



Università
Ca' Foscari
Venezia

Dipartimento di Scienze Molecolari e
Nanosistemi

*Corso di Laurea in Chimica e
Tecnologie Sostenibili*

Tesi di Laurea Magistrale

—
Ca' Foscari
Dorsoduro 3246
30123 Venezia

Analisi qualitativa dell'aerosol atmosferico
in area urbana (Belgrado) mediante
spettrometria di massa
ad alta risoluzione

Relatore

Prof. Andrea Gambaro

Correlatrice

Dott.ssa Roberta Zangrando

Correlatore

Dott. Giovanni Rizzato

Laureando

Denis Comelato

Matricola 826765

Anno Accademico

2014/2015

Indice

1-Scopo della tesi	pag. 6
2-Particolato atmosferico	pag. 7
2.1 Formazione aerosol atmosferico e sua origine	pag. 10
2.1.1 Aerosol primario	pag. 10
2.1.2 Aerosol secondario	pag. 12
2.2 Composizione chimica del particolato	pag. 13
2.3 Effetti del particolato	pag. 14
2.3.1 Effetti su clima e microclima	pag. 14
2.3.2 Effetti sugli ecosistemi, sulle piante e sui materiali	pag. 15
2.3.3 Effetti sulla visibilità	pag. 16
2.3.4 Effetti sulla salute	pag. 16
2.4 Combustione di biomassa	pag. 20
2.4.1 L'utilizzo delle combustioni di biomassa in Serbia	pag. 22
3-Area di studio	pag. 24
3.1 Serbia	pag.24
3.2 Belgrado	pag. 26
4-Materiali utilizzati	pag. 27
4.1 Solventi e reagenti	pag. 27
4.2 Attrezzatura di laboratorio	pag. 27
4.3 Piccola strumentazione	pag. 28
4.4 Strumentazione di analisi	pag. 28
4.5 Colonne cromatografiche utilizzate	pag. 28
4.6 Campionatore	pag. 28
5-Campionamento	pag. 29
5.1 Sito di campionamento	pag. 29

5.2 Utilizzo del campionatore	pag. 31
6-Strumentazione analitica	pag. 34
6.1 HPLC	pag. 36
6.2 Spettrometria di massa	pag. 40
6.2.1 LTQ orbitrap XL	pag. 41
6.2.1.1 Sorgente di ionizzazione	pag. 41
6.2.1.2 Interfaccia e focalizzazione	pag. 44
6.2.1.3 Trappola ionica lineare	pag. 46
6.2.1.4 Analizzatore orbitrap	pag. 48
6.2.1.5 Cella di collisione HCD	pag. 52
7-Metodo qualitativo	pag. 52
7.1 Metodo cromatografico	pag. 52
7.1.1 Reverse phase	pag. 53
7.1.2 HILIC	pag. 55
7.2 Metodo per lo spettrometro di massa	pag. 57
7.2.1 Calibrazione	pag. 57
7.2.2 Descrizione del metodo ion tree profile	pag. 59
8-Preparazione e trattamento del campione	pag. 61
9-Elaborazione dei dati	pag. 63
9.1 Sieve ⁺	pag. 63
9.2 Xcalibur	pag. 69
9.3 Identificazione degli analiti	pag. 72
9.4 Strumenti matematici impiegati	pag. 75
9.4.1 Kendrick mass defect	pag. 75
9.4.2 Diagrammi di Van Krevelen	pag. 77
10-Risultati e discussioni	pag. 79
10.1 Kendrick mass defect	pag. 81

10.2 Diagrammi di Van Krevelen	pag. 89
10.3 DBE (double bond equivalent)	pag. 96
10.4 OSc (stato di ossidazione medio del carbonio)	pag. 99
10.5 OM/OC	pag. 103
10.6 Confronti	pag. 105
10.6.1 settembre vs dicembre	pag. 106
10.6.2 settembre vs ottobre	pag. 108
10.6.3 ottobre vs dicembre	pag. 111
10.7 Analisi fattoriale	pag. 115
10.7.1 Positivo	pag. 115
10.7.2 Negativo	pag. 118
11-Conclusioni	pag. 122
12-Bibliografia e sitografia	pag. 124
Ringraziamenti	pag. 131
Appendice	pag. 132

1-Scopo della tesi

Lo studio delle sorgenti e delle trasformazioni dei composti organici presenti nell'aerosol atmosferico è fondamentale per comprendere il ruolo sulla salute umana, sul clima terrestre e sui cicli biogeochimici (Kroll et al. 2011). Tali studi risultano comunque molto difficili per la complessità della matrice ambientale aerosol atmosferico.

La frazione organica dell'aerosol atmosferico è costituita da migliaia di composti, ognuno dei quali può subire diverse trasformazioni chimico-fisiche in atmosfera (Kroll et al. 2011).

In questo lavoro di tesi viene presentato uno studio della frazione organica solubile in acqua (WSOCs water soluble organic compounds) dell'aerosol atmosferico allo scopo di individuare le principali specie chimiche e di caratterizzarlo in base alla sua composizione chimica globale.

Negli ultimi anni, nello studio qualitativo della frazione organica dell'aerosol, si sono sviluppati approcci analitici che basati sulla spettrometria di massa ad alta risoluzione (FT-ICR-MS e Orbitrap-MS sia con ionizzazione ESI che nanoESI in infusione diretta) e mediante l'impiego di strumenti chemiometrici e matematici permettono la semplificazione e l'analisi dei dati ottenuti (Kourtchev et al. 2013) (Kim et al. 2003) (Mazzoleni et al. 2012), individuando le formule brute degli analiti. Da queste è possibile ottenere informazioni generali sulle specie chimiche presenti nella matrice di analisi sulla presenza di particolari eteroatomi, gruppi funzionali, grado di ossidazione e trarre indicazioni sulle reazioni a cui possono essere sottoposte le specie presenti nella matrice.

In questo lavoro di tesi si è cercato di mettere a punto un approccio alternativo e integrato a quello precedentemente descritto, prevedendo l'utilizzo dell' HPLC-orbitrapMS allo scopo di migliorare la separazione fra le specie analizzate (es. isomeri impossibile in infusione diretta) e la riduzione dell'effetto matrice, nonché l'impiego di software utilizzati in campo metabolomico ottenendo non solo le formule brute delle molecole rilevate (come finora operato), ma anche l'identificazione delle molecole stesse quando le specie osservate siano comprese in database e in letteratura.

2-Particolato atmosferico

Per particolato atmosferico si intende tutto il materiale solido e liquido disperso in atmosfera che presenta un diametro compreso tra qualche nanometro (nm) fino a decine di micrometri (μm) (Turchet M. 2012) (Marconi A. 2003).

Le particelle presenti in atmosfera presentano dimensioni e forme molto varie e questo porta ad una velocità di sedimentazione diversa per ogni particella; la classificazione di queste molecole deve però basarsi su un aspetto comune a tutte, per cui viene preso in considerazione un parametro definito diametro medio equivalente (d_{ae}) che altro non è che il diametro di una particella sferica con densità unitaria (1 g cm^{-3}) e un comportamento aerodinamico uguale, ad esempio stessa velocità di sedimentazione, alla particella considerata nelle stesse condizioni di temperatura (T), pressione (P) e umidità relativa (Smith et al. 2009b).

Attraverso il parametro d_{ae} possiamo andare a classificare il particolato atmosferico in varie classi, ovvero TPS (Total Suspended Particles); PM_{10} e $\text{PM}_{2.5}$ (Turchet M. 2012).

Le TPS o particelle totali sospese sono particelle che presentano una dimensione tale da rimanere in aria per un tempo sufficiente per essere campionate, solitamente presentano un $d_{ae} < 100 \mu\text{m}$. Le PM_{10} , sono particelle che presentano un $d_{ae} \leq 10 \mu\text{m}$ e tramite un campionatore apposito se ne può raccogliere il 50%; analogamente le $\text{PM}_{2.5}$ sono particelle che presentano un $d_{ae} \leq 2,5 \mu\text{m}$ e possono anch'esse essere campionate con un'efficienza del 50% (Lowe 1997); esse rappresentano circa il 60% delle PM_{10} ed essendo di minor grandezza possono penetrare di più nell'organismo e provocare danni maggiori (Marconi A. 2003).

Un'altra suddivisione del particolato atmosferico può essere effettuata classificandolo in frazioni, in questo caso avremmo:

FRAZIONE ULTRAFINE: d_{ae} compreso tra 0,01 e 0,1 μm , sono particelle che derivano da processi di nucleazione omogenea di vapori di composti come SO_2 , NH_3 , NO_x o prodotti derivanti dalla combustione.

FRAZIONE FINE: presenta un d_{ae} compreso tra 0,1 e 2,5 μm . Questa frazione viene a formarsi in vari modi, attraverso una nucleazione eterogenea dovuta ad una conversione gas-particella o attraverso delle condensazioni dei gas su particelle già preesistenti.

All'interno delle aree industrializzate, i maggiori costituenti di tali particelle sono composti derivanti direttamente dalle attività che si svolgono e possono essere solfati, nitrati, ione

ammonio, carbonio elementare e organico, ma anche composti di origine biologica come spore fungine, lieviti e batteri.

COARSE: presentano un d_{ae} compreso tra 2,5 e 100 μm , come si evince dalle dimensioni sono le particelle più grosse, quindi tendono a sedimentare in tempi relativamente più brevi e sono formate da materiale derivante da processi quali erosione, risospensione, macinazione e contengono principalmente elementi del suolo e dell'ambiente circostante che può essere sia di tipo terriero che marino. Per questo motivo all'interno di questa frazione si trova per esempio il sale marino generato dall'esplosione di bolle da parte del vento sulla superficie marina o dall'azione delle onde (Marconi A. 2003)(Hernes & Benner 2002).

In Figura 1 si può osservare uno schema che mette in relazione la distribuzione dimensionale in

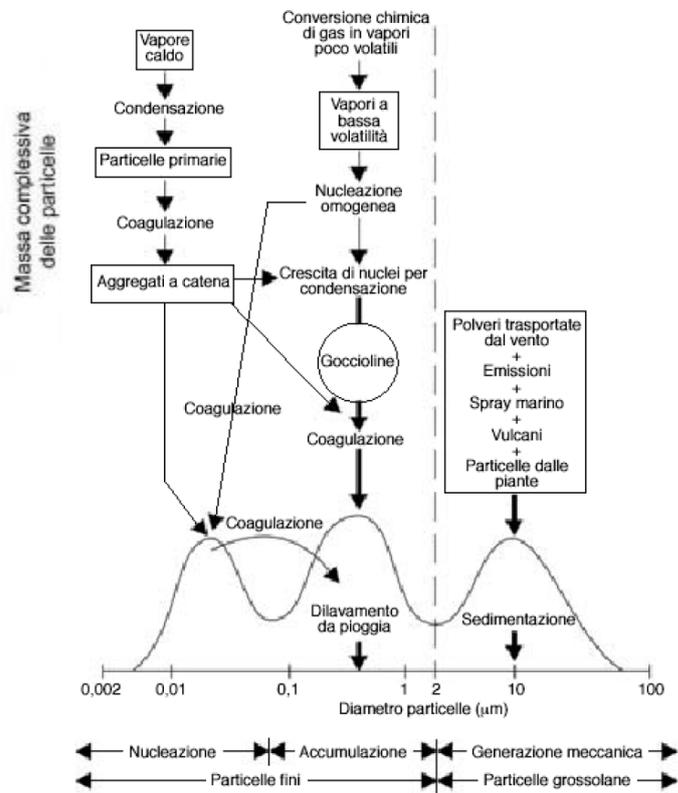


Figura 1: correlazione della distribuzione dimensionale delle particelle di particolato con il loro Volume, Massa, mezzo di dispersione ed origine (Marconi A. 2003)

termini di Massa e Volume delle particelle, con l'origine e il mezzo in cui sono disperse.

Per quanto riguarda le particelle fini, $d_{ae} < 1 \mu\text{m}$, in atmosfera si trova una concentrazione compresa tra le 10 e le 10.000 particelle/cm³ mentre per quanto riguarda particelle con dimensioni maggiori, $d_{ae} > 1 \mu\text{m}$, la concentrazione si assesta attorno alle 10 particelle/cm³.

E' importante sottolineare che le particelle con $d_{ae} < 2,5 \mu\text{m}$ rappresentano oltre il 95% delle particelle totali (Lowe 1997), mentre quelle con d_{ae} compreso tra 5 e 50 μm rappresentano la parte maggiore della massa del particolato in quanto risultano avere un peso di gran lunga superiore a quelle più piccole anche se sono in numero inferiore.

2.1 FORMAZIONE AEROSOL ATMOSFERICO E SUA ORIGINE

Come già descritto precedentemente, l'aerosol atmosferico può essere classificato in base alle dimensioni delle particelle che lo compongono.

Non sempre però questa classificazione può essere sufficiente per descriverne nei dettagli l'appartenenza. Per questo motivo un'ulteriore classificazione può essere fatta in base all'emissione del particolato in atmosfera differenziando così aerosol primario da aerosol secondario.

2.1.1 AEROSOL PRIMARIO

L'aerosol primario è costituito da tutte le particelle, sia di piccole dimensioni sia più grandi, che vengono ad originarsi direttamente dalla sorgente di partenza e che quindi vengono emesse in atmosfera già nella loro forma finale senza andare incontro ad ulteriori modificazioni che ne cambiano la struttura o la natura stessa (Marconi A. 2003)(Fuzzi et al. 2015).

Questo aerosol può essere di vari tipi:

Aerosol marino, generato dal vento o dalle onde che sospendono il sale e altri componenti organici in atmosfera, molti dei quali rimangono tutt'oggi incaratterizzati (Karanasiou et al. 2012) in quanto derivano dalla degradazione di organismi e minerali e sono formati da composti a base di acidi grassi, carboidrati, saccaridi, cellule frammentate e sostanze umiche (Querol et al. 2009).

Polveri minerali, che derivano da materiale crostale spazzato dal vento; in alcune regioni questo costituisce la maggior componente dell'aerosol atmosferico; basti pensare alle regioni confinanti con i deserti quali il Sahara considerato la più grande sorgente di polveri naturali (Kandler et al. 2009) e che anche a distanza di chilometri, incide fortemente sui valori di PM₁₀ registrati in regioni come quelle mediterranee (Karanasiou et al. 2012)(Fuzzi et al. 2015).

Aerosol biologico primario (PBAP), include una elevata differenziazione di composti biologici comprendenti inoltre microrganismi, batteri, alghe, funghi, archeobatteri e materiale disperso come spore, pollini, virus e frammenti biologici emessi direttamente in atmosfera dalle sorgenti (Fuzzi et al. 2015).

Questo tipo di aerosol varia in concentrazione (dipende molto dall'area di studio, dall'altitudine e dalla stagione) e generalmente rappresenta circa il 25% dell'aerosol totale (Szidat et al. 2009)(Lanz et al. 2008).

Combustione di legno. La combustione di materiale legnoso all'interno di stufe o generatori porta alla formazione di particolato che viene direttamente scaricato in atmosfera attraverso i camini. La combustione di legno è responsabile di una grande quantità di emissioni di carbonio organico (OC), ad esempio in inverno a Zurigo l'OC emesso dalle stufe risulta essere il 45% del totale (Fuzzi et al. 2015). Oltre alla legna anche il cosiddetto "biomass burning" ovvero la combustione di materiale organico (biomassa) derivante da residui boschivi, agricoli, vinicoli porta all'emissione di una grande quantità di OC e solo in Europa questa quantità è compresa tra il 30 e il 75% (Kocbach Bølling et al. 2009)(Kasper-giebl et al. 2007).

Le caratteristiche del particolato emesso dipendono da vari fattori, come le condizioni di combustione, il tipo di legno ed eventuali filtri per abbattimento di polveri pesanti. Queste considerazioni assumono rilevante importanza grazie all'evidenza della relazione tra fumo di legna ed effetti sulla salute quali minore resistenza alle infezioni, riduzione delle funzioni polmonari e asma (Facchini M.V. 2001).

2.1.2 AEROSOL SECONDARIO

L'aerosol secondario è costituito da inquinanti che vengono a formarsi in atmosfera per reazioni chimiche e trasformazioni fisiche, di aggregazione e nucleazione, tra sostanze già presenti in aria. Queste sostanze sono principalmente ossidi di azoto NO_x , ossidi di zolfo SO_x , NH_3 e composti organici volatili (VOC); l'aerosol secondario è generalmente formato da particelle fini che presentano un $d_{ae} < 1 \mu\text{m}$ (Fuzzi et al. 2015).

Una volta in atmosfera, le particelle subiscono vari processi, come la condensazione, l'evaporazione, la coagulazione, che ne fa aumentare o diminuire le dimensioni.

La concentrazione resta comunque abbastanza costante in quanto le particelle grosse tendono a depositarsi per effetto della gravità o di fenomeni di deposizione mentre quelle piccole passano maggior tempo in aria (Air Guidelines Europe 2nd edition 2010).

Nella deposizione secca le particelle vanno a depositarsi sulla superficie terrestre senza alcun intervento di precipitazioni che ne aiutano la discesa al suolo, mentre nella deposizione umida fenomeni come pioggia, neve o nebbia facilitano la deposizione delle particelle sul terreno in forma acquosa.

In questo caso particelle grandi si depositeranno velocemente aiutate anche dal loro peso, mentre quelle più piccole rimarranno in aria per un tempo maggiore.

2.2 COMPOSIZIONE CHIMICA DEL PARTICOLATO

La composizione chimica del particolato dipende molto dal luogo di provenienza e dalla sorgente che lo emette (Seinfeld and Pandis 2006); questo differenzia due grandi categorie di sorgenti, naturali e antropiche.

Le sorgenti naturali, come dice la parola stessa, sono fonti di materiale naturale come rocce, ceneri di incendi e vulcani, materiale biologico da piante e animali, spore, spray marino ecc.

Le sorgenti antropiche sono invece legate all'attività umana e derivano principalmente dall'uso di combustibili fossili, processi industriali o anche dallo smaltimento di rifiuti, attività agricole o tutte le attività manifatturiere che attua l'uomo (Lowe 1997).

Giornalmente, si stima che circa 10 milioni di tonnellate di particolato vengono emesse in atmosfera (Van Dingenen et al. 2004) dove il 94% derivano da sorgenti naturali e il 6% deriva da sorgenti antropiche; tuttavia anche se la quantità di particolato da sorgenti antropiche risulta essere in quantità molto più bassa, è in questa frazione che possono essere contenute sostanze pericolose per la salute umana e per l'ambiente. Un altro aspetto da tenere in considerazione è che queste sostanze vanno a concentrarsi in quelle zone dove l'attività umana è molto forte e quindi all'interno di centri urbani o zone di interesse industriale.

Come già indicato, il particolato contiene sia materiale organico, sia materiale inorganico, sia specie biologiche. Tenzialmente solfati, C organico, NH_4^+ e alcuni metalli di transizione si concentrano nelle particelle fini derivanti da fonti secondarie; non è comunque raro trovare C elementare o IPA (idrocarburi policiclici aromatici) che rappresentano una derivazione e un legame con l'aerosol di tipo primario (Seinfeld and Pandis 2006).

Elementi come Si, Ca, Mg, Al, Fe che rappresentano sostanze cristalline, ovvero derivanti direttamente dalla crosta terrestre, sono contenuti in maniera preponderante nella parte grossolana del particolato che deriva da fonti primarie, inoltre nella frazione grossolana si trovano anche ioni inorganici solubili in acqua (Cl^- , NO_3^- , Na^+ , Mg^+ , Ca^+) mentre ioni come SO_4^{2-} e NH_4^+ si trovano nel particolato fine (Smith et al. 2009)(Samara et al. 2003).

2.3 EFFETTI DEL PARTICOLATO

Gli effetti che il particolato può imprimere non riguardano solamente l'uomo e la sua salute, ma colpiscono anche l'ambiente, il clima e le strutture di cui viene fatto uso quotidiano.

2.3.1 EFFETTI SU CLIMA E MICROCLIMA

La radiazione proveniente dal sole può essere assorbita o riflessa dai composti organici presenti all'interno dell'aerosol atmosferico, questo avviene in modo diversificato in base alle dimensioni, alla composizione chimica delle particelle, ma anche dalla lunghezza d'onda della radiazione solare (Lutgens et al. 2005).

L'assorbimento della radiazione da parte dell'aerosol può portare ad un raffreddamento del pianeta in quanto le particelle possono fungere da nuclei di condensazione per le nuvole aumentandone così la loro formazione. D'altra parte, però, queste potranno anche portare ad un innalzamento delle temperature provocando un surriscaldamento globale, in quanto un aumento di nuvolosità blocca la dispersione del calore che si è già incamerato nell'atmosfera (Brunekreef 2005) (Lutgens et al. 2005). Anche il microclima urbano è influenzato dagli effetti del particolato atmosferico; nei centri urbani infatti l'inquinamento contribuisce all'effetto "isola di calore" creato dall'elevata cementificazione che inibisce la perdita di radiazione e calore durante la notte (Smith et al. 2009).

Rispetto alle zone circostanti, inoltre, l'umidità all'interno di una grande città è più bassa del 2-8%; questo è conseguenza della maggior temperatura della città stessa e della veloce evaporazione dell'acqua meteorica.

Nelle città, comunque, si può notare la frequente formazione di nubi e nebbie (figura 2) dovute alle attività umane che producono particelle che fungono da nuclei di condensazione nella formazione delle nubi e quando il numero di nuclei igroscopici è elevato, questi portano ad un aumento delle precipitazioni direttamente legate al particolato atmosferico (Smith et al. 2009)



Figura 2: Formazione di nebbia sopra due metropoli per effetto del particolato atmosferico.

2.3.2 EFFETTO SUGLI ECOSISTEMI, SULLE PIANTE E SUI MATERIALI

Ecosistemi come quello acquatico o terrestre possono essere influenzati pesantemente dalla presenza di una grossa quantità di particolato atmosferico.

Fenomeni come l'acidificazione e l'eutrofizzazione portano seri problemi sulle coltivazioni e sul terreno stesso come il danneggiamento delle cellule e dei tessuti vegetali.

Un terreno con un'acidità elevata è dovuto principalmente alla presenza di acidi rilasciati nel terreno o ad un dilavamento di basi; inoltre il rilascio di altri elementi come l'alluminio che bene si legano ai complessi di scambio che si formano nel terreno porta ad ulteriori danni.

Per quanto riguarda l'eutrofizzazione, questa avviene quando una maggiore quantità rispetto alle normali concentrazioni di nitrati, fosfati e solfati sono presenti nell'ambiente. Il tutto porta ad un accrescimento degli organismi vegetali e successivamente ad un degrado dell'ambiente circostante in quanto questo fenomeno provoca la formazione di un ambiente povero di ossigeno .

Un altro danno diretto che ha il particolato atmosferico è sui materiali; questi infatti vanno incontro ad un processo di annerimento in quanto le particelle che si depositano fungono da serbatoio di acidi che corrodono il materiale (Lutgens et al. 2005). Processi di questo tipo sono intensificati dall'aumentare dell'umidità; si è già visto che le particelle di particolato fungono da nuclei di condensazione per gocce d'acqua nelle quali possono sciogliersi molti gas (Smith et al. 2009). Oltre a tutto questo, possono esserci anche danni a circuiti elettrici, ad edifici, ad opere d'arte, a verniciature, a tessuti e a qualsiasi altro oggetto che viene esposto a tali particelle.

2.3.3 EFFETTI SULLA VISIBILITA'

Per visibilità si intende la massima distanza alla quale è possibile identificare un oggetto scuro in condizioni di luce solare (visibilità diurna), o una sorgente luminosa in condizioni di buio (visibilità notturna) (Cohen et al. 2006).

I valori di visibilità possono essere ridotti da nebbia, fuliggine, polveri, sabbia, fumo, precipitazioni atmosferiche, tutti fattori legati o interconnessi alla presenza di particolato atmosferico e alla sua concentrazione.

2.3.4 EFFETTI SULLA SALUTE

Recentemente il problema del particolato atmosferico è stato trattato da un punto di vista più approfondito andando a studiarne più dettagliatamente le problematiche che porta alla salute dell'uomo. Questo perché l'esposizione a particelle pericolose per la salute non è ristretto a poche singole persone ma accomuna tutta la popolazione mondiale.

Come già accennato, il particolato è divisibile in varie dimensioni e per quanto riguarda il fattore salute, le frazioni generalmente tenute sotto controllo sono le PM_{10} e le $PM_{2.5}$.

Le particelle incidono maggiormente sull'apparato respiratorio e la dimensione di queste è molto importante in quanto, in base al loro diametro, sono in grado di penetrare all'interno dell'apparato respiratorio a profondità diverse. Naturalmente la pericolosità dipenderà sia dal tipo di particella che penetra nell'organismo, sia dal punto di deposizione di quest'ultima.

In figura 8 si può osservare uno schema raffigurativo delle dimensioni delle particelle legate alla percentuale di deposizione e ai loro punti di deposizione.

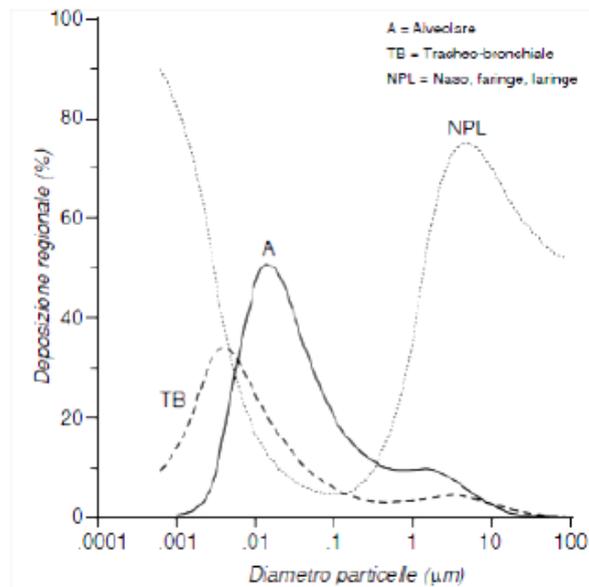


Figura 3: Correlazione tra dimensioni delle particelle, punti di deposizione nell'organismo umano e % di deposizione (Marconi A. 2003).

Facendo riferimento alle particelle di aerosol che si depositano nel tratto respiratorio, possiamo classificarle in varie frazioni:

FRAZIONE INALABILE: include tutte le particelle che entrano nelle narici e nella bocca e hanno una grandezza compresa tra 10 µm e 100 µm.

FRAZIONE TORACICA: in questo caso le particelle presentano una grandezza inferiore ai 10 µm e riescono a passare attraverso la laringe ed ad entrare nella zona polmonare tracheo-bronchiale (inclusa trachea e via cigliate).

FRAZIONE RESPIRABILE: sono le cosiddette polveri ultrafini, presentano dimensioni inferiori ad 1 µm e possono raggiungere gli alveoli polmonari incluse le vie non cigliate e i sacchi alveolari. (figura 4)

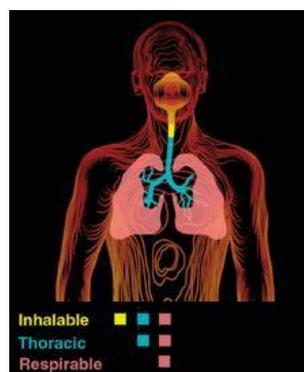


Figura 4: zone di deposizione delle frazioni di aerosol.

Queste suddivisioni sono cruciali per il campionamento in quanto vanno a definire delle convenzioni per gli strumenti di prelievo a cui devono conformarsi.

Le convenzioni, definite per le tre frazioni descritte sopra, sono rappresentabili da curve aventi il 50% di efficienza in corrispondenza del diametro aerodinamico pari a $100\ \mu\text{m}$, $10\ \mu\text{m}$ (PM_{10}) e $4\ \mu\text{m}$ (PM_4). Inoltre è stato aggiunto un'ulteriore curva con efficienza del 50% in corrispondenza del diametro aerodinamico di $2,5\ \mu\text{m}$ ($\text{PM}_{2,5}$). In figura 5 sono raffigurate le curve di efficienza corrispondenti le convenzioni per il campionamento.

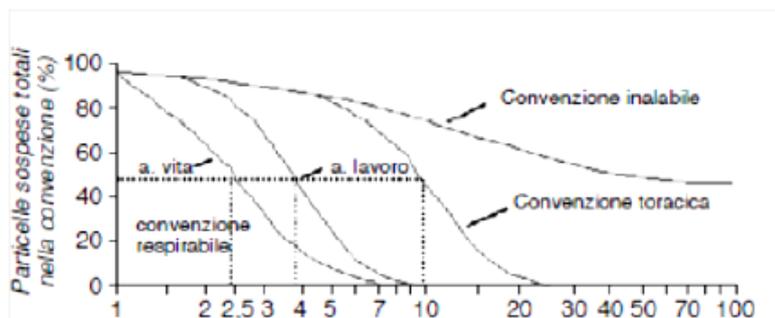


Figura 5: Convenzioni per il campionamento delle frazioni, inalabile, toracica e respirabile espresse come percentuale delle particelle sospese totali negli ambienti di lavoro e di vita (Marconi A. 2003).

Le norme di riferimento vengono applicate ugualmente in tutti gli ambienti, che sia domestico, lavorativo, outdoor o indoor.

La pericolosità delle particelle che penetrano nel sistema respiratorio non dipende solamente dalla grandezza, ma anche e soprattutto dalla composizione e dalla natura della particella stessa. Le vie respiratorie possiedono meccanismi di difesa contro le sostanze estranee che penetrano al loro interno, come secernere muco, o la presenza di ciglia che bloccano eventuali particelle. Le sostanze nocive che riescono ad entrare nelle vie respiratorie possono danneggiare questi meccanismi di difesa; inoltre se le particelle risultano essere solubili possono assorbirsi e provocare danni in zone circostanti al punto di penetrazione o essere trasportate in altre zone del corpo e provocare danni ben più gravi o provocare malattie respiratorie come asma, bronchiti, enfisema ecc (Curtis L. 2002).

In figura 6 è possibile osservare uno schema riassuntivo correlante la grandezza delle particelle e il loro livello di penetrazione nelle vie respiratorie.

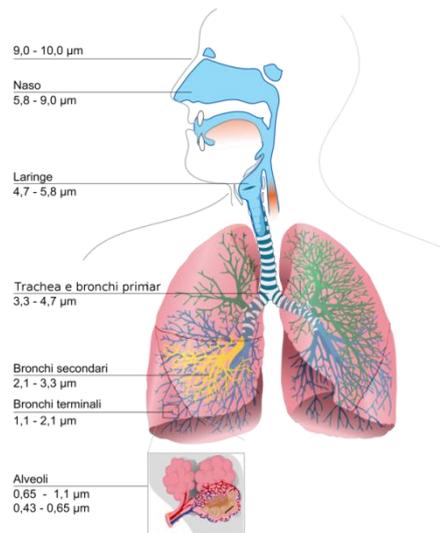


Figura 6: Grandezza delle particelle di particolato atmosferico e livelli di penetrazione.

Dalla figura 6 si può capire come le particelle più piccole siano potenzialmente le più dannose e nocive in quanto possono arrivare più in profondità all'interno dell'organismo.

Il problema della salute umana correlato all'aerosol atmosferico è stato trattato da molti Paesi e organizzazioni internazionali che hanno revisionato gli standard di qualità dell'aria, per esempio l'Unione Europea attraverso le direttive 2008/50/EC ha definito dei valori limite per i $PM_{10} < 28 \mu\text{g}/\text{m}^3$, mentre per i $PM_{2.5}$ è stato chiesto di attuare un controllo continuo alla loro concentrazione in quanto i valori limite misurati non vengono applicati alle misurazioni effettuate per valutare la conformità all'obiettivo di riduzione dell'esposizione al $PM_{2.5}$ (Ce et al. 2008).

2.4 COMBUSTIONE DI BIOMASSA

Per biomassa si intende l'insieme di organismi vegetali presenti in un dato ambiente che può essere combusto e subire trasformazioni per scopi energetici o combustioni non volute quali incendi o roghi boschivi.

La biomassa è formata principalmente da due frazioni, carboidrati e lignina.

CARBOIDRATI: essi rappresentano la parte maggioritaria della biomassa, circa il 70% del totale in peso (Favarelli T. 2006). All'interno di questa frazione si possono trovare sia monosaccaridi come glucosio o fruttosio ma anche polisaccaridi come cellulosa ed emicellulosa.

La cellulosa è un polisaccaride naturale con formula bruta $(C_6H_{10}O_5)_n$ (figura 7); essa è costituita da una grande quantità di molecole di glucosio legate tra di loro da un legame β (1 \rightarrow 4) glicosidico. All'interno degli organismi vegetali il suo ruolo è quello di dare resistenza in quanto la sua struttura è molto fibrosa (Favarelli T. 2006).

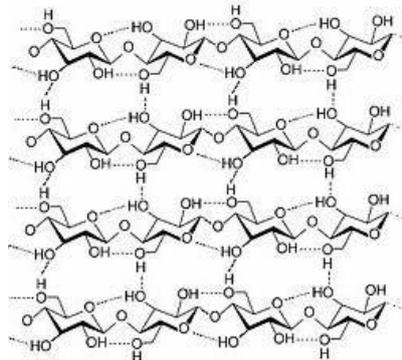


Figura 7: Struttura della cellulosa.

L'emicellulosa (figura 8), anch'essa un polisaccaride naturale, è scarsamente solubile in acqua, a differenza della cellulosa. La sua struttura risulta essere ramificata, formata da zuccheri differenti dal glucosio che conferiscono all'emicellulosa la capacità di tenere assieme cellulosa e lignina (Favarelli T. 2006).

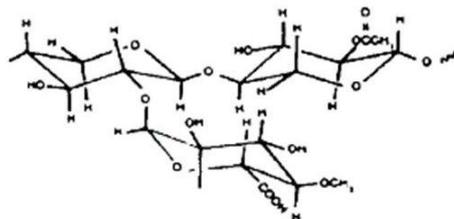


Figura 8: Struttura dell'emicellulosa.

LIGNINA: (figura 9) rappresenta circa il 30% della biomassa ed è costituita soprattutto da composti fenolici (Đerčan et al. 2012).

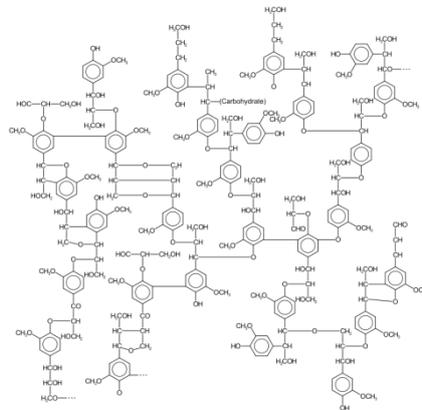


Figura 9: Struttura della lignina [146].

La combustione di biomassa racchiude tutta una serie di reazioni che prevedono come passaggio finale l'ossidazione del carbonio a CO_2 e dell' O_2 ad H_2O .

Se la combustione avviene in condizioni di parziale carenza di O_2 , allora si avrà la formazione anche di altri composti come CO, VOC, IPA e particolato (Turchet M. 2012).

Naturalmente i prodotti della combustione dipendono molto dal tipo di biomassa e dalle sue caratteristiche ma i principali risultano essere CO_2 ; CO, particolato e composti pericolosi per la salute umana come IPA e VOC, oltre a una serie di composti non ossidati completamente come aldeidi, chetoni, alcoli, acidi carbossilici e carbon black (Curtis L. 2002).

Riassumendo i passaggi tipici della combustione della biomassa abbiamo:

- Riscaldamento del solido,
- Essiccamento,
- Pirolisi, dove vengono rilasciati i composti volatili,
- Combustione primaria in fase gas,
- Combustione secondaria eterogenea gas-solido (Favarelli T. 2006).

Tutto questo porta alla consapevolezza che le problematiche e i fenomeni legati alla combustione di biomassa siano molto complessi. E', inoltre, evidente di come la combustione di materiale organico vegetale porti al rilascio in atmosfera di gas e particelle che possono avere un'incidenza sulla salute umana e sull'ambiente.

Dalla combustione di ogni specie di pianta sono rilasciati in atmosfera composti caratteristici dei suoi componenti utili ad ottenere informazioni sulla tipologia di pianta combusta (Smith et al. 2009).

Tra tutti questi composti alcuni sono di rilevante importanza, perché risultano essere dei veri e propri marker di combustione di biomassa e permettono tra tutte le sostanze presenti nel particolato, di dire con certezza che c'è stata una combustione di materiale organico vegetale; un classico esempio di marker è il levoglucosan o la siringaldeide (Smith et al. 2009).

2.4.1 L'UTILIZZO DELLE COMBUSTIONI DI BIOMASSA IN SERBIA

La biomassa legnosa in Serbia ha un grande range di utilizzo, oltre al tradizionale uso per riscaldare abitazioni, strutture commerciali e pubbliche viene anche usato per la produzione del cosiddetto "wood biofuels".

Annualmente in Serbia vengono prodotte 12.5 milioni di tonnellate di biomassa di cui solo 9 milioni provenienti dalla Voivodina; di questa quantità il 25% è usata per produrre un equivalente di 1.3 milioni di tonnellate di diesel (Curcic et al. 2014). Un'altra ingente quantità viene utilizzata per la produzione del cosiddetto pellets o di tronchetti di cippato (Figura 10) che vengono utilizzati come generatori di energia in caldaie o stufe, oltre al normale legno usato per il riscaldamento domestico che avviene nel periodo invernale.

Si calcola che nel 2010 la quantità utilizzata in Serbia di biomassa da legno sia stata di circa 7.41 Mm³ dove il 94.94% (7.03 Mm³) era in forma di legna da ardere (Đerčan et al. 2012). Nelle stufe la biomassa non serve solamente per generare calore o elettricità, ma viene usata anche nella produzione di aria, acqua e vapore caldo riutilizzabile per altri scopi (energia elettrica, termica, acqua calda utilizzabile) (Mech et al. 2009).

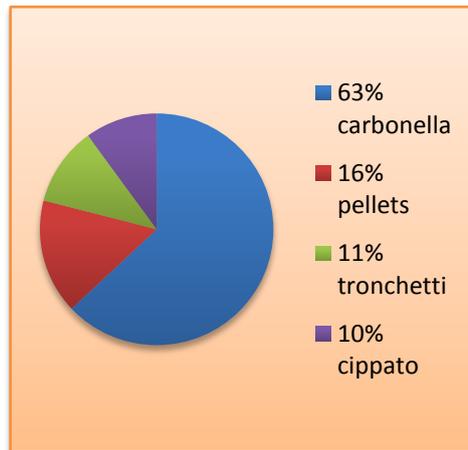


Figura 10: Suddivisione in percentuale dei prodotti derivanti dalla frazione di biomassa usata per la produzione di "wood biofuels" (Glavonjic and Oblak 2012).

Non tutta la biomassa prodotta, però, e tra questa il materiale di scarto (sfalci, residui agricoli, residui di foresta, residui di orticoltura e viticoltura) può essere sempre utilizzata come fonte di energia. Solamente quella in accordo con la legislazione può essere lavorata e riutilizzata; tutto questo a salvaguardia dell'ambiente e per regolare le immissioni di eventuali inquinanti in atmosfera da parte di stufe o generatori (Đerčan et al. 2012).

Tuttavia il materiale di scarto (biomassa) prodotto spesso per essere smaltito è bruciato in campi aperti, come avviene in Serbia (Glavonjic and Oblak 2012).

La combustione di tutto questo materiale in campi aperti porta ad emissioni incontrollate di dannose per l'uomo e fonte di particolato atmosferico.

3-Area di studio

3.1 SERBIA

La Serbia o Repubblica di Serbia è uno stato situato nell'est Europa e facente parte della penisola balcanica che comprende molti altri stati come Croazia, Montenegro, Bosnia-Erzegovina, Bulgaria, Kosovo, Albania, Macedonia, Grecia e Turchia. La popolazione totale è circa 9.424.000 con una densità di circa 98 abitanti per Km² (Populationpyramid.net), la capitale del Paese è Belgrado. La Serbia copre 88361 Km² dove lo 0.13 % è sommerso da fiumi e corsi d'acqua; la sua superficie è molto vasta e il paesaggio molto vario, infatti si va dalle grandi pianure situate a Nord alle catene montuose del Sud.

Il Paese è solcato da molti fiumi, ma i principali sono il Danubio, che attraversa il nord per 588 Km, la Morava che invece scorre nel sud del Paese e poi troviamo molti altri fiumi di dimensioni minori come l'Ibar, la Drime o il Sava.

Dal punto di vista della suddivisione territoriale, la Serbia comprende 108 comuni ed è divisa in tre grandi regioni principali. A nord troviamo la Voivodina comprendente 54 comuni, a sud il Kosovo e Metochia autoproclamatosi stato indipendente sotto il controllo delle Nazioni Unite e comprendenti 30 comuni, mentre la regione compresa tra Voivodina e Kosovo viene chiamata Serbia centrale come è possibile osservare in Figura 11.



Figure 11: Suddivisione territoriale della Serbia.

Dal punto di vista climatico la Serbia presenta un clima di tipo continentale a nord del paese, con inverni freddi ed estati calde ed umide (Enciclopedia britannica Online); mentre a sud il clima è caldo e secco d'estate e freddo e nevoso in inverno (Hydrometeorologic service of Serbia).

Questo tipo di clima influenza molto anche la flora e la fauna. La Serbia infatti, è caratterizzata da una alta quantità di specie e da una biodiversità molto accentuata con un ecosistema diversificato lungo tutto il territorio. Si possono trovare infatti animali selvatici di vario tipo, come il lupo o il cinghiale, oltre naturalmente a tutti gli animali da pascolo o da allevamento.

Anche la Flora risulta essere molto varia e si possono osservare paesaggi diversi all'interno del Paese; nella Voivodina infatti spiccano grandi pianure che bene si adattano alle coltivazioni ed è per questo che in questa regione troviamo grandi appezzamenti terrieri (Berenji et al. 2011).

Nella sezione orientale, invece, troviamo grandi foreste soprattutto di querce e faggi e il paesaggio montano che si apre fa sì che si trovino anche molte conifere. Approssimativamente in Serbia sono registrate ufficialmente 44200 taxa ma queste potrebbero essere molte di più se alcuni organismi venissero studiati più approfonditamente (Biodiversity strategy of Serbia).

Per quanto riguarda la produzione agricola il mais e il frumento sono i prodotti più coltivati all'interno del Paese ma non gli unici, tra tutte le altre coltivazioni si possono annoverare tabacco, girasoli, soia, barbabietole da zucchero, sorgo bicolor e il luppolo.

Per quanto riguarda lo sfruttamento delle foreste che si trovano all'interno del territorio le specie di piante maggiormente utilizzate sono le Conifere e Pini (*Pinus peuce*, *Pinus heldrichii*, *Pinus nigra*), Aceri (*Acer heldrichii*), Betulle (*Betula pendula*), Frassino (*fraxinus pallisae*) e Noce (*Corylus colurna*)(Country report of Serbia).

I prodotti che si ottengono da questo settore sono grano, prodotti da agricoltura, semi commercializzabili, cibi e bevande, legname da vendita e prodotti a base di legno (Country report of Serbia). Tutta questa produzione vegetale e legnosa porta alla formazione di una grande quantità di scarti che viene trasformata in biomassa che a sua volta viene utilizzata per la produzione di energia (Đerčan et al. 2012). L'utilizzo di questo tipo di tecnologia è sviluppato nelle regioni dove l'attività industriale risulta essere maggiormente progredita come per esempio a Belgrado (Beograd.rs).

3.2 BELGRADO

Belgrado è la capitale della Serbia ed è situata nella regione della Serbia centrale (Figura 12), la sua ubicazione è a 117 metri sul livello del mare, copre una superficie di 359.96 Km² e presenta una popolazione di 1.659.440 abitanti (Turchet M. 2012).



