

CHIMICA & SPETTROMETRIA DI MASSA

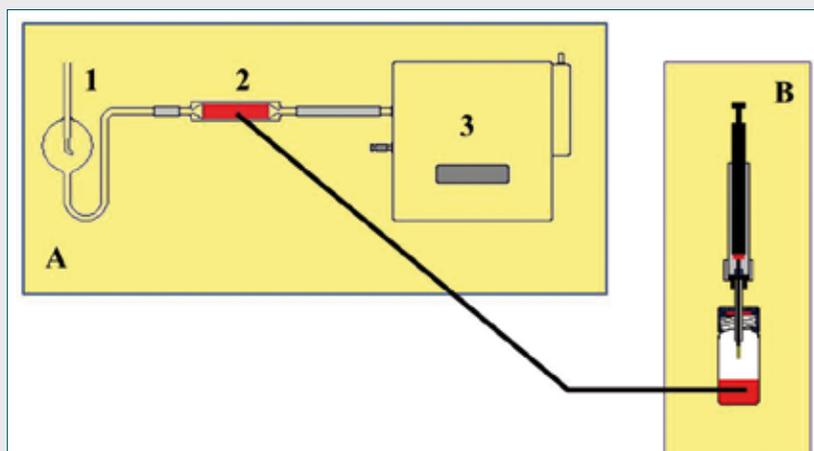


Fig. 1 - Schema del campionamento di VOCs nell'atmosfera. A) Campionamento: 1. Tubo con bolla per l'eventuale aggiunta di standard interni, 2. Cartuccia contenente Tenax A, 3. Pompa aspirante; B) SPME dello spazio di testa sopra il Tenax A

Andrea Raffaelli¹, Angela Cuzzola²,
Alessandro Saba³

¹Istituto di Fisiologia Clinica
CNR - Pisa

²Dipartimento di Scienze Agrarie,
Alimentari e Agro-ambientali
Università di Pisa

³Dipartimento di Patologia Chirurgica, Medica,
Molecolare e dell'Area Critica
Università di Pisa

andrea.raffaelli@cnr.it

SPETTROMETRIA DI MASSA E SOSTANZE ORGANICHE INQUINANTI PER L'AMBIENTE: UNA COMBINAZIONE MOLTO BRILLANTE

L'articolo illustra alcuni esempi di applicazioni della spettrometria di massa nell'analisi di inquinanti organici volatili nell'atmosfera, nello studio della reazione di ossidazione di Fenton e del suo effetto sulla degradazione di tensioattivi, e nella determinazione di sbiancanti ottici in carta ottenuta da materiale di riciclo.

La determinazione, sia a livello qualitativo che a livello quantitativo, delle sostanze inquinanti presenti nelle varie matrici ambientali è sicuramente un problema di largo interesse per tutta la comunità. Fra tutte le matrici, aria e acqua sono sicuramente le più importanti nonché quelle maggiormente studiate e monitorate. L'aria è in effetti una matrice ambientale fondamentale e tutti gli organismi, piante e animali, sono in continuo contatto con essa [1]. Un essere umano, ad esempio, inspira circa 5 kg di aria al giorno. Al contempo, aria e acqua sono anche i principali vettori per il trasporto degli inquinanti. Conseguentemente la disponibilità di metodi analitici a elevata sensibilità e affidabilità è di estrema importanza.

La spettrometria di massa, normalmente accoppiata con adeguate tecniche separative, è sicuramente la tecnica più sensibile, e in molti casi l'unica, per l'identificazione dei singoli componenti responsabili

dell'inquinamento, grazie alle note caratteristiche di sensibilità e selettività. Le matrici ambientali sono relativamente complesse, e contengono un numero molto elevato di componenti di varia natura, presenti a livelli di concentrazione considerevolmente variabili. Le sostanze inquinanti stesse sono presenti in numero elevato, hanno proprietà chimiche molto varie (sostanze inorganiche, metalli, sostanze organiche, composti volatili, non volatili, polari, apolari e così via). Anch'esse sono presenti a livelli di concentrazione altamente variabili, in questo caso, comunque, molto bassi (si va in genere da frazioni di parti per trilione, ppt, alle parti per milione, ppm).

Le concentrazioni così basse costituiscono sicuramente un aspetto positivo per noi e per la nostra salute, ma tendono a complicare la vita al chimico analitico che deve determinarli. Risulta chiaro che in queste situazioni la disponibilità di tecniche altamente sensibili è di

Il contributo è stato presentato al Convegno Massa 2012 della Divisione di Spettrometria di Massa della SCI; Palermo, 1-5 luglio 2012.

fondamentale importanza, ma anche la fase di preparazione del campione è estremamente critica: i processi di estrazione e manipolazione dovrebbero essere ridotti al minimo, per evitare il pericolo di introdurre nel campione sostanze non originariamente presenti (ad esempio le impurezze dei solventi utilizzati).

Questo articolo presenta alcuni esempi di applicazione della spettrometria di massa nell'analisi di inquinanti organici volatili (*Volatile Organic Compounds*, VOCs) nell'atmosfera e nell'analisi di alcune sostanze polari presenti in matrici acquose. I VOCs vengono analizzati mediante tecniche di gascromatografia accoppiate alla spettrometria di massa (GC-MS), mentre i composti polari vengono analizzati mediante tecniche LC-MS basate sulle principali tecniche di ionizzazione a pressione atmosferica: ionizzazione per elettro-nebulizzazione (*Electrospray Ionization*, ESI) e ionizzazione chimica a pressione atmosferica (*Atmospheric Pressure Chemical Ionization*, APCI).

Analisi di VOCs nell'atmosfera

L'analisi qualitativa e quantitativa di VOCs presenti nell'atmosfera viene comunemente effettuata con una procedura standard che comprende tre fasi:

1. campionamento mediante assorbimento su opportune cartucce adsorbenti;
2. desorbimento delle sostanze depositate dall'adsorbente presente nella cartuccia (in genere mediante l'uso di solventi oppure termicamente);
3. identificazione, caratterizzazione e determinazione degli inquinanti presenti mediante tecniche di gascromatografia, in particolare GC-MS.

L'approccio da noi proposto introduce una variazione a livello del punto 2, in cui il desorbimento verrà effettuato mediante l'impiego della microestrazione in fase solida (*Solid Phase MicroExtraction*, SPME) [2].

Campionamento

Il campionamento viene comunemente effettuato aspirando l'aria attraverso un tubo, in genere in vetro, contenente una sostanza adsorbente capace di trattenere i VOCs.

L'assorbimento è dovuto a fenomeni sia fisici che chimici, dipendenti dal tipo di adsorbente, dalla natura dei composti organici, dalla temperatura, dal flusso di aspirazione e dal grado di umidità.

Sono disponibili in commercio numerose varietà di cartucce di questo tipo, contenenti adsorbenti di varia natura, sia naturali che sintetici (polimeri).

Desorbimento

I VOCs presenti sull'adsorbente possono essere recuperati in due modi: utilizzando un opportuno solvente, oppure termicamente facendo passare un flusso gassoso a elevata temperatura.

Desorbimento con solvente - La sostanza adsorbente contenente i VOCs viene trasferita in una fiala dove si aggiunge un opportuno sol-

vente. Quest'ultimo deve essere caratterizzato da un forte potere solvente per i VOCs. In genere si impiega solfuro di carbonio. La miscela viene poi posta in bagno a ultrasuoni per facilitare il desorbimento dei VOCs e la soluzione limpida viene iniettata nel sistema GC-MS. Questa tecnica offre come vantaggi principali un buon recupero dei VOCs, la possibilità di effettuare numerose analisi sullo stesso campione e la possibilità di conservare il campione stesso per eventuali futuri controlli. Per contro, l'impiego del solvente presenta anche alcuni svantaggi. Innanzitutto, in questo modo si ha una diluizione dei VOCs originariamente adsorbiti sulla cartuccia: considerando che di norma si aggiunge 1 ml di solvente e che il normale volume di iniezione in GC-MS è 1 μ l, si inietta un millesimo di quanto raccolto, perdendo almeno in parte il vantaggio di aver concentrato con l'adsorbimento su cartuccia. Inoltre, la presenza del picco del solvente sul cromatogramma "maschera" una zona con la perdita potenziale di informazioni su alcuni dei VOCs presenti nel campione. Inoltre, le impurezze del solvente possono essere scambiate per inquinanti, anche se non erano presenti nel campione originale.

