



**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI  
DI PARMA**



**Società Chimica Italiana  
Divisione di  
Chimica Analitica**

# **XVIII CONGRESSO NAZIONALE DI CHIMICA ANALITICA**

**Chimica Analitica e  
Sicurezza Alimentare**



**PARMA  
19 - 23 Settembre 2004**





UNIVERSITÀ DEGLI STUDI  
DI PARMA



Società Chimica Italiana  
Divisione di  
Chimica Analitica

# XVIII CONGRESSO NAZIONALE DI CHIMICA ANALITICA

**Chimica Analitica e  
Sicurezza Alimentare**



**PARMA 19 - 23 Settembre 2004**

SCI-DCA

**Lunedì 20 Settembre 2004**

**Conferenza Plenaria**

*R. Niessner,  
Technische Universitaet Muenchen*

**LASER OR ANTIBODIES: THE BEST FRIENDS OF ANALYSTS**

**Aula Magna  
Palazzo Centrale**

**10.30**

## LASER LIGHT OR ANTIBODIES: THE BEST FRIENDS OF ANALYSTS

Reinhard Niessner

Institute of Hydrochemistry, Technical University of Munich, Germany

[www.ws.chemie.tu-muenchen.de](http://www.ws.chemie.tu-muenchen.de)

The lecture covers two means being advantageous in Analytical Chemistry: laser light and antibodies. Laser light is ideal when techniques are applied whose signal formation depends on light intensity. Known is fluorescence where the photons are the product of stimulated molecule excitation. Here, photo- or optoacoustic spectroscopy is shown as a technique allowing online and *in situ* observation of analytes.

A first example given is the photoacoustic soot sensor. Here diesel exhaust has to be observed and quantified due to its soot content during fast transient test cycles. Photoacoustic spectroscopy with laser diodes exhibits an excellent wide dynamic working range, instantaneous response ( $< 1$  sec), best sensitivity ( $< 10 \mu\text{g EC/m}^3$ ) and no interferences by other exhaust constituents (e.g. water vapour in the g-range or  $\text{NO}_2$  etc.).

In a second example depth profiling of living tissues is demonstrated. Biofilms in water-pipes or walls of water reservoirs or sewage water plants host many microorganisms beneficial for decontamination or organic compounds (TOC/DOC). Usage of pulsed laser beams create after light absorption (at the appropriate wavelength) an acoustical signal: a pressure wave. Time-resolved observation enables the exact location of the absorber within the  $\mu\text{m}$ -range. The dynamic behaviour of a biofilm, e.g. the efficacy of algicides can be tested by such an arrangement.

In contrast to laser light, which makes use of its high photon density and monochromaticity to achieve sensitivity and selectivity, antibodies recognize the three-dimensional counterpart used for generating them. Cooperative forces lead to high stability (affinity) constants, such yielding high selectivity and sensitivity, too.

In a first example the development of a classical test format developed for the microcystin toxin detection in surface waters is shown. Algae blooming produces an enormous variety of toxins. Therefore, broadband antibodies are needed. The developed monoclonal antibodies recognize the common amino acid ADDA, which is part of all microcystin toxins, down to the lower ppt level.

Chromatographers like to see all analytes within a sample. Hence, highly selective receptors, like antibodies, are not wanted there. On the other hand enrichment and/or cleanup steps are often needed when faced to difficult matrices. Antibodies, generated as broadband responders, encapsulated within a sol-gel matrix offer excellent features. We demonstrate the advantageous usage of anti-PAH antibodies in combination with LC. Perfect separation of hydroxy metabolites of PAHs in urinary excretion is demonstrated.

Finally the application of protein chip technology for fast antibody or antigen screening is shown. By spotting devices the requested counterpart is arranged at a glass surface in an unique manner. Injected into a FIA system the chip comes into contact with the aqueous matrix (sample). At each individual spot a competitive reaction takes place, finally quantified by chemiluminescence detection of the luminosity of the individual spots. A CCD camera system observes the total chip surface at one glance. First successful examples are allergen blood screening or detection of antibiotics in milk samples.

**Lunedì 20 settembre**

**TECNICHE COMBINATE – SPETTROMETRIA DI MASSA  
Prima sessione**

**Aula Magna  
Palazzo Centrale  
11.40-13.00**

# APPLICAZIONE DELLA SPETTROMETRIA DI MASSA CON IONIZZAZIONE AD ELETTRISPRAY (ES-MS) ALLO STUDIO DEGLI EQUILIBRI DI COMPLESSAMENTO METALLO-LEGANTE IN SOLUZIONE

Valerio B. Di Marco<sup>a</sup>, G. Giorgio Bombi<sup>a</sup>, Pietro Traldi<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Dipartimento di Scienze Chimiche, via Marzolo 1, 35131 Padova

<sup>b</sup> CNR, Istituto di Scienze e Tecnologie Molecolari, Corso Stati Uniti 4, 35100 Padova

Lo studio degli equilibri di complessamento metallo-legante in soluzione acquosa rappresenta una tematica di ricerca di fondamentale importanza in ambito ambientale, industriale e fisiologico. In tali studi, la potenziometria è la tecnica che in assoluto fornisce i più accurati dati quantitativi (i valori delle costanti di equilibrio); la sua più importante limitazione consiste nel fatto che i dati qualitativi, ovvero il numero dei complessi che si formano e la loro stechiometria, sono desumibili solo in maniera indiretta, valutando l'accordo tra le curve di titolazione sperimentali e quelle calcolate, e confrontando i risultati ottenuti per diverse ipotesi di speciazione. Questa limitazione diviene particolarmente pesante per sistemi metallo-legante complicati, per i quali l'identificazione univoca delle specie risulta difficile e talvolta impossibile. Per tale motivo si ritiene in genere opportuno, se non indispensabile, affiancare alla potenziometria altre tecniche indipendenti, che permettano di ottenere dati qualitativi più diretti, quali le spettroscopie NMR, IR ed UV, e la cristallografia a raggi X. Ciascuna di esse possiede delle limitazioni intrinseche, che non permettono un loro utilizzo generale. Inoltre, le informazioni ottenute su sistemi complicati sono spesso ancora insufficienti per una completa definizione del quadro di speciazione.

Emerge quindi la necessità di disporre di altre tecniche nello studio degli equilibri di complessamento in soluzione. La spettrometria di massa con ionizzazione ad elettrospray (ES-MS) è una tecnica relativamente nuova che consente lo studio diretto di sistemi in soluzione acquosa. Grazie a questa proprietà, nonché alla "delicatezza" del metodo di ionizzazione (che limita la frammentazione delle specie e ne consente una più facile identificazione), le applicazioni dell'ES-MS in chimica inorganica e metallorganica sono rapidamente aumentate negli ultimi anni. Anche nel campo della chimica di coordinazione l'ES-MS si presenta come una tecnica qualitativa (e forse quantitativa) molto promettente.

Nella presente comunicazione, saranno riassunti e discussi i vantaggi e le limitazioni di tale tecnica nello studio degli equilibri di complessamento metallo-legante. Verranno inoltre illustrati alcuni esempi di applicazione della tecnica, e saranno mostrati alcuni tra i risultati più significativi ottenuti, sia in letteratura sia presso i nostri laboratori.

## LIQUID CHROMATOGRAPHY AND ELECTRON IONIZATION: EVALUATION OF THE PERFORMANCE OF THE DIRECT-EI INTERFACE.

*Achille Cappiello, Giorgio Famiglioni, Pierangela Palma, Antonella Siviero*

*Università di Urbino "Carlo Bo"- Istituto di Scienze Chimiche "F. Bruner", Urbino*

**Introduction:** Direct-EI interface allows the direct introduction of the effluent from a capillary HPLC column into the electron ionization ion source of a mass spectrometer. Thanks to the reduced liquid intake, the interfacing process, nebulization, desolvation, solute vaporization and ionization, occurs in the ion source. No intermediate complicated interfacing mechanisms are interposed between the column and the mass spectrometer, thus circumventing undesired sample loss. The miniaturization of the entire apparatus was the best support to overcome the traditional obstacles encountered: high vacuum loss and chemical ionization reactions. This simple and effective approach, exploits at its best the micro-flow nebulization technology into a new suitable interface for a variety of applications of environmental and biological interest and provides necessary linearity, ruggedness, sensitivity and reproducibility of response for trace level analysis, and readily interpretable mass spectra for unambiguous identification of unknown compounds of small-medium molecular weight. Direct-EI has been tested on several key applications, reported in literature [1-3], demonstrating that EI can still play a fundamental role for all the LC amenable compounds that can withstand such ionization conditions. In this work we thoroughly evaluate the performance of the Direct-EI interface taking into account technical variations with respect to the first design.

**Methods:** The Direct-EI interface equips a HP5989A quadrupole mass spectrometer. Nano-flow rates are obtained with a splitting device and using a Kontron HPLC 422 dual pump equipped with an Upchurch M-435 nano-injector. A lab-made column, 150 x 0.075 mm, packed with 3  $\mu\text{m}$  C<sub>18</sub> particles is used to test the system. Injection volume: 60 nL. For this study we used five test compounds: bisphenol A, testosterone, caffeine, azinphos-ethyl, and ibuprofen. The interface performance has been tested also on critical separation of mixtures of pesticides, hormones and nitro-PAH.

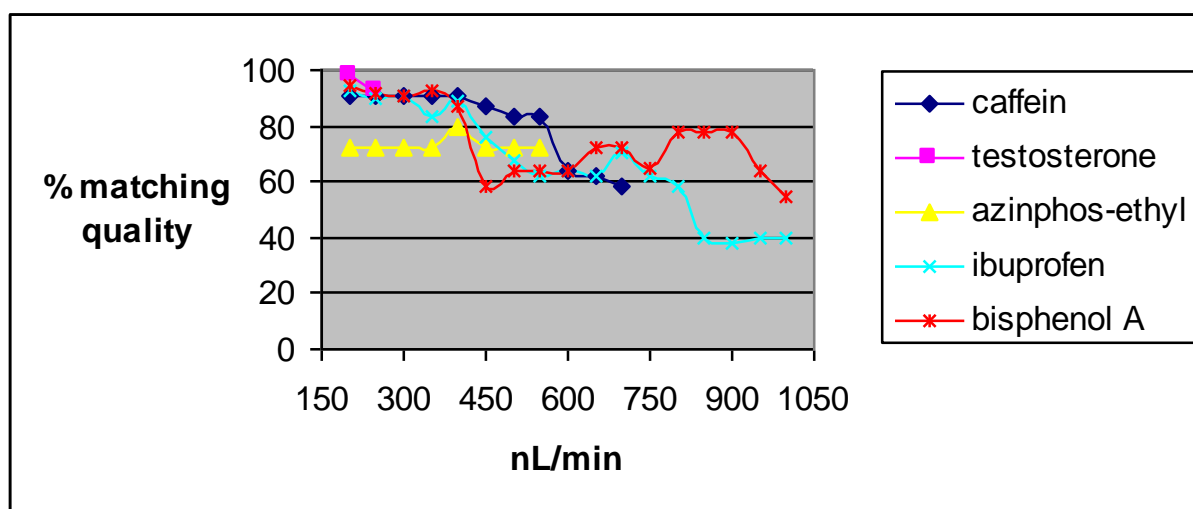
**Results:** Several parameters, crucial for a successful integration of liquid chromatography and mass spectrometry, have been considered in the evaluation of the functioning of Direct-EI: limit of detection, linearity of response, reproducibility, and separation compatibility. Different mobile phases, also containing non volatile buffers, were taken into account. The entire set of experiments was carried out at different flow rates and temperatures of the ion source. Limit of detection was assessed in SIM, full scan and in extracted ion mode. Linearity was investigated starting near LOD and extending up two orders of magnitude. Five different concentrations were considered with five replicates for each one. The correlation coefficients are all close to unity, indicating good linearity over the measured range. Intra-day reproducibility was evaluated throughout the day from a series of 30 injections. Response variations were very limited as indicated by the good relative standard deviation (RSD). To test the interface behavior in different chromatographic conditions, we took into account several separations, using a choice of mobile phase and modifiers. Mobile phase containing phosphate buffer 0.01 M was continuously introduced into the system for 4 days from 9 am to 5 pm, and the ion source parameters were monitored at the beginning and at the end of the working day. No appreciable alteration of the performance of the instrument was detected over this period, as shown in Table 1. An important attribute of this interface is the possibility to record library matchable mass spectra. Depending on the operating flow rate, the matching quality of the recorded mass spectra compared with those reported in the Wiley electronic library was comprised between 70 and 98% (Figure 1).



**Acknowledgements:** The authors are grateful to Upchurch Scientific (Oak Harbor, WA) for the gift of the M-435 nano-injector and for their long-standing support in providing HPLC fittings and valves.

**Table 1:** Fundamental instrumental parameters recorded after a continuous introduction of phosphate buffer

	1 <sup>st</sup> Day		2 <sup>nd</sup> Day		3 <sup>rd</sup> Day		4 <sup>th</sup> Day	
	9 a.m.	5 p.m.	9 a.m.	5 p.m.	9 a.m.	5 p.m.	9 a.m.	5 p.m.
ion focus (mV/amu)	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
entrance lens (V)	120	90	90	95	95	75	95	110
X-ray (V)	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
AMU gain (V)	146	146	146	146	146	146	148	144
axis gain (V)	-11	7	-9	7	-5	7	7	7
multiplier (V)	1890	1961	1913	1961	1913	1913	1913	1890
m/z 502 (%)	2.71	3.61	3.56	3.99	3.73	2.89	3.02	2.74
Repeller (V)	7	7	7	7	7	7	7	7
Caffein area counts	120	148	58	111	84	93	82	97



**Figure 1:** Wiley electronic library and experimental mass spectra matching quality results depending on the operating flow rate.

## References

- [1] A. Cappiello, G. Famiglioni, P. Palma, F. Mangani *Anal. Chem.* **2002**, 74, 3547-3554.
- [2] A. Cappiello, G. Famiglioni, F. Mangani, P. Palma, A. Siviero *Analytica Chimica Acta* **2003**, 493, 125-136.
- [3] A. Cappiello, G. Famiglioni, P. Palma *Anal. Chem.* **2003**, 75, 496A-503A.

## STUDI DI DEGRADAZIONE DI COLORANTI ALIMENTARI MEDIANTE TECNICA HPLC-MS

F. Gosetti, V. Gianotti, S. Angioi, S. Polati, E. Marengo, M.C. Gennaro

Università del Piemonte Orientale "Amedeo Avogadro"  
Dipartimento di Scienze dell'Ambiente e della Vita  
Spalto Marengo 33 - 15100 Alessandria

Un dato allarmante di recente segnalato nella comunità scientifica riguarda la possibilità che, attraverso l'instaurarsi di processi degradativi naturalmente indotti dall'azione della luce e di temperature elevate, coloranti alimentari contenuti in bibite commerciali si trasformino in specie tossiche o cancerogene, quali ad esempio ammine aromatiche (anilina, naftilammina, benzidina, 4-aminobifenile...).

Evidenze sperimentali ottenute nei nostri laboratori hanno mostrato che i coloranti Sunset Yellow (E110) e Brilliant Blue FCF (E133), contenuti in confezioni sigillate di bibite analcoliche commerciali, subiscono una totale decolorazione se sottoposti a irraggiamento solare. Tale variazione cromatica è indice di processi di degradazione subiti dalla struttura del colorante con conseguente formazione di nuove specie potenzialmente pericolose per la salute dei consumatori.

Obiettivo di questo lavoro è l'identificazione dei prodotti che si formano durante il processo di degradazione dei coloranti.

Prima di affrontare lo studio di identificazione delle forme degradate direttamente nelle bibite, matrici complesse che contengono diversi altri componenti, si sono simulate in laboratorio condizioni atte a innescare reazioni di degradazione che portino a una decolorazione dei coloranti in oggetto. A questo scopo, sono risultate efficaci tecniche che prevedono reazioni di riduzione con acido ascorbico o reazioni di foto-ossidazione condotte in presenza di persolfato. Entrambe le reazioni sono caratterizzate da una cinetica di reazione sufficientemente lenta da permettere lo studio dei prodotti intermedi che si formano durante il processo di degradazione.

Un buon supporto a questo studio è rappresentato dalla caratterizzazione condotta mediante spettrometria di massa per i coloranti in studio, entrambi contenenti gruppi solfonati. La caratterizzazione, effettuata per infusione diretta in *electrospray ionization* (ESI) modalità ioni negativi mediante esperimenti in MS e MS<sup>n</sup>, ha permesso la identificazione di un gran numero di ioni figli che derivano dalle frammentazioni di tipo collisionale tipiche dell'analisi MS<sup>n</sup> sequenziali nel tempo.

Per la separazione e determinazione dei coloranti e per seguirne la cinetica di degradazione, sono stati sviluppati, ottimizzati e validati mediante tecniche di *experimental design*, metodi HPLC compatibili con la rivelazione a spettrometria di massa. Mediante l'uso comparato delle tecniche di spettrofotometria UV-visibile e di HPLC-MS è stata seguita la cinetica di degradazione e sono stati calcolati i tempi di dimezzamento.

I più recenti risultati basati su metodi HPLC-MS hanno portato alla identificazione per i coloranti E133 e E110 di alcuni intermedi di degradazione che non permettono di escludere la formazione di ammine aromatiche.

### Riferimenti

- A. Pieleusz, I. Baronowska, A. Rybak, A. Wlochowich, "Detection and determination of aromatic amines as products of reductive splitting from selected azo dyes", *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 53 (2002) 42.

- V. Gianotti, S. Angioi, F. Gosetti, E. Marengo, M.C. Gennaro, “Chemometrically assisted development of IP-RP-HPLC and spectrophotometric methods for the identification and determination of synthetic dyes in commercial soft-drinks and preliminary degradation studies”, *J. Liq. Chromatogr. Rel. Techn.* in stampa (2004)
- F. Gosetti, V. Gianotti, S. Angioi, S. Polati, E. Marengo, M.C. Gennaro, “Oxidative degradation of food dye E133 Brilliant Blue FCF. HPLC-ESI-MS identification of the oxidative degradation products”, *J. Chromatogr. A* inviato (marzo 2004)

# METODI ANALITICI BASATI SULLA SPETTROMETRIA DI MASSA TANDEM A BASSA ED ALTA RISOLUZIONE PER LA DETERMINAZIONE ACCURATA DI CONTAMINANTI IN TRACCE IN ALIMENTI

F. Calbiani, M. Careri, L. Elviri, A. Mangia, L. Pistarà, I. Zagnoni

Dipartimento di Chimica Generale ed Inorganica, Chimica Analitica, Chimica Fisica, Università degli Studi di Parma, Parco Area delle Scienze 17/A, 43100 Parma

Nell'ambito della sicurezza alimentare, il controllo delle materie prime e dei prodotti finiti richiede metodi sempre più affidabili. Recentemente, a seguito dell'allarme lanciato in Francia per la contaminazione dal colorante Sudan I di alimenti a base di peperoncino provenienti dall'India, nel 2004 la CE ha decretato un provvedimento recante misure di emergenza relative al peperoncino e ai prodotti derivati, nel quale si proibisce la presenza di Sudan I, Sudan II, Sudan III e Sudan IV, sostanze classificate dall'IARC come possibili cancerogeni per l'uomo, nel peperoncino essiccato, tritato e polverizzato e nel curry [1, 2].

In questo studio sono stati sviluppati per la prima volta metodi innovativi di cromatografia liquida (LC) abbinati alla spettrometria di massa tandem (MS/MS) a bassa ed alta risoluzione per la determinazione simultanea degli azo-coloranti Sudan I, Sudan II, Sudan III e Sudan IV in prodotti finiti a base di pomodoro contenenti peperoncino. Le tecniche LC-MS e LC-MS/MS offrono infatti notevoli potenzialità per l'identificazione e la quantificazione di contaminanti a livello di tracce. La diffusione di analizzatori di massa da banco a triplo quadrupolo (QqQ) e a quadrupolo-tempo di volo (Q-TOF) permette inoltre di ottenere elevata sensibilità e selettività grazie all'impiego di diverse modalità di acquisizione del segnale.

In questo contesto, è stato sviluppato un metodo LC-QqQ-MS/MS con ionizzazione electrospray (ESI) per la determinazione di Sudan I-IV in campioni di salsa a base di pomodoro [3]. Particolare attenzione è stata rivolta alla validazione del metodo, in quanto la capacità di rilevare e misurare con un elevato grado di affidabilità l'eventuale presenza di composti indesiderati è uno dei punti fondamentali del sistema di garanzia della qualità. Sono stati valutati i limiti di rivelazione, i limiti di quantificazione, la linearità, l'accuratezza in termini di precisione e di esattezza, la selettività e il recupero su due tipi di matrice contenenti peperoncino (salsa di pomodoro, salsa di pomodoro e formaggio) [4]. Eccellenti risultati sono stati ottenuti in termini di limiti di rivelazione e di quantificazione, calcolati negli intervalli 3-24  $\mu\text{g}/\text{kg}$  e 5-48  $\mu\text{g}/\text{kg}$  rispettivamente nelle due matrici, e in termini di recupero. Infatti, applicando un procedimento rapido di estrazione S/L, per tutti gli analiti il recupero è stato stimato negli intervalli 85-101% e 92-103 % ai livelli di concentrazione 1 e 5  $\mu\text{g}/\text{kg}$ .

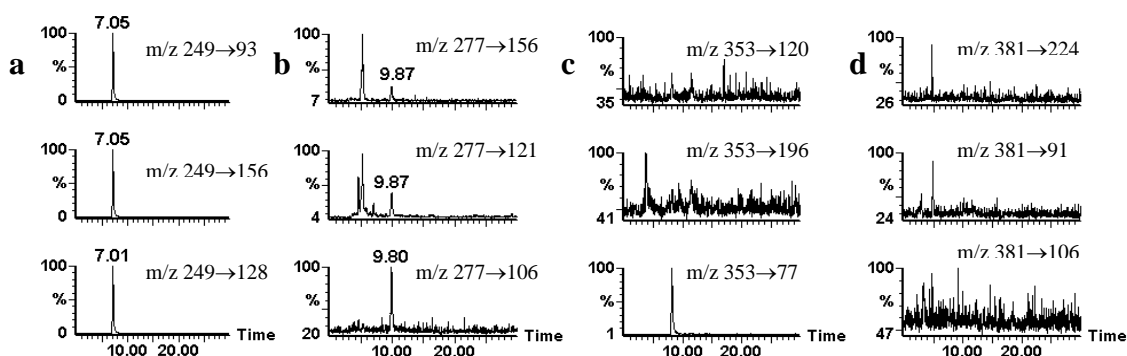


Figura 1. Cromatogrammi LC-QqQ-MS/MS di un campione di salsa di pomodoro con peperoncino. Analiti identificati: (a) Sudan I; (b) Sudan II.

Le tracce (c) e (d) si riferiscono al monitoraggio del Sudan III e Sudan IV.

La tecnica LC-ESI-QqQ-MS/MS si configura quindi come la tecnica di elezione per una analisi selettiva, sensibile ed accurata di questa classe di contaminanti in tracce in matrici complesse. Queste potenzialità sono evidenziate in Figura 1, che illustra i risultati ottenuti per un campione di salsa a base di pomodoro contenente peperoncino risultato positivo sia al Sudan I ( $1.41 \pm 0.06$  mg/kg) che al Sudan II (<LOQ).

In una seconda fase della ricerca, è stato messo a punto un metodo basato sulla cromatografia liquida capillare abbinata al sistema ESI-QTOF MS. Rispetto alla LC convenzionale, la cromatografia capillare consente di migliorare la sensibilità delle misure MS nel caso di impiego di un analizzatore TOF. Sono stati valutati i limiti di rivelazione in termini di concentrazione minima alla quale si ottiene un segnale nello spettro di massa a cui è possibile assegnare un valore di massa esatto con un'esattezza inferiore ai 5 ppm; i valori stimati su matrice sono risultati compresi fra 0.04 e 2 µg/g. L'accuratezza dei dati MS, critica per misure con analizzatore Q-TOF, è stata valutata in termini di precisione e di esattezza eseguendo misure replicate di massa esatta. La precisione su misure di massa esatta è stata calcolata in termini di  $\lambda_{\text{ppm}}$  (al 95% di confidenza)

$$\lambda_{\text{ppm}} = 10^6 / \text{CRS}^{1/2}$$

dove C è una costante strumentale, R è la risoluzione dell'analizzatore di massa e S è il numero di ioni campionati nella misura. La tecnica ha presentato buoni valori di precisione (inferiore a 9.5 ppm nei campioni reali) e di esattezza (errore medio nelle misure di massa pari a 0.04 ppm per Sudan I, -0.7 ppm per Sudan II, 1.6 ppm per Sudan III e 0.003 ppm per Sudan IV), che attestano le potenzialità di misure MS ad alta risoluzione per analisi di contaminanti.

Il metodo microLC-ESI-QTOF MS è stato quindi impiegato sia per la conferma dell'identità degli analiti nei campioni di salsa risultati positivi (esattezza <4.4 ppm) (Figura 2), sia per eseguire la frammentazione delle sostanze in esame con monitoraggio degli ioni prodotti in condizioni di alta risoluzione. Questo ha consentito di razionalizzare i processi di rottura dei legami delle molecole e degli eventuali riarrangiamenti delle strutture in fase gas.

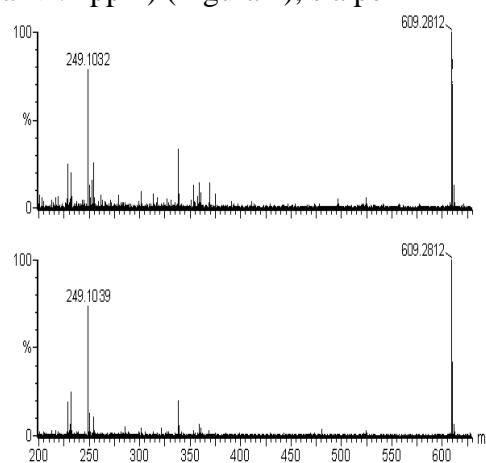


Figura 2. Spettri *microLC-ESI(+)-Q-TOF MS* di Sudan I (PM esatto teorico 249.1028) in un campione positivo di (A) salsa di pomodoro contenente peperoncino (PM esatto calcolato 249.1032, esattezza 1.6 ppm) e (B) (A) salsa di pomodoro e formaggio contenente peperoncino (PM esatto calcolato 249.1039, esattezza 4.4 ppm). Il segnale a  $m/z$  609.2812 è riferito alla reserpina (*lock mass*)

## Riferimenti

- [1] Commission Decision of 20 June 2003 on emergency measures regarding hot chilli and hot chilli products, notified under document number C(2003) 1970, (2003/460/EC), OJ L. 154/114, 21.6.2003.
- [2] Implementation of Commission Decision 2003/460/EC of the 21<sup>st</sup> January 2004.
- [3] F. Calbiani, M. Careri, L. Elviri, A. Mangia, L. Pistarà, I. Zagnoni, *J. Chromatogr. A*, (2004), in corso di stampa.
- [4] The Fitness for Purpose of Analytical Methods: A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics, *EURACHEM Guide*, (1998); <http://www.eurachem.ul.pt/>

---

Lavoro svolto nell'ambito del Progetto COFIN 2002 (MIUR): Sicurezza degli alimenti. Nuovi metodi di controllo per contaminanti naturali in tracce

**Lunedì 20 Settembre**  
**ELETTROANALITICA**

**Aula dei Filosofi**  
**Palazzo Centrale**  
**11.40-13.00**

## FILM ULTRASOTTILI DI IONOMERI PREPARATI MEDIANTE LA TECNICA DI LANGMUIR BLODGETT PER APPLICAZIONI IN SENSORI

*L.M.Moretto, P.Scopece, P. Ugo*

*Dipartimento di Chimica Fisica, Università Ca' Foscari di Venezia*

La voltammetria di scambio ionico è una tecnica elettroanalitica che impiega elettrodi solidi modificati con un film sottile di polimeri di scambio ionico [1]. Il rivestimento polimerico permette la preconcentrazione selettiva per scambio ionico e la determinazione voltammetrica di tracce di specie organiche e inorganiche elettroattive di interesse in campo ambientale, biomedico e farmaceutico. I film di ionomeri di scambio ionico vengono usualmente preparati mediante procedure di semplice deposizione di microvolumi di soluzione dello ionomero o per spin-coating. Tali procedure presentano, però, alcuni problemi, quali riproducibilità relativamente scarsa, difficoltà nel controllo delle proprietà strutturali e superficiali del film, oltre a richiedere lunghi tempi di preconcentrazione per l'incorporazione dell'analita.

Recentemente nel nostro laboratorio sono stati sviluppati metodi originali per la preparazione di film di polimeri ionomerici (Nafion, Tosflex, Eastman AQ) utilizzando le tecniche di Langmuir-Blodgett (LB) e Langmuir-Schaefer (LS) [1,2]. Le caratteristiche morfologiche di questi film sono state analizzate tramite microscopia a forza atomica. Film sottili LB e LS, di spessore dell'ordine di 10 nm, presentavano una uniformità soddisfacente e il completo rivestimento della superficie elettrodica, mantenendo completamente le proprietà di scambio ionico.

Le proprietà di scambio ionico e di trasporto di massa e di carica indicano un differente grado di organizzazione degli strati polimerici ottenuti con queste tecniche rispetto a quelle ottenute con i metodi convenzionali di rivestimento degli elettrodi [3].

Con la tecnica LB sono stati preparati film ultrasottili di una miscela ionomero/proteina per l'applicazione di elettrodi modificati utili nel campo dei biosensori. Sono presentati e discussi i risultati riguardanti la preparazione e la caratterizzazione di film di Nafion e del poliestere sulfonato AQ55 con citocromo c.

1. P.Ugo, L.M.Moretto, F.Vezzà, *ChemPhysChem*, **2002**, 3, 917-925.
2. P.Bertoncello, M.K. Ram, A.Notargiacomo, P.Ugo, C.Nicolini, *Phys.Chem.Chem.Phys.*, **2002**, 16, 4036-4043.
3. P.Bertoncello, P.Ugo, *J.Braz.Chem.Soc.*, **2003**, 14, 517-522.

# UN SENSORE ELETTROANALITICO PERMSELETTIVO PER LA DETERMINAZIONE DI PEROSSIDO DI IDROGENO IN PRESENZA DI ACIDO ASCORBICO

*Rosanna Toniolo, Mara Sabbadini, Sabina Susmel, Andrea Pizzariello,  
Nicolò Dossi, Gino Bontempelli*

*Dipartimento di Scienze e Tecnologie Chimiche, Università di Udine,  
via Cotonificio 108, 33100 Udine*

La determinazione selettiva di perossido di idrogeno in campioni nei quali è presente anche acido ascorbico (AA) rappresenta una problematica analitica che si riscontra in molteplici settori, quali quello alimentare, medico-biologico e ambientale<sup>1-6</sup>.

In particolare, in numerosi campioni alimentari contenenti AA, sia di origine naturale che appositamente addizionato per sfruttare la sua azione antiossidante, si riscontra anche la presenza di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, poiché questo è un prodotto naturale di alcuni processi ossidativi e respiratori. Inoltre, il perossido di idrogeno viene frequentemente impiegato nei processi di disinfezione, grazie al suo potere microbicida che trae origine dalla sua capacità ossidante, cosicché esso può residuare negli alimenti o nell'ambiente circostante, ove la sua presenza deve essere monitorata sia per ottemperare a disposizioni legislative che per motivi igienico-sanitari.

AA e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> esibiscono entrambi proprietà redox che sono fra loro antagoniste, cosicché il perossido di idrogeno agisce da ossidante nei confronti di AA portando, in base a considerazioni prettamente termodinamiche, ad un decadimento quantitativo di quello dei due componenti che risulta essere minoritario. Tuttavia, se uno di tali componenti è presente in concentrazione relativamente bassa, la cinetica di decadimento diventa così lenta da consentire la sopravvivenza contemporanea delle due specie nel medesimo campione anche per tempi piuttosto lunghi. Le importanti azioni esercitate da queste due specie rendono frequentemente essenziale il controllo della loro presenza in numerose matrici e questo comporta che la disponibilità di metodiche analitiche adatte alla loro determinazione selettiva nei campioni nei quali esse coesistono assuma un notevole rilievo. Tale disponibilità è tuttavia pesantemente limitata dalla circostanza che AA e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> presentano non solo, come già ricordato, proprietà redox tra loro antagoniste, ma anche altre proprietà chimiche che li rendono frequentemente interferenti l'uno nei confronti dell'altro.

Questa indagine è stata condotta allo scopo di sviluppare un sensore elettroanalitico per il monitoraggio selettivo di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in campioni contenenti anche AA che consenta di accedere ad un basso limite di rivelabilità, requisito indispensabile per la sua determinazione in tale tipologia di campioni nei quali esso è generalmente presente in bassa concentrazione (10<sup>-6</sup>-10<sup>-7</sup> M), inferiore di ca. 2-4 ordini di grandezza rispetto a quella di AA.

A questo scopo, è stato preliminarmente condotto per entrambi gli analiti un accurato studio voltammetrico su diverse superfici elettrodiche (Au, Pt e GC) e in mezzo acquoso tamponato a diversi valori di pH (2.8, 6.8 e 12.0). E' stato così possibile individuare alcuni approcci elettroanalitici che consentono la determinazione indipendente di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e del possibile interferente AA, sfruttando semplicemente la selettività consentita dai potenziali imposti e dalla diversa sovratensione esibita dai loro processi anodici sulle diverse superfici elettrodiche considerate. Questi approcci, seppur soddisfacenti sotto il profilo della selettività, si sono rivelati tuttavia inadeguati sotto il profilo del limite di rivelabilità relativo al perossido di idrogeno, anche allorché venivano adottati in un sistema in flusso (FIA) con rivelatore elettrochimico a due elettrodi lavoranti.

Questo sfavorevole risultato è stato superato adottando per il monitoraggio del perossido di idrogeno un elettrodo di Pt modificato con un sottile strato permselettivo che



consente l'accesso alla superficie elettrodica del solo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, impedendolo invece all'anione ascorbato che è la forma sotto la quale AA è presente al valore di pH=6.8 impiegato nelle misure. Il film permselectivo è stato preparato per elettropolimerizzazione anodica *in situ* di eugenolo, dopo aver verificato che esso offre, nel caso specifico, prestazioni migliori in termini di selettività rispetto a quelle fornite da film ottenuti per elettropolimerizzazione di altre analoghe specie fenoliche<sup>7</sup>, quali resorcinolo, guaiacolo ed isoeugenolo, in accordo con i risultati riportati anche da altri autori<sup>8,9</sup>. In questo caso, l'ottimale permselectività del film di polieugenolo deriva da una vantaggiosa combinazione di due meccanismi di esclusione, l'uno per dimensioni e l'altro per repulsione elettrostatica.

Le prestazioni di tale elettrodo modificato si sono rivelate pienamente soddisfacenti in termini sia di sensibilità, che di limite di rivelabilità e intervallo di risposta lineare nella determinazione FIA di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> su campioni sintetici contenenti anche AA. Inoltre, l'accoppiamento di tale elettrodo modificato con un semplice elettrodo di grafite vetrosa, inseriti entrambi all'interno di un rivelatore elettrochimico costituito da una cella a flusso laminare capace di alloggiare due elettrodi lavoranti posti tra loro in successione rispetto alla direzione del flusso, ha consentito l'assemblaggio di un sensore adatto alla determinazione selettiva e simultanea di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e AA anche in campioni nei quali essi sono presenti in concentrazioni molto diverse tra loro.

Le prestazioni di questo sensore bi-analita, valutate su campioni sintetici, sono riassunte nella seguente Tabella :

Analita	AA	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
Sensibilità (mA/M) Pt modificato E=800 mV	$(0 \pm 5) \times 10^{-3}$	$6 \pm 1$
Sensibilità (mA/M) Grafite vetrosa E=800 mV	$23 \pm 4$	$0.000 \pm 0.023$
DL su Pt modificato (M) (mol)		$8 \times 10^{-8}$ $8 \times 10^{-12}$
DL su Grafite vetrosa (M) (mol)	$6.6 \times 10^{-6}$ $6.6 \times 10^{-10}$	
Intervallo di risposta lineare su Pt modificato		$8 \times 10^{-8} - 5 \times 10^{-3}$
Intervallo di risposta lineare su Grafite vetrosa	$6.6 \times 10^{-6} - 1 \times 10^{-3}$	

Sono tuttora in corso indagini rivolte a valutare la trasferibilità di tale approccio a matrici reali, anche allo scopo di verificare se la permselectività esibita dal film di polieugenolo rende possibile la determinazione selettiva di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> anche in presenza di altri potenziali interferenti elettroattivi frequentemente presenti in numerosi campioni alimentari, quali etanolo, biossido di zolfo, antociani e fenoli.

- 1 T. J. Cardwell and M. J. Christophersen, *Anal. Chim. Acta* 416 (2000) 105.
- 2 M. P. Bradshaw, P. D. Prenzler and G. R. Scollary, *Electroanalysis* 14 (2002) 546.
- 3 Z. Peng, B. Duncan, K. F. Pocock and M.A. Sefton. *Aust. J. Grape Wine Res.* 4 (1998) 127.
- 4 A. Spector and W. Ma, R. Wang and N.J. Kleiman, *Exp. Eye Res.* 65 (1997) 457.
- 5 F. Palmisano and P. G. Zambonin, *Anal. Chem.* 65(1993) 2690.
- 6 R. T. Toledo, *J. Agric. Food Chem.* 34 (1986) 405.
- 7 J. Wang, S.-P. Chen, M.S. Lin, *J. Electroanal. Chem.* 273(1989)231.
- 8 A. Ciszewski and G. Milczarek, *Anal. Chem.* 71(1999)1055.
- 9 A. Ciszewski and G. Milczarek, *Electroanalysis* 13(2001)860.

# UN NUOVO METODO PER LA DETERMINAZIONE DI CADMIO, PIOMBO E RAME NELLE SPUGNE DI MARE (*SPONGIA OFFICINALIS* E *PETROSIA FICIFORMIS*) BASATO SULLA VOLTAMMETRIA DI RIDISSOLUZIONE ANODICA AD ONDA QUADRA (SWASV)

*Cristina Truzzi, Annalise Petroselli, Anna Annibaldi, Giuseppe Scarponi*

*Dipartimento di Scienze del Mare, Università Politecnica delle Marche  
Via Brecce Bianche, 60131 Ancona*

Le spugne di mare accumulano metalli pesanti in proporzione diretta alla concentrazione di questi nelle acque in cui vivono; per questo motivo esse sono state proposte come bioindicatori di inquinamento da metalli (1,2). Normalmente, la determinazione dei metalli in tracce nel tessuto organico delle spugne viene effettuata mediante spettrofotometria di assorbimento atomico e non si trovano in letteratura lavori relativi alla determinazione mediante voltammetria. Inoltre, a nostra conoscenza, non esistono metodi proposti per le misure nello scheletro siliceo (le cosiddette spicole).

In questo lavoro è stato sviluppato un nuovo metodo, voltammetrico, per la determinazione di Cd, Pb e Cu nelle spugne di mare, prendendo in considerazione sia il tessuto organico sia le spicole. È stata messa a punto una tecnica per ridissoluzione anodica basata sulla scansione del potenziale ad onda quadra (SWASV), che è stata confrontata con la metodica che prevede la scansione differenziale ad impulsi (DPASV). I risultati evidenziano che la tecnica ad onda quadra, come già si era verificato nel caso dell'acqua di mare (3), è più sensibile e permette di lavorare con tempi di analisi più brevi. Questa è stata quindi scelta.

Le spugne utilizzate appartengono a due specie ubiquitarie del bacino del Mediterraneo, la *Spongia officinalis* e la *Petrosia ficiformis*. Esse sono state prelevate nella riserva naturale di Portofino. Mentre la prima specie è costituita esclusivamente da tessuto organico, la seconda presenta anche uno scheletro siliceo costituito da spicole. Per quanto riguarda la preparazione del campione, è stato messo a punto un metodo sperimentale per l'essiccamento e la digestione dello stesso, per la separazione della parte organica della spugna dallo scheletro siliceo e per la dissoluzione delle spicole. I campioni sono stati essiccati sotto cappa a flusso laminare (classe 100) e il tessuto organico è stato disciolto in acido nitrico superpuro al 65%. Le spicole, ove presenti sono state separate dalla soluzione per decantazione, essiccate e disciolte con acido fluoridrico superpuro al 50%.

Risultati preliminari mostrano che le concentrazioni dei metalli pesanti nel tessuto organico sono dell'ordine di 1 ppm (riferito al peso secco) per Cd e Pb e di qualche decina di ppm per Cu. Il contenuto di metalli nelle spicole della specie *Petrosia ficiformis*, è invece decisamente inferiore rispetto al tessuto organico, dell'ordine delle decine di ppb.

Il metodo messo a punto per il tessuto organico fornisce risultati confrontabili con dati di letteratura ottenuti mediante altre tecniche (2,4). Non sono invece possibili confronti per le misure effettuate sulle spicole, dato che non esistono dati di letteratura.

1. I.V. Hansen, J.M. Weeks, M.H. Depledge, *Marine Pollution Bulletin*, 31 (1995), 133-138.
2. B. Patel, M.C. Balani, S. Patel, *The Science of Total Environment*, 41 (1985), 143-152.
3. C. Truzzi, L. Lambertucci, G. Gambini, G. Scarponi, *Annali di Chimica*, 92 (2002), 313-326.
4. B. Verdenal, C.D.A. Arnoux, J. Vacelet, *3<sup>d</sup> Int. Sponge Conf.* (1985), 516-524.

## DEVELOPMENT AND OPTIMIZATION OF THE ELECTROCHEMICAL IMMUNOASSAYS FOR DETECTION AND QUANTIFYING OCHRATOXIN A IN WHEAT

Sergio Alarcón,<sup>1</sup> Giuseppe Palleschi,<sup>1</sup> Dario Compagnone,<sup>2</sup> Michelangelo Pascale,<sup>3</sup> Angelo Visconti.<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Dipartimento di Scienze e Tecnologie Chimiche. Università degli Studio di Roma "Tor Vergata". Rome. Italy.

<sup>2</sup> Dipartimento degli Alimento. Università degli Studio di Teramo. Teramo. Italy.

<sup>3</sup> Istituto Tossine e Micotossine da Parassiti Vegetali, CNR. Bari. Italy.

Ochratoxin A (OTA) is one of the mycotoxins which are toxic secondary metabolites produced by fungi (the species *Aspergillus* and *Penicillium*) growing on agricultural commodities in the field or during storage. Ota occurs in a variety of food commodities of which cereal and cereal products, coffee, wine are beer are the most important sources of intake. OTA has been shown to be nephrotoxic, teratogenic, immunotoxic and carcinogenic in several animal species. The International Agency for research on Cancer has classified OTA as possibly carcinogenic in humans (group 2B carcinogenic).

The Standing Committee for Foodstuffs recently proposed E.U. regulatory limits for OTA in cereals (5 µg/Kg), cereal products (3 µg/Kg) and dried fruits (10 µg/Kg).

The methods currently used for identifying OTA are often based on high performance liquid chromatography (HPLC). These methods require cleanup steps before analysis and are not suitable to analyze multiple samples. Official analytical methods available for the analysis of mycotoxins in food and foodstuffs are listed in the AOAC International Official Methods of Analysis. For OTA, official HPLC methods are available for barley, corn, wheat, kidney, wine and beer (*J. Gilbert, E. Anklam, Trends in Analytical Chemistry, 91 (6-7), 468, 2002*).

The aim of this work is to provide a rapid, selectivity and sensitivity method for the determination of OTA using an immunochemical assay with electrochemical detection.

Primary attention was focused on describes the optimisation of the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) competition conditions with monoclonal antibodies for OTA, in the indirect and direct format, using spectrophotometric detection and the transfer of the assay to screen printed electrodes. In this way, 2 immunosensors were development.

One of these immunosensors (in the direct format) was challenged with wheat to assess a matrix effect. After this, a recovery study was performed by spiking the samples with OTA standards at different levels. Recovery values obtained were satisfactory, ranging from 70 to 120 %.

The present studies clearly show that these immunoassays with electrochemical detection could be applied to detect the OTA contamination in wheat. These electrochemical immunosensors provides very high sensitivity and optimal range, similar to HPLC official method and it will be useful to screen OTA contamination easily, simply and economically when the number of samples is large.

**Lunedì 20 settembre**

**BIOANALITICA**

**Aula Magna  
Palazzo Centrale**

**15.50-17.10**

## SVILUPPO DI UN METODO IMMUNOCROMATOGRAFICO RAPIDO E SENSIBILE PER LA DETERMINAZIONE DI AFLATOSSINE

*Laura Anfossi, Caterina Ferroglio, Gianfranco Giraudi, Adriano Vanni*

*Laboratorio di Bioanalitica, Dipartimento di Chimica Analitica, Università di Torino  
[laura.anfossi@unito.it](mailto:laura.anfossi@unito.it)*

I saggi immunochimici per la determinazione di analiti a basso peso molecolare sono normalmente del formato ELISA (saggi di tipo competitivo), con limiti di rilevabilità in condizioni ottimizzate dell'ordine dei ppb-ppt. Pertanto quando applicati a matrici reali, si osservano LOD dell'ordine dei ppb oppure è necessario ricorrere a pre-trattamenti del campione. Un miglioramento significativo del limite di rilevabilità dei saggi immunochimici può essere ottenuto utilizzando un formato di tipo non-competitivo. Questo formato è potenzialmente molto più sensibile del formato competitivo (LOD inferiore di uno-due ordini di grandezza), poiché nel saggio non competitivo si ha la misura di un segnale che è direttamente proporzionale alla concentrazione di analita, mentre nel saggio di tipo competitivo si osserva un segnale inversamente proporzionale alla concentrazione dell'analita. Tuttavia, il modello classico di saggio non-competitivo non può essere applicato ad analiti a basso peso molecolare, dato che richiede il legame simultaneo di due anticorpi che risulta impossibile per molecole di piccola dimensione.

Nel nostro gruppo, è stato studiato un modello di saggio immunochimico non-competitivo di tipo immunocromatografico per la determinazione di piccole molecole (in particolare di pesticidi), che ha dimostrato l'effettivo miglioramento nei limiti di rilevabilità previsti teoricamente [1]. Questo modello si basa sulla possibilità di legare l'analita per mezzo di un anticorpo specifico, presente in eccesso in soluzione, e di separare il complesso dall'eccesso di anticorpo libero attraverso un passaggio in cromatografia di affinità. In precedenza il complesso anticorpo-analita veniva rivelato mediante la raccolta dell'eluato e successiva incubazione in micropiastre per 24h, aggiunta di un secondo anticorpo marcato con enzima (1h) e sviluppo colorimetrico (30 min). Per limitare i tempi di analisi, ci si è rivolti alla possibilità di marcare in fluorescenza l'anticorpo specifico in modo da poter direttamente misurare la concentrazione del complesso in uscita dalla colonna cromatografica, attraverso la misura della fluorescenza dell'anticorpo. Infatti, l'eccesso di anticorpo libero rimane legato alla fase stazionaria, mentre il complesso analita-anticorpo non interagisce con questa e viene eluito in corrispondenza del volume morto. La fluorescenza misurata per il volume morto risulta direttamente proporzionale alla concentrazione di complesso analita-anticorpo e, in definitiva, alla concentrazione di analita presente in soluzione.

Il metodo descritto è stato sviluppato per la determinazione di aflatossine, una classe di metaboliti tossici prodotti da alcune specie di *Aspergillus*, che possono essere presenti in alimenti quali farina, mais, soia, arachidi e spezie di provenienza principalmente tropicale o sub-tropicale [2]. In particolare, l'aflatossina B1 (AFB1) è riconosciuta come carcinogena (gruppo I) dall'International Agency for Research on Cancer e l'Unione Europea stabilisce una soglia per la contaminazione in alimenti sia da AFB1, sia da aflatossine totali (somma di B1, B2, G1 e G2). I livelli soglia variano in funzione della matrice da 2 a 5 µg/Kg per l'AFB1 e da 4 a 10 µg/Kg per le aflatossine totali.

Per la messa a punto del metodo è stato necessario preparare la fase stazionaria per la cromatografia di affinità, immobilizzando covalentemente un coniugato proteina-AFB1 su di un opportuno supporto, ed ottimizzare i parametri che influenzano la separazione (in particolare, dimensioni della colonna e velocità di flusso). Inoltre, si è studiate ed ottimizzate sia la procedura per la marcatura in fluorescenza dell'anticorpo specifico con

fluoresceina isotiocianato, introducendo due passaggi successivi di marcatura a pH basico, sia un metodo di purificazione per affinità dell'anticorpo policlonale commerciale utilizzato.

Le indicazioni preliminari di applicazione del saggio alla determinazione dell'AFB1 (la più diffusa e tossica) mostrano la possibilità di raggiungere limiti di rivelabilità nel range dei ng/Kg, molto inferiori a quanto riportato per saggi immunochimici competitivi sia commerciali, sia descritti in letteratura (si veda, a titolo di esempio [4]). I tempi di analisi risultano drasticamente ridotti rispetto al metodo precedentemente sviluppato per un pesticida e sono dell'ordine dei minuti per ogni campione.

Inoltre, dato che i saggi di tipo non-competitivo sono per loro natura meno selettivi dei saggi competitivi, dato che si lavora in eccesso di anticorpo, si può applicare il metodo descritto non solo per migliorare le prestazioni dei modelli di saggio immunochimico generalmente utilizzati in termini di sensibilità e di rapidità della determinazione, ma anche per ridurre la selettività nei casi, come quello delle aflatossine, dove risulta importante non solo la determinazione del composto singolo, ma anche quella dell'intera classe di sostanze.

Questa ricerca è stato finanziato dal MIUR (COFIN prot. n. 2003035285\_003)

- [1] L. Anfossi, G. Giraudi, C. Tozzi, C. Giovannoli, C. Baggiani and A. Vanni, *Anal. Chim. Acta* 506 (2004) 87-95
- [2] European Mycotoxin Awareness Network, <http://www.lfra.co.uk/eman2>
- [3] Commission Regulation 466/2001 Official Journal L077, 16/03/2001, pp 0001-0003
- [4] S. Lipigorngoson, P. Limtrakul, M. Suttajit, T. Yoshizawa, *Food Addit. Contam.* 20 (2003) 838-845

# SVILUPPO DI UN NUOVO METODO IMMUNOENZIMATICO COMPETITIVO A FLUSSO CON RIVELAZIONE CHEMILUMINESCENTE PER APPLICAZIONI MULTI-ANALITA

Sonia Casolari<sup>1</sup>, Dora Melucci<sup>1</sup>, Pierluigi Reschiglian<sup>1</sup>, Mara Mirasoli<sup>2</sup>, Aldo Roda<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Dip. di Chimica "G.Ciamician", Università degli Studi di Bologna, Via Selmi 2, 40126 Bologna

<sup>2</sup>Dip. di Scienze Farmaceutiche, Università degli Studi di Bologna, Via Belmeloro 6, 40126 Bologna

Lo sviluppo di metodi analitici rapidi e sensibili per la determinazione quali-quantitativa di analiti presenti in tracce in campioni di origine alimentare è un obiettivo di notevole e sempre crescente interesse in chimica analitica. I metodi EIA (*Enzyme Immunoassay*) ben si prestano ad essere impiegati in questi casi in quanto sfruttano la selettività del legame analita-anticorpo (An-Ab) e l'effetto di amplificazione del segnale dovuto al *turnover* del substrato. I metodi EIA competitivi sono basati sulla interazione competitiva tra An ed un tracciante enzimatico (An\*, ottenuto per coniugazione con l'enzima) nei confronti di un numero limitato di molecole di Ab, in genere immobilizzate su un supporto solido (*Enzyme-Lynked Immunosorbent Assay*; ELISA) costituito tipicamente dai pozzetti di una piastra *microtiter* [1].

In questo lavoro proponiamo uno studio di fattibilità per la realizzazione di un metodo ELISA competitivo a flusso e multi-analita basato sull'uso di nano o microparticelle di diametro differente alle quali vengono legati diversi Ab, e che vengono separate utilizzando la tecnica di frazionamento in campo flusso-flusso (FIFFF), che le fraziona in base alle loro dimensioni. Ogni An così eluito sarà quindi singolarmente quantificato mediante la misura dell'attività enzimatica su ciascuna popolazione di particelle, previa costruzione di una curva *dose-risposta*, impiegando la chemiluminescenza (CL) come metodo di rivelazione ultrasensibile [2]. L'utilizzo di una fase solida nano o microdispersa presenta due peculiari vantaggi rispetto al formato convenzionale in piastra *microtiter*. In primo luogo la fase di lavaggio della superficie che lega gli anticorpi è attuata in corso di analisi. Inoltre la maggiore estensione dell'interfaccia solido-soluzione in uno sistema eterogeneo nano o microdisperso favorisce la cinetica della reazione immunologica.

Lo studio di fattibilità di tale metodo *immunoassay* è stato compiuto nel caso di un singolo analita, il cloramfenicolo (CAF), un batteriostatico ad ampio spettro d'azione il cui uso è stato vietato negli animali destinati alla produzione di alimenti per l'uomo in quanto presenta una notevole tossicità per l'uomo. Lo schema strumentale adottato prevede un accoppiamento di tipo *on-line* tra il dispositivo frazionatore FIFFF e il rivelatore a CL, con introduzione del substrato per lo sviluppo della CL in flusso post-colonna (FIFFF-FIA-CL). Sono state sperimentate condizioni tali da ottenere nel frattogramma una risoluzione a linea di base tra *void peak* e picco del ritenuto, un recupero alto e riproducibile, un meccanismo di frazionamento delle sfere che non perturbi la stabilità del legame An\*-Ab. La capacità del frazionatore FIFFF di separare nano e microparticelle di polistirene di vari diametri già dimostrata in precedenti lavori [5] evidenzia il potenziale impiego del nostro sistema FIFFF-FIA-CL per la realizzazione di un saggio immunoenzimatico multianalita e ultrasensibile, con risvolti applicativi di evidente interesse nel campo della contaminazione alimentare.

[1] C.P. Price, Principles and Practice of Immunoassay, 2<sup>nd</sup> ed. D.J. Newman Eds., New York, 1997.

[2] Roda, A. *et al.*, Fresenius J. Anal. Chem. (2000), 366, 752.

[3] Melucci, D. *et al.*, Talanta (2003), 60, 303.

[4] Reschiglian, P. *et al.*, J. Sep. Sci., (2003), 26, 1417.

[5] Reschiglian, P. *et al.*, Anal. Chem., (2000), 72, 5945.

## SVILUPPO DI UN SAGGIO IMMUNOCHEMILUMINESCENTE PER LA DETERMINAZIONE DI AZINFOS-METILE NELLA MATRICE APE

Fabiana Fini<sup>1</sup>, Stefano Girotti<sup>1</sup>, Severino Ghini<sup>1</sup>, Silvia Totti<sup>1</sup>, Josep Vicent Mercader<sup>2</sup>, Angel Montoya<sup>2</sup>, Sergei A. Eremin<sup>3</sup>

<sup>1</sup> U.C.I. Scienze Chimiche, Radiochimiche e Metallurgiche Università di Bologna, via San Donato 15, 40127 Bologna, Italy

<sup>2</sup> Laboratorio Integrado de Bioingeniería, Universidad Politécnica de Valencia, Camino de Vera, s/n. 46022-Valencia, Spain

<sup>3</sup> Department of Chemical Enzymology, Faculty of Chemistry, M.V. Lomonosov Moscow State University, Moscow 119899, Russia

I pesticidi organofosforati, nonostante la loro elevata tossicità, sono ancora fra i prodotti più utilizzati in agricoltura [Rossi S. *et al.*, 2001]. Questi pesticidi, a seguito di un loro uso spropositato, si accumulano nell'ecosistema, determinando quindi un pericolo per tutte le specie animali e per l'uomo, che ne sono continuamente esposti. Fra i composti organofosforati, uno degli insetticidi più tossici è l'*Azinfos-metile*. In particolare è stata dimostrata l'elevata tossicità di questa molecola per le api ed altri insetti benefici [Kamrin M.A., 1997]. L'ape è infatti un insetto molto sensibile alla presenza di pesticidi, e risponde al loro utilizzo nell'ambiente con la propria morte o trattenendone dei residui nel proprio organismo, rappresentando così un valido bioindicatore ambientale per il controllo dell'inquinamento dovuto all'azione di un ingente numero di contaminanti [Porrini C. *et al.*, 2002].

Scopo di questo lavoro è stata la messa a punto di un dosaggio immunoenzimatico ELISA di tipo competitivo per l'analisi qualitativa e quantitativa di pesticidi organofosforati, in particolare dell'*Azinfos-metile* che fosse rapido e sensibile e che potesse essere impiegato per lo *screening* di un grande numero di campioni. A tale scopo si è pensato di coniugare la grande sensibilità e selettività dei dosaggi immunologici con l'elevata sensibilità del sistema chemiluminescente luminolo/perossidasi. In particolare sono stati impiegati anticorpi monoclonali, dotati quindi di elevata specificità, e micropiastre a 96 pozzetti.

Le tecniche più utilizzate per la determinazione dei pesticidi organofosforati sono la gas cromatografia (GC) e la cromatografia liquida ad alta pressione (HPLC) [Rossi S. *et al.*, 2001], mentre l'estrazione dei campioni è generalmente basata su di una ripartizione liquido-liquido (LLE), che richiede una buona manualità e l'utilizzo di una elevata quantità di solventi [Morzycka B., 2002].

Il saggio ELISA è stato messo a punto valutando diversi parametri specifici (concentrazione degli immunoreagenti) e aspecifici (effetto di solventi organici). Il limite di rivelazione nel saggio immunoenzimatico per l'*Azinfos-metile* è risultato pari a 0,01 ng/mL con un  $IC_{50}=0,40$  nM. Il metodo chemiluminescente è stato inoltre confrontato con quello colorimetrico messo a punto con gli stessi reagenti, ottenendo una sensibilità, espressa come  $IC_{50}$ , paragonabile per i due metodi e un limite di rivelazione leggermente inferiore per la rivelazione luminescente (0,01 ng/mL per il chemiluminescente, 0,05 ng/mL per il colorimetrico), impiegando quantità uguali o inferiori di immunoreagenti.

Il saggio è stato poi applicato a estratti di api forniti dalla Cooperativa La Carlina. Il problema principale riscontrato nell'analisi di questo tipo di campioni è stato l'elevato effetto matrice dell'ape sul saggio ELISA. Sono stati quindi valutati campioni di ape estratti con due distinte metodiche, la ripartizione liquido/liquido e l'estrazione in fase solida con carbone grafitizzato, e opportunamente diluiti. Gli estratti ottenuti con questa seconda tecnica si sono rivelati i migliori per la successiva valutazione immunoenzimatica: nell'analisi di estratti con



carbone si ha un recupero dello standard aggiunto mai inferiore al 60%, mentre con l'estrazione liquido/liquido si ha un recupero che va dal 20% al 40% (Tab. 13). I risultati migliori si ottengono quindi utilizzando una metodica estrattiva molto meno laboriosa, più rapida, più a basso costo e con una netta riduzione del consumo di solventi, andando quindi ad eliminare anche il problema dello smaltimento degli stessi.

Sono infine stati analizzati alcuni campioni di api russe: la metodica ha consentito di individuare alcuni campioni sicuramente positivi, come confermato dall'analisi gascromatografica. L'*Azinfos-metile* è stato inoltre riscontrato in piccole quantità anche in altri campioni, ma in questo caso non è stato possibile il riscontro gas cromatografico poiché il limite di rivelazione di quest'ultimo per l'*Azinfos-metile* è superiore alla quantità contenuta nei campioni stessi (10 ng/mL).

Il saggio si è quindi rivelato efficace per la determinazione della presenza di *Azinfos-metile* nella matrice ape.

### **Bibliografia**

- ◆ Kamrin M. A., "Pesticide profiles", CRC press, New York, 1997.
- ◆ Morzycka B., "Simple method for the determination of trace levels of pesticides in honeybees using matrix solid-phase dispersion and gas chromatography", J. of Chromatography, 2002, 982: 267-273.
- ◆ Porrini C., Ghini S., Girotti S., Sabatini A. G., Gattavecchia E., Celliu G., "Use of honeybees as bioindicators of environmental pollution in Italy", In "Honeybees: the environmental impact of chemicals", J. Devillers and M. H. Pham-Delègue, Routledge-Taylor & Francis Group, London, 2002, 186-247.
- ◆ Rossi S., Dalpero A. P., Ghini S., Colombo R., Sabatini A. G., Girotti S., "Multiresidual method for the gas chromatographic analysis of pesticides in honeybees cleaned by gel permeation chromatography", J. of Chromatography, 2001, 905:223-232.

## SVILUPPO DI UN METODO BRET (BIOLUMINESCENCE RESONANCE ENERGY TRANSFER) PER LA RIVELAZIONE DI COMPOSTI CON ATTIVITÀ SIMIL-ESTROGENICA

*Elisa Michellini<sup>1</sup>, Mara Mirasoli<sup>1</sup>, Matti Karp<sup>2</sup>, Marko Virta<sup>3</sup>, Aldo Roda<sup>1</sup>*

<sup>1</sup> *Dipartimento di Scienze Farmaceutiche, Università di Bologna, Bologna*

<sup>2</sup> *Department of Biotechnology, University of Turku, Turku, Finland*

<sup>3</sup> *Department of Biochemistry and Food Chemistry, University of Turku, Turku, Finland*

Numerose evidenze sperimentali suggeriscono che la comparsa di anomalie riproduttive nella fauna selvatica e l'aumentata incidenza di determinate patologie (alcuni tipi di cancro, difetti congeniti dell'apparato riproduttivo, ridotta fertilità) nell'uomo siano correlate con l'esposizione a composti in grado di interferire con il sistema endocrino/di regolazione ormonale. Tali composti, definiti generalmente "distruttori endocrini" (Endocrine Disrupting Compounds, EDC), sono caratterizzati da strutture chimiche molto diverse, ma hanno in comune il meccanismo di tossicità, che deriva dalla loro capacità di legarsi al recettore per gli estrogeni (ER), attivandolo. Poiché molti di tali composti persistono nell'ambiente, è importante acquisire informazioni approfondite sulle loro possibili conseguenze sulla salute dell'uomo, in modo da permettere la definizione, a livello normativo, di limiti tollerabili negli alimenti o nell'ambiente.

Allo scopo di eseguire uno screening della presenza di composti ad attività simil-estrogenica in matrici complesse, è stato sviluppato ed ottimizzato un metodo BRET (bioluminescence resonance energy transfer) sensibile e di semplice realizzazione. Il metodo si basa sulla valutazione diretta dell'omo-dimerizzazione del recettore  $\alpha$  degli estrogeni (ER $\alpha$ ), come risultato della sua attivazione. Il fenomeno BRET si basa su un trasferimento di energia non radiativo che avviene tra un donatore bioluminescente ed un accettore fluorescente. In particolare, se la distanza tra donatore ed accettore ed il loro orientamento sono corretti, si osserva, in seguito alla reazione bioluminescente il trasferimento di parte dell'energia all'accettore e di conseguenza la sua emissione caratteristica.

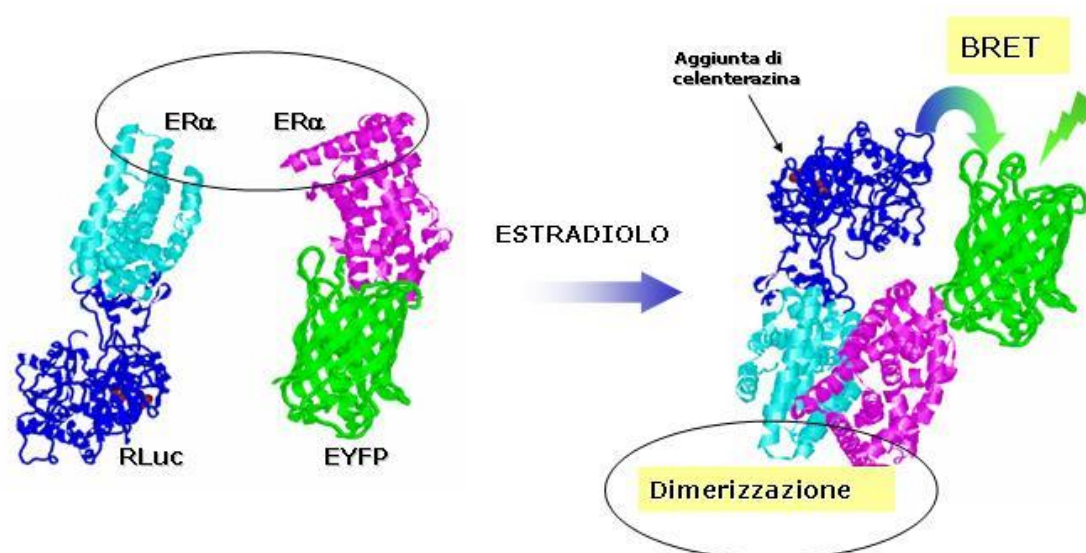


Figura 1. In seguito all'aggiunta di un composto in grado di attivare ER, si osserva la omo-dimerizzazione di ER $\alpha$  che comporta l'avvicinamento di RLuc e EYFP. Grazie al trasferimento energetico che ne consegue, si osserverà emissione da parte di EYFP in seguito all'aggiunta di celenterazina, substrato della reazione bioluminescente.

In questo lavoro, il monomero ER $\alpha$  è stato fuso geneticamente alla luciferasi da *Renilla* (Rluc) oppure ad una variante della green fluorescent protein (GFP), chiamata "enhanced yellow fluorescent protein" (EYFP). Quando le due proteine di fusione (ER $\alpha$ -Rluc e ER $\alpha$ -GFP) sono miscelate in assenza di estrogeni, si osserva, in seguito all'aggiunta di celenterazina (substrato della reazione bioluminescente), solo l'emissione di Rluc ( $\lambda_{\max}$  485 nm); viceversa, in presenza di estrogeni, la dimerizzazione di ER $\alpha$  avvicina le due proteine Rluc ed EYFP a circa 1-10 nm per cui, in seguito all'aggiunta di celenterazina, si osserva il trasferimento di energia che determina l'eccitazione di EYFP, la quale emette a  $\lambda_{\max}$  530 nm. Il fenomeno BRET, quindi, si traduce in una diminuzione dell'intensità di emissione a 485 nm e nella comparsa di un picco a 530 nm. Il principio del metodo è mostrato in Figura 1. Poiché l'efficienza del trasferimento di energia viene misurata come rapporto tra l'emissione dell'accettore e quella del donatore, questi metodi presentano il vantaggio, rispetto a quelli basati sulla semplice misura dell'intensità di segnali fluorescenti o bioluminescenti, di ridurre la variabilità dovuta a cambiamenti del numero di cellule e dei parametri sperimentali in genere.

In una prima fase è stato sviluppato un saggio di BRET *in vitro*. Nello specifico, le proteine di fusione ER $\alpha$ -Rluc and ER $\alpha$ -EYFP sono state espresse in *E. coli*, purificate ed utilizzate in soluzione. Sono state valutate le prestazioni analitiche del saggio *in vitro* in presenza di 17- $\beta$ -estradiolo. Successivamente, è stato sviluppato un saggio BRET *in vivo* tramite co-espressione delle due proteine di fusione in cellule di epatocarcinoma, HepG2, consentendo di valutare la biodisponibilità del composto da analizzare e studiare l'interazione all'interno delle cellule in maniera quantitativa. I risultati sono mostrati in Figura 2. Tale saggio può essere effettuato in piastre microtiter a 96 pozzetti e richiede un tempo di incubazione di 20 minuti del campione in soluzione acquosa con le cellule, consentendo un limite di determinazione pari a 1 nM di 17 $\beta$ -estradiolo con un intervallo dinamico da 10<sup>-9</sup> a 10<sup>-7</sup> M con EC<sub>50</sub> di 20 nM.

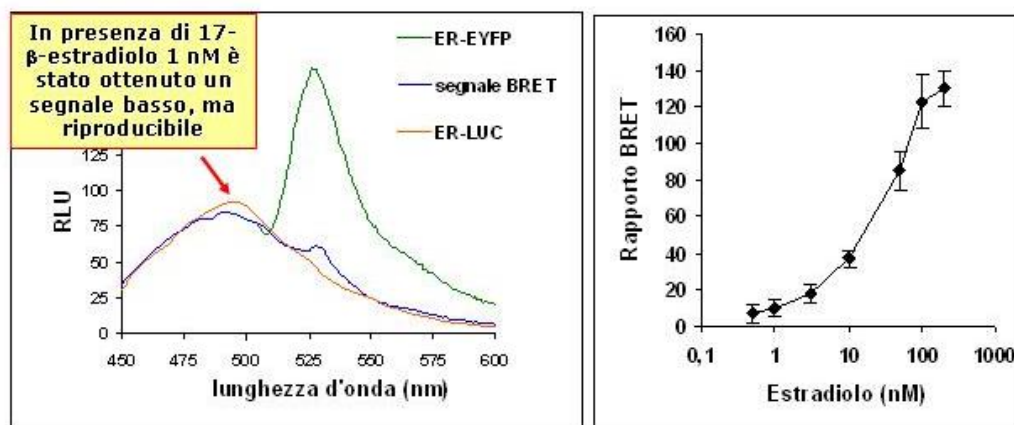


Figura 2. Sinistra: in seguito all'aggiunta di 17 $\beta$ -estradiolo, si osserva diminuzione dell'intensità di emissione a 485 nm e la comparsa di un picco a 530 nm. Destra: curva di calibrazione per 17 $\beta$ -estradiolo ottenuta mediante il metodo *in vivo*.

Questo nuovo metodo presenta quindi caratteristiche idonee all'utilizzo nello screening di xenoestrogeni e fitoestrogeni provenienti da campioni biologici od ambientali e per applicazioni ad alta produttività nel processo di "drug discovery".

**Lunedì 20 Settembre**

**SPETTROSCOPIA ANALITICA**

**Aula dei Filosofi  
Palazzo Centrale**

**15.50-17.10**

## CRESCITA E CARATTERIZZAZIONE DEL FILM PASSIVO SU ACCIAI INOSSIDABILI IN NaOH 0.1M MEDIANTE MISURE ELETTROCHIMICHE E XPS

*Danilo Addari, Davide Atzei, Bernhard Elsener, Antonella Rossi*

*Dipartimento di Chimica Inorganica e Analitica, Università di Cagliari, Complesso Universitario di Monserrato, I - 09042 Monserrato (Cagliari)*

L'idea, predominante fino agli anni '70, dell'eternità delle strutture di calcestruzzo armato ha dovuto scontrarsi con i limiti di durabilità di questo materiale, dovuti principalmente alla corrosione delle armature (fig. 1 a, b). Quest'ultima si può manifestare sia come fenomeno "generalizzato" (corrosione dovuta alla carbonatazione) sia come fenomeno "localizzato" in alcuni punti della barra di rinforzo, in questo caso denotato col nome di vaiolatura o "pitting corrosion" (fig. 1 c, d) [1]

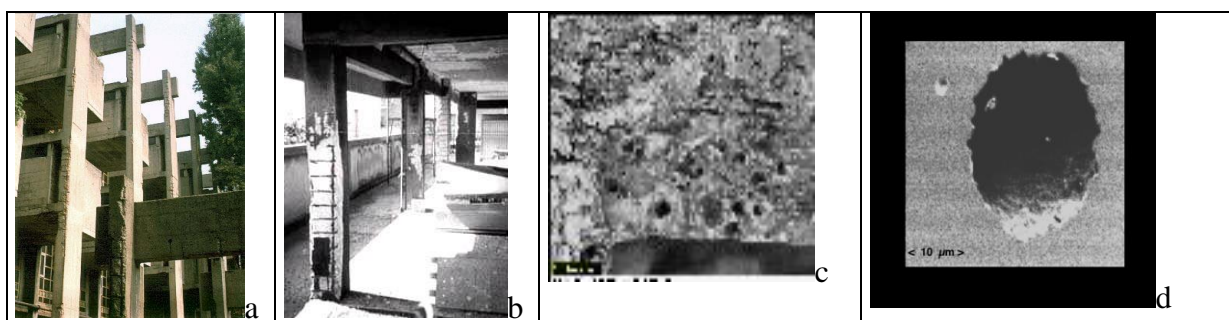


Figura 1 a,b Esempi di deterioramento di strutture di calcestruzzo armato; c Pitting su un acciaio inossidabile della serie 300; d Immagine SEM di un pit sullo stesso acciaio

Fra le soluzioni considerate per prolungare la vita d'esercizio delle strutture c'è la sostituzione, integrale o parziale, delle armature di acciaio al carbonio con barre di acciaio inossidabile. In generale, gli acciai maggiormente impiegati per questo scopo hanno microstruttura austenitica od austeno-ferritica (duplex) [1]. In questo lavoro sono stati studiati una lega modello contenente il 15% in peso di cromo, Fe15Cr, un acciaio austenitico, DIN 1.4301 o AISI 304 (18% Cr, 8% Ni), ed un acciaio austeno-ferritico, DIN 1.4462 (22% Cr, 6% Ni, 2% Mo).

Fino ad ora questi materiali sono stati studiati principalmente in mezzo acido o neutro. Il loro comportamento elettrochimico e le caratteristiche del film passivo che si forma sulla loro superficie in ambiente alcalino sono assai meno noti. Allo scopo di fornire un contributo in tale senso gli esperimenti sono stati progettati secondo il seguente schema:

- i campioni sono stati puliti meccanicamente con paste diamantate fino ad 1  $\mu\text{m}$ ;
- sono state condotte misure elettrochimiche di potenziale di circuito aperto (OCP) esponendo i suddetti campioni ad una soluzione di NaOH 0.1 M per tempi variabili da 15 minuti a tre giorni. Successivamente è stata effettuata l'analisi XPS per poter correlare le variazioni di potenziale alle modifiche intervenute nel film passivo.

Lo stato della superficie dopo pulitura meccanica a specchio è lo stato iniziale della superficie per tutti gli esperimenti riportati in questo lavoro. Tutti gli acciai, dopo immersione, assumono un potenziale di circuito aperto inizialmente assai negativo, dell'ordine di  $-600$  mV vs. SCE. L'OCP aumenta asintoticamente verso valori più positivi in funzione del tempo di immersione [2]. Questo indica una crescente passivazione della lega. Misure di analisi di superficie XPS permettono di distinguere i vari stati di ossidazione del ferro (figura 2), del cromo e del nichel. Dagli spettri del Fe2p<sub>3/2</sub> si calcola il rapporto Fe(II)/Fe(III) che diminuisce col tempo di esposizione alla soluzione (figura 3a). Il valore finale del potenziale

di circuito aperto è correlato alla percentuale Fe(II)/Fe(III) presente nel film passivo degli acciai [2].

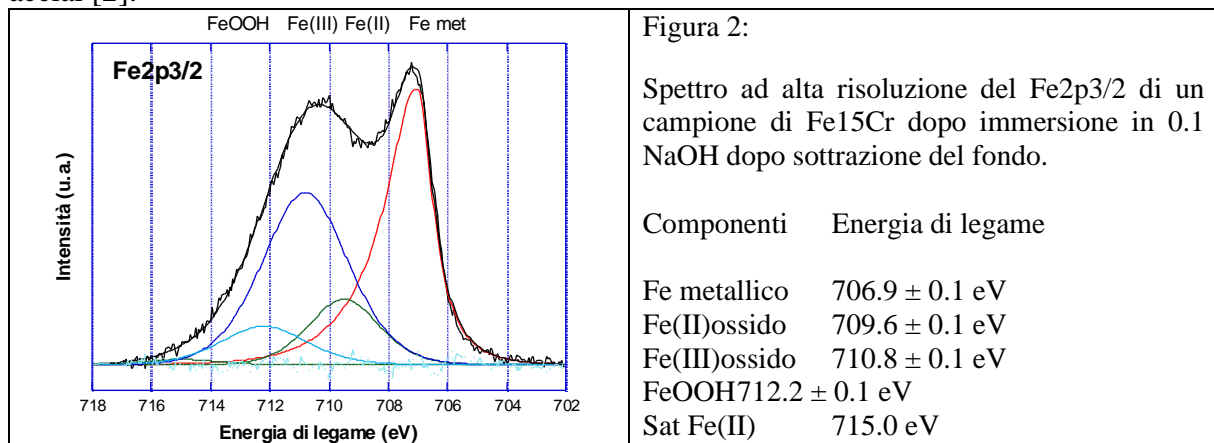


Figura 2:

Spettro ad alta risoluzione del Fe2p3/2 di un campione di Fe15Cr dopo immersione in 0.1 NaOH dopo sottrazione del fondo.

L'applicazione del modello a tre strati [3] per calcolare lo spessore e la composizione del film e dell'interfaccia film-lega immediatamente sottostante (figura 3b) permette di rivelare un arricchimento dell'ossido di cromo nel film ed un forte aumento del tenore di nichel metallico nell'interfaccia. Questo porta al modello della dissoluzione preferenziale del ferro (figura 3b). In sintesi, i seguenti fattori contribuiscono alla maggiore stabilità degli acciai presi in esame come armature del calcestruzzo:

- nel film passivo si verifica un arricchimento di ossi-idrossidi di cromo, l'impoverimento di ossidi di ferro e, nel DIN 1.4301, una marcata crescita della presenza di nichel ossidato;
- l'interfaccia film-lega è impoverita di ferro e di cromo, ma arricchita di nichel metallico.

Sono attualmente in corso le prove atte a valutare il comportamento degli stessi materiali in ambienti alcalini in presenza di ioni cloruro.

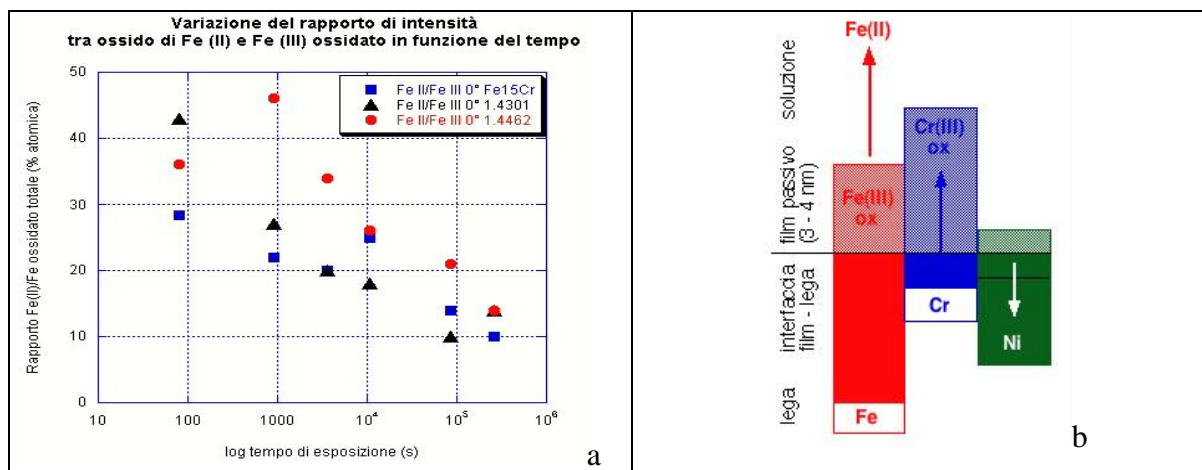


Figura 3 a Andamento del rapporto Fe(II)/Fe(III) ossido; b Meccanismo di formazione del film passivo: dissoluzione preferenziale del ferro (rosso), arricchimento del cromo nel film passivo (blu), arricchimento del nichel all'interfaccia film passivo - lega (verde).

[1] L. Bertolini, B. Elsener, P. Pedferri, R. Polder, *Corrosion of Steel in Concrete*, WILEY VCH (2004)  
 [2] A. Rossi, G. Puddu, B. Elsener, The surface of iron and Fe10Cr alloys in alkaline media, EUROCORR 2003 paper N° 105, *Accepted for publication by EFC: publication Nr 38 (2004)*  
 [3] A. Rossi, B. Elsener, *Surface Interface Analysis* 18 (1992) 499

Si ringraziano la Regione Autonoma della Sardegna (RAS) e il MIUR per il contributo alla ricerca

# CARATTERIZZAZIONE AFM E FOTOELETTROCHIMICA DI COMPOSTI SEMICONDUTTORI NANOSTRUTTURATI PER COMPONENTI DI CELLE SOLARI

*M. Innocenti<sup>a</sup>, S. Cattarin<sup>b</sup>, F. Loglio<sup>a</sup>, G. Pezzatini<sup>a</sup>, E. Salvietti<sup>a</sup>, and M.L. Foresti<sup>a</sup>*

<sup>a</sup>*Dipartimento di Chimica, Università degli Studi di Firenze, via della Lastruccia 3, 50019 Sesto Fiorentino (FI)*

<sup>b</sup>*Istituto per l'Energetica e le Interfasi del CNR, Corso Stati Uniti 4, 35127 Padova*

In questa comunicazione verranno riportati i risultati della crescita di composti semiconduttori depositati strato per strato su monocristalli di argento attraverso la tecnica Electrochemical Atomic Layer Epitaxy (ECALE)<sup>1,2</sup>. In particolare sono stati studiati composti binari quali CdS, ZnS e composti ternari quali  $Cd_xZn_{1-x}S$  e  $Cd_xZn_{1-x}Se$ .

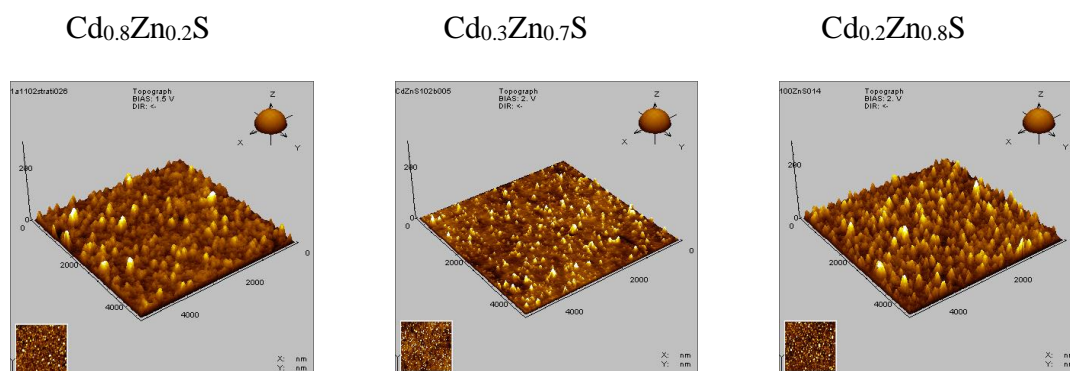
La quantità degli elementi depositata è stata determinata sciogliendo i depositi in HCl conc. e usando la tecnica classica dello stripping anodico su elettrodo a goccia di mercurio.

La Microscopia a Forza Atomica (AFM) è stata usata per caratterizzare:

1) Differenti morfologie dei composti ternari dello stesso spessore con differenti rapporti Cd/Zn.

2) Evoluzione morfologica al crescere della deposizione di  $Cd_{0.3}Zn_{0.7}S$ , sulle superfici di argento monocristalline.

La figura sottostante mostra immagini AFM di campioni di  $Cd_xZn_{1-x}S$  ottenuti con lo stesso numero di cicli di deposizione ma con differenti valori di composizione x.



I film ottenuti sono stati caratterizzati attraverso tecniche fotoelettrochimiche per misurare il bandgap dei materiali semiconduttori al variare del parametro di composizione x. Lo spettro di fotocorrente registrato agli elettrodi in giunzione liquida con una soluzione alcalina di polisolfuro mostra, in accordo con la letteratura, una transizione diretta per i composti ternari. Il bandgap di  $Cd_xZn_{1-x}S$  varia in modo lineare con il parametro stechiometrico x nel range 0-1, con un comportamento che indica la formazione di soluzioni solide su tutto l'intervallo di composizioni.

1 F.Loglio, M.Innocenti, G. Pezzatini and M.L. Foresti, J.Electroanal.Chem 562 (2004), 117-125.

2 M. Innocenti, S. Cattarin, F. Loglio, T. Cecconi, G. Seravalli and M.L. Foresti, Electrochimica Acta 49 (2004), 1327-1337.

# STUDIO XPS DELL'INFLUENZA DELLE CONDIZIONI SPERIMENTALI SULLA IMMOBILIZZAZIONE DI GLUTAMMATO DEIDROGENASI (GDH) SU Si/SiO<sub>2</sub> DI IMPIEGO IN BIOSENSORI

*M.R.Guascito<sup>a</sup>, C.Malitesta<sup>a</sup>, L.Longo<sup>b</sup>, G.Vasapollo<sup>b</sup>*

*<sup>a</sup>Laboratorio di Chimica Analitica, Dipartimento di Scienza dei Materiali, <sup>b</sup>Dipartimento di Ingegneria dell'Innovazione*

*Università di Lecce, Via Arnesano, 73100 Lecce*

L'importanza della spettroscopia fotoelettronica a raggi X (XPS) nello sviluppo di biosensori ad enzima immobilizzato è ormai testimoniata da numerose applicazioni [1, 2, 3]. Nel caso dell'immobilizzazione elettrochimica, per esempio, preziose informazioni sulla struttura chimica del film intrappolante sono state ottenute e correlate con alcune caratteristiche analitiche del biosensore [2].

Anche l'elemento biologico di riconoscimento può essere significativamente caratterizzato con XPS, praticamente non distruttiva anche su materiali così delicati. La quantità di enzima immobilizzato, direttamente determinabile mediante più complesse procedure che usano di marcatori radioattivi [4] o fluorescenti [5], può essere stimata attraverso una accurata valutazione delle specie chimiche dell'N e del C [6] e/o l'uso di tecniche di derivatizzazione chimica accoppiata a XPS [1]. Persino la disposizione dell'enzima sulla superficie elettrodica [7] può essere evidenziata utilizzando tutta l'informazione disponibile negli spettri XPS.

Anche l'immobilizzazione covalente di proteine a superfici solide ha beneficiato delle capacità della tecnica XPS. In questo caso l'impiego della tecnica può fornire informazioni non solo sul dispositivo finale, ma anche aiutare a caratterizzare i numerosi stadi necessari di derivatizzazione superficiale in termini di decorso effettivo della reazione, coverage/resa, identità delle unità biologiche immobilizzate, ecc.

Recentemente è stata riportata l'immobilizzazione di monostrati di GDH, ancora attiva, covalentemente ancorata a un substrato Si/SiO<sub>2</sub> [8]. Risultati preliminari relativi alla caratterizzazione XPS di tale sistema sono stati presentati [9]. Nella presente comunicazione vengono dettagliatamente illustrate le informazioni ottenute dall'indagine XPS su ciascuno degli stadi di derivatizzazione chimica (silanizzazione, reazione con dialdeide, ancoraggio dell'enzima) necessari per legare covalentemente GDH al substrato. Esse mostrano che nel range di concentrazioni utilizzate il grado di ricoprimento non è elevato né nello stadio di silanizzazione né in termini di proteina alla fine della procedura. Inoltre la reazione di formazione della base di Schiff coinvolge verosimilmente una forma oligimerica della dialdeide. Le interazioni elettrostatiche tra le molecole di proteina ( e quindi il pH) sembrano governare la quantità di enzima immobilizzato.

## **Bibliografia**

1. A. Glidle, T. Yasukawa, C.S. Hadyoon, N. Anicet, T. Matsue, M. Nomura, J. M. Cooper, Anal. Chem. 75 (2003) 2559
2. F. Palmisano, C. Malitesta, D. Centonze, P.G. Zambonin, Anal. Chem. 67 (1995) 2207
3. M. N. Mar, B.D. Ratner, S. S. Yee, Sens. Act. B54 (1999) 125
4. P. N. Bartlett, Z. Ali, V. Eastwickfied, J. Chem. Soc., Faraday Trans. 1 88 (1992) 2677
5. J. H. Wang, L.W. Ruddok, A. E. G. Cass, Biosens. Bioelectron 9 (1994) 647
6. A. Griffith, A. Glidle, G. Beanson, J. M. Cooper, J. Phys. Chem. B 101 (1997) 2092
7. G.E. De Benedetto, C. Malitesta, C.G. Zambonin, J. Chem. Soc., Faraday Trans. 90 (1994) 1499
8. G. Vasapollo e altri, Phys. Rev. E 67 (2003) 41902
9. C.Malitesta, L.Longo, G.Vasapollo, SCI2003, XXI Congresso Nazionale della SCI, Torino 22-27 giugno 2003, Atti, Vol.2, p. AN-CP-056



## **ANALISI XPS DI SUPERFICI DI MINERALI: UN NUOVO SISTEMA CHIUSO PER IL TRASFERIMENTO DEL CAMPIONE IN ULTRA ALTO VUOTO**

*Davide Atzei, Bernhard Elsener, Marzia Fantauzzi, Antonella Rossi*

*Dipartimento di Chimica Inorganica ed Analitica dell'Università di Cagliari, Complesso Universitario di Monserrato, SS 554, bivio per Sestu, 09042 Monserrato (Cagliari).*

*- INSTM Unità di ricerca di Cagliari*

L'XPS (X-ray photoelectron spectroscopy) è una tecnica analitica che permette di identificare quali elementi siano presenti sulla superficie ed il loro intorno chimico (speciazione) anche nel caso di matrici complesse. Questa tecnica è in grado di fornire, limitatamente ai primi strati atomici del campione (circa 30-100 Å a seconda del materiale), anche la composizione chimica (analisi quantitativa). L'analisi di sistemi reali multicomponenti e con strati sottilissimi di ossido in superficie richiede una modellazione (curve fitting) dei segnali multicomponenti. Per una corretta ed affidabile analisi qualitativa e quantitativa dei sistemi reali è dunque estremamente importante poter disporre di spettri acquisiti su campioni con una superficie ben definita in modo da poter ricavare i parametri per la modellazione. Uno dei limiti delle banche dati attualmente disponibili è che i dati sono stati acquisiti su campioni che presentavano uno strato di contaminazione di superficie e con spettrometri la cui geometria è molto diversa da quella attuale.

La preparazione del campione da sottoporre ad analisi di superficie costituisce, quindi, una fase particolarmente delicata perché contaminazioni o reazioni superficiali indesiderate possono compromettere il risultato dell'analisi. L'esigenza della preparazione e del trasferimento del campione in un sistema chiuso senza contatto con l'atmosfera è stata avvertita fin dagli anni 80. Sono stati così proposti sistemi direttamente collegati allo spettrometro che permettono la manipolazione del campione e la sua preparazione (fratture, abrasioni, test elettrochimici o test di usura) senza contatto con l'atmosfera. Questi sistemi sebbene possano permettere di realizzare studi anche molto interessanti [1, 2] sono molto costosi e presentano il limite di non adattarsi facilmente a campioni con forme diverse.

Nel Laboratorio d'Analisi di Superficie dell'Università di Cagliari tutte le operazioni di preparazione dei campioni, compresa quella di pasticcatura delle polveri, sono fatte in una camera a guanti che permette la manipolazione in ambiente controllato (Ar o N<sub>2</sub>), con tenori di O<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O inferiori a 1 ppm, di materiali estremamente reattivi verso l'ossigeno atmosferico e l'umidità. Tuttavia, detto metodo non elimina completamente l'esposizione del campione all'aria: quando questo deve essere estratto dalla camera a guanti ed introdotto nello spettrofotometro, benché l'operazione di trasferimento abbia una durata massima di una decina di secondi, può accadere che la superficie appena preparata subisca delle alterazioni irreversibili. Questa reattività è stata riscontrata riguardo a superfici "fresche" di minerali quali la pirite, o a campioni quali solfuri di rame da noi utilizzati come standard per la costituzione di una banca dati.

Per risolvere l'inconveniente, abbiamo quindi ideato e realizzato una "campana" munita di un piccolo coperchio a tenuta garantita da un O-ring, che permette il trasferimento del campione, dalla camera a guanti allo spettrofotometro, in un sistema senza contatto con l'atmosfera di laboratorio (Figura 1). Le dimensioni della campana sono limitate dal diametro della porta d'ingresso dei campioni in camera d'analisi ma essa è utile ed applicabile con successo al trasferimento di tutti i campioni di altezza non superiore ai 3 – 4 mm.

Gli accorgimenti tecnici per far sì che la campana fosse gestibile con il wobblestick dello strumento (accessorio col quale si posiziona il portacampioni nella sede d'analisi) e quelli adottati per trasferire la campana dalla camera a guanti (a pressione atmosferica) alla camera d'analisi (in ultra alto vuoto) saranno discussi in sede di presentazione.

In quell'occasione saranno inoltre illustrati e confrontati alcuni dati sperimentali acquisiti su campioni preparati in camera a guanti e trasferiti senza la campana e quelli ottenuti sugli stessi campioni trasferiti con la campana (in ambiente saturo di Ar).

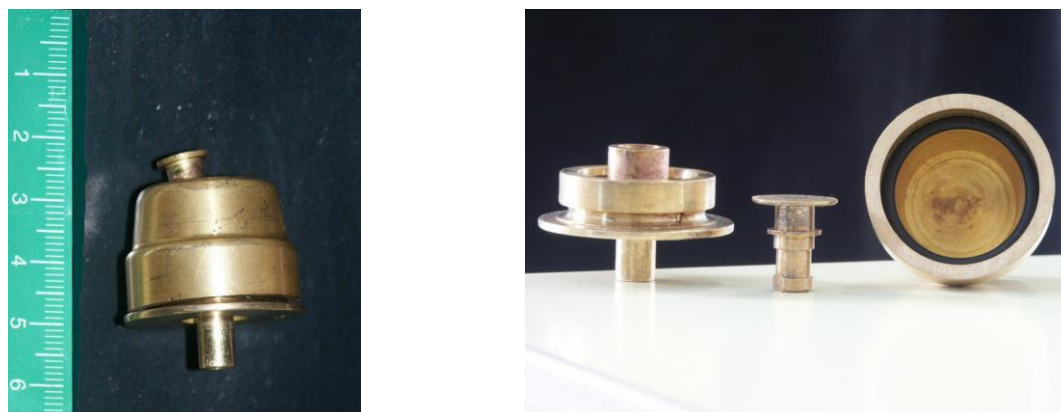


Fig 1 Campana in ottone per il trasferimento del campione dalla camera a guanti alla camera d'analisi in ultra alto vuoto senza contatto con l'atmosfera.

In figura 2a e 2b sono riportate le scansioni di insieme raccolte su pirite ( $\text{FeS}_2$ ) frantumata in ambiente controllato e trasferita a) mediante la campana e b) senza la campana che assicura l'isolamento da ossigeno, umidità e contaminazioni varie. Nell'esempio della figura a) sono assenti i segnali attribuibili a C di contaminazione e ad ossigeno. Questi segnali sono invece presenti sulla superficie della pirite contaminata, anche se solo per pochi secondi, dall'aria del laboratorio (spettro b).

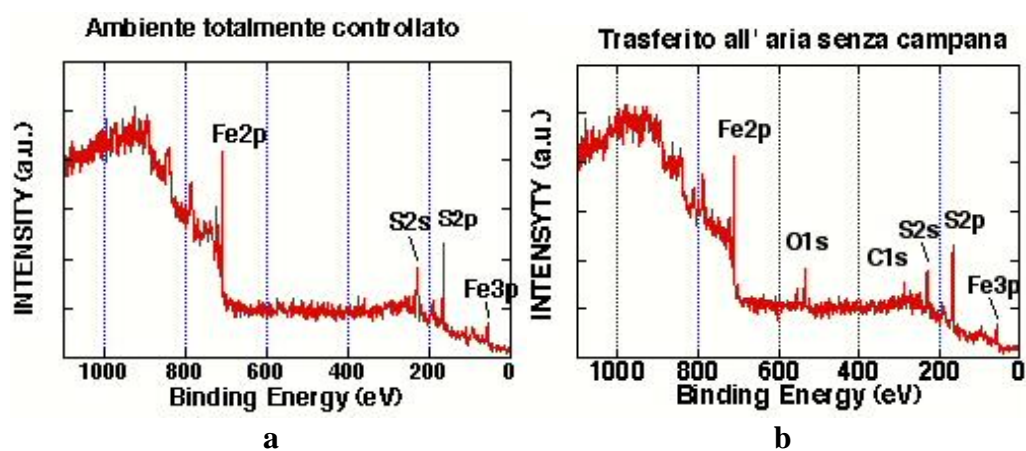


Figura 2. a) campione di pirite frantumato in camera a guanti e trasferito in ambiente controllato con la campana; b) campione trasferito passando per l'aria del laboratorio.

#### Ringraziamenti

Si ringrazia Carlo De Rubeis il cui lavoro in officina ha permesso la realizzazione della campana in ottone.

- 1 Haupt S, Collisi U, Speckmann HD, and Strehblow H.H., J ELECTROANAL CHEM 194 (2): 179-190 1985
- 2 Martin JM, Liang H, Le Mogne T, Malroux M, Low-temperature friction in the XPS analytical ultrahigh vacuum tribotester, TRIBOLOGY LETTERS, 14 (1): 25-31 JAN 2003

**Lunedì 20 settembre**

**CHIMICA ANALITICA E BENI CULTURALI**

**Aula Magna  
Palazzo Centrale**

**17.30-18.30**

# MONITORAGGIO DI SUPERFICI PITTORICHE SOTTOPOSTE A PROCESSI DI INVECCHIAMENTO ACCELERATO MEDIANTE TECNICHE SPETTROSCOPICHE E CARTE DI CONTROLLO MULTIVARIATE

*Maria Cristina Liparota, Emilio Marengo*

*Dipartimento di Scienze dell'Ambiente e della Vita,*

*Università del Piemonte Orientale "Amedeo Avogadro", Spalto Marengo 33, 15100 Alessandria*

## **Riassunto**

Oggetto di questo lavoro è lo sviluppo di un metodo per il monitoraggio dello stato di conservazione di superfici pittoriche, basato sull'applicazione dei principi del controllo multivariato di processo a dati spettroscopici.

Il metodo è stato sviluppato su campioni di tela di cotone dipinti con tre pigmenti organici (alizarina, rosso naftolo e verde ftalocianina). A questo scopo sono state preparate le 10 miscele dei pigmenti (miscele binarie, ternarie, e pigmenti puri) previste dal piano sperimentale *simplex-centroid augmented*. Ogni miscela è stata preparata pesando le polveri dei pigmenti e diluendo successivamente il coacervo in rapporto 1:1 con olio di lino. Con ogni miscela è stata dipinta una striscia di tela di cotone.

Inoltre, per simulare un dipinto vero e proprio, i tre pigmenti sono stati utilizzati per eseguire un disegno, realizzato in modo da creare nei vari punti della tela situazioni di composizione del colore il più possibile variabili. Atteso il tempo necessario per l'essiccazione, i campioni sono stati analizzati mediante tre tecniche spettroscopiche già ampiamente utilizzate nel ramo della conservazione di beni culturali, e cioè la spettroscopia ATR FT-IR, la spettroscopia Raman e la spettroscopia UV-visibile. I dati raccolti in questa fase di caratterizzazione forniscono una descrizione dello stato di conservazione delle superfici in condizioni di controllo statistico, dato che in questa fase, terminata l'essiccazione, i campioni vengono mantenuti in un'atmosfera controllata e non sono sottoposti a sollecitazioni che li possano alterare. Terminata la fase di caratterizzazione, che serve a raccogliere informazioni sulla variabilità sperimentale tipica dei vari campioni, in relazione alle tecniche di misurazione utilizzate, si è proceduto a sottoporli a processi di invecchiamento accelerato, esponendoli, per esempio, a raggi UV, per simulare l'esposizione ad una porzione aggressiva dei raggi solari. I trattamenti sono stati interrotti periodicamente per eseguire le analisi spettroscopiche sulle superfici, necessarie per seguire l'evoluzione delle componenti sottoposte ad invecchiamento accelerato.

Terminata la fase di invecchiamento accelerato i risultati delle analisi spettroscopiche sono stati utilizzati per costruire le carte di controllo basate sull'analisi delle componenti principali (Shewhart e CUSUM) e le carte SMART (Simultaneous Scores Monitoring and Residuals Tracking).

L'uso dei dati spettroscopici e delle carte di controllo multivariate ha permesso di individuare il momento in cui è iniziato il processo degradativo e di avanzare ipotesi sul tipo di processi degradativi instauratisi e sulle molecole coinvolte. L'uso di tre tecniche spettroscopiche diverse ha permesso di evidenziarne la diversa utilità in relazione al controllo dello stato di conservazione dei pigmenti e della superficie. Inoltre è stato possibile quantificare, nel dipinto simulato, la composizione in termini di percentuale dei tre pigmenti in ciascun punto della tela.

Il metodo di monitoraggio, già applicato con successo su oggetti di legno e campioni di tele dipinte con un unico pigmento<sup>1,2</sup>, ha mostrato di poter essere applicato con successo anche a miscele di pigmenti, cioè ad un campione che simula molto da vicino un dipinto vero e proprio. Le potenzialità di applicazione sono molto interessanti poiché tale metodo può

consentire, attraverso un monitoraggio continuo, di individuare prontamente la natura e l'inizio di un processo degradativo a carico del manufatto e di intervenire così con un'opportuna azione di recupero prima che si instaurino danni gravi.

### **Riferimenti bibliografici**

[1] E. Marengo, E. Robotti, M.C. Liparota, M.C. Gennaro: "A new method for monitoring the surface conservation of wooden objects by Raman Spectroscopy and multivariate control charts", *Analytical Chemistry* 75, 5567-5574, 2003;

[2] E. Marengo, E. Robotti, M.C. Liparota, M.C. Gennaro: "Monitoring of pigmented and wooden surfaces in accelerated ageing processes by FT-Raman Spectroscopy and Multivariate Control Charts", *Talanta* (in press).

**IMPIEGO DELLE TECNICHE DE-MS E GC-MS  
NELLA IDENTIFICAZIONE DI RESIDUI ORGANICI PRESENTI  
IN ANFORE ARCHEOLOGICHE EGIZIANE E ROMANE**

*F. Modugno, M.P. Colombini, E. Ribechini*

*Dipartimento di Chimica e Chimica Industriale, Università di Pisa,  
frances@dcc.unipi.it*

I residui organici rinvenuti in reperti archeologici quali ciotole, vasi o anfore, sono il risultato dell'elaborazione di sostanze di origine naturale effettuata dall'uomo centinaia o migliaia di anni fa. Lo studio chimico di tali residui fornisce informazioni sull'uso a cui erano preposti i manufatti, sulla dieta, sulle ricette di preparati con funzione medicale o cosmetiche oppure può dare indicazioni riguardanti le tecnologie in uso ed i trattamenti che venivano eseguiti sui manufatti ceramici allo scopo di renderli impermeabili per la conservazione di liquidi o nell'intento di effettuare una riparazione.

