



LCxLC-HRMS PER L'ANALISI “NON-TARGET” DI PFAS

La cromatografia liquida bidimensionale (LCxLC) combinata alla spettrometria di massa in alta risoluzione (HRMS) è una soluzione analitica vantaggiosa per l'analisi di campioni complessi e l'identificazione di strutture note o incognite. Questo studio riassume i vantaggi della tecnica LCxLC-HRMS per l'identificazione “non-target” di sostanze poli- e perfluoroalchiliche (PFAS).

Introduzione

Le sostanze per- e polifluoroalchiliche o PFAS (dall'inglese “per- and polyfluoroalkyl substances”) sono al centro dell'attenzione della comunità scientifica da ormai più di due decenni, proprio a causa delle crescenti evidenze sperimentali sulla loro presenza ubiquitaria nell'ambiente e sulla nostra esposizione [1]. Infatti, i risultati recentemente pubblicati da Greenpeace a gennaio 2025 a seguito di una campagna di monitoraggio sulle acque potabili italiane, hanno riportato che il 79% dei campioni analizzati sono risultati positivi alla contaminazione da PFAS [2].

I risultati dello studio di Greenpeace rappresentano solo uno degli scenari allarmanti che, a livello europeo, hanno portato all'emanazione di direttive comunitarie volte a introdurre limiti per i PFAS sia nelle acque potabili [3] che in matrici alimentari [4].

Per comprendere meglio i rischi e le conseguenze per gli organismi viventi derivanti dall'esposizione a queste sostanze, è fondamentale possedere una conoscenza accurata dello spazio chimico dei PFAS. Infatti, dalle prime evidenze di una contaminazione su larga scala di acido perfluorooctanoico (PFOA) e acido perfluorooctansolfonico (PFOS), a causa delle diffuse esigenze industriali, si è assistito alla sintesi di precursori e prodotti alternativi fluorurati, che hanno portato a oltre 4.700 strutture uniche di PFAS distribuite in più di 130 serie omologhe (e.g., acidi carbossilici, acidi solfonici, solfonammidi ed eteri) [5].

Per avere un'immagine più nitida di questo complesso spazio chimico, in Fig. 1 è riportata la distribuzione per più di 3000 strutture uniche di PFAS, risultante dall'analisi delle componenti principali di variabili fisico-chimiche e strutturali come peso molecolare e XLogP, estratte da PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>). È interessante notare come le strutture in giallo, che comprendono l'elenco di PFAS monitorate dall'Unione Europea nelle matrici sopramenzionate e altre strutture comunemente analizzate in campioni ambientali, coprono uno spazio chimico molto limitato, rispetto alla complessità strutturale che caratterizza questo gruppo di sostanze.

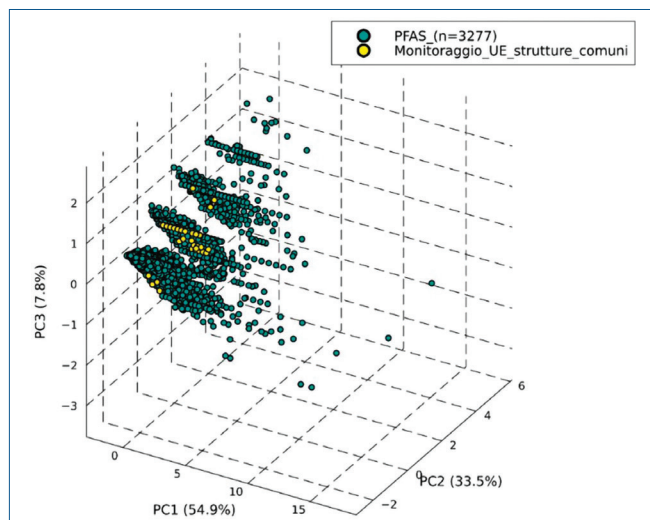


Fig. 1 - Grafico degli scores dell'analisi delle componenti principali sulle variabili (i) peso molecolare, (ii) XLogP, siti (iii) donatori e (iv) accettori di protoni e (v) area superficiale polarizzabile (estratte da PubChemCrawler.jl; <https://doi.org/10.1016/j.cogsc.2023.100775>) di 3277 strutture uniche di PFAS. Le strutture in giallo indicano i PFAS monitorati a livello europeo a livello ambientale e alimentare





Si rende, quindi, necessario l'impiego di strategie analitiche in grado di "catturare" l'ampio spazio chimico dei PFAS. In questo contesto, infatti, sono sempre più diffusi gli approcci di analisi "non-target" ("non-target analysis", NTA), che, grazie all'utilizzo della spettrometria di massa in alta risoluzione ("high-resolution mass spectrometry", HRMS) in combinazione con la cromatografia liquida ("liquid chromatography", LC) e/o la mobilità ionica [6], risultano efficaci nel monitoraggio dell'esposizione ambientale di PFAS. Infatti, l'acquisizione "comprehensive" della massa accurata degli ioni precursori e dei frammenti durante la separazione cromatografica permette di ottenere "features" analitiche con un'elevata informazione strutturale (formula molecolare e frammenti diagnostici), svincolando questo approccio dalla necessità di standard di riferimento, che sono impiegati nei protocolli routinari di monitoraggio, ma che per molte di queste strutture non sono disponibili [7]. Recentemente, per supportare questo contesto, è stato anche definito un sistema di assegnazione di livello di confidenza specifico per l'identificazione di PFAS mediante NTA LC-HRMS [8].