Desorbimento termico - La cartuccia viene inserita in un dispositivo per il desorbimento termico accoppiato con il sistema GC-MS, dove viene riscaldata in presenza di un flusso di un gas di trasporto (si usa in genere il carrier gas del gascromatografo). In questo modo tutti i VOCs vengono rilasciati nel flusso gassoso per effetto termico. Il principale vantaggio di questo metodo è la sensibilità piuttosto elevata: tutto quello che è stato raccolto sulla cartuccia viene inviato "one-shot" nel sistema GC-MS. L'altro aspetto positivo è la mancanza di solvente, e quindi degli svantaggi descritti sopra.

Anche questo approccio presenta i suoi svantaggi: è possibile eseguire una singola analisi per ogni campione. Questo può costituire un problema se dobbiamo ripetere più volte, per qualche motivo, l'analisi. Tanto per fare un esempio, nell'analisi GC-MS per l'identificazione di composti organici in campioni di varia natura, è buona norma utilizzare entrambe le tecniche di ionizzazione disponibili per questo settore della spettrometria di massa.

La ionizzazione mediante elettroni (*Electron Ionization*, EI), caratterizzata da estesa frammentazione, fornisce informazioni strutturali e consente la ricerca degli spettri in banche dati, ma può far perdere l'informazione sul peso molecolare. Tale informazione può essere ottenuta utilizzando la ionizzazione chimica (*Chemical Ionization*, CI), con la quale, grazie alla minore energia interna trasferita sullo ione, la frammentazione è molto più contenuta e lo ione molecolare in genere rimane sullo spettro [3]. In conseguenza di questo fatto, si dovrebbero effettuare almeno due analisi per ogni campione: una con ionizzazione EI per avere informazioni strutturali e per la ricerca di libreria e una mediante CI per la conferma del peso molecolare.

Altri svantaggi di questo metodo sono la necessità di disporre di un apparecchio per il desorbimento termico e che, dato il riscaldamento a elevate temperature si possa avere degradazione termica dei composti più termolabili.

CHIMICA & SPETTROMETRIA DI MASSA

Un nuovo approccio: SPME [4, 5] - La sostanza assorbente contenente i VOCs viene trasferita in una fiala, che viene chiusa ermeticamente mediante un setto perforabile. Tale operazione può essere effettuata immediatamente sul sito di campionamento, evitando al massimo possibili perdite (o aggiunte) di analiti. La fiala viene quindi campionata nello spazio di testa mediante una fibra SPME, che viene poi inserita nel sistema GC-MS dove i VOCs vengono desorbiti termicamente nell'iniettore. La Fig. 1 riporta schematicamente il concetto descritto.

Questo approccio consente indubbi vantaggi: innanzitutto, il campione non subisce in pratica nessun trattamento e le possibilità di inquinarlo o di perdere alcuni componenti sono realmente tendenti a zero. L'assenza di qualsiasi solvente o reagente impedisce da una parte la sopra descritta possibilità di "oscuramento" di una zona del cromatogramma (la zona in cui esce il solvente stesso e la relativa "coda"), dall'altra impedisce l'introduzione delle impurezze del solvente nel campione. Infine, è possibile effettuare numerose analisi (almeno alcune decine) senza perdita apprezzabile nell'intensità del segnale.

Risultati e discussione

I parametri che devono essere studiati e messi a punto sono diversi: tipo di sorbente nella cartuccia di campionamento, tempo e flusso di campionamento, tipo di fibra SPME, temperatura tempo di esposizione della fibra allo spazio di testa, tempo di permanenza della fibra nell'iniettore del sistema GC-MS, programma cromatografico e parametri di acquisizione degli spettri di massa. L'ottimizzazione di questi parametri viene fatta in maniera più agevole impiegando un autocampionatore adatto alla gestione in automatico di tutto il processo SPME. La scelta del sorbente e del tipo di fibra SPME è anche legata al tipo di sostanze che dobbiamo analizzare, ma nel primo caso la scelta deve orientarsi necessariamente su una fase capace di trattenere adeguatamente gli analiti per permettere tempi di campionamento relativamente lunghi, con un conseguente maggiore arricchimento, senza perdere parte degli analiti per problemi di breakthrough volume. Allo stesso tempo però il legame fra gli analiti deve essere sufficientemente labile perché ne venga liberata una quantità sufficiente nello spazio di testa per l'assorbimento SPME. Abbiamo testato vari tipi di sorbente, ma quello che meglio si presta a questo approccio è il Tenax A. Tale sostanza offre anche il vantaggio di essere abbastanza idrofoba, così che il campionamento non risulta eccessivamente disturbato anche in presenza di forte umidità.

La scelta fra le varie fibre SPME è legata ancora alla natura degli analiti di interesse, ma le più idonee si sono rivelate essere la 100 μm PDMS e la 65 μm PDMS/DVB, almeno per gli analiti su cui era stato messo a punto il metodo: toluene [4] e benzene [5]. Entrambe le fibre, poi, sono abbastanza "universali", adatte quindi a un lavoro di screening qualitativo che è sicuramente il settore in cui questo approccio può fornire i migliori risultati.

Le prove sono state condotte su un sistema GC-MS Varian composto da un gascromatografo mod. 3800, equipaggiato con un autocampionatore CTC Combipal, e uno spettrometro di massa a trappola ionica

Tab. 1 - Campionamento aria in un'area industriale: confronto fra desorbimento con solvente e SPME

| Desorbimento con solvente | Campionamento SPME |
|--------------------------------------|---|
| Sorbente: Carbone attivo | Sorbente: Tenax A |
| Solvente: Carbonio Solfuro | Fibra SPME: PDMS 100 μm |
| Flusso campionamento: 200 ml/min. | Flusso campionamento: 160 ml/min. |
| Tempo campionamento: 30 minuti | Tempo campionamento: 30 minuti |
| Aria filtrata: 6 l | Aria filtrata: 4,8 |
| Volume di desorbimento: 1 ml | Tempo di esposizione fibra SPME: 3 minuti |
| Volume di iniezione: 1 μl | |

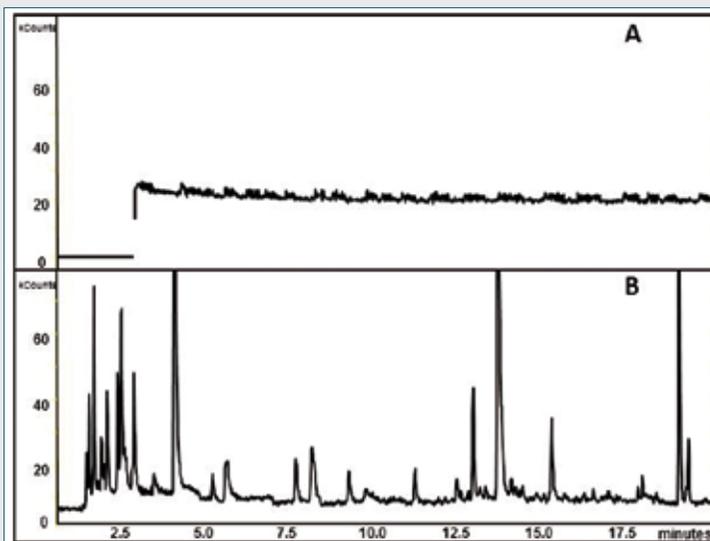


Fig. 2 - Confronto fra l'analisi di VOCs mediante desorbimento con solvente (A) e mediante SPME (B)

Saturn 2000. Gli altri parametri sopra menzionati sono stati ottimizzati e prevedono l'esposizione della fibra SPME per 3 minuti a 80 °C e l'analisi GC-MS nelle seguenti condizioni: colonna poli-(5%-difenil-95%-dimetilsilossano), lunghezza 30 m, diametro interno 0,25 mm, spessore film 0,25 μm ; programma GC: 60 °C (0 min.), fino a 240 °C (3 °C/min., 0 min.), fino a 280 °C (30 °C/min., 2 min.); MS: El full scan (m/z 28÷650), CI con isobutano full scan (m/z 60÷650).