Questo lavoro descrive uno studio svolto sui materiali organici presenti come impermeabilizzanti sulla superficie interna di anfore egiziane (III-II secolo a.C.) e romane (IV sec. a.C.-II sec. d.C.). Nell'antichità la superficie interna del vasellame atto a contenere vino o altri liquidi veniva comunemente impermeabilizzata mediante un trattamento con resine o pece. Al fine di identificare i materiali impermeabilizzanti e sigillanti utilizzati e il loro stato di degradazione, vengono discussi i risultati ottenuti nell'analisi di numerosi campioni di rivestimento interno di anfore, di diversa tipologia, recuperate in due siti archeologici: il Porto Antico di Pisa, dove sono state rinvenute navi di epoca romana e parte del loro carico, e l'oasi di Medinet Madi nel Fayyum, in cui numerosi reperti ceramici sono stati portati alla luce nel corso di scavi di unità abitative situate nei pressi del Tempio.

Due approcci analitici basati sulla spettrometria di massa sono stati confrontati ai fini della caratterizzazione dei materiali organici archeologici: la spettrometria di massa risolta termicamente (DE-MS) e la gas cromatografia - spettrometria di massa (GC-MS). Le due procedure hanno permesso di stabilire che il materiale di impermeabilizzazione delle anfore per entrambi i siti archeologici era una pece ottenuta da resina di piante della famiglia delle *Pinaceae*.

I 51 campioni analizzati sono stati confrontati quantitativamente mediante analisi multivariata, in base al contenuto di 9 biomarker selezionati. L'esame della struttura dei dati, effettuato con analisi delle componenti principali ha messo in evidenza una chiara struttura nel set di dati ed ha reso possibile individuare differenze nel profilo molecolare riconducibili alle tecniche di produzione della pece ed ai processi degradativi subiti.

## LA CARATTERIZZAZIONE DI LEGANTI POLISACCARIDICI TRAMITE GC-MS

*M.P. Colombini, V. Restivo*

*Dipartimento di Chimica e Chimica Industriale, Università di Pisa, perla@dcci.unipi.it*

Le gomme vegetali (arabica, adragante, da albero da frutta...) sono state impiegate sin dall'antichità come leganti pittorici naturali .....Sono costituite da catene polisaccaridiche caratterizzate da varie unità di pentosi, esosi e acidi uronici.

La caratterizzazione dei leganti polisaccaridici a livello di pochi microgrammi in un campione pittorico comporta l'adozione di procedure analitiche atte alla rottura del legame glicosidico, alla eliminazione dei componenti non glicosidici, che rappresentano il contenuto maggiore del campione, e all'adozione di trattamenti capaci di evitare la formazione delle forme anomere.

Questo lavoro presenta una nuova procedura analitica basata su GC-MS per la determinazione di monosaccaridi ed acidi uronici, componenti le gomme vegetali, a livello di concentrazione di pochi  $\mu\text{g}$  in campioni antichi. In particolare, sono state ottimizzate:

- la reazione di mercaptalazione delle componenti glicosidiche per ottenere i rispettivi ditioacetali al fine di evitare la formazione di specie anomere;
- la reazione di silanizzazione delle componenti glicosidiche dietil-mercaptalate al fine di ottenere singoli componenti monosaccaridici e uronici volatili.

Caratteristica saliente della procedura sviluppata è la capacità di determinare tutte le componenti, monosaccaridiche ed uroniche, in un unico stadio analitico con limiti di rivelabilità compresi tra  $0,1 \text{ ng}/\mu\text{l}$  e  $0,3 \text{ ng}/\mu\text{l}$ .

La procedura sviluppata è stata impiegata per la caratterizzazione di campioni di gomme fresche, mentre l'applicabilità a campioni antichi è stata verificata tramite l'analisi di stesure pittoriche di riferimento invecchiate naturalmente e fornite dall'Opificio delle Pietre Dure di Firenze. L'analisi multivariata della struttura dei dati ottenuti ha permesso di distinguere tra di loro le diverse gomme vegetali analizzate e non ha evidenziato differenze significative tra gomme fresche e gomme naturalmente invecchiate. Vengono, infine, discussi i risultati ottenuti applicando la procedura proposta a campioni pittorici provenienti dai dipinti murali ritrovati nelle tombe macedoni di Aghios Athanassios, Lefkadia e Derveni, risalenti al IV-III secolo avanti Cristo.

**Lunedì 20 Settembre**

**EQUILIBRI IN SOLUZIONE**

**Aula dei Filosofi  
Palazzo Centrale**

**17.30-18.30**



## SPECIATION OF Mn(II), Zn(II) AND Cu(II) IN TEA INFUSION

*Giancarla Alberti, Raffaella Biesuz, Girolamo D'Agostino, Maria Pesavento*

*Dipartimento di Chimica Generale - Università di Pavia – Pavia (Italy)*

Tea is one of the most popular beverages in the world. Tea infusion contains little protein, vitamins, fibre and carbohydrate, but is nutritionally interesting, since it contains a considerably high concentration of some essential dietary metals [1]. The distribution of such metals between different chemical species is of overwhelming importance for the assimilation through the biological membranes. Their toxicity is determined not only by the concentration, but also by the chemical species in which the metal ions are present, the most toxic forms being usually the free metal ion, or the weakly bound species. Despite of the importance of this information, only a few investigations have been dedicated to the evaluation of the speciation of metals in drinks, and in particular in tea infusions.

In the present investigation not only the concentration of manganese(II), zinc(II) and copper(II) in some tea infusions was determined, but also their distribution in species of different stability. This was studied by a method based on the sorption of the metal ion on a complexing resin, which acts as the titrant of the metal ion. The method, called Resin Titration (RT), was previously used for the investigation of the metal speciation in fresh and seawaters [2, 3], and in one case also of aluminium speciation in tea infusion [4]. The metal concentration partially or totally sorbed on the considered resin under specific operating conditions, is determined, together with the reaction coefficient of the metal ion in solution, in the presence of the resin.

In the present research, the complexation of the metal ions is studied in black and green tea packed in portion bag, using the strongly sorbing resin Chelex 100. This makes it possible the investigation of high stability complexes, if they are present. The RT of the three metal ions was carried out simultaneously, with 0.08 g of resin, and sample volumes ranging from 10 to 150 ml. After one night equilibration, at room temperature and under stirring, the resin was separated, the metals eluted with 10 ml of 0.5 M nitric acid, and determined by GF-AAS. Different kinds of infusions were examined, for instance with and without paper bag, and with and without sugar. The investigation was carried out at the natural pH of the drink.

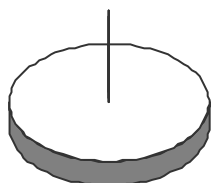
For all the metal considered, the total metal concentration was obtained also directly by GF-AAS in an acidified portion of the sample.

As an example, some results are graphically reported in the Figure. The largest fraction of metals are present in complexes defined as “weak complex” since they are quantitatively sorbed by Chelex 100, having a reaction coefficient lower than that reported in the Figure for each sample and metal. Actually, they are often not so weak, as for instance in the case of copper(II). In order to have more detailed information, this kind of complexes can be further investigated by RT using a less strong sorbing resin, for instance Amberlite CG 50.

It's important to point out that the method proposed does not give any indication about the chemical nature and the structure of the ligands. Nevertheless it is possible to compare the constants of the complexes here determined, which are real conditional constants, not operationally defined, with those reported in literature for selected ligands reasonably present in the sample. It is well known that tea contains a large number of compounds that are able to complex metal ions. It has often been assumed that polyphenols, which make up about 40% of the dry matter present in tea infusions, are the most important complexing compounds in tea due to the phenolic hydroxyl groups that provide a large number of potential complexation sites [4].

Distribution of metal ions between species of different stability in tea infusions, determined by RT with Chelex 100.

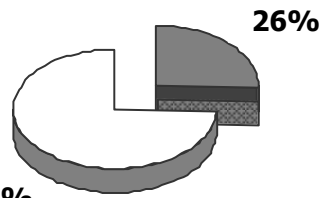
### Cu-black tea- pH=4.1



100%

- % strong ( $\log \alpha > 6$ )
- ▣ % intermediate ( $\log \alpha = 3.66$ )
- % very weak ( $\log \alpha < 4$ )

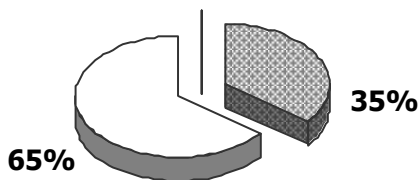
### Cu-green tea- pH=4.1



74%

- % strong ( $\log \alpha > 6$ )
- ▣ % intermediate ( $4 < \log \alpha < 6$ )
- % very weak ( $\log \alpha < 4$ )

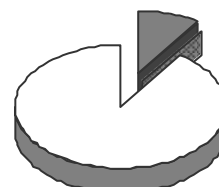
### Mn-black tea- pH=4.1



65%

- % strong ( $\log \alpha > 2.3$ )
- ▣ % intermediate ( $\log \alpha = 0.83$ )
- % very weak ( $\log \alpha < 0.3$ )

### Mn-green tea- pH=4.0

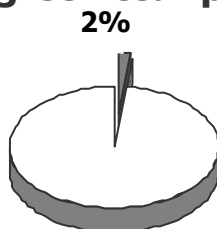


9%

91%

- % strong ( $\log \alpha > 2.3$ )
- ▣ % intermediate ( $0.3 < \log \alpha < 2.3$ )
- % very weak ( $\log \alpha < 2.3$ )

### Zn-green tea- pH=4.0



2%

98%

- % strong ( $\log \alpha > 3.4$ )
- ▣ % intermediate ( $1.4 < \log \alpha < 3.4$ )
- % very weak ( $\log \alpha < 1.4$ )

### References

- 1- J. Powell, T.J. Burden, R.P.H. Thompson, *Analyst* 123 (1998) 1721.
- 2- M. Pesavento, G. Alberti, R. Biesuz, *Anal. Chim. Acta* 367 (1998) 215.
- 3- M. Pesavento, G. Alberti, *Wat. Res.*, 34 (18) (2000) 4482.
- 4- G. Alberti, R. Biesuz, A. Profumo, M. Pesavento, *J. Inorg. Biochem.* 97 (2003) 79.

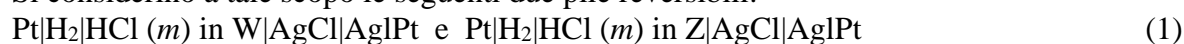
## NUOVO METODO DI QUANTIFICAZIONE DELL'EFFETTO PRIMARIO DI SOLVENTE SULLO IONE H<sup>+</sup> PER L'INTERCONFRONTO DI SCALE PH-METRICHE FRA SOLVENTI DIVERSI

*Luigi Falciola, Patrizia Mussini, Torquato Mussini e Francesco Rossi*

*Università Degli Studi di Milano, Dipartimento di Chimica Fisica ed Electrochimica, via Golgi 19, 20133 Milano; e-mail: torquato.mussini@unimi.it*

La *vexata quaestio* della pH-metria in solventi non acquosi od acquo-organici è quella della difficile interconfrontabilità delle scale pH-metriche (cioè dei pH<sub>X</sub> misurati, degli standard pH<sub>S</sub> di riferimento, e dell'ampiezza di ciascuna scala). Per la risoluzione di tale problema è indispensabile la determinazione del cosiddetto *effetto primario di solvente sullo ione H<sup>+</sup>* (B.B.Owen, R.G.Bates). Tale determinazione implica, com'è noto, procedimenti od assunzioni di carattere extratermodinamico, poichè essa riguarda il singolo ione H<sup>+</sup> e non l'intero elettrolita nella sua neutralità elettrica: i risultati di tali disparati procedimenti od assunzioni sono assai discordanti (Y.Marcus). Il procedimento qui proposto e sperimentato è particolarmente semplice e si presta ottimamente all'esplorazione sistematica di solventi acquo-organici a varia composizione.

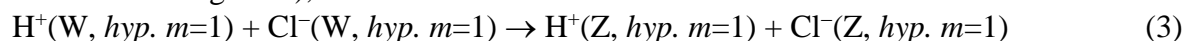
Si considerino a tale scopo le seguenti due pile reversibili:



per le quali si ha, per definizione:

$${}^{\text{W}}E^\circ - {}^{\text{Z}}E^\circ = 2k \log(\gamma^{\text{t}}) = (\Delta G^\circ_{\text{W} \rightarrow \text{Z}})_{\text{HCl}} / F \quad (2)$$

dove:  $k = (\ln 10)RT/F$ ;  $E^\circ$  = forza elettromotrice (fem) standard di pila;  $\gamma^{\text{t}}$  [*transfer activity coefficient*] costituisce misura dell'effetto primario di solvente (eps) sull'intero elettrolita HCl tra le due pile, cioè della variazione di energia standard di Gibbs  $(\Delta G^\circ_{\text{W} \rightarrow \text{Z}})_{\text{HCl}}$  per il trasferimento di HCl da W (=acqua) al solvente Z (non acquoso, oppure miscela W+S dove S = cosolvente organico), in condizioni di stato standard:



L'equazione 2 può essere riscritta nella forma:

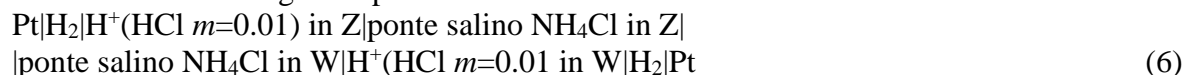
$$\log(\gamma^{\text{t}}) = (\Delta G^\circ_{\text{W} \rightarrow \text{Z}})_{\text{HCl}} / (2RT \ln 10) = \{({}^{\text{W}}E^\circ_{\text{AgCl}} - {}^{\text{Z}}E^\circ_{\text{AgCl}}) - ({}^{\text{W}}E^\circ_{\text{H}} - {}^{\text{Z}}E^\circ_{\text{H}})\} / 2k \quad (4)$$

ed articolata nelle due seguenti:

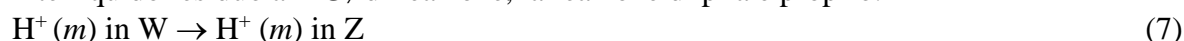
$$({}^{\text{W}}E^\circ_{\text{AgCl}} - {}^{\text{Z}}E^\circ_{\text{AgCl}}) = k \log(\gamma^{\text{t}})_{\text{Cl}^-} \quad (5a) \quad \text{e} \quad ({}^{\text{W}}E^\circ_{\text{H}} - {}^{\text{Z}}E^\circ_{\text{H}}) = k \log(\gamma^{\text{t}})_{\text{H}^+} \quad (5b)$$

in cui  $E^\circ_{\text{H}}$  ed  $E^\circ_{\text{AgCl}}$  sono rispettivamente i potenziali *assoluti* (cioè *veri*) dell'elettrodo ad idrogeno e dell'elettrodo a cloruro d'argento.

Si consideri ora la seguente pila eterosolvenziale:



dove, assumendo come ragionevolmente trascurabile il contributo del piccolissimo potenziale interliquido residuo al  $\Delta G_7$  di reazione, la reazione di pila è proprio:



ed il suo  $\Delta G_7 = -FE_6$  rappresenta la variazione di energia di Gibbs  $(\Delta G_{\text{W} \rightarrow \text{Z}})_{\text{H}^+}$  per il trasferimento di H<sup>+</sup> da W a Z a molalità *finita*. Pertanto, usando l'identica bassissima molalità (qui  $m=0.01$ ) per entrambi gli elettrodi, e poichè a tale diluizione l'equazione di Debye-Hückel certamente esprime con accuratezza i coefficienti d'attività  $\log(\gamma_{\text{H}^+})^{\text{W}}$  e  $\log(\gamma_{\text{H}^+})^{\text{Z}}$  (*effetto secondario di solvente su H<sup>+</sup>*), si perviene all'equazione:

$$RT \ln(\gamma^{\text{t}})_{\text{H}^+} = -F ({}^{\text{W}}E^\circ_{\text{H}} - {}^{\text{Z}}E^\circ_{\text{H}}) = (\Delta G^\circ_{\text{W} \rightarrow \text{Z}})_{\text{H}^+} \approx -FE_6 + RT \ln[(\gamma_{\text{H}^+})^{\text{W}}/(\gamma_{\text{H}^+})^{\text{Z}}] \quad (8)$$

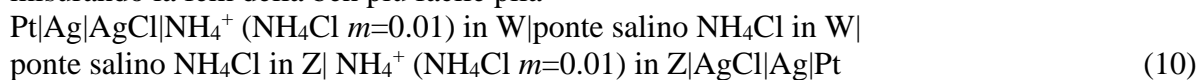
che fornisce il dato cercato di eps  $(\Delta G^\circ_{\text{W} \rightarrow \text{Z}})_{\text{H}^+}$ . La pila (6) è comunque di piuttosto laborioso assetto ed operazione. Pertanto, considerando che l'effetto primario di solvente sull'intero elettrolita HCl risulta dalla somma dei contributi del catione (H<sup>+</sup>) e dell'anione (Cl<sup>-</sup>),

$$(\Delta G^{\circ}_{W \rightarrow Z})_{\text{HCl}} = (\Delta G^{\circ}_{W \rightarrow Z})_{\text{H}^+} + (\Delta G^{\circ}_{W \rightarrow Z})_{\text{Cl}^-} \quad (9)$$

è assai più vantaggioso procedere per differenza rispetto al dato noto di  $(\Delta G^{\circ}_{W \rightarrow Z})_{\text{HCl}}$ , cioè

$$(\Delta G^{\circ}_{W \rightarrow Z})_{\text{H}^+} = (\Delta G^{\circ}_{W \rightarrow Z})_{\text{HCl}} - (\Delta G^{\circ}_{W \rightarrow Z})_{\text{Cl}^-},$$

misurando la fem della ben più facile pila



per la quale, trascurando il minimo potenziale interliquido residuo, la reazione è:



$$\text{e si ha: } -FE_{11} = \Delta G_{11} \approx (\Delta G_{W \rightarrow Z})_{\text{Cl}^-} \quad (12)$$

dove  $(\Delta G_{W \rightarrow Z})_{\text{Cl}^-}$  è la variazione di energia di Gibbs per il trasferimento da W a Z a molalità finita (qui ancora  $m = 0.01$ ). Ragionando con la stessa linea-guida, si perviene all'equazione:

$$RT \ln(\gamma^{\dagger})_{\text{Cl}^-} = F ({}^W E^{\circ}_{\text{AgCl}} - {}^Z E^{\circ}_{\text{AgCl}}) = (\Delta G^{\circ}_{W \rightarrow Z})_{\text{Cl}^-} \approx -FE_{11} + RT \ln[(\gamma_{\text{Cl}^-})^W / (\gamma_{\text{Cl}^-})^Z] \quad (13)$$

in cui l'ultimo termine (*effetto secondario di solvente su Cl<sup>-</sup>*) è quantificato mediante l'equazione di Debye-Hückel già citata.

Vale la pena di sottolineare alcuni punti importanti, che fanno preferire la pila (11) alla (6):

- (1) L'elettrodo a cloruro d'argento è di gran lunga più semplice e non meno adeguatamente affidabile e preciso (per lo scopo presente) di quello ad idrogeno;
- (2) Il ponte salino a  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , come da noi verificato incontrovertibilmente mediante amplissima sperimentazione preliminare, è quello che meglio mantiene adeguato livello di equitrasferenza (cioè assai strettamente  $t_+ = t_-$ ) passando dall'acqua agli svariati solventi non acquosi od acquo-organici;
- (3) Il catione  $\text{NH}_4^+$  dell'elettrolita di supporto ( $0.01 \text{ m NH}_4\text{Cl}$ ) è ora (cioè nella pila 11) identico a quello del ponte salino ( $\text{NH}_4\text{Cl conc.}$ ), e ciò contribuisce in modo decisivo all'azzeramento dei potenziali interliquidi.

La presente metodologia di determinazione dell'effetto primario di solvente sullo ione  $\text{H}^+$  è stata sperimentata estesamente su una vasta gamma di solventi non acquosi (protici ed aprotici, di permittività relative varianti tra 25 e 180) e loro miscele con acqua. I risultati, con le attese ricadute per l'interconfronto di scale pH-metriche in solventi diversi, vengono qui presentati e discussi.

## THE FORMATION OF IRON(III)-SALICYLHYDROXAMIC ACID COMPLEXES

*M. Iuliano<sup>1</sup> e G. De Tommaso<sup>2</sup>*

<sup>1</sup>*Dipartimento di Scienze Ambientali, Seconda Università di Napoli, via Vivaldi 43 - 81100 Caserta, Italy.* <sup>2</sup>*Dipartimento di Chimica, Università di Napoli "Federico II", via Cinthia 45 - 80126 Napoli, Italy.*

Hydroxamic acids are a class of organic acids of general formula  $RC(=O)N(R')OH$ , that have very important role in biological systems. These compounds possess antibacterial and antifungal properties and are inhibitors of enzymes (such as peroxidases and ureases). Moreover, their physiological effects have been attributed to particular affinity for metals, as Iron(III). Some of these molecules are studied as model for naturally Iron(III) siderophores, such as desferrioxamina B. One of these ligand is the Salicylhydroxamic Acid ( $H_2L$ ).

Studies on the complexation of Iron(III) with Salicylhydroxamic Acid are reported in this communications. The equilibria have been investigated at 25°C in 1 M  $NaClO_4$  ionic medium, using potentiometry and UV optical absorptiometry. The concentrations of  $Fe^{3+}$  and  $H^+$  ions were measured by a glass and redox  $Fe^{3+}/Fe^{2+}$  half-cells. Previous informations on the Iron(II)-Salicylhydroxamic Acid complexation constants must be known. The concentrations of the metal and of the ligand were varied in the range  $3 \cdot 10^{-4}$  M to 0.02 M and  $1 \cdot 10^{-4}$  M to 0.02 M respectively.

Even in acid media Iron(III) forms intensely coloured complexes with this ligand which are useful for spectrophotometric analysis. The absorption spectra of solutions containing Iron(III) and Salicylhydroxamic Acid in the ratio 1:0.1 to 0.1:1 were measured between 350 nm and 800 nm, at various acidity values.

In the evaluation of the experimental data graphical as well as numerical procedures (the least-squares computer program HYPERQUAD<sup>\*</sup>) were applied.

The potentiometric (e.f.m.) and spectrophotometric (spectr.) data have been interpreted with the equilibria:

EQUILIBRIA		E.F.M.	SPECTR.
$Fe^{3+} + H_2L \rightleftharpoons FeHL^{2+} + H^+$	$\log \beta_{1,1,1}$	$2.42 \pm 0.01$	$2.35 \pm 0.01$
$Fe^{3+} + 2H_2L \rightleftharpoons Fe(HL)_2^{2+} + 2H^+$	$\log \beta_{1,2,2}$	$3.05 \pm 0.02$	$2.95 \pm 0.02$
$Fe^{3+} + 2H_2L \rightleftharpoons FeL_2^- + 4H^+$	$\log \beta_{1,4,2}$	$-4.48 \pm 0.03$	—
$5Fe^{3+} + H_2O + 5H_2L \rightleftharpoons Fe_5(OH)_8(HL)_5^{2+} + 13H^+$	$\log \beta_{5,13,5}$	$1.57 \pm 0.03$	—

Equilibrium constants at infinite dilution have been evaluated by applying the specific interaction theory.

(\* ) P.Gans, A.Sabatini and A.Vacca, *Talanta*, **43**, 1739-1753(1996).

**Martedì 21 Settembre**

**CHIMICA ANALITICA E ALIMENTI**  
**Prima sessione**

**Auditorium**  
**Campus Universitario**  
**Area delle Scienze**

**9.00-11.00**

## **DETERMINAZIONE DELL' AFLATOSSINA M1 NEL LATTE TRAMITE SISTEMI DI ANALISI INNOVATIVI BASATI SULL'USO DI SENSORI ED IMMUNOSENSORI ELETTROCHIMICI**

*Palleschi G., Moscone D., Micheli L., Badea M.*

*Dipartimento di Scienze e Tecnologie Chimiche, Università di Roma "Tor Vergata", via della Ricerca Scientifica, 00133 Roma*

*Marconi E., Panfili G., Messia M.C., Candigliota T.*

*DISTAAM, Università del Molise, via De Sanctis, 86100 Campobasso*

*Cagnasso P., Gandolfi I., Maggi A., Di Silvestro G., Besia G.,*

*Parmalat, Ricerca e sviluppo, via San Vitale, Castellaro di Sala Baganza, Parma*

La sicurezza d'uso di un alimento è il principale requisito che deve rispettare l'azienda che produce alimenti destinati al consumo umano. Questo aspetto diventa ancora più stringente per l'industria alimentare qualora esista una precisa normativa che stabilisca i valori massimi ammissibili per determinati analiti negli alimenti.

L'azienda alimentare deve, quindi, impostare una strategia finalizzata all'utilizzo di sistemi di controllo che uniscano la validità analitica alle esigenze dell'industria (economicità e rapidità).

In questo contesto è stato predisposto un progetto europeo "Robust chemical sensors and biosensors for rapid on-line identification of freshly collected milk, QLK-CT-2001-01617", per lo sviluppo e validazione di metodi rapidi per la determinazione della aflatoossina M1 nel latte.

Nel latte di animali in lattazione, alimentati con mangimi contaminati con aflatoossina B1 prodotta da ceppi di *Aspergillus flavus*, è possibile riscontrare la presenza di un suo metabolita idrossilato, l'aflatoossina M1. L'entità di tale *carry-over*, che è influenzato anche dalla razza bovina, varia mediamente da 0.17 al 3%, con punte del 6%, dell'aflatoossina B1 ingerita.

L'aflatoossina M1 è una sostanza dotata di elevata tossicità sia acuta che cronica. L'elevatissima attività biologica e l'ampio spettro di azione delle aflatoossine scaturisce molto probabilmente dalla loro peculiare capacità di legarsi con gli acidi nucleici e con le nucleo proteine cellulari, determinando effetti deleteri sulla sintesi proteica e sull'integrità cellulare. A causa di ciò la Commissione Europea ha fissato un limite massimo consentito nel latte alimentare e derivati pari a 0.05 µg/Kg (Regolamento CE 466/2001; G.U. CE L77 del 16/03/2001).

In una prima fase del progetto sono state valutate le *performances* di metodi analitici utilizzati routinariamente per l'analisi del contenuto di aflatoossina M1 nel latte. In particolare, due basati sull'uso di colonnine di immunoaffinità e della cromatografia liquida (metodi AOAC 2000.08 e FIL-IDF 171:1995), ed un terzo basato sul sistema ELISA (kit commerciale).

Le *performances* analitiche dei metodi di riferimento sono state valutate mediante: a) uso di soluzioni standard di aflatoossina M1; b) aggiunta di standard di aflatoossina M1 al latte crudo e scremato; c) prove di recupero con diversi tipi di colonne di immunoaffinità; d) uso di materiale di riferimento certificato, e) circuito interlaboratoriale

Nella seconda fase del progetto i suddetti metodi di riferimento sono stati utilizzati per validare i nuovi sistemi di analisi utili ad evidenziare l'eventuale presenza dell'aflatoossina M1.

Tra i nuovi metodi proposti figurano:

- a) sistema elettrochimico che prevede l'uso di elettrodi screen printed (da usare sia come trasduttori di segnale che come fase solida su cui immobilizzare i reattivi) e misure di cronoamperometria e voltammetria differenziale ad impulsi (DPV).
- b) sistema flow injection immunoassay (FIIA) con rivelazione amperometrica. Questo sistema costituisce una nuova valida alternativa alla tecnica tradizionale ELISA con micropiastre.

*Attività di ricerca svolta nell'ambito del progetto europeo "Robust chemical sensors and biosensors for rapid on-line identification of freshly collected milk", QLK-CT-2001-01617. Coordinatore del progetto Prof. G. Palleschi.*



## “SUDAN” LE ESPERIENZE DEL GRUPPO NEOTRON DOPO UN ANNO DALL’ALLERTA ALIMENTARE

G. Zoboli<sup>^</sup>, A. Colombini<sup>^</sup>, N. Bandiera<sup>^</sup>, S. Malagoli<sup>^</sup>, G.C. Gatti<sup>^</sup>, R. Luneia<sup>\*</sup>

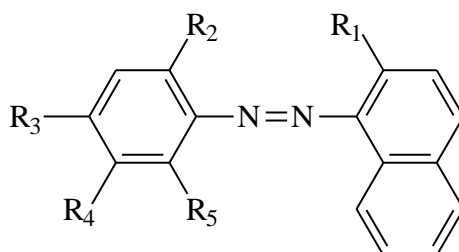
<sup>^</sup> NEOTRON S.p.A.-Stradello Aggazzotti, S. Maria di Mugnano (MO)

<sup>\*</sup> ANALYSIS s.r.l.-Gruppo NEOTRON- Loc. Pantalla di Todi- c/o Parco Tecnologico Agroalimentare dell’Umbria-Todi (PG)

### INTRODUZIONE

Nel maggio del 2003 la Francia notifica alla CE, attraverso il sistema di allerta rapido per gli alimenti, la presenza del colorante Sudan I in peperoncini rossi provenienti dall’India. Il Sudan I oltre ad essere un colorante non autorizzato negli alimenti, è una molecola cancerogena genotossica, classificata dallo IARC (Istituto per la Ricerca sul Cancro) nella categoria III delle sostanze cancerogene. La commissione europea con la Decisione 2003/460/CE del 21 giugno 2003<sup>1a</sup>, ha subito adottato misure di emergenza relativamente all’importazione ed ai controlli sul peperoncino rosso e sui prodotti derivati che possono contenere Sudan I. Nella successiva decisione del 30 gennaio 2004<sup>1b</sup> tali misure di emergenza sono state estese anche ai coloranti Sudan II, III e IV. Inizialmente sono state riscontrate due problematiche: l’assenza di metodiche analitiche applicabili agli alimenti in quanto i Sudan (I-IV) appartengono ad una categoria di coloranti utilizzati nell’industria delle vernici e la necessità di scendere a limiti di rivelazione molto bassi. Infatti vista la sua elevata tossicità e la sua origine dovuta esclusivamente ad aggiunte fraudolente non è possibile stabilire un limite di tolleranza se non il minimo valore che le migliori tecniche analitiche consentono di raggiungere. Tale argomento risulta quindi interessante sia per la messa a punto di metodi analitici robusti e rapidi, sia per l’ottenimento del maggior numero di dati analitici necessari a valutare la portata di questa “emergenza alimentare”.

Inizialmente sono stati proposti un metodo francese<sup>2</sup> in HPLC/DAD o LC/MS con un limite di quantificazione (LQ) per il Sudan I di 10 mg/Kg e due metodi inglesi<sup>3</sup> in HPLC/UV-Vis; nessuno di questi è stato però adottato come metodo di controllo univoco a livello comunitario rendendo quindi molto complicato l’ottenimento di riferimenti certi. Altre procedure analitiche utilizzate in Italia prevedevano l’utilizzo di purificazioni TLC e rivelazioni in GC/MS. Basandoci su queste informazioni il nostro gruppo ha potuto mettere a punto un metodo in LC-MS/MS (ESI) che permette di determinare il Sudan I con limiti di rivelazione di 0,005 mg/Kg (LQ 0,01 mg/Kg) e con limiti paragonabili anche per tutti gli altri sette componenti della famiglia del Sudan. In questo studio sono riportate le tappe che hanno consentito di raggiungere tale obiettivo.



**Sudan I:** R<sub>1</sub>=OH; R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub>, R<sub>5</sub>= H

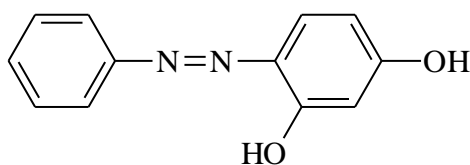
**Sudan II:** R<sub>1</sub>=OH; R<sub>2</sub>, R<sub>4</sub>=H; R<sub>3</sub>, R<sub>5</sub>=CH<sub>3</sub>

**Sudan III:** R<sub>1</sub>=OH; R<sub>2</sub>, R<sub>4</sub>, R<sub>5</sub>=H; R<sub>3</sub>=Ph-N=N-

**Sudan IV:** R<sub>1</sub>=OH; R<sub>2</sub>=CH<sub>3</sub>, R<sub>4</sub>, R<sub>5</sub>=H; R<sub>3</sub>=oCH<sub>3</sub>-Ph-N=N-

**Sudan Red 7B:** R<sub>1</sub>=EtNH; R<sub>2</sub>, R<sub>4</sub>, R<sub>5</sub>= H; R<sub>3</sub>=Ph-N=N-

**Sudan Red B:** R<sub>1</sub>=OH; R<sub>4</sub>=CH<sub>3</sub>; R<sub>2</sub>, R<sub>5</sub>=H; R<sub>3</sub>=mCH<sub>3</sub>-Ph-N=N-  
**Sudan Red G:** R<sub>1</sub>=OH; R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub>, R<sub>5</sub>=H; R<sub>2</sub>=CH<sub>3</sub>O-



**Sudan Orange G**

## MATERIALI E METODI

**Metodo A)** Il primo metodo messo a punto consentiva la determinazione del Sudan I mediante estrazione del campione omogeneizzato con metanolo o con una miscela acetone/esano 1:1 e purificazione per ripartizione liquido-liquido. Gli estratti organici ottenuti venivano poi analizzati in RP-HPLC-DAD (colonna Alltima C-18, fase mobile H<sub>2</sub>O/MeOH/THF). Una possibile conferma era effettuata in GC/MS (colonna DB5) previa purificazione degli estratti su Florisil.

**Metodo B)** Successivamente il metodo è stato esteso anche agli altri isomeri della famiglia del Sudan. I campioni omogeneizzati sono estratti con una miscela acetone/esano 1:1 e purificati per ripartizione liquido-liquido. Gli estratti organici concentrati sono rivelati in LC-MS/MS (ESI) (colonna XTerra C18, fase mobile Acido Formico 0,1%-Acetonitrile)

## CONCLUSIONI

Il nostro gruppo ha potuto analizzare molti campioni appartenenti a differenti matrici alimentari tra cui: peperoncini interi o in polvere, preparati gastronomici contenenti peperoncino quali paste secche, formaggi ed oli di oliva.

Per quanto riguarda gli aspetti prettamente tecnico-analitici è possibile affermare che il metodo in LC-MS/MS (Metodo B) si è dimostrato molto robusto e sensibile (LQ 0,01 mg/Kg per Sudan I, Sudan II e Sudan Red 7B e LQ 0,05 mg/Kg per Sudan III, Sudan IV, Sudan Orange G, Sudan Red B, Sudan Red G) in tutte le matrici alimentari analizzate (oltre 20). Tuttavia anche la rivelazione in HPLC/DAD è risultata essere robusta anche se meno sensibile (LQ 0,25 mg/Kg), ma comunque interessante per essere utilizzata come "screening iniziale" per campioni ad alto contenuto di Sudan I.

## BIBLIOGRAFIA

1. a) Decisione della Commissione Europea, 2003/460/CE, G. U. dell'U. E. serie L154/144 del 21 giugno 2003; b) Decisione della Commissione Europea, 2004/./CE, G. U. dell'U. E. serie L27/52 del 30 gennaio 2004.
2. Direction Generale de la Concurrence, de la Consommation et de la Repression des Fraudes "Methodes pour la recherche du Soudan I dans les poudres de piment".
3. Collaborative trial 145 of a method for the detection and determination of Sudan I in chilli products by HPLC: "Method 145A e 145B".

## SICUREZZA ALIMENTARE: DETERMINAZIONE DI RESIDUI DI ORMONI NEGLI ALIMENTI DESTINATI ALL'INFANZIA MEDIANTE SPETTROMETRIA DI MASSA AD ALTA E BASSA RISOLUZIONE

Manuel Sergi\*, Alessandra Gentili, Stefano Marchese, Roberta Curini

Dipartimento di Chimica, Università "La Sapienza" di Roma, Piazzale Aldo Moro n°5, P.O. Box 34, Posta 62, 00185 Roma, Italia.

Nei moderni sistemi di allevamento sono innumerevoli le sostanze naturali o di sintesi che vengono utilizzate per massimizzare la resa produttiva, come ad esempio l'incremento ponderale dei capi di bestiame tramite farmaci auxinici. Gli effetti che queste sostanze possono procurare sono molteplici e dipendono principalmente dalla loro natura, tossicità e dalla concentrazione. Non va trascurato però che non tutte le fasce della popolazione sono egualmente esposte al rischio tossicologico; in particolare, i bambini in età prepuberale sono fisiologicamente più sensibili rispetto ai soggetti adulti, anche a causa di una dieta meno variata e quantitativamente più ricca se rapportata al peso corporeo.

Allo scopo di minimizzare i rischi per i consumatori i legislatori hanno creato nel corso degli anni un sistema di regolamentazione e di controlli molto stringenti sulle derrate alimentari di origine animale. La direttiva 96/22/CE è stato sancito il divieto d'utilizzazione di talune sostanze ad azione ormonica, tireostatica e delle sostanze  $\beta$ -agoniste, in contrasto con le autorità americane per le quali queste sostanze sono permesse, seppure con certe limitazioni.

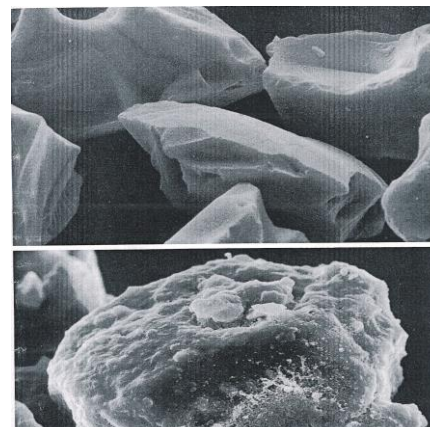
Il più recente provvedimento in materia redatto dalla UE (la decisione 657/2002) ha fissato dei parametri di qualità rigorosi per quanto riguarda le metodiche analitiche. Sono stati confermati due livelli nella procedura di ricerca di residui di contaminanti: lo screening e la conferma. Per quest'ultima vengono richieste performance, attraverso l'introduzione dei Punti di Identificazione (IP), che possono essere raggiunte solo combinando tecniche di cromatografia e di spettrometria di massa.

Per le sostanze che ammettono Limite Massimo di Residuo (MRL), antibiotici e chemioterapici in generale, sono necessari 3 IP, mentre per le sostanze bandite, tra cui ormoni,  $\beta$ -agonisti e corticosteroidi, almeno 4 IP devono essere raggiunti.

La Cromatografia Liquida accoppiata alla Spettrometria di Massa Tandem (LC-MS/MS) consente di raggiungere le specifiche per richieste dalla UE per i metodi di analisi di conferma (IP) per tutte le classi di composti ed inoltre permette una sensibilità maggiore delle altre tecniche analitiche attualmente utilizzate. E' stata, quindi, scelta questa tecnica per la determinazione di residui di ormoni in matrici alimentari carnee, con particolare attenzione ai prodotti per l'infanzia (omogeneizz

Per il recupero degli analiti dalla matrice si è scelto d

come la Dispersione della Matrice in Fase Solida (MSPD), che consente di ottenere in un unico step l'omogeneizzazione, la disgregazione cellulare e la purificazione del campione. Campione e supporto solido vengono dispersi in un mortaio grazie all'azione meccanica di un pestello che consente di ottenere pulverulenta, con cui successivamente è impaccata una cartuccia di vetro dalla capacità di 6 mL. L'eluizione degli analiti è realizzata con 6mL di metanolo mantenuto a bassa temperatura. L'eluato veniva, quindi, portato a  $-18^{\circ}\text{C}$ , filtrato e,

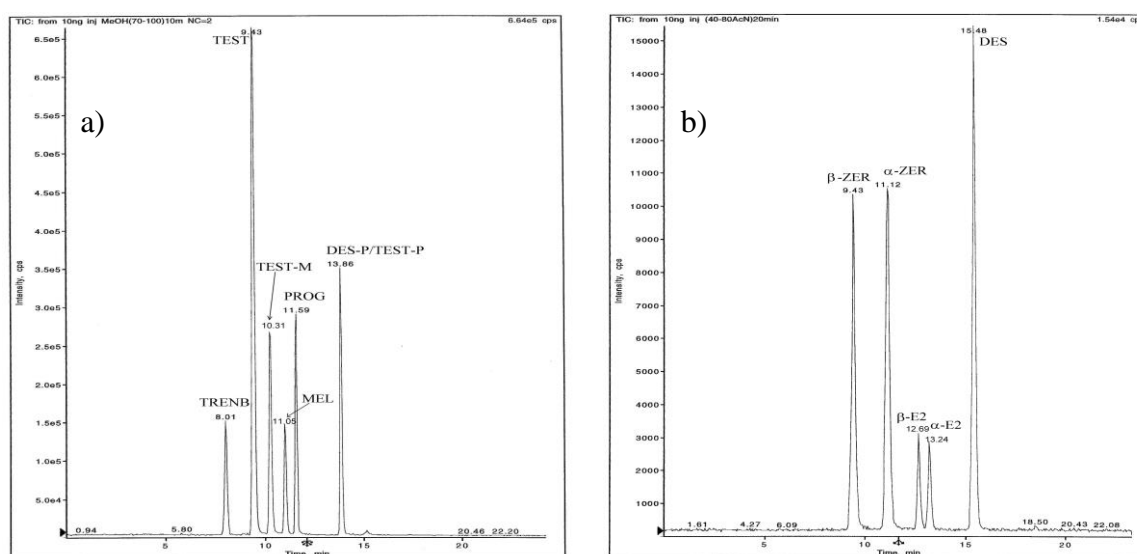


**Fig.1:** immagine al microscopio elettronico di particelle di C-18 prima e dopo la dispersione della matrice.

dopo essere stato concentrato tramite evaporazione, 50 $\mu$ L dell'estratto finale venivano iniettati nel sistema LC-MS.

Nella nostra ricerca abbiamo selezionato ormoni naturali e di sintesi tra androgeni: testosterone (TES), metil-testosterone (m-TES), testosterone propionato (TES-p) e trenbolone acetato (TREN); estrogeni :estradiolo (E2), dietilstilbestrolo (DES), dietilstilbestrolo dipropionato (DES-p),  $\alpha$ - e  $\beta$ -zeranolo ( $\alpha$ -e  $\beta$ -ZER); progestinici: progesterone (PROG), melengestrolo acetato (MEL).

Due differenti tecniche di ionizzazione sono state utilizzate nella determinazione di queste sostanze in quanto per alcune di esse (TREN, TES, m-TES, MEL, DES-p, TES-p,) è risultato vantaggioso l'utilizzo della sorgente APCI in ionizzazione positiva, mentre per ( $\alpha$ -e  $\beta$ -ZER, ( $\alpha$ -e  $\beta$ -E2, DES) è stata preferita la sorgente TurboIonSpray utilizzando una soluzione di ammoniaca in post-column per incrementare e stabilizzare la ionizzazione negativa.



**Fig. 2 a-b:** cromatogrammi degli ormoni rivelati in ionizzazione positiva con sorgente APCI (a) e negativa con sorgente TurboIonSpray (b)

Per la separazione cromatografica, effettuata in entrambi i casi in fase inversa su colonne C-18, la scelta delle fasi eluenti è stata fatta anche in funzione della tecnica di ionizzazione utilizzata: con la sorgente APCI l'utilizzo del metanolo come fase organica ha consentito di ottenere prestazioni migliori in termini di rapporto segnale/rumore rispetto all'acetonitrile, che invece si è dimostrato indispensabile in negativo per poter separare gli epimeri  $\alpha$ - e  $\beta$ -zeranolo ed  $\alpha$ - e  $\beta$ -estradiolo.

Per l'analisi quantitativa è stato utilizzato uno spettrometro di massa a triplo quadrupolo, in modalità MRM, selezionando due transizioni per ogni molecola (4 IP). Per gli androgeni ed i progestinici sono state riscontrati sempre due frammenti caratteristici che possono essere utilizzati per la ricerca di sostanze analoghe, ma di struttura incognita, attraverso la modalità Precursor Ion Scan. Al fine di ottenere una conferma (qualitativa) assoluta è stato utilizzato uno spettrometro di massa ibrido quadrupolo/Time of Flight (TOF) che permette di raccogliere l'intero spettro di frammentazione ad alta risoluzione per ogni sostanza lavorando in modalità Product Ion Scan (PIS).

# RESIDUI DI NITROFURANI NEGLI ALIMENTI DI ORIGINE ANIMALE: APPLICAZIONE DELLA DECISIONE 2002/657/CE IN UN LABORATORIO DI CONTROLLO UFFICIALE

Giannetti L., Barchi D., Neri B.

Istituto Zooprofilattico Sperimentale Regioni Lazio e Toscana, Via Appia Nuova 1411, 00178 Roma ([bneri@rm.izs.it](mailto:bneri@rm.izs.it))

L'uso dei nitrofurani quali il furazolidone, il furaltadone, il nitrofurazone ed la nitrofurantoina nelle produzioni animali è vietato nell'unione europea dal 1993 (1995 per il furaltadone) [1]. Queste sostanze sono farmaci con azione antibatterica e spesso sono aggiunte agli alimenti degli animali da reddito per promuovere la crescita delle loro masse muscolari e per impedire lo sviluppo di infezioni gastrointestinali causate da *Escherichia coli* e *Salmonella spp.* A causa dei potenziali effetti tossici sulla salute umana [2] l'unione europea ha proibito il loro relativo uso nella pratica di allevamento di animali destinati al consumo umano.

I nitrofurani possiedono una stabilità relativamente breve nei tessuti degli animali a cui vengono somministrati (poche ore di vita), mentre i loro metabolici persistono nelle carni per periodi più lunghi, legati alle proteine animali nei tessuti edibili (dai 4 ai 10 giorni dopo somministrazione) [3]. Per questa ragione il monitoraggio dei residui dei metaboliti dei nitrofurani, ovvero di 1-aminoidantoina (AHD; metabolita della nitrofurantoina), 3-amino-2-oxazolidone (AOZ; metabolita del furazolidone), 5-methylamorfolino-3-amino-2-oxazolidone (AMAZ; metabolita del furaltadone) e della semicarbazide (SEM; metabolita del nitrofurazone) permette di controllare efficacemente l'utilizzo illegale di queste sostanze. Nel 2002, in seguito al rinvenimento di residui di metaboliti di nitrofurani in prodotti alimentari importati da Paesi Asiatici e America Latina, la Comunità Europea ha imposto agli stati membri, di aumentare il numero dei controlli sui prodotti alimentari importati dai questi Paesi considerati ad elevato rischio.

Il presente lavoro descrive il processo di validazione di un metodo analitico sensibile e semplice per la rilevazione dei quattro metaboliti dei nitrofurani, nei tessuti di pollo e gamberi, basato su una reazione d'idrolisi con acido cloridrico, una reazione di derivatizzazione con 2-nitrobenzaldeide e un'estrazione con acetato di etile. I derivati nitrofenilici ottenuti sono analizzati tramite cromatografia liquida - spettrometria di massa senza alcuna ulteriore procedura di purificazione.

La validazione è stata eseguita secondo i criteri riportate nella Decisione Europea (2002/657/CE) determinando la linearità, la precisione, il recupero, la specificità, la capacità di rilevazione e il limite di decisione utilizzando metaboliti marcati.

Il metodo e può essere applicato anche ad altre matrici animali come tessuti di maiale, uovo, miele.

Infine sono riportati i dati relativi all'incidenza dei campioni analizzati in Italia durante il periodo compreso tra il 2002 e il 2004 su alcuni prodotti analizzati nel nostro Paese nell'ambito dei programmi di controllo ufficiale. Positività dovute alla presenza di SEM e AMAZ sono state riscontrate in alcuni dei campioni investigati e confermate in spettrometria di massa rispettando i criteri della Decisione Europea (2002/657/CE) sopra citata.

## Riferimenti bibliografici

- [1] Commission Regulation (EC) 1442/95, Off. J. Eur. Commun. No. L143, 1995, p. 26.
- [2] Van Koten-Vermeulen, J.E.M., Wouters, M.F.A., and Van Leeuwen, F.X.R. (1993) Report of the 40<sup>th</sup> Meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA), World Health Organisation, Geneva, 85-123
- [3] R.J. McCracken, W.J. Blanchflower, C. Rowan, M.A. McCoy, D.G. Kennedy, Analyst 120 (1995) 2347.

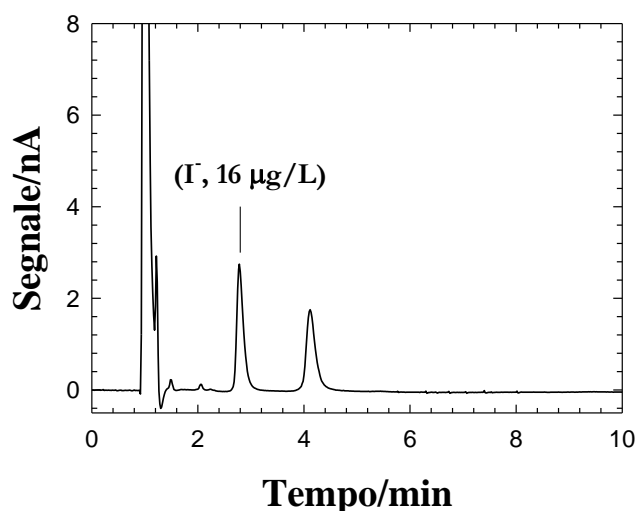
# DETERMINAZIONE ALTAMENTE SENSIBILE E SELETTIVA DELLO IODURO IN MATRICI ALIMENTARI MEDIANTE CROMATOGRAFIA A SCAMBIO ANIONICO E RIVELAZIONE ELETTROCHIMICA SU ELETTRODO DI PLATINO

*Alessandra Rubino, Luca Miccoli, Maria Carmela Laviola e Tommaso R.I. Cataldi*

*Dipartimento di Chimica, Università degli Studi della Basilicata,  
Via N. Sauro, 85 - 85100 Potenza ([cataldi@unibas.it](mailto:cataldi@unibas.it))*

Lo iodio inorganico è da molti anni riconosciuto come un micronutriente essenziale per la salute umana e la sua assunzione giornaliera, attraverso la dieta, è indispensabile per garantire il regolare svolgimento di funzioni metaboliche [1]. Lo iodio, sotto forma di ioduro, è essenziale per la biosintesi degli ormoni tiroidei tetraiodotironina o tiroxina ( $T_4$ ) e triiodotironina ( $T_3$ ), che, nei mammiferi in fase di crescita, sono fattori fondamentali per un normale sviluppo; nell'adulto, invece, il ruolo principale è quello di mantenere la stabilità metabolica influenzando la funzione di tutti gli organi. La quantità giornaliera minima raccomandata di iodio (RDA) è per un individuo adulto di 150  $\mu\text{g}/\text{die}$  ed aumenta fino a 200  $\mu\text{g}/\text{die}$  per le donne durante il periodo di allattamento. Un apporto di 40-50  $\mu\text{g}/\text{die}$  è sufficiente nei neonati [2]. Variazioni significative rispetto alla sua concentrazione ottimale nei tessuti e nei liquidi organici mettono a rischio la salute dell'individuo. Quando lo iodio non viene assunto in quantità sufficienti ad assicurare una normale produzione ormonale si ha una predisposizione al gozzo e all'ipotiroidismo. Gli effetti negativi della deficienza di iodio sulla crescita e sullo sviluppo sono chiamati malattie da deficienza di iodio (IDD). Al contrario una iperproduzione ormonale predispone all'ipertiroidismo. L'unica misura in grado di eradicare il gozzo endemico consiste nella profilassi iodica, come è stato ampiamente documentato in tutte le aree endemiche, soprattutto nei paesi in via di sviluppo. L'integrazione dietetica di iodio, traguardo che si è posto l'OMS (Organizzazione Mondiale della Sanità), è stata realizzata con successo attraverso l'introduzione di latte e sali da cucina iodati e iodurati [3]. Altri metodi, ugualmente efficaci, sono quelli basati sull'aggiunta di ioduro all'acqua potabile, alla farina e ai mangimi animali. Considerata l'importanza di questo micronutriente in campo clinico e nutrizionale, varie sono le procedure analitiche proposte per la sua determinazione in matrici reali. Oltre ai metodi colorimetrici, che pur essendo sensibili e pratici, sono poco selettivi [4], le tecniche più adatte a questo tipo di determinazione sono l'ICP-MS e l'AAN [5,6]; tuttavia nonostante la sensibilità e l'accuratezza ottenibili, queste tecniche non sono facilmente accessibili a causa dell'alto livello di specializzazione richiesto e degli elevati costi di utilizzo. Sono stati anche utilizzati vari metodi di separazione cromatografica ed elettroforetica, accoppiati generalmente a rivelazione UV diretta o indiretta, ma questo tipo di rivelazione non garantisce un'adeguata sensibilità del metodo [7].

In questa comunicazione viene descritto un metodo analitico semplice, affidabile, rapido e sensibile di determinazione diretta dello ioduro libero nei prodotti alimentari di origine vegetale ed animale. Tale metodo è basato sulla cromatografia a scambio anionico e la rivelazione amperometrica in corrente continua su un elettrodo di lavoro in platino opportunamente trattato secondo una nuova procedura di "condizionamento". Il metodo proposto si è dimostrato utile, affidabile e soprattutto selettivo per determinazioni di quantitativi di ioduro estremamente bassi in matrici particolarmente complesse quali latte, vegetali, alghe marine commestibili e sali da cucina iodati e iodurati. La metodica, basata su una semplice eluizione isocratica con fase mobile acida,  $\text{HNO}_3$  25 mM con aggiunta di  $\text{NaNO}_3$  50 mM e sull'uso di un potenziale costante, ha permesso di realizzare una separazione cromatografica in tempi brevi di circa 6 minuti e di ottenere ottimi risultati in termini di sensibilità, con un limite di rivelabilità pari a 0,5 ppb ( $S/N = 3$ ). La Figura 1 riporta una tipica separazione cromatografica ottenuta per un campione di latte fresco vaccino.



**Figura 1.** Separazione cromatografica dello ioduro in un campione di latte vaccino diluito 1:10 mediante cromatografia a scambio anionico e rivelazione amperometrica a potenziale costante. Colonna Dionex IonPac AS11 (4 x 250 mm) con precolonna; rivelazione elettrochimica su elettrodo di platino condizionato,  $E_{app} = +0.85 \text{ V vs Ag/AgCl}$ ; volume iniettato  $50 \mu\text{L}$ .

Tale metodica analitica è attualmente utilizzata per la determinazione di ioduro in campioni biologici al fine di offrire un metodo rapido e semplice di prima valutazione dei disturbi da iododeficienza e, quindi, di disfunzioni tiroidee.

### Riferimenti bibliografici

1. C.A. Keele and E. Neil. *Fisiologia applicata di Samson Wright* 2. Società Editrice Universo, Roma.
2. WHO (World Health Organization Report), *Trace Elements in Human Nutrition on Health*, (1996) 49-59.
3. World Health Organization; Document WHO/NUT/94.6. Geneva: WHO 22 (1994) 4.
4. E.B. Sandell, M. Kolthoff, *Mikrochim. Acta* 1 (1937) 9-25.
5. M. Haldimann, A. Eastgate and B. Zimmerli, *Analyst* 125 (2000) 1977-1982.
6. X. Hou, H. Dahlgaard, B. Rietz, U. Jacobsen, S. P. Nielsen, *J. Radioanal. Nucl. Chem.* 244/1 (2000) 87-91.
7. V.G. Saar, E.M. Koroleva and T.G. Nikitina, *Pharmaceut. Chem. J.* 34/8 (2000) 50-52.

# DETERMINAZIONE DI ALDEIDI ED AMMIDI INSATURE MEDIANTE CROMATOGRAFIA LIQUIDA CON RIVELAZIONE AMPEROMETRICA PULSATA

*Innocenzo G. Casella, Michela Contursi, Marianna Pierri*

*Dipartimento di Chimica, Università degli Studi della Basilicata  
Via N. Sauro, 85 – 85100 Potenza*

Aldeidi ed ammidi a basso peso molecolare sono molecole ampiamente diffuse in natura, esse sono presenti in fluidi biologici, acque, alimenti, materiali plastici, cosmetici, tabacco, etc. Alcune di queste molecole quali acroleina, crotonaldeide, acrilammide, etc. rappresentano un importante fattore di rischio per gli organismi superiori a causa delle loro potenziali tossicità, essendo sostanze cancerogene, citotossiche e genotossiche (1-3). Conseguentemente questi composti possono essere correlati con gravi patologie quali disturbi cardiovascolari, patologie neoplastiche, arterosclerosi, disturbi neurologici, etc.

Lo sviluppo di metodi per la determinazione di questi composti è pertanto di grande importanza ed attualità. A tal scopo metodiche di analisi basate su tecniche cromatografiche abbinate alla rivelazione elettrochimica possono rappresentare valide strategie analitiche in alternativa ad approcci di analisi basati su tecniche di derivatizzazione pre- o post-colonna.

In questa comunicazione sono riportati alcuni risultati preliminari relativi alla messa a punto di una metodica analitica diretta all'analisi di alcune aldeidi alifatiche ed ammidi insature, mediante cromatografia liquida con rivelazione amperometrica pulsata. Allo scopo è stato impiegato un sensore amperometrico a base di platino operante in ambiente acido (10 mM, e/o 50 mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) per la rivelazione delle suddette molecole. Sono stati valutati una serie di parametri sperimentali, quali valori dei potenziali applicati e forma d'onda, composizione della fase mobile, ed effetto dell'ossigeno sulla risposta amperometrica, e sulla separazione cromatografica al fine di sviluppare una metodica sensibile e soprattutto selettiva. Nelle condizioni sperimentali ottimalmente definite ed applicate, la metodica analitica proposta presenta limiti di rivelazione paragonabili ad altre metodiche cromatografiche implicanti procedure di derivatizzazione e/o processi di preparazione e purificazione dei campioni in esame. La validità del metodo, è stata testata per la determinazione di acroleina in matrici alimentari, valutandone la correlazione tra trattamento termico e contenuto della stessa in oli alimentari di natura vegetale. Ulteriori indagini sono in corso al fine di definire le condizioni sperimentali più opportune per la determinazione di acrilammide ed acido acrilico in campioni di acqua, caffè, e birra.

## Riferimenti

- 1) H.D. Hoberman, R.C.S. George, J. Biochem. Toxicol., 3, (1988), 105.
- 2) V.L. Wilson, P.G. Foiles, F.L. Chung, A.C. Povey, A.A. Frank, C.C. Harris, Carcinogenesis, 12 (8), (1991), 1483.
- 3) K.L. Segal, D.J. Brusick, Mutation Research, 330, (1995), 71.



**Martedì 21 Settembre 2004**

**CHIMICA ANALITICA E BENI CULTURALI**  
**Seconda sessione**

**Aula La Torre**  
**Campus Universitario**  
**Area delle Scienze**

**9.00-10.00**

## INDAGINI ANALITICHE SUL CONTENUTO DI ANFORE ROMANE DEL I SECOLO D.C.

*Pietro Baraldi, Francesca Paccagnella, Paolo Zannini*

*Università di Modena e Reggio Emilia - Dipartimento di Chimica  
Via G. Campi, 183 – 41100 Modena Tel. 059 205.5035 – Fax. 059 373.543*

Nel corso di scavi per la realizzazione di un nuovo edificio in pieno centro storico di Modena (Piazza Grande) sono venute alla luce consistenti tracce di pavimentazioni di edifici romani, databili al primo secolo dopo Cristo, costruite su di un sottofondo caratterizzato da copiose, ora come allora, canalizzazioni di acqua proveniente da falde freatiche in terreno argilloso. Particolare interesse ha evidenziato una sottostruttura di sospensione ed isolamento, realizzata tramite l' infissione nel fango argilloso di un cospicuo numero di anfore ceramiche rovesciate: l' occlusione da parte del fango impermeabile degli orifizi ha permesso una conservazione inusualmente buona delle tracce di contenuto delle anfore stesse, certamente da considerare di scarto, e probabilmente utilizzate per contenere diverse partite di derrate alimentari.



*Tipico aspetto di un' anfora*



*Abbondanza di materiale campionabile*

Fra le ipotesi più plausibili sul materiale contenuto erano, ovviamente, da considerare l' Olio di Oliva, il Vino (probabilmente resinato) od il “*Garrum*”, condimento a base di pesce molto usato ed apprezzato dai Romani.

L' approccio analitico, anche in funzione di una particolare disponibilità di campione, è stato progettato cercando di integrare le informazioni ottenibili tramite differenti tecniche: analisi strutturale XRPD, analisi termica simultanea TG/DTA, analisi elementare C,H,N,S, micro-morfologia in SEM con annessa microanalisi e.d.s., Spettroscopia FTIR e Mic-FTIR, Mic-Raman, sui campioni tal quali.

Si è poi cercato di individuare una o più metodologie di disaggregazione e trasformazione dei campioni, per rendere le eventuali componenti organiche atte ad analisi cromatografiche selettive, per analisi in GC-MS ed HPLC-MS, con eventuali approfondimenti in H<sup>+</sup> NMR.

I risultati via via ottenuti sono stati comparati con quelli ottenibili da campioni di riferimento risalenti ad altri scavi, da recuperi di imbarcazioni coeve ed anche da campioni provenienti da tentativi autonomamente effettuati di invecchiamento forzato di olii e vino resinato greco.

I risultati ottenuti, particolarmente dalle indagini GC-MS e FTIR, sembrerebbero convergere su tracce di materiali resinoso-resinosi, e sono in corso ulteriori indagini per cercare di distinguere il tipo di materiale resinoso (quale tipo di conifera), e quindi la provenienza alimentare, dalla possibile matrice resinosa utilizzata per impermeabilizzare la superficie ceramica interna delle anfore.

Non si sono avute evidenze di tracce di trigliceridi o di altre molecole legate alla presenza di sostanze grasse, anche di quelle presenti negli estratti ittici.

Naturalmente è stata evidenziata anche la natura della matrice inorganica di tipo silicatico-argilloso, che ha pervaso nel corso dei secoli le anfore.

## LA CHIMICA ANALITICA A SUPPORTO DELLA STORIA: ANALISI DEGLI INCHIOSTRI IN UN MANOSCRITTO

*Maurizio Aceto, Dipartimento di Scienze dell'Ambiente e della Vita, Università del Piemonte Orientale – CENISCO, Centro Interdisciplinare di Studio sui Beni Culturali*

*Enrico Boccaleri, Dipartimento di Scienze e Tecnologie Avanzate, Università del Piemonte Orientale – CENISCO, Centro Interdisciplinare di Studio sui Beni Culturali*

*Angelo Agostino, Dipartimento di Chimica Generale e Organica Applicata*

Il contributo della Chimica Analitica allo studio dei Beni Culturali presenta molteplici aspetti e uno dei più affascinanti campi d'applicazione è la caratterizzazione chimica degli inchiostri impiegati nella stesura dei testi antichi. L'analisi degli inchiostri in un manoscritto può infatti fornire utili informazioni agli studiosi di storia e religione, relativamente alla sequenza delle pagine, alla possibilità di stesure posteriori o di più mani nella composizione.

Uno dei primi lavori in questo settore è costituito dall'elegante studio sui Manoscritti Galileiani, effettuato presso l'Istituto Nazionale di Fisica Nucleare di Firenze [1]. I Manoscritti, conservati presso la Biblioteca Nazionale di Firenze, sono stati analizzati con la tecnica Proton Induced X-Emission per determinare la distribuzione elementare degli inchiostri e risalire alla cronologia dei documenti, permettendo così di dare un contributo alla conoscenza dell'evoluzione del pensiero scientifico di Galileo.

Naturalmente, la composizione dell'inchiostro non è di per sé sufficiente a datare un documento. Le sostanze utilizzate per gli inchiostri neri e rossi erano piuttosto limitate: carbone o metallogallato per il nero, cinabro (HgS) o minio (Pb<sub>3</sub>O<sub>4</sub>) per il rosso; è piuttosto difficile, quindi, riuscire a identificare composizioni caratteristiche di un certo scrittore o di una certa epoca. Inoltre, non è pensabile che le ricette impiegate nell'antichità avessero carattere di riproducibilità. Nondimeno, dal confronto delle distribuzioni elementari dell'inchiostro in un manoscritto, si possono avere numerose informazioni che hanno valore soprattutto se considerate nell'ambito del singolo manoscritto.

In questo lavoro sono stati analizzati gli inchiostri nero e rosso utilizzati nella stesura del manoscritto noto come *Codex Evangelorum* o Evangelario Eusebiano, conservato presso l'Archivio Capitolare di Vercelli. Il manoscritto, chiamato *Codice A* secondo la nomenclatura interna dell'Archivio, costituisce la più antica traduzione esistente dei quattro Evangelii dalla lingua greca al latino: esso risale al IV secolo d.C., e la sua stesura, o quantomeno la commissione dell'opera, sarebbe attribuita a S. Eusebio. Il codice pergamenaceo è composto da 634 pagine, scritte su due colonne in caratteri onciali. Il manoscritto nell'antichità aveva un elevato valore devozionale e fu considerato una vera e propria reliquia, tanto che era consuetudine per i Vercellesi prestare giuramento su di esso.

L'analisi degli inchiostri è stata effettuata con spettrometria Raman e spettroscopia di fluorescenza a raggi X (XRF), impiegando sia strumenti portatili, sia strumenti da banco. La spettrometria Raman fornisce informazioni sui composti impiegati, e in particolare permette di distinguere nettamente tra cinabro e minio per il rosso, e tra carbone e metallogallato per il nero; la spettroscopia XRF, oltre a identificare Hg e Pb come elementi-chiave negli inchiostri rossi, dà informazioni aggiuntive sugli elementi presenti in tracce (principalmente Pb, Fe, Cu e Mn) negli inchiostri neri, permettendo così di evidenziare le differenze di distribuzione elementare tra zone diverse del manoscritto.

Nel caso del Codice A, considerazioni filologiche e stilistiche fanno presumere che alcune pagine, in particolare la prima del Vangelo di Matteo e l'ultima del Vangelo di Marco, siano state scritte in un secondo tempo o da una mano diversa. Sono inoltre presenti in più pagine segni a lato o sul testo, evidentemente apportati in epoche posteriori. L'analisi chimica degli

inchiostri neri e rossi può confermare l'ipotesi di una scrittura postuma delle pagine citate, e può fornire informazioni anche sulla natura dei segni.

Il manoscritto è stato analizzato direttamente *in situ* con le strumentazioni portatili, ponendo le pagine in esame su uno stage con movimenti xy per l'analisi XRF e su un cavalletto da pittore per l'analisi Raman. Inoltre, per confermare i risultati dell'analisi Raman, alcune pagine del manoscritto sono state analizzate in laboratorio con uno strumento microRaman da banco. L'analisi Raman è risultata più complessa: l'irraggiamento con il laser provoca un riscaldamento locale che può indurre movimenti microscopici della pergamena e, quindi, perdita della messa a fuoco. Questo inconveniente è risolvibile limitando il tempo di esposizione del campione al laser e ponendo il foglio in esame tra due pannelli di policarbonato, in modo da limitare la mobilità del supporto pergameneo. L'analisi XRF, oltre a non provocare alcun effetto alla pergamena, ha una tolleranza maggiore dal punto di vista della profondità di campo.

I risultati ottenuti evidenziano differenze notevoli nella composizione degli inchiostri neri e rossi impiegati nella maggioranza del testo e nelle pagine ritenute postume. In particolare:

- l'inchiostro rosso risulta composto da cinabro nel testo e da minio nelle pagine postume, una differenza giustificabile con l'ipotesi di scrittura in tempi diversi
- l'inchiostro nero sembra essere, in tutto il testo, del tipo metallo-gallato, ottenuto miscelando noci di galla con solfati di ferro o rame; sono presenti impurezze di Fe, Cu, Mn e Pb, ma la distribuzione dei quattro metalli è nuovamente differente nel testo che compone la maggioranza delle pagine e nel testo che compone le due pagine ritenute postume.

In definitiva, le analisi effettuate confermano l'ipotesi di una scrittura postuma per quanto riguarda le due pagine in esame. Sono poi risultati di composizione nettamente differente gli inchiostri impiegati per le note a margine, come ci si poteva ragionevolmente aspettare: alcune note sono composte da inchiostro a base carboniosa anziché metallo-gallato, altre hanno impurezze metalliche con una distribuzione elementare nettamente differente da quelle del testo.

1) L. Giuntini, F. Lucarelli, P.A. Mandò, W. Hooper e P.H. Barker, "Galileo's Writings: Chronology by PIXE", *Nucl. Instr. & Meth. B*, 95, 389 (1995)

## LA CARATTERIZZAZIONE DELL'AGLIO E LA SUA IDENTIFICAZIONE NELLE DORATURE

*I. Bonaduce, M.P. Colombini, S. Diring*

*Dipartimento di Chimica e Chimica Industriale, Università di Pisa, via Risorgimento 32,  
56126 Pisa*

Nel corso del medioevo e del rinascimento l'uso delle lamine metalliche (oro, argento, stagno) per decorare e conferire preziosità i diversi manufatti, e alle opere pittoriche in particolare, era profondamente diffuso.

Un esame delle ricette antiche riportate nei trattati tecnici di pittura, evidenzia che il succo dell'aglio era tra i materiali organici più comunemente impiegati nella formulazione degli adesivi della foglia metallica.

La letteratura relativa alla caratterizzazione dell'aglio è principalmente rivolta allo studio dei composti solforati volatili, responsabili delle numerose virtù mediche di questo vegetale. Risulta assente la caratterizzazione di questo materiale volta alla sua identificazione in campioni di dorature provenienti da opere d'arte. La difficoltà della sua determinazione in campioni provenienti dal settore dei beni culturali risiede nel fatto che oltre alle dimensioni estremamente ridotte ed alla sua eterogeneità, l'identificazione non si può basare sulla presenza dei composti solforati che vengono persi con l'invecchiamento.

In questo lavoro si presenta la caratterizzazione del contenuto proteico dell'aglio mediante una procedura analitica basata sulla gas cromatografia spettrometria di massa. In particolare, al fine di costruire un sistema di riferimento sono stati analizzati diversi campioni di dorature, preparate seguendo ricette antiche, sia nella loro forma fresca, che quella secca, che sottoposta a invecchiamento accelerato.

Vengono, infine, riportati i risultati più significativi relativi alla caratterizzazione di campioni di dorature provenienti da dipinti murali delle chiese di San Frediano in Lucca e San Francesco in Lodi.

**Martedì 21 Settembre 2004**

**EQUILIBRI IN SOLUZIONE**  
**Seconda sessione**

**Aula La Torre**  
**Campus Universitario**  
**Area delle Scienze**

**10.00-11.00**

## IL CONDENSATO DELL'ARIA ESALATA: EQUILIBRIO ACIDO-BASE NELLA FISIOPATOLOGIA DELL'ASMA

*Giuseppina Folesani, Massimo Corradi, Alberico Borghetti, Antonio Mutti*

*Dipartimento di Clinica Medica Nefrologia e Scienze della Prevenzione dell'Università di Parma e Centro Studi e Ricerche I.S.P.E.S.L. presso l'Università di Parma*

Il condensato dell'aria espirata (CAE), ottenuto raffreddando l'aria esalata durante la respirazione a volume corrente, è una nuova tecnica che può fornire una valutazione della patobiologia polmonare, ed il cui studio rappresenta oggi un campo di ricerca in costante crescita nella medicina respiratoria (1). Il CAE è una matrice liquida composta essenzialmente da acqua e da piccole particelle in sospensione, probabilmente goccioline che si staccano dal film liquido che riveste le vie respiratorie. I principi generali che regolano la formazione del CAE non sono del tutto noti, tuttavia si ipotizza che le goccioline del liquido di rivestimento delle vie aeree siano liberate e trasportate dalla corrente di vapore espirata. I fattori che determinano la formazione dell'aerosol non sono stati studiati in dettaglio, anche se è probabile che la tensione superficiale del liquido, la velocità e l'umidità dell'aria inalata, i cambiamenti nella turbolenza espiratoria svolgano un ruolo importante. Tra i vantaggi del CAE, possiamo annoverare la non invasività e la semplicità del campionamento, che può essere ottenuto con strumenti portatili, utilizzabili anche a domicilio o nei luoghi di lavoro.

Molte malattie polmonari come asma, broncopneumopatia cronica ostruttiva e fibrosi cistica, implicano processi di infiammazione cronica con alterazione del pH nelle vie aeree. Il CAE, come sangue ed urina, è un sistema tampone ed il suo stato acido-base può essere valutato determinandone il pH e il contenuto di ammonio ( $\text{NH}_4^+$ ).

Lo scopo del presente studio è stato la determinazione dei livelli di pH e di  $\text{NH}_4^+$  nel CAE di bambini con asma bronchiale. Inoltre, i livelli di pH e di  $\text{NH}_4^+$  nel CAE sono stati correlati con un riconosciuto indicatore di infiammazione bronchiale, rappresentato dalla concentrazione di monossido di azoto nell'aria esalata (FeNO).

Il CAE è stato raccolto in un gruppo di bambini con asma bronchiale in fase stabile (n=18, età media 12 anni, range 6-16) ed in un gruppo di bambini sani (n=13, età media 10 anni, range 6-12). Il CAE è stato raccolto facendo respirare i soggetti a volume corrente entro un circuito di condensazione. Dopo derivatizzazione dei campioni con cloruro di dansile, le concentrazioni di  $\text{NH}_4^+$  nel CAE sono state determinate mediante cromatografia liquida a fase inversa in condizioni di eluizione isocratica ( $\text{CH}_3\text{CN}/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ , 3/7/7) e rivelazione fluorimetrica ( $\lambda_{\text{em.}} = 500 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{ecc.}} = 368 \text{ nm}$ ). Il pH è stato misurato con un elettrodo Biotrode Hamilton per microcampioni operando in atmosfera di argon. FeNO è stato determinato con il metodo del singolo respiro con analizzatore a chemiluminescenza.

I livelli di pH e di  $\text{NH}_4^+$  sono risultati significativamente inferiori nei soggetti asmatici rispetto ai controlli: ( $\text{pH}_{\text{asmatici}} 7.6 \pm 0.03$ ,  $\text{pH}_{\text{controlli}} 7.90 \pm 0.02$ ,  $p < 0.01$ ;  $\text{NH}_4^+_{\text{asmatici}} 214.30 \pm 27.93 \mu\text{M}$ ,  $\text{NH}_4^+_{\text{controlli}} 881.07 \pm 118.90 \mu\text{M}$ , test di Mann-Whitney). I livelli di pH e di  $\text{NH}_4^+$  nei bambini asmatici, erano positivamente correlati (test di Spearman,  $r=0.6$ ,  $p=0.003$ ). I livelli di FeNO nei bambini asmatici (46.20 ppb; range 29.50-69.30) erano significativamente più elevati rispetto ai controlli (8.75 ppb; range 6.33-13.48). Inoltre, è stata riscontrata una correlazione negativa tra la concentrazione di  $\text{NH}_4^+$  nell'EBC e l'NO esalato ( $r=-0.6$ ;  $p < 0.001$ ). I dati mostrano che i livelli di pH e di  $\text{NH}_4^+$  nel CAE di bambini asmatici sono inferiori rispetto ai livelli nei bambini sani, e che i livelli di  $\text{NH}_4^+$  correlano con le concentrazioni di FeNO. Questi risultati supportano l'ipotesi che l'acidificazione delle vie aeree possa avere un ruolo nella fisiopatologia dell'asma.

(1) I. Rahman, F. Kelly, Free Radic. Res., 37(12), 1253-1266.



## SPECIAZIONE DELLO IONE RAME NELLE ACQUE DEL LAGO DI COMO

*Damiano Monticelli, Andrea Credaro, Andrea Pozzi, Carlo Dossi*

*Dipartimento di Scienze Chimiche e Ambientali  
Università degli Studi dell'Insubria, via Valleggio 11, 22100 Como*

Il Lago di Como è il più complesso tra i laghi prealpini dal punto di vista morfostrutturale, presentando una notevole profondità (410 m) e una geometria molto articolata. La sua complessità morfostrutturale si riflette anche in un'elevata complessità chimica: le caratteristiche chimico-fisiche delle acque variano notevolmente in funzione della posizione e della profondità. In particolare, nel presente studio si è cercato di comprendere la speciazione dello ione rame lungo la colonna d'acqua del Lario. A questo scopo, sono state campionate, nel novembre 2002, due colonne d'acqua, una in prossimità della città di Como (9 profondità) e una all'altezza di Argegno, punto di maggior profondità del lago (12 profondità), entrambe nel ramo occidentale del lago di Como.

Nei campioni è stata determinata la concentrazione degli ioni principali, indispensabili per la caratterizzazione generale delle acque, e quella di alcuni metalli in traccia: nichel, cobalto, ferro, manganese e rame. L'attenzione si è poi incentrata su quest'ultimo, con l'intento di comprenderne a fondo la distribuzione tra le diverse specie: ione libero, complessi inorganici e complessi forti di origine organica ed inorganica. A questo scopo è stato utilizzato il metodo di competizione dei leganti con determinazione della frazione labile tramite stripping catodico (CLE-CSV). Questa metodologia permette di ottenere, tramite la titolazione del campione con metallo, la concentrazione dei leganti presenti e la costante di formazione condizionale del complesso rame-legante.

Lo studio è stato indirizzato sullo ione rame in quanto è un elemento che forma complessi organometallici molto stabili e la sua speciazione è stata ampiamente studiata in fiumi, laghi ed oceani [1]. La capacità di complessazione è stata determinata sul campione filtrato (0.45  $\mu\text{m}$ ) tramite titolazione con metallo e competizione con il legante salicilaldossima (ossima della 2-idrossibenzaldeide, SA): questo legante forma un complesso 2:1 con lo ione  $\text{Cu}^{2+}$  che può essere determinato per via voltammetrica. La frazione di rame labile è stata quindi quantificata tramite voltammetria di stripping catodico (CSV) su un elettrodo a goccia di mercurio pendente (HMDE). La determinazione è stata eseguita dopo un opportuno periodo di tempo necessario per permettere al sistema di raggiungere l'equilibrio. Il potenziale viene mantenuto a  $-0.1\text{V}$  per 90 secondi per adsorbire il complesso  $\text{Cu}(\text{SA})_2$  sull'elettrodo di mercurio e in seguito portato fino a  $-0.5\text{V}$  con una scansione in onda quadra (frequenza 25 Hz): si ottiene in questo modo un picco di riduzione per il complesso  $\text{Cu}(\text{SA})_2$ . Il metodo impiegato è basato su un procedimento proposto per la speciazione del rame in acqua di mare [2], opportunamente adattato al caso di acque con bassa salinità. In particolare, è stato necessario determinare il coefficiente alfa relativo alla reazione di complessazione dello ione rame da parte del legante aggiunto, parametro che deve essere individuato per ogni matrice analizzata.

I risultati hanno evidenziato la presenza di leganti forti lungo entrambe le colonne d'acqua: questi presentano concentrazioni abbastanza elevate, fino a valori vicini a 70 nM e costanti di equilibrio condizionale per la formazione del complesso rame-legante attorno a  $10^{13}$ . Questi dati devono essere confrontati con le concentrazioni totali di rame determinate che sono comprese tra 5 e 15 nM: è quindi evidente che lo ione rame è completamente complessato da questi leganti. Classi di leganti con capacità complessante e costante condizionale simile sono stati osservati nei laghi in corrispondenza ai periodi di massima attività biologica [3].

Oggetto della comunicazione sarà la presentazione della ottimizzazione della metodica analitica e dei risultati ottenuti, nonché la discussione dei possibili sviluppi di questa ricerca.

### **Bibliografia**

- [1] Town RM, Filella M, *Aquatic Sciences* 62: 252-295 (2000)
- [2] Campos MLAM, van den Berg CMG, *Analytica Chimica Acta* 284: 481-496 (1994)
- [3] Xue H, Oestreich A, Kistler D, Sigg L, *Aquatic Sciences* 58: 69-87 (1996)

## SORPTION PROPERTIES OF THREE ACTIVATED CARBONS FOR As(V) BY A BATCH EQUILIBRIUM PROCEDURE

*Antonella Profumo, Giancarla Alberti, Maria Pesavento, Raffaella Biesuz*

*Dipartimento di Chimica Generale - Università di Pavia – Pavia (Italy)*

Arsenic, which is toxic to all living organisms, creates potentially serious environmental problems. Leaching of arsenic into ground water can occur from either natural earth crust or from the activities of man. After leaching, arsenic contaminates the food chain of humans through drinking water or green vegetables that have absorbed the minerals. Inorganic arsenic generally exists in two predominant oxidation states, arsenite and arsenate, both of which are toxic to man and plants. Among the methods used for arsenic removal from water, adsorption has proven to be very efficient.[1] Extensive adsorption studies have been conducted to characterize the reaction of arsenite and arsenate with various solid phases, including lanthanum compounds, iron compounds, clay minerals, carbon specimens, etc. [1].

Activated carbon has been recently recognized to have interesting sorbing properties towards toxic metal ions. This property can be used to lower the content of these important pollutants in water [2].

In this work a simple model is proposed, on the basis of which the sorption of As(V) on three iron treated activated carbons (Chemviron, Norit W 35 and Purolite) can be efficiently characterized. It assumes that the adsorption takes place through combination of the metal ion with a limited number of specific interaction sites in the solid phase, so it is similar to the Langmuir model [2]. No assumption is made about the structure of the sites and the nature of the bonds, and about the number of the sites in the carbon phase. The concentration of these sites and the conditional adsorption coefficients were determined for each activated carbon by titration of the solid, in suspension in aqueous phase, at constant acidity, with the metal itself. For each titration point, the concentration of the metal in the solution phase after equilibration was determined, and the data were processed by the Ruzic linearization method, to obtain the concentration of the active sites involved in the sorption, and the conditional constant. The effect of the acidity was also examined, in the pH range 3 – 9 obtaining that the adsorption is maximum within pH 3 and 6, for all the three activated carbons. The adsorption constants ( $\beta$ ) were determined from the conditional adsorption coefficients obtained at the different acidities. The concentration of the active sites and the adsorption constants for each carbon are reported in the following table.

Activated carbon	$c_L$ (mol/g)	$\beta$
Chemviron + Fe (0.53%)	$4(1) 10^{-5}$	$1.2(6) 10^5$
Norit + Fe (0.53%)	$9.7(3) 10^{-5}$	$1.4(6) 10^5$
Purolite + Fe (0.6%)	$6(1) 10^{-5}$	$1.40(8) 10^4$

Some parameters are affected by a large uncertainty, probably due to the heterogeneity of the active groups in the activated carbons. Even if so, these parameters make it possible a good prediction of the adsorption in a wide range of conditions. The experimental data obtained show similar adsorption capacity for Chemviron and Purolite while Norit exhibits an higher exchange capacity.

It has been demonstrated that As(III) is oxidized by all the three carbon to As(V), probably by the oxygen sorbed in the pores of the carbon.

### Reference

- 1- J. Pattanayak , K. Mondal, S. Mathew, S.B. Lalvani, *Carbon* 38 (2000) 589–596.
- 2- M. Pesavento, A. Profumo, G. Alberti, F. Conti, *Anal. Chim. Acta* 480 (2003) 171-180.

**Mercoledì 22 Settembre 2004**

**Conferenza Plenaria**

*R. Lobinski*  
*CNRS, Pau*

**METALLOMICS: A NEW FACE OF SPECIATION ANALYSIS**

**Aula Magna**  
**Palazzo Centrale**

**9.00**

## METALLOMICS: A NEW FACE OF SPECIATION ANALYSIS

*Ryszard Lobinski*

*Equipe de Chimie Analytique Bio-inorganique, CNRS UMR 5034, Hélioparc, 2, av. Pr. Angot, F-64053 Pau, France; e-mail: [ryszard.lobinski@univ-pau.fr](mailto:ryszard.lobinski@univ-pau.fr)*

The recognition of the fact that chemical, biological and toxicological properties of an element in environmental chemistry, occupational health, nutrition and medicine are critically dependent on the form in which the element occurs in the sample has spurred a rapid development of an area of analytical chemistry referred to as speciation analysis. Traditionally, the latter targeted well-defined analytes, usually anthropogenic organometallic compounds and the products of their environmental degradation, such as methylmercury, alkyllead, butyl- and phenyltin compounds, and simple organoarsenic and organoselenium species. Calibration standards were either available or could be readily synthesized. The presence of a metal(loid)-carbon covalent bond assured a reasonable stability of the analyte(s) during sample preparation. The volatility of the species allowed the use of gas chromatography with its inherent advantages, such as the high separation efficiency and the absence of the condensed mobile phase that enabled a sensitive (down to the femtogram levels) element-specific detection by atomic spectroscopy.

A totally different situation is faced by the analyst interested in endogenous metal species in biological systems. Millions of years of evolution have resulted in a great variety of biological ligands with a significant coordinating potential for trace elements. They include small organic ligands (e.g. citrate, tartrate, oxalate, or phytate, aminoacids, oligopeptides), macrocyclic chelating molecules, and macromolecules, such as proteins, DNA restriction fragments or polysaccharides. The complexity and the usually poor understanding of the system (the majority of trace element species with biological ligands have not yet been discovered!) often makes even the definition of the target analyte problematic. The functionality of a protein is critically dependent on the presence of specific prosthetic groups in its active site, such as metal ions of its compounds, as e.g. cyanocobalamin, post-translational modifications, such as e.g. phosphorylation, or the presence of an atypical amino acid, such as *e.g.*, selenocysteine.

The recent developments in analytical techniques allow one to obtain information on the identity and quantity of heteroatom-containing biomolecules. The lecture discusses the emerging areas of bioinorganic analysis including: (i) a comprehensive analysis of the entirety of metal and metalloid species within a cell or tissue type (metallomics), (ii) the study of the part of the metallome involving the protein ligands (metalloproteomics), and (iii) the use of a heteroelement, naturally present in a protein or introduced in a tag added by means of derivatisation, for the spotting and quantification of proteins (heteroatom-tagged proteomics). Inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP MS), used as detector in chromatography and electrophoresis, and supported by electrospray and MALDI MS, appears as the linchpin analytical technique for these emerging areas. This lecture focuses on the recent advances in ICP MS in biological analysis such as sensitive detection of non-metals, especially selenium, sulfur and phosphorous, couplings to capillary and nanoflow HPLC and capillary electrophoresis, laser ablation ICP MS spotting in gel electrophoresis, and isotope dilution quantification of biomolecules.

**Mercoledì 22 Settembre 2004**

**TECNICHE SEPARATIVE**

**Aula Magna  
Palazzo Centrale  
9.50-11.30**

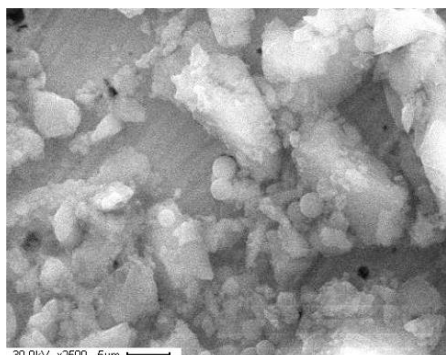
## PREPARAZIONE DI FASI STAZIONARIE A STAMPO MOLECOLARE ATTRAVERSO FOTOGRAFTING SU BEADS POLIMERICI MONODISPERSI

*Claudio Baggiani, Patrizia Baravalle, Cristina Giovannoli, Cinzia Tozzi*

*Laboratorio di Bioanalitica, Dipartimento di Chimica Analitica, Università di Torino*

La tecnica dello stampo molecolare permette di ottenere materiali polimerici con predeterminate proprietà di riconoscimento molecolare attraverso una metodologia caratterizzata da una grande versatilità e semplicità d'esecuzione. Tale tecnica si è rivelata utile per preparare fasi stazionarie ad elevata selettività, con potenziali utilizzi pratici in cromatografia, elettroforesi capillare ed estrazione in fase solida.

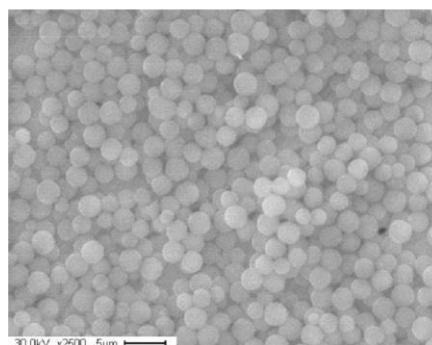
Il metodo tradizionalmente più utilizzato per produrre polimeri a stampo molecolare (MIPs) consiste in una polimerizzazione radicalica termo- o fotoindotta di una miscela di molecole stampo, monomeri funzionali ed agenti reticolanti dissolti in un opportuno solvente porogenico. Tale metodo porta alla formazione di monoliti polimerici ad elevato grado di reticolazione, che richiedono lunghe e tediose procedure di frantumazione e setacciatura prima di poter essere utilizzati come fasi stazionarie. Il materiale così ottenuto si presenta inoltre come un particolato mesoporoso altamente irregolare e polidisperso, poco adatto ad essere impaccato in colonne HPLC.



In questi ultimi anni numerosi sforzi sono stati dedicati allo sviluppo di metodi alternativi per la preparazione di materiali a stampo con proprietà cromatografiche superiori in termini d'efficienza separativa, ma nessuno dei metodi riportati in letteratura sembra rappresentare una valida alternativa pratica all'approccio tradizionale.

Tra le tecniche proposte, risultano particolarmente attraenti il fotografting di sottili strati di polimero su supporti cromatografici preformati e la termopolimerizzazione per precipitazione controllata.

In questa comunicazione riportiamo i risultati sperimentali ottenuti accoppiando le due tecniche per preparare polimeri a stampo molecolare verso analiti d'interesse clinico ed ambientale. Tali risultati dimostrano che è possibile preparare in condizioni sperimentali facilmente standardizzabili e riproducibili beads polistirenici monodispersi e con porosità controllata, e che tali materiali, economici e di facile preparazione, rappresentano una valida alternativa ai supporti silicei per la preparazione di fasi stazionarie a stampo molecolare mediante fotopolimerizzazione superficiale controllata.



Il comportamento cromatografico di colonne impaccate con tali materiali è comparabile a quello di colonne impaccate con MIPs preparati secondo la tecnica tradizionale in termini di selettività e capacità legante, mentre l'efficienza della colonna risulta migliorata. Possibili applicazioni nel campo dell'estrazione in fase solida sono brevemente discusse.

## **PSEUDO FASI STAZIONARIE IN SOSPENSIONE E LIQUIDI IONICI IMPIEGATI IN ELETTROFORESI CAPILLARE DI PEPTIDI E PROTEINE**

*Danilo Corradini, Cristiano Bello, Lucio Bevilacqua*

*Istituto di Metodologie Chimiche del CNR, Area della Ricerca di Roma 1, Montelibretti*

La comunicazione riporta i risultati di una ricerca finalizzata a migliorare efficienza, selettività e risoluzione di peptidi e proteine in elettroforesi capillare (CE), utilizzando capillari di silice fusa non sottoposti a modificazione chimica della superficie interna e soluzioni elettrolitiche studiate per questo tipo di separazioni. L'impiego di capillari di silice fusa non modificati richiede che le soluzioni elettrolitiche utilizzate in CE di peptidi e proteine abbiano la capacità di sopprimere o limitare le interazioni che questi analiti possono stabilire con i gruppi silanolo presenti sulla superficie interna del capillare. Tali interazioni determinano scarsa efficienza e asimmetria dei picchi e, nei casi estremi, possono dare luogo all'adsorbimento irreversibile dell'analita sulla superficie interna del capillare di silice fusa. Altra caratteristica delle soluzioni elettrolitiche valutate negli studi da noi intrapresi è la capacità di controllare l'equilibrio protonico in ampi intervalli di pH e di limitare la conducibilità elettrica al fine di contenere le variazioni di temperatura dovute al calore prodotto per effetto Joule, conseguente all'applicazione di elevati valori del potenziale elettrico, per altro richiesti per elevare l'efficienza e minimizzare il tempo d'analisi.

I risultati presentati in questa comunicazione illustrano le potenzialità di alcuni liquidi ionici ad essere utilizzati in CE di peptidi e proteine come modificatori dinamici delle proprietà superficiali dei capillari di silice fusa e come additivi delle soluzioni elettrolitiche costituite da un'oligoammmina alifatica in miscela con un acido poliprotico o da soluzioni tampone convenzionali. I liquidi ionici sono stati recentemente oggetto di numerosi studi e pubblicazioni per le loro singolari proprietà, tra le quali l'assenza di pressione di vapore, il carattere ionico, le buone proprietà solventi per composti sia organici sia inorganici. Lo studio è stato condotto utilizzando liquidi ionici del tipo 1-alcil-3-metilimidazolio tetrafluoroborato o tetrapentilammonio metansolfonato. I risultati presentati illustrano l'influenza di diversi liquidi ionici sulla formazione del doppio strato elettrico all'interfaccia tra la parete del capillare e la soluzione elettrolitica, con conseguente effetto sul flusso elettroosmotico e mascheramento dei gruppi silanolo.

Altre soluzioni elettrolitiche investigate per la CE di peptidi e proteine sono costituite da sospensioni di liposomi nella soluzione tampone utilizzata come elettrolita. I liposomi o vescicole sono aggregati della forma di sfere microscopiche nelle quali una fase acquosa è interamente racchiusa da una o più membrane composte da molecole anfifile, cioè molecole in cui sono contemporaneamente presenti gruppi funzionali polari e apolari. I liposomi che si ottengono dall'aggregazione di fosfolipidi possono avere dimensioni e numero di doppi strati diversi che possono essere regolati mediante opportuna selezione del metodo di preparazione. Vescicole multilamellari (MLV) di grandi dimensioni (500÷1000 nm) sono costituite da doppi strati concentrici separati da un sottile strato di solvente. Liposomi di dimensioni minori, con diametro di 100÷400 nm (LUV) e di 25÷40 nm (SUV) sono invece costituite da un singolo doppio strato e possono essere preparati dalle vescicole multilamellari mediante diverse tecniche.

Sono riportati i risultati dello studio intrapreso per valutare la potenzialità dei liposomi ad essere utilizzati come fase stazionaria in sospensione, come modificatore delle proprietà superficiali del capillare di silice fusa e come additivo della soluzione elettrolitica per regolare il flusso elettroosmotico e le proprietà elettroforetiche di peptidi e proteine. Lo studio è stato condotto mediante la preparazione di liposomi unilamellari di differenti dimensioni costituiti da fosfolipidi, quali l'*1-palmitoil-2-oleil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina* (POPC), i quali sono



stati preparati mediante una tecnica di estrusione attraverso membrane di policarbonato di dimensioni appropriate. L'omogeneità e la distribuzione delle dimensioni della sospensione estrusa sono state verificate tramite elettroforesi capillare (CE), utilizzando un capillare di silice fusa dello stesso diametro (50  $\mu\text{m}$ ) e lunghezza totale (33.0 cm) di quelli utilizzati per tutti gli esperimenti e mediante misure di light scattering.

Abbiamo investigato l'influenza della forza ionica, pH e composizione della soluzione elettrolitica sul flusso elettroosmotico e la separazione di peptidi e proteine in capillari di silice fusa non modificati. Lo studio ha incluso l'investigazione di diverse tecniche mediante le quali utilizzare i liposomi come una pseudo fase stazionaria in sospensione. Le diverse strategie valutate includono il parziale o totale riempimento del capillare con la sospensione dei liposomi, oppure l'impiego dei liposomi come additivo in sospensione della soluzione elettrolitica. Lo studio è stato condotto valutando gli effetti delle diverse strategie sperimentali sulle proprietà elettroforetiche di peptidi e proteine.

# COATING DINAMICO E COATING SOL-GEL DI CAPILLARI: NUOVE STRATEGIE PER L'INTERFACCIAMENTO DELLA ELETTROFORESI CAPILLARE ALLA SPETTROMETRIA DI MASSA

*C. Corradini, F. Bianchi, M. Careri, A. Mangia, A. Stercoli*

*Dipartimento di Chimica Generale ed Inorganica, Chimica Analitica, Chimica Fisica, Università degli Studi di Parma, Parco Area delle Scienze 17/A, 43100 Parma*

La possibilità di modulare la direzione e l'intensità del flusso elettroosmotico (EOF) è di particolare interesse nelle separazioni mediante elettroforesi capillare di anioni di piccole dimensioni, sia organici che inorganici. Ciò può essere realizzato mediante l'aggiunta all'elettrolita di un opportuno additivo; l'adsorbimento dell'additivo sulle pareti del capillare di silice fusa ha la funzione di modificare il doppio strato elettrico che si genera all'interfaccia tra la parete del capillare e la soluzione elettrolitica, dal quale dipende la direzione e l'entità del flusso elettroosmotico. Normalmente, applicando il campo elettrico i cationi mobili concentrati in prossimità del doppio strato elettrico, migrano verso il catodo ed essendo solvatati producono nel capillare un flusso a profilo piatto dell'elettrolita diretto dall'anodo verso il catodo. L'adsorbimento di un additivo cationico sulla superficie del capillare modifica la densità delle cariche negative superficiali e, qualora la concentrazione di additivo adsorbito per unità di superficie di capillare sia superiore alla densità superficiale dei gruppi silanolo, origina all'interfaccia tra la parete del capillare e la soluzione elettrolitica l'inversione del segno delle cariche del doppio strato elettrico. In questa situazione, l'applicazione di una differenza di potenziale agli elettrodi genera un EOF rivolto in direzione opposta a quella osservata in assenza di additivo (EOF in direzione anodica). Questo effetto dipende dalla composizione chimica e dalle dimensioni molecolari dell'additivo, dalla sua concentrazione, dalla temperatura, dal pH e dalla forza ionica della soluzione elettrolitica [1, 2]. In particolare, il flusso elettroosmotico anodico aumenta progressivamente con la concentrazione dell'additivo presente nell'elettrolita, fino a raggiungere un valore limite secondo un andamento caratteristico e simile alle isoterme di Langmuir [1]. Le strategie usualmente adottate per modulare l'intensità del flusso elettroosmotico in capillari di silice fusa non modificati chimicamente, prevedono l'ottimizzazione di parametri quali forza ionica e pH, e soprattutto la presenza di un policatione o di un tensioattivo cationico nell'elettrolita. Questa impostazione preclude, o rende difficile, un eventuale interfacciamento dell'elettroforesi capillare ad uno spettrometro di massa [3].

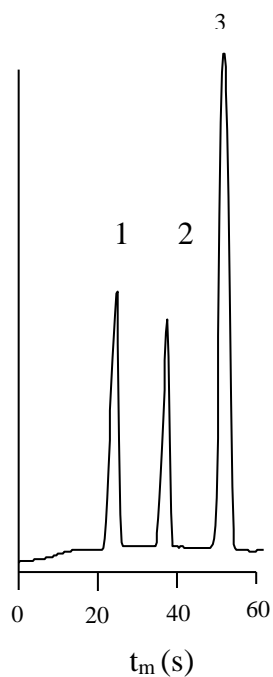
Per superare questa limitazione, nel presente lavoro la modulazione del flusso elettroosmotico è stata ottenuta seguendo due vie. La prima consiste nella realizzazione di un coating dinamico con esadimetrina bromuro quale policatione funzionalizzato con ammine quaternarie; la seconda consiste nella formazione di un sol-gel, utilizzando etil-amminopropil-trimetossisilano come agente silanizzante in grado di funzionalizzare con gruppi amminici la parete interna del capillare di silice fusa.

Entrambi gli approcci proposti non prevedono l'impiego di un additivo aggiunto all'elettrolita in uso per le separazioni elettroforetiche, rendendoli idonei alla realizzazione di sistemi separativi in cui alla selettività ed efficienza propria dell'elettroforesi capillare può essere combinata l'efficacia nell'identificazione della spettrometria di massa.

I risultati acquisiti mostrano come gli approcci proposti, per la loro semplicità, versatilità, rapidità di esecuzione e ripetibilità dei dati sperimentali acquisiti, possiedono potenzialità per essere applicate con successo alla determinazione di anioni, sia organici che inorganici, in matrici complesse.

Un esempio della possibilità di modulare il flusso elettroosmotico mediante coating sol-gel dei capillari è evidenziato nell'elettroferogramma di Figura 1 in cui è riportata la

separazione degli anioni nitrato e nitrito ottenuta con un capillare di silice fusa (lunghezza effettiva 200 mm, lunghezza totale 320 mm, diametro interno 100  $\mu\text{m}$ ), la cui parete interna è stata chimicamente modificata mediante tecnica sol-gel con etil-ammino-propil-trimetossisilano. Il picco elettroforetico relativo all'ossido di mesitile, impiegato come marker del flusso elettroosmotico, evidenzia come questo, alle condizioni elettroforetiche adottate, risulti riversato in direzione anodica.



Elettroferogramma relativo alla separazione di nitrati e nitriti su capillare di silice fusa chimicamente modificato mediante tecnica sol-gel.

Condizioni elettroforetiche: elettrolita, tampone formiato 50 mM, pH 2.8; potenziale applicato, -30 kV; temperatura, 25°C; rivelazione, UV a 214 nm, in direzione anodica.

Identificazione dei picchi elettroforetici: 1) nitrato ( $t_m = 21.6$  s), 2) nitrito ( $t_m = 33.0$  s), 3) ossido di mesitile (marker EOF,  $t_m = 45.6$  s)

### Riferimenti

- [1] D. Corradini, A. Rhomberg, C. Corradini, *J. Chromatogr. A*, 661 (1994) 305.
- [2] D. Corradini, G. Cannarsa, E. Fabbri, C. Corradini, *J. Chromatogr. A*, 709 (1995) 127.
- [3] W.M.A. Niessen, U.R. Tjaden, J. van der Greef, *J. Chromatogr.* 636 (1993) 3.

## SELEZIONE CELLULARE MEDIANTE FRAZIONAMENTO IN CAMPO GRAVITAZIONALE-FLUSSO ACCOPPIATO A METODI DI RIVELAZIONE SPECIFICI ED ULTRASENSIBILI

*B. Roda*,<sup>\*1</sup> *D. Melucci*,<sup>1</sup> *S. Casolari*,<sup>1</sup> *P. Reschiglian*,<sup>1</sup> *E. Michelini*,<sup>2</sup> *A. Roda*,<sup>2</sup> *R. Conte*,<sup>3</sup>  
*P.L. Tazzari*,<sup>3</sup> *M. Buzzi*,<sup>3</sup> *F. Ricci*,<sup>3</sup> *K. Hakkila*<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Dipartimento di Chimica “G. Ciamician”, Via Selmi 2, 40126 Bologna.

<sup>2</sup>Dipartimento di Scienze Farmaceutiche, Via Belmeloro 6, 40126 Bologna.