Figura 12: Ubicazione di Belgrado nella Serbia

Belgrado si trova nella confluenza tra i fiumi Danubio e Sava che rende questa città un punto focale nel trasporto di merci attraverso l'arteria fluviale (Beograd.rs). La città, essendo posizionata nel nord del Paese, gode di un clima continentale e molte volte in inverno un vento freddo chiamato Kosava fende la città da nord-est, mentre in estate la temperatura supera anche i 40°C e il clima risulta essere umido (Turchet M. 2012). Belgrado risulta essere la città più importante della Serbia e racchiude in se molte istituzioni come ad esempio la Banca Nazionale e la Japan Tabacco. In un centro urbano così grande e fortemente popolato, si deve tenere sotto osservazione l'aria che si va a respirare ma più in generale l'atmosfera della città, si avrà infatti la formazione di particolato atmosferico che si crea sia da fonti di origine naturale, sia dalle operazioni antropiche fatte dall'uomo; ed è in queste zone così intensamente popolate e con un forte impatto umano, che il particolato atmosferico va a concentrarsi maggiormente.

4-Materiali Utilizzati

4.1 SOLVENTI E REAGENTI

Metanolo ultragradient (Ramil LTD-Cambridge, UK);

Acetonitrile (Ramil LTD-Cambridge, UK);

H₂O ultrapura (18,2 MΩ cm, 0,01 TOC) (Purelab Flex Elga, High Wycombe, UK);

Acido Formico 98% (Fluka Sigma Aldrich, Buchs, Switzerland);

Detergente vetreria Contrad® 2000 conc. (VWR International s.r.l Milano, Italy);

Per la modalità positiva la soluzione calibrante contiene Caffaina 20µg/ml; MRFA (massa 524) C₂₂H₂₇N₇O₅S (H-Met-Arg-Ph Ala-OH) 1µg/ml; Ultramark 1621 0,001% in soluzione acquosa di aceto nitrile (50%), metanolo (25%) e acido acetico (1%);

Per la modalità negativa la miscela di sostanze note è costituita da SDS (sodio dodici solfato) 2,9 µg/ml; Sodio taurocolato 5,4 µg/ml; Ultramark 1621 0,001% in soluzione acquosa di aceto nitrile (50%), metanolo (25%) e acido acetico (1%);

Soluzione standard contenente 70 ng di ¹³C₆ vanillina, 1500 ng di ¹³C₆ levoglucosan e 200-300 ng di una miscela di ¹³C aminoacidi (Ala*, Arg*, Glu*).

4.2 ATTREZZATURA DI LABORATORIO

Beute 50 ml (Vetrotecnica, Padova, Italy);

Filtri in fibra di quarzo To-13 (QFF), porosità 1 µm, diametro 10 cm (SKC Inc, Eighty four, Pennsylvania, USA);

Filtri in PTFE diametro 25 mm e porosità 0,45 µm (National Scientific Company, Rockwood, Tennessee, USA);

Micropipette 10, 20, 100, 1000, 5000 µl con puntali sterili in PET (Eppendorf AG, Hamburg, Germany);

Micropipette 10, 20, 50, 100, 200 µl con capillari in vetro, per trasferimento solventi organici Transferpettor Brand (Rudolf Brand GMBH+CO, Wertheim-Gloshütte, Germany);

Siringhe 10ml in vetro Fortuna® Optima® (Poulten & Graf GmbH, Wertheim, Germany);

Vial in vetro da 2 ml per auto campionatore (Agilent, Waldbronn, Germany);

Vial ambrate in vetro da 2, 4, 9 per stoccaggio (Supelco, Bellefonte, USA).

4.3 PICCOLA STRUMENTAZIONE

Bagno ad ultrasuoni (Ultrasonic FALC);

Bilancia analitica 5 cifre KERN ALT 220-4NM (KERN & Sohn GmbH, Belinger, Germany);

Impianto di depurazione H₂O Purelab Option-R pure water system accoppiato a Purelab

Ultra Analytic ultra pure water system (Elga Lab Water, High Wycombe, UK).

4.4 STRUMENTAZIONE DI ANALISI

UHPLC Ultimate 3000 (Dionex Softron GmbH Part of Thermo Fisher Scientific Inc, Gemering, Germany);

LTQ Orbitrap XL (Thermo Scientific, USA Watham, Massachusetts).

4.5 COLONNE CROMATOGRAFICHE UTILIZZATE

Filtro in acciaio HPLC column in-line filter, s.s 0,5 µm porosità 1,5 mm (Phenomenex, Torrance, USA);

ZIC[®]-HILIC 2,1 x 150 mm;

ZORBAX Sb-Aq C₁₈ 2,1 x 150 mm (Agilent Technologies).

4.6 CAMPIONATORE

Campionatore ad alto volume TE 5000 Tisch Enviromental Inc.

5-Campionamento

5.1 SITO DI CAMPIONAMENTO E CAMPIONI

Come descritto precedentemente l'area di studio e il sito di campionamento sono rappresentati dalla zona urbana di Belgrado (44°49'14"N, 20°24'44"E). In Figura 13 è possibile osservare la posizione del campionamento avvenuta sul tetto dell'università di chimica e metallurgia di Belgrado. I campioni ottenuti sono stati collezionati durante il periodo settembre-dicembre del 2008; il loro campionamento è stato effettuato in periodi di 6 giorni ogni 24 ore per quanto riguarda i campioni che vanno dal 1 settembre al 30 novembre, mentre in periodi di 6 giorni ma di 12 ore per quanto riguarda i campioni dal 1 dicembre al 13 dicembre.

In Tabella 1 sono riportate le date di campionamento e i rispettivi volumi d'aria campionati (m³).

Giorno di campionamento	Volume aspirato In m³
1 settembre 2008	357
7 settembre 2008	332
13 settembre 2008	376
19 settembre 2008	362
25 settembre 2008	351
1 ottobre 2008	333
7 ottobre 2008	345
13 ottobre 2008	345
19 ottobre 2008	397
25 ottobre 2008	381
31 ottobre 2008	380
6 novembre 2008	381
12 novembre 2008	390
24 novembre 2008	383
30 novembre 2008	380
1 dicembre 2008 ore: 8:44	186
1 dicembre 2008 ore: 20:39	184
2 dicembre 2008 ore: 8:32	187
2 dicembre 2008 ore: 20:43	180
3 dicembre 2008 ore: 8:33	183
3 dicembre 2008 ore: 20:30	192
4 dicembre 2008 ore: 20:28	181
5 dicembre 2008 ore: 8:11	179
5 dicembre 2008 ore: 20:26	197
6 dicembre 2008 ore: 8:57	180
8 dicembre 2008 ore: 20:26	196
9 dicembre 2008 ore: 8:33	198

10 dicembre 2008 ore: 8:45	193
10 dicembre 2008 ore: 20:31	203
11 dicembre 2008 ore: 8:33	219
11 dicembre 2008 ore: 21:02	183
12 dicembre 2008 ore: 8:31	182
12 dicembre 2008 ore: 20:19	197
13 dicembre 2008 ore: 8:21	197

Tabella 1: giorni e relativo Volume di campionamento.

Il campionamento nel mese di dicembre è avvenuto ogni 12 ore contrariamente agli altri mesi che è avvenuto ogni 24 ore, viene così riportata anche l'ora in cui il campionamento è stato effettuato.

La temperatura media registrata del periodo di campionamento era di 3°C per il periodo invernale (dicembre) e di 28°C per il periodo estivo (settembre) con una temperatura media di 13°C per tutto il periodo. La pressione media registrata è risultata essere di 1016.18 hPa con un'umidità del 68% e un vento che soffiava in direzione Nord-Ovest ad una velocità media di 3.5 m s⁻¹.

I filtri una volta raccolti sono stati avvolti in fogli di alluminio e stoccati a -20°C fino al momento dell'analisi.



Figura 13: sito di campionamento a Belgrado

Dal 2004 la legislazione serba prevede leggi per la salvaguardia dell'ambiente:

Legge sulla protezione dell'ambiente;

Legge sulla valutazione ambientale strategica;

Legge sulla valutazione dell'impatto ambientale;

Legge sulla protezione e controllo integrato dell'inquinamento (Gazzetta ufficiale Repubblica di Serbia).

Queste leggi hanno reso possibile un adeguamento della legislazione verso le direttive UE 85/337/CEE in materia di impatto ambientale, 2001/43/CE e IPPC 96/61/CE in materia di valutazione strategica e 2003/35/CE per quanto riguarda le norme per la partecipazione del pubblico (Turchet M. 2012).

5.2 UTILIZZO DEL CAMPIONATORE

Per il campionamento è stato utilizzato un campionatore ad alto volume TE 5000 della Tisch Environmental Inc osservabile nelle Figure 14 e 15.

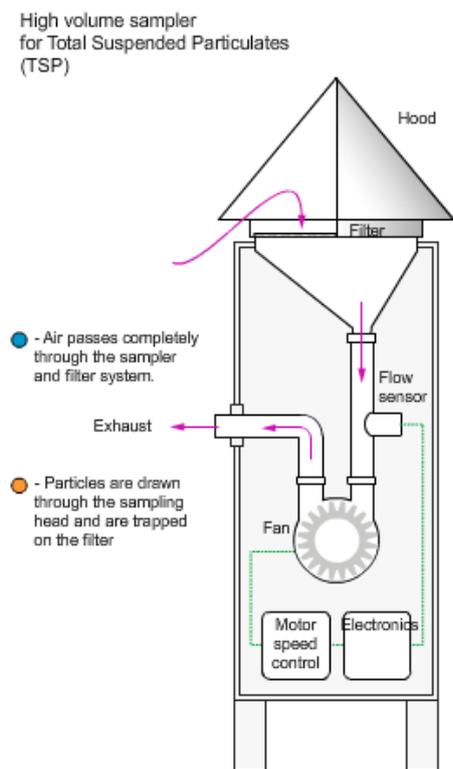


Figura 14: schema del campionatore ad alto vuoto TE 5000 (Tisch-env.com).



Figura 15: campionatore TE 5000

Il sistema permette di campionare simultaneamente sia il particolato solido sospeso, sia inquinanti organici in fase vapore.

Come visibile nella Figura 15 il campionatore è in alluminio anodizzato anticorrosivo[®] per resistere alle diverse condizioni meteo a cui può essere sottoposto; inoltre è resistente alla corrosione e il materiale di cui è composto minimizza eventuali contaminazioni.

La Figura 18 rappresenta uno schema del campionatore dove è possibile osservare come l'aria entri da delle fenditure poste lateralmente nella parte superiore del campionatore, parte che comprende anche una copertura per evitare l'entrata di materiale non gradito.

Nella parte superiore si può notare anche la presenza del contenitore di raccolta dei campioni con i relativi filtri chiamato "sampling head" che si collega alla parte inferiore e più specificatamente al flussimetro e al manometro, attraverso il tubo di aspirazione.

Il sampling head è formato da due differenti dispositivi, i filtri in fibra di quarzo e il bicchiere in vetro contenente il PUF (polyurethane foam).

L'aspirazione dell'aria avviene attraverso l'utilizzo di una pompa che attraverso un controllo elettronico è collegata ad un sensore di aspirazione che controlla la quantità di aria aspirata.

Le particelle verranno aspirate assieme all'aria ma mentre questa passa attraverso i filtri e viene eliminata attraverso un tubo di exhaust, gli analiti verranno trattenuti dal filtro e dal PUF.

Importante per l'analisi è la calibratura del campionatore che viene effettuata prima e dopo il periodo di campionamento; questo serve ad avere un'accurata misura del flusso e servirà per il calcolo dei m³ di aria campionata.

La calibrazione viene effettuata costruendo una curva di calibrazione; questa viene costruita mettendo in relazione la forza di aspirazione e le variazioni di pressione misurate dal calibratore, che registra la differenza tra la pressione atmosferica e quella esercitata dalla pompa sulla testa del filtro.

La calibrazione andrà bene quando l'R² della curva di calibrazione sarà superiore a 0.990.

6-Strumentazione analitica

La cromatografia liquida, in particolare l'HPLC, accoppiato con lo spettrometro di massa ad alta risoluzione (HR/MS) è diventata una tecnica ifenata sempre più utilizzata per l'identificazione di analiti in matrici molto complesse (Laskin et al. 2012). Ciò permette una speciazione di particolari composti che possono caratterizzare un'area o una sorgente ben definita (Barbaro et al. 2011).

L'utilizzo della spettrometria di massa ad alta risoluzione accoppiata con una tecnica di ionizzazione "soft" come la ESI (ElectroSpray ionization) è una delle tecniche di caratterizzazione di molecole all'interno di campioni complessi (Marshall & Rodgers 2004) (Panda et al. 2007) anche se questo tipo di tecnica ha conosciuto un notevole sviluppo solo in tempi recenti (Wozniak et al. 2008) (Makarov 2000).

Essendo la ESI una sorgente, questa potrà e dovrà essere accoppiata con un analizzatore come ad esempio l'orbitrap.

L'orbitrap è stato descritto per la prima volta nel 2000 (Makarov 2000) e commercializzato dal 2005 (Hu et al. 2005); da allora ha avuto sempre più importanza nella spettrometria di massa.

La possibilità inoltre di utilizzarlo accoppiato ad un cromatografo HPLC, permette di avere a disposizione una macchina dalle capacità eccezionali. Si potrà avere una risoluzione elevata $R=100000$ alla m/z 400 e un'accuratezza di massa inferiore ai 2 ppm (Hu et al. 2005) (Perry et al. 2008) anche se recenti studi e un nuovo design hanno portato a caratteristiche migliori ottenendo $R=350000$ alla massa a m/z 524 (Hu et al. 2005) (Makarov et al. 2009).

Lo spettrometro, infatti, permette di differenziare le specie ioniche attraverso il potere risolvente. L'espressione di tale capacità per l'Orbitrap (Perry et al. 2008) è data dell'equazione 1:

$$R = \frac{m}{\Delta m} \quad (1)$$

dove m indica la massa del picco e Δm la sua ampiezza alla metà dell'altezza del picco (FWHM: Full Width at Half Maximum peak height).

Dalla capacità di uno spettrometro di separare i picchi adiacenti, e quindi dalla risoluzione, dipende l'accuratezza di massa.

La stima di tale accuratezza è espressa mediante il valore dell'errore sulla massa misurata il quale, espresso in ppm (parti per milione), è definito dall'equazione 2:

$$e_m = \frac{m_a - m_t}{m_t} * 10^6 \quad (2)$$

dove m_a indica la massa accurata misurata strumentalmente e m_t è la massa esatta teorica.

La capacità di misurare la massa di un composto con un'accuratezza adeguata determina direttamente la possibilità di ottenere quella che viene definita composizione elementare (Makarov & Scigelova 2010). La possibilità di utilizzare l'Orbitrap in concomitanza con una trappola ionica lineare permette l'acquisizione di frammenti di massa che consentono l'identificazione degli analiti all'interno della matrice (Makarov & Scigelova 2010).

Anche per questo motivo tale tecnica può essere applicata in un ampio range di analisi che vanno da quelle di routine per l'identificazione di semplici analiti, all'analisi in tracce in matrici molto complesse, al controllo di cibi e bevande, all'analisi anti-doping fino all'analisi proteomica (Perry et al. 2008). Lo strumento LTQ Orbitrap XL è definito come uno spettrometro di massa "ibrido" in quanto presenta all'interno della sua ottica ionica più analizzatori di massa: trappola ionica, HCD e Orbitrap. Risulta pertanto un sistema complesso impiegabile in molti modi tra i quali vi è la modalità Full scan nella quale l'acquisizione può essere condotta sia nella trappola ionica a bassa risoluzione sia nella trappola orbitalica ad alta risoluzione.

Tale strumento, inoltre, permette di ottenere la frammentazione degli ioni utilizzando la trappola ionica e la cella di collisione HCD acquisendo la MS/MS.

Ulteriori step di frammentazioni MS^n (da $n=3$ a $n=10$) possono essere effettuati utilizzando la trappola ionica lineare. Gli ioni frammento ottenuti possono essere rilevati dal detector della trappola ionica lineare o inviati all'Orbitrap per ottenere uno spettro di massa ad alta risoluzione; gli ioni frammento derivanti dalla cella di collisione HCD potranno essere rilevati solamente dall'Orbitrap in alta risoluzione.

In questo lavoro di tesi è stato utilizzato un cromatografo UHPLC (Ultra High Performance Liquid Chromatography) Ultimate 3000 (Dionex) accoppiato allo spettrometro di massa ad alta risoluzione LTQ Orbitrap XL (Thermo Scientific).

Nell'analisi dell'aerosol organico, l'utilizzo di questa tecnica, evita la derivatizzazione dei composti e garantisce un'elevata selettività anche in caso di separazione cromatografica non ottimale (Scalabrin et al. 2015).

6.1 HPLC

La cromatografia in fase liquida a elevate prestazioni (HPLC) è diventata una tecnica analitica importante per la separazione, la pianificazione e la determinazione di una grande varietà di sostanze tanto da poter essere applicata a vari campi inclusi quello farmaceutico, delle biotecnologie, dell'inquinamento ambientale, agroalimentare e polimerico.

Questo strumento permette, inoltre, l'identificazione e l'analisi di quei composti che risulterebbero difficilmente analizzabili con altre tecniche cromatografiche come analisi polari, termolabili non volatili o difficilmente volatilizzabili e instabili (Cozzi R. 1998).

Esistono vari criteri di classificazione per le numerosi varianti di HPLC esistenti.

Una prima classificazione può essere effettuata in base alla definizione della polarità della fase stazionaria e della fase mobile. La cromatografia normale (Normal Phase Chromatography, NPC) presenterà una fase stazionaria polare e una fase mobile apolare e una cromatografia a fase inversa (Reverse Phase Chromatography, RPC) che avrà una fase stazionaria apolare e una fase mobile polare.

Procedendo con una classificazione in base al meccanismo di separazione o natura delle fasi avremo:

- cromatografia di adsorbimento liq-sol (LSC);
- cromatografia di ripartizione liq-liq (LLC);
- cromatografia di esclusione (SEC);
- cromatografia scambio ionico (IEC);
- cromatografia di affinità (AFC) (Cozzi R. 1998).

Gli studi effettuati sui campioni di Aerosol sono stati effettuati mediante l'utilizzo di una cromatografia di ripartizione.

Il principio su cui si basa la separazione degli analiti è quello della ripartizione delle sostanze tra fase mobile e fase stazionaria.

La fase mobile è un liquido a bassa viscosità, mentre la fase stazionaria è costituita da particelle porose impaccate all'interno di una colonna lunga in genere da 3 a 50 cm avente un diametro interno (ID) di pochi millimetri.

Le particelle del riempimento presentano una granulometria molto fine tra 1,8 e 10 μm e il flusso dell'eluente può essere ottenuto solamente esercitando una pressione ottenuta attraverso l'utilizzo di una pompa (Cozzi R. 1998).

Per questo motivo le colonne dovranno resistere alla pressione esercitata e sono generalmente in acciaio o in peek (polimero resistente e inerte).

La scelta della fase mobile dipende molto dalla fase stazionaria ma l'eluente deve comunque possedere alcuni requisiti:

- bassa viscosità: minore è la viscosità, maggiore è l'efficienza;
- immiscibilità con la fase stazionaria;
- capacità di solubilizzare il campione;
- compatibilità con il rilevatore;
- bassa corrosività;
- bassa volatilità;
- minima tossicità;
- elevata purezza;
- basso costo;
- facilità di reperibilità (Cozzi R. 1998).

La scelta della fase mobile, come la fase stazionaria, è molto importante in quanto la separazione degli analiti avverrà tramite interazioni chimico-fisiche che avvengono tra gli analiti stessi e le due fasi.

Analiti che presenteranno una affinità maggiore con la fase stazionaria verranno eluiti con un t_R più alto in quanto verranno trattenuti per un tempo maggiore rispetto ad analiti che presentano un'affinità maggiore per la fase mobile.

L'uscita dalla colonna degli analiti con t_R differenti permette la loro distinzione sia da un punto di vista qualitativo che quantitativo.

Molte volte, per salvaguardare la colonna e di conseguenza evitare l'intasamento della fase stazionaria da parte di materiale inquinante, si pone una pre-colonna riempita dello stesso materiale della colonna stessa ma di granulometria maggiore o in forma pellicolare. Queste pre-colonne hanno in genere lo stesso diametro delle colonne ma sono lunghe solamente 2-5 cm e sono poste tra l'iniettore e la colonna.

Uno schema raffiguranti le parti principali di un HPLC è visibile in figura 16.

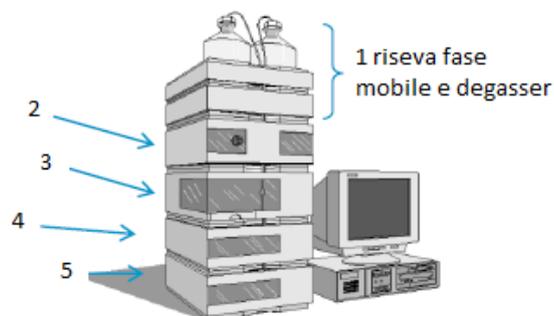


Figura 16: schema componenti principali dell'HPLC (Agilent Technologies).

- 1) DEGASER: sistema che consente di eliminare eventuali bolle presenti nel solvente.
- 2) POMPA: il ruolo della pompa è quello di spingere la fase mobile attraverso la fase stazionaria con un determinato rapporto volume/tempo (ml/min). La pompa può essere impostata in modi differenti:
 - Isocraticamente: in questo caso la composizione percentuale della fase mobile resta costante nel tempo e si può utilizzare un solo solvente.
 - A gradiente: la composizione percentuale della fase mobile varia nel tempo, in questo caso si devono avere due o più solventi miscibili tra loro.
- 3) SISTEMA DI INIEZIONE: l'iniettore serve per introdurre il campione liquido all'interno della colonna trasportato dalla fase mobile. Il campione viene introdotto mediante l'utilizzo di una valvola di iniezione a monte della colonna e trascinato in quest'ultima dalla fase mobile senza interrompere il flusso.

In HPLC è diffuso l'utilizzo di auto campionatori che rendono possibile l'iniezione di un gran numero di campioni in sequenza.
- 4) COLONNE: a colonna è da considerarsi il cuore di un cromatografo in quanto permette la separazione degli analiti in base alle loro caratteristiche chimico-fisiche. Come già spiegato le colonne possono essere varie e per molto tempo sono state utilizzate colonne con lunghezza compresa tra 25 cm e 2-3 m; oggi invece risultano essere molto più piccole 25-30 cm che forniscono elevata efficienza. Generalmente le colonne presentano un diametro interno di 4-10mm. Diametri piccoli forniscono un'efficienza elevata anche se l'impaccamento della fase stazionaria risulta essere più difficoltoso.

Come regola nella scelta delle caratteristiche geometriche di una colonna occorre tener presente che:

 - con piccoli diametri interni si favorisce la rivelazione di tracce risparmiando eluente ma perdendo capacità di carico e l'efficienza a parità di granulometria;
 - aumentando la lunghezza della colonna, cresce il numero di piatti teorici ma è conveniente utilizzare più colonne in serie rispetto ad una troppo lunga che risentirebbe delle problematiche di impaccamento (Cozzi R. 1998).

- 5) DETECTOR: il detector ha la funzione di rilevare le molecole eluite in uscita dalla colonna, questo fornisce le indicazioni sui composti eluiti e l'output al computer che attraverso un'elaborazione dei dati darà un cromatogramma con tutti i parametri come t_R , area del picco, ecc.
- 6) I rilevatori disponibili in commercio sono di diversi tipi ognuno con caratteristiche particolari e la sua scelta è correlata al metodo analitico che si è attuato.

Tra i vari si possono annoverare lo spettrometro UV/visibile, il fluorimetro, lo spettrometro IR, il polarimetro, il rifrattometro, il conduttimetro e lo spettrometro di massa. Proprio quest'ultimo si sta diffondendo sempre maggiormente come rilevatore; l'accoppiamento HPLC-HRMS è stato dimostrato essere una tecnica potente per l'analisi di composti organici in matrici complesse (Smith et al. 2009).

6.2 SPETTROMETRIA DI MASSA

La spettrometria di massa è una tecnica basata sulla ionizzazione delle molecole presenti in matrice, sulla loro frammentazione in ioni e sulla separazione mediante il diverso rapporto massa/carica (m/z). Gli ioni vengono generati da una sorgente e successivamente passano nell'analizzatore che li separa in base al loro rapporto m/z . Gli ioni vengono poi rilevati da un rivelatore che darà lo spettro di massa dopo amplificazione del segnale.

Questa tecnica consente di ottenere una separazione dei composti e tramite le frammentazioni la possibilità di identificare gli analiti presenti all'interno della matrice.

Le sezioni principali dello strumento sono visibili in figura 17.

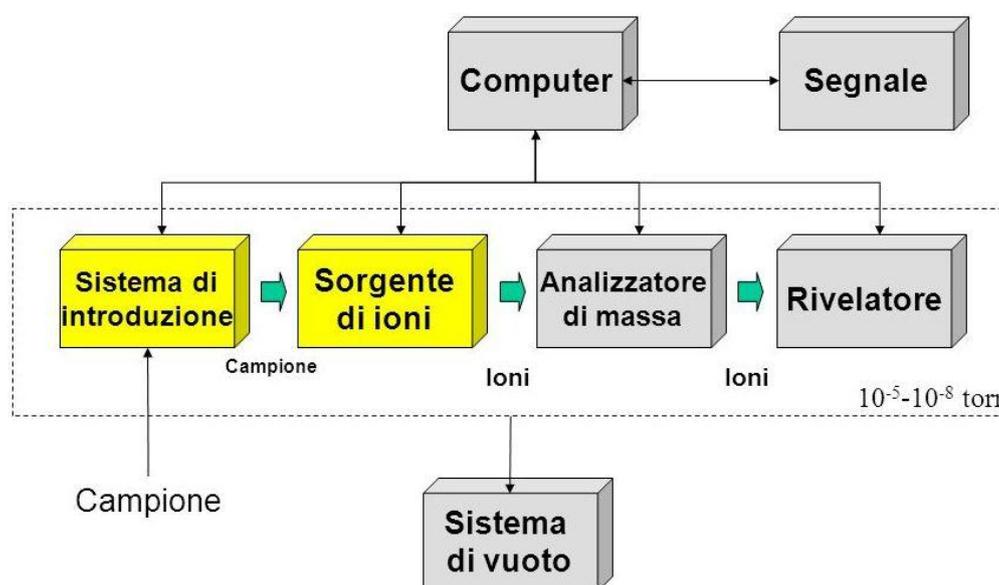


Figura 17: schema a blocchi raffigurante le parti principali di uno spettrometro di massa.

6.2.1 LTQ ORBITRAP XL

In figura 18 è possibile osservare uno schema che descrive in modo semplificato le parti di maggior importanza dello strumento LTQ Orbitrap XL.

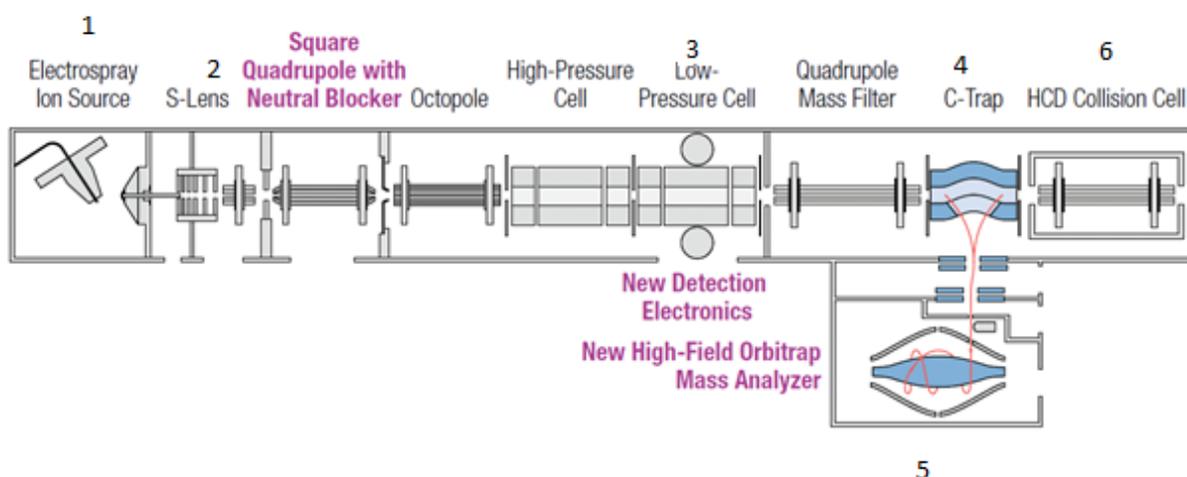


Figura 18: schema dello strumento LTQ Orbitrap XL (Makarov & Scigelova 2010).

Dalla figura sono visibili le parti più importanti dello strumento.

- Sezione 1: sorgente ionica;
- Sezione 2: interfaccia formata da due quadrupoli e un ottapolo;
- Sezione 3: trappola ionica lineare;
- Sezione 4: c-trap;
- Sezione 5: analizzatore Orbitrap;
- Sezione 6: cella di collisione HCD.

6.2.1.1 SORGENTE DI IONIZZAZIONE

Per molto tempo l'accoppiamento tra HPLC e spettrometro di massa è stato problematico.

In un cromatografo liquido, si eseguono separazioni cromatografiche impiegando flussi di solvente che possono arrivare anche a 5ml/min. Lo spettrometro di massa invece lavora in condizioni di depressione, 10^{-5} - 10^{-6} tor, poichè si deve evitare la perdita di ioni a causa dell'urto con i gas atmosferici.

Pertanto l'introduzione diretta dei campioni in uscita dall'HPLC all'interno della sorgente di ionizzazione dello spettrometro di massa non poteva essere effettuata e di conseguenza le due strumentazioni non potevano essere accoppiate.

Questo fu possibile solamente tramite la progettazione e lo sviluppo di nuove sorgenti di ionizzazione chiamate API (Atmospheric Pressure Ionization) che permettessero la ionizzazione degli analiti, la trasformazione del campione da liquido a gas (il campione per essere iniettato nella massa deve essere gassoso), il collegamento di pressioni molto diverse e l'eliminazione dell'eluente. Tra le varie sorgenti API una delle più diffuse è la ESI (Electron Spray Ionization) (Cole 2010).

ESI (Electron Spray Ionization)

La sorgente ESI (Figura 19) è una tecnica di ionizzazione soft ovvero provoca una scarsa frammentazione del campione formando molecole protonate $[M+H]^+$ e deprotonate $[M-H]^-$ oltre ad adotti degli analiti con specie ioniche come Na^+ e K^+ .

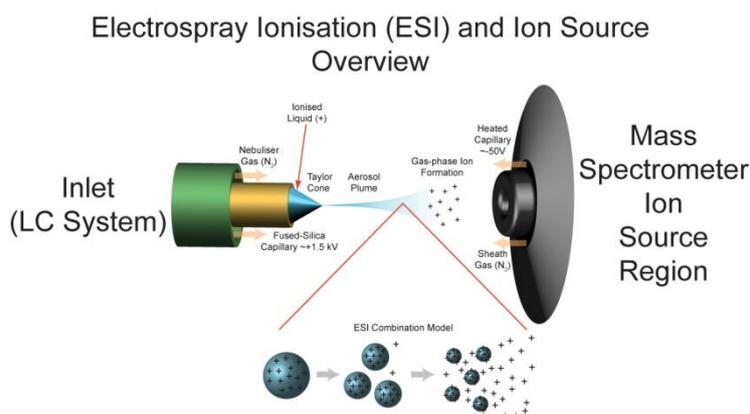


Figura 19: Schema della sorgente ESI.

Per campioni come l'aerosol, la formazione di addotti con il Na^+ è un processo comune (Walser et al. 2008) e la formazione di $[M+H]^+$ o $[M+Na]^+$ è determinata dalla affinità protonica e dall'abilità di legarsi al sodio. Questo tipo di sorgente viene molto utilizzata per molecole termolabili, ad alto peso molecolare e per composti che sono facilmente ionizzabili in soluzione.

Risulta perciò adatta alla ionizzazione di composti polari, di proteine, di peptidi e di polimeri.

La soluzione in uscita dall'HPLC viene iniettata nella sorgente ESI attraverso la camera di ionizzazione. L'entrata è favorita dall'applicazione di un potenziale elettrico (positivo o negativo in base alla carica dell'analita) che focalizza gli ioni verso il centro e da un flusso di gas inerte chiamato Sheath gas (generalmente N_2) che agendo coassialmente al capillare nebulizza la soluzione in una aerosol.

Nella nebulizzazione viene a crearsi il cono di Taylor (Figura 20).

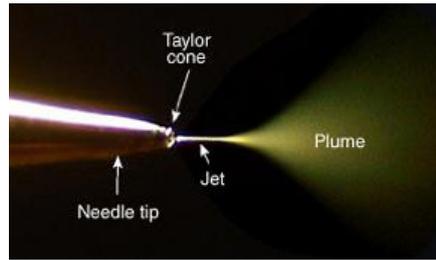


Figura 20: formazione del cono di Taylor.

La sua formazione avviene in quanto l'applicazione del potenziale fa deformare la superficie del liquido a causa della perdita di tensione superficiale. Più il liquido si avvicina al campo elettrico, più una forza agisce sulla superficie della goccia formando un cono con punta convessa.

Quando si raggiunge un certo voltaggio si ha l'inversione della punta e l'emissione di un getto di liquido chiamato Cone-Jet. Questo è l'inizio dell'elettrospray dove gli ioni possono essere portati in fase gas. Si viene a formare uno spray di gocce cariche (plume) con diametro variabile (1-60 μm), queste vengono desolvate dalla temperatura della sorgente e da un flusso di gas ausiliario (auxiliary gas) che assieme allo sheath gas nebulizza il campione e fa evaporare il solvente. L'evaporazione del solvente porta ad una diminuzione del volume delle gocce e inevitabilmente ad un aumento della densità di carica superficiale (Cole R.B. 2010).

Questo processo di desolvatazione procede fino al raggiungimento del limite di Rayleigh, in cui la tensione superficiale non supporta la repulsione di carica tra gli ioni e avviene un'esplosione coulombiana con disgregazione delle gocce (Pozniak & Cole 2007).

Il processo continua fino a che tutto il solvente non è evaporato ottenendo ioni desolvati di analita in fase gas.

6.2.1.2 INTERFACCIA E FOCALIZZAZIONE

L'interfaccia è formata da componenti tenuti sotto vuoto, i principali costituenti di tale zona sono l'ion swipe cone, lo spray cone, l'ion transfer capillary (capillari di trasferimento) e le lenti focalizzatrici (Figura 21) (Hardware manual LTQ series).

La sorgente è posta a 60° rispetto al capillare al fine di mantenerlo pulito.

L'ion swipe cone inoltre, costituisce una barriera meccanica che protegge il capillare da gocce troppo grosse e dal particolato.

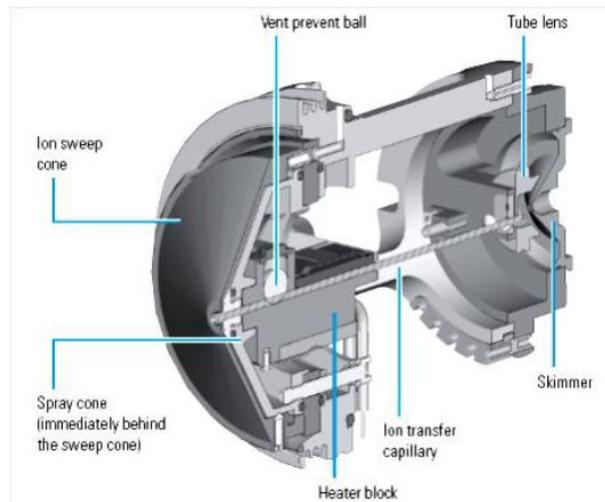


Figura 21:interfaccia LTQ Orbitrap XL (Hardware manual LTQ series).

L'ion transfer capillary è attraversato da un voltaggio che attrae gli ioni che vengono aspirati da una differenza di pressione tra la camera di ionizzazione (pressione atmosferica) e il capillare (bassa pressione 2 torr). In questa zona la presenza dello sweep gas che fluisce dietro lo sweep cone fa sì che gli ioni siano declusterizzati e gli addotti siano ridotti; l'azione si completerà nel capillare di trasferimento (Hardware manual LTQ series).

Lo sweep cone è formato da due sezioni, il curtain plate e l'orifice plate. (Figura 22)

Il curtain plate presenta una grande fenditura di entrata per avere una elevata cattura, il problema principale risulta essere quello del vuoto.

Più la fenditura è grande più si avrà una perdita di vuoto, per questo motivo subito dietro è presente un'altra piastra chiamata orifice plate che presenta una fenditura di entrata molto più piccola.

Tra le due piastre viene fatto fluire un gas in controcorrente il curtain gas che permette, per effetto venturi, di mantenere il vuoto tra le due piastre e contemporaneamente ha il compito di lasciare fuori i composti neutri (Hardware manual LTQ series).

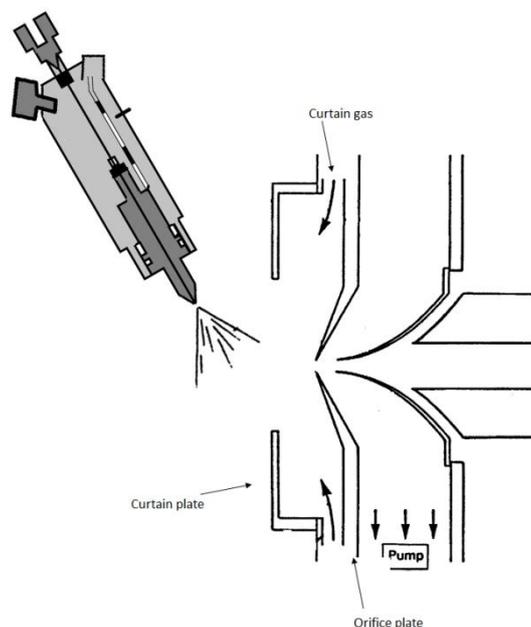


Figura 22: schema dell'orifice e del curtain plate.

Una volta passato l'ion transfer capillary gli ioni vengono focalizzati dalla tube lens, parametro che deve essere scelto e aggiustato con estrema cura in quanto ad esso è legata l'intensità con cui verrà rilevato lo ione.

Posto dietro alla tube lens si trova lo skimmer che permette una eliminazione per deriva dei composti non ionici.

Una volta attraversato lo skimmer, gli ioni passano attraverso un sistema di due quadrupoli e un ottapolo (figura 23) che hanno la funzione di focalizzare, accelerare e convogliare gli ioni verso la trappola ionica lineare.

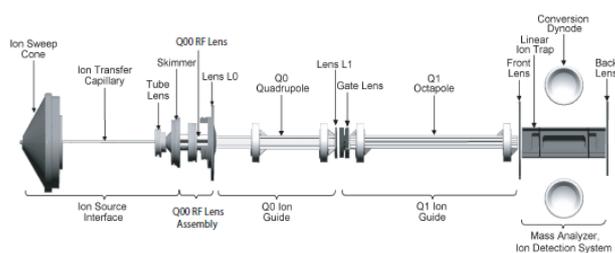


Figura 23: sistema formato da due quadrupoli e un ottapolo per la focalizzazione degli ioni.

6.2.1.3 TRAPPOLA IONICA LINEARE

La trappola ionica lineare è un vero e proprio analizzatore di massa. All'interno dello strumento la trappola ionica può lavorare indipendentemente immagazzinando, isolando e frammentando gli ioni in arrivo dalla sorgente (Hardware manual LTQ series).

La trappola ionica prevede un set di quadrupoli e due elettrodi terminali (Figura 24).

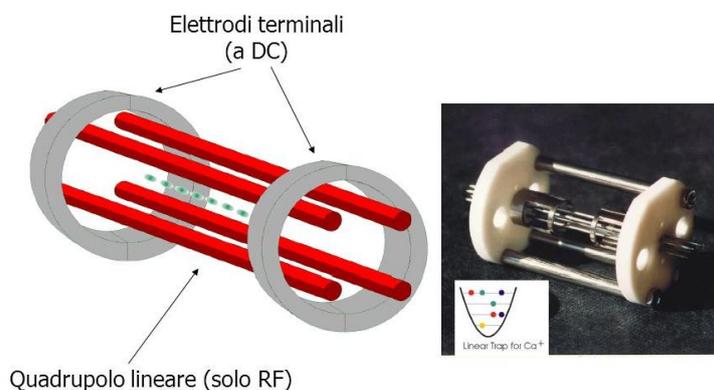


Figura 24: trappola ionica lineare

La variazione dei voltaggi DC (corrente continua) e RF (radiofrequenza) tra gli elettrodi esterni e il quadrupolo permette l'ottenimento dello spettro di massa. Gli ioni entrano tra le quattro barre e vengono intrappolati per un certo tempo con la possibilità di frammentarli attraverso l'utilizzo di elio (buffer gas), contenuto nella trappola.

Come detto nella trappola ionica vengono applicati due tipi di potenziali differenti, se si vuole intrappolare una serie di ioni con diverso rapporto m/z sarà applicato un potenziale RF agli elettrodi della trappola lineare, che confinerà gli ioni radialmente, e un potenziale DC ai due elettrodi terminali che confinerà gli ioni assialmente (Hardware manual LTQ series).

In seguito variando la tensione RF si potranno espellere sequenzialmente dalla trappola una serie di ioni in base al rapporto m/z (Figura 25), mantenendo all'interno gli ioni che si vorranno frammentare.

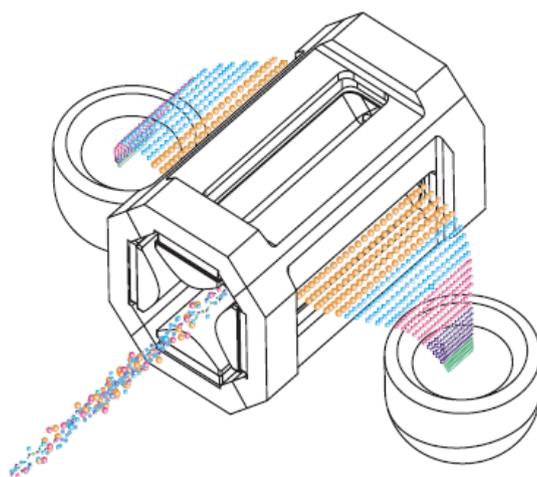


Figura 25: selezione di massa operata dalla trappola ionica lineare (Hardware manual LTQ series).

Gli ioni espulsi dalla trappola costituiranno uno spettro di massa grazie alla loro determinazione da parte del detector SEM della trappola ionica stessa.

La trappola ionica può operare in più fasi successive definite come MS^n dove in ogni fase si avrà una selezione di massa. Nel caso della trappola ionica lineare LTQ sono possibili da $n=1$ a $n=10$ scansioni di massa. Vari tipi di scansione sono possibili (Hardware manual LTQ series):

- FULL SCAN: è un tipo di scansione singola ($n=1$) che permette l'ottenimento di uno spettro di massa completo. Gli ioni scansionati in questa modalità vengono espulsi sequenzialmente dopo una scansione continua in un determinato range di massa. Questo permette di effettuare l'analisi sull'intera popolazione ionica e bene si adatta ad analisi qualitative.
- SIM (Select Ion Monitoring): in questa modalità si ha la selezione di un singolo ione o di una serie di ioni. L'acquisizione viene effettuata in una singola scansione ($n=1$), gli ioni prodotti dalla sorgente vengono accumulati nella trappola e solamente lo ione o gli ioni con un rapporto m/z voluto vengono trattenuti all'interno della trappola mentre tutti gli altri vengono espulsi. Lo ione o gli ioni rimasti in trappola vengono scansionati ottenendo uno spettro di massa SIM. In modalità SIM si incrementa sia la velocità di acquisizione che la sensibilità, parametri utili per analisi di composti target presenti in tracce e in matrici complesse.
- SRM (Selected Reaction Monitoring): in questa modalità viene effettuata una selezione di un ione all'interno della trappola mentre gli altri vengono espulsi. Lo ione viene frammentato mediante collisione con il gas buffer producendo ioni frammento.

Viene fatta una selezione di uno o più ioni frammento con un dato rapporto m/z mentre gli altri vengono espulsi. Gli ioni selezionati vengono scansionati ottenendo uno spettro SRM.