Scontato il fatto che il desorbimento termico tradizionale è quello che offre la maggiore sensibilità (ma una sola corsa analitica), abbiamo effettuato un confronto con il classico desorbimento con solventi. Sono stati prelevati in parallelo due campioni, uno analizzato secondo il metodo del desorbimento con solvente e uno analizzato mediante il nostro approccio SPME. La Tab. 1 riporta i parametri di campionamento. La soluzione in solfuro di carbonio è stata analizzata mediante GC-MS iniettandone 1 μl , mentre la fibra SPME è stata introdotta nel liner apposito dell'iniettore dopo 3 minuti di esposizione allo spazio di testa sopra la fase sorbente a una temperatura di 80 °C. La Fig. 2 riporta i cromatogrammi di corrente ionica totale a confronto.

Come si può osservare, il cromatogramma relativo all'approccio SPME presenta un elevato numero di picchi, mentre quello relativo al desorbimento con solvente risulta praticamente piatto. Andando a estrarre selettivamente alcuni valori di m/z , si possono evidenziare segnali anche

nel cromatogramma 1, ma la differenza di sensibilità non ha bisogno di ulteriori commenti.

Il metodo è stato applicato per la valutazione della presenza di VOCs in aree a diverso tasso di inquinamento [6]. In particolare, sono stati prelevati campioni nelle seguenti zone:

1. strada cittadina a elevato tenore di traffico in un'ora di punta (Pisa, Via Contessa Matilde, ore 8);
2. area pedonale all'interno del centro storico della stessa città (Pisa, Piazza dei Cavalieri);
3. riserva naturale in riva al mare (Marina di Vecchiano, PI; bosco di pini);
4. foresta boschiva nell'entroterra (Staffoli, PI, bosco di pini di Poggio Adorno);
5. area in aperta campagna 1 (Orciano Pisano, PI, area agricola);
6. area in aperta campagna 2 (Montepulciano, SI, area aperta all'interno di una fattoria vinicola).

I campioni sono stati raccolti filtrando 18 litri di aria a un flusso di 200 ml/min. per 90 minuti. Le cartucce sono state aperte sul posto e il materiale sorbente posto in una fiala che è stata sigillata ermeticamente. L'analisi è stata effettuata utilizzando il metodo e le condizioni riportate precedentemente, effettuando una corsa cromatografica con la EI e una con la CI.

I files acquisiti sono stati elaborati mediante il software Varian Workstation 6.6 Data Analysis, confrontando gli spettri ottenuti con quelli presenti nella libreria NIST 2002, con l'ausilio di eventuali procedure di deconvoluzione mediante software AMDIS, in caso di composti parzialmente coeluenti. Gli spettri acquisiti in modalità CI hanno permesso la conferma del peso molecolare, aumentando così l'affidabilità dell'identificazione. Sono stati considerati solo quei composti la cui identificazione fosse praticamente certa.

I risultati ottenuti sono in qualche modo coerenti e in linea con le aspettative. I campioni urbani sono quelli in cui è stato identificato il maggior numero di VOCs (circa 50), con una prevalenza di idrocarburi aromatici (benzene, toluene, xileni, alchilbenzeni vari). A livello qualitativo non si osserva una grossa differenza fra il sito a elevato tenore di traffico e la zona pedonale, anche se la prima presenta livelli di concentrazione più elevati. Le zone boschive (circa 25 composti identificati), anche se in zone diverse, sono relativamente simili e si caratterizzano per una presenza di terpenoidi (soprattutto eucaliptolo), aldeidi (benzaldehyde) e chetoni (acetofenone), mentre le zone rurali (circa 30 composti identificati), a loro volta simili fra loro, presentano soprattutto aldeidi (in prevalenza esanale) e terpenoidi (soprattutto α -pinene).

Il metodo risulta particolarmente indicato per l'analisi dell'atmosfera in corrispondenza o nelle vicinanze di particolari industrie o impianti, quali ad esempio le discariche di rifiuti solidi urbani. In questo caso è possibile anche un monitoraggio regolare delle maleodoranze tipiche di queste strutture, campionando in vari punti scelti opportunamente. Il campionamento e l'analisi vengono effettuati secondo la stessa procedura precedentemente descritta. La Fig. 3 riporta un tipico cromatogramma EI (3-1) e CI (3-2).

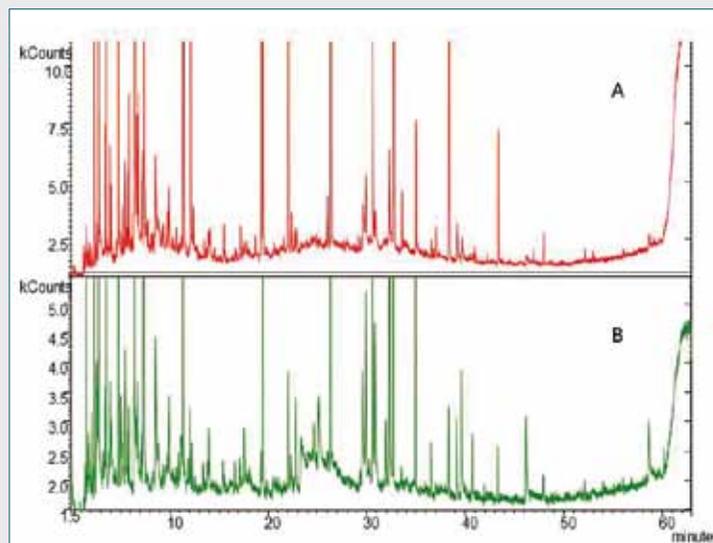


Fig. 3 - Cromatogrammi GC-EI-MS (A) e GC-CI-MS (B) relativi a un campione di aria prelevato presso una discarica

Anche l'elaborazione dati viene fatta con la medesima procedura. Sono stati esaminati diversi siti di discariche e riportiamo qui un esempio relativo a un impianto posto in provincia di Firenze. Sono stati identificati circa 35 composti, appartenenti a 9 classi chimiche, che possono essere considerati in certa misura come rappresentativi della composizione delle emissioni di una discarica di RSU. Di seguito sono elencate le 9 classi (fra parentesi il componenti più abbondante): idrocarburi aromatici (toluene), idrocarburi alifatici (ottano), chetoni alifatici (isobutilmetilchetone), chetoni aromatici (acetofenone), aldeidi alifatici (nonanale), acidi carbossilici alifatici (acido butanoico), esteri alifatici (etil acetato), composti clorurati (cloroformio), composti aromatici azotati (3-metilpiridina).

Studio della reazione di ossidazione di Fenton di tensioattivi

Le potenzialità della spettrometria di massa nell'identificazione, caratterizzazione ed eventuale quantificazione di tensioattivi in varie matrici ambientali sono molto interessanti. La spettrometria di massa, infatti, può essere considerata una sorta di "rivelatore universale": tutte le molecole hanno una massa.

Previa ionizzazione, quindi, la spettrometria di massa può essere in grado di determinare anche molecole che risultano "trasparenti" per altre tecniche di rivelazione. Molti tensioattivi, come ad esempio gli alchil solfati e gli alcoli grassi polietossilati, sono privi di cromofori e, quindi, completamente invisibili a rivelatori UV. Lo stesso discorso vale anche per eventuali metaboliti e prodotti di degradazione dei tensioattivi stessi.

Nei nostri laboratori abbiamo affrontato il problema dell'analisi delle varie classi di tensioattivi mediante spettrometria di massa con ionizzazione ESI [7], con ottimi risultati. Vogliamo però riportare qui il caso dell'ossidazione di Fenton, con l'identificazione dei prodotti di ossidazione intermedia.