<sup>3</sup>Servizio di Immunoematologia e Trasfusionale, Policlinico S. Orsola-Malpighi, Bologna.

<sup>4</sup>Dipartimento di Biochimica, Università di Turku, Finlandia.

\**barbara@ciam.unibo.it*

Le tecniche di frazionamento in campo-flusso (FFF) rappresentano una famiglia di tecniche separative che si sono dimostrate da tempo ideali per la caratterizzazione di cellule per la notevole versatilità e alcuni vantaggi peculiari quali meccanismo “soft” di separazione, relativamente brevi tempi di analisi, biocompatibilità strumentale e possibilità di utilizzare campioni di cellule direttamente nel campione nel quale essi si trovano. Queste caratteristiche permettono il frazionamento di cellule intere senza modificarne la vitalità e le proprietà morfologiche, fornendo quindi campioni adatti ad applicazioni di selezione cellulare (*cell sorting*) in campo biomedico o biotecnologico [1]. Tra le varianti FFF quella a campo gravitazionale (GrFFF) si è dimostrata particolarmente interessante per il *cell sorting* per via la notevole semplicità costruttiva, il basso costo e la facile implementabilità in un sistema liquido-cromatografico del dispositivo frazionatore [2]. La tecnica di rivelazione finora più utilizzata in GrFFF di sistemi cellulari è stata la turbidimetria UV/Vis che risulta tuttavia aspecifica e di complicata interpretazione [3]. E’ quindi interessante la possibilità di accoppiare alla GrFFF per applicazioni di *cell sorting* tecniche di rivelazione più specifiche e sensibili. In questo lavoro è presentato uno studio sull’accoppiamento della GrFFF con la rivelazione a chemiluminescenza (CL) e la citometria a flusso (FC), tecniche analitiche specifiche ed ultrasensibili impiegate per la selezione cellulare [4] e per applicazioni bioanalitiche [5].

Vari tipi di cellule possono esprimere CL o bioluminescenza (BL) sia spontaneamente che per modificazione genica. Le possibilità analitiche di un accoppiamento GrFFF-CL sono state descritte impiegando un analita-modello costituito da particelle di polistirene di dimensioni cellulari sulla cui superficie era stato immobilizzato per via chimica un enzima in grado di catalizzare la reazione CL [6] e successivamente globuli rossi umani. Qui presentiamo alcuni sviluppi di tale studio preliminare al fine di utilizzare l’accoppiamento GrFFF-BL per il frazionamento e la caratterizzazione di sistemi cellulari eucarioti e procarioti. Si sono considerate linee cellulari di epatociti neoplastici (HepG2) modificati con il gene che codifica per l’espressione della luciferasi quando attivato da acido colico, e linee cellulari di lievito (*S. cerevisiae*) attivate in presenza di androgeni. Sono stati inoltre presi in considerazione campioni di batteri (*E. coli*) geneticamente modificati per esprimere BL. Tali sistemi cellulari sono impiegati come biosensori per lo screening di farmaci e monitoraggio ambientale o come biotraccianti *in vivo* per la diagnosi *in situ* di cellule tumorali e metastasi.

La tecnica GrFFF è stata accoppiata *off-line* con la FC per l’identificazione post-frazionamento di cellule specifiche marcate con anticorpi. In particolare viene mostrata la possibilità di frazionare campioni di cellule di origine linfoide ottenuti per aferesi da pazienti in attesa di trapianto di midollo osseo. Lo studio è stato rivolto alla possibilità di arricchire le frazioni in cellule staminali emopoietiche identificate tramite *flow-activated cell sorting* (FACS) dopo marcatura con anticorpo specifico per l’antigene CD34. L’antigene CD34 [7] identifica una popolazione cellulare che ha la caratteristica di generare *in vitro* colonie

cellulari di tipo clonale costituite da elementi appartenenti alle diverse filiere proliferative emopoietiche, in grado di ricostruire nell'uomo la mielo-linfopoiesi dopo un trattamento mioterapeutico.

I risultati qui presentati evidenziano come l'accoppiamento di tecniche di rivelazione specifica quali CL, BL ed FC con tecniche separative FFF permetta una sinergia tra i vantaggi intrinseci che entrambe queste tecniche offrono per applicazioni dirette alla selezione cellulare.

- [1] A. Lucas, F. Lepage, P. Cardot. Field-Flow Fractionation Handbook; Schimpf, M.E.; Caldwell, K.; Giddings, J.C., Eds.; Wiley-Interscience: New York, 2000; Chapter 29.
- [2] P. Reschiglian, A. Zattoni, B. Roda, S. Casolari, M. H. Moon, J. Lee, J. Jung, K. Rodmalm and G. Cenacchi, *Anal. Chem.* 74 (2002) 4895-4904.
- [3] A. Zattoni, E. Loli piccolomini, G. Torsi, P. Reschiglian, *Anal. Chem.* 75 (2003) 6469.
- [4] K.L. Chan, H. Morgan, E. Morgan, I.T. Cameron, M.R. Thomas, *Biochim. Biophys. Acta.* 1500 (2000).
- [5] A.K. Campbell, *Chemiluminescence: Principles and Applications in Biology and Medicine*, Ellis Horwood, Chichester – VCH, Weinheim, 1988.
- [6] D. Melucci, M. Guardagli, B. Roda, A. Zattoni, P. Reschiglian, A. Roda, *Talanta* 60 (2003) 303.
- [7] E.J. Shpall, R. Champlin, J.A. Glaspy, *Biology of Blood and Marrow Transplantation* 4 (1998) 84.

# OSSERVAZIONE DI UNA SINGOLA MOLECOLA E CROMATOGRAFIA. RAPPRESENTAZIONE UNIFICATA NEL MODELLO DEI PROCESSI STOCASTICI DI LEVY

*Francesco Dondi, Luisa Pasti, Alberto Cavazzini*

*Dipartimento di Chimica, Università di Ferrara*

L'osservazione della dinamica di una molecola singola in mezzi simili a quelli cromatografici consente una visione diretta dei vari processi che compongono una separazione cromatografica [1, 2]. Questi processi sono i processi classici di adsorbimento/partizione ed i processi diffusivi in due o tre dimensioni. Tuttavia questi processi sono osservati a livello di singole molecole e non come insieme di molecole, come le concentrazioni nelle descrizioni della Termodinamica Classica o nelle equazioni fenomenologiche dei Fenomeni di Trasporto. Inoltre questi processi molecolari individuali sono osservati direttamente su sistemi reali, ad esempio su di una superficie fisica reale.

Al fine di poter tener conto di queste condizioni di osservazione, si propone un modello stocastico rinnovato della cromatografia che consente di stabilire un ponte concettuale tra i dati di osservazione della dinamica di una singola molecola in un dato mezzo cromatografico ed i risultati di un esperimento cromatografico eseguito sullo stesso mezzo. Questo modello rinnovato e' basato sulla così detta descrizione di Lévy dei processi stocastici [3,4] e rappresenta un avanzamento rispetto ai modelli stocastici tradizionali [5], poichè in esso viene introdotta lo spettro sperimentale relativo agli eventi elementari che costituiscono il processo cromatografico, al posto di una distribuzione ipotetica dei medesimi. Il metodo è applicato a dati di letteratura [1, 2].

1. M. J. Wirth, D. J. Swinton, *Anal. Chem.*, **1998**, 70, 5264-5271
2. S.H.Kang, M.R. Shortreed, E.S. Yeung, *Anal.Chem.*, **2001**, 73, 1091-1099.
3. P. Lévy, *Théorie de l'Addition des Variables Aléatoires*, Gautier-Villars Ed. Paris (F), **1954**
4. *Lévy Processes Theory and Applications*, O. E. Barndorff-Nielsen, T. Mikosch, S. I. Resnick Eds., Birkhauser Boston, **2001**
5. F. Dondi, A. Cavazzini, M. Remelli; in *Advances in Chromatography*; P. R. Brown , E. Grushka Eds; Marcel Dekker, New York, **1998**, 38, 51-74,

**Mercoledì 22 Settembre 2004**

**SENSORI**

**Aula dei Filosofi  
Palazzo Centrale  
9.50-11.30**

# AN ELECTROCHEMICAL BIOSENSOR FOR THE DETECTION OF PESTICIDES IN DURUM WHEAT PRODUCTS

*M. Del Carlo*<sup>\*1</sup>, *M. Mascini*<sup>1</sup>, *A. Pepe*<sup>1</sup>, *M. De Gregorio*<sup>1</sup>, *A. Visconti*<sup>2</sup> & *D. Compagnone*<sup>1</sup>

<sup>1</sup>University of Teramo, Department of Food Science, 64023 Teramo, Italy.

<sup>2</sup>Institute of Sciences of Food Production, CNR, Bari, Italy

[delcarlo@unite.it](mailto:delcarlo@unite.it)

Organophosphate and carbamate pesticides are extensively used, due to their high insecticide activity and relatively low persistence, during durum wheat storage. Currently, dichlorvos and pirymiphos methyl (figure 1) are among the most widely used pesticides worldwide for this application. Since their target enzyme, acetylcholinesterase (AChE), is common to neural transmission both in insects and in mammalian, including humans, they represent a potential hazard for human health.

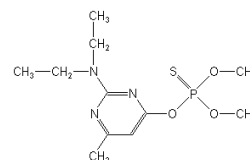
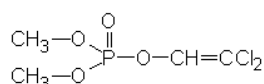


Figure 1: Dichlorvos and pirymiphos methyl structure.

In this report we discuss the development of analytical protocols, based on an electrochemical biosensors, for the detection of these pesticides in different products, namely durum wheat, flour, and pasta.

The approach was based on the inhibition of the AChE by the pesticides: a chemically modified screen printed electrode was obtained by deposition of the electrochemical mediator Prussian Blue on the graphite surface of a screen printed electrode, this device was then used to immobilize choline oxidase. The biosensor was used to detect the product of AChE during the inhibition assay.

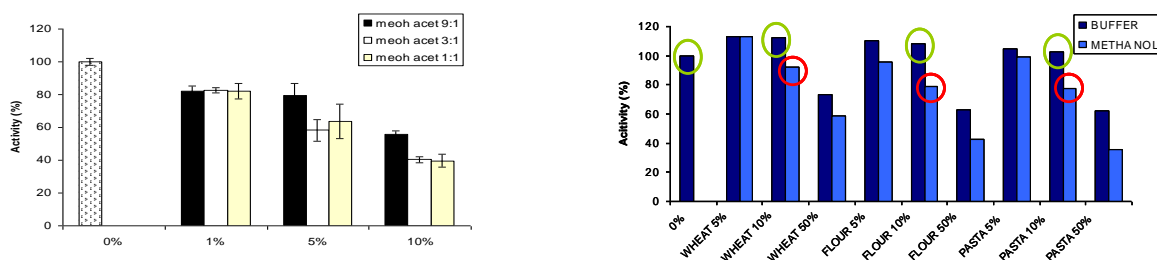


Figure 2: solvent and matrix effect on AChE assay.

The analytical performance of the method was evaluated with respect to solvent and matrix effect (figure 2). In this respect, the device was calibrated using dichlorvos and pirymiphos methyl standard solutions and in extracts of different durum wheat products.

Moreover a simple extraction procedure was optimised for both pesticides, from the different matrices, in order to detect the pesticides at the maximum admissible level which varies, depending on molecule and matrix, from 0.5 to 5 ppm.

Acknowledgements: Work supported by MIUR (DL 297/27 July 1999), SINSIAF Project



## ELECTROCHEMICAL GENOSENSOR FOR SEQUENCE-SPECIFIC ANALYSIS OF FISH SPECIES

*F. Lucarelli, M. L. Del Giallo, G. Marrazza, M. Mascini*

*Dipartimento di Chimica, Università degli Studi di Firenze*

In this paper, an electrochemical genosensor for the toxic fish species differentiation (*Takifugu niphobles*) from edible species (*Lophius budegassa*) was developed using screen-printed gold electrodes.

Screen-printed gold electrodes were firstly modified with a mixed monolayer of a 21-mer thiol-tethered DNA probe and a spacer thiol, 6-mercaptop-1-hexanol (MCH).

An enzyme-amplified detection scheme, based on the coupling of a streptavidin-alkaline phosphatase conjugate and biotinylated target sequences was then applied. The enzyme catalysed the hydrolysis of the electroinactive  $\alpha$ -naphthyl phosphate to  $\alpha$ -naphthol; this product is electroactive and was detected by means of differential pulse voltammetry.

The assay was, firstly, characterised using synthetic oligonucleotide. Relevant analytical parameters, such as the probe concentration, the immobilisation time and hybridization time were investigated and optimized. The genosensor response was found to be linearly related ( $R^2 = 0.998$ ) to the target concentration between 0 and 15 nmol/L; the detection limit was 0.06 nmol/L of oligonucleotide target sequence.

The analytical procedure was then applied for the identification of fish species in DNA samples isolated from fish fillets and amplified by PCR. The DNA probe sequence was corresponded to the top primer used for the PCR amplification, thus allowing both amplicons to be captured at the electrode surface. The differentiation between the two fish species was accomplished using a biotinylated secondary probe, specific for either the toxic or edible specie, in a sandwich hybridisation assay. Critical aspects of the analytical assay, such as thiolated DNA probe sequence and surface density and biotinylated secondary probe sequence were investigated and optimised. Almost no signal was obtained exposing the probe modified electrodes to pure buffer, secondary probe alone and both amplicons (12 nmol/L) in the absence of the biotinylated secondary probe. Clear sample identification was on the contrary achieved analysing both DNAs in the presence of the *Lophius*-specific biotinylated secondary probe.

Moreover, analysis of significantly lower ( $< 1$  nmol/L) amplicon concentrations was allowed through the use of multiple secondary probes (recognising different discrimination regions) and subsequent binding of several enzymatic conjugates per target copy.

In conclusion, the results showed that the genosensor enabled sensitive differentiation of fish species. Its use for tracing the presence of toxic species in industrial fish products (in which the morphological identity of the fish is lost) appears to be an attractive application.

## SVILUPPO DI UN BIOSENSORE PIEZOELETTRICO A BASE DI DNA PER LA RICERCA DI BATTERI PATOGENI

A. Santucci, M. Minunni, S. Tombelli, M.M. Spiriti, M. Mascini

Università degli Studi di Firenze, Dipartimento di Chimica  
Via della Lastruccia 3, 50019 Sesto Fiorentino (FI)  
e-mail:mascini@unifi.it

Un problema rilevante negli ambienti nosocomiali è la presenza di un elevato numero di batteri manifestanti resistenza antibiotica. Tra questi vi è lo *Staphylococcus aureus* meticillino resistente (MRSA), che suscita seria preoccupazione negli ambienti sanitari in quanto è responsabile di una vasta gamma di gravi infezioni post-operatorie, quali meningiti, polmoniti ed endocarditi. La resistenza antibiotica del batterio deriva dalla produzione di una proteina di membrana anomala (PBP2a), codificata da un gene denominato *mecA* (2007 pb), acquisito dallo *S. aureus* da altre specie per trasferimento orizzontale. La rapida identificazione di questo ceppo batterico è necessaria per consentire l'isolamento delle aree e delle persone infette e per eseguire un mirato intervento terapeutico.

Le tradizionali tecniche di microbiologia per l'identificazione del MRSA richiedono dalle 24 alle 48 ore per una risposta di positività/negatività. L'utilizzo di un biosensore quale quello presentato in questo lavoro punta ad una riduzione dei tempi di analisi.

Il sistema piezoelettrico studia la reazione di ibridazione tra un'opportuna sonda, immobilizzata sulla superficie del biosensore, e la sequenza complementare presente nel campione, in tempo reale e senza l'impiego di marcatori aggiunti. Per l'immobilizzazione della sonda (27 basi) sono stati seguiti due protocolli: nel primo viene impiegata una sonda oligonucleotidica sintetica modificata in posizione 5' con una molecola di biotina. Nel secondo metodo si utilizza invece una sonda funzionalizzata questa volta in posizione 5', con un gruppo C<sub>6</sub>-SH. Del biosensore realizzato con entrambi i metodi di immobilizzazione, sono stati valutati parametri analitici quali sensibilità, specificità e riproducibilità, così da determinare il sistema più adatto all'analisi intrapresa.

La capacità del sensore di individuare il gene *mecA* è stata valutata prima su sequenze oligonucleotidiche sintetiche ed in seguito su campioni di DNA batterico amplificati tramite reazione polimerasica a catena. Quest'ultimi si presentano a doppio filamento quindi per essere disponibili all'ibridazione devono essere sottoposti a denaturazione, a tale scopo è stato ottimizzato un nuovo metodo di denaturazione.

Il sistema è stato in grado di rilevare la presenza del gene *mecA* sia nelle sequenze sintetiche che negli amplificati PCR.

I risultati delle reazioni di ibridazione indicano come tecnica di immobilizzazione più adatta a questo tipo d'indagine, quella con sonde biotinilate che, a parità di concentrazione di campione indagata, fornisce segnali maggiori (~ 40% in più) e più riproducibili (Il CV% passa da 18 a 8 nei campioni di PCR) della tecnica che utilizza le sonde tiolate. Inoltre, i campioni analizzati con il nuovo procedimento di denaturazione hanno fornito, a parità di metodo d'immobilizzazione, segnali maggiori.

## OPTIMIZATION OF AN ELECTROCHEMICAL SENSOR FOR DETECTION OF BACTERIAL POPULATION

M. Berrettoni<sup>1</sup>, I. Carpani<sup>1</sup>, P. Conti<sup>2</sup>, G. Fumarola<sup>1</sup>, S. Lanteri<sup>3</sup>, E. Leoni<sup>4</sup>, P. Legnani<sup>4</sup>, D. Tonelli<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dipartimento di Chimica Fisica ed Inorganica e UdR INSTM, Università di Bologna, V.le Risorgimento 4, 40136 Bologna, Italy

<sup>2</sup>Dipartimento di Scienze Chimiche, Università di Camerino, Via S. Agostino, I-62032 Camerino (MC) Italy

<sup>3</sup>Dipartimento di Chimica e Tecnologie Farmaceutiche e Alimentari, Università di Genova, Via Brigata Salerno (s/n), 16147 Genova, Italy

<sup>4</sup>Dipartimento di Medicina e Sanità Pubblica, Università di Bologna, Via S. Giacomo 12, 40126 Bologna, Italy

The estimation of microbial load is critical for food safety. Conventional detection procedures take more than 24-48 hours to obtain results, a time that is incompatible with on line quality control in food industry [1]. Rapid methods have been developed in recent years but they have some drawbacks, including lack of sensitivity, accuracy and/or specificity, and often require high cost instruments.

In a previous paper [2] we described a home-made ultra-microelectrodes array which was used to record Normal Pulse Voltammetry (NPV) signals on suspensions containing different loads of *Escherichia Coli* and *Pseudomonas Aeruginosa* chosen as test microorganisms. The voltammetric measurements were coupled with a biased regression and variable selection method [3] (Partial Least Squares with Iterative Prediction Weighting, IPW-PLS) enabling us to rapidly correlate the aerobic plate microbial cell counting with the current signals.

In the present work we describe the preliminary results obtained using Square Wave Voltammetry (SWV) in place of NPV measurements in order to verify if this technique allows for lower detection limits. At first, the method has been tested on *Escherichia Coli* ATCC 13706.

The measurements were performed in a conventional three electrodes cell (SCE as reference and platinum wire as counter electrodes) using a CHI 620 electrochemical workstation. An ultra-microelectrodes array consisting of Reticulated Vitreous Carbon (RVC) filled with epoxy resin [2], was the working electrode. A parallel plate counting was performed in order to obtain the bacterial load expressed as colony forming units (CFU) ml<sup>-1</sup>. Before each series of samples the working electrode was conditioned in a sterile solution with the same composition as that used for preparing the bacterial suspensions, by repeating the potential scan until almost superimposable curves were obtained (blank signal). The blank signal was also recorded at the end and during the measurements.

SWV and NPV measurements were performed in a potential range -1.6 V to 1.6 V in anodic direction. The suspensions at different bacterial loads were prepared by serial dilutions in phosphate buffer of a liquid culture of *Escherichia Coli* in tryptic soy broth. The results obtained after the data treatment procedure were good and comparable for both electrochemical techniques; cross-validated prediction ability, with the leave-one out validation method, resulting greater than 95%. In particular SWV seems able to detect lower bacterial loads.

SWV parameters i.e., potential increment (V), square wave amplitude (V) and square wave frequency (Hz) were then optimised with a full factorial experimental design 2<sup>3</sup>, 3 factors and two levels, plus the triplicate experiment at the central point. Each of the 11 experiments of the experimental design consisted of the multivariate biased regression (IPW-PLS) on five

SWV measurements acquired on samples whose bacterial load (response) ranged from 400 to 19300 CFU.

The best experimental conditions (160 potentials, predictors) resulted potential increment 0.02V, square wave amplitude 0.01V and square wave frequency 100Hz, corresponding to the best cross-validated variance percentage of 99%.

The experimental design was conditioned by the long time needed to run the experiences so that few samples were possible. This can explain the poor number of latent variables used and the large difference between similar experimental conditions.

Recently, we have applied the optimised parameters on new data sets. The prediction performances were confirmed also if more complex model were selected (7 latent variables) and, consequently, more potentials were retained.

The use of an ultra-microelectrodes array allows to perform measurements in situ without any chemical pollution. The electrochemical methods jointed with chemometric treatment of the data permit to obtain an analytical signal directly correlated to the bacterial population. Further studies are in progress to test the reliability, the accuracy and detection limits of the method based on SWV.

## References

1. N.S. Hobson, I. Tothill, A.P.F. Tuner, *Biosensor & Bioelectronics*, 11 (1996) 455-477.
2. M. Berrettoni, I. Carpani, N. Corradini, P. Conti, G. Fumarola, G. Legnani, S. Lanteri, R. Marassi, D. Tonelli, *Anal. Chim Acta*, 509 (2004), 95-101.
3. M. Forina, C. Casolino, C. Pizarro Millan, *J. Chemometrics*, 13 (1999), 165-184.

# NUOVO SENSORE PER LA RIVELAZIONE SELETTIVA DI SOLVENTI IN FASE GAS SU CRISTALLI PIEZOELETTRICI MODIFICATI TRAMITE ELETTROPOLIMERIZZAZIONE DI UNITA' BITIOFENICHE FUNZIONALIZZATE

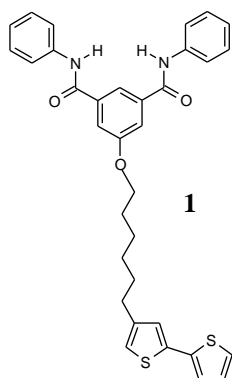
*Marco Giannetto<sup>a</sup>, Valentina Mastria<sup>a</sup>, Giovanni Mori<sup>a</sup>, Andrea Secchi<sup>b</sup>*

<sup>a</sup>*Dipartimento di Chimica Generale ed Inorganica, Chimica Analitica, Chimica Fisica.*

<sup>b</sup>*Dipartimento di Chimica Organica e Industriale.*

*Università di Parma. Parco Area delle Scienze 17/A I-43100 Parma*

In letteratura<sup>1,2</sup> sono riportati numerosi studi riguardanti sensori piezoelettrici a trasduzione frequenzimetrica per gas, basati sull'utilizzo di polimeri conduttori a base tiofenica, pirrolica o anilinic. Le risposte di tali dispositivi risultano però aspecifiche, così come lo sono le interazioni tra l'analita e il polimero stesso; tali interazioni, inoltre, provocano spesso modificazioni irreversibili delle proprietà chimico-fisiche del polimero, compromettendo il tempo di vita di tali sensori.



Inoltre i sensori QCM per gas fino ad ora realizzati si basavano sulla deposizione di mono- o multi-layers di film di materiale attivo tramite "spin coating"<sup>3</sup> oppure avvalendosi della tecnica "Langmuir-Blodgett"<sup>4,5</sup>, con notevoli difficoltà nella riproducibilità dei coatings.

E' stato da noi messo a punto e studiato un nuovo sensore QCM, ottenuto tramite elettropolimerizzazione di un recettore molecolare (**1**) derivatizzato con 2,2'-bitiofene su quarzi per EQCM con superficie elettroica in oro.

Il meccanismo di coordinazione del recettore si basa sulla formazione di legami ad idrogeno con molecole contenenti atomi elettronegativi

Il polimero così ottenuto è in grado di formare, tramite gli atomi di idrogeno delle funzioni ammidiche, legami idrogeno con diversi analiti contenenti atomi elettronegativi.

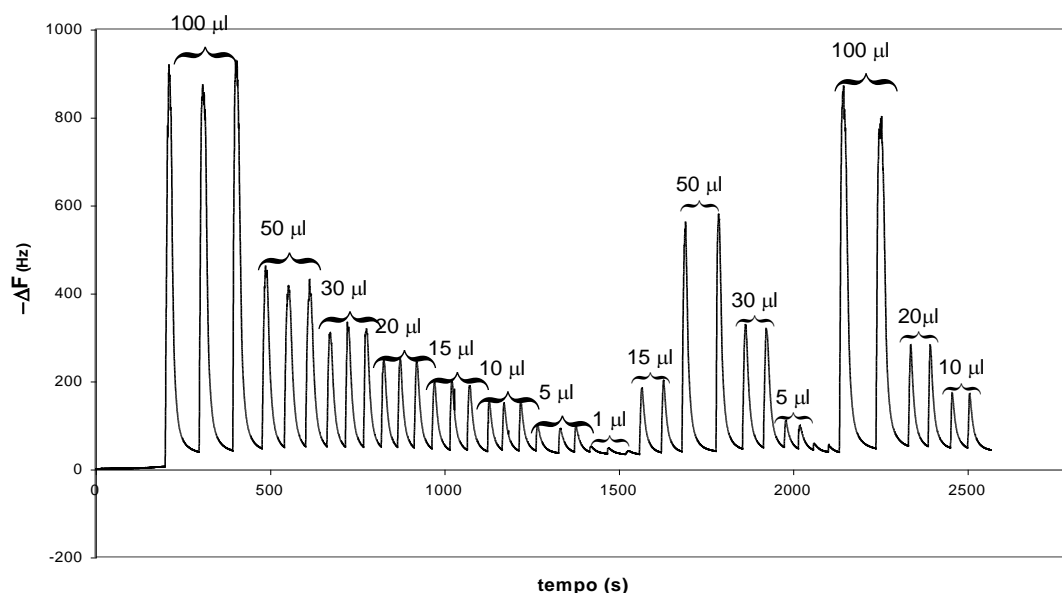
Il vantaggio derivante dall'impiego di tali film polimerici, oltre che nella loro agevole preparazione tramite elettrosintesi, risiede nella notevole specificità della risposta, verificata tramite calibrazione con un pool di solventi come cloroformio, acetone, acetato di etile, etanolo, acqua, esano, toluene.

Si è sono ottenute elevate sensibilità e selettività per solventi come cloroformio, acetone e acetato di etile, capaci di formare legami idrogeno con il recettore, nei confronti di solventi non alogenati o ossigenati come l'esano o il toluene, che non interagiscono con il recettore.

L'efficacia del recettore è stata verificata tramite confronto delle risposte ottenute con coatings di polibitiofene non derivatizzato.

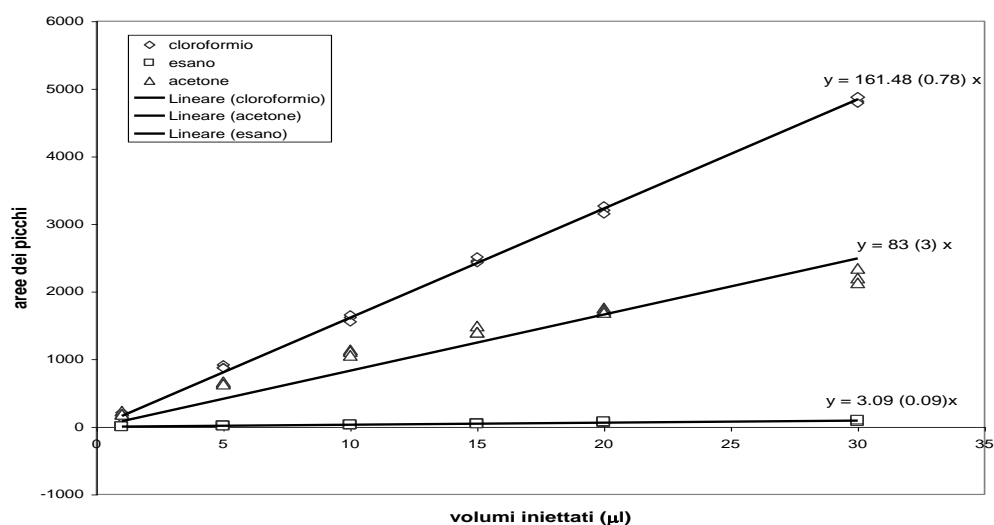
La specificità della risposta, che è basata su interazioni coordinative reversibili, garantisce anche tempi di vita lunghi e buona riproducibilità.

In Figura 1 è illustrato il segnale ottenuto durante una calibrazione con cloroformio. Oltre alla riproducibilità del segnale, si può notare l'assenza di effetto memoria. Le calibrazioni sono state effettuate esponendo la cella di rivelazione contenente l'unità QCM ad un flusso di N<sub>2</sub> di 0.5 l/min. e iniettando volumi di solvente compresi tra 1 e 100 µl in una camera di iniezione da 100 ml, termostata ed installata a monte della cella di rivelazione.



**Figura 1**

Un confronto tra le risposte ottenute con cloroformio, acetone ed esano è illustrato in Figura 2, dove si evidenzia l'elevata selettività per solventi alogenati (cloroformio) o ossigenati (acetone) nei confronti dell'esano. Le calibrazioni illustrate sono state effettuate in un range compreso tra 1 e 30  $\mu\text{l}$  di solvente iniettato, ma è stato individuato un'altro intervallo di linearità della risposta, compreso tra 50 e 100  $\mu\text{l}$ .



**Figura 2**

Le prospettive di utilizzo di questi nuovi sensori non si limitano al loro funzionamento diretto, ma si prevedono ottime potenzialità di tali dispositivi nella messa a punto di rivelatori selettivi per gascromatografia.

#### Bibliografia

- 1) C. Malitesta, I. Losito, P.G. Zambonin, *Anal. Chem.*, **1999**, *71*, 1366-1370
- 2) N.E. Agbor, M.C. Petty, A.P. Monkman, *Sens. and Act. B*, **1995**, *28*, 173-17
- 3) Zhang, J. Hu, Z.Q. Zhu, H. Gong, S.J. O' Shea, *Coll. and Surf. A: Physicochem. and Engin. Aspect*, **2004** *236*, *1*, 23-30.
- 4) S. Zhang, Z.K. Chen, G.W. Bao, S.F.Y. Li, *Talanta*, **1998**, *45*, 727-733
- 5) Z. Chen, S. Ng, S.F.Y. Li, L. Zhong, L. Xu, H.S.O. Chan, *Synt. Met.*, **1997**, *87*, 201-204

**Mercoledì 22 Settembre 2004**

**TECNICHE COMBinate - SPETTROMETRIA DI MASSA**  
**Seconda sessione**

**Aula Magna**  
**Palazzo Centrale**

**11.50-13.10**

## NUOVI METODI CROMATOGRAFICI (GCxGC E LCxLC) PER L'IDENTIFICAZIONE DI MOLECOLE DI INTERESSE ALIMENTARE

*Luigi Mondello*

*Dipartimento Farmaco-chimico, Facoltà di Farmacia, Università degli Studi di Messina, 98168 – Messina, Italia.*

Matrici naturali, di complessità anche bassa, presentano una distribuzione caotica dei picchi che richiede un elevato livello di efficienza per la totale risoluzione dei componenti. Di conseguenza, l'utilizzo di una singola colonna capillare o di un sistema multidimensionale classico si dimostra spesso insufficiente.

Lo sviluppo e l'impiego di metodiche automatiche "comprehensive" bidimensionali stanno aumentando continuamente in tutti i campi. Ciò è dovuto al fatto che queste tecniche sono caratterizzate da un potere risolutivo fortemente incrementato rispetto agli approcci cromatografici tradizionali.

Un sistema "comprehensive" bidimensionale deve possedere i seguenti requisiti:

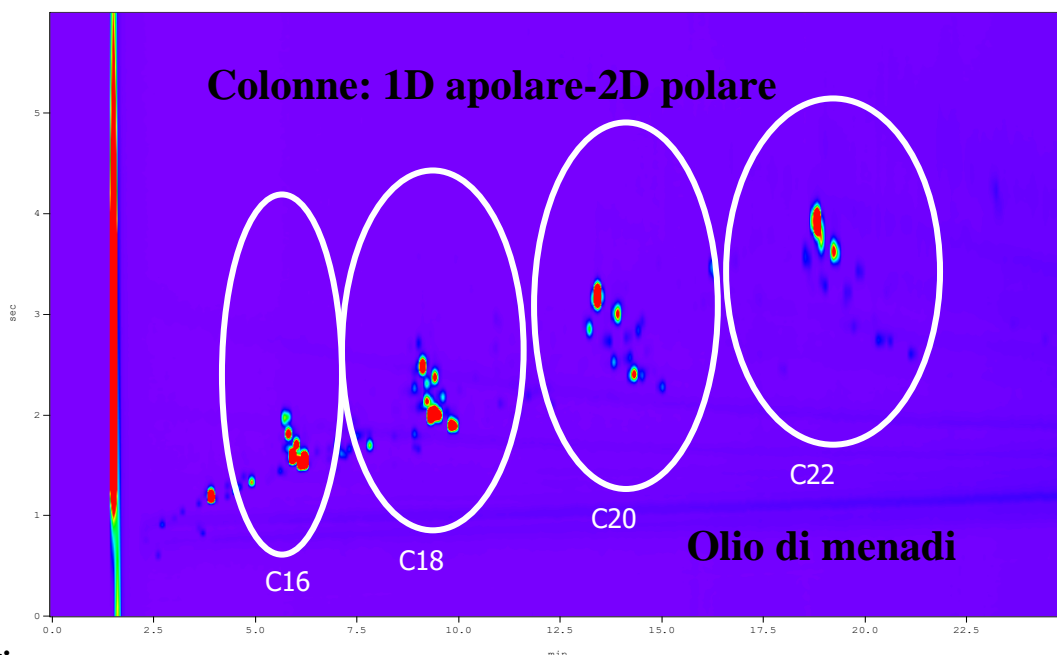
- tutti i componenti presenti in un campione vengono assoggettati a due separazioni di diverso tipo.
- qualsiasi composto separato nella prima dimensione deve rimanere separato anche nella seconda.
- i profili di eluizione in entrambe le dimensioni devono essere conservati.

Una separazione bidimensionale tipica viene effettuata, generalmente, su due distinte colonne (con diversa selettività) connesse in serie mediante un modulatore. La tipologia di interfaccia che viene utilizzata dipende dalla specifica metodologia. La funzione del modulatore è di tagliare e poi rilasciare frazioni continue dell'eluato monodimensionale in una seconda colonna più corta. Affinchè la separazione monodimensionale venga preservata, le bande iniettate nella seconda colonna devono eluire prima della successiva riiniezione. I tempi di ritenzione secondari devono essere, al massimo, uguali a quella della durata di un singolo periodo di modulazione.

I dati cromatografici 2D possono essere meglio apprezzati se trasformati in un cromatogramma bidimensionale, dove, ad ogni componente, corrisponde un picco di forma ovale, definito da due tempi di ritenzione (uno in ascisse, l'altro in ordinata). Il colore e le dimensioni del picco sono correlati alla quantità totale del composto presente nel campione. Lo spazio bidimensionale può contenere molti più picchi e quindi ha una maggiore capacità del picco rispetto ad un cromatogramma riferito ad una sola ascisse. La sovrapposizione di due molecole strutturalmente diverse è statisticamente improbabile, in quanto richiederebbe due tempi di eluizione uguali in due colonne aventi fasi stazionarie diverse. Bisogna aggiungere che molecole appartenenti alla stessa classe chimica formano, nello spazio bidimensionale, dei pattern caratteristici che aumentano il potere di identificazione di queste metodiche.

La GC x GC è una tecnica adatta alla separazione di miscele molto complesse di composti volatili e semivolatili. Nella presente ricerca è stata applicata all'analisi di esteri metilici degli acidi grassi (FAMES) derivanti da lipidi alimentari. Quest'ultimi sono matrici moderatamente complesse, per l'analisi delle quali una singola colonna capillare sarebbe sufficiente. L'uso della GC x GC, in questo caso, è di notevole interesse per la formazione di pattern relativi a componenti che presentano similitudini strutturali. Un cromatogramma bidimensionale, relativo ad un campione di olio di menadi, è riportato nella figura 1. Come si può vedere, i FAMES con lo stesso numero di atomi di carbonio si dispongono nella stessa zona. Inoltre, esteri metilici omologhi, con lo stesso numero di doppi legami, si allineano in bande ben definite.

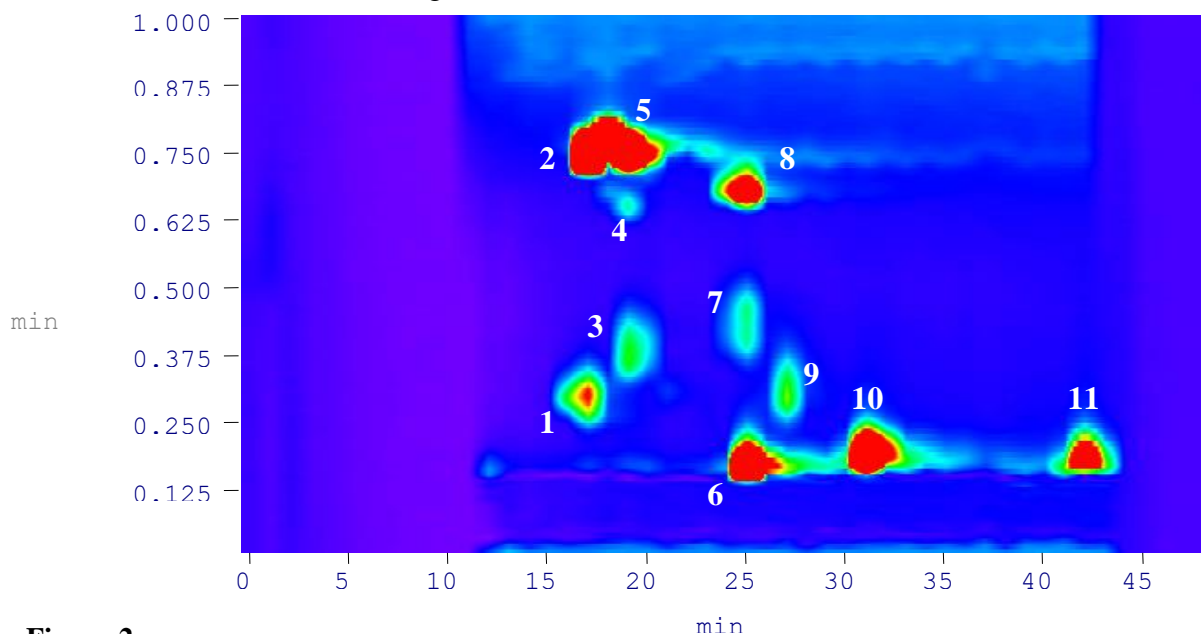




**Figura 1.**

Nella GC, sebbene siano disponibili varie fasi stazionarie con differenti selettività, la ritenzione è in gran parte legata al punto di ebollizione dei soluti. Le tecniche LC, al contrario, sono caratterizzate da una gran varietà di meccanismi di separazione basati su selettività del tutto diverse. Come tale, il numero possibile di combinazioni bidimensionali è maggiore anche se alcune di questi sono incompatibili.

Un sistema automatizzato LC x LC, basato sull'uso di una colonna a diametro interno ridotto (micro-bore) operata in fase normale nella prima dimensione e di una colonna monolitica operata in fase inversa nella seconda dimensione, è stato recentemente sviluppato. Questo metodo è stato sfruttato per la separazione dei componenti ossigenati eterociclici presenti in un olio essenziale di limone (Figura 2).



**Figura 2**

Identificazione picchi: 1) non identificato, 2) 5-geranyloxy-psoralen, 3) 5-isopentenylloxy-psoralen, 4) 5-geranyloxy-8-methoxy-psoralen, 5) 5-geranyloxy-7-methoxycoumarin, 6) 5,7-dimethoxycoumarin, 7) 5-methoxy-8-isopentenylloxy-psoralen, 8) 8-geranyloxy-psoralen, 9) 5-isopentenylloxy-8-epoxy isopentenylloxy-psoralen, 10) 5-epoxyisopentenylloxy-psoralen, 11) 5-methoxy-8-(2,3-epoxyisopentenylloxy)psoralen

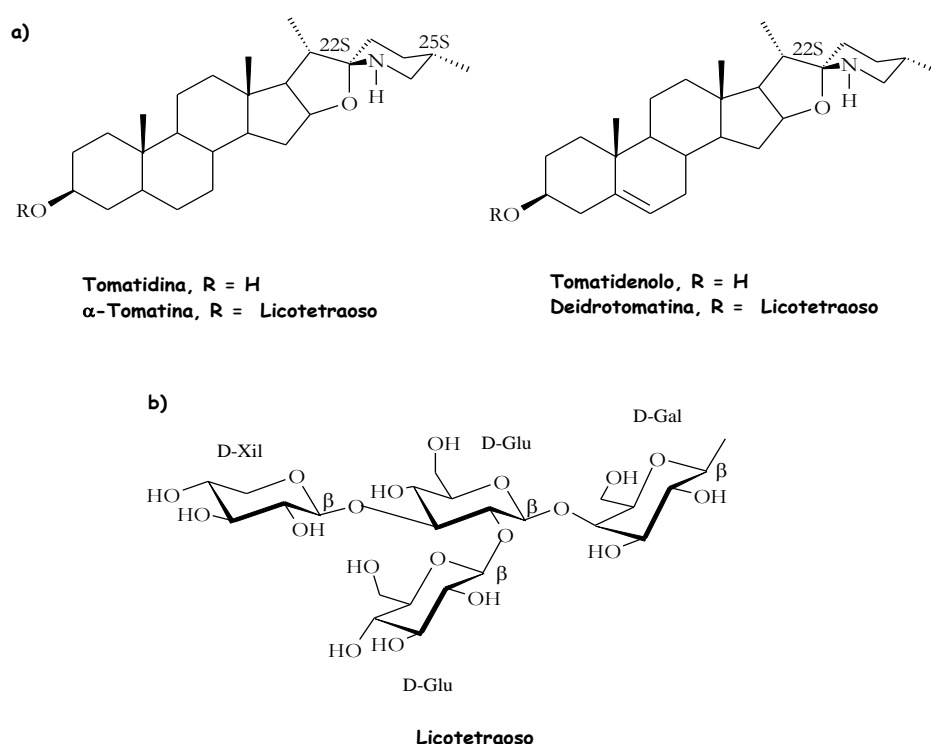
# IDENTIFICAZIONE STRUTTURALE DI NUOVI GLICOALCALOIDI DELLA PIANTA DI POMODORO MEDIANTE CROMATOGRAFIA LIQUIDA E IONIZZAZIONE ELECTROSPRAY IN SPETTROMETRIA DI MASSA (LC/ESI-MS)

*Filomena Lelario*<sup>1</sup>, *Giovanna Margiotta*<sup>1</sup>, *Sabino A. Bufo*<sup>1</sup>, *Tommaso R. I. Cataldi*<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Dipartimento di Produzione Vegetale e <sup>2</sup>Dipartimento di Chimica, Università degli Studi della Basilicata, Via N. Sauro, 85 - 85100 Potenza ([cataldi@unibas.it](mailto:cataldi@unibas.it))

I glicoalcaloidi (GA) sono metaboliti secondari presenti in numerose specie della famiglia delle *Solanaceae* e delle *Liliaceae* [1,2]. La loro presenza nelle piante, un tempo ritenuta priva di qualsiasi ruolo fisiologico, è ora considerata particolarmente importante svolgendo una funzione di difesa nei confronti di organismi patogeni ed erbivori [3]. Sono stati, altresì, evidenziati importanti effetti farmacologici e tossicologici sugli animali e sull'uomo tanto da rendere lo studio di tali sostanze particolarmente interessante [4].

I GA più rappresentativi della specie *Lycopersicon esculentum* sono l' $\alpha$ -tomatina e la deidrotomatina, rispettivamente forme glucosilate degli alcaloidi steroidei tomatidina e tomatidenolo (Figura 1).



**Figura 1.** Struttura dei principali glicoalcaloidi del pomodoro: agliconi (a) e residuo glucidico (b).

La determinazione in matrici alimentari dei glicoalcaloidi è tipicamente eseguita mediante gas cromatografia, previa opportuna derivatizzazione, e cromatografia liquida con rivelazione ultravioletta o amperometrica pulsata [5,6]. Queste metodiche sono caratterizzate da una relativa complessità nella preparazione del campione con tempi di analisi relativamente lunghi e sensibilità e selettività non sempre adeguate. L'accoppiamento della cromatografia liquida ad alta efficienza (HPLC) con la spettrometria di massa (MS) rappresenta una combinazione particolarmente efficace in quanto permette di sfruttare simultaneamente l'efficienza separativa propria della HPLC e la capacità di identificazione

della MS. La HPLC-MS si configura, quindi, come la tecnica di elezione per incrementare contemporaneamente selettività e sensibilità di rivelazione anche in assenza di lunghe e laboriose procedure di pretrattamento del campione.

In questa comunicazione verranno presentati i risultati di un nuovo metodo cromatografico di analisi dei glicoalcaloidi del pomodoro che risulta essere molto sensibile e rapido, utilizzando la rivelazione spettrometrica di massa a ionizzazione electrospray (ESI-MS). L'impiego di condizioni di analisi ottimizzate ha consentito l'individuazione negli estratti di bacche e foglie di pomodoro della  $\alpha$ -tomatina, della deidrotomatina e di altri glicoalcaloidi minori, non ancora riportati in letteratura. Un aspetto molto interessante di questo studio è risultato quello del comportamento alla rivelazione in massa degli analiti presi in esame. I composti incogniti hanno, infatti, esibito spettri di massa peculiari, caratterizzati dalla presenza dello ione pseudo-molecolare  $[M+H]^+$ , di un frammento dovuto alla perdita del trisaccaride xilosio-(glucosio-)-glucosio e di uno ione bicarica  $[M+H+Na]^{2+}$ , riconducibile alla formazione di un addotto tra la molecola protonata e lo ione sodio. Lo studio di questi picchi caratteristici e degli spettri tandem MS/MS ha consentito di ottenere informazioni strutturali utili per il riconoscimento dei glicoalcaloidi delle piante del pomodoro.

### **Riferimenti bibliografici**

1. Maga, J. A. (1994). Glycoalkaloids in Solanaceae. *Food Rev. Int.*, 10: 385-418.
2. Friedman, M., McDonald, G.M. (1997). Potato glycoalkaloids: chemistry, analysis, safety and plant physiology. *Crit. Rev. Plant Sci.*, 16: 55-132.
3. Tingey, W.M. (1984). Glycoalkaloids as pest resistance factors. *Am. Potato J.*, 61: 157-167.
4. Jadhav, S. J., Sharma, R. D., Salunkhe, D. K. (1981). Naturally occurring toxic alkaloids in food. *Crit. Rev. Toxicol.*, 9: 21-104.
5. Friedman, M., Levin, C.E., McDonald, G.M. (1994).  $\alpha$ -Tomatine determination in tomatoes by HPLC using pulsed amperometric detection. *J. Agric. Food Chem.*, 42: 1959-1964.
6. Laurila, J., Laakso, I., Vaananen, T., Kuronen, P., Huopalahti, R., Pehu, E. (1999). Determination of solanidine- and tomatidine-type glycoalkaloid aglycones by gas chromatography/mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.*, 47: 2738-2742.

## PEPTIDI BIOATTIVI IN PRODOTTI CASEARI: IDENTIFICAZIONE MEDIANTE SPETTROMETRIA DI MASSA A TRAPPOLA IONICA CON IONIZZAZIONE ELETTROSPRAY (ESI-IT-MS)

I. Losito\*, T. Carbonara\*, M.D. De Bari\*, P.G. Zambonin\*, M. Gobbetti<sup>o</sup>

\* Dipartimento di Chimica, Università di Bari, Via E. Orabona 4, 70126 Bari

<sup>o</sup> Dipartimento di Protezione delle Piante e Microbiologia Applicata, Università di Bari, Via Amendola 165, 70125 Bari

Oltre a svolgere un ruolo fondamentale come fonte di amminoacidi le proteine introdotte con la dieta possono esercitare importanti funzioni biologiche, interagendo, a seconda dei casi, con i sistemi cardiovascolare, endocrino, immunitario e nervoso. Tali funzioni sono attribuibili a peptidi fisiologicamente attivi, contenuti all'interno della sequenza primaria delle proteine e rilasciati in seguito ad idrolisi enzimatica o *in vitro*, nel corso dei processi di produzione degli alimenti che le contengono, o *in vivo*, durante la digestione.

Peptidi con tali proprietà vengono definiti *bioattivi* e rivestono un grandissimo interesse in campo biomedico in virtù della varietà di effetti fisiologici che possono esercitare. Indubbiamente il maggior numero di peptidi bioattivi finora studiati si può ricondurre alle proteine del latte e dei suoi derivati (si vedano i rif. 1-3 per delle monografie sull'argomento), in particolare alle caseine  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\kappa$ , nella cui sequenza sono stati individuati peptidi oppioidi (casomorfine, lactorfine, casoxine), trasportatori di calcio (caseino-fosfopeptidi), inibitori dell'enzima convertitore dell'Angiotensina-I (ACE), stimolatori del sistema immunitario, peptidi con attività antimicrobica. La scoperta di tali effetti ha stimolato la possibilità di introdurre artificialmente tali peptidi anche all'interno di alimenti che ne sono naturalmente privi per trasformarli nei cosiddetti *cibi funzionali*, ossia alimenti in grado di esercitare una funzione fisiologica, oltre che nutrizionale.

Uno degli stadi determinanti in tale direzione è pertanto rappresentato dall'identificazione della sequenza amminoacidica dei peptidi bioattivi, fondamentale per la preparazione degli analoghi sintetici.

La spettrometria di massa con ionizzazione elettrospray (ESI-MS) può svolgere un ruolo fondamentale in questo senso ed è stata recentemente impiegata per l'individuazione di peptidi bioattivi<sup>4</sup>.

In questo lavoro la tecnica ESI-MS è stata accoppiata ad una separazione HPLC bidimensionale per la determinazione di peptidi presenti in una serie di prodotti caseari di largo consumo in Italia (ad esempio stracchino, caciocavallo, pecorino, ecc.) e caratterizzati da attività antimicrobica.

In particolare, l'estratto acquoso derivante dalle diverse matrici prese in considerazione, private di lipidi e proteine integre, è stato sottoposto ad una prima separazione cromatografica (FPLC-UV). Le frazioni, raccolte in automatico, sono state sottoposte a test microbiologici con *Lactobacillus sakei* per uno screening preliminare dell'eventuale attività antimicrobica.

Le frazioni risultate attive sono state quindi sottoposte ad analisi HPLC-ESI-MS. L'uso di uno spettrometro a trappola ionica ha permesso di effettuare analisi MS e MS/MS su ciascuna delle frazioni, permettendo di evidenziare la presenza di una serie di peptidi.

La sequenza di questi ultimi è stata poi ricostruita mediante un'analisi bio-informatica dei dati MS/MS ottenuti, rivolgendo particolare attenzione alla correlazione fra i dati sperimentali e quelli proposti nelle banche dati nel caso dei peptidi per i quali le sequenze amminoacidiche candidate erano molteplici.

L'analisi ha mostrato la presenza di sequenze peptidiche derivanti dalle caseine del latte in tutte le frazioni microbiologicamente attive (talvolta più sequenze nella stessa frazione) derivanti dai prodotti caseari presi in considerazione.

Alcune delle sequenze corrispondono a quelle di peptidi bioattivi già individuati in altri alimenti e per i quali erano stati riportati dati relativi ad altri effetti biologici/fisiologici. Appare inoltre evidente la tendenza della maggior parte delle sequenze a provenire da particolari zone della struttura primaria delle caseine, confermando l'ipotesi già avanzata in letteratura circa la presenza in queste proteine di specifiche regioni in grado di generare peptidi bioattivi.

### **Riferimenti bibliografici**

1. H. Meisel *Livestock production science* **50** (1997) 125-138
2. M. Gobbetti, L. Stepaniak, M. De Angelis, A. Corsetti, R. Di Cagno, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **42** (2002) 223-239
3. H. Korhonen, A. Pihlanto, *Current Pharmaceutical Design* **9** (2003) 1297-1308
4. D.A. Van Elswijk, O. Diefenbach, S. Van der Berg, H. Irth, U.R. Tjaden, J. Van der Greef, B.V. Kiadis, N. Leiden, *Journal of Chromatography A* **1020** (2003) 45-58

## ANALISI LC-MS<sup>n</sup> DI DITERPENI IN FOGLIE DI *SALVIA DIVINORUM*

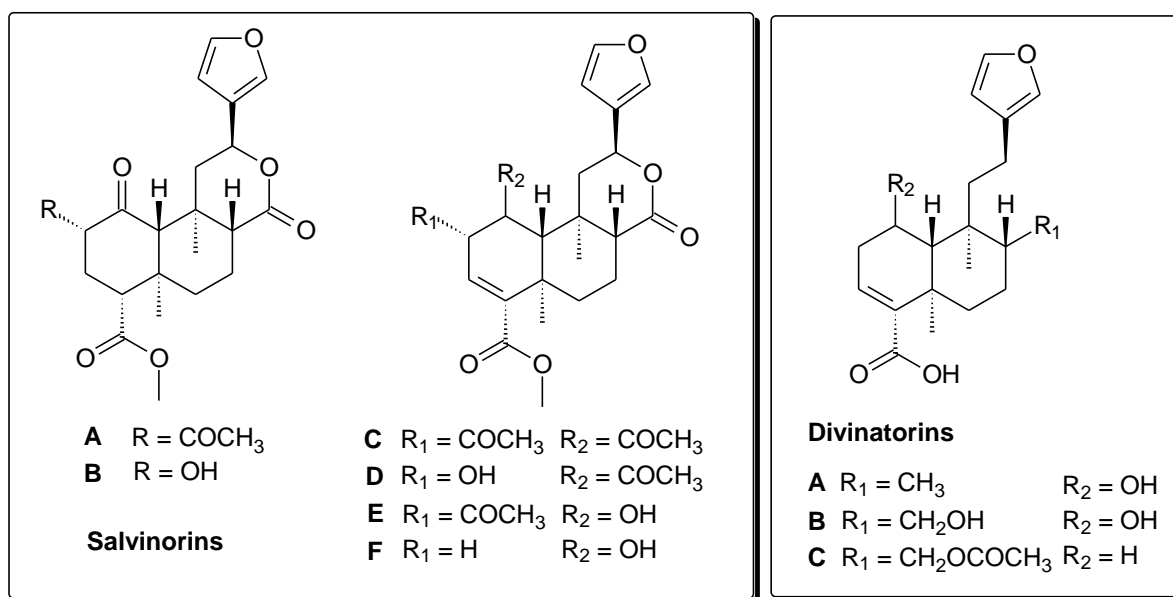
Claudio Medana, Cristina Massolino, Marco Pazzi, Riccardo Aigotti e Claudio Baiocchi

Dipartimento di Chimica Analitica, Università degli Studi di Torino  
Via P. Giuria 5, 10125 Torino – I

*Salvia divinorum* (Diviner's sage) è una pianta psicoattiva nota anche come “menta magica”, usata da secoli in pratiche tradizionali messicane. Oggi è largamente coltivata in Europa e Stati Uniti come sostituto della marijuana<sup>1</sup>. Vendita e possesso della pianta o del principio attivo sono attualmente illegali solo in Australia (dal giugno 2002); il commercio di preparati vegetali a base di *Salvia divinorum* e di altre piante non illegali, ampiamente diffuso sulla rete internet, ha promosso lo sviluppo e la diffusione dei cosiddetti “smart shops”, negozi oggi ampiamente diffusi anche in Italia.

La Salvinorina A, principale principio attivo della *Salvia divinorum*, è il più potente allucinogeno naturale conosciuto e ha una potenza paragonabile a quella del semisintetico LSD<sup>2</sup>. Dal punto di vista strutturale, appartiene alla classe dei diterpeni neoclerodanici e rappresenta l'unico agonista selettivo per i recettori K-opioidi non contenente azoto.

Nelle foglie di *Salvia divinorum* sono stati isolati 6 diversi composti della classe delle salvinorine e tre delle divinatorine:



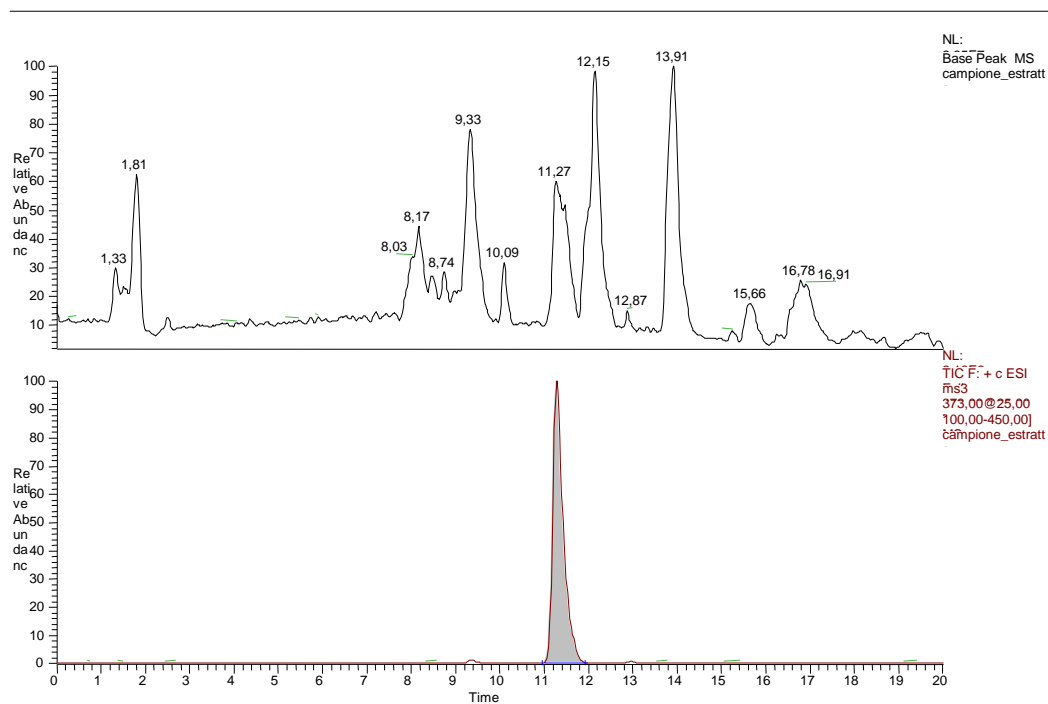
In questo lavoro vengono descritte la separazione e quantificazione per LC-MS<sup>n</sup> di tali diterpeni in preparati vegetali in commercio in confronto con foglie di *Salvia divinorum* di diversa origine.

La metodica HPLC è particolarmente adatta all'analisi diretta di infusi acquosi e idroalcolici di interesse tossicologico-forense e non rende necessari processi di estrazione o di derivatizzazione prima dell'analisi. Sono comunque state valutate differenti metodiche estrattive a partire dalla materia prima vegetale.

Sono state valutate a scopo analitico sia differenti sorgenti di ionizzazione (*electrospray*, *atmospheric pressure chemical ionization* e *atmospheric pressure photoionization*) sia differenti tecniche di scansione di massa (MS/MS, SRM, MS<sup>n</sup>, CRM) sfruttando le potenzialità del rivelatore di massa a trappola ionica.

L'acquisizione dei dati con una sorgente ESI, in modalità MS<sup>3</sup> ha garantito le migliori condizioni di selettività e sensibilità per la determinazione quali-quantitativa della Salvinorina

A, principale principio attivo della pianta, responsabile del potere allucinogeno, la cui presenza è stata valutata in campioni vegetali di differente origine.



Cromatogrammi LC-MS e LC-MS<sup>3</sup> di un estratto idroalcolico di *Salvia divinorum*

### Bibliografia

1. C. Giroud, F. Felber, M. Augsburger, B. Horisberger, L. Rivier, P. Mangin, *Forensic Science International* **112**, 143-150 (2000)
2. D.J. Sheffler and B. L. Roth, *Trends in Pharmacological Sciences* **24**, 107-109 (2003)
3. T.A. Munro and M.A. Rizzacasa, *Journal of Natural Products* **66**, 703-705 (2003)

**Mercoledì 22 Settembre 2004**

**SPETTROSCOPIA ANALITICA  
Seconda Sessione**

**Aula dei Filosofi  
Palazzo Centrale**

**11.50-13.10**



## SPETTROMICROSCOPIE XRF CON SORGENTE DI LUCE DI SINCROTRONE PER L'ANALISI DI PARTICOLATO AERODISPERSO

*Pierluigi Barbieri<sup>1</sup>, Federico Cozzi<sup>1</sup>, Burkhard Kaulich<sup>2</sup>, Italo Pellegrini<sup>3</sup>, Gianpiero Adami<sup>1</sup>,  
Edoardo Reisenhofer<sup>1</sup> e Murielle Salomé<sup>4</sup>*

<sup>1</sup>*Dipartimento di Scienze Chimiche, Università di Trieste, Via Giorgieri 1, 34127 Trieste*

<sup>2</sup>*Sincrotrone Trieste S.C.p.A. Strada Statale 14 - 34012 Basovizza, Trieste*

<sup>3</sup>*A.R.P.A.-F.V.G., Dipartimento di Trieste, Via Lamarmora 13, 34139 Trieste*

<sup>4</sup>*European Synchrotron Radiation Facility, Grenoble (F)*

Le caratteristiche delle linee di microscopia di fluorescenza di raggi X operanti con sorgente di luce di sincrotrone, installate presso i laboratori ESRF di Grenoble (ID21 (1)) ed ELETTRA a Trieste (TwinMic (2)), consentono di ottenere informazioni sulla distribuzione morfologica e dimensionale, nonché sulla composizione degli elementi che emettono fluorescenza X ad energie inferiori a quella incidente sui campioni considerati. Tra le potenzialità dell'approccio analitico vanno citate la possibilità di effettuare analisi senza pretrattamento del campione, ottenendo informazione su campioni spessi, e la possibilità di effettuare una speciazione in modalità XANES (X-ray Absorption Near Edge Structure). La risoluzione spaziale è uguale o inferiore ad un micron. Durante gli esperimenti ME 588 e ME820 condotti a Grenoble sono stati analizzati filtri di captazione di particolato aereodisperso PM10, determinando elementi leggeri con fluorescenza nel range spettrale da 0.2 a 8.0 KeV e consentendo fra l'altro di individuare un contributo specifico di una sorgente industriale al particolato, non evidenziato con altri approcci. Gli approcci in questione vengono confrontati con altre tecniche spettromicroscopiche, quali la microscopia elettronica SEM-EDX e la microscopia IR.

### **Bibliografia**

1. Susini J, Salomé M, Fayard B, et al., The scanning X-ray microprobe at the ESRF "x-ray microscopy" beamline, SURF REV LETT 9 (1): 203-211 FEB 2002.
2. Kaulich B, Bacescu D, Cocco D, et al., Twinmic: A European twin microscope station combining full-field imaging and scanning microscopy, J PHYS IV 104: 103-107 MAR 2003.

# **ANALISI DI ELEMENTI IN TRACCE IN PRODOTTI PETROLCHIMICI, INTERMEDI PER LA DETERGENZA E LA COSMESI MEDIANTE FLUORESCENZA A RAGGI X A RIFLESSIONE TOTALE (TXRF) E CONFRONTO CON ICP-OES**

*A. Cinosi, M. Rustioni e N. Andriollo*

*Sasol Italy S.p.A. – R & D – Via Reali, 4 – 20037 Paderno Dugnano (MI) – ITALY*

## **Abstract**

La ricerca di elementi in tracce in matrici organiche (ad es. paraffine, olefine, alchilbenzeni lineari, alcoli, esteri) è un efficace mezzo per il controllo sia dell'intero processo produttivo che della logistica ad esso correlata (stoccaggio, trasporto). Tramite la TXRF è possibile individuare e quantificare i metalli eventualmente presenti derivanti da tracce di catalizzatore o da elementi (Fe, Ni, Cr, Mn, ecc....) legati a problemi di corrosione e/o inquinamenti accidentali.

L'analisi di alcune impurezze metalliche riveste particolare importanza in quanto questi prodotti possono venire utilizzati come materie prime per la produzione di altri prodotti finiti destinati in settori merceologici di grande consumo come, ad esempio:

- Alimentare
- Cosmetico
- Detergenza
- Lubrificazione
- Industria della carta

che, a loro volta, sono regolati da normative e limiti differenti sia per il loro utilizzo che per il loro impatto ambientale dopo il consumo.

In relazione alle applicazioni alle quali tali prodotti sono destinati, i metodi di analisi devono permettere di quantificare concentrazioni di metalli in concentrazioni molto basse, spesso inferiori alla ppm.

La principale tecnica analitica utilizzata per questo scopo, sulla base delle linee guida ASTM, è la Spettroscopia Atomica sia in Assorbimento (A.A.S.) che in Emissione (I.C.P.-O.E.S.).

Per entrambe queste tecniche, prima dell'analisi strumentale, il campione deve essere sottoposto ad una fase critica di trattamento che, non sempre, permette di raggiungere limiti di sensibilità appropriati.

Scopo del presente lavoro è dimostrare la possibilità dell'utilizzo della TXRF ed i vantaggi offerti nell'analisi dei prodotti sopra citati con particolare riferimento a:

- Limiti di rivelabilità
- Accuratezza e precisione della risposta analitica
- Velocità/potenzialità analitica.

Per poter utilizzare al meglio questa tecnica, è stata messa a punto una nuova procedura di trattamento del campione, che consiste nella progressiva rimozione della fase organica e nell'arricchimento dei metalli direttamente sul portacampione in quarzo. L'accuratezza dei risultati ottenuti è stata poi valutata tramite un test di recupero su un alchilbenzene lineare (LAB) arricchito ad un livello di 0.4 ppm con una serie di elementi (Ti, Cr, Fe, Ni, Cu, Se, Pb) disciolti in matrice oleosa (CONOSTAND®), che cadono in un'ampia finestra spettrale (vedi fig.1).

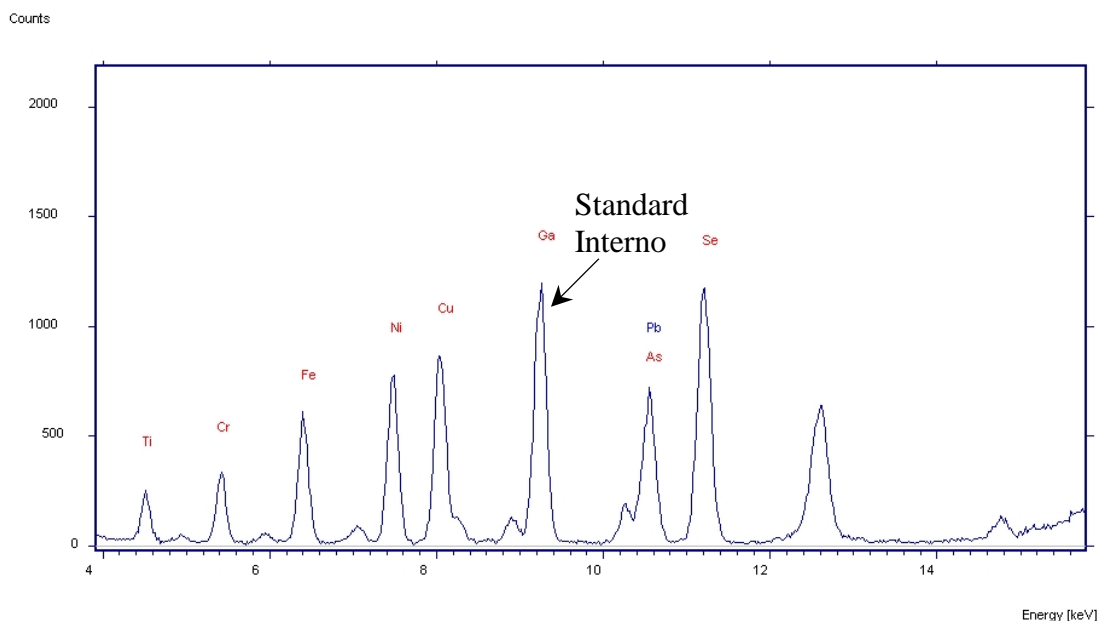


Fig.1. – Spettro di fluorescenza Rx a riflessione totale ottenuto su una matrice contenente 0.4 µg/g di metalli in alchilbenzene lineare (LAS).

### Confronto ICP-OES vs TXRF.

Il trattamento tipico del campione per l'analisi di matrici organiche in ICP-OES prevede il suo incenerimento solforico che, in gran parte dei casi, richiede molte ore di lavoro.

I recuperi in ICP-OES di Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Mo, Ni, Pb, Rh, Sn, Sr, V e Zn, ottenuti sul campione così trattato, sono stati confrontati con quelli ottenuti tramite attacco del campione in situ sul riflettore della TXRF.

I risultati analitici ottenuti con le due tecniche sono pienamente confrontabili e non evidenziano scostamenti sistematici.

I principali vantaggi della TXRF sono:

- Rapidità esecutiva (poche ore in confronto a ore/giorni).
- Minimizzazione della manipolazione del campione.
- Simultanea ed accurata determinazione degli elementi ( $Z > 15$ ) a livello di ppb, impiegando un solo standard di riferimento.
- Ottima risposta analitica sia in termini di accuratezza che di precisione che di limiti di rivelabilità.

## LA SUPERFICIE DEI MINERALI SOLFURI E IL RILASCIO DELL'ARSENICO NELL'AMBIENTE: UNO STUDIO XPS ED ELETTROCHIMICO

*M. Fantauzzi, D. Atzei, B. Elsener, P. Lattanzi e A. Rossi*

*Dip.to di Chimica Inorg. e Analitica, Università di Cagliari, Cittadella Universitaria, 09042  
(Cagliari) – ITALY - INSTM Unità di ricerca di Cagliari*

L'arsenico è considerato tra i più pericolosi contaminanti ambientali. In natura è diffuso sulla crosta terrestre con concentrazioni nei suoli che variano da 0,1 a 1000 mg Kg<sup>-1</sup>. Nel pulviscolo atmosferico la concentrazione è compresa tra 50-400 mg Kg<sup>-1</sup>, mentre nell'acqua di mare il livello medio di arsenico è di 2.6 ppb e nelle acque dolci è di circa 0.4 ppb [1].

Sono di grande attualità i fenomeni di inquinamento da arsenico in acque di falda in diverse regioni del Bangladesh e dell'India e che riguardano molte decine di milioni di persone [2]. La concentrazione massima ammissibile stabilita dal DL 2 Febbraio 2001 n° 31 concernente la qualità delle acque destinate al consumo umano è di 10 µg/L. I valori di arsenico nelle acque in Italia ed in Sardegna sono spesso superiori a questo valore.

La presenza dell'arsenico in un'acqua è legata a processi naturali di cessione degli elementi da parte dei minerali e sono di particolare interesse, rispetto all'inquinamento da arsenico, gli ambienti acidi di miniera. Il grado e le modalità con cui l'arsenico può essere rilasciato dipendono dalla stabilità e dalla reattività delle superfici dei minerali che contengono questo elemento in funzione dei parametri chimico-fisici del sistema considerato. I composti dell'arsenico mostrano tossicità diversa a seconda dello stato chimico: gli arseniti sono molto più tossici degli arseniati. E' quindi necessario mettere a punto un metodo che permetta di distinguere tra As (III) e As (V) sulle superfici dei minerali e che permetta la determinazione delle loro concentrazioni sia nell'acqua sia sulla superficie del minerale. Nell'ambito di uno studio intrapreso sulla reattività dei solfuri contenenti arsenico è stato messo a punto un metodo per l'analisi quantitativa dei film di spessore nanometrico presenti sulle superfici dei minerali esposti all'aria [3] e grazie all'applicazione del diagramma di Wagner o diagramma di stato chimico dell'arsenico si è nelle condizioni di distinguere tra i due stati di ossidazione [4].

Obiettivo di questo lavoro è studiare il rilascio dell'arsenico da parte di un minerale solfuro combinando per la prima volta metodi di analisi di superficie, elettrochimici e analisi di soluzioni.

Il minerale studiato è l'enargite Cu<sub>3</sub>AsS<sub>4</sub>, un solfuro di rame e arsenico piuttosto diffuso in Sardegna, in particolar modo nell'area mineraria di Furtei (Cagliari). Questo minerale è associato con altri minerali solfuri e con l'oro micro-implicato. Per poter studiare la reattività delle superfici di enargite isolando i parametri che ne possono influenzare la dissoluzione il nostro studio è partito da un'enargite estratta da una miniera peruviana perché più pura dell'enargite di Furtei. I campioni di enargite sono stati immersi in una soluzione di acido solforico a pH 4 che simula una pioggia acida e quindi in soluzioni contenenti anche la coppia Fe<sup>2+</sup>/Fe<sup>3+</sup>. Le superfici appena sfaldate di campioni di minerale sono state analizzate con la spettroscopia di fotoelettroni a raggi X (XPS) prima e dopo l'esposizione alle soluzioni.

In precedenza erano state condotte analisi su campioni di enargite sintetica e naturale, per ottenere i parametri necessari per adattare funzioni modello, costituite da una miscela di Gaussiane e Lorenziane, ai segnali sperimentali [5].

Durante l'immersione sono state condotte misure elettrochimiche di potenziale di circuito aperto che non hanno mostrato variazioni in funzione del tempo: 0.00 mV dopo 1 giorno e 0.05 mV dopo 7 giorni. L'immersione dei campioni si è protratta per 24 ore e per 7 giorni. La successiva analisi XPS della superficie del minerale ha consentito di osservare le variazioni di

composizione superficiale determinate dall'esposizione. Sulle soluzioni sono stati determinati rame e arsenico mediante AAS.

L'analisi elementare mostra solo la presenza degli elementi costituenti il minerale e di carbonio e ossigeno di contaminazione. Lo stato di ossidazione formale del rame è +1, quello dell'arsenico è +5 e quello dello zolfo è -2 sia prima sia dopo l'esposizione alla soluzione a pH 4. Non si ha la formazione di un film ma piuttosto l'esposizione del minerale alla soluzione determina un depauperamento di rame ed un aumento del tenore di zolfo (fig.1), con la comparsa di zolfo elementare o polisolfuri, limitatamente agli strati immediatamente più esterni; il tenore di arsenico rimane invece sostanzialmente invariato anche in seguito all'esposizione per 7 giorni.

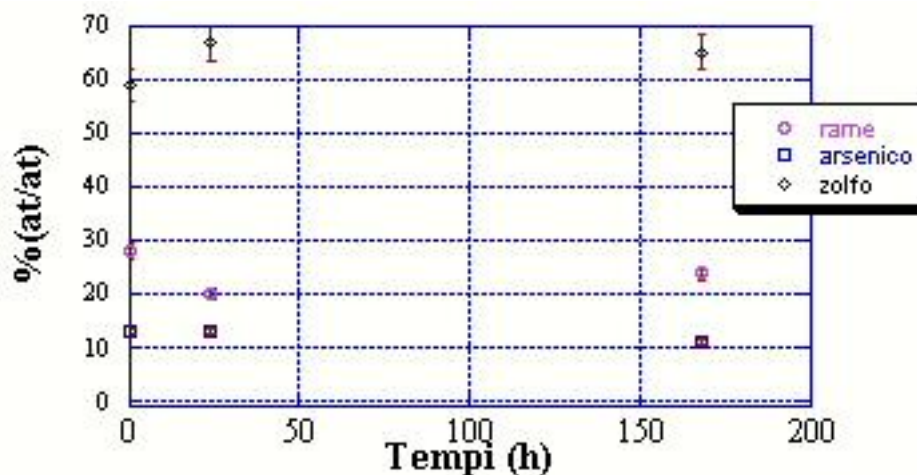


Fig. 1 Variazione della composizione superficiale dell'enargite in funzione del tempo di esposizione ad una soluzione di acido solforico a pH.

Saranno presentati e discussi anche i risultati dell'esposizione della superficie del minerale a soluzioni contenenti la coppia Fe(II)/Fe(III), che simulano l'ambiente ossidante caratteristico delle discariche minerarie.

#### Ringraziamenti

Si ringrazia la Dott.ssa Lilli Cucca della Progemisa per le analisi all'AAS. Questa ricerca e la borsa di studio per il dottorato di ricerca della Dr. Fantauzzi sono stati finanziati dal MIUR (PRIN 2000).

#### Bibliografia

1. Rita Mukhopadhyay, et al., *Microbial arsenic: from geocycles to genes and enzymes*. FEMS Microbiology Reviews, 2002. **26**: p. 311-325.
2. R.T. Nickson, et al., *Mechanism of arsenic release to groundwater, Bangladesh and West Bengal*. Applied Geochemistry, 2000. **15**: p. 403-413.
3. A. Rossi, D. Atzei, S. Da Pelo, F. Frau, P. Lattanzi, K.E.R. England, D.J.Vaughan, *Surface Interface Analysis*, 31, 465 - 470, 2001
4. D. Atzei, S. DaPelo, B. Elsener, M. Fantauzzi, F. Frau, P. F. Lattanzi and A. Rossi, *Annali di Chimica, Journal of Analytical and Environmental Chemistry* 93, 11-19, 2003
5. M. Fantauzzi, D. Atzei, S. DaPelo, B. Elsener, , F. Frau, P. F. Lattanzi and A. Rossi, *Enargite by XPS, Surface Science Spectra*, Vol.9, 2002

## **DETERMINAZIONE SIMULTANEA DI ARSENICO, SELENIO E MERCURIO IN MATRICI ALIMENTARI MEDIANTE HG-ICP-AES**

*Marco Grotti, Cristina Lagomarsino, Francesco Soggia, Emanuele Magi, Roberto Frache*

*Dipartimento di Chimica e Chimica Industriale  
Università di Genova  
Via Dodecaneso 31, 16146 Genova*

Il crescente interesse per un'accurata quantificazione di elementi essenziali o tossici in campioni alimentari ha recentemente stimolato lo sviluppo di nuovi metodi per la loro determinazione.

La maggior parte di questi prevedono un opportuno stadio di preparazione del campione (omogeneizzazione, solubilizzazione totale o parziale, attacchi enzimatici, etc...) e l'impiego di una tecnica analitica strumentale, principalmente la spettrometria di assorbimento atomico con atomizzazione elettrotermica e la spettrometria di massa con sorgente a plasma. Le principali problematiche relative alla determinazione strumentale sono dovute da un lato alle concentrazioni analitiche estremamente basse - sia perché molti elementi sono presenti nel campione a livelli di concentrazione inferiori al  $\mu\text{g/g}$ , sia per la diluizione necessaria per la solubilizzazione del campione - e dall'altro alle forti interferenze chimiche e spettrali derivanti dalla complessità della matrice. Inoltre, nel caso di applicazioni a protocolli di controllo sistematico, un ulteriore requisito consiste nella possibilità di effettuare determinazioni multielementari, precluse, ad esempio, dalle tecniche di assorbimento atomico.

Arsenico, mercurio e selenio sono tra gli elementi di maggiore interesse nel settore alimentare, i primi due a causa dell'elevata tossicità e possibilità di accumulo in terreni ed organismi, il terzo in quanto elemento essenziale, il cui elevato fabbisogno giornaliero (55-75  $\mu\text{g}$ ) ha suggerito l'opportunità di assumerlo con la dieta mediante la preparazione e il consumo di alimenti arricchiti in selenio, quali la patata o il riso.

Nel presente lavoro, è stata sviluppata una procedura per la determinazione di arsenico, mercurio e selenio basata sulla generazione simultanea dei relativi idruri (o dell'elemento in fase vapore, nel caso del mercurio) e sulla successiva rivelazione mediante ICP-AES. Il sistema di generazione di idruri consente infatti la totale separazione degli analiti dalla matrice, con conseguente drastica riduzione delle interferenze, e un'elevata efficienza di introduzione del campione nella sorgente di eccitazione. Data la sensibilità richiesta per l'analisi di campioni reali e la necessità di acquisire i segnali di emissione in modo simultaneo, è stato impiegato uno spettrometro con sorgente a plasma in configurazione assiale, dotato di policromatore a doppia dispersione e rivelatore allo stato solido.

Lo sviluppo della metodica ha previsto: (a) l'ottimizzazione multivariata delle condizioni operative per ottenere la generazione simultanea degli idruri di selenio e arsenico e di vapori di mercurio, (b) lo studio dell'influenza dello stato di ossidazione sull'efficienza di generazione, (c) lo studio della correlazione temporale tra i segnali di emissione e (d) la valutazione delle interferenze dovute alla presenza di elementi di transizione.

Il metodo ottimizzato è stato applicato a materiali di riferimento certificati di riso, muscolo di tonno, spinaci e a campioni di riso naturali e arricchiti in selenio.

**Mercoledì 22 Settembre 2004**

**CHIMICA ANALITICA E ALIMENTI**  
**Seconda sessione**

**Aula Magna**  
**Palazzo Centrale**

**15.30-16.50**

## DETERMINAZIONE SIMULTANEA DI SUDAN I, II, III E IV MEDIANTE HPLC IN MATRICI ALIMENTARI COMPLESSE

*Ceci E., Tantillo G.M.*

*Dipartimento di Sanità e Benessere degli Animali – Sezione di Ispezione degli Alimenti  
Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Bari  
Strada Prov.le per Casamassima km. 3, 70010 – Valenzano – Bari - Italia*

Il colore degli alimenti è una caratteristica sensoriale che contribuisce in modo determinante al gradimento del cibo, pertanto, sovente i coloranti sono additivati agli alimenti per aggiungere o mantenere il colore al fine di migliorare l'attrattiva visiva e soddisfare le aspettative del consumatore. Tuttavia i coloranti non possono essere utilizzati per mascherare delle frodi o nascondere una scarsa qualità. Tutti i coloranti ammessi sono rigorosamente regolamentati dal D.M. n. 209 (4) che garantisce la sicurezza degli alimenti. L'utilizzo del Sudan I e dei suoi congeneri è vietato da circa trent'anni perché sostanza in grado di provocare, per via parenterale, tumori epatici nel topo e che lo IARC ha inserito nella classe 3. A seguito dell'emanazione della Circolare n° 92 del 21 gennaio 2004 (2, 3) della Commissione dell'Unione Europea, riguardante le misure di emergenza da adottare per l'importazione del peperoncino rosso (essiccato, tritato o in polvere) e dei prodotti alimentari che lo contengono, i Paesi U.E. richiedono una certificazione che attesti l'assenza dei coloranti Sudan I, II, III e IV. L'inserimento del Sudan I nella lista delle sostanze vietate è ampiamente giustificato in quanto è impiegata esclusivamente per colorare le spezie e non per assicurare la conservazione degli alimenti. Nel presente lavoro è stato messo a punto un metodo HPLC-DAD utile per una rapida ed affidabile identificazione e quantificazione dei quattro coloranti Sudan in differenti matrici alimentari.

I campioni analizzati sono stati recuperati dal mercato e possono essere suddivisi in tre gruppi:

- a) peperoncino (sia polvere che tritato), patatine speziate e prodotti salati da forno piccanti (taralli, ecc.);
- b) sughi e condimenti al pomodoro contenenti peperoncino e succhi di frutta (arancia rossa);
- c) insaccati e pancetta piccante, formaggi con aggiunta di peperoncino e succedaneo del caviale rosso.

Per ciascuno gruppo di campioni sono state ottimizzate le condizioni di estrazione con acetonitrile e di purificazione dell'estratto su membrane di acetato di cellulosa.

L'analisi cromatografica è stata effettuata mediante cromatografo liquido ad alta efficienza munito di colonna C18 e di detector spettrofotometrico a fotodiodi (5). L'eluizione isocratica è stata effettuata a temperatura ambiente, con flusso di 1.0 ml/min utilizzando acetonitrile come fase mobile. Sui campioni risultati positivi si è proceduto alla conferma della presenza dei coloranti mediante GC-MS (sono risultati gas-cromatografabili solo il Sudan I e II). Per migliorare la sensibilità analitica sono stati considerati i seguenti frammenti per il Sudan I: 248 m/z; 171 m/z; 143 m/z; 115 m/z; 77 m/z; mentre per il Sudan II i frammenti: 276 m/z; 143 m/z; 115 m/z; 105 m/z; 77 m/z. (1).

Per le prove di recupero sono state allestite opportune soluzioni standard di Sudan I, II, III e IV contenenti 25, 50, 100, 200, 400, 500 e 1000 µg/l necessarie per costruire la retta di calibrazione. L'adeguatezza del modello lineare è stata confermata, in tutte le nove matrici alimentari considerate (n=5), dall'analisi della varianza applicata alla regressione che non ha mostrato deviazioni significative dalla linearità (CV < 2.1%).



La percentuale di recupero dei quattro coloranti, con il presente metodo estrattivo, è risultata compresa tra il 96.5 ed il 99.3%. La quantità di Sudan I aggiunta alle differenti matrici alimentari considerate non mostra alcuna interferenza con la percentuale di recupero.

Il limite di rivelabilità, calcolato come la concentrazione corrispondente al triplo del rumore di fondo, è risultato pari a 20 ng/g.

Sulla base dei risultati ottenuti con l'applicazione del metodo HPLC-DAD per la ricerca dei quattro coloranti Sudan (I, II, III e IV) nelle differenti matrici alimentari è possibile asserire che la metodica proposta permette l'analisi quali-quantitativa particolarmente accurata anche per basse concentrazioni. L'applicazione di differenti approcci estrattivi consente, inoltre, di effettuare rapidi screening su molteplici matrici, in quanto la fase di estrazione non supera i 20 min, e non risente della presenza di altre sostanze interferenti. La versatilità, la sensibilità e l'accuratezza del metodo HPLC-DAD proposto è confermata mediante GC-MS con il controllo delle positività riscontrate nei campioni alimentari analizzati.

### **Bibliografia**

1. Amenduni, C., Ferrieri, F., Spinelli, S., Fiume, F., Lattarulo, O. (2004). Proposta di un metodo per la determinazione del colorante artificiale rosso Sudan I nei prodotti alimentari contenenti peperoncino. *Bollettino dei chimici igienisti*, in press.
2. Commission Decision (E.C.) n. 460/2003 of 20 June 2003. On emergency measures regarding hot chilli and hot chilli products. *Off. J. Eur. Union*, L. 2003, 154, 114
3. Commission Decision (E.C.) n. 92/2004 of 21 January 2004. On emergency measures regarding hot chilli and hot chilli products. *Off. J. Eur. Union*, C. 2004, 68.
4. Decreto 27 febbraio 1996 n. 209, "Regolamento concernente la disciplina degli additivi alimentari consentiti nella preparazione e per la conservazione delle sostanze alimentari in attuazione delle direttive n. 94/34/CEE, 94/35/CEE, 94/36/CEE, 95/2/CEE e 95/31/CEE.
5. Tateo, F., & Bononi, M. (2004). Fast determination of Sudan I by HPLC/APCI-MS in hot chili, spices, and oven-baked foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 655-658.

# ESTRAZIONE ACCELERATA CON SOLVENTE DI RESIDUI DI SULFAMIDICI NELLE CARNI E NEGLI OMOGENEIZZATI PER BAMBINI SEGUITA DA ANALISI DI CONFERMA MEDIANTE CROMATOGRAFIA LIQUIDA-SPETTROMETRIA DI MASSA TANDEM

Alessandra Gentili\*, Giuseppe D'Ascenzo, Daniela Perret, Manuel Sergi e Ugo Tentolini

Dipartimento di Chimica, Università "La Sapienza" di Roma, Piazzale Aldo Moro n°5, P.O. Box 34, Posta 62, 00185 Roma, Italia

Nei moderni sistemi di allevamento sono utilizzati diversi farmaci veterinari ad attività antimicrobica a scopo terapeutico e/o profilattico e, a dosi sub terapeutiche, come promotori della crescita soprattutto per animali destinati alla produzione di cibo. L'uso irresponsabile di queste sostanze, come la somministrazione di dosi maggiori del necessario o il mancato rispetto dei corretti tempi di sospensione prima della macellazione, può portare alla presenza di residui indesiderati nei prodotti alimentari. Le ripercussioni sulla salute umana sono correlate sia con la tossicità intrinseca dei farmaci e dei loro metaboliti, sia con la selezione di batteri resistenti che, attraverso la catena alimentare, possono essere trasferiti agli esseri umani.

Le solfonammidi (SA) sono chemioterapici comunemente usati nella pratica veterinaria grazie alla loro economicità ed al loro ampio spettro di azione. Per esplicare la loro azione le short-life SA sono mescolate col cibo diverse volte al giorno, mentre le long-life SA vengono somministrate per via parenterale con maggiore probabilità di lasciare residui significativi nei tessuti animali. La presenza di residui di SA nei cibi è un notevole problema a livello tossicologico, perché alcune SA possono essere cancerogene, causare reazioni allergiche e ridurre l'efficacia terapeutica di questi farmaci sugli esseri umani. La Commissione Europea (Commission Regulation 508/99/EC) e la Food and Drug Administration (FDA) hanno fissato per le SA dei limiti massimi di residuo (MRL) di 100µg/kg nei tessuti animali e nel latte, mentre non è stata ancora stabilita una normativa che definisca misure più stringenti quanto riguarda l'alimentazione per l'infanzia. La UE ha inoltre fissato con la 2002/657 nuovi criteri di qualità per quanto riguarda le metodiche analitiche e l'interpretazione dei dati in campo alimentare, stabilendo ad esempio che la spettrometria di massa è praticamente indispensabile come metodo di conferma.

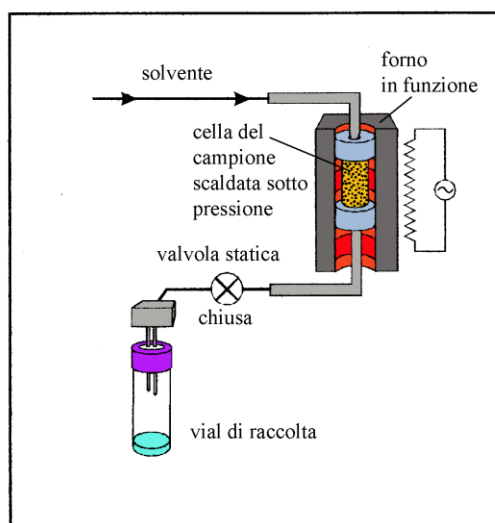
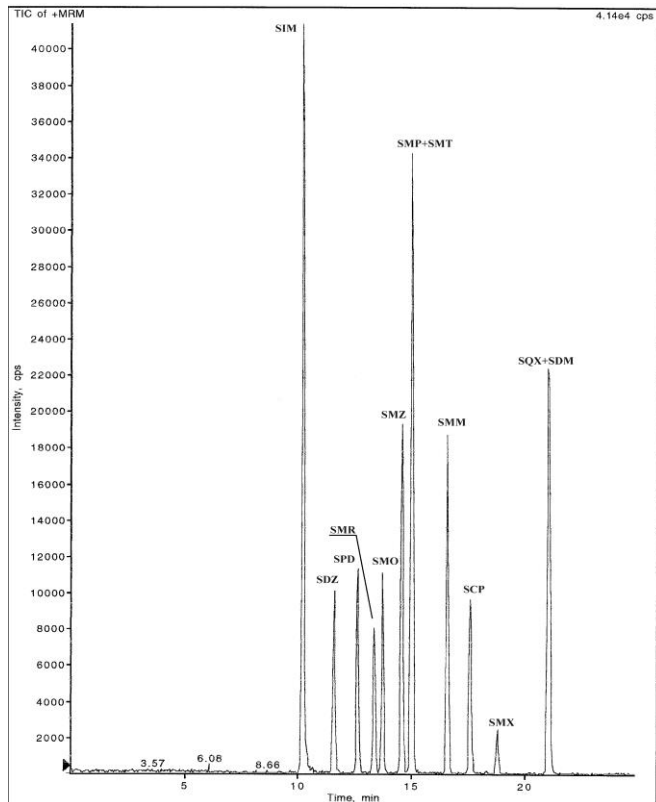


Fig. 1. SCHEMA ESTRAZIONE ASE

Questo lavoro descrive un metodo per l'analisi di 13 SA che comprende una procedura di estrazione estremamente rapida mediante ASE (Accelerated Solvent Extraction) accoppiata ad una conferma inequivocabile attraverso la cromatografia liquida-spettrometria di massa tandem (LC-MS/MS). Dopo aver mescolato 1g di campione con 2g di C18 come supporto solido la miscela veniva impaccata in una cella di estrazione e le SA venivano estratte con acqua a 160°C e 100 bar; 100µL dell'estratto venivano iniettati direttamente nel sistema LC-MS. Gli analiti erano ionizzati in una sorgente electrospray in modalità positiva e identificati attraverso due transizioni MRM (Multi Reaction Monitoring), che garantivano la specificità del metodo.

I recuperi da carne fresca o da omogeneizzati per bambini andavano dal 71 al 101% ad un livello di fortificazione di 100ppb, che corrisponde al MRL fissato sia dalla UE che dalla FDA. La precisione del metodo (interday) era minore di 8.5% ed i limiti di rivelabilità (LOD) erano inferiori a 2.6 ppb. Questo studio ha tenuto conto della soppressione ionica causata dall'effetto matrice comparando la retta di calibrazione in solvente con quella in matrice (matrix matched calibration). Per le 13 SA monitorate sono state individuate 4 positività in alcuni campioni prelevati in diversi negozi di Roma attraverso la metodologia sopra descritta.



**Fig. 2:** cromatogramma delle 13 SA investigate

## ANALISI HPLC E DOSAGGI RAPIDI DI POLIFENOLI IN VARIETÀ EDIBILI DI *BRASSICACEAE*

P. Vignolini, A. Romani<sup>+</sup>, M.G. Dini, P. Pinelli<sup>+</sup>, D. Heimler

Dipartimento di Scienza del Suolo e Nutrizione della Pianta, Università degli Studi di Firenze, P.le delle Cascine 18, 50144 Firenze, Italy

<sup>+</sup>Dipartimento di Scienze Farmaceutiche, Università degli Studi di Firenze via U. Schiff 6, 50019 Sesto Fiorentino, Italy

Il cavolo (dal lat. tardo *caulus*, dal gr. *kaulós*) è una pianta erbacea della famiglia delle Crucifere o Brassicaceae, nota per le numerose specie orticole che ne sono derivate. I cavoli sono noti per possedere elevate quantità di sali minerali e vitamine. Scopo di questo lavoro è stata l'indagine su diverse cultivar di Brassicaceae di composti di natura polifenolica, in particolare di flavonoli, solo parzialmente indagati in alcune di queste varietà (1,2). Il potere antiossidante è stato inoltre recentemente valutato per questa specie (3) e correlato alla capacità di prevenire il cancro. Un ulteriore aspetto da considerare è il forte interesse nella valorizzazione di specie tipiche locali che, avendo caratteristiche di maggiore spontaneità, possono presentare proprietà interessanti per incrementare il loro utilizzo come cibo funzionale.

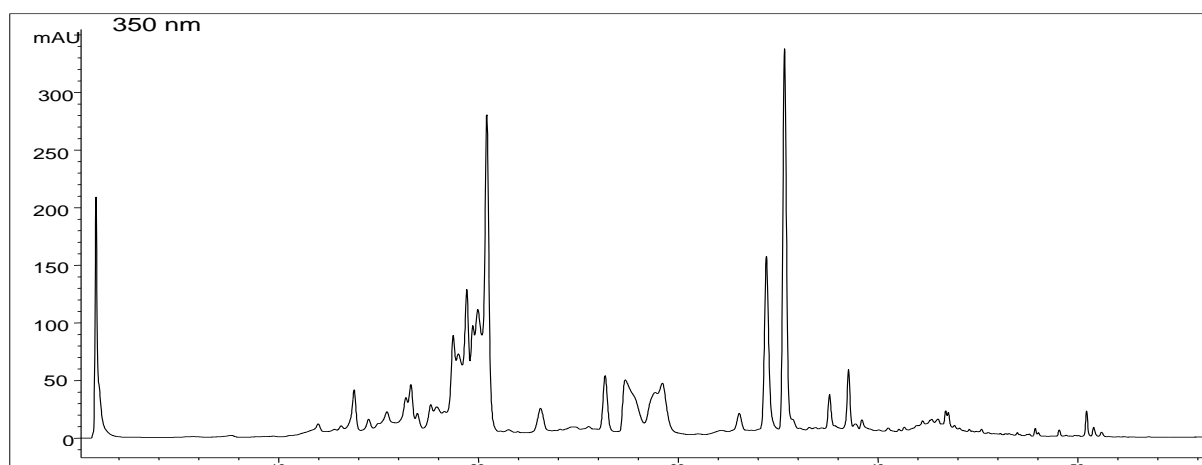
L'utilizzazione di metodi analitici HPLC/DAD e HPLC/MS ha permesso la caratterizzazione e la valutazione del contenuto dei derivati polifenolici in: cime di rapa (*Brassica rapa* L. subsp. *sylvestris* Janch, var. *esculenta* Hort.), cavolo cappuccio (*Brassica oleracea* L. var. *capitata* L.), cavolo broccolo (*Brassica oleracea* L. conv. *botrytis* L. var. *italica* Plenck), cavolo nero (*Brassica oleracea* L. var. *acephala* D C.) cavolo verza (*Brassica oleracea* L. var. *sabauda* L.), cavolfiore verde (*Brassica oleracea* L. conv. *botrytis* L. var. *botrytis* cv Verde di Macerata), cavolfiore bianco (*Brassica oleracea* L. conv. *botrytis* L. var. *botrytis* cv Snow ball) e cavolini di Bruxelles (*Brassica oleracea* L. var. *gemmifera* Zencher), considerato che in letteratura si ritrovano informazioni soltanto relativamente ai broccoli, al cavolo cinese e al cavolo nero, varietà tipica toscana (2).

La caratterizzazione dei componenti polifenolici dei campioni di cavolo è stata ottenuta impiegando tempi di ritenzione, spettri UV-Vis e spettri di massa, acquisibili sia in ionizzazione positiva che negativa, confrontandoli con quelli di standard e/o prodotti isolati. In **figura 1** è riportato a titolo di esempio il profilo cromatografico acquisito a 350 nm di un estratto di cime di rapa. Nell'estratto sono stati individuati derivati mono, di, tri e tetraglicosidici del kaempferolo, della quercetina e dell'isoramnetina come anche riportato in precedenti lavori (6,7). Sono stati inoltre individuati derivati acil-glicosidici degli stessi agliconi, in particolare sinapoil, feruloil, caffeoil e cumaroil glicosidi.

Ulteriore scopo di questo lavoro è stata la valutazione del potere antiossidante e la verifica del possibile impiego di test rapidi (dosaggio dei polifenoli con il reattivo di Folin-Ciocalteu, dosaggio dei flavonoidi mediante test con AlCl<sub>3</sub>) per caratterizzare le diverse varietà. La determinazione del potere antiossidante ed i test rapidi sono stati effettuati su estratti ottenuti trattando 1,5 g di materiale fresco con 20 mL di soluzione idroalcolica .

Il potere antiossidante è stato determinato come attività anti-scavenging nei confronti di radicali liberi con il test del DPPH• (radicale 1,1,-difetil-2-picrilidrazile); la capacità antiossidante è stata misurata secondo la procedura di Sanchez-Moreno et al. (4) ed è stata espressa come EC<sub>50</sub> (dose di antiossidante necessaria per causare il 50% di inibizione). Il contenuto totale di composti fenolici è stato determinato usando il metodo di Folin-Ciocalteu lievemente modificato, e il contenuto in flavonoidi mediante il test con AlCl<sub>3</sub> (5); ambedue questi metodi prevedono una lettura spettrofotometrica. In **tabella 1** sono riportati i risultati dei test effettuati. Confrontando i valori di alcuni standard come quercetina (EC<sub>50</sub> = 0,20),

quercitrina ( $EC_{50} = 0,49$ ), kaemferolo ( $EC_{50} = 0,44$ ), acido ascorbico ( $EC_{50} = 0,21$ ), si può vedere come alcuni dei campioni analizzati mostrano valori di  $EC_{50}$  dello stesso ordine di grandezza di composti naturali con forti proprietà antiossidanti.