Grazie all'impiego di questa tecnica è stato possibile espandere la conoscenza dello spazio chimico delle serie omologhe di PFAS, inclusi composti anionici, cationici e zwitterionici presenti in specifici prodotti industriali come, ad esempio, le schiume acquose filmogene ("aqueous film-forming foams", AFFF), nonché il loro impatto e la loro diffusione in diverse matrici ambientali [9, 10]. Tuttavia, esistono ancora delle limitazioni in ambito analitico nell'analisi "comprehensive" dello spazio chimico di PFAS. Infatti, poiché circa il 90% delle piattaforme NTA LC-HRMS dedicate impiega metodi standard su fasi stazionarie ottadeciliche in combinazione con un'eluizione a gradiente lineare in metanolo o acetonitrile, vi è una maggiore copertura nella rilevazione e nell'identificazione di strutture con XLogP compreso tra 1,5 e 10. Questo implica che i PFAS a più basso peso molecolare (note anche come "PFAS a catena corta") e i precursori di sintesi più polari (es. acido triflico e trifluoroacetico, XLogP<1) non sono rilevati in queste condizioni analitiche, in quanto scarsamente o per nulla ritenuti. Inoltre, l'elevata idrofobicità che guida la ritenzione in fase inversa, può generare

un'elevata co-eluzione di diverse serie omologhe di PFAS che influisce sulla qualità della deconvoluzione degli spettri di massa dei precursori e dei frammenti, fondamentale per eseguire un'indagine strutturale di elevata qualità che garantisca un elevato tasso di annotazione. Per questo motivo, pur impiegando un approccio NTA virtualmente "comprehensive", lo spazio chimico effettivamente rilevabile dei PFAS si riduce a circa un 10% delle strutture esistenti [11].

La necessità di ampliare il numero di PFAS rilevabili con un unico metodo ha portato all'impiego di fasi stazionarie alternative, come quelle a "modalità di ritenzione mista" ("mixed-mode chromatography", MMC) funzionalizzate con scambiatori anionici deboli. Sebbene questi studi siano stati condotti in modo "target", sono stati ottenuti risultati ottimali nella rilevazione simultanea di differenti serie omologhe di PFAS nell'intervallo C1-C14 della lunghezza della catena alchilica [12, 13]. Infatti, variando opportunamente pH e forza ionica della fase mobile, il contributo dello scambio ionico alla ritenzione in funzione del gruppo polare carico (ad esempio carbossilato vs solfonato) è reso ancora più effettivo, incrementando così la distribuzione dei PFAS nello spazio cromatografico.

Dall'evidenza di questa opportunità di incrementare lo spazio chimico rilevabile dei PFAS, nasce l'idea di declinare la combinazione di fase stazionarie C18 con fasi MMC in un approccio di cromatografia liquida bidimensionale "comprehensive" (LCxLC) accoppiato alla rilevazione NTA HRMS.

Questa configurazione permette teoricamente, grazie all'ortogonalità dei meccanismi di separazione impiegati, di aumentare la "peak capacity", ovvero il numero di picchi risolti all'interno del dominio cromatografico [14, 15]; inoltre, il costante frazionamento dalla prima dimensione analitica, permette di trasferire tutte le frazioni del campione in esame alla seconda dimensione e quindi all'analizzatore HRMS, che nell'ottica NTA è ottimale per raccogliere la più ampia informazione sullo spazio chimico investigato.

Vedremo come ottimizzando la separazione nelle due dimensioni cromatografiche, sia possibile ottenere un guadagno nella qualità della rilevazione e della identificazione di PFAS nel dominio MS (sia precursori che frammenti).

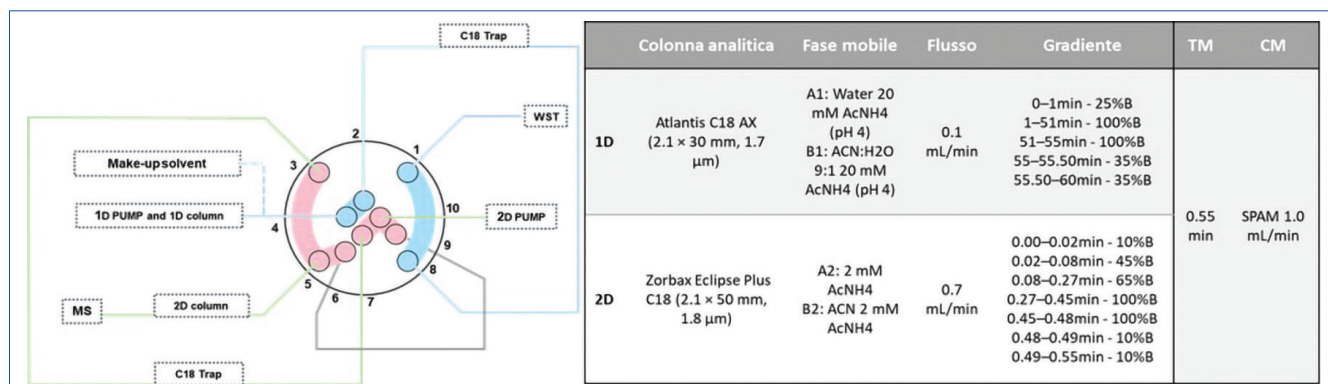


Fig. 2 - (Sinistra) Sistema di valvole 2D-LC adottato per le strategie di modulazione assistita da fase stazionaria (“stationary phase assisted modulation” SPAM). (Destra) Fasi stazionarie e composizione delle fasi mobili, flusso operativo (mL/min) e programma di gradiente per le due dimensioni. Tempo di modulazione (TM) e configurazione di modulazione (CM), incluso flusso operativo del “make-up solvent”

II Metodo LCxLC-HRMS

La piattaforma analitica impiegata per l’analisi LCxLC (Infinity LC Agilent, Waldbronn, Germania) è costituita da moduli opportunamente dedicati a ciascuna dimensione cromatografica, tra cui un autocampionatore con un “loop” da 50 μL, due pompe binarie, una pompa isocratica, un comparto termostato per le colonne analitiche e un sistema di modulazione a valvole che impiega la modulazione assistita in fase stazionaria (“Stationary Phase Assisted Modulation”, SPAM). L’uso di SPAM consente di ridurre il fenomeno di “break-through” e sdoppiamento del picco in seconda dimensione riducendo il contenuto della frazione organica dalla prima dimensione utilizzando un

eluente di “make-up” (soluzione 2 mM di acetato di ammonio in acqua MilliQ). La configurazione del sistema è schematizzata in Fig. 2 (sinistra). Inoltre, per evitare la potenziale contaminazione delle analisi da PFAS derivanti dal cromatografo e dai solventi impiegati, è stata installata una colonna di ritardo con una fase stazionaria ottadecilica. In Fig. 2 (destra) sono riportate le condizioni ottimizzate del metodo bi-dimensionale, sia in termini di fase stazionaria che di fase mobile, modificatori e gradiente impiegati. Per la separazione cromatografica in prima dimensione è stata impiegata una colonna a scambio anionico debole Atlantis C18 AX, mentre in seconda dimensione è stata utilizzata una colonna a fase inversa Zorbax Eclipse Plus C18.