CHIMICA & SPETTROMETRIA DI MASSA

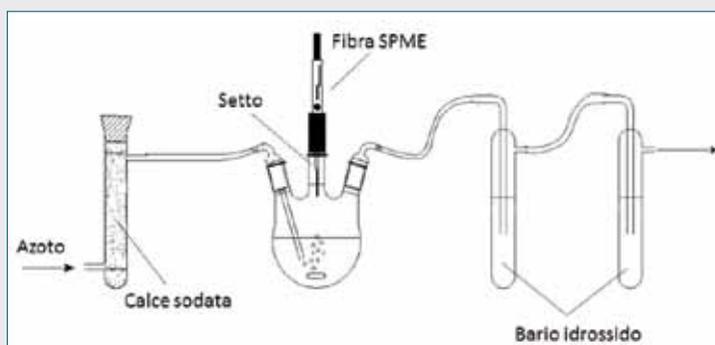


Fig. 4 - Schema dell'apparecchiatura utilizzata per lo studio della reazione di ossidazione di Fenton di tensioattivi

Come noto, l'ossidazione di Fenton [8], basata su una combinazione di acqua ossigenata e di sali ferrosi, è uno dei possibili trattamenti chimici cui possono essere sottoposti i reflui, civili o industriali, negli impianti di depurazione. Nei confronti dei tensioattivi si riteneva, fino a non molto tempo fa, che il processo portasse alla completa mineralizzazione degli stessi [9]. Questo sulla base dell'osservazione che, dopo un trattamento Fenton, si perdeva la proprietà tensioattiva, si osservava una netta diminuzione del COD (*Chemical Oxygen Demand*) e una netta diminuzione del TOC (*Total Organic Carbon*). Nessuno studio era stato effettuato sui prodotti di ossidazione, ritenendo che essi consistessero solo in acqua e anidride carbonica. Lo studio è stato condotto prendendo inizialmente in considerazione come composto "modello" il sodio laurilsolfato (sodio dodecilsolfato, SDS), in quanto è uno dei pochissimi esempi di tensioattivi "monocomponente", condizione che rendeva sicuramente più agevole l'interpretazione degli spettri e l'elaborazione dei risultati. Successivamente, comunque, lo studio è stato esteso ad altre classi di tensioattivi, alcoli grassi polietossilati [10], alcoli grassi polietossilati, alchilfenoli polietossilati [11] e alchilbenzensolfonati lineari (LAS) [12].

Lo studio si è sviluppato in tre fasi:

1. valutazione della quantità di anidride carbonica sviluppata mediante la formazione di un precipitato di carbonato di bario;
2. identificazione e caratterizzazione dei prodotti di ossidazione intermedia non volatili mediante analisi in spettrometria di massa ESI;
3. identificazione e caratterizzazione di ossidazione intermedia volatili mediante analisi GC-MS dello spazio di testa della miscela di reazione.

La reazione è stata condotta utilizzando l'apparecchiatura illustrata nella Fig. 4.

Il substrato e i reagenti vengono posti nel pallone di reazione, l'anidride carbonica che si sviluppa viene strappata dalla soluzione mediante gorgogliamento di azoto (purificato da eventuali tracce di anidride carbonica per passaggio attraverso una trappola contenente calce sodata) e raccolta in una serie di due trappole contenenti bario idrossido. Il carbonato di bario che precipita nelle suddette trappole viene essiccato e pesato per stabilire il grado di mineralizzazione, calcolato rapportando la quantità di anidride carbonica raccolta con la quantità che si dovrebbe formare per la stechiometria della completa mineralizzazione. Una fibra SPME viene esposta allo spazio di testa per il campionamento di eventuali prodotti volatili.

Risultati e discussione

Grado di mineralizzazione - Il grado di mineralizzazione dipende da numerosi fattori, quali il tipo di sale ferroso utilizzato, i rapporti molarli fra acqua ossigenata, sali ferrosi e tensioattivo, la temperatura ecc., mantenendosi comunque estremamente basso, al di sotto del 5%. Tale grado di mineralizzazione può essere migliorato impiegando altri tipi di catalizzatori, quali complessi di titanio, o anche mediante fotocatalisi, ma anche nelle migliori condizioni non siamo mai riusciti a ottenere gradi di mineralizzazione al di sopra del 30-35%. Risulta quindi importante identificare e caratterizzare i prodotti di ossidazione intermedia.

Prodotti di ossidazione intermedia non volatili - La miscela di reazione viene filtrata e diluita 1:100 con acqua/metanolo contenente ammonio acetato a una concentrazione di 5 mM.

La soluzione diluita viene iniettata con la tecnica dell'iniezione in flusso (*Flow Injection Analysis, FIA*) in una sistema HPLC-MS-MS composto da uno spettrometro di massa PE Sciex API IIIplus equipaggiato con una sorgente Ionspray articolata accoppiato con una pompa quaternaria Perkin Elmer Serie 200.

Le condizioni dell'analisi sono le seguenti: fase mobile: acqua/metanolo 1:1 a 50 μ l/min. Gli spettri ESI sono stati acquisiti in modalità ioni negativi nelle seguenti condizioni sperimentali: potenziale nebulizzatore (IS): -4 kV; potenziale all'orifizio (OR): -40 V; intervallo di scansione: 100-1000 Th in 4,7 secondi; risoluzione unitaria. La Fig. 5 riporta lo spettro ESI del campione di SDS prima (A) e dopo (B) la reazione di ossidazione Fenton nell'intervallo 250-340 Th.

Lo spettro del campione di SDS mostra solo uno ione a 265 Th attribuibile all'anione molecolare, $[C_{12}H_{25}OSO_3]^-$. La reazione porta alla formazione sia di specie a valori di m/z più basse che a valori di m/z più elevati rispetto al prodotto di partenza.

Osservando lo spettro in Fig. 5b si può ipotizzare una serie di inserimenti di ossigeno e di eliminazioni di acqua: l'anione dodecilsolfato (265 Th) acquisisce un atomo di ossigeno formando lo ione a 281 Th. Questo a sua volta può acquisire un altro atomo di ossigeno, formando lo ione a 297 Th, o eliminare acqua formando lo ione a 263 Th, che a

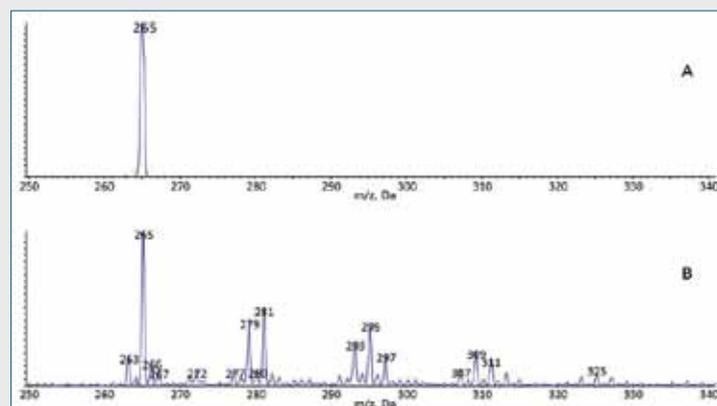


Fig. 5 - Spettro ESI-MS del sodio laurilsolfato prima (A) e dopo (B) essere sottoposto a un trattamento Fenton

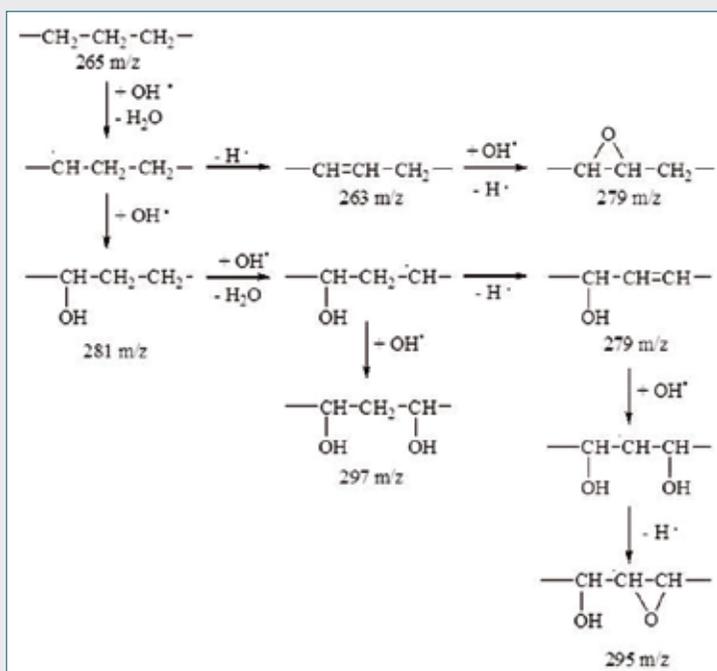


Fig. 6 - Ipotesi di meccanismo di ossidazione della catena alchilica del sodio laurilsolfato durante il trattamento Fenton