**Figura 1** Cromatogramma acquisito a 350 nm di un estratto idroalcolico di cime di rapa.

**Tabella 1.**

<b>VARIETA'</b>	<b>EC<sub>50</sub></b>	<b>Polifenoli totali</b>	<b>Flavonoidi totali</b>	<b>EC<sub>50</sub> è espresso in mg di cavolo (peso secco)/mg DPPH I polifenoli totali sono espressi come mg acido gallico/ g cavolo (peso secco) I flavonoidi totali sono espressi come mg (+)-catechina /g cavolo (peso secco)</b>
<b>Cavolo cappuccio</b>	3,48	11,6	1,98	
<b>Cime di rapa</b>	0,54	27,19	9,87	
<b>Broccoli</b>	0,71	22,78	6,72	
<b>Cavolo nero</b>	0,82	20,96	5,09	
<b>Verza</b>	3,24	8,89	1,35	
<b>Cavolfiore giallo</b>	3,1	11,76	2,52	
<b>Cavolini di Bruxelles</b>	3,51	16,28	3,07	
<b>Cavolfiore bianco</b>	8,82	13,3	2,11	

### **Bibliografia**

- 1) K.R. Price, F. Casuscelli, I.J. Colquhoun, M.J.C. Rhodes, 1998. J. Sci. Food Agric., 1998, 77, 468- 472
- 2) A.Romani, P.Pinelli, C.Galardi, G.Corti, A.Agnelli, F.F.Vincieri, D.Heimler. It. J. Food Sci. 2003, 15, 197-205
- 3) Y.H. Chu, C.L. Chang, H.F. Hsu. J. Sci. Food Agric., 2000, 80, 561-566
- 4) C. Sanchez-Moreno, J.A. Larrauri, F. Saura-Calixto. J. Sci. Food Agric., 1998, 76, 270-276
- 5) V. Dewanto, X. Wu, K.K. Adom, R.H. Liu. J. Agric. Food Chem., 2002, 50, 3010-3014
- 6) J.K. Nielsen, C.E. Olsen and M.K. Petersen, Phytochemistry, 1993, 34(2),539-544
- 7) J.K. Nielsen, R.Norbaek and C.E. Olsen, Phytochemistry, 1998, 49(7), 2171-217

# DETERMINAZIONE DELLA COMPONENTE POLIFENOLICA NELLE ACQUE DI VEGETAZIONE DI FRANTOIO E DI PESTICIDI TRIAZINICI IN CAMPIONI ALIMENTARI VEGETALI, PER MEZZO DI UN BIOSENSORE A TIROSINASI

*L. Campanella, E. Martini, N. Todini, M. Tomassetti*

*Dipartimento di Chimica, Università di Roma "La Sapienza", P.le Aldo Moro 5, 00185 Roma Italia*

I biosensori sono dispositivi molto versatili ed adatti alla risoluzione di problemi di vario tipo, che si presentano in numero sempre crescente nei diversi campi della chimica, particolarmente in quello alimentare ed in quello ambientale. Negli ultimi anni è andato sempre più sviluppandosi un nuovo settore della biosensoristica, quello degli OPEEs (Organic Phase Enzyme Electrodes), cioè dei biosensori in grado di funzionare anche in solventi organici. Uno dei biosensori enzimatici dimostratisi particolarmente versatile, è quello a tirosinasi, di cui è stata da noi sviluppata sia una versione operante in soluzioni acquose, sia una adatta ai solventi organici (OPEE) [1,2]. Questo biosensore, costituito da un trasduttore amperometrico a diffusione gassosa per l'ossigeno, accoppiato con l'enzima tirosinasi, si è già rivelato particolarmente utile per applicazioni nel settore alimentare e, recentemente, anche per analisi in campo ambientale; in particolare, in questo lavoro, esso è stato utilizzato sia per la determinazione della componente polifenolica presente in matrici ambientali, derivanti da processi produttivi industriali del settore alimentare, quali le acque di vegetazione di frantoio, sia per la determinazione di pesticidi triazinici, in prodotti vegetali, sfruttando il loro potere di inibizione nei riguardi dell'enzima tirosinasi. Le acque di vegetazione sono spesso smaltite nei terreni agricoli risultando in tal modo responsabili dell'inibizione di molti microrganismi e della diminuzione della germinazione. In alcune ricerche preliminari è stata già prospettata la possibilità di impiegare un biosensore a tirosinasi operante in solvente organico [3], ma la validità di questo approccio al problema risulta ancora molto incerta. Nel presente lavoro è stato quindi verificato sperimentalmente il reale comportamento di biosensori a tirosinasi operanti sia in solvente acquoso, sia in fase organica, che in miscele acqua/acetone a diversi rapporti in volume, per la determinazione dei polifenoli nelle acque di vegetazione. È stata quindi condotta, una ricerca sistematica, a questo proposito e valutata la reale validità del metodo biosensoristico, a questo riguardo, confrontando anche, i risultati ottenuti, con quelli trovati per mezzo del noto metodo spettrofotometrico di Folin-Ciocalteu. La seconda applicazione è derivata da recenti ricerche, condotte nel nostro laboratorio [4,5], che hanno dimostrato la validità dell'approccio biosensoristico, condotto per mezzo di OPEEs ad inibizione enzimatica, nel caso di determinazione integrale di pesticidi organofosforici e carbammici, scarsamente solubili in soluzioni acquose. Poiché alcuni pesticidi triazinici, quali l'atrazina, sono anch'essi molto solubili in solventi organici, quali etere, metanolo, cloroformio, piuttosto che in acqua, nella presente ricerca si è voluta verificare la possibilità di effettuare l'analisi di questa classe di pesticidi, utilizzando un OPEE a tirosinasi, operante in fase cloroformica, anziché acquosa. I risultati ottenuti hanno dimostrato la validità del metodo, per determinare, ad esempio, il contenuto totale di pesticidi triazinici in campioni vegetali alimentari, quali olive e limoni, metodo che è stato anche ottimizzato, attraverso il confronto fra due possibili diversi procedimenti operativi.

## Riferimenti

- [1] L. Campanella, M. P. Sammartino, M. Tomassetti. *Sensors and Actuators B*, 7 (1992), 383-388.
- [2] L. Campanella, G. Favero, M. P. Sammartino, M. Tomassetti. *Talanta* 41 (1994), 1015-1023.
- [3] L. Campanella, G. Favero, L. Persi, M. P. Sammartino, M. Tomassetti. *Sensors and Microsystems*, Proceeding del Congresso AISEM 2001, Pisa 5-7 Febbraio, 40-49.
- [4] L. Campanella, S. De Luca, M. P. Sammartino, M. Tomassetti. *Analytica Chimica Acta* 385 (1999), 59-71.
- [5] L. Campanella, L. Persi, M. P. Sammartino, M. Tomassetti, S. Zanella. *Annali di Chimica* 90 (2000), 35-49.

**Mercoledì 22 Settembre 2004**

**CHIMICA ANALITICA E AMBIENTE**  
**Prima sessione**

**Aula dei Filosofi**  
**Palazzo Centrale**

**15.30-16.50**

## DETERMINAZIONI DI ULTRA TRACCE DI Ir E Pt IN CAMPIONI DI GHIACCIO POLARE MEDIANTE ICP-SFMS ACCOPPIATO AD UN SISTEMA DI DESOLVATAZIONE

Giulio Cozzi<sup>a</sup>, Paolo Gabrielli<sup>a,b</sup>, Anita Varga<sup>a</sup>, Carlo Barbante<sup>a,c</sup>, Claude Boutron<sup>b</sup>, Vania Gaspari<sup>a</sup>, Frédéric Planchon<sup>a</sup>, Warren Cairns<sup>c</sup>, Sungmin Hong<sup>d</sup>, Christophe Ferrari<sup>b</sup>, Gabriele Capodaglio<sup>b,c</sup>, Paolo Cescon<sup>b,c</sup>

<sup>a</sup> Dipartimento di Scienze Ambientali, Università di Venezia, Ca' Foscari, 30123 Venezia

<sup>b</sup> Laboratoire de Glaciologie et Géophysique de l'Environnement du CNR, 54, rue Molière, B.P. 96, 38402 St Martin d'Heres cedex, France

<sup>c</sup> Istituto per la Dinamica dei Processi Ambientali-CNR, Università di Venezia, Ca' Foscari, 30123 Venezia

<sup>d</sup> Korea Polar Research Institute, Korea Ocean Research & Development Institute, Ansan, PO Box 29, Seoul 425-600, Korea

Nel corso della ricerca è stata messa a punto una nuova metodologia analitica per la misura di Ir e Pt in campioni di ghiaccio polare ad un livello di concentrazione inferiore al femtogrammo per grammo ( $1 \text{ fg g}^{-1} = 1 \text{ ppq} = 10^{-15} \text{ g g}^{-1}$ ). La tecnica è basata sulla spettrometria di massa a settore magnetico con sistema di ionizzazione al plasma accoppiato induttivamente (ICP-SFMS) e sfrutta allo stesso tempo l'impiego di un micro nebulizzatore concentrico ed un sistema di desolvatazione. Durante la fase di preparazione dei campioni sono state adottate procedure ultrapulite in modo da evitare eventuali problemi di contaminazione; è risultata necessaria anche una fase di preconcentrazione per evaporazione ad una temperatura inferiore a quella di ebollizione. La procedura permette di misurare concentrazioni di Ir e Pt fino a 0.02 ppq e 0.08 ppq rispettivamente. La riproducibilità della procedura analitica a livello di 1 ppq è di circa il 50% per l'Ir e del 30% per il Pt mentre misure di singole aggiunte preconcentrate hanno permesso di ottenere un recupero del 75% ed del 93% dell'Ir e del Pt iniziale. Le interferenze spettrali che interessano Ir e Pt sono state ridotte mediante un sistema di desolvatazione e la frazione interferente residua è stata quantificata e sottratta. Questo nuovo metodo ci ha permesso di analizzare Ir e Pt nel ghiaccio incontaminato dell'Antartide e della Groenlandia. Gli intervalli di concentrazione variano tra 0.1 e 5 ppq per l'Ir e tra 0.2 e 7 ppq per il Pt. Queste concentrazioni rappresentano le prime misure di Ir in ghiaccio non filtrato e le più basse concentrazioni di Pt mai misurate in campioni naturali.



## CARATTERIZZAZIONE DELLA MOBILITÀ DI METALLI IN SUOLI CONTAMINATI MEDIANTE ESTRAZIONE SEQUENZIALE

*M. Malandrino<sup>1</sup>, O. Abollino<sup>1</sup>, A. Giacomino<sup>1</sup>, E. Mentasti<sup>1</sup>, M. Aceto<sup>2</sup>, R. Barberis<sup>3</sup>*

*1, Dipartimento di Chimica Analitica, Università di Torino*

*2, Dipart. Scienze e Tecnol. Av., Università Piemonte Orientale, Alessandria*

*3, Arpa Piemonte, Area Ricerca e Studi, Torino*

L'impatto ambientale dell'inquinamento da metalli nel suolo dipende non solo dalla loro concentrazione totale, ma anche dalla loro mobilità e disponibilità, che influenzano il loro rilascio e la loro interazione con altre componenti dell'ecosistema, come acqua, aria e vegetali.

Per valutare la mobilità dei metalli nei suoli si possono utilizzare procedure di estrazione singola e sequenziale. In particolare, nelle estrazioni sequenziali il suolo viene messo in contatto con una serie di estraenti di reattività crescente, che provocano il rilascio di frazioni di metallo con diversa labilità e quindi diversa mobilità. Le frazioni estratte con i reagenti più blandi sono quelle più mobili e quindi più pericolose dal punto di vista ambientale, perché rappresentano la porzione di metallo più facilmente rilasciata dal suolo in altri comparti ambientali, ad esempio nelle acque superficiali e sotterranee.

In questo studio abbiamo preso in esame un suolo contaminato prelevato in Piemonte da un sito inquinato da scarti di attività industriali.

E' stata studiata la distribuzione orizzontale e verticale di 13 metalli (Al, Cr, Cu, Fe, La, Mn, Ni, Pb, Sc, Ti, V, Y, Zn). La concentrazione totale degli analiti è stata determinata mediante spettrometria di emissione atomica a plasma ad accoppiamento induttivo (ICP-AES) dopo attacco del suolo con una miscela di acqua regia e acido fluoridrico in un mineralizzatore a microonde. I risultati ottenuti sono stati confrontati con le concentrazioni limite previste nella legislazione italiana sulle bonifiche dei siti contaminati (DM 471/99) e con gli intervalli tipici per il contenuto di metalli nel suolo. Si è riscontrato che il sito in esame è inquinato fortemente da rame, piombo e zinco ed in misura minore da cromo, manganese e nichel.

Successivamente abbiamo applicato il protocollo di Tessier, che permette di ripartire il contenuto totale di metalli in cinque frazioni, definite operativamente come scambiabile, legata a carbonati, legata a ossidi di ferro e manganese, associata alla materia organica e residua. I reagenti utilizzati per le cinque estrazioni sono rispettivamente: cloruro di magnesio, acetato di sodio a pH 5, cloruro di idrossilammonio, miscela di acido nitrico e acqua ossigenata, miscela di acqua regia e acido fluoridrico. L'obiettivo dello studio non è tanto di identificare l'associazione del metallo a specifiche fasi del suolo, quanto di valutare la possibilità di rilascio di metalli in seguito a variazioni nelle caratteristiche del suolo, ad esempio il pH od il potenziale redox, e di prevedere l'efficacia dell'applicazione di tecniche di bonifica per la rimozione dei metalli stessi.

Nelle prime due frazioni sono state trovate quantità rilevabili (fino all'11 % nella prima ed al 42 % nella seconda) di Cu, Pb e Zn. Questo risultato è indice dell'origine prevalentemente antropica di questi metalli, che nei suoli non contaminati sono in genere presenti a livelli molto bassi nelle prime due frazioni, tanto che le percentuali di elementi scambiabili sono spesso inferiori ai limiti di rivelabilità dell'ICP-AES. Rame, piombo e zinco sono presenti in percentuali rilevanti (fino al 60 %) nella terza frazione e più basse (fino al 24 %) nella quarta. La porzione residua dei tre metalli, cioè quella fortemente legata alla matrice minerale del suolo, è in molti casi inferiore al 60 %. Anche questo dato è indice dell'origine prevalentemente non geologica dei metalli in esame.

Per quanto riguarda gli altri analiti presi in considerazione, alluminio e titanio sono presenti in percentuali superiori all'80 % nella frazione residua, mentre un'aliquota significativa di ferro

è contenuta nella terza frazione, presumibilmente sotto forma di ossidi cristallini e amorfi. Per questi metalli si può ipotizzare una origine prevalentemente geologica, anche se non si può escludere un apporto antropico, soprattutto per elementi ampiamente utilizzati come ferro e alluminio. Il manganese è contenuto in misura rilevante nella terza frazione, come prevedibile, ma è presente anche nelle altre quattro frazioni. Nella maggior parte dei campioni il cromo è estratto in percentuali molto basse dai primi quattro reagenti del protocollo di Tessier: questo comportamento può essere dovuto all'inerzia chimica di questo metallo, per cui anche la porzione di origine antropica è difficilmente rilasciata dal suolo. Le concentrazioni di nichel, lantanio, scandio, vanadio e ittrio sono spesso inferiori ai limiti di rivelabilità nella prima e (per Ni, Sc e V) quarta frazione, e sono essenzialmente ripartiti tra la terza frazione e la componente residua. Per questi elementi si può ipotizzare un parziale apporto antropogenico, legato alle attività industriali che hanno causato l'inquinamento del sito.

I risultati dell'estrazione sequenziale sono stati elaborati con due tecniche statistiche: i) l'analisi delle componenti principali (PCA), che consente una rappresentazione grafica dei dati analitici in uno spazio a due-tre dimensioni, e nel contempo evidenzia similitudini e differenze tra i campioni e correlazioni tra le variabili, costituite dagli analiti; ii) il clustering gerarchico agglomerativo (HCA), che permette una classificazione dei campioni a seconda delle loro analogie e differenze.

Dallo studio condotto è emerso che esiste la possibilità di rilascio di metalli dal suolo verso altri comparti ambientali, in particolare in seguito a variazioni di pH o potenziale redox. Si può inoltre ipotizzare che tecniche di bonifica basate sull'estrazione con leganti organici o con reagenti analoghi a quelli utilizzati nella terza frazione possano risultare efficaci per la rimozione degli inquinanti metallici dal suolo in esame.

### **Bibliografia**

- 1) O. Abollino, M. Aceto, M. Malandrino, E. Mentasti, C. Sarzanini, R. Barberis, "Distribution and mobility of metals in contaminated sites. Chemometric investigation of pollutant profiles", *Environ. Pollut.* **119** (2002) 177-193.
- 2) A. Tessier, P.G.C. Campbell, M. Bisson, 1979, "Sequential extraction procedure for the speciation of particulate trace metals", *Anal. Chem.* **51** (1979) 844-851.
- 3) A. Sahuquillo, A. Rigol, G. Rauret, "Overview of the use of leaching/extraction tests for risk assessment of trace metals in contaminated soils and sediments", *Trend Anal. Chem.* **22** (2003) 152-159.

**MESSA A PUNTO DI UNA METODOLOGIA ANALITICA  
PER STUDIARE LA DISTRIBUZIONE DELLA SOSTANZA ORGANICA  
IN MATRICI SOLIDE (SUOLI E SEDIMENTI)**

*N. Calace, D. Pacioni, S. Persia, B.M. Petronio, M. Pietroletti*

*Dipartimento di Chimica, Università "La Sapienza", P.le A. Moro 5, 00185 Roma*

La conoscenza delle diverse forme chimiche in cui è distribuita la sostanza organica presente nei sedimenti e nei suoli riveste un ruolo fondamentale sia per individuarne l'origine che per studiare i processi di trasformazione a cui essa è soggetta.

A tal fine è stata messa a punto una metodologia analitica in grado di "speciare" il materiale organico, anche nel caso di matrici caratterizzate da un basso contenuto di sostanza organica, che a partire dalle forme più labili arriva alla determinazione della frazione altamente refrattaria. In particolare, per tale frazione la procedura sviluppata consente di ottenere un buon grado di demineralizzazione e di ridurre notevolmente i tempi di analisi, rispetto ai metodi riportati in letteratura (si passa da 24 ore a 40 minuti per ogni attacco acido). Tale risultato si è ottenuto impiegando il forno a microonde, in cui la reazione di dissoluzione della matrice minerale sfrutta l'azione contemporanea di temperatura e pressione. In questo caso è stato necessario individuare la tipologia del programma di attacco ed il numero di trattamenti e verificare, attraverso un insieme di tecniche strumentali, che il trattamento non modificasse in alcun modo la natura del materiale in esame. Va sottolineato che la frazione di carbonio organico altamente refrattaria (umina) fino ad ora è stata presa in scarsa considerazione, data la difficoltà presentata in fase di purificazione, che prevede l'allontanamento di un'elevata quantità di sostanza inorganica, in prevalenza silice, mentre la sua individuazione è indispensabile tutte le volte in cui si voglia effettuare un bilancio di carbonio.

La metodologia proposta, basata su trattamenti in sequenza, consente di individuare sei diverse classi, che, dal punto di vista ambientale, sono altamente significative: sostanza organica idrofobica labile, sostanza organica idrofilica labile, acidi fulvici, acidi umici, umina idrolizzabile ed umina refrattaria. Per alcuni step di estrazione si sono utilizzate procedure riportate in letterature e già largamente impiegate (estrazione degli acidi fulvici, degli acidi umici e recupero della sostanza organica idrofilica durante l'estrazione degli acidi fulvici ed umici) mentre per gli altri step è stato necessario mettere a punto la metodologia da adottare.

La validità dello schema di frazionamento messo a punto è stata dimostrata dai risultati ottenuti sia su sedimenti che su suoli. In particolare, la sequenza è stata applicata a diverse tipologie di campioni quali: un sedimento marino antartico di origine recente (0-2 cm), un sedimento marino antartico di origine intermedia (4,4-7 cm), un sedimento marino antartico di origine antica (23,5-27,5 cm) in cui il contenuto di carbonio organico totale oscilla tra 9 e 4 mg/g ed un suolo agricolo, il cui contenuto di carbonio organico totale era di 49 mg/g.

Il contenuto di carbonio organico totale è risultato in ottimo accordo con la somma del contenuto di carbonio organico nelle varie frazioni estratte ed il recupero è stato superiore al 90% per ogni campione analizzato, come si può vedere dai dati riportati nella Tabella 1.

L'analisi dei risultati ottenuti con la metodologia messa a punto nel caso di sedimenti a diverso stadio evolutivo e del suolo ci permette di asserire che lo studio della distribuzione del carbonio in classi aventi caratteristiche diverse e significative da un punto di vista ambientale, fornisce utili informazioni per quanto si riferisce ai meccanismi di trasformazione ai quali è soggetta la sostanza organica e quindi ne mette in risalto le importanti potenzialità.

Tabella 1. Distribuzione del carbonio organico in sedimenti antartici di origine recente (1), di origine intermedia (2) e di origine antica (3) e di un suolo (4).

	C organico totale (mg/g)	C idrofobico (mg/g)	C idrofilico (mg/g)	C umico (mg/g)	C fulvico (mg/g)	C umina idrolizzabile (mg/g)	C umina refrattaria (mg/g)	Perdita (%)
1	8,9±0,25 (3)	0,2±0,008 (5)	0,16±0,011 (7)	1,5±0,09 (6)	0,4±0,04 (10)	5,54±0,18 (3)	0,85±0,09 (10)	3
2	5,4±0,42 (8)	0,08±0,005 (6)	0,11±0,01 (8)	0,75±0,06 (8)	0,2±0,03 (15)	3,08±0,14 (4)	0,71±0,09 (13)	9
3	3,6±0,36 (10)	0,07±0,004 (6)	0,11±0,01 (7)	0,45±0,03 (7)	0,19±0,03 (16)	1,36±0,09 (7)	1,24±0,16 (13)	9
4	49±0,16 (0,3)	0,26±0,011 (4)	0,42±0,01 (3)	8,56±0,1 (2)	6,73±0,11 (2)	18,8±0,24 (1)	12,3±0,34 (3)	4

(In parentesi sono riportate le deviazioni standard relative)

## STUDI DI ADSORBIMENTO DI MICROINQUINANTI ORGANICI SU CAOLINITE E Na-MONTMORILLONITE

S. Polati, V. Gianotti, S. Angioi, M. Roz, F. Gosetti, M.C. Gennaro

Università del Piemonte Orientale "Amedeo Avogadro"  
Dipartimento di Scienze dell'Ambiente e della Vita  
Spalto Marengo 33 - 15100 Alessandria

Studi recenti hanno messo in evidenza l'importante ruolo della frazione argillosa del suolo nel trattenimento di sostanze xenobiotiche. Il fenomeno è dovuto all'elevata area superficiale che caratterizza i minerali argillosi, alle possibili interazioni delle specie in esame con la densità di carica superficiale dell'argilla e a fenomeni di intercalazione.

La tendenza del suolo a trattenere specie organiche, e in particolare specie inquinanti, influisce notevolmente sulla mobilità e diffusione degli inquinanti nel suolo, sulla loro biodisponibilità e sull'effetto del dilavamento. Per raccogliere informazioni sulle possibili interazioni suolo-inquinante, sono stati condotti esperimenti di trattenimento su due minerali argillosi, rispettivamente caolinite (KGa-1) e montmorillonite sodica (SWy-1), degli inquinanti più diffusi caratterizzati da diverse strutture e proprietà, quali cloroaniline, anilina, clorofenoli, pesticidi triazinici e fenilureici.

Si è messo in evidenza che vengono più facilmente trattenute le cloroaniline ossia le specie più lipofile tra quelle studiate. Rilevante e recente è l'interesse per questa classe di composti, a causa della loro riconosciuta cancerogenità associata a una elevatissima diffusione nell'ambiente (molteplici congeneri provengono da fonti industriali o sono originati dalla degradazione di pesticidi fenilureici largamente utilizzati in agricoltura).

Il trattenimento di mono-, di- e triclوروaniline su caolinite e montmorillonite è stato studiato in modo sistematico in funzione della concentrazione e del tempo di contatto, attraverso la determinazione HPLC della frazione non trattenuta.

Sono state valutate le cinetiche di adsorbimento e i coefficienti di adsorbimento  $K_D$ , che correlano la quantità di inquinante trattenuto con la concentrazione iniziale disponibile.

Lo studio della dipendenza dalla concentrazione ha permesso di proporre e discutere modelli di trattenimento secondo le isoterme di Langmuir e di Freundlich.

Per gli inquinanti con caratteristiche di maggiore polarità, gli studi di trattenimento hanno anche considerato la dipendenza dal pH e dalla densità di carica superficiale di caolinite e montmorillonite, valutata per via potenziometrica.

I risultati ottenuti per gli inquinanti finora studiati indicano un generale maggiore trattenimento delle specie più lipofile, per le quali si può ipotizzare accanto ad un trattenimento superficiale anche un fenomeno di intercalazione. Questa ipotesi è confermata da studi diffrattometrici che per i sistemi Na-montmorillonite/cloroaniline mostrano un evidente effetto di intercalazione, cui contribuisce in modo significativo l'inquinante.

### Riferimenti

- Schroth B.K. and Sposito G. "Surface charge properties of kaolinite", *Clays and Clay Minerals*, 45, 85-91 (1997).
- S. Polati, V. Gianotti, S. Angioi, M.C. Gennaro, "Studio dell'interazione suolo-microinquinanti organici recalcitranti", Convegno Società Italiana di Chimica Agraria (Ancona, Settembre 2003)
- S. Angioi, S. Polati, M. Roz, C. Rinaudo, V. Gianotti, M.C. Gennaro, "Sorption studies of chloroanilines on kaolinite and Na-montmorillonite", *Environmental Pollution* inviato (febbraio 2004)

**Mercoledì 22 Settembre 2004**

**CHIMICA ANALITICA E ALIMENTI  
Terza sessione**

**Aula Magna  
Palazzo Centrale**

**17.10-18.30**

## STUDIO DELLE PROPRIETÀ ANTIOSSIDANTI DI CULTIVAR DI MELE OTTENUTE CON DIVERSE METODOLOGIE PRODUTTIVE E AVENTI DIFFERENTE PROVENIENZA GEOGRAFICA

*L. Lamperi\**, *L. Checchini\**, *L. Lepri\**, *E. Giordani\*\** e *M. Del Bubba\**

*Università degli Studi di Firenze*

*\* Dipartimento di Chimica, Via della Lastruccia n.3*

*50019 Sesto Fiorentino (FIRENZE)*

*\*\* Dipartimento di Ortoflorofrutticoltura, Viale delle Idee n.30*

*50019 Sesto Fiorentino (FIRENZE)*

Nella presente ricerca, sviluppata in collaborazione con l'Azienda Unicoop di Firenze, sono state esaminate mele appartenenti alle cultivar Golden Delicious, Red Chief, Stayman Niepling ed Annurca, ottenute con metodologie produttive biologiche e convenzionali e provenienti sia dal territorio toscano sia da altre zone dell'Italia.

Le polpe e le bucce dei frutti esaminati (precedentemente immerse in azoto liquido e conservate ad una temperatura di  $-80^{\circ}\text{C}$  fino al momento dell'analisi) sono state sottoposte ad un'estrazione mediante l'uso di una miscela acquoso/metanolica, addizionata di NaF allo scopo di inibire l'azione della polifenolossidasi; sull'estratto così ottenuto sono state effettuate le determinazioni del contenuto di polifenoli con il metodo spettrofotometrico di Folin-Ciocalteu, la caratterizzazione della frazione polifenolica attraverso analisi HPLC (Tomas-Barberan et al., 2001) e la valutazione dell'attività antiossidante mediante reazione con il radicale DPPH (Brand-Williams et al., 1995).

Per quanto riguarda il contenuto di polifenoli determinato con il metodo di Folin-Ciocalteu si osserva una notevole variazione in funzione della cultivar e della tipologia produttiva; in particolare per quanto concerne la produzione convenzionale, sia toscana che nazionale, la sequenza del contenuto di polifenoli per le quattro cultivar analizzate è risultata la seguente: Annurca>Red Chief>Stayman>Golden, mentre per la coltivazione biologica, pur riguardando essa solo tre cultivar (in quanto la Stayman biologica non è risultata disponibile), si osserva una variazione sostanziale nella sequenza suddetta in quanto il contenuto maggiore di polifenoli è stato determinato nella Red Chief.

Il contenuto di polifenoli così determinato risulta inoltre significativamente correlato ( $P<0,01$ ) con l'attività antiossidante degli estratti dei frutti con elevati valori del coefficiente di correlazione lineare ( $R^2 = 0,88$  e  $0,94$  rispettivamente per bucce e polpe) dimostrando così che i polifenoli liberi e glicosidati svolgono un ruolo importante nella protezione contro i radicali liberi. Tale correlazione risulta di particolare interesse in quanto dimostra che la valutazione della capacità antiossidante della frutta può essere eseguita utilizzando il metodo di Folin, che, a differenza di quelli basati sull'utilizzo di radicali liberi, è molto rapido e di facile esecuzione.

I risultati delle analisi HPLC hanno evidenziato, in accordo con i dati ottenuti mediante il metodo di Folin-Ciocalteu e con quanto riportato in letteratura, una generale maggiore abbondanza dei polifenoli e dei loro glicosidi nelle bucce rispetto alle polpe. L'unica eccezione a tale tendenza è rappresentata dall'acido clorogenico che risulta, in generale, presente nelle polpe in concentrazione paragonabile o maggiore rispetto alle bucce, in accordo con quanto evidenziato da altri autori (Kondo et al., 2002; Alonso-Salches et al., 2001; Burda et al., 1990). L'acido clorogenico, inoltre, è risultato, insieme alla procianidina B2, l'unico composto presente in tutti i campioni di polpa e buccia analizzati.

Un risultato particolarmente interessante è stato ottenuto per kuromanina e keracianina, entrambi glicosidi della cianidina, che sono due dei composti responsabili del colore rosso nei frutti; in accordo con questo fatto, questi due composti sono stati ritrovati esclusivamente

nelle bucce delle mele rosse, mentre risultano del tutto assenti nei campioni di polpa e nelle bucce delle Golden.

Gli agliconi quercetina, floretina e cianidina non sono mai stati determinati in nessuno dei campioni analizzati, mentre catechina, epicatechina e, soprattutto, iperoside floridzina e quercitrina si ritrovano quasi esclusivamente nella buccia in modo del tutto analogo a quanto evidenziato in altri lavori (Kondo et al., 2002; Alonso-Salches et al., 2001; Burda et al., 1990; Vamos-Vigyazo et al., 1976).

### **Bibliografia**

- Alonso-Salces, R.M.; Korta, E.; Barranco, A.; Berrueta, L.A.; Gallo, B. e Vicente, F. (2001). *Pressurized liquid extraction for the determination of polyphenols in apple*. Journal of Chromatography A 933, 37-43..
- Brand-Williams, W.; Cuvelier, M.E. e Berset, C. (1995). *Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity*. Lebensm.-Wiss.u.-Technol. 28, 25-30.
- Burda, S.; Oleszek, W. e Lee, C.Y. (1990). *Phenolic compounds and their changes in apples during maturation and cold storage*. J. Agric. Food Chem. 38, 945-948.
- Kondo, S.; Tsuda, K.; Muto, N. e Ueda, J. (2002). *Antioxidative activity of apple skin or flesh extracts associated with fruit development on selected apple cultivars*. Scientia Horticulturae 96, 177-185.
- Tomas-Barberan, F.A.; Gil, M.I.; Cremin, P.; Waterhouse, A.L.; Hess-Pierce, B. and Kader, A.A. (2001). *HPLC-DAD-ESIMS analysis of phenolic compounds in nectarines, peaches and plums*. J.Agric. Food Chem. 49, 4748-4760.
- Vamos-Vigyazo, L., Gajzago, I., Nadudvari-Marcus, V., Mihalyi, K. (1976). *Studies into the enzymatic browning and the polyphenol-polyphenol oxidase complex of apple cultivars*. Confructa, 21, 24-35.



## UTILIZZO DEL RAPPORTO ISOTOPICO $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ PER LO SVILUPPO DI MODELLI DI TRACCIABILITÀ GEOGRAFICA DI PRODOTTI ALIMENTARI

M. Cocchi<sup>a</sup>, G. Ferrari<sup>a</sup>, J. A. Hoogewerff<sup>b</sup>, D. Manzini<sup>c</sup>, A. Marchetti<sup>a</sup>, S. Sighinolfi<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Università di Modena e Reggio Emilia, Dipartimento di Chimica, via Campi 183, 41100 Modena, Italy

<sup>b</sup>Institute of Food Research, Norwich Research Park, Colney, Norwich, NR4 7UA, UK

<sup>c</sup> Università di Modena e Reggio Emilia, Dipartimento di Scienze Agrarie, via Kennedy 17, 42100 Reggio Emilia, Italy

Molti paesi europei vantano una notevole tradizione eno-gastronomica, che comprende numerose produzioni di alimenti tipici regionali di alto valore commerciale. Il consumo di tali prodotti si è diffuso largamente negli ultimi anni, e ciò ha indotto l'unione europea a tutelare tali alimenti tramite l'introduzione delle denominazioni di qualità, ossia "Specialità Territoriale Garantita" (STG), "Indicazione Geografica Protetta" (IGP) e "Denominazione di Origine Protetta" (DOP).

La diffusione di alimenti tipici regionali ha incrementato notevolmente l'interesse verso lo sviluppo di metodi di tracciabilità, intesa come processo che segue l'alimento durante tutte le fasi della produzione, ossia come un insieme di informazioni sull'origine delle materie prime, sul luogo di produzione e sulle tecniche di produzione che portano all'ottenimento dell'alimento.

Finora la tutela dei prodotti tipici è stata legata, essenzialmente, ad una tracciabilità di tipo cartaceo ma, per individuare imitazioni o frodi legate a prodotti ottenuti in zone diverse da quelle di tutela, sta nascendo la necessità di una tracciabilità "oggettiva" basata, cioè, su criteri oggettivi che fanno riferimento a misure scientifiche.

L'impiego del rapporto isotopico di elementi stabili, unitamente alla concentrazione di metalli ed elementi in tracce può essere usata con successo per l'individuazione dell'origine geografica di un alimento, in quanto questi dati tendono a rimanere maggiormente costanti rispetto a numerosi composti organici che possono essere analogamente utilizzati per lo sviluppo di metodi di tracciabilità.

Tra i prodotti con denominazione DOP si inserisce l'Aceto Balsamico Tradizionale di Modena (ABTM) che rappresenta, probabilmente, uno degli alimenti tipici più conosciuti ed apprezzati dell'universo gastronomico mondiale.

La produzione di questo condimento di antica origine, derivante da mosti cotti di uve selezionate tipiche della provincia di Modena, avviene in botticelle di differenti essenze legnose e di diversa capacità, per fermentazione alcolica ed acetica seguita da una lunga maturazione in cui si verificano processi naturali di invecchiamento.

Dato il lungo periodo di invecchiamento e le peculiarità del processo produttivo, l'ABTM rappresenta una matrice molto interessante da un punto di vista scientifico e può essere considerato un "banco di prova" per lo sviluppo di un modello di tracciabilità.

In questo lavoro sono presentati i risultati di un primo studio pilota volto all'elaborazione di un sistema di tracciabilità per l'ABTM, mediante la determinazione del rapporto isotopico  $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$  e della concentrazione degli elementi Ca, Mg, Sr, Cu, Cd, Zn, Fe, Pb.

Per la presente ricerca sono stati individuati alcuni produttori di ABTM, variamente dislocati nella provincia di Modena, i quali rinalzano le botti con mosto proveniente da uve di loro stessa coltivazione e conducono da tempo le batterie selezionate con mosto prodotto nelle loro aziende.

Presso tali produttori, sono state campionate le terre del vigneto, le acque eventualmente usate per l'irrigazione, i mosti cotti e gli aceti invecchiati.

Le tecniche MC-ICP/MS (multi collector ICP/MS), FAAS e GFAAS sono state usate per la misura del rapporto isotopico dello stronzio e per la determinazione della concentrazione totale dei metalli, rispettivamente. I dati ottenuti sono stati successivamente elaborati con tecniche di analisi chemiometrica.

I risultati ottenuti sono estremamente interessanti e promettenti, soprattutto per quanto concerne la possibilità di correlare le caratteristiche delle materie prime (mosti) con la composizione dei terreni di provenienza.

Le misure del rapporto isotopico  $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$  hanno evidenziato, infatti, una relazione significativa tra mosti e terreni, correlabile alle diverse zone geologiche che si possono identificare nel territorio modenese.

Questi risultati sono stati confermati dai dati riguardanti i metalli investigati, tra i quali Ca e Mg hanno maggiormente influenzato la discriminazione dei campioni.

I campioni di ABTM, invece, hanno mostrato caratteristiche simili non direttamente correlabili a zone specifiche del territorio modenese. Tuttavia, i valori ottenuti per gli aceti possono costituire una base per il confronto con aceti di provenienza diversa da Modena e per l'autenticazione del prodotto stesso.

## **RESIDUI DI CLORAMFENICOLO NELLE CARNI : CONTRIBUTO ALLA MESSA A PUNTO E VALIDAZIONE DI UN METODO DI ANALISI MEDIANTE HPLC/DAD**

*Palermo C.\*\*, Centonze D.\*\*, Muscarella M.\*, Iammarino M.\*, Lo Magro S.\**

*(\*\*)Dipartimento di Scienze Agro-ambientali, Chimica e Difesa Vegetale- Facoltà di Agraria Università degli Studi di Foggia*

*(\*) Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Puglia e della Basilicata-Foggia*

Il Cloramfenicolo, ammidato derivata dall'acido dicloroacetico, è nella sua forma levorotatoria un noto antibiotico ad ampio spettro, largamente utilizzato in passato, sia nell'uomo sia negli animali, nelle terapie antibatteriche.

A livello intestinale, tale farmaco può essere trasformato in metaboliti tossici, che inibiscono i principali enzimi coinvolti nella biosintesi dell'eme, causando anemia aplastica irreversibile.

Malgrado l'Unione Europea abbia vietato sin dal 1994 l'uso del CAF, sono tuttavia frequenti le segnalazioni di uso illecito di tale principio attivo in campo zootecnico ed in acquacoltura.

Da quanto esposto emerge, quindi, la necessità di disporre di un metodo di analisi rapido e semplice ma al tempo stesso accurato e sensibile per l'identificazione e la quantificazione di residui di CAF negli alimenti.

I metodi presenti in letteratura per la determinazione di CAF in diverse matrici biologiche prevedono tecniche ELISA per indagini di screening e di gas cromatografia con rivelazione a cattura di elettroni [1,2] e a spettrometria di massa [3,4] (GC-ECD, GC-MS) o tecniche di cromatografia liquida con rivelazione UV-DAD [5-6] e a spettrometria di massa [4,7] (HPLC-UV/DAD, HPLC-MS) per analisi quali-quantitative di conferma.

Tuttavia le tecniche gas-cromatografiche richiedono procedure di derivatizzazione lunghe e laboriose inoltre, l'eventuale presenza di picchi interferenti rende meno idoneo l'utilizzo di queste tecniche rispetto a quelle di cromatografia liquida.

Un anello fondamentale nella catena della sicurezza alimentare, è rappresentato dalla disponibilità di metodi di controllo supportati da una adeguata validazione che garantiscano l'affidabilità dei risultati analitici.

In questa Nota viene descritta una metodica analitica per la ricerca di residui di CAF nelle carni basata sulla cromatografia liquida ad elevate prestazioni con rivelazione UV a serie di diodi (HPLC-UV/DAD)

La metodica prevede preliminarmente una idrolisi enzimatica con  $\beta$ -glucuronidasi, secondo le modalità descritte da Epstein et al.(8), ed una estrazione e purificazione mediante SPE-C<sub>18</sub> effettuate prima della determinazione analitica in HPLC.

Sono state condotte l'ottimizzazione sia della fase di estrazione sia di quella di purificazione, nonché la separazione HPLC al fine di eliminare la coeluizione di sostanze interferenti come evidenziato dal cromatogramma in figura (fig.1).

La metodica è stata successivamente applicata all'analisi di carni bovine, suine ed avicole mostrando elevata specificità.

Il metodo è stato validato in termini di precisione, accuratezza, linearità di risposta e sensibilità.

Sono state effettuate prove in cromatografia liquida accoppiata ad un rivelatore a spettrometria di massa per la conferma dei risultati ottenuti e per ottenere una più alta sensibilità rispetto alla rivelazione UV.

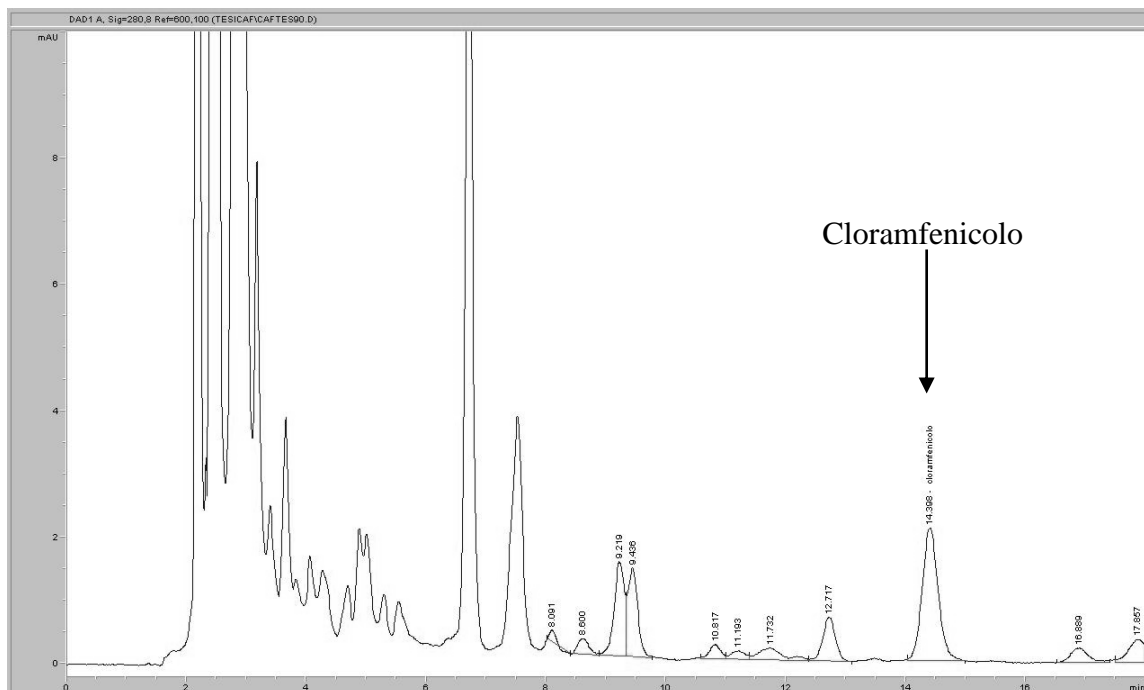


Fig.1 cromatogramma di un campione di carne di pollo additivato con 100ppb di CAF.

## Bibliografia

- 1 R .K. Moon, D.C. Holland, J.E. Roybal, J.M. Storey, A.R. Lomg, G.R. Stehly, S.M. Plakas, J. AOAC Int. 77 (1994) 596.
- 2 A .P. Pfenning, M.R. Madson, J.E. Roybal, S.B. Turnipseed, S. A Gonzalas, J.A. Hurlbut, G.D. Salmon, J. AOAC Int. 81 [(1998) 714.
- 3 P .J. Kijak, J. AOAC Int. 77 (1994) 34.
- 4 T .L. Li, Y.J. Chung-Wang, Y.C. Shih, J. Food Sci. 67 (2001) 21.
- 5 G .F.S. Bories, J.C. Peleran, J.M. Wal, J. AOAC Int. 66 (1983) 1521.
- 6 H .J. Keukens, M.M.L. Aerts, W.A. Traag, J.F.M. Nouws, W.G. Deruig, W.M.J. Beek, J.M.P. De Hartog, J. AOAC Int. 75 (1992) 245.
- 7 B. Roudaut, J. Liq. Chromatogr. Rel. Technol. 19 (1994) 1097.
- 8 R. L Epstein, C. Hery, K.P. Holland, J. Dreas, Journal of AOAC International 77, no. 3 (1994) 570-576.

## VALUTAZIONE DEL RISCHIO ASSOCIATO AL CONSUMO DI PRODOTTI ITTICI CONTAMINATI DA TRIBUTILSTAGNO: IL PROGETTO OT-SAFE

*Paolo Massanisso<sup>+</sup>, Fabiana Di Rosa<sup>+</sup>, Frank Willemsen<sup>°</sup>, Roberto Morabito\**

<sup>+</sup>ENEA-PROT/CHIM, \*ENEA-PROT – Via Anguillarese, 301 – 00060 Roma

<sup>°</sup>IVM – The Netherlands

La contaminazione diffusa dell'ambiente marino ad opera del tributilstagno (TBT) è dovuta principalmente al suo utilizzo come principio attivo nelle vernici antivegetative.

La sua elevata tossicità e la capacità di essere accumulato in organismi di notevole importanza commerciale, quali mitili ed ostriche, ha prodotto danni notevoli anche dal punto di vista economico. Per questo l'utilizzo del TBT è ormai regolato in molti Paesi da una legislazione restrittiva varata inizialmente dalla Francia agli inizi degli anni 80, in seguito ai problemi riscontrati negli allevamenti di ostriche nella Baia di Arcachon, e successivamente adottata da numerosi altri Paesi. A tale proposito l'IMO (Organizzazione Marittima Internazionale) ha fissato la data del 1 gennaio 2008 come termine ultimo per la completa eliminazione delle vernici a base di TBT dagli scafi delle navi.

Al fine di valutare l'efficacia di tali legislazioni e i livelli di concentrazione dei composti organostannici in generale nei vari comparti ambientali, sono state effettuate in tutto il mondo numerose campagne di monitoraggio le quali, se da un lato hanno dimostrato una diffusa diminuzione dei livelli di concentrazione di tributilstagno in acqua, dall'altro non hanno evidenziato una tendenza analoga nei sedimenti e negli organismi marini.

Il dibattito che rimane quindi aperto nella comunità scientifica è relativo alla persistenza di stati di contaminazione elevata dell'ambiente marino da parte del tributilstagno e se questo possa rappresentare anche un rischio per la salute umana. L'esposizione umana ai composti organostannici, infatti, è di tipo prevalentemente alimentare dovuta principalmente al consumo di prodotti ittici e soprattutto di bivalvi i quali, oltre a rappresentare una risorsa economica per molti Paesi, sono anche una componente fondamentale della dieta di molte popolazioni. La determinazione dei livelli di concentrazione di composti organostannici in tali organismi risulta pertanto di fondamentale importanza per la valutazione dei livelli di rischio per l'uomo, insieme alla stima del TDI (Tolerable Daily Intake) e del TARL (Tolerable Average Residue Levels).

Il progetto "Sources, consumer exposure and risks of organotin contamination in seafood – OT-SAFE", ha avuto inizio il 1 dicembre 2001 ed è terminato il 31 maggio 2004. Il progetto è stato finanziato dalla Comunità Europea nell'ambito del V° programma quadro ("Quality of Life and Management of Living Resources", Contratto n° QLK1-2001-01437) ed ha visto la partecipazione di 6 partners principali (tra cui l'ENEA) e 6 subcontraenti da 10 Paesi Europei. Scopo finale del progetto è stato valutare il rischio, per i consumatori europei, associato al consumo di prodotti ittici contaminati da TBT.

Il progetto prevedeva una serie di attività strutturate in tre "workpackages (WPs)", concernenti la determinazione dei livelli di concentrazione del TBT nei prodotti ittici venduti in Europa e la raccolta di dati sul consumo procapite di tali prodotti (WP1), lo studio della eventuale degradazione dei composti organostannici presenti nei prodotti ittici, dopo la cottura dei prodotti stessi utilizzando ricette comuni o procedure industriali (WP2) e la valutazione del rischio associato al consumo di prodotti ittici per i consumatori Europei (WP3).

Nel presente lavoro saranno discusse le attività di ricerca condotte all'interno del WP2, coordinato dall'ENEA.

Al fine di valutare la estensione di eventuali fenomeni di degradazione a carico dei composti organostannici durante la cottura, sono stati utilizzati sia metodi di cottura domestici che

metodi di cottura industriali. I diversi procedimenti di preparazione, sia domestici che industriali, sono stati condotti su campioni omogenei di mitili provenienti da un sito di allevamento Italiano.

Per quanto riguarda la cottura domestica, i mitili sono stati fatti cuocere secondo ricette comuni della tradizione Italiana ed Europea (con temperature e tempi di cottura differenti), ed in particolare in forno a microonde, al vapore, in padella con differenti condimenti, nonché bolliti per tempi crescenti. La concentrazione di composti organostannici è stata valutata prima e dopo la cottura dei campioni.

La cottura a vapore per un tempo inferiore ai due minuti, è il procedimento comunemente utilizzato per il trattamento industriale dei mitili. Tale procedimento di cottura è stato condotto presso un impianto di trattamento mitili situato in Olanda. Dopo la cottura a vapore, una parte del campione è stata immersa in aceto e sottoposta ad un trattamento di pastorizzazione. La concentrazione di composti organostannici è stata valutata sul campione fresco, sul campione dopo cottura a vapore e sul campione dopo il trattamento di pastorizzazione.

L'affidabilità dei risultati analitici ottenuti è stata valutata tramite l'utilizzo di carte di controllo e l'analisi di un materiale di riferimento certificato (BCR 477: composti butilici dello stagno in tessuto di mitile liofilizzato).

I risultati ottenuti nello studio di degradazione del tributilstagno e dei composti di- e monosostituiti (dibutil- e monobutilstagno) in mitili sottoposti a cottura saranno presentati e discussi.

**Mercoledì 22 Settembre 2004**

**CHEMIOMETRIA**

**Aula dei Filosofi  
Palazzo Centrale**

**17.10-18.30**

## QUALE TIPO DI DATI (NORMALMENTE DISTRIBUITI, STANDARDIZZATI, TRASFORMATI) PER UNA CORRETTA ANALISI DEI FATTORI?

Roberto Aruga

Dipartimento di Chimica Analitica, Università di Torino, via Giuria 5, 10125 Torino

E' fuori di dubbio che la tecnica dell'analisi dei fattori (FA) mostri a tutt'oggi due facce piuttosto contrastanti. Da un lato essa è da annoverare tra le tecniche chemiometriche maggiormente diffuse e apprezzate, dall'altro lato mostra alcuni aspetti non ancora arrivati a una sistemazione concettuale definitiva e generalmente accettata. Per esempio, per quanto riguarda la distribuzione statistica dei dati iniziali, si va da posizioni restrittive, come quella di Davis, che assume come condizione usuale una distribuzione normale multivariata, o quella di Reyment, che sottolinea l'influenza negativa di distribuzioni asimmetriche, a posizioni meno restrittive, secondo cui la normalità dei dati è necessaria solo in particolari casi. Posizioni differenti sono anche state assunte riguardo all'utilità di una eventuale trasformazione di tipo logaritmico, a proposito della quale si intrecciano i due aspetti della normalizzazione della distribuzione e della ugualizzazione delle varianze.

Va anche detto che il chimico-chemiometrista che usa la FA e che vuole valutare la validità dei risultati ottenuti, li valuta inevitabilmente in modo soggettivo, ossia sulla base di un confronto tra i risultati stessi e la situazione che egli *presume* sia quella reale per il sistema in studio.

Sulla base di queste considerazioni si è pensato di proporre un procedimento diretto di valutazione della bontà dei risultati, fissando a priori, per esempio per uno o più ipotetici sistemi di tipo fluviale, un certo numero di fattori latenti e la loro rispettiva natura chimica. Su questa base si è poi proceduto alla costruzione delle corrispondenti matrici di dati. Per quanto riguarda la costruzione dei dati simulati si è proceduto con grande cura, riferendosi costantemente al comportamento di sistemi reali studiati in precedenza nel nostro laboratorio. I dati costruiti sono poi stati sottoposti a diversi pretrattamenti (autoscaling, trasformata logaritmica, autoscaling e logaritmo insieme, introduzione di differenti gradi di gaussianizzazione delle variabili, introduzione di differenti livelli di perturbazione casuale dei dati, con varie combinazioni tra i suddetti pretrattamenti), eseguendo ogni volta una corrispondente FA. Vennero eseguite oltre 40 prove in totale. Ogni volta si confrontava il risultato ottenuto con la situazione reale, secondo un preciso protocollo, e si valutava la corrispondente capacità predittiva del risultato. Queste valutazioni vennero completate sulla base di dati reali relativi al fiume Po nella regione Piemonte, per il quale si hanno conoscenze sufficientemente sicure sulla natura e sulla varietà dei fattori di inquinamento.

Tra le conclusioni principali si possono evidenziare le seguenti. (i) I dati solo autoscalati portavano a risultati generalmente realistici, indipendentemente dalla natura gaussiana o asimmetrica dei dati. (ii) La trasformata logaritmica dava risultati variabili, nel senso che i risultati erano buoni solo se a detta trasformata si accompagnava una ugualizzazione delle varianze; la sola gaussianizzazione dei dati non portava miglioramenti nei risultati. (iii) Il logaritmo e l'autoscaling insieme non davano miglioramenti rispetto al solo autoscaling, e in qualche caso peggioravano lievemente la predittività del risultato. Altre conclusioni riguardavano l'uso della rotazione obliqua oppure rigida, e l'uso del metodo dell'*average variance* oppure della *cross validation* per stabilire il numero dei fattori significativi. Ai fini della bontà dei risultati della FA veniva dunque dimostrato, in definitiva, che la condizione necessaria e sufficiente è quella di avere dei dati omoscedastici (resi tali per esempio con l'autoscaling) mentre la normalità o non normalità della distribuzione non sembra avere influenza rilevante.



## MODELLAMENTO DELLE EMISSIONI IN ATMOSFERA D'UN CEMENTIFICIO MEDIANTE LE RETI NEURALI ARTIFICIALI, CONFRONTO CON I METODI CLASSICI.

*Emilio Marengo\**, *Marco Bobba\**, *Elisa Robotti\**, *Maria Cristina Liparota\**

*\* Dipartimento di Scienze dell'Ambiente e della Vita, Università del Piemonte Orientale  
Amedeo Avogadro, Spalto Marengo 33, 15100 Alessandria, Italy*

La produzione di cemento è un processo che genera una gran varietà di rifiuti ma le emissioni in atmosfera sono sicuramente le fonti d'inquinamento più elevate. Le emissioni derivano principalmente dalla combustione di materie prime e combustibili nel forno di cottura e sono principalmente ossidi di azoto, ossidi di zolfo, polveri, ossido di carbonio e monossido di carbonio.

Lo scopo di questo lavoro è lo sviluppo di un modello matematico che sia in grado di predire le quantità di gas emesse dal processo di produzione del cemento. Le variabili indipendenti utilizzate per costruire il modello riguardano le proprietà chimiche e chimico-fisiche delle materie prime e dei combustibili (sia tradizionali sia alternativi) e le condizioni operative del forno, mentre le emissioni di gas (NO<sub>2</sub>, SO<sub>2</sub> e polveri) sono considerate variabili dipendenti.

I metodi di regressione più utilizzati per la costruzione di modelli di calibrazione sono PCR (Principal Component Regression) e PLS (Partial Least-Squares). Questi algoritmi assumono una relazione lineare tra le variabili X e le variabili Y e forniscono risultati corretti fino a quando le deviazioni dalla linearità non sono molto elevate. In presenza di un elevato grado di non-linearità è necessario utilizzare degli algoritmi alternativi. In questo lavoro sono state utilizzate le reti neurali artificiali (ANN). Le ANN sono funzioni matematiche che simulano la capacità del cervello umano di risolvere problemi complessi; esse possono virtualmente approssimare qualsiasi funzione in modo stabile ed efficiente.

Il principale problema da risolvere per ottenere un buon modello, in grado di predire in modo corretto le emissioni di gas, è la scelta dell'architettura ottimale della rete. Per questa ragione è stata valutata la capacità predittiva di diverse reti le quali sono addestrate con il classico algoritmo d'apprendimento back-propagation.

Il dataset iniziale (costituito dai dati di un mese di monitoraggio) è stato suddiviso, utilizzando le mappe di Kohonen (SOM, self-organising map), in un training set e in un test set. Il training set è utilizzato per costruire il modello di regressione mentre il test set è utilizzato per selezionare il numero di variabili latenti, nel caso di PCR e PLS, o scegliere la fine del processo di addestramento, nel caso delle ANN.

Una procedura leave-more-out, applicata al test set, permette di costruire il cosiddetto "production set". Questa procedura consiste nell'eliminare, a turno, dal test set, tutti i dati relativi ad un giorno intero e predirne la risposta con l'utilizzo del modello costruito in assenza di questo gruppo di campioni. Questo tipo di validazione permette di testare la reale capacità predittiva del modello su campioni che non sono stati utilizzati nella fase di sviluppo del modello; si tratta quindi di predizioni genuine.

Per tutte e tre le risposte sperimentali, i risultati ottenuti con le reti neurali artificiali, sia in fitting sia in predizione, sono sensibilmente superiori rispetto ai risultati forniti da PCR e PLS. In particolare, per le emissioni di SO<sub>2</sub> e delle polveri, le ANN forniscono una capacità predittiva comparabile con l'incertezza delle misure sperimentali; questo dimostra che è possibile predire in modo soddisfacente le due risposte sperimentali in modo da poter evitare problemi ambientali e legali legati all'emissione di composti inquinanti in atmosfera.

Lo studio successivo ha lo scopo di rendere i modelli, costruiti precedentemente, più semplici da interpretare. Questo vuol dire cercare quali variabili indipendenti influenzano in modo più significativo il valore della risposta sperimentale.

Le variabili  $x$ , tranne una, sono mantenute ad un valore costante; il valore della variabile eliminata varia in un certo range. Ad intervalli regolari della variabile eliminata è calcolata la derivata della rete neurale. Questa procedura è ripetuta per tutte le variabili indipendenti del dataset.

E' costruito un grafico che riporta in ascissa la variazione della variabile eliminata ed in ordinata il valore della derivata. In questo modo è possibile osservare quale variabile  $x$  influenza maggiormente la risposta  $y$  e l'eventuale presenza d'effetti quadratici. Le variabili meno importanti sono eliminate ed il modello è ricostruito utilizzando le variabili rimaste. I modelli sono costruiti e validati secondo la procedura utilizzata precedentemente.

Lo studio è stato effettuato per tutte e tre le emissioni gassose.

Analizzando i risultati ottenuti si può concludere che non tutte le variabili utilizzate nella prima fase del lavoro influenzavano in modo significativo il valore della risposta sperimentale; infatti, eliminando alcune variabili, che aggiungono solo rumore ai dati, si ottengono risultati, sia in fitting sia in predizione, leggermente superiori a quelli ottenuti precedentemente.

Questo risultato è stato raggiunto sia per i classici modelli di regressione PCR e PLS sia per le reti neurali artificiali.

## **APPLICAZIONE DELL'ALGORITMO WPTER SU SPETTRI NIR DI FARINE DI FRUMENTO TENERO PER LA CLASSIFICAZIONE NELLE DIVERSE CLASSI DI QUALITÀ**

*Marina Cocchi<sup>a</sup>, Maria Corbellini<sup>c</sup>, Giorgia Foca<sup>a</sup>, Lorenzo Tassi<sup>a</sup> e Alessandro Ulrici<sup>b</sup>*

*<sup>a</sup>Dipartimento di Chimica, Università di Modena e Reggio Emilia, Via Campi, 183 – 41100 Modena*

*<sup>b</sup>Dipartimento di Scienze Agrarie, Università di Modena e Reggio Emilia, Via Kennedy 17, 42100 Reggio Emilia*

*<sup>c</sup>Istituto Sperimentale per la Cerealicoltura, via Forlani 3, 26866 S. Angelo Lodigiano (Lodi)*

Un aspetto importante dell'analisi chemiometrica, che svolge un ruolo fondamentale nell'applicazione della spettroscopia NIR al contesto della calibrazione e classificazione multivariata, riguarda anche le prestazioni dei metodi utilizzati. A questo proposito, è stato recentemente proposto da alcuni di noi un metodo di classificazione/selezione di variabili, WPTER [1], basato sulla trasformata Wavelet Packet, il quale prima di eseguire la classificazione effettua una selezione delle variabili nel dominio wavelet. Lavorare nel dominio wavelet comporta il vantaggio di poter considerare sia gli aspetti puntuali che di forma che caratterizzano il segnale; infatti, questa trasformata permette di decomporre il segnale in modo da suddividere l'informazione in esso contenuta in contributi a diversa frequenza tenendo traccia della loro localizzazione nel dominio originale. Diviene così possibile semplificare il sistema pur mantenendone gli aspetti maggiormente informativi. In questo lavoro l'algoritmo WPTER è stato utilizzato per sviluppare modelli di classificazione di campioni di farina di grano tenero appartenenti a diverse categorie merceologiche, sulla base dei loro spettri NIR.

La legislazione italiana, infatti, stabilisce che per la classificazione merceologica delle farine si faccia riferimento ai parametri chimici di proteine e ceneri; tuttavia, questo genere di classificazione non fornisce indicazioni sul comportamento tecnologico degli sfarinati in fase di impastamento. Per questo motivo, recentemente è stata sviluppata dall'ASSINCER una classificazione tecnologica delle farine in quattro differenti classi qualitative in funzione della destinazione d'uso (frumento da biscotto, panificabile, panificabile superiore, di forza), sulla base di parametri più significativi ai fini produttivi [2]. In particolare, tale classificazione viene effettuata in base ai seguenti caratteri: indice di Hagberg o Falling Number, contenuto proteico, indici alveografici (W, P/L) e stabilità farinografica. Questi parametri vengono determinati mediante analisi convenzionali che prevedono lunghi tempi di esecuzione e l'impiego di personale particolarmente esperto, che assegna anche i campioni alle rispettive classi qualitative. Nelle transazioni commerciali, viceversa, le materie prime vanno caratterizzate nel più breve tempo possibile. A tal fine, può essere interessante valutare la possibilità di utilizzare, accoppiandola ad opportune tecniche di classificazione, la spettroscopia di riflettanza nel vicino infrarosso, che è caratterizzata da rapidità, economicità e semplicità nella preparazione del campione. In questo modo si può così evitare il ricorso all'analisi convenzionale per la determinazione dei singoli indici chimico-fisici e reologici con lo scopo di assegnare ogni campione di farina di grano tenero alla corrispondente categoria merceologica d'impiego.

Al fine di sviluppare modelli di classificazione d'uso generale, sono stati utilizzati 178 campioni di farina provenienti da grani derivati da varie reti di prove parcellari, molto eterogenei per genotipo, ambienti e anni di coltivazione. Ogni campione è stato analizzato utilizzando le metodiche ufficiali e sulla base dei valori ottenuti per i diversi parametri è stato assegnato alla classe merceologica corrispondente. Inoltre, per ogni campione, sono stati acquisiti due spettri in ordine randomizzato e lo spettro medio risultante è stato utilizzato in

fase di analisi dei dati. In questa fase, l'analisi PCA preliminare degli spettri NIR ha mostrato la parziale sovrapposizione delle quattro tipologie di campioni nello spazio delle componenti principali significative. In particolare, i campioni di frumento panificabile risultano dispersi in tutto lo spazio e rendono particolarmente difficoltosa la differenziazione delle quattro classi. Per questa ragione, si è scelto di applicare l'algoritmo di classificazione WPTER soltanto alle due classi più differenti in termini di proprietà chimico-reologiche: frumento da biscotto (FB) e di forza (FF). Per valutare la capacità predittiva dei modelli ottenuti, i 72 campioni appartenenti alle classi FB ed FF sono stati suddivisi in tre insiemi: un training set, un monitoring set ed un test set. Tra tutti i 600 modelli calcolati (valutando tutte le combinazioni di 20 wavelet, 5 livelli di decomposizione e 6 criteri di selezione dei coefficienti) è stato selezionato come maggiormente efficace per la classificazione quello ottenuto utilizzando la wavelet daubechies 4, al quinto livello di decomposizione, con una percentuale di coefficienti wavelet mantenuti uguale allo 0.5%. Dalla PCA effettuata sui coefficienti wavelet selezionati dal modello si può notare che, dopo la selezione delle variabili effettuata dall'algoritmo, la separazione delle due classi appare decisamente più netta.

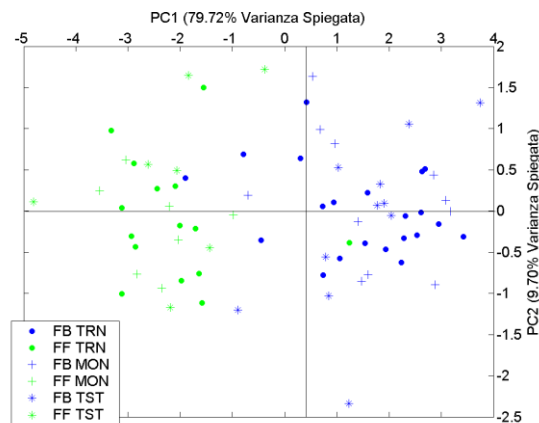


Figura 1. Grafico degli scores delle prime due componenti principali ottenuto dalla PCA sui coefficienti selezionati da WPTER per il modello scelto

Dal confronto tra le prestazioni del modello SIMCA calcolato sugli spettri originali e del modello ottenuto con WPTER si osserva un netto miglioramento in termini di Specificità; inoltre, il modello ottenuto con WPTER risulta molto parsimonioso. Da questi risultati si può certamente asserire che la metodica proposta pare promettente per la classificazione delle farine di grano tenero, almeno nelle due classi di qualità definite dall'ISQ con le caratteristiche più diverse, in quanto risulta particolarmente rapida rispetto alle analisi tradizionali e fornisce risultati più che soddisfacenti.

## Bibliografia

- [1] M. Cocchi, R. Seeber, A. Ulrici, WPTER: Wavelet Packet Transform for Efficient pattern Recognition of signals, *Chemom. Intell. Lab. Syst.*, 57, 97-119 (2001).
- [2] E. Borasio, (1997) *Atti Convegno GranoItalia*, Bologna, pp. 59-61.

## **STRUMENTI DI ANALISI MULTIVARIATA PER LO STUDIO E LA CLASSIFICAZIONE DI MAPPE 2D-PAGE PER L'ANALISI DEL PROTEOMA**

*E. Marengo\**, *E. Robotti\**, *P.G. Righetti\*\**

\* *Dipartimento di Scienze dell'Ambiente e della Vita - University of Eastern Piedmont - Spalto Marengo 33 - 15100 Alessandria - Italy - e-mail: [robotti@mfn.unipmn.it](mailto:robotti@mfn.unipmn.it)*

\*\* *Scientific and Technological Department - University of Verona - Strada le Grazie 15 - Verona - Italy*

La gel-elettroforesi bidimensionale è una delle tecniche più diffuse nei campi della genomica e proteomica, per lo studio delle proteine presenti in estratti cellulari umani, animali o vegetali. Lungo la prima dimensione, le proteine sono separate in base al punto isoelettrico (attraverso un gradiente di pH), mentre la seconda dimensione ne esegue una successiva sulla base della massa molecolare (attraverso un gradiente di porosità). Il risultato finale è una mappa bidimensionale, chiamata 2D-PAGE (2D polyacrilamide gel-electrophoresis), sulla quale le proteine sono rappresentate come macchie disperse nella matrice polimerica.

Il patrimonio proteico cellulare può andare incontro a profonde modificazioni (cambiamenti delle abbondanze relative di alcune proteine; presenza/assenza di altre proteine) in seguito all'insorgere di una patologia oppure in seguito alla somministrazione di un farmaco e questo ne giustifica l'interesse e l'importanza.

Non a caso, il confronto di mappe 2D-PAGE appartenenti a classi diverse di campioni (sani/malati oppure malati/trattati con un farmaco) appare fondamentale al fine di utilizzare le stesse mappe 2D per scopi diagnostici/prognostici oppure nell'ambito di studi di drug-design; questo utilizzo è purtroppo reso problematico dalla scarsa riproducibilità che affligge la tecnica analitica. La bassa ripetibilità è dovuta ad alcune caratteristiche quali: 1) la complessità del campione (biologico); 2) la complessità dei passaggi di pre-trattamento del campione; 3) il numero elevato di parametri strumentali che devono essere controllati durante la corsa elettroforetica.

La variabilità è tanto elevata da causare differenze anche molto marcate all'interno di mappe replicate della stessa corsa elettroforetica. Alla luce di queste considerazioni, appare fondamentale la messa a punto di nuovi metodi, che permettano di tenere in considerazione la scarsa riproducibilità e che consentano di eseguire confronti più efficaci tra le diverse classi di mappe 2D-PAGE.

Il nostro gruppo di ricerca ha sviluppato metodi per il confronto di mappe 2D-PAGE, attraverso l'utilizzo di diversi strumenti della statistica multivariata. Sono stati applicati con successo metodi basati sull'Analisi delle Componenti Principali, accoppiata con metodi di classificazione (Linear Discriminant Analysis e SIMCA), sulla Three-Way PCA, sul Multidimensional Scaling e sui principi della logica fuzzy. Tutti questi approcci permettono di tenere in considerazione la scarsa riproducibilità della tecnica sperimentale e sono stati applicati con successo a svariati dataset.

Di recente, un approccio basato sull'Analisi delle Componenti Principali e sul metodo SIMCA (Soft-Independent Model of Class Analogy) è stato applicato con successo a due dataset di natura diversa. Il primo è costituito da mappe 2D-PAGE relative a estratti proteici di ghiandole surrenali di topolini sani e affetti da neuroblastoma. Il neuroblastoma, insieme a linfoma, leucemia, osteosarcoma, tumori di Ewing, rhabdomyosarcoma e leucemia linfoblastica, appartiene a un gruppo di tumori infantili non differenziati conosciuti come tumori a cellule piccole. Il neuroblastoma rappresenta la più comune forma tumorale extracranica solida dell'infanzia; colpisce il midollo surrenale o i gangli del sistema simpatico di addome, petto o collo. Questa gravissima patologia è responsabile di circa il 96% dei tumori infantili. L'analisi delle componenti principali è stata applicata a 20 mappe 2D-PAGE

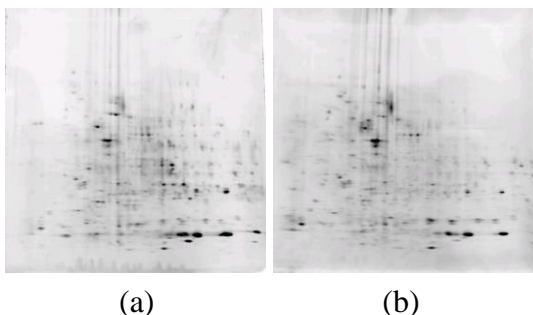


Figura 1: Esempi di mappe 2D-PAGE: campione di controllo (a) e campione affetto da Neuroblastoma (b)

Successivamente è stato applicato il metodo SIMCA per identificare le classi di campioni presenti e le macchie responsabili delle differenze riscontrate. Tra le catene polipeptidiche che sono risultate sovra- o sotto- espresse, alcune sono state identificate attraverso la spettrometria di massa MALDI-TOF.

relative a estratti proteici di ghiandole surrenali di topolini sani (10 mappe) e affetti da neuroblastoma (10 mappe). In figura 1 è rappresentato un esempio di mappa 2D-PAGE ottenuta per ciascuna classe di campioni. Lo score plot relativo alle prime due componenti principali è riportato in figura 2 e mostra i due gruppi di campioni separati efficacemente lungo la prima componente principale.

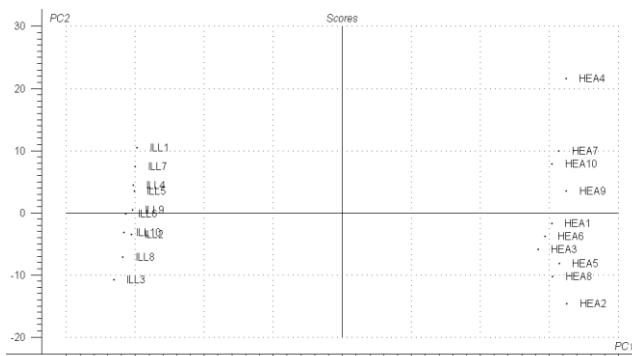


Figura 2: Score plot PC2 vs PC1 (campioni di controllo (HEA1-HEA10); campioni patologici (ILL1-ILL10) )

Il secondo dataset è invece relativo alla messa a punto di nuove linee cellulari utilizzate come standard di riferimento. Nell'ottica dello sviluppo di una nuova linea cellulare standard, si rende necessario il confronto tra il pattern bidimensionale fornito dalla linea cellulare già in commercio con quello generato dalla linea cellulare che si vuole mettere a punto. Il confronto è stato eseguito su 10 mappe 2D-PAGE relative alle due linee. L'analisi delle componenti principali e la successiva applicazione del metodo SIMCA hanno permesso di valutare le differenze esistenti tra i due tipi di pattern bidimensionale. Attualmente si sta procedendo all'identificazione delle catene polipeptidiche responsabili delle differenze riscontrate.

**Giovedì 23 Settembre 2004**

**Conferenza Plenaria**

*J. -L. Wolfender  
Université de Lausanne*

**HYPHENATION AND HYPERNATION. THE PRACTICE OF MULTIPLE  
HYPHENATION FOR THE ON-LINE STRUCTURAL INVESTIGATION OF PLANT  
METABOLITES**

**Aula Magna  
Palazzo Centrale**

**9.00**

*J. -L. Wolfender*  
*Université de Lausanne*

**HYPHENATION AND HYPERNATION. THE PRACTICE OF MULTIPLE  
HYPHENATION FOR THE ON-LINE STRUCTURAL INVESTIGATION OF PLANT  
METABOLITES**



**Giovedì 23 Settembre 2004**

**BIOANALITICA**

**Aula Magna  
Palazzo Centrale**

**9.50-11.10**

## USE OF MALDI/MS FOR MAPPING OF A NEW AMYLOID $\beta$ -PEPTIDES LOWERING AGENT FOR THE TREATMENT OF ALZHEIMER DISEASE

*Silvia Catinella<sup>a</sup>, Paola Puccini<sup>a</sup>, Benedetta Riccardi<sup>a</sup>, Gino Villetti<sup>a</sup>, Bruno P. Imbimbo<sup>a</sup>, Andrea Rizzi<sup>a</sup>, Tiziana Peveri<sup>a</sup>, Roberta Seraglia<sup>b</sup>, Nadia Moretto<sup>c</sup>, S. Ottonello<sup>c</sup>*

*a Chiesi Farmaceutici s.p.a, R&D, Via Palermo 26/A, I43100 Parma*

*b C.N.R., Istituto di Scienze e Tecnologie Molecolari Sezione di Padova, Corso Stati Uniti 4 , I35100 Padova*

*c Dipartimento di Biochimica e Biologia Molecolare, Università di Parma, Parco Area delle Scienze 23/A, I43100 Parma*

Accumulation of amyloid deposits in brain, is the crucial step in the development of Alzheimer disease (AD). Soluble  $\beta$ -amyloid (sA $\beta$ ) are a series of peptides normally produced from the proteolytic processing of a much larger 695 aminoacid-long amyloid precursor protein (APP). However, it is believed that the longest forms, A $\beta$ <sub>40</sub> and A $\beta$ <sub>42</sub>, play a key role in triggering the disease by promoting the formation of the first insoluble aggregates.

Epidemiological studies indicate that long-term use of nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) can reduce the risk for AD. Since A $\beta$  aggregates are able to induce an inflammatory response through an increased A $\beta$  production and a concomitantly increased amyloid deposition, anti-inflammatory drugs have been suggested as beneficial agents in AD therapy. A selective A $\beta$ <sub>42</sub> lowering action, most likely resulting from a direct modulation of  $\gamma$ -secretase activity, has already been documented for some NSAIDs. In contrast to  $\gamma$ -secretase inhibitors, 'target selective', A $\beta$ <sub>42</sub>-lowering NSAIDs do not impair S3 cleavage in the NOTCH receptor and release of the receptor intracellular domain, a finding with potential implications for the development of safer drugs targeting A $\beta$  production through  $\gamma$ -secretase modulation<sup>1</sup>.

To test the *in vitro* activity of an original NSAID derivative proposed for AD treatment (CHF 5074), Matrix Assisted Laser Desorption Ionization/Mass Spectrometry (MALDI/MS) was used to simultaneously map all the A $\beta$  peptides selectively immunoprecipitated from human neuroglioma cells incubated in presence of this novel compound<sup>2</sup>. In particular, H4 15X cell lines, genetically modified to overexpress APP, were treated with two different concentrations of CHF 5074 and with two reference compounds with a well described action on the whole A $\beta$  profile<sup>2</sup>; untreated cells were used as controls. Through the combined use of a monoclonal antibody (mAb, 4G8) that selectively recognizes peptides harbouring the 17-24 region of A $\beta$ <sub>42</sub> and MALDI/MS analysis of the immunoprecipitates produced by such mAb, a complete mapping of all the amyloid peptides expressed in each cellular sample was achieved. More than 20 different variants were simultaneously detected and their levels evaluated in terms of absolute abundance. When compared with the two reference compounds, a preferential A $\beta$ <sub>42</sub> lowering action was observed for CHF 5074 so suggesting an applicability of this new NSAID derivative in the AD treatment. A parallel increase of the shorter peptides (1-38, 1-33, 1-28, 1-27, 1-18) was also observed, thus suggesting that CHF5074 alters A $\beta$  production through the same mechanism previously described for NSAIDs<sup>1</sup>.

1. J.L. Eriksen et al, J. Clin. Invest. **3**, 440 (2003).
2. R.Wang et al, J. Biol. Chem. **50**, 31894 (1996).

## OLIGOPEPTIDI CON PROPRIETÀ LEGANTI VERSO MICOTOSSINE OTTENUTI PER VIA COMBINATORIALE

*Cinzia Tozzi, Caterina Ferroglio, Cristina Giovannoli, Gianfranco Giraudi*

*Laboratorio di Bioanalitica – Dip. di Chimica Analitica – Via P. Giuria 5 – 10125 Torino  
cinzia.tozzi@unito.it*

La sintesi di leganti sintetici di piccole dimensioni sta aprendo nuove prospettive nel campo dei sistemi che mimano le proprietà di riconoscimento molecolare dei leganti naturali [1].

L'approccio combinatoriale alla sintesi di questi leganti permette la creazione di librerie contenenti un alto numero di composti diversi con differenti capacità di legame. Gli aminoacidi per le loro caratteristiche chimico-fisiche si sono dimostrati dei buoni monomeri di partenza per la creazione di queste librerie [2,3].

In questo lavoro è stata sfruttata una sintesi combinatoriale in fase solida allo scopo di preparare librerie di peptidi dalle quali selezionare leganti specifici indirizzati verso micotossine, quali le aflatossine e l'ocratossina A.

Una resina polistirenica funzionalizzata con gruppi carbossilici è stata utilizzata come fase solida mentre dodici aminoacidi sono stati impiegati nella creazione della libreria (arg, ser, pro, val, leu, asn, gly, ala, phe, lys, his, trp). L'acido aminobutirrico è stato usato come braccio spaziatore.

Il lavoro sperimentale ha seguito il seguente schema in entrambi i casi: una prima fase ha visto la creazione di una prima libreria di dipeptidi le cui proprietà di legame sono poi state testate verso l'analita di interesse. Il dipeptide che ha mostrato le migliori capacità di legame è stato selezionato e le sue proprietà di legame sono state verificate anche verso altre tossine. Le costanti di affinità sono risultate promettenti ( $K > 10^3 \text{ M}^{-1}$ ), per questo, usando questa sequenza come base di partenza, è stata preparata una seconda libreria di tetrapeptidi. Nuovamente sono state testate le proprietà di legame verso le tossine di interesse ed è stata selezionata una sequenza di quattro aminoacidi che ha mostrato costanti di affinità  $> 10^4 \text{ M}^{-1}$ .

Sia per le aflatossine sia per l'ocratossina A è stata infine affrontata la verifica delle capacità di legame del tetrapeptide selezionato preparando una colonnina per estrazione in fase solida. La procedura sperimentale è stata ottimizzata in tampone e poi sono state affrontate alcune matrici alimentari. I risultati preliminari concordano con quelli riportati in letteratura per i dispositivi di immunoaffinità classici.

Questo lavoro ha permesso di dimostrare la possibilità di ottenere peptidi leganti con buone proprietà di riconoscimento molecolare utilizzando una tecnica combinatoriale mirata. L'impiego di peptidi leganti in sistemi di pre-concentrazione ed estrazione è stato in questi primi studi soddisfacente. In prospettiva futura, se i peptidi confermeranno i risultati ottenuti anche verso un più alto numero di campioni reali, potranno porsi come un'alternativa economica, versatile e di sviluppo più rapido rispetto ai sistemi di riconoscimento molecolare classici.

Questo progetto di ricerca è finanziato dal Ministero dell'Istruzione e della Ricerca (COFIN 2003, prot. 2003035285\_003).

[1] A.D. Hamilton. *Nature* **2002**, 418, 375-376

[2] C.Tozzi, L.Anfossi, G.Giraudi, C.Giovannoli, C.Baggiani, A.Vanni. *J.Chromatogr.A* **2002**, 966, 71-79.

[3] C.Tozzi, L.Anfossi, G.Giraudi. *J. Chromatogr. B* **2003**, 797, 289-304.

# CONFRONTO TRA UN NUOVO METODO CALORIMETRICO ED UN CLASSICO METODO SPETTROFOTOMETRICO PER LA DETERMINAZIONE DEL PARACETAMOLO NEI COMUNI FARMACI ANALGESICI COMMERCIALI

L. Campanella<sup>1</sup>, A.L. Magrì<sup>1</sup>, V. Rossi<sup>2</sup>, M. Tomassetti<sup>1</sup>, S. Vecchio<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Dipartimento di Chimica, Università di Roma "La Sapienza"

<sup>2</sup>Dipartimento di Ingegneria Chimica, dei Materiali delle Materie Prime e Metallurgia, Università di Roma, "La Sapienza"

## Abstract

Il paracetamolo è probabilmente il più comune dei principi attivi contenuti nei farmaci analgesici non narcotici di più largo uso. Il forte consumo di questi farmaci, la loro grande diffusione e quindi la notevole quantità che di essi viene prodotta e commercializzata, rendono sempre più ampia e frequente la necessità di controlli quantitativi di questi prodotti farmaceutici, che, peraltro, sono generalmente venduti come comuni prodotti da banco. Per questo motivo non mancano in letteratura metodi cromatografici e spettrofotometrici, raccomandati per effettuare il dosaggio del paracetamolo. Ciononostante i metodi cromatografici richiedono notoriamente tempi di analisi non brevi, mentre quelli spettrofotometrici possono essere soggetti ad interferenze a causa dei numerosi eccipienti, cui il principio attivo è associato nelle diverse specialità farmaceutiche; proprio per questi motivi, per il controllo di tale specialità, i metodi spettrofotometrici più recenti prevedono letture in derivata, o utilizzano procedimenti di una certa complessità, che tuttavia non sempre riescono a risolvere i problemi analitici che si presentano. La ricerca di metodi alternativi per un controllo semplice, rapido e soprattutto poco costoso, non è quindi una pura esercitazione accademica, ma una reale necessità analitica. La presenza nella curva DSC (calorimetria differenziale a scansione) del paracetamolo di un picco di fusione ben definito e non sovrapposto a quelli di altri processi chimici o fisici del principio attivo stesso, o dei principali eccipienti, ci ha suggerito di tentare l'applicazione di un metodo calorimetrico, già proposto per altri farmaci da uno degli autori di questo articolo, ma ancora poco utilizzato [1]. Le esperienze calorimetriche sono state condotte su cinque diverse specialità farmaceutiche commerciali, dei cui componenti è stata anche valutata preventivamente la compatibilità. I risultati ottenuti sono stati confrontati con quelli trovati applicando un classico metodo spettrofotometrico riportato dalla Farmacopea. Nella presente ricerca sono stati indagati nel dettaglio anche i diversi procedimenti operativi possibili in entrambi i metodi strumentali considerati, compreso il procedimento in derivata prima, nel caso del metodo spettrofotometrico. I vantaggi principali del metodo calorimetrico consistono nella completa assenza di qualsiasi pretrattamento, o manipolazione del campione; il metodo risulta quindi semplice, rapido, di basso costo e necessita di una modestissima quantità di campione per effettuare l'analisi del paracetamolo. Tuttavia la sua accuratezza è risultata inferiore a quella del metodo spettrofotometrico, soprattutto se di quest'ultimo si utilizza il procedimento di misura in derivata prima.

## Riferimenti

[1] U. Biader Ceipidor, R. Curini, G. D'Ascenzo, M. Tomassetti, *Thermochim. Acta*, 46 (1981) 279-287

## SVILUPPO DI UNA METODOLOGIA ANALITICA PER LA DETERMINAZIONE DELLA SELENOMETIONINA IN MATRICI BIOLOGICHE MEDIANTE GC-MS

*C. Brunori<sup>1</sup>, S. Chiavarini<sup>1</sup>, S. Tavella<sup>1</sup> e R. Morabito<sup>2</sup>*

*<sup>1</sup>PROT-CHIM, ENEA – C.R. Casaccia Via Anguillarese 301, 00060 Roma- ITALY*

*<sup>2</sup>PROT, ENEA – C.R. Casaccia Via Anguillarese 301, 00060 Roma- ITALY*

Le metodologie analitiche proposte in letteratura per la determinazione della selenometionina in matrici biologiche sono basate in larga parte sull'utilizzo di cromatografia liquida ad elevate prestazioni (HPLC) accoppiata con rivelatori a spettrometria di massa o a spettrometria a fluorescenza atomica. In minor numero sono presenti anche studi sulla determinazione della selenometionina mediante tecniche gas cromatografiche (GC), che presentano alcuni vantaggi, tra cui elevata risoluzione, rapidità di analisi, basso consumo di solventi, contenuto costo strumentale. L'accoppiamento con un rivelatore a spettrometria di massa consente inoltre di abbinare una elevata sensibilità di analisi con la possibilità del riconoscimento qualitativo dell'analita.

Scopo del presente lavoro è stata la messa a punto di una metodologia che consenta di determinare la selenometionina in matrici biologiche mediante gas-cromatografia con rivelatore a spettrometria di massa. In particolare, sono stati studiati e ottimizzati i seguenti quattro passaggi critici dell'intera procedura: l'estrazione dell'analita dalla matrice (confronto di tre metodi proposti in letteratura), la purificazione dell'estratto (mediante "clean up" su colonna impaccata con ossido di alluminio), la derivatizzazione dell'amminoacido per ottenere un composto volatile (ottimizzazione della derivatizzazione con etilcloroformato e successivo confronto con altra procedura di derivatizzazione proposta in letteratura) ed infine l'analisi gas-cromatografica con rivelatore a spettrometria di massa. Una volta ottimizzati i quattro passaggi critici della procedura di determinazione della selenometionina, è stato investigato il possibile utilizzo della Se-metilselenocisteina come standard di procedura, in modo da poter effettuare correzioni per le eventuali perdite durante i passaggi della procedura e/o per gli errori dovuti a parziale o non quantitativo recupero della selenometionina e/o del composto di derivatizzazione. La Se-metilselenocisteina è risultata avere comportamento assimilabile a quello della selenometionina nella fasi di purificazione, derivatizzazione e analisi gas cromatografica, ed è quindi risultata essere uno standard di procedura idoneo agli scopi prefissi.

Infine, la procedura ottimizzata è stata valutata su due materiali di riferimento per l'analisi di selenio nel lievito e nella farina di grano, preparati nell'ambito del Progetto Europeo SEAS ("Feasibility Studies for Speciated CRMs For Arsenic in Chicken, Rice, Fish and Soil and Selenium in Yeast and Cereal"). Tali materiali sono stati oggetto di uno studio interlaboratorio sulla speciazione del selenio tra diversi laboratori europei alla fine del 2002. La procedura ottimizzata ha consentito di ottenere risultati in ottimo accordo con quelli dello studio interlaboratorio nel caso del materiale di riferimento di farina di grano, mentre scarse prestazioni sono state ottenute nel caso del materiale di riferimento di lievito.

**23 Settembre 2004**

**CHIMICA ANALITICA E AMBIENTE**  
**Seconda sessione**

**Aula dei Filosofi**  
**Palazzo Centrale**

**9.50-11.10**

## TRASPORTO DI IDROCARBURI POLICICLICI AROMATICI E POLICLOROBIFENILI IN “FASE GASSOSA” VERSO LA LAGUNA DI VENEZIA

A. Gambaro<sup>1,2</sup>, L. Manodori<sup>1</sup>, R. Zangrando<sup>2</sup>, R. Piazza<sup>1</sup>, I. Moret<sup>1,2</sup>, G. Capodaglio<sup>1,2</sup>, P. Cescon<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Dipartimento di Scienze Ambientali, Università Ca' Foscari di Venezia, Dorsoduro, 2137. 30123, Venezia, Italy

<sup>2</sup>Istituto per la Dinamica dei Processi Ambientali, IDPA-CNR, Dorsoduro, 2137. 30123, Venezia, Italy.

L'aerosol atmosferico ha un ruolo fondamentale nel trasporto di inquinanti a livello globale e nel “global change” e può influire sulla salute umana. Recentemente diversi studi sono stati condotti in ambienti sottoposti a diverso grado di antropizzazione per la caratterizzazione chimica dell'aerosol atmosferico.

L'immissione diretta di scarichi industriali, gli scambi atmosfera-acqua, gli scambi acqua-sedimento e l'immissione di acque dolci sono i processi che maggiormente contribuiscono alla contaminazione della Laguna di Venezia. Recentemente sono state intraprese attività di ricerca finanziate dal CORILA (Consorzio per la Gestione del Centro di Coordinamento delle Attività di Ricerca inerenti il Sistema Lagunare di Venezia) con lo scopo di comprendere il ruolo svolto dall'aerosol nel trasporto di inquinanti verso il sistema lagunare veneziano. Nell'ambito di queste ricerche si inserisce questo studio sui Policlorobifenili (PCB) e sugli Idrocarburi Policiclici Aromatici (IPA) in fase “gassosa” in due stazioni della Laguna di Venezia (INDUSTRIALE e MARINA) e in una stazione sui colli Euganei presso Teolo (RURALE). La ricerca è stata condotta nell'arco di un anno allo scopo di:

- indagare l'evoluzione temporale e la variabilità spaziale della concentrazione di PCB e IPA nell'aerosol atmosferico;
- individuare le principali sorgenti di questi microinquinanti nell'aerosol atmosferico;
- stimare il flusso di microinquinanti organici trasportati dall'aerosol atmosferico entrante nella Laguna di Venezia dall'entroterra e dal mare Adriatico.

La metodologia analitica utilizzata consiste nel campionamento di aerosol con campionatori ad alto volume in grado di differenziare operativamente la frazione “particolata” e la frazione “gassosa” mediante filtri e un supporto in schiuma di poliuretano. L'estrazione è stata effettuata in Soxhlet utilizzando una miscela pentano-diclorometano (2:1 v.v.). L'estratto era purificato su una colonna di allumina-florisil. I PCB (54 congeneri) e gli IPA (16 composti) sono stati analizzati mediante gascromatografia-spettrometria di massa (HRGC-LRMS).

Per quanto riguarda la  $\sum$ PCB si osserva che la stazione INDUSTRIALE presenta una concentrazione media annua 3 volte superiore a quella rilevata nella stazione MARINA e 1,5 volte maggiore di quella rilevata nella stazione RURALE. Per quanto riguarda la  $\sum$ IPA la stazione RURALE presenta una concentrazione media 1,5 volte superiore a quella INDUSTRIALE e 5 volte superiore a quella MARINA. Per entrambe le classi di analiti si è potuto osservare un evidente andamento temporale legato alle varie sorgenti.

Per i PCB si è potuto osservare che in tutte le stazioni le concentrazioni più elevate si hanno nel periodo estivo, mentre le minori nel periodo invernale. La relazione con la temperatura è stata indagata evidenziando che:

- le tre stazioni sono influenzate da differenti sorgenti di PCB;
- la stazione RURALE presenta come omologo più abbondante quello dei triclorobifenili. Le sorgenti di PCB nell'aerosol in questa stazione possono essere individuate nelle emissioni lontane ed in un successivo trasferimento terrestre di PCB anche se emissioni locali secondarie non possono essere escluse;

- la stazione INDUSTRIALE presenta come omologo più abbondante quello dei pentaclorobifenili. Le sorgenti di PCB nell'aerosol in questa stazione possono essere individuate nelle emissioni dirette locali o in "vecchie" sorgenti secondarie;
- la stazione MARINA come la INDUSTRIALE presenta come omologo più abbondante quello dei pentaclorobifenili. Le sorgenti di PCB nell'aerosol in questa stazione possono essere individuate nelle emissioni lontane e nel trasferimento per lunghe distanze sopra il mare.

Per gli IPA si osserva che nel periodo invernale le concentrazioni sono elevate in tutte le stazioni, mentre nel periodo estivo nelle stazioni INDUSTRIALE e MARINA si hanno i valori minimi e i massimi nella RURALE. Lo studio della relazione con la temperatura ci ha permesso di avanzare le seguenti ipotesi:

- le tre stazioni sono influenzate da diverse tipologie di combustioni responsabili della presenza di IPA in atmosfera;
- nella stazione INDUSTRIALE e MARINA le emissioni industriali e dei mezzi di trasporto sono le principali fonti di IPA nei mesi più caldi (fine primavera, estate e primi di autunno), mentre nei mesi più freddi (fine autunno, inverno e prima primavera) gli IPA sono principalmente emessi in atmosfera dai sistemi di riscaldamento delle abitazioni;
- nella stazione URBANA gli IPA sono emessi principalmente dagli scarichi dei mezzi di trasporto in primavera e autunno, dalle combustioni di biomasse (principalmente incendi) in estate e dai sistemi di riscaldamento delle abitazioni in inverno.

Per stimare il contributo delle differenti sorgenti alla concentrazione di PCB e IPA nell'atmosfera della Laguna di Venezia è stato calcolato il flusso medio annuo per la stazione INDUSTRIALE e MARINA. I risultati hanno messo in evidenza che il flusso di PCB e IPA nella stazione INDUSTRIALE ( $10.9 \text{ mg m}^{-2} \text{ y}^{-1}$ ;  $191 \text{ mg m}^{-2} \text{ y}^{-1}$ ) è rispettivamente 8 e 9 volte maggiore di quello calcolato per la stazione MARINA ( $1.31 \text{ mg m}^{-2} \text{ y}^{-1}$ ;  $20.5 \text{ mg m}^{-2} \text{ y}^{-1}$ ).

Questi risultati hanno messo in evidenza che nel valutare le sorgenti di microinquinanti nell'atmosfera della Laguna di Venezia l'apporto del mare deve essere preso in considerazione.



## DEGRADAZIONE FOTOCATALITICA DI FENOLO E CLORODERIVATI ASSISTITA DA TENSIOATTIVI. CONTROLLO ANALITICO DEL PROCESSO

*Debora Fabbri, Alessandra Bianco Prevot, Edmondo Pramauro*

*Dipartimento di Chimica Analitica, Università di Torino, Via P. Giuria 5, 10125 Torino*

L'attenzione crescente verso le problematiche di bonifica ambientale ha portato allo sviluppo di processi in grado non solo di rimuovere selettivamente le molecole organiche inquinanti presenti nei comparti ambientali (acqua e suolo), ma di ottenere anche la loro completa distruzione. In tale prospettiva si colloca il tentativo di accoppiare la metodica estrattiva mediante soluzioni micellari, già impiegata nei processi di soil-washing, ad un successivo trattamento degradativo basato su processi di ossidazione avanzata. In particolare è stata applicata la tecnica di fotocatalisi eterogenea in presenza di sospensioni di  $\text{TiO}_2$ .

Nella presente ricerca è stata esaminata la degradazione di alcuni inquinanti fenolici, scelti quali composti aromatici modello (fenolo, 2,5-diclorofenolo e 2,4,5-triclorofenolo), valutando l'effetto del tensioattivo cationico bromuro di cetiltrimetilammonio (CTAB) sul processo.

Gli esperimenti di irraggiamento sono stati eseguiti prima su soluzioni acquose dei singoli composti (in concentrazione  $2 \times 10^{-4}$  M) e successivamente in presenza di concentrazioni crescenti di tensioattivo, sia al di sotto che al di sopra della concentrazione critica micellare. Si è operato in presenza di sospensioni di  $\text{TiO}_2$  (400 mg/L), in un reattore fotochimico anulare dotato di lampada a vapori di mercurio a media pressione da 125 W.

L'andamento del processo primario è stato seguito mediante analisi HPLC della sospensione irraggiata. Si è altresì seguita, via IC, l'evoluzione del  $\text{Cl}^-$ , prodotto residuale di mineralizzazione del substrato.

Si è osservato che la diversa idrofobicità dei substrati determina un comportamento significativamente diverso nelle degradazioni condotte in presenza del CTAB. Nel caso dei composti più idrofilici la presenza del tensioattivo rallenta la velocità di degradazione, fenomeno spiegabile sulla base della competizione per i siti attivi da parte del tensioattivo, che si degrada a sua volta. Per il 2,4,5-triclorofenolo, composto più idrofobico, si osserva invece un notevole aumento della velocità di degradazione in presenza del tensioattivo.

La formazione di microstrutture organizzate (admicelle) sulla superficie delle particelle di semiconduttore è alla base dei fenomeni osservati. In particolare la più spiccata tendenza dei composti idrofobici a legarsi con tali strutture determina l'incremento della loro concentrazione locale sul catalizzatore, favorendone l'attacco da parte delle specie ossidanti radicaliche originate dall'interazione semiconduttore/luce. Per concentrazioni di tensioattivo superiori a quella critica micellare si osservano effetti cinetici meno favorevoli, imputabili alla ripartizione dell'inquinante tra il tensioattivo adsorbito e gli aggregati micellari.

Operando in condizioni di pH che sfavoriscono l'adsorbimento del CTAB sul  $\text{TiO}_2$  si è osservato un forte rallentamento della velocità di degradazione, a conferma del ruolo cruciale svolto dalle strutture admicellari.

I risultati ottenuti confermano la fattibilità del trattamento degradativo proposto in presenza di tensioattivi cationici anche a concentrazioni superiori alla c.m.c., condizioni che si verificano spesso nel trattamento dei reflui di lavaggio di fasi ambientali contaminate con soluzioni micellari.

## **CARATTERIZZAZIONE CHIMICA DELL'AEROSOL ATMOSFERICO NELL'AREA FIORENTINA: VALUTAZIONE DELLE FONTI ANTROPICHE E NATURALI NELLE DIFFERENTI CLASSI DIMENSIONALI DEL PARTICOLATO**

*A. Mannini, S. Becagli, S. Bellandi, S. Benassai, I. Fattori, M. Innocenti, R. Udisti*

*Dipartimento di Chimica, Università degli Studi di Firenze,  
via della Lastruccia 3, 50019 Sesto Fiorentino (FI)*

L'effetto dell'aerosol atmosferico sugli equilibri naturali, sulla salute degli esseri viventi, sulla degradazione dei materiali, sulla trasparenza dell'atmosfera (proprietà ottiche) e sul clima dipende dalla composizione chimica e dalla distribuzione dimensionale delle particelle che lo compongono. In particolare, le particelle micrometriche e sub-micrometriche esercitano un forte impatto sulla qualità dell'aria e sulla salute umana.

In questo ambito, vengono presentati i risultati della caratterizzazione chimica e fisica del particolato atmosferico campionato con selezione dimensionale a Sesto Fiorentino (FI), un'area cittadina caratterizzata da attività commerciali e industriali. La selezione dimensionale del particolato è stata effettuata attraverso l'uso di campionatori a cut-off predefinito (PM10 e PM2.5, secondo le norme EN 12341) e di impattori sequenziali multistadio (8 classi dimensionali da 10 a 0.4  $\mu\text{m}$ ).

L'effettiva distribuzione delle particelle nelle classi dimensionali nominali è stata verificata attraverso la microscopia a forza atomica (AFM). Tale tecnica, appartenente ai metodi di microscopia a scansione di sonda, consente la ricostruzione della topografia della superficie dei filtri permettendo di valutare la morfologia e l'estensione superficiale delle singole particelle raccolte.

L'analisi chimica del particolato atmosferico è stata effettuata mediante le tecniche di cromatografia ionica (determinazione del contenuto ionico) e di spettroscopia di Assorbimento Atomico con fornetto di grafite (GFAAS) (analisi di selezionati metalli pesanti). Per la determinazione dei metalli, il trattamento di una porzione dei filtri con  $\text{HNO}_3$  a  $\text{pH} = 2$  in bagno ad ultrasuoni ha permesso la determinazione della frazione solubilizzabile nelle condizioni di estrazione.

Il data-set così ottenuto ha permesso di individuare trend stagionali e/o annuali per alcuni componenti naturali e antropici e di valutare l'influenza degli eventi meteorologici, quali vento e pioggia, sulle variazioni del carico e della composizione del particolato atmosferico.

La composizione chimica dell'aerosol atmosferico campionato a Sesto Fiorentino è stata confrontata con quella relativa a un sito a basso impatto antropico locale (area forestale di Monte Morello, 750 m s.l.m.). Tale stazione, posta a una distanza in linea d'aria di circa 15 km dal centro di Firenze e a circa 7 km da quello di Sesto F.no, può essere considerata rappresentativa di un aerosol di background urbano (al di sopra dello strato di inversione termica dell'area fiorentina).

Un'analisi statistica multivariata (PCA – Principal Component Analysis) ha permesso di individuare comuni sorgenti (spray marino, erosione crostale, emissioni antropiche) o simili processi di trasporto per alcune classi di componenti, determinandone il contributo relativo nelle differenti classi dimensionali.

# VALUTAZIONE DELL'IMPATTO AMBIENTALE DI CENERI LEGGERE DERIVANTI DA IMPIANTI DI TERMODISTRUZIONE DI RIFIUTI SOLIDI URBANI

*R. Fuoco, A. Ceccarini, Y. Wei, S. Giannarelli, A. Brongo, S. Francescani*

*Dipartimento di Chimica e Chimica Industriale  
Via Risorgimento, 35 - 56126 Pisa (Italy)*

## **Abstract**

L'impatto ambientale di ceneri leggere provenienti da un impianto di termodistruzione di rifiuti solidi urbani (RSU) è stato valutato sulla base del contenuto di metalli tossici (Pb, Cu e Cd) ed inquinanti organici (idrocarburi policiclici aromatici, policlorobifenili e pesticidi clorurati). Le determinazioni analitiche sono state condotte sia sui campioni tal quali che sulla soluzione utilizzata per le prove di rilascio, effettuate secondo la procedura IRSA-CNR. Al fine di valutare l'effetto del processo di inertizzazione e solidificazione sul rilascio di sostanze inquinanti, sono stati confrontati due diversi processi: il primo basato sull'impiego di miscele a base di cemento Portland, ed il secondo di miscele a base di resine poliestere. I risultati ottenuti hanno permesso di evidenziare le prestazioni nettamente migliori delle resine sia in termini di rilascio degli inquinanti che di caratteristiche meccaniche, a fronte di un modesto aumento di peso di circa il 25 %.

**Giovedì 23 Settembre 2004**

**CHIMICA ANALITICA E SCIENZE FORENSI**

**Aula Magna  
Palazzo Centrale**

**11.30-12.10**

## ESTRAZIONE ED IDENTIFICAZIONE MEDIANTE GC-MS DI PRINCIPI PSICOATTIVI DA MATRICI DI ORIGINE NATURALE

*Cristiana Melchioni<sup>a</sup>, Guido Persico<sup>b</sup>, Egidio Lumaca<sup>a</sup>, Serena Detti<sup>a</sup>, Valter Fraioli<sup>a</sup>, Giuseppe Pandolfi<sup>a</sup>*

<sup>a</sup>*Direzione Centrale Polizia Criminale – Servizio Polizia Scientifica – Sezione Indagini sulle Droghe d’Abuso - viale dell’Aeronautica 7, 00144 ROMA*

<sup>b</sup>*Gabinetto Interregionale di Polizia Scientifica per la Campania ed il Molise - Laboratorio Indagini Chimiche - via Medina 75, 80100 NAPOLI*

Hanno nomi latini, costano molto ma alcune di esse sono perfettamente legali. Sono le nuove-vecchie droghe naturali, in vendita in tutta Italia in negozietti molto eleganti che si chiamano genericamente smart-shop, nonché acquistabili on-line attraverso svariati siti Internet.