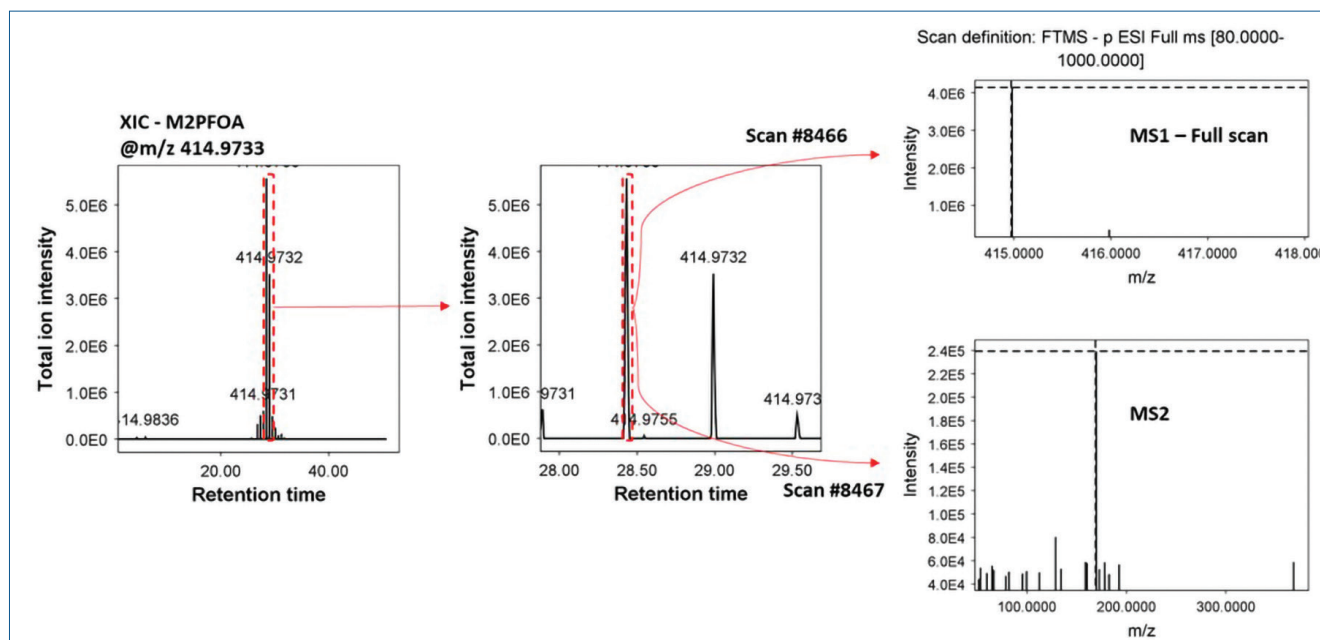


Fig. 3 - Dettagli del contributo della modulazione nel frazionamento del picco (M2PFOA, standard marcato isotopicamente) dalla prima alla seconda dimensione cromatografica e qualità dei dati HRMS (livelli MS1 e MS2)



Il volume d'iniezione è stato fissato a 20 μL sia per l'iniezione della miscela standard di 24 PFAS (0,5-1 mg L^{-1} in acqua/metanolo 80/20, v/v), che dei campioni di AFFF impiegati come caso studio rilevante in ambito analitico e ambientale.

Il sistema LCxLC è accoppiato ad un analizzatore di massa HRMS Orbitrap Q Exactive Plus di Thermo-Fisher Scientific tramite una sorgente di ionizzazione elettrospray (HESI-II). L'acquisizione in modalità "full scan" (MS1) sull'intera finestra cromatografica è stata eseguita applicando un potenziale negativo per la ionizzazione degli analiti, nel range di massa 80-1000 Da con risoluzione di 35.000 a 200 m/z .

La miscela di standard analitici ed i campioni sono stati acquisiti anche in modalità "tandem" (sia "data-dependent" che "data-independent") per registrare gli spettri di massa dei frammenti (MS2 o MS/MS) dei PFAS (note e non) per individuare gli ioni diagnostici funzionali alla loro identificazione. Come riportato in Fig. 3, la modulazione del picco cromatografico dalla prima alla seconda dimensione genera un sottoinsieme di separazioni per il singolo analita che garantisce un campionamento ottimale del picco in seconda dimensione (tempo di iniezione dell'analizzatore ≤ 100 ms) per acquisire entrambi gli spettri MS1 e MS2.

Ulteriori dettagli sul metodo analitico LCxLC-HRMS e -HRMS/MS sono reperibili nelle rispettive pubblicazioni [16, 17].

Risultati e discussione

Risoluzione nel dominio cromatografico del metodo LCxLC-HRMS

In Fig. 4 sono riportati i grafici di dispersione dello spazio bidimensionale relativi all'analisi di una miscela standard di 24 PFAS (Fig. 4A) e di un campione di AFFF (Fig. 4B) impiegando le condizioni LCxLC-HRMS sopramenzionate. Questa ricostruzione dei cromatogrammi LCxLC è stata ottenuta grazie ad un algoritmo NTA opportunamente sviluppato per l'identificazione di "feature" bidimensionali [16].

Un primo risultato molto interessante si riflette nell'elevata "peak capacity" del sistema LCxLC ($n'_{c,2D} = 342$) rispetto ad approcci monodimensionali impiegati per l'analisi di PFAS ($n'_c \sim 100$) [16].

Inoltre, la maggiore efficienza cromatografica nella prima e seconda dimensione (Fig. 4A) ha permesso di (i) separare in modo significativo i PFAS a catena corta (cioè $< C8$) e di (ii) mantenere la separazione della perfluoroottansulfonamide (PFOSA) dalle altre

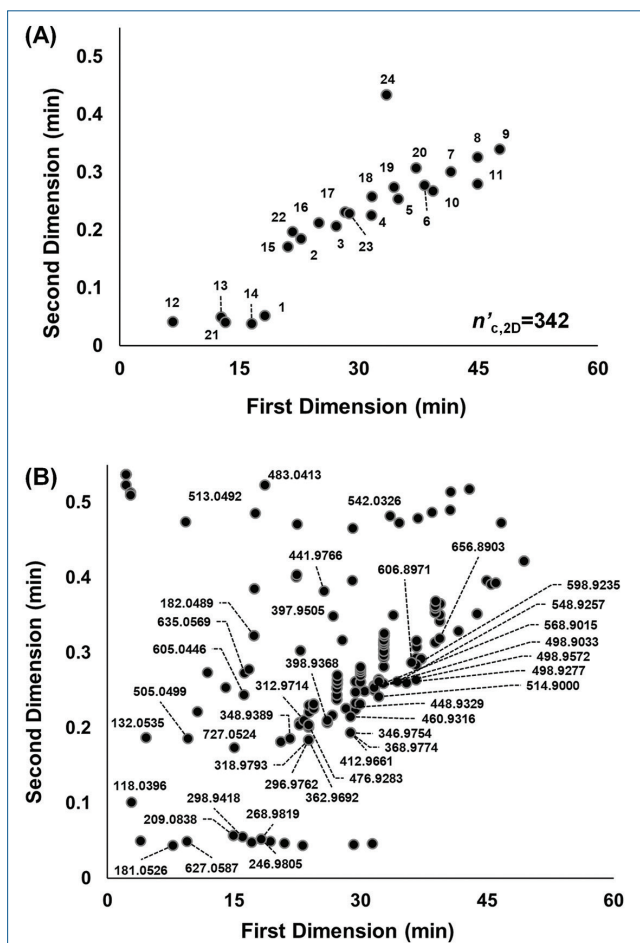


Fig. 4 - Grafici di dispersione bidimensionali (A) della miscela standard di 24 PFAS e (B) di un campione di AFFF (3M Light Water 3%). $n'_{c,2D}$ = capacità di picco per sistemi bidimensionali; 1 = PFHxA, 2 = PFHpA, 3 = PFOA, 4 = PFNA, 5 = PFDA, 6 = PFUnDA, 7 = PFDoDA, 8 = PFTrDA, 9 = PFTeDA, 10 = Me-FSA, 11 = Et-FSA, 12 = BuFA, 13 = FPFPeA, 14 = BuS, 15 = FPFPePeS, 16 = FPHxS, 17 = PFHpS, 18 = PFOS, 19 = PFNS, 20 = PFDS, 21 = Hx-FTS, 22 = Oc-FTS, 23 = D-FTS, 24 = PFOSA. I valori di massa accurata riportati nel grafico di dispersione del campione di AFFF si riferiscono ai potenziali PFAS in base all'analisi del difetto di massa di Kendrick

serie omologhe della miscela standard, evidenziando anche aree selettive di eluizione in funzione della struttura del gruppo polare di ciascun PFAS (come, ad esempio, acidi carbossilici vs solfonici). La Fig. 4B supporta questa evidenza, in quanto si ottiene una buona separazione nello spazio bidimensionale anche per il campione, in linea con la capacità di picco prevista per il sistema LCxLC. Infatti, seppur il campione sia caratterizzato da una maggiore complessità rispetto alla miscela standard, si possono distinguere le zone di eluizione approssimativamente comprese tra i seguenti intervalli di tempo di ritenzione t_R : (i) tra $t_{R1D} = 0-30$ min. e $t_{R2D} = 0,0-0,1$ min. attribuibile alla regione delle potenziali PFAS più polari, (ii) tra $t_{R1D} = 15-50$ min. e $t_{R2D} = 0,1-0,4$ min.

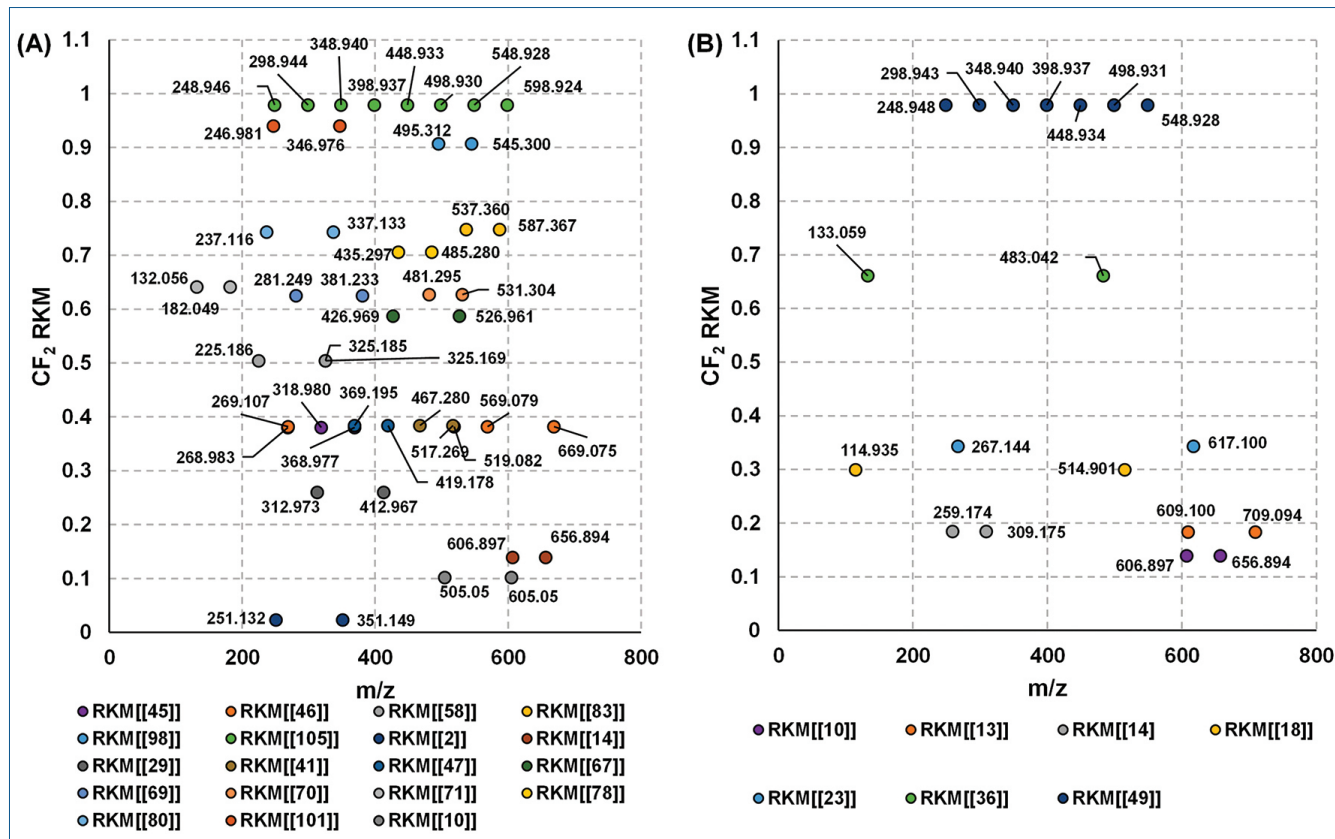


Fig. 5 - Grafici dell'andamento delle potenziali PFAS (m/z) vs il difetto di massa calcolato secondo l'approccio del "remainder of Kendrick mass" (RKM) per l'unità ripetente CF_2 (49,9968 Da). I grafici sono relativi all'allineamento dei dati (A) LCxLC-HRMS e (B) LC-HRMS di 2 campioni di AFFF (3M Light Water 3% e Orchidex 3% Eco). RKM[[i]] sono le potenziali serie omologhe di PFAS rilevate

relativa all'incremento di idrofobicità nella struttura chimica (ad esempio, allungamento della catena di serie omologhe).

Risoluzione nel dominio HRMS e HRMS/MS

In linea teorica, l'incremento della risoluzione cromatografica ottenuto con il metodo LCxLC-HRMS permette di aumentare anche la capacità di rilevazione nel dominio di massa di potenziali PFAS in campioni complessi. In Fig. 5 sono riportate le potenziali serie omologhe di PFAS rilevate in dati allineati dall'analisi di due campioni di AFFF, confrontando il metodo LCxLC-HRMS (Fig. 5A) con un metodo monodimensionale LC-HRMS (Fig. 5B). Le serie omologhe sono raggruppate in funzione del difetto di massa valutato come "remainder of Kendrick mass" (RKM[[i]]) per l'unità ripetente CF_2 [17]. È evidente a colpo d'occhio come il numero dei potenziali PFAS identificati sia maggiore nella configurazione bidimensionale rispetto all'analisi LC monodimensionale. Infatti, nell'ultimo caso, l'elevata frequenza di co-eluzione tra le serie omologhe di PFAS nei 2 campioni pe-

nalizza la deconvoluzione dei segnali nel dominio di massa per l'estrazione dei *features*, già a livello delle scansioni MS1 (ovvero, l'acquisizione dei segnali degli ioni precursori generati dopo la ionizzazione ESI). L'incremento della risoluzione nel dominio MS1 porta dei vantaggi anche nella qualità della frammentazione diagnostica delle PFAS. A tal proposito, in Fig. 6 vengono confrontati gli spettri di massa tandem LCxLC vs LC di due precursori di PFAS nei campioni investigati, valutando il rispettivo numero di frammenti ottenuti e la loro intensità espressa come rapporto segnale-rumore (S/N) in entrambe le configurazioni. La qualità degli spettri HRMS/MS ottenuti sotto separazione LCxLC è caratterizzata da un significativo miglioramento, sia in termini di aumento del numero di frammenti provenienti dallo stesso precursore, che di rapporto S/N a seconda del frammento considerato.

Il sinergismo tra risoluzione cromatografica e risoluzione nel dominio di massa ottenuto nella configurazione LCxLC-HRMS permette di ottenere dati spettrali di altissima qualità, agevolando il processo di

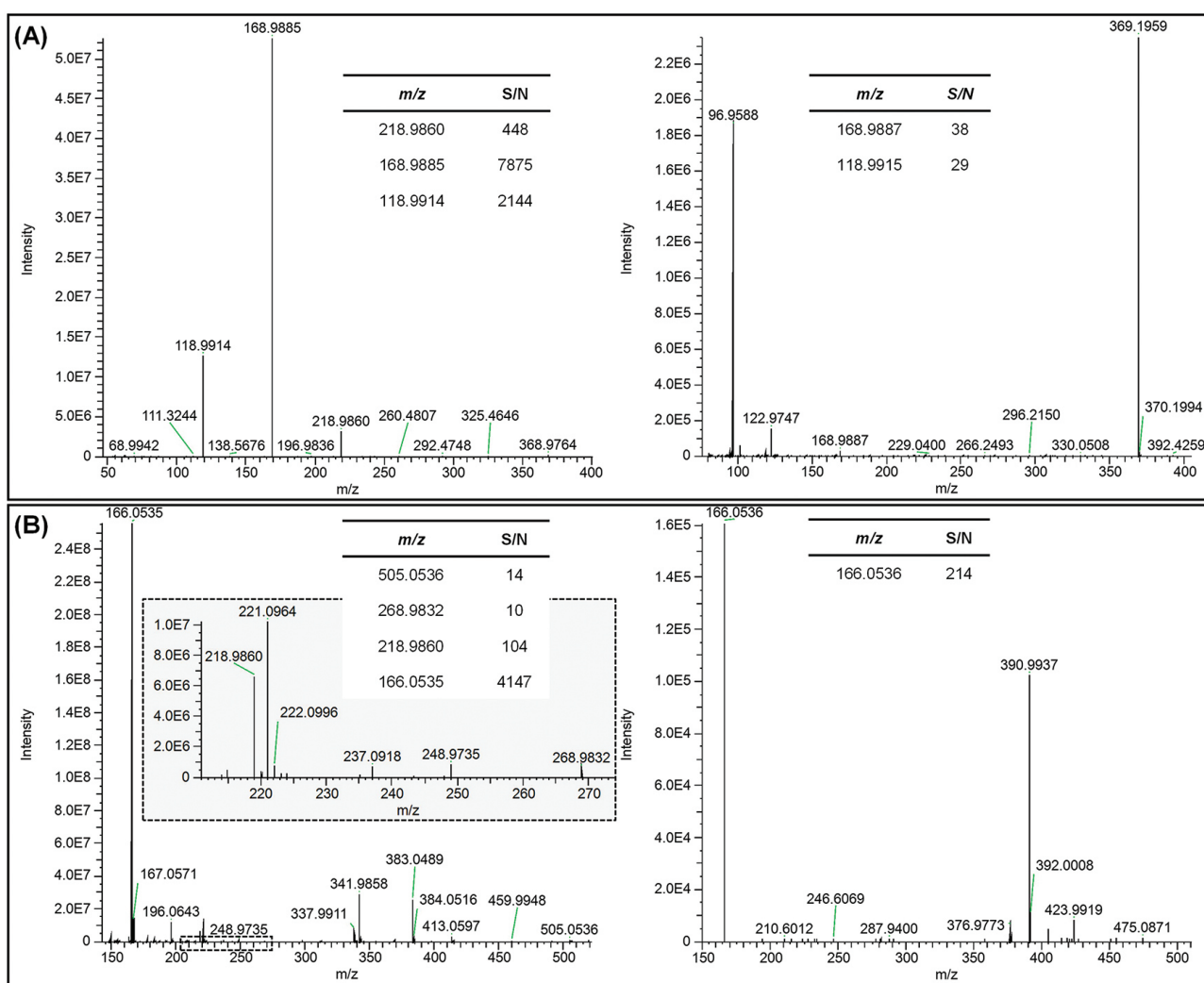


Fig. 6 - Confronto degli spettri di massa tandem per i precursori PFAS (A) $m/z=368,9773$ e (B) $m/z=519,0817$ nelle configurazioni LCxLC (colonna di sinistra) vs LC-HRMS (colonna di destra). I rapporti segnale-rumore (S/N) sono riportati per i principali frammenti diagnostici tra gli spettri

identificazione delle strutture PFAS verso una maggiore comprensione e conoscenza del complesso spazio chimico di questa famiglia di composti. Nel caso dell'analisi delle miscele AFFF qui menzionate, questo approccio ha permesso di identificare 12 serie omologhe di PFAS, compresi composti appartenenti alle serie degli acidi perfluoroalchilcarbossilici (PFACAs), acidi perfluoroalchilsolfonici (PFASAs), (*N*-pentafluoro(5)solfuro)-perfluoroalcani solfonati (SF5-PFASAs), *N*-sulfopropildimetilammoniopropil perfluoroalcansulfonammidi (*N*-SPAM-P-FASA), e *N*-carbossimetildimetilammoniopropil perfluoroalcansulfonammidi (*N*-CMAMP-FASA). In aggiunta, sono state identificate per la prima volta nei campioni analizzati le serie omologhe relative ad aldeidi perfluoroalchiliche e PFASA clorurati.