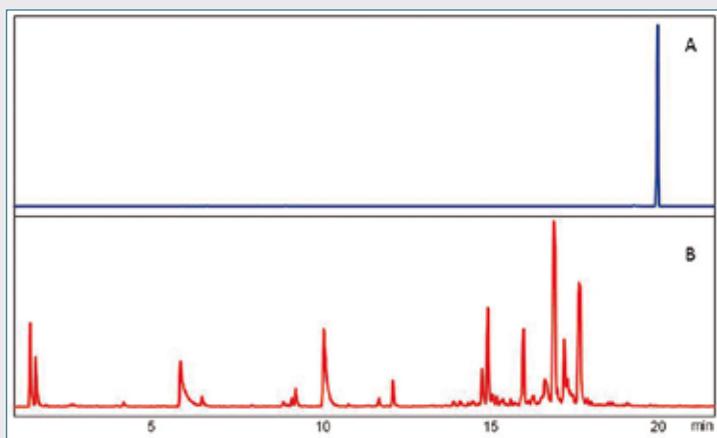


Fig. 7 - Cromatogrammi SPME-GC-MS dello spazio di testa sopra una soluzione di sodio laurilsolfato prima (A) e dopo (B) il trattamento Fenton

sua volta può acquisire un ossigeno formando lo ione a 279 Th che a sua volta può dare lo ione a 295 Th e così via.

In pratica la reazione procede attraverso una serie di inserzioni di ossigeno e di eliminazioni di acqua, con un meccanismo ipotizzabile rappresentato nella Fig. 6.

L'ipotesi trova conferma sia in misure in spettrometria di massa tandem, che confermano le strutture proposte, sia da misure fatte in HPLC, dove i prodotti di reazione, molto polari, non vengono praticamente trattenuti ed eluiscono col fronte del solvente.

Prodotti di ossidazione intermedia volatili - Durante gli esperimenti preliminari, condotti in recipienti aperti, al momento della reazione si poteva avvertire un odore pungente. Questo effetto è attribuibile allo sviluppo di sostanze organiche volatili. Per questo motivo abbiamo

collocato una fibra SPME per campionare lo spazio di testa sulla miscela di reazione. L'analisi dei prodotti volatili è stata condotta mediante GC-MS, utilizzando la strumentazione descritta precedentemente per l'analisi di VOCs.

La Fig. 7 riporta i cromatogrammi GC-MS (con ionizzazione EI) dello spazio di testa della miscela di reazione prima (solo SDS, A) e dopo (B) l'ossidazione di Fenton.

È possibile osservare la formazione di serie omologhe di composti organici volatili, come meglio evidenziato nella Fig. 8, che riporta i cromatogrammi estratti di corrente ionica (*eXtracted Ion Current*) degli ioni molecolari protonati.

L'identificazione di questi composti è stata effettuata mediante ricerca in libreria degli spettri EI-MS, che ha permesso di identificare questi composti come aldeidi alifatiche con catene di atomi di carbonio nell'intervallo 6-12. A titolo di esempio la Fig. 9 riporta a confronto gli spettri EI-MS del composto con tempo di ritenzione di 12,34 minuti (spettro B), con lo spettro presente nella libreria NIST proposto dall'algoritmo di ricerca (spettro C) e con quello di uno standard autentico di decanale (spettro A), il quale, analizzato in GC-MS, ha un tempo di ritenzione di 12,34 minuti.

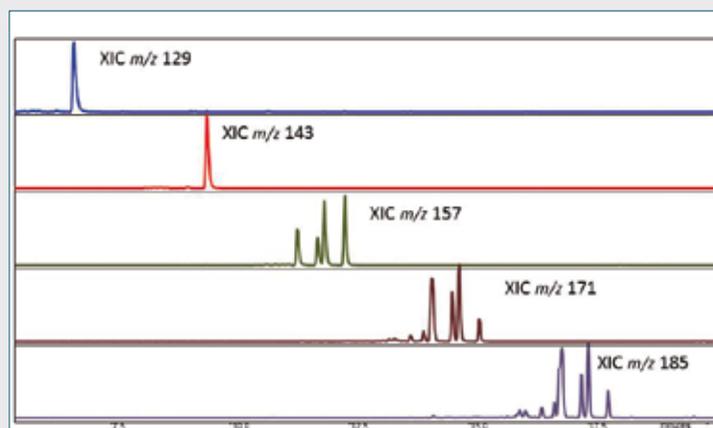


Fig. 8 - Cromatogrammi SPME-GC-MS di corrente ionica estratta relativa agli ioni molecolari protonati delle specie volatili omologhe che si producono durante l'ossidazione Fenton

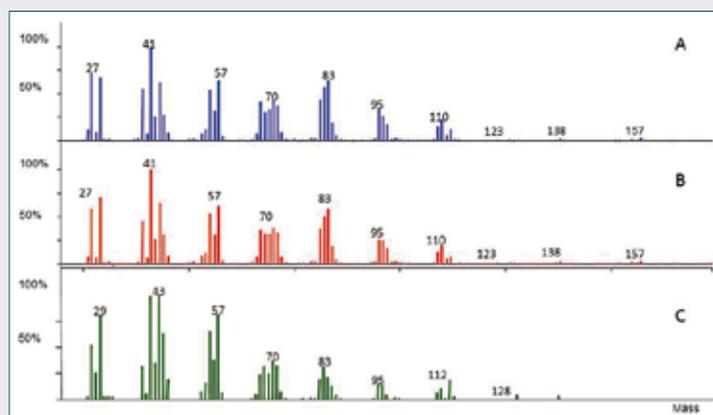
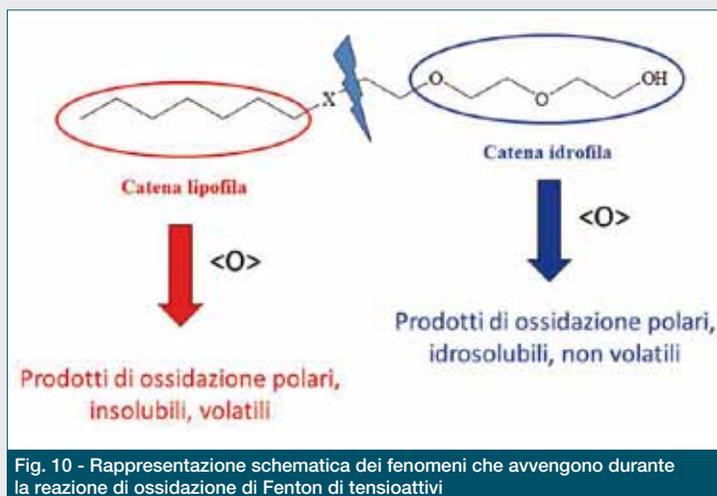


Fig. 9 - Identificazione del componente con tempo di ritenzione di 12,34 minuti (B), confrontato con lo spettro dalla libreria NIST 2002 del decanale (C) e con quello di uno standard autentico di decanale (A, tempo di ritenzione 12,34 minuti)

CHIMICA & SPETTROMETRIA DI MASSA



Conclusioni

I risultati ottenuti nell'ossidazione di Fenton del sodio laurilsolfato sono stati confermati anche con le altre classi di tensioattivi prese in esame [10-12]. Anche per questi composti si osserva la formazione di catene ossidate per successive inserzioni di ossigeno ed eliminazioni di acqua, nonché l'emissione di aldeidi alifatiche volatili ed insolubili in acqua. In presenza di catene polietossilate, inoltre, si osservano ioni attribuibili a oligomeri di polietilenglicol.

Sulla base di queste osservazioni sperimentali possiamo ipotizzare il destino dei tensioattivi sottoposti a processi ossidativi di tipo Fenton come schematizzato nella Fig. 10.

All'inizio della reazione il reagente ossidante spezza la molecola del tensioattivo, separando la catena lipofila dalla catena idrofila. Successivamente la catena idrofila viene ossidata con formazione di composti di ossidazione polari, non volatili e solubili in acqua, mentre la catena lipofila forma prodotti di ossidazione polari, volatili e insolubili in acqua. Questo comportamento spiega molto bene le osservazioni riportate in letteratura [9]: il trattamento Fenton provoca la scomparsa della proprietà tensioattiva (in effetti la molecola viene spezzata all'altezza della congiunzione fra parte lipofila e parte idrofila).