- CRM (Consecutive Reaction Monitoring): l'acquisizione avviene in più stadi (da n=3 a n=10). Anche in questo caso dopo la selezione di un dato ione e la sua frammentazione all'interno della trappola ionica questo funge da nuovo ione precursore subendo un'ulteriore frammentazione. Gli ioni frammento che si vengono a creare si accumulano all'interno della trappola ed alcuni vengono selezionati e scansionati in modalità SRM. Con questo metodo si ottiene un MS³ o superiore dipendente dal numero di cicli di selezione e frammentazione che si effettuano.

6.2.1.4 ANALIZZATORE ORBITRAP

La parte principale dello strumento è rappresentata dall'analizzatore Orbitrap. Quest'ultimo è formato da due elettrodi, uno interno a forma di fuso e uno esterno a forma di campana posti coassialmente tra loro (Figura 26) (Turchet M. 2012).

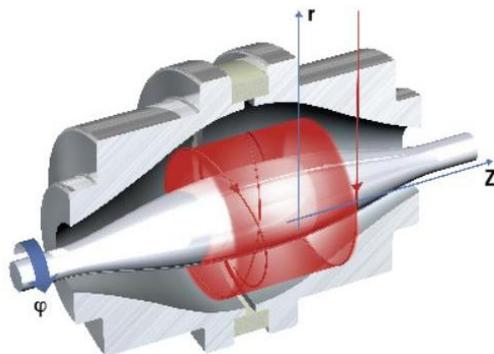


Figura 26: analizzatore Orbitrap (Thermo Fischer Scientific).

L'applicazione di campi elettrici nei due elettrodi permette la cattura e il confinamento degli ioni all'interno dell'analizzatore (Makarov 2000).

Tra l'elettrodo esterno e quello interno si applica una tensione di corrente continua, chiamata potenziale elettrostatico quadro-logaritmico definita dall'equazione 3:

$$U(r, z) = \frac{k}{2} * \left(z^2 - \frac{r^2}{2} \right) + \frac{k}{2} * (R_m)^2 \ln \left(\frac{r}{R_m} \right) + c \quad (3)$$

dove: r e z sono le coordinate cilindriche, k la curvatura del campo e R_m il raggio caratteristico (Hu et al. 2005).

A causa della forma dell'elettrodo centrale e del potenziale applicato, il movimento degli ioni avverrà lungo l'asse z (Hu et al. 2005).

Se la velocità degli ioni è tale da passare il centro dell'elettrodo ecco che si potranno attuare dei movimenti completi lungo l'asse z. La velocità di ingresso è molto importante; se questa è tale da permettere un'oscillazione completa dello ione nell'elettrodo, allora la frequenza di oscillazione è indipendente dalla velocità.

Esiste una velocità minima necessaria per far sì che lo ione passi il centro dell'elettrodo.

La frequenza sarà dipendente dal rapporto m/z e potrà essere espressa mediante l'equazione 4 (Perry et al. 2008):

$$\omega = \left(\frac{K \cdot q}{m} \right)^{1/2} \quad (4)$$

Ponendo esternamente un altro elettrodo (conduttore) questo risentirà del campo magnetico prodotto dagli ioni in movimento, si andrà a creare una corrente elettrica oscillante sul conduttore. La corrente creata può essere misurata nel tempo e si avrà un andamento sinusoidale. Misurando il numero di oscillazioni nel tempo si potrà definire la frequenza legata al rapporto m/z . Il problema principale è la presenza di molti ioni poiché potrebbero scontrarsi all'interno dell'analizzatore. Inoltre ioni aventi massa uguale dovranno partire dalla stessa posizione per avere una rotazione nello stesso istante.

Gli ioni, dopo aver iniziato l'oscillazione, subiranno una contrazione della nube elettronica dovuta all'aumento del campo elettrico, che a sua volta dipende dalla variazione di voltaggio dell'elettrodo centrale per non far collidere gli ioni all'interno dell'analizzatore.

Un ulteriore aumento del campo schiatterà ancora di più la traiettoria degli ioni (Figura 27), e il raggio rotazionale dipenderà dal rapporto m/z .

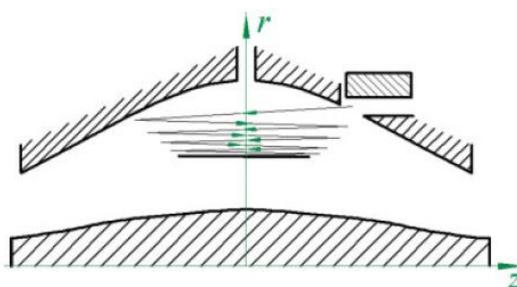


Figura 27: traiettoria degli ioni sotto l'effetto del campo elettrico applicato (Hu et al. 2005).

La distribuzione lungo l'asse verticale degli ioni in base al rapporto m/z permette di immettere molti ioni all'interno dell'analizzatore. Una volta che tutti gli ioni sono all'interno il voltaggio dell'elettrodo interno viene mantenuto costante e si avrà la rivelazione delle frequenze di oscillazione da cui tramite trasformata di Fourier si otterrà lo spettro di massa. (Figura 28)

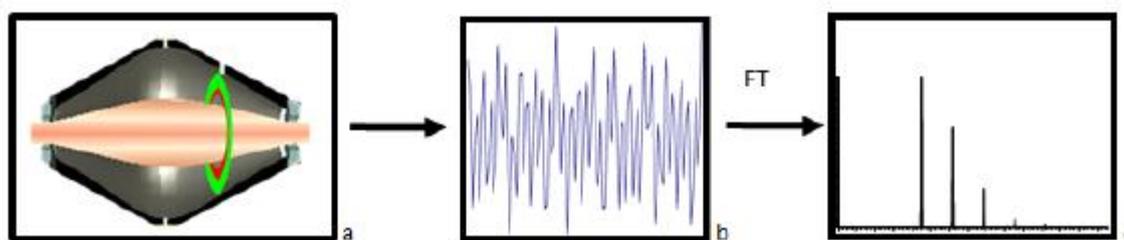


Figura 28: Produzione spettro di massa attraverso trasformata di Fourier (Makarov & Scigelova 2010).

All'interno dell'analizzatore ioni aventi traiettorie stabili presenteranno un'oscillazione lungo l'asse z , una rotazione attorno all'elettrodo centrale e delle vibrazioni lungo l'asse radiale.

Ioni con rapporto m/z uguale ruoteranno assieme con frequenza uguale, questo permetterà di avere frequenze di rotazione diverse per pacchetti di ioni aventi m/z diverso.

Questo permette raggi di rotazione differenti all'interno dell'analizzatore evitando così la collisione degli ioni (Figura 29).

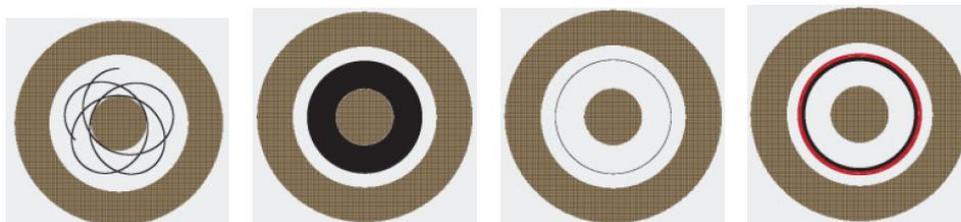


Figura 29: distribuzione degli ioni all'interno dell'analizzatore in base al rapporto m/z . Questo permette la rotazione degli ioni evitando collisioni tra di essi (Hu et al. 2005).

La distribuzione orizzontale diventa così un parametro importante perché due o più ioni uguali dovranno partire da posizioni uguali altrimenti ruoterebbero con traiettorie differenti portando a frequenze di rotazione diverse. Per focalizzarli si dovrà applicare un potenziale verticale e orizzontale. A tale scopo prima di entrare nell'analizzatore gli ioni vengono fatti passare attraverso un quadrupolo a trasmissione totale e a un ottapolo sottovuoto ottenendo una focalizzazione verticale massima. Successivamente gli ioni entrano in una trappola lineare curva chiamata C-Trap che permette una focalizzazione orizzontale. La C-Trap prevede due elettrodi posti alle estremità, il gate electrode da dove entrano gli ioni e il trap electrode. Gli ioni vengono a trovarsi in un ambiente confinato contenente azoto che ne dissipa l'energia e che li focalizza sull'asse della trappola. Successivamente l'applicazione di voltaggi crescenti nella C-Trap permette la focalizzazione degli ioni in uno stretto fascio lungo l'asse (Hardware manual LTQ series). A questo punto per poter far uscire gli ioni dalla trappola e mandarli all'analizzatore Orbitrap il potenziale è spento e viene applicato un voltaggio pulsato che estrae gli ioni ortogonalmente all'asse attraverso una fessura posta nell'arco iperbolico. (Figura 30)

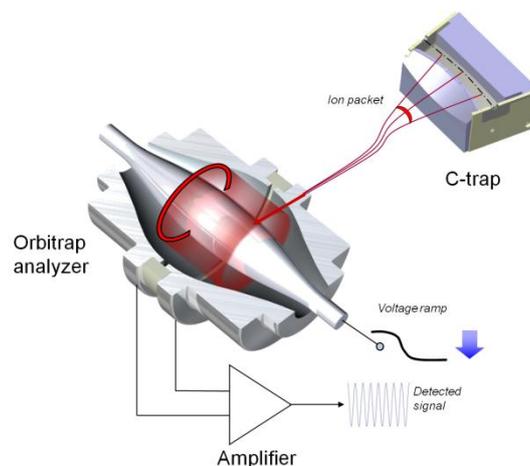


Figura 30:C-Trap e analizzatore Orbitrap (Thermo Fisher Scientific).

A causa della curvatura della C-Trap gli ioni convertono verso l'entrata dell'Orbitrap, questo metodo di estrazione inoltre permette di avere ioni con una velocità adeguata per attuare la rotazione e il movimento oscillatorio lungo l'asse z dell'Orbitrap.

Con questi meccanismi gli ioni entreranno focalizzati nell'analizzatore il quale permetterà una rilevazione ad alta risoluzione degli ioni in base al rapporto m/z .

6.2.1.5 CELLA DI COLLISIONE HCD

La cella di collisione HCD è rappresentata da un multipolo connesso direttamente alla C-Trap.

La parte di cella connessa alla C-Trap presenta delle lenti per il tunaggio della trasmissione ionica e per il passaggio degli ioni tra la cella stessa e la C-Trap.

L'HCD è riempita di azoto che permette di ottenere delle frammentazioni degli ioni iniettati al suo interno. I frammenti verranno inviati attraverso il passaggio alla C-Trap nell'Orbitrap e questo permette l'acquisizione di spettri di frammentazione ad alta risoluzione che daranno informazioni complementari a quelle ottenute dalla trappola ionica (Hardware manual LTQ series).

7-Il metodo qualitativo

In questo lavoro di tesi si è voluto svolgere un'analisi qualitativa per caratterizzare la componente organica solubile in acqua (WSOCs) presente nei campioni di aerosol, poter osservare la famiglia di appartenenza degli analiti presenti e cercare di classificarli per poterne indicare una precisa fonte di emissione.

L'analisi HPLC-MS è stata eseguita accoppiando un cromatografo liquido ad alte prestazioni (HPLC) con uno spettrometro di massa ad alta risoluzione (HRMS).

La creazione o messa a punto del metodo analitico strumentale in HPLC-MS è un momento in un'analisi strumentale dove si ottimizzano tutti i parametri che permettono una buona separazione ed identificazione degli analiti presenti all'interno del campione.

7.1 METODO CROMATOGRAFICO

Un metodo cromatografico è impostato per sfruttare le diverse affinità delle molecole nei confronti di due fasi diverse definite come fase stazionaria e fase mobile. Nella cromatografia infatti, una fase viene immobilizzata e perciò viene definita fase stazionaria, mentre l'altra viene fatta scorrere in continuo sulla fase stazionaria e viene chiamata fase mobile.

Queste due fasi fanno sì che la separazione cromatografica dei componenti di una miscela avviene per diversa affinità delle sostanze o analiti nei confronti delle due fasi.

Più un analita sarà affine alla fase stazionaria, più a lungo verrà trattenuta all'interno della colonna e avrà un tempo di ritenzione t_R (tempo impiegato da ciascuna sostanza a scorrere attraverso la colonna, misurato dal momento in cui la miscela viene introdotta nello strumento, fino all'istante

in cui si registra il picco cromatografico) alto; analogamente più sarà affine alla fase mobile più verrà eluito con un tempo di ritenzione basso e quindi uscirà prima.

Se si indica con C_M la concentrazione di una sostanza in fase mobile e C_S la concentrazione nella fase stazionaria si può ottenere una costante di distribuzione tra le due fasi definita con K_c (equazione 5) (Cozzi R. et al 1998).

$$K_c = \frac{C_S}{C_M} \quad (5)$$

La costante di distribuzione dipenderà dalla natura della fase mobile, da quella stazionaria e dalla temperatura, sarà così una grandezza termodinamica.

Se K_c presenta valori alti allora la sostanza risulta essere più affine per la fase stazionaria e rimarrà per un tempo maggiore all'interno della colonna cromatografica eluendo con tempi di ritenzione maggiori.

I campioni sono stati analizzati mediante due diversi tipi di analisi cromatografiche, la HILIC e la reverse phase. Poiché si tratta di un'analisi cromatografica volta all'individuazione di molecole incognite, al fine di migliorare la separazione degli analiti le corse sono state molto lunghe sia in reverse phase sia in HILIC.

7.1.1 REVERSE PHASE

La reverse phase fa parte della cromatografia di ripartizione dove la fase stazionaria è un liquido che impregna un solido inerte e granulare, il più delle volte rappresentato da allumina.

Durante l'eluizione le molecole si ripartiscono tra le due fasi che risultano essere immiscibili tra loro (figura 31).

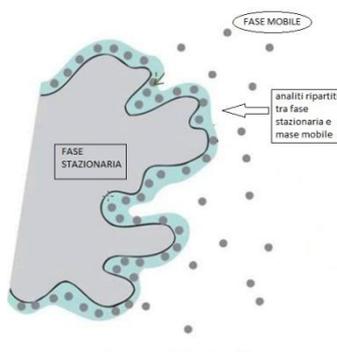


Figura 31: meccanismo di ripartizione degli analiti tra fase mobile e fase stazionaria.

Per fase inversa si intende l'utilizzo di una fase stazionaria apolare e una fase mobile polare, il più delle volte rappresentata da acetonitrile.

Le molecole si ripartiranno in base alla loro polarità tra le due fasi, tanto più grande è l'idrofobicità dell'analita tanto più questo legherà con la fase stazionaria eluendo a t_R alti. La colonna utilizzata è una C₁₈ Zorbax Sb-Aq 2,1x150 mm (Agilent Technologies) e la fase mobile una miscela di H₂O acidificata con acido formico 0,01% e acetonitrile acidificato con acido formico 0,01%. La corsa cromatografica ha un tempo totale di 75 minuti e l'eluizione è stata eseguita a gradiente.

Per eluizione a gradiente si intende l'utilizzo di fasi mobili che eluiscono con composizione % diversa nel tempo durante la corsa cromatografica.

In questo lavoro la composizione è stata fatta variare con un flusso di 200 µl/min secondo il programma riportato in in tabella 2 .

minuti	µl/min	%B	%A
0	200	0	100
5	200	0	100
45	200	100	0
60	200	100	0
60,1	200	0	100
75	200	0	100

Tabella 2: corsa cromatografica attuata per la Reverse phase.

A = H₂O + acido formico 0,01%;

B = acetonitrile + acido formico 0,01%.

Questo tipo di corsa cromatografica permette una separazione massima degli analiti, anche di quelli che presentano un'affinità maggiore per la fase stazionaria.

L'acetonitrile risulta essere la fase mobile migliore per analisi di questo tipo in quanto aumenta la ritenzione degli analiti con bassa polarità e aumenta la risoluzione dei picchi cromatografici, un vantaggio se si è in presenza di matrici complesse come nel nostro caso (Scalabrin et al. 2015) (Scalabrin E. 2015).

7.1.2 HILIC

La cromatografia ad interazione idrofobica o HILIC è una variante della cromatografia liquida a fase normale. La fase stazionaria è rappresentata da sostanze adsorbenti polari altamente idrofile (come ad esempio silice polare, impaccamenti polimerici polari o scambiatori ionici) mentre la fase mobile è una soluzione che contiene apprezzabili quantità di H₂O combinata con un solvente meno polare, ad esempio aceto nitrile.

Il termine HILIC è stato coniato da Alper A.J. nel 1990 che ha utilizzato questa tecnica per i suoi studi (Alpert 1990). Il meccanismo di separazione della HILIC risulta essere molto complicato ed è stato discusso in maniera dettagliata solo recentemente da Henström et al. (2006) (Henström & Irgum 2006); la fase mobile forma un piccolo strato di H₂O sulla superficie della fase stazionaria (figura 32) creando una carenza di molecole d'acqua nella fase mobile e questo deficit porta ad un sistema di estrazione simile a quello liquido-liquido.

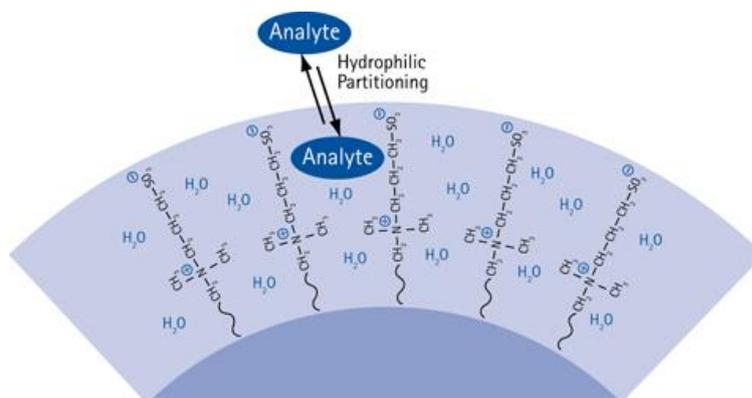


Figura 32: formazione del film d'acqua sulla superficie della fase stazionaria e ripartizione degli analiti tra le due fasi.

In questo modo i composti polari presenteranno una interazione maggiore rispetto a quelli poco polari con lo strato acquoso sulla superficie della fase stazionaria. L'analisi andrà a distribuirsi tra le due fasi, ma si dovrà tenere conto anche di forze come interazioni tra specie polari neutre e meccanismi elettrostatici con l'eluente, per questo motivo la sua spiegazione dettagliata è avvenuta solo di recente.

La colonna utilizzata è una ZIC[®]-HILIC 2,1x150mm e la corsa cromatografica è stata effettuata a gradiente per gli stessi motivi descritti in precedenza per la reverse phase utilizzando come fase mobile sempre una miscela di H₂O acidificata con acido formico 0,1% e aceto nitrile acidificato con acido formico 0,1%. La corsa cromatografica osservabile in tabella 3 e figura 22 ha un tempo di eluizione di 50 minuti con un flusso di 150 µl/min.

minuti	µl/min	%B	%A
0	150	85	15
10	150	85	15
30	150	15	85
40	150	15	85
40,1	150	85	15
50	150	85	15

Tabella 3: corsa cromatografica attuata per la HILIC

A = H₂O + acido formico 0,1%;

B = acetonitrile + acido formico 0,1%.

7.2 METODO PER LO SPETTROMETRO DI MASSA

L'ottimizzazione del metodo per lo spettrometro di massa consiste nell'impostare tutti i parametri necessari per ottenere la miglior risposta strumentale possibile. Questo viene ottenuto calibrando lo strumento attraverso l'utilizzo di apposite soluzioni standard. Inoltre viene scelta modalità di polarizzazione della sorgente ESI con cui si vuole lavorare, in questo caso si è lavorato sia in polarità positiva che negativa.

7.2.1 CALIBRAZIONE

Passaggio importante nella messa a punto del un metodo analitico è il tuning dello spettrometro di massa, ovvero impostare tutti i parametri in modo da ottenere la migliore intensità di segnale possibile. Questo viene effettuato iniettando una soluzione di standard noti nella sorgente dello spettrometro di massa per infusione diretta utilizzando la pompa a siringa dello strumento stesso. La calibrazione dello strumento viene effettuata con miscele di standard noti al fine di assicurare l'accuratezza delle masse misurate.

Per la modalità positiva la soluzione calibrante contiene:

- Caffaina 20µg/ml;
- MRFA (massa 524) $C_{22}H_{27}N_7O_5S$ (H-Met-Arg-Ph Ala-OH) 1µg/ml;
- Ultramark 1621 0,001% (è un polipeptide).

In soluzione acquosa di aceto nitrile (50%), metanolo (25%) e acido acetico (1%).

Per la modalità negativa la miscela di sostanze note è costituita da:

- SDS (sodio dodici solfato) 2,9 µg/ml;
- Sodio taurocolato 5,4 µg/ml;
- Ultramark 1621 0,001%.

In soluzione acquosa di aceto nitrile (50%), metanolo (25%) e acido acetico (1%).



Figura 33: soluzioni calibranti utilizzate per la calibrazione dello spettrometro di massa. A sinistra la soluzione utilizzata per la modalità positiva, mentre a destra la soluzione per la modalità negativa.

La calibrazione viene effettuata ogni 48 ore e questo permette di ottenere un'accuratezza di massa di 5 ppm. Una migliore accuratezza, ≈ 2 ppm, si ottiene impiegando come riferimento delle impurezze presenti nelle fasi mobili e nello strumento che essendo note e di cui si conosce la massa esatta rappresentano un sistema di calibrazione interno continuo e sono chiamate lock mass. Lo strumento monitorando in modo continuo le lock mass permette un'acquisizione caratterizzata da un'accuratezza migliore.

Le analisi sono state condotte con una risoluzione di $R=60000$ con un range di massa tra 100 e 1000 m/z per la reverse phase e 100-600 m/z per la HILIC. In tabella 4 è possibile osservare tutti i parametri impostati durante la calibrazione sia per la modalità di ionizzazione positiva che negativa.

	REVERSE PHASE		HILIC	
	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo
Sorgente	ESI	ESI	ESI	ESI
Vol Inj	10 μ l	10 μ	15 μ	15 μ
T° sorgente	300°C	300°C	300°C	300°C
Source Voltage	4 KV	-3 KV	4,5 KV	-3,5KV
Sheath Gas flow	35	35	35	35
Aux Gas flow	5	5	5	5
Tube lens	100	-100	100	-100
Tune mass	524	514	524	514
R	60000	60000	60000	60000
Lock mass	149,02332 279,159090 391,284290 445,120030	112,985630	149,02332 279,159090 391,284290 445,120030	112,985630
Range mass	100-1000 m/z	100-1000 m/z	100-600 m/z	100-600 m/z

Tabella 4: parametri più importanti impostati durante la calibrazione dello strumento.

7.2.2 DESCRIZIONE DEL METODO ION TREE PROFILE

Nell'identificazione delle molecole riveste grande importanza lo studio strutturale delle specie effettuato mediante la frammentazione delle stesse. Per ottenere questo tipo di acquisizione si registrano i dati in ion tree profile.

In profilo non si ha una scansione (scan event) sola come nel caso del full scan ma si avranno più scansioni intervallate da azioni di frammentazione. Gli ioni verranno selezionati, frammentati e il segnale relativo ai frammenti sarà acquisito. Se l'operazione viene ripetuta più volte si avranno più fasi di frammentazione definite SCAN EVENT (MS^n con $n = 2,3...$) permettendo così un miglior riconoscimento strutturale dell'analita.

Nello SCAN EVENT 1 gli ioni generati dalla sorgente vengono analizzati in full scan con un intervallo di massa da 100 a 1000 m/z e una risoluzione di $R=60000$.

Nello SCAN EVENT 2 lo ione che presenta una intensità maggiore viene frammentato nella trappola ionica con un CID (collision induced decomposition) di 35 eV per il positivo e 20 eV per il negativo, dopo la frammentazione ci sarà un nuovo full scan con $R = 15000$ ottenendo così una MS^2 .

Nello SCAN EVENT 3 si avrà una frammentazione dello ione più intenso ottenuto nello scan event 2 con un CID sempre di 35 eV o 20eV in base alla polarità in cui si vuole lavorare e si ripeterà nuovamente un full scan ottenendo una MS^3 .

Nello SCAN EVENT 4 verrà preso l'analita che produce il secondo segnale più intenso nello scan event 1 e viene frammentato con un CID di 35 eV (modalità positiva) o 20 eV (modalità negativa), segue poi un full scan con $R = 15000$.

Nello SCAN EVENT 5 verrà preso lo ione dell'analita che ha prodotto il terzo segnale più intenso nello scan event 1, viene frammentato con un CID di 35 eV (modalità positiva) o 20 eV (modalità negativa) e poi verrà effettuato un full scan con $R = 15000$.

In figura 34 si può osservare uno schema riassuntivo della procedura impiegata.

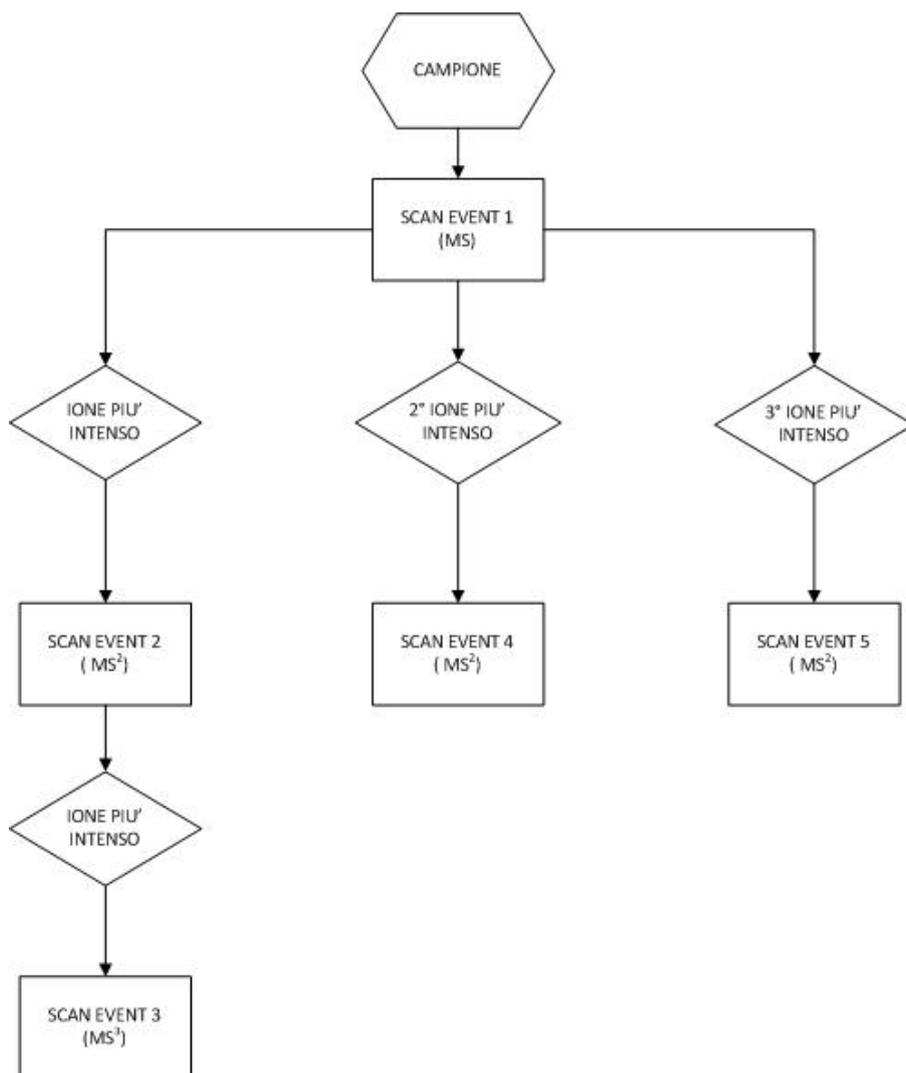


Figura 34: schema esemplificativo raffigurante gli scan event che avvengono nell'analisi dei campioni.

8-Preparazione e trattamento del campione

I campioni sono stati ottenuti utilizzando il campionatore TE 5000.

I filtri prima del campionamento sono stati trattati in muffola a 400°C per 4 ore e successivamente conservati in cold room avvolti in un triplo strato di alluminio a -20°C per evitare la degradazione microbica del campione fino al momento dell'analisi.

La procedura pre-analitica risulta essere una delle fasi più delicate dell'intero processo, in quanto si deve avere molta attenzione sia nel non contaminare i campioni, sia nel non perdere aliquote di campione compromettendo parte delle informazioni ottenibili.

Alcuni accorgimenti sono stati attuati per evitare una contaminazione da parte dell'operatore e dell'ambiente circostante. La vetreria utilizzata è stata attentamente pulita lasciando tutto il materiale immerso in una soluzione di H₂O e Contrad® (sapone per vetreria) per 24 ore e successivamente è avvenuto un attento risciacquo con H₂O ultrapura eliminando così ogni traccia di sapone eventualmente rimasta.

Successivamente per eliminare la presenza di eventuali composti organici sono stati effettuati due cicli da 14 minuti ciascuno in bagno ad ultrasuoni con H₂O ultrapura.

Per i campioni in esame, la procedura di preparazione porta all'estrazione di una grande quantità di analiti e per poter attuare un confronto tra i campioni questi dovranno essere trattati in modo riproducibile. I filtri ottenuti sono stati trattati seguendo in protocollo utilizzato da Zangrando et al. (2015) (Zangrando et al. 2015) e Perrone et al. (2012) (Perrone et al. 2012).

3/8 di ogni filtro sono stati spezzettati e immessi in beute da 50 ml utilizzando delle pinze di acciaio, successivamente è stata aggiunta una soluzione standard contenente 70 ng di ¹³C₆ vanillina, 1500 ng di ¹³C₆ levoglucosan e 200-300 ng di una miscela di ¹³C aminoacidi (Ala*, Arg*, Glu*). I filtri sono stati poi sottoposti a bagno ad ultrasuoni per estrarre gli analiti con due cicli da 15 minuti aggiungendo 5 ml e 2 ml di acqua ultrapura.

Infine l'estratto è stato filtrato mediante filtri da 0,45 µm PTFE per eliminare tracce di materiale solido come pezzetti di filtro e la frazione è stata raccolta in vials pronta per essere analizzata mediante cromatografia liquida ad alte prestazioni (HPLC) abbinata a spettrometria di massa ad alta risoluzione (HRMS).

Le stesse condizioni operative sono state impiegate anche le analisi dei bianchi di campo per valutare la contaminazione dovuta al campionamento e trattamento dei campioni. Per l'ottenimento del bianco di campo il filtro precedentemente muffolato è stato posto nell'alloggiamento del campionatore e lasciato per 5'. Poi è stato avvolto in carta di alluminio e conservato a -20°C con i campioni. Il bianco di campo è stato sottoposto alla stessa procedura di preparazione e analitica impiegata per i campioni.

Tutte le operazioni sono state eseguite all'interno di una cappa a flusso laminare per evitare qualsiasi tipo di contaminazione.

I campioni analizzati sono gli stessi che sono stati impiegati per la determinazione quantitativa di composti quali: anidro zuccheri, zuccheri, metossifenoli e amminoacidi in Zangrando et al (2015). Gli standard interni impiegati hanno permesso di valutare la riproducibilità della preparazione del campione e il monitoraggio della costanza e riproducibilità della ionizzazione.

Inoltre considerando che il tempo di campionamento per i campioni raccolti fra settembre e novembre è di 24 ore mentre quello a dicembre è di 12 ore , l'intensità delle specie ioniche è stata normalizzata per il volume di campionamento.

9-Elaborazione dei dati

I dati ottenuti dall'analisi HPLC-HRMS sono stati elaborati con differenti software, alcuni dedicati all'indagine metabolomica per ottenere il maggior numero di informazioni possibili.

9.1 SIEVE⁺

Sieve⁺ è un programma distribuito da Thermo Fisher Scientific che grazie ad una analisi statistica integrata è in grado di confrontare molti cromatogrammi di analisi diverse contemporaneamente, ma può anche effettuare un confronto fra i campioni e i bianchi (Control Compare Trend) (User manual Sieve⁺). Inoltre un'altra applicazione del software è in grado di confrontare gruppi di campioni tra loro (Two Sample Differential Analysis). La creazione di un nuovo esperimento (Figura 35) prevede la scelta di parametri iniziali tra cui il tipo di confronto che si vuole effettuare tra i campioni.

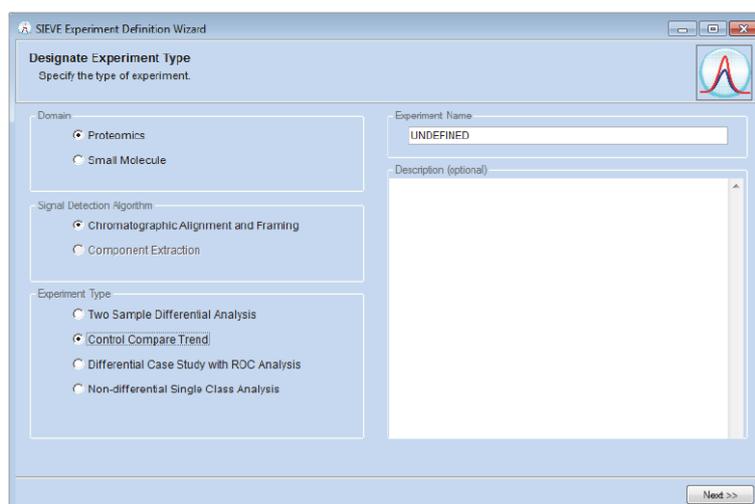


Figura 35: schermata iniziale di Sieve+ per la creazione di un nuovo esperimento (User manual Sieve⁺).

La procedura per l'utilizzo del software prevede il caricamento dei file di analisi (figura 36).

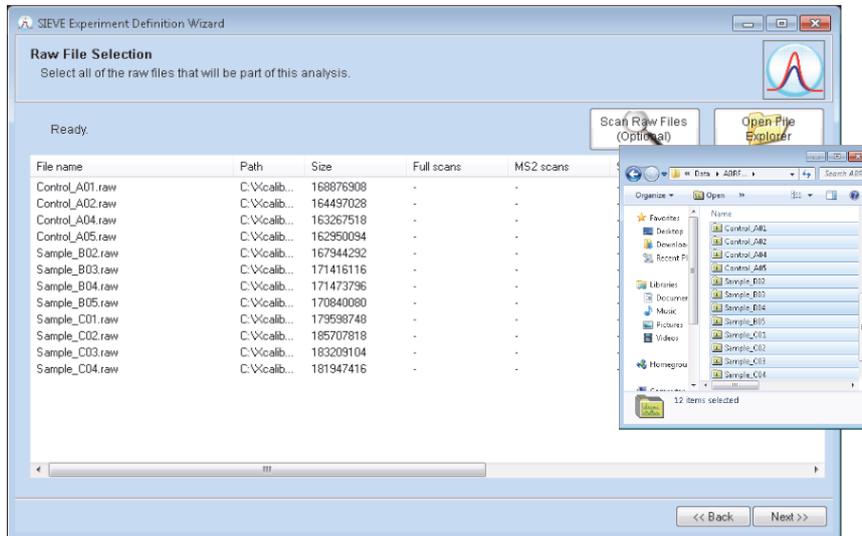


Figura 36: schermata di caricamento dei file da analizzare (User manual Sieve⁺).

Dopo la verifica dell'integrità dei file, a questi sarà assegnata una classe di appartenenza (categoria ad esempio campione, bianco, ecc) (figura 37).

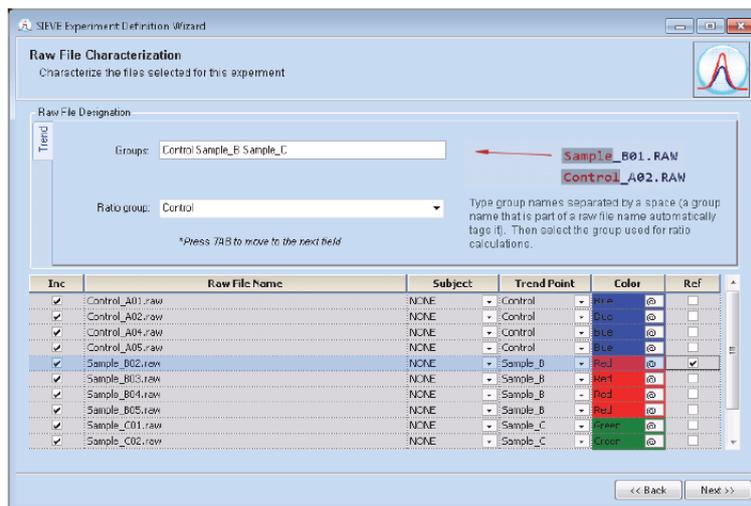


Figura 37: schermata di denominazione dei campioni e suddivisione delle categorie di appartenenza (User manual Sieve⁺).

Successivamente si definiscono il range di m/z su cui svolgere l'analisi, il tempo di ritenzione (ad esempio tra 3 e 60 minuti) e l'errore sull'accuratezza di massa espresso in ppm sul rapporto m/z (figura 38).

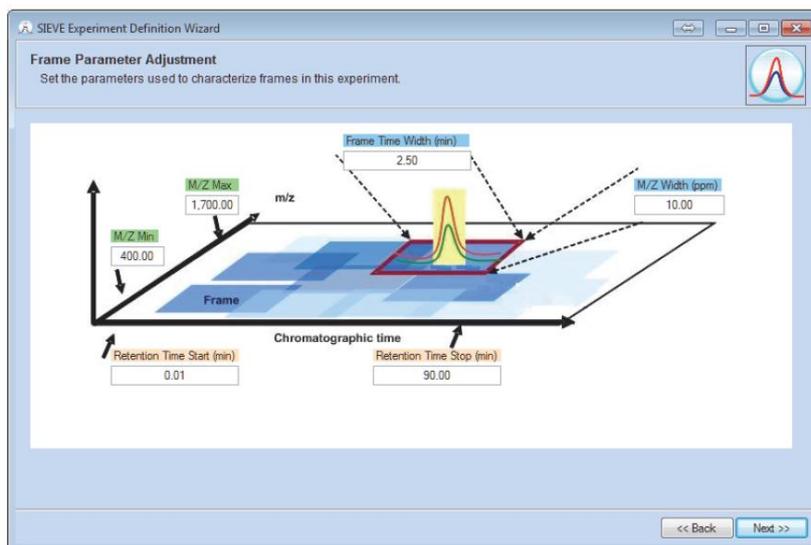


Figura 38: schermata di definizione dei parametri relativi al tempo di osservazione dei dati, range di m/z ed errore ppm di m/z (User manual Sieve[†]).

In seguito si impostano una serie di parametri operativi come carica dello ione $[M+H]^+$ o $[M-H]^-$, errore massimo sulla massa (10 ppm), Threshold (300000), larghezza del picco cromatografico (2.5 minuti) e database di riferimento nel quale cercare gli analiti (figura 39).

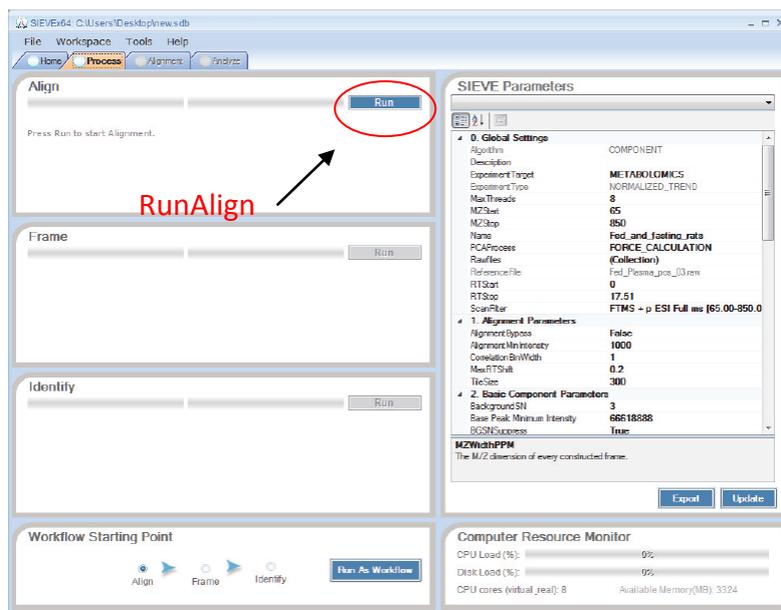


Figura 39: schermata di comando per fare partire l'esperimento (User manual Sieve[†]).

Attraverso il pulsante RunAlign è possibile elaborare tutti i dati caricati che daranno come risultato finale un cromatogramma ottenuto dall'allineamento di tutti i cromatogrammi acquisiti dai campioni. (figura 40)

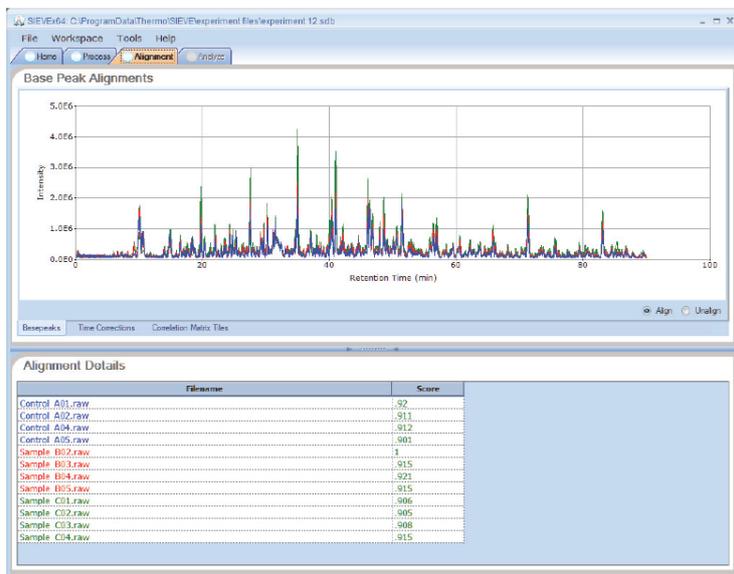


Figura 40: cromatogramma degli analiti (User manual Sieve[®]).

L'elaborazione dei dati avviene in 3 step successivi:

1. Affiancamento di tutti i cromatogrammi (fa un confronto di tutti i tempi di ritenzione e allinea i cromatogrammi di tutti i campioni figura 45);
2. Analisi dei frame ovvero degli ioni individuati. Questo permette la creazione di una tabella contenente tutte le informazioni come massa, rapporto m/z, errore espresso in ppm, intensità di segnale nei vari campioni, deviazione standard, tempo di ritenzione dei cosiddetti "Frame" ovvero gli ioni presenti all'interno dei campioni. Ogni ione presente sarà associato ad un picco cromatografico visibile nell'area soprastante alla tabella contenente tutti i dati degli analiti (Figura 41).

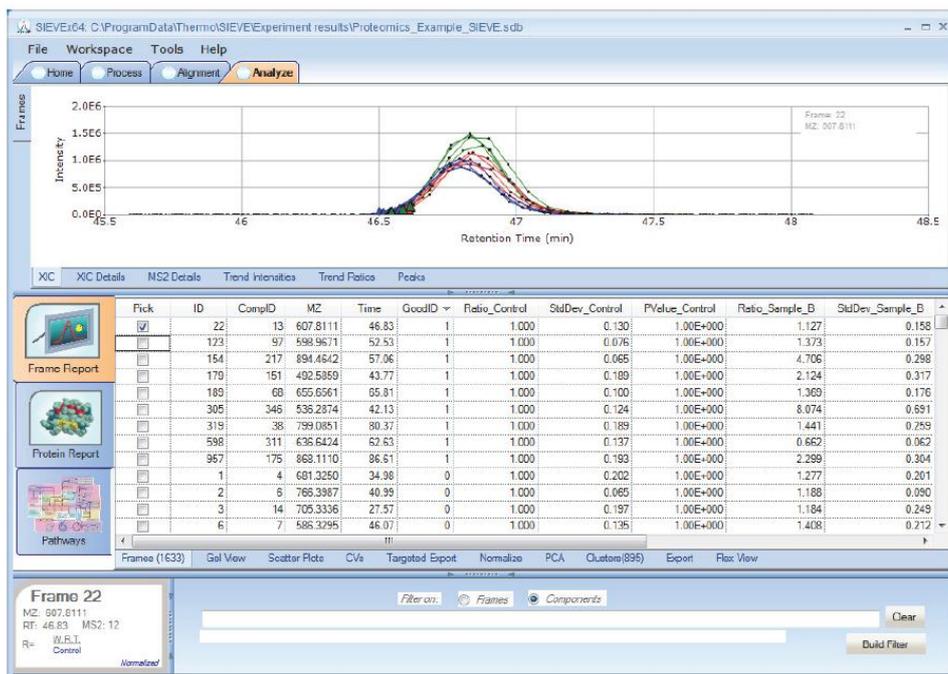


Figura 41: schermata contenente la tabella con tutti gli ioni presenti nei campioni e le relative informazioni (User manual Sieve⁺).

3. L'ultima parte dell'analisi riguarda l'identificazione autonoma degli ioni trovati da parte del software. Quest'ultimo suggerisce formula bruta e identità dello ione. In tal caso il software ricercherà lo ione e i suoi frammenti nella libreria pre-impostata inizialmente come ad esempio Chem Spider o PubChem.

Al fine di effettuare un'attribuzione ponderata delle specie ioniche trovate, ogni ione che il software ha individuato come significativamente diverso dal rumore di fondo e dall'intensità delle specie presenti nei bianchi è stato cercato tramite il software Xcalibur.

9.2 XCALIBUR

Questo software permette l'interfaccia dello spettrometro di massa con il cromatografo e l'utente. Per ogni campione analizzato Xcalibur restituisce un cromatogramma formato dalle molte scansioni effettuate dallo strumento, per ognuna delle quali sarà acquisito uno spettro di massa (Figura 42).

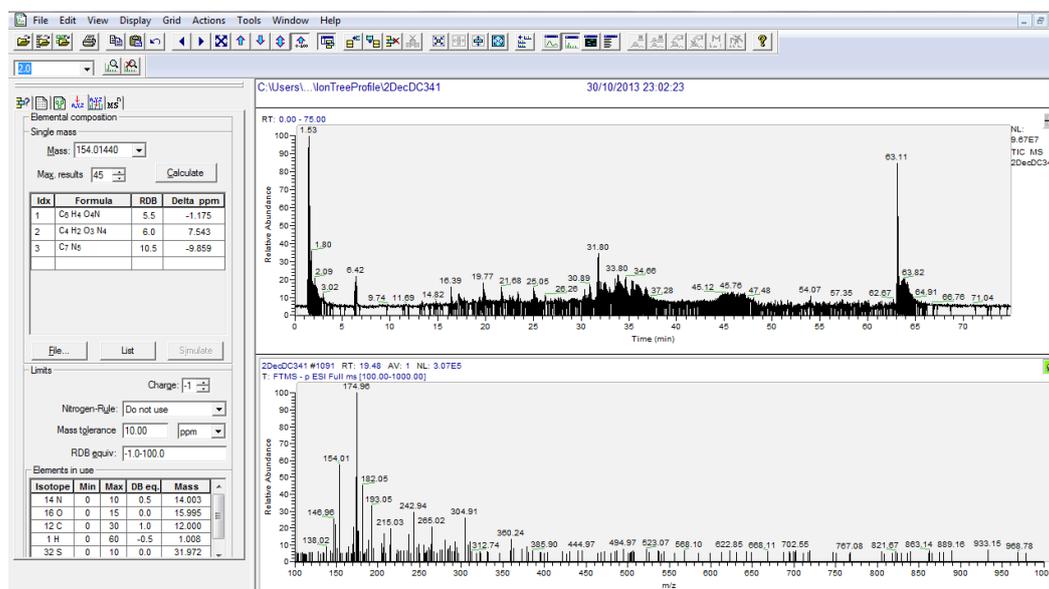


Figura 42: nella parte superiore della figura è possibile osservare il cromatogramma dell'analisi su di un campione. Nella parte sottostante è presente uno spettro di massa di uno ione rilevato.

Ogni ione presenterà un picco con una certa intensità a cui è associato un ben preciso rapporto m/z. Da questo è possibile ottenere una serie di formule brute proposte dal software caratterizzate da due parametri, RPB e l'errore di massa. La formula bruta è calcolata considerando un numero di atomi di $^{12}\text{C} \leq 100$, $^1\text{H} \leq 200$, $^{16}\text{O} \leq 50$, $^{15}\text{N} \leq 5$, $^{32}\text{S} \leq 2$ (Kourtchev et al. 2013). Il Δppm rappresenta l'errore di massa calcolato sulla massa esatte, naturalmente più risulta essere grande questo valore più la formula bruta proposta si discosta da quella reale. Per tale motivo si può decidere di impostare inizialmente il parametro "mass tolerance" che permette di scartare tutte le eventuali formule brute che presentano un errore superiore a quello impostato che risulta essere < 5 ppm (anche se in generale le formule scelte presentavano un errore di circa 2 ppm). Il parametro RDB (Ring double bond equivalent) indica il grado di insaturazione di un composto organico ed è dato dalla somma di tutti gli anelli, doppi e tripli legami presenti nella molecola. Ad esempio, il benzene ha un RDB = 4 in quanto presenta un anello e tre doppi legami, l'etilene avrà RDB = 1 in quanto ha solamente un doppio legame.

Per molecole complesse viene utilizzato un altro criterio di calcolo del parametro RDB (equazione 6).

$$RDB = x - \frac{1}{2}y + \frac{1}{2}z + 1 \quad (6)$$

X = numero di atomi di carbonio

Y = numero di atomi di idrogeno

Z = numero di atomi di azoto

Il parametro RDB può essere un utile strumento nella descrizione della formula di struttura di un composto, ma dovrà essere supportato da altri parametri come per esempio eventuali frammentazioni dello ione.

L'identificazione della formula bruta a volte risulta essere molto complicato per via della grande quantità di possibilità fornite. Una regola che può aiutare è la regola dell'azoto, se la massa del composto è pari allora la molecola conterrà un numero di atomi di N pari a zero o con numero pari intero, se la massa dell'analita presenta un numero dispari di atomi di N allora la molecola avrà un numero dispari di atomi di N.

Un ulteriore controllo nell'attribuzione della formula bruta è la verifica del cluster isotopico che si effettua valutando l'intensità relativa delle specie ioniche presenti confrontando il cluster sperimentale con quello teorico della formula proposta (figura 43).

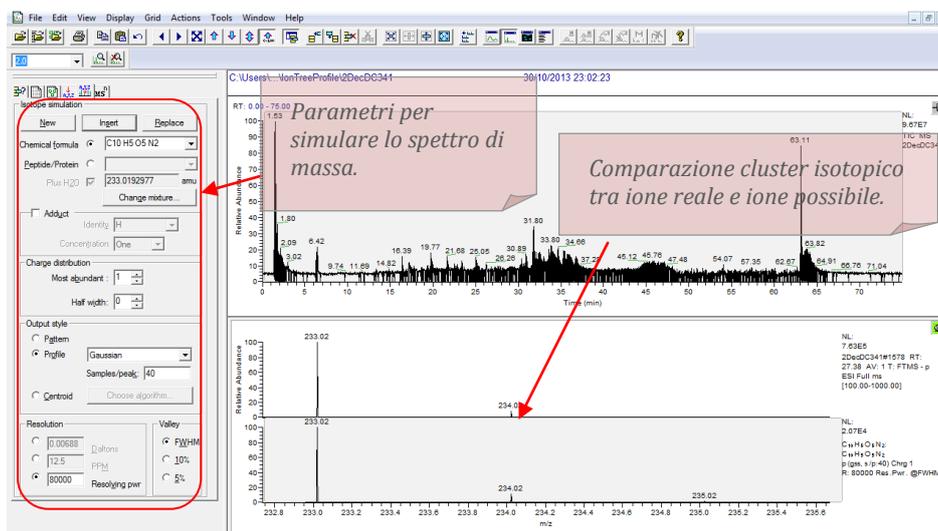


Figura 43: simulazione spettro di massa ed osservazione del cluster isotopico.

Inoltre sono state prese in considerazione molecole aventi rapporti $O/C \geq 1.5$, $0.3 \leq H/C \leq 2.5$, $N/C \geq 0.5$ e $S/C \geq 0.2$ questo perché analiti che presentano rapporti che non rientrano in tali valori è poco probabile esistano in natura (Kourtchev et al. 2013) (Wozniak et al. 2008) (Kind & Fiehn 2007).

Questo permette di eliminare una parte di formule semplificando il lavoro di identificazione. Con Xcalibur si possono osservare anche le frammentazioni degli ioni acquisite durante i data dependent scan e che è possibile richiamare e studiare al fine di ottenere indicazioni di tipo strutturale (Figura 44).

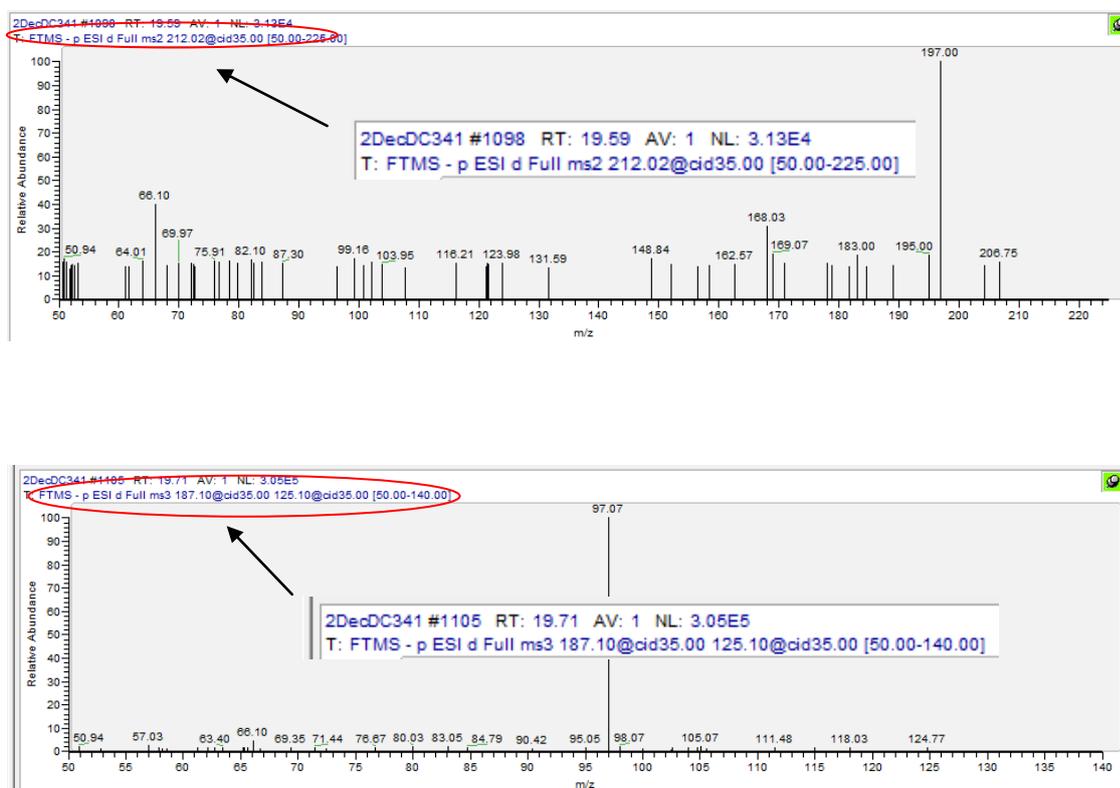


Figura 44: spettro di massa MS2 e MS3.

Questo permette di aiutare ulteriormente il lavoro di identificazione delle molecole in quanto la frammentazione è caratteristica dei gruppi funzionali e della forza di legame e in questo modo molti analiti possono così essere scartati in quanto non coerenti con le frammentazioni stesse.

9.3 IDENTIFICAZIONE DEGLI ANALITI

L'identificazione degli analiti parte dall'ottenimento della formula bruta grazie all'utilizzo di Sieve⁺ e di Xcalibur come descritto precedentemente.

La valutazione dell'accuratezza di massa, lo studio del cluster isotopico e le frammentazioni permettono di limitare il numero di formule da analizzare.

Tutto questo però non basta per una identificazione certa degli analiti con un alto grado di confidenza. E' possibile stabilire 4 livelli di identificazione dei metaboliti:

1. Confidently identified compounds
2. Putatively anotated compounds
3. Putatively anotated compounds clases
4. Unknown compounds

Il primo livello presenta una confidenza elevata e si può ottenere confrontando uno o più proprietà dell'analita con uno standard dell'analita stesso. Anche utilizzando questo metodo non è comunque possibile distinguere isomeri aventi massa o caratteristiche cromatografiche uguali (Dunn et al. 2012).

Il secondo livello prevede l'assegnazione di un nome alla molecola in assenza di standard di riferimento, ma valutando le caratteristiche chimico-fisiche o andando a confrontare lo spettro di massa con spettri presenti in banche dati e/o in letteratura (Sumner et al. 2007).

Utilizzando una tecnica come l'HPLC-HRMS il grado di accuratezza del rapporto m/z fa sì che siano sufficienti le frammentazioni e i tempi di ritenzione per confrontare lo spettro dell'analita con quelli presenti in letteratura senza il bisogno di avere altri parametri a disposizione (Dunn et al. 2012). Il terzo livello fa affidamento sulle proprietà chimico-fisiche dell'analita, in questo caso le caratteristiche di quest'ultimo lo introdurranno in una classe di composti anche se non è possibile indicare informazioni aggiuntive (Sumner et al. 2007).

Nel livello quattro entrano tutti gli analiti a cui non è possibile associare né una formula di struttura né una formula bruta e restano così non identificabili.

Per tutti questi motivi parallelamente all'utilizzo di X-calibur sono stati usati anche database online intrecciando le informazioni ottenibili per raggiungere lo scopo di identificazione degli analiti. I supporti utilizzati sono stati:

- METLIN: è un database di metabolomica (figura 45) che presenta una vasta lista di metaboliti con le relative masse esatte, formule brute e di struttura. Sono presenti inoltre

anche spettri di massa con le relative frammentazioni degli analiti che permettono così un confronto diretto con gli spettri ottenuti dall'analisi e una identificazione più accurata. Il programma permette la ricerca dell'analita impostando la massa esatta, l'errore di massa espresso in ppm, la carica dello ione, il tipo di ione (H^+ , Na^+ , K^+ , Li ecc) eliminando così tutti quegli analiti che non rispondono alle caratteristiche impostate.

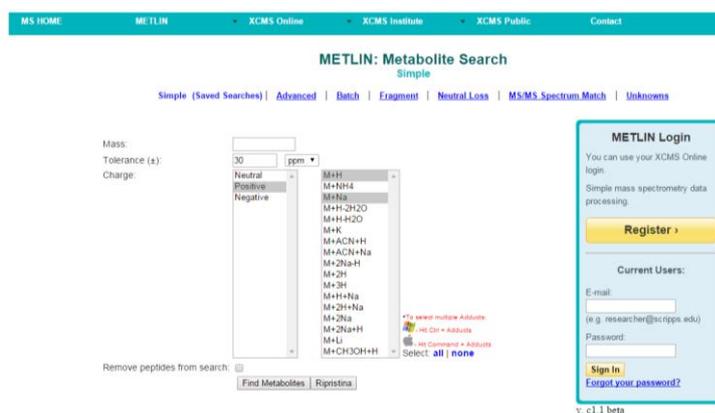


Figura 45: Schermata principale Metlin (metlin.scripps.edu).

- HMDB (Human metabolome database): anche questo è un database di metabolomica che permette di ottenere la denominazione dell'analita, la formula di struttura e anche una breve descrizione sul tipo di analita e sulla sua distribuzione.
- SCIENCE DIRECT: è un sito web dove è possibile consultare giornali accademici, pubblicazioni e libri in cui è possibile trovare informazioni utili sugli analiti in analisi.
- CHEM SPIDER: è un database contenente oltre 26 milioni di molecole. La ricerca degli analiti può essere effettuata utilizzando il nome IUPAC, nomi sistematici registrati, sinonimi, attraverso il numero CAS della molecola, attraverso la formula molecolare o la massa molecolare.

- MET FRAG: tramite l'utilizzo di questo sito (figura 46) è possibile ricercare lo ione desiderato in database come KEGG, Pub Chem, Chem Spider avendo la possibilità di inserire le frammentazioni al fine di attuare una ricerca più accurata.

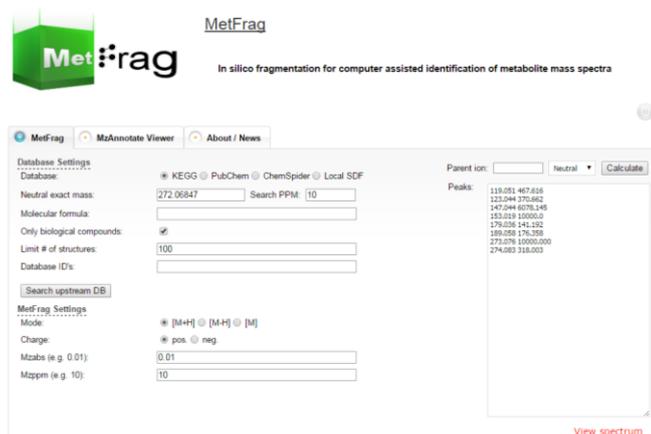


Figura 46: Schermata principale di MetFrag (msbi.ipb-halle.de/MetFrag/).

- PUB CHEM: è un database di molecole chimiche dove è possibile trovare informazioni su milioni di strutture di composti registrati.
- CHEM DRAW: è un programma utile per il disegno di formule di struttura dei composti e per ipotizzare una loro frammentazione.

La ricerca simultanea su tutte queste piattaforme ha permesso l'identificazione degli analiti con livelli diversi di confidenza. Per alcuni è stato possibile indicare solamente la formula molecolare in quanto le informazioni necessarie per dare un più accurato grado di identificazione erano scarse, per altre invece è stato possibile indicare un nome e conseguentemente una formula di struttura vista la presenza di informazioni come tempi di ritenzione o frammentazioni.

Attraverso l'utilizzo del programma Excel è stato possibile la preparazione di tutte le maschere e le matrici che sono servite in seguito per l'analisi statistica dei dati ottenuti.

E' stato utilizzato anche per l'applicazione dei metodi di analisi Krendick mass defect e Van Krevelen spiegati nel capito 9.5 e 9.6.

9.4 STRUMENTI MATEMATICI IMPIEGATI

9.4.1 KENDRICK MASS DEFECT

La Kendrick mass analysis è una tecnica utilizzata in spettri di massa ad alta risoluzione per l'identificazione di composti omologhi che differiscono in base ad una unità base come ad esempio CH₂ (Kendrick 1963) (Marshall & Rodgers 2004).

L'attuazione di questa tecnica viene effettuata andando a calcolare due parametri, la Kendrick massa e il Kendrick mass defect.

La Kendrick mass viene calcolata come segue (Marshall & Rodgers 2004) (equazione 7):

$$Kendrick\ mass = IUPAC\ mass * \frac{14.00000}{14.01565} \quad (7)$$

Dove IUPAC mass è la massa esatta dello ione in analisi, 14.00000 è la massa approssimata dell'unità CH₂ mentre 14.01565 è la massa IUPAC dell'unità CH₂. Oltre all'unità CH₂ è possibile utilizzare anche altri gruppi di atomi per definire la Kendrick mass, come ad esempio O, CO₂, H₂ e H₂O (Reemtsma 2009). In tal caso l'equazione (equazione 8) da applicare presenterà delle variazioni.

$$Kendrick\ mass\ (F) = observed\ mass * \frac{Nominal\ mass\ F}{exact\ mass\ F} \quad (8)$$

Dove la observed mass è la massa osservata dello ione, la nominal mass F è la massa approssimata dell'unità utilizzata e l'exact mass F è la massa esatta dell'unità usata per il calcolo della Kendrick mass.

Per quanto concerne il Kendrick mass defect viene utilizzata l'equazione 9.

$$Kendrick\ mass\ defect = nominal\ mass - Kendrick\ mass \quad (9)$$

dove la massa nominale rappresenta la massa della molecola arrotondata al più vicino intero.

Una volta calcolati questi due parametri è possibile ottenere un plot riportando in ascissa la Kendrick mass e in ordinata il Kendrick mass defect.

Ioni analoghi presenteranno valori di Kendrick mass defect uguali ma diversi valori di Kendrick mass posizionandosi così tutti su una retta orizzontale nel plot. Andando a determinare la formula molecolare di uno degli analiti presenti nella retta, gli altri dovranno presentare una formula simile che differisce solamente dell'unità con cui si sono calcolati i due parametri. La distribuzione in verticale degli ioni rappresenta una diversa composizione e quindi una diversa formula molecolare, in quanto possono essere presenti eteroatomi diversi o cicli carboniosi e non che ne differenziano le strutture.

Spesso l'analisi di Kendrick viene utilizzata in concomitanza con i diagrammi di Van Krevelen in cui la composizione elementare dei composti è ottenuta in base a dei rapporti H/C, O/C o N/C (Reemtsma 2009) (Wu et al. 2004).

9.4.2 DIAGRAMMI DI VAN KREVELEN

I diagrammi di Van Krevelen furono introdotti nel 1950 (Krevelen 1950) per descrivere i cambiamenti della composizione elementare durante la formazione del carbone. Recentemente l'utilizzo di questo diagrammi ha ottenuto notevole importanza per l'interpretazione dei dati ottenuti mediante spettrometria ad alta risoluzione (Kim et al. 2003).

I diagrammi consistono in un plot, bidimensionale o tridimensionale, in cui sono generalmente considerati i rapporti H/C e O/C ma anche N/C, S/C ecc.

Le principali classi di composti biogeochimici, come ad esempio lignina, lipidi o carboidrati presentano dei caratteristici rapporti H/C e O/C che li posizionano in una zona definita all'interno del diagramma (Kim et al. 2003).

La storia diagenetica di questi composti può essere tracciata osservando i diagrammi di Van Krevelen perchè le tipiche reazioni biogeochimiche come condensazioni, ossidazioni, metilazioni, riduzioni, idrogenazioni, deidrogenazioni, portano ad una perdita o ad un guadagno di atomi come C, H, O o N che porterà ad una traiettoria ben specifica all'interno del diagramma come mostrato in figura47 (Krevelen 1950).

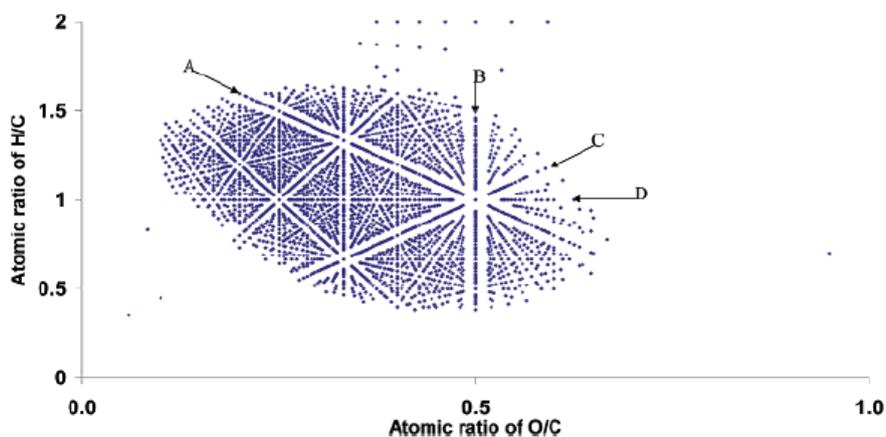


Figura 47: diagramma di Van Krevelen. Le linee nel plot rappresentano le reazioni chimiche caratteristiche. (A) indica una metilazione-demetilazione, (B) una idrogenazione-deidrogenazione, (C) una idratazione o condensazione e (D) una ossidazione o riduzione (Kim et al. 2003).

Le linee che appaiono nel diagramma di Van Krevelen (figura 47) rappresentano le reazioni chimiche che possono avvenire e differenziare gli analiti all'interno di un campione come l'aerosol atmosferico. Muovendosi lungo tale linee gli analiti che sono disposti su di esse si differenzieranno per una unità caratteristica della reazione che descrive quella linea. Ad esempio analiti che si stanno sulla linea della reazione di metilazione si differenzieranno per unità CH_3 mentre quelle che stanno sulla linea della idrogenazione-deidrogenazione si differenzieranno per H_2 . Questo tipo di analisi risulta quindi essere un valido strumento dei composti nello studio delle caratteristiche chimiche all'interno di una matrice complessa come l'aerosol.

10-Risultati e Discussioni

I campioni relativi all'autunno inverno 2008 raccolti a Belgrado sono stati analizzati sia con i metodi in reverse phase che HILIC descritti precedentemente. Le analisi in reverse phase unite ad alcuni dati ottenuti con le analisi in HILIC rappresentano i risultati ottenuti in questi lavoro di tesi. I dati sono stati elaborati in una prima fase utilizzando Sieve⁺ per la ricerca di Small molecules effettuando un confronto fra il gruppo dei campioni e quello dei bianchi di campo, che ha eliminato le specie presenti nel background e ha fatto emergere gli ioni significativi nei campioni (tabella in appendice).

Per alcuni analiti è stato possibile identificare la molecola in base alle informazioni ottenute dalla massa esatta, dal cluster isotopico e dalle informazioni di tipo strutturale che suggeriscono esclusivamente quel composto del quale si è avuto riscontro dalle banche dati e dalla letteratura. Osservando la tabella in appendice è possibile vedere che in modalità di ionizzazione positiva gli ioni sono presenti in forma protonata $[M+H]^+$ e con la presenza di eteroatomi come ossigeno o azoto indicano composti organo ossigenati o organo azotati, inoltre si può notare la simultanea presenza di composti sodiati $[M+Na]^+$. Composti come gli organo ossigenati possono derivare da fonti naturali o antropiche come combustioni di lignina o cellulosa (Oros & Simoneit 2001a), mentre la presenza di composti azotati o azo-ossigenati possono essere attribuiti alle reazioni che avvengono in atmosfera in presenza di NO_x (Mazzoleni et al. 2010) (Docherty & Ziemann 2006).

Per quanto riguarda gli ioni ottenuti in polarità in negativa $[M-H]^-$, si può osservare come sia presente una rilevante quantità di sostanze contenenti lo zolfo e denominate organo solfati. Queste possono essere associate a particelle biogeniche primarie (Surratt et al. 2008) liberate in atmosfera, ma anche a reazioni di VOCs (volatile organic compounds) in fase acquosa in atmosfera dovute all'alta acidità dell'aerosol (Surratt et al. 2008) (Altieri et al. 2009). In negativo sono state osservate anche specie chimiche contenenti atomi di C,H,O,N e S, queste, definite come nitroossi-organosolfati (Altieri et al. 2009) derivano presumibilmente anch'esse dalla reazione dei VOCs o dei loro derivati ossidati (Altieri et al. 2009).

Sono state individuate serie di acidi carbossilici solforati (tabella 6 serie 12, 15), acidi carbossilici aromatici (tabella 6 serie 13), perossidi solforati di acidi carbossilici (tabella 6 serie 16) e acidi carbossilici aromatici (tabella 6 serie 2).

Alcuni analiti identificati possono essere indicatori "marker" di specifiche fonti di emissione. Numerosi dei composti individuati sono riconducibili al biomass burning (tabella in appendice)

quali ad esempio siringaldeide, siringolo o alcool sinapilico (Simoneit et al. 1999) Altri composti derivati da piante (Ganoderal A, Isoclerone, Herniarin), amminoacidi e derivati di amminoacidi (Fenilalanina, acido piroglutammico), composti di origine microbica e fungina (N-acetil glucosamina, acido aspergilloso), derivati di sostanze di impiego agricolo (2-naftilammina), composti legati a produzioni di tipo industriale (glicole dietilenico, Amphoteric L) ect.

Alcune importanti e specifiche considerazioni possono essere effettuate su alcuni analiti individuati. L'isoclerone è un composto policiclico idrossilato che si trova nel legname di *Corylus avellana* (nocciolo) e nei nostri campioni soprattutto in dicembre. In Serbia, nel periodo invernale, viene utilizzato molto il riscaldamento domestico derivante da combustione di legna (Glavonjic & Oblak 2012), utilizzando diverse piante arboree pino, betulle, frassino, aceri, faggio e nocciolo (Country report of Serbia). Tutti questi alberi possono essere utilizzati come legname da utilizzare nelle stufe e il rilascio di un componente specifico come l'isoclerone (nocciolo) indica chiaramente l'impiego di questa legna nel riscaldamento domestico.

La 2-naftilammina è un composto che si può trovare sia all'interno del fumo di sigaretta (Center for disease control e prevention), che utilizzato per la preparazione di composti chimici per l'agricoltura (PubChem). Considerando che l'intensità del segnale osservato è maggiore ad ottobre, probabilmente la sorgente di emissione è da individuare nell'impiego in agricoltura da composti chimici rilasciati in atmosfera nel corso delle combustioni in campo aperto osservate in questo periodo.

Dai campioni analizzati è stata determinata anche la nicotina, questa presenta intensità di segnale differenti nei vari giorni di campionamento indicando che tale analita non deriva solamente dall'utilizzo di tabacco dalla popolazione. A Belgrado tra le varie industrie presenti è riportata anche la Japan Tabacco che lavora il tabacco derivante dalle coltivazioni presenti in grande quantità nel Paese (Country report of Serbia). Questa immissione di nicotina in atmosfera può essere dovuta proprio a queste lavorazioni che vengono effettuate sulle foglie di tabacco, o anche alla combustione in campi aperti degli scarti derivanti dalla coltivazione.

10.1 KENDRICK MASS DEFECT

Al fine di verificare la presenza di serie omologhe all'interno dei campioni è stato effettuato lo studio del diagramma di Kendrick (figura 48) dove in ascissa è riportato la Kendrick mass mentre in ordinata il Kendrick mass defect (paragrafo 9.5).

In figura 48 è possibile osservare il diagramma di Kendrick per gli ioni positivi e negativi.

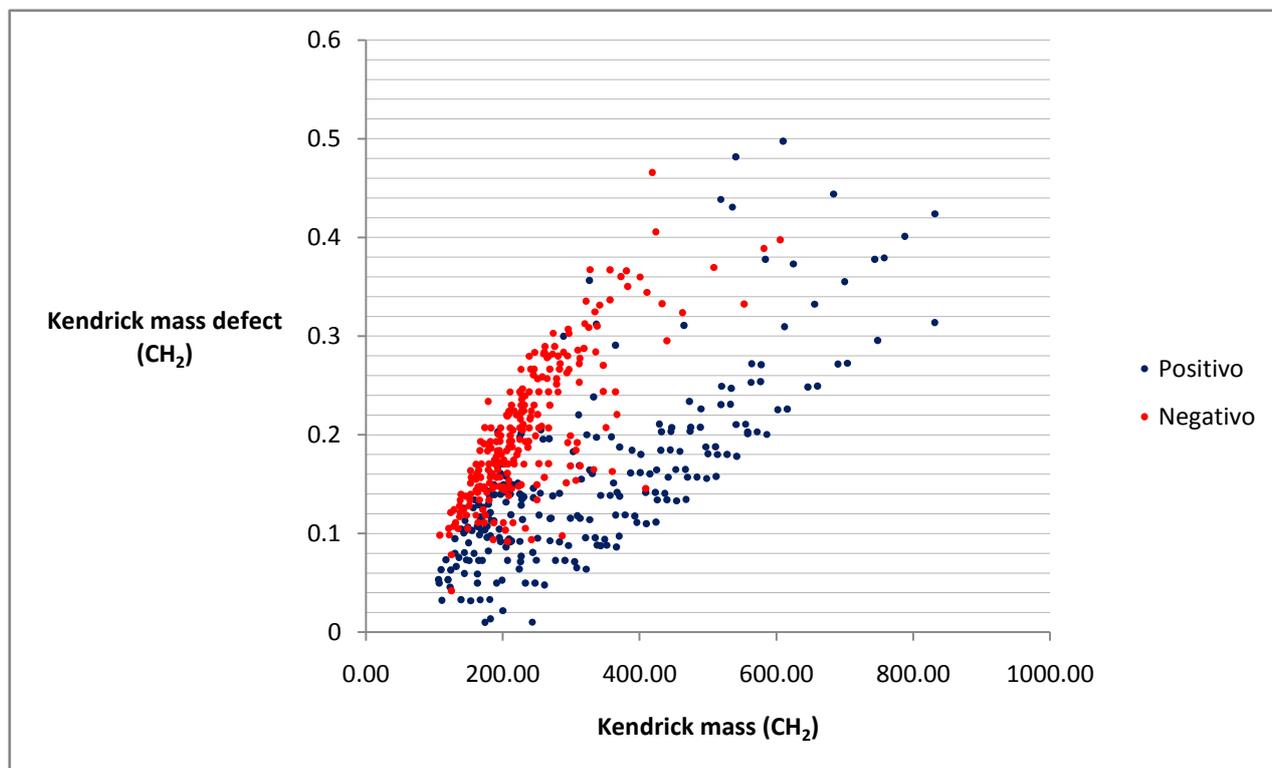


Figura 48: Kendrick mass defect polarit  positiva e negativa.

In entrambi i casi è possibile osservare che il valore di Kendrick mass defect aumenta con l'aumentare della massa molecolare. Questo aumento è da attribuire ad un più alto livello di ossidazione o di insaturazione degli analiti a maggior massa molecolare (Smith et al. 2009).

Analiti che risultano essere sulla stessa linea orizzontale differiscono tra loro di multipli di 14 Da ovvero di unità CH_2 . Questi faranno parte della stessa serie di composti omologhi che si differenziano per il numero di unità alchiliche CH_2 (Hughey et al. 2001).

Molecole che quindi si differenziano solamente per il numero dei gruppi alchilici presentano uno stesso valore di Kendrick mass defect ma diverso valore di Kendrick mass, composti che invece si differenziano per numero di doppi legami o per presenza di eteroatomi come N, O o S (in numero diverso) sono caratterizzati da valori diversi di Kendrick mass defect (Reemtsma 2009). Ad esempio un'aggiunta di un atomo di O in una molecola porta ad un incremento del valore di Kendrick mass defect di 0.0229 Da mentre l'aggiunta di una unità H_2 porta ad una diminuzione del valore di 0.0134Da (Reemtsma 2009).

Focalizzando l'attenzione sul diagramma di Kendrick mostrato in figura 49 è possibile osservare come un numero considerevole di composti differiscano tra loro di una unità alchilica CH_2 risultando essere omologhi tra loro. Questo aiuta molto l'identificazione dei composti in quanto individuato un analita della serie, gli altri risulteranno facilmente determinabili in quanto presenteranno una struttura simile differendo solamente da unità C_nH_{2n} .

Inoltre dalla figura 48 osserviamo che le specie ionizzate in polarità negativa (pallini rossi) risultano in generale avere massa inferiore e un valore di Kendrick mass defect maggiore a significare un maggior numero di specie contenenti eteroatomi (O,N e S) rispetto al positivo (pallini blu).

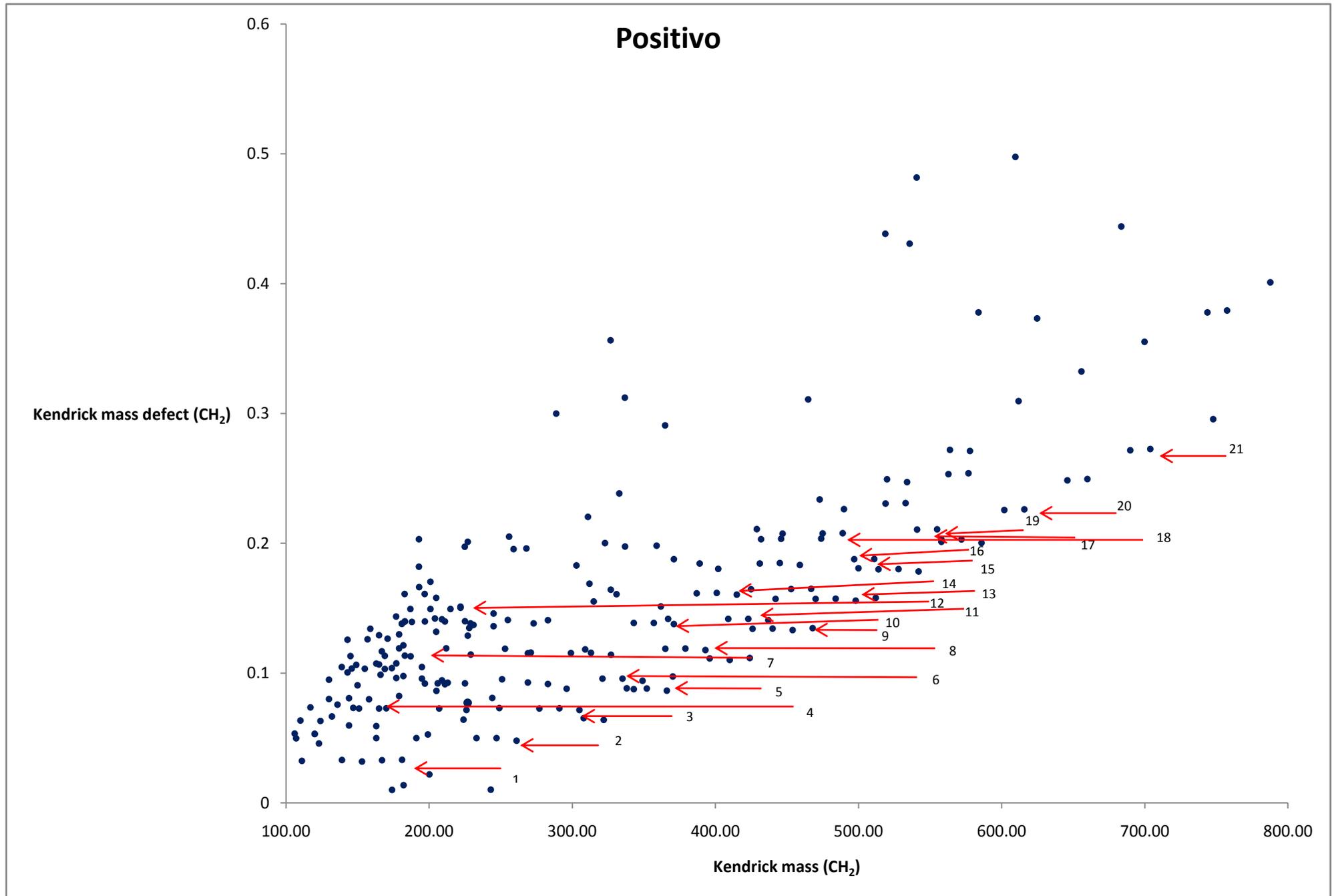


Figura 49: diagramma di Kendrick mass defect per gli ioni positivi. I numeri evidenziati all'interno del diagramma indicano gli omologhi trovati rappresentati in tabella 5.

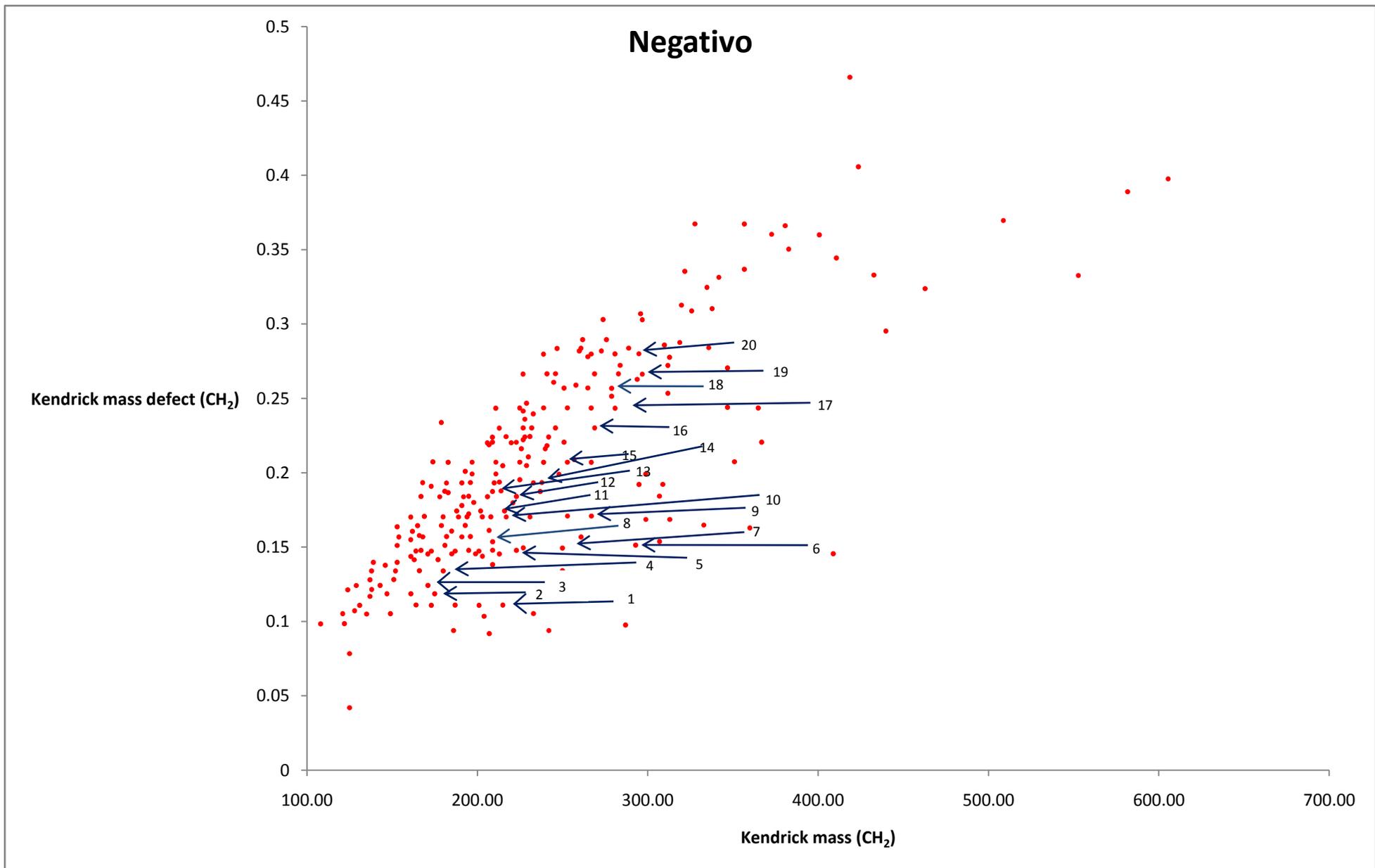


Figura 50: diagramma di Kendrick mass defect per gli ioni negativi. I numeri evidenziati all'interno del diagramma indicano gli omologhi trovati rappresentati in tabella 6.

In tabella 5 sono riportati gli analiti omologhi ottenuti dal diagramma di Kendrick mass defect per la polarità in positivo mentre in tabella 6 sono riportati quelli per la polarità in negativo.

Numero serie	Serie omologa polarizzazione positiva	Ione portatore di carica
1	C ₆ H ₁₀ N ₂ C ₈ H ₁₄ N ₂ C ₉ H ₁₆ N ₂ C ₁₀ H ₁₈ N ₂ C ₁₁ H ₂₀ N ₂	H H H H H
2	C ₈ H ₁₈ O ₃ C ₁₀ H ₂₂ O ₃ C ₁₃ H ₃₀ O ₃	H H H
3	C ₇ H ₁₆ O ₄ C ₁₀ H ₂₂ O ₄ C ₁₃ H ₂₈ O ₄ C ₁₅ H ₃₂ O ₄	H H H H
4	C ₉ H ₇ N C ₁₀ H ₉ N C ₁₁ H ₁₁ N	H H H
5	C ₁₅ H ₂₉ N ₅ O C ₁₈ H ₃₅ N ₅ O C ₁₉ H ₃₇ N ₅ O	H H H
6	C ₈ H ₁₉ O ₅ C ₁₂ H ₂₆ O ₅ C ₁₇ H ₃₆ O ₅ C ₁₈ H ₃₈ O ₅	H H H H
7	C ₉ H ₁₂ O ₃ C ₁₀ H ₁₄ O ₃	H H
8	C ₁₁ H ₂₄ O ₆ C ₁₅ H ₃₂ O ₆ C ₁₉ H ₄₀ O ₆ C ₂₀ H ₄₂ O ₆	H H H H
9	C ₂₈ H ₄₃ O ₂ N C ₂₉ H ₄₅ O ₂ N C ₃₁ H ₄₉ O ₂ N	H H H
10	C ₁₂ H ₂₆ O ₅ Na C ₁₇ H ₃₆ O ₅ Na C ₁₈ H ₃₈ O ₅ Na C ₁₉ H ₄₀ O ₅ Na	Na Na Na Na
11	C ₁₈ H ₃₈ O ₇ C ₂₁ H ₄₄ O ₇	H H

	$C_{22}H_{44}O_7$	H
12	$C_8H_{10}O_5$ $C_9H_{12}O_5$ $C_{10}H_{14}O_5$	H H H
13	$C_{28}H_{43}O_3N$ $C_{30}H_{47}O_3N$ $C_{31}H_{49}O_3N$ $C_{32}H_{51}O_3N$ $C_{33}H_{53}O_3N$	H H H H H
14	$C_{15}H_{32}O_6Na$ $C_{19}H_{40}O_6Na$ $C_{20}H_{42}O_6Na$ $C_{21}H_{44}O_6Na$	Na Na Na Na
15	$C_{24}H_{35}O_4N$ $C_{31}H_{48}O_4N$ $C_{32}H_{51}O_4N$ $C_{33}H_{53}O_4N$	H H H H
16	$C_{18}H_{38}O_7Na$ $C_{21}H_{45}O_7Na$ $C_{22}H_{47}O_7Na$	Na Na Na
17	$C_{25}H_{37}O_5N$ $C_{27}H_{39}O_5N$ $C_{28}H_{43}O_5N$ $C_{34}H_{55}O_5N$ $C_{35}H_{57}O_5N$	H H H H H
18	$C_{28}H_{40}O_3Na$ $C_{30}H_{44}O_3Na$ $C_{31}H_{46}O_3Na$	Na Na Na
19	$C_{26}H_{36}O_5$ $C_{34}H_{52}O_5$ $C_{35}H_{54}O_5$	H H H
20	$C_{28}H_{43}O_6N$ $C_{36}H_{58}O_6N$ $C_{37}H_{61}O_6N$	H H H
21	$C_{31}H_{44}O_8N$ $C_{32}H_{50}O_8N$ $C_{40}H_{67}O_8N$ $C_{41}H_{69}O_8N$	H H H H

Tabella 5: tabella rappresentante i composti omologhi trovati per la polarità in positivo. Il numero progressivo è legato al numero presente in figura 49 che indica la serie omologa corrispondente in tabella.

Numero serie	Serie omologa polarizzazione negativa	Ione portatore di carica
1	C ₅ H ₈ O ₄ C ₈ H ₁₄ O ₄ C ₉ H ₁₆ O ₄ C ₁₀ H ₁₈ O ₄ C ₁₁ H ₂₀ O ₄	H H H H H
2	C ₉ H ₈ O ₂ C ₁₀ H ₁₀ O ₂ C ₁₁ H ₁₂ O ₂	H H H
3	C ₅ H ₆ O ₄ C ₆ H ₈ O ₄	H H
4	C ₆ H ₅ NO ₃ C ₇ H ₇ NO ₃ C ₈ H ₉ NO ₃ C ₉ H ₁₁ NO ₃	H H H H
5	C ₁₁ H ₈ O ₂ C ₁₂ H ₁₀ O ₂ C ₁₃ H ₁₂ O ₂ C ₁₄ H ₁₄ O ₂	H H H H
6	C ₇ H ₁₀ O ₅ C ₈ H ₁₂ O ₅ C ₉ H ₁₄ O ₅	H H H
7	C ₅ H ₁₂ O ₄ S C ₇ H ₁₆ O ₄ S C ₈ H ₁₈ O ₄ S	H H H
8	C ₈ H ₆ O ₄ C ₉ H ₈ O ₄ C ₁₀ H ₁₀ O ₄	H H H
9	C ₅ H ₆ O ₆ C ₇ H ₁₀ O ₆ C ₈ H ₁₂ O ₆ C ₉ H ₁₄ O ₆	H H H H
10	C ₄ H ₁₀ O ₅ S C ₉ H ₁₂ O ₅ S C ₁₀ H ₂₂ O ₅ S C ₁₁ H ₂₄ O ₅ S	H H H H
11	C ₁₀ H ₇ NO ₃ C ₁₁ H ₉ NO ₃ C ₁₂ H ₁₁ NO ₃	H H H
12	C ₄ H ₈ O ₅ S C ₆ H ₁₂ O ₅ S C ₈ H ₁₆ O ₅ S	H H H

13	C ₈ H ₆ O ₅	H
	C ₁₀ H ₁₀ O ₅	H
	C ₁₂ H ₁₄ O ₅	H
14	C ₆ H ₃ NO ₅	H
	C ₇ H ₅ NO ₅	H
	C ₈ H ₇ NO ₅	H
	C ₉ H ₉ NO ₅	H
	C ₁₁ H ₁₃ O ₅ N	H
15	C ₄ H ₈ O ₆ S	H
	C ₅ H ₁₀ O ₆ S	H
	C ₆ H ₁₂ O ₆ S	H
	C ₇ H ₁₄ O ₆ S	H
	C ₈ H ₁₆ O ₆ S	H
	C ₉ H ₁₈ O ₆ S	H
	C ₁₀ H ₂₀ O ₆ S	H
16	C ₅ H ₁₀ O ₇ S	H
	C ₆ H ₁₂ O ₇ S	H
	C ₉ H ₁₈ O ₇ S	H
17	C ₅ H ₈ O ₇ S	H
	C ₆ H ₁₀ O ₇ S	H
	C ₈ H ₁₄ O ₇ S	H
	C ₉ H ₁₆ O ₇ S	H
	C ₁₀ H ₁₈ O ₇ S	H
	C ₁₆ H ₃₀ O ₇ S	H
18	C ₈ H ₁₂ O ₇ S	H
	C ₉ H ₁₄ O ₇ S	H
	C ₁₀ H ₁₆ O ₇ S	H
19	C ₅ H ₈ O ₈ S	H
	C ₆ H ₁₀ O ₈ S	H
	C ₈ H ₁₄ O ₈ S	H
	C ₉ H ₁₆ O ₈ S	H
	C ₁₀ H ₁₈ O ₈ S	H
20	C ₆ H ₈ O ₈ S	H
	C ₈ H ₁₂ O ₈ S	H
	C ₉ H ₁₄ O ₈ S	H
	C ₁₀ H ₁₆ O ₈ S	H

Tabella 6: tabella rappresentante i composti omologhi trovati per la polarità in negativo. Il numero progressivo è legato al numero presente in figura 50 che indica la serie omologa corrispondente in tabella.

10.2 DIAGRAMMI DI VAN KREVELEN

I diagrammi di Van Krevelen vengono ottenuti calcolando preventivamente il rapporto tra il numero di atomi di idrogeno contro il numero di atomi di carbonio e il rapporto tra eteroatomi presenti e il numero di atomi di carbonio (ad esempio O/C, N/C, S/C). Questo tipo di analisi viene utilizzata per descrivere l'evoluzione della miscela organica presente in matrice e in particolare la loro saturazione-insaturazione.

I diagrammi di Van Krevelen sono stati ottenuti plottando il rapporto H/C (ordinata) contro il rapporto O/C (ascissa) per tutte le molecole identificate.

In figura 51 è possibile osservare il diagramma di Van Krevelen per quanto riguarda la modalità positiva mentre in figura 52 è rappresentato quello per la modalità negativa.

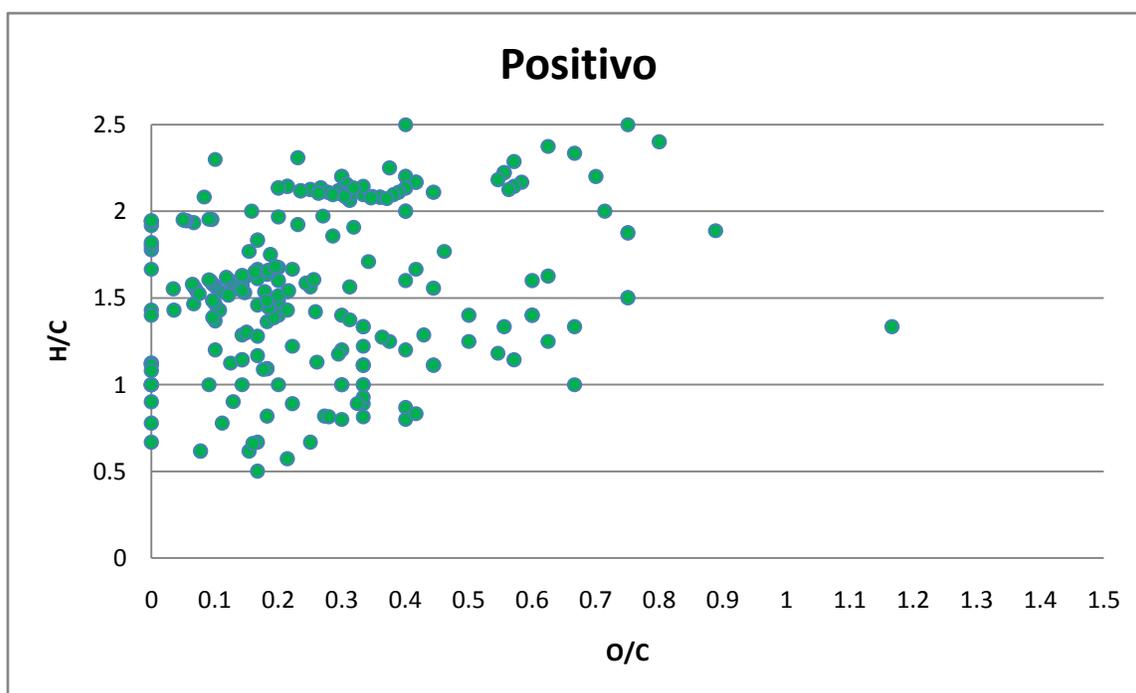


Figura 51: Van Krevelen ottenuto plottando i dati ottenuti per la modalità positiva.

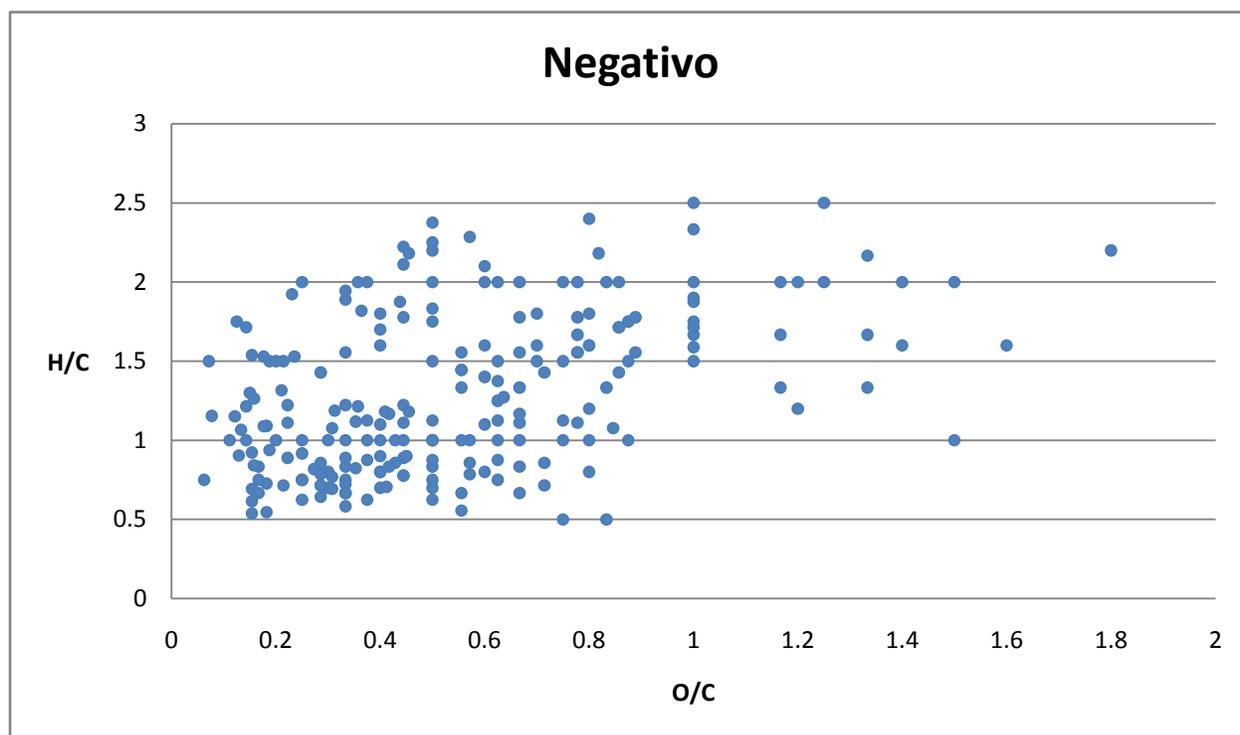


Figura 52: Van Krevelen plottando i dati ottenuti in modalità negativa.

Il rapporto H/C va a separare i composti in accordo con il loro grado di insaturazione mentre il rapporto O/C separa le classi di composti in base al numero di atomi di ossigeno e carbonio presenti nelle molecole indicando nell'aerosol organico crescenti livelli di ossidazione e di invecchiamento (Meija 2006).

E' possibile osservare come per il rapporto O/C=0, soprattutto in positivo, si raggruppino tutte le specie che non presentano al loro interno atomi di ossigeno e che di conseguenza risultano essere composti organo azotati (Smith et al. 2009) (figura 52).

In figura 53 è riportato il diagramma di Van Krevelen relativo a tutte le molecole individuate riunendo i dati osservati in modalità positiva e in modalità negativa.

Si può osservare, come suggerito da Kourtchev (2013), che nelle aree A ($H/C \geq 1.5$ e $O/C \leq 0.5$) sono individuabili specie alifatiche, mentre nell'area B ($H/C \leq 1.0$ e $O/C \leq 0.5$) sono presenti specie aromatiche (Kourtchev et al. 2013).

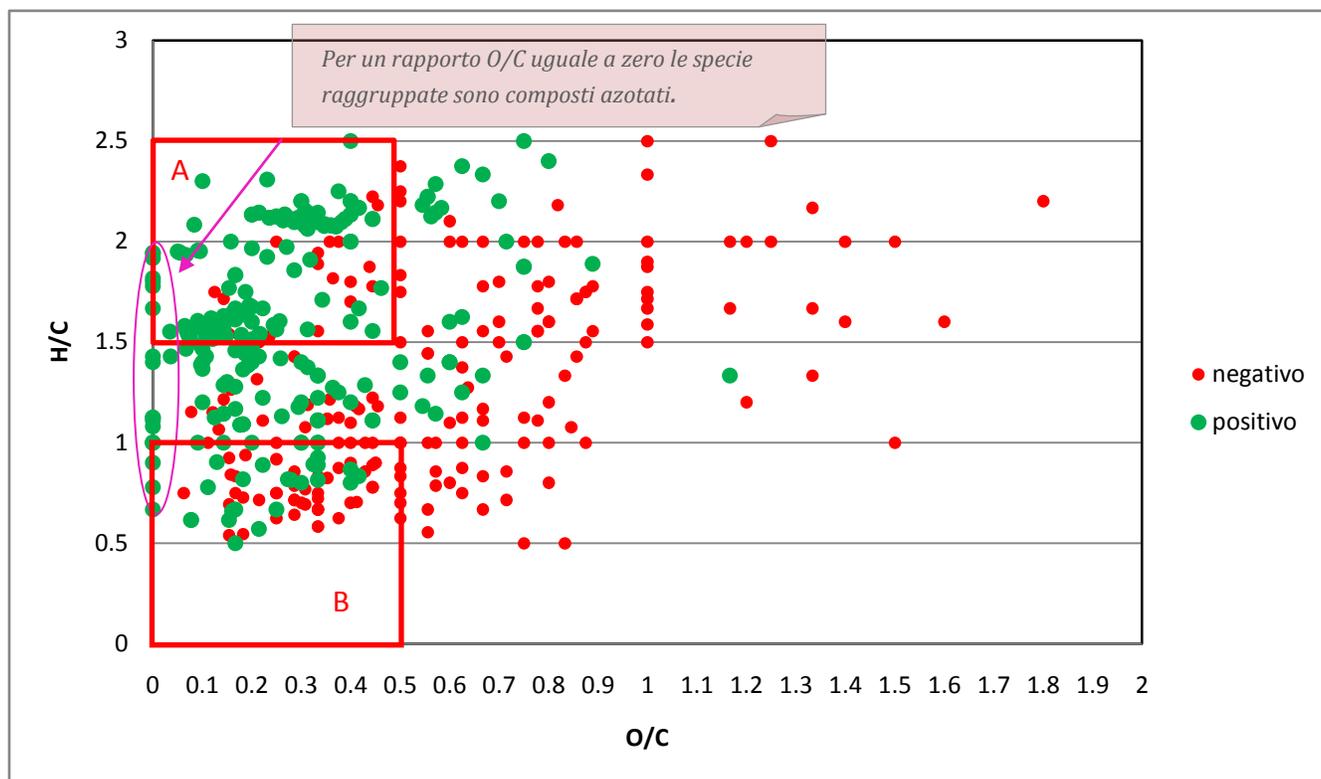


Figura 53: plot con tutti i dati ottenuti. In verde sono rappresentati gli analiti ottenuti in positivo mentre in rosso quelli ottenuti in negativo.

Attraverso l'equazione 10 è possibile indicare il tipo di reazione chimica per cui differiscono gli analiti e le caratteristiche della linea stessa (tabella 7).

$$\frac{H}{C} = -a * \left(\frac{O}{C}\right) + b \quad (10)$$

Dove a e b sono rispettivamente la pendenza e l'intercetta della retta considerata.

Reazione chimica	Caratteristiche della linea
Metilazione-demetilazione	b=2
Idrogenazione-deidrogenazione	Linee verticali
Idratazione-deidratazione	a=2
Ossidazione-riduzione	b=0
decarbossilazione	a=0; b=2

Tabella 7: caratteristiche delle linee di connessione tra i vari composti e reazioni chimiche associate nel plot di Van Krevelen (Kim et al. 2003).

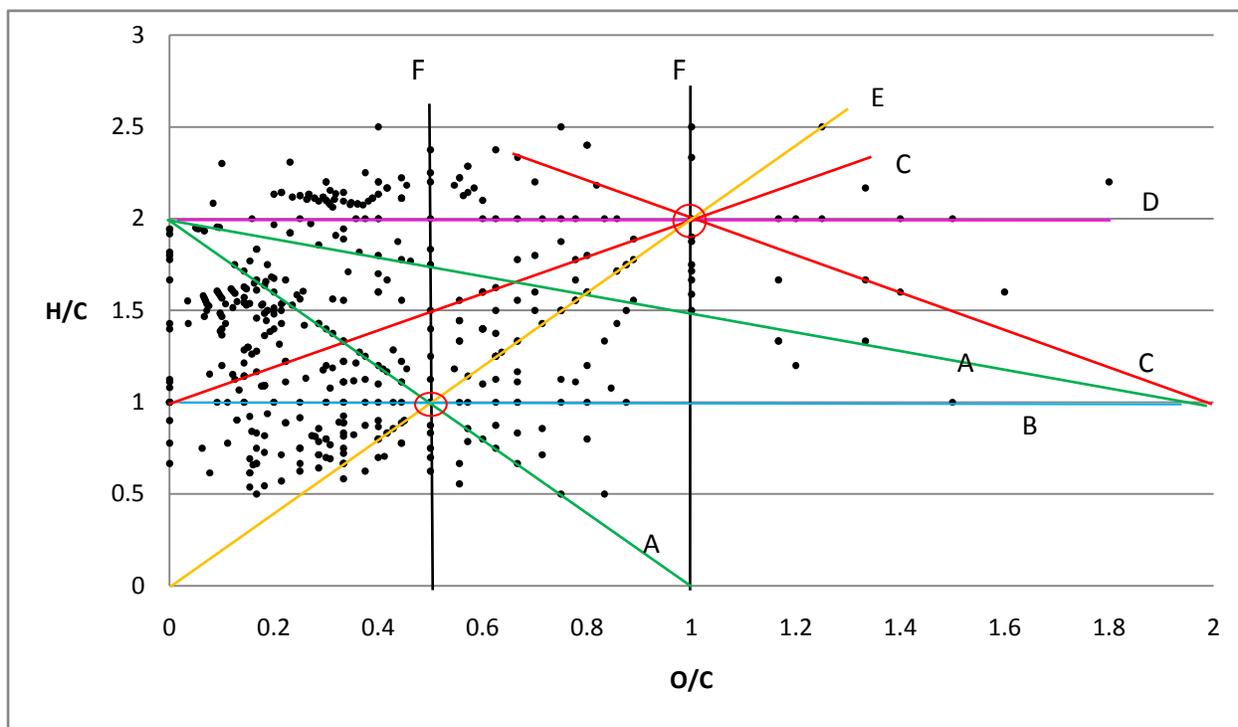


Figura 54: plot con tutti i dati. In rosso è possibile osservare i due punti focali da dove partono le linee che identificano le reazioni chimiche osservabili con il diagramma di Van Krevelen.

In figura 54 sono evidenziate delle linee di tendenza che descrivono i fenomeni di trasformazione chimica e che permettono di caratterizzare e differenziare gli analiti presenti; in rosso inoltre sono cerchiati i punti centrali da dove partono le linee.

La linea B in azzurro indica reazioni di ossidazione o riduzione, muovendosi verso rapporti O/C maggiori si avranno reazioni di ossidazione mentre muovendosi verso rapporti minori si avranno riduzioni (Kim et al. 2003).

Le linee A (linee verdi) indicano reazioni di metilazione, demetilazione o allungamento di catena alchilica (Kim et al. 2003).

Le linee F (linee nere) indicano reazioni di idrogenazione o deidrogenazione delle molecole; più il valore H/C è alto più la quantità di atomi di idrogeno è alta e in tal caso avremmo la presenza di reazioni di idrogenazione (Kim et al. 2003).

Le linee C (rosse) individuano reazioni dove si ha l'aggiunta o la perdita di unità CH₂O (Mazzoleni et al. 2010).

La linea orizzontale D (viola) che interseca il valore $H/C=2$ indica reazioni di decarbossilazione, mentre la linea E (gialla) reazioni di idratazione o disidratazione (Kim et al. 2003).

Dalla figura 54 si può vedere come la maggior parte dei composti sia racchiusa in un intervallo tra 0,1 e 1 per il parametro O/C e 0,5 e 2 per il parametro H/C . Questo indica in generale una significativa ossidazione dei composti (Mazzoleni et al. 2010), con una maggiore ossidazione degli analiti trovati in modalità negativa che presentano valori O/C più elevati.

I dati ottenuti sono stati suddivisi considerando gli eteroatomi presenti (figura 55).

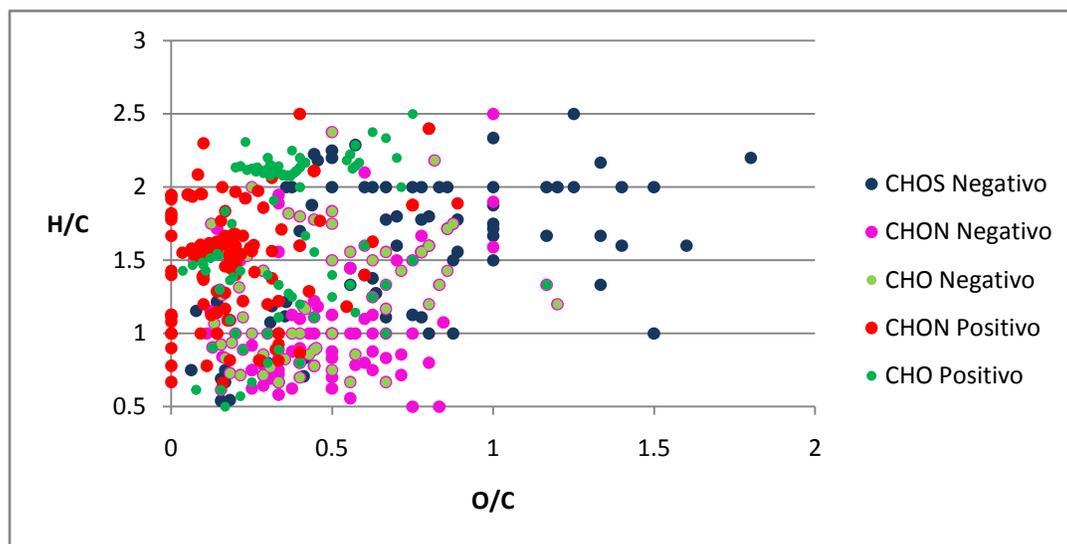


Figura 55: Van Krevelen confronto tra specie suddivise per eteroatomi.

Le specie C, H, O rilevate in positivo si osservano prevalentemente per $H/C \geq 1$ (idrogenazione/deidrogenazione), in negativo sono disposte lungo la linea E indicando reazioni di idratazione/disidratazione. In modalità positiva le specie CHON sono caratterizzate per la maggior parte da valori $O/C \leq 0.5$, in negativo da specie con $O/C \geq 0.5$ indicando un maggior grado di ossidazione. Le specie solforate invece (CHOS) sono presenti prevalentemente ad alti valori di O/C e H/C .

Una considerazione aggiuntiva può essere effettuata osservando la figura 56 ottenuta da studi precedenti di Van Krevelen e Visser (Krevelen 1950) (Visser 1983) dove è illustrata la collocazione delle classi più importanti di composti biologici come lipidi, derivati da cellulosa, composti derivanti da lignina, proteine e idrocarburi condensati nello spazio bidimensionale H/C vs O/C .

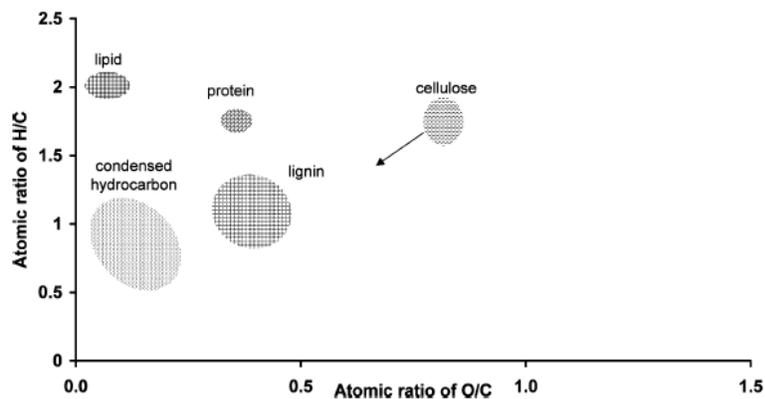


Figura56: Regioni delle composizioni elementari di alcuni importanti componenti biomolecolari sul diagramma Van Krevelen, riprodotti da studi precedenti (Van Krevelen 1950) (Kim et al. 2003) (Visser 1983).

Comparando i dati da noi ottenuti con quelli di letteratura (figura 57) è possibile osservare nei campioni analizzati la presenza di analiti appartenenti alle classi di composti derivanti dalla lignina, dalla cellulosa e dagli idrocarburi condensati; per quanto riguarda lipidi e proteine non è presente una rilevante quantità di analiti che ricadono in queste aree.

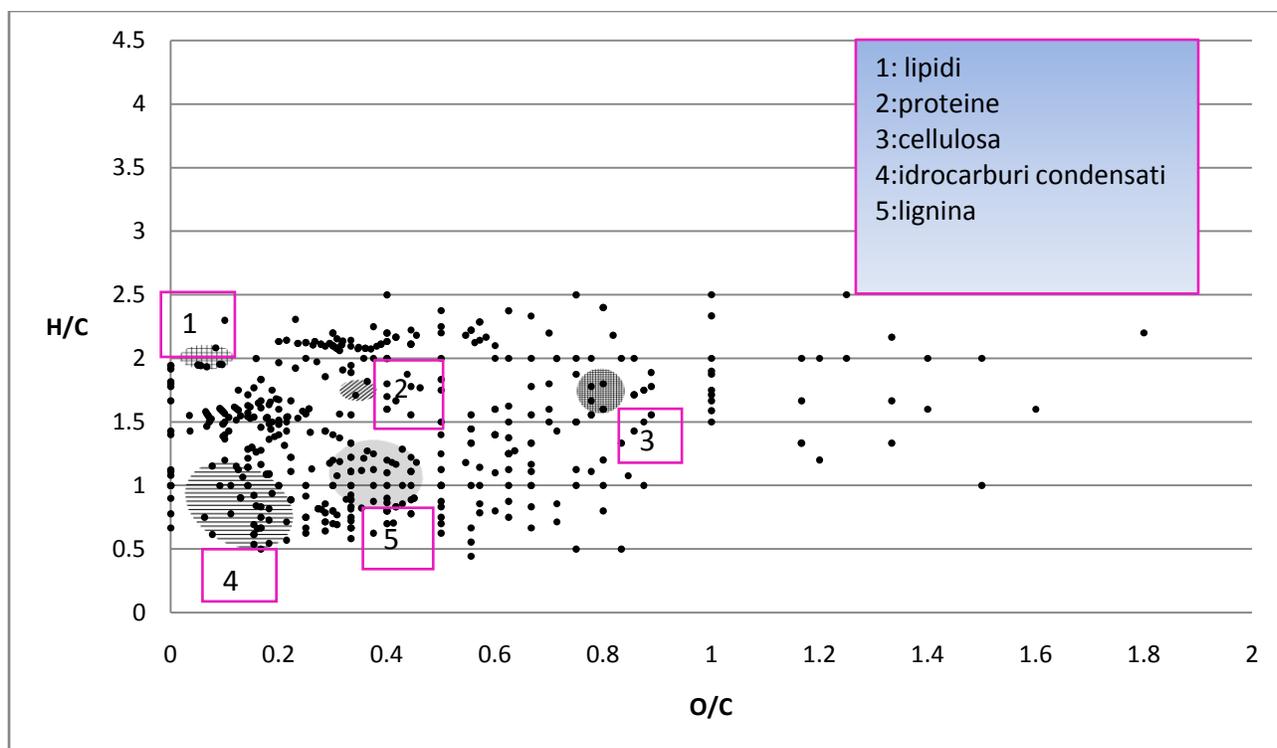


Figura57: confronto tra i dati ottenuti e le zone di interesse biomolecolare ottenute da Van Krevelen.

I risultati migliori sono stati ottenuti per il gruppo della lignina in quanto in esso ricadevano molti composti identificati derivanti o legati ad essa, quali ad esempio siringaldeide, l'acido caffeico, il metil 4-nitrofenolo, l'acetosiringone, il siringolo, il metil sinapato, l'acido anisico, l'alcool sinapilico, l'acetovanillone, la coniferil aldeide, l'acido p-cumarico. Tutti questi composti derivano dalla combustione della lignina presente nella biomassa (Simoneit et al. 1999) (Oros & Simoneit 2001a) (Boerjan et al. 2003) e quindi dal legname.

Un'osservazione interessante riguarda l'assenza fra gli ioni osservati del levoglucosan che non è stato rilevato né in positivo, né in negativo né sotto forma di addotto con il Na. Questo si può spiegare in quanto l'eluizione di questo analita avviene in testa, poiché è scarsamente ritenuto dalle colonne in fase inversa, quando la fase mobile è essenzialmente acqua acidificata. Queste condizioni molto probabilmente hanno inibito la ionizzazione negativa e comunque non hanno favorito nemmeno la ionizzazione in polarità positiva.

10.3 DBE (DOUBLE BOND EQUIVALENT)

Un altro parametro valutato nell'analisi dei dati è stato il Double Bond Equivalent (DBE) calcolato mediante l'equazione 11.

$$DBE = (c + 1) - \left(\frac{h}{2} - \frac{n}{2} - \frac{x}{2}\right) \quad (11)$$

dove c è il numero di atomi di carbonio presenti nella molecola, n il numero di atomi di azoto e x il numero di atomi di alogeni.

Il parametro DBE indica il numero di anelli e/o doppi legami presenti all'interno della molecola in esame (Smith et al. 2009). Una diminuzione del numero di atomi di idrogeno all'interno della molecola porta ad un aumento dell'insaturazione e conseguentemente a valori maggiori di DBE. E' comunque da sottolineare che tale parametro dipende solo dal numero di atomi di C, H e N mentre è indipendente dal numero di atomi di O e S presenti (Koch & Dittmar 2006).

Sono state tenute solo le formule con valori di DBE intero e positivo come indicato in letteratura (Kourtchev et al. 2013) (Kind & Fiehn 2007). Sono stati effettuati vari diagrammi plottando i valori di DBE contro il numero di atomi di carbonio ottenendo un grafico per le specie rilevate in polarità positiva (figura 58), uno per quelle in negativo (figura 59) e uno per il confronto delle specie in positivo contro quelle in negativo (figura 60).

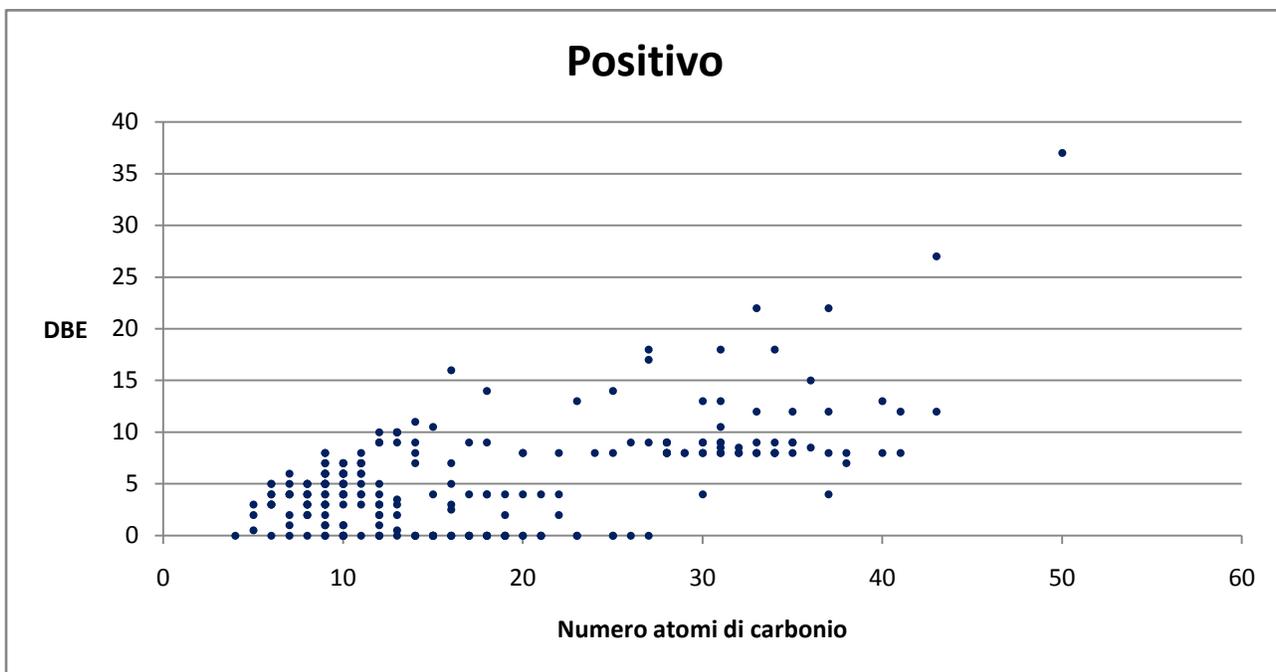


Figura58: diagramma per la modalità positiva, DBE contro il numero di atomi di carbonio presenti nelle molecole.

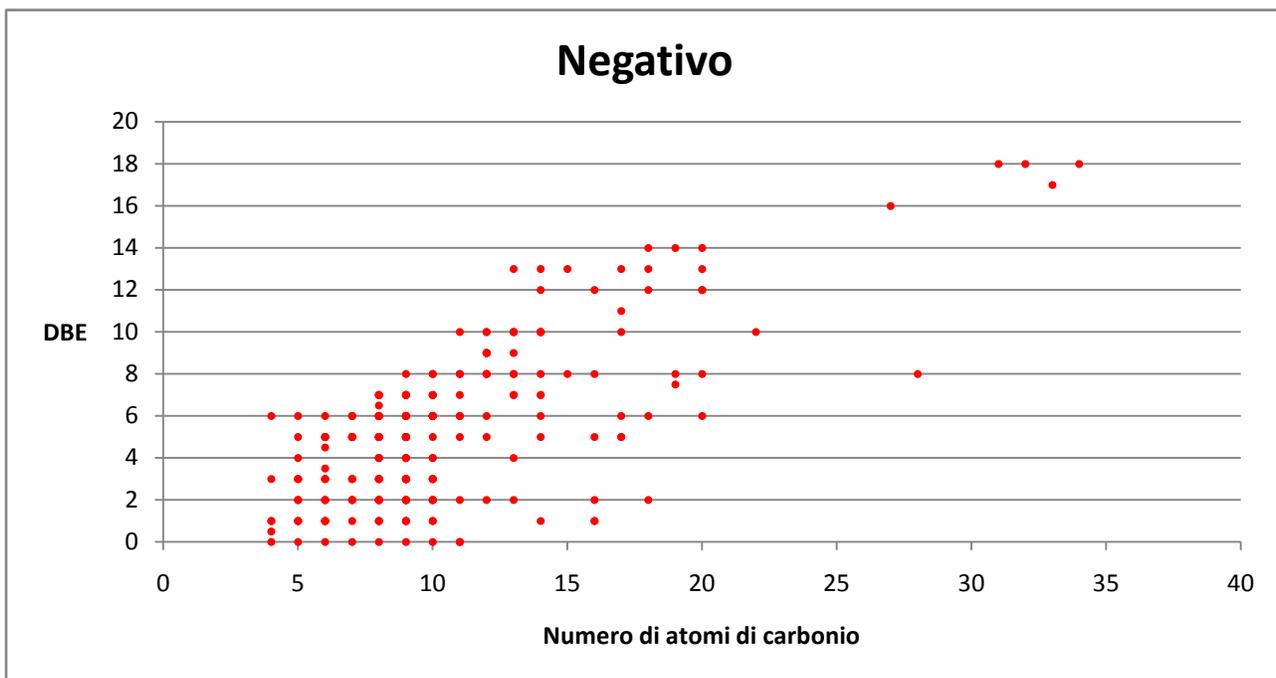


Figura 59: diagramma per la modalità negativa, DBE contro il numero di atomi di carbonio presenti nelle molecole.

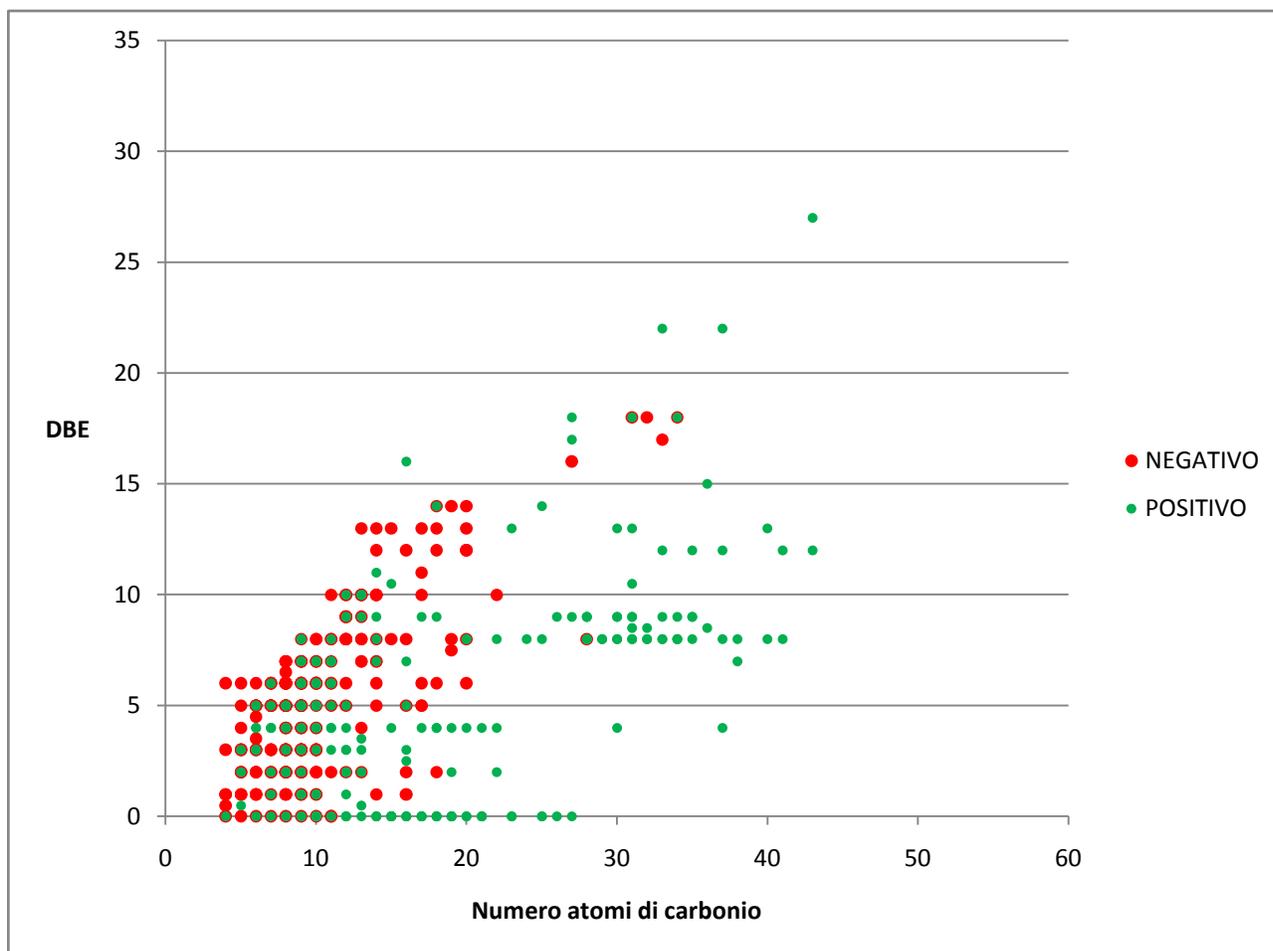


Figura 60: confronto tra positivo e negativo del DBE contro il numero di atomi di carbonio.

Osservando le figure del DBE contro il numero di atomi di carbonio è possibile osservare come un aumento del numero di atomi di carbonio porti ad un incremento del valore di Double Bond Equivalent in accordo con la possibilità di avere un maggior numero di anelli e/o doppi e tripli legami all'interno di una molecola che presenta un maggior numero di atomi da carbonio.

Un altro aspetto da tenere in considerazione è che con l'aumentare del valore di DBE aumenta il grado di insaturazione delle molecole, quindi dai grafici 58 e 59 si può osservare come le molecole a maggior numero di atomi di carbonio abbiano la tendenza ad essere maggiormente insature mentre molecole che presentano un numero di atomi di carbonio più basso presentino un carattere più saturo.

Dalla figura 60 è inoltre possibile vedere come le molecole trovate per la modalità positiva presentino un numero di atomi di carbonio superiore rispetto a quelle trovate in modalità

negativa. E' comunque da sottolineare che pur avendo un numero di atomi di carbonio superiore i valori di DBE risultano simili, con eccezione di alcune molecole in positivo, e di conseguenza anche l'insaturazione risulta essere confrontabile.

10.4 OSc (STATO DI OSSIDAZIONE MEDIO DEL CARBONIO)

Lo stato di ossidazione del carbonio è definito come la carica che presenta un atomo di carbonio quando cede elettroni ad atomi più elettronegativi o ne acquista da atomi elettropositivi nella formazione di un legame chimico. Gli stati di ossidazione dei singoli atomi di carbonio in una molecola o in una miscela, possono cambiare al momento dell'ossidazione ma, lo stato di ossidazione medio (OSc) deve aumentare. OSc diventa così un parametro importante per valutare il grado di ossidazione di specie organiche in atmosfera e può essere utile per la descrizione di composti presenti in matrici complesse come l'aerosol (Kroll et al. 2011).

In atmosfera un incremento dello stato di ossidazione dipende dalla creazione di legami tra il carbonio e l'ossigeno o tra carbonio e altri elementi elettronegativi e/o la rottura di legami carbonio-idrogeno o carbonio con altri elementi elettropositivi (Kroll et al. 2011).

Possiamo osservare che lo stato di ossidazione del carbonio è legato al numero di atomi di carbonio della molecola. In figura 61 è possibile osservare le possibili combinazioni di OSc con il numero di atomi di carbonio presenti in molecole organiche stabili.

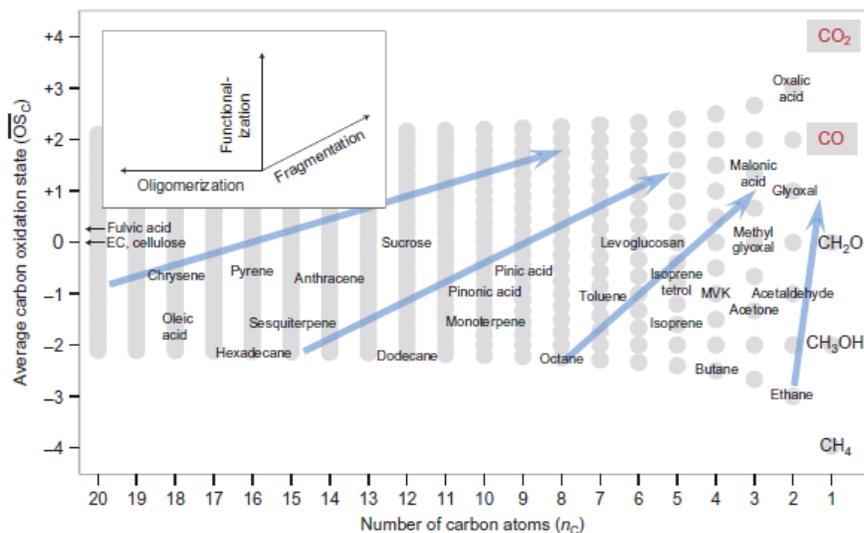


Figura 61: possibili combinazioni di stati di ossidazione e numero di atomi di carbonio in molecole organiche stabili (Kroll et al. 2011).

Dalla figura 61 è possibile osservare una grande quantità di composti, quelli che presentano valori OSc minori di zero risulteranno ridotti, mentre quelli con valori superiori a zero saranno ossidati. Sono inoltre visibili dei vettori (figura 61 grafico piccolo) che corrispondono a delle classi di reazione atmosferiche in cui prendono parte i composti organici. Spostandosi verticalmente si troveranno reazioni di funzionalizzazione, spostandosi orizzontalmente si avranno reazioni di oligomerizzazione, mentre in diagonale si trovano reazioni di frammentazione (Kroll et al. 2011).

Il parametro OSc è legato ai rapporti O/C e H/C utilizzati nei diagrammi di Van Krevelen. Il parametro OSc viene calcolato mediante l'equazione 12.

$$\overline{OSc} \sim 2 * \frac{O}{C} - \frac{H}{C} \quad (12)$$

Questo tipo di equazione è utilizzata per composti contenuti solo atomi di C,H e O. La presenza di eteroatomi introduce delle deviazioni dall'OSc calcolato solo per C, H e O. Per semplicità atomi come N,S e P possono essere esclusi nella valutazione di OSc considerando che il contributo di questi atomi su OSc è generalmente piccolo e si hanno minime variazioni nello stato di ossidazione (Kroll et al. 2011).

In figura 62, 63 e 164 sono riportati i grafici di OSc contro il numero di atomi di carbonio per le specie osservate in polarità positiva, negativa e per i confronto tra le due.

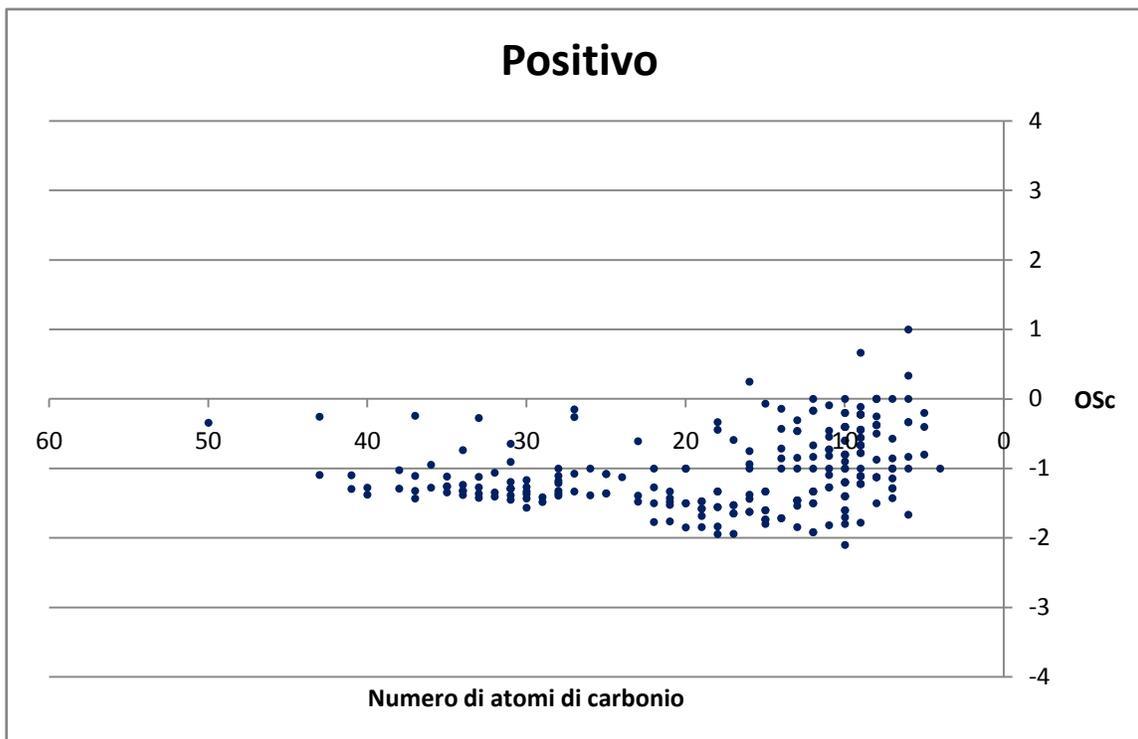


Figura62: OSc contro numero atomi di carbonio per la polarità positiva.

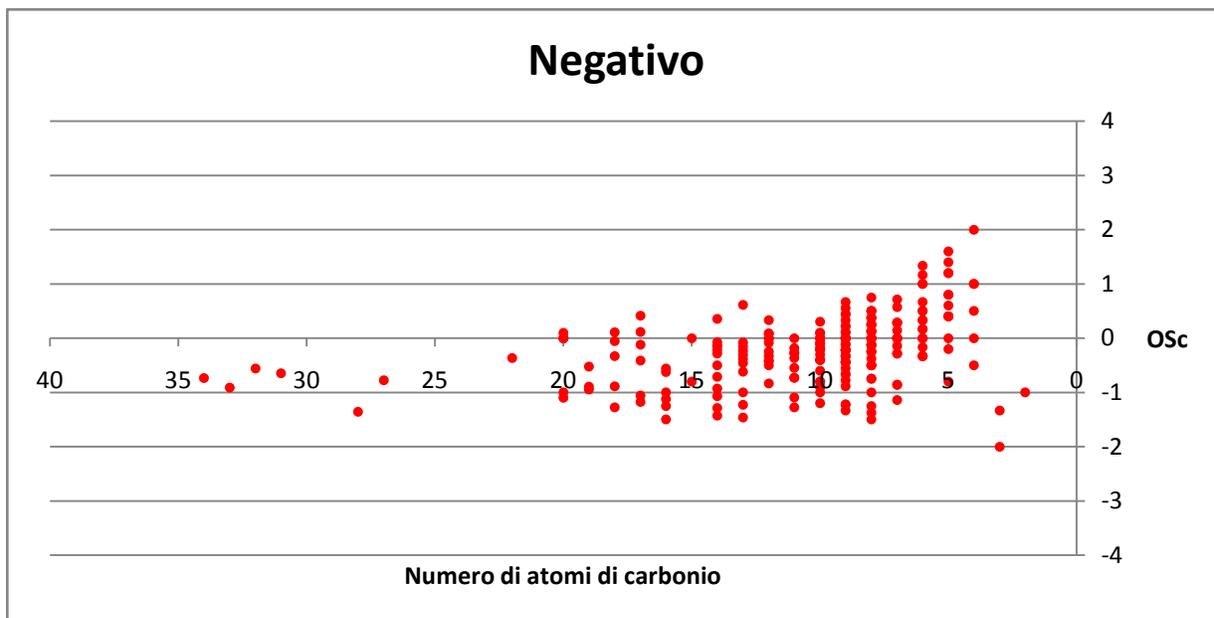


Figura 63: OSc contro numero atomi di carbonio per la polarità negativa.

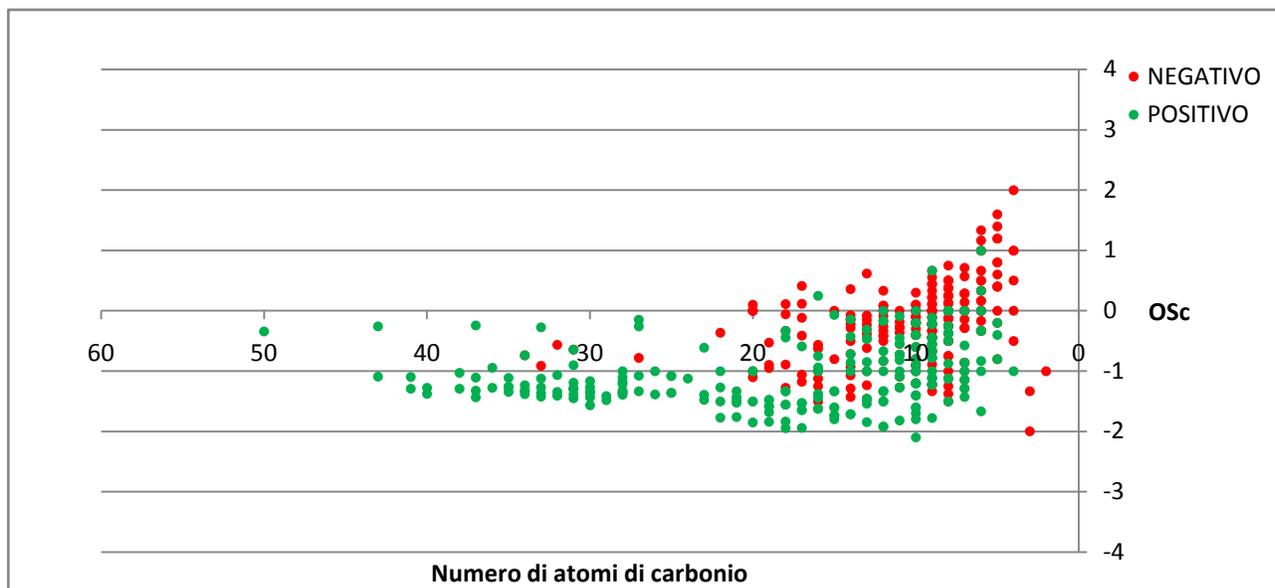


Figura 64: Osc contro numero atomi di carbonio per il confronto positivo-negativo.

Osservando la distribuzione delle specie in figura 64 è possibile individuare una maggiore ossidazione nei composti ottenuti in modalità negativa, mentre quelli ottenuti in positivo risultano essere maggiormente ridotti. Si può notare, inoltre, che le molecole ottenute in negativo presentano traiettorie di distribuzione verticali e diagonali che in accordo con quanto riportato in figura 61 indica una maggiore funzionalizzazione delle molecole e una maggior frammentazione.

Per quanto riguarda le molecole ottenute in positivo queste si distribuiscono soprattutto orizzontalmente, indicando una maggiore oligomerizzazione degli analiti stessi.

E' da notare inoltre che quasi la totalità delle molecole presenta valori di Osc compresi tra +1 e -2 in accordo con il range di valori di ossidazione per i composti organici presenti nell'aerosol atmosferico (Kroll et al. 2011).

10.5 OM/OC

Per tutti gli i giorni in cui è stato effettuato il campionamento si è stimata la quantità di carbonio organico (OC) rispetto alla massa totale organica (OM).

L'utilizzo della spettrometria ad alta risoluzione permette la caratterizzazione del rapporto OM/OC valutando conseguentemente la massa di carbonio organico presente nell'aerosol in rapporto al totale della massa organica, cosa complicata utilizzando tecniche differenti (Simon et al. 2011) (Aiken et al. 2008).

Il rapporto OM/OC viene calcolato attraverso l'equazione 13:

$$\frac{OM}{OC} = \frac{1 + \frac{16}{12} \sum_i x_i o_i}{\sum_i x_i c_i} + \frac{\frac{1}{12} \sum_i x_i h_i}{\sum_i x_i c_i} \quad (13)$$

Dove x_i rappresenta l'intensità di segnale per la i -esima molecola mentre c, o e h rispettivamente il numero di atomi di carbonio, ossigeno e idrogeno della molecola i -esima

Attraverso l'equazione 13 si è potuto ottenere una stima della quantità di carbonio organico rispetto alla massa organica totale riportata in tabella 8.

Giorno di campionamento	Rapporto OM/OC per molecole in Positivo	Rapporto OM/OC per molecole in Negativo
1 Settembre	1.31	2.17
7 Settembre	1.19	2.74
13 Settembre	1.25	2.67
19 Settembre	1.33	3.34
25 Settembre	1.48	3.11
1 Ottobre	1.17	3.43
7 Ottobre	1.76	1.76
13 Ottobre	1.09	1.49
19 Ottobre	1.31	1.99
25 Ottobre	1.12	1.96
31 Ottobre	1.28	3.87
6 Novembre	1.31	2.04
12 Novembre	1.20	1.54
24 Novembre	1.25	3.49
30 Novembre	1.52	2.34
1 Dicembre giorno	1.19	2.28
1 Dicembre notte	1.88	4.99

2 Dicembre giorno	1.38	2.54
2 Dicembre notte	1.57	2.21
3 Dicembre giorno	1.34	1.79
3 Dicembre notte	1.42	2.19
4 Dicembre notte	1.80	2.93
5 Dicembre giorno	1.64	4.19
5 Dicembre notte	1.68	5.13
6 Dicembre giorno	1.45	2.51
8 Dicembre notte	1.38	2.49
9 Dicembre giorno	1.69	3.68
10 Dicembre giorno	1.63	3.16
10 Dicembre notte	2.35	3.63
11 Dicembre giorno	1.49	3.46
11 Dicembre notte	2.12	3.20
12 Dicembre giorno	2.42	4.96
12 Dicembre notte	2.95	7.22
13 Dicembre giorno	2.63	4.81
Media dei valori ± deviazione standard	1.6 ± 0.4	3 ± 1.2

Tabella 8: in tabella è possibile osservare i rapporti OC/OM calcolati per tutto il periodo di campionamento sia per il positivo che per il negativo.

Osservando i valori ottenuti si può notare che la maggioranza dei rapporti OM/OC rientra nei parametri riportati in letteratura per l'aerosol urbano (OM/OC 1.6 ± 0.2) e per quello non urbano (OM/OC 2.1 ± 0.2) (Simon et al. 2011).

Valori superiori sono riportati anche da Aiken et al (2008) su campioni ambientali (Aiken et al. 2008). Valori di circa 3.8, possono essere associati a composti alifatici dicarbonilici (Turpin & Lim 2001); inoltre valori ancora superiori possono essere legati alla presenza di una grande quantità di composti solforati (Simon et al. 2011) che comunque sono stati effettivamente osservati nei campioni di Belgrado in polarità negativa e questa può essere una valida spiegazione ai valori più elevati ottenuti per le specie rilevate in polarità negativa rispetto alla positiva.

10.6 CONFRONTI

Come già indicato il periodo di campionamento va da settembre a dicembre ed è rappresentativo di circa tre stagioni differenti; ad inizio settembre infatti si è avuto un clima ancora estivo, a ottobre e novembre un clima autunnale, mentre a dicembre è prevalso un clima di tipo invernale. A tal fine si è eseguito un confronto tra campioni dello stesso periodo andando a confrontare i campioni di settembre con ottobre, settembre con dicembre e ottobre con dicembre. Il confronto è stato effettuato utilizzando Sieve⁺ (Two Sample Differential Analysis) in cui vengono attribuiti gruppi diversi a campioni raccolti in periodi diversi oltre ad un gruppo rappresentato dai bianchi di campo. Questo permette contemporaneamente il confronto dei campioni e l'eliminazione delle specie ioniche presenti nel bianco.

All'interno dei parametri di analisi del software Sieve⁺, il Ratio risulta essere particolarmente interessante. Questo è il rapporto tra le intensità di segnale di uno ione presente in una classe di campioni differenti. Nel nostro caso infatti oltre ad una identificazione completa di tutti gli analiti presenti nei campioni da settembre fino a dicembre, sono state fatte delle prove comparando tra di loro i campioni dei vari mesi.

Il parametro Ratio presenta valori compresi tra 0 e 99999,99 che indicano se lo ione in questione è maggiormente presente in un periodo rispetto ad un altro. Considerando ad esempio settembre vs ottobre un Ratio uguale a 0 sta a significare che l'analita è presente solamente in ottobre. Ratio uguale a 99999,99 sta ad indicare la presenza dell'analita solamente in settembre, mentre un Ratio uguale a 1 indica l'appartenenza dell'analita in tutti i campioni con intensità di segnale simile. Tramite questo parametro sono stati valutati tutti gli analiti presenti in tutti i campioni analizzati e si è deciso di prendere in considerazione solamente quelli con $\text{Ratio} < 1$ e $\text{Ratio} > 1$. Questi infatti vanno a differenziare i campioni fornendo informazioni importanti, mentre analiti presenti in tutti i campioni con intensità di segnale simile ($\text{Ratio} \simeq 1$) ci danno al momento scarse informazioni.

Sono stati in seguito confrontati i dati dei diversi periodi utilizzando i diagrammi di Kendrick, di Van Krevelen e calcolando lo stato di ossidazione medio OSc.

10.6.1 SETTEMBRE vs DICEMBRE

Dal confronto dei campioni di settembre contro dicembre è possibile comparare i dati ottenuti sia in positivo che in negativo.

In figura 65 e 66 sono rappresentati i grafici per il numero di atomi di carbonio contro il DBE per la modalità positiva e negativa.

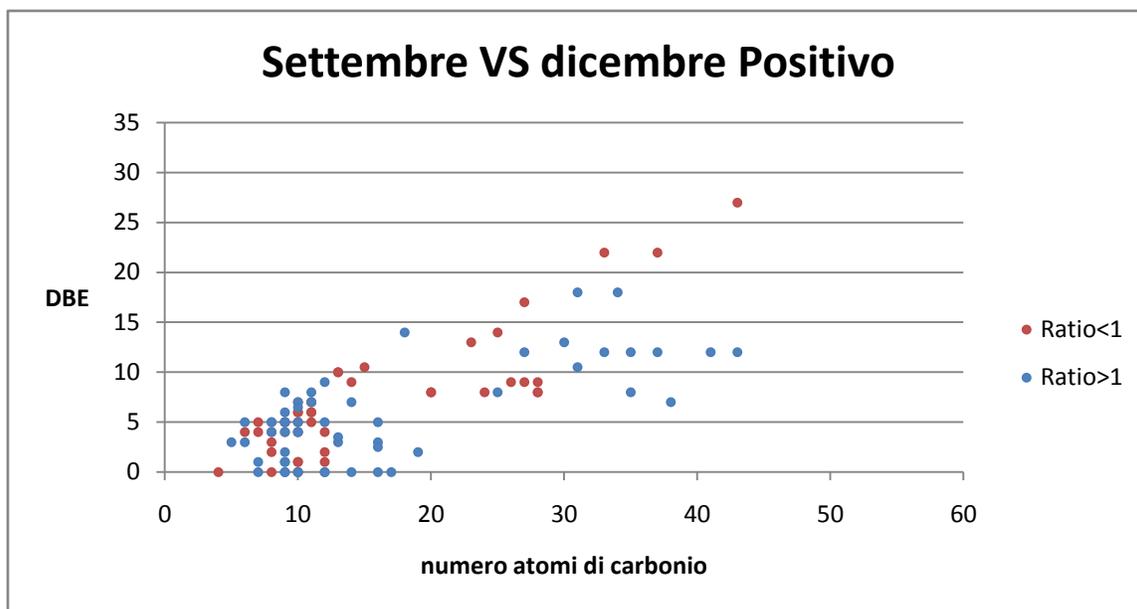


Figura 65: DBE contro numero di atomi di carbonio per il confronto settembre VS dicembre in positivo.

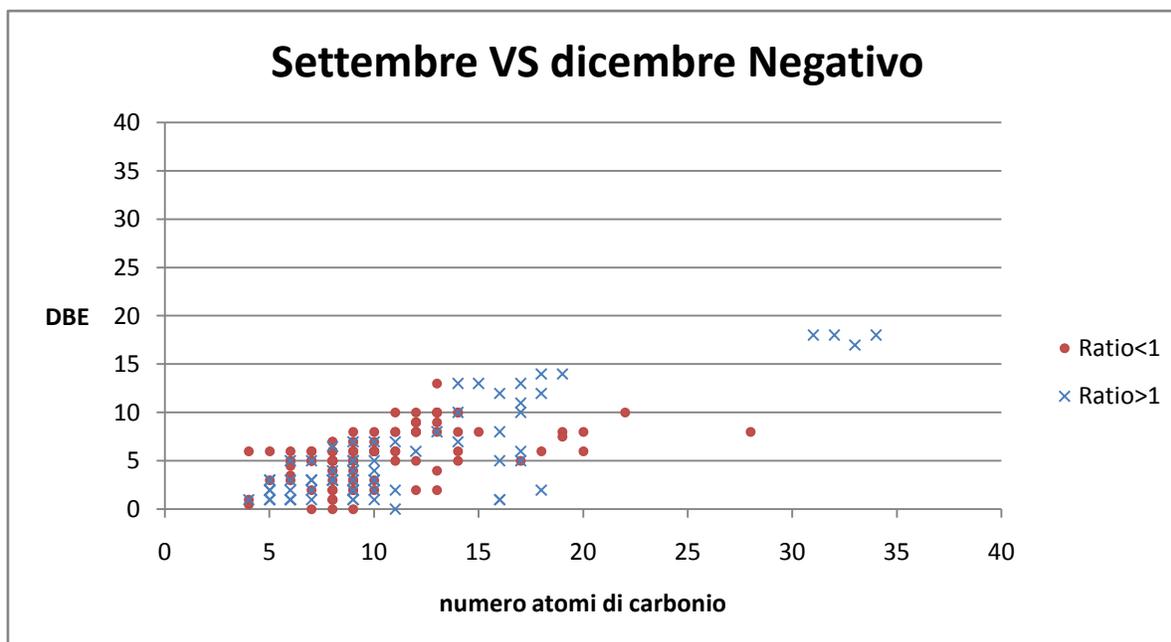


Figura 66: DBE contro numero di atomi di carbonio per settembre VS dicembre in negativo.

In questo caso le molecole che presentano un $\text{Ratio} < 1$ sono presenti maggiormente in dicembre mentre le molecole che presentano un $\text{Ratio} > 1$ sono presenti in settembre. Osservando le figure 65 e 66 gli analiti risultano essere molto distribuiti sia per la modalità positiva che negativa non evidenziando notevoli differenze tra le molecole indipendentemente dal Ratio che presentano. Analogamente osservando le figure 67 e 68 che riportano il valore di OSc contro il numero di atomi di carbonio di molecole aventi diverso Ratio si osserva che sostanziali differenze nel grado di ossidazione.

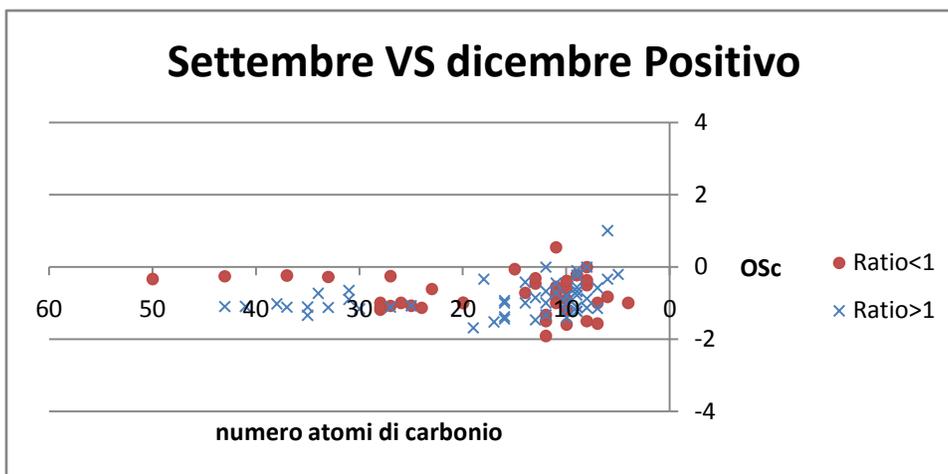


Figura 67: OSc contro numero di atomi di carbonio per settembre VS dicembre in modalità positiva.

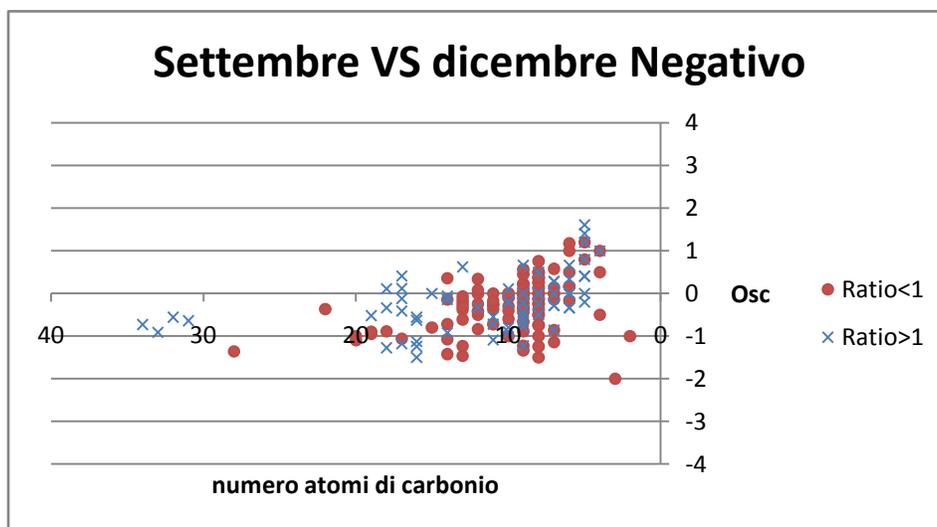


Figura 68: OSc contro numero di atomi di carbonio per settembre VS dicembre in modalità negativa.

Le specie che emergono e che differenziano i campioni sono quelle di origine biogenica a settembre e da combustione di biomassa per riscaldamento domestico a dicembre.

10.6.2 SETTEMBRE vs OTTOBRE

Similmente a quanto discusso per settembre contro dicembre nelle figure 69 e 70 è possibile osservare i grafici del DBE contro il numero di atomi di carbonio per le modalità positiva e negativa mentre in figura 71 e 72 sono riportati i grafici per lo stato di ossidazione del carbonio contro il numero di atomi di carbonio per entrambe le modalità di ionizzazione utilizzate.

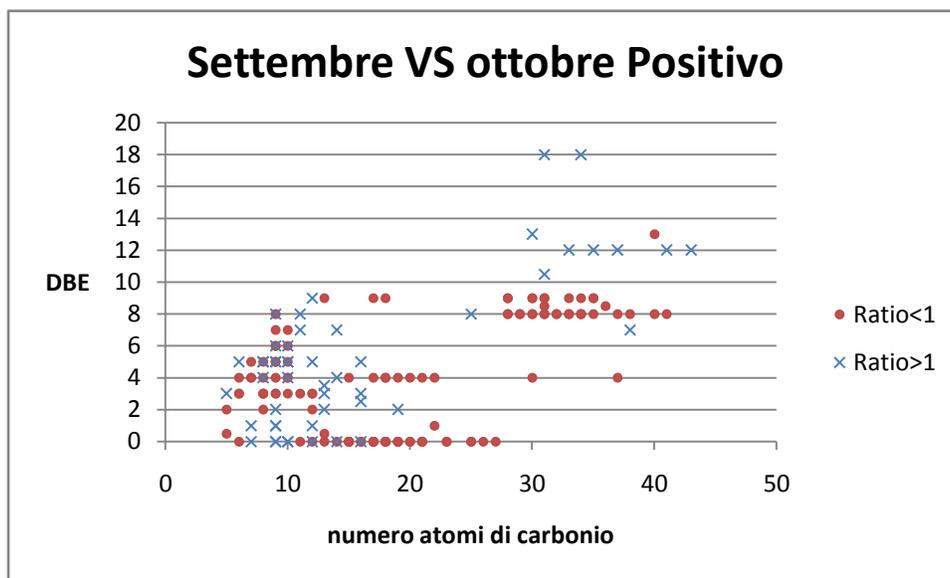


Figura 69: DBE contro numero di atomi di carbonio settembre VS ottobre positivo.

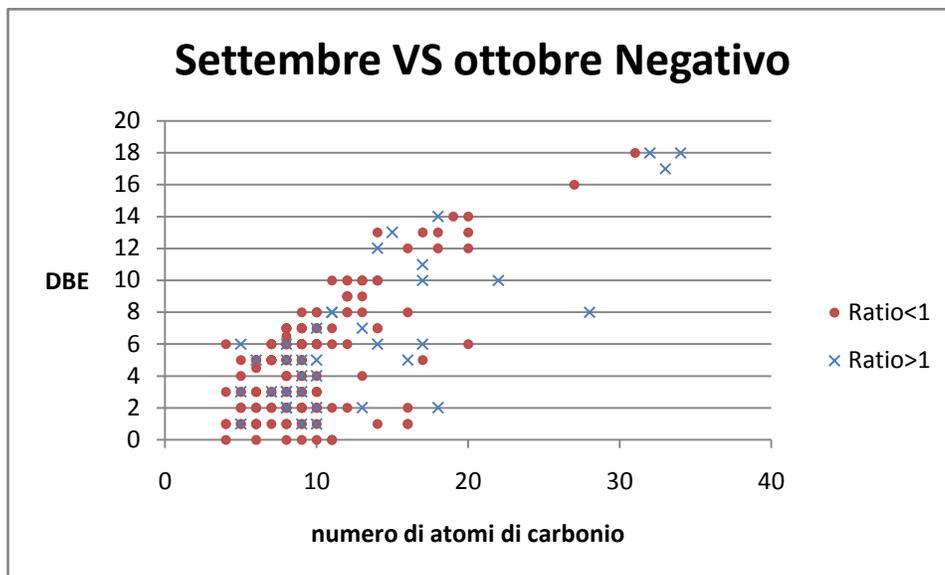


Figura 70: DBE contro numero di atomi di carbonio settembre VS ottobre negativo.

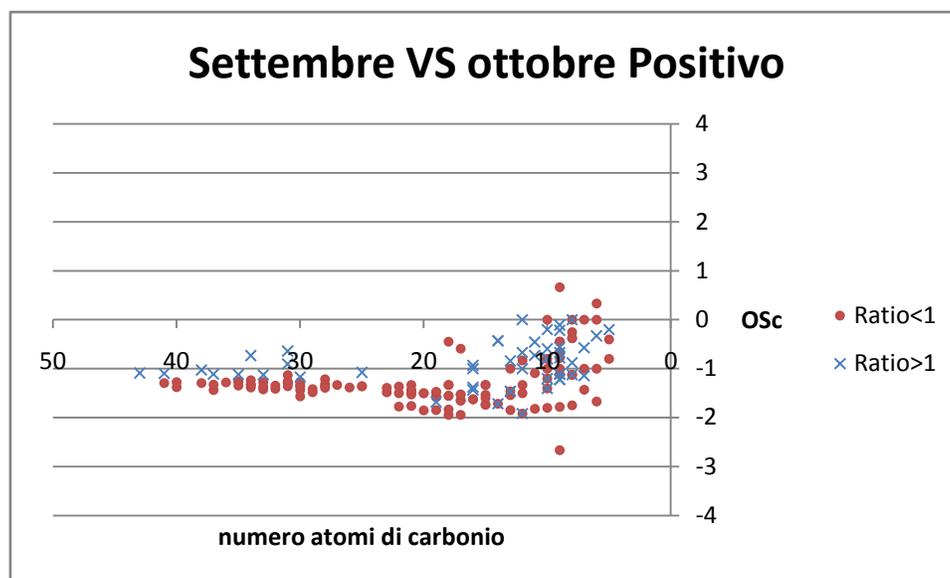


Figura 71: OSc contro numero di atomi di carbonio settembre VS ottobre positivo.

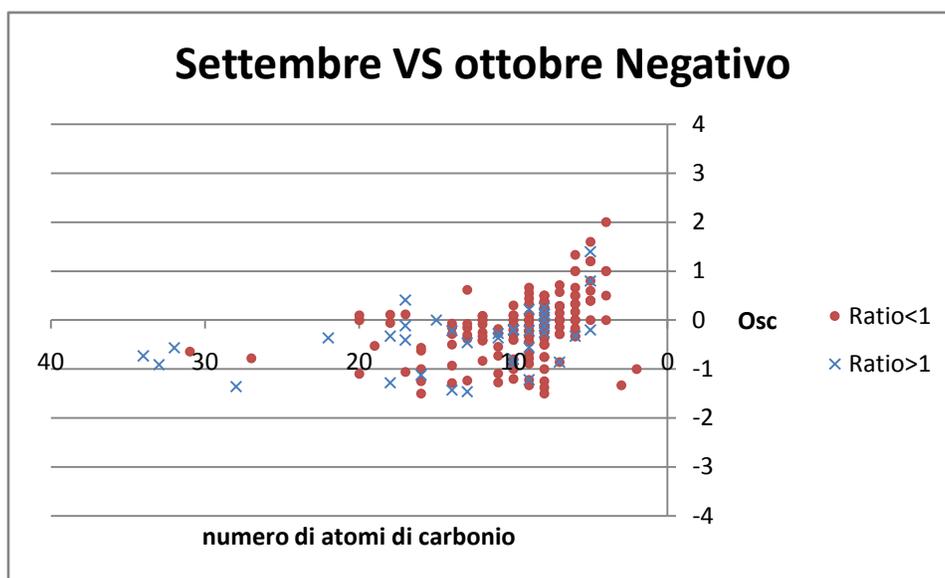


Figura 72: Osc contro numero di atomi di carbonio settembre VS ottobre negativo.

Osservando i dati ottenuti dal confronto di settembre contro ottobre in positivo (figura 69) è possibile vedere come ad ottobre sia presente un maggior numero di specie ad elevato numero di carbonio rispetto a settembre. In figura 71 si osserva che le molecole rilevate in positivo ad ottobre sono maggiormente ridotte rispetto a quelle presenti a settembre suggerendo una differente sorgente. Questo concorda con l'osservazione del diagramma di Van Krevelen in figura 55 dove si osservano specie azotate più ridotte rilevate in modalità positiva.

In figura 70 e 72 vengono evidenziati il valore DBE e Osc per la modalità negativa di settembre contro ottobre, in entrambe si può osservare come le molecole siano distribuite e presentino valori simili sia di ossidazione che di DBE non differenziando le molecole in modo evidente.

10.6.3 OTTOBRE vs DICEMBRE

In figura 73 è riportato il DBE contro il numero di atomi di carbonio per il confronto dicembre contro ottobre in modalità positiva. In figura 74 è osservabile l'Osc contro il numero di atomi di carbonio per dicembre contro ottobre in positivo. Analogamente in figura 75 e 76 vengono riportati i grafici del DBE e di Osc per la modalità negativa sempre riguardanti il confronto tra dicembre ed ottobre.

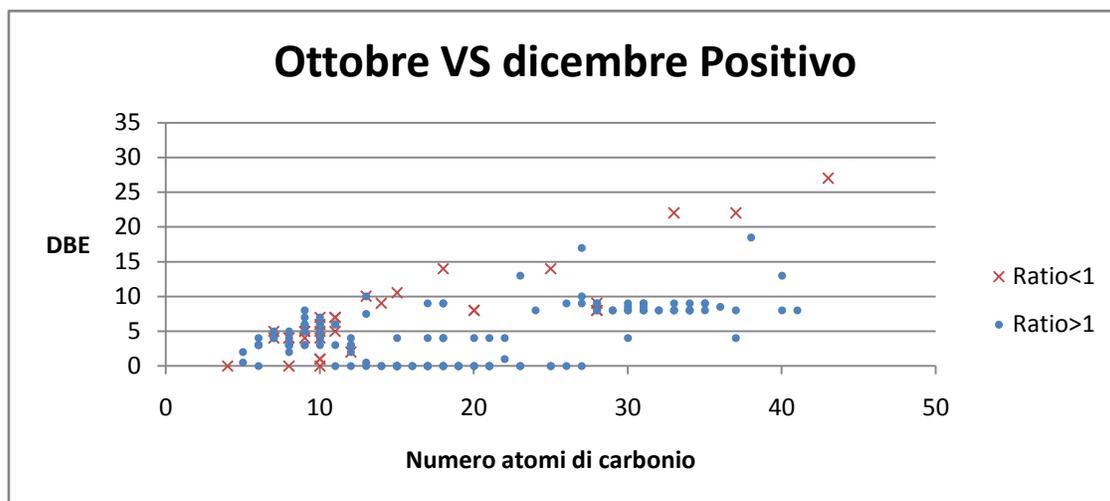


Figura 73: DBE contro numero di atomi di carbonio per ottobre VS dicembre in modalità positiva.

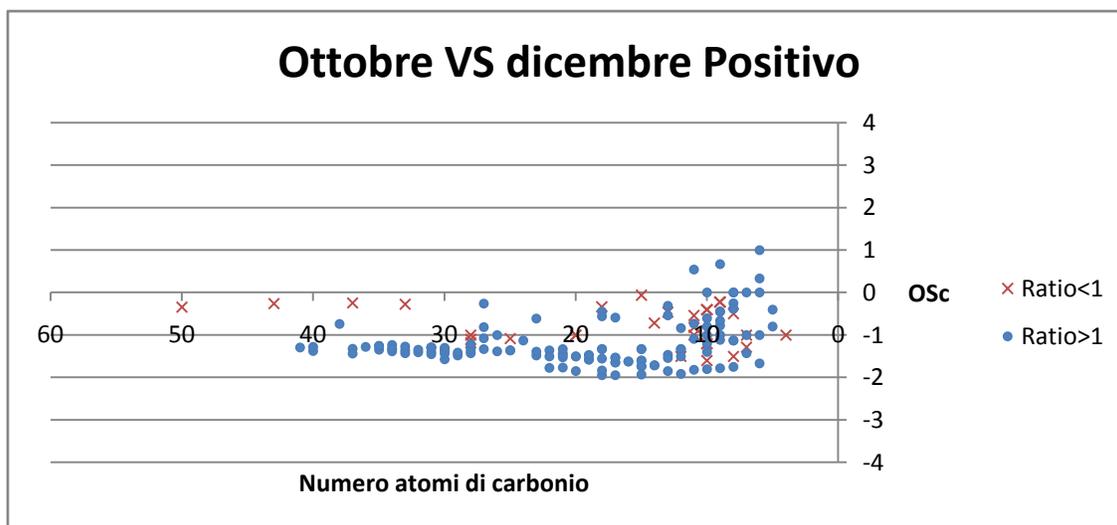


Figura 74: Osc contro numero di atomi di carbonio per ottobre VS dicembre in modalità positiva.

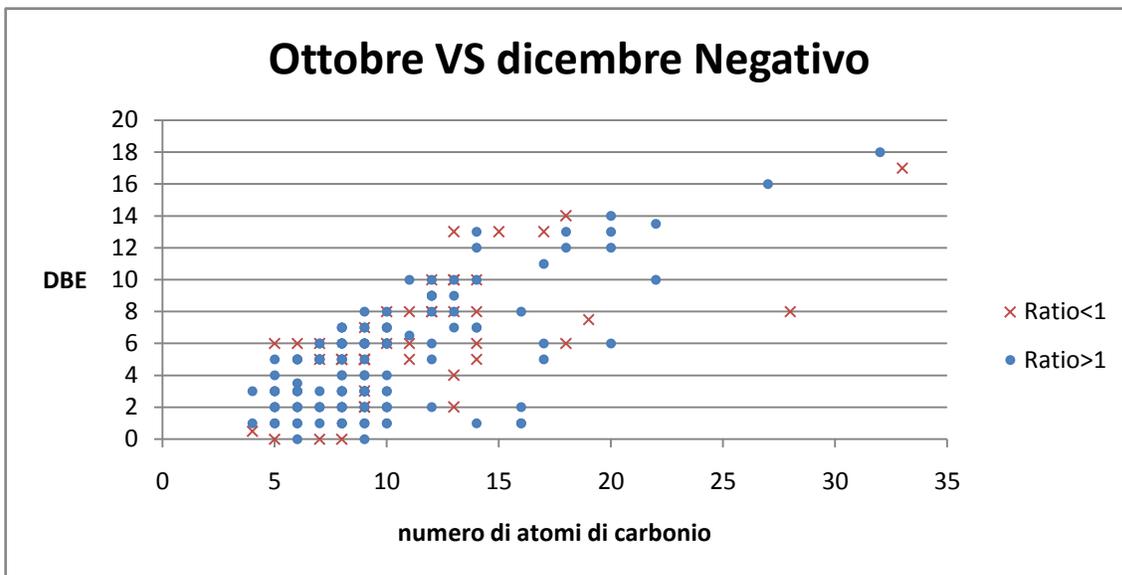


Figura 74: DBE contro numero di atomi di carbonio per ottobre VS dicembre in modalità negativa.

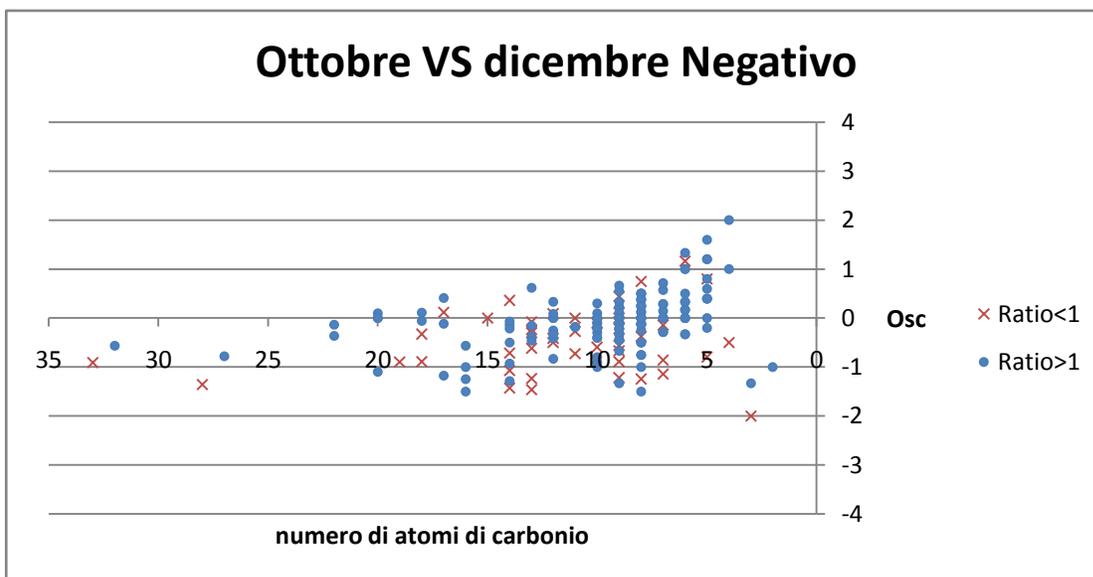


Figura 75: Osc contro numero di atomi di carbonio per ottobre VS dicembre in modalità negativa.

Per quanto concerne il confronto tra ottobre e dicembre i composti presenti con un Ratio >1 sono presenti maggiormente nel mese di ottobre, mentre quelli ottenuti per un Ratio <1 sono maggiormente presenti nel mese di dicembre.

Per quanto riguarda la modalità di ionizzazione positiva è possibile osservare come ad ottobre sia presente un numero maggiore di specie rispetto a dicembre e che queste presentano un numero di atomi di carbonio superiore.

Per quanto riguarda lo stato di ossidazione OSc in positivo le specie presenti in ottobre (Ratio >1) risultano essere più ridotte rispetto a quelle presenti in dicembre.

In negativo, come visto precedentemente per il confronto settembre vs ottobre, le specie non si differenziano in modo significativo, infatti risultano avere una distribuzione analoga sia per quanto riguarda il numero di carbonio, sia per quanto riguarda parametri DBE e OSc.

In generale da tutti e tre i confronti effettuati settembre contro dicembre si assomigliano molto con un numero di molecole simili che presentano uno stato di ossidazione simile e un numero di anelli e/o doppi legami simili. Per quanto riguarda i confronti settembre contro ottobre e dicembre contro ottobre, questi evidenziano che il numero di analiti è superiore nel mese di ottobre e le molecole in tale periodo risultano essere più ridotte per la modalità positiva con un OSc che si attesta generalmente su valori compresi tra -1 e -2.

Questo significa che ciò che va a differenziare settembre da dicembre sono molecole biogeniche presenti nel mese di settembre (periodo ancora estivo) e composti derivanti da biomass burning nel mese di dicembre.

I campioni raccolti nel mese di ottobre invece si differenziano da quelli campionati negli altri mesi, probabilmente a causa di vari sorgenti tipiche di questo periodo come processi di degradazione legati alla caduta delle foglie, eventuale marcescenza nel deposito di materiale biologico sul terreno, un clima che diventa più piovoso e fenomeni di combustione nei campi impiegati per eliminare tutto il materiale di scarto che viene a crearsi dalle operazioni agricole come la potatura e la raccolta o lavorazione dei prodotti della terra.

Un appunto è da fare sul mese di novembre che non è stato riportato nei grafici ma è stato elaborato come gli altri mesi. La sua osservazione ha portato infatti a definirlo come un mese di transizione, esso presenta infatti caratteristiche sia del mese di ottobre che del mese di

dicembre e in particolar modo la prima metà del mese è in accordo con il periodo precedente mentre da circa il 15 in poi le caratteristiche cambiano allineandosi con dicembre. Inoltre presentando queste caratteristiche presentava anche gli stessi composti e un confronto con gli altri mesi non ha portato a significative informazioni.

Un altro studio effettuato è stato quello di comparazione tra i campioni di dicembre. In questo periodo infatti il campionamento è avvenuto ogni 12 ore e si è voluto andare ad osservare eventuali differenze tra i campioni giornalieri e quelli notturni. L'osservazione dei dati non ha portato a differenze tra giorno e notte, infatti gli analiti osservati e identificati risultano essere gli stessi. Ciò che varia sono le intensità del segnale che in alcuni casi risultavano essere maggiori durante il giorno mentre in altri maggiori durante la notte.

10.7 ANALISI FATTORIALE

Osservando i dati ottenuti da Zangrando et al (2015) si è andati ad eseguire un'analisi fattoriale sui campioni analizzati utilizzando come variabili gli analiti determinati nell'analisi qualitativa effettuata per osservare delle correlazioni tra i due studi.

E' stata eseguita l'analisi fattoriale applicando come rotazione una Varimax normalizzata sia per quanto riguarda gli analiti ottenuti in positivo sia quelli osservati in negativo.

10.7.1 POSITIVO

Attraverso lo screen plot si è andati a scegliere un numero di fattori pari a 4 in grado di spiegare il 72.2% della varianza; si sarebbe potuto decidere di scegliere un numero maggiore di fattori ma l'osservazione dei factor loadings mostrava che nei fattori successivi le variabili non pesavano molto.

In figura 76 è possibile osservare lo screen plot per la modalità positiva da qui si è scelto di tenere quattro fattori.

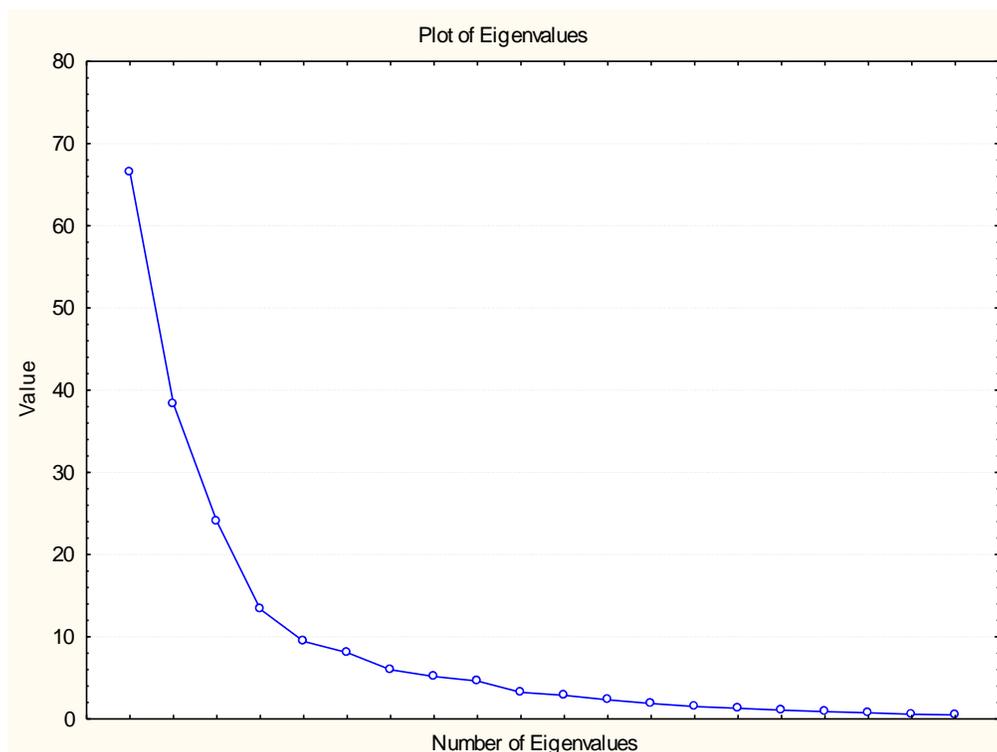


Figura 76: Scree plot per la modalità positiva.

Per quanto riguarda il fattore 1 questo è rappresentato da sostanze come Octadecanitrile, alchil nitrile derivante da alberi decidui (Oros & Simoneit 2001a), Ergosta-4,6,8,22-tetraen-3-one uno steroide naturale (Hill et al. 1991) e Ganoderal A un triterpenoide naturale (HMDB). Questi tipi di composti, evidenziati in figura 77 (cerchio rosso), indicano un fattore di tipo vegetale fresco ed osservando i factor scores questi sono maggiori nel mese di ottobre.

Il fattore 2 è rappresentato dalla presenza degli acidi siringici individuati ovvero siringolo, siringaldeide, acetosiringone, alcool sinapilico, tutti composti derivanti da combustione di biomassa e in particolar modo da legna da ardere hardwood. Inoltre è presente anche l'acido 3-osso deidroabietico un acido diterpenoico associato anch'esso alla combustione di legname (HMDB) e la coniferil aldeide un composto fenolico derivante dalla combustione di lignina (Zangrando et al. 2015); composti evidenziati in figura 78 (cerchio verde).

I factor score per questo fattore sono alti per i campioni del mese di dicembre e inferiori in ottobre indicando che questo tipo di fattore indica una combustione invernale, ipotesi supportata anche dal tipo di composti che rappresentano il fattore e che derivano tutti dalla combustione della lignina.

Il fattore 3 presenta alti loadings per l'acido levulinico derivante dalle biomasse, acetovanillone e l'acido omovanillico composti fenolici derivanti da biomass burning (Oros & Simoneit 2001a) (Oros & Simoneit 2001b), l'1,4:3,6-dianidro- β -D-glucopiranosio derivante anch'esso dalla combustione della lignina (Oros & Simoneit 2001b) e per la nicotina, evidenziati in figura 78 (cerchio blu). L'alto valore dei factor scores per i mesi di ottobre quando è riportata la presenza di incendi in campi aperti attuati per eliminare tutto il materiale agricolo di scarto in accordo da quanto descritto da Zangrando et al (Zangrando et al. 2015).

Per quanto riguarda il fattore 4 questo risulta essere più difficile da interpretare in quanto non si hanno molte informazioni sull'identità dei composti in esso contenuti in quanto non si è riusciti a individuare molte delle specie in esso presenti. Quelli presenti individuati con certezza però, sono acido piroglutammico e fenil alanina, il primo è un derivato amminoacidico mentre il secondo un amminoacido. Osservando poi i factor scores questi pesano in maniera simile tra settembre e novembre e in maniera maggiore ad ottobre indicando ancora una volta la presenza ad ottobre di combustioni in campi aperti mentre per quanto concerne settembre

livelli alti di amminoacidi sono stati osservati anche in altri lavori (Zangrando et al. 2015) e risultano essere presenti in sorgenti di emissione naturali. Questo fattore può quindi considerarsi misto tra un fattore di tipo naturale e uno con caratteristiche di “open fire”.

10.7.2 NEGATIVO

Analogamente per quanto fatto in positivo, è stata effettuata un’analisi fattoriale anche per i dati ottenuti in modalità negativa applicando una rotazione Varimax normalizzata.

In questo caso sono stati scelti 5 fattori in quanto spiegano il 74.7% della varianza totale mentre scegliendo solamente quattro fattori la varianza spiegata sarebbe stata troppo bassa come è possibile vedere in figura 79.

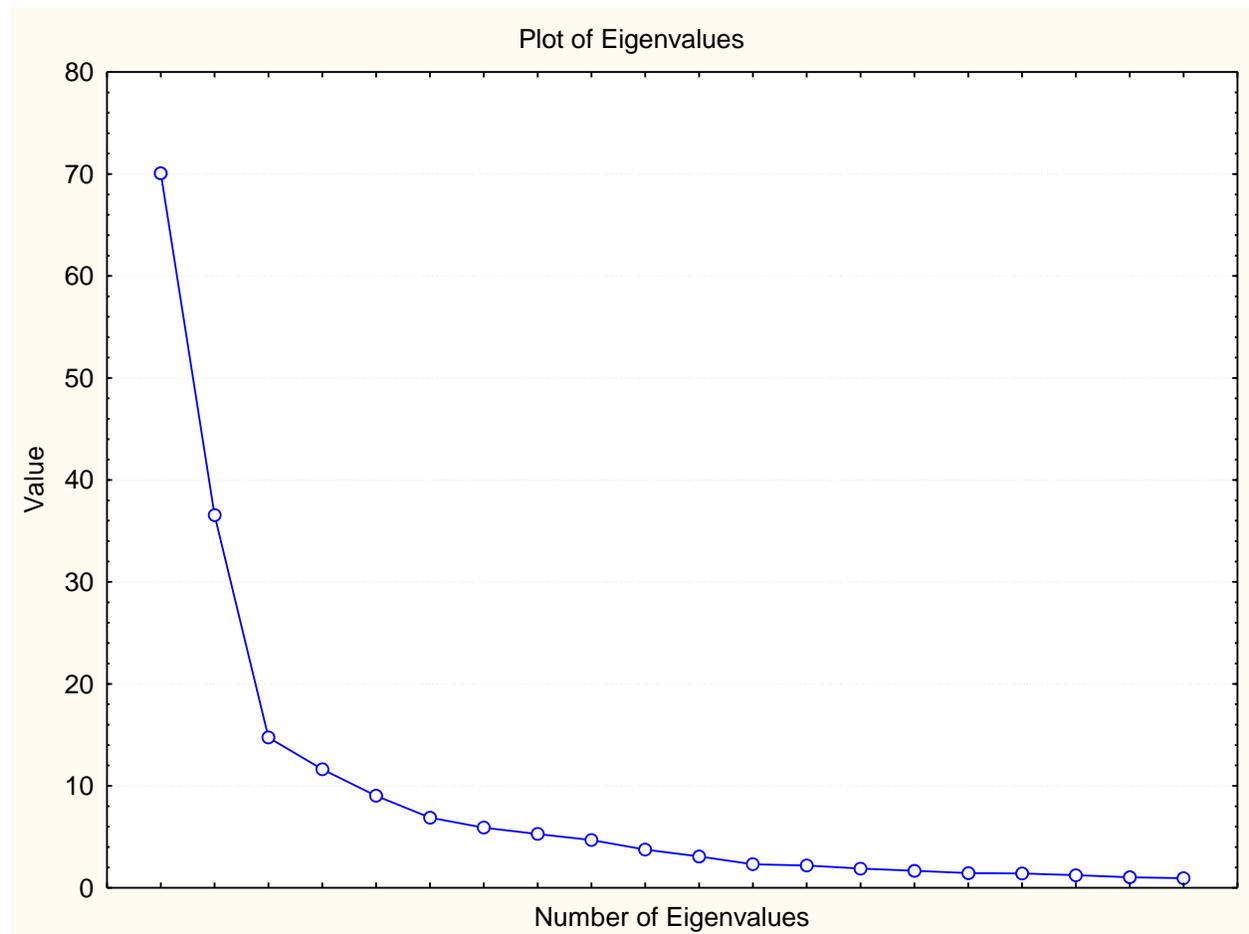


Figura 79: Screen plot della modalità negativa. Si può vedere come il primo e il secondo fattore spieghino la maggior parte della varianza, mentre dal terzo la varianza spiegata da ogni singolo fattore diminuisce.

E' stato effettuato un confronto tra i fattori ottenendo dei grafici visibili nella figura 80.

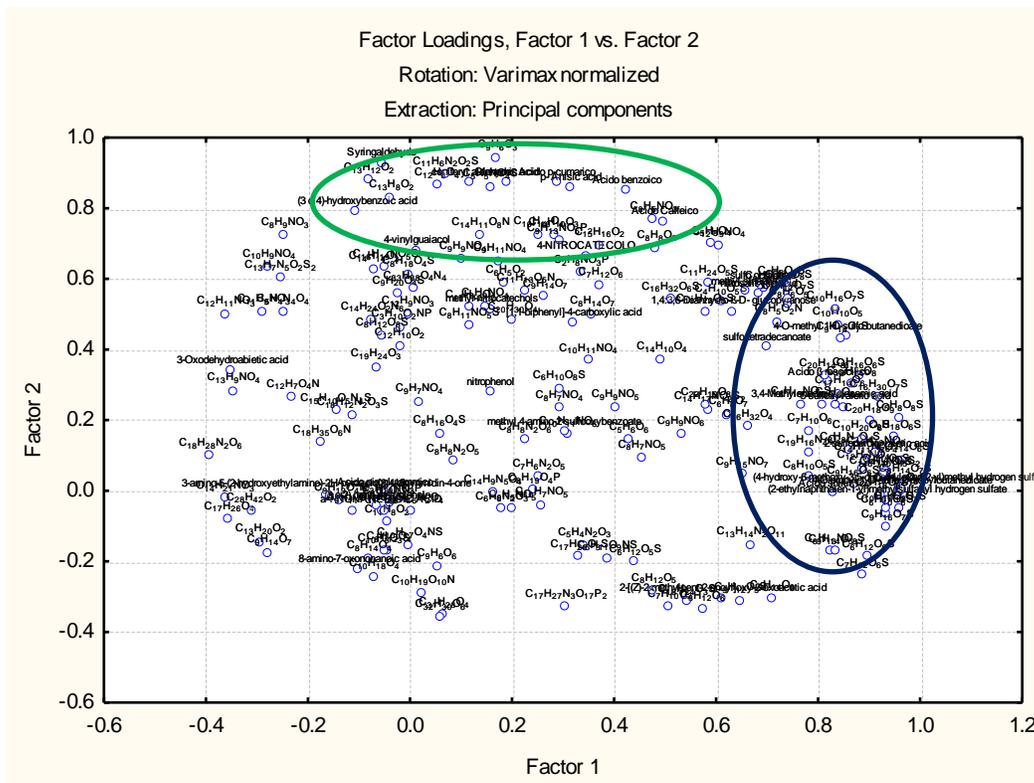


Figura 80: Fattore 1 VS fattore 2 per la modalità negativa.

Osservando il fattore 1 questo presenta vari composti determinati come l'acido β resorcilico, che deriva del Resorcinolo contenuto in molte resine di alberi e arbusti (Seeram et al. 2001), l'acido nitro salicilico un composto derivante da combustione di biomassa lignino cellulosica (Kitanovski et al. 2012), l'acido shikimico un metabolita di piante e microorganismi che prende parte anche al ciclo metabolico dello shikimato per la produzione di amminoacidi (Herrmann & Weaver 1999), il metil sinapato derivante anch'esso da biomass burning (Oros & Simoneit 2001a) e il 1,4:3,6-Dianhydro- β -D- glucopyranose un anidro zucchero derivante dalla cellulosa che si sviluppa durante la combustione di biomassa (Oros & Simoneit 2001b) (gruppo blu figura 81).

Osservando poi i factor scores questo tipo di fattore è preponderante ad ottobre e meno rilevante nei primi giorni di novembre, comparando inoltre gli analiti con questa distribuzione

temporale del fattore è suggerire l'emmissione di materiale naturale nel corso di combustioni in campo aperto.

Il fattore 2 contiene una quantità molto elevata di composti tra i quali si possono annoverare l'acido cinnamico che deriva da combustione di lignina (Oros & Simoneit 2001a); l'acido caffeico che deriva direttamente dalla lignina essendo un intermedio nella sua formazione risultando così uno dei componenti principali delle piante (Boerjan et al. 2003); la coniferil aldeide, composto fenolico derivante dalla combustione di lignina. (Zangrando et al. 2015); l'acido nitrosalicidico anch'esso derivante da processi di biomass burning (Oros & Simoneit 2001a); l'acido p cumarico che deriva dalla combustione della lignina (Oros & Simoneit 2001b); la siringaldeide che fa parte degli acidi siringici e risulta essere uno dei composti più importanti per la determinazione di biomass burning (Zangrando et al. 2015); oltre ad altri come l'acido benzoico, l'acido idrossibenzoico, il vinil guaiacolo, l'acido anisico il nitrocatecolo, il metil nitrocatecolo, il metil sinapato tutti composti derivanti direttamente alla combustione di biomassa e in particolare dalla combustione di lignina (Oros & Simoneit 2001a) (Kitanovski et al. 2012) (Boerjan et al. 2003) (gruppo verde figura 81).

Osservando i factor score per questo fattore si è visto che questo incideva in maniera preponderante sul mese di dicembre mentre per quanto riguarda gli altri mesi l'incidenza di tale fattore era molto bassa. Questo ha portato a definire che questo tipo di fattore sia legato alle combustioni di legna che avvengono a dicembre per riscaldare le abitazioni ed è stato denominato come fattore di combustione invernale.

Continuando con il fattore 3 questo presenta composti come l'acido piroglutammico che risulta essere un derivato amminoacidico; l'acido 8-ammino-7-ossanonanoico che risulta essere un composto di tipo naturale (Dictionary of natural product) e l'acido 3 ossodeidroabietico, un composto organico che si trova nelle resine degli alberi come ad esempio le conifere (Oros & Simoneit 2001a).

Osservando i factor scores si è osservato che questo fattore pesa in maniera maggiore su dicembre rispetto agli altri mesi e viste le caratteristiche degli analiti al suo interno si può ipotizzare che sia anch'esso, come il fattore 2, legato alla combustione di legna nel periodo invernale.

Il fattore 4 presenta pochi analiti determinati al suo interno, ma la presenza di nitro fenolo e metil nitrocatecolo indicano un fattore legato nuovamente a combustione di biomassa, tesi supportata dai factor scores che fanno pesare questo fattore nei mesi di ottobre, novembre e dicembre. Essendo questi due composti derivanti da biomass burning, ma anche derivati fenolici possono trovarsi sia in materiale vegetale, come arbusti e piante, sia svilupparsi dalla combustione di legna (Oros & Simoneit 2001a) (Kahnt et al. 2013). Dai factor scores si è potuto osservare che questo fattore pesa in modo simile su ottobre, novembre e dicembre sottolineando il fatto che si tratta di un fattore collegabile alle combustioni ma in maniera generale e non specifica nei confronti di una combustione rispetto ad un'altra. Infine al fattore 5 non si è riusciti a dare una spiegazione plausibile in quanto al suo interno sono assenti composti individuati in modo chiaro. Anche i factor scores non aiutano in quanto il peso di questo fattore sui vari mesi non è così marcato come invece nel caso degli altri.

Tutte queste informazioni, confrontate con quelle ottenute per i dati in positivo, dimostrano che in questi campioni abbiamo due tipi di combustioni differenti, la prima che avviene ad ottobre è di tipo aperto, ovvero combustione di biomassa nei campi, mentre la seconda è dovuta all'utilizzo di legna da ardere e avviene in inverno. Tutto questo è supportato e concorde con le informazioni trovate da Zangrando et al che dimostravano la presenza di diverse tipologie di combustione nello stesso periodo di osservazione e sugli stessi campioni.

11-Conclusioni

I campioni provenienti da un campagna di campionamento condotta a Belgrado nel 2008 sono stati analizzati al fine di caratterizzare la componente organica solubile in acqua (WSOCs water soluble organic compounds) dell'aerosol atmosferico utilizzando il software Sieve⁺ impiegato in campo metabolomico accanto a tecniche matematiche volte alla semplificazione dei complessi dati ambientali ottenuti in spettrometria di massa .

A nostra conoscenza l'approccio integrato utilizzato in questo lavoro di tesi è per la prima volta impiegato nello studio di matrici ambientali.

I dati sperimentali riportano la presenza di specie ioniche positive come $[M+H]^+$ e $[M+Na]^+$ contenenti composti caratterizzati da C, H, O e in negativo $[M-H]^-$ con specie contenenti C, O, N e S. Dallo studio dei diagrammi di Kendrick abbiamo osservato la presenza di specie omologhe di acidi alifatici e aromatici e derivati solforati di acidi carbossilici alifatici. In negativo si è osservata la presenza di specie a minor peso molecolare e con un maggior numero di eteroatomi rispetto a quanto osservato in positivo.

Lo studio dei diagrammi di Van Krevelen ha aiutato nella comprensione delle specie chimiche presenti nell'aerosol organico. Le specie con un rapporto O/C maggiore, quindi maggiormente ossidate, sono state ionizzate principalmente in polarità negativa mentre quelle più ridotte sono state ionizzate in positivo. Sono inoltre distinguibili direzioni che individuano reazioni cui è sottoposto l'aerosol in atmosfera.

E' stato inoltre osservato come il parametro DBE, aumenti con il numero di atomi di carbonio Dal parametro OSc è stato rilevato una maggior ossidazione per le specie ioniche ottenute in modalità negativa caratterizzate da una maggior frammentazione e funzionalizzazione. Le specie ottenute in polarità positiva invece, sono più ridotte e a maggior grado di oligomerizzazione.

E' stato inoltre possibile valutare il rapporto OM/OC che nella maggior parte dei casi è stato osservato simile ai valori riportati in letteratura.

Dai confronti fra le specie ioniche rilevate nei mesi di settembre e dicembre non si ottengono rilevanti indicazioni riguardo l'ossidazione OSc, mentre si osserva la presenza di specie biogeniche a settembre e da combustione a dicembre.

Dai confronti fra settembre e ottobre e fra ottobre e dicembre confermano che le specie prodotte ad ottobre e ionizzate in modalità positiva sono maggiormente ridotte rispetto agli altri mesi.

Infine l'analisi fattoriale condotta sui dati ottenuti in positivo e negativo indica la presenza di diversi fenomeni di combustione che avvengono in ottobre e dicembre e la presenza di sorgenti di emissione di sostanze di origine biogenica autunnali.

E' stato inoltre possibile identificati alcuni analiti che possono essere dei "marker" di specifiche fonti di emissione. Numerosi dei composti individuati sono riconducibili al biomass burning quali ad esempio siringaldeide, siringolo o alcool sinapilico, composti derivanti da piante (Ganoderol A, Isoclerone, Herniarin), amminoacidi e derivati di amminoacidi (Fenilalanina, acido piroglutammico), composti di origine microbica e fungina (N-acetil glucosammina, acido aspergillico), derivati di sostanze di impiego agricolo (2-naftilammina) e composti legati a produzioni di tipo industriale (glicole dietilenico, Amphoteric L).

11-Bibliografia e sitografia

Agilent Technologies. Agilent.com.

Aiken, A.C. et al., Page S1 of S6 Supporting Information : O/C and OM/OC Ratios of Primary , Secondary , and Ambient Organic Aerosols with a High Resolution Time-of-Flight Aerosol Mass Spectrometer Dommen , Jonathan Duplissy , Axel Metzger , Urs Baltensperger , and Jose . , pp.1–6.

Alpert, A.J., 1990. Hydrophilic-interaction chromatography for the separation of peptides, nucleic acids and other polar compounds. *Journal of chromatography*, 499, pp.177–96.

Altieri, K.E., Turpin, B.J. & Seitzinger, S.P., 2009. and Physics Oligomers , organosulfates , and nitrooxy organosulfates in rainwater identified by ultra-high resolution electrospray ionization FT-ICR mass spectrometry. , pp.2533–2542.

American Chemical Society, acs.org, molecule of the week, archive, S, Syringol.

Barbaro, E. et al., 2011. Free amino acids in atmospheric particulate matter of Venice, Italy. *Atmospheric Environment*, 45(28), pp.5050–5057.

Barros L., Dueñas M., Ferreira I. C., Baptista P., Santos-Buelga, C., June 2009. Phenolic acids determination by HPLC–DAD–ESI/MS in sixteen different Portuguese wild mushrooms species. *Food and Chemical Toxicology*.

Beograd.rs

Berenji, J. et al., 2011. Origin, History, Morphology, Production, Improvement, and Utilization of Broomcorn [*Sorghum bicolor* (L.) Moench] in Serbia1. *Economic Botany*, 65(2), pp.190–208.

Boerjan, W., Ralph, J. & Baucher, M., 2003. Lignin biosynthesis. *Annual review of plant biology*, 54, pp.519–46.

Bolton, G., Nester, E. & Gordon, M., 1986. Plant phenolic compounds induce expression of the *Agrobacterium tumefaciens* loci needed for virulence. *Science*, 232(4753), pp.983–985.

Brunekreef, B., 2005. Epidemiological evidence of effects of coarse airborne particles on health. *European Respiratory Journal*, 26(2), pp.309–318.

Ce, D., Parlamento, D.E.L. & Del, E.E., 2008. 11.6.2008.

Center for disease control e prevention. Hidmet.gov.rs.

- Cohen, A.J. et al., 2006. The global burden of disease due to outdoor air pollution. *Journal of toxicology and environmental health. Part A*, 68(13-14), pp.1301–7.
- Cole, R.B. ed., 2010. *Electrospray and MALDI Mass Spectrometry*, Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.
- Cozzi Renato; Pierpaolo Protti; Tarcisio Ruoro , Zanichelli 1998. “Elementi di analisi chimica strumentale”.
- Curcic S.; Milunovic S.; Koprivica, May 23rd 2014. SUSTAINABLE DEVELOPMENT USING WOOD WASTE FROM BOUNDED PART OF THE RUDNIK MOUNTAIN. 8 th International Quality Conference Center for Quality, Faculty of Engineering, University of Kragujevac.
- Curtis L., Netten A., 2002. Unit costs of health and social care.
- Đerčan, B., Lukić, T. & Bubalo-Živković, M., 2012. Possibility of efficient utilization of wood waste as a renewable energy resource in Serbia. *and Sustainable Energy*.
- Dictionary of natural product, Vol 4 John Buckingham Chapman & hall chemical database.
- Van Dingenen, R. et al., 2004. A European aerosol phenomenology—1: physical characteristics of particulate matter at kerbside, urban, rural and background sites in Europe. *Atmospheric Environment*, 38(16), pp.2561–2577.
- Docherty, K.S. & Ziemann, P.J., 2006. Reaction of oleic acid particles with NO₃ radicals: Products, mechanism, and implications for radical-initiated organic aerosol oxidation. *The journal of physical chemistry. A*, 110(10), pp.3567–77.
- Dunn, W.B. et al., 2012. Mass appeal: metabolite identification in mass spectrometry-focused untargeted metabolomics. *Metabolomics*, 9(S1), pp.44–66.
- Enciclopedia britannica online. Britannica.com
- Faravelli T., A. Frassoldati S. Granata, A. Cuoci, E. Ranzi; 2006. Fenomenologia della combustione di biomasse. LEAP; pp 171-219.
- Flick E.W., 1993. Industrial surfactants 2 nd edition. Noyes publications, Park Ridge, New Jersey USA.
- Fuzzi, S. et al., 2015. Particulate matter, air quality and climate: lessons learned and future needs. *Atmospheric Chemistry and Physics Discussions*, 15(1), pp.521–744.
- Gazzetta ufficiale Repubblica di Serbia, n. 135/2004.

Glavonjic, B. & Oblak, L., 2012. Consumption of woody biomass in industry, commercial, and public facilities in Serbia: Present state and possible contribution to the share of renewable sources in final energy consumption. *Thermal Science*, 16(1), pp.7–19.

Hardware Manual “LTQ Series” Thermo Scientific.

Hemström, P. & Irgum, K., 2006. Hydrophilic interaction chromatography. *Journal of separation science*, 29(12), pp.1784–821.

Hernes, P.J. & Benner, R., 2002. Transport and diagenesis of dissolved and particulate terrigenous organic matter in the North Pacific Ocean. *Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers*, 49(12), pp.2119–2132.

Herrmann, K.M. & Weaver, L.M., 1999. THE SHIKIMATE PATHWAY. *Annual review of plant physiology and plant molecular biology*, 50, pp.473–503.

Hill R.A., H.L.J. Makin, D.N. Kirk, 1991. Science dictionary of steroids.

Hydrometeorologic service of Serbia. Hidmet.gov.rs.

The Human metabolome database. Hmdb.ca.

Hu, Q. et al., 2005. The Orbitrap: a new mass spectrometer. *Journal of mass spectrometry : JMS*, 40(4), pp.430–43.

Hughey, C.A. et al., 2001. Kendrick Mass Defect Spectrum : A Compact Visual Analysis for Ultrahigh-Resolution Broadband Mass Spectra. , 73(19), pp.4676–4681.

Kahnt, A. et al., 2013. One-year study of nitro-organic compounds and their relation to wood burning in PM10 aerosol from a rural site in Belgium. *Atmospheric Environment*, 81(12), pp.561–568.

Kamm Birgit, Patrick R. Gruber, Michael Kamm, 2006. Biorefineries—Industrial processes and products. status quo and future directions. Vol. 1, WILEY-VCH, Weinheim.

Kandler, K. et al., 2009. Size distribution, mass concentration, chemical and mineralogical composition and derived optical parameters of the boundary layer aerosol at Tinfou, Morocco, during SAMUM 2006. *Tellus B*, 61(1), pp.32–50.

Karanasiou, a et al., 2012. Health effects from Sahara dust episodes in Europe: literature review and research gaps. *Environment international*, 47, pp.107–14.

Kasper-giebl, A. et al., 2007. Source apportionment of PM2.5 organic aerosol over Europe : Primary secondary, natural anthropogenic, and fossil biogenic origin. , 112, pp.1–12.

- Kendrick, E., A Mass Scale Based on CH₂, = 14.0000 for High Resolution Mass Spectrometry of Organic Compounds.
- Kim, S., Kramer, R.W. & Hatcher, P.G., 2003. Graphical Method for Analysis of Ultrahigh-Resolution Broadband Mass Spectra of Natural Organic Matter, the Van Krevelen Diagram, *Journal of Mass Spectrometry*, 38(12), pp.1336–1344.
- Kind, T. & Fiehn, O., 2007. Seven Golden Rules for heuristic filtering of molecular formulas obtained by accurate mass spectrometry. *BMC bioinformatics*, 8, p.105.
- Kitanovski, Z. et al., 2012. Liquid chromatography tandem mass spectrometry method for characterization of monoaromatic nitro-compounds in atmospheric particulate matter. *Journal of chromatography. A*, 1268, pp.35–43.
- Kocbach Bølling, A. et al., 2009. Health effects of residential wood smoke particles: the importance of combustion conditions and physicochemical particle properties. *Particle and fibre toxicology*, 6(i), p.29.
- Koch, B.P. & Dittmar, T., 2006. From mass to structure: an aromaticity index for high-resolution mass data of natural organic matter. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 20(5), pp.926–932.
- Kourtchev, I. et al., 2013. Molecular Composition of Boreal Forest Aerosol from Hyytiälä, Finland, Using Ultrahigh Resolution Mass Spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry*, 48(12), pp.1336–1344.
- Krevelen, D.W. van, 1950. Graphical—statistical method for the study of structure and reaction process of coal. *Journal of Applied Chemistry*, 29, pp.269–284.
- Kroll, J.H. et al., 2011. Carbon oxidation state as a metric for describing the chemistry of atmospheric organic aerosol. *Nature chemistry*, 3(2), pp.133–9.
- Lanz, V.A., Alfarra, M.R. & Prevot, A.S.H., 2008. Source Attribution of Submicron Organic Aerosols during Wintertime Inversions by Advanced Factor Analysis of Aerosol Mass Spectra. *Journal of Mass Spectrometry*, 43(1), pp.214–220.
- Laskin, A., B, D.J.L. & C, S.A.N., 2012. Mass spectrometric approaches for chemical characterisation of atmospheric aerosols : critical review of the most recent advances. *Journal of Mass Spectrometry*, 47(2), pp.163–189.
- Lowe, J.A., 1997. MARINE AEROSOL, SEA-SALT, AND THE MARINE SULPHUR CYCLE : A SHORT REVIEW. *Journal of Marine Research*, 55(1), pp.73–80.
- Lutgens, F. K., and E. J. Tarbuck, 1995: The Atmosphere. Prentice-Hall.

- MacDonald J.C., 1961. Biosynthesis of Aspergillilic Acid. The journal of biological chemistry, Vol.236, No. 2.
- Makarov, A., 2000. Electrostatic Axially Harmonic Orbital Trapping: A High-Performance Technique of Mass Analysis. *Analytical Chemistry*, 72(6), pp.1156–1162.
- Makarov, A., Denisov, E. & Lange, O., 2009. Performance evaluation of a high-field Orbitrap mass analyzer. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 20(8), pp.1391–6.
- Makarov, A. & Scigelova, M., 2010. Coupling liquid chromatography to Orbitrap mass spectrometry. *Journal of chromatography. A*, 1217(25), pp.3938–45.
- Marconi A. «Materiale particellare aerodisperso: definizioni, effetti sanitari, misura e sintesi delle indagini ambientali effettuate a Roma.» *Annali dell' Istituto superiore di sanità (ISSN)* 39, 2003: 329-342.
- Marshall, A.G. & Rodgers, R.P., 2004. Petroleomics : The Next Grand Challenge for Chemical Analysis *Petroleum and Mass Spectrometry : Divergent.* , pp.53–59.
- Mazzoleni, L.R. et al., 2012. Identification of water-soluble organic carbon in non-urban aerosols using ultrahigh-resolution FT-ICR mass spectrometry: organic anions. *Environmental Chemistry*, 9(3), p.285.
- Mazzoleni, L.R. et al., 2010. Water-Soluble Atmospheric Organic Matter in Fog: Exact Masses and Chemical Formula Identification by Ultrahigh-Resolution Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry. *Environmental Science & Technology*, 44(10), pp.3690–3697.
- Mech; Branimir Jovanovic; Miroslav Parovic, 2009. Condition and development of biomass in Serbia.
- Metlin.scripps.edu.
- Meija, J., 2006. Mathematical tools in analytical mass spectrometry. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 385(3), pp.486–99.
- Ministry of Environment and Spatial Planning Biodiversity Strategy of the Republic of Serbia for the period 2011–2018.
- Msbj.ipb-halle.de/MetFrag/.
- Oros, D.R. & Simoneit, B.R.T., 2001a. *Identification and emission factors of molecular tracers in organic aerosols from biomass burning Part 1 . Temperate climate conifers,*

- Oros, D.R. & Simoneit, B.R.T., 2001b. Identification and emission factors of molecular tracers in organic aerosols from biomass burning Part 2 . Deciduous trees. , 16.
- Panda, S.K., Andersson, J.T. & Schrader, W., 2007. Mass-spectrometric analysis of complex volatile and nonvolatile crude oil components: a challenge. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 389(5), pp.1329–1339.
- Perrone, M.G. et al., 2012. Sources of high PM_{2.5} concentrations in Milan, Northern Italy: molecular marker data and CMB modelling. *The Science of the total environment*, 414(August 2015), pp.343–55.
- Perry, R.H., Cooks, R.G. & Noll, R.J., 2008. ORBITRAP MASS SPECTROMETRY : INSTRUMENTATION , ION MOTION AND APPLICATIONS. , (December 2007), pp.661–699.
- Populationpyramid.net/it/serbia/2015/.
- Pozniak, B.P. & Cole, R.B., 2007. Current measurements within the electrospray emitter. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 18(4), pp.737–48.
- PubChem.ncbi.nlm.nih.gov.
- Querol, X. et al., 2009. African dust contributions to mean ambient PM₁₀ mass-levels across the Mediterranean Basin. *Atmospheric Environment*, 43(28), pp.4266–4277.
- Reemtsma, T., 2009. Determination of molecular formulas of natural organic matter molecules by (ultra-) high-resolution mass spectrometry: status and needs. *Journal of chromatography. A*, 1216(18), pp.3687–701.
- Republic of Serbia. Country report on the state of plant genetic resources for food and agriculture (FAO).
- Samara, C. et al., 2003. Chemical mass balance source apportionment of PM₁₀ in an industrialized urban area of Northern Greece. *Atmospheric Environment*, 37(1), pp.41–54.
- Sangalli D., 2010. “LA CONCENTRAZIONE NUMERICA DI PARTICOLATO FINE ATMOSFERICO NELLA CITTA’ DI MILANO”.
- Santamour F. S., Riedel L.G.H., 1994. Distribution and inheritance of scopolin and herniarin in some Prunus species. *Biochemical systematics and ecology* 22 (2), pp. 197–201.
- Scalabrin E., 2015. “ Chemical characterization of plant materials and development of analytical methodologies for metabolite determination”.

Scalabrin, E. et al., 2015. Metabolomic analysis of wild and transgenic *Nicotiana langsdorffii* plants exposed to abiotic stresses: unraveling metabolic responses. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 407(21), pp.6357–68.

Seeram, N.P., Bourquin, L.D. & Nair, M.G., 2001. Degradation Products of Cyanidin Glycosides from Tart Cherries and Their Bioactivities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(10), pp.4924–4929.

Seinfeld J.H., Spyros N. Pandis, September 2006. Atmospheric Chemistry and Physics: From Air Pollution to Climate Change, 2nd Edition, ISBN: 978-0-471-72018, pp. 8 1232.

Siegmund B., Leitner E., Pfannhauser W., 1999. Determination of the nicotine content of various edible nightshades (Solanaceae) and their products and estimation of the associated dietary nicotine intake. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(8), 3113–20.

Sigmaaldrich.com

Simon, H. et al., 2011. Determining the spatial and seasonal variability in OM/OC ratios across the US using multiple regression. *Atmospheric Chemistry and Physics*, 11(6), pp.2933–2949.

Simoneit, B.R.T. et al., 1999. Levoglucosan , a tracer for cellulose in biomass burning and atmospheric particles. , 33.

Simoneit, B. R. T., 2002. *Biomass burning — a review of organic tracers for smoke from incomplete combustion* (Vol. 17).

Smith, J.S., Laskin, A. & Laskin, J., 2009b. Molecular characterization of biomass burning aerosols using high-resolution mass spectrometry. *Analytical chemistry*, 81(4), pp.1512–21.

Sumner, L.W. et al., 2007. Proposed minimum reporting standards for chemical analysis Chemical Analysis Working Group (CAWG) Metabolomics Standards Initiative (MSI). *Metabolomics : Official journal of the Metabolomic Society*, 3(3), pp.211–221.

Surratt, J.D. et al., 2008. Organosulfate Formation in Biogenic Secondary Organic Aerosol. , pp.8345–8378.

Szidat, S. et al., 2009. and Physics Fossil and non-fossil sources of organic carbon (OC) and elemental carbon (EC) in Göteborg , Sweden. , pp.1521–1535.

Tisch-env.com

Turchet M., 2012. "Determinazione di composti organici nell'aerosol atmosferico mediante LC-MS ad alta risoluzione".

Turpin, B.J. & Lim, H.-J., 2001. Species Contributions to PM_{2.5} Mass Concentrations: Revisiting Common Assumptions for Estimating Organic Mass. *Aerosol Science and Technology*, 35(1), pp.602–610.

Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry. (2000). Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.

User manual Sieve⁺ Thermo Scientific.

Visser, S.A., 1983. Application of Van Krevelen's graphical-statistical method for the study of aquatic humic material. *Environmental Science & Technology*, 17(7), pp.412–417.

Zangrando R., Barbaro E., Kirchgeorg T., Vecchiato M., Scalabrin E., Radaelli M., Gambaro A., 2015. Aerosol primary sources in Belgrade atmosphere. Submitted.

Walser, M.L. et al., 2008. High-resolution mass spectrometric analysis of secondary organic aerosol produced by ozonation of limonene. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 10(7), pp.1009–1022.

Wozniak, A.S. et al., 2008. and Physics Technical Note : Molecular characterization of aerosol-derived water soluble organic carbon using ultrahigh resolution electrospray ionization Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry. , pp.5099–5111.

Wu, Z. et al., 2004. Two- and Three-Dimensional van Krevelen Diagrams : A Graphical Analysis Complementary to the Kendrick Mass Plot for Sorting Elemental Compositions of Complex Organic Mixtures Based on Ultrahigh-Resolution Broadband Fourier Transform Ion Cyclotron Resonanc. , 76(9), pp.2511–2516.

Ringraziamenti

Vorrei ringraziare il Professor Andrea Gambaro per avermi dato l'opportunità di effettuare il tirocinio e la tesi. Ringrazio la Dott.ssa Roberta Zangrando e il Dott. Giovanni Rizzato per avermi seguito e consigliato in tutti gli aspetti riguardanti il tirocinio e la tesi.

Ringrazio inoltre tutti i componenti dell'ufficio 5 che mi hanno accolto con loro in maniera eccezionale e gli altri componenti del gruppo di ricerca per i mesi passati assieme.

Ringrazio i miei genitori e mia sorella che hanno permesso questo mio percorso di studi senza avermi mai fatto mancare nulla. Un ringraziamento va anche ad Alessandra che mi ha sempre spronato a dare il massimo. Grazie a loro non ho mai mollato e ho sempre cercato di dare tutto me stesso per ottenere il meglio dagli studi.

Ora si apre una porta su un mondo nuovo che affronterò sempre con coraggio e determinazione perché i limiti come le paure, sono spesso soltanto illusioni.

Appendice

Tabella A1 rappresentante tutte le specie individuate in positivo. Per tutte le specie è indicato il rapporto m/z , la massa, il tipo di specie ionica, la formula bruta e il grado di assegnazione spiegato nel capitolo 9.3. Per alcune è stato possibile dare l'assegnazione e l'origine.

m/z	Massa	Specie ionica carica (+)	Formula	Assegnazione	Grado di assegnazione	Origine	Riferimento
106.06469	105.0567	H	C ₇ H ₇ N		3		
107.06938	106.0614	H	C ₄ H ₁₀ O ₃	Glicole dietilenico	2	Industriale	PubChem
110.05915	109.0512	H	C ₆ H ₇ NO		3		
111.09132	110.0834	H	C ₆ H ₁₀ N ₂		3		
117.05681	116.0489	H	C ₅ H ₈ O ₃	Acido levulinico	2	Cellulosa	Kamm 2006
120.08038	119.0724	H	C ₈ H ₉ N		3		
120.08066	119.0727	H	C ₈ H ₉ N	2-feniletanimmina	2	Industriale	PubChem
123.09116	122.0832	H	C ₇ H ₁₀ N ₂		3		
124.07491	123.067	H	C ₇ H ₉ ON		3		
130.04988	129.0419	H	C ₅ H ₇ O ₃ N	Acido piroglutammico	2	Amminoacidi	HMDB
130.06468	129.0567	H	C ₉ H ₇ N		3		
132.08031	131.0724	H	C ₉ H ₉ N	Scatolo	2	Marcescenza	HMDB
136.0757	135.0678	H	C ₈ H ₉ NO		3		
139.05009	138.0422	H	C ₆ H ₆ O ₂ N ₂		3		
139.12183	138.1139	H	C ₈ H ₁₄ N ₂		3		
143.03348	142.0255	H	C ₆ H ₆ O ₄		3		
143.05869	142.0507	H	C ₉ H ₆ N ₂		3		
144.07962	143.0717	H	C ₁₀ H ₉ N	2-naftillamina	2	Prodotto uso agricolo	cdc.gov
144.10078	143.0928	H	C ₇ H ₁₃ NO ₂		3		
145.04839	144.0404	H	C ₆ H ₈ O ₄	1,4:3,6-dianidro-β-D-glucopiranosio	2	Cellulosa	Oros & Simoneit, 2001
146.05902	145.0511	H	C ₉ H ₇ ON	8-idrossichinolina	2	Piante (<i>Centaurea diffusa</i>)	HMDB
147.09045	146.0825	H	C ₉ H ₁₀ N ₂		3		
149.05946	148.0515	H	C ₉ H ₈ O ₂	Acido cinnamico	2	Piante e fragranze	Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, 2000
150.07631	149.0684	H	C ₅ H ₁₂ O ₄ N		3		
151.09543	150.0875	H	C ₆ H ₁₄ O ₄		3		
153.1386	152.1307	H	C ₉ H ₁₆ N ₂		3		
155.06929	154.0614	H	C ₈ H ₁₀ O ₃	Siringolo	2	Pirolisi lignina	American chemical society
157.04866	156.0407	H	C ₇ H ₈ O ₄		3		
158.09602	157.0881	H	C ₁₁ H ₁₁ N		3		
159.04294	158.035	H	C ₁₅ H ₁₃ O ₆ N ₂		3		
163.0741	162.0662	H	C ₁₀ H ₁₀ O ₂		3		
163.12244	162.1145	H	C ₁₀ H ₁₄ N ₂	Nicotina	2	Tabacco	Siegmund 1999
163.13167	162.1237	H	C ₈ H ₁₈ O ₃		3		
165.05464	164.0467	H	C ₉ H ₈ O ₃	Acido 2-idrossicinnamico	2	Piante e funghi	Barros 2009

165.0771	164.0692	H	C ₇ H ₈ N ₄ O		3		
165.11101	164.1031	H	C ₇ H ₁₆ O ₄		3		
166.08615	165.0782	H	C ₉ H ₁₁ NO ₂	Fenilalanina	2	Amminoacidi	PubChem
167.06918	166.0612	H	C ₉ H ₁₀ O ₃	Acetovanillone	2	Pirolisi lignina	Oros & Simoneit, 2001
167.15318	166.1452	H	C ₁₀ H ₁₈ N ₂		3		
169.07489	168.067	H	C ₉ H ₁₀ O ₃		3		
169.08498	168.077	H	C ₉ H ₁₂ O ₃	3,5-dimetossi-4-idrossitoluene	2		
170.11646	169.1085	H	C ₉ H ₁₅ NO ₂		3		
171.06387	170.0559	H	C ₈ H ₁₀ O ₄		3		
174.08998	173.082	H	C ₁₁ H ₁₁ ON		3		
174.1839	173.176	H	C ₁₀ H ₂₃ NO		3		
177.05357	176.0456	H	C ₁₀ H ₈ O ₃	Herniarin	2	Piante	Santamour 1994
177.08965	176.0817	H	C ₁₁ H ₁₂ O ₂		3		
177.10091	176.093	H	C ₁₀ H ₁₂ N ₂ O		3		
179.06898	178.061	H	C ₁₀ H ₁₀ O ₃	Coniferil aldeide	2	Pirolisi cellulosa	Oros & Simoneit, 2001
179.06955	178.0616	H	C ₁₀ H ₁₀ O ₃	Isoclerone	2	Nocciolo	HMDB
179.0802	178.0723	H	C ₇ H ₁₄ O ₅		3		
179.11694	178.109	H	C ₁₀ H ₁₄ ON ₂		3		
181.06339	180.0554	H	C ₁₃ H ₈ O		3		
181.06351	180.0556	H	C ₁₃ H ₈ O		3		
181.16843	180.1605	H	C ₁₁ H ₂₀ N ₂		3		
182.08125	181.0733	H	C ₉ H ₁₁ O ₃ N		3		
182.10497	181.097	H	C ₇ H ₁₁ ON ₅		3		
182.18906	181.1811	H	C ₁₂ H ₂₃ N		3		
183.04271	182.0348	H	C ₁₂ H ₆ O ₂		3		
183.06393	182.056	H	C ₉ H ₁₀ O ₄	Siringaldeide	2	Pirolisi lignina	Oros & Simoneit, 2001
183.06406	182.0561	H	C ₉ H ₁₀ O ₄		3		
183.09035	182.0824	H	C ₁₀ H ₁₄ O ₃	Acido omovanillico	2	Pirolisi lignina	Oros & Simoneit, 2001
187.05879	186.0509	H	C ₈ H ₁₀ O ₅		3		
187.0952	186.0873	H	C ₉ H ₁₄ O ₄		3		
188.0699	187.062	H	C ₁₁ H ₉ NO ₂		3		
191.16283	190.1549	H	C ₁₀ H ₂₂ O ₃		3		
193.01169	192.0037	H	C ₉ H ₄ O ₅		3		
193.03293	192.025	H	C ₆ H ₈ O ₇	Acido 4-(carbossimetilperossi)-4-ossabutanoico	2		
193.04869	192.0408	H	C ₁₀ H ₈ O ₄		3		
195.11253	194.1046	H	C ₁₀ H ₁₄ N ₂ O ₂		3		
195.1214	194.1135	H	C ₈ H ₁₉ O ₅		3		
197.05833	196.0504	H	C ₁₃ H ₈ O ₂		3		
197.07957	196.0716	H	C ₁₀ H ₁₂ O ₄	Acetosiringone	2	Pirolisi lignina	Oros & Simoneit, 2001
197.12755	196.1196	H	C ₁₀ H ₁₆ O ₂ N ₂		3		
199.16884	198.1609	H	C ₁₂ H ₂₂ O ₂		3		
200.20097	199.193	H	C ₁₂ H ₂₅ NO		3		
201.05347	200.0455	H	C ₁₂ H ₈ O ₃		3		
201.07439	200.0664	H	C ₉ H ₁₂ O ₅		3		
204.08519	203.0772	H	C ₈ H ₁₃ NO ₅	1,6-Anidro-2-acetammido-2-deossiglucosio	2		
205.07024	204.0623	H	C ₈ H ₁₂ O ₆		3		
205.09644	204.0885	H	C ₁₁ H ₁₂ N ₂ O ₂		3		
205.14198	204.134	H	C ₁₀ H ₂₀ O ₄		3		
206.13734	205.1294	H	C ₉ H ₁₉ O ₄ N		3		
207.15782	206.1499	H	C ₁₀ H ₂₂ O ₄		3		
209.09131	208.0834	H	C ₁₀ H ₁₂ N ₂ O ₃		3		

209.13831	208.1304	H	C ₉ H ₂₀ O ₅		3		
211.09512	210.0872	H	C ₁₁ H ₁₄ O ₄	Alcool sinapilico	2	Pirolisi lignina	Oros & Simoneit, 2001
211.14281	210.1349	H	C ₁₁ H ₁₈ N ₂ O ₂		3		
211.14354	210.1356	H	C ₁₁ H ₁₈ N ₂ O ₂		3		
212.11696	211.109	H	C ₁₃ H ₁₃ N ₃		3		
213.14465	212.1367	Na	C ₁₀ H ₂₂ O ₃ Na		3		
215.09003	214.0821	H	C ₁₀ H ₁₄ O ₅		3		
222.09605	221.0881	H	C ₈ H ₁₅ O ₆ N	N-acetilglucosammina	2	Batteri e funghi	Sigma Aldrich
222.09676	221.0888	H	C ₈ H ₁₅ NO ₆		3		
224.18547	223.1775	H	C ₁₀ H ₂₅ O ₄ N		3		
225.05313	224.0452	H	C ₁₄ H ₈ O ₃		3		
225.1106	224.1027	H	C ₁₂ H ₁₆ O ₄		3		
225.15846	224.1505	H	C ₁₂ H ₂₀ O ₂ N ₂	Acido aspergilloso	2	Funghi	MacDonald 1961
226.18015	225.1722	H	C ₁₃ H ₂₃ NO ₂		3		
227.05156	226.0436	Na	C ₈ H ₁₂ O ₆ Na		3		
227.12404	226.1161	Na	C ₁₀ H ₂₀ O ₄ Na		3		
227.1759	226.168	H	C ₁₂ H ₂₂ N ₂ O ₂		3		
228.11914	227.1112	Na	C ₉ H ₁₉ NO ₄ Na		3		
229.1167	228.1088	H	C ₁₀ H ₁₆ O ₄ N ₂		3		
229.14087	228.1329	Na	C ₁₀ H ₂₂ O ₄ Na		3		
231.12016	230.1122	Na	C ₉ H ₂₀ O ₅ Na		3		
233.20966	232.2017	H	C ₁₃ H ₃₀ O ₃		3		
243.281	242.2731	H	C ₁₄ H ₁₄ N ₂ O ₂		3		
244.19098	243.183	H	C ₁₃ H ₂₅ NO ₃		3		
245.12695	244.119	H	C ₁₄ H ₁₆ N ₂ O ₂		3		
245.13666	244.1287	H	C ₁₂ H ₂₀ O ₅		3		
247.22527	246.2173	H	C ₁₄ H ₃₀ O ₃		3		
249.20433	248.1964	H	C ₁₃ H ₂₈ O ₄		3		
251.18423	250.1763	H	C ₁₂ H ₂₆ O ₅		3		
253.16313	252.1552	H	C ₁₁ H ₂₄ O ₆		3		
255.14311	254.1352	H	C ₁₀ H ₂₂ O ₇		3		
256.07993	255.072	H	C ₁₁ H ₁₃ O ₆ N		3		
259.0928	258.0849	H	C ₁₀ H ₁₄ N ₂ O ₆		3		
261.2428	260.2349	H	C ₁₅ H ₃₂ O ₃		3		
268.10242	267.0945	H	C ₉ H ₁₇ NO ₈		3		
269.18445	268.1765	H	C ₁₆ H ₂₈ O ₃		3		
269.20694	268.199	Na	C ₁₄ H ₃₀ O ₃ Na		3		
271.18619	270.1782	Na	C ₁₃ H ₂₇ O ₄ Na		3		
273.16589	272.158	Na	C ₁₂ H ₂₆ O ₅ Na		3		
277.23575	276.2278	H	C ₁₅ H ₃₂ O ₄		3		
283.17441	282.1665	H	C ₁₂ H ₂₆ O ₇		3		
283.22366	282.2157	Na	C ₁₅ H ₃₂ O ₃ Na		3		
289.02173	288.0138	H	C ₁₆ H ₄ O ₄ N ₂		3		
291.25131	290.2434	H	C ₁₆ H ₃₄ O ₄		3		
296.24185	295.2339	H	C ₁₅ H ₂₉ N ₅ O		3		
299.21753	298.2096	Na	C ₁₅ H ₃₂ O ₄ Na		3		
303.15442	302.1465	H	C ₁₃ H ₂₃ O ₆ N ₂		3		
305.26822	304.2603	H	C ₁₇ H ₃₆ O ₄		3		
308.2778	307.2699	H	C ₁₇ H ₃₃ N ₅		3		
309.22595	308.218	H	C ₁₅ H ₃₂ O ₆		3		
311.12585	310.1179	H	C ₁₄ H ₁₈ N ₂ O ₆		3		
312.17853	311.1706	H	C ₁₆ H ₂₅ NO ₅		3		
313.23306	312.2251	Na	C ₁₆ H ₃₄ O ₄ Na		3		
315.19574	314.1878	H	C ₂₀ H ₂₆ O ₃	Acido 3-ossodeidroabietico	2	Resine conifere	Oros & Simoneit, 2001
321.26175	320.2538	H	C ₁₇ H ₃₆ O ₅		3		
322.2948	321.2869	H	C ₁₈ H ₃₅ N ₅	Octadecanitrile	2	Pirolisi	Oros &

						lignina/ naturale	Simoneit, 2001
323.15958	322.1516	H	C ₁₆ H ₂₂ N ₂ O ₅		3		
327.19986	326.1919	H	C ₁₄ H ₃₀ O ₈		3		
327.25015	326.2422	Na	C ₁₇ H ₃₆ O ₄ Na		3		
331.20782	330.1999	Na	C ₁₅ H ₃₂ O ₆ Na		3		
333.13235	332.1244	H	C ₁₈ H ₂₀ O ₆		3		
335.27734	334.2694	H	C ₁₈ H ₃₈ O ₅		3		
337.17783	336.1699	Na	C ₂₀ H ₂₆ O ₃ Na		2		
338.28827	337.2803	H	C ₁₈ H ₃₅ N ₅ O		3		
343.24347	342.2355	Na	C ₁₇ H ₃₆ O ₅ Na		3		
343.29443	342.2865	H	C ₁₉ H ₃₈ N ₂ O ₃	Amphoteric L	2	Anfotero per detergenza	Flick 1993
349.29468	348.2867	H	C ₁₉ H ₄₀ O ₅	3,6,9,12-Tetraossatricosan- 1-olo	2		
352.30392	351.296	H	C ₁₉ H ₃₇ ON ₅		3		
357.25906	356.2511	Na	C ₁₈ H ₃₈ O ₅ Na		3		
359.20166	358.1937	H	C ₂₂ H ₃₀ O ₄		3		
362.25186	361.2439	H	C ₁₆ H ₃₃ N ₄ O ₅		3		
365.28787	364.2799	H	C ₁₉ H ₄₀ O ₆		3		
366.32129	365.3133	H	C ₂₀ H ₃₉ ON ₅		3		
367.26709	366.2591	H	C ₁₈ H ₃₈ O ₇		3		
370.5098	369.5019	H	C ₂₅ H ₂₇ N ₃		3		
371.22549	370.2176	H	C ₁₆ H ₃₄ O ₉		3		
371.27545	370.2675	Na	C ₁₉ H ₄₀ O ₅ Na		3		
379.30328	378.2953	H	C ₂₀ H ₄₂ O ₆		3		
387.26959	386.2617	Na	C ₁₉ H ₄₀ O ₆ Na		3		
389.24881	388.2409	Na	C ₁₈ H ₃₈ O ₇ Na		3		
393.32004	392.3121	H	C ₂₈ H ₄₀ O	Ergosta-4,6,8,22-tetraen-3- one	2	Steroide	PubChem
396.32983	395.3219	H	C ₂₁ H ₄₁ O ₂ N ₅		3		
401.28488	400.2769	Na	C ₂₀ H ₄₂ O ₆ Na		3		
402.2674	401.2595	H	C ₂₄ H ₃₅ O ₄ N		3		
409.31384	408.3059	H	C ₂₁ H ₄₄ O ₇		3		
410.34665	409.3387	H	C ₂₂ H ₄₃ O ₂ N ₅		3		
415.30188	414.2939	Na	C ₂₁ H ₄₄ O ₆ Na		3		
423.32935	422.3214	H	C ₂₂ H ₄₄ O ₇		3		
424.36078	423.3528	H	C ₂₉ H ₄₅ ON		3		
425.3089	424.301	H	C ₂₁ H ₄₄ O ₈		3		
426.34039	425.3325	H	C ₂₈ H ₄₃ NO ₂		3		
429.26685	428.2589	H	C ₂₆ H ₃₆ O ₅		3		
431.29556	430.2876	Na	C ₂₁ H ₄₅ O ₇ Na		3		
432.27792	431.27	H	C ₂₅ H ₃₇ O ₅ N		3		
437.3461	436.3382	H	C ₂₃ H ₄₈ O ₇	Ganoderal A	2		HMDB
440.35587	439.3479	H	C ₂₉ H ₄₅ O ₂ N		3		
442.33521	441.3273	H	C ₂₈ H ₄₃ O ₃ N		3		
445.31091	444.303	Na	C ₂₂ H ₄₇ O ₇ Na		3		
446.29337	445.2854	H	C ₂₇ H ₃₉ O ₅ N		3		
447.29047	446.2825	Na	C ₂₈ H ₄₀ O ₃ Na		3		
453.33975	452.3318	H	C ₂₃ H ₄₈ O ₈		3		
454.37268	453.3647	H	C ₃₀ H ₄₇ O ₂ N		3		
459.32791	458.32	Na	C ₃₀ H ₄₄ O ₂ Na		3		
465.20685	464.1989	H	C ₃₁ H ₂₈ O ₄		3		
467.35529	466.3473	H	C ₃₁ H ₄₆ O ₃		3		
468.3866	467.3787	H	C ₃₁ H ₄₉ O ₂ N		3		
470.36639	469.3585	H	C ₃₀ H ₄₇ O ₃ N		3		
473.29297	472.285	H	C ₂₈ H ₄₀ O ₆		3		
474.32428	473.3163	H	C ₂₈ H ₄₃ O ₅ N		3		
475.32141	474.3135	Na	C ₃₀ H ₄₄ O ₃ Na		3		
484.38184	483.3739	H	C ₃₁ H ₄₉ O ₃ N		3		

489.33694	488.329	Na	C ₃₁ H ₄₆ O ₃ Na	3		
490.31946	489.3115	H	C ₂₈ H ₄₃ O ₆ N	3		
497.36581	496.3579	H	C ₂₅ H ₅₂ O ₉	3		
498.39899	497.391	H	C ₃₂ H ₅₁ O ₃ N	3		
500.37616	499.3682	H	C ₃₁ H ₄₈ O ₄ N	3		
511.38129	510.3733	H	C ₃₃ H ₅₀ O ₄	3		
512.41241	511.4045	H	C ₃₃ H ₅₃ NO ₃	3		
514.39252	513.3846	H	C ₃₂ H ₅₁ O ₄ N	3		
519.13934	518.1314	H	C ₂₇ H ₂₂ N ₂ O ₉	3		
519.34741	518.3395	Na	C ₂₅ H ₅₂ O ₉ Na	3		
520.32983	519.3219	H	C ₃₀ H ₄₁ N ₅ O ₃	3		
528.4079	527.4	H	C ₃₃ H ₅₃ O ₄ N	3		
533.36273	532.3548	Na	C ₂₆ H ₅₄ O ₉ Na	3		
534.34766	533.3397	H	C ₃₁ H ₄₃ O ₃ N ₅	3		
536.16595	535.158	H	C ₂₇ H ₂₅ N ₃ O ₉	3		
541.39209	540.3841	H	C ₃₄ H ₅₂ O ₅	3		
542.42548	541.4175	H	C ₃₄ H ₅₅ NO ₄	3		
555.40735	554.3994	H	C ₃₅ H ₅₄ O ₅	3		
558.41858	557.4106	H	C ₃₄ H ₅₅ O ₅ N	3		
558.42041	557.4125	H	C ₃₄ H ₅₅ O ₅ N	3		
563.3739	562.366	Na	C ₂₇ H ₅₆ O ₁₀ Na	3		
564.3562	563.3483	H	C ₃₁ H ₄₄ O ₈ N	3		
572.43414	571.4262	H	C ₃₅ H ₅₇ O ₅ N	3		
577.38879	576.3809	Na	C ₃₅ H ₅₄ O ₅ Na	3		
578.37268	577.3647	H	C ₃₂ H ₅₀ O ₈ N	3		
584.27246	583.2645	H	C ₃₄ H ₃₇ N ₃ O ₆	3		
586.45233	585.4444	H	C ₃₀ H ₅₉ N ₅ O ₆	3		
602.44495	601.437	H	C ₃₆ H ₅₈ O ₆ N	3		
610.18158	609.1736	H	C ₃₃ H ₂₇ O ₉ N ₃	3		
612.37201	611.3641	H	C ₃₃ H ₄₉ N ₅ O ₆	3		
616.46002	615.4521	H	C ₃₇ H ₆₁ O ₆ N	3		
625.32281	624.3149	Na	C ₃₆ H ₄₆ N ₂ O ₆ Na	3		
646.47107	645.4631	H	C ₃₈ H ₆₃ O ₇ N	3		
656.39819	655.3903	H	C ₃₅ H ₅₃ N ₅ O ₇	3		
660.48578	659.4778	H	C ₄₀ H ₆₁ O ₃ N ₅	3		
684.20551	683.1976	H	C ₃₇ H ₃₃ NO ₁₂	3		
690.49689	689.4889	H	C ₄₀ H ₆₇ O ₈ N	3		
700.42438	699.4164	H	C ₃₇ H ₅₇ N ₅ O ₈	3		
704.5116	703.5037	H	C ₄₁ H ₆₉ O ₈ N	3		
744.45081	743.4429	H	C ₃₈ H ₆₅ O ₁₃ N	3		
748.53754	747.5296	H	C ₃₇ H ₇₃ N ₅ O ₁₀	3		
758.22321	757.2153	H	C ₄₃ H ₃₅ O ₁₂ N	3		
788.4765	787.4686	H	C ₄₁ H ₆₅ N ₅ O ₁₀	3		
832.23999	831.2321	H	C ₅₀ H ₃₃ O ₈ N ₅	3		
832.50262	831.4947	H	C ₄₃ H ₆₉ N ₅ O ₁₁	3		

Tabella A2 rappresentante tutte le specie individuate in negativo. Per tutte le specie è indicato il rapporto m/z, la massa, il tipo di specie ionica, la formula bruta e il grado di assegnazione spiegato nel capitolo 9.3. Per alcune è stato possibile dare l'assegnazione e l'origine.

m/z	Massa	Specie ionica carica (-)	Formula	Assegnazione	Grado di assegnazione	Origine	Riferimento
108.021851	109.0298	H	C ₆ H ₅ O ₂		3		
121.02951	122.0375	H	C ₇ H ₆ O ₂	Acido benzoico	2	Pirolisi lignina	Oros & Simoneit, 2001
122.037331	123.0453	H	C ₃ H ₁₀ O ₂ NP		3		
124.016701	125.0246	H	C ₂ H ₈ NO ₃ P		3		
125.060783	126.0687	H	C ₇ H ₁₀ O ₂		3		
125.097191	126.1051	H	C ₈ H ₁₄ O		3		
128.035339	129.0433	H	C ₅ H ₇ NO ₃	Acido piroglutammico	2	Aminoacidi	HMDB
129.019363	130.0273	H	C ₅ H ₆ O ₄		3		
131.034927	132.0429	H	C ₅ H ₈ O ₄		3		
135.045273	136.0532	H	C ₈ H ₈ O ₂		3		
137.024384	138.0323	H	C ₇ H ₆ O ₃	Acido idrossibenzioco	2	Pirolisi lignina	Oros & Simoneit, 2001
137.035599	138.0435	H	C ₆ H ₆ O ₂ N ₂		3		
138.019638	139.0276	H	C ₆ H ₅ NO ₃	Nitro fenolo	2	Pirolisi lignina	Kahnt 2013
138.032181	139.0401	H	C ₃ H ₁₀ NO ₃ P		3		
139.014908	140.0228	H	C ₅ H ₄ N ₂ O ₃		3		
143.034943	144.0429	H	C ₆ H ₈ O ₄	1,4:3,6-Dianidro-β-D-glucopiranosio	2	Cellulosa	Oros & Simoneit, 2001
146.02475	147.0327	H	C ₈ H ₅ O ₂ N		3		
147.045059	148.053	H	C ₉ H ₈ O ₂	Acido cinnamico	2	Naturale	Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, 2000
149.060684	150.0686	H	C ₉ H ₁₀ O ₂	4-vinilguaiacolo	2	Pirolisi lignina	Kitanovski 2014
151.039917	152.0479	H	C ₈ H ₈ O ₃	Acido p- anisico	2	Pirolisi lignina	Oros & Simoneit, 2001; Simoneit 2002
152.035202	153.0431	H	C ₇ H ₇ NO ₃	metil-4-nitrofenolo	2	Pirolisi lignina	Kitanovski 2014;
153.006653	154.0146	H	C ₄ H ₂ O ₃ N ₄		3		
153.019196	154.0271	H	C ₇ H ₆ O ₄	Acido β resorcilico	2	Naturale	Bolton 1986
153.030563	154.0385	H	C ₆ H ₆ N ₂ O ₃		3		
154.014603	155.0225	H	C ₆ H ₅ NO ₄	4-nitrocatecolo	2	Pirolisi lignina	Kahnt 2013
161.009033	162.017	H	C ₅ H ₆ O ₆		3		
161.0242	162.0321	H	C ₉ H ₆ O ₃		3		
161.035522	162.0435	H	C ₈ H ₆ N ₂ O ₂		3		
161.060654	162.0686	H	C ₁₀ H ₁₀ O ₂		3		
162.019714	163.0277	H	C ₈ H ₅ NO ₃		3		
163.039993	164.0479	H	C ₉ H ₈ O ₃	Acido p-cumarico	2	Pirolisi cellulosa	Oros & Simoneit, 2001; Kitanovski 2014
164.035172	165.0431	H	C ₈ H ₇ NO ₃		3		
164.071487	165.0794	H	C ₉ H ₁₁ O ₂ N		3		
165.019241	166.0272	H	C ₈ H ₆ O ₄		3		
166.026962	167.0349	H	C ₄ H ₁₀ NO ₄ P	Acido 1-acetammido etil fosfonico	2		
166.050751	167.0587	H	C ₈ H ₉ NO ₃		3		
167.001801	168.0097	H	C ₄ H ₈ O ₅ S		3		
167.038162	168.0461	H	C ₅ H ₁₂ O ₄ S		3		
167.993713	169.0017	H	C ₆ H ₃ NO ₅		3		
168.030106	169.038	H	C ₇ H ₇ NO ₄	Metil nitrocatecolo	2	Pirolisi lignina	Kahnt 2013

169.017426	170.0254	H	C ₄ H ₁₀ O ₅ S		3		
171.044998	172.0529	H	C ₁₁ H ₈ O ₂		3		
171.066071	172.074	H	C ₈ H ₁₂ O ₄		3		
173.001633	174.0096	H	C ₆ H ₇ O ₄ P		3		
173.045334	174.0533	H	C ₇ H ₁₀ O ₅	Acido shikimico	2	Naturale	Herrmann 1999
173.081757	174.0897	H	C ₈ H ₁₄ O ₄		3		
173.986374	174.9943	H	C ₅ H ₅ NO ₄ S		3		
175.076233	176.0842	H	C ₁₁ H ₁₂ O ₂		3		
177.055481	178.0634	H	C ₁₀ H ₁₀ O ₃	Coniferil aldeide	2	Pirolisi lignina	Oros & Simoneit, 2001; Kitanovski 2014
178.014374	179.0223	H	C ₈ H ₅ NO ₄		3		
178.965363	179.9733	H	C ₄ H ₄ O ₆ S		3		
179.034805	180.0427	H	C ₉ H ₈ O ₄	Acido caffeico	2	Pirolisi lignina	Oros & Simoneit, 2001
180.029984	181.0379	H	C ₈ H ₇ NO ₄		3		
180.066406	181.0743	H	C ₉ H ₁₁ O ₃ N		3		
181.014023	182.022	H	C ₈ H ₆ O ₅		3		
181.050293	182.0582	H	C ₉ H ₁₀ O ₄	Siringaldeide	2	Pirolisi lignina	Oros & Simoneit, 2001
182.009445	183.0174	H	C ₇ H ₅ NO ₅	Acido nitrosalicilico	2	Pirolisi lignina	Oros & Simoneit, 2001
182.045547	183.0535	H	C ₈ H ₉ NO ₄		3		
182.996658	184.0046	H	C ₄ H ₈ O ₆ S		3		
183.017075	184.025	H	C ₅ H ₄ N ₄ O ₄		3		
185.045166	186.0531	H	C ₈ H ₁₀ O ₅	Acido 2-[(Z)-2-metilpent-2-enoil]ossi-2-ossoacetico	2		
185.060486	186.0684	H	C ₁₂ H ₁₀ O ₂		3		
186.113297	187.1212	H	C ₉ H ₁₇ NO ₃	Acido 8-ammino-7-ossanonanoico	2		
187.060913	188.0689	H	C ₈ H ₁₂ O ₅		3		
187.09729	188.1052	H	C ₉ H ₁₆ O ₄	Acido α-ω-nonanedioico	2		
188.035004	189.0429	H	C ₁₀ H ₇ NO ₃		3		
189.0401	190.048	H	C ₇ H ₁₀ O ₆		3		
191.019394	192.0273	H	C ₆ H ₈ O ₇		3		
191.034607	192.0425	H	C ₁₀ H ₈ O ₄	Acido 3,4-metilendiossiccinnamico	2		
191.05571	192.0636	H	C ₇ H ₁₂ O ₆		3		
192.029907	193.0378	H	C ₉ H ₇ NO ₄		3		
193.013947	194.0219	H	C ₉ H ₆ O ₅		3		
193.050278	194.0582	H	C ₁₀ H ₁₀ O ₄		3		
194.045547	195.0535	H	C ₉ H ₉ NO ₄		3		
195.032883	196.0408	H	C ₆ H ₁₂ O ₅ S		3		
195.0448	196.0527	H	C ₁₃ H ₈ O ₂		3		
195.069336	196.0773	H	C ₇ H ₁₆ O ₄ S		3		
196.024811	197.0328	H	C ₈ H ₇ NO ₅		3		
196.061081	197.069	H	C ₉ H ₁₁ NO ₄		3		
197.012222	198.0202	H	C ₅ H ₁₀ O ₆ S	Acido 5-sulfossi valerico	2		
197.020065	198.028	H	C ₇ H ₆ N ₂ O ₅		3		
198.040405	199.0483	H	C ₈ H ₉ NO ₅		3		
199.076035	200.084	H	C ₁₃ H ₁₂ O ₂		3		
201.076523	202.0845	H	C ₉ H ₁₄ O ₅		3		
201.1129	202.1208	H	C ₁₀ H ₁₈ O ₄		3		
202.050583	203.0585	H	C ₁₁ H ₉ NO ₃		3		
203.055634	204.0636	H	C ₈ H ₁₂ O ₆		3		
203.082153	204.0901	H	C ₁₁ H ₁₂ O ₂ N ₂		3		
204.123734	205.1317	H	C ₉ H ₁₉ O ₄ N		3		
206.009216	207.0172	H	C ₉ H ₅ NO ₅		3		
206.045471	207.0534	H	C ₁₀ H ₉ NO ₄		3		
207.011597	208.0195	H	C ₁₀ H ₈ O ₃ S		3		

207.069275	208.0772	H	C ₈ H ₁₆ O ₄ S		3		
207.138687	208.1466	H	C ₁₃ H ₂₀ O ₂		3		
208.061157	209.0691	H	C ₁₀ H ₁₁ NO ₄		3		
209.008743	210.0167	H	C ₉ H ₆ O ₆		3		
209.01207	210.02	H	C ₆ H ₁₀ O ₆ S		3		
209.045258	210.0532	H	C ₁₀ H ₁₀ O ₅		3		
209.079086	210.087	H	C ₇ H ₁₀ N ₆ O ₂	3-ammino-5-(2-idrossietilammino)-2H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4-one	2		
209.084839	210.0928	H	C ₈ H ₁₈ O ₄ S		3		
209.094437	210.1024	H	C ₈ H ₁₉ O ₄ P		3		
210.040588	211.0485	H	C ₉ H ₉ NO ₅		3		
210.991394	211.9993	H	C ₅ H ₈ O ₇ S	4-O-metil 1-O-sulfo butandioato	2		
211.027786	212.0357	H	C ₆ H ₁₂ O ₆ S		3		
211.03566	212.0436	H	C ₈ H ₈ N ₂ O ₅		3		
213.007095	214.015	H	C ₅ H ₁₀ O ₇ S	Acido 2-sulfoperossi valerico	2		
213.043427	214.0514	H	C ₆ H ₁₄ O ₆ S		3		
213.091736	214.0997	H	C ₁₄ H ₁₄ O ₂		3		
214.050461	215.0584	H	C ₁₂ H ₉ NO ₃		3		
215.034668	216.0426	H	C ₁₂ H ₈ O ₄		3		
215.128494	216.1364	H	C ₁₁ H ₂₀ O ₄		3		
216.066177	217.0741	H	C ₁₂ H ₁₁ NO ₃		3		
217.017242	218.0252	H	C ₈ H ₁₀ O ₅ S		3		
217.071289	218.0792	H	C ₉ H ₁₄ O ₆		3		
220.024658	221.0326	H	C ₁₀ H ₇ NO ₅		3		
221.066238	222.0742	H	C ₈ H ₁₄ O ₇		3		
223.02771	224.0356	H	C ₇ H ₁₂ O ₆ S		3		
223.064163	224.0721	H	C ₈ H ₁₆ O ₅ S	sulfo ottanoato	2		
223.100525	224.1085	H	C ₉ H ₂₀ O ₄ S		3		
225.006912	226.0149	H	C ₆ H ₁₀ O ₇ S		3		
225.043365	226.0513	H	C ₇ H ₁₄ O ₆ S		3		
225.055237	226.0632	H	C ₁₄ H ₁₀ O ₃		3		
226.035355	227.0433	H	C ₉ H ₉ NO ₆		3		
226.986282	227.9942	H	C ₅ H ₈ O ₈ S		3		
227.011185	228.0191	H	C ₈ H ₈ N ₂ O ₄ S		3		
227.022614	228.0306	H	C ₆ H ₁₂ O ₇ S		3		
227.030518	228.0385	H	C ₈ H ₈ N ₂ O ₆		3		
227.103256	228.1112	H	C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₄		3		
228.017761	229.0257	H	C ₁₅ H ₁₆ O ₂		3		
228.029739	229.0377	H	C ₁₂ H ₇ O ₄ N		3		
229.008209	230.0161	H	C ₁₂ H ₇ NO ₄		3		
229.050186	230.0581	H	C ₁₁ H ₆ N ₂ O ₂ S		3		
230.045349	231.0533	H	C ₁₃ H ₁₀ O ₄	Acido [1,1-bifenil]-4-carbossilico	2		
231.03273	232.0407	H	C ₁₂ H ₉ NO ₄		3		
231.08696	232.0949	H	C ₉ H ₁₂ O ₅ S		3		
232.028046	233.036	H	C ₁₀ H ₁₆ O ₆		3		
233.019806	234.0277	H	C ₈ H ₁₁ NO ₅ S		3		
233.066254	234.0742	H	C ₉ H ₁₄ O ₇		3		
233.154251	234.1622	H	C ₉ H ₁₄ O ₇		3		
237.076462	238.0844	H	C ₁₂ H ₁₄ O ₅	metil sinapato	2	Pirolisi lignina	Oros & Simoneit, 2001; Kitanovski 2014; Simoneit 2002
238.071548	239.0795	H	C ₁₁ H ₁₃ O ₅ N		3		
238.986267	239.9942	H	C ₆ H ₈ O ₈ S		3		
239.0224	240.0303	H	C ₇ H ₁₂ O ₇ S		3		

239.059097	240.067	H	C ₈ H ₁₆ O ₆ S		3	
240.05098	241.0589	H	C ₁₀ H ₁₁ NO ₆		3	
241.001785	242.0097	H	C ₆ H ₁₀ O ₆ S		3	
241.050095	242.058	H	C ₁₄ H ₁₀ O ₄		3	
242.045258	243.0532	H	C ₁₃ H ₉ NO ₄		3	
242.175613	243.1836	H	C ₁₃ H ₂₅ NO ₃		3	
245.011917	246.0199	H	C ₉ H ₁₀ O ₆ S		3	
246.007202	247.0151	H	C ₈ H ₉ NO ₆ S	metil 4-ammino-2-sulfoossibenzoato	2	
246.04361	247.0515	H	C ₉ H ₁₃ NO ₅ S		3	
246.991272	247.9992	H	C ₈ H ₈ O ₇ S		3	
248.077103	249.085	H	C ₉ H ₁₅ NO ₇		3	
250.129013	251.137	H	C ₁₀ H ₂₁ O ₆ N		3	
250.144333	251.1523	H	C ₁₄ H ₂₁ NO ₃		3	
251.022476	252.0304	H	C ₈ H ₁₂ O ₇ S		3	
251.058823	252.0668	H	C ₉ H ₁₆ O ₆ S		3	
253.038071	254.046	H	C ₈ H ₁₄ O ₇ S		3	
253.074615	254.0826	H	C ₉ H ₁₈ O ₆ S		3	
253.11087	254.1188	H	C ₁₀ H ₂₂ O ₅ S		3	
257.077362	258.0853	H	C ₁₀ H ₁₄ O ₆ N ₂		3	
258.02829	259.0362	H	C ₆ H ₁₃ NO ₈ S		3	
260.007477	261.0154	H	C ₅ H ₁₁ O ₉ NS		3	
261.006836	262.0148	H	C ₉ H ₁₀ O ₇ S		3	
261.13382	262.1418	H	C ₁₂ H ₂₂ O ₆		3	
262.002106	263.01	H	C ₁₂ H ₉ NO ₂ S ₂		3	
265.016998	266.0249	H	C ₁₂ H ₁₀ O ₅ S		3	
265.037994	266.0459	H	C ₉ H ₁₄ O ₇ S		3	
267.017426	268.0254	H	C ₈ H ₁₂ O ₈ S		3	
267.053772	268.0617	H	C ₉ H ₁₆ O ₇ S		3	
267.09024	268.0982	H	C ₁₀ H ₂₀ O ₆ S		3	
267.126434	268.1344	H	C ₁₁ H ₂₄ O ₅ S		3	
269.032928	270.0409	H	C ₈ H ₁₄ O ₈ S		3	
269.069397	270.0773	H	C ₉ H ₁₈ O ₇ S	(4-idrossi-6-metossi-3,5-dimetilossan-2-il)metil idrogeno solfato	2	
273.022003	274.0299	H	C ₁₄ H ₁₀ O ₄ S		3	
274.002014	275.01	H	C ₁₃ H ₉ NO ₂ S ₂		3	
276.017731	277.0257	H	C ₉ H ₁₃ NO ₅ P ₂		3	
279.053802	280.0617	H	C ₁₀ H ₁₆ O ₇ S		3	
279.059204	280.0671	H	C ₁₆ H ₁₂ N ₂ OS		3	
281.032928	282.0409	H	C ₉ H ₁₄ O ₈ S		3	
281.069427	282.0774	H	C ₁₀ H ₁₈ O ₇ S	4-O-propil 1-O-sulfo 2-propilbutandioato	2	
283.048553	284.0565	H	C ₉ H ₁₆ O ₈ S		3	
284.043915	285.0519	H	C ₈ H ₁₅ NO ₈ S		3	
287.222107	288.23	H	C ₁₆ H ₃₂ O ₄		3	
289.037933	290.0459	H	C ₁₁ H ₁₄ O ₇ S		3	
293.175049	294.183	H	C ₁₇ H ₂₆ O ₄		3	
294.064545	295.0725	H	C ₁₄ H ₁₇ NO ₂ S ₂		3	
295.048401	296.0563	H	C ₁₀ H ₁₆ O ₈ S		3	
295.136414	296.1444	H	C ₁₆ H ₂₄ O ₃ S		3	
296.022614	297.0306	H	C ₁₃ H ₁₅ NOS ₃		3	
297.02774	298.0357	H	C ₁₃ H ₁₄ O ₄ S ₂	(2-etilnaftalen-1-il)metilsulfanil idrogeno solfato	2	
297.064301	298.0722	H	C ₁₀ H ₁₈ O ₈ S		3	
299.133881	300.1418	H	C ₁₁ H ₂₄ O ₉		3	
299.164337	300.1723	H	C ₁₉ H ₂₄ O ₃		3	
307.157593	308.1655	H	C ₁₄ H ₂₈ O ₅ S	Sulfo tetradecanoato	2	
307.18811	308.1961	H	C ₁₄ H ₂₄ O ₂ N ₆		3	

309.151947	310.1599	H	C ₁₇ H ₂₆ O ₃ S		3		
310.059265	311.0672	H	C ₁₄ H ₉ N ₅ O ₄		3		
312.075226	313.0832	H	C ₁₄ H ₁₁ N ₅ O ₄		3		
312.093933	313.1019	H	C ₁₀ H ₁₉ O ₁₀ N		3		
313.070831	314.0788	H	C ₁₇ H ₁₄ O ₆		3		
313.180023	314.188	H	C ₂₀ H ₂₆ O ₃	Acido 3-Ossodeidro abietico	2	Pirolisi lignina	Oros & Simoneit, 2001
319.067535	320.0755	H	C ₁₂ H ₁₆ O ₁₀		3		
320.043549	321.0515	H	C ₁₄ H ₁₁ O ₈ N		3		
322.02298	323.0309	H	C ₁₀ H ₁₅ NO ₇ P ₂		3		
326.054108	327.062	H	C ₁₀ H ₁₇ O ₄ NS		3		
327.997742	329.0057	H	C ₁₃ H ₇ N ₅ O ₂ S ₂		3		
333.206116	334.2141	H	C ₂₀ H ₃₀ O ₄		3		
335.04834	336.0563	H	C ₁₈ H ₁₂ N ₂ O ₃ S		3		
336.089996	337.0979	H	C ₁₆ H ₁₉ NO ₅ S		3		
338.065948	339.0739	H	C ₁₈ H ₁₃ NO ₆		3		
342.049316	343.0573	H	C ₁₄ H ₁₇ NO ₅ S ₂		3		
347.115906	348.1238	H	C ₁₉ H ₁₆ N ₄ O ₃		3		
347.142426	348.1504	H	C ₁₉ H ₂₅ O ₄ P		3		
351.183502	352.1914	H	C ₁₆ H ₃₂ O ₆ S		3		
357.030182	358.0381	H	C ₁₅ H ₁₀ O ₅ N ₄ S		3		
357.060577	358.0685	H	C ₁₈ H ₁₄ O ₈		3		
360.238068	361.246	H	C ₁₈ H ₃₅ O ₆ N		3		
365.162903	366.1708	H	C ₁₆ H ₃₀ O ₇ S		3		
367.18808	368.196	H	C ₁₈ H ₂₈ N ₂ O ₆		3		
373.054901	374.0628	H	C ₁₃ H ₁₄ N ₂ O ₁₁		3		
381.058014	382.066	H	C ₂₀ H ₁₄ O ₈		3		
383.07605	384.084	H	C ₂₀ H ₁₆ O ₈		3		
401.086517	402.0945	H	C ₂₀ H ₁₈ O ₉		3		
409.309998	410.3179	H	C ₂₈ H ₄₂ O ₂		3		
411.113159	412.1211	H	C ₂₂ H ₁₉ O ₈		3		
419.000488	420.0084	H	C ₁₇ H ₁₂ N ₂ O ₇ S ₂		3		
424.066315	425.0743	H	C ₁₇ H ₁₉ N ₃ O ₆ S ₂		3		
433.1492	434.1571	H	C ₂₂ H ₂₆ O ₉		3		
440.194641	441.2026	H	C ₂₇ H ₂₇ N ₃ O ₃		3		
463.191742	464.1997	H	C ₃₁ H ₂₈ O ₄		3		
509.197205	510.2051	H	C ₃₂ H ₃₀ O ₆		3		
553.283203	554.2911	H	C ₃₃ H ₃₈ O ₄ N ₄		3		
582.259216	583.2672	H	C ₃₄ H ₃₇ N ₃ O ₆		3		
606.072205	607.0801	H	C ₁₇ H ₂₇ N ₃ O ₁₇ P ₂		3		