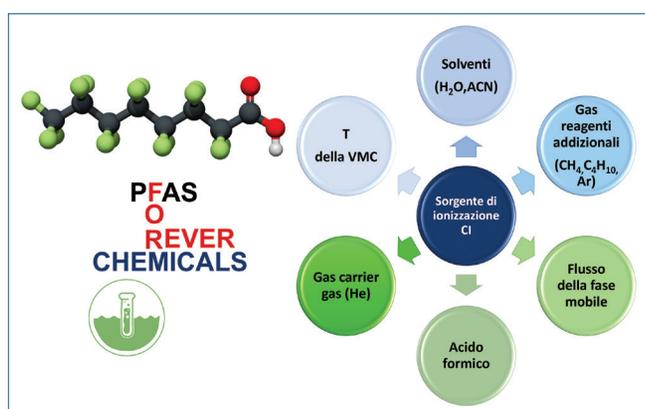




PFAS: I CONTROVERSI “FOREVER CHEMICALS”

Le sostanze per- e polifluoroalchiliche sono definite “forever chemicals” per il loro carattere bioaccumulabile che comporta significativi rischi per la salute. La ricerca condotta è stata finalizzata a valutare i parametri (gas reagenti, presenza di acqua e acido formico come componenti della fase mobile cromatografica e flusso) coinvolti nella ionizzazione chimica negativa dei PFAS accoppiata alla LC tramite interfaccia liquid electron ionization.



Introduzione Chimica dei PFAS

Le sostanze per- e polifluoroalchiliche (PFAS) rappresentano un gruppo esteso di composti alifatici perfluorurati sintetici (>3000) noti come “forever chemicals” a causa della loro persistenza nell’ambiente. Queste sostanze organiche fluorurate, note anche come “contaminanti preoccupanti” (*contaminant of concern*, COC) e come inquinanti organici persistenti (*persistent organic pollutants*, POP), vengono prodotte in vari processi industriali, causando conclamati rischi per l’ambiente e la salute [1].

I composti PFAS appartengono a diverse categorie di sostanze chimiche fluorurate lineari/ramificate e cicliche con proprietà fisico-chimiche distinte quali lipofilia, idrofobia, oleofobia ed emivita prolungata. Sono stati ampiamente utilizzati in vari settori industriali a partire dagli anni Cinquanta grazie anche alla loro eccezionale stabilità termica derivante dalla presenza del legame carbonio-fluoro (C-F) [2]. La

Fig. 1 illustra l’acido perfluorooctansolfonico (PFOS) come esempio di struttura dei PFAS non polimerici, che comprende una coda fluorurata idrofobica e una testa polare idrofila. La coda idrofobica contiene legami C-C posizionati centralmente, circondati da legami C-F, e può essere costituita da un numero variabile di atomi di carbonio e fluoro. I composti con catene carboniose fino a cinque atomi sono considerati a catena corta, da sei atomi di carbonio si parla di catena lunga. La testa idrofila contiene gruppi polari come solfonati, carbossilati e fosfati, dando origine a categorie distinte di composti PFAS, rispettivamente perfluorosolfonati, perfluorocarbossilati e perfluorofosfati [3].

L’acronimo PFAS dovrebbe, quindi, includere una famiglia di composti che soddisfano questi criteri:

- sostanze perfluoroalchiliche, in cui tutti gli atomi di idrogeno legati agli atomi di carbonio nella sostanza non fluorurata sono stati sostituiti da atomi di fluoro, ad eccezione di quegli atomi di idrogeno la cui sostituzione modificherebbe la natura di eventuali gruppi funzionali presenti;
- sostanze polifluoroalchiliche, in cui tutti gli atomi di idrogeno legati ad almeno un atomo (ma non tutti) di carbonio sono stati sostituiti con atomi di fluoro.

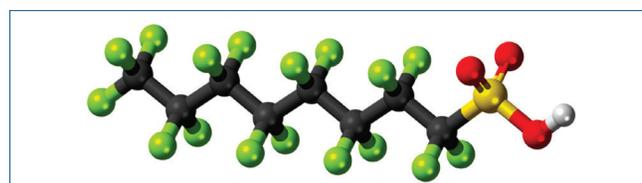


Fig. 1 - Struttura dell’acido perfluorooctansolfonico

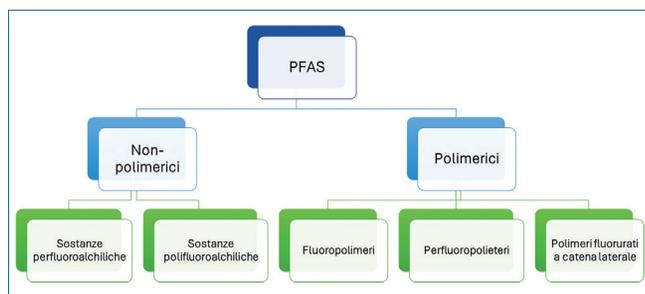


Fig. 2 - Classificazione gerarchica dei PFAS

Più in generale, la famiglia dei PFAS può essere suddivisa in due sottogruppi principali: polimerici e non polimerici (Fig. 2).

Impiego dei PFAS

Grazie alle loro caratteristiche chimiche, i PFAS sono ampiamente utilizzati nei prodotti per la casa, come imballaggi per alimenti e pentole antiaderenti, nonché in contesti industriali di produzione, tra cui tensioattivi, tessuti, abbigliamento, additivi per rivestimenti, detersivi e semiconduttori.

La forza del legame C-F contribuisce alla loro resistenza alla degradazione e li rende bioaccumulabili [4].

I PFAS sono ampiamente segnalati a livello globale in contesti ambientali e ora sono comunemente rilevati in acqua, aria, suolo e animali a causa delle loro proprietà fisico-chimiche, dell'uso diffuso nei prodotti commerciali, della persistenza ambientale e della mobilità fino alla contaminazione delle falde acquifere [5]. È generalmente accettato che l'acqua potabile, l'aria e l'assunzione di alimenti di origine vegetale e animale siano le principali vie di esposizione degli esseri umani ai PFAS, che rappresentano una seria preoccupazione per la salute umana, inducendo potenzialmente alterazioni nello sviluppo, nel sistema endocrino, nell'immunotossicità e nell'epatotossicità [6].

Prospettiva storica dei PFAS

La storia dei PFAS risale agli anni Trenta, quando il politetrafluoroetilene (PTFE) fu scoperto come risultato della ricerca chimica condotta da DuPont sui refrigeranti fluorurati. Il PTFE fu poi commercializzato come Teflon nel 1947 e il metodo della fluorurazione elettrochimica fu utilizzato per preparare i PFAS. La società 3M iniziò a produrre composti a base di PFOS nel 1949, realizzando una miscela di catene di carbonio pari e dispari. Nel 1976, l'acido

perfluorooctanoico (PFOA) fu rilevato per la prima volta nel siero del sangue umano [7].

Ci vollero altri due decenni prima che emergessero i dati sulla tossicità dei PFAS e dei composti correlati, spingendo l'Agenzia di Protezione Ambientale degli Stati Uniti (*United States Environmental Protection Agency*, EPA) a indagare sulla loro tossicità e sulla loro distribuzione. Il millennio successivo portò a decisioni epocali sul destino dei PFAS e iniziò con l'eliminazione graduale della produzione di PFAS da parte della 3M. Dal 2002 al 2007, l'EPA ha elaborato nuove importanti norme sugli 88 composti PFAS esistenti, limitando la futura produzione e importazione di questi composti e, nel 2007, ha aggiornato le normative vietando altri 183 PFAS e interrompendone la produzione negli Stati Uniti.

Nel 2009, il PFOA e i composti correlati sono stati elencati come inquinanti organici persistenti (POP) ai sensi dell'Allegato B della Convenzione di Stoccolma, limitando l'uso di PFOS nei settori dei semiconduttori e della placcatura dei metalli. Circa un decennio dopo, solo la Cina ha continuato la produzione ed è diventata un produttore e consumatore leader di PFOS a causa della domanda. Nel 2019 e nel 2022, PFOA, PFHxA e composti simili sono stati inclusi nell'elenco dei POP della Convenzione di Stoccolma.

Tecniche analitiche convenzionali per l'analisi dei PFAS

I recenti progressi nei metodi analitici hanno migliorato significativamente l'estrazione e la quantificazione dei PFAS in diverse matrici, con conseguente rilevamento più accurato e sensibile, contribuendo a una migliore comprensione della loro prevalenza e del loro impatto in vari contesti ambientali, industriali e biologici.

È degno di nota che la maggior parte dei PFAS elencati dall'EPA sono rilevabili mediante cromatografia liquida-spettrometria di massa tandem con ionizzazione elettrospray (LC-ESI-MS/MS) [8]. Nel regno dei PFAS, esistono anche PFAS volatili analizzabili mediante gascromatografia [9].

L'estrazione in fase solida (SPE) è una tecnica versatile di preparazione dei campioni ampiamente utilizzata per isolare i PFAS da matrici solide e liquide. Comporta l'uso di un materiale adsorbente solido per separare e concentrare i composti target.



Questo metodo è particolarmente vantaggioso per isolare i PFAS da campioni ambientali e biologici complessi grazie alla sua elevata selettività ed efficienza. La microestrazione in fase solida (SPME) rivoluziona il processo, integrando campionamento, estrazione, pulizia e arricchimento in un unico passaggio. Ciò si traduce in un metodo di analisi altamente efficiente e rapido che semplifica l'intera procedura di preparazione del campione.

I nuovi approcci per l'analisi dei PFAS Ionizzazione chimica

La spettrometria di massa a ionizzazione chimica (CI-MS) è un metodo di ionizzazione *soft* che prevede la ionizzazione di una molecola tramite una reazione con ioni reagente. Nella CI, un gas reagente (comunemente metano, isobutano o ammoniaca) viene introdotto nella sorgente ionica, dove viene ionizzato, in genere tramite impatto elettronico. Gli ioni risultanti reagiscono quindi con le molecole campione, portando alla formazione di ioni molecolari e ioni frammento, principalmente tramite meccanismi di trasferimento protonico.

La tecnica di ionizzazione chimica impiega una sorgente strettamente correlata a quella della ionizzazione elettronica (EI), ma specificamente progettata per funzionare a pressioni più elevate di circa 1 torr [10]. Questo design distinto consente un livello di frammentazione relativamente basso e la formazione di ioni molecolari, rendendo la CI utile nell'elucidazione strutturale e nell'identificazione di molecole organiche di piccole e medie dimensioni. A polarità negativa è particolarmente preziosa per l'analisi di composti contenenti atomi o gruppi elettronegativi e in varie applicazioni analitiche in cui sensibilità e selettività risultino essere cruciali [11].

Liquid Electron Ionization

La *Liquid Electron Ionization* (LEI) è un'interfaccia innovativa concettualizzata da A. Cappiello e coll. [12], sviluppata per connettere la cromatografia liquida alla ionizzazione elettronica, e successivamente impiegata anche con la ionizzazione chimica (CI) [13].

La Fig. 3 mostra lo schema dettagliato dell'interfaccia LEI che include tre componenti principali:

1) un connettore liquido-gas per l'introduzione del flusso di gas elio;

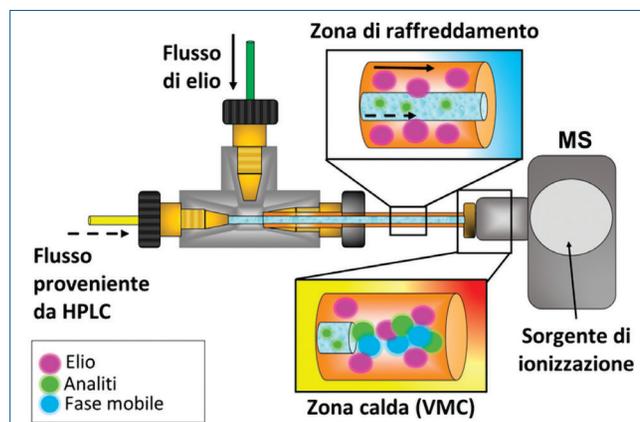


Fig. 3 - Schema dettagliato dell'interfaccia LEI

- 2) un gap di raffreddamento per separare la regione di vaporizzazione calda dal connettore;
- 3) una zona di conversione liquido-gas (microcanale di vaporizzazione, VMC) dove l'eluato vaporizza e si mescola con l'elio.

Nella tecnica LEI, la trasformazione dell'eluato in gas avviene prima che gli analiti entrino nella sorgente ionica. Questo processo è fondamentale poiché aiuta a mantenere l'integrità chimica dei composti e a conservare le informazioni cromatografiche e, soprattutto, consente l'acquisizione di spettri EI ricercabili in libreria. L'eluato cromatografico subisce una vaporizzazione a pressione atmosferica all'interno di un microcanale di vaporizzazione, che è strettamente collegato alla sorgente EI. Questo microcanale, appositamente progettato, svolge la funzione essenziale di separare il processo di vaporizzazione dalla successiva fase di ionizzazione, assicurando che ogni fase avvenga in modo efficiente.

Un video esplicativo sul funzionamento dell'interfaccia LEI è disponibile sulla piattaforma web YouTube al link <https://www.youtube.com/watch?v=ZzLRmvcnxcg>. Dalla sua ideazione a oggi, l'interfaccia LEI ha ampiamente dimostrato di consentire la corretta vaporizzazione dei composti prima di raggiungere la sorgente di ionizzazione sottovuoto, EI o CI, e ha prodotto validi risultati in numerosi ambiti di applicazione [13].

L'EPA statunitense utilizza principalmente protocolli LC-ESI-MS/MS per la rilevazione dei PFAS a causa dell'elevata sensibilità di questa tecnica. Metodi analitici alternativi per l'analisi dei PFAS si basano sulla ionizzazione chimica (CI). Conven-

zionalmente, le sorgenti CI sono accoppiate alla GC e il meccanismo di ionizzazione è influenzato principalmente dal tipo di gas reagente utilizzato, mentre il flusso del gas reagente (2 mL/min) e la temperatura della sorgente ionica (250 °C e 150 °C, rispettivamente per CI positiva e negativa) sono generalmente parametri predefiniti. La tecnica CI in modalità negativa (NCI) offre diversi vantaggi, come un migliore rapporto segnale/rumore dovuto a una maggiore selettività verso molecole elettrone-attrattive. La NCI si verifica quando una molecola cattura un elettrone con energia cinetica inferiore, infatti il ruolo preliminare del gas reagente è quello di ridurre l'elevata energia degli elettroni, piuttosto che fornire uno ione reagente. Gli spettri sono caratterizzati da una frammentazione limitata e da ioni molecolari. Le tecniche di ionizzazione soft, come la CI, stanno quindi riscuotendo un rinnovato interesse, dimostrando i loro vantaggi e la loro idoneità in diversi campi, che vanno dall'ambiente e dalla biologia all'alimentazione, grazie all'elevata sensibilità e specificità verso i composti contenenti ioni elettronegativi e specifici gruppi funzionali. Il forte carattere elettrofilo dei PFAS è dato dalla presenza di F e del gruppo carbossilico terminale, rendendo questi composti sensibili alle modalità NCI piuttosto che a quelle EI o PCI.

Valutazione dei parametri implicati nella ionizzazione chimica negativa dei PFAS e metodo UHPLC-LEI-NCI-MS

Considerata l'elevata selettività della CI per i composti alogenati [14], nello studio condotto presso il laboratorio LC-MS del Università di Urbino Carlo Bo (<https://www.linkedin.com/company/lc-ms-group/>), un sistema UHPLC è stato accoppiato a una sorgente CI, utilizzando l'interfaccia LEI, per l'analisi di cinque PFAS selezionati (acido perfluorotridecanoico (PFTrDA); acido perfluorododecanoico (PFDoDA); acido perfluorodecanoico (PFDA); acido perfluorononanoico (PFNA) e perfluorottanoico (PFOA)) [15].

È stato quindi necessario valutare come diversi parametri influenzassero l'efficienza di ionizzazione dei PFAS in questa specifica condizione analitica, in cui l'eluato cromatografico raggiunge la sorgente CI. Una volta vaporizzato all'interno dell'interfaccia LEI, il solvente eluito dal sistema UHPLC raggiunge

la sorgente ionica CI e può fungere da gas reagente. Pertanto, il ruolo di gas reagente dell'acetonitrile come componente della fase mobile è stato valutato da solo o in combinazione con i gas reagenti convenzionali. È stata, inoltre, stimata l'influenza dell'acqua, come componente necessaria della fase mobile cromatografica in gradiente e il flusso, insieme all'effetto dell'acido formico usato come additivo. Come risultato dell'ottimizzazione di queste variabili è stata dimostrata una migliore efficienza di ionizzazione dei composti selezionati impiegando l'ACN della fase mobile come unico gas reagente, quindi svelando la possibilità concreta di utilizzare la sola fase mobile come gas reagente per analisi LEI-CI-MS.

Il flusso che ha generato la migliore risposta è stato 400 µL/min, pari ad un flusso in ingresso nella sorgente di ionizzazione di 1 µL/min a seguito della riduzione operata da uno *splitter* passivo. La presenza di acqua ha influenzato negativamente l'abbondanza relativa dei frammenti monitorati, tuttavia il metodo analitico sviluppato, tenendo conto delle variabili analizzate, ha evidenziato che i PFAS

Parametro	Set
Colonna	Eclipse Plus C18 (50x2,1 mm; 1,8 µm)
Fase mobile	H2O (solvente A), ACN (solvente B)
Gradiente	0 min, 20% B; 5 min, 70% B; 10 min, 100% B
Flusso	400 µL/min (ridotto a 1 µL/min)
Volume di iniezione	20 µL
T della sorgente	150 °C
T della transfer line	350 °C
Gas reagente	-
Flusso del gas reagente	-
Range m/z (modalità scan)	60-800 m/z
<i>m/z selezionati (modalità SIM)</i>	
Acronimo	m/z
PFOA	312
PFNA	362
PFDA	390
PFDoDA	490
PFTrDA	540

Tab. 1 - Condizioni analitiche del metodo UHPLC-LEI-NCI-MS sviluppato per l'analisi dei PFAS e ioni selezionati per l'acquisizione in modalità SIM



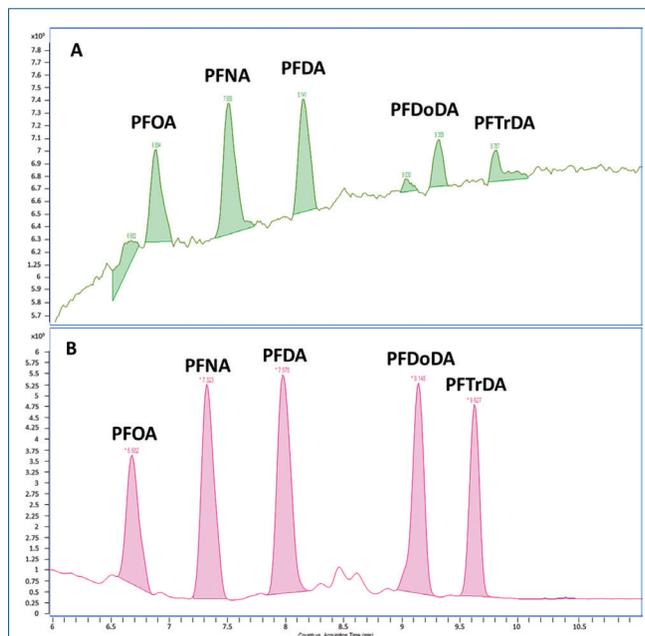


Fig. 4 - Cromatogrammi UHPLC-LEI-NCI-MS della miscela di PFAS in modalità di acquisizione TIC (A) e SIM (B) nelle condizioni analitiche descritte in Tabella 1. I frammenti selezionati per l'analisi SIM sono riportati in Tab. 1

in esame eluiscono a rapporti ACN/H₂O superiori al 50% riducendo l'influenza negativa dell'acqua sull'efficienza di ionizzazione.

Il metodo sviluppato (Tab. 1) sulla base dei risultati ottenuti, ha consentito l'analisi UHPLC-LEI-NCI-MS dei PFAS in modalità *Selected Ion Monitoring* (SIM) in un tempo inferiore a dieci minuti (Fig. 4).

Questo studio presenta l'ottimizzazione di un metodo non convenzionale per l'analisi dei PFAS, che accoppia la cromatografia liquida alla ionizzazione chimica negativa mediante l'interfaccia LEI.

L'elevata adattabilità dell'interfaccia LEI viene ancora una volta evidenziata, facilitando efficacemente il processo di NCI dei composti target dopo la loro separazione cromatografica.

Lo studio esplora la frammentazione NCI anche attraverso una serie di vie di frammentazione proposte. L'impiego di ACN come unico gas reagente ha semplificato le condizioni analitiche delucidando alcuni meccanismi come la formazione di esteri metilici per tutti i composti analizzati, che potrebbero essere considerati ioni specifici per la rilevazione e l'identificazione dei PFAS.

Considerando questi risultati, questa ricerca getta le basi per ulteriori approfondimenti nell'analisi dei PFAS e nelle metodologie NCI-MS.



Fig. 5
QR code di collegamento al profilo LinkedIn del gruppo di ricerca afferente al laboratorio LC-MS dell'Università di Urbino guidato dal Prof. Achille Cappiello

BIBLIOGRAFIA

- [1] D. Dey, T. Shafi *et al.*, *Chemosphere*, 2024, **351**, 141164.
- [2] M. Kalyn, H. Lee *et al.*, *Environmental Pollution*, 2023, **326**, 121479.
- [3] S.F. Nakayama, M. Yoshikane *et al.*, *TrAC*, 2019, **121**, 115410.
- [4] M. Ateia, A. Maroli *et al.*, *Chemosphere*, 2019, **220**, 866.
- [5] M.W. Sima, P.R. Jaffé, *Science of the Total Environment*, 2021, **757**, 143793.
- [6] E. Panieri, K. Baralic *et al.*, *Toxics*, 2022, **10**, 44.
- [7] G.L. Kennedy, J.L. Butenhoff *et al.*, *Critical Rev. in Toxicol.*, 2004, **34**, 351.
- [8] J. Fang, S. Li *et al.*, *J. of Environm. Chem. Engin.*, 2023, **12**, 111833.
- [9] U. Shafique, S. Schulze *et al.*, *ACA*, 2017, **949**, 8.
- [10] J. Gross, *J. Mass Spectrometry - A Textbook*, Third Edition, Springer, 2017.
- [11] R. Húšková, E. Matisová *et al.*, *J. Chromatogr. A*, 2009, **1216**, 6326.
- [12] V. Termopoli, G. Famigliani *et al.*, *Anal. Chem.*, 2017, **89**, 2049.
- [13] G. Grasselli, A. Arigò *et al.*, *Critical Reviews in Anal. Chem.*, 2024, **1**.
- [14] Y. Yang, M. Lin *et al.*, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2020, **412**, 6679.
- [15] M. Dutt, A. Arigò *et al.*, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 2024, **35**, 890.

PFAS: the Hot-Button "Forever Chemicals"

Per- and polyfluoroalkyl substances are defined as "forever chemicals" due to their bioaccumulative character, posing significant health hazards. The research was aimed at evaluating the parameters (reagent gases, presence of water and formic acid as chromatographic mobile phase components, and mobile phase flow rate) involved in the negative chemical ionization of PFASs coupled with LC via liquid electron ionization interface.