Contengono principi attivi di origine vegetale ed hanno effetti per lo più di tipo allucinogeno: chi li assume parte per il cosiddetto *trip*, un viaggio fantastico, extracorporale, in cui immagini e sensazioni di grande impatto emotivo, spesso anche angoscianti e brutali, si susseguono a ritmo vertiginoso. In preda al delirio onirico il “viaggiatore” non è più padrone di se stesso, con conseguenze non facilmente immaginabili.

Nell’antichità, ed ancora oggi in civiltà tribali, queste droghe erano già al centro di tradizionali riti ed usanze celebrative; oggi, in una temperie culturale in cui vi è un rinnovato interesse per tutto ciò che è “naturale”, sono tornate ad esser di largo consumo le “smart drugs” quali la *Salvia divinorum*<sup>1</sup>, i funghi del genere *Psilocybe*<sup>2</sup> e semi tra i più vari alcuni dei quali come quelli di *Argyreia nervosa* o di *Ipomea violacea*<sup>3</sup> con effetti decisamente violenti.

I gravi problemi individuali e sociali connessi al consumo hanno sensibilizzato le istituzioni nazionali circa la necessità di sottoporre molte di queste sostanze al controllo della legge, prevedendone il loro inserimento nelle tabelle delle sostanze proibite allegate al T.U. 309/90 in materia di disciplina delle sostanze stupefacenti e psicotrope.

Di fronte a questa nuova emergenza, la Polizia Scientifica si trova in prima linea nel dover dare risposte rapide e certe a quanti, forze dell’ordine e magistratura, operano sequestri di sostanze ad azione stupefacente su tutto il territorio nazionale. E’ necessario pertanto disporre di procedure veloci e semplificate sia per quanto riguarda l’estrazione dei principi attivi, che per l’applicazione di metodologie analitiche qualitative e quantitative.

Nei nostri laboratori di Polizia Scientifica abbiamo adottato semplici metodiche che consentono una estrazione selettiva e quantitativa dei principi attivi dalle complesse matrici vegetali, nonché metodi rapidi per la loro determinazione mediante analisi in gascromatografia e spettrometria di massa.

In questo lavoro riportiamo le procedure da noi sviluppate per l’estrazione e per l’identificazione della salvinorina A e dell’ergolina, principi attivi rispettivamente della *Salvia divinorum* e dell’ *Argyreia nervosa*, e della psilocina, alcaloide indolico presente nei funghi allucinogeni appartenenti al genere *Psilocybe*.

### Bibliografia

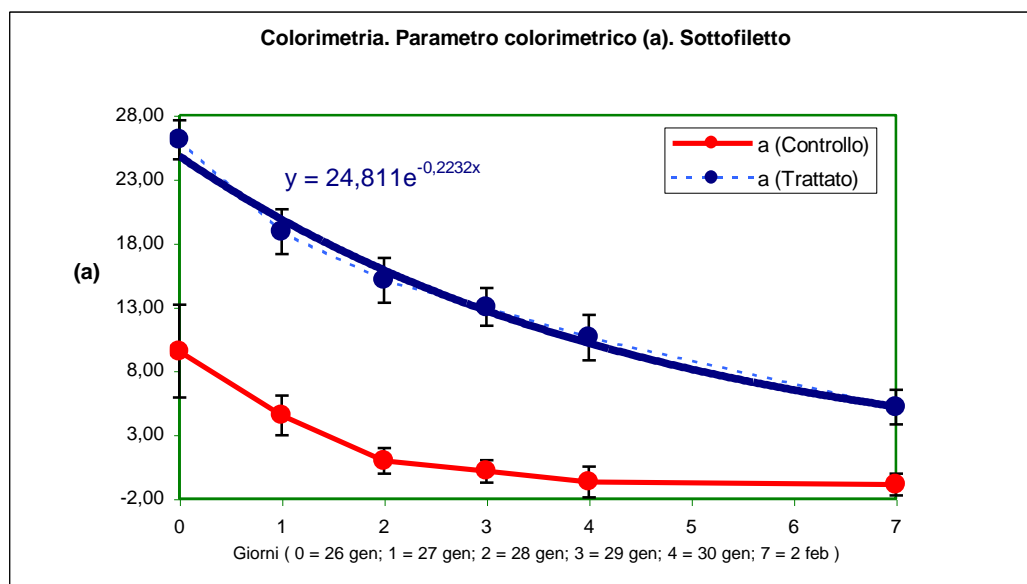
1. D.J. Sheffler and B.L. Roth, *TRENDS in Pharmacological Sciences* **2003**, 24 (3), 107.
2. S.T. Gross, *Journal of Forensic Sciences* **2002**, 47 (6), 1298.
3. J.M. Chao, A.H. Der Marderosian, *Journal of Pharmaceutical Sciences* **1973**, 62 (4), 588.

## INDAGINE ANALITICA SUL TRATTAMENTO ILLECITO DELLE CARNI CON MONOSSIDO DI CARBONIO

Marco Vincenti, Marco Pazzi

Dipartimento di Chimica Analitica, Università di Torino

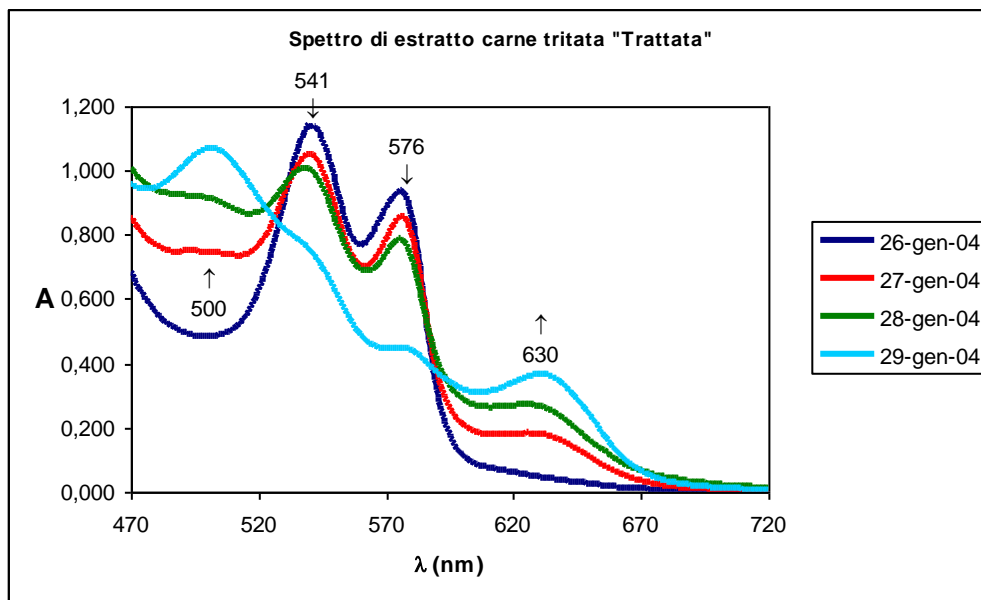
Il monossido di carbonio introdotto illecitamente nelle confezioni sigillate di carne si ripartisce nel tempo per reazione con i tessuti muscolari superficiali della carne, per formare la carbossimioglobina, assai più stabile (25 volte) dell'ossimioglobina. Col trascorrere del tempo dal momento della macellazione (o dallo scongelamento) l'ossimioglobina si ossida per formare metamioglobina. Analogo processo avviene per la carbossimioglobina, se viene rimossa l'atmosfera di monossido di carbonio. Ossimioglobina e carbossimioglobina hanno forte colorazione rossa, data dall'interazione del complesso di ferro (II) dell'eme con le molecole di gas ( $O_2$  oppure  $CO$ ), diversamente dalla metamioglobina, di colore giallo-bruno. Il colorimetro è uno strumento capace di determinare le coordinate di colore degli oggetti sottoposti ad analisi. La misura viene effettuata appoggiando la testa piatta della sonda di rilevamento alla superficie della quale si voglia misurare il colore. Il segnale emesso viene rielaborato, ed eventualmente mediato dopo una serie di letture in punti differenti della superficie in esame. Rispetto alle tecniche spettrali, l'analisi colorimetrica ha il pregio di definire quantitativamente il punto di colore dell'oggetto studiato. Il sistema di coordinate intuitivamente più semplice è costituito dai parametri (L, a, b). Il parametro "L" definisce la luminosità globale dell'oggetto, i parametri "a" e "b" definiscono antipodi di colore, dove alti valori positivi e negativi di "a" sono associati al colore rosso e al colore verde, mentre alti valori positivi e negativi di "b" sono associati rispettivamente ai colori giallo e blu.



Abbiamo effettuato misure colorimetriche con cadenza quotidiana, a partire dal giorno in cui i campioni surgelati sono stati scongelati e posti in frigorifero alla temperatura di  $+4^{\circ}C$ . La prima misura è stata effettuata al termine del processo di scongelamento mentre le misure dei giorni successivi sono state effettuate sulle medesime confezioni aperte e conservate in frigorifero in atmosfera naturale. La figura riporta l'andamento nel tempo della coordinata "a" per il campione di sottofiletto "Trattato" e per quello di "Confronto". I punti sperimentali sono riportati con gli intervalli di errore, rappresentati dalla deviazione standard. Si possono

effettuare le seguenti considerazioni: (1) l'intensità del colore rosso, definito quantitativamente dalla coordinata "a", già al momento dello scongelamento è più che doppio per la carne trattata con monossido di carbonio rispetto a quella non trattata; (2) dopo quattro giorni dallo scongelamento e dall'apertura della confezione, la carne trattata con CO mantiene un colore rosso più vivo di quello che aveva la carne non trattata al momento dello scongelamento; (3) dopo sette giorni in frigorifero la carne trattata mantiene ancora un netto colore rosso, benché tendente al bruno, paragonabile a quello che ha la carne non trattata dopo un solo giorno di frigorifero; (4) la carne non trattata acquista un netto colore marrone-bruno già al secondo giorno di conservazione, che si accentua successivamente. I punti sperimentali, relativi al campione "Trattato" sono interpolati con una funzione esponenziale, che modella la dinamica del rilascio del monossido di carbonio dalla mioglobina. Considerazioni analoghe valgono per campioni di carpaccio e di carne trita.

Per osservare l'evoluzione nel tempo dei processi ossidativi da ossi- e carbossi-mioglobina a meta-mioglobina da un altro punto di vista, abbiamo effettuato una serie di estrazioni dai campioni di carne tritata, in giorni consecutivi, e di questi estratti abbiamo registrato gli spettri di assorbimento nel visibile, dopo opportuna filtrazione e diluizione.



Per quanto si riferisce ai campioni trattati, il profilo spettrale relativo al giorno 26 gennaio corrisponde a quello della carbossi-emoglobina pura, con picchi netti e ben distinti a 541 e 576 nm. Il fatto che lo spettro della carbossiemoglobina sia estremamente simile a quello della ossiemoglobina fa sì che la carne trattata con monossido di carbonio simuli un colore naturale. Gli spettri relativi ai giorni 27 e 28 gennaio confermano la persistenza della carbossimioglobina negli estratti, anche se i picchi tipici della metamioglobina (500 e 630 nm) tendono a crescere nel tempo e manifestano la progressiva ossidazione della carbossimioglobina. Lo spettro del 29 gennaio denuncia la quasi completa trasformazione della carbossimioglobina in metamioglobina.

Oltre alle analisi colorimetriche e spettrofotometriche citate, sono state effettuate analisi in riflettanza, unitamente a determinazioni spettrofotometriche nell'infrarosso e a determinazioni gascromatografiche. L'insieme di queste tecniche ha permesso di delineare un quadro conoscitivo completo e a pervenire a conclusioni certe riguardo al potenziale rischio sanitario associato al trattamento delle carni con monossido di carbonio.

**Giovedì 23 Settembre 2004**

**CHIMICA ANALITICA E AMBIENTE**  
**Terza sessione**

**Aula dei Filosofi**  
**Palazzo Centrale**

**11.30-12.10**



## NITRAZIONE ED IDROSSILAZIONE DEL BENZENE IN PRESENZA DI NITRITO IN SOLUZIONE ACQUOSA

*Davide Vione, Valter Maurino, Claudio Minero, Mirco Lucchiari, Ezio Pelizzetti*

*Dipartimento di Chimica Analitica, Università di Torino, Via P. Giuria 5, 10125 Torino  
www.environmentalchemistry.unito.it      www.abcr.org.it      davide.vione@unito.it*

I nitroderivati aromatici sono inquinanti che destano preoccupazione a causa della loro tossicità e mutagenicità. Nel campo della chimica dell'atmosfera i più importanti composti appartenenti a questa classe sono i nitroderivati degli idrocarburi policiclici aromatici (nitro-PAH), mutageni [1,2] ed i nitrofenoli, fitotossici e responsabili di danni alla vegetazione in aree inquinate [3,4]. I composti citati sono in parte emessi direttamente in seguito ai processi di combustione, tuttavia i dati disponibili indicano che la frazione principale si forma in atmosfera dopo l'emissione dei substrati da cui derivano (PAH e fenoli) [3,5-7]. La nitrificazione degli idrocarburi aromatici in atmosfera può avvenire in fase gas (ad opera di  $\bullet\text{OH} + \bullet\text{NO}_2$  o di  $\bullet\text{NO}_3 + \bullet\text{NO}_2$  [1,2]) od in fase condensata, a livello dell'aerosol, in presenza di  $\bullet\text{NO}_2 + \text{HNO}_3$  [8],  $\bullet\text{NO}_3 + \bullet\text{NO}_2$  [9],  $\text{N}_2\text{O}_5$  e  $\text{ClNO}_2$  [6]. Di particolare interesse sono anche le reazioni che avvengono in presenza di nitrato e nitrito, al buio e sotto irradiazione. Tali processi sono stati particolarmente studiati nel caso dei composti fenolici [10,11]. Lo ione nitrito svolge un ruolo importante nella fotochimica della fase acquosa in atmosfera e studi sul campo hanno dimostrato che la fotolisi di  $\text{NO}_2^-$  può essere la principale sorgente di radicali  $\bullet\text{OH}$  nella fase acquosa atmosferica in aree inquinate [12,13].

Lo ione nitrito assorbe la radiazione UV con un massimo di assorbimento vicino a 360 nm. La fotolisi porta alla formazione di specie radicaliche quali  $\bullet\text{OH}$ ,  $\bullet\text{NO}$  ed  $\bullet\text{NO}_2$ . Anche l'acido nitroso è in grado di dare origine a reazioni analoghe, avendo inoltre una resa quantica di fotolisi superiore [12].



Nel lavoro qui riportato si è studiata la trasformazione del benzene in presenza di nitrito sotto irradiazione UV. In tali condizioni i principali intermedi di reazione identificati sono fenolo, nitrobenzene, 2-nitrofenolo e 4-nitrofenolo. I nitrofenoli potrebbero derivare dalla nitrificazione del fenolo o dall'idrossilazione del nitrobenzene. Occorre però osservare che l'idrossilazione del nitrobenzene produce anche l'isomero 3-nitrofenolo in concentrazione rilevante, laddove la nitrificazione del fenolo per fotolisi del nitrito genera 2- e 4-nitrofenolo nel rapporto 60:40, compatibile con quello osservato a partire dal benzene [11]. Si può così concludere che, in presenza di benzene e nitrito sotto irradiazione, i nitrofenoli sono prodotti per nitrificazione del fenolo.

La formazione di fenolo dal benzene avviene ad opera del radicale  $\bullet\text{OH}$ , il quale si addiziona al benzene per dare l'intermedio di addizione idrossicicloesadienile. Quest'ultimo subisce poi cattura di un atomo di idrogeno da parte dell'ossigeno molecolare per produrre fenolo ed idroperossido. È interessante notare che la formazione del fenolo è fortemente inibita in assenza di ossigeno e che un eccesso di nitrito ( $[\text{NO}_2^-] > 0.01 \text{ M}$ ) sottrae radicali ossidrilici in soluzione (reazione 2), diminuendo la velocità di formazione del fenolo.

La nitrificazione del benzene non sembra avvenire per reazione con il biossido di azoto ( $\bullet\text{NO}_2/\text{N}_2\text{O}_4$ ), a differenza di quanto osservato per il fenolo [11]. Occorre notare che la

formazione del biossido di azoto per fotolisi del nitrito necessita l'azione intermedia di un radicale ossidrilico (reazione 2) e che l'aggiunta di scavenger di  $\bullet\text{OH}$  (2-propanolo, t-butanolo) dovrebbe inibire un processo mediato da  $\bullet\text{NO}_2/\text{N}_2\text{O}_4$ . La nitrificazione del benzene non è tuttavia inibita in presenza di 2-propanolo o t-butanolo, il che sembra escludere il biossido di azoto come specie nitrificante. È più probabile che la formazione del nitrobenzene avvenga ad opera di una specie quale  $\text{NO}_2^*$ , la cui formazione per irradiazione del nitrito non richiede l'azione intermedia del radicale ossidrilico. Il fatto che la nitrificazione del benzene per fotolisi del nitrito non sia inibita dalla presenza di scavenger di radicali ossidrilici ha un notevole significato dal punto di vista ambientale. Nelle acque naturali, sia superficiali che atmosferiche, la presenza di composti che reagiscono con i radicali  $\bullet\text{OH}$  (principalmente materia organica e ioni  $\text{HCO}_3^-$ ) tende a diminuirne la concentrazione. In tali condizioni, in presenza di nitrito sotto irradiazione, processi di nitrificazione che richiedono la presenza di  $\bullet\text{NO}_2/\text{N}_2\text{O}_4$  (e quindi di radicali  $\bullet\text{OH}$ , reazioni 2,4) vengono inibiti [11]. Non ci si deve invece attendere un effetto di inibizione per la nitrificazione di composti che hanno un comportamento analogo al benzene.

I risultati sperimentali ottenuti permettono anche di valutare la velocità di formazione dei nitrofenoli a partire dal fenolo nella fase acquosa atmosferica, in presenza di nitrito sotto irradiazione. Per livelli di nitrito e fenolo tipici di aree inquinate (fenolo  $10^{-6}$  M [6], il nitrito può raggiungere  $10^{-4}$  M [13]), valori di concentrazione dei nitrofenoli pari a  $10^{-8} - 10^{-9}$  M [6] possono essere raggiunti in 1-10 ore, un tempo più che ragionevole per quanto riguarda la permanenza degli aerosol in atmosfera. Questo significa che la fotolisi del nitrito può essere una fonte importante di nitrofenoli, composti fitotossici, in aree inquinate.

- [1] Atkinson, R.; Arey, J. *Environ. Health Persp.* **1994**, *102*, 117.
- [2] Finlayson-Pitts, B. J.; Pitts Jr., J. N. *Science* **1997**, *276*, 1045.
- [3] Lüttke, J. et al. *Atmos. Environ.* **1997**, *16*, 2637.
- [4] Blank, L. W. *Nature* **1985**, *314*, 311.
- [5] Pitts Jr., J. N.; Arey, J.; Zielinska, B.; Winer, A. M.; Atkinson, R. *Atmos. Environ.* **1985**, *19*, 1601.
- [6] Lüttke, J.; Levsen, K.; Acker, K.; Wieprecht, W.; Möller, D. *Int. J. Environ. Anal. Chem.* **1999**, *74*, 69.
- [7] Belloli, R.; Barletta, B.; Bolzacchini, E.; Meinardi, S.; Orlandi, M.; Rindone, B. *J. Chromatogr. A* **1999**, *846*, 277.
- [8] Wang, H.; Hasegawa, K.; Kagaya, S. *Chemosphere* **1999**, *39*, 1923.
- [9] Barletta, B.; Bolzacchini, E.; Meinardi, S.; Orlandi, M.; Rindone, B. *Environ. Sci. Technol.* **2000**, *34*, 2224.
- [10] Machado, F.; Boule, P. *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.* **1995**, *86*, 73.
- [11] Vione, D.; Maurino, V.; Minero, C.; Pelizzetti, E. *Chemosphere* **2001**, *44*, 237; **2001**, *45*, 893; **2001**, *45*, 903; **2004**, *55*, 941; *Environ. Sci. Technol.* **2002**, *36*, 669; **2003**, *37*, 4635; *Ann. Chim. (Rome)* **2002**, *92*, 919; *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2003**, *10*, 321.
- [12] Arakaki, T.; Miyake, T.; Hirakawa, T.; Sakugawa, H. *Environ. Sci. Technol.* **1999**, *33*, 2561.
- [13] Anastasio, C.; McGregor, K. G. *Atmos. Environ.* **2001**, *35*, 1079.

## ANALYSIS OF FISH BILE WITH DNA-BASED BIOSENSOR FOR THE ASSESSMENT OF ENVIRONMENTAL POLLUTION IN THE NORTH SEA

*Graziana Bagni<sup>1\*</sup>, Silvia Hernandez<sup>1,2</sup>, Thierry Baussant<sup>3</sup>, Marco Mascini<sup>11</sup>*

*Department of Chemistry, University of Florence, Via della Lastruccia 3, 50019 Sesto Fiorentino (FI), Italy*

*Department of Chemistry, National University of Littoral,- University Campus, 3000 Santa Fe, Argentina*

*RF - Rogaland Research, Akvamiljø as. Mekjarvik 12, N-4070 Randaberg, Norway*

DNA based biosensors represent a new research field with interesting possibilities for practical application in various fields such as environmental and medical screening. Many molecules show a high affinity for DNA and they can interact with the nucleic acids immobilised on the electrode surface. The interactions between DNA and environmental pollutants can cause chemical and conformational modifications of nucleic acids and thus variation of the electrochemical properties of DNA. The presence of these compounds is measured by their effect on the guanine base: the changes in oxidation of the guanine peak, obtained by a square wave voltammetric scan, is used as analytical signal [1].

Measurement of contaminants or their metabolites in bile of fish were exploited in this research. A rapid and low cost device, based on electrochemical DNA biosensor, is proposed as a screening tool for the detection of PAH exposure at contaminated sites. PAH exposure in marine organisms is often assessed by measuring the concentration of PAHs in their tissues. However, fish caught at highly polluted sites often showed only trace levels of PAHs in the tissue, due to their ability to metabolise these compounds. Laboratory studies have demonstrated that the presence of PAH metabolites in bile is well correlated with levels of exposure [2], as the gallbladder bile is a major excretion route for PAH in fish. After biotransformation, PAH metabolites are excreted into the bile and concentrated. Thus, the bile can be used as an indicator of PAH exposure.

Preliminary studies with PAH metabolites standard solution were performed, using naphthalene, phenantrene, pyrene and benzo[a]pyrene hydroxy or dihydroxy as model compounds. The effect of these compounds on the surface-confined DNA was found to be linearly related to the concentration of the PAH derivative in solution and correlated to the ring number of the molecule. Then, the DNA biosensor was used to investigate the genotoxic effect due to the presence of PAH metabolites in fish bile samples. Two different sample groups were analysed: bile analysis of fish injected with a single PAH and fish caught bile samples at different sampling sites in the North Sea. A one-way analysis of variance (ANOVA) was used to compare between the different sample groups. When the ANOVA indicated that significant differences existed, Fisher's multiple comparison test was then used. Dunnett's test was used to determine the significance of differences between the reference sample groups and the control (blank assay) group. A significance level of  $P < 0.05$  was applied in all statistical tests. The results demonstrated that the sampling sites presented different pollution levels and that the PAH derivative presented different genotoxic effect.

The results obtained with the biosensor analysis were compared with fixed wavelength fluorescence (FF) at the excitation/emission wavelengths of pyrene (340/380nm) and benzo[a]pyrene (380/430nm) and a good correlation was found.

[1] Lucarelli F., Authier L., Bagni, G., Baussant T., Aas E., Marrazza G., Mascini M., *Anal. Lett.*, 36, 9, 1887-1901 (2003).

[2] Lin E.L.C., Cormier S.M., Torsella J., *Ecotox. and Env. Safety*, 35, 16-23 (1996).

\* *CORRESPONDING AUTHOR: E-mail: graziana.bagni@unifi.it, Ph: +39-055-4573311, Fax: +39-055-4573384*

**Giovedì 23 Settembre 2004**

**Conferenza Plenaria**

*L. Garofano,  
Raggruppamento Carabinieri Investigazioni Scientifiche  
Parma*

**STATO DELL'ARTE E PROSPETTIVE DELLA CHIMICA ANALITICA NELLE  
SCIENZE FORENSI**

**Aula Magna  
Palazzo Centrale**

**12.10**

*L. Garofano,  
Raggruppamento Carabinieri Investigazioni Scientifiche  
Parma*

**STATO DELL'ARTE E PROSPETTIVE DELLA CHIMICA ANALITICA NELLE  
SCIENZE FORENSI**

## **COMUNICAZIONI POSTER**

### **SPETTROSCOPIA ANALITICA**

**SVILUPPO E APPLICAZIONE DI UNA METODICA ANALITICA CV-AAS  
PER LA DETERMINAZIONE DI MERCURIO IN MATRICI MARINE**

*Paola Rivaro, M. Luisa Abelmoschi, Carmela Ianni, Francesco Soggia*

*Sezione di Chimica Analitica e Ambientale*

*– Dipartimento di Chimica e Chimica Industriale – Università di Genova, Genova*

Il ciclo biogeochimico del mercurio in ambiente marino è un argomento di grande interesse. Grazie a diversi processi e reazioni, infatti, questo elemento può essere trasferito facilmente nell'ecosistema, subire diverse trasformazioni ed essere assimilato dalle specie viventi.

La tossicità del mercurio è legata al bioaccumulo e alla biomagnificazione lungo la catena alimentare.

In questa comunicazione vengono presentati i risultati di esperimenti in cui, riproducendo condizioni tipiche di un sito inquinato da mercurio, sono state valutate sia la capacità di accumulo di Hg inorganico da parte di esemplari di molluschi bivalvi (*Mytilus galloprovincialis*) sia la ripartizione del metallo in sedimenti e acqua di mare. Questo punto costituisce una novità in studi di mesocosmo rispetto a lavori riportati in letteratura, nei quali viene valutato unicamente il bioaccumulo.

Per poter effettuare esperimenti di questo tipo, con determinazione del mercurio a diversi livelli di concentrazione in diversi tipi di matrici (acqua, sedimenti, organismi), è necessario disporre di un metodo analitico affidabile, sensibile e versatile. E' stata pertanto sviluppata e ottimizzata una metodica per la determinazione del mercurio mediante spettroscopia di assorbimento atomico con generazione di vapori freddi (CV-AAS).

Al fine di determinare le condizioni per ottenere la maggiore sensibilità e riproducibilità del sistema, insieme ad una attestata accuratezza dei dati, diversi parametri (concentrazione di SnCl<sub>2</sub>, NaBH<sub>4</sub> e di HCl, utilizzati nel sistema di generazione dei vapori freddi, e flusso del campione) sono stati ottimizzati mediante disegno sperimentale (central composite design) per l'ottenimento del maggior numero di informazioni sulle variabili con un numero limitato di esperimenti.

Le condizioni ottimali per l'analisi sono state ottenute impiegando SnCl<sub>2</sub> a concentrazione 15% (m/v), HCl 3.5 e un flusso di campione pari a 2 ml/minuto. Il ricorso alla formazione dell'amalgama con oro ha consentito la determinazione di Hg a livelli inferiori al ppb (D.L. 0.2 µg/l); il sistema di preconcentrazione è risultato stabile per circa 400 atomizzazioni.

Tali condizioni garantiscono inoltre il massimo segnale analitico nell'analisi del Hg in tutte le matrici studiate (acqua di mare, sedimenti, organismi).

I risultati ottenuti nel corso degli esperimenti hanno permesso di valutare che, considerando le perdite verso l'atmosfera, si hanno percentuali di accumulo negli organismi e nel sedimento pari, rispettivamente, al 34 e al 39 %, confermando l'elevata reattività del mercurio nell'ecosistema marino.



**ALCUNE OSSERVAZIONI SULLA DETERMINAZIONE DEL FERRO NEI VINI  
MEDIANTE ETA-AAS ZEEMAN SENZA TRATTAMENTI PRELIMINARI**

Marco Taddia,\* Bénédicte Valloton\*\*

\*Dipartimento di Chimica “G. Ciamician”, Università di Bologna,

Via F. Selmi 2, I-40126 Bologna

\*\*Haute Ecole Valaisanne, Route du Rawil 47, CH-1950 Sion (Svizzera)

Questo lavoro si inserisce in una ricerca più ampia dedicata alla caratterizzazione geografica dei vini del Cantone Vallese, che prevede il confronto fra le caratteristiche dei suoli delle zone di origine e l'individuazione di possibili elementi marcatori nei vini stessi. Dopo un'analisi esplorativa effettuata tramite ICP-MS (spettrometria di massa con sorgente di ionizzazione al plasma accoppiato induttivamente), il primo elemento preso in considerazione per uno studio più approfondito è stato il ferro. Al di là dei motivi di carattere geologico che hanno determinato questa scelta, è ben noto che tale elemento esercita una notevole influenza sulla qualità dei vini, perciò non vi è da stupirsi se la letteratura analitica è particolarmente ricca di studi sull'argomento, inclusi quelli di speciazione [1]. La spettrometria di assorbimento atomico con atomizzazione in fiamma (FAAS) è forse la tecnica più utilizzata per la determinazione del ferro nei vini. Ciò dipende dal fatto che, in linea di massima, il vino si può nebulizzare direttamente in fiamma dopo diluizione con acqua ed etanolo e la concentrazione incognita può venire ricavata dal confronto con standard nel medesimo solvente. Questo tipo di procedura è previsto, ad esempio, nei metodi ufficiali di analisi AOAC [2], mentre in quelli CEE [3] è richiesta una preliminare eliminazione dell'alcool. Il contenuto in ferro nei vini commerciali e domestici è piuttosto variabile. Dipende, oltre che dai terreni, dai trattamenti subiti e dalle modalità di conservazione. I valori indicativi per i vini svizzeri vanno da 3 a 8 mg L<sup>-1</sup> per i bianchi e rosati, a 3-10 mg L<sup>-1</sup> per i rossi. La tecnica FAAS, che a 248,3 nm presenta una sensibilità ( $A=0,0044$ ) pari a 100 µg L<sup>-1</sup> può rivelarsi inadeguata all'analisi dei campioni a più basso tenore in ferro, diluiti 1+9 secondo il metodo AOAC. A questo proposito va ricordato che la diluizione è necessaria sia per la presenza di complessanti del ferro come l'acido tartarico, l'acido citrico e altri acidi organici, che di carboidrati (glucosio, fruttosio, arabinosio, xilosio, galattosio e sorbitolo). Per tali motivi, è stato giustamente ricordato che l'analisi FAAS per la determinazione del Fe nel vino può presentare numerose interferenze e che il contenuto in Fe totale (incluso quello legato ai tannini) richiede una preventiva mineralizzazione del campione con agenti ossidanti [1]. Il ricorso alla spettrometria di assorbimento atomico con atomizzazione elettrotermica (ETA-AAS) può risultare più conveniente, sia in termini di limiti di rivelabilità, che di semplificazioni procedurali, in quanto la mineralizzazione può venire sostituita da un programma di trattamento termico adeguato. La versione che impiega la correzione del segnale di fondo basata sull'effetto Zeeman (ETA-AAS Zeeman) è particolarmente adatta all'analisi diretta di matrici alimentari, così come dimostrano anche le prime rassegne sull'argomento che includono la determinazione diretta di Pb, Cd e As nei vini [4].

In questo lavoro è stato sviluppato un metodo per il ferro che ha la caratteristica di operare alla lunghezza d'onda alternativa di 372,0 nm, circa sei volte meno sensibile di quella a 248,3 nm. Tale scelta di compromesso ha consentito di ridurre la sensibilità alla contaminazione, che complica la determinazione di Fe in ETA-AAS, mantenendo comunque una sensibilità adatta all'analisi del vino. Questo viene semplicemente diluito (generalmente 1+4) con acqua e acido cloridrico 5% v/v fino a una concentrazione finale in HCl pari all'1% v/v. Gli standard di confronto vengono preparati anch'essi in HCl all'1%. La diluizione del campione può essere regolata a piacere, secondo necessità, perché si è visto che il segnale aumenta proporzionalmente con la concentrazione di vino nel campione diluito, purchè si misuri

l'assorbanza integrata. La massa caratteristica ( $m_0$ ) è di ca. 73 pg e il limite di rivelabilità ( $3s_B$ ), per la diluizione 1+4 è ca. 87 ng mL<sup>-1</sup> che, ovviamente, può essere abbassato operando a concentrazioni maggiori di vino e alle lunghezze d'onda più sensibili. Il confronto della pendenza della retta di calibrazione in HCl 1% v/v con la retta di addizione standard al vino diluito non mostra differenze statisticamente significative ( $P=0,05$ ). Il metodo è stato applicato all'analisi di una quindicina di vini bianchi e rossi provenienti da diverse zone del Vallese e i risultati ottenuti verranno presentati e discussi.

### **Bibliografia**

1. E.K. Paleologos, D.L. Giokas, S.M. Tzouwara-Karayanni, M.I. Karayannis, *Anal.Chim. Acta* 458 (2002) 241
2. S. Williams ed., *Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists*, 14Edn, p. 180, 223, Association of Official Analytical Chemists, Inc., Arlington, 1984
3. Regolamento CEE n. 2676/90, *Gazzetta Ufficiale delle Comunità Europee* L 272 del 3/10/90, Allegato 30: ferro
4. B. Casetta, F. Aldrighetti "La correzione ad effetto Zeeman nel dosaggio di elementi in traccia in alimenti" in C. Minoia, S. Caroli ed. "Applicazioni dell'ETA-AAS Zeeman nel laboratorio chimico e tossicologico" Vol. I "Acque, alimenti, ambiente" Libreria Cortina, Padova, 1989, p. 271

**PROPOSTA E VALIDAZIONE DI UN METODO IN SPETTROMETRIA ICP-MS  
PER LA DETERMINAZIONE DI Pt IN ULTRATACCE  
IN CAMPIONI DI PLASMA E FRAZIONE ULTRAFILTRATA**

*M.C. Bruzzoniti<sup>1</sup>, P. Langer<sup>2</sup>, A. Mangia<sup>3</sup>, M. Maffini<sup>3</sup>, C. Mucchino<sup>3</sup>, C. Sarzanini<sup>1</sup>*

<sup>1</sup> *Dipartimento di Chimica Analitica, Università di Torino, via P. Giuria 5, 10125 Torino*

<sup>2</sup> *Pharmacokinetic, Dynamics & Metabolism, Nerviano Medical Science, Viale Pasteur 10, 20014 Nerviano (MI)*

<sup>3</sup> *Dipartimento di Chimica Generale ed Inorganica, Chimica Analitica, Chimica Fisica, Università di Parma, Parco Area delle Scienze 17/A, 43100 Parma*

La moderna terapia farmacologica antitumorale prevede la somministrazione di quantità di farmaco strettamente necessarie all'ottenimento degli effetti desiderati, a causa della tossicità dei principi attivi utilizzati. In quest'ambito, gli studi di farmacocinetica e la determinazione, quindi, del principio attivo nei vari fluidi biologici sono di estrema attualità e necessitano di metodi analitici sempre più accurati e sensibili [1,2]. Poiché infatti i livelli di platino nella porzione ultrafiltrata del plasma possono essere a livello di  $\text{nmolL}^{-1}$ , sono richiesti metodi analitici estremamente sensibili, quali quelli basati sull'impiego della tecnica ICP-MS. L'ampio intervallo di concentrazione atteso rende inoltre questa tecnica particolarmente indicata. I moderni strumenti ICP-MS dispongono della cosiddetta modalità "hot plasma" che presenta vantaggi, come l'aumentata sensibilità ai rapporti massa/carica elevati senza che il rumore di fondo aumenti apprezzabilmente.

Scopo di questo lavoro è stato lo sviluppo e la validazione di un metodo ICP-MS in modalità "hot plasma" per la determinazione del Pt totale in plasma di topo e nella frazione ultrafiltrata di animali trattati con farmaci a base di Pt.

Lo strumento utilizzato è un ICP-MS X-7 (ThermoElemental, Winsford, UK) con nebulizzatore Meinardt e camera impact bead raffreddata con un peltier a  $3^{\circ}\text{C}$ . I parametri strumentali per la modalità "hot plasma" sono stati ottimizzati per ottenere almeno  $2 \times 10^6$  cps per  $^{238}\text{U}$  e  $1.5 \times 10^6$  per  $^{115}\text{In}$ , con una soluzione di *tune* a  $5 \mu\text{g/l}$ . La stabilità dello strumento è stata verificata mediante una acquisizione di 10 ripetizioni di una opportuna soluzione di *tune* equispaziata nell'intervallo di masse (short term stability): in tutti i casi il valore RSD è risultato inferiore allo 0.7%.

Il plasma e la frazione ultrafiltrata sono stati trattati con acqua regia mediante mineralizzatore a microonde utilizzando bombe in PFA con inserto interno di quarzo. Le metodologie di trattamento del campione reperite in letteratura per questa tipologia di matrice [3] e a questi livelli di concentrazione ( $\text{nmolL}^{-1}$ ) hanno evidenziato una scarsa ripetibilità. Il ciclo di mineralizzazione è stato pertanto ottimizzato ottenendo come risultato finale  $\text{CV}\% < 5\%$  ottenuti dall'esecuzione di 6 replicati di mineralizzazione, utilizzando una soluzione standard alla concentrazione di  $5 \text{ ngL}^{-1}$  in Pt.

La validazione è stata condotta in accordo con le linee guida *FDA Bioanalytical Validation* [4]; inoltre, alcuni parametri sono stati definiti anche sulla base delle raccomandazioni EURACHEM/CITAC [5].

Al fine di evidenziare contaminazioni accidentali è stata adottata una opportuna strategia di mineralizzazione che ha previsto il trattamento sia del bianco di mineralizzazione che delle soluzioni standard in triplicato. La retta di calibrazione è stata ottenuta utilizzando soluzioni standard mineralizzate: in ciascuna corsa l'Ir e l'Au sono stati aggiunti come standard interni alla concentrazione finale di  $100 \text{ ngL}^{-1}$ . Sono state confrontate inoltre le pendenze delle rette risultanti da soluzioni standard ottenute da oxaliplatino e da soluzioni standard di acido esacloro platinico, per evidenziare possibili effetti dovuti alle diverse forme dell'analita: la

differenza tra le due pendenze non è risultata statisticamente significativa al livello di confidenza del 95%.

La validazione secondo il protocollo FDA è stata eseguita separatamente per le due tipologie di matrici, in considerazione degli ampi intervalli di concentrazione attese. La linearità è stata pertanto verificata nell'intervallo 5-2500 nmolL<sup>-1</sup> per quanto riguarda la validazione sulla matrice della frazione ultrafiltrata, mentre sul plasma è stata verificata nell'intervallo 50-25000 nmolL<sup>-1</sup>.

Particolare attenzione è stata rivolta alla valutazione dell'effetto memoria mediante il confronto dell'analisi dello stesso bianco prima e dopo l'acquisizione sia di standard che di campioni di controllo (QC) di plasma e di ultrafiltrato. Effetti memoria sono stati rivelati solo relativamente all'analisi di campioni di plasma contenenti Pt ad elevata concentrazione, richiedendo pertanto l'introduzione di un'ulteriore fase di lavaggio con una miscela di HNO<sub>3</sub> (2%), HCl (6%) e Triton X-100 (0.05%) dopo tali campioni.

Il limite di rivelabilità, la linearità, la ripetibilità intra-day e la precisione between-day sono stati valutati statisticamente considerando i risultati ottenuti nell'arco di tre giorni, utilizzando tre lotti indipendenti di standard e campioni di controllo.

La linearità è stata valutata anche applicando alla calibrazione ottenuta i test del *lack-of-fit* e di Mandel. La significatività dell'intercetta con  $\alpha=5\%$  è stata verificata eseguendo un *t*-test. E' stato ottenuto un valore di limite di rivelabilità inferiore a 2.5 nmolL<sup>-1</sup> (corrispondenti a circa 1 ngL<sup>-1</sup>), così come un'elevata precisione applicando la correzione per lo standard interno.

I campioni di controllo prodotti da un laboratorio esterno per entrambe le matrici biologiche (plasma e ultrafiltrato) a tre livelli di concentrazione (basso, intermedio e alto), sono stati analizzati in un *blind test*; l'accordo fra i risultati ottenuti e quelli dichiarati sono risultati accettabili per il protocollo bioanalitico seguito (15%).

E' stata anche valutata la robustezza della procedura analitica rispetto al trattamento e alla conservazione del campione, confrontando i risultati ottenuti dall'analisi dei campioni di controllo conservati in un caso per 4 ore a temperatura ambiente prima dell'analisi e nell'altro scongelati e ricongelati per tre volte prima dell'analisi. In nessun caso è stata evidenziata alcuna differenza significativa.

Il metodo è stato quindi applicato all'analisi di due lotti di plasma e corrispondente frazione ultrafiltrata provenienti da topi trattati con farmaco a base di platino.

## Riferimenti

- [1] J.G. Morrison, P. White, S. McDougall, J.W. Firth, S.G. Woolfrey, M.A. Graham, D. Greenslade, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 24, (2000) 1-10.
- [2] M. Verschraagen, K. Van der Born, T.H.U. Zwiers, W.J.F. Van der Vijgh, *J. Chromatogr. B*, 772, (2002) 273-281.
- [3] *ML-1200 Application Notes*, Milestone FKV, Sorisole (BG), Italy, 1999.
- [4] *Guidance for Industry, Bioanalytical Method Validation*, Internet version, Maggio 2001 <http://www.fda.gov/cder/guidance/4252fn1.htm>
- [5] *The Fitness for Purpose of Analytical Methods: A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics*, EURACHEM Guide, (1998) LGC, Teddington, GB; <http://www.eurachem.ul.pt/>

## GLI ANTICHI RICETTARI: SINTESI DEL GIALLO DI NAPOLI E SUA CARATTERIZZAZIONE

*Pietro Baraldi, Dipartimento di Chimica, Università di Modena e Reggio E., via Campi 183, 41100 Modena*

*Federica Bondioli, Dipartimento di Ingegneria dei Materiali e dell'Ambiente, Università di Modena e Reggio E., Via Vignolese 905, 41100 Modena*

La prima citazione sulla presenza di antimonio fra i componenti di pigmenti per vetri e ceramiche è da attribuire a Biringuccio e Piccolpasso, un'alchimista e un ceramurgo del '500, rispettivamente. Una prima indicazione dell'impiego del pigmento in pittura si riscontra nel "Ricettario Darduin", di certo non posteriore al 1654.

Nella "Istruzione per dipingere a fresco" di Andrea Pozzo si trova il giallo di Napoli indicato come "giallolino di fornace" che "chiamasi a Roma giallolino di Napoli", utilizzato per l'affresco.

Il giallo di Napoli è noto già dalle prime culture mesopotamiche (700 a.C.) ed egizie (1500 a.C.) e risulta il solo materiale utilizzato per i vetri opachi e le ceramiche: nel XVIII secolo, poi, sostituisce completamente il giallolino nell'uso pittorico.

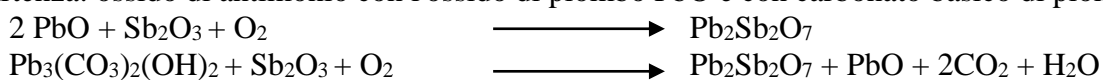
Un primo accenno alla preparazione del giallo antimoniato di piombo arriva da Ferrante Imperato, molto vaga: "Il giallolino si prepara da bianco di piombo e imita il colore della ginestra; è un giallolino che diventa rosso intenso per forte riscaldamento".

Nel 1758 Passeri pubblica la prima ricetta di preparazione del giallo di Napoli, con la denominazione equivoca di giallolino: "Il giallolino o color d'oro si fa con una libra di antimonio, una e mezza di piombo, ed un'oncia d'allume di feccia ed un'altra di sal comune". Seguirono via via alte ricette più dettagliate e con proporzioni differenti dei componenti.

Come materiale di partenza del giallo di Napoli sono stati impiegati i seguenti composti: Piombo, massicot, litargirio, minio, nitrato di piombo, metallo da tipografia, antimonio, ossido di antimonio, antimoniato di potassio, stibina, tartaro emetico, NH<sub>4</sub>Cl, allume, sale, ZnO, SnOx.

Un po' più complicato è definire le attestazioni pittoriche di tale pigmento: sono presenti, ad esempio, piccole quantità di antimonio in dipinti di Caravaggio, ma questo non dimostra un uso inequivocabile del giallo di Napoli: nella copia del San Giovanni Battista dei Musei Capitolini, di Caravaggio, compare solo giallo di piombo e stagno mentre nella copia del medesimo quadro della galleria Doria Pamphili, completata entro il 1666, è presente l'antimoniato di piombo.

Per la preparazione del giallo di Napoli sono state utilizzate due miscele di composti di partenza: ossido di antimonio con l'ossido di piombo PbO e con carbonato basico di piombo



Nella miscela 1, si è riscontrata la formazione del pigmento, nella forma Pb<sub>6</sub>Sb<sub>2</sub>O<sub>11</sub> (I.C.D.D. 34-1190) solo nel campione calcinato a 700°C per due ore, anche se in concomitanza con altre fasi Pb<sub>2</sub>Sb<sub>2</sub>O<sub>7</sub> (I.C.D.D. 39-834) e Pb<sub>3</sub>Sb<sub>2</sub>O<sub>7</sub> (I.C.D.D. 21-940). Negli altri casi il pigmento non si forma neanche come miscela di ossidi misti. Nella miscela 2 è evidente come, per tutti i tempi e le temperature studiate, non sia possibile ottenere il composto stechiometrico, ma solo le fasi Pb<sub>6</sub>Sb<sub>2</sub>O<sub>11</sub> (I.C.D.D. 34-1190) e Pb<sub>3+x</sub>Sb<sub>2</sub>O<sub>8+x</sub> (I.C.D.D. 34-1196).

Essi presentano uno spettro vibrazionale variabile con il contenuto di un ossido rispetto all'altro. Il loro colore è di un giallo arancio acceso, come quello dell'antimoniato di piombo. La scarsa osservazione del piroantimoniato può essere attribuita a varie cause, tra le quali l'impiego di miscele di reagenti abbastanza impure. Inoltre l'impiego del rapporto PbO:

Sb<sub>2</sub>O<sub>3</sub> di 1:3, secondo le antiche ricette, è lontano da quello presente nel composto stechiometrico.

Con i raggi X e le spettroscopie vibrazionali sono stati identificati più composti. Con la microscopia Raman è stato possibile osservare sostanze presenti in bassa concentrazione, ma focalizzabili al microscopio (anche cristalli di 1  $\mu\text{m}$ ). I dati forniti dalle tecniche sono risultati complementari.

**COMUNICAZIONI POSTER**

**ELETTROANALITICA**

## UTILIZZO DEL CATECOLO E DI SUOI DERIVATI COME LEGANTI IN VOLTAMMETRIA DI STRIPPING CATODICO ADSORBITIVO

*O. Abollino, A. Giacomino, C. La Gioia, M. Malandrino, E. Mentasti*

*Dipartimento di Chimica Analitica, Via Giuria 5, 10125 Torino*

La voltammetria di stripping catodico adsorbitivo (AdSV) è ampiamente utilizzata per la determinazione di sostanze organiche e della maggior parte dei metalli di transizione e delle terre rare. La tecnica è basata sull'accumulo dell'analita per adsorbimento sulla superficie dell'elettrodo, seguito da una scansione di potenziale in senso catodico; la conseguente riduzione dell'analita, o di una specie ad esso correlata, genera un picco, in una curva intensità-potenziale, di altezza proporzionale alla sua concentrazione. L'elettrodo più utilizzato è quello a goccia statica di mercurio (HMDE), sul quale i cationi inorganici possono adsorbirsi sotto forma di complessi con leganti organici. In particolare, il catecolo è uno dei leganti utilizzabili per la determinazione di rame e ferro mediante AdSV. Un suo derivato, il diidrossinaftalene, è alla base di uno dei metodi più sensibili per la misura di concentrazioni di ferro a livello di nmoli/l.

In questo studio abbiamo esaminato il comportamento voltammetrico del piombo sotto forma di complesso con il catecolo e con otto suoi derivati: 4-nitrocatecolo, 4-tert-butil catecolo, tetraclorocatecolo, tetrabromocatecolo, 2,3-diidrossinaftalene, acido 4,5-diidrossi-1,3-benzendisolfonico (Tiron), acido 6,7-diidrossi-2-naftalensolfonico, 2,3-diidrossipiridina.

I complessi di interesse sono stati accumulati sulla superficie di un HMDE e si è studiato l'andamento del segnale di riduzione del piombo in funzione della natura del legante e di una serie di parametri chimici e operativi: pH, concentrazione di legante, potenziale di deposizione, tempo di deposizione.

Si è osservato che il picco del piombo cresce al crescere del pH, in seguito all'aumentata stabilità del complesso, fino ad un valore massimo, corrispondente a pH 7 per quasi tutti i leganti considerati. La diminuzione del segnale a pH superiori è imputabile alla competizione degli ioni idrossido per la complessazione del piombo.

Un aumento della concentrazione di legante favorisce la formazione del complesso e provoca un incremento nell'altezza del picco del metallo fino ad un valore massimo, oltre il quale un'ulteriore aggiunta di complessante causa una diminuzione dell'intensità di corrente di riduzione, probabilmente in seguito alla competizione tra la forma libera e complessata del legante per l'adsorbimento sulla superficie elettrodica.

Il potenziale di accumulo influenza notevolmente l'adsorbimento delle specie presenti in soluzione, perché determina la carica dell'elettrodo: per ogni legante è stato quindi individuato l'intervallo di potenziale ottimale per la deposizione del complesso.

Il picco del piombo aumenta all'aumentare del tempo di accumulo, a conferma del fatto che si verifica effettivamente un adsorbimento dei complessi sulla superficie dell'elettrodo. La crescita del segnale dell'analita con il tempo diventa sempre più graduale all'aumentare della durata della deposizione, e l'altezza del picco rimane costante o addirittura diminuisce a tempi lunghi, a causa della saturazione della superficie dell'elettrodo e dell'adsorbimento competitivo di altre specie presenti in soluzione. In tutte le prove precedentemente descritte il tempo di accumulo del complesso è stato di 120 s.

Il grado di reversibilità della reazione elettrodica del piombo è stato valutato tramite voltammetria ciclica. I picchi di riduzione e ossidazione del piombo aumentano all'aumentare della velocità di scansione del potenziale.

Se si prendono in considerazione i soli leganti diidrossibenzenici e la diidrossipiridina, la massima sensibilità di risposta per il piombo è stata osservata in presenza di tetracloro- e



tetrabromocatecolo: probabilmente la loro bassa polarità causa una diminuzione dell'affinità dei complessi per la fase acquosa e favorisce il loro trattenimento sull'elettrodo.

Tra tutti i leganti studiati, il 2,3-diidrossinaftalene si è rivelato il più adatto per la determinazione del piombo tramite AdSV, sia in termini di sensibilità che di forma del picco. Se l'adsorbimento del complesso avviene anche in seguito ad interazioni a livello di elettroni  $\pi$ , come ipotizzato in letteratura, la presenza di due anelli aromatici condensati favorisce l'accumulo di diidrossinaftaleni rispetto a derivati diidrossibenzenici.

### **Bibliografia**

- 1) H. Obata, M.C.G. van den Berg, "Determination of picomolar levels of iron in seawater using catalytic cathodic stripping voltammetry", *Anal. Chem.*, **73** (2001) 2522-2528.
- 2) O. Abollino, M. Aceto, C. Sarzanini, E. Mentasti, "Behavior of different metal/ligand systems in adsorptive cathodic stripping voltammetry", *Electroanalysis*, **11** (1999) 870-878.
- 3) J. Limson, T. Nyokong, "Substituted catechols as complexing agents for the determination of bismuth, lead, copper and cadmium by adsorptive stripping voltammetry", *Anal. Chim. Acta*, **344** (1997) 87-95.

## UNA PROCEDURA DI DIGESTIONE A MICROONDE DI CAMPIONI BIOLOGICI PER LA CONVERSIONE QUANTITATIVA A Se(IV) DEL Se IN ESSI PRESENTE

*Rosanna Toniolo, Andrea Pizzariello, Sabina Susmel, Nicolò Dossi, Gino Bontempelli*

*Dipartimento di Scienze e Tecnologie Chimiche, Università di Udine,  
via Cotonificio 108, 33100 Udine*

Il selenio è un elemento che a basse concentrazioni costituisce un micronutriente essenziale, mentre a concentrazioni più elevate esso diventa un elemento tossico. Dosi giornaliere di ca. 70 µg sono infatti proficue, mentre dosi di solo 4-5 volte superiori risultano essere tossiche. Dal momento che la differenza tra le concentrazioni che determinano questi effetti nettamente contrastanti è piuttosto piccola, risulta essenziale poter disporre di metodi analitici precisi ed accurati per la sua determinazione, in particolare in matrici alimentari.

Le metodiche analitiche adottate per la determinazione di Se in campioni preliminarmente mineralizzati prevedono tipicamente la generazione degli idruri corrispondenti e la loro successiva determinazione mediante tecniche spettrali, quali la spettrofotometria di assorbimento atomico (HG-AAS), la spettrometria di emissione a plasma indotto accoppiato con rivelazione sia spettrale (HG-ICPES) che mediante spettrometria di massa (HG-ICPMS) e la spettrometria di fluorescenza atomica (HG-AFS). Accanto a queste metodiche spettrali, merita di essere ricordata anche la determinazione del Se per stripping catodico (CSV), tecnica che non richiede una strumentazione sofisticata ma che è caratterizzata anch'essa da un basso limite di rivelabilità.

Tutte queste metodiche consentono l'acquisizione di risultati affidabili per il Se soltanto se questo elemento è presente nel campione da sottoporre all'analisi strumentale nello stato di ossidazione 4+, poiché il Se (IV) è la sola forma che è facilmente convertibile ad idruro, come richiesto per incrementare la sensibilità delle tecniche spettrali, e che nel contempo è determinabile mediante CSV. Appare pertanto evidente la necessità di disporre di una metodica di mineralizzazione dei campioni da analizzare che consenta la conversione quantitativa a Se(IV) delle varie forme possibili sotto le quali tale elemento può essere originariamente presente.

L'obiettivo di questa indagine è stato per l'appunto quello di sviluppare una procedura che consenta di pervenire a detta conversione quantitativa ricorrendo ad un processo di digestione a microonde, traendo così vantaggio dalla rapidità e dalla riproducibilità che caratterizzano questa modalità di mineralizzazione.

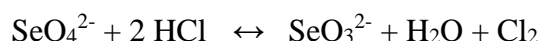
A questo scopo, sono stati sottoposti a digestione a microonde numerosi campioni sintetici preparati miscelando in diversi rapporti quantità note di composti standard (ZnSe, Se, Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> e Na<sub>2</sub>SeO<sub>4</sub>·10H<sub>2</sub>O) contenenti il Se nei quattro stati di ossidazione 2-, 0, 4+ e 6+. Questi campioni sintetici, introdotti negli appositi contenitori in quantità tale da far sì che il contenuto in Se totale variasse nell'intervallo 50-200 ppb, sono stati preliminarmente sottoposti a trattamento a microonde (ca. 20 min) adottando diversi programmi di irraggiamento e utilizzando come mezzo di digestione una miscela costituita da 1 ml di HNO<sub>3</sub> concentrato addizionato con 0.2-1 ml di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30 % v/v, ossia una miscela che viene tipicamente utilizzata per la mineralizzazione di campioni biologici.

I risultati ottenuti sottoponendo ad analisi CSV i campioni pretrattati adottando queste condizioni, che come già ricordato sono quelle più adatte per la mineralizzazione di campioni biologici, erano deludenti in quanto evidenziavano che soltanto ca. il 40 % del Se totale veniva convertito a Se(IV) quando questo veniva introdotto nello standard di partenza negli stati di ossidazione 2-, 0 e 4+, mentre il Se (IV) era addirittura totalmente assente nei campioni derivanti da miscele standard preparate introducendo il Se come seleniato. Nel contempo, le analisi ICP-MS eseguite sui medesimi campioni, utilizzando il segnale relativo

all'isotopo  $^{82}\text{Se}$ , evidenziavano invece contenuti di Se totale in buon accordo con le quantità di questo elemento presenti negli standard, indipendentemente dallo stato di ossidazione nel quale questo veniva in essi introdotto.

Si è reso pertanto necessario integrare il processo di mineralizzazione sopra descritto (verosimilmente indispensabile per realizzare una buona digestione di matrici biologiche) con uno stadio successivo, finalizzato a rendere possibile la riduzione a Se(IV) del Se(VI) formato nelle condizioni fortemente ossidanti originate da miscele digerenti costituite da  $\text{HNO}_3 + \text{H}_2\text{O}_2$ .

E' stato possibile verificare che tale riduzione poteva essere realizzata selettivamente, senza pervenire a forme contenenti il Se in stati di ossidazione inferiori a 4+, sottoponendo i campioni provenienti dalla digestione ossidativa ad una ulteriore digestione a microonde (ca. 5 min) condotta dopo addizione di HCl concentrato, sfruttando la seguente reazione :



Poteva essere infatti verificato, mediante analisi CSV dei campioni sottoposti a questo duplice processo di trattamento a microonde, che il  $98 \pm 6$  % del Se in essi presente veniva convertito a Se(IV), indipendentemente dal suo stato di ossidazione iniziale.

Questo risultato incoraggiante ha suggerito la possibilità di pervenire ad una conversione più rapida, ma comunque quantitativa, del Se totale nella specie desiderata ( $\text{SeO}_3^{2-}$ ) operando una singola operazione di digestione a microonde dei campioni che permetta di realizzare una buona digestione delle matrici biologiche contemporaneamente alla riduzione a Se(IV) del Se(VI) che si origina in presenza di miscele digerenti ad elevata capacità ossidante. Questa singola operazione, che è in grado di consentire una sensibile riduzione dei tempi di analisi, sembra potersi realizzare adottando come liquido di digestione una miscela di  $\text{HNO}_3$  concentrato e  $\text{H}_2\text{O}_2$  30 % v/v addizionata con ioni cloruro. Sono attualmente ancora in corso indagini, i cui risultati preliminari sono indubbiamente promettenti, volte ad ottimizzare sia la composizione di tale miscela digerente che le condizioni di irraggiamento da adottare nel processo di digestione e, nel contempo, a verificare l'applicabilità di tale procedura a matrici biologiche reali.

**DETERMINAZIONE DELLA CAPACITA' ANTIOSSIDANTE DI COMUNI  
PRODOTTI FARMACEUTICI CONTENENTI ACIDO ACETILSALICILICO E DI  
INTEGRATORI ALIMENTARI USANDO DIVERSI METODI VOLTAMMETRICI,  
BIOSENSORISTICI E SPETTROFLUORIMETRICI**

*L. Campanella, D. Bellantoni, A. Bonanni, G. Favero, T. Gatta, M. Tomassetti*

*Dipartimento di Chimica, Università degli Studi di Roma "La Sapienza", P.le Aldo Moro 5,  
00185 Roma*

E' in costante incremento l'interesse della medicina moderna nei riguardi delle proprietà antiossidanti e di "radical scavengers" possedute da alcuni alimenti, soprattutto di tipo vegetale, sia nei riguardi di veri e propri prodotti farmaceutici, molti dei quali riconosciuti ormai importanti in virtù delle gravi malattie che potrebbero essere prevenute dalla regolare assunzione di questi farmaci. La moderna industria farmaceutica, recependo queste acquisizioni dalla scienza medica, ha lanciato sul mercato sia alcuni prodotti classificati come integratori alimentari, di cui ci siamo occupati in una recente ricerca [1], che è stata ora completata, sia alcuni preparati farmaceutici, i quali però sono a volte venduti non soltanto e spesso non principalmente per le proprietà antiossidanti dei principi attivi in essi contenuti. Ad esempio, alcune delle più comuni specialità farmaceutiche, basate sull'acido acetilsalicilico, liberamente vendute come prodotti da banco, anche se commercializzate principalmente per le loro proprietà analgesiche, possiedono anche una specifica attività antiossidante. In questa ricerca, abbiamo valutato e confrontato la capacità antiossidante totale di alcuni prodotti di questo tipo facilmente reperibili in farmacia, per i quali è interessante determinare le differenze inerenti la capacità antiossidante, per uguali quantità in peso ingerite. Sebbene siano stati proposti diversi metodi per la misura della capacità antiossidante, non esiste allo stato attuale un metodo ufficiale per la sua determinazione. Con lo scopo di validare i risultati ottenuti, in questa ricerca la determinazione della capacità antiossidante è stata eseguita contemporaneamente sui suddetti campioni, ma con metodi diversi: due di questi (metodo biosensoristico e voltammetria ciclica) sono stati recentemente studiati nel nostro laboratorio, un altro (metodo spettrofluorimetrico) è il metodo più conosciuto ed usato in letteratura. Recentemente è stato proposto un altro metodo voltammetrico, basato sulle seguenti considerazioni: la riduzione elettrochimica dell'ossigeno disciolto, ad un elettrodo di mercurio, o di carbone vetroso, ha luogo al catodo con un meccanismo in più step e con la formazione di radicali superossido; un composto antiossidante, che reagisca con il superossido, diminuisce, quindi, la concentrazione di quest'ultimo. Diminuisce in tal modo la corrente dovuta alla reazione di riduzione dell'ossigeno e tale decremento può essere usato per valutare la capacità antiossidante del composto considerato. Senza dubbio, questo metodo è molto interessante ma, nelle condizioni operative riportate in letteratura [2], comporta un tempo di analisi troppo lungo (alcune ore). Attualmente, stiamo, quindi, valutando la possibilità di applicare questo metodo, previa modifica delle condizioni operative (impiegando cioè la voltammetria differenziale ad impulsi, anziché la voltammetria classica) con l'intento di ridurre il tempo di analisi. Uno dei principali risultati di questa ricerca è stata la possibilità di valutare i diversi metodi sopra descritti, confrontandone i risultati ottenuti nell'applicazione all'analisi dell'acido acetilsalicilico, contenuto in diverse specialità farmaceutiche, che differiscono principalmente per la diversa complessità della formulazione farmaceutica.

#### **Bibliografia**

- [1] L.Campanella, D.Bellantoni, A.Bonanni, G.Favero, M.Tomassetti, Atti del XXI Cong. Naz., SCI, 2003, Torino, 22-27/06/2003, Vol.2, AN-CP-019  
[2] E I.Korotkova, Y.A.Karbainov, A.V.Shevchuk, J.Electroanal.Chem., 518, 2002, 56-60

## ELETTORIDUZIONE CATALITICA DI NITRITI, CLORITI E BROMATI SU ELETTRODI A BASE DI OSSIDI DI TUNGSTENO IN AMBIENTE ACIDO

*Michela Contursi, Innocenzo Casella*

*Dipartimento di Chimica, Università degli Studi della Basilicata, Via N. Sauro, 85 – 85100 Potenza*

L'impiego di substrati elettrodi costituiti da ossidi-idrossidi di alcuni metalli di transizione e/o loro miscele riveste un considerevole interesse in diversi settori delle tecnologie applicate e nella elettroanalisi (1). Tali ossidi infatti, esplicano significative attività elettrocatalitiche sia verso l'ossidazione che la riduzione di svariate importanti classi di molecole organiche e ioni inorganici (2-4). La loro preparazione, nonché la loro caratterizzazione elettrochimica e spettroscopica risulta essere essenziale nella definizione e razionalizzazione di nuovi dispositivi amperometrici e/o voltammetrici tesi alla rivelazione di molecole di interesse analitico.

Scopo della presente comunicazione è la caratterizzazione elettrochimica e spettroscopica di elettrodi a base di triossido di tungsteno ( $\text{WO}_3$ ) in ambiente acido circa la riduzione cataliticamente assistita di ioni nitrito, clorito e bromato. Gli elettrodi costituiti da tungsteno in forma policristallina, sono caratterizzati nella finestra di potenziali compresa tra 0.6 V e -0.3 V (SCE), valutandone l'attività catalitica in funzione delle diverse variabili sperimentali quali: pH, temperatura e composizione ionica della soluzione di elettrolisi; condizioni voltammetriche quali: velocità di scansione e potenziali applicati. L'analisi XPS (X-ray Photoelectron Spectroscopy), condotta su substrati elettrodi di tungsteno trattati a diversi potenziali elettrodi in condizioni acide, in combinazione con le informazioni di tipo elettrochimico, ha lo scopo di fornire una adeguata razionalizzazione dei processi di elettroriduzione catalitica delle molecole in oggetto.

Infine, gli elettrodi in studio sono testati come sensori amperometrici operanti a potenziali applicati costanti nella regione compresa tra 0.0 e - 0.3 V (SCE) al fine di valutarne le reali performance analitiche circa l'applicabilità degli stessi in contesti analitici per la determinazione in tracce di ioni nitrito, clorito e bromato.

### RIFERIMENTI

- 1) J. Lipkowski, P.N. Ross Eds., in *Electrocatalysis, Frontiers of Electrochemistry*, Wiley-VCH, (1998), New York.
- 2) K. Kost, D.E. Bartak, B. Kazee, T. Kuwana, *Anal. Chem.*, 62, (1990), 151.
- 3) W.R. LaCourse, *Pulsed Electrochemical Detection in High-Performance Liquid Chromatography*, John Wiley & Sons, (1997), New York.
- 4) M. Trojanowicz, M. Szewczynska, M. Wcislo, *Electroanalysis*, 15 (5), (2004), 347.

## UTILIZZO DI ELETTRODI DI CARBONE VETROSO MODIFICATI CON NAFION PER LA DETERMINAZIONE DI COLORANTI ALIMENTARI DI SINTESI

Barbara Brunetti, Raffaella Cattaneo, Elio Desimoni, Irene Grassi

DiProVe, Università degli Studi di Milano, Via Celoria 2, 20123 Milano

La determinazione dei coloranti negli alimenti e nelle acque reflue degli impianti di produzione è un problema d'interesse ambientale ed alimentare, data la nota genotossicità ed ecotossicità di molti di essi [1,2]. Allo scopo vengono in genere utilizzati metodi cromatografici, che richiedono spesso complessi pretrattamenti, e spettrofometrici, caratterizzati da una sensibilità frequentemente inadeguata. I metodi elettrochimici possono rappresentare una valida alternativa grazie alla loro elevata sensibilità, all'ampio range lineare ed al loro basso costo. La letteratura riporta numerose applicazioni dei metodi elettrochimici per la determinazione dei coloranti su elettrodi di mercurio a goccia o statici [3-7]. In un solo caso sono utilizzati elettrodi di carboni vetrosi (GC) [8,9]. Per quanto è a nostra conoscenza, non sono stati condotti studi riguardanti la determinazione di coloranti ad elettrodi di GC modificati con polimeri.

Questa ricerca è diretta alla valutazione dell'applicabilità degli elettrodi di GC modificati con Nafion alla determinazione di coloranti alimentari di sintesi. Il primo analita considerato, il blu patentato V, è un derivato del trifenilmetano. Esso è stato bandito negli USA e in altri Stati per sospetta cancerogenità, ma è ancora utilizzato nell'Unione Europea con la sigla E131, in quanto la sua presenza in bassa concentrazione e/o in cibi di ridotto consumo non viene considerata nociva per la salute.

In una prima fase della ricerca è stato analizzato il quadro voltammetrico dell'analita mediante voltammetria ciclica. Si è potuto verificare che la corrente di picco cresce in funzione del tempo e tende asintoticamente al valore corrispondente al raggiungimento dell'equilibrio di scambio ionico (Figura 1).

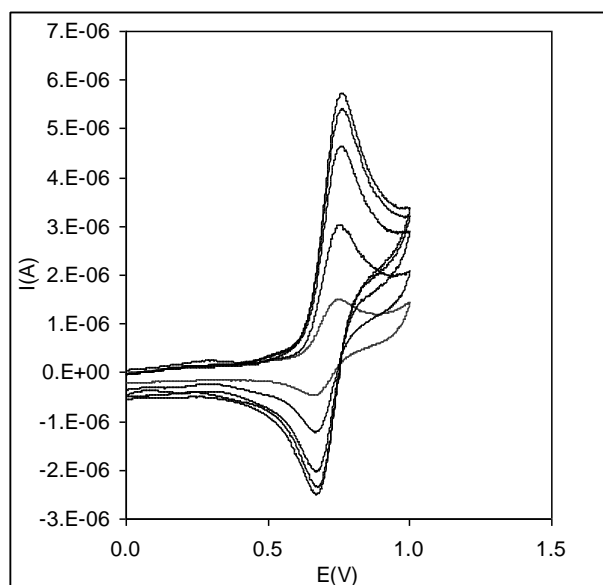


Figura 1. Voltammogrammi ciclici registrati a tempi successivi (0 , 5, 15, 30, 40 min dopo l'immersione) in soluzione di E131  $10^{-4}$  M in NaCl 0.1M a 100 mV/s utilizzando un elettrodo NMGC.

Il valore della corrente di picco osservato all'elettrodo modificato in condizioni di equilibrio è risultato molto maggiore di quello registrato ad un elettrodo di GC non modificato. Ciò ha permesso di dimostrare che il Nafion preconcentra efficacemente l'analita,

proprietà che permette di prevedere un netto miglioramento del limite di rivelabilità. È quindi possibile diluire notevolmente il campione in analisi, minimizzando i problemi legati all'effetto matrice, peraltro già parzialmente risolti dalla presenza del film polimerico. È infatti noto [10] che quest'ultimo permette di prevenire fenomeni indesiderati, quali adsorbimenti e precipitazioni che, nel caso di analisi in matrici reali, possono inattivare la superficie elettrodica.

Per ottimizzare la sensibilità e riproducibilità dell'analisi è stata quindi valutata l'influenza della composizione e pH dell'elettrolita di supporto sull'entità dell'incorporazione. Il mezzo ideale è risultato essere un sistema tampone acetato/acido acetico a pH 5,0. In queste condizioni sperimentali sono stati valutati range dinamico e lineare, funzione di calibrazione e limite di rivelabilità. Quest'ultimo è stato stimato utilizzando i diversi approcci che permettono il controllo degli errori falsi positivi e falsi negativi [11].

Infine, è in corso di valutazione la selettività del metodo nei confronti di altri coloranti sintetici (elettroattivi) e naturali (non elettroattivi, ma che potrebbero essere incorporati nel Nafion) in quanto E131 è spesso presente nei campioni reali in miscele binarie. Il primo colorante ad essere considerato nelle prove di selettività è stato la tartrazina, un colorante della serie dei gialli, comunemente utilizzato in miscela con il blu per ottenere colorazioni verdi. Tale colorante, che risulta determinabile ad un elettrodo GC, non interferisce con il blu nel caso di elettrodi NMCG nelle condizioni di analisi summenzionate in quanto esso viene escluso dal film polimerico nelle condizioni sperimentali utilizzate.

La ricerca è attualmente in progresso.

## Riferimenti

1. J. Zima, J. Barek, J.C. Moreira, V. Mejstřík, A.G. Fogg, *Fresenius J. Anal. Chem.*, 369 (2001) 567.
2. A.G. Fogg, M.V.B. Zanoni, A.R.H.M. Yusoff, R. Ahmad, J. Barek, J. Zima, *Anal. Chim. Acta*, 362 (1998) 235.
3. G. Xu, J.J. O'Dea, G. Osteryoung, *Dyes and Pigments*, 30/3 (1996) 201.
4. S. Combeau, M. Chatelut, O. Vittori, *Talanta*, 56 (2002) 115.
5. Y. Ni, J. Bai, L. Jin, *Anal. Chim. Acta*, 329 (1996) 65.
6. M.V.B. Zanoni, A.G. Fogg, J. Barek, J. Zima, *Anal. Chim. Acta*, 349 (1997) 101.
7. J. Barek, J. Beranová, A.G. Fogg, V. Mejstřík, J.C. Moreira, J. Zima, *Anal. Chim. Acta*, 356 (1997) 231.
8. A.G. Fogg, D. Bhanot, *Analyst*, 105 (1980) 868.
9. A.G. Fogg, D. Bhanot, *Analyst*, 106 (1981) 883.
10. P. Ugo and L. M. Moretto, *Electroanalysis*, 7 (1995) 1105.
11. E. Desimoni, B. Brunetti, R. Cattaneo, *Annali di Chimica*, in stampa.

## DETERMINAZIONE DEL RODIO A LIVELLO DI sub- $\mu\text{g/L}$ MEDIANTE VOLTAMMETRIA CATALITICA DI ADSORBIMENTO E RIDISSOLUZIONE

*Barbara Brunetti, Raffaella Cattaneo, Elio Desimoni*

*DiProVe, Università degli Studi di Milano, Via Celoria 2, 20123 Milano*

A partire dagli anni '80, le emissioni dei convertitori catalitici per autotrazione hanno determinato un continuo incremento della concentrazione di platino, rodio e palladio nell'ambiente e negli alimenti [1].

Per quanto riguarda il platino, sono noti casi di contaminazioni rilevanti in matrici vegetali campionate in vicinanza di strade di grande comunicazione (fino a 350  $\mu\text{g/kg}$ ) [2], ma normalmente la concentrazione nelle matrici d'interesse in campo ambientale ed alimentare è inferiore di almeno di un ordine di grandezza [1,3,4]. In queste stesse matrici la concentrazione del rodio è ancora dell'ordine dei sub- $\mu\text{g/kg}$ , perché il metallo è usato nei convertitori in minore concentrazione del platino.

Le informazioni sulla tossicità dei composti del rodio derivanti da tali emissioni e distribuiti lungo la catena alimentare sono ancora piuttosto scarse [5-7] ma è prevedibile che, come nel caso dei composti del platino, essi determinino problemi ambientali e sanitari. Risulta pertanto evidente la necessità di sviluppare metodi analitici adeguati per la quantificazione di così basse concentrazioni di analita.

Un metodo che sembra particolarmente adatto alla determinazione di platino e rodio è quello sviluppato da Hoppstock e coll. [8,9], utilizzante la voltammetria catalitica di adsorbimento e ridissoluzione (CAdSV) su elettrodo a goccia pendente di mercurio (HMDE). In ambiente acido per acido solforico ed in presenza di idrazina e formaldeide, il platino forma il complesso Pt(II)-formazione. La determinazione del rodio non richiede la presenza di idrazina: in ambiente acido per acido cloridrico ed in presenza di formaldeide si forma il complesso Rh(III)-formaldeide [10]. Entrambi i complessi possono essere adsorbiti su mercurio a  $-700\text{mV}$  (vs.  $\text{Ag/AgCl/Cl}^-$  (3.0 M)). L'adsorbimento determina una significativa riduzione della sovratensione di scarica dell'idrogeno e la corrente registrata risulta proporzionale alla concentrazione dell'analita in soluzione. Il metodo permette la determinazione di platino e rodio a livello di sub- $\mu\text{g/kg}$  e presenta, come unico svantaggio, l'estrema sensibilità a tracce anche minime di sostanze organiche. La qualità del risultato dipende quindi dall'efficienza delle procedure di mineralizzazione, specifiche per ogni matrice. Anche altri Autori [10-12] hanno usato il metodo CAdSV per la determinazione del rodio, ma le informazioni riportate in letteratura sono parzialmente contrastanti.

Questo lavoro è stato diretto all'ottimizzazione delle condizioni sperimentali (mineralizzazione e misurazione CAdSV) per la quantificazione del rodio in matrici reali.

I risultati ottenuti nel corso di esperimenti preliminari, condotti su soluzioni standard contenenti platino e rodio, hanno dimostrato che la procedura di determinazione sequenziale dei due analiti [8,9] non permette un'efficiente ottimizzazione delle condizioni di lavoro. Limitando l'attenzione alla determinazione del solo rodio, è stato possibile dimostrare che un'adeguata accuratezza (intesa come precisione ed esattezza) poteva essere raggiunta solo adattando il tempo di accumulo del complesso Rh(III)-formaldeide sull'HMDE alla concentrazione attuale dell'analita.

L'applicabilità del metodo a matrici reali è stata quindi verificata analizzando campioni di lenticchie (*Lens esculenta*) messi a germinare su substrati contenenti concentrazioni crescenti di rodio (da 0 fino a 5,0  $\text{mg/L}$ ). In presenza di 5,0  $\text{mg/L}$  non si è verificata nessuna germinazione.



I test di mineralizzazione, eseguiti sui campioni germinati essiccati a 80 °C fino a peso costante, hanno permesso di individuare il metodo più adeguato (doppio irraggiamento UV di 10 – 30 mg di campione secco + 6 mL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + 2 mL acqua ultrapura per 60'). I sub-campioni di radici, germogli e tegumenti sono stati quindi analizzati indipendentemente. La Figura 1 riporta un esempio dei voltammogrammi relativi all'analisi di un campione di germogli provenienti dai semi messi a germinare in presenza di 1,0 mg/L di rodio.

La concentrazione maggiore di rodio è stata determinata nelle radici. Quella massima, rilevata nei campioni messi a germinare in presenza di 1,0 mg/L di rodio, è stata  $24,2 \pm 3,7$  ng/L ( $\alpha = 0,05$ ;  $v = 5$ ) nella cella voltammetrica, corrispondente a  $19,9 \pm 3,0$  µg/g (peso secco).

Questo risultato preliminare è un'ulteriore conferma che il rodio può facilmente entrare nella catena alimentare. Il metodo sarà sottoposto ad uno studio completo di validazione.

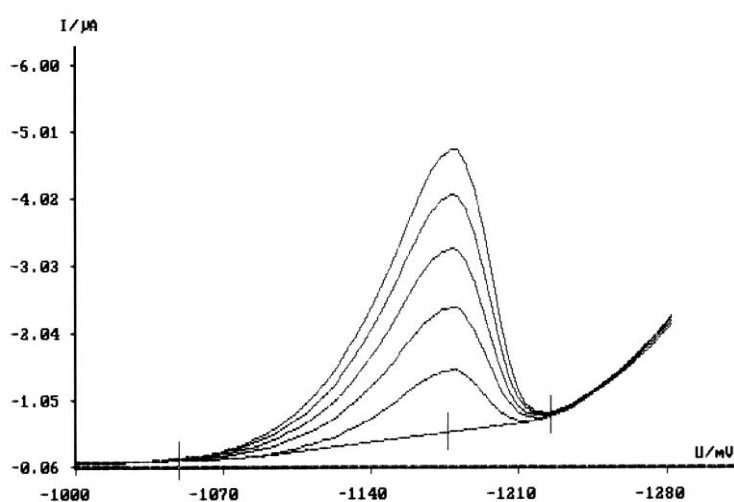


Figura 1. Voltammogrammi relativi all'analisi di germogli di lenticchia prima e dopo 4 aggiunte standard di 20 µL di una soluzione standard contenente 10 µg/L di rodio.

## Riferimenti

1. M.A. Palacios, M. Moldovan, M.M. Gomez, in: F. Zereini, F. Alt (Eds.), *Anthropogenic Platinum Group Element Emissions. Their Impact on Man and Environment*, Springer, Berlin 1999, p. 3.
2. G. Weber, Institute of Spectrochemistry and Applied Spectroscopy, Dortmund, comunicazione privata
3. E. Desimoni, B. Brunetti, R. Cattaneo, *J.Phys. IV France*, 107 (2003) 373.
4. E. Desimoni, B. Brunetti, R. Cattaneo, *Electroanalysis*, 16 (2004) 304.
5. T. Gebel, in: F. Zereini, F. Alt (Eds.), *Anthropogenic Platinum Group Element Emissions. Their Impact on Man and Environment*, Springer, Berlin 1999, p. 245.
6. N. Katsaros, A. Anagnostopoulou, *Crit. Rev. Oncol. Hemat*, 42 (2002) 297.
7. S. Artelt, O. Creutzberg, H. Kock, K. Levsen, D. Nactigall, U. Heinrich, T. Ruhle, R. Schlogl, *Sci. Total Environ*, 228 (1999) 219.
8. K. Hoppstock, F. Alt, K. Cammann, G. Weber, *Fresenius Z. Anal. Chem.*, 335 (1989) 813.
9. C. Leon, H. Emons, P. Ostapczuk, K. Hoppstock, *Anal. Chim. Acta*, 356 (1997) 99
10. Metrohm Application Bulletin 220/3 e, Voltammetric detection of Platinum and Rhodium in the Ultratrace Range.
11. T. Hong, M. Czae, C. Lee, Y Kwon, M. Hong, *Bull. Korean Chem. Soc.*, 15 (1994) 1035
12. E. Helmers, N. Mergel, *Fresenius J. Anal. Chem.*, 362 (1998) 522.

## SENSORI ELETTROCHIMICI MINIATURIZZATI MERCURY-FREE PER LA DETERMINAZIONE DI METALLI PESANTI

*Serena Laschi, Ilaria Palchetti, Marco Mascini*

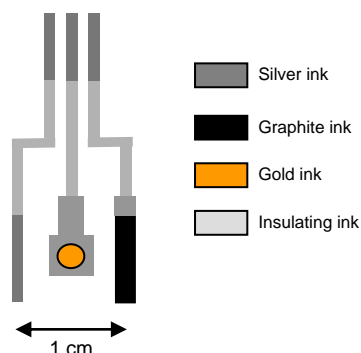
*Università degli Studi di Firenze, Dipartimento di Chimica  
Polo Scientifico, via della Lastruccia 3, 50019, Sesto Fiorentino, Firenze, Italy*

### Abstract

La voltammetria di ridissoluzione costituisce uno dei metodi elettrochimici più utilizzati per la determinazione di metalli pesanti in matrici complesse di varia natura [1]. Per tali applicazioni sono largamente impiegati elettrodi a base di mercurio; tuttavia, l'interesse crescente nel limitare il più possibile l'uso di sostanze tossiche per l'analisi ambientale ha spostato l'attenzione della ricerca verso la messa a punto di sistemi di misura alternativi in cui non fosse previsto l'uso del mercurio.

In questo lavoro sensori stampati a base di oro vengono proposti come trasduttori elettrochimici utilizzabili per la determinazione di elementi come Cd(II), Pb(II), Cu(II) e lo stesso Hg(II). Elettrodi di oro di diverse tipologie sono già stati utilizzati per la determinazione di metalli come Cu(II) e Hg(II) [2, 3], mentre elettrodi stampati con film di oro depositato sono stati recentemente impiegati per la determinazione del Pb(II) nell'analisi in flusso [4].

Nel nostro approccio, celle a tre elettrodi sono state prodotte in laboratorio attraverso stampa serigrafica, secondo lo schema riportato in figura 1:



**Fig. 1:** Schema di un elettrodo stampato a base di oro

Tali sensori sono stati ottenuti attraverso deposizioni successive di inchiostri a base di resine termoplastiche; in particolare l'elettrodo di lavoro è costituito da un inchiostro contenente particelle disperse di oro. La superficie di oro così ottenuta è stata impiegata per l'accumulo di metalli mediante l'applicazione di un opportuno potenziale. L'analisi di ridissoluzione è stata poi eseguita tramite voltammetria ad onda quadra, le cui condizioni sono state ottimizzate attraverso esperimenti preliminari, utilizzando HCl 0.1M come elettrolita di supporto.

Il sistema così messo a punto è stato applicato alla determinazione di Cd(II), Pb(II) Cu(II) e Hg(II) in soluzioni standard ed in campioni reali; per i suddetti analiti sono stati raggiunti limiti di determinazione dell'ordine del  $\mu\text{g/L}$ , associati a tempi di analisi inferiori ai 3 minuti. Il trascurabile effetto di avvelenamento della superficie elettrodica, soprattutto a basse concentrazioni di metallo, ha reso inoltre possibile l'uso del sensore per più misure consecutive.

Un ulteriore approccio ha poi riguardato l'applicazione dello stesso sensore alla determinazione della specie As(III). Anche in questo caso la misura ha previsto fasi di

accumulo e di ridissoluzione per le quali è stato necessario riottimizzare i parametri analitici. Risultati positivi sono stati ottenuti dagli esperimenti preliminari effettuati, i quali hanno inoltre mostrato, oltre ad una soddisfacente riproducibilità, una buona sensibilità del sistema. Il sensore sviluppato è stato infine accoppiato ad una strumentazione portatile, rendendolo applicabile ad eventuali analisi sul campo.

### **Bibliografia**

1. J. Wang, B. Tian; *Analytical Chemistry*, 65 (1993), pp 1529-1532.
2. Y. Bonfil, M. Brand, E. Kirowa-Eisner; *Analytica Chimica Acta*, 387 (1999), pp 85-95.
3. C. M. Watson, D. J. Dwyer, J. F. Andle, A. E. Bruce, M. R. M. Bruce; *Analytical Chemistry*, 71 (1999), pp. 3181-3186.
4. P. Masawat, S. Liawruangrath, J. M. Slater; *Sensors and Actuators B: Chemical*, 91 (2003), pp. 52-59.

**PROPOSTA DI UNA PROCEDURA ANALITICA PER LA SIMULTANEA  
VOLTAMMETRICA DETERMINAZIONE DI METALLI PESANTI IN MATRICI DI  
INTERESSE ALIMENTARE ANCHE IN PRESENZA DI RECIPROCHE  
INTERFERENZE**

*Clinio Locatelli e Giancarlo Torsi*

*Dipartimento di Chimica “G. Ciamician”, Università di Bologna, Via F. Selmi 2,  
I-40126 Bologna (Italy)  
e-mail: [clinio.locatelli@unibo.it](mailto:clinio.locatelli@unibo.it)*

I metodi voltammetrici sono tecniche estremamente versatili ed adatte per la simultanea determinazione di metalli in matrici complesse.

Il presente lavoro, riguardante la determinazione di Cr(VI), Pb(II), Sn(II), Sb(III), Cu(II), Zn(II), Mn(II) and Mo(VI) mediante voltammetria ad onda quadra (SWV), può essere un interessante esempio circa la possibilità di determinare ciascun singolo elemento in matrici reali (in questo caso farine di frumento e di mais), anche nel caso di reciproche interferenze.

Come elettrolita di supporto è stato impiegato citrato d'ammonio pH 6.5 e 8.7, mentre le misure voltammetriche sono state eseguite impiegando una convenzionale cella a tre elettrodi. La procedura analitica, una volta messa a punto su soluzioni acquose di riferimento è stata verificata mediante l'analisi di materiali standard di riferimento: Wholemeal BCR-CRM 189, Wheat Flour NIST-SRM 1567a e Rice Flour NIST-SRM 1568a.

La precisione e l'accuratezza, espresse rispettivamente come deviazione standard relativa ed errore relativo, sono risultate inferiori al 7 % in tutti i casi.

I limiti di rivelabilità per ciascun elemento si sono mostrati inferiori a 0.096 µg/g. Come sottolineato in precedenti studi [1], anche nel presente caso, l'impiego dell'area di picco anziché l'altezza di picco come parametro strumentale consente di ottenere limiti di rivelabilità migliori.

In presenza di reciproche interferenze di segnale di elementi aventi potenziali di picco molto vicini fra loro, ancora una volta [2] il metodo delle aggiunte standard ha permesso di migliorare considerevolmente la risoluzione delle diverse specie.

Una volta messa a punto su soluzioni acquose di riferimento e verificata su materiali standard di riferimento, la procedura analitica proposta è stata trasferita ed applicata su campioni di farina commerciali.

Nel presente lavoro viene anche discusso un confronto critico con misure spettroscopiche effettuate sugli stessi campioni.

1. C. Locatelli, *Electroanalysis* 15 (2003) 1397-1402.
2. C. Locatelli, G. Torsi, *J. of Electroanal. Chem.* 509 (2001) 80-89.

**STUDIO MORFOLOGICO DI POLITIOFENI CONDUTTORI AL VARIARE DELLE CONDIZIONI DI POLIMERIZZAZIONE E DI DROGAGGIO-DEDROGAGGIO**

*Omar Cerri<sup>a</sup>, Massimo Innocenti<sup>a</sup>, Laura Pigani<sup>b</sup>, Serena Santiccioli<sup>a</sup>, Renato Seeber<sup>b</sup>, Fabio Terzi<sup>b</sup>, Roberto Udisti<sup>a</sup>, Chiara Zanardi<sup>b</sup>*

<sup>a</sup>*Dipartimento di Chimica, Università degli Studi di Firenze, via della Lastruccia 3, 50019 Sesto Fiorentino (FI)*

<sup>b</sup>*Dipartimento di Chimica, Università degli Studi di Modena e Reggio Emilia, via G. Campi 183, 41100 Modena*

I polimeri conduttori (CP) costituiscono una nuova classe di materiali, che ha destato particolare interesse in relazione alle numerose applicazioni possibili in campo scientifico e tecnologico, conseguenti alle loro caratteristiche elettriche ed ottiche: dalle batterie ai dispositivi molecolari elettronici, alla protezione dalla corrosione, alle applicazioni sensoristiche. In particolare, lo sviluppo di sensori altamente selettivi e sensibili, ed allo stesso tempo semplici da usare, rappresenta un obiettivo di notevole importanza per la chimica analitica. Uno stadio preliminare, essenziale per la comprensione del funzionamento di un sensore elettrochimico costituito da un elettrodo modificato da un CP, è rappresentato dall'analisi di tutte le caratteristiche del film elettrogenato, in particolare della sua struttura (morfologia), nella fase in cui l'elettrodo viene utilizzato e in cui vengono esplicate le proprietà del polimero verso i substrati.

In questo poster si evidenzierà come il processo di crescita dei CP, in particolare di politiofeni conduttori, e le caratteristiche morfologiche del film polimerico generato, siano influenzati da variabili sperimentali come l'elettrolita di supporto utilizzato, il metodo di crescita scelto (potenziodinamico o potenziostatico), ed il potenziale applicato nella successiva fase di drogaggio per via elettrochimica (di p- e, possibilmente, anche di n-doping). In quest'ottica, la possibilità di effettuare simultaneamente misure elettrochimiche convenzionali e misure morfologiche (EC-AFM – ElectroChemical Atomic Force Microscopy) *in situ* sotto stretto controllo del potenziale è risultata fondamentale per interpretare e comprendere i fenomeni legati all'elettrogenazione del polimero. La cella di misura EC-AFM è stata ideata, costruita, sperimentata ed adattata nel laboratorio di elettroanalitica dell'Università di Firenze, per permettere la raccolta contemporanea di dati elettrochimici e morfologici con ricambio della soluzione sotto controllo del potenziale. Dopo avere verificato come le diverse variabili sperimentali influenzano la morfologia di diversi politiofeni recanti sostituenti di varia natura sulla catena, si cercherà di evidenziare un'eventuale corrispondenza tra le differenze osservate nei responsi elettrochimici e le morfologie dei depositi, sia in assenza che in presenza di potenziale applicato. In questo lavoro vengono riportati i risultati ottenuti durante la crescita e la caratterizzazione di alcuni tra i polimeri studiati considerati più rappresentativi: il polibitiofene (PBT), considerato il politiofene di "riferimento"; il poli 4,4'-bis(butilsulfanil)-2,2'-bitiofene (PBST), ottenuto da un monomero di sintesi originale su cui è già stata eseguita una ampia caratterizzazione elettrochimica dal nostro gruppo di ricerca; il poli(3,4-etilenediossitiufene) (PEDOT), uno dei politiofeni più ampiamente studiati in questi tempi grazie alle numerose applicazioni dovute al valore di band gap particolarmente ridotto; il nostro gruppo ha solo di recente iniziato ad occuparsi di questo CP. Il PEDOT inoltre, presenta il notevole vantaggio di potere essere elettrosintetizzato direttamente in soluzioni acquose, ottenendo film omogenei di elevata stabilità, aspetto questo molto importante in vista delle possibili applicazioni analitiche.

A titolo di esempio illustrativo dei risultati finora raccolti, riportiamo in Figura 1 due immagini che evidenziano le differenze del PBT cresciuto per via potenziostatica in presenza

di due diversi elettroliti supporto,  $\text{LiClO}_4$  e tetrabuttilammonioesafluorofosfato,  $\text{TBAPF}_6$  e in Figura 2 l'effetto di 'rigonfiamento', sempre del PBT, a potenziali di p-doping crescenti.

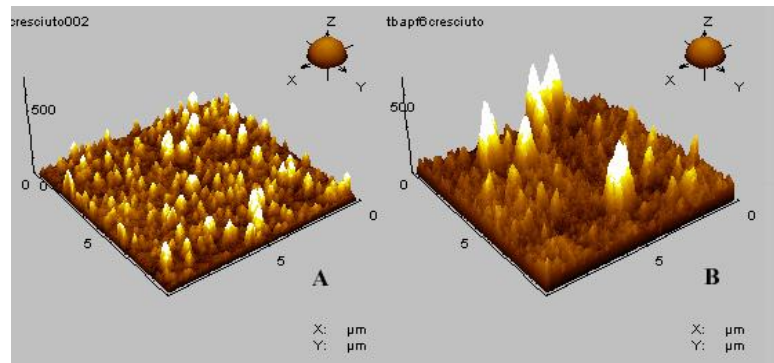


Figura 1: Immagini AFM tridimensionali  $10\mu\text{m} \times 10\mu\text{m}$  del film polimerico di PBT ottenuto con la modalità di crescita potenziostatica in presenza di A)  $\text{LiClO}_4$  e B)  $\text{TBAPF}_6$  come elettroliti di supporto

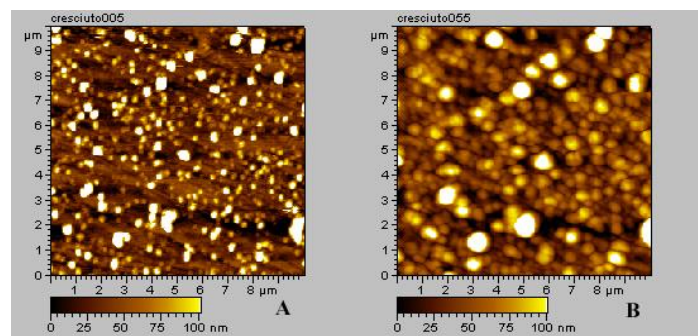


Figura 2: Immagini AFM di depositi di PBT ottenuti mediante una crescita potenziostatica in presenza di  $\text{LiClO}_4$  come elettrolita di supporto e sottoposti ad un potenziale A)  $+0.8\text{ V}$  e B)  $+1.0\text{ V}$ .

**SINTESI E CARATTERIZZAZIONE ELETTROCHIMICA DI  
DERIVATI TIOFENICI CON SOSTITUENTI TERPIRIDINICI  
COME PRECURSORI DI POLIMERI CONDUTTORI FUNZIONALIZZATI**

*Roberta Scanu<sup>1</sup>, Marco Serra<sup>1</sup>, Maria Pilo<sup>1</sup>, Nadia Spano<sup>1</sup>, Gavino Sanna<sup>1</sup>, Alberto Mariani<sup>1</sup>,  
Antonio Zucca<sup>1</sup>, Paola Piu<sup>1</sup>, Laura Pigani<sup>2</sup>, Chiara Zanardi<sup>2</sup>, Renato Seeber<sup>2</sup>*

<sup>1</sup>*Dipartimento di Chimica – Università di Sassari – Via Vienna, 2 – 07100 Sassari*

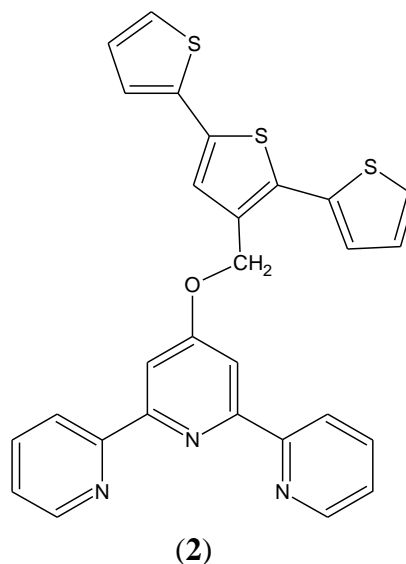
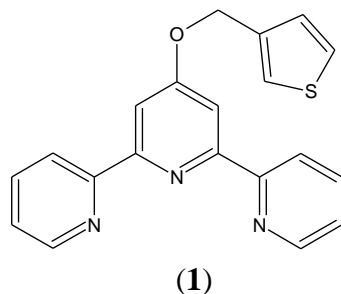
<sup>2</sup>*Dipartimento di Chimica – Università di Modena e Reggio Emilia – Via G.Campi, 183 – 41100 Modena*

Negli ultimi anni una delle innovazioni più significative nel settore dell'elettroanalisi ha riguardato la modifica di superfici elettrodiche con polimeri conduttori, in particolare a base tiofenica. Peraltro, l'introduzione nel polimero di un sito redox specifico può modificarne radicalmente le caratteristiche di reattività e di conducibilità.

Alla luce di queste considerazioni, il nostro interesse di ricerca si è indirizzato alla sintesi e caratterizzazione elettrochimica di nuove specie in cui sono presenti sia un gruppo tiofenico che un legante azotato, quale la terpiridina, in grado di complessare ioni metallici, come ad esempio Ru(III). È infatti nota la capacità complessante dei leganti azotati (mono- o polidentati) nei confronti di ioni di metalli di transizione dell'VIII gruppo.

Il primo stadio di tale ricerca ha portato alla sintesi del composto **(1)** e del relativo complesso del Ru(III), entrambi caratterizzati mediante spettroscopia NMR ed IR, analisi elementare, punto di fusione e voltammetria ciclica. I tentativi di polimerizzare questa specie per via elettrochimica non hanno sinora portato a risultati positivi.

Considerando che una probabile causa della difficoltà di ottenere il polimero per via elettrochimica risiede nell'eccessivo ingombro sterico della terpiridina, si è pensato di funzionalizzare l'anello centrale di un sistema tertiofenico, così da 'allontanare' il legante laterale dal sito di propagazione della catena. Abbiamo quindi messo a punto la sintesi della specie **(2)**, che è attualmente in fase di completa caratterizzazione.



## TiO<sub>2</sub> NANOSTRUCTURED MATERIAL TO ASSEMBLE ELECTROCHEMICAL PROBES: DIRECT ELECTROCHEMISTRY AND BIOELECTROCHEMISTRY

A. Curulli<sup>1\*</sup>, F. Valentini<sup>2</sup>, G. Padeletti<sup>3</sup>, S. Kaciulis<sup>3</sup>, M. Viticoli<sup>3</sup>, D. Caschera<sup>3</sup>, and G. Palleschi<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Institute of Nanostructured Materials (ISMN) CNR Division 2, via del Castro Laurenziano 7, 00161 Rome (Italy).

<sup>2</sup> Tor Vergata University, Department of Chemistry, via della Ricerca Scientifica 1, 00133 Rome (Italy).

<sup>3</sup> Institute of Nanostructured Materials (ISMN) CNR Division of Montelibretti, via Salaria Km.29.5, 00016 Monterotondo Rome (Italy).

\*Corresponding author: antonella.curulli@uniroma1.it

### Abstract

Nanotechnology[1] has been defined as technology that arises from the exploitation of novel and improved properties, phenomena and processes specifically at the intermediate scale between atoms/molecules and bulk behaviour (0.1-100 nm). In this area, one of the research subjects at the CNR ISMN Institute and Tor Vergata University, is Smart (Nano)Materials with biosensing functions.

Smart (Nano)Materials with biosensing functions possess enormous potential in development of new generation of stable biosensors, affinity separation matrices and drugs development and due to this are subject of intense study in hundreds of research centers and companies across the Europe.

The particular areas of science and applications include:

- Design of responsive ("smart") nanomaterials for the incorporation of the sensing functions;
- Development of new generation of stable biomimetic sensors for extreme environments, environmental and clinical monitoring.

In this work we produced inorganic nano-structured materials by bottom-up techniques like MOCVD, which allow us to obtain surfaces of polycrystalline materials in which the dimension of grains are of the order of tens of nanometers. Moreover, we are able to synthesise nanostructured metals, oxides (Fig. 1) and semiconductors. Recently, there is a considerable interest in using TiO<sub>2</sub> nanostructured materials as a film-forming material since they have high surface area, optical transparency, and good biocompatibility[2]. Studies were carried out on nanostructured TiO<sub>2</sub> film electrodes, to demonstrate the direct electrochemistry of proteins, as cytochrome c, myoglobin, and hemoglobin, and other biological molecules (like: dopamine, epinephrine, DOPAC, uric acid, ascorbic acid, ecc.,) and inorganic substrates (like: potassium ferricyanide, hexaammineruthenium(III) chloride, sodium hexachloroiridate(III) hydrate, ferrocene monocarboxylic acid, and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Titania nanostructured films were also used to immobilize enzymes, as glucose oxidase (GOD a model enzyme) or Horseradish peroxidase (HRP) which are enzymes using H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> as an electron acceptor.

The immobilization of GOD enzyme on the nanostructured TiO<sub>2</sub> film surface allows the construction of glucose responsive biosensors, for which the immobilisation of single or clustered GOD molecules represents a crucial and important step. In this work we described on the amperometric biosensors assembled on TiO<sub>2</sub> nanostructured film electrodes, where the reduction current of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (vs. Ag/AgCl reference electrode) were recorded as the analytical signal. Morphological informations are acquired using Atomic Force Microscopy (AFM; Fig. 1), and X-ray photoelectron spectroscopy (XPS) to characterize not only the inorganic nanostructured materials (TiO<sub>2</sub>) but also the biological component (GOD enzyme) adsorbed



on the nanostructured film surfaces. In particular, the XPS technique offers a possibility to recognize the chemical groups involved for enzyme linking on the nanostructured substrates. This aspect is a crucial point to understand the performances of the new assembled nanostructured biosensors, whose properties were closely related to the spatial arrangement of the enzyme molecules adsorbed on the nanostructured  $\text{TiO}_2$  film electrodes, the intramolecular interactions, and the dependence of molecular clustering on the adsorption concentrations.

**Keywords:** nanostructured materials; enzyme biosensors; electrochemical sensors.

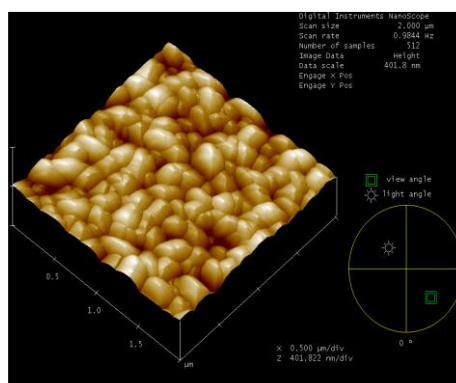


Fig. 1 AFM image of nanostructured metal oxide.

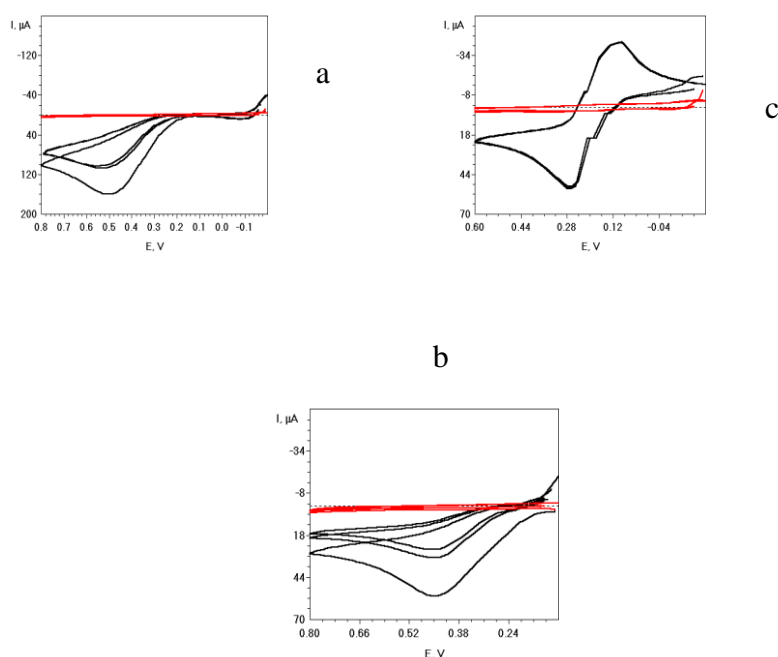


Fig. 2. Cyclic Voltammograms for 0.1 mM epinephrine (a); 0.1 mM norepinephrine (b); and 0.1 mM dopamine (c) in 0.1 M phosphate buffer solution, pH 7.0. Scan rate: 100 mV/s, 3 cycles. Experiments were carried out at R.T.

## References

1. S. Iijima, and T. Ichihashi; *Nature*, 363 (1993), p 503.
2. Y. Zhang, P. He, N. Hu; *Electrochimica Acta*, 49 (2004), pp 1981-1988.

## DETERMINAZIONE DI NICHEL E CADMIO NEL PARTICOLATO ATMOSFERICO PM<sub>2.5</sub> TRAMITE TECNICHE VOLTAMMETRICHE PULSATE

*Enrica Alfieri, Marco Giannetto, Giovanni Mori, Massimo Pizzol*

*Dipartimento di Chimica Generale ed Inorganica, Chimica Analitica, Chimica Fisica  
Università degli Studi di Parma - Parco Area delle Scienze 17/A I-43100 Parma  
e-mail: alfierenrica@libero.it, ealfieri@nemo.cce.unipr.it*

È ormai noto che l'aria dei grandi centri urbani è interessata dalla presenza di molteplici inquinanti. Tra questi le polveri presentano un crescente interesse per i possibili effetti sanitari sulla popolazione.<sup>1</sup>

La composizione del particolato è estremamente variabile in base all'origine delle particelle (piombo, nichel, zinco, rame, cadmio, fibre di amianto, solfati, nitrati, idrocarburi policiclici pesanti, polvere di carbone e cemento). La frazione di polveri considerata più pericolosa per l'uomo è quella in grado di superare le barriere delle vie aeree superiori ovvero i PM<sub>10</sub> e i PM<sub>2.5</sub>, particelle di polvere con diametro inferiore a 10 e a 2,5 micron rispettivamente. Questo inquinante, che si origina soprattutto dalla combustione, reagisce chimicamente nell'atmosfera con altre sostanze. I danni addebitabili alle particelle inalate sono dovuti al fatto che tali particelle, raggiungendo gli alveoli polmonari, rilasciano sostanze tossiche e possono ostruire gli alveoli stessi. Ne consegue un effetto irritante per le vie respiratorie e la possibilità di indurre alterazioni nel sistema immunitario, favorendo il manifestarsi di malattie croniche, quali maggior sensibilità agli agenti allergizzanti. L'effetto irritante è strettamente dipendente dalla composizione chimica del particolato. E' anche ormai accertato il diretto rapporto tra elevata concentrazione di particolato e tasso di mortalità per complicanze polmonari che si verificano nei giorni successivi ad elevate concentrazioni.<sup>2</sup>

La valutazione del materiale particolato atmosferico riveste significativa importanza sia per la determinazione della qualità dell'aria che per l'identificazione delle varie sorgenti di contaminazione (attività industriali, traffico veicolare, ecc.).<sup>3</sup>

I metalli si ritrovano nel particolato atmosferico a seguito del loro adsorbimento. Una grande varietà di metalli di transizione volatilizzano in seguito a processi di combustione di combustibili fossili, di smaltimento di minerali o di incenerimento dei rifiuti solidi urbani e sono emessi come particolato fine (o vapori che si trasformano rapidamente in particolato fine).<sup>1</sup>

In seguito a un lavoro che si propone di ricercare nelle polveri sottili dei possibili traccianti del traffico veicolare, si sta procedendo nello sviluppo di metodi pseudopolarografici per la determinazione di Ni e Cd nel particolato atmosferico PM<sub>2.5</sub> (polveri atmosferiche con diametro aerodinamico inferiore a 2,5 µm).

Un campionatore sequenziale ad alto volume (HVS: High Volume Sampler) ha prelevato il particolato PM<sub>2.5</sub> in un sito non direttamente esposto a grandi flussi di traffico, che si configura come un sito di fondo urbano (v.le Messina a Milano). Si è assunto che i dati del sito possano caratterizzare il fondo urbano, risultante dall'attività di tutte le sorgenti. I filtri in fibra di quarzo, condizionati e pesati, in camera ad atmosfera controllata, sono stati sezionati ed analizzati in seguito a mineralizzazione in acido nitrico 65% *suprapur* assistita da microonde.

In questo lavoro sono stati monitorati Ni e Cd in una trentina di filtri di PM<sub>2.5</sub> in fibra di quarzo relativi ai periodi settembre 2002 - novembre 2003 raggruppati nei quattro periodi stagionali e distribuiti in giorni feriali e festivi allo scopo di identificarne eventuali differenze riportate anche in letteratura.<sup>4,5</sup>

Il cadmio è contenuto nelle benzine e negli oli e nei lubrificanti dei motori a due tempi, che equipaggiano gran parte degli scooter, ed è per tale motivo immesso nell'atmosfera

principalmente a seguito della combustione da traffico veicolare. Può inoltre essere immesso direttamente nell'aria dalle industrie che lo utilizzano nei più svariati processi produttivi.<sup>6</sup> La determinazione del cadmio nel  $PM_{2.5}$  è stata effettuata tramite voltammetria di ridissoluzione anodica con scansione differenziale ad impulsi (*Differential Pulse Anodic Stripping Voltammetry*, DPASV). La voltammetria di ridissoluzione sfrutta la proprietà che hanno alcuni metalli (tra cui il Cd) di formare amalgami con il mercurio.<sup>7</sup> La soluzione mineralizzata deve essere parzialmente neutralizzata con NaOH *ultrapur* e addizionata di un tampone acetico a pH 4.6.

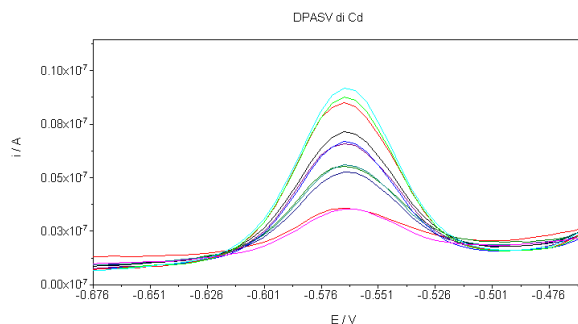


Figura 1: Voltammogrammi DPASV relativi alla determinazione del Cadmio in un filtro di particolato atmosferico  $PM_{2.5}$  con il metodo delle aggiunte multiple (3 aggiunte, 2 replicati per ciascun livello).

Il Nichel si trova nell'ambiente atmosferico a bassi livelli come il risultato del rilascio della combustione di oli e carbone, la raffinazione del nichel metallico, l'incenerimento dei fanghi, le produzioni manifatturiere e altre sorgenti come nafta, acciaio e leghe. A differenza del cadmio, il Ni può essere determinato elettroanaliticamente tramite voltammetria di stripping catodico adsorbitivo (*Differential Pulse Adsorptive Cathodic Stripping Voltammetry* DPAdCSV) a pH elevati ( $\approx 9.5$ ) e in presenza di Dimetilgliossima ( $Na_2DMG$ ) come agente complessante.

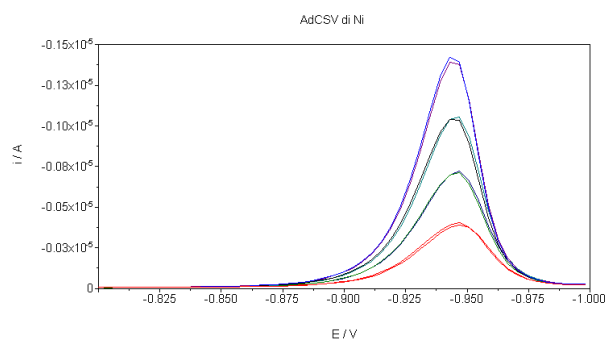


Figura 2: Voltammogrammi DPAdCSV relativi alla determinazione del Nichel in un filtro di particolato atmosferico  $PM_{2.5}$  con il metodo delle aggiunte multiple (3 aggiunte, 2 replicati per ciascun livello).

## Riferimenti

- [1] E. Alfieri, G. Mori, M. Giugliano e M. Giannetto: "Monitoraggio del particolato atmosferico e di alcune sue componenti nell'atmosfera urbana di Parma"; tesi di laurea in Scienze Ambientali, Università degli studi di Parma, a.a. 2000-2001.
- [2] Ministero Italiano della Salute, "La promozione della salute", p. 70
- [3] Stanley E. Manahan, "Environmental Chemistry", Lewis Publishers - CRC Press LLC, Seventh Edition (2000), 898 ss.
- [4] Lonati G., Cernuschi S., Giugliano M., "Il particolato fine in Lombardia nel 1999", Dipartimento di Ingegneria Idraulica, Ambientale e del Rilevamento - Sezione Ambientale - Politecnico di Milano, 1999
- [5] Houthuijs D., Breugelmans O., Hoek G., Vaskovi E., Mihalikova E., Pastuszka JS., Jirik V., Sachelarescu S., Lolova D., Meliefste K., Uzunova E., Marinescu C., Volf J., de Leeuw F., van de Wiel H., Fletcher T., Lebret E., Brunekreef B., "PM<sub>10</sub> and PM<sub>2.5</sub> concentrations in Central and Eastern Europe: results from the Cesar study", *Atmospheric Environment*, 35(15), 2001, pp. 2757 – 2771
- [6] Vismara R., *Ecologia applicata*, ed. Hoepli, seconda edizione, 1992
- [7] Cozzi R., Protti P., Ruaro T., *Analisi chimica strumentale*, ed. Zanichelli, Seconda edizione, A, 1997, 134-135

## SVILUPPO DI UN SISTEMA AUTOMATICO PER LA DETERMINAZIONE ELETTROCHIMICA DI NITRITI E NITRATI NELLE ACQUE

V. Biagiotti<sup>1</sup>, M. Burgio<sup>1</sup>, A. Amine<sup>2</sup>, M. Badea<sup>3</sup>, D. Moscone<sup>1</sup>, G. Palleschi<sup>1</sup>

1. Dipartimento di Scienze e Tecnologie Chimiche, Università di Roma "Tor Vergata", Roma
2. Faculté de Sciences et Techniques, Université Mohammadia, Mohammadia, Marocco
3. Biotechnology Department, Institute for Chemical Research, University of Bucharest, Bucharest, Romania

Le analisi di controllo delle acque destinate al consumo umano (acque potabili e minerali) prevedono il monitoraggio di differenti parametri chimici, fisici, organolettici e microbiologici. Tra i parametri chimici assumono grande rilevanza per la salute umana e per il controllo dell'inquinamento alcuni composti dell'azoto ed in particolare nitriti e nitrati.

I nitriti possono provocare la metemoglobinemia ed inoltre nell'apparato digerente umano possono essere convertiti nelle cancerogene nitrosammine.

I nitrati invece sono molto più stabili e meno tossici dei nitriti ma possono essere rapidamente convertiti a nitriti tramite processi riduttivi ad opera di batteri.

Le innovazioni introdotte a livello normativo sul controllo della qualità delle acque comportano lo sviluppo di sistemi di analisi più frequenti e possibilmente "on-line".

Sono stati sviluppati numerosi metodi per la determinazione di questi due analiti, ma tuttora il metodo di riferimento per la determinazione dei nitriti è quello basato sulla reazione di Greiss (spettrofotometrico), mentre i nitrati vengono determinati nello stesso modo, previa riduzione a nitriti. Tuttavia questo metodo presenta dei tempi di risposta relativamente lunghi e per questo motivo non è facilmente adattabile a sistemi di misura in flusso continuo.

In questo lavoro è stato sviluppato un metodo elettrochimico per la determinazione accoppiata di nitrati e nitriti. I nitrati sono ridotti a nitriti mediante una colonnina Cu/Cd; i nitriti sono elettroattivi e possono essere facilmente ossidati su un elettrodo di platino polarizzato a 900 mV (vs Ag/AgCl). A causa dell'alto potenziale di lavoro, numerose altre specie elettroattive presenti in soluzione, possono interferire nella misura; per ovviare a questo inconveniente la superficie dell'elettrodo è stata coperta con una membrana di acetato di cellulosa, che impedisce il passaggio degli interferenti più comuni. È stato assemblato un sistema in flow injection analysis (FIA), successivamente automatizzato con l'utilizzo di valvole solenoidali. In questo modo è stato possibile effettuare un numero elevato di misure senza alcun intervento da parte dell'operatore.

**DETERMINATION OF LEAD IN MILK SAMPLES USING DIFFERENTIAL PULSE ANODIC STRIPPING VOLTAMMETRY AT THE BISMUTH FILM ELECTRODE**

*Josefina Calvo Quintana, Aziz Amine, Danila Moscone, Giuseppe Palleschi*

*Dipartimento di Scienze e Tecnologie Chimiche, Università di Roma "Tor Vergata", Roma*

One of the most serious problems the world is facing today is the environment pollution by inorganic, organic and organometallic species. An area of particular interest is the detection of heavy metals in environmental matrices. These toxic metals are incorporated into drinking water and in food chains.

Electrochemical techniques, especially stripping analysis, satisfy many of the requirements for on-site screening of heavy metal ions because of the low cost, low power requirements, speed of analysis, sensitivity and instrument compatibility. The remarkable sensitivity obtained with stripping analysis is attributed to the deposition step in which the target analytes are preconcentrated onto the working electrode.

A three-electrode configuration system has been fabricated using low-cost screen-printed technology and this, coupled with a electrochemical instruments, has provided a relatively inexpensive on-site detector for trace levels of toxic metals. The carbon surface of the screen-printed working electrode is used as a substrate for in situ deposition of metallic film of bismuth, which allows the electrochemical preconcentration of metal ions. Lead is detected using Differential Pulse Anodic Stripping Voltammetry (DPASV) at the bismuth film electrode. Detection limits of 0.3  $\mu\text{g/L}$  (ppb) of lead were obtained for a deposition time of 120s. The developed method was applied to the determination of lead in different types of milk.

Investigations on novel types of metallic film electrodes has been carried out and, at present, it is focused on the direct modification of the paste with solid oxide such  $\text{HgO}$  and  $\text{Bi}_2\text{O}_3$ . Screen printed electrode bulk-modified with  $\text{Bi}_2\text{O}_3$  was used for the determination of Lead (II). Different bismuth oxide compositions were used on the surface carbon, the optimization of different experimental parameters has been studied in detail: deposition potential, a short equilibrium period in quiet solution, comparison of analytical performance with that of conventional film electrodes. Preliminary results in these directions are very encouraging.

**COMUNICAZIONI POSTER**

**BIOANALITICA**

## UN NUOVO APPROCCIO PER LA PREPARAZIONE DI OLIGOPEPTIDI LEGANTI IL p,p'-DDT A PARTIRE DA ANTICORPI

*Laura Anfossi, Cristina Giovannoli, Gianfranco Giraudi, Adriano Vanni*

*Laboratorio di Bioanalitica, Dipartimento di Chimica Analitica, Università di Torino*

*[laura.anfossi@unito.it](mailto:laura.anfossi@unito.it)*

Lo sviluppo di sistemi sintetici riproducibili, controllabili e poco costosi in grado di mostrare capacità di riconoscimento molecolare simili a ciò che si riscontra in natura, come ad esempio nel caso di anticorpi, enzimi, recettori, è uno degli obiettivi di interesse attuale della ricerca scientifica. A tal fine si sono sviluppati molti approcci, tra i quali alcuni ormai consolidati come la tecnica della sintesi di polimeri a stampo molecolare (si veda ad esempio [1]), altri più recenti, ma molto promettenti, come l'utilizzo di peptidi sintetici con proprietà leganti nei confronti di molecole di interesse [2].

Nel nostro gruppo in particolare, è stata messa a punto una tecnica di preparazione di peptidi leganti, mediante sintesi combinatoriale, che ha mostrato buoni risultati in termini di capacità di riconoscimento molecolare, di semplicità di preparazione, di riproducibilità e di economicità [3,4]. Il limite attuale di quest'approccio riguarda la limitata, anche se buona, affinità dei peptidi ottenuti (costanti di affinità dell'ordine di  $10^4$ - $10^5$  M<sup>-1</sup>) e la loro dimensione, che per ragioni sia sintetiche sia di metodo rimane inferiore a 6-8 unità aminoacidiche per peptide.

Al fine di ottenere sequenze peptidiche con affinità superiori a quelle osservate con l'approccio combinatoriale per poterle utilizzare in veri e propri saggi analitici, in sostituzione di anticorpi, si propone di determinare la sequenza aminoacidica del sito legante di un anticorpo, che mostri un'elevata affinità verso una molecola di interesse, e di preparare per via sintetica tale sequenza, caratterizzandola poi dal punto di vista dell'affinità e della selettività.

L'approccio proposto consiste nell'immobilizzare l'anticorpo specifico su di una fase stazionaria funzionalizzata con un derivato dell'analita di interesse, procedere ad un attacco proteolitico dell'anticorpo mediante tripsinizzazione, eliminare i peptidi ottenuti ad esclusione di quelli direttamente interessati al legame con l'analita mediante lavaggio della fase stazionaria ed infine eluizione e recupero dei peptidi leganti in condizioni tali da favorire la dissociazione del complesso peptide-analita. Le sequenze così ottenute devono poi essere identificate e, a tal fine, si è messo a punto un opportuno metodo di separazione e determinazione mediante LC-ESI-MS. Una volta identificate le sequenze, si potrà procedere a sintetizzarle e a caratterizzarne le proprietà di legame. Queste verranno confrontate con quelle di peptidi ottenuti attraverso la tecnica della sintesi combinatoriale per valutare le potenzialità e l'efficienza dell'approccio proposto.

Come sistema modello per studiare questo approccio, si è scelto il p,p'-DDT (1,1,1-tricloro-2,2-bis-(4-clorofenil)etano), noto pesticida e modulatore endocrino, di cui sono disponibili sia un anticorpo con buona affinità, sia un derivato commerciale direttamente coniugabile ad una resina per la preparazione della fase stazionaria di cattura.

Si è proceduto quindi allo studio ed alla messa a punto delle fasi di cattura dell'anticorpo, della digestione con tripsina e della separazione e recupero dei peptidi interessati al legame con l'analita dal resto del digerito triptico. Inoltre, si è sviluppato un opportuno metodo di separazione cromatografica e di caratterizzazione in spettrometria di massa (ESI-Q) di oligopeptidi per l'identificazione delle sequenze.

Parallelamente è stato ottenuto e caratterizzato un tetrapeptide legante il p,p'-DDT per sintesi combinatoriale in modo da valutare e confrontare i 2 approcci su di uno stesso analita, sia dal

punto di vista di quali aminoacidi siano coinvolti nel legame, sia dal punto di vista delle caratteristiche di legame, in vista di un utilizzo come mimici di anticorpi in saggi analitici.

- [1] B. Sellergren in Molecular imprinted polymers. Man made mimics of antibodies and their application in analytical chemistry. B. Sellergren eds. Elsevier, Amsterdam
- [2] V.J. Hruby, Nature Rev 1 (2002) 847-585
- [3] C. Tozzi, L. Anfossi, G. Giraudi, C. Giovannoli, C. Baggiani, A. Vanni, J Chromatogr. A 966 (2002) 71-79
- [4] C. Tozzi, L. Anfossi, C. Baggiani, C. Giovannoli, G. Giraudi, Anal. Bioanal. Chem. 375 (2003) 994-999



## DETECTION OF PESTICIDE IN ORGANIC SOLVENT BY CHOLINESTERASE INHIBITION TO AVOID HEAVY METALS INTERFERENCE

F. Arduini<sup>1</sup>, F. Ricci<sup>1</sup>, I. Bourais<sup>2</sup>, A. Amine<sup>2</sup>, D. Moscone<sup>1</sup>, G. Palleschi<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Dipartimento di Scienze e Tecnologie Chimiche, Università di Roma Tor Vergata, Via della Ricerca Scientifica, Rome, Italy*

<sup>2</sup>*Faculté des Sciences et Techniques de Mohammedia, Morocco*

Pesticides are among the most important environmental pollutants because of their high toxicity and their significant presence in the environment.

Among the many methods reported for pesticide detection, chromatographic methods such as HPLC (High Performance Liquid Chromatography) and GC (Gas Chromatography) are used as reference methods. Despite their high sensitivities, these techniques are expensive, time consuming and required highly qualified personnel. Thus enzymatic methods have been adopted as an alternative to classical methods (GC, HPLC) for faster and simpler detection of some environmental pollutants.

The use of cholinesterase enzymes for inhibition-based determination of pollutants has shown great promise for environmental screening analysis [1,2]. The measurement of enzymatic activity can be accomplished by spectrophotometric method [3,4]. However, several problems have to be solved in order to make this kinetic approach effective.

A major problem relates to the effect of the organic solvents normally used for pesticide extraction on Acetylcholinesterase activity as many of these solvents are known to inhibit the AchE reaction [5]. At the same time, liquid extraction with organic solvents are the procedures usually adopted for pesticide determination. A second major problem involves the interference of heavy metals with the enzymatic determination of pesticides based on their inhibition of Acetylcholinesterase activity.

The need of an extraction method to avoid the presence of heavy metals during the measurement of pesticides based on Acetylcholinesterase (AchE) inhibition has been demonstrated by studying the reaction between thiocholine and heavy metals. Mercury ( $\text{Hg}^{2+}$ ) and Copper ( $\text{Cu}^{2+}$ ), usually present in contaminated samples, together with Silver ( $\text{Ag}^+$ ) have shown a strong affinity towards thiocholine.

We present the preliminary results obtained by using two different phases, one organic and the other aqueous, in which pesticide and enzyme are respectively solubilised. Firstly the concentration of the substrate acetylthiocholine (1 mM), of enzyme (7 mU/ml) and the reaction time (20 min) were optimised in aqueous solution. The organic phase was then added and the effect of various solvents on the enzyme activity was evaluated after 10 minutes of mixing. It was found that using hexane, the enzyme retained almost 100 % of activity and it was chosen for pesticide assays.

Hexane was spiked with different concentration of pesticides and then added to the enzyme aqueous phase. The pesticide are able to inhibit the enzyme at the interface between the two solutions. The degree of inhibition obtained with increasing amounts of pesticide was evaluated. A 50% inhibition has been observed by using paraoxon solution of  $9 \cdot 10^{-7}$  M and carbofuran solution of  $1 \cdot 10^{-7}$  M.

1. Bernabei M., Chiavarini S., Cremisini C., Palleschi G. Anticholinesterase Activity Measurement by a Choline Biosensor: Application in Water Analysis. *Biosens. Bioelectron.* **1993**, *8*, 265-271.
2. Cremisini, C.; Di Sario, S.; Mela, J.; Pilloton, R.; Palleschi, G. Evaluation of the Use of Free and Immobilised Acetylcholinesterase for Paraoxon Detection with an Amperometric Choline Oxidase Based Biosensor. *Anal. Chim. Acta* **1995**, *311*, 273-280.
3. P Mora, X. Michel, J. Narbonne. Cholinesterase activity as potential biomarker in two bivalves. *Environmental Toxicology and Pharmacology* **1999**, *7*, 253-260.
4. Ellman, G.L., Courtney K.D., Andres V, Featherstone R.M. A new and rapid colorometric determination of Acetylcholinesterase Activity, **1961**, *Biochem. Pharmacol.* *7*, 88-95.
5. Campanella L.; De Luca S.; Sammartino M.P.; Tomassetti M. A New Organic Phase Enzyme Electrode for the Analysis of Organophosphorus Pesticides and Carbamates. *Anal. Chim. Acta* **1999**, *385*, 59-71.

**MATERIALI ODONTOIATRICI E SICUREZZA**

*L. Campanella<sup>1</sup>, R. Dragone<sup>2</sup>*

*1 Dipartimento di Chimica Università “La Sapienza” P.le Aldo Moro, 5 – 00185 Roma*

*2 Istituto IMIP – CNR, sez. MICE c/o Dip. di Chimica Università “La Sapienza” - Roma*

La diffusione in odontoiatria di materiali protesici e otturativi, ha portato la comunità scientifica ad occuparsi dei rischi sanitari ad essi connessi, anche al fine di sviluppare nuovi materiali che offrano maggiore sicurezza.

Tra i primi materiali odontoiatrici si annovera l'amalgama d'argento (le prime notizie risalgono al 1826), che è costituito da argento, stagno, rame, zinco e mercurio; la sua caratteristica è di essere facilmente modellabile, aderente e di indurirsi completamente in circa due ore.

I primi studi di tossicità risalgono proprio al rilascio di metalli da parte di amalgami dentali, soprattutto per quanto riguarda gli effetti sul sistema nervoso da parte del mercurio in essi presente. Al fine di limitare l'interazione dell'amalgama con l'organismo ospite, sono stati sviluppati alcuni materiali per ricoprire l'amalgama dentale.

In generale, la valutazione dei rischi sanitari, connessi all'uso di materiali odontoiatrici, non è facile in quanto la loro possibile tossicità si manifesta per lo più con effetti subacuti che si evidenziano con il tempo e quindi non sempre facilmente correlabili ad essi. Inoltre c'è da considerare che tali effetti sono anche da mettere in relazione alla composizione chimica della saliva che può variare da individuo a individuo a causa delle abitudini personali, (es. fumo), particolari stati patologici, assunzione di medicinali.

Lo scopo di questo lavoro è stato duplice:

- valutare il rilascio da materiali odontoiatrici dei metalli contenuti in essi in presenza della saliva in condizioni fisiologiche o alterata a causa di patologie, cure mediche o per abitudini personali;
- confrontare il comportamento degli amalgami commerciali fra loro e con altre leghe eventualmente pretrattate per stabilizzarle.

A tal fine sono stati verificati i rilasci di metalli da questi materiali odontoiatrici, quando sono posti a contatto con saliva artificiale tal quale o additivata con sostanze che riproducono le alterazioni sopra citate.

Inoltre, al fine di verificare se i rilasci di metalli dai materiali odontoiatrici esaminati possano costituire una fonte di rischio per l'uomo, sono stati effettuati dei test respirometrici, su soluzioni simulanti quelle salivari di attacco, con cellule di lievito immobilizzate su terreno agarizzato. Il lievito rappresenta un buon modello biologico in diversi studi biochimici e tossicologici; inoltre, offre il vantaggio di evidenziare in tempi brevi, dell'ordine dell'ora, effetti subacuti che nell'uomo richiedono anni. Naturalmente rimane, come per gli altri test tossicologici eseguiti su animali o microorganismi, l'incertezza della correlazione dei risultati ottenuti con gli effetti sull'uomo.

I biotest sono stati eseguiti utilizzando soluzioni preparate in concentrazioni tali da somministrare alle cellule di lievito esattamente gli stessi quantitativi di metalli ottenuti nelle prove di rilascio.

## DETERMINAZIONE DELLA CAPACITA' ANTIOSSIDANTE DI SPEZIE COMMERCIALI MEDIANTE BIOSENSORI E SPETTROFLUORIMETRIA

*L. Campanella, A. Bonanni, T. Gatta, E. Gregori, M. Tomassetti*

*Dipartimento di Chimica, Università degli Studi di Roma "La Sapienza", P.le Aldo Moro, 5  
00185 Roma*

La ricerca intrapresa alcuni anni orsono dal nostro gruppo, tendente allo sviluppo di nuovi sensori e/o biosensori per la determinazione dei radicali liberi, ci ha condotto in tempi più recenti, a mettere a punto metodi elettrochimici o biosensoristici per la determinazione della capacità antiossidante; d'altra parte la misura di quest'ultima, o la misura del contenuto dei radicali liberi, in matrici reali, rappresentano null'altro che le due facce di un medesimo problema.

La migliore realizzazione da noi effettuata al riguardo consiste in un biosensore a superossido dismutasi (SOD), che abbiamo utilizzato, in un primo tempo, per la determinazione del radicale superossido [1] e, in un secondo tempo, per la misura della capacità antiossidante di un gran numero di matrici reali, soprattutto di interesse alimentare, o farmaceutico [2,3]. Negli ultimi anni sono state ad esempio considerate alcune comuni bevande (vino, tè), numerose matrici vegetali, fresche o essiccate, vari tipi di frutta, e prodotti erboristici. Recentemente sono stati analizzati anche un gran numero di spezie quali: anice, finocchio, basilico, menta, dragoncello, maggiorana, rosmarino, timo, prezzemolo, ginepro, alloro e diversi tipi di pepe. Tutti i campioni sono stati esaminati, a parità di peso, con il metodo biosensoristico, sia dopo accurata omogeneizzazione in tampone fosfato, che dopo centrifugazione dell'omogeneizzato a 3500 giri per 15 minuti [4,5].

I valori della capacità antiossidante, trovati con il metodo biosensoristico, per i campioni omogeneizzati e centrifugati, sono stati confrontati con quelli ottenuti con il classico metodo spettrofluorimetrico (ORAC) scelto come metodo di riferimento. Tale confronto è ovviamente avvenuto non sulla base dei valori assoluti, in quanto ogni metodo determina proprie scale di valori, ma sulla base dei valori relativi e delle scale d'ordine. I risultati ottenuti con i due metodi hanno mostrato in genere di essere in buon accordo, confermando la validità analitica del metodo biosensoristico.

### **Bibliografia**

- [1] L. Campanella, G. Favero, M. Tomassetti, *Anal. Letters* 32,(13), 1999, pp. 2559-2581
- [2] L. Campanella, G. Favero, L. Persi, M. Tomassetti, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 23, 2000, pp.69-76
- [3] L. Campanella, G. Favero, L. Persi, M. Tomassetti, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 24, 2001, pp.1055-1064
- [4] G.Cao, G.Verdon, C.P.Wu, A.H.B.Wang, R.L.Prior, *Clin. Chem.*, 1995, **41** pp. 1738-1744
- [5] G.Cao, H.M.Alessio, R.G.Culter, *Free Radical. Biol. Med.*, 1993, **14** pp. 303-311

## SEPARATION OF CHONDROCYTES BY HYPERLAYER/FLOW FIELD-FLOW FRACTIONATION: A PRELIMINARY STUDY

*Catia Contado<sup>1</sup>, Sarmistha Mukherjee<sup>2</sup>, P. Stephen Williams<sup>3</sup>, Cahir A. McDevitt<sup>2</sup>, Maciej Zborowski<sup>3</sup>*

<sup>1</sup>*Department of Chemistry, University of Ferrara, Via Luigi Borsari 46, I-44100 Ferrara, I. E.mail: Catia.Contado@unife.it*

<sup>2</sup>*Departments of Biomedical Engineering and Orthopaedic Research Center, Lerner Research Institute, The Cleveland Clinic Foundation, 9500 Euclid Avenue, Cleveland OH 44195, USA.*

<sup>3</sup>*Department of Biomedical Engineering, Lerner Research Institute, The Cleveland Clinic Foundation, 9500 Euclid Avenue, Cleveland, OH, 44195, USA.*

The meniscus is now considered to be an integral component of the knee joint, with important functions in load distribution, joint stability, shock absorption, and lubrication. ACL injuries are usually the most common reason for hospitalization in athletes. Autologous chondrocyte transplantation is currently under evaluation as a potential improvement over current strategies for treating knee cartilage defects. So there is a great interest to find new separation methods to isolate the fibrochondrocytes from the three distinct populations of cells in the joint meniscus: fibrochondrocytes, fibroblast-like cells and superficial zone cells [1].

Among all the available separation techniques, the Field-Flow Fractionation (FFF) techniques appear to be among the most promising tools for cell sorting. They are a family of elution-based techniques similar to the chromatographic techniques. The mechanism of separation is well reported in literature. Briefly, particles with different properties are carried differentially down the length of a ribbon shaped channel by a stream of carrier liquid. The differential migration of particles is caused by the application of an external field such as gravitational, centrifugal, flow, thermal, electric, magnetic [2]. To date, for both analytical and semipreparative purposes, the most successful method has used the centrifugal field (sedimentation FFF) [3]. However, gravitational FFF, which uses the simple gravitational field, has the advantage of a practical and simple instrumental design. Red Blood cell separations have also been performed with both symmetrical and asymmetrical flow FFF [4,5]. For preparative scale objectives (purification of  $> 10^9$  cells), SPLITT methods can be also used [6].

Flow FFF (FIFFF) is one of the FFF separation technique [7]. The elution separation method is based only on the size and shape of the cells, i.e. on their hydrodynamic diameter. It is highly selective for the separation of particles in the diameter range from 1-50  $\mu\text{m}$ . The separation occurs in an open channel, whose walls are porous frits, which allow the crossflow to enter one and to exit through the accumulation wall. A semi-permeable membrane, of suitable material, is usually placed over the accumulation wall to prevent loss of sample. When FIFFF is operated in the hyperlayer mode, the particles, cells, or molecules elute in the order decreasing hydrodynamic diameter. An appealing feature of this technique is that the fractionation can be carried out in essentially any desired carrier medium, making it possible to choose the buffer that best preserves cell viability during and after the separation process.

The aim of this work was to verify the separability with an FIFFF apparatus of a chondrocyte sample. For this preliminary study, chondrocytes from bovine articular cartilage were used. From this tissue they can be easily isolated as a single population. The femoral and tibial articular cartilage were dissected from the knee joints of skeletally mature cows and digested with 0.05% testicular hyaluronidase for 30 minutes and then further digested overnight on a shaker with a solution of 0.25% trypsin and 0.2 collagenase A (0.247U/mg) in DMEM 1X medium at 37°C. The digestion solution was then strained

through a cell strainer (40  $\mu\text{m}$ ), and the cells were centrifuged, washed and resuspended in 1X PBS [8].

The instrument performance for cell separation was first checked using Jurkat cells as a model. These cells were chosen because they show a similar shape and their size distribution is intermediate between the chondrocytes themselves and chondrocytes with their intact pericellular matrix, composed in part of type VI collagen. This cell line is derived from human T lymphocyte -cell leukaemia. They live and grow singly or in clumps in suspension. Their cultivation is relatively straightforward in RPMI 1X with L-glutamine, 25 mM HEPES, Pen/strp D, FBS buffer at 37 °C. Also in this case the cells were centrifuged, washed and resuspended in 1X PBS, which was also used as mobile phase for the FIFFF channel.

The FIFFF separations were performed under conditions that took into account the need to preserve the viability of the cells, i.e. gentle flow rates have been selected both for the applied field (cross flow) and for the elution flow. To limit aggregation and metabolic modification, and to conserve the viability, all the cells were injected in a rather dilute suspension ( $<10^6/\text{mL}$ ).

The results presented in this work, although still preliminary, open a new path for cell isolation and purification.

## References

- [1] S. Mukherjee, C.A. McDevitt, H. Kambic, R. Parker, *Current opinion in Orthopaedics*, **13**, 345-350, 2002.
- [2] “Field Flow Fractionation Handbook,” Edited by M. Schimpf, K. Caldwell, J.C. Giddings, Wiley Interscience, N.Y. 2000.
- [3] P.J. Cardot, J. Gerota and m. Martin, *J. Chromatogr.*, **548**, 393, 1991.
- [4] J.C. Giddings, B.N. Barman, M.K.Liu, in *Cell Separation Science and Technology*, ACS Symposium Series 464, D.S. Kompala and P.Todd (Eds.), American Chemical Society, Washington DC., 1991.
- [5] A. Litzen, K.G. Wahlund, *J. Chromatogr.*, **548**, 393, 1991.
- [6] S. Levin, J.C. Giddings, *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, **50**, 43, 1990.
- [7] R. Beckett, Z.Jue, J.C. Giddings, *Environ. Sci. Technol.*, **21**, 289-295, 1987.
- [8] G. Lee, C. Poole, S. Kelley, J. Chang, B. Caterson, *Osteoarthritis and Cartilage*, **5**, 261-274, 1997.

## DETERMINAZIONE DELLA COSTANTE DI LEGAME E DELLA SELETTIVITÀ DI ANTICORPI MONOCLONALI DIRETTI VERSO UNA PROTEINA TRANSGENICA

*Caterina Ferroglio, Laura Anfossi, Gianfranco Giraudi*

*Laboratorio di Bioanalitica, Dipartimento di Chimica Analitica, Università di Torino, 10125  
Torino*

*[caterina.ferroglio@unito.it](mailto:caterina.ferroglio@unito.it)*

In base alla legislazione nazionale e comunitaria, un Organismo Geneticamente Modificato (OGM) si definisce tale quando “il materiale genetico è stato modificato in modo diverso da quanto si verifica in natura mediante un incrocio o con una ricombinazione genetica naturale”. Questo può avvenire grazie a tecniche di ingegneria genetica che permettono il trasferimento di geni da un essere vivente ad un altro, anche se di specie diverse (transgenici) [1]. Gli effetti della manipolazione si manifestano mediante la sintesi di nuove proteine o enzimi, che esprimono le caratteristiche desiderate.

Introdurre degli OGM nell’agricoltura e/o sul mercato di una nazione implica una sorveglianza particolare in quanto, potenzialmente, si potrebbero avere effetti negativi a livello ambientale e sanitario. Da qui nasce l’esigenza di ottimizzare i metodi di analisi per individuare e selezionare gli OGM, sia che si tratti di metodi basati sul DNA, sia di metodi che sfruttano l’interazione tra proteine, come i metodi immunochimici di analisi che utilizzano anticorpi.

Nel nostro lavoro si è presa in considerazione la proteina transgenica Cry IA. Essa è prodotta sottoforma di protossina dal *Bacillus thuringiensis*, un batterio commercializzato in tutto il mondo per il controllo di alcuni insetti, responsabili della distruzione di interi raccolti. Il gene della Cry IA è stato inserito nel genoma di alcune specie vegetali coltivate su larga scala, come il mais. La protossina clivata da una proteasi origina la tossina vera e propria che è stata impiegata nello studio condotto [2].

Lo scopo del lavoro è stato quello di calcolare la costante di affinità di sei anticorpi monoclonali diretti verso la tossina nelle sue isoforme Cry IAb/c e di selezionare il migliore per utilizzarlo in un saggio immunochimico per la determinazione della proteina transgenica. Inoltre si è valutata la capacità di riconoscere anche l’isoforma Cry IAa, normalmente non riconosciuta dai kit immunoenzimatici commerciali.

Inizialmente sono state fatte delle prove di cinetica e di legame per stabilire a quale concentrazione di anticorpo si poteva lavorare ottenendo un segnale colorimetrico apprezzabile. In seguito, essendo particolarmente difficile disporre di grandi quantità di Cry IA, si è ricorsi ad un kit immunoenzimatico commerciale, che prevede delle piastre ricoperte con un anticorpo che riconosce le isoforme “b” e “c”, che possono essere rivelate colorimetricamente, una volta legate, mediante un secondo anticorpo marcato. L’esperimento è stato condotto lasciando reagire diverse aliquote di Cry IA del kit con una quantità fissa di ciascun anticorpo da testare. Ciascuna diluizione è stata, successivamente, dispensata in una piastra del kit, in modo da permettere il legame tra la proteina libera e l’anticorpo immobilizzato e, allo stesso tempo, eliminare l’eventuale complesso formatosi. A questo punto il secondo anticorpo marcato ha permesso di valutare quanta Cry IA libera si era legata alla piastra; così da ottenere in modo indiretto, mediante un algoritmo matematico, il valore delle costanti di affinità di ogni anticorpo monoclonale [3].

Inoltre gli anticorpi monoclonali sono stati testati su delle piastre rivestite con Cry IAa per determinare se poteva esistere un’interazione con questa isoforma che, solitamente, non è possibile determinare. La prova ha dato come risultato un riconoscimento piuttosto buono di uno dei sei anticorpi a disposizione.

Pertanto, si può affermare che con un metodo rapido ed efficace, si è riusciti a valutare una duplice caratteristica di questi anticorpi monoclonali (affinità e selettività), tenendo conto che la proteina transgenica in questione è difficilmente reperibile e molto costosa, a causa di processi di estrazione e purificazione laboriosi.

- [1] Decreto Legislativo n° 92 del 03/03/1993, art. 3
- [2] Neppel CC, "Management of resistance to Bt toxins" – the environmental studies program – University of Chicago, 2000 May 26
- [3] Friguet B. et al., Journal of Immunological Methods, 1985, 77, 305-319



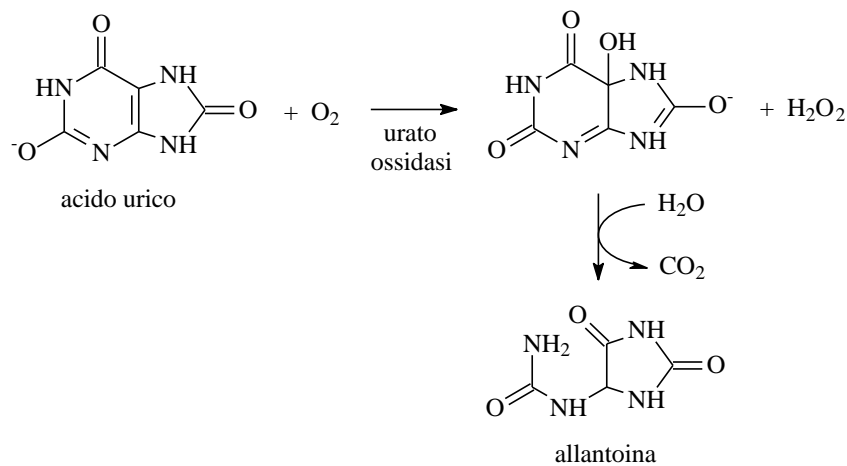
## DETERMINAZIONE CHEMILUMINESCENTE ULTRASENSIBILE DELL'ATTIVITA' DELL'URATO OSSIDASI NEL SIERO

*Massimo Guardigli, Aldo Roda*

*Dipartimento di Scienze Farmaceutiche, Università degli Studi di Bologna, Via Belmeloro 6,  
40126 Bologna*

*E-mail: [massimo.guardigli@unibo.it](mailto:massimo.guardigli@unibo.it)*

L'urato ossidasi (EC 1.7.3.3) è un enzima, attualmente disponibile in forma ricombinante, utilizzato a scopo terapeutico nel trattamento sintomatico delle patologie che determinano elevati livelli ematici di acido urico. Esso è infatti in grado di convertire l'acido urico in allantoina, una specie che risulta più facilmente eliminabile dall'organismo, attraverso una serie di reazioni che comportano l'ossidazione dell'acido urico ad acido 5-idrossiisourico e la sua decomposizione spontanea in allantoina.

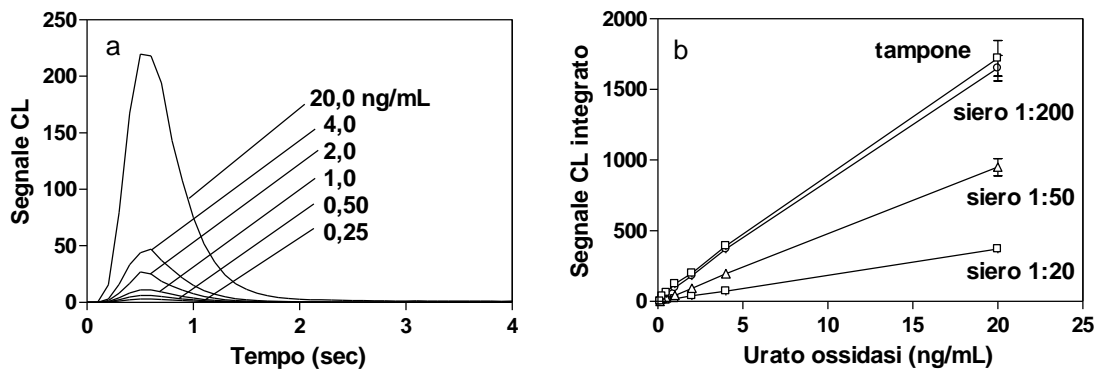


L'efficacia del trattamento terapeutico con urato ossidasi viene normalmente valutata attraverso la misura dei livelli ematici di acido urico, ma sarebbe comunque utile potere misurare direttamente, in modo semplice e rapido, l'attività dell'enzima nel sangue.

L'attività enzimatica può essere misurata mediante la quantificazione dell'acqua ossigenata ottenuta in presenza in un eccesso di acido urico. Questa determinazione può essere effettuata ad esempio per via spettrofotometrica, ma per aumentare la sensibilità della misura e ridurre i tempi di analisi è stato messo a punto un metodo basato sulla chemiluminescenza. A causa dell'effetto antiossidante dell'acido urico (che interferisce nella produzione del segnale) non è stato possibile sfruttare il sistema chemiluminescente luminolo/perossidasi, comunemente impiegato per misurare l'attività delle ossidasi utilizzando reazioni enzimatiche accoppiate. È stata quindi utilizzata la reazione chemiluminescente fra l'acqua ossigenata ed il bis(2,4,6-triclorofenil)ossalato (TCPO) in presenza di dipiridamolo, una molecola fluorescente che funge da accettore di energia e produce l'emissione. L'analisi viene effettuata in piastra microtiter a 96 pozzetti, e consiste essenzialmente nell'incubazione del campione in presenza di un eccesso di substrato enzimatico (acido urico), seguita dall'aggiunta di dipiridamolo in acetonitrile (che inoltre blocca la reazione enzimatica) e dalla misura del segnale chemiluminescente transiente ottenuto per aggiunta di TCPO. Viene quindi calcolato l'integrale del segnale chemiluminescente, che è proporzionale alla concentrazione di acqua ossigenata, e quindi all'attività dell'enzima nel campione in esame.

I risultati preliminari ottenuti finora mostrano che il metodo permette la determinazione quantitativa dell'urato ossidasi in tampone con un limite di rivelazione di circa 0,2 ng/mL ed

un intervallo di linearità che si estende almeno fino a 20 ng/mL. Nei campioni di siero è stata osservata una forte interferenza da parte della matrice, che provoca la riduzione dell'intensità del segnale chemiluminescente. L'interferenza può essere ridotta mediante diluizione del campione, e diventa praticamente trascurabile per diluizioni sufficientemente elevate (1:100 o 1:200). Il limite di rivelazione effettivo dell'urato ossidasi nel siero ottenibile con questo metodo è quindi notevolmente più elevato di quello misurato in tampone, risultando dell'ordine della decina di nanogrammi per millilitro. Questo valore è comunque più che sufficiente per misurare la concentrazione di urato ossidasi nel sangue a livelli terapeutici.



- (a) Profili cinetici di chemiluminescenza ottenuti in presenza di diverse quantità di urato ossidasi.  
 (b) Curve di calibrazione ottenute in tampone ed in siero a diverse diluizioni.

L'analisi richiede volumi ridotti di campione (alcune decine di microlitri), è più veloce ed ha un limite di rivelazione inferiore rispetto al metodo colorimetrico basato sulla quantificazione dell'acqua ossigenata prodotta dalla reazione mediante il sistema perossidasi/cromogeno (che richiede un secondo stadio di incubazione prima della misura). Il sistema può inoltre essere facilmente automatizzato utilizzando sistemi di preparazione del campione e dispensazione dei reagenti disponibili in commercio.

L'elevata sensibilità della misura potrebbe essere inoltre sfruttata per mettere a punto il metodo in un formato ad alta produttività, ad esempio in piastra microtiter a 384 pozzetti. La procedura di analisi messa a punto per l'urato ossidasi potrebbe essere poi applicata alla determinazione dell'attività di altre ossidasi, permettendo ad esempio di effettuare screening di inibitori enzimatici.

**SVILUPPO DI UN METODO IMMUNOENZIMATICO ULTRASENSIBILE  
CHEMILUMINESCENTE PER LA DETERMINAZIONE DELL'AFATOSSINA M<sub>1</sub>  
NEL LATTE**

*M. Magliulo<sup>1</sup>, M. Mirasoli<sup>1</sup>, P. Simoni<sup>2</sup>, R. Lelli<sup>3</sup>, O. Portanti<sup>3</sup>, A. Roda<sup>1</sup>*

<sup>1</sup> *Dipartimento di Scienze Farmaceutiche, Università di Bologna, Bologna*

<sup>2</sup> *Dipartimento di Medicina Interna e Gastroenterologia, Università di Bologna, Bologna*

<sup>3</sup> *Istituto Zooprofilattico dell'Abruzzo e Del Molise "G. Caporale", Teramo*

Le Aflatossine sono metaboliti secondari dei funghi *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*. Le muffe possono colonizzare diverse matrici vegetali e rilasciare le aflatossine, che, essendo molto stabili nel tempo e resistenti ai trattamenti termici, si ritrovano in diversi alimenti (cereali e derivati, arachidi, latte e derivati, ecc...). In particolare, il latte può essere contaminato da aflatossina M<sub>1</sub>, se l'animale è stato alimentato con mangimi contaminati da aflatossina B<sub>1</sub>. Essendo l'aflatossina M<sub>1</sub> prevalentemente legata alle proteine del latte, essa si ritrova anche nei derivati. Il sistema più efficace per limitare il rischio di esposizione per l'uomo è un controllo capillare e costante lungo tutta la filiera alimentare. Ad esempio anche piccole aziende lattiero casearie dovrebbero effettuare controlli giornalieri sulle partite di latte in ingresso, prima di introdurlo nella catena produttiva. Questo richiede la disponibilità di metodologie analitiche per la determinazione di aflatossina M<sub>1</sub> nel latte, che siano rapide, semplici, accurate, affidabili ed esportabili al di fuori di un laboratorio di analisi.

A questo scopo è stato messo a punto un metodo immunoenzimatico quantitativo chemiluminescente per la determinazione diretta della Aflatossina M<sub>1</sub> nel latte. Il metodo, di tipo competitivo indiretto, consente di analizzare un elevato numero di campioni di latte in un'unica seduta analitica senza pretrattamenti lunghi e complessi del campione. È infatti sufficiente sottoporre il latte a sgrassatura mediante centrifugazione e sottoporlo ad analisi. L'uso della chemiluminescenza potenziata come metodo di rivelazione ultrasensibile ha permesso di ottenere un basso limite di rivelazione per l'aflatossina M<sub>1</sub> nel latte (limite di rivelazione di 0,001 ppb; limite di quantificazione di 0,01 ppb) e di ottenere una riduzione dei tempi di analisi. Infatti a differenza dei sistemi colorimetrici che richiedono un periodo d'incubazione del substrato, in chemiluminescenza il segnale può essere immediatamente misurato.

L'analisi di campioni di latte certificati CRM (Certified Reference Material) contenenti una concentrazione di Aflatossina M<sub>1</sub> nota compresa tra 0,034 ppb e 0,127 ppb, è risultata in valori di recupero compresi tra 85 e 110 %. Inoltre, analizzando campioni di latte di controllo fortificati con varie concentrazioni di Aflatossina M<sub>1</sub> comprese tra 0,01 e 0,1 ppb, è stata ottenuta un coefficiente di variazione intra-saggio inferiore a 10% ed un coefficiente di variazione inter-saggio inferiore a 15%. Queste caratteristiche analitiche sono assolutamente soddisfacenti per un metodo bioanalitico rapido ed ad alta produttività applicato direttamente al campione. I campioni risultati positivi potranno poi essere sottoposti ad un'analisi di conferma mediante tecniche cromatografiche.

È inoltre in corso l'ottimizzazione del metodo su piastre a 384 pozzetti allo scopo di aumentare notevolmente la alta produttività analitica del metodo, che permetterebbe l'analisi simultanea di un numero elevato di campioni utilizzando una stazione automatica di campionamento e dispensazione dei reattivi (Roda A, Manetta AC, Portanti O, Mirasoli M, Guardagli M, Pasini P, Lelli R. *Luminescence* **2003**; *18*, 72-78).

## STABILITÀ TERMICA E DURABILITÀ CHIMICA DI DISPOSITIVI BIOMEDICALI A BASE PVC

*Lidia Maria Bodecchi, Marina Cocchi, Giorgia Ferrari, Matteo Manfredini, Andrea Marchetti*

*Università degli Studi di Modena e Reggio Emilia, Dipartimento di Chimica (INSTM, UdR di Modena), via Campi 183, 41100 Modena*

Il Polivinilcloruro (PVC) è oggi uno dei materiali polimerici più utilizzati in un vasto numero di campi. Si pensa infatti che la sua estensione d'impiego sia seconda soltanto alla grande classe delle matrici poliolefiniche. Tale incredibile diffusione è fondamentalmente dovuta al suo basso costo di produzione, alla sua grande facilità di lavorazione ed alla sua attitudine alla formazione di miscele stabili con una numero estremamente elevato di additivi diversi. Questi a loro volta sono in grado di modulare e modificare le caratteristiche chimiche, fisiche, meccaniche e di superficie del PVC in modo da estendere esponenzialmente le sue prestazioni, almeno in confronto alla resina polimerica presa singolarmente. I campi di applicazione del PVC additivato spaziano dai materiali edili, per costruzione e per infrastrutture, fino alla produzione di manufatti tecnologici a più alto valore aggiunto. Tipici esempi di quest'ultima categoria sono i prodotti afferenti al settore dei biomateriali e dei conseguenti dispositivi biomedicali. Si stima che il PVC ed in particolare il PVC plastificato costituisca circa il 25% del quantitativo di tutti i materiali plastici impiegati con applicazioni mediche o biomedicali. In particolare il PVC plastificato è il materiale più utilizzato per la produzione di dispositivi (e, *a fortiori*, per dispositivi monouso) per il contatto con il sangue, quali ad esempio sacche per il contenimento, cateteri, circuiti per la circolazione sanguigna extracorporea ed altri accessori e dispositivi impiegati nei trattamenti di dialisi extracorporea. Infatti, nonostante l'utilizzo del PVC plastificato come biomateriale abbia certamente alcuni punti alquanto controversi, nessun altro materiale ne ha finora manifestato o riprodotto le medesime caratteristiche in termini di emocompatibilità.

Tuttavia, il suo impiego presenta alcuni limiti fondamentali; tra questi, la resistenza termica è uno degli aspetti maggiormente limitanti per questo materiale plastico. La più nota reazione di degradazione a carico del PVC è detta deidroclorurazione. Essa consiste nella rottura dei legami C-Cl della catena polimerica con svolgimento di HCl gassoso e formazione di catene polieniche sul materiale. Nel corso degli anni è stato possibile ridurre e minimizzare questo problema mediante l'impiego di opportuni additivi, detti stabilizzanti termici, in grado di prevenire oppure rallentare la deidroclorurazione del polimero. Nel caso di PVC plastificato per uso biomedicale gli unici additivi stabilizzanti termici permessi dalle normative internazionali sono i saponi metallici a base di Calcio e Zinco, ciò per via della loro bassa tossicità intrinseca. Inoltre, l'uso di tali stabilizzanti si è rivelato di importanza fondamentale nell'impiego di PVC in ambito biomedicale. In effetti il processo di lavorazione che porta dalla resina polimerica tal quale al manufatto pronto all'uso è alquanto complesso, e prevede la fusione ripetuta del materiale, il quale ovviamente deve esibire la più alta stabilità termica possibile, per non alterare la biocompatibilità finale del dispositivo. Per soprappiù, lo stadio finale della filiera di produzione di dispositivi biomedicali è la loro sterilizzazione. Nonostante esistano numerose e differenziate tecniche di sterilizzazione, attualmente le cosiddette tecniche a radiazioni ionizzanti incontrano un favore sempre maggiore, in particolare per i dispositivi a basso costo monouso, grazie alla loro efficienza ed alla loro rapidità. Tuttavia, è noto come l'effetto termico delle radiazioni ionizzanti sui materiali polimerici sia decisamente non trascurabile, e per di più è stato dimostrato come intensi dosaggi di radiazioni ionizzanti (nella fattispecie, elettroni accelerati) possano alterare o modificare le superfici dei materiali che vengono irraggiati [1,2].

Nel presente lavoro ci si è proposti di valutare l'eventuale contributo alla degradazione termica di dispositivi a base di PVC plastificato arrecato tanto dal processo di sterilizzazione mediante elettroni accelerati (Raggi  $\beta$ ) quanto dalle condizioni di conservazione e stoccaggio dei dispositivi prima del loro impiego reale. Riguardo a quest'ultimo parametro, è da considerare infatti come la degradazione termica del PVC e la sua conseguente deidroclorurazione siano fenomeni molto ben documentati anche a temperature relativamente poco elevate.

Il lavoro sperimentale è stato suddiviso in tre parti distinte. Nella prima è stato allestito un protocollo per la simulazione del processo di irraggiamento che mimasse nella maniera più verosimile possibile le reali condizioni cui sono sottoposti i dispositivi nella fase di sterilizzazione. Contestualmente è stato anche sviluppato un protocollo di degradazione termica per la simulazione delle condizioni di conservazione e stoccaggio dei prodotti finiti. In entrambi i casi si sono scelte condizioni simulate più severe di quelle effettivamente impiegate (nel caso della sterilizzazione) o che si pensa esistano (nel caso dello stoccaggio) nei casi reali.

Poiché la deidroclorurazione del PVC ha come effetto principale lo svolgimento di HCl gassoso, la concentrazione di tale specie rappresenta di conseguenza un'evidenza direttamente proporzionale all'estensione della degradazione termica a carico del materiale polimerico. Pertanto, la fase successiva del lavoro sperimentale, a seguito all'applicazione su un congruo set di campioni del protocollo di degradazione simulata bipartito sopra accennato, è constatata nello sviluppo di un metodo analitico per la rimozione, l'estrazione l'intrappolamento, ed il recupero di HCl dai dispositivi degradati.

Infine, si è proceduto alla determinazione quantitativa dell'HCl svolto (sotto la forma di ione  $\text{Cl}^-$  corrispondente, in seguito alla dissoluzione della specie gassosa nella soluzione estraente) mediante tecniche in cromatografia liquida (HPLC-IC). Inoltre, sulle stesse soluzioni sono state determinate le concentrazioni di Calcio e Zinco mediante tecniche spettroscopiche (FAAS).

Dal presente lavoro si può concludere come corrette e controllate fasi di stoccaggio e conservazione di dispositivi biomedicali a base di PVC plastificato arrechino una trascurabile degradazione termica ai materiali. Al contrario, si pensa che le condizioni operative dei processi di sterilizzazione mediante elettroni accelerati debbano essere valutate con la massima cura. Infatti, in tal caso l'impatto delle radiazioni sulla stabilità termica e sulla relativa durabilità chimica dei materiali considerati, e dunque in ultima analisi sulla biocompatibilità dei dispositivi studiati, si è rivelato decisamente più elevato.

## **Bibliografia**

- 1) D. Atzei, M. Manfredini, A. Marchetti, B. Elsener, A. Rossi, F. Galavotti, M. Malagoli Radiation-induced Migration of additives in PVC-based Biomedical Disposable Devices. Part 1: Surface Morphology by AFM and SEM/EDS. *Surface and Interface Analysis*, **35**, (4), 395-402, 2003
- 2) D. Atzei, M. Manfredini, A. Marchetti, B. Elsener, A. Rossi, F. Galavotti, M. Malagoli Radiation-induced Migration of additives in PVC-based Biomedical Disposable Devices. Part 2: Surface Analysis by XPS. *Surface and Interface Analysis*, **35**, (8), 673-681, 2003

**BIOMIMETIC RECEPTORS FOR FOOD CONTAMINANTS**

*Marcello Mascini, Michele Del Carlo, Dario Compagnone, Cinzia Tozzi\*,  
Gianfranco Giraudi\**

*Dipartimento di Scienze degli Alimenti, Università degli Studi di Teramo, via C. Lerici 1,  
Mosciano S. Angelo 64023(Te)*

*\*Dip. di Chimica Analitica, Università degli studi di Torino, Via P. Giuria 5 – 10125  
Torino*

*E-mail: mmascini@unite.it, Ph: 0861266783, Fax: 0858071509*

**Abstract**

In this study a series of receptors based on aminoacid motif has been designed and their affinity toward different food contaminants as aflatoxins and pesticides has been tested by a computational approach using Leapfrog® algorithm, a module from Sybyl Software (Payne and Glen 1993; Goodford, 1985).

Two approaches have been tested: the first was to start from biological structures, and to produce a series of possible ligands to be used as biomimetic receptors. This approach has been already proved successful in the development of biomimetic traps for dioxins. The estimated computational binding energy toward dioxins of the selected oligopeptides binding has been correlated to the data obtained using QCM sensors array (Mascini et al., 2003, Mascini et al 2004). Three sequences of tetrapeptides virtually able to bind organophosphates and carbamates were then obtained starting from the structure of electric eel acetylcholinesterase binding site. Both classes of pesticides are, in fact, known to be inhibitors of the enzyme. Affinity toward 17 different carbamate and organophosphate pesticides has been tested and compared with the affinity obtained using the acetylcholinesterase binding sites. These data, together with the preliminary data obtained to detect the binding affinity of the selected tetrapeptides in solution will be presented and discussed.

The second approach relied on the data obtained previously for the combinatorial development of binding peptides for the aflatoxins B1, B2, G1 and G2 (Cozzi et al., 2003). Different combinations of the aminoacids alanine, arginine, serine, proline, valine, leucine, glutamine, glycine and phenylalanine have been designed and their affinity toward aflatoxins has been tested. The computational data have been compared with the data obtained by combinatorial approach and the computational procedure refined to match the latter. Data obtained with this procedure will be also presented and discussed.

The meaning of this work was to compare different procedures that could improve the selection of biomimic receptors, for food contaminants, to be used in sensors applications or in preconcentration procedures.

*Authors wish to thank MIUR COFIN 2003, proj. 2003035285\_003*

**References**

- Cozzi, C., Anfossi, L., Baggiani, C., Giovandoli, C., Giraudi, G. (2003). A combinatorial approach to obtain affinity media with binding properties towards the aflatoxins. *Anal Bioanal Chem* 375, 994.
- Goodford, P. J. (1985). A Computational Procedure for Determining Energetically Favorable Binding Sites on Biologically Important Macromolecules. *J. Med. Chem.*, 28, 849.
- Mascini, M., Magagnano, A., Monti, D., Compagnone, D., Paolesse, R., Chen, B., Warner, P., D'Amico, A., Di Natale, C., and Cozzani, I., (2003). Biomimetic Traps for Dioxins. *A*

Mixed Computational and Experimental Approach. Sensors and Microsystems: Proceedings of the 8th Italian Conference, World Scientific ISBN 981-238-747-1, 50-55.

- M. Mascini, A. Macagnano, D. Monti, M. Del Carlo, R. Paolesse, B. Chen, P. Warner, A. D'Amico, C. Di Natale, D. Compagnone (2004) "Piezoelectric sensors for dioxins: a biomimetic approach" Biosensors&Bioelectronics, in press.

- Payne, A. W. R., Glen, R. C. (1993). Molecular Recognition Using a Binary Genetic Search Algorithm. J. Mol. Graph., 11, 74.

## DETERMINAZIONE SIMULTANEA DEL DI(2-ETILESIL)FTALATO (DEHP) E DEL SUO PRINCIPALE METABOLITA (MEHP) IN CAMPIONI DI LIQUIDO SEMINALE

*Di Pasquale Dorina<sup>1</sup>, Ruggieri Fabrizio<sup>1</sup>, Mazzeo Pietro<sup>1</sup>, Carlucci Giuseppe<sup>2</sup>*

<sup>1</sup>*Dipartimento di Chimica, Ingegneria Chimica e Materiali - Università dell'Aquila - via Vetoio 67010 Coppito - L'Aquila*

<sup>2</sup>*Dipartimento di Scienze del Farmaco - Facoltà di Farmacia - Università degli Studi "G. D'Annunzio" Chieti - via dei Vestini 66100 Chieti*

Gli ftalati vengono comunemente usati come plastificanti in una vasta gamma di prodotti a base di cloruro di polivinile (PVC), quali dispositivi medici (cateteri per dialisi, sacche per sangue e plasma, sondini), giocattoli, pellicole e contenitori per alimenti.

Fino a poco tempo fa giustificavano preoccupazione per i possibili effetti tossici di tali sostanze soprattutto le ricerche su animali da esperimento. Attualmente, dati raccolti da studi epidemiologici ne confermano la pericolosità per la specie umana. Un'indagine recente ha verificato che l'esposizione ambientale allo ftalato più tossico e più largamente utilizzato come plastificante, il DEHP (Fig.1A), influisce negativamente sull'attività riproduttiva dello sperma. Numerosi studi hanno evidenziato un'atrofia dei testicoli dopo esposizione ad alte dosi di DEHP, con maggiore incidenza negli individui giovani rispetto a quelli più vecchi.

Il principale metabolita di questa sostanza, il MEHP o mono-(2-etilesil) ftalato (Fig.1B), ha effetti tossici sulle cellule del Sertoli e sembra in grado di determinare una riduzione della produzione spermatica negli animali esposti.

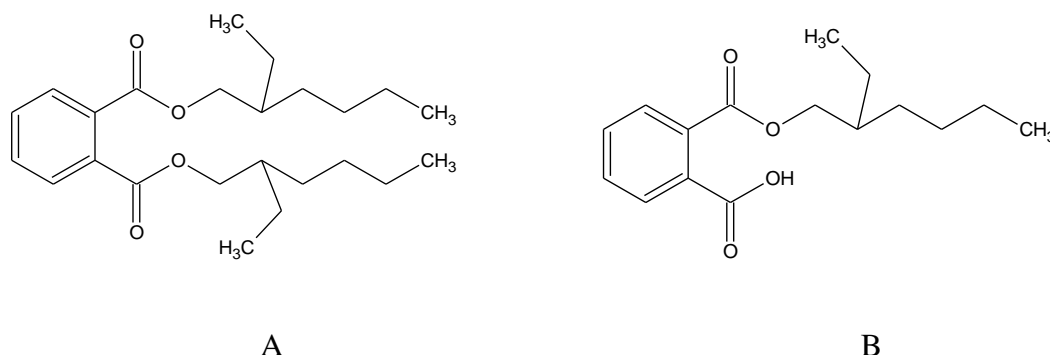


Figura 1

Nel presente lavoro viene illustrato un metodo per la determinazione simultanea del DEHP e del MEHP in campioni di liquido seminale per HPLC.

Il procedimento adottato prevede la purificazione del campione, di per sé molto complesso, attraverso un processo di estrazione liquido-liquido e la successiva analisi cromatografica.

I recuperi si sono mostrati molto buoni con valori del 98% e del 100% per il MEHP ed il DEHP rispettivamente.

La metodologia analitica illustrata risulta essere un valido mezzo per il monitoraggio di soggetti con problemi di fertilità ricollegabili all'esposizione ambientale a tali sostanze.



## DEVELOPMENT OF AN IMMUNOSENSOR FOR TETRODOTOXIN DETERMINATION IN SEAFOOD

*°Neagu D., Micheli L., °Danet A., Palleschi G.*

*Dipartimento di Scienze e Tecnologie Chimiche, Università di Roma "Tor Vergata", Via della Ricerca Scientifica, 1 — 00133 Roma*

*°Facoltà di Chimica, Università di Bucarest, Via Panduri 90-92, Bucarest (Romania)*

Increasing incidents of poisoning by seafood contaminated with marine toxins are posing serious problems for public health and fishery industries worldwide. Fish poisoning by consumption of toxins of the Tetraodontiformes group is one of the serious forms of intoxication from marine species. The gonads, liver, intestines, and skin of pufferfish can contain levels of tetrodotoxin (TTX) sufficient to produce rapid and violent death. Poisoning from tetrodotoxin, the most important toxin of this group, has been almost exclusively associated with the consumption of pufferfish from waters of the Indo-Pacific ocean regions.

At present, the toxic dose is not clear because each puffer fish has different concentrations of tetrodotoxin; in a case, a dose of 1-2 mg of purified toxin can be lethal [1]. The first symptom of intoxication is a slight numbness of the lips and tongue, appearing between 20 minutes to three hours after eating poisonous pufferfish. Parathesia in the face and extremities, headache, epigastric pain, nausea, diarrhea, and/or vomiting may occur. Death usually occurs within 4 to 6 hours.

Currently, laborious and expensive mouse assay methods are used to estimate the toxicity of the fish. This method is not particularly sensitive and is not specific for the selected toxin. HPLC is more sensitive [2], but requires expensive instrumentation, chemical clean-up and skilled operators. The development of a rapid, cost-effective and easy way procedure, such as an immunosensor, would be of great help for the food industry. Immunologically based analyses for marine toxins have become popular recently because of their specificity and sensitivity as well as their relative simplicity and low cost [3]. The development of disposable immunosensors for toxin assays is the aim of this work, through the following steps: 1) development of protein-toxin conjugates with AP (alkaline phosphatase); 2) spectrophotometric assay to evaluate the specificity and the activity of this conjugate and optimise the ELISA parameters; 3) study and development of an immunosensor selective for TTX based on the use of Screen Printed Electrodes (SPE<sub>s</sub>). It has been shown that electrochemical immunosensor can combine the high selectivity of immunoanalysis with the ease of the electrochemical detection methods.

Immunoassay parameters, such as amount of antibody and labelled antigen, buffer and pH, length of time and temperature of each precoating, coating, binding and competition step were evaluated and optimised with a spectrophotometric Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA) procedure, a powerful tool in biochemical trace analysis. A competitive ELISA was carried out using a monoclonal antibody T2OGIO and a purified goat antimouse IgG (H+L) alkaline phosphatase conjugate. Following this, the system was transferred to screen printed electrodes and different electrochemical methods (Cronoamperometry and Differential Pulse Voltammetry) for the final detection step were evaluated in order to select the most sensitive one.

[1] V. R. Rivera, M. A. Poli, G. S. Bignami, *Toxicon*, 33 (1995), 1231-1237

[2] I. Yasumoto et al., *J. AOAC International*, 78 (1995), 574-582

[3] M. P. Kreuzer, M. Pravda, C. K. O'Sullivan, G. G. Guilbault, *Toxicon*, 40 (2002), 1267-1274

**DETERMINAZIONE DI MUTAZIONI PUNTIFORMI DI INTERESSE CLINICO  
CON BIOSENSORI A DNA LABEL-FREE**

*M. Minunni, D. dell'Atti, S. Tombelli, M. Mascini*

*Dipartimento di Chimica, Università degli Studi di Firenze  
Polo Scientifico, Via della Lastruccia 3, 50019 Sesto F.no (FI)  
[minunni@unifi.it](mailto:minunni@unifi.it)*

Mutazioni a carico del gene TP53 risultano essere correlate ad una serie di tumori a carico di diversi organi. E, inoltre, riportato che il conoscere il tipo di mutazione può essere di aiuto nella scelta del trattamento terapeutico e può essere, inoltre, indicativa circa la prognosi del paziente.

Il poter quindi disporre di sistemi capaci di determinare, in tempo reale e senza l'impiego di marcatori, la presenza di mutazioni a carico di questo gene è sicuramente di una certa rilevanza nella diagnostica molecolare.

Utilizzando i sistemi di trasduzione di tipo piezoelettrico ed ottico, quest'ultimo basato sulla risonanza plasmonica di superficie, si è voluto valutare la possibilità di sviluppare un sensore a base di DNA per l'analisi di una particolare mutazione a carico del gene P53.

E' stato scelto il sito di mutazione corrispondente al codone 248 della proteina codificata dal TP53, che risulta essere quello predominante nei tumori coloretali.

Sulla superficie del sensore sono immobilizzate sonde oligonucleotidiche corrispondenti alla sequenza del gene contenente il sito di mutazione.

Il sistema di riconoscimento sfrutta la reazione d'ibridazione tra la sonda immobilizzata e la sequenza bersaglio presente in soluzione. I sensori vengono studiati nella loro risposta con oligonucleotidi sintetici corrispondenti alle sequenze complementari e mutate.

Una volta individuate le migliori condizioni operative, questi vengono utilizzati per l'analisi di campioni reali provenienti da DNA, preventivamente amplificato mediante la reazione polimerasica a catena (PCR), estratto da colture cellulari normali (wild type) e contenenti la mutazione in questione.

I risultati ottenuti mostrano una capacità dei sistemi a riconoscere la mutazioni puntiformi corrispondente al codone 248 delle proteina corrispondente, presenti nell'esone VII del gene TP53.

**SVILUPPO DI UN METODO MULTIANALITA PER LA RIVELAZIONE  
SIMULTANEA DI METALLI PESANTI IN CAMPIONI AMBIENTALI MEDIANTE  
BIOSENSORI BATTERICI RICOMBINANTI LUMINESCENTI IMMOBILIZZATI**

*Mara Mirasoli<sup>1</sup>, Kaisa Hakkila<sup>2</sup>, Marko Virta<sup>2</sup>, Aldo Roda<sup>1</sup>*

<sup>1</sup> *Dipartimento di Scienze Farmaceutiche, Università di Bologna, Bologna*

<sup>2</sup> *Department of Biochemistry, University of Turku, Finland*

L'inquinamento da metalli pesanti è un problema molto pressante nei paesi industrializzati, particolarmente evidente nelle zone portuali, nelle zone altamente industrializzate o soggette a sfruttamento minerario. La rivelazione dei metalli pesanti in campioni ambientali viene comunemente eseguita mediante metodi spettroscopici (assorbimento o emissione atomica), che tuttavia richiedono procedure estensive di trattamento preanalitico del campione e l'uso di attrezzatura complessa e costosa.

Recentemente stanno suscitando interesse i biosensori batterici ricombinanti luminescenti che permettono di rivelare la presenza in un campione ambientale di un determinato metallo pesante (ad esempio: mercurio inorganico ed organico, arsenico, piombo, cadmio, zinco, rame, cromo), a concentrazioni dell'ordine  $10^{-12}$  -  $10^{-15}$  M, utilizzando strumentazione relativamente semplice. Questi biosensori sono stati ottenuti introducendo nella cellula batterica un plasmide nel quale il gene della luciferasi da lucciola (*luc*) è sotto il controllo trascrizionale di un sistema di regolazione (operatore/promotore) specifico per un metallo. Una caratteristica importante di questi batteri è quella di rivelare solo la frazione di metallo che entra nella cellula batterica e quindi di fornire una misura non della concentrazione totale di metallo nel campione, ma della sua frazione biodisponibile. Questa informazione, difficilmente ottenibile con altre tecniche analitiche, è di particolare importanza nella valutazione del livello di rischio eco-tossicologico di un territorio.

I biosensori batterici vengono solitamente utilizzati in formato piastra microtiter da 96 pozzetti, permettendo quindi la determinazione della concentrazione di un determinato metallo in numerosi campioni in una seduta analitica.

Allo scopo di permettere la determinazione simultanea della presenza di diversi metalli in uno stesso campione, è stata esplorata la possibilità di immobilizzare le cellule batteriche nei pozzetti di un nuovo formato di piastra microtiter appositamente disegnato nel nostro laboratorio per permettere la determinazione simultanea di più analiti in uno stesso pozzetto. La piastra contiene 24 pozzetti principali, ciascuno suddiviso in 7 pozzetti interni: questo permette di immobilizzare in posizioni separate all'interno dello stesso pozzetto principale 7 diversi ceppi batterici, ciascuno specifico per un determinato metallo. Sarà quindi possibile quantificare 7 metalli distinti in una stessa aliquota di campione.

Sono stati valutati diversi supporti di immobilizzazione (agar 0,8% in terreno di coltura, alginato di calcio, ecc...), costituiti da gel in grado di mantenere le cellule in un intorno fisiologico, contenente l'acqua ed i nutrienti necessari alla sopravvivenza cellulare e di permettere la diffusione del metallo presente nel campione per raggiungere le cellule batteriche. Per la misura del segnale analitico da questi sistemi miniaturizzati è stata utilizzata una videocamera CCD retroilluminata e raffreddata, che permette la quantificazione e la localizzazione spaziale del segnale bioluminescente.

Per ciascun ceppo batterico sono state ottenute caratteristiche curve dose-risposta. Saranno riportati i risultati in termini di ottimizzazione del metodo di immobilizzazione, sensibilità del metodo per ciascun metallo, specificità della risposta (anche in relazione alla specificità dei singoli ceppi batterici), possibilità di conservare le piastre dopo l'immobilizzazione dei batteri.

**SVILUPPO DI UN BIOUSSENSORE LUMINESCENTE BASATO SU UNA LINEA CELLULARE RICOMBINANTE DI EPATOCARCINOMA UMANO (HepG2) PER LA DETERMINAZIONE DELL'ATTIVITA' DI ACIDI BILIARI NATURALI E SINTETICI**

*Patrizia Pasini<sup>1</sup>, Elisa Michelini<sup>1</sup>, Gabriele Campana<sup>2</sup>, Enrico Roda<sup>3</sup>, Santi Spampinato<sup>2</sup>, Aldo Roda<sup>1</sup>*

*Dipartimenti di Scienze Farmaceutiche<sup>1</sup>, Farmacologia<sup>2</sup>, Medicina Interna e Gastroenterologia<sup>3</sup>, Università di Bologna*

Gli acidi biliari (AB) svolgono fisiologicamente la funzione di detergenti e sono coinvolti nella solubilizzazione, trasporto ed assorbimento dei lipidi assunti con la dieta, nonché nel metabolismo del colesterolo. Recentemente, gli AB sono stati identificati quali ligandi naturali del recettore X farnesoide (FXR), un recettore nucleare che gioca un ruolo fondamentale nell'omeostasi degli acidi biliari stessi e del colesterolo, rappresentando così un possibile bersaglio terapeutico per nuovi farmaci.

Nel presente studio abbiamo messo a punto un biosensore luminescente, basato su una linea cellulare ricombinante di epatocarcinoma umano HepG2, per la valutazione della capacità di acidi biliari naturali e sintetici di attivare FXR. Le cellule sono state trasfettate stabilmente con il vettore di espressione pcDNA3.1-FXR, contenente il cDNA che codifica per il recettore FXR umano, allo scopo di ottenere cloni che esprimano il recettore a livelli costanti. I cloni stabili HepG2-FXR sono poi stati trasfettati transitoriamente con un plasmide reporter (IBABP-Luc) che comprende il gene della luciferasi da lucciola (*luc*), utilizzato come reporter, sotto il controllo del promotore del gene che codifica per la "intestinal bile acid binding protein" (IBABP), uno dei geni bersaglio del recettore FXR attivato. Quando un AB in grado di attivare FXR si lega al recettore, si ha l'attivazione del promotore e l'espressione dei geni da esso controllati, con conseguente sintesi della proteina reporter luciferasi. Le cellule sono state coltivate in piastre per colture cellulari a 24 o 96 pozzetti e trattate per 24 h con AB a diverse concentrazioni. In seguito a lisi delle cellule ed aggiunta del substrato enzimatico luciferina, l'attivazione di FXR risulta in una produzione di fotoni, mediata dalla reazione luciferina-luciferasi, che dipende dalla dose e dalla potenza degli AB valutati.

La fase iniziale del lavoro ha riguardato la caratterizzazione e la valutazione delle prestazioni analitiche del biosensore cellulare luminescente, condotte utilizzando acidi biliari noti per la loro capacità di attivazione del recettore FXR, in particolare l'acido chenodesossicolico (CDCA) ed i suoi glico- e tauro-coniugati (GCDCA e TCDCA). CDCA alla concentrazione 50  $\mu$ M ha indotto una risposta cellulare superiore a quella del controllo negativo di circa un fattore 2, mentre GCDCA e TCDCA hanno indotto una risposta superiore di un fattore 1.5, probabilmente dovuta ad una minore permeabilità degli AB coniugati attraverso la membrana plasmatica. Il biosensore è in grado di rispondere quantitativamente, come dimostrato dal grafico dose-risposta riportato in Figura 1a, ottenuto trattando le cellule con CDCA a concentrazioni comprese tra 10 e 100  $\mu$ M. Nella figura si osserva un abbassamento di segnale alla dose 100  $\mu$ M, dovuto alla citotossicità diretta di CDCA a dosi elevate. Il controllo negativo è costituito da cellule trasfettate non trattate con acidi biliari che danno comunque un segnale diverso da zero, dovuto presumibilmente alla presenza di acidi biliari endogeni. Tale segnale, benchè relativamente elevato, è comunque soggetto a piccole fluttuazioni sia nell'ambito della stessa coltura che tra colture cellulari diverse:  $1.98 \pm 0.17$  ULR (unità luce relative),  $n = 10$ . Il limite di rivelazione del metodo, definito come la concentrazione di analita che produce un segnale pari al valore medio del controllo negativo +  $3 \sigma$ , è risultato pari a 10  $\mu$ M per CDCA, una concentrazione dello stesso ordine di grandezza delle concentrazioni

fisiologiche degli AB nei fluidi biologici. La precisione del metodo è stata valutata sia intra- che inter-esperimenti ed è risultata soddisfacente, con coefficienti di variazione inferiori al 10%.

L'utilizzo di piastre a 24 o 96 pozzetti e la possibilità di automatizzare alcune fasi operative (dispensazione delle cellule, rimozione del terreno di coltura, aggiunta del substrato enzimatico) consente l'analisi rapida e simultanea di numerosi composti, conferendo al metodo bioanalitico caratteristiche di alta produttività analitica.

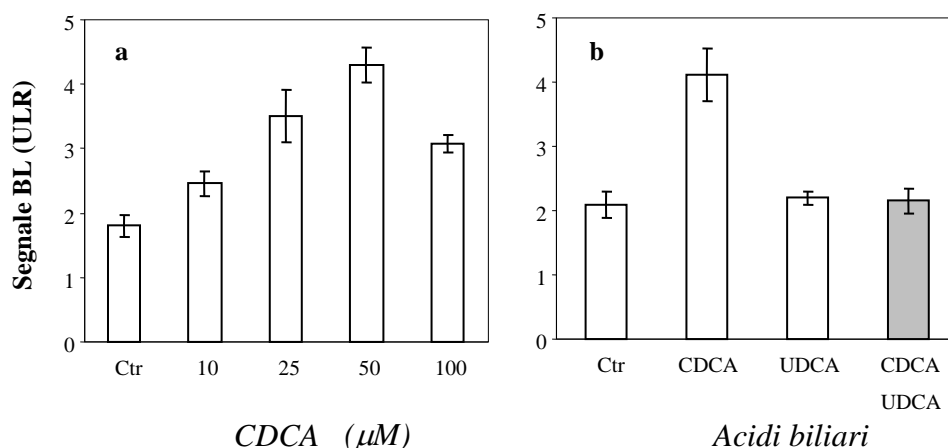


Figura 1. (a) Risposta del biosensore cellulare a diverse concentrazioni di acido chenodesossicolico (CDCA). (b) Risposta del biosensore cellulare a diversi acidi biliari a concentrazione 50  $\mu\text{M}$ . Acido ursodesossicolico (UDCA), controllo negativo (Ctr). Ciacun dato rappresenta la media  $\pm$  dev. st. di almeno tre replicati.

Le cellule sono state trattate successivamente con acido ursodesossicolico (UDCA) 50  $\mu\text{M}$ , vista la sua importanza legata all'uso come farmaco (trattamento della calcolosi biliare di colesterolo e di epatopatie colestatiche). I risultati hanno mostrato che UDCA induce una risposta quantitativamente simile a quella del controllo negativo (Figura 1b), quindi non è in grado di attivare il recettore FXR. La co-incubazione delle cellule con concentrazioni equimolari (50  $\mu\text{M}$ ) di CDCA ed UDCA ci ha permesso di dimostrare che UDCA è in grado di antagonizzare l'azione di CDCA, indicando la possibilità di utilizzare il biosensore per lo screening sia di agonisti che di antagonisti di FXR. Studi di legame al recettore, utilizzando UDCA marcato con  $^3\text{H}$ , hanno confermato lo spiazzamento dose-dipendente di CDCA.

Abbiamo avviato, in via preliminare, uno screening di acidi biliari naturali e di sintesi per valutarne la capacità di attivazione di FXR. Acidi biliari con la catena laterale modificata, quali gli analoghi C23 e C25 di CDCA, così come AB diossidrilati con diversa posizione dei gruppi ossidrilici, hanno mostrato una capacità di attivazione di FXR simile o superiore a quella di CDCA, noto come il più potente attivatore naturale di FXR. Benchè siano necessari ulteriori studi per caratterizzare queste molecole ed esplorarne la possibilità di impiego come farmaci, i risultati ottenuti mostrano le potenzialità del biosensore cellulare per la individuazione rapida di composti di possibile interesse terapeutico.

Una prospettiva di sviluppo di questo studio riguarda la costruzione di biosensori cellulari più complessi, che permettano di valutare simultaneamente gli effetti di potenziali farmaci, o comunque molecole bioattive, su due geni bersaglio che regolano vie metaboliche distinte. La strategia è quella di co-trasfettare le cellule con due plasmidi che portino due geni reporter diversi, ciascuno sotto il controllo del promotore di uno dei geni bersaglio. Si potrebbero utilizzare come reporter la luciferasi da lucciola ed una luciferasi con una diversa lunghezza d'onda d'emissione, quale la luciferasi ottenuta da un organismo diverso (ad es. *Renilla reniformis*) o una luciferasi mutata.

**SVILUPPO DI UN METODO DI ANALISI DELL'IMMAGINE IN  
BIOLUMINESCENZA PER IL MONITORAGGIO *IN VIVO* DI INFEZIONI  
BATTERICHE E DELL'AZIONE DI FARMACI**

*Patrizia Pasini<sup>1</sup>, Rita Aldini<sup>2</sup>, Enrico Roda<sup>3</sup>, Aldo Roda<sup>1</sup>*

*Dipartimenti di Scienze Farmaceutiche<sup>1</sup>, Scienze Chimiche<sup>2</sup>, Medicina Interna e Gastroenterologia<sup>3</sup>, Università di Bologna*

L'analisi dell'immagine in luminescenza è una tecnica analitica che permette la localizzazione e quantificazione di molecole di interesse su una superficie bersaglio. La tecnica può essere impiegata per studiare la distribuzione spaziale di analiti sia a livello microscopico (sezioni di tessuto e singole cellule) sia a livello macroscopico (superficie di organi isolati, animali da esperimento intatti).

Nel presente studio è stato sviluppato un metodo di analisi dell'immagine in bioluminescenza per il monitoraggio in vivo di infezioni batteriche e dell'azione di farmaci. Come indicatori bioluminescenti sono stati utilizzati dei batteri di un ceppo enterotossico di *Escherichia coli* modificati geneticamente mediante l'inserimento nel cromosoma dell'intera cassetta genica *luxCDABE* che codifica per il sistema bioluminescente luciferina/luciferasi derivato da batteri spontaneamente luminescenti (*Photobacterium luminescens*). In questo modo i batteri *E. coli* esprimono costitutivamente i geni responsabili della luminescenza e sono stabilmente luminescenti. Tali batteri sono stati introdotti per gavaggio nell'apparato gastroenterico di animali da esperimento intatti (ratti e topi) e, a vari intervalli di tempo, sono state acquisite immagini del segnale luminescente sulla superficie degli animali stessi, mediante un sistema di analisi dell'immagine in luminescenza basato su una videocamera CCD raffreddata con un doppio Peltier (Night Owl, EG&G Berthold), come schematizzato in Figura 1.

Il metodo è stato ottimizzato in termini di quantità di cellule e volume di sospensione batterica somministrati, pH del mezzo di coltura e all'interno dell'apparato gastroenterico, tempo di acquisizione delle immagini digitali. La massima intensità di segnale è stata ottenuta somministrando circa  $10^{10}$  cellule batteriche in un volume di 2.5 mL. Il pH ottimale per la reazione bioluminescente, e per la vitalità batterica, è 7.3-7.4. Studi in vitro ci hanno permesso di dimostrare che l'intensità di segnale si riduce circa del 50% a pH 6, si mantiene pressochè costante a pH 5 e 4, per poi ridursi drasticamente a pH 3; al contrario, a valori di pH 8 e 9 l'intensità dell'emissione non varia significativamente. Di conseguenza, l'introduzione dei batteri nell'animale è stata preceduta dalla somministrazione di 0.8 mL di bicarbonato di sodio all'8.4% per tamponare l'ambiente acido dello stomaco. Il tempo di acquisizione ottimale con il miglior rapporto segnale/fondo è risultato di 5 min.

Il primo risultato significativo è stato la visualizzazione di un segnale analitico intenso, nonostante i fenomeni di assorbimento e di scattering dei fotoni che si verificano durante il passaggio della luce attraverso i tessuti animali. In condizioni ottimizzate è stato possibile monitorare in tempo reale la colonizzazione batterica dell'apparato gastroenterico. Immediatamente dopo la somministrazione dei batteri il segnale luminoso è stato osservato in corrispondenza dell'esofago, per essere poi rivelato in tratti successivi in corrispondenza del procedere dei batteri, come mostrato in Figura 2, ottenuta elaborando con falsi colori le

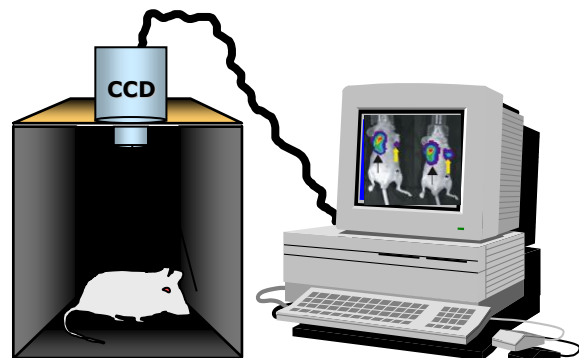


Figura 1. Schema del dispositivo per analisi dell'immagine.

immagini in b/n del segnale bioluminescente e sovrapponendole a quelle in luce riflessa dell'animale. La misura del segnale analitico allo stesso tempo dopo la somministrazione dei batteri in ratti diversi ha dato valori di intensità dello stesso ordine di grandezza (dopo 5 min,  $2.3 - 4.9 \times 10^4$  fotoni/s/pixel), dimostrando la riproducibilità del modello.

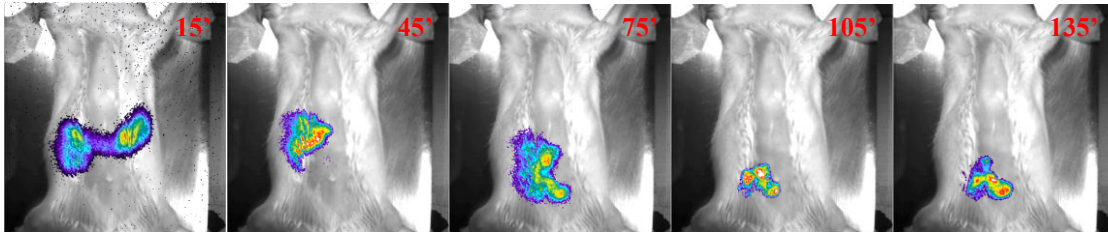


Figura 2. Localizzazione sulla superficie dell'animale intatto del segnale analitico derivante da batteri *E. coli* ricombinanti, resi stabilmente bioluminescenti, introdotti nell'apparato gastroenterico.

A nostra conoscenza quello presentato è il primo modello di monitoraggio in vivo di infezioni batteriche nel tratto gastroenterico di animali intatti effettuato con “probe” bioluminescenti. In letteratura sono presenti alcuni studi in cui vengono utilizzati probe fluorescenti, che presentano l'inconveniente di essere accompagnati da un segnale di fondo molto elevato, dovuto alla fluorescenza spontanea dei tessuti animali, che riduce notevolmente la rivelabilità del segnale. Un altro vantaggio della bioluminescenza rispetto alla fluorescenza è la possibilità di eseguire un'analisi quantitativa più accurata. A questo scopo verrà condotto uno studio approfondito dei fenomeni di assorbimento e scattering dei fotoni attraverso i tessuti, in modo da definire la relazione tra intensità del segnale superficiale e numero di cellule batteriche presenti nel tratto gastroenterico. Le prospettive di questo studio includono la valutazione dell'effetto della somministrazione di antibiotici o di probiotici in vivo, avendo a disposizione un modello estremamente rapido e predittivo.

## SVILUPPO PER VIA COMBINATORIALE DI PEPTIDI LEGANTI PER LA DETERMINAZIONE DI PROTEINE DA OGM

*Cinzia Tozzi, Caterina Ferroglio, Cristina Giovannoli, Gianfranco Giraudi*

*Laboratorio di Bioanalitica – Dip. di Chimica Analitica – Via P. Giuria 5 – 10125 Torino  
[cinzia.tozzi@unito.it](mailto:cinzia.tozzi@unito.it)*

La presenza di organismi geneticamente modificati (OGM) può essere valutata sia mediante la determinazione del gene esogeno sia attraverso la determinazione di una o più proteine espresse dal transgene. La determinazione di queste proteine può essere particolarmente utile durante procedure di screening di un elevato numero di campioni. Per questo tipo di analisi i metodi immunochimici sono quelli maggiormente utilizzati grazie alle loro caratteristiche di semplicità di esecuzione ed automazione, alla possibilità di effettuare analisi sul campo con kit economici. Nel caso delle proteine espresse da OGM, però, le quantità di proteina disponibili sono ridotte e rendono la produzione degli anticorpi molto costosa, incrementando i costi finali dell'analisi. Lo sviluppo di leganti sintetici in grado di mimare le proprietà di riconoscimento molecolare degli anticorpi costituisce una valida alternativa per la determinazione di queste proteine.

La tecnica da noi sviluppata [1,2] permette, con un consumo molto ridotto dell'analita, di ottenere oligopeptidi con proprietà di riconoscimento molecolare verso la molecola di interesse.

Lo scopo di questo lavoro è stata la preparazione di librerie combinatoriali in fase solida dalle quali selezionare peptidi con buona affinità e selettività verso la neomicina fosfotransferasi II (Npt II). L'Npt II è un enzima che causa la perdita delle proprietà antibiotiche della neomicina e della kanamicina A e il gene viene frequentemente inserito negli OGM per facilitarne l'identificazione proprio sfruttando questa proprietà dell'Npt II.

Una resina polistirenica funzionalizzata con gruppi carbossilici è stata utilizzata come fase solida mentre dodici amminoacidi sono stati impiegati nella creazione della libreria (arg, ser, pro, val, leu, gln, gly, ala, phe, lys, his, trp). L'acido aminobutirrico è stato usato come braccio spaziatore.

La procedura sperimentale ha previsto la costruzione di una prima libreria di 144 dipeptidi utilizzando gli amminoacidi precedentemente citati. Per ogni dipeptide è stata testata l'affinità verso l'Npt II e la selettività verso altre proteine scelte come esempio di possibili interferenti. Definite le costanti di affinità e le selettività, sono state scelte le due sequenze che mostravano la maggiore affinità ( $K > 10^4 \text{ M}^{-1}$ ) e le migliori selettività.

La seconda fase ha previsto la costruzione di due nuove librerie di 144 tetrapeptidi, utilizzando come sequenze base i due dipeptidi selezionati. Anche su queste due librerie si è provveduto a determinare l'affinità per la proteina di interesse e a testarne la selettività verso quelle interferenti. Anche in questo caso è stato possibile selezionare due sequenze di tetrapeptidi.

E' interessante notare come ogni proteina sia caratterizzata da una specifica distribuzione di affinità nella libreria peptidica, che diventa quasi un'impronta digitale della proteina e che ne permetterebbe l'identificazione.

Ai fini di individuare le condizioni sperimentali migliori per il legame tetrapeptide-proteina sono stati ottimizzati parametri quali la forza ionica e il pH per entrambe le sequenze ottenendo costanti di affinità dell'ordine di  $10^5 \text{ M}^{-1}$ .

E' stata infine affrontata la verifica delle capacità di legame dei tetrapeptidi selezionati preparando colonnine per estrazione in fase solida di campioni reali quali foglie di patata e pomodoro, matrici in cui viene inserito il gene per l'Npt II. I risultati sono stati soddisfacenti.



L'ottenimento di leganti sintetici di questo tipo apre ampie possibilità per il loro impiego, inoltre, se i peptidi confermeranno i risultati ottenuti anche in altri campioni reali, potranno porsi come un'alternativa più economica e rispetto ai sistemi di immunoaffinità classici.

[1] C.Tozzi, L.Anfossi, G.Giraudi, C.Giovannoli, C.Baggiani, A.Vanni. *J.Chromatogr.A* **2002**, 966, 71-79.

[2] C.Tozzi, L.Anfossi, C.Baggiani, C.Giovannoli, G.Giraudi. *Anal. Bioanal. Chem.* **2003**, 375, 994-999.

## STUDIO DELLE INTERAZIONI TRA BIOMOLECOLE MEDIANTE SURFACE PLASMON RESONANCE IMAGING

*Giuseppe Arena, Roberta D'Agata, Giuseppe Spoto*

*Dipartimento Scienze Chimiche, Università degli Studi di Catania, Viale Andrea Doria 6, Catania. (gspoto@dipchi.unict.it)*

Grande interesse è oggi riposto nello sviluppo di tecniche in grado di effettuare, con alta efficienza, screening veloci di interazioni tra sistemi biologici. La Surface Plasmon Resonance (SPR) operante secondo procedure di *imaging* è stata recentemente proposta quale tecnica di studio di interazioni, in grado di massimizzare l'efficienza e la velocità dello studio. Per tale motivo l'individuazione di procedure d'uso dell'SPR imaging per tali finalità è oggi di grande interesse.

Il lavoro presentato si muove secondo tali finalità. Sono state infatti studiate le interazioni tra glicoproteine e lectine, individuando ed ottimizzando nuove procedure di funzionalizzazione del substrato metallico che consentono uno studio in parallelo dell'interazione tra le glicoproteine ancorate in modo spazialmente risolto su un substrato di oro ed una serie di lectine. L'ottimizzazione dell'uso di tecniche di SPR *imaging* nello studio di interazioni tra glicoproteine e lectine è motivato dal fatto che le catene oligosaccaridiche di certe glicoproteine giocano un ruolo chiave nei processi di riconoscimento, adesione ed interazione cellulare coinvolti in risposte apoptotiche ed immuni. Lectine in grado di interagire con specifici epitopi di glicoconjugati possono, quindi, essere utilizzate per caratterizzare strutture glicaniche.

L'ancoraggio spazialmente risolto è stato ottenuto realizzando dei microcanali in PDMS, mentre adsorbimenti aspecifici di biomolecole sulla superficie sono stati minimizzati funzionalizzando con m-PEG la superficie non interessata a fenomeni di interazione specifica.

**COMUNICAZIONI POSTER**

**SENSORI**

## DISPOSABLE ELECTROCHEMICAL IMMUNOSENSOR FOR DETERMINATION OF AFLATOXINS IN BARLEY

Nagwa H. S. Ammida\*, Laura Micheli and Giuseppe Palleschi

\* Department of Chemistry, Garyounis University, Benghazi-Libya

Dipartimento di Scienze e Tecnologie Chimiche, Università di Roma "Tor Vergata", Via della Ricerca Scientifica, 00133 Rome, Italy.

Aflatoxins are toxic compounds, known to be carcinogenic, mutagenic, teratogenic and immunosuppressive which are produced as secondary metabolites by the fungi *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* growing on a variety of food products. Among 18 different types of aflatoxins identified, the major ones are aflatoxin B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>), AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub> and AFG<sub>2</sub>. The International Agency for Research on Cancer (IARC) has classified all four aflatoxins as Group 1 carcinogens (in order of toxicity, AFB<sub>1</sub> > AFG<sub>1</sub> > AFB<sub>2</sub> > AFG<sub>2</sub>).

The European Committee Regulations (ECR) establish the maximum acceptable level of total aflatoxins (AFB<sub>1</sub>, AFG<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub> and AFG<sub>2</sub>) at 4 ppb, in cereals, peanuts and dried fruits either for direct human consumption, or as an ingredient in foods.

Several methods for aflatoxins determination in various samples, have been developed and reported in literature. Methods based on thin-layer chromatography (TLC) and high performance liquid chromatography (HPLC) coupled with different detectors have been reported. However, these methods require well equipped laboratories, trained personnel, harmful solvents and several hours to complete an assay.

In recent years, enzyme linked immunosorbent assays (ELISA) have been described for aflatoxin determination. ELISA methods potentially have advantages over the other procedures because of their simplicity, sensitivity, low cost and the use of safe reagents.

The goal of our work focuses on the development of a disposable electrochemical immunosensor for the detection of total aflatoxins (AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub> and AFG<sub>2</sub>) in barley by use of a polyclonal antibody anti-aflatoxin (PAb). Spectrophotometric ELISA was primarily tested, prior to transfer the assay onto screen printed electrode (SPEs). The detection of the selected analyte is carried out through the competition between the BSA-AFB<sub>1</sub> immobilised on the support and the free antigen (standard or sample) for the binding sites of the PAb. After the competition step, the amount of PAb that reacted with the immobilised BSA-AFB<sub>1</sub>, was evaluated using a secondary antibody labelled with alkaline phosphatase (Ab<sub>II</sub>-AP). A fast electrochemical technique, differential pulse voltammetry (DPV), has been used for detection. Probe stability, sensitivity and reproducibility are under studies. The results will be confirmed by comparison with results obtained by HPLC coupled with the conventional fluorescence detection.

## DNA ELECTROCHEMICAL BIOSENSOR FOR THE DETECTION OF GENOTOXIC COMPOUNDS IN SOIL SAMPLES

Silvia Raquel Hernandez <sup>1,2</sup>, Graziana Bagni <sup>1\*</sup>, Giovanna Marrazza <sup>1</sup>, Marco Mascini <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Department of Chemistry, University of Florence, Via della Lastruccia 3, 50019 Sesto Fiorentino (FI), Italy

<sup>2</sup> Department of Chemistry, National University of Littoral, University Campus, 3000 Santa Fe, Argentina

The soil plays a central role within ecosystems and fulfils a multitude of functions (as a habitat, regulatory and production functions). When reaching soils, pollutants can adversely affect these functions; thus they can move to other media and cause damage to other components of the ecosystem.

In this work, an electrochemical DNA-based biosensor is proposed as a screening method for the rapid detection of genotoxic compounds in soil samples. The biosensor was assembled by immobilising double stranded calf thymus DNA on screen-printed electrodes. The interactions between DNA and environmental pollutants can cause variations of the electrochemical properties of DNA [1]. Therefore, the changes in oxidation of the guanine peak, obtained by a square wave voltammetric scan, was used as analytical signal. The index of toxicity was expressed by the relative signal  $G/G_0$  (where  $G$  and  $G_0$  are the corrected marker SWV peak currents in experiments with and without the analyte, respectively).

Preliminary studies were performed using the benzene, naphthalene and anthracene derivatives as model compounds. The effect of these compounds on the surface-confined DNA was found to be linearly related to the concentration of these compounds in solution. On the other hand, the objective was to optimise the ultrasonic extraction conditions of these compounds from spiked soil samples. Then, the applicability of such a biosensor was evaluated by analysing soil samples from four sites of an Italian region with ecological risk.

The results were analysed statistically, the analysis of variance (ANOVA) was used to compare between the different sample groups. When the ANOVA indicated that significant differences existed between the groups, Fisher's "least-significant difference" (LSD) multiple comparison test was then used. A significance level of  $P < 0.05$  was applied in all statistical tests. The results demonstrated that the sampling sites presented different pollution levels and that the compounds analysed presented different genotoxic effect.

[1] Chiti G., Marrazza G., Mascini M. Electrochemical DNA biosensor for environmental monitoring. *Anal. Chim. Acta* 2001, 427, 155-164.

\* CORRESPONDING AUTHOR: E-mail: graziana.bagni@unifi.it, Ph: +39-055-4573311, Fax: +39-055-4573384

**DOSAGGIO DELLA FOSFOLIPASI D MEDIANTE UN BIOSENSORE  
AMPEROMETRICO A COLINA OSSIDASI  
MODIFICATO CON POLIPIRROLO OVEROSSIDATO**

*C. Caivano, R. Ciriello, A. Guerrieri*

*Dipartimento di Chimica, Università degli Studi della Basilicata  
Via N. Sauro 85, 85100 Potenza (guerrieri@unibas.it)*

Le Fosfolipasi D (PLD) sono una famiglia di enzimi calcio-dipendenti in grado di catalizzare l'idrolisi del legame estereo esistente tra l'acido fosfatidico e l'entità alcolica dei fosfolipidi. Oltre ad esercitare attività idrolitica, le PLD catalizzano anche la reazione di transfosfatidilazione in presenza di una elevata concentrazione di alcool primario [1]. Sono state isolate e sequenziate PLD da varie fonti. Nei mammiferi tale enzima è coinvolto in importanti processi cellulari quali la proliferazione delle cellule stesse, la secrezione proteica e la regolazione metabolica. La maggior parte degli studi condotti sulle piante hanno riguardato i suoi possibili effetti sul deterioramento delle membrane in relazione a stress, invecchiamento e patogenesi. Nei lieviti l'attività della PLD è indispensabile alla sporulazione mentre la PLD batterica può mimare alcune reazioni che avvengono nelle cellule. Tra gli enzimi idrolitici di fonte batterica, la PLD da *Streptomyces Chromofuscus* è caratterizzata da una notevole capacità di transesterificazione. Tale proprietà, piuttosto insolita, è di notevole interesse pratico in quanto consente di preparare fosfolipidi non naturali utilizzati nell'industria farmaceutica e alimentare a partire dalla fosfatidilcolina. La produzione microbica di PLD trarrebbe sicuramente beneficio dalla messa a punto di una metodica di dosaggio rapida e precisa.

La maggior parte delle metodiche [2, 3] esistenti per il dosaggio delle PLD riguarda la determinazione della colina (Ch) mediante blu di bromotimolo oppure per via enzimatica. Sono state inoltre descritte tecniche titrimetriche o pH-stat così come tecniche cromatografiche o in flusso accoppiate in alcuni casi alla rivelazione per fluorescenza o chemiluminescenza [4]. Il metodo più rapido e più sensibile è attualmente il dosaggio radiometrico che richiede però l'impiego di reattivi, oltre che nocivi, piuttosto costosi. Il dosaggio enzimatico delle PLD tramite biosensori a Ch è sostanzialmente inesplorato. Vrbová et al. [5] hanno riportato, unico esempio in letteratura, la determinazione dell'attività delle PLD tramite un elettrodo di Clark modificato con una membrana in nylon co-immobilizzante colina ossidasi e catalasi. A parte le difficoltà intrinseche associate alla tecnica di immobilizzazione adottata e all'impiego di sensori ad O<sub>2</sub>, sfortunatamente gli autori non riportano alcuna figura di merito relativamente al dosaggio delle PLD né le eventuali proprietà anti-interferenti del sensore stesso.

Lo scopo del presente lavoro di ricerca è stato quello di realizzare un biosensore amperometrico per il dosaggio della PLD basato sulla immobilizzazione della colina ossidasi mediante co-crosslinking enzimatico su un elettrodo di platino precedentemente modificato con un film di polipirrolo overossidato. L'immobilizzazione dell'enzima colina ossidasi mediante co-crosslinking è già stata riportata in letteratura nel caso di un sensore bienzimatico per la rivelazione di colina ed acetilcolina realizzato co-immobilizzando, con tale tecnica, colina ossidasi e acetilcolinesterasi su elettrodi di platino [6, 7]. Tale procedura è risultata estremamente promettente poiché è facilmente adattabile alla geometria dell'elettrodo di lavoro ed inoltre assicura una elevata stabilità dell'enzima e bassi tempi di risposta. La caratterizzazione elettroanalitica del biosensore in oggetto ha evidenziato un range lineare in Ch esteso fino a 0.5 mM ed un limite di rivelabilità di 1 µM. Inoltre, l'impiego del film di

polipirrolo overossidato assicura una notevole permselettività consentendo la reiezione di specie interferenti usualmente presenti nelle matrici reali [8].

Al fine di ottimizzare il responso del sensore nei confronti del dosaggio enzimatico è stato condotto uno studio di taluni parametri di analisi quali la velocità di rotazione dell'elettrodo, il pH della soluzione tampone, la concentrazione di calcio e di tensioattivo e la concentrazione del substrato enzimatico. La presente metodica ha consentito di dosare la PLD in un intervallo di linearità esteso fino a 0.33 UI/ml e si è rivelata adatta per la rivelazione dell'attività enzimatica in matrici reali (ad esempio estratti vegetali crudi) fino a valori di circa  $8 \times 10^{-5}$  UI/ml in cella di analisi.

- [1] H. Eibl, S. Kovatchev, *Methods Enzymol.* 72 (1981) 633
- [2] M. Heller, *Adv. Lipid. Res.* 16 (1978) 267
- [3] A. J. Morris, M. A. Frohman, J. Engebrecht, *Analytical Biochemistry* 252 (1997) 1
- [4] P. Rauch, E. N. Ferri, S. Girotti, H. Rauchova, G. Carrera, R. Bovara, F. Fini, A. Roda, *Analytical Biochemistry* 245 (1997) 133
- [5] E. Vrbová, I. Kroupová, O. Valentová, Z. Novotná, J. Kas, *Analytica Chimica Acta* 280 (1993) 43
- [6] A. Guerrieri, G.E. De Benedetto, F. Palmisano, P.G. Zambonin, *Analyst* 120 (1995) 2731
- [7] A. Guerrieri, F. Palmisano, *Anal. Chem.* 73 (2001) 2875
- [8] A. Guerrieri, G. E. De Benedetto, F. Palmisano, P. G. Zambonin, *Biosensors & Bioelectronics* 13 (1) (1998) 103

## BIOSENSORI ELETTROCHIMICI ASSEMBLATI CON ENZIMI DEIDROGENASI PER IL CONTROLLO DELLA QUALITÀ DEL VINO

A.Lupu, M.Iorgulescu, D.Compagnone\*, G.Palleschi

Dipartimento di Scienze e Tecnologie Chimiche, Università di Roma "Tor Vergata",  
via della Ricerca Scientifica, 1, 00133, Roma

\*Dipartimento di Scienze degli Alimenti, Università di Teramo,  
via Spagna 1, 64023, Mosciano Stazione, Teramo

Lo sviluppo di metodiche analitiche basate su strumentazione di basso costo, facile utilizzo e trasportabile, è essenziale nel settore enologico che è formato da un gran numero di piccole aziende. Sistemi di monitoraggio di alcuni composti presenti nel vino consentono di controllare la qualità finale del prodotto e/o di intervenire per correggere situazioni particolarmente critiche.

L'ossidazione elettrochimica del NADH è un problema studiato a fondo, in quanto esso è il coenzima di più di 350 enzimi deidrogenasi<sup>1</sup>. L'ossidazione elettrochimica del NADH a NAD<sup>+</sup> (un'ossidazione che coinvolge 2e<sup>-</sup> e 1 H<sup>+</sup>) fornisce quindi una possibile via di sviluppo per un'ampia gamma di sensori enzimatici amperometrici, per vari substrati. Inoltre, offre un ideale sistema modello per provare diverse strategie di sviluppo di elettrodi modificati, in quanto il NADH e le sue reazioni in soluzione sono già conosciuti. Il comportamento redox della coppia NAD<sup>+</sup>/NADH all'elettrodo è irreversibile, infatti il NAD<sup>+</sup> ridotto può formare un dimero che spesso si adsorbe sulla superficie dell'elettrodo. Il NADH può essere ossidato elettrochimicamente all'elettrodo di lavoro, a NAD<sup>+</sup>, però a potenziali molto più elevati (intorno a +0.75 mV) rispetto al potenziale redox della coppia (-0.32 mV)<sup>2</sup>. Questo svantaggio può essere eliminato utilizzando mediatori redox, che spostano il potenziale di ossidazione verso valori meno positivi.

In questo lavoro, verrà presentato lo sviluppo di sensori enzimatici mediati, usa e getta, basati su enzimi deidrogenasi, per applicazioni nel controllo della qualità del vino. Questi sensori sfruttano la specificità delle deidrogenasi e la selettività dei sensori amperometrici mediati, per il NADH.

È stato utilizzato come mediatore il 2,7 dinitro-9- fluorenone, un composto solo da poco entrato nel contesto dell'elettrocatalisi del NADH ed il PMS (fenazina metansolfato) già riportato in letteratura per misure nel vino<sup>3</sup>. Il 2,7 dinitro-9- fluorenone adsorbito sulla superficie dell'elettrodo di lavoro sotto forma di precursore inattivo viene poi attivato elettrochimicamente. La capacità catalitica del mediatore adsorbito è stata testata in voltammetria ciclica (Fig.1). La curva di calibrazione ottenuta mostra un limite di rilevabilità di 1 µM ed un intervallo lineare fino a 100 µM. La sensibilità di misura è di circa 800 nA/mM e la RSD dell' 1.4% (n = 5, c = 100 µM).

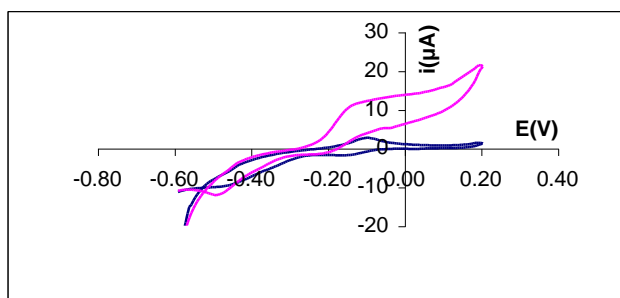


Fig.1 Elettroossidazione catalizzata all'elettrodo modificato con 2,7 dinitro-9- fluorenone



Sono stati assemblati biosensori basati sull'utilizzo della glicerolo deidrogenasi e della fruttosio deidrogenasi, per la misura di glicerolo e fruttosio. Verranno presentati i risultati ottenuti, insieme ai dati relativi all'effetto matrice ed alle strategie per l'eliminazione di interferenze.

1. M. Dixon, E.C. Webb, *Enzymes*, Longman, London, 1979
2. B.R.Eggins, *Chemical Sensors and Biosensors*, ISBN 0-471-89914-3, John Wiley&Sons, LTD, New York, NY (2002)
3. M.Esti, G.Volpe, D.Compagnone, G.Mariotti, D.Moscone, G.Palleschi, *American Journal of enology and viticulture*, 54(1), 39-45, 2003.

Si ringraziano i progetti europei WINEBIOSENS No QLK1-CT-2002-70884 e NOVTECH. No HPRN-CT-2002-00186 per i finanziamenti erogati.

## DETERMINAZIONE DI Hg<sup>2+</sup> MEDIANTE UN BIOSENSORE BASATO SU ENZIMA IMMOBILIZZATO ELETTROCHIMICAMENTE

*C.Malitesta, M.R.Gualcito*

*Laboratorio di Chimica Analitica, Dipartimento di Scienza dei Materiali, Università di Lecce*

La possibilità di determinare metalli pesanti mediante l'uso di biosensori ad enzima immobilizzato è stata oggetto di un certo numero di studi (per es. riff. 1-4) e vari enzimi sono stati utilizzati a questo scopo, sfruttando l'inibizione enzimatica causata da tali specie per ottenere un responso, giacchè non sono disponibili enzimi per i quali tali metalli (tossici!) costituiscano substrati. In generale l'uso di questi dispositivi analitici di basso costo offre il vantaggio di consentire determinazioni in-situ e/o un rapido screening di una serie di campioni per decidere quali di essi debbano essere ulteriormente indagati. Tale approccio presenta l'ulteriore caratteristica di poter in qualche misura presentare un responso solo per specie di più diretta rilevanza tossicologica. Numerosi sono però ancora i problemi da risolvere prima che tali biosensori possano trovare pratica applicazione. Tra questi: la rigenerazione dell'enzima, il tempo d'analisi, la selettività della risposta, ecc.

Nonostante si sia accumulata una significativa quantità di lavoro su biosensori di vario tipo, apparentemente nessuno sforzo è stato fatto per esplorare le potenzialità in questo campo dei biosensori basati su enzimi immobilizzati elettrochimicamente. Ciò è sorprendente se si considera che essi hanno mostrato in generale interessanti prestazioni ( per es. ridotta interferenza da specie elettro- e tensio-attive, tempi di vita lunghi).

Per esplorare le eventuali peculiarità di tale via si è scelto uno dei primi biosensori ad enzima immobilizzato elettrochimicamente [5], le cui interessanti prestazioni analitiche sono state estesamente investigate in relazione alle applicazioni cliniche. In questa comunicazione si riporteranno risultati relativi all'uso di tale biosensore per il glucosio nella determinazione di Hg<sup>2+</sup>.

1. A.M. Donlan, G.J.Moody, J.D.R. Thomas, *Analytical Letters* **22** (1989) 1873
2. N.F. Starodub, N.I. Kanjuk, A.L. Kukla, Yu.M. Shirshov, *Anal. Chim. Acta* **385** (1999) 461
3. T. Krawczynski vel Krawczyk, M. Moszczynska, M. Trojanowicz, *Biosensors & Bioelectronics* **15** (2000) 681
4. S.V. Dzyadevych, A. P. Soldatkin , Y. I. Korpan, V.N. Arkhypova, A. V. El'skaya, J. Chovelon, C. Martelet, N. Jaffrezic-Renault, *Anal. Bioanal. Chem.* **377** (2003) 496
5. C.Malitesta, F.Palmisano, L.Torsi, P.G.Zambonin, *Anal. Chem.* **62** (1990) 2735

## UN BIOSENSORE PIEZOELETTRICO PER LA DETERMINAZIONE DI SEQUENZE IN DNA GENOMICO NON AMPLIFICATO

*M. Minunni, S. Tombelli, M.M. Spiriti, J. Fonti, I. Mannelli, M. Mascini*

*Dipartimento di Chimica, Università degli Studi di Firenze  
Polo Scientifico, Via della Lastruccia 3, 50019 Sesto F.no (FI)  
[minunni@unifi.it](mailto:minunni@unifi.it)*

Negli ultimi anni sono stati sviluppati biosensori capaci di determinare sequenze di DNA, sfruttando la reazione di ibridazione tra una sonda immobilizzata sulla superficie del sensore e la sequenza bersaglio in soluzione. Il campione di DNA è, generalmente, un amplificato di DNA ottenuto mediante la reazione polimerasica a catena (PCR). Con questo tipo di approccio, accoppiando diversi sistemi di trasduzione (elettrochimico, ottico e piezoelettrico), sono stati realizzati vari biosensori capaci di determinare sequenze specifiche, complementari alla sonda immobilizzata, in campioni di amplificati PCR. Le applicazioni vanno dall'analisi ambientale per la presenza di microrganismi patogeni, alla diagnostica clinica per lo screening di mutazioni genetiche, all'analisi alimentare per la ricerca di organismi geneticamente modificati (OGM).

La possibilità di determinare sequenze di interesse direttamente in campioni di DNA genomico non amplificato rappresenta uno dei problemi di frontiera nel campo dei biosensori a DNA.

In questo lavoro, è stato applicato un sistema piezoelettrico all'analisi di varie sequenze bersaglio, variamente rappresentate in DNA di origine animale e vegetale. Sulla superficie del sensore, un cristallo piezoelettrico, con elettrodi d'oro vaporizzati sulla superficie, sono immobilizzate sonde biotilate di DNA, specifiche per le sequenze d'interesse (metodo tioli-destrano-stepatavidina). In particolare, per studiare l'effettiva capacità del sistema a rilevare sequenze non amplificate, sono dapprima state scelte sequenze altamente ripetute (highly repeated DNA), significativamente presenti nei genomi. Queste sequenze sono caratteristiche della specie e noi abbiamo scelto quelle relative alla specie *Bos Taurus* (DNA bovino) ed in particolare la sequenza denominata satellite 13. Come controllo negativo è stato impiegato il DNA di *Sus scrofa* (DNA suino).

DNA di origine vegetale, estratto dalla pianta *Nicotiana glauca* geneticamente modificata (GM), è stato poi utilizzato per analizzare la presenza della sequenza relativa al promotore p35S del virus CamV, caratteristica della maggior parte degli OGM. Come controllo negativo è stata utilizzata la stessa pianta non modificata geneticamente (wild type). Questa sequenza è presente nella pianta GM in circa 1-2 copie per genoma aploide.

Dapprima il dispositivo è stato ottimizzato con oligonucleotidi sintetici, successivamente sono stati analizzati campioni di DNA genomico contenenti le sequenze d'interesse. È stato necessario studiare le condizioni di denaturazione della doppia elica per questo tipo di applicazione. Inoltre si è resa necessaria una digestione enzimatica del DNA estratto con enzimi di restrizione in modo da assicurarne la frammentazione e quindi la successiva reazione di ibridazione.

## STUDIO DELL'ASSEMBLAGGIO DI UN BIOSENSORE PER IL GLUCOSIO ATTRAVERSO LA TECNICA DI DEPOSIZIONE LAYER-BY-LAYER

*L. Pigani, R. Seeber, F. Terzi, C. Zanardi*

*Dip. Chimica, Università degli Studi di Modena e Reggio Emilia, via G. Campi, 183 – 41100, Modena*

*H. J. Ahonen, J. Kankare, J. Lukkari*

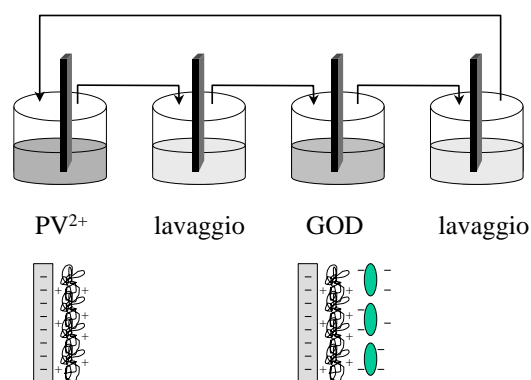
*Dep. Chemistry, University of Turku, Turku (Finland)*

I sensori amperometrici trovano oggi applicazione in vari settori della chimica analitica, da quello medico a quello ambientale, dal controllo di qualità durante la fase di produzione a quello del prodotto finito. Nella maggior parte dei casi, viene richiesta una elevata specificità nell'interazione fra il sensore e l'analita di interesse, da ottenere grazie all'utilizzo dell'opportuno mediatore redox ancorato alla superficie elettrodica. A tal fine, elementi riconoscitivi di natura biologica, primi fra tutti gli enzimi, costituiscono senza ombra di dubbio sostanze adatte al riconoscimento specifico del relativo substrato e, pertanto, i biosensori sono a tutt'oggi materia di studio di grande interesse.

L'ancoraggio di enzimi alla superficie elettrodica è stato ottenuto mediante diverse tecniche. In particolare, in questi ultimi anni si stanno compiendo i primi passi verso un nuovo tipo di fissaggio, mediante la deposizione layer-by-layer di polielettroliti di carica opposta, alternativamente depositati sull'elettrodo; essi risultano legati l'uno all'altro per interazione elettrostatica. Anche gli enzimi possono essere considerati polielettroliti anionici o cationici, se depositati da soluzioni a valori di pH rispettivamente al di sopra o al di sotto del loro punto isoelettrico.

In questo contesto, ci siamo occupati della deposizione dell'enzima glucoso-ossidasi su un elettrodo di oro per intercalazione con un derivato del poliviologeno di sintesi originale. Quest'ultimo costituisce un polielettrolita cationico, il quale potrebbe per di più svolgere la funzione di mediatore redox nella successiva fase di analisi del glucosio.

La deposizione dei diversi strati viene condotta previa modifica dell'elettrodo di oro con acido 2-mercaptoetansolfonico, al fine di rendere la superficie elettrodica carica negativamente. Seguono poi immersioni alternate in soluzioni di poliviologeno e di enzima, come riportato nello schema, fino ad ottenere un ricoprimento dello spessore desiderato.



Schema di deposizione del biosensore con la tecnica layer-by-layer

Visto lo scarso numero di lavori di letteratura riguardanti l'ancoraggio di enzimi a superfici elettrodiche mediante questa particolare tecnica di deposizione, si è preferito compiere i primi studi utilizzando un diverso e più noto polielettrolita anionico, ovvero il sodio polistirene solfonato. L'intercalazione di tale elettrolita con il poliviologeno è stata studiata per venti successive deposizioni, ottenendo importanti informazioni circa la cinetica di deposizione ed il meccanismo di trasporto di carica all'interno del film ottenuto.

**COMUNICAZIONI POSTER**

**TECNICHE SEPARATIVE**

**DETERMINAZIONE MEDIANTE HS-SPME/GC DI BENZENE, TOLUENE E XILENE IN SOLUZIONI OTTENUTE DA ESPERIMENTI DI ASSORBIMENTO PERCUTANEO DI BENZINE**

*Gianpiero Adami<sup>1</sup>, Francesca Larese<sup>2</sup>, Filippo Lo Coco<sup>3</sup>, Marta Venier<sup>1</sup>,  
Pierluigi Barbieri<sup>1</sup> e Edoardo Reisenhofer<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>*Dipartimento di Scienze Chimiche, Università di Trieste, Via Giorgieri 1, 34127 Trieste*

<sup>2</sup>*UCO di Medicina del Lavoro, Università di Trieste, Trieste*

<sup>3</sup>*Università degli Studi di Udine, Dipartimento di Scienze Economiche, Via Tomadini 30/A, 33100 Udine*

In letteratura sono presenti numerosi studi sull'assorbimento per via inalatoria di vapori di composti aromatici o di loro miscele, quali ad esempio le benzine, ma si riscontra una carenza di informazioni quantitative riguardo la loro penetrazione cutanea [1,2].

Questo lavoro si propone di integrare tali conoscenze attraverso degli esperimenti condotti in vitro su cute umana. In particolare, sono state scelte tre diverse benzine commerciali e, per ognuna di esse, si sono monitorati tre componenti aromatici rilevanti dal punto di vista tossicologico: benzene, toluene e xilene [1]. Inoltre, si sono effettuati degli studi paralleli per valutare l'assorbimento percutaneo dei singoli componenti.

Gli esperimenti sono stati eseguiti utilizzando il sistema delle celle di Franz [3,4]. Queste sono costituite da una fase donatrice (le benzine o i singoli composti) che viene separata da un lembo di cute umana proveniente da operazioni di chirurgia estetica dalla fase ricevente costituita da una soluzione di NaCl allo 0.9% e di siero albumina bovina al 5%. Mediante prelievi della soluzione ricevente a tempi prefissati (2, 4, 6, 7 e 8 ore) si è valutato il passaggio dei composti in esame attraverso la membrana.

La composizione delle benzine commerciali utilizzate è stata determinata mediante gascromatografia multidimensionale ad alta risoluzione che consente in una singola analisi una buona separazione delle varie classi di idrocarburi presenti e la loro separazione secondo il numero di atomi di carbonio.

Per l'analisi dei campioni di soluzione ricevente si è impiegata la tecnica della micro estrazione in fase solida su spazio di testa (HS-SPME) accoppiata ad un gas cromatografo con rivelatore FID. Si sono quindi calcolati il flusso ( $\mu\text{g cm}^{-2} \text{h}^{-1}$ ), il lag time (h) ed il coefficiente di permeazione ( $\text{cm h}^{-1}$ ), i cui valori medi sono riportati nella tabella seguente.

**Valori medi ottenuti per le diverse benzine analizzate**

	<b>FLUSSO</b> ( $\mu\text{g cm}^{-2} \text{h}^{-1}$ )	<b>LAG TIME</b> (h)	<b>COEFF.PERM. *10<sup>6</sup></b> ( $\text{cm h}^{-1}$ )
<b>benzene</b>	1.338 ± 0.306	1.242 ± 1.043	257.3 ± 71.5
<b>toluene</b>	2.889 ± 1.318	1.697 ± 0.808	4.547 ± 0.836
<b>xilene</b>	0.495 ± 0.349	3.280 ± 1.100	4.970 ± 3.061

Gli esperimenti condotti confermano che le benzine, ed in particolare i tre componenti esaminati benzene, toluene e xilene, sono in grado di attraversare la cute in maniera significativa. Inoltre il tempo necessario per raggiungere un flusso costante, rappresentato dal

lag time, risulta relativamente basso. Non si sono osservate differenze di assorbimento rilevanti tra le diverse benzine commerciali.

### **Bibliografia**

1. Hanke J. et al. (2000) “The absorption of benzene through human skin”, *Int J Occup Environ Health*, 6/2, 104-111.
2. Tsuruta H. (1996) “Skin absorption of solvent mixtures”, *Industrial Health*, 34, 369-378.
3. Franz TJ (1975) “Percutaneous absorption: on the relevance of in vitro data”, *J Invest Dermatol*, 64, 190-195.
4. Venier M. et al. (2004) “Percutaneous absorption of 5 glycol ethers through human skin in vitro”, *Toxicology in vitro*, in press (available on line).

## PROPRIETÀ LEGANTI DI POLIMERI A STAMPO MOLECOLARE PREPARATI IN PRESENZA DI COMONOMERI POLARI

*Claudio Baggiani, Patrizia Baravalle, Cristina Giovannoli, Cinzia Tozzi*

*Laboratorio di Bioanalitica, Dipartimento di Chimica Analitica, Università di Torino*

Il metodo tradizionalmente più utilizzato per produrre fasi stazionarie basate su polimeri a stampo molecolare (MIPs) consiste in una polimerizzazione in un opportuno solvente porogenico di una miscela di molecole stampo e monomeri funzionali in presenza di un forte eccesso d'agente reticolante. Le caratteristiche chimico-fisiche dell'agente reticolante comunemente impiegato, l'etilene dimetacrilato (EDMA), conferisce alla matrice polimerica uno spiccato carattere idrofobico, che, accanto all'interazione di riconoscimento molecolare tra molecola-stampo e siti leganti, comporta un'interazione non specifica tra matrice polimerica e molecole poco polari. Tale interazione diventa predominante in condizioni di fase mobile prevalentemente acquosa, e contribuisce significativamente a ridurre la selettività del polimero a stampo molecolare. Nel caso dell'utilizzo di MIPs come fasi solide per estrazione, l'idrofobicità della matrice polimerica comporta inoltre una limitata bagnabilità da parte di matrici acquose, con conseguenti ricuperi incompleti e, talvolta, adsorbimenti irreversibili in fase solida.

Al fine di ovviare a tali inconvenienti, si è pensato di introdurre nella miscela di polimerizzazione un comonomero polare, incapace di interagire significativamente con le molecole stampo, ma presente in quantità tale da ridurre il carattere d'idrofobicità della matrice polimerica. A tale scopo, si è considerato un sistema modello, rappresentato da una libreria di fasi stazionarie a base di polimeri a stampo molecolare diretti verso il fungicida pyrimethanil (4,6-dimethyl-N-phenyl-2-pyrimidinamine). Tali MIPs sono stati preparati introducendo nella miscela di polimerizzazione una serie di comonomeri a polarità crescente: metilmetacrilato (MMA), N-metacrilamidopiperazina (MAMpip), N-metacrilamidopirrolidina (MAMpyr), N,N-dimetilacrilammide (DMAM), acrilonitrile (AN), N-metacrilamido morfina (MAMmor), N-vinilpirrolidone (NVP), 2-idrossietilmetacrilato (HEMA).

Per studiare l'effetto dei comonomeri sulle interazioni di riconoscimento molecolare è stata studiata la variazione del fattore di selettività in funzione della polarità della fase mobile per la coppia pyrimethanil / fenilazoresorcinolo (FAR), costituita dalla molecola stampo, capace di stabilire sia interazioni specifiche con i siti leganti che non specifiche con la matrice polimerica, e da una molecola di idrofobicità equivalente ma di struttura completamente diversa, incapace quindi di stabilire interazioni di riconoscimento molecolare.

I risultati sperimentali ottenuti mostrano che, rispetto a un polimero preparato solo con un monomero funzionale e un agente reticolante, l'introduzione di un comonomero polare causa un aumento generalizzato del fattore di selettività per la molecola stampo rispetto al FAR quando la colonna viene eluita in ambiente non acquoso, mentre nel caso di eluenti acquosi tale aumento appare essere limitato ai comonomeri più polari MAMmor e NVP, con un limitato calo nel caso degli altri monomeri. La variazione della selettività sembra quindi essere funzione non solo dell'idrofobicità del comonomero, ma anche della sua struttura molecolare.

Risulta quindi essere confermata l'ipotesi che la presenza di alcuni comonomeri polari riduce significativamente le interazioni non specifiche a carattere idrofobico, senza peraltro danneggiare significativamente la capacità legante verso la molecola stampo.



## CARATTERIZZAZIONE DI MATERIALI BIOCOMPATIBILI IMPIEGATI PER LA COSTRUZIONE DI CANALI PER FRAZIONAMENTO IN CAMPO-FLUSSO DI CAMPIONI DI ORIGINE BIOLOGICA

*N. Cioffi<sup>1</sup>, N. Ditaranto<sup>1</sup>, L. Sabbatini<sup>1</sup>, P.G. Zambonin<sup>1</sup>, B. Roda<sup>2</sup>, D. Melucci<sup>2</sup>, S. Casolari<sup>2</sup>, A. Zattoni<sup>2</sup>, P. Reschiglian<sup>2</sup>*

<sup>1</sup>*Dipartimento di Chimica, Università degli Studi di Bari, Via Orabona 4, 70126 Bari.*

<sup>2</sup>*Dipartimento di Chimica “G. Ciamician”, Università di Bologna, Via Selmi 2, 40126 Bologna*

*tel.: 0805442019, fax: 0805442026, email:*

Le tecniche di frazionamento in campo-flusso (FFF, Field-Flow Fractionation) si sono dimostrate adatte alla separazione di cellule eucariote e procariote su basi morfologiche, con la peculiarità di poter mantenere intatta la vitalità delle cellule così frazionate [1,2], nonché di macromolecole di interesse biologico quali proteine, polisaccaridi e acidi nucleici. L’ottimizzazione delle potenzialità della FFF per applicazioni in campo biologico, biomedico o biotecnologico e diagnostico è legata alla possibile scelta tra i diversi materiali biocompatibili che possono essere impiegati per la costruzione dei canali FFF. In FFF, infatti, il frazionamento avviene all’interno di un canale capillare vuoto grazie all’azione combinata di un flusso longitudinale di fase mobile e di un campo esterno di diversa natura applicato ortogonalmente; qualsiasi interazione con le pareti dell’elemento separatore può quindi influenzare il frazionamento dei campioni [3]. Risulta quindi importante avere a disposizione tecniche per la caratterizzazione o modifica dei materiali che si possono scegliere per la preparazione di questi canali. In particolare in questo lavoro presentiamo alcuni risultati sullo studio dei materiali da noi impiegati per la costruzione dei dispositivi separativi di due diverse tecniche FFF: la FFF a campo gravitazionale (GrFFF) e la FFF a campo idrodinamico con canale a fibra cava porosa (HF FIFFF). Per quanto riguarda la GrFFF, interessante per la sua facile implementazione strumentale e sterilizzabilità, diversi studi sono presenti in letteratura sulla biocompatibilità delle pareti che costituiscono il canale, rispetto all’utilizzo di pareti in vetro o vetro trattato o in materiali plastici [4].

La tecnica GrFFF è stata applicata al frazionamento di batteri interi vivi per il frazionamento dei quali l’implementazione del sistema è stata ottenuta attraverso la caratterizzazione e l’utilizzo di materiale plastico di due tipologie. Nel primo caso si è impiegata una parete commerciale a base di PVC, nel secondo si è scelto di modificarla attraverso la deposizione per *ion beam sputtering* (IBS) [5-6] di uno strato sottile (200nm), compatto ed uniforme di fluoropolimero a bassa rugosità. La tecnica IBS si è rivelata ottimale per la realizzazione di film sottili ed estremamente omogenei, la cui composizione chimica è facilmente modulabile attraverso la variazione di semplici parametri di deposizione, quali l’energia e la corrente di *sputtering*, la composizione dell’atmosfera gassosa in camera di deposizione, ovvero facendo ricorso a processi di *co-sputtering*, in grado di includere nanoparticelle inorganiche nella matrice *teflon-like*. La superficie dei canali è stata poi caratterizzata tramite spettroscopia fotoelettronica a raggi X (XPS). Questa tecnica ha consentito di identificare gruppi funzionali inattesi sulla superficie del canale commerciale a base di PVC, che si è rivelato esser costituito da una miscela di PVC e di un poli-etero, in proporzioni ponderali 2:1. L’apprezzabile polarità riscontrata nel caso della superficie della parete commerciale viene decisamente ridotta a seguito della deposizione di un film sottile fluoropolimerico. L’analisi XPS della parete modificata evidenzia la presenza di fluoro, carbonio e di una bassissima concentrazione di ossigeno; lo studio della regione C1s ha consentito di identificare i diversi gruppi funzionali fluorurati del carbonio, mentre l’applicazione di semplici modelli strutturali

ha consentito di quantificare il grado di ramificazione del polimero, mettendone in evidenza l'incrementata idrofobicità.

Nel caso della HF FIFFF, variante prototipo della FIFFF per cui solo recentemente si stanno sviluppando applicazioni in ambito biologico e che in tale ambito può presentare vantaggi ulteriori rispetto alla tecniche FFF più consolidate quali miniaturizzazione e possibile impiego monouso [7], è stato condotto uno *screening* volto alla caratterizzazione di diversi materiali di cui sono costituite le fibre cave porose da microdialisi utilizzate per la preparazione dell'elemento separatore. Le applicazioni considerate si sono rivolte al frazionamento di batteri interi e di proteine. Allo scopo di studiare anche le possibili interazioni che possono avvenire in corso di analisi tra analita e parete del canale, quali eventuali fenomeni di adsorbimento superficiale, si è inoltre analizzata la superficie interna di fibre impiegate per analisi di matrici reali. In figura 1 si riportano gli spettri C1s di una fibra di polisolfone nuova (fig 1a) e di un campione identico, ma impiegato per l'analisi di campioni di mioglobina da cuore di cavallo ed albumina di siero bovino (fig 1b). Il paragone tra questi due spettri ha consentito di evidenziare l'incremento dell'intensità del segnale 2 (dovuto a gruppi  $\underline{C}-O$ ;  $\underline{C}-N$ ) e la comparsa del picco 3 (attribuito a gruppi carbossilici o ammidici). Di contro, il picco 1 (dovuto a carbonio alchilico ed arilico non sostituito con atomi o gruppi elettron-attrattori) e la componente dovuta a fenomeni di *shake-up* (tipica delle insaturazioni del polietersolfone), subiscono una diminuzione. Queste evidenze, insieme con l'andamento delle percentuali atomiche osservate nel caso dei campioni di canale contaminato, indicano la presenza sul polisolfone di un *overlayer* contenente carbonio, azoto ed ossigeno. Si è escluso che la contaminazione fosse dovuta in maniera quantitativamente significativa all'impiego di acetato d'ammonio (presente nell'eluente), sulla base della posizione e forma del segnale N1s. Questo infatti presenta un unico intorno chimico, il cui massimo risulta centrato a 400.0 eV, valore tipico di gruppi ammidici.

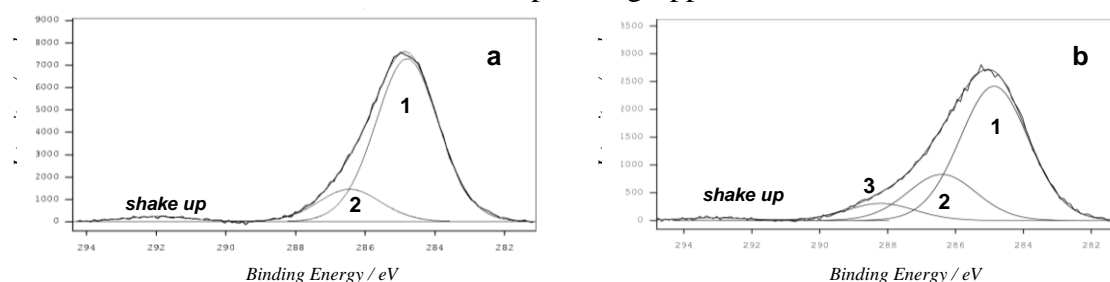


Figura 1. *Curve-fit* della regione ad alta risoluzione C1s relativa alla superficie interna di una fibra in polisolfone nuova (a) o contaminata (b, segnale campionato in corrispondenza della regione di focalizzazione).

- [1] A. Lucas, F. Lepage, P. Cardot. Field-Flow Fractionation Handbook; Schimpf, M.E.; Caldwell, K.; Giddings, J.C., Eds.; Wiley-Interscience: New York, 2000; Chapter 29.
- [2] P. Reschiglian, A. Zattoni, B. Roda, S. Casolari, M. H. Moon, J. Lee, J. Jung, K. Rodmalm and G. Cenacchi, Anal. Chem. 74 (2002) 4895.
- [3] J. C. Bigelow, J. C. Giddings, Y. Nabeshima, T. Tsuruta, K. Kataoka, T. Okano, N. Yui, Y. Sakurai, J. Immunol. Meth. 117 (1989), 289.
- [4] P. J. P. Cardot, J. Gerota, M. Martin, J. Chromatogr. 568 (1991) 93.
- [5] N. Cioffi, I. Losito, L. Torsi, I. Farella, A. Valentini, L. Sabbatini, P.G. Zambonin, T. Bleve-Zacheo, Chem. Mater. 14 (2002), 804 e riferimenti ivi citati.
- [6] N. Cioffi, L. Torsi, I. Farella, D. Altamura, A. Valentini, N. Ditaranto, L. Sabbatini, P.G. Zambonin, T. Bleve-Zacheo, Thin Solid Films, 449 (2004), 25.
- [7] P. Reschiglian, A. Zattoni, L. Cinque, B. Roda, D. Melucci, F. Dal Piaz, A. Roda, M.H. Moon, B.R. Min, Anal. Chem. 76 (2004) 2103.

## **CROMATOGRAFIA IONICA A GRADIENTE DI CAPACITÀ. USO DELLA COLONNA CRIPTAND A1 NELLA SEPARAZIONE DI ANIONI INORGANICI**

*Agatino Casale, Francesco Crea, Alessandro De Robertis*

*Dipartimento di Chimica Inorganica, Chimica Analitica e Chimica Fisica dell'Università degli Studi di Messina. Salita Sperone, 31 Messina (Vill. S. Agata)- 98166 Messina*

Il recente sviluppo delle tecniche cromatografiche è legato tra l'altro alla commercializzazione di specifiche colonne cromatografiche utilizzabili in molti settori applicativi, come nel campo della chimica forense, nel controllo delle sofisticazione alimentari, nell'industria farmaceutica ed in campo ambientale. Il vantaggio comune è la possibilità di effettuare la determinazione degli analiti (metalli pesanti, organometalli, polioni-organici, ecc.) anche se presenti in tracce nelle diverse matrici naturali.

Recentemente è stata immessa sul mercato una nuova colonna cromatografica denominata Ionpac Cryptand A1, progettata per la separazione di anioni polivalenti quali polifosfati e polisolfonati. Essa è costituita da un supporto di poli(stirene-divinilbenzene) sulla cui superficie è legato covalentemente un [2, 2, 2] criptando. Le separazioni su tale colonna sono basate sulla capacità degli eteri corona di intrappolare nelle proprie cavità cationi metallici con forza differente in funzione del loro raggio ionico permettendo pertanto di ottenere colonne cromatografiche aventi capacità di scambio (e quindi tempi di ritenzione) modulabile in funzione della forza di interazione criptando-metallo.

Le informazioni circa le potenzialità di questa colonna sono quelle ricavabili dal manuale a corredo [1]. Le considerazioni riportate in questo lavoro sul meccanismo di eluizione e di separazione degli analiti considerati serviranno come base per un successivo studio su altre classi di analiti, quali ad esempio gli anioni organici ed inorganici a basso ed alto peso molecolare.

I risultati che presentiamo in questo lavoro riguardano lo studio del comportamento cromatografico di anioni monovalenti (alogenuri, nitrati, nitriti ed perclorato) eluiti su una colonna cryptand A1 con eluenti tali da impartire alla colonna stessa capacità di scambio ionico nettamente differenti (NaOH, LiOH e miscele di NaOH+LiOH).

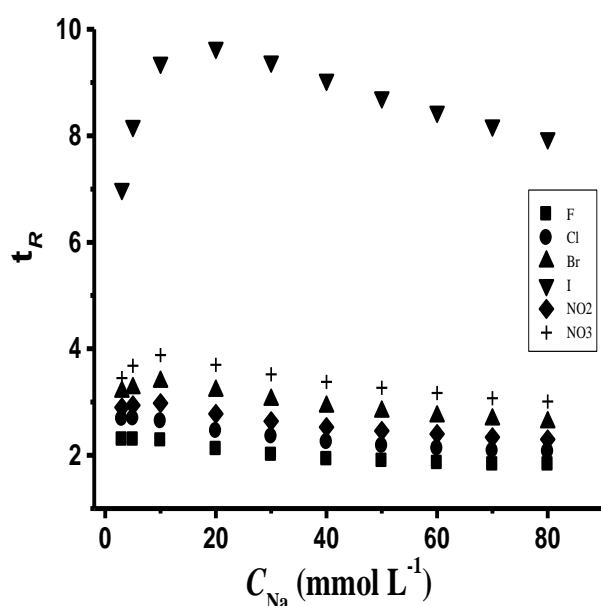
Dai risultati sperimentali si è osservato che per lo stesso anione, i tempi di ritenzione ( $t_R$ ) non sono funzione diretta della concentrazione dell'eluente. E' stato osservato infatti che per concentrazioni di NaOH comprese tra 5-20 mmol L<sup>-1</sup> (Fig. 1), si ottiene un graduale aumento dei tempi di ritenzione, poiché al crescere della concentrazione cationica nell'eluente corrisponde un proporzionale aumento del numero delle cavità occupate dallo ione metallico e conseguentemente un aumento della capacità di scambio. Raggiunta la saturazione della colonna (massima capacità di scambio), un ulteriore incremento di  $C_{Na}$  contribuisce ad aumentare l'effetto di massa (trascinante) con la relativa velocizzazione dei tempi di eluizione. Con LiOH non è stato osservato lo stesso andamento (Fig. 2) a causa della debole interazione tra il criptando e lo ione Li<sup>+</sup>, per cui la colonna raggiunge la saturazione per concentrazioni di litio superiori a 100 mmol L<sup>-1</sup>. Per quanto riguarda la separazione degli anioni, abbiamo potuto evidenziare come l'ordine di eluizione degli analiti non è legato al peso molecolare degli analiti (come generalmente osservato su classiche colonne a scambio ionico), ma al loro raggio termochimico [2].

Le velocità di eluizione degli anioni sono legate all'instaurarsi di due tipi di equilibri; il primo è un equilibrio dinamico tra l'anione legato al metallo intrappolato nelle cavità del criptando e l'anione libero in soluzione; mentre il secondo è un equilibrio legato alla formazione in soluzione di una coppia ionica tra lo ione Na<sup>+</sup> (o Li<sup>+</sup>) dell'eluente e l'anione analizzato. Pertanto, raggiunta la saturazione, un aumento della concentrazione dell'eluente

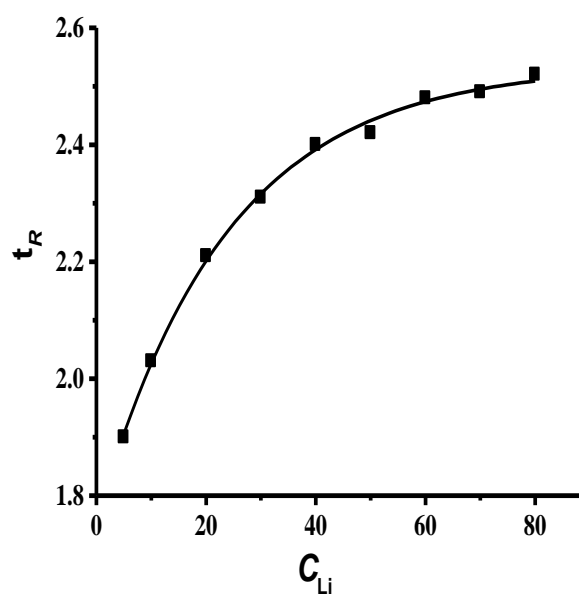
contribuirà ad aumentare la quantità di anione legato al metallo in soluzione, rispetto alla quantità di anione legato al metallo intrappolato nelle cavità del criptando.

Le conclusioni cui siamo giunti hanno permesso di ottimizzare delle procedure di separazione degli anioni studiati, in tempi relativamente brevi, e soprattutto di poter analizzare ioni polarizzabili, come lo ione perclorato, generalmente difficile da rivelare su altre colonne cromatografiche a scambio ionico, con tempi di ritenzione di pochi minuti e con limiti di rivelabilità dell'ordine di pochi ppb, così come illustrato in Fig.1 e 2.

Alla luce dei risultati sperimentali ottenuti è possibile evidenziare che il principale vantaggio derivante dall'utilizzo di questa colonna è la possibilità di applicare gradienti di capacità, piuttosto del classico gradiente di concentrazione, consentendo pertanto di modulare la capacità di scambio della colonna in funzione della diversa affinità del criptando verso il catione dell'eluente, consentendo la separazione di classi di anioni con differenti caratteristiche chimico-fisiche, in tempi relativamente bassi.



**Fig. 1** -  $t_R$  vs  $C_{Na}$  per gli alogenuri ed  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NO}_2^-$



**Fig. 2** -  $t_R$  vs  $C_{Li}$  per lo ione  $\text{ClO}_4^-$

### Bibliografia

1. Dionex Co., *Guide to Applications* (product training manual), Sunnyvale, CA, (2003).
2. A.F. Kapustinskii, *Quart. Rev. Chem. Soc.*, 10, 283-294 (1956).

## DETERMINAZIONE DELL'ACIDO OROTICO IN MATRICI REALI MEDIANTE CROMATOGRAFIA IONICA E RIVELAZIONE AMPEROMETRICA PULSATA

*Donatella Nardiello e Tommaso R.I. Cataldi*

*Dipartimento di Chimica, Università degli Studi della Basilicata,  
Via N. Sauro, 85 - 85100 Potenza ([cataldi@unibas.it](mailto:cataldi@unibas.it))*

Noto anche, secondo la nomenclatura IUPAC, come 6-carbossi-uracile, l'acido orotico (AO) è un derivato pirimidinico, precursore fondamentale dell'uracile e della citosina nella biosintesi del DNA e RNA [1]. La sua determinazione nei fluidi biologici (urine e plasma), rappresenta un valido mezzo per la diagnosi di molte malattie congenite quali l'oroticoaciduria, o disordini di carattere metabolico di vario tipo [2,3]. L'acido orotico è naturalmente presente nel latte, rientrando fra le sostanze azotate non proteiche, il cui contenuto è soggetto a variazioni per effetto di molteplici fattori, come quelli di natura genetica (specie, razza degli animali lattiferi) ed ambientale (alimentazione, clima, tipo di allevamento) [4]. Considerata l'importanza dell'AO in campo medico, chimico e nutrizionale, varie sono le procedure analitiche proposte per la sua determinazione in matrici reali. Oltre al metodo microcalorimetrico [5] che pur essendo abbastanza selettivo soffre di bassa sensibilità, sono stati utilizzati vari metodi di separazione cromatografica ed elettroforetica, seguiti generalmente da rivelazione UV a 280 nm [6-9].

In questa comunicazione viene descritto un nuovo metodo analitico per la determinazione dell'acido orotico in campioni reali basato sulla cromatografia a scambio anionico e la rivelazione amperometrica pulsata su elettrodo di lavoro in oro. Le condizioni operative prescelte hanno previsto l'uso di una fase mobile alcalina, NaOH 100 mM con aggiunta di NaNO<sub>3</sub> 40 mM, in modo da realizzare una sensibile riduzione dei tempi di analisi, con una durata massima di 30 minuti per ogni corsa cromatografica. L'ambiente basico favorisce la ionizzazione dell'AO e migliora la rivelazione all'elettrodo di oro. A causa della scarsa ossidabilità elettrochimica dell'acido orotico è stato necessario definire ed ottimizzare una forma d'onda del potenziale a quattro impulsi che prevede una fase di attivazione della superficie elettrodica. L'applicazione di tale forma d'onda ha permesso di ottenere buoni risultati in termini di sensibilità con un limite di rivelabilità di 0.1 µM (S/N = 3) corrispondente a 160 pg assoluti di AO. Una volta definite le migliori condizioni sperimentali di separazione e rivelazione, sono stati analizzati diversi tipi di latte al fine di valutare l'influenza della specie, del trattamento termico e del processo di scrematura sul contenuto di AO.

### Riferimenti bibliografici

1. L. Stayer, *Biochemistry*, W.H. Freeman (ed), New York 1988, pp. 607-608.
2. E. Jellum, H. Dollekamp, A. Brunsvig, R. Gislefoss *J. Chromatogr. B* 689 (1997) 155.
3. J. Ševčík, T. Adam, V. Sázel *Clin. Chim. Acta* 259 (1997) 73.
4. P. Resmini, L. Pellegrino *It. J. Food Sci.* 3 (1990) 173.
5. G. Anastasi, M. L. Antonelli, A. Biondi, G. Vinci *Talanta* 52 (2000) 947.
6. A. Fioravanti, M. Flaviani, C. Gambelunghe, A. Micheletti, M. Sposito, S. Rufini *J. Chromatogr. B* 703 (1997) 263.
7. I.M.P.L.V.O. Ferreira, A.M.P. Gomes, M.A. Ferreira *Carbohydr. Polym.* 37 (1998) 225.
8. C. Salerno, P. D'Eufemia, M. Celli, R. Finocchiaro, C. Crifò, O. Giardini *J. Chromatogr. B* 734 (1999) 175.
9. A. Procházková, L. Křivánková, P. Boček *J. Chromatogr. A* 838 (1999) 213.

**ANALISI DI DISTRIBUZIONE DIMENSIONALE DI LIEVITI PER USO  
VINICOLO MEDIANTE FRAZIONAMENTO IN CAMPO DI FLUSSO-FLUSSO  
CON RIVELAZIONE TURBIDIMETRICA A LUNGHEZZA D'ONDA MULTIPLA**

*A. Zattoni,<sup>1\*</sup> R. Sanz,<sup>2</sup> D. Melucci,<sup>1</sup> L. Puignou,<sup>2</sup> M. T. Galceran<sup>2</sup>, P. Reschiglian<sup>1</sup>*

<sup>1</sup> *Dipartimento di Chimica “G. Ciamician”, Università di Bologna.*

<sup>2</sup> *Dipartimento di Chimica Analitica, Università di Barcellona (Spagna).*

\* *andrea.zattoni@unibo.it*

I lieviti sono microrganismi estesamente impiegati in numerosi settori dell'industria alimentare, fra cui la produzione di prodotti da forno e di bevande fermentate quali il vino e la birra. Lo sviluppo di nuovi metodi analitici per il controllo di qualità e la caratterizzazione dei lieviti è quindi oggetto di crescente interesse. Le proprietà biofisiche delle cellule di lievito, fra cui la loro dimensione, sono correlate alla capacità del lievito di produrre, durante il processo di fermentazione, metaboliti primari e secondari che determinano le proprietà organolettiche del prodotto finale.

In precedenti lavori abbiamo proposto la tecnica di frazionamento in campo gravitazionale-flusso (GrFFF) per la caratterizzazione di lieviti per uso vinicolo [1]. La GrFFF con rivelazione turbidimetrica UV/vis si è dimostrata in grado di ottenere la caratterizzazione per *fingerprint* di numerose varietà [2]. Tuttavia, accoppiando la GrFFF con il frazionamento in campo di flusso-flusso (FIFFF), abbiamo recentemente dimostrato che la ritenzione delle cellule di lievito in GrFFF non dipende solo dalle loro dimensioni, ma anche da una serie di caratteristiche fisiche fra cui la loro forma e la densità [3]. Tale complessa dipendenza ha finora impedito l'applicazione di metodi per l'analisi quantitativa in FFF con rivelazione UV/vis [4]. L'informazione quantitativa è tuttavia importante per l'applicabilità della FFF alla caratterizzazione di cellule, sia per scopi analitici che micro-preparativi. Per esempio, la valutazione accurata del recupero va considerata un requisito fondamentale per l'applicazione della FFF a campioni biologici.

In questo lavoro presentiamo un metodo per la caratterizzazione dimensionale quantitativa di varietà commerciali di lievito per uso vinicolo mediante FIFFF con rivelazione turbidimetrica a lunghezza d'onda multipla. L'impiego di uno spettrofotometro a serie di diodi consente di applicare il metodo originale, da noi recentemente sviluppato per l'analisi quantitativa di campioni dispersi frazionati mediante tecniche a flusso [5]. La scelta della FIFFF è dovuta al fatto che, al contrario della GrFFF, per questa sottotecnica la ritenzione è indipendente dalla densità degli analiti. La conversione del tempo di ritenzione in scala di dimensioni delle cellule, necessaria per l'applicazione del metodo quantitativo, si ottiene quindi per calibrazione con standard di dimensioni note, la cui forma e densità non coincidono con quelle del lievito. I risultati ottenuti su sei varietà commerciali di lievito vengono confrontati con i dati ottenuti mediante un metodo di riferimento per l'analisi dimensionale di cellule.

[1] R. Sanz, L. Puignou, P. Reschiglian, M.T. Galceran, J. Chromatogr. A 919 (2001) 339.

[2] R. Sanz, B. Torsello, L. Puignou, P. Reschiglian, M.T. Galceran, J. Chromatogr. A 966 (2002) 135.

[3] R. Sanz, L. Puignou, M.T. Galceran, P. Reschiglian, A. Zattoni, D. Melucci Anal. Bioanal. Chem. (2004) *in stampa*.

[4] P. Reschiglian, A. Zattoni, D. Melucci, G. Torsi Rev. Anal. Chem. 20 (2001) 239.

[5] A. Zattoni, E. Loli Piccolomini, G. Torsi, P. Reschiglian, Anal. Chem. 75 (2003) 6469.

## PURIFICAZIONE E SEPARAZIONE DIMENSIONALE DI NANOTUBI DI CARBONIO MEDIANTE FRAZIONAMENTO IN CAMPO DI FLUSSO-FLUSSO

*Andrea Zattoni,<sup>1\*</sup> Sonia Casolari,<sup>1</sup> Pierluigi Reschiglian,<sup>1</sup> Maurizio Prato,<sup>2</sup> Enzo Menna<sup>3</sup>*

<sup>1</sup> *Dipartimento di Chimica “G. Ciamician”, Università di Bologna.*

<sup>2</sup> *Dipartimento di Scienze Farmaceutiche, Università di Trieste.*

<sup>3</sup> *Dipartimento di Chimica Organica, Università di Padova.*

\* *andrea.zattoni@unibo.it*

I nanotubi di carbonio (*carbon nanotubes*, CNT) sono molecole cilindriche di lunghezza fino ad alcuni micrometri. I nanotubi a parete singola (*single wall nanotubes*, SWNT) sono costituiti di un singolo strato a struttura grafica di diametro variabile tra 0.4 a 3 nm, mentre i nanotubi a parete multipla (MWNT) comprendono un fascio di cilindri concentrici con diametri che vanno da 1.4 a 100 nm. Grazie alle loro peculiari proprietà elettroniche, meccaniche e strutturali, i CNT presentano un enorme potenziale applicativo nella scienza dei materiali. L'impiego dei CNT è stato proposto in diversi campi, dalla nanoelettronica allo sviluppo di materiali compositi fino alla chimica clinica [1]. Tutti gli approcci alla produzione di CNT conducono tuttavia a materiali che contengono, come principali impurezze, carbonio in forma amorfa e particelle metalliche. Poiché la scarsa purezza e l'elevata polidispersità dimensionale costituiscono alcuni tra i maggiori ostacoli al successo di nuove applicazioni dei CNT, per la loro purificazione e riduzione della dispersione dimensionale sono stati recentemente proposti numerosi metodi. È stato peraltro dimostrato che la funzionalizzazione organica può fornire ai CNT proprietà tipiche delle specie molecolari, quali la solubilità in vari solventi fra cui le soluzioni acquose [2,3]. La funzionalizzazione potrebbe quindi aumentare la compatibilità dei CNT con altri materiali, e facilitarne le procedure di purificazione e riduzione della dispersione dimensionale.

Il frazionamento in campo di flusso-flusso (FIFFF), la più versatile fra le tecniche FFF, è in grado di frazionare macromolecole e colloidali in base al loro coefficiente di diffusione. Liu *et al.* hanno per la prima volta dimostrato la possibilità di frazionare in base alla lunghezza SWNT accorciati per ossidazione [4]. Più recentemente, Chen *et al.* hanno applicato la FIFFF al frazionamento di MWNT purificati [5]. In questo lavoro, proponiamo la FIFFF per la purificazione e il frazionamento dimensionale di CNT funzionalizzati. La FIFFF con programmazione di campo e di flusso si dimostra in grado di purificare CNT funzionalizzati idrosolubili dalle componenti metalliche ed amorphe contenute nel grezzo di reazione. La caratterizzazione delle frazioni raccolte mediante microscopia elettronica in trasmissione mostra la presenza di popolazioni di CNT di diversa lunghezza, dimostrando la capacità della FIFFF di frazionare, con elevata selettività dimensionale, campioni di CNT altamente polidispersi in lunghezza (da poche centinaia di nm fino ad oltre 10 μm).

[1] M. Dresselhaus, G. Dresselhaus, Ph. Avouris (Eds.) *Carbon Nanotubes: Synthesis, Properties and Applications*, Springer, Berlin, Germany, 2001.

[2] D. Tasis, N. Tagmatarchis, V. Georgakilas, M. Prato, *Chem. Eur. J.* 9 (2003) 4000.

[3] E. Menna, F. Della Negra, M. Dalla Fontana, M. Meneghetti, *Phys. Rev. B* 68 (2003) 193412.

[4] J. Liu, A.G. Rinzler, H. Dai, J.H. Hafner, R.K. Bradley, P. J. Boul, A. Lu, T. Iverson, K. Shelimov, C.B. Huffman, F. Rodriguez-Macias, Y.-S. Shon, T.R. Lee, D.T. Colbert, R.E. Smalley, *Science* 280 (1998) 1253.

[5] B. Chen, J.P. Selegue, *Anal. Chem.* 74 (2002) 4774.

**MONITORAGGIO DELLA FORMAZIONE DI NANOPARTICELLE NELLA  
REAZIONE DI COPOLIMERIZZAZIONE DEL SOLFOPROPILMETACRILATO  
(SPMA) E METILMETACRILATO (MMA) MEDIANTE FRAZIONAMENTO IN  
FLUSSO-CAMPO CON CAMPO IN FLUSSO (FLFFF).**

*Maria-Anna Benincasa, Giampaolo Cartoni, Valeria Mazzoni*

*Dip. di Chimica. Università di Roma "La Sapienza". Ple A. Moro, 5. 00185 Roma*

*E-mail: mariaanna.benincasa@uniroma1.it*

L'affascinante mondo delle applicazioni delle nanoparticelle, dai computers <sup>(1)</sup> molecolari agli apparati medico-diagnostici capaci di penetrare le pareti cellulari per esplicitare varie funzioni <sup>(2)</sup>, ha stimolato un crescente coinvolgimento delle tecniche analitiche nello studio di questi materiali. Per esempio, la possibilità di produrre materiali con dimensioni calibrate e proprietà chimico-fisiche predefinite che possano o meno essere confinati alla veicolazione intravascolare ha reso ormai indispensabile l'impiego delle nanoparticelle come mezzo di contrasto nelle tecniche di mappatura magnetica per la diagnosi precoce di tumori o di sclerosi epatiche. In oftalmologia <sup>(3)</sup> la bassa efficienza dei farmaci per uso topico in soluzione acquosa, dovuta alla relativa impermeabilità della cornea ed alla rapida eliminazione per il fisiologico ricambio intraoculare, è stata affrontata approntando soluzioni base che risiedano più a lungo nell'occhio o per l'aumentata viscosità oppure per l'azione di vettori farmacologici come liposomi o nanoparticelle. Delle varie innovazioni introdotte a questo scopo la somministrazione del farmaco veicolato per adsorbimento o per incapsulamento in nanoparticelle copolimeriche è risultata terapeuticamente più efficace e praticamente meno fastidiosa per il paziente.

Tra i vari approcci alla sintesi controllata di strutture molecolari su scala nanoscopica l'utilizzo dei copolimeri a blocchi si è dimostrata particolarmente utile poiché l'inserimento di blocchi con proprietà diverse crea le condizioni per la formazione dell'ulteriore struttura supramolecolare e la separazione di fase. Purtroppo i polimeri più frequentemente utilizzati per la produzione di nanoparticelle (polialchilcianoacrilati o polialchilmetacrilati) forniscono particolato con bassa idrofilia superficiale e quindi relativamente poco idonei all'impiego come vettori di farmaci i quali sono chiamati ad espletare la loro azione principalmente in ambiente acquoso. La necessità di una buona idrofilia associata alla stabilità chimico-fisica ha stimolato lo sviluppo di nanoparticelle da copolimeri di metilmetacrilato (MMA) e solfopropilmetacrilato (SPMA) che tramite i gruppi solfonici fortemente acidi garantisce una carica superficiale negativa in un ampio intervallo di pH. L'impiego mirato delle nanoparticelle richiede una completa caratterizzazione dei prodotti di copolimerizzazione che avvenendo per via radicalica tende a portare a miscele di composti con alta dispersione sia dimensionale che composizionale. Lo studio di questi sistemi con tecniche analitiche in "batch", pur altamente accurate, fornisce comunque dati mediati in base all'abbondanza relativa di specie con caratteristiche diverse. D'altra parte, l'applicazione della tecnica separativa classicamente utilizzata per l'analisi dei materiali polimerici, la GPC, a sistemi in fase acquosa presenta ancora limitazioni in alcuni casi insormontabili <sup>(4)</sup>.

Nel frazionamento in flusso-campo con campo in flusso (Flow FFF) <sup>(5, 6)</sup> l'assenza di una fase stazionaria, il meccanismo separativo basato sul confinamento selettivo dei soluti in un flusso laminare con gradiente di velocità, e la versatilità e flessibilità nella scelta dei parametri sperimentali creano condizioni particolarmente adatte all'applicazione di questa tecnica alla caratterizzazione di sistemi complessi.

Due campioni di poli(SPMA-b-MMA), ottenuti seguendo protocolli di sintesi diversi, sono stati analizzati per mezzo del FIFFF in acqua. Il diverso risultato fornito dal processo di copolimerizzazione in due fasi, eseguito con un primo stadio di precipitazione e isolamento



per liofilizzazione del PSPMA ed uno successivo di costruzione del copolimero nella soluzione di poli(SPMA)<sub>50</sub> ridisciolti, rispetto alla copolimerizzazione in singola fase del poli(MMA)<sub>25</sub> con il blocco di poli(SPMA)<sub>50</sub> ottenuto previamente, e senza l'isolamento preliminare di quest'ultimo è evidenziato in modo inequivocabile dai profili di eluizione ottenuti in FIFFF. In particolare il profilo simmetrico del campione ottenuto dalla sintesi in due fasi e la distribuzione dimensionale incentrata in modo riproducibile intorno a 23 nm e sostanzialmente invariante con la forza ionica rivelano che questo protocollo di sintesi fornisce un prodotto a bassa dispersione con il comportamento caratteristico del particolato nanoscopico. Al contrario i profili di eluizione molto ampi forniti dal campione sintetizzato in un'unica fase, poco riproducibili anche a forze ioniche crescenti sono più caratteristici di miscele di specie diverse probabilmente tendenti a formare aggregati dalla stechiometria non ben definita <sup>(7)</sup>.

### Riferimenti Bibliografici

1. Y. Xia, A. J. Rogers, E. K. Paul, G. M. Whitesides, *Chem. Rev.*, **1999**, 99, 1823
2. S. I. Stupp, V. LeBonheur, K. Walker, L. S. Li, K. E. Huggins, M. Keser, A. Amstutz, *Science*, **1997**, 276, 384
3. K. Langer, E. Mutschler, G. Lambrecht, D. Mayer, G. Troschau, F. Stieneker, J. Kreuter, *Int. J. Pharm.*, **1997**, 158, 219
4. K. Langer, C. Marburger, A. Berthold, J. Kreuter, F. Stieneker, *Int. J. Pharm.*, **1996**, 137, 67
5. J. C. Giddings, *Unified Separation Science*, Wiley, NY, **1991**
6. S. K. R. Williams and M.-A. Benincasa, in *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, R. A. Meyers ed., Wiley, Chichester, **2000**, 7582
7. M.-A. Benincasa, G. Cartoni, N. Imperia, *J. Sep. Sci.*, **2002**, 25, 405

## SELEZIONE CELLULARE CON TECNICHE DI FRAZIONAMENTO IN FLUSSO-CAMPO (FFF)

*Maria-Anna Benincasa*<sup>1</sup>, *Lee R. Moore*<sup>2</sup>, *P. Stephen Williams*<sup>2</sup>, *Earl Poptic*<sup>3</sup>,  
*Francesca Carpino*<sup>2</sup>, *Maciej Zborowski*<sup>2</sup>

1. *Dip di Chimica, Universita' di Roma "La Sapienza". Ple A. Moro, 5. 00185 Roma. IT. E-mail: mariaanna.benincasa@uniroma1.it*
2. *Dept. of Biomedical Engineering. The Cleveland Clinic Foundation. 9500 Euclid Ave. Cleveland, OH 44195*
3. *Hybridoma Core. The Cleveland Clinic Foundation. 9500 Euclid Ave. Cleveland, OH 44195*

Benché alcune tecniche di selezione cellulare fossero note da tempo, la richiesta di linee cellulari pure per applicazioni in campo biomedico e biotecnologico ha suscitato un rinnovato interesse in questo settore.

Per esempio, la produzione di ibridomi da cellule di cancro, di cui mantengono la sorprendente vitalità e cellule sane, da cui ereditano l'attività biologica <sup>(1)</sup> ha rivoluzionato la produzione degli anticorpi permettendo l'ottenimento di grandi quantità di anticorpi monoclonali <sup>(2)</sup> virtualmente da un'unica cellula ibrida grazie alla proprietà degli ibridomi di riprodursi indefinitamente. Benché lo scopo dell'ibridizzazione cellulare sia l'ottenimento di ibridomi binucleari, l'impossibilità di controllare completamente il processo di fusione cellulare porta generalmente a miscele di cellule multinucleari che contengono solo una piccola frazione di cellule binucleari alcune delle quali biologicamente inattive. Per alcune innovative applicazioni biomediche ancora in fase sperimentale però sono richiesti solo gli ibridomi di dimensioni minori. In un altro campo applicativo, la rigenerazione tissutale in vitro richiede popolazioni di cellule staminali ad alta purezza morfologica e funzionale.

La maggior parte delle tecniche di selezione cellulare disponibili, benché in alcuni casi altamente selettive e con buone rese risultano molto costose e complesse nell'operatività e nel mantenimento.

Le tecniche di frazionamento in flusso-campo (FFF) hanno dimostrato molto presto la loro applicabilità alla selezione cellulare sia in scala analitica con il frazionamento in flusso-campo con campo in flusso (FIFFF) <sup>(3)</sup> che preparativa con il sistema SPLITT <sup>(4)</sup>. Quest'ultimo risulta economicamente conveniente e particolarmente adatto al fragile materiale biologico quando opera con il campo gravitazionale (G-SPLITT) <sup>(5)</sup>. Con il sistema G-SPLITT è possibile ottenere la selezione di diversi milioni di cellule con buona selettività e basso stress idrodinamico sia operando su miscele di cellule sane e cancerose che con campioni di ibridomi. Inoltre, operando in condizioni sperimentali ottimali grazie a misure preliminari di mobilità gravitazionale ottenute per mezzo della CTV (Cell Tracking Velocimetry prodotto da una collaborazione della Cleveland Clinic Foundation con l'Ohio State University, Columbus, OH) <sup>(6)</sup> è possibile contenere il tempo di frazionamento entro 10 minuti circa.

### Bibliografia

1. G. Kohler, C. Milstein, *Nature*, **1975**, 256, 495
2. E. Harlow, D. Lane, *Antibodies. A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY **1988**

3. B. N. Barman, E. R. Ashwood, and J. C. Giddings, *Anal. Biochem.*, **1993**, 35, 212
3. S. R. Springston, M. N. Myers, J. C. Giddings, *Anal. Chem.*, **1987**, 344, 59
4. C. Giddings, *Sep. Sci. Technol.*, **1992**, 1489, 27
5. M.-A. Benincasa, L. R. Moore, P. S. Williams, E. Poptic, F. Carpino, M. Zborowski, In preparazione.
6. L. R. Moore, M. Zborowski, M. Nakamura, K. McCloskey, S. Gura, M. Zuberi, S. Margel, J. J. Chalmers, *J. Biochem. Biophys. Methods*, **2000**, 44, 115

## LE CELLE SPLITT NELLA CARATTERIZZAZIONE DI SEDIMENTI DELLA SACCA DI GORO

G. Blo\*, C. Conato, C. Contado, F. Fagioli e F. Dondi

Dipartimento di Chimica, Università di Ferrara

\* e-mail: gbc@unife.it

Lo studio dei sedimenti di sistemi acquatici è di interesse per una valutazione ambientale completa del sistema idrico stesso, in quanto tali matrici se da un lato costituiscono un archivio storico dei fenomeni di inquinamento, dall'altro giocano un ruolo rilevante all'interfase con l'acqua, partecipando a tutti quei processi di scambio che sono determinanti per il trasferimento dei metalli tossici in tracce lungo la catena alimentare.

Gli studi di caratterizzazione dimensionale e composizionale di queste matrici possono essere implementati con l'applicazione di tecniche di frazionamento innovative quali le celle SPLITT (Split Flow Thin)<sup>1</sup>. Questi sistemi di frazionamento binario in flusso continuo, sono molto interessanti, se accoppiati con tecniche spettroscopiche identificative, per la caratterizzazione di questi campioni ambientali di notevole complessità<sup>2</sup>.

Il presente lavoro riporta alcuni risultati dello studio di caratterizzazione di sedimenti della Sacca di Goro, la baia più meridionale del Delta del Po, mediante un approccio metodologico integrato SPLITT/ICP-AES, in condizioni operative di stretto controllo quantitativo. I campioni di sedimento e le relative sub-frazioni sono sottoposti ad analisi ICP-AES (Inductive Coupled Plasma) per la determinazione di alcuni elementi compositivi e di interesse ambientale (Al, Fe, Cd, Cr, Cu, Ni, Mn, Pb and Zn) ai fini dello studio della loro distribuzione nelle frazioni dimensionali studiate.

1. C. Contado, F. Dondi, R. Beckett and J.C. Giddings, *Analytica Chimica Acta*, 345 (1997) 99.
2. G. Blo, C. Contado, F. Fagioli, F. Dondi, *Analyst*, 125 (2000) 1335

**COMUNICAZIONI POSTER**

**TECNICHE COMBinate - SPETTROMETRIA DI MASSA**

## STUDIO DELL'EFFETTO MATRICE NELLA DETERMINAZIONE DELLE VITAMINE LIPOSOLUBILI NEL SIERO MEDIANTE LC-APCI-MS/MS

R. Andreoli<sup>a,b</sup>, P. Manini<sup>a,b</sup>, D. Poli<sup>a,b</sup>, E. Bergamaschi<sup>a</sup>, A. Mutti<sup>a</sup>, W.M.A. Niessen<sup>c</sup>

<sup>a</sup>Dipartimento di Clinica Medica Nefrologia e Scienze della Prevenzione dell'Università di Parma, via Gramsci 14, 43100 Parma e <sup>b</sup>Centro Studi e Ricerche I.S.P.E.S.L presso l'Università di Parma

<sup>c</sup>hyphen MassSpec Consultancy, De Wetstraat 8, 2332 XT, Leiden, The Netherlands

La cromatografia liquida accoppiata alla spettrometria di massa *tandem* (LC-MS/MS), per le sue caratteristiche di sensibilità e specificità, è considerata tecnica di riferimento per la determinazione quantitativa di sostanze endogene ed esogene nei fluidi biologici. Recenti studi nel campo della farmacocinetica hanno però evidenziato come anche questa tecnica non sia esente da effetti di soppressione e/o intensificazione del segnale, dovuti alla matrice. È stato dimostrato che tali effetti, dipendenti sia dalla matrice che dall'analita, possono variare anche tra lotti diversi della stessa matrice ottenuti dal medesimo soggetto, con conseguenze ben prevedibili sull'accuratezza e la precisione delle determinazioni analitiche. Pertanto, lo studio dell'effetto matrice dovrebbe essere considerato parte integrante nella validazione dei metodi in LC-MS, benchè specifici protocolli sperimentali non siano ancora stati definiti (1).

Scopo del presente lavoro è stato quello di validare un nuovo metodo analitico per la determinazione delle concentrazioni sieriche di alcune vitamine liposolubili con potere antiossidante (retinolo,  $\alpha$ -tocoferolo e  $\beta$ -carotene) mediante LC-MS/MS. Non disponendo di standard interni marcati con isotopi stabili, particolare attenzione è stata dedicata al trattamento del campione ed all'effetto matrice (2). A tal proposito, per la deproteinizzazione del siero e l'estrazione degli analiti, sono stati utilizzati cinque solventi (o miscele) di diversa polarità, ed i risultati ottenuti sono stati confrontati in termini di: (i) efficienza di ionizzazione degli analiti in assenza di matrice; (ii) effetto della matrice, valutato mediante l'aggiunta di soluzioni standard di concentrazione crescente ai campioni denaturati; (iii) recupero degli analiti, valutato mediante l'aggiunta delle stesse soluzioni ai campioni prima della denaturazione. Dai risultati di questo studio è emerso come l'impiego di una miscela 1:1 (v/v) di etanolo ed acetato di etile (240  $\mu$ L aggiunti a 60  $\mu$ L di siero) consenta di ottenere, in un unico passaggio, sia la precipitazione delle proteine che la solubilizzazione di tutti gli analiti, garantendo così recuperi elevati (>95%) ed una soddisfacente riproducibilità (CV<10%), riducendo al minimo l'effetto matrice. L'utilizzo degli esteri del retinolo e del tocoferolo come standard interni non ha prodotto alcun miglioramento sulla riproducibilità della metodica, a causa del diverso effetto matrice riscontrato sugli analiti e sui loro esteri.

Le vitamine antiossidanti sono state separate in cromatografia a fase inversa, utilizzando una colonna C8 ed una fase mobile composta di metanolo/diclorometano (95/5, v/v). La ionizzazione degli analiti è stata ottenuta mediante la tecnica *atmospheric pressure chemical ionization* (APCI). Operando in ionizzazione positiva e rivelando le transizioni caratteristiche degli analiti in modalità *selected-reaction monitoring* (SRM), i limiti di rivelazione di retinolo,  $\alpha$ -tocoferolo e  $\beta$ -carotene sono risultati essere, rispettivamente, 0.7, 1.2 e 1.9 nM; i corrispondenti limiti di quantificazione, invece, 1.7, 2.3 e 4.1 nM. L'elevata sensibilità del metodo ha permesso l'iniezione diretta dei campioni deproteinizzati, riducendo così al minimo la manipolazione del campione. Utilizzando questo metodo sono stati analizzati oltre 1000 campioni di siero raccolti nell'ambito di un progetto Europeo (QLK4-CT-1999-01308).

(1) B.K. Matuszewski, M.L. Costanzer, C.M. Chavez-Eng, *Anal. Chem.* 75 (2003) 3019.

(2) R. Andreoli, P. Manini, D. Poli, E. Bergamaschi, A. Mutti, W.M.A. Niessen, *Anal. Bioanal. Chem.*, 378 (2004) 987.

## A NEW METHOD FOR URINARY 8-HYDROXY-2'--DEOXYGUANOSINE QUANTIFICATION USING SPE AND MICRO-HPLC-ESI-MS/MS ANALYSIS

Laura Sabatini<sup>1</sup>, Anna Barbieri<sup>2</sup>, Marco Tosi<sup>1</sup>, Aldo Roda<sup>3</sup> and Francesco Saverio Violante<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Occupational Medicine Unit, University of Bologna, S. Orsola-Malpighi Hospital, via Palagi 9, 40138 Bologna, Italy

<sup>2</sup> Safety, Hygiene and Occupational Medicine Service, University of Bologna, via Palagi 9, 40138 Bologna, Italy

<sup>3</sup> Department of Pharmaceutical Sciences, University of Bologna, via Belmeloro 6, 40126 Bologna, Italy

### Introduction

8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8OHdG), one of the major oxidative DNA lesions induced by radical agents,<sup>1,2</sup> is commonly used as a biomarker for oxidative stress, nowadays preferably in urine<sup>3</sup>. Urinary 8OHdG has been analyzed by several techniques but recently HPLC-ESI-MS/MS has emerged as the method of choice for his specificity and sensitivity.<sup>3-6</sup> A further step could be micro-HPLC-ESI-MS/MS, allowing more sensitive and accurate analysis of 8OHdG with very small sample volumes. We developed a specific and accurate new method for 8OHdG determination in urine, characterized by a very low limit of detection (LOD), using micro-HPLC-ESI-MS/MS following solid phase extraction (SPE) and external calibration.

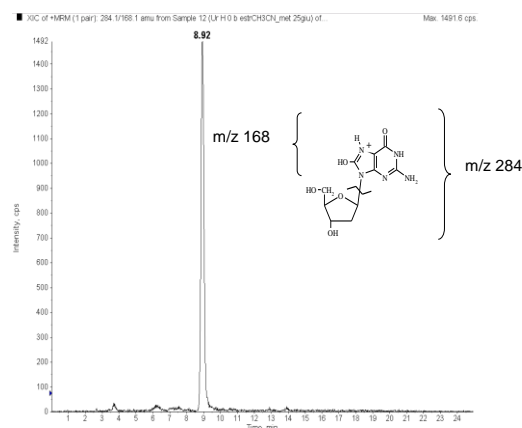
### Materials and methods

Urine samples were mixed and then centrifuged at 1500 x g for 10 min. Clean-up procedure of 500 µL was optimized by comparing three different types of reversed phase SPE cartridges: Isolute<sup>®</sup> C<sub>18</sub>, Isolute<sup>®</sup> 101 and Isolute<sup>®</sup> Env<sup>+</sup>. The latter were selected because they guarantee the best selectivity and extraction efficiency of 8OHdG.

A volume of 0.5 µL of SPE final extract (dried and resolved with 50 µL of mobile phase) was injected into micro-HPLC system (Series 1100Agilent Technologies).

Chromatographic separation was performed at a flow rate of 10 µL min<sup>-1</sup> using 10 mM ammonium acetate (pH 4.3) and methanol with a SB C<sub>18</sub> Zorbax capillary column (0.5 x 150 mm, 5 µm). A linear gradient from 10% to 40% of methanol was run in 10 min, and 8OHdG was resolved and eluted at a retention time of 8.9 min.

MS/MS analysis was performed in positive ion mode, using an API 2000 triple-quadrupole mass spectrometer, equipped with a turboionspray source. Multiple reaction monitoring (MRM) acquisition mode was used; m/z 168 (the most intensive product ion, resulting from the parent ion [M+H]<sup>+</sup> m/z 284) was utilized as the quantifier ion (Figure 1).



**Figure 1:** MRM (m/z 284→168) chromatogram of a urine sample spiked with 10 ng mL<sup>-1</sup> of 8OHdG, processed and analyzed by micro-HPLC-ESI-MS/MS method (0.5 µL injected) and molecular structure.

## Results

Analytical characteristics of the SPE micro-HPLC-ESI-MS/MS method for urinary 8OHdG quantification are summarized in Table 1. A linear calibration curve ( $R^2 > 0.999$ ) was obtained in urine between 0 and 10 ng mL<sup>-1</sup> of 8OHdG (each analysis was conducted in triplicate). The absolute limit of detection (LOD), calculated as 3 times the signal/noise ratio of the 8OHdG aqueous standard solution, was 0.35 fmol. In the urine sample, a LOD of 0.2 ng mL<sup>-1</sup> was determined by analyzing the standard error of the intercept (Sb) of the urinary calibration curve ( $y = mx + b$ ), and defining the LOD as 2 times Sb/m. The accuracy and the repeatability of the method were estimated using 12 different urine samples from 6 subjects, which were spiked with 8OHdG at 3 concentration levels (0.4, 1.0 and 10.0 ng mL<sup>-1</sup>). Despite the use of external calibration, the method offers high levels of precision and accuracy: repeatability of the total procedure, expressed as the mean relative standard deviation (RSD), was found to be <10% and accuracy was on average 90.2 % (Table 1). The recovery of the total procedure, calculated using standard solution at three different concentrations (1, 5 and 10 ng mL<sup>-1</sup>) extracted in triplicate by SPE in the same way as the samples, was 83.2 % ± 5.3. The optimized method was applied to determination of 8OHdG in 18 urinary samples derived from 3 healthy volunteers: 8OHdG urinary excretion ranged from 3.0 to 7.9 µg/day and a relatively large intra-individual variation was found.

The method, characterized by high-throughput (50 samples/day), is suitable for routine monitoring exposure to DNA damaging factors in a large number of subjects, even with very small volumes of urine. It could be automated for screening applications, utilizing 96-well microtiter plates instead of SPE columns

**Table 1:** Analytical characteristics of the SPE micro-HPLC-ESI-MS/MS method

<b>Calibration curve equation</b>	$y = mx + b$ $m = 1333.4$ $b = 79.0$ $R^2 = 0.999$
<b>LOD</b>	0.2 ng mL <sup>-1</sup>
<b>Intra-assay RSD (%)</b>	8.7 (6.5–12.5)
<b>Inter-assay RSD (%)</b>	9.9 (7.1–13.3)
<b>Accuracy a (%)</b>	90.2 (84.9–94.9)
<b>Recovery b</b>	83.2 ± 5.3

## References

1. Breen AP, Murphy JA. Reactions of oxyl radicals with DNA. *Free Radic. Biol. Med.* 1995; **18**: 1033.
2. Dizdaroglu M. Oxidative damage to DNA in mammalian chromatin. *Mutat. Res.* 1992; **275**: 331.
3. Ravanat JL, Duret B, Guiller A, Douki T, Cadet J. Isotope dilution high-performance liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry assay for the measurement of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine in biological samples. *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* 1998; **715**: 349.
4. Serrano J, Palmeira CM, Wallace KB, Kuehl DW. Determination of 8-hydroxydeoxyguanosine in biological tissue by liquid chromatography/electrospray ionization-mass spectrometry/mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 1996; **10**: 1789.
5. Reddy DM, Rieger RA, Torres MC, Iden CR. Analysis of synthetic oligodeoxynucleotides containing modified components by electrospray ionization mass spectrometry. *Anal. Biochem.* 1994; **220**: 200.
6. Renner T, Fechner T, Scherer G. Fast quantification of the urinary marker of oxidative stress 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine using solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography with triple-stage quadrupole mass detection. *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* 2000; **738**: 311.



**TRATTAMENTI ANTIBIOTICI NON AUTORIZZATI IN APICOLTURA:  
SVILUPPO E VALIDAZIONE DI UN METODO PER LA QUANTIFICAZIONE E LA  
RICONFERMA DI RESIDUI DI TILOSINA NEL MIELE MEDIANTE HPLC-MS/MS**

C. Benetti<sup>1</sup>, G. Biancotto<sup>1</sup>, R. Angeletti<sup>1</sup>, N. Dainese<sup>1</sup>, R. Piro<sup>2</sup>, F. Mutinelli<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, viale dell'Università 10, 35020 Legnaro (PD), Italia; email: gbiancotto@izsvenezie.it

<sup>2</sup>Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna, via Bianchi 7, 25124 Brescia, Italia

La peste americana è una malattia batterica largamente diffusa e generalmente considerata una delle più gravi malattie delle api, poiché causa importanti perdite economiche agli apicoltori. L'agente che causa questa malattia è un batterio sporigeno Gram positivo, il *Paenibacillus larvae* subsp. *Larvae*.

Il provvedimento generalmente indicato, in armonia con le prescrizioni dettate dal Regolamento di polizia veterinaria (DPR 320/54), prevede, in caso di focolaio, la distruzione mediante incenerimento delle colonie colpite dall'infezione allo scopo di limitarne la diffusione.

A causa della severità nell'applicazione delle vigenti norme di polizia veterinaria, molti apicoltori non denunciano la presenza della malattia preferendo affidarsi, senza alcun controllo veterinario, all'utilizzo di antibiotici, nell'errato convincimento di prevenire lo sviluppo di focolai della malattia stessa.

Ne deriva quindi un problema di notevole importanza relativo alla presenza di residui nel miele.

Da qui la necessità di disporre di metodiche affidabili per la ricerca di residui di antibiotici nel miele allo scopo di garantire al consumatore un prodotto salubre.

Gli antibiotici maggiormente utilizzati nel controllo della peste americana sono stati il sulfatiazolo (fin dal 1946) e più tardi la tetraciclina e l'ossitetraciclina (fin dal 1950); non sorprende quindi che dopo più di cinquant'anni di utilizzo l'organismo abbia sviluppato una resistenza a questi antibiotici.

Recenti indagini hanno evidenziato che la tilosina, antibiotico appartenente alla famiglia dei macrolidi, sembra essere sempre più usata in apicoltura in sostituzione di sulfamidici e tetracicline. Tuttavia studi comparativi di stabilità fra ossitetraciclina e tilosina in sciroppo di zucchero hanno messo in evidenza che il tempo di dimezzamento della tilosina è molto più lungo della ossitetraciclina, con la conseguenza che residui di tilosina possano persistere nei prodotti dell'alveare (soprattutto nel miele) provocando nei consumatori effetti tossici quali reazioni allergiche o fenomeni di antibiotico-resistenza.

Lo scopo di questo lavoro è stato sviluppare e validare un metodo per la determinazione di residui di tilosina nel miele mediante tecnica HPLC/MS-MS.

Il metodo prevede una semplice diluizione del campione mediante l'utilizzo di tampone TRIS, pH 10.5 e successiva purificazione colonnine SPE OASIS usando come standard interno la roxitromicina. La separazione cromatografica di tilosina e roxitromicina è stata ottenuta mediante colonna C18 (100 x 2.1 mm I.D. 5 µ) usando un gradiente di ammonio acetato e acetonitrile come fase mobile ad una velocità di flusso di 0.25 ml/min.

Il metodo è stato validato sulla base dei criteri indicati nella Decisione Europea 2002/657/CE. I parametri considerati nel corso della validazione sono stati: la linearità di risposta, la specificità, il recupero (valore medio 101.1%), la precisione (valore medio 12.1%), il limite di decisione ( $Cc\alpha$  inferiore a 3 ng/g) e la capacità di rilevazione ( $Cc\beta$  inferiore a 5 ng/g).

## IDROCARBURI ALOGENATI NELLE ACQUE DA BERE. MIGLIORAMENTI NELLA DETERMINAZIONE ANALITICA

L. Amendola, C. Cafaro, S. Insogna, L. Zoccolillo

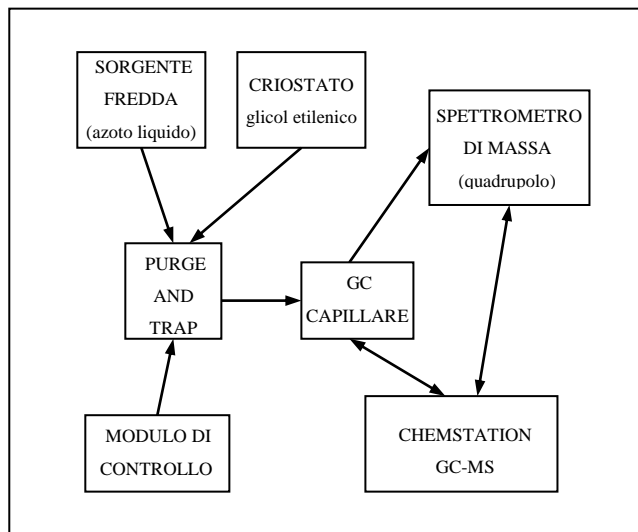
Dipartimento di Chimica, Università degli Studi di Roma “La Sapienza”,  
piazzale Aldo Moro 5, 00185 Roma. E-mail: [lelio.zoccolillo@uniroma1.it](mailto:lelio.zoccolillo@uniroma1.it)

Gli idrocarburi clorurati volatili (VCHC), in quanto contaminanti globali, sono presenti nelle acque da bere (acque minerali e acque di rete) in seguito a fall-out atmosferico. Altra importante classe di composti alogenati sono i trialometani (THM) che si formano nelle acque di rete in seguito ai trattamenti di disinfezione con sostanze cloranti.

Recentemente sono state emanate due nuove normative, che recepiscono altrettante direttive europee, concernenti la qualità delle acque da bere. La prima (Decreto Legislativo n. 31 del 02/02/01), entrata in vigore il 25 dicembre del 2003, riguarda i limiti per i vari contaminanti presenti nelle acque destinate al consumo umano. Questa legge, per la prima volta, relativamente agli idrocarburi alogenati volatili nelle acque di rete, fa una distinzione tra THM e VCHC fissando il limite per i trialometani a 30 µg/L e per tricloroetilene e il tetracloroetilene (i più rappresentativi tra gli idrocarburi clorurati volatili) a 10 µg/L. La seconda normativa (Decreto Ministeriale del 29/12/03) riguarda le acque minerali e, in relazione agli idrocarburi clorurati volatili, parla di assenza al limite di rivelabilità del metodo. Le due leggi appaiono discordanti. Per le acque di rete i valori limite sono superiori a quelli della precedente normativa e sembrano piuttosto tolleranti. Per le acque minerali invece il limite relativo ai VCHC appare restrittivo visto che molte di queste sostanze, in quanto contaminanti globali, sono sempre presenti.

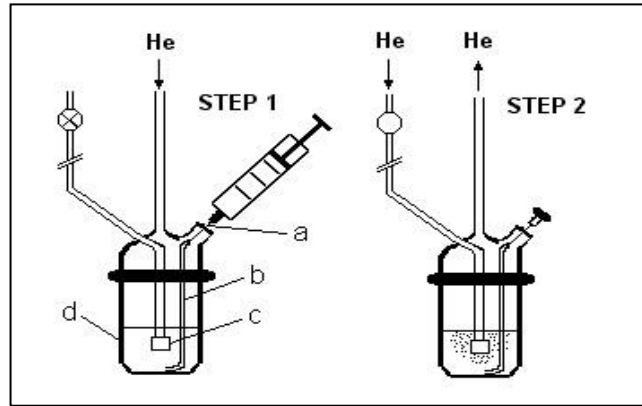
Per l'analisi di VCHC e THM nelle acque la tecnica più comune prevede una estrazione con solvente (n-pentano o n-esano) seguita da gas-cromatografia capillare con rivelatore a cattura di elettroni (LLE-GC-ECD). Questa tecnica non consente certezza nella identificazione delle sostanze e per alcune di esse è poco accurata. Se viene impiegato per l'estrazione n-esano alcune specie sono eluite dalla colonna insieme al solvente causando per esse sottostima. Se invece viene usato n-pentano, la sua alta volatilità provoca sovrastima per le sostanze meno volatili. Inoltre i due solventi non sono mai del tutto esenti dalle specie da analizzare e questo comporta problemi nella misura delle basse concentrazioni.

In questo lavoro, per l'analisi di VCHC e THM nelle acque, viene proposta e migliorata la tecnica che impiega un Purge and Trap interfacciato ad un gas cromatografo-spettrometro di massa (PTI-GC-MS) impiegato in modalità SIM (Fig. 1).



**Fig. 1:** Sistema di analisi on line (estrazione e analisi) di campioni di acqua mediante tecnica combinata Purge and Trap-GC-MS.

Questa tecnica consente l'analisi on-line del campione e rispetto alla LLE-GC-ECD offre una serie di vantaggi quali un ridotto volume di campione, l'eliminazione del solvente di estrazione e dei problemi ad esso correlati e un'alta specificità dovuta alla modalità SIM di impiego del rivelatore di massa. La PTI-GC-MS consente la misura accurata nelle acque anche di VCHC come cloroformio e metilcloroformio non misurabili mediante LLE-GC-ECD. Una modifica nella linea analitica, che permette l'introduzione e la rimozione del campione senza mai aprire il sistema (Fig. 2), ha migliorato di molto la



**Fig. 2:** Sistema di introduzione del campione di acqua nel PTI. **Step 1** caricamento del campione. **Step 2** fase di purge. a) ago fisso; b) tubicino che collega l'ago col fondo del vessel impiegato sia per l'introduzione che per la rimozione del campione; c) setto poroso; d) vessel.

riproducibilità dell'analisi eliminando possibili contaminazioni prodotte dall'aria ambiente.

## STUDIO DELLE TRASFORMAZIONI FOTOINDOTTE DI COMPOSTI AMMINOPIRIMIDINICI ALLA SUPERFICIE DEL TiO<sub>2</sub> MEDIANTE HPLC/MS

Paola Calza, Claudio Medana, Claudio Baiocchi, Ezio Pelizzetti

Dipartimento di Chimica Analitica, Università di Torino, 10125 Torino, Italy

I composti amminopirimidinici sono stati individuati come prodotti metabolici di analiti appartenenti a differenti classi, come erbicidi sulfonilici e sulfamidici. Potrebbe pertanto risultare molto utile la ricerca e l'identificazione, oltre che dei residui dei composti iniziali, anche dei loro prodotti di trasformazione, nonché la valutazione della loro tossicità e stabilità. Alcune informazioni di questo tipo possono essere ottenute adottando un processo fotocatalitico, che può simulare efficacemente le trasformazioni che avvengono in ambienti naturali [1, 2]. La fotoeccitazione del semiconduttore promuove gli elettroni dalla banda di valenza alla banda di conduzione, generando buche ad elevata capacità ossidante ( $h^+_{VB}$ ) ed elettroni ( $e^-_{CB}$ ); mentre gli elettroni reagiscono generalmente con l'ossigeno,  $h^+_{VB}$  può reagire alla superficie con gruppi idrossilici o molecole d'acqua adsorbite generando radicali  $\cdot OH$  superficiali.

Studi precedenti condotti sui composti sulfamidici [3] hanno evidenziato la formazione di composti amminopirimidinici come intermedi di degradazione, la cui stabilità fotocatalitica è risultata dipendere dalla posizione del gruppo amminico e dalla natura dei sostituenti sull'anello eteroaromatico. Si è notato che la presenza di una sub-struttura  $-N-C(NH_2)-N-$  nella molecola porta ad una scarsa conversione dell'azoto organico in azoto inorganico nei tempi di irradiazione considerati.

Nel tentativo di chiarire i possibili cammini di trasformazione percorsi da tali strutture, si sono esaminati alcuni analiti recanti il gruppo amminico in posizioni diverse (2- e 4-amminopirimidina) e differientemente sostituiti, con un gruppo metilico (2-ammino-4-metilpirimidina) o metossi (4-ammino-2,6-dimetossipirimidina). Si è monitorato la scomparsa degli amminopirimidinici in funzione del tempo di irradiazione, la formazione di composti intermedi (identificati mediante HPLC/MS) e la conversione finale di tali strutture in specie inorganiche (seguite attraverso misure di TOC ed CI).

Sia l'entità del rilascio dell'azoto che il rapporto  $[NH_4^+]/[NO_3^-]$  sono risultate essere legate alla natura dei sostituenti ed alla posizione del gruppo amminico sull'anello eteroaromatico. Quando il gruppo amminico è posizionato sul C<sup>4</sup>, il cammino di trasformazione procede principalmente attraverso la rottura dei legami C-N, con la formazione come intermedi di strutture ossigenate ed il rilascio dell'azoto organico principalmente sotto forma di ioni ammonio. In questo caso, sia la conversione stechiometrica dell'azoto in ioni inorganici che la completa mineralizzazione sono conseguite entro poche ore di irradiazione.

Al contrario, quando il gruppo amminico è collocato sul C<sup>2</sup>, si osserva sia per l'azoto che per il carbonio una mineralizzazione incompleta. Ciò è attribuibile alla conversione stechiometrica del gruppo  $N-C(NH_2)-N$  nella guanidina, un composto molto stabile per il quale la mineralizzazione è ottenuta solo a tempi di irradiazione molto lunghi (> 70 h); in quest'ultimo caso, l'azoto è rilasciato principalmente come ioni nitrato. Lo stato iniziale del carbonio (+4 nella guanidina) favorisce infatti l'attacco dei radicali  $\cdot OH$  sui gruppi amminici, inducendo così il rilascio dell'azoto principalmente come ioni nitrato.

### Riferimenti bibliografici:

- [1] S.Y. Panshin, D.S. Carter, E.R. Bayless, *Environ. Sci. Technol.*, 34 (2000) 2131
- [2] P. Calza, E. Pelizzetti, M. Brussino, C. Baiocchi, *J. Am. Soc. Mass. Spectrom.*, 12 (2001) 1286
- [3] P. Calza, C. Medana, M. Pazzi, C. Baiocchi, E. Pelizzetti, *Appl. Catal. B: Environ.*, in stampa

**SVILUPPO DI UN METODO ANALITICO GC/MS PER LA  
DETERMINAZIONE DI MOLECOLE SEGNALE COINVOLTE NELLA  
COMUNICAZIONE BATTERICA INTERCELLULARE**

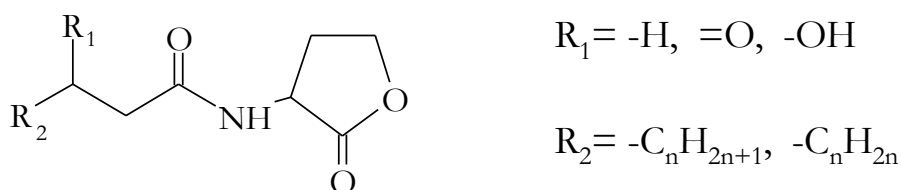
*Tommaso R. I. Cataldi<sup>a</sup>, Giuliana Bianco<sup>a</sup>, Tiziana Angelotti<sup>a</sup>, Marisa Caruso<sup>b</sup> e Patrizia Romano<sup>b</sup>*

<sup>a</sup>*Dipartimento di Chimica, Università degli Studi della Basilicata, via N. Sauro 85, Potenza;*

<sup>b</sup>*Dipartimento Biologia, Difesa e Biotecnologie Agro-Forestali, Università degli Studi della Basilicata, Campus Macchia Romana, 85100 Potenza.*

*email: cataldi@unibas.it*

Negli ultimi 10-15 anni è stato acclarato che i batteri sono in grado di comunicare fra loro mediante la sintesi di sostanze chimiche chiamati auto induttori che si accumulano all'esterno della cellula [1]. In particolare, molti batteri Gram-negativi sono in grado di verificare se sono in numero sufficiente, cioè se hanno raggiunto un *quorum*, per iniziare l'espressione di geni specifici [2]. Questo fenomeno è conosciuto come *quorum sensing*, definito anche "comunicazione intercellulare", in base al quale verrebbero espresse specifiche funzioni solo quando la popolazione ha raggiunto una determinata densità di crescita [3]. Nei batteri Gram-negativi molti di questi composti appartengono alla classe chimica dei lattoni dell'*N*-acilomoserina (AHL), i quali differiscono nella lunghezza della catena laterale legata all'atomo di azoto, nel tipo di sostituzione all'atomo di carbonio in posizione 3 e nella presenza o assenza di uno o più doppi legami nella catena laterale [4] (Figura 1).



**Fig. 1.** Lattoni dell'*N*-acilomoserina

Le tecniche analitiche maggiormente utilizzate per l'analisi qualitativa e semiquantitativa degli AHL sono basate sul confronto tra l'attività di un induttore presente in un estratto di coltura batterica con quella riscontrata in un campione standard a concentrazione nota [5-7]. Shaw et al. [8] hanno sviluppato un metodo per le molecole segnale che accoppia la separazione cromatografica su strato sottile con la rivelazione mediante l'uso di *Agrobacterium Tumefaciens*. Charlton et al. [9] hanno riportato un metodo per la quantificazione del 3-chetoacilomoserin lattone (3-cheto-AHL) basato sulla conversione del 3-cheto-AHL nel corrispondente derivato pentafluorobenzilossima seguito poi da analisi via gas cromatografia-spettrometria di massa. Di recente è stato riportato l'uso di tecniche di separazione capillare (partial filling micellar capillary electrochromatography [10] e nanoLC [11]) accoppiate alla rivelazione di massa per l'analisi degli AHL in estratti di *Burkholderia cepacia*.

In questa comunicazione saranno riportati i risultati preliminari di un approccio innovativo per la determinazione di alcuni lattoni dell'*N*-acilomoserina (*N*-butanoil, *N*-esanoil, *N*-eptanoil, *N*-ottanoil, *N*-decanoil, *N*-dodecanoil, e *N*-tetradecanoil, rispettivamente BHL, HHL, HpHL, OHL, DHL, dDHL, e tDHL) basato sulla gas cromatografia accoppiata alla spettrometria di massa (GC-EI/MS). La separazione gas cromatografica di una miscela di AHL è stata realizzata, senza derivatizzazione, in soli 15 minuti. I picchi sono stati rivelati ed

identificati dai corrispondenti segnali di massa [12]. Gli AHL analizzati hanno mostrato un comune spettro di frammentazione caratterizzato dalla presenza di un segnale intenso per un valore di  $m/z$  pari a 143; un tale segnale è stato selezionato come frammento identificativo per l'analisi in modalità SIM degli AHL in estratti di *Aeromonas hydrophyla* (Figura 2).

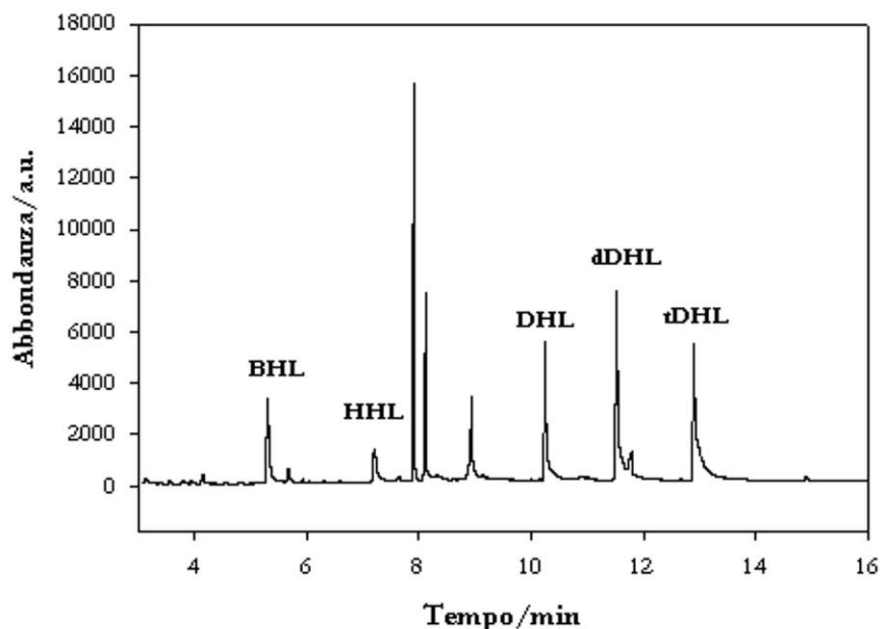


Fig. 2. Cromatogramma SIM ( $m/z$  143) in GC/MS di un estratto in cloroformio di *Aeromonas hydrophyla*

### Riferimenti

1. Fuqua, W. C. Winans, S.C. & Greenberg, E.P. (1996) *Ann. Rev. Microbiol.* 50, 727-751.
2. G. M. Dunny, S.C. Winans (Eds.), *Cell-Cell Signaling in Bacteria*, ASM Press, Washington, D.C., 1999.
3. Gray, K:M. (1997) *Trends Microbiol.* 5, 184.
4. Cámara, M., Daykin, M., Chhabra, S.R. (1998) *Meth. Microbiol.* 27, 319.
5. Graciela Brelles-mariño, Eulogio J. Bedmar (2001) *J. Biotech.* 91, 197.
6. Eberhard, A. (1972) *J. Bacteriol.* 109, 1101.
7. Adar, Y. Y. & Ulitzur, S. (1993) *J. Biolumin. Chemilumin.* 8, 261.
8. P. D. Shaw, G. Ping, S. L. Daly, C. Cha, J.E. Cronan, Jr. K.L. Rinehart, S. K. Farrand. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 6036.
9. T. S. Charlton, R. de Nys, A. Netting, N. Kumar. M. Hentzer, M. Givskov, S. Kjelleberg (2000) *Environ. Microbiol.* 2, 530.
10. Frommberger M, Schmitt-Kopplin P, Menzinger F, Albrecht V, Schmid M, Eberl L, Hartman A, Kettrup A. (2003) *Electrophoresis* 24, 3067.
11. Frommberger M, Schmitt-Kopplin P, Hartman A, Kettrup, A. (2004) *Anal. Bioanal. Chem.* 378, 1014.
12. T. R. I. Cataldi, G. Bianco, M. Frommberger, Ph. Schmitt-Kopplin, *Rapid Comm. in Mass Spectr.* in press.

**CONFRONTO QUALITATIVO E QUANTITATIVO DEL CONTENUTO DI  
TRIACILGLICEROLI IN LATTE DI DIVERSA ORIGINE MEDIANTE ANALISI  
GC-MS E HPLC-APCI-MS-MS**

*Daniela Gastaldi, Claudio Medana, Marco Pazzi, Riccardo Aigotti e Claudio Baiocchi*

*Dipartimento di Chimica Analitica, Università degli Studi di Torino  
Via P. Giuria 5, 10125 Torino – I*

I triacilgliceroli (TAG) sono molecole neutre, ad alto peso molecolare, non volatili e quindi non facilmente analizzabili direttamente mediante gascromatografia. Nell'analisi dei TAG, una volta chiarita la composizione in acidi grassi, normalmente determinati in gascromatografia come esteri metilici ottenuti mediante trans-metilazione, la conoscenza del modo in cui questi acidi grassi sono distribuiti all'interno della molecola del glicerolo assume interesse preminente, sia per quanto riguarda l'aspetto nutrizionale, sia per quanto riguarda l'aspetto normativo e di controllo di qualità.

Tra gli acidi grassi presenti negli alimenti, particolare rilievo hanno assunto gli acidi grassi polinsaturi (PUFA), e soprattutto gli omega-3, per il ruolo che essi hanno nella prevenzione di malattie cardiovascolari e come antiossidanti; il loro il valore in campo dietetico ha indotto molte industrie alimentari ad inserirli come integratori nei loro prodotti. Data l'importanza di queste sostanze per la salute, è essenziale conoscerne non solo la concentrazione negli alimenti, ma anche la distribuzione nella frazione lipidica.

Nel nostro lavoro abbiamo confrontato i dati ottenuti con la GC-MS con quelli forniti dall'HPLC-APCI-MS. L'analisi HPLC-MS è stata condotta su latte intero, previa precipitazione della frazione proteica, mentre con la GC-MS si è valutato il contenuto di acidi grassi, determinati come esteri metilici dopo aver proceduto ad una transesterificazione con BF<sub>3</sub> – metanolo.

L'indagine è stata effettuata su campioni di latte vaccino di diverse marche, campioni di latte caprino e un campione di latte umano.

Il vantaggio dell'HPLC-MS con interfaccia APCI, rispetto al metodo gascromatografico, è di fornire informazioni non soltanto sull'identità degli acidi grassi presenti in una molecola di TAG, ma anche sulla loro specifica distribuzione all'interno della molecola stessa, in un'unica corsa cromatografica. La tecnica APCI applicata ai trigliceridi produce un picco a [M+H]<sup>+</sup> e frammenti relativi ai digliceridi ([DAG]<sup>+</sup>) generati dalla perdita di una molecola di acido grasso [M - (R-COO)]<sup>+</sup>. L'intensità dello ione [M+H]<sup>+</sup> è correlata al grado di insaturazione della molecola: maggiore è il grado d'insaturazione, più intenso è lo ione pseudomolecolare<sup>(1)</sup>. L'intensità degli ioni [DAG]<sup>+</sup>, invece, è legata alla posizione occupata dall'acido grasso rimosso: gli ioni [DAG]<sup>+</sup> meno abbondanti corrispondono alla perdita dell'acido grasso in posizione 2, perché essa è energeticamente sfavorita rispetto alle perdite in posizione 1 o 3<sup>(2,3)</sup>. L'utilizzo della Tandem Mass Spectrometry ha consentito di ottenere ulteriori dettagli strutturali delle catene aciliche presenti.

### **Bibliografia**

1. W. C. Byrdwell, *Lipids* **36**, 327-345 (2001)
2. H. R. Mottram, S. E. Woodbury, R. P. Evershed, *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **11**, 1240-1252 (1997)
3. L. Mondello, G. Dugo, P. Dugo, *LC-GC Europe, Recent Applications in LC-MS*, 12-18, (Novembre 2002)

## STRATEGIE PER L'UTILIZZO DELLA CROMATOGRAFIA A FASE INVERSA E RIVELAZIONE IN SPETTROMETRIA DI MASSA NELLA DETERMINAZIONE DI AMMINE BIOGENE

*V. Gianotti, F. Gosetti, S. Polati, S. Angioi, M.C. Gennaro*

*Università del Piemonte Orientale “Amedeo Avogadro”*

*Dipartimento di Scienze dell'Ambiente e della Vita*

*Spalto Marengo 33 - 15100 Alessandria*

L'uso della cromatografia liquida associata alla rivelazione in spettrometria di massa, oltre ad offrire innegabili vantaggi in termini soprattutto di selettività e di facilità di identificazione in diverse matrici di sostanze attese, permette anche di ipotizzare la presenza di sostanze non attese, quali ad esempio metaboliti e prodotti di degradazione. E' inoltre possibile la rivelazione di sostanze che non assorbono sensibilmente nella zona UV-Vis.

Molecole organiche ioniche o molto polari che sono adatte ad una rivelazione in spettrometria di massa non possono però essere separate per via cromatografia con i metodi abituali in fase inversa ma richiedono l'aggiunta alla fase mobile di reagenti di coppia ionica o di interazione ionica, spesso sali non volatili e non compatibili con le interfacce cromatografia-spettrometria di massa.

L'identificazione e la determinazione delle ammine biogene nei cibi riveste particolare interesse ed attualità perché alcune di queste, pur formandosi naturalmente in alcuni alimenti, possono diventare nocive alla salute in funzione del livello di concentrazione. Alcune ammine sono caratterizzate da apprezzabile assorbività molare nella zona UV-Vis, però richiedono l'aggiunta nella fase mobile di reagenti di interazione [1, 2], mentre per altre che hanno assorbività molare trascurabile sono necessarie reazioni di derivatizzazione [3].

Lo scopo di mettere a punto un metodo per la separazione e determinazione di ammine biogene mediante RP-HPLC accoppiata ad una rivelazione di massa, senza l'uso di reagenti di interazione ionica e di fasi di derivatizzazione, è stato realizzato utilizzando colonne cromatografiche a fase inversa di recente concezione, che contengono nel loro impaccamento delle funzionalità polari. Le potenzialità di queste fasi stazionarie sono state verificate e confrontate nella separazione di diverse specie organiche a diversa polarità e carica.

L'uso di una fase stazionaria Polaris C<sub>18</sub> Amide ha permesso la separazione di una miscela di ammine biogene. La fase mobile è una miscela metanolo-acqua addizionata di acetato d'ammonio e la rivelazione è effettuata in spettrometria di massa con ionizzazione elettrospray a ioni positivi.

### Riferimenti

[1] M.C. Gennaro, C. Abrigo, “Ion-interaction reversed-phase high performance liquid chromatography in the analysis of food”, *Analisis* (1991) 19, 151-154

[2] M.C. Gennaro, C. Abrigo, “Separation of food-related biogenic amines by ion-interaction reversed-phase high performance liquid chromatography. Tyramine, histamine, 2-phenylethylamine, tryptamine and precursor aminoacids”, *Chromatographia* (1991) 31, 381-386

[3] M.C. Gennaro, V. Gianotti, E. Marengo, D. Pattono, R.M. Turi, “A chemometric investigation of the effect of the cheese-making process on contents of biogenic amines in a semi-hard Italian cheese (Toma)”, *Food Chemistry* (2003) 82, 545-551



## MODIFICAZIONI STRUTTURALI INDOTTE TERMICAMENTE NELLE PROTEINE DEL SIERO DEL LATTE: UNO STUDIO MEDIANTE HPLC-ESI-MS

*I. Losito, C.M. Placentino, L. Monaci, F. Palmisano, P.G. Zambonin*

*Dipartimento di Chimica, Università di Bari, Via E. Orabona 4, 70126 Bari*

Il siero del latte trova largo impiego nell'industria alimentare per le sue proprietà nutrizionali e funzionali. Esso viene infatti adoperato come sostituito del latte scremato o in polvere, nonché come fonte di proteine alternative a quelle dell'uovo, nella preparazione di gelati, dessert, prodotti da forno. Da un punto di vista funzionale il siero del latte può invece agire come stabilizzatore di creme e schiume, come emulsionante o come intensificatore di sapore in una varietà di prodotti alimentari, non necessariamente derivanti dal latte (ad esempio anche carni, salumi, salse).

La versatilità del suo impiego è legata tuttavia in modo critico allo stato delle due proteine presenti in maggior percentuale al suo interno, la  $\beta$ -lattoglobulina (51%, nelle sue due varianti A e B) e l' $\alpha$ -lattalbumina (19%). I trattamenti di risanamento a cui il latte viene sottoposto prima dell'impiego nei processi di lavorazione (pastorizzazione, trattamenti UHT, ecc.) possono infatti indurre modificazioni significative della struttura di tali proteine, compromettendone le proprietà.

Uno dei processi tipici è rappresentato dalla reazione di Maillard, innescata dalla condensazione di un gruppo amminico delle due proteine (in particolare quelli dei residui di lisina) con un gruppo carbonilico del lattosio, e dal successivo riarrangiamento a formare il corrispondente amminodeossichetoso (composto di Amadori).

In parallelo possono verificarsi processi di denaturazione termica, scissione proteolitica o ossidazione di particolari residui amminoacidici (metionina).

Le spettrometria di massa a ionizzazione elettrospray (ESI-MS) e MALDI sono state impiegate per studiare in modo diretto alcune delle modificazioni strutturali indotte da tali processi nell' $\alpha$ -lattalbumina e nella  $\beta$ -lattoglobulina, in particolare la glicosilazione con lattosio (lattosilazione)<sup>1-4</sup>, mostrando una correlazione con i trattamenti termici subiti dal latte. Nel presente lavoro tale studio è stato approfondito rivolgendo particolare attenzione alle possibili modificazioni di conformazione indotte termicamente nelle due proteine. A tal scopo un metodo HPLC-ESI-MS è stato applicato sia a campioni di latte commerciale derivanti da trattamenti termici diversi (pastorizzazione, alta pastorizzazione, UHT) sia a campioni standard delle due proteine sottoposti a riscaldamento.

In questo caso, oltre a consentire l'identificazione di diverse forme lattosilate e ossidate della  $\beta$ -lattoglobulina e dell' $\alpha$ -lattalbumina la tecnica ESI-MS, attraverso la valutazione dei profili multi-carica delle due proteine nei diversi sistemi analizzati, ha fornito indicazioni sulle modificazioni della loro struttura terziaria indotte termicamente.

### Riferimenti bibliografici

1. J. Leonil, D. Molle, J. Fauquant, J.L. Maubois, R.J. Pearce, S. Bouhallab, *Journal of Dairy Science* **80** (1997) 2270-2281
2. R. Siciliano, B. Rega, A. Amoresano, P. Pucci, *Anal. Chem.* **72** (2000) 408-415
3. J. Hau, L. Bovetto, *J. Chromat. A* **926** (2001) 105-112
4. L.F. Marvin, V. Parisod, L.B. Fay, P.A. Guy, *Electrophoresis* **23** (2002) 2505-2512

## ANALISI LC-MS<sup>n</sup> DI DERIVATI DELL'ACIDO LISERGICO: CONFRONTO DELLE PRESTAZIONI DEGLI ANALIZZATORI DI MASSA A TRIPLO QUADRUPOLO E TRAPPOLA IONICA

Claudio Medana, Daniela Gastaldi, Marco Pazzi, Riccardo Aigotti e Claudio Baiocchi

Dipartimento di Chimica Analitica, Università degli Studi di Torino  
Via P. Giuria 5, 10125 Torino – I

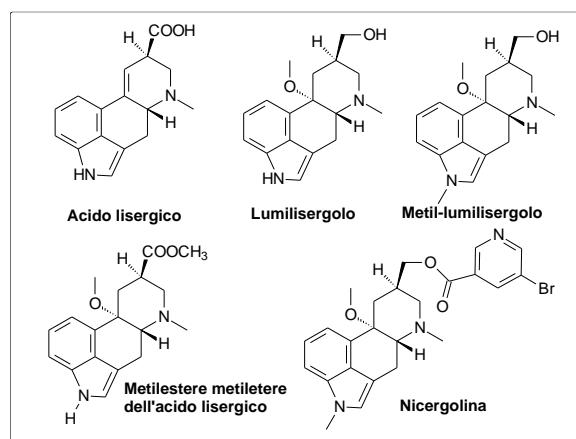
L'analisi di residui di farmaci in campo ambientale viene normalmente condotta tramite l'uso di gascromatografi dotati di svariati rivelatori. Una notevole limitazione all'uso di tale tecnica è rappresentato dalla necessità di estrazione del campione, particolarmente laboriosa nel caso di matrici acquose/alimentari. L'utilizzo di metodiche HPLC, già ampiamente diffuse per l'analisi di composti di interesse farmaceutico e alimentare può attualmente essere esteso all'utilizzo di un rivelatore a spettrometria di massa che garantisce notevoli vantaggi sia dal punto di vista qualitativo (determinazione della struttura) che quantitativo (sensibilità analitica).

Tra i più diffusi analizzatori di massa attualmente disponibili, il triplo quadrupolo e la trappola ionica offrono la possibilità di significative considerazioni riguardanti le modalità di acquisizione dei segnali in spettrometria di massa tandem<sup>1</sup>.

Entrambi gli strumenti permettono di lavorare utilizzando differenti modalità: la scansione completa dell'intervallo di massa (*full mass*), la scansione di singoli ioni (*SIM*) che permette un'incremento di sensibilità con perdita di informazioni sullo spettro, le tecniche spettrometriche tandem per scansione completa (*MS/MS*) o selettiva degli ioni prodotto (*SRM*). La trappola ionica consente di estendere il numero di eventi *MS/MS* procedendo nella genealogia degli ioni prodotto (*MS<sup>3</sup>*, *MS<sup>4</sup>*, ecc.) anche in modo selettivo (*CRM*). Il triplo quadrupolo normalmente garantisce sensibilità più elevate sulla prima frammentazione<sup>2</sup>.

La struttura molecolare dell'analita può permettere uno o più cammini di frammentazione a partire dallo ione generato nella sorgente. In prima approssimazione sarà quindi più efficiente l'analizzatore quadrupolare nel caso di cammini multipli di frammentazione, mentre lo sarà la trappola nel caso di cammini singoli.

Particolarmente interessante è il caso di composti come i derivati dell'acido lisergico<sup>3</sup> il cui comportamento di frammentazione è stato studiato nel presente lavoro.



Sono state confrontate le sensibilità di due differenti strumentazioni LC-MS/MS, sulla base dell'ottimizzazione delle tecniche LC-MS<sup>2</sup> in un caso e LC-MS<sup>4</sup> nell'altro. Per quel che riguarda la tecnica triplo quadrupolo, allo scopo di ottenere una metodica selettiva per la classe di composti in esame per la determinazione di residui di tali farmaci in campioni reali,

è stata valutata anche la tecnica dello ione precursore<sup>4</sup>, basata sull'analisi a ritroso di ioni genitore formanti ioni prodotto comuni.

### **Bibliografia**

1. J.L. Josephs, M. Sanders, *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **18**, 743-759 (2004)
2. E. de Rijke, H. Zappey, F. Ariese, C. Gooijer, U.A.T. Brinkman, *Journal of Chromatography A* **984**, 45-58 (2003)
3. A.K.S. Ahmad, M.A. Kawy, M. Nebsen, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **30** 479-489 (2002)
4. F. Sanchez-Rabameda, O. Jauregui, R.M. Lamuela-Raventos, F. Viladomat, J. Bastida, C. Codina, *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **18**, 553-563 (2004)

## CARATTERIZZAZIONE E DOSAGGIO DEI METABOLITI DEGLI ISOFLAVONI DELLA SOIA IN SIERO DI TOPI CD1 MEDIANTE LC-ESI-MS

*Sheila Morandi, Daniela Locati, Francesca Ferrario, Anna Arnoldi*

*Dipartimento di Scienze Molecolari Agroalimentari, Laboratorio di Chimica degli Alimenti e Spettrometria di massa, Università degli Studi di Milano, via Celoria, 2-20133 Milano  
e-mail: [sheila.morandi@unimi.it](mailto:sheila.morandi@unimi.it)*

**INTRODUZIONE:** Negli ultimi anni la soia è stata oggetto di numerosi studi per le sue proprietà nutraceutiche, in particolare per la prevenzione del rischio cardiovascolare e per l'azione chemopreventiva, in base alla minor incidenza delle patologie cardiovascolari e di alcuni tipi di tumore (seno, prostata, etc.) nelle popolazioni orientali, grandi consumatrici di soia. Tali proprietà sono attribuite a diverse componenti della soia, in particolare agli isoflavoni o a specifiche componenti proteiche.

Per quanto riguarda i peptidi/proteine, l'azione anticolesterolemica è legata alla frazione  $\alpha'$  delle globuline 7S (1), mentre l'azione antimittotica (2) potrebbe essere legata alla lunasina, un peptide di 43 aminoacidi capace di legarsi alla cromatina ipoacetilata provocando il displacement del core proteico.

Gli isoflavoni, invece, agirebbero attraverso vari meccanismi, tra cui l'effetto antiossidante, l'induzione del cambiamento della reattività vascolare e l'interazione con i recettori per gli estrogeni endogeni, responsabile dell'attività estrogeno-simile di tali molecole (3). Tuttavia, le evidenze sperimentali a favore degli isoflavoni non sono ancora sufficienti, mentre stanno aumentando le segnalazioni dei loro effetti indesiderati.

**SCOPO:** Nell'ambito di un più ampio studio teso alla valutazione dell'influenza che diete a vario contenuto di isoflavoni hanno sullo sviluppo tumorale, nel nostro laboratorio è stata messa a punto una metodica per la caratterizzazione e il dosaggio dei metaboliti degli isoflavoni della soia in siero di topi CD1 (modello transgenico per il tumore mammario).

**RISULTATI E DISCUSSIONE:** Gli animali erano stati suddivisi in 4 gruppi nutriti con le seguenti diete: una dieta certificata *isoflavone-free* (A), una dieta formulata contenente 20% di proteine testurizzate a basso dosaggio isoflavonico (Croksoy<sup>®</sup>, B), una contenente 20% di un isolato proteico di soia commerciale (C) e una chow diet standard ad elevato contenuto di isoflavoni (D). Estrahendo e analizzando in HPLC-UV in modo convenzionale (4) le diete, le concentrazioni ricavate risultano pari a 31.3  $\mu\text{g/g}$  (B), 224.8  $\mu\text{g/g}$  (C) e 502.3  $\mu\text{g/g}$  (D), mentre è stata confermata l'assenza di isoflavoni nella dieta (A), sottoposta ad analisi HPLC-DAD-ESI-MS.

Le concentrazioni estremamente basse dei metaboliti isoflavonici nel siero dei topi hanno reso necessaria una specifica messa a punto della metodica analitica. I campioni di siero (100  $\mu\text{l}$ ) sono stati sottoposti a digestione con una miscela enzimatica contenente  $\beta$ -glucuronidasi e solfatasi, per idrolizzare i glucuronidi e i solfati, in modo da liberare le forme non coniugate degli isoflavoni. L'identificazione dei metaboliti plasmatici è stata eseguita mediante LC-ESI-MS e LC-ESI-MS/MS, per confronto con i tempi di ritenzione e gli spettri di massa di standard di riferimento. Le analisi sono state effettuate utilizzando una colonna Alltima<sup>®</sup> RP-18, 150x2.1 mm, 100 Å, 3  $\mu\text{m}$ ; □ volume di iniezione 5  $\mu\text{l}$ , utilizzando come eluenti (A) H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>COOH 0.1% e (B) CH<sub>3</sub>CN/CH<sub>3</sub>COOH 0.1% con un gradiente lineare dal 20 al 50% di (B) in 10 min, seguiti da 10 min al 50% di (B), flusso 0.2 ml/min; i cromatogrammi UV sono stati registrati a 254 nm, mentre i TIC-MS sono stati registrati in modalità negativa.

In letteratura sono presenti numerosi lavori sul metabolismo degli isoflavoni nel ratto, che descrivono i glucuronidi e i solfati di genisteina e daidzeina come forme plasmatiche principali, oltre che O-desmetilangolensina, diidrodaidzeina (DHD) ed equolo (5, 6). Per quanto riguarda il topo, come metaboliti plasmatici sono stati descritti la genisteina e la daidzeina, mentre la DHD e l'equolo sono stati descritti solo come metaboliti urinari (7). Dal tracciato cromatografico in corrente ionica totale si è notata la presenza di due picchi con tempo di ritenzione 13.8 min e 15.8 min: il picco a 15.8 minuti era in accordo con il tempo di ritenzione ( $t_r$ ) della genisteina standard, attribuzione confermata anche dalle analisi in MS ( $[M-H]^- = 269$  m/z) e in MS/MS. Il picco a 13.8 min,  $[M-H]^- = 255$ , non si accordava né con la massa né con il tempo di ritenzione della daidzeina ( $t_r = 12.8$  minuti), mentre il valore di m/z di 255 suggeriva che si potesse trattare della diidrodaidzeina (PM = 256). Sono state quindi eseguite le analisi LC-ESI-MS ed MS/MS su standard autentici di equolo e diidrodaidzeina: l'equolo aveva un  $t_r$  di 16 minuti ed un  $[M-H]^- = 241$ , mentre la DHD coincideva con il picco incognito a 13.8 min, sia per il tempo di ritenzione che per i dati MS e MS/MS.

La quantificazione, basata su dati LC-MS, è stata effettuata con il metodo dello standard interno marcato ( $D_4$ -genisteina); sono state costruite due rette di calibrazione, in matrice di siero di topo alimentato con la dieta *isoflavone-free*. Ogni campione è stato addizionato con 10  $\mu$ l di  $D_4$ -genisteina, in modo da ottenere una concentrazione di standard deuterato 0.37  $\mu$ M.

**CONCLUSIONI:** E' stata messa a punto una metodica che consente di analizzare i metaboliti degli isoflavoni anche in campioni dove questi sono presenti a basso dosaggio, con la quale è stato possibile identificare nel siero di topi CD1, per la prima volta, la diidrodaidzeina, un metabolita della daidzeina, solitamente descritto come metabolita urinario nel topo e plasmatico nel ratto.

#### **BIBLIOGRAFIA:**

1. Manzoni, C. et al. *J. Nutr.*, **2003**, *133*, 2149-2155
2. Jeong, H. J. et al. *J. Agric. Food Chem.*, **2003**, *51*, 7901-7906
3. Sirtori, C.R. *Drug Safety*, **2001**, *24*, 665-682
4. Song, T. et al. *Am. J. Clin. Nutr.*, **1998**, *68* (suppl.), 1474-1479
5. Fang, N. et al. *J. Agric. Food Chem.*, **2002**, *50*, 2700-2707
6. Shir, Y. et al. *Anesth. Analg.*, **2002**, *94*, 421-426
7. Tamura, M. et al. *Nutr. Res.*, **2002**, *22*, 705-713

**SVILUPPO DI UN METODO PER LA DETERMINAZIONE DI COCCIDIOSTADICI IN ALIMENTI DI ORIGINE ANIMALE MEDIANTE LC-MS-MS**

*Bidolli G., Gennuso E., Fiorucci F., Sanna P.*

*Istituto Zooprofilattico Sperimentale Regioni Lazio e Toscana, Via Appia Nuova 1411, 00178 Roma ([bneri@rm.izs.it](mailto:bneri@rm.izs.it))*

Nel controllo ufficiale degli alimenti di origine animale sono ricercati i residui di coccidiostatici, sostanze ampiamente utilizzate per impedire lo sviluppo della coccidiosi, una malattia amebica contagiosa che interessa il bestiame, specialmente pollame, che può svilupparsi in particolari condizioni di temperatura e umidità. La malattia è trasportata dagli organismi unicellulari che appartengono al genere *Eimeria* appartenente alla categoria Sporozoa ed è la malattia parassita più importante di pollame [1] che può portare a perdite economiche significative all'industria di prova del pollame [2].

In questo lavoro è stato sviluppato e validato un metodo rapido, accurato e sensibile per la determinazione di alcuni coccidiostatici (nicarbazina, robenidina, dimetridazolo, metilclorpidolo) in diverse matrici alimentari di origine animale, come muscolo e uova.

Dopo una prima estrazione con solvente organico e sua successiva filtrazione, l'estratto viene analizzato direttamente in LC-MS-MS, frammentando lo ione genitore sul secondo quadruplo con azoto. La separazione cromatografica è stata realizzata con una colonna C<sub>18</sub> (150 mm X 2.1 mm X 5µm) in condizioni di eluizione in gradiente, utilizzando una fase mobile costituita da acetonitrile /acqua contenente 0.1% di acido formico in percentuali variabili nel tempo di fase organica. La rivelazione, eseguita con ionizzazione positiva e negativa, è stata ottenuta utilizzando uno spettrometro di massa con interfaccia ion-spray e un'acquisizione in multi reaction monitoring (MRM).

La validazione è stata eseguita seguendo le indicazioni riportate nella decisione Europea (2002/657/CE) determinando la linearità, la precisione, il recupero, la specificità, la capacità di rilevazione e il limite di decisione.

Tale metodo risulta particolarmente indicato per quei laboratori coinvolti nella ricerca dei residui di coccidiostatici in campioni di alimenti di origine animale perché semplice, veloce e affidabile.

**Riferimenti bibliografici**

[1] D.K. Matabudul, N.T. Crosby, S. Sumar, *Analyst* 124 (1999) 499.

[2] P.L. Long (Ed.), *The Biology of the Coccidia*, Univ. Park Press, Baltimore, MD, 1982.

## STUDIO DEI PRODOTTI DI OSSIDAZIONE DELL'ACIDO CAFFEICO MEDIANTE LC-ESI-MS/MS

*Pati S., Losito I., Palmisano F., Zambonin P.G.*

*Università degli Studi di Bari – Dipartimento di Chimica*

Gli idrossicinnammati, in particolare i derivati dell'acido caffeico, largamente distribuiti nel regno vegetale, sono i responsabili del cosiddetto *browning* ossidativo, fenomeno ben conosciuto poiché solitamente causa una perdita del valore estetico (variazione nel colore, odore, consistenza e solubilità) e nutrizionale dei prodotti alimentari vegetali. Nel processo sono coinvolti due tipi di reazione:

1. *l'ossidazione enzimatica*,<sup>1-3</sup> preponderante nei frutti freschi, dovuta all'enzima polifenolossidasi,
2. *l'autossidazione non enzimatica*<sup>4,5</sup>, particolarmente rapida a pH alcalino.

Il primo stadio della reazione di *browning* è l'ossidazione degli o-difenoli ai corrispondenti o-chinoni<sup>6</sup>, specie fortemente reattive. In qualità di elettrofili, i chinoni possono formare addotti con diversi substrati nucleofili<sup>7</sup> quali amino derivati, tioli e acqua o, agendo da ossidanti, possono ripristinare il fenolo originale<sup>8</sup>. In assenza di altri substrati l'o-chinone può condensare, e poi polimerizzare, con il corrispondente idrochinone attraverso un'addizione 1,4 tipo Michael o attraverso un meccanismo che coinvolge semichinoni radicalici<sup>5</sup>.

Il fenomeno è stato studiato utilizzando come modello l'acido caffeico<sup>2-5</sup>, sistema base utile alla comprensione di più complessi processi di ossidazione di derivati cinnamici naturali.

Nonostante la relativa semplicità del sistema studiato, i meccanismi di propagazione della reazione e i suoi prodotti erano, e in parte rimangono, di difficile definizione.

Per quanto a noi noto, tutti gli studi condotti finora hanno previsto tecniche di purificazione ed isolamento delle frazioni contenenti i prodotti di ossidazione, alcuni dei quali sono stati poi caratterizzati off-line generalmente tramite spettrometria di massa e risonanza magnetica nucleare<sup>2,5</sup>.

Nel corso del presente lavoro, la reazione citata è stata studiata tramite tecniche UV, HPLC-DAD e HPLC-ESI/MS, senza previo isolamento dei prodotti di reazione.

L'impiego di un analizzatore di massa a trappola ionica ha consentito di effettuare misure di spettrometria di massa sequenziale su diversi prodotti di degradazione consolidando conoscenze già acquisite e apportando nuovi ed originali contributi alla risoluzione del problema. Il lavoro è ancora in fase di studio soprattutto relativamente alla presenza di prodotti ed intermedi individuati nel corso della presente ricerca e non riportati in letteratura.

- 
1. Coseteng, M. Y.; Lee, C. Y. *J. Food Sci.* 1987, 52, 985-989
  2. Rompel, A. et al. *FEBS Letters* 1999, 445, 103-110
  3. Cheynier, V.F.; Moutounet, M. *J. Agric. Food Chem.* 1992, 40, 2038-2044
  4. Cilliers, J.J.L.; Singleton, V.L. *J. Agric. Food Chem.* 1989, 37, 890-896
  5. Cilliers, J.J.L.; Singleton, V.L. *J. Agric. Food Chem.* 1991, 39, 1298-1303
  6. Pierpoint, W. S. *Biochem. J.* 1966, 98, 567-580
  7. Cheynier, V.F. et al. *J. Agric. Food Chem.* 1986, 34, 217-221
  8. Mathew, A. G.; Parpia, H.A.B. *Adv. Food Res.* 1971, 19, 75-145

## SEPARAZIONE E DETERMINAZIONE DI PESTICIDI DI NUOVA GENERAZIONE MEDIANTE HPLC-MS/MS

M. Pazzi, C. Baiocchi, C. Medana, P. Branca\*, S.J. Coluccia\*, D. Loia\*

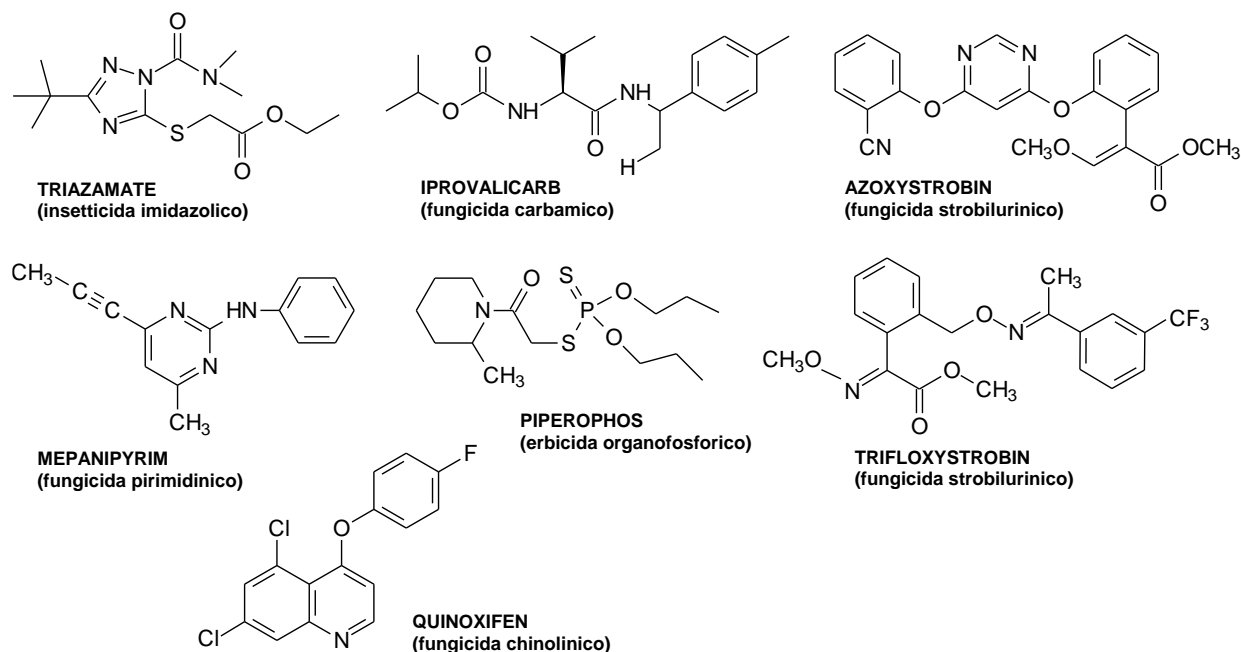
Dipartimento Chimica Analitica, Università di Torino, Via P. Giuria 5, 10125 Torino

\*Polo Chimico Regionale Alimenti – ARPA PIEMONTE, La Loggia, Torino

Una serie di pesticidi di nuova generazione di recentissima introduzione sul mercato è stata presa in considerazione per la messa a punto di un metodo di separazione multi-residuo di composti appartenenti a classi chimiche differenziate.

Sono stati ottimizzati la loro separazione cromatografica e il loro comportamento alla frammentazione MS/MS allo scopo di ottimizzare la selettività e la sensibilità della loro determinazione.

I composti presi in considerazione sono: Triazamate (insetticida triazolico) Iprovalicarb (fungicida carbamico) Azoxystrobin (fungicida strobilurino) Mepanipirim (fungicida pirimidinico), Piperophos (erbicida organofosforico), Trifloxystrobin (fungicida strobilurino) Quinoxifen (fungicida chinolinico).



### Bibliografia

1. Hengel MJ, Shibamoto T, Method development and fate determination of pesticide-treated hops and their subsequent usage in the production of beer *J AGR FOOD CHEM* 50 (12): 3412-3418 JUN 5 2002
2. Garau VL, Angioni A, Del Real AA, et al., Disappearance of azoxystrobin, pyrimethanil, cyprodinil, and fludioxonil on tomatoes in a greenhouse *J AGR FOOD CHEM* 50 (7): 1929-1932 MAR 27 2002
3. Chonan T, Determination of azoxystrobin in tea by HPLC *J FOOD HYG SOC JPN* 42 (4): 249-251 AUG 2001



**APPLICAZIONE DELLA TECNICA MICROESTRAZIONE IN FASE SOLIDA  
ACCOPPIATA ALLA GASCROMATOLOGRAFIA/ SPETTROMETRIA DI MASSA  
(SPME-GC/MS) IN UN CASO DI CONTAMINAZIONE DA TRICLOROETILENE IN  
UN CENTRO DI DIALISI**

*D. Poli<sup>1,2</sup>, L. Pavone<sup>2</sup>, P. Tansinda<sup>2</sup>, D. Tagliavini<sup>2</sup>, S. David<sup>2</sup>, A. Mutti<sup>2</sup>, I. Franchini<sup>2</sup>*

*<sup>1</sup>Centro Studi e Ricerche ISPESL presso l'Università di Parma, <sup>2</sup>Dipartimento di Clinica Medica, Nefrologia e Scienze della Prevenzione, Università degli Studi di Parma, Via Gramsci 14, 43100 Parma*

Il sangue di pazienti sottoposti ad una emodialisi convenzionale viene depurato grazie al contatto, attraverso una membrana artificiale semipermeabile, con una soluzione acquosa. Poiché un trattamento emodialitico standard prevede che soggetti privi di capacità di escrezione urinaria siano esposti settimanalmente a 300-400 L di liquido di dialisi, è evidente come questi pazienti abbiano un più alto rischio di accumulo di sostanze tossiche eventualmente presenti nell'acqua. Da qui l'importanza e la necessità di ottenere un liquido di dialisi il più possibile chimicamente e microbiologicamente puro.

I parametri chimici di qualità e purezza del liquido di dialisi imposti sia dell'Association for the Advancement of Medical Instrumentation (AAMI) [1] che della Farmacopeia Europea [2] si focalizzano sulla contaminazione da parte di sostanze inorganiche per le quali è stata documentata una tossicità nei soggetti sottoposti ad emodialisi. Per i composti organici xenobiotici normalmente presenti nelle acque sono invece comunemente accettati i valori di riferimento indicati per l'acqua di rete.

Durante un test periodico effettuato in un centro di emodialisi sono stati evidenziati valori eccezionalmente elevati (60 µg/L) di Tricloroetilene (TCE), ben al di sopra dei valori di riferimento raccomandati dagli organismi di competenza per l'acqua potabile (10 µg/L) [3]. Alla luce della nota tossicità neurologica ed epatica nonché della sospetta cancerogenicità dovute ad un'esposizione cronica a TCE, il centro è stato immediatamente chiuso ed i pazienti allontanati.

In questa situazione di emergenza gli obiettivi principali sono stati rivolti all'individuazione delle possibili fonti di inquinamento ed alla successiva bonifica del circuito di dialisi attraverso la sostituzione dei materiali contaminati (carboni attivi, filtri in propilene avvolto e tubatura in PVC). Quindi, tramite la misurazione del TCE ematico, è stata quantificata l'avvenuta esposizione dei pazienti sottoposti a emodialisi.

La misura di TCE è stata quindi effettuata in campioni ematici e nel liquido di dialisi utilizzando la tecnica di estrazione SPME dello spazio di testa (75 µm Carboxen/PDMS, Supelco, Bellefonte, PA, USA) accoppiata ad un sistema di analisi GC/MS con acquisizione in frammentografia. Poiché è stata seguita la concentrazione ematica del TCE fino ai valori basali della popolazione generale non esposta (mediana 0,109 µg/L) [4], per ottenere la massima efficienza di estrazione è stato necessario ottimizzare i parametri SPME studiando il tempo e la temperatura di estrazione, l'effetto salino negativo, l'agitazione del campione e l'aggiunta dello standard interno. Il metodo è stato quindi validato, sia nei campioni di sangue che di acqua, in termini di intervallo di linearità (4 ordini di grandezza), limite di rivelazione (0,005 µg/L), limite di quantificazione (0,017 µg/L), riproducibilità intra-day (2,3-7,9%) e inter-day (4,6-8,0%).

I risultati hanno permesso in tempi relativamente brevi di bonificare il circuito di dialisi e di individuare le possibili origini della contaminazione da TCE, permettendo così una rapida riapertura del centro. Le misure effettuate sul sangue dei pazienti due settimane dopo la segnalazione dell'episodio di contaminazione in concomitanza con la riapertura del centro,

hanno evidenziato quote ematiche di TCE (mediana 1,65 µg/L) superiori ai valori riportati in letteratura per la popolazione generale [4], indice di un avvenuto contatto con il clorurato. La concentrazione ematica è ritornata nei valori basali o al di sotto dei limiti di rivelazione solo dopo 45 giorni dall'esposizione. Una volta confermata l'assenza di TCE ematico nei pazienti, la grande sensibilità del metodo ci ha permesso di quantificare, grazie ai relativi bilanci di massa ed al calcolo dei coefficienti di ripartizione, il trasferimento del TCE presente in tracce dal liquido di dialisi verso il compartimento ematico. Risulta quindi evidente la necessità di controlli periodici sul liquido di dialisi allo scopo di individuare concentrazioni eccezionalmente elevate di sostanze xenobiotiche normalmente presenti in tracce e in grado di diffondere facilmente attraverso la membrana emodialitica.

- (1) AAMI Standard and Recommendation Practice. AAMI/DS-1 RD 62. Water treatment equipment for hemodialysis applications. Association for the Advancement of Medical Instrumentation. Arlington, VA, USA; 2000: 2-32
- (2) European Pharmacopoeia, 3rd edn, Supplement 2001: Monograph 1997: 1167 corrected 2000. Hemodialysis solution, concentrated water for diluting.
- (3) D.lgs. 2 Febbraio 2001, n° 31 “Attuazione della Direttiva 98/83/CE relativa alla qualità delle acque destinate al consumo umano”
- (4) F. Brugnone, L. Perbellini, C. Giuliari, M. Cervelloni, M. Soave, *Med Lav*, 85 (1994) 370-389

## METODI RAPIDI PER LA DETERMINAZIONE DI AMMINE BIOGENE IN PRODOTTI CASEARI: ESTRAZIONE MSPD ED ANALISI HPLC-ESI-MS/MS

F. Calbiani, M. Careri, L. Elviri, A. Mangia, L. Pistarà, I. Zagnoni

*Dipartimento di Chimica Generale ed Inorganica, Chimica Analitica, Chimica Fisica, Università degli Studi di Parma, Parco Area delle Scienze 17/A, 43100 Parma*

Nell'ambito di studi sulla qualità e la sicurezza degli alimenti, le ammine biogene rappresentano una classe di contaminanti che ha recentemente suscitato notevole interesse, motivato dall'approfondimento delle conoscenze sia circa il loro ruolo fisiologico di mediatori di vari processi metabolici, sia sulla loro capacità di agire quali induttori di reazioni allergiche [1]. Grazie alla correlazione fra la loro concentrazione e l'entità di processi di decarbossilazione enzimatica di origine microbica, le ammine biogene possono essere considerate marker di contaminazione microbica di alimenti. L'elevata variabilità nel contenuto di ammine sia tra alimenti diversi, quali carne, pesce, formaggi, birra, vino, che all'interno di alimenti della stessa tipologia è riconducibile a diversi fattori quali il contenuto di sali, il pH, la temperatura e la disponibilità di substrati [2].

Lo sviluppo di metodi affidabili per la determinazione di ammine biogene in matrici alimentari quali pesce e formaggi è di notevole importanza, in quanto la presenza di queste sostanze negli alimenti è correlata al manifestarsi di sintomi riconducibili rispettivamente alla sindrome da "avvelenamento da sgombroidi" e alla "cheese reaction". Questa azione si esplica a concentrazioni delle ammine variabili da poche decine a migliaia di mg/kg in funzione della sensibilità individuale e di fattori legati all'assunzione di determinati farmaci.

Nel presente lavoro, è stato sviluppato un metodo rapido basato sulla cromatografia liquida abbinata alla spettrometria di massa tandem (HPLC-MS/MS) con sorgente electrospray (ESI) per l'identificazione e la determinazione di ammine biogene, quali istamina, tiramina e  $\beta$ -feniletilamina (Figura 1), in campioni di formaggio fresco e formaggio stagionato.

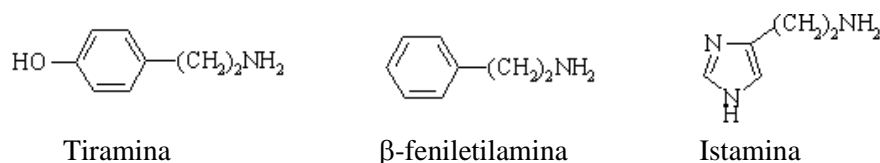


Figura 1. Struttura chimica delle ammine biogene.

La separazione cromatografica degli analiti in oggetto è stata effettuata con meccanismo di ripartizione a fase inversa mediante impiego di una colonna Luna C18(2) narrow-bore (250 x 2.0 mm, 5 $\mu$ m, Phenomenex), utilizzando quale fase mobile una miscela di metanolo e acqua acidificata con TFA 0.1% (v/v), con eluizione in gradiente. La rivelazione ESI-MS/MS è stata effettuata acquisendo il segnale degli ioni positivi in modalità MRM (Multiple Reaction Monitoring) ed utilizzando gli standard deuterati degli analiti come standard interni. Al fine di aumentare la selettività, sono state acquisite due transizioni per ciascuno degli analiti considerati. Particolare attenzione è stata posta alla fase di trattamento del campione, per la quale è stato valutato l'impiego di nuove tecniche di estrazione "solvent-free".

L'applicazione della tecnica di estrazione solido/liquido per impiego di acqua acidificata per HCl 0.1 M ha consentito di ottenere buoni risultati per entrambe le matrici. Nel caso del formaggio stagionato, a causa dell'elevato contenuto proteico, si è resa necessaria una successiva purificazione dell'estratto mediante filtrazione con filtri a taglio molecolare (Centricon YM-3, 3000 MWCO, Amicon, Millipore). Tuttavia, allo scopo di sviluppare metodi rapidi di trattamento del campione ed al fine di ridurre il consumo di solventi e la

quantità di campione da sottoporre ad analisi, è stato sviluppato un metodo alternativo, basato sull'impiego dell'estrazione per dispersione della matrice in fase solida (MSPD). Il metodo sviluppato, che presenta il vantaggio di combinare l'omogeneizzazione, l'estrazione e la purificazione in un unico stadio, consentendo di trattare direttamente campioni solidi, semi-solidi e viscosi, prevede nel caso in esame l'omogeneizzazione di 0.25g di formaggio con 1g di silice funzionalizzata con gruppi cianopropile, e la successiva eluizione con miscela metanolo/acqua acidificata con acido formico 0.1% (v/v). L'applicabilità dei metodi MSPD sviluppati è attestata dalle buone rese di estrazione ottenute. In particolare, nel caso del formaggio stagionato sono stati calcolati recuperi pari a  $84\pm 10\%$  (istamina),  $91\pm 12\%$  (tiramina),  $117\pm 3\%$  ( $\beta$ -fenilettilamina) al livello di concentrazione di 3 mg/kg, 0.4 mg/kg e 2 mg/kg per istamina, tiramina e  $\beta$ -fenilettilamina rispettivamente.

In conformità alle linee guida proposte dalla Eurachem [3], i metodi proposti sono stati validati in termini di robustezza, selettività, limiti di rivelazione e quantificazione, intervallo di linearità e accuratezza, utilizzando quale 'bianco' di matrice un campione di formaggio fresco cremoso, addizionato degli analiti ad opportuni livelli di concentrazione. In particolare, gli eccellenti limiti di rivelazione (0.05-0.25 mg/kg) e quantificazione (0.09-0.55 mg/kg) attestano l'applicabilità del metodo per la quantificazione di ammine biogene nel formaggio a livello di tracce.

La determinazione delle ammine biogene in campioni di formaggio stagionato ha consentito di determinare la tiramina a concentrazione variabile da  $0.21\pm 0.03$  a  $16.8\pm 1.4$  mg/kg e l'istamina da  $4.3\pm 0.2$  a  $12.3\pm 0.8$  mg/kg e di evidenziare una dipendenza dei livelli di concentrazione dal tempo di stagionatura. E' stato inoltre riscontrato un buon accordo dei dati ottenuti con i due metodi di estrazione considerati. In Figura 2 sono illustrati i cromatogrammi MRM delle transizioni estratte di istamina e tiramina in un campione di formaggio stagionato.

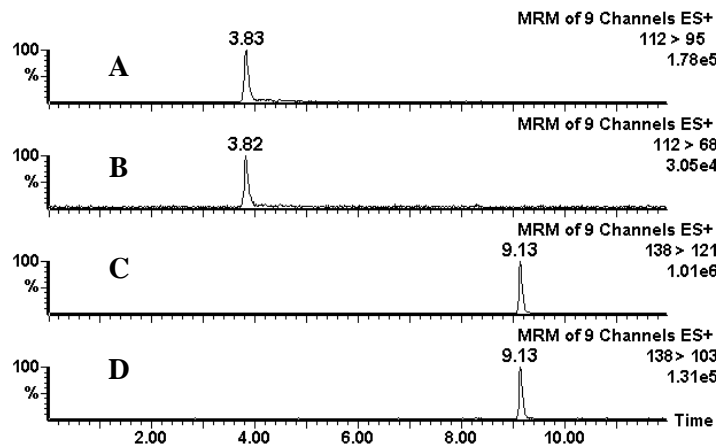


Figura 2. Cromatogrammi HPLC-ESI-MS/MS MRM delle transizioni estratte di istamina (A-B) e tiramina (C-D) in un campione di formaggio stagionato.

## Riferimenti

- [1] A.R. Shalaby, *Food Research Int.*, 7 (1996) 675.
- [2] A. Halasz, A. Barath, L.S. Sarkadi, W. Holzapfel, *Trends in Food Science & Technology*, 51 (1994) 42.
- [3] The Fitness for Purpose of Analytical Methods: A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics, EURACHEM Guide, (1998) LGC, Teddington, GB; <http://www.eurachem.ul.pt/>

Lavoro svolto nell'ambito del Progetto COFIN 2002 (MIUR): Sicurezza degli alimenti. Nuovi metodi di controllo per contaminanti naturali in tracce

**IMPIEGO DELLA SPETTROMETRIA DI MASSA CON IONIZZAZIONE  
ELECTROSPRAY IN STUDI DI PROTEOMICA STRUTTURALE: STUDIO DI  
VARIAZIONI CONFORMAZIONALI DI PROTEINE CRBP E CRABP INDOTTE DA  
METANOLO MEDIANTE ESPERIMENTI DI SCAMBIO IDROGENO/DEUTERIO**

*M. Careri,<sup>a</sup> L. Elviri,<sup>a</sup> I. Zagnoni,<sup>a</sup> D. Cavazzini,<sup>b</sup> F. Torta,<sup>b</sup> G.L. Rossi<sup>b</sup>*

<sup>a</sup> *Dipartimento di Chimica Generale ed Inorganica, Chimica Analitica, Chimica Fisica, Università degli Studi di Parma, Parco Area delle Scienze 17/A, 43100 Parma*

<sup>b</sup> *Dipartimento di Biochimica e Biologia Molecolare, Università degli Studi di Parma, Parco Area delle Scienze 23/A, 43100 Parma*

La spettrometria di massa con sorgente electrospray (ESI-MS) rappresenta uno strumento particolarmente utile per lo studio di stati conformazionali di proteine [1, 2]. Negli ultimi anni, enormi progressi sono stati compiuti nell'applicazione di questa tecnica in campo bioanalitico e biochimico per i numerosi vantaggi offerti nell'analisi di macromolecole.

Scopo del presente lavoro è stato lo studio dei cambiamenti conformazionali indotti da metanolo, delle proteine CRBP I (Cellular Retinol Binding Protein Type I), CRBP II, e CRABP I (Cellular Retinoic Acid Binding Protein Type I) deputate al trasporto del retinolo e dell'acido retinoico, appartenenti alla famiglia delle "lipid binding proteins", nelle rispettive forme apo (assenza di ligando) e olo (presenza di ligando). A tal scopo sono state effettuate misure ESI-MS di scambio idrogeno-deuterio (H/D) [3]. In particolare, sono state analizzate soluzioni (pH 6.8, 20 mM acetato d'ammonio) a differenti concentrazioni di agente denaturante (MeOD, 10-60%), al fine di simulare l'abbassamento della costante dielettrica che si verifica a livello delle membrane biologiche.

Monitorando l'andamento delle distribuzioni di carica al variare della percentuale di MeOD, non è stato possibile osservare negli spettri ottenuti segnali a bassi valori di m/z attribuibili alla perdita di struttura terziaria (Figura 1). Dalla sola analisi della forma delle distribuzioni di carica delle proteine CRBP, incentrate sui picchi di ioni con +8 e +9 cariche, non sono quindi emerse differenze di conformazione tra le forme -apo e -olo, evidenziate invece dai dati ottenuti mediante reazione di scambio. Infatti, dai dati ricavati in seguito alla reazione di scambio, è emerso che concentrazioni crescenti di MeOD comportano una diminuzione del numero di atomi di idrogeno scambiati. Tale fenomeno fa ipotizzare che l'aggiunta dell'agente denaturante favorisca la formazione di conformazioni più protette dallo scambio rispetto a quelle native. Ciò nonostante, già a partire dal 10% di MeOD, si assiste alla comparsa graduale, accanto ai segnali delle forme olo, dei picchi relativi alle rispettive apo-proteine, ad indicare che le proteine, pur mantenendo ancora conformazioni piuttosto compatte, iniziano a perdere i propri ligandi.

Si osserva inoltre, che olo-CRBP, olo-CRBP II e olo-CRABP I scambiano, nell'arco della prima ora, un numero di atomi di idrogeno inferiore alle rispettive forme apo. Questo comportamento indica le olo-proteine siano presenti in conformazioni più protette dallo scambio, rispetto alle corrispondenti forme apo. E' inoltre emerso come, in condizioni native, la proteina apo-CRABP I riesca a scambiare, rispetto alle altre due proteine studiate, il maggior numero di atomi di idrogeno, pari al 89% del totale (Figura 2). Questo risultato

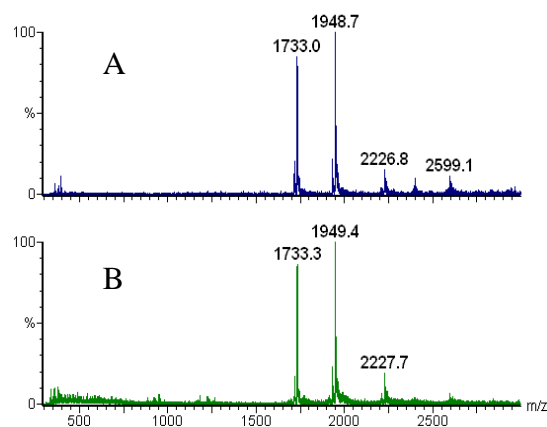


Figura 1. Spettri ESI-MS di apo-CRBP II registrati dopo 1 h, in assenza di metanolo (A) e ad una percentuale del 60 % di metanolo (B).

evidenza come quest'ultima esponga al solvente un numero più elevato di atomi di idrogeno scambiabili.

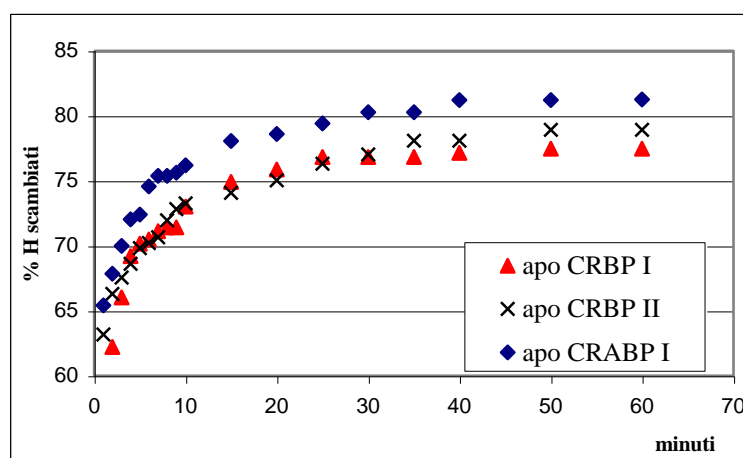


Figura 2. Percentuale di idrogeni scambiati nell'arco di 60 min da CRBP I, CRBP II e CRABP I in forma apo (0% MeOD).

Questo metodo di studio, si inserisce come un potente strumento di indagine nell'ambito della ricerca che concerne la dinamica, la struttura e la funzione di proteine implicate nel rilascio e nell'assunzione intracellulare di molecole, fornendo risultati complementari rispetto ai più comuni metodi di indagine (dicroismo circolare, NMR).

### Riferimenti

- [1] L. Elviri, I. Zagnoni, M. Careri, D. Cavazzini, G.L. Rossi, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 15 (2001) 2186.
- [2] M. Careri, L. Elviri, I. Zagnoni, D. Cavazzini, G.L. Rossi, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 17 (2003) 2773.
- [3] K.R. Babu, A. Moradian, D.J. Douglas, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 12 (2001) 317.

**DETERMINAZIONE DELLE FUMONISINE NEL MAIS E PRODOTTI DERIVATI  
MEDIANTE HPLC-MS/MS**

S. Barbera, C. Cavaliere, E. Pastorini, R. Samperi e A. Laganà\*

Dipartimento di Chimica, Università “La Sapienza”, P.le A. Moro 5, 00185 Roma – Italia

\* [aldo.lagana@uniroma1.it](mailto:aldo.lagana@uniroma1.it)

Le fumonisine sono una classe di micotossine prodotte dal metabolismo di alcuni funghi parassiti appartenenti alla specie *Fusarium* (principalmente *Fusarium moniliforme* e *F. proliferatum*). Tali funghi si sviluppano prevalentemente nelle zone a clima temperato infestando colture cerealicole sia su campo che durante le fasi di raccolta, stoccaggio e lavorazione [1]. Nonostante siano più di 11 le fumonisine fin'ora identificate, quelle di tipo B vengono generalmente rinvenute, nell'ordine di abbondanza  $FB_1 > FB_2$  e  $FB_3 > FB_4$ , in alimenti contaminati [2]. Numerosi studi hanno evidenziato che le fumonisine sono causa di effetti tossici a danno di animali da allevamento e da laboratorio. Le fumonisine sono state inoltre classificate dallo IARC come possibili cancerogeni per l'uomo [3] e studi epidemiologici in Sud Africa e Cina le hanno collegate all'aumento di incidenza di cancro umano all'esofago [1]. Pertanto queste micotossine costituiscono un motivo emergente di preoccupazione a causa dell'elevato rischio tossicologico connesso all'assunzione di alimenti contaminati attraverso la dieta.

Il nostro gruppo di ricerca ha messo a punto un metodo analitico sensibile e accurato, basato sulla cromatografia liquida accoppiata alla spettrometria di massa tandem con ionizzazione elettrospray (HPLC-MS/MS) per la determinazione delle fumonisine  $FB_1$  e  $FB_2$ .

La preparazione del campione consiste nell'estrazione degli analiti da 1 g di matrice (farina di mais, popcorn e cornflakes) mediante omogeneizzazione e filtrazione su  $C_{18}$ , utilizzando acetonitrile/acqua acidificata come solvente, e nella purificazione dell'estratto mediante estrazione in fase solida (SPE). Questa procedura, oltre ad essere rapida ed accurata, consente la parziale rimozione della frazione lipidica dal campione. L'estratto viene purificato mediante Carbograph-4 che per le sue caratteristiche peculiari permette di separare efficacemente gli analiti in studio dagli interferenti, eluendoli selettivamente [4]. In questo modo l'effetto matrice osservato è praticamente assente.

Le condizioni cromatografiche ottimizzate prevedono la separazione in colonna  $C_{18}$  (250x2,1mm i.d.,  $\Phi=200$   $\mu$ L/min) con gradiente di  $H_2O/MeOH$ , 25 mM in acido formico. Per quanto riguarda le condizioni di spettrometria di massa, viene selezionato lo ione  $[M+H]^+$  di ciascuna fumonisina, come precursore, e scelti due ioni frammento per l'acquisizione in modalità MRM (*Multiple Reaction Monitoring*), secondo il criterio di legge stabilito per i metodi di conferma [5].

Per lo studio dell'accuratezza del metodo sono stati utilizzati campioni non contaminati e fortificati con gli analiti a tre diversi livelli di concentrazione nell'intervallo 50-5000 ng/g ottenendo recuperi maggiori del 90% e limiti di rivelabilità  $\leq 5$  ng/g.

Il metodo sviluppato è stato applicato a diversi campioni di mais e a prodotti da esso derivati: farina di mais, popcorn e cornflakes. La fumonisina  $FB_1$  è stata trovata in tutti i campioni analizzati nell'intervallo 600-2000 ng/g per la farina di mais e nell'intervallo 15-80 ng/g per le restanti matrici. La  $FB_2$  è stata rinvenuta solo nei campioni di farina di mais nel range 100-300 ng/g.

Infine, una grossa potenzialità della spettrometria di massa consiste nel potere identificativo nei confronti di composti correlati strutturalmente con classi di sostanze note. Ciò si realizza utilizzando una particolare modalità di acquisizione in MS/MS, a scelta tra “*neutral loss scan*” e “*precursor ion scan*”. L'identificazione è resa ancora più attendibile impiegando uno strumento ibrido di nuova generazione - Q-trap<sup>TM</sup> - che, per la presenza della trappola ionica

lineare, risponde con maggiore sensibilità rispetto ad un quadrupolo e ad una trappola ionica 3-D e con maggiore risoluzione di un quadrupolo, potendo effettuare esperimenti combinati e operare in MS<sup>n</sup> [6]. In questo lavoro è stato impiegato il protocollo *Independent Data Acquisition* (IDA), presente nel software di acquisizione dello strumento, per l'identificazione delle altre due fumonisine di tipo B, FB<sub>3</sub> e FB<sub>4</sub>, i cui standard non sono facilmente reperibili in commercio. Il protocollo IDA è stato applicato a campioni naturalmente contaminati da FB<sub>1</sub> e FB<sub>2</sub>, imponendo la scansione dei precursori che generano la perdita neutra caratteristica di questa classe ([M+H-370]<sup>+</sup>). I precursori sono stati confermati dalla scansione ad alta risoluzione e dalla loro frammentazione in trappola ionica lineare. Nei campioni contaminati da FB<sub>1</sub> e FB<sub>2</sub> è stata riscontrata la presenza dell'FB<sub>3</sub> in concentrazioni confrontabili alla FB<sub>2</sub> e dell'FB<sub>4</sub> solamente a livello di tracce.

### Riferimenti bibliografici

- [1] Turner PC, Nikiema P, Wild CP, *Mut. Res.* **1999**, *443*, 81-93.
- [2] IARC *Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans* IARC: Lyon, France **1993**, *56*, 445.
- [3] Musser SM. *J. Agric. Food Chem.* **1997**, *45*, 1169-1173.
- [4] Laganà A, Curini R, D'Ascenzo G, De Leva I, Faberi A, Pastorini E. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2003**, *17*, 1037-1043.
- [5] Decisione della Commissione 2002/657/CE del 12.08.02, *Gazzetta Ufficiale* 17.08.02 L221/8.
- [6] Xia Y-Q, Miller JD, Bakhtiar R, Franklin RB, Liu DQ. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2003**, *17*, 1137-1145.



**HPLC-MS/MS CON SORGENTE A FOTOIONIZZAZIONE (APPI)  
PER LA DETERMINAZIONE DI BENZIDINE E CLOROANILINE  
NEGLI EFFLUENTI INDUSTRIALI**

*A. Bacaloni, F. Folliero, R. Samperi e A. Laganà\**

*Dipartimento di Chimica Università di Roma “La Sapienza”*

*P.le Aldo Moro, 5 – 00185 ROMA*

*\* [aldo.lagana@uniroma1.it](mailto:aldo.lagana@uniroma1.it)*

Le benzidine e le cloroaniline sono composti chimici riscontrabili in numerosi processi industriali, quali ad esempio l'industria tessile, quella dei pellami e nella produzione dei coloranti. Le benzidine, inoltre, hanno trovato impiego nella produzione di materie plastiche poliuretiche. Il rilascio nell'ambiente di tali sostanze, quindi, appare un evento tutt'altro che improbabile.

Queste sostanze hanno rilevanti implicazioni tossicologiche: alcune sono classificate dalla CE e dallo IARC come cancerogeni accertati (se non addirittura ne è ristretto l'uso) e per quasi tutte le rimanenti permane il sospetto di cancerogenicità. Di conseguenza, il monitoraggio della loro presenza in matrici ambientali – segnatamente nelle acque - e lo studio del loro destino sono importanti per la protezione dell'ambiente e della salute.

Le tecniche analitiche più comuni per la determinazione di queste sostanze in campioni acquosi sono quelle basate su GC ed HPLC. Tuttavia, data la tendenza alla degradazione termica, l'analisi gas-cromatografica diretta risulta essere di difficile applicabilità e si rendono necessarie procedure di derivatizzazione. La cromatografia liquida ad alte prestazioni è una valida alternativa perché non richiede operazioni preliminari di manipolazione del campione. I metodi di rivelazione di benzidine e cloroaniline, usati fino ad oggi in HPLC, sono l'UV, il diode-array ed il rivelatore elettrochimico. L'accoppiamento della spettrometria di massa con l'HPLC non è stato molto utilizzato a causa della scarsa sensibilità sinora ottenuta. Infatti la diclorobenzidina e le di- e tri-cloro aniline sono piuttosto apolari e, quindi, poco ionizzabili. I loro segnali ionici non sono rivelabili mediante interfaccia di ionizzazione ESI e rispondono, invece, debolmente con l'interfaccia APCI.

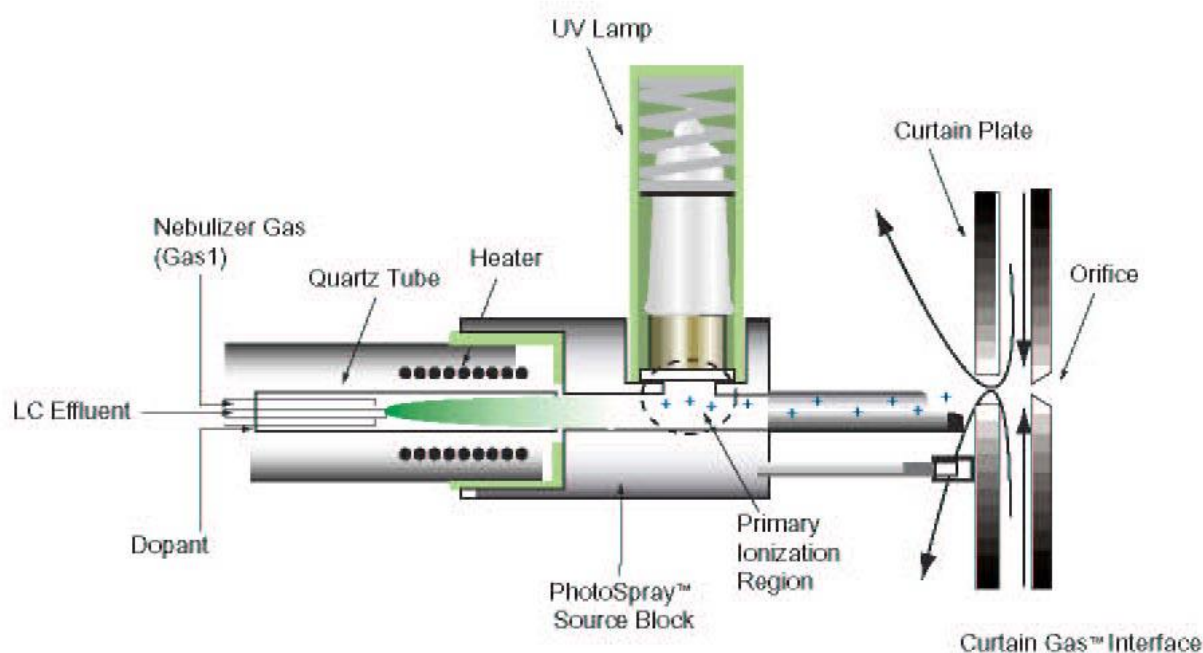
Tuttavia, dato che questi composti tossici devono essere determinati in matrici molto complesse (come gli effluenti industriali) ed a basse concentrazioni, occorre che la tecnica di rivelazione sia molto specifica. Per questo motivo è opportuno ricorrere alla spettrometria di massa come metodo di rivelazione e di conferma per questi analiti.

L'impiego della fotoionizzazione a pressione atmosferica (APPI), un nuovo metodo di ionizzazione per l'HPLC-MS, ha permesso di superare le limitazioni che hanno ostacolato lo sviluppo di metodi analitici per la determinazione di questi composti basati sulla spettrometria di massa.

In questa tecnica di interfacciamento LC-MS, l'effluente HPLC, dopo essere stato vaporizzato, viene irradiato con dei fotoni prodotti da una lampada a raggi UV e, contemporaneamente ai vapori, si aggiunge un agente dopante (anisolo o toluene) in grado di formare, in seguito ad irraggiamento, fotoioni. Successivamente, tramite una serie di reazioni a cascata, si ha il trasferimento della carica alla fase mobile ed, infine, agli analiti. L'impiego di questa sorgente ha permesso di ottenere un apprezzabile miglioramento dell'intensità del segnale utilizzando la cromatografia in fase diretta.

Particolare attenzione è stata posta nello studio dell'influenza del solvente sull'intensità del segnale, data la capacità di soppressione del segnale da parte dei solventi polari nell'APPI, diversamente dai solventi apolari.

Lo schema dell'apparecchiatura è visibile nella figura seguente.



Per quanto riguarda la metodologia di estrazione dei campioni acquosi, è stata sviluppata una procedura di estrazione SPE (Solid Phase Extraction); l'adsorbente scelto è un copolimero stirene/divinilbenzene che, oltre a presentare un elevato sviluppo superficiale, permette di utilizzare solventi apolari, opzione importante se si opera in fase diretta.

Questa procedura permette il recupero quantitativo degli analiti; le condizioni cromatografiche ottimizzate prevedono una eluizione isocratica per 12 minuti con fase mobile A (toluene/isooctano 50:50, v/v) seguita da un veloce gradiente (1 minuto) sino alla fase B (toluene con 1% di isopropanolo) per permettere l'eluizione della benzidina.

Di ciascun analita è stato scelto come ione precursore la specie  $M^{+\bullet}$  oppure  $[M+H]^+$  o entrambi per l'esperimento di doppia spettrometria di massa. Conseguentemente alla scelta dei frammenti caratteristici, l'analisi quantitativa è stata effettuata in modalità MRM (Multi Reaction Monitoring).

Il metodo sviluppato evidenzia una buona linearità (da 0.02 a 100 ng iniettati), recuperi elevati (> 80%) e limiti di rivelabilità compresi tra 0,02 e 0.1 ng iniettati).

Questa procedura presenta due interessanti vantaggi: la manipolazione del campione è ridotta al minimo, minimizzando pertanto il rischio di esposizione dell'operatore a queste sostanze tossiche; inoltre, viene eliminato lo stadio critico di evaporazione del campione, fattore questo che comporta in generale (e, nel nostro caso, in modo evidente) irriproducibilità nei risultati.

#### Riferimenti bibliografici

- S. Lacorte, M.C. Perrot, D. Fraisse, D. Barcelò, J. Chromatogr. A, 833 (1999), 181-194.
- L. Muller, E. Fattore, E. Benfenati, J. Chromatogr. A, 791 (1997), 221-230.
- S. Lacorte, T. Vinhas, P. Viana, D. Barcelò, J. Chromatogr. A, 879 (2000), 13-26.
- M.C. Gennaro, E. Marengo, V. Gianotti, S. Angioi, J. Chromatogr. A, 945 (2002), 287-292.

## SPETTROMETRIA DI MASSA PER LO STUDIO DEL PROFILO DEI METABOLITI GLICOSILATI DI ISOFLAVONI

*M.L. Antonelli, A. Faberi, G. Fago, P. Foglia e A. Laganà\**

*Dip. di Chimica - Università di Roma "La Sapienza"*

*P.le A. Moro 5, 00185 Roma*

*\* [aldo.lagana@uniroma1.it](mailto:aldo.lagana@uniroma1.it)*

Gli isoflavoni, una delle principali classi tra i fitoestrogeni, sono composti difenolici presenti in molte piante commestibili e particolarmente abbondanti nei legumi (1). Data la loro accertata azione estrogenica, anti-estrogenica, anti-cancerogena e anti-ossidante negli animali e nell'uomo (2-4), risulta di grande interesse la loro determinazione, sia nella pianta intera che nell'estratto.

E' necessario considerare due aspetti analitici: il contenuto totale in isoflavoni e il pattern di distribuzione tra le varie forme glicosilate. Il più comune approccio per la misura del contenuto totale di isoflavoni è quello di condurre un'idrolisi acida o alcalina seguita dall'analisi cromatografia (5,6). Tuttavia, in questo modo tutte le informazioni riguardo la presenza dei composti ricercati in forma glicosilata si perdono. Sebbene la spettrometria di massa tandem sia una tecnica di comprovata affidabilità per l'identificazione e quantificazione di molecole biologiche, nel caso dell'analisi dei metaboliti glicosilati degli isoflavoni la difficoltà nel reperire gli standard di riferimento, nonché la loro tendenza alla rapida degradazione, costituisce un ostacolo per la loro determinazione.

L'impiego di strumenti di ultima generazione, che utilizzano protocolli di acquisizione "intelligenti", in grado di cambiare la modalità d'acquisizione nel corso di una separazione cromatografica, ha permesso di superare questa limitazione. I glucosidi, infatti, sono molecole che frammentano facilmente già in sorgente, cosicché nello spettro MS è sempre visibile il frammento della loro porzione agliconica, anche utilizzando tecniche di ionizzazione "soft" quale l'ESI e bassi potenziali di declustering. La presenza nello spettro MS di un frammento con rapporto m/z pari a quello caratteristico di un isoflavone aglicone è stata utilizzata quindi come criterio di screening, per identificare i metaboliti glicosilati.

Estratti metanolici di soia e di vari altri tipi di legumi, dopo essere stati sottoposti a clean-up per eliminare la frazione lipidica e proteica sono stati analizzati, previa separazione cromatografica, mediante spettrometria di massa utilizzando uno spettrometro di massa ibrido quadrupolo-tempo di volo (Q-TOF), caratterizzato da elevata risoluzione ed accuratezza.

Lavorando in modalità di acquisizione Parent Survey Scan, inizialmente veniva effettuata una scansione su un ampio range di masse (200-1000 m/z) per individuare negli spettri ottenuti la presenza di un frammento con massa pari a quella dello ione pseudomolecolare di un isoflavone aglicone. Quando questo veniva trovato, lo strumento automaticamente commutava in modalità MS-MSTOF, e selezionava a turno nel quadrupolo, tutti frammenti dello spettro con m/z superiore a quello del frammento.

La scansione del range di massa del precursore era condotta a due diverse energie di collisione (CE). Una bassa CE (15 eV) che induceva una debole frammentazione e permetteva di identificare solo il precursore ed il prodotto (glicosilato e aglicone); mentre un'alta CE (30 eV), inducendo una maggiore frammentazione, permetteva l'identificazione del tipo di aglicone coniugato.

Gli isoflavoni, infatti, presentano un caratteristico pattern di frammentazione che può essere usato per confermarne l'identità, discriminando le varie forme isomeriche.

Applicando tale metodica a campioni di soia, piselli ed altri legumi, è stato possibile identificare i principali isoflavoni (DAID daidzein; GEN Genistein; GLY Gliciteina;

BIOCHAN-A Biocanina A), i loro derivati glicosilati (glucoside-, acetyl-glucoside-, malonyl-glucoside-) nonché tracciare il profilo di distribuzione delle varie forme glicosilate per gli isoflavoni presenti nei campioni esaminati.

#### **Riferimenti bibliografici**

1. W.M. Mazur, J.A. Duke, K. Wähälä, S. Rasku and H. Aldercreutz, *Nutritional Biochemistry* 9 (1998) 193
  2. J.N. Davis, O. Kucuk, F.H. Sarkar, *Mol. Carcinog.* 34 (2002) 91.
  3. D. Wang, J. Gutkowska, M. Marcinkiewicz, G. Rachelska, M. Jankowski, *Cardiovasc. Res.* 57, (2003)186.
  4. S. Zhou, G. Turgeman, E. Harris Stephen, C. Leitman Dale, S. Komm Barry, V.N. Bodine Peter, D. Gazit, *Mol. Endocrinol.* 17 (2003). 56.
  5. T. Cornwell, W. Cohick, I. Raskin, *Phytochemistry* 65 (2004) 995.
- J.Liu, J.E Burdette, H. Xu, C. Gu,., van Breemen, R.B., Bhat, K.P., N. Booth, A.I. Constantinou, J.M. Pezzuto, H.H. Fong, N.R. Farnsworth, J.L. Bolton, *J. Agric. Food Chem.* 49 (2001) 2472.

**COMUNICAZIONI POSTER**

**CHEMIOMETRIA**

## ANALISI DRIFTS PER LA CLASSIFICAZIONE DI MIELI UNIFLORALI

*Bertelli D, Plessi M.*

*Dipartimento di Scienze Farmaceutiche, Università degli Studi di Modena e Reggio Emilia  
Via Campi 183, 41100 Modena*

In Italia esiste una produzione di mieli uniflorali estremamente varia, circa 60-70 tipi. Solo una decina di questi viene prodotta in quantità tali da poter essere reperita nella grande distribuzione, fra i più comuni ricordiamo: agrumi, castagno, robinia (acacia), tarassaco e tiglio. Questi mieli trovano una collocazione privilegiata grazie al fatto che rappresentano prodotti differenziati e tipizzati, con ottime possibilità di stimolare i consumatori. La denominazione botanica dei mieli rappresenta quindi un ottimo strumento di valorizzazione.

Tale denominazione dovrebbe richiedere ovviamente una certificazione d'origine, che oggi non è prevista. La metodica oggi più utilizzata per il riconoscimento dei mieli uniflorali, oltre alla degustazione da parte di esperti, è l'analisi melissopalnologica, cioè l'analisi dei pollini che si riscontrano nei vari tipi di mieli; esistono inoltre parametri analitici di base, che possiedono valore discriminante solo per pochi casi, ad esempio la rotazione specifica è utile per il riconoscimento dei mieli di melata, e che in genere non risultano risolutivi per una corretta identificazione.

Allo scopo, quindi, di valutare la possibilità di sviluppare un metodo analitico strumentale obiettivo utile alla discriminazione dei mieli uniflorali, nel presente lavoro si presenta un primo approccio all'analisi DRIFTS (Diffuse Reflectance Infrared Fourier Transformed Spectroscopy) di mieli uniflorali. Gli spettri ottenuti con tale metodica sono stati sottoposti ad analisi statistica multivariata al fine verificare la classificabilità in base ai risultati spettrali.

### **Preparazione dei campioni**

Sono stati sottoposti ad analisi 40 campioni di miele di certa provenienza: 15 campioni di miele di robinia (Acacia), 10 di Castagno, 5 di agrumi e 10 campioni di miele millefiori. Un grammo esattamente pesato di ogni campione è stato diluito a 100 ml con acqua bidistillata, quindi 4 ml di tale soluzione addizionati con 900 mg di potassio bromuro per spettroscopia, sono stati liofilizzati. Il liofilizzato ottenuto è stato sottoposto dopo breve mescolamento all'analisi DRIFTS.

### **Acquisizione e trasformazione degli spettri**

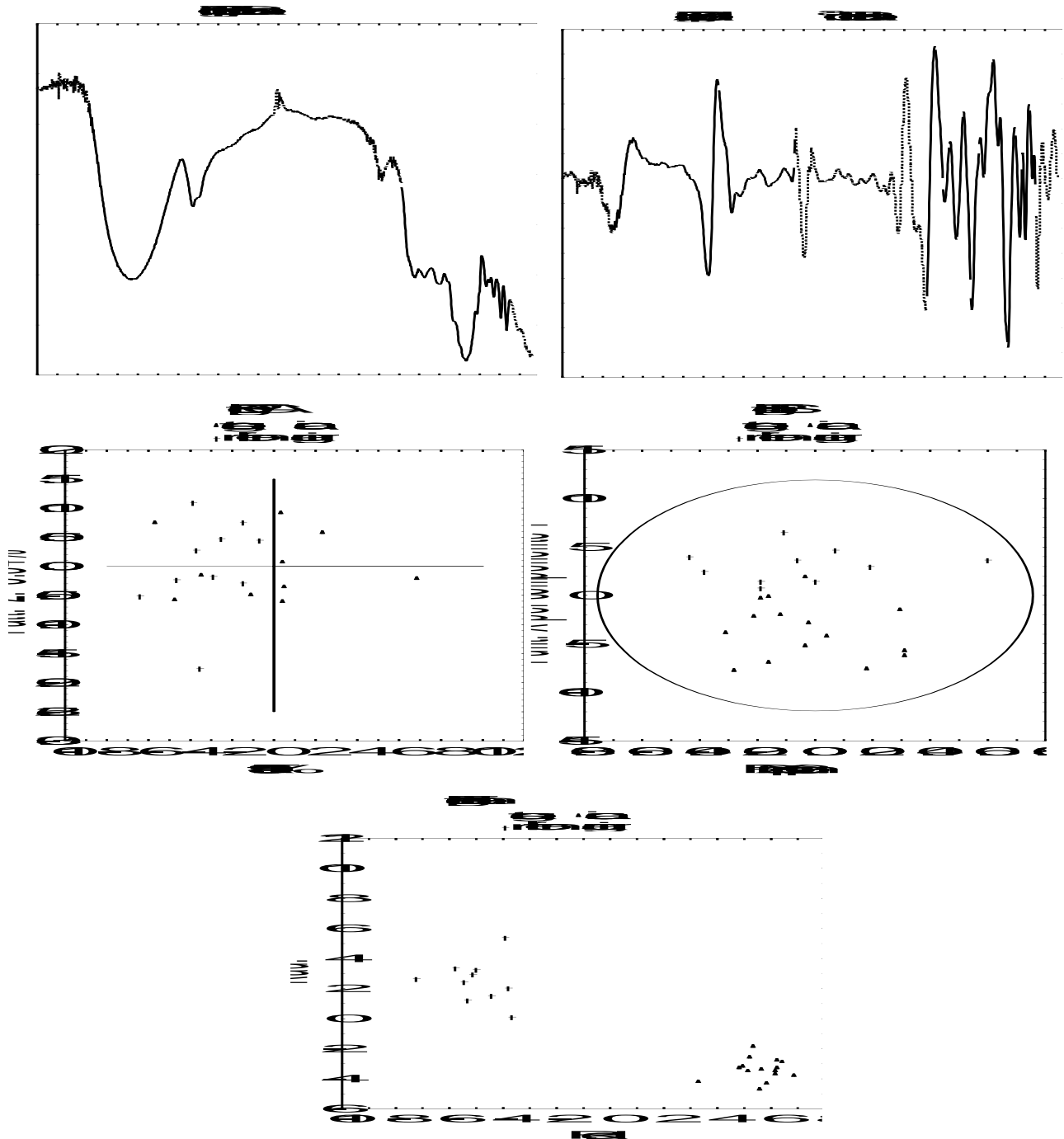
Gli spettri vengono acquisiti nell'intervallo spettrale 4000-600  $\text{cm}^{-1}$  con risoluzione di 4  $\text{cm}^{-1}$ . Gli spettri ottenuti sono stati sottoposti a analisi statistica come tali o dopo trasformazione mediante l'algoritmo di Kubelka-Munk, sono stati anche valutati i corrispondenti spettri di derivata 2<sup>a</sup>. In figura 1 e 2 a titolo di esempio sono riportati un tipico spettro non trasformato di un campione di miele di robinia e la sua derivata 2<sup>a</sup>, le parti a linea intera corrispondono alle lunghezze d'onda utilizzate per l'analisi statistica i punti nel grafico di derivata alle variabili selezionate per l'analisi discriminante.

### **Analisi statistica**

I data set ottenuti dagli spettri sono stati analizzati mediante diverse tecniche: analisi fattoriale, analisi delle principali componenti, PLS, analisi discriminante canonica.

In figura 3 è riportato il plot delle prime due componenti principali relativo agli spettri di derivata 2<sup>a</sup>, ottenuto mediante analisi PCA sulle variabili che dopo analisi fattoriale mostravano pesi fattoriali superiori a 0.9. In figura 4 è riportato il grafico per le stesse variabili ottenuto mediante metodo PLS.

In figura 5 è riportato invece il risultato ottenuto mediante analisi discriminante sui dati relativi alle variabili rappresentative degli spettri di derivata 2<sup>a</sup>.



### Risultati

Il miglior risultato è stato ottenuto come evidente dalla figura 5 mediante l'applicazione della tecnica di analisi discriminante che è in grado di classificare correttamente tutti i campioni, questo risultato è stato confermato dalla validazione incrociata effettuata mediante il metodo della singola esclusione. Tuttavia le altre tecniche statistiche pur meno efficaci a scopo classificatorio potranno essere utilizzate per studi in relazione alla composizione chimica dei mieli.

### Bibliografia

- 1) Atti del convegno finale Il ruolo della ricerca in apicoltura, Bologna marzo 2002
- 2) Henrion & Henrion (1994) Multivariate datenanalyse. Berlin: Springer-Verlag

**MULTI-WAY PLS REGRESSION APPLICATA ALLO STUDIO DELLE  
RELAZIONI TRA LA FRAZIONE VOLATILE ED I PARAMETRI SENSORIALI  
DURANTE IL PROCESSO DI INVECCHIAMENTO DELL' ACETO BALSAMICO  
TRADIZIONALE DI MODENA**

*Marina Cocchi <sup>a</sup>, Caterina Durante <sup>a</sup>, Margherita Grandi <sup>a</sup>, Andrea Marchetti <sup>a</sup>, Daniela Manzini <sup>b</sup>, Simona Sighinolfi <sup>a</sup> and Rasmus Bro <sup>c</sup>*

<sup>a</sup> *Dipartimento di Chimica, Università di Modena e Reggio Emilia,  
Via Campi 183, 41100 Modena, Italy*

<sup>b</sup> *Dipartimento di Scienze Agrarie, Università di Modena e Reggio Emilia,  
Via Kennedy 17, 42100 Reggio Emilia*

<sup>c</sup> *Department of Dairy and Food Science, The Royal Veterinary and Agricultural University,  
Rolighedsvej 30, DK-1958 Frederiksberg, Denmark*

L'Aceto Balsamico Tradizionale di Modena (ABTM) è un prodotto regionale tipico insignito della denominazione d'origine protetta (DOP) nell'anno 2000. E' ottenuto a partire da mosto cotto di uve selezionate per fermentazione acetica e bio-ossidazione alcolica. Subisce un lungo invecchiamento in serie di botticelle di legno di differente qualità e capacità. Ogni anno viene sottoposto alla procedura dei rinalzi che consiste nel trasferire un'aliquota di prodotto dalla botticella precedente a quella immediatamente successiva, in ordine decrescente d'età. La botticella più giovane viene rinalzata con mosto cotto fresco. La commercializzazione del prodotto richiede l'approvazione da parte di un Panel di Maestri Assaggiatori esperti, educati dall'Autorità competente.

Questo lungo periodo di invecchiamento e la peculiarità della procedura tradizionale rende questo prodotto molto interessante come banco di prova per nuove procedure analitiche.

In particolare, diverse fonti di variabilità devono essere contemporaneamente considerate per avere una visione generale delle caratteristiche del prodotto e del processo di invecchiamento, quali le diverse acetaie, le diverse botticelle in una serie, il giudizio dei diversi Maestri Assaggiatori.

In questo studio i metodi multi-way di analisi dei dati, quale N-PLS [1], sono stati impiegati per studiare la relazione tra la frazione volatile del prodotto, campionata e analizzata mediante la metodica SPME/GC/MS, ed il profilo sensoriale ottenuto dai diversi Maestri Assaggiatori. Gli obiettivi principali della ricerca sono: a) lo studio della variazione delle caratteristiche sia compositive che sensoriali del prodotto durante il processo di invecchiamento; b) l'individuazione di possibili markers di invecchiamento; e c) la costruzione di modelli in grado di prevedere le caratteristiche sensoriali sulla base dei tracciati gas-cromatografici della frazione volatile. Infatti, è fortemente sentita la necessità di affiancare metodologie analitiche oggettive alla valutazione sensoriale, che, pur se tradizionalmente efficace, rimane soggettiva. In questo studio sono stati considerati 36 campioni di aceto balsamico tradizionale campionati da una serie di sei diverse acetaie, ogni serie essendo costituita da una sequenza di sei botticelle. Un Panel di otto esperti Maestri Assaggiatori, ha valutato ciascuno dei 36 campioni, rispetto ai 13 parametri sensoriali presenti nella scheda di degustazione del prodotto.

La frazione volatile è stata campionata mediante la tecnica della micro-estrazione in fase solida (SPME) utilizzando una fibra mista Carboxen/PDMS; le condizioni di estrazione sono state scelte in modo da mimare le condizioni che si verificano durante la valutazione olfattiva del prodotto, ovvero la fibra è stata esposta allo spazio di testa ad una temperatura di 40°C.

I tracciati gas cromatografici sono stati acquisiti a frequenza costante per un totale di 59 minuti (Varian 3400, FID detector) con una colonna apolare. I segnali risultano di uguale lunghezza per tutti i campioni pari a 6990 punti.



La natura multidimensionale del set di dati analizzato nasce dalla presenza di diverse fonti di variabilità sia relativamente al blocco delle variabili indipendenti X, dovute allo studio dei segnali cromatografici di 6 diverse botticelle per 6 diverse acetaie, sia per quanto riguarda il blocco delle variabili dipendenti Y, dove abbiamo i 36 campioni delle diverse botticelle e delle diverse acetaie, valutati rispetto a 13 parametri sensoriali, da 8 diversi giudici. Per questo motivo è stata pianificata una strategia di analisi dei dati dove i risultati ottenuti con l'applicazione di metodi di unfolding sono stati confrontati con il metodo N-PLS, che consente di operare l'analisi di regressione tenendo direttamente conto della natura multidimensionale dei dati. Sono stati ottenuti modelli di regressione soddisfacenti che hanno messo in evidenza come la frazione volatile contenga informazioni rilevanti ai fini del processo di maturazione e invecchiamento dell'ABTM. Inoltre la possibilità di prevedere correttamente il profilo sensoriale è rilevante ai fini dell'autenticazione del prodotto.

[1] R.Bro, Multi-way Calibration. Multi-linear PLS, *J.Chemom.*, 1996, 10 (1), 47-62

## IMPIEGO DEL DISEGNO SPERIMENTALE PER L'OTTIMIZZAZIONE DELLA MICROESTRAZIONE IN FASE SOLIDA DI PESTICIDI DA ACQUA POTABILE

F. Bianchi <sup>a</sup>, M. Careri <sup>a</sup>, R. Fumagalli <sup>b</sup>, A. Mangia <sup>a</sup>, M. Musci <sup>a</sup>

<sup>a</sup> Dipartimento di Chimica Generale ed Inorganica, Chimica Analitica, Chimica Fisica, Università degli Studi di Parma, Parco Area delle Scienze 17/A, 43100 Parma

<sup>b</sup> A.R.P.A. Lombardia - Dipartimento Provinciale di Lecco  
Via I° Maggio 21/b, 23848 Oggiono (LC)

La tecnica della microestrazione in fase solida (Solid Phase Micro Extraction, SPME) rappresenta una valida alternativa alle tradizionali tecniche liquido-liquido per l'estrazione di pesticidi da acqua. Infatti tale tecnica è semplice, di facile utilizzo, non richiede l'impiego di solventi né di strumentazioni complesse o dedicate e può essere facilmente automatizzata. Sulla base di tali considerazioni, negli ultimi anni sono stati sviluppati molti metodi di estrazione di pesticidi da campioni di acque basati sulla tecnica SPME [1-5]. Questi lavori sono volti allo studio dei parametri strumentali che possono influenzare la resa del processo estrattivo, quali la natura della fase stazionaria che riveste la fibra, la durata e la temperatura dell'estrazione, l'agitazione, il pH, la forza ionica ecc, allo scopo di individuare le condizioni sperimentali in grado di ottimizzare la resa di estrazione.

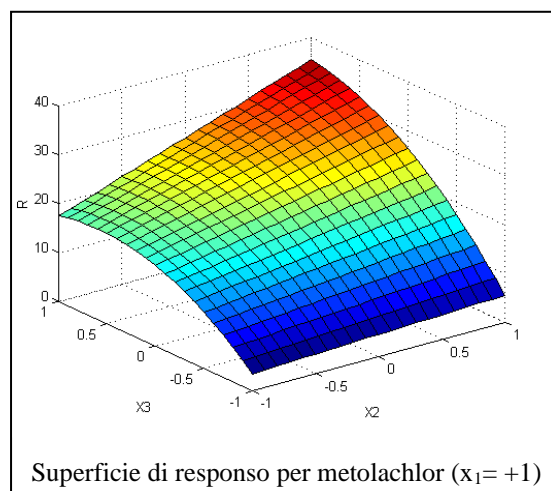
Nella maggior parte dei lavori presenti in letteratura [1-3], a parte poche eccezioni [4,5], la ricerca delle condizioni ottimali viene effettuata mediante un approccio di tipo OVAT (One-Variable-at-A-Time), secondo il quale, una volta ottimizzate le condizioni sperimentali relative ad uno dei parametri considerati, si procede con lo studio degli effetti di un altro parametro. Questo tipo di approccio presenta alcuni limiti: infatti, pur richiedendo l'esecuzione di un numero elevato di esperimenti, non permette di ottenere un modello matematico in grado di definire in maniera oggettiva e quantificabile la relazione fra le variabili considerate e la risposta, in questo caso la resa di estrazione.

Nel presente lavoro l'ottimizzazione delle condizioni sperimentali per l'estrazione SPME di 18 pesticidi appartenenti a diverse classi chimiche, impiegati come insetticidi ed erbicidi, è stata condotta utilizzando un disegno sperimentale di tipo Centrale Composito a Facce Centrate (Face Centered-Central Composite Design, FC-CCD) [6]. Sono stati considerati tre fattori: la temperatura di estrazione ( $x_1$ ), il tempo di estrazione ( $x_2$ ) e la concentrazione di NaCl aggiunto al campione ( $x_3$ ). Ogni fattore è stato valutato a tre diversi livelli ( $x_1 = 30-70^\circ\text{C}$ ;  $x_2 = 15-45$  min;  $x_3 = 0-40\%$ ).

L'estrazione SPME è stata seguita da analisi gascromatografica con rivelatore ECD.

L'elaborazione dei dati ottenuti dall'esecuzione dei 19 esperimenti complessivamente richiesti dal piano sperimentale ha consentito di ottenere per ognuno degli analiti in esame una funzione polinomiale in grado di descrivere la relazione fra i parametri considerati e la resa di estrazione, permettendo di valutare gli effetti principali e di interazione delle variabili in esame e gli effetti responsabili della curvatura delle superfici di responso.

I modelli di regressione così ottenuti sono stati



quindi utilizzati per individuare per ogni analita le condizioni di estrazione ottimali all'interno del dominio sperimentale considerato.

Per tutti i pesticidi in esame le condizioni ottimali di estrazione sono risultate corrispondere al valore massimo di temperatura ( $x_1 = 70^\circ\text{C}$ ) e di durata ( $x_2 = 45$  min) del processo estrattivo nell'ambito del dominio sperimentale. Per quanto riguarda l'effetto dell'aggiunta di sale sono stati evidenziati due comportamenti opposti, che hanno permesso di raggruppare gli analiti in due classi distinte in relazione alla polarità. In particolare, per gli analiti più polari le condizioni ottimali di estrazione sono state ottenute in corrispondenza dell'aggiunta alla matrice del 40% di NaCl, mentre per gli analiti meno polari le condizioni ottimali per l'estrazione sono state ottenute operando in assenza di sale.

### Riferimenti

- [1] J. Beltran, F.J. López, F. Hernández, *J. Chromatogr. A* 885 (2000) 389.
- [2] P. Pérez-Trujillo, S. Frías, J.E. Conde, M.A. Rodríguez-Delgado, *J. Chromatogr. A* 963 (2002) 95.
- [3] G. Gonçalves, M.F. Alpendurada, *J. Chromatogr. A* 963 (2002) 19.
- [4] C. Aguilar, A. Peñalver, E. Pocurull, J. Ferré, F. Borrull, R.M. Marcé, *J. Chromatogr. A* 844 (1999) 425
- [5] R. Batlle, C. Sanchez, C. Nerin, *Anal. Chem.* 71 (1999) 2417.
- [6] F. Bianchi, M. Careri, E. Marengo, M. Musci, *J. Chromatogr. A*, 975 (2002) 113.

**COMUNICAZIONI POSTER**

**EQUILIBRI IN SOLUZIONE**

**IL POTENZIALE REDOX DELLA COPPIA Ti(IV, III) A 25°C NEL MEZZO  
HCl 1 M NaCl 2 M**

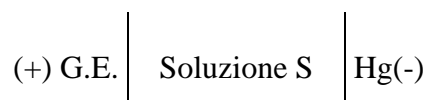
*Diana Amorello, Vincenzo Gambino, Vincenzo Romano, Roberto Zingales*

*Università di Palermo – Dipartimento di Chimica Inorganica e Analitica “Stanislao Cannizzaro” Viale delle Scienze - Parco d’Orleans II - 90128 Palermo*

L’ottenimento di specie iperossidate ( $\text{Ag}^{2+}$  [1],  $\text{Co}^{3+}$  [2],  $\text{Ce}^{4+}$  [3]) ed ipoossidate ( $\text{Cr}^{2+}$  [4],  $\text{V}^{2+}$  [5],  $\text{U}^{3+}$  [6],  $\text{Yb}^{2+}$ [7]) in soluzioni acquose abbastanza stabili da permettere lo studio della loro chimica, in particolare gli equilibri ossidoriduttivi, riveste particolare interesse per differenti settori della Chimica; a tale categoria appartengono anche Ti (III), Ti (II), Ti (-I), Ti(-II). La titanometria ad esempio è basata sull’uso di soluzioni cloridriche di Ti (III), per determinazioni volumetriche di  $\text{Fe}^{3+}$  e di alcune sostanze organiche (nitro, nitroso, azocoloranti) [8]. Le soluzioni cloridriche di Ti (III) subiscono facilmente la ossidazione da parte dell’aria e di  $\text{H}^+$  e questa è una delle ragioni dei differenti valori riportati per il potenziale di ossidoriduzione della coppia Ti (IV, III) [9, 10]. Ancora più ossidabile risulta Ti(II), come il valore di -0.37 V riportato per la coppia Ti (III, II) lascia prevedere [11]. L’ottenimento di soluzioni relativamente stabili di tale specie sicuramente richiede condizioni di temperatura inferiore anche a 0°C [1, 2, 3, 7].

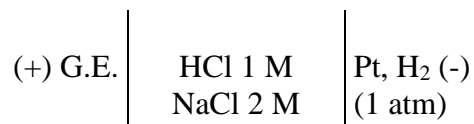
Nell’ambito di indagini in soluzione sulle specie ipoossidate del Titanio questa comunicazione riporta lo studio del potenziale redox della coppia Ti (IV, III) nel mezzo NaCl 2 M, HCl 1 M a 25°C.

Miscela di Ti (III) ottenuto per dissoluzione a caldo in HCl ridistillato di quantità pesate di titanio metallico estremamente puro, e di Ti (IV) ottenuto per ossidazione elettrolitica del Ti (III), sono state utilizzate nella cella:



Con G.E. = Elettrodo a vetro e S = a M  $\text{TiCl}_3$ ; b M  $\text{TiCl}_4$ ; 1 M HCl; (2-3a-4b) M NaCl

La misura accurata a 25°C, in ambiente inerte, della fem in un intervallo di valori della concentrazione di tali miscele (5-50 mM in Titanio totale) ha permesso di ottenere il valore di  $0.009 \pm 0.001$  V quale potenziale redox formale della coppia Ti(IV, III) nel mezzo NaCl 2 M, HCl 1 M nella scala dell’elettrodo standard ad idrogeno preso uguale a zero a 25°C nel mezzo indicato. Tale conversione è stata effettuata tramite misure di fem della cella:



L’esperienza acquisita in tale ricerca dovrebbe permettere di affrontare lo studio della chimica in soluzione del Ti (II), attenuando la sua estrema ossidabilità da parte di  $\text{H}^+$ , conducendo le misure in un set di celle simile a quello sopra riportato eventualmente a bassa temperatura (0; -5°C) come nel caso della coppia Yb(III, II) [7].

**Bibliografia:**

- [1] G. Biedermann, F. Maggio, V. Romano, R. Zingales, *Acta Chem. Scand.*, