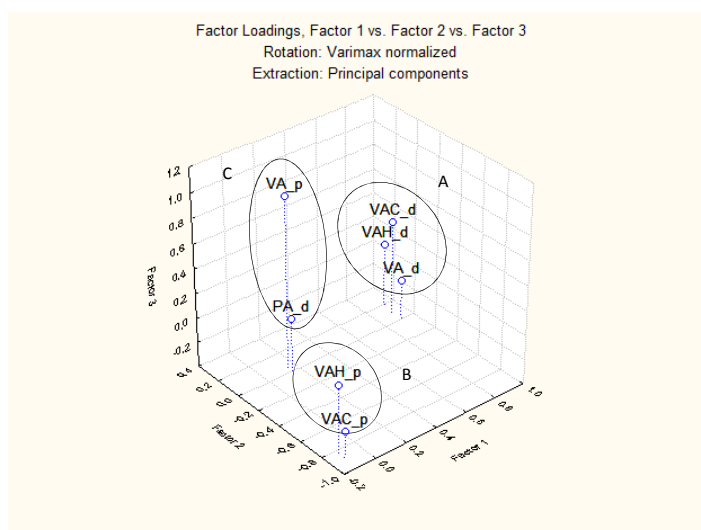


Figura 4.35 Loading plot dei fattori 1, 2 e 3

Tali raggruppamenti sono osservabili anche nella matrice dei *loadings* (tabella 4.23) in cui si può capire anche quale fattore contribuisca alla differenziazione delle variabili: il primo separa acetovanillone, vanillina e acido vanillico presenti nella frazione disciolta dagli altri analiti, il secondo differenzia vanillina e acetovanillone nel particellato dagli altri composti, il terzo e il quarto fattore separano rispettivamente l'acido vanillico particellato e l'acido p-cumarico.

Tabella 4.23 Matrice dei *Loadings*

	Factor - 1	Factor - 2	Factor - 3	Factor - 4
VA_d	0,911843	0,009224	-0,078514	0,157650
VAH_d	0,927120	0,194812	0,113996	-0,000790
VAC_d	0,911121	0,097471	0,361693	0,067532
PA_d	0,138851	-0,026244	0,053331	0,953429
VA_p	0,154901	0,043768	0,980528	0,061851
VAH_p	-0,114646	-0,823486	0,150884	0,399985
VAC_p	-0,113296	-0,881135	-0,193047	-0,223300
Expl.Var	2,590406	1,504670	1,174294	1,152118
Prp.Totl	0,370058	0,214953	0,167756	0,164588

Si può osservare quindi che le due tecniche di analisi statistica multivariata utilizzate, pur basandosi su approcci matematici diversi, portano a simili conclusioni avvalorandone i risultati.

L'analisi statistica dei dati ha evidenziato potenziali diverse origini per i metossifenoli nelle acque dell'Antartide. L'analisi dei campioni ha mostrato che le maggiori concentrazioni sono osservate nella frazione disciolta e soprattutto nelle acque più superficiali e meno saline.

Nel corso della discussione sono state accennate come possibili sorgenti di MP nelle acque marine la degradazione fotochimica⁷ e/o microbiologica delle lignine,^{8,9} la degradazione di lignine di origine algale,^{86,87} nonché la secrezione di acido p-cumarico come metabolita durante il ciclo vitale dell'*Emiliania huxleyi* e dovuta alla simbiosi con il *Phaeobacter gallaeciensis*.⁸⁰ La presenza del Bacterioplancton potrebbe essere la chiave per l'interpretazione dei dati di metossifenoli presenti soprattutto nella frazione disciolta.

Da studi di letteratura^{11,71,73} sul Mare di Ross è emerso che circa il 90% del materiale organico derivante da *bloom* fitoplanctonici si distribuisce nel materiale organico particellato (POM). Il fatto che il fitoplancton sia legato alla frazione particellata, porta ad escluderlo come responsabile diretto della presenza dei metossifenoli vanillici rilevati nella frazione disciolta.

Negli ultimi decenni sono stati compiuti diversi studi sul Bacterioplancton nelle zone polari e in particolare nel Mare di Ross. Si tratta di una specie batterica dominante in acque marine costiere in grado di degradare la lignina,⁸⁸ ma anche di decomporre rapidamente il materiale organico disciolto DOM che deriva principalmente dai *bloom* di *Phaeocystis Antarctica*.⁷¹ Nonostante la temperatura sia costantemente inferiore ai 2°C e per molto tempo si sia pensato che questo impedisse una significativa attività batterica, è stato provato non solo che i batteri siano presenti, ma siano anche piuttosto numerosi e attivi.¹⁰ Il Bacterioplancton è legato al DOM e l'attività batterica risulta essere pesantemente limitata in assenza di concentrazioni sufficienti e disponibili di materiale organico disciolto.¹⁰

Inoltre Celussi et al.⁸² hanno rilevato come le comunità batteriche nella Baia Terranova siano influenzate più dalla bassa salinità dovuta alla fusione del ghiaccio e da variabili legate alla luce, come ossigeno disciolto e fluorescenza, che dalla temperatura e dal DOC (carbonio organico disciolto), e come l'abbondanza e l'attività batterica diminuiscano con la profondità. Questo potrebbe indicare i batteri come i responsabili dell'ossidazione delle lignine di origine terrigena o algale nell'area di studio.

Ducklow et al.¹⁰ hanno condotto uno studio sul Bacterioplancton nel Mare di Ross rilevando un aumento della massa batterica tra metà ottobre e metà febbraio (figura 4.36) con un *bloom* batterico a fine gennaio che corrisponde al periodo di raccolta dei campioni analizzati nel presente lavoro di tesi.

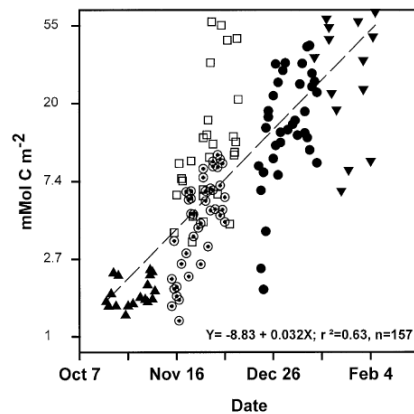


Figura 4.36 Accumulo di biomassa batterica nel Mare di Ross tra il 1994-1997¹⁰

Inoltre la *Phaeocystis Antarctica* presenta una fioritura che si sviluppa tra metà novembre e metà dicembre-inizio gennaio, mentre il *bloom* batterico ha un ritardo di un mese rispetto a quello fitoplanctonico.¹⁰ Da metà gennaio invece si registra il *bloom* delle Diatomee⁷² alle quali sono legati i Roseobatteri che vivono nelle acque superficiali di moltissimi ambienti marini, inclusi quelli polari, e sono più abbondanti in presenza di *bloom* algali.⁸⁹

Celussi et al.⁹⁰ hanno studiato le diverse comunità batteriche di Bacterioplancton nelle masse d'acqua del Mare di Ross osservando una differenza sostanziale solo fra la AASW (*Antarctic Surface Waters*) e gli altri corpi idrici presenti nel bacino: essa risulta essere più attiva e si muove nella direzione del transetto D che presenta livelli elevati di metossifenoli vanillici (figura 4.37):

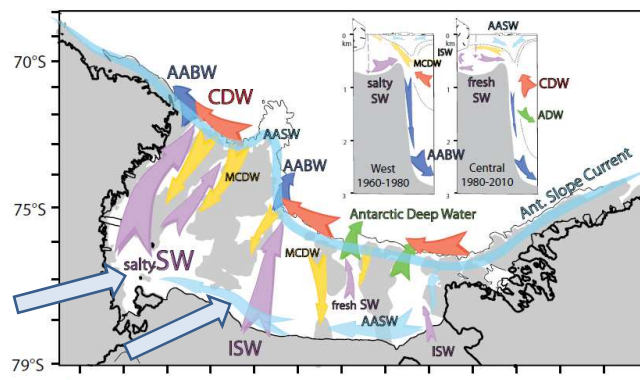


Figura 4.37 Antarctic Surface Water (AASW)⁶⁸

Quanto appena esposto e ricavato dalla letteratura sembra sostenere l'ipotesi che, oltre alla degradazione fotochimica, la degradazione microbica ad opera del Bacterioplancton sulle lignine giochi un ruolo importante.

La possibilità che nel periodo di campionamento fosse in atto una degradazione batterica sul materiale disciolto può trovare ulteriore sostegno confrontando i livelli di concentrazione dei metossifenoli in esame nei due campioni raccolti nello stesso sito di campionamento a distanza di due giorni (E1_12 campionato il 6/02/12, E6_20 l'8/02/12). La figura 4.38 mostra come la concentrazione di tutti gli analiti sia maggiore nel campione prelevato in un momento successivo e come l'incremento di acido vanillico sia inferiore rispetto agli altri composti.

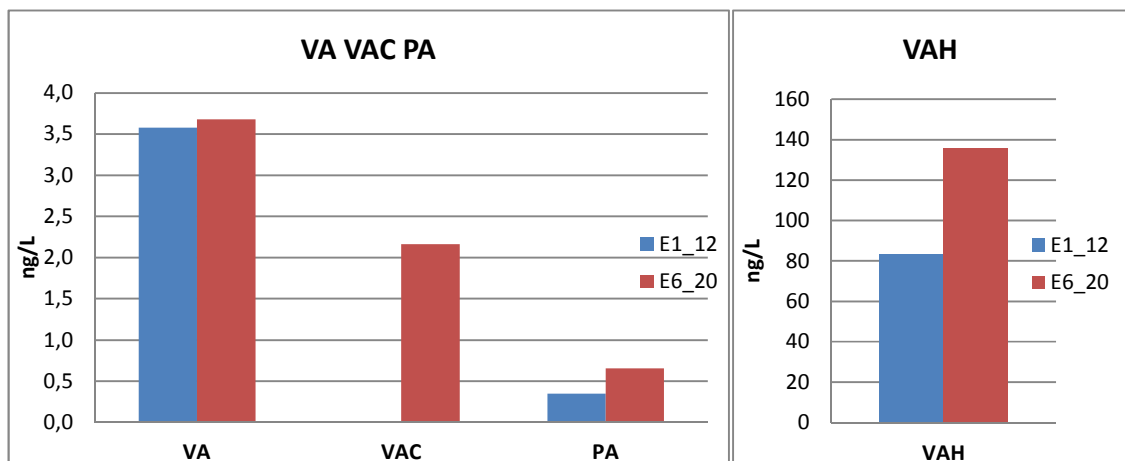


Figura 4.38 Variabilità temporale delle concentrazioni di VA, VAC, PA e VAH nella frazione disciolta

L'analisi di questi dati presenti in letteratura ha permesso di ipotizzare la diversa origine dei metossifenoli nelle due frazioni disciolta e particellata, ipotizzata anche mediante le distribuzioni spaziali e l'analisi statistica dei risultati. Inoltre ha anche evidenziato come una possibile origine dei fenoli vanillici che sarà verificata in futuro con ulteriori studi, oltre alla possibile degradazione di lignine di origine terrigena proveniente dall'apporto degli altri oceani,¹⁸ sia dovuta probabilmente alla degradazione del fitoplancton ad opera del Bacterioplancton. Esso presenta un *bloom* proprio nel periodo di raccolta dei campioni ed è preceduto dalla fioritura della *Phaeocystis Antarctica* che è la maggior componente del DOM.

CAPITOLO 5

CONCLUSIONI

Nel corso di questo lavoro di tesi è stato sviluppato un metodo per la determinazione di metossifenoli liberi (acido vanillico, vanillina, acido siringico, siringaldeide, acido omo vanillico, acido p-cumarico, acetovanillone, acido isovanillico e acetosiringone) nella frazione disciolta e particellata di acqua marina, mettendo a punto sia una metodologia preparativa che una metodica analitica strumentale per HPLC-ORBITRAP MS e HPLC/MS-MS.

Il metodo è stato validato mediante la stima di resa, esattezza, precisione, linearità della risposta strumentale, bianco procedurale, limiti di rilevabilità e di quantificazione procedurali e strumentali; la quantificazione è stata effettuata mediante il metodo dello standard interno. I LOD ottenuti mediante cromatografia liquida accoppiata a spettrometria di massa tandem, inferiori di circa un ordine di grandezza rispetto a quelli ottenuti in alta risoluzione, sono confrontabili con quelli riportati in letteratura e pari ad un valore medio di 3 pg assoluti.

Il metodo validato è stato applicato a 28 campioni reali di acqua marina raccolti durante la campagna oceanografica della XXVII spedizione in Antartide (2011/2012) nel Mare di Ross, determinando livelli di acido vanillico, vanillina, acetovanillone e acido p-cumarico sia nella frazione disciolta che particellata dell'ordine dei fg/ μ L. Di questi analiti sono state osservate le distribuzioni spaziali in entrambe le frazioni evidenziando come la loro presenza sia associata principalmente alla frazione disciolta. Inoltre i loro livelli risultano maggiori sulla costa della Terra Vittoria che al largo del Mare di Ross, nelle acque più superficiali e meno saline.

Queste osservazioni concordano con quanto riportato da altri autori relativamente alla presenza di lignine nelle aree costiere, suggerendo queste come composti precursori da cui per degradazione fotochimica e/o microbiologica si possano liberare i metossifenoli; tale degradazione può avvenire a partire da lignine di origine algale o terrigena, derivanti dall'apporto degli oceani. Inoltre per i fenoli vanillici le due frazioni disciolta e particellata sembrano avere una differente origine, come mostrato dall'analisi statistica e dalle distribuzioni spaziali. Ciò trova conferma in studi di letteratura nei quali emerge come la frazione particellata sia maggiormente legata al fitoplancton, mentre al materiale organico disciolto (DOM) sia generalmente associata la presenza del Bacterioplancton, rendendo quindi l'ipotesi della degradazione microbica particolarmente interessante. L'acido p-cumarico invece sembra legato alle alghe: esso infatti viene secreto come metabolita durante il ciclo vitale di una microalga in simbiosi con un battere.

Questo lavoro di tesi, nato dall'osservazione di metossifenoli liberi nella particelle fini dell'aerosol marino costiero antartico presso la stazione Mario Zucchelli, supporta la sorgente marina come fonte di metossifenoli nell'atmosfera antartica. Anche se ulteriori indagini volte alla determinazione di altri parametri, come DOC e nutrienti, sono necessarie, questo studio ha posto le basi per la comprensione dei processi di produzione dei metossifenoli. Essi negli ambienti marini, sia locali che remoti, non sono attribuibili esclusivamente alla degradazione per combustione della

lignina (*marker di biomass burning*), ma, come evidenziato in questo studio, sono probabilmente legati alla presenza di sorgenti e processi di degradazione biologica.

APPENDICE

STRUMENTAZIONE ANALITICA

A.1 HPLC/MS-MS

Lo strumento impiegato per la determinazione dei metossifenoli nel presente lavoro di tesi è un cromatografo liquido ad alte prestazioni (HPLC) Agilent 1100 Series HPLC System (Agilent, Waldbronn, Germania) accoppiato ad uno spettrometro di massa a triplo quadrupolo *Applied Biosystem* API 4000 (Biosystem/MDS SCIEX, Concord, Ontario, Canada).

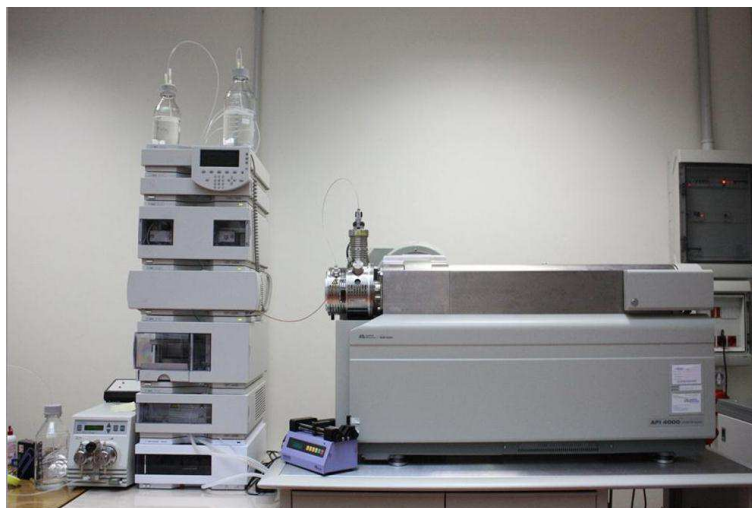


Figura A.1 Lo strumento HPLC/MS-MS

La cromatografia liquida è la tecnica separativa più utilizzata in quanto consente la separazione di composti polari, non volatili o termicamente labili, permette di effettuare determinazioni quantitative molto accurate e trova applicazione in vari campi, come quello industriale, farmaceutico e ambientale. Si basa sulla ripartizione dell'analita tra una fase stazionaria e una fase mobile in grado di dissolvere l'analita e competere con la fase stazionaria stessa che è formata da particelle solide dal diametro molto piccolo impaccate in colonne. Questa tecnica necessita però di un rivelatore per gli analiti: in questo lavoro è stato impiegato uno spettrometro di massa che usa come analizzatore un triplo quadrupolo. Esso identifica i composti sulla base del rapporto massa/carica (m/z) degli ioni, è molto selettivo e sensibile grazie alla riduzione del rumore di fondo.

L'HPLC è costituito dalle seguenti componenti:

- i serbatoi dei solventi che contengono le fasi mobili, di solito A acqua e B solvente organico
- il degasatore che elimina le tracce di aria dai solventi
- la pompa binaria che aspira la fase mobile e la porta al miscelatore
- l'autocampionatore termostato dove, mediante un braccio meccanico, avvengono le iniezioni dei campioni
- il pannello di controllo con il quale si comanda il cromatografo impostando ad esempio il flusso in colonna e la composizione della fase mobile
- il vano colonna dove è collocata la colonna analitica

L'analisi è stata effettuata mediante una cromatografia a fase inversa: la fase stazionaria è apolare e costituita da una base di silice neutra alla quale sono legate delle catene C₁₈, mentre la fase mobile è polare formata da acqua e una miscela metanolo/acetonitrile; per primi vengono eluiti gli analiti più polari, poi via via quelli più apolari.

Lo spettrometro di massa è uno strumento che analizza gli analiti in fase gassosa, a seguito di ionizzazione e frammentazione, sulla base del rapporto m/z degli ioni. È formato dalle seguenti parti:

- la sorgente di ionizzazione dove le molecole neutre sono ionizzate e accelerate verso il sistema analizzatore
- l'analizzatore che separa i vari ioni in base al rapporto massa/carica
- il *detector* che rileva gli ioni in uscita dall'analizzatore
- un sistema di pompaggio per generare e mantenere il vuoto all'interno dello strumento

La sorgente di ionizzazione impiegata nel presente lavoro di tesi è la sorgente ESI (ionizzazione elettrospray): si tratta di una tecnica di ionizzazione per elettronebulizzazione che viene condotta a temperature e pressioni atmosferiche. La soluzione in uscita dalla colonna cromatografica viene pompata attraverso un ago capillare mantenuto ad un elevato potenziale elettrico nella camera di ionizzazione, dove viene nebulizzata. Grazie al campo elettrico si forma uno *spray* di minuscole goccioline cariche che viene fatto passare attraverso l'apertura del controlettrodo formata da un capillare desolvante e uno *skimmer*. Nello spazio compreso tra il controlettrodo e la punta del capillare avviene l'evaporazione del solvente grazie al flusso di un gas ausiliario inerte e a due getti (*turbo heaters*) di gas riscaldato con un'angolazione di 45°. Con la desolvatazione le goccioline diventano sempre più piccole e la loro densità di carica aumenta fino a quando la tensione superficiale non riesce più a sopportare la repulsione coulombiana tra le cariche (limite di Rayleigh) e avviene un'esplosione coulombiana che disgrega ogni gocciolina in altre più piccole. Questo processo continua fino a quando non è stato rimosso tutto il solvente dall'analita con formazione di ioni desolvati gassosi carichi.

L'analizzatore è un triplo quadrupolo: il primo e l'ultimo sono analizzatori quadrupolari, mentre quello intermedio costituisce la cella di collisione. Prima dei tre quadrupoli ne è presente un altro (Q0) che focalizza gli ioni generati dalla sorgente di ionizzazione nel primo quadrupolo Q1 che seleziona un particolare ione (ione precursore) e lo invia al Q2. Qui lo ione colpisce un gas di collisione (N₂) e si frammenta formando gli ioni frammento che vengono selezionati in Q3. Infine gli ioni vengono rilevati dal *detector*, che è un moltiplicatore di elettroni a dinodo continuo che, attraverso l'emissione secondaria di elettroni, genera un segnale elettrico che viene amplificato per produrre lo spettro di massa. Nel presente lavoro di tesi l'acquisizione dei dati è avvenuta in modalità MRM (figura A.2): il Q1 seleziona lo ione precursore da analizzare e lo invia al Q2 dove viene

frammentato, mentre il Q3 seleziona gli ioni frammento scelti come ione quantificatore e qualificatore.

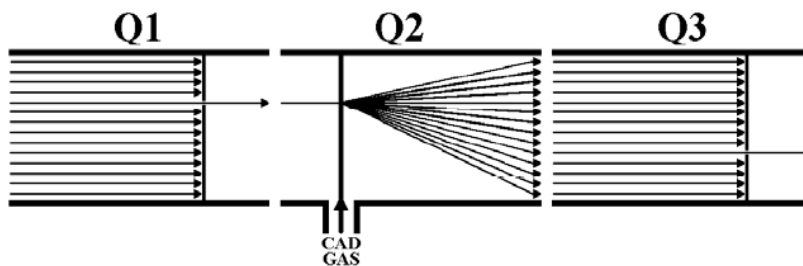


Figura A.2 Multiple Reaction Monitoring MRM

A.2 HPLC-ORBITRAP MS

Lo strumento utilizzato nel presente lavoro di tesi è un cromatografo liquido ad ultra alte prestazioni (UHPLC) UltiMate 3000 (Dionex Softron GmbH, Thermo Fisher Scientific Inc., Germering, Germany) accoppiato ad uno spettrometro di massa ad alta risoluzione LTQ Orbitrap XL (Thermo Fisher Scientific, USA Waltham, Massachusetts).



Figura A.3 Lo strumento HPLC-ORBITRAP MS

L'UHPLC è formato dalle seguenti componenti:

- il degasatore che permette di rimuovere eventuali bolle presenti nelle fasi mobili che potrebbero compromettere l'efficienza cromatografica e il funzionamento dei rivelatori
- il vano per l'alloggiamento delle due pompe, una pompa analitica che lavora ad un flusso massimo di 5 mL/min e una nano pompa che raggiunge gli 1,5 μ L/min
- il vano termostato dove alloggia la colonna analitica ed eventuale pre-colonna
- l'autocampionatore termostato

Lo spettrometro di massa invece è formato dalle seguenti parti (figura A.4):

- la sorgente ionica
- la zona di interfaccia e di focalizzazione degli ioni
- la trappola ionica
- la C-Trap, ovvero un dispositivo intermedio di stoccaggio degli ioni richiesto per iniezioni di ioni in brevi impulsi
- l'analizzatore Orbitrap per l'analisi in alta risoluzione
- la cella di collisione per frammentazioni HCD ad alta energia

L'LTQ Orbitrap XL è uno spettrometro di massa "ibrido" in quanto sono presenti tre analizzatori di massa: la trappola ionica, l'Orbitrap e la cella di collisione (figura A.4). Per questo motivo può operare in varie modalità: in questo lavoro di tesi è stato impiegato in *full scan*, modalità che analizza in alta risoluzione (caratteristica dell'analizzatore Orbitrap) tutti gli ioni prodotti dalla sorgente in un certo intervallo di massa. È possibile lavorare anche a bassa risoluzione eseguendo l'analisi in *full scan* e la frammentazione degli ioni impiegando la trappola ionica; gli ioni frammento poi sono analizzati tramite i suoi *detectors* SEM in bassa risoluzione, altrimenti in alta risoluzione tramite l'Orbitrap. La frammentazione può avvenire anche nella cella di collisione, che può utilizzare solo l'Orbitrap come analizzatore.

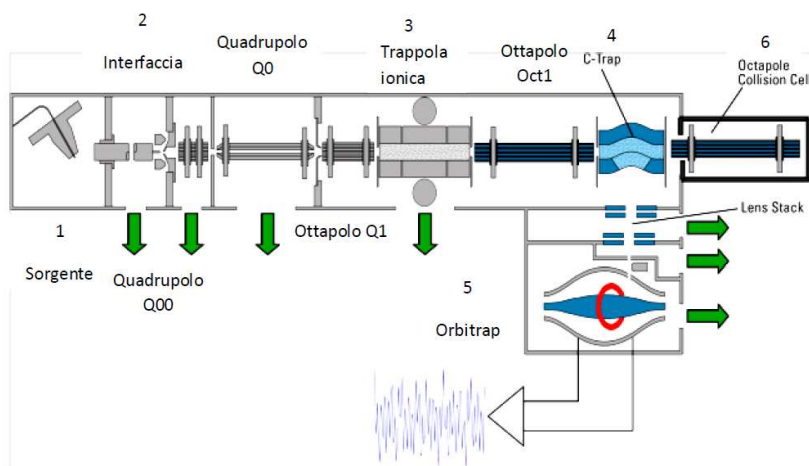


Figura A.4 Schema dello strumento LTQ Orbitrap XL

La sorgente di ionizzazione è una sorgente ESI che permette la trasmissione degli ioni all'analizzatore senza perturbarne il vuoto. Si tratta di una sorgente "soft" in quanto provoca una scarsa frammentazione del campione generando ioni molecolari protonati o deprotonati, oppure addotti con specie ioniche, come Na^+ e K^+ .

All'uscita dalla sorgente ionica gli ioni passano attraverso un'interfaccia e un sistema formato da due quadrupoli Q00 e Q0 e un ottapolo Q1 che consentono la focalizzazione e l'accelerazione degli ioni verso zone a pressione via via minore fino a convogliarli nella trappola ionica lineare.

La trappola ionica è un analizzatore di massa che può immagazzinare, isolare e frammentare gli ioni per poi rilevarli mediante i suoi *detectors* oppure inviarli all'Orbitrap per l'analisi in alta risoluzione. Variando i potenziali continuo e a radiofrequenze è possibile espellere sequenzialmente gli ioni in base al loro rapporto m/z , mentre variando solo il potenziale a radiofrequenze la trappola prima espelle tutti gli ioni tranne alcuni (ioni precursori) che frammenta per collisione con le molecole di un gas inerte (N_2) presente al suo interno, per poi espellere gli ioni prodotto in base al rapporto m/z .

Gli ioni provenienti dalla trappola lineare percorrono un ottapolo RF e raggiungono la C-Trap, una trappola lineare curva contenente gas che ne diminuisce l'energia e li invia all'analizzatore. I voltaggi applicati agli elettrodi della C-Trap creano una barriera di potenziale lungo il suo asse che consente di "impacchettare" gli ioni in uno stretto fascio che viene poi focalizzato mediante delle lenti fino all'entrata dell'Orbitrap.

L'Orbitrap è costituito da un elettrodo interno a forma di fuso (figura A.5), posto coassialmente ad un elettrodo esterno a forma di campana; impiega campi elettrici per trattenere gli ioni al suo interno. Nell'analizzatore gli ioni con traiettoria stabile ruotano attorno ad un elettrodo centrale con oscillazioni armoniche lungo il suo asse. La frequenza ω di tali oscillazioni è proporzionale al rapporto m/z ($\omega = \sqrt{\frac{k}{m/z}}$). L'oscillazione degli ioni produce una corrente immagine, rilevata dalle due metà dell'elettrodo esterno, dalla quale mediante una FTT (Trasformata di Fourier veloce), si ottengono le frequenze di oscillazione dei vari ioni e di conseguenza il loro rapporto m/z . Quando tutti gli ioni sono entrati nella trappola orbitalica ha inizio la rilevazione delle correnti immagine.

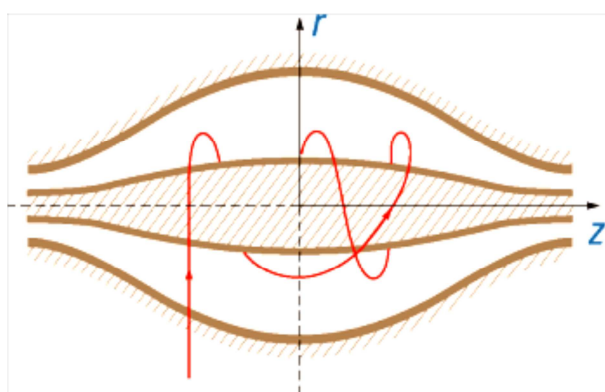


Figura A.5 L'analizzatore Orbitrap

La cella di collisione infine è formata da un multipolo all'interno del quale si trova un gas (N_2) le cui molecole collidendo con gli ioni precursori generano gli ioni frammento che sono inviati mediante la C-Trap all'Orbitrap che li analizza in alta risoluzione.

BIBLIOGRAFIA

1. C. D. Simpson, M. Paulsen, R. L. Dills, L. J. S. Liu, D. A. Kalman, *Determination of methoxyphenols in ambient atmospheric particulate matter: tracers for wood combustion*, *Environmental Science & Technology*, 2005, vol. 39, pp. 631-637.
2. D. Oros, B. R. T. Simoneit, *Identification and emission factors of molecular tracers in organic aerosol from biomass burning Part 1. Temperate climate conifers*, *Applied Geochemistry*, 2001, vol. 16, pp. 1513-1544.
3. D. Oros, B. R. T. Simoneit, *Identification and emission factors of molecular tracers in organic aerosols from biomass burning Part 2. Deciduous trees*, *Applied Geochemistry*, 2001, vol. 16, pp. 1545-1565.
4. B. R. T. Simoneit, J. J. Schauer, C. G. Nolte, D. R. Oros, V. O. Elias, M. P. Fraser, W. F. Rogge, G. R. Cass, *Levoglucosan, a tracer for cellulose in biomass burning and atmospheric particles*, *Atmospheric Environment*, 1999, vol. 33, pp. 173-182.
5. B. R. T. Simoneit, W. F. Rogge, M. A. Mazurek, L. J. Standley, L. M. Hildemann, G. R. Cass, *Lignin pyrolysis products, lignans, and resin acids as specific tracers of plant classes in emissions from biomass combustion*, *Environmental Science & Technology*, 1993, vol. 27, pp. 2533-2541.
6. J. I. Hedges, D. C. Mann, *The characterization of plant tissues by their lignin oxidation products*, *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 1979, vol. 43, pp. 1803-1807.
7. S. Opsahl, R. Benner, *Photochemical reactivity of dissolved lignin in river and ocean waters*, *Limnology Oceanography*, 1998, vol. 43, pp. 1297-1304.
8. D. L. Crawford, R. L. Crawford, *Microbial degradation of lignin*, *Enzyme and Microbial Technology*, 1980, vol. 2, pp. 11-22.
9. R. Vicuña, *Bacterial degradation of lignin*, *Enzyme and Microbial Technology*, 1988, vol. 10, pp. 646-655.

10. H. Ducklow, C. Carlson, M. Church, D. Kirchman, D. Smith, G. Steward, *The seasonal development of the Bacterioplankton bloom in the Ross Sea, Antarctica, 1994-1997*, Deep-Sea Research II, 2001, vol. 48, pp. 4199-4221.
11. A. Bergamasco, V. Defendi, P. Del Negro, S. Fonda Umani, *Effects of the physical properties of water masses on microbial activity during an Ice Shelf Water overflow in the central Ross Sea*, Antarctic Science, 2003, vol. 15, pp- 405-411.
12. T. K. Kirk, R. L. Farrell, *Enzymatic "combustion": the microbial degradation of lignin*, Annual Review of Microbiology, 1987, vol. 41, pp. 465-505.
13. K. E. L. Eriksson, R. A. Blanchette, P. Ander, *Microbial and enzymatic degradation of wood and wood components*, Berlino, Springer-Verlag, 1990.
14. K. E. Hammel, *Fungal degradation of lignin*, Driven by nature: plant litter quality and decomposition, 1997, pp. 33-45.
15. X. Li, T. Zhang, S. Sun, H. Lan, T. Yu, *Lignin in marine environment and its analysis – A Review*, Journal Ocean University of China (Oceanic and coastal sea research), 2012, vol. 11, pp. 501-506.
16. R. Benner, S. Opsahl, *Molecular indicators of the sources and transformations of dissolved organic matter in the Mississippi river plume*, Organic Geochemistry, 2001, vol. 32, pp. 597-611.
17. G. D. Onstad, D. E. Canfield, P. D. Quay, J. I. Hedges, *Sources of particulate organic matter in rivers from the continental USA: Lignin phenol and stable carbon isotope compositions*, Geochimica et Cosmochimica Acta, 2000, vol. 64, pp. 3539-3546.
18. S. Opsahl, R. Benner, *Distribution and cycling of terrigenous dissolved organic matter in the ocean*, Nature, 1997, vol. 386, pp. 480-482.
19. L. Cotrim da Cunha, L. Serve, F. Gadel, J.-L. Blazi, *Lignin-derived phenolic compounds in the particulate organic matter of a French Mediterranean river: seasonal and spatial variations*, Organic Geochemistry, 2001, vol. 32, pp. 305-320.

20. J. M. Lobbes, H. P. Fitznar, G. Kattner, *Biogeochemical characteristics of dissolved and particulate organic matter in Russian rivers entering the Arctic Ocean*, *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 2000, vol. 64, pp. 2973-2983.
21. D. Fabbri, F. Sangiorgi, I. Vassura, *Pyrolysis-GC-MS to trace terrigenous organic matter in marine sediments: a comparison between pyrolytic and lipid markers in the Adriatic Sea*, *Analytica Chimica Acta*, 2005, vol. 530, pp. 253-261.
22. D. W. Page, *Characterisation of organic matter in sediment from Corin Reservoir, Australia*, *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 2003, vol. 70, pp. 169-183.
23. K. M. Shakya, P. Louchouart, R. J. Griffin, *Lignin-derived phenols in Houston aerosols: implications for natural background sources*, *Environmental Science & Technology*, 2011, vol. 45, pp. 8268-8275.
24. C. D. Simpson, M. Paulsen, R. L. Dills, L. J. S. Liu, D. A. Kalman, *Determination of methoxyphenols in ambient atmospheric particulate matter: Tracers for wood combustion*, *Environmental Science & Technology*, 2005, vol. 39, pp. 631-637.
25. M. A. Bari, G. Baumbach, B. Kuch, G. Scheffknecht, *Temporal variation and impact of wood smoke pollution on a residential area in southern Germany*, *Atmospheric Environment*, 2010, vol. 44, pp. 3823-3832.
26. S. J. Dutton, D. E. Williams, J. K. Garcia, S. Vedal, M. P. Hannigan, *PM(2.5) characterization for time series studies: Organic molecular marker speciation methods and observations from daily measurements in Denver*, *Atmospheric Environment*, 2009, vol. 43, pp. 2018-2030.
27. S. B. Hawthorne, M. S. Krieger, D. J. Miller, M. B. Mathiason, *Collection and quantitation of methoxylated phenol tracers for atmospheric pollution from residential wood stoves*, *Environmental Science & Technology*, 1989, vol. 23, pp. 470-475.
28. R. Amarowicz, S. Weidner, *Content of phenolic acids in rye caryopses determined using DAD-HPLC method*, *Czech Journal of Food Sciences*, 2001, vol. 19, pp. 201-205.

29. S. Kuwatsuka, H. Shindo, *Behavior of phenolic substances in the decaying process of plants: I. Identification and quantitative determination of phenolic acids in rice straw and its decayed product by Gas Chromatography*, Soil Science and Plant Nutrition, 1973, vol. 19, pp. 219-227.
30. K. I. Priyadarsini, S. N. Guha, M. N. A. Rao, *Physico-chemical properties and antioxidant activities of methoxy phenols*, Free Radical Biology and Medicine, 1998, vol. 24, pp. 933-941.
31. L. Barros, M.-J. Ferreira, B. Queiros, I. C. F. R. Ferreira, P. Baptista, *Total phenols, ascorbic acid, β -carotene and lycopene in Portuguese wild edible mushrooms and their antioxidant activities*, Food Chemistry, 2007, vol. 103, pp. 413-419.
32. P. Mattila, J. Kumpulainen, *Determination of free and total phenolic acids in plant-derived foods by HPLC with Diode-Array Detection*, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2002, vol. 50, pp. 3660-3667.
33. A. Michalkiewicz, M. Biesaga, K. Pyrzyńska, *Solid-phase extraction procedure for determination of phenolic acids and some flavonols in honey*, Journal of Chromatography A, 2008, vol. 1187, pp. 18-24.
34. R. Mateos, J. L. Espartero, M. Trujillo, J. J. Rios, M. L. Camacho, F. Alcludia, A. Cert, *Determination of phenols, flavones, and lignans in virgin olive oils by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography with diode array ultraviolet detection*, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2001, vol. 49, pp. 2185-2192.
35. M. Tsimidou, G. Papadopoulos, D. Boskou, *Determination of phenolic compounds in virgin olive oil by reversed-phase HPLC with emphasis on UV detection*, Food Chemistry, 1992, vol. 44, pp. 53-60.
36. M. A. R. Delgado, S. Malovaná, J. P. Perez, T. Borges, F. J. G. Montelongo, *Separation of phenolic compounds by high-performance liquid chromatography with absorbance and fluorimetric detection*, Journal of Chromatography A, 2001, vol. 912, pp. 249-257.
37. L. Barros, M. Dueñas, I. C. F. R. Ferreira, P. Baptista, C. S. Buelga, *Phenolic acids determination by HPLC-DAD-ESI/MS in sixteen different Portuguese wild mushrooms species*, Food and Chemical Toxicology, 2009, vol. 47, pp. 1076-1079.

38. J. Michałowicz, *The natural and anthropogenic processes responsible for the presence of methoxyphenols in ecosystems and human surrounding*, Rocznik Ochrona Środowiska (Annual Set the Environment Protection), 2008, vol. 10, pp. 143-164.
39. M. S. Virk, P. Issenberg, *Effects of phenol and 2,6-dimethoxyphenol (syringol) in vivo formation of N-nitromorpholine in rats*, Carcinogenesis, 1976, vol. 7, pp. 867-870.
40. S. M. Kumbar, G. V. Shanbhag, S. B. Halligudi, *Synthesis of monoallyl guaiacol via allylation using HY zeolite*, Journal of Molecular Catalysis A: Chemical, 2006, vol. 244, pp. 278-282.
41. S. Reale, A. Di Tullio, N. Spreti, F. De Angelis, *Mass spectrometry in the biosynthetic and structural investigation of lignins*, Mass Spectrometry Reviews, 2003, vol. 23, pp. 115-120.
42. R. Keil, K. Salemme, B. Forrest, J. Neibauer, M. Logsdon, *Differential presence of anthropogenic compounds dissolved in the marine waters of Puget Sound, WA and Barkley Sound, BC*, Marine Pollution Bulletin, 2011, vol. 62, pp. 2404-2411.
43. J. M. Lobbes, H. P. Fitznar, G. Kattner, *High-performance liquid chromatography of lignin-derived phenols in environmental samples with Diode Array Detection*, Analytical Chemistry, 1999, vol. 71, pp. 3008-3012.
44. B. Krimmel, F. Swoboda, S. Solar, G. Reznicek, *OH-radical induced degradation of hydroxybenzoic- and hydroxycinnamic acids and formation of aromatic products- A gamma radiolysis study*, Radiation Physics and Chemistry, 2010, vol. 79, pp. 1247-1254.
45. D. Hoffmann, Y. Iinuma, H. Herrmann, *Development of a method for fast analysis of phenolic molecular markers in biomass burning particles using high performance liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionisation mass spectrometry*, Journal of Chromatography A, 2007, vol. 1143, pp. 168-175.
46. J. I. Hedges, J. R. Ertel, *Characterization of lignin by gas capillary chromatography of cupric oxide oxidation products*, Analytical Chemistry, 1982, vol. 54, pp. 174-178.
47. R. G. Keil, J. A. Neibauer, *Analysis of cooking spices in natural waters*, Limnology and Oceanography: Methods, 2009, vol. 7, pp. 848-855.

48. P. Louchouart, S. Opsahl, R. Benner, *Isolation and quantification of dissolved lignin from natural waters using Solid-Phase Extraction and GC/MS*, *Analytical Chemistry*, 2000, vol. 72, pp. 2780-2787.
49. P. Louchouart, R. M. W. Amon, S. Duan, C. Pondell, S. M. Seward, N. White, *Analysis of lignin-derived phenols in standard reference materials and ocean dissolved organic matter by gas chromatography/tandem mass spectrometry*, *Marine Chemistry*, 2010, vol. 118, pp. 85-97.
50. J. Ralph, R. D. Hatfield, *Pyrolysis-GC-MS characterization of forage materials*, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1991, vol. 39, pp. 1426-1437.
51. C. A. Mullen, A. A. Boateng, *Catalytic pyrolysis-GC/MS of lignin from several sources*, *Fuel Processing Technology*, 2010, vol.91, pp. 1446-1458.
52. M. A. Goñi, J. I. Hedges, *Lignin dimers: Structures, distribution, and potential geochemical applications*, *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 1992, vol. 56, pp. 4025-4043.
53. T. Zhang , X. Li, S. Sun, H. Lan, P. Du, M. Wang, *Determination of lignin in marine sediment using alkaline cupric oxide oxidation-Solid Phase Extraction-on-Column Derivatization-Gas Chromatography*, *Journal Ocean University of China (Oceanic and coastal sea research)*, 2013, vol. 12, pp. 63-69.
54. F. Edelkraut, U. Brockmann, *Simultaneous determination of carboxylic acids and carbonyl compounds in estuaries by HPLC*, *Chromatographia*, 1990, vol. 30, pp. 432-435.
55. B. Charrière, F. Gadel, L. Serve, *Nature and distribution of phenolic compounds in water and sediments from Mediterranean deltaic and lagunal environments*, *Hydrobiologia*, 1991, vol. 222, pp. 89-100.
56. J. O. Metzger, C. Bicke, O. Faix, W. Tuszynski, R. Angermann, M. Karas, K. Strupat, *Matrix-assisted laser desorption mass spectrometry of lignins*, *Angewandte Chemie International Edition in English*, 1992, vol. 31, pp. 762-764.

57. Y. Iinuma, H. Herrmann, *Method development for the analysis of particle phase substituted methoxy phenols and aromatic acids from biomass burning using capillary electrophoresis/electrospray ionization mass spectrometry (CE/ESI-MS)*, *Journal of Chromatography A*, 2003, vol. 1018, pp. 105-115.
58. R. H. J. Creighton, R. D. Gibbs, H. Hibbert, *Studies on lignin and related compounds. LXXV. Alkaline nitrobenzene oxidation of plant materials and application to taxonomic classification*, *Journal of the American Chemical Society*, 1944, vol. 66, pp. 32-37.
59. M. A. Goñi, S. Montgomery, *Alkaline CuO oxidation with a microwave digestion system: Lignin analysis of geochemical samples*, *Analytical Chemistry*, 2000, vol. 72, pp. 3116-3121.
60. D. J. Clifford, D. M. Carson, D. E. McKinney, J. M. Bortiatynski, P. G. Hatcher, *A new rapid technique for the characterization of lignin in vascular plants: thermochemolysis with tetramethylammonium hydroxide (TMAH)*, *Organic Geochemistry*, 1995, vol. 23, pp. 169-175.
61. F. Shadkani, B. B. Sithole, R. Helleur, *Rapid screening of hardwood and softwood lignin using low temperature thermochemolysis with a GC injection port*, *Organic Geochemistry*, 2010, vol. 41, pp. 586-594.
62. G. R. Aiken, E. M. Thurman, R. L. Malcolm, *Comparison of XAD macroporous resins for the concentration of fulvic acid from aqueous solution*, *Analytical Chemistry*, 1979, vol. 51, pp. 1799-1803.
63. R. G. M. Spencer, G. R. Aiken, R. Y. Dyda, K. D. Butler, B. A. Bergamaschi, P. J. Hernes, *Comparison of XAD with other dissolved lignin isolation techniques and a compilation of analytical improvements for the analysis of lignin in aquatic settings*, *Organic Geochemistry*, 2010, vol. 41, pp. 445-453.
64. P. C. Rodrigues Pinto, E. A. Borges da Silva, A. E. Rodrigues, *Comparative study of Solid-Phase Extraction and Liquid-Liquid Extraction for the reliable quantification of high value added compounds from oxidation processes of wood-derived lignin*, *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 2010, vol. 49, pp. 12311-12318.

65. F. Edelkraut, *Dissolved Vanillin as Tracer for Estuarine Lignin Conversion*, *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 1996, vol. 43, pp. 737-745.
66. J. B. Anderson, *Antarctic Marine Geology*, New York, Cambridge University Press, 1999.
67. A. H. Orsi, C. L. Wiederwohl, *A recount of Ross Sea waters*, *Deep Sea Research Part II*, 2009, vol. 56, pp. 778-795.
68. W. O. J. Smith, P. N. Sedwick, K. R. Arrigo, D. G. Ainley, A. H. Orsi, *The Ross Sea in a sea of change*, *Oceanography*, 2012, vol. 25, pp. 90-103.
69. D. H. Bromwich, D. D. Kurtz, *Katabatic wind forcing of the Terra Nova Bay Polynya*, *Journal of Geophysical Research*, 1984, vol. 89, pp. 3561-3572.
70. S. S. Jacobs, A. F. Amos, P. M. Bruchhausen, *Ross sea oceanography and Antarctic bottom water formation*, *Deep Sea Research and Oceanographic Abstracts*, 1970, vol. 17, pp. 935-962.
71. C. A. Carlson, D. A. Hansell, E. T. Peltzer, W. O. J. Smith, *Stocks and dynamics of dissolved and particulate organic matter in the southern Ross Sea, Antarctica*, *Deep-Sea Research II*, 2000, vol. 47, pp. 3201-3225.
72. W. O. J. Smith, D. G. Ainley, K. R. Arrigo, M. S. Dinniman, *The Oceanography and Ecology of the Ross Sea*, *Annual Review of Marine Science*, 2013, vol. 6, pp. 469-487.
73. W. D. Gardner, M. J. Richardson, W. O. J. Smith, *Seasonal patterns of water column particulate organic carbon and fluxes in the Ross Sea, Antarctica*, *Deep-Sea Research II*, 2000, vol. 47, pp. 3423-3449.
74. M. Turchet, *Determinazione di composti organici nell'aerosol atmosferico mediante LC-MS ad alta risoluzione*, Tesi di Laurea magistrale in Chimica, Università Ca' Foscari, Venezia, 2012.
75. R. Zangrando, E. Barbaro, P. Zennaro, S. Rossi, N. M. Kehrwald, J. Gabrieli, C. Barbante, A. Gambaro, *Molecular Markers of Biomass Burning in Arctic Aerosols*, *Environmental Science & Technology*, 2013, vol. 47, pp. 8565-8574.

76. E. Barbaro, R. Zangrando, S. Rossi, W. R. L. Cairns, R. Piazza, F. Corami, C. Barbante, A. Gambaro, *Domoic acid at trace levels in lagoon waters: assessment of a method using internal standard quantification*, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2013, vol. 405, pp. 9113-9123.
77. E. Barbaro, *Tossine in matrici ambientali: quantificazione mediante metodi accoppiati HPLC/MS ad elevata sensibilità*, Tesi di dottorato di ricerca in Scienze chimiche, Università Ca'Foscari, Venezia, 2013.
78. P. Kebarle, L. Tang, *From ions in solution to ions in the gas phase-the mechanism of electrospray mass spectrometry*, *Analytical Chemistry*, 1993, vol. 65, pp. 972A-986A.
79. B. K. Matuszewski, M. L. Constanzer, C. M. Chavez-Eng, *Matrix effect in quantitative LC/MS/MS analyses of biological fluids: a method for determination of finasteride in human plasma at picogram per milliliter concentrations*, *Analytical Chemistry*, 1998, vol. 70, pp. 882-889.
80. M. R. Seyedsayamdost, R. J. Case, R. Kolter, J. Clardy, *The Jekyll-and-Hyde chemistry of *Phaeobacter gallaeciensis**, *Nature Chemistry*, 2011, vol. 3, pp. 331-335.
81. M. A. Moran, L. R. Pomeroy, S. E. Sheppard, P. L. Atkinson, R. E. Hodson, *Distribution of terrestrially derived dissolved organic matter on the southeastern U. S. continental shelf*, *Limnology Oceanography*, 1991, vol. 36, pp. 1134-1149.
82. M. Celussi, B. Cataletto, S. Fonda Umani, P. Del Negro, *Depth profiles of bacterioplankton assemblages and their activities in the Ross Sea*, *Deep-Sea Research I*, 2009, vol. 56, pp. 2193-2205.
83. J. I. Hedges, R. A. Blanchette, K. Weliky, A. H. Devol, *Effects of fungal degradation on the CuO oxidation products of lignin: a controlled laboratory study*, *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 1988, vol. 52, pp. 2717-2726.
84. S. Opsahl, R. Benner, *Early diagenesis of vascular plant tissues: Lignin and cutin decomposition and biogeochemical implications*, *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 1995, vol. 59, pp. 4889-4904.

85. J. R. Ertel, J. I. Hedges, A. H. Devol, J. E. Richey, M. D. G. Ribeiro, G. Ribeiro, *Dissolved humic substances of the Amazon River system*, *Limnology and Oceanography*, 1986, vol. 31, pp. 739-754.
86. P. T. Martone, J. M. Estevez, F. Lu, K. Ruel, M. W. Denny, C. Somerville, J. Ralph, *Discovery of Lignin in Seaweed Reveals Convergent Evolution of Cell-Wall Architecture*, *Current Biology*, 2009, vol. 19, pp. 169-175.
87. C. Ververis, K. Georghiou, D. Danielidis, D.G. Hatzinikolaou, P. Santas, R. Santas, V. Corleti, *Cellulose, hemicelluloses, lignin and ash content of some organic materials and their suitability for use as paper pulp supplements*, *Bioresource Technology*, 2007, vol. 98, pp. 296-301.
88. A. S. Rehnstam, S. Bäckman, D. C. Smith, F. Azam, Å. Hagström, *Blooms of sequence-specific culturable bacteria in the sea*, *FEMS Microbiology Ecology*, 1993, vol. 102, pp. 161-166.
89. A. Buchan, J. M. González, M. A. Moran, *Overview of the Marine Roseobacter Lineage*, *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, vol. 71, pp. 5665-5677.
90. M. Celussi, A. Bergamasco, B. Cataletto, S. Fonda Umani, P. Del Negro, *Water masses' bacterial community structure and microbial activities in the Ross Sea, Antarctica*, *Antarctic Science*, 2010, vol. 22, pp. 361-370.