Inoltre, si osserva un abbassamento del COD (in effetti i prodotti di ossidazione hanno un grado di ossigenazione più elevato e, di conseguenza, assorbiranno una quantità inferiore di ossigeno). Infine, si ha anche un abbassamento del TOC (in effetti l'emissione di prodotti volatili abbassa il contenuto di carbonio organico). Quest'ultimo punto, però, è un'arma a doppio taglio: l'inquinamento della fase acquosa diminuisce grazie alla diminuzione del TOC, ma in compenso si ha l'emissione di VOCs nell'atmosfera!

Determinazione di sbiancanti ottici nella carta

Gli sbiancanti ottici (*Optical Brightening Agents*, OBAs) sono coloranti che assorbono la luce nella regione del violetto e ultravioletto (intorno a 340-370 nm) e riemettono nella regione del blu (tipicamente 420-470 nm). Questo causa un effetto sbiancante: il materiale appare meno "giallo" grazie alla maggiore componente di luce blu riflessa.

Tali sostanze non sono dei veri sbiancanti, dato che il loro effetto è solo apparente, a differenza dei veri sbiancanti "chimici" (come ad esempio la candeggina), che inducono reazioni di ossidazione.

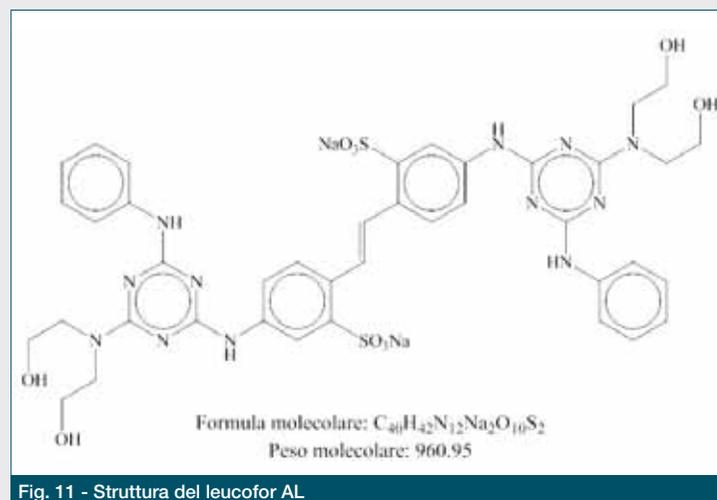
Gli sbiancanti ottici sono utilizzati ampiamente in diversi settori, nei detersivi, in additivi per tessuti e anche nel settore della carta, con particolare riferimento alla carta di riciclo. Il loro effetto sulla salute dell'uomo e sull'ambiente non è completamente noto: le schede di sicurezza contengono informazioni sulle molecole che compongono gli additivi, ma non riportano niente sui possibili metaboliti e prodotti di degradazione. Quello che è certo è che l'uso quotidiano di carta contenente sbiancanti ottici può avere conseguenze dirette derivanti dall'uso e anche indirette dovute all'immissione di tali sostanze nel comparto ambientale. Risulta quindi interessante poter valutare la quantità di sbiancanti ottici contenuti in una carta di riciclo e, in seguito, anche nelle varie matrici ambientali.

Risultati e discussione

Viene qui riportato, come esempio, la determinazione di leucofor AL in campioni di carta riciclata (Fig. 11) [13].

Il leucofor AL, la cui struttura è riportata nella figura è un derivato stilbenico utilizzato nell'industria della carta come additivo con la funzione di sbiancante ottico, soprattutto nella produzione di carta da materiale di riciclo. La presenza di ben 12 atomi di azoto basici impartisce alla molecola una buona risposta in spettrometria di massa con ionizzazione ESI in modalità ioni positivi. Una risposta altrettanto buona in modalità ioni negativi viene assicurata dalla presenza di due gruppi solfonato salificati con sodio.

Le misure sono state effettuate su uno spettrometro di massa a triplo quadrupolo PE Sciex Mod. API 365 equipaggiato con una sorgente Turbo-Ionspray, accoppiato con una pompa HPLC quaternaria Perkin Elmer Serie 200. Gli spettri di massa ESI di uno standard di leucofor AL presentano tutte le forme ioniche possibili in entrambe le modalità: nello spettro di ioni positivi possiamo osservare ioni a 961 Th ($[M+H]^+$), 983 Th ($[M+Na]^+$), 939 Th ($[M-Na+2H]^+$) e 917 ($[M-2Na+3H]^+$), oltre agli ioni doppiamente caricati con tutte le combinazioni protone/sodio, fra i



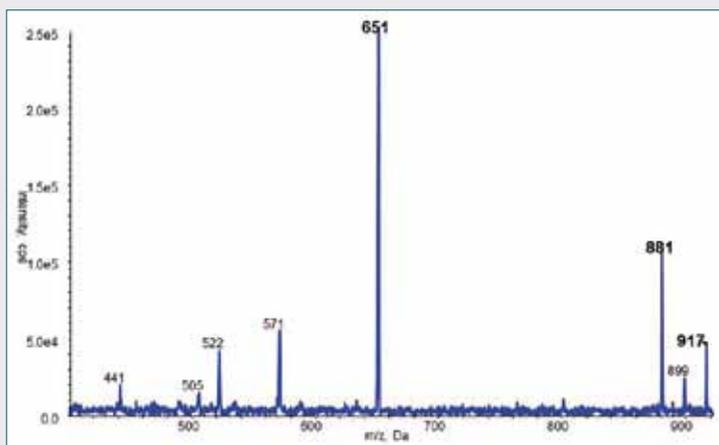


Fig. 12 - Spettro MS-MS di ioni prodotto dello ione $[M-2Na+3H]^+$ ottenuto dalla ionizzazione ESI di uno standard di leucofor AL

quali prevale nettamente lo ione a 459 Th ($[M-2Na+4H]^{2+}$). In modalità ioni negativi abbiamo ioni a 959 Th ($[M-H]^-$), 937 Th ($[M-Na]^-$) e 915 Th ($[M-2Na+H]^-$), oltre allo ione doppiamente caricato a 457 Th ($[M-2Na]^{2-}$). L'ottimizzazione dei parametri strumentali indica la scelta dello ione ($[M-2Na+3H]^+$) a 917 Th come quello che consente di ottenere la migliore sensibilità. Lo spettro MS-MS di ioni prodotto di tale precursore è riportato nella Fig. 12.

Successivamente sono state individuate le frammentazioni per il monitoraggio di frammentazioni selezionate (*Selected Reaction Monitoring*, SRM). Per avere una rivelazione affidabile occorre seguire almeno due frammentazioni. Quelle che permettono di ottenere la massima sensibilità sono quelle che dallo ione a 917 portano allo ione a 881 Th ($917 \rightarrow 881$) e 651 Th ($917 \rightarrow 651$). Per la cromatografia HPLC si è utilizzato una colonna Phenomenex Gemini 4,6x150 mm C18 110 Å 5 µm. Come fase mobile è stata utilizzata una miscela acqua/metano 25/75 contenente tampone ammonio acetato 5 mM a un flusso di 600 µl/min. In queste condizioni si ottiene un cromatogramma come quello riportato nella Fig. 13.

Il cromatogramma di Fig. 13 si riferisce a una soluzione standard di leucofor AL a una concentrazione di 300 ng/ml. Prima del picco principale a 4,35 minuti si può osservare un picco di intensità inferiore a 3,95 minuti. Data la selettività del metodo SRM, tale picco può essere attribuibile solo a un isomero del leucofor AL.

I campioni di carta sono stati estratti con un protocollo messo a punto utilizzando campioni di carta trattata con leucofor AL e campioni di carta esenti, appositamente preparati. Durante le fasi di messa a punto è stato possibile evidenziare un effetto interessante: il leucofor AL estratto dai campioni di carta trattati ha un rapporto invertito tra i picchi cromatografici, spiegabile con un'isomerizzazione del leucofor AL durante il processo produttivo (Fig. 14).

Osservando la struttura del leucofor (Fig. 11) si può ipotizzare un'isomerizzazione da *trans*-stilbene a *cis*-stilbene. La giustificazione per tale comportamento potrebbe essere la possibilità di stabilizzare la forma *cis* grazie alla formazione di legami a idrogeno intramolecolari. Abbiamo investigato questo aspetto sottoponendo una soluzione standard

di leucofor AL a condizioni potenzialmente isomerizzanti. In particolare è stata provata senza successo un'isomerizzazione termica, scaldando a riflusso una soluzione acquosa dello standard a nostra disposizione. Dopo aver tenuto la soluzione a riflusso per oltre 72 ore non si osservava alcun cambiamento nelle intensità relative dei due picchi sul cromatogramma.

Abbiamo quindi provato a ottenere una fotoisomerizzazione, irradiando la stessa soluzione con una lampada ultravioletta. Dopo 12 ore di trattamento si aveva l'inversione dei picchi, che passavano da un rapporto 3/97% a un rapporto 47/53%. La conferma dell'ipotesi di isomerizzazione *trans*→*cis* è stata ottenuta mediante misure di risonanza magnetica nucleare.

Le Fig. 15 e 16 riportano lo spettro 1H -NMR dello standard di leucofor AL, nella zona dei protoni insaturi, rispettivamente prima e dopo la fotoisomerizzazione.

Nello spettro di Fig. 16 compare un segnale attribuibile a protoni del doppio legame dello stilbene in configurazione *cis*, accanto a quello attribuibile ai protoni del doppio legame in configurazione *trans*.

Per la determinazione quantitativa i due picchi cromatografici sono stati sommati in modo da avere il contenuto totale di leucofor AL nelle due forme isomeriche.

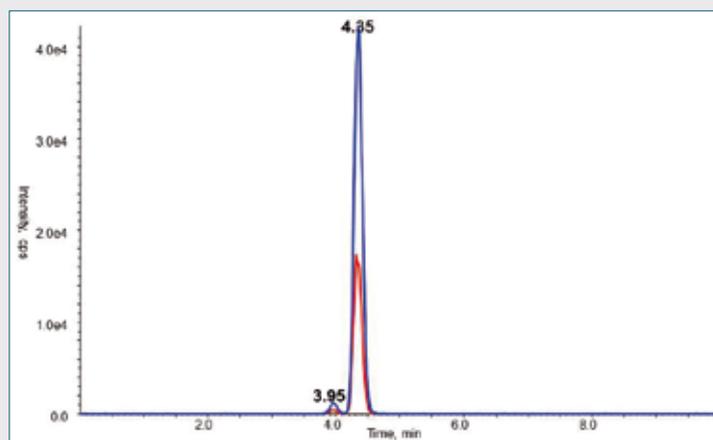


Fig. 13 - Cromatogramma SRM relativo alle due transizioni 917→651 (in blu) e 917→881 (in rosso) di una soluzione standard di leucofor AL

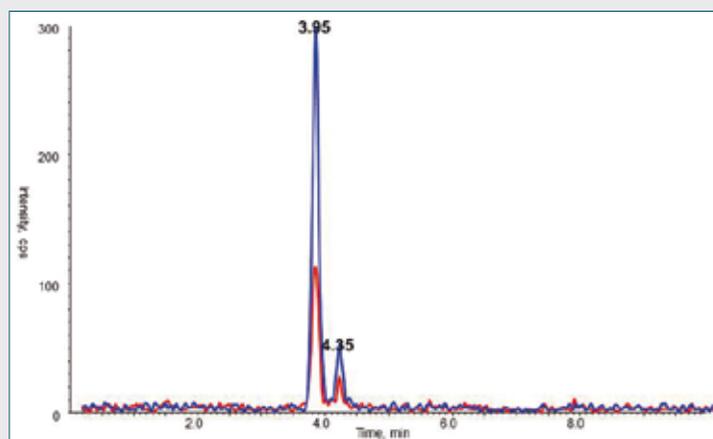


Fig. 14 - Cromatogramma SRM relativo alle due transizioni 917→651 (in blu) e 917→881 (in rosso) di un estratto di carta prodotta da riciclo

CHIMICA & SPETTROMETRIA DI MASSA

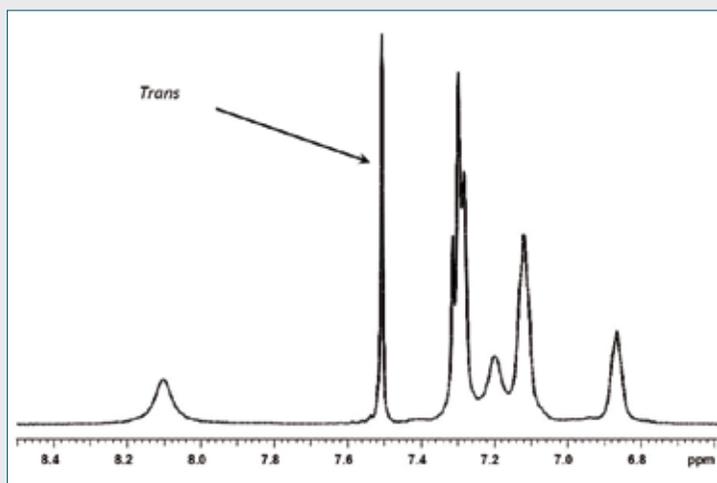


Fig. 15 - Spettro NMR dello standard di leucofor AL nella regione dei protoni insaturi

Il protocollo di estrazione utilizzato è molto semplice:

1. prelievo di circa 50 mg di carta. Il prelievo viene effettuato dalla zona centrale di un foglio interno del lotto in esame;
2. il campione prelevato viene sminuzzato e posto in una fiala Eppendorf da 2 ml aggiungendo 1,2 ml di acqua;
3. la fiala viene chiusa e agitata mediante miscelatore Vortex per 5 minuti;
4. la fiala viene posta in bagno a ultrasuoni per 20 minuti;
5. il campione di carta viene compattato sul fondo della fiala con l'aiuto di una bacchetta di vetro;
6. si centrifuga per 10 minuti a 20.000 G;
7. prelievo del surnatante (0,8-1 ml) posto in una fiala per l'analisi;
8. iniezione di 50 μ l nel sistema HPLC-MS.

La procedura di estrazione consente un recupero medio, valutato utilizzando campioni di carta dello stesso tipo di quella da analizzare ma ottenuta da una produzione che non impiegava lo sbiancante, ai quali si aggiungevano quantità note di standard di leucofor AL, del 46%. Nonostante sia piuttosto basso, risulta comunque ben riproducibile, e comunque non è stato possibile migliorarlo nemmeno con procedure più complesse.

Utilizzando il leucofor AL standard sono state preparate delle soluzioni con una concentrazione di 50, 100, 200, 400, 800 e 1600 ng/ml. L'analisi delle soluzioni standard è stata effettuata in triplicato, ottenendo la retta di calibrazione descritta dalla seguente equazione:

$$y = 24,5x + 517 \text{ (coefficiente di correlazione } R=0,9923)$$

Il coefficiente di correlazione R, pari a 0,9923, è molto buono, con una buona accuratezza, compresa tra il 92 e il 102%. Anche la riproducibilità risulta ottima, con un coefficiente di variazione del 7% a 100 ng/ml e del 2% a 1600 ng/ml.

Sono stati analizzati quindi numerosi lotti di carta, ancora effettuando le analisi in triplicato, con coefficienti di variazione tra il 5 e il 9%. Il contenuto di leucofor AL è risultato compreso tra 0,4 e 15 μ g/g di carta, con un contenuto medio di 6,7 \pm 4,4 μ g/g di carta.

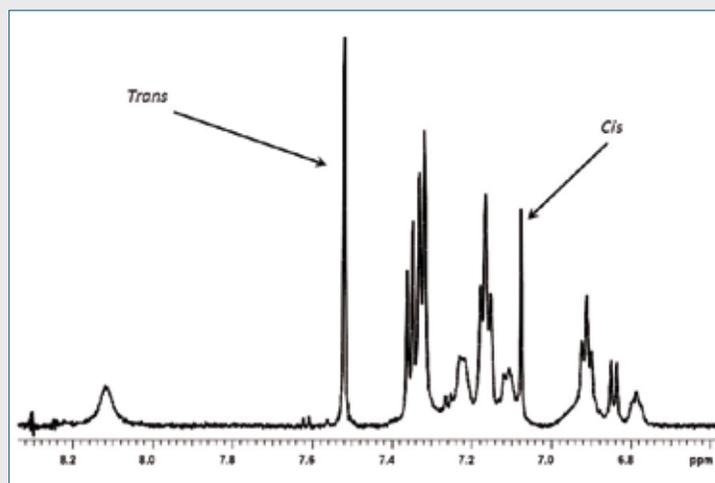


Fig. 16 - Spettro NMR dello standard di leucofor AL dopo fotoisomerizzazione nella regione dei protoni insaturi

Conclusioni

Nel corso di questa applicazione è stato messo a punto un metodo rapido, robusto e affidabile per la determinazione quantitativa di leucofor AL in campioni di carta. Nei campioni esaminati sono state riscontrate quantità variabili di leucofor AL, con un valore medio di circa 7 μ g/g. Il prodotto presente nella carta, comunque, non risulta essere lo stesso che viene aggiunto durante il processo di lavorazione, ma un suo isomero, che si forma evidentemente nelle condizioni del processo di produzione della carta stessa. Tale isomero è stato identificato, grazie a misure di risonanza magnetica nucleare, come lo stereoisomero *cis*. A questo proposito vale la pena di notare come il prodotto finito contenga un componente del quale non è disponibile la scheda di sicurezza, che è disponibile solo per l'isomero *trans*.

Conclusioni generali

Gli esempi descritti in questo articolo dimostrano ampiamente l'enorme utilità di tecniche basate sulla spettrometria di massa accoppiata con tecniche di separazione cromatografica per l'analisi di sostanze inquinanti organiche in varie matrici ambientali. In particolare, inquinanti volatili possono essere analizzati con tecniche GC-MS, sia utilizzando la ionizzazione EI, che ci permette di effettuare ricerche nelle librerie elettroniche per l'identificazione dei componenti, sia la ionizzazione CI, che ci fornisce la conferma del peso molecolare degli stessi componenti, nonché informazioni complementari sulla loro struttura.

Composti organici non volatili invece possono essere analizzati mediante tecniche HPLC-MS con tecniche di ionizzazione adatte, quali la ESI e la APCI, con l'ausilio anche di tecniche di spettrometria di massa tandem per avere informazioni strutturali e per aumentare sensibilità e selettività nelle analisi quantitative. Tutto questo può essere realizzato, grazie all'elevata sensibilità della spettrometria di massa in generale, con un trattamento del campione ridotto all'essenziale e quindi con una manipolazione ridotta, diminuendo al contempo la possibilità di contaminare il campione con impurezze provenienti dai solventi e dai materiali utilizzati in fase di trattamento stesso.

Ringraziamenti: Gli autori desiderano ringraziare per il contributo fornito nello sviluppo delle applicazioni qui presentate le seguenti persone: il Dott. Marco Tumbiolo, per il contributo fornito all'applicazione sui VOCs, oggetto delle proprie tesi di laurea triennale e, quindi, specialistica, in Scienze e Tecnologie per l'Ambiente e il Territorio; le Dott.sse Laura Campolmi e Carla Falaschi, che hanno contribuito allo sviluppo dello studio sull'ossidazione di Fenton di tensioattivi come parte del loro lavoro di tesi di laurea in Chimica Industriale; il Sig. Marco Ventavoli, della Cartiera Lucchese di Diecimo (LU), del gruppo Lucart, per averci fornito i campioni di carta di riciclo e aver preparato dei campioni di carta esenti da sbiancante; la Prof.ssa Gloria Uccello Barretta e la Dott.ssa Federica Balzano, del Dipartimento di Chimica e Chimica Industriale, per le misure di risonanza magnetica nucleare.

Bibliografia

- [1] H. Knöppel, *Annali di Chimica*, 1977, **67**, 649 e riferimenti ivi citati.
- [2] C.L. Arthur, J. Pawliszyn, *Analytical Chemistry*, 1990, **62**, 2145.
- [3] M.S.B. Munson, F.H. Field, *J. Am. Chem. Soc.*, 1966, **88**, 2621.
- [4] A. Saba *et al.*, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 1999, **13**, 1899.
- [5] A. Saba *et al.*, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 2001, **15**, 2404.
- [6] M. Tumbiolo, Tesi di laurea in "Scienze e Tecnologie per l'Ambiente", 2006.
- [7] L. Campolmi, Tesi di laurea in "Chimica Industriale", 1995.
- [8] H.J.H. Fenton, *J. Chem. Soc.*, 1894, **65**, 899.
- [9] A. Cuzzola *et al.*, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 1999, **13**, 2140 e riferimenti ivi citati.
- [10] A. Cuzzola *et al.*, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 2000, **14**, 834.
- [11] A. Cuzzola *et al.*, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 2001, **15**, 1198.
- [12] A. Cuzzola *et al.*, *Appl. Catal. B Environ.*, 2005, **59**, 113.
- [13] A. Raffaelli *et al.*, XIX Discussion Group on Mass Spectrometry - Applicazioni della spettrometria di massa e soluzioni strumentali nel settore ambientale, Pian degli Ontani (PT), 7-8 novembre 2011.

ABSTRACT

Mass Spectrometry and Organic Environmental Pollutants: a Very Brilliant Combination

This paper describes some examples of mass spectrometry applications in the analysis of volatile organic compounds in the atmosphere, in the study of the widely used Fenton oxidation and its impact on the degradation of surfactants and in the determination of optical brightening agents in paper produced from recycled material.

La Società Chimica Italiana su Internet

Sito web della Sci: www.soc.chim.it

È anche attiva una mailing list all'indirizzo: SCI-list@list.cineca.it

Blog della Sci: <http://ilblogdellasci.wordpress.com>

Gruppo Giovani: www.scigiovani.it

Sezioni

Abruzzo: www.sciab.unich.it/index.html

Basilicata: www.soc.chim.it/it/sezioni/basilicata/home

Calabria: www.soc.chim.it/it/sezioni/calabria/home

Campania: www.scicampania.unina.it/index.htm

Emilia Romagna: www.soc.chim.it/it/sezioni/emiliariomagna/home

Friuli Venezia Giulia: www.dschi.units.it/scifvg/

Lazio: www.soc.chim.it/it/sezioni/lazio/home

Liguria: www.chimica.unige.it/sci/

Lombardia: http://users.unimi.it/sci_lombardia

Marche: www.soc.chim.it/it/sezioni/marche/home

Piemonte Valle d'Aosta: www.sci.unito.it/

Puglia: www.scipuglia.uniba.it/

Sardegna: www.soc.chim.it/it/sezioni/sardegna/home

Sicilia: www.soc.chim.it/it/sezioni/sicilia/home

Toscana: www.soc.chim.it/it/sezioni/toscana/home

Umbria: www.chm.unipg.it/chimgen/sci_umbria.htm

Veneto: www.chimica.unipd.it/gdc/sciveneto.html

Divisioni

Chimica Ambientale e dei Beni Culturali: www.socchimdabc.it/

Chimica Analitica: www.soc.chim.it/it/divisioni/analitica/home

Chimica Farmaceutica: www.soc.chim.it/it/divisioni/farmaceutica/home

Chimica Fisica: www.soc.chim.it/it/divisioni/fisica/home

Chimica Industriale: www.chimind.it/

Chimica Inorganica: <http://dci.mfn.unipmn.it/>

Chimica Organica: www.soc.chim.it/it/divisioni/organica/home

Chimica dei Sistemi Biologici: www.soc.chim.it/it/divisioni/sisbio/home

Didattica Chimica: www.soc.chim.it/it/divisioni/didattica/home

Elettrochimica: www.soc.chim.it/it/divisioni/elettrochimica/home

Spettrometria di Massa: www.soc.chim.it/it/divisioni/sdmassa/home

Chimica Teorica e Computazionale: www.soc.chim.it/it/divisioni/teocomp/home

Gruppi interdivisionali

Catalisi: <http://gic.istm.cnr.it/>

Chimica dei Carboidrati: <http://www.gicc.farm.unipi.it>

Scienza e Tecnologia degli Aerosol: www.socchimdabc.it/

Spettroscopie Raman ed effetti ottici non lineari:

Fotochimica: <http://ww2.unime.it/gif/GIF/Home.html>

Radiochimica: <http://www.lasa.mi.infn.it>

Sicurezza in Ambiente Chimico: www.gisac.it

Scienza delle Separazioni: www.scisep.it

Green Chemistry - Chimica Sostenibile: <http://www-2.unipv.it/photochem/greenchemistry>