Ringraziamenti

Ringraziamo vivamente il Prof. Andrea F.G. Gargano e il Prof. Saer Samanipour dell'Istituto di Scienze Molecolari "van't Hoff" dell'Università di Amsterdam per la loro collaborazione a supporto dei risultati di questa attività di ricerca.

BIBLIOGRAFIA

- [1] Z. Wang *et al.*, *Environmental Science & Technology*, **55**(23), DOI: [10.1021/acs.est.1c06896](https://doi.org/10.1021/acs.est.1c06896).
- [2] G. Ungherese, <https://www.greenpeace.org/italy/storia/26119/pfas-analisi-acqua-potabile-in-tutte-le-regioni-d-italia/>, accessed: Mar. 15, 2025.
- [3] <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX:32020L2184>, accessed: Mar.

- 14, 2025.
- [4] <https://eur-lex.europa.eu/eli/reco/2022/1431/oj/eng>, 2022.
- [5] H. Joerss, F. Menger, *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry*, 2023, **40**, 100775, DOI: [10.1016/j.cogsc.2023.100775](https://doi.org/10.1016/j.cogsc.2023.100775).
- [6] K. Gao *et al.*, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2020, **133**, 116114, DOI: [10.1016/j.trac.2020.116114](https://doi.org/10.1016/j.trac.2020.116114).
- [7] B. Bugsel, J. Zweigle, C. Zwiener, *Trends in Environmental Analytical Chemistry*, 2023, **40**, e00216, DOI: [10.1016/j.teac.2023.e00216](https://doi.org/10.1016/j.teac.2023.e00216).
- [8] J.A. Charbonnet *et al.*, *Environ. Sci. Technol. Lett.*, 2022, **9**(6), DOI: [10.1021/acs.estlett.2c00206](https://doi.org/10.1021/acs.estlett.2c00206).
- [9] K.A. Barzen-Hanson *et al.*, *Environ. Sci. Technol.*, 2017, **51**(4), 2047, DOI: [10.1021/acs.est.6b05843](https://doi.org/10.1021/acs.est.6b05843).
- [10] M. Liu, G. Munoz *et al.*, *Environ. Sci. Technol.*, 2022, **56**(2), 885, DOI: [10.1021/acs.est.1c04798](https://doi.org/10.1021/acs.est.1c04798).
- [11] S.R. Newton *et al.*, *Environ. Sci. Technol. Lett.*, 2025, **12**(2), 104, DOI: [10.1021/acs.estlett.4c00930](https://doi.org/10.1021/acs.estlett.4c00930).
- [12] X.Z. Niu, L. Abrell *et al.*, *J. Chromatogr. A*, 2022, **1664**, 462817, DOI: [10.1016/j.chroma.2022.462817](https://doi.org/10.1016/j.chroma.2022.462817).
- [13] R. Montes, R. Rodil *et al.*, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2020, **412**(20), 4849, DOI: [10.1007/s00216-020-02434-w](https://doi.org/10.1007/s00216-020-02434-w).
- [14] B.W.J. Pirok, A.F.G. Gargano, P.J. Schoenmakers, *Separation Science*, 2018, **41**(1), 68, DOI: [10.1002/jssc.201700863](https://doi.org/10.1002/jssc.201700863).
- [15] D.R. Stoll, P.W. Carr, *Anal. Chem.*, 2017, **89**(1), 519, DOI: [10.1021/acs.analchem.6b03506](https://doi.org/10.1021/acs.analchem.6b03506).
- [16] L. Renai, M. Del Bubba *et al.*, *Anal. Chim. Acta*, 2022, **1232**, 340485, DOI: [10.1016/j.aca.2022.340485](https://doi.org/10.1016/j.aca.2022.340485).
- [17] L. Renai, M. Del Bubba *et al.*, *Science of the Total Environment*, 2024, **952**, 175908, DOI: [10.1016/j.scitotenv.2024.175908](https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2024.175908).

Non-target LCxLC-HRMS for PFAS Analysis

Two-dimensional liquid chromatography (LCxLC) combined with high-resolution mass spectrometry (HRMS) is a powerful analytical method for analyzing complex samples and identifying both known and unknown structures. This study highlights the benefits of the LCxLC-HRMS technique for the non-target identification of poly- and perfluoroalkyl substances (PFAS).



TEAM
mastery

The best **consultancy company**
for your **regulatory needs**

Know the rules, play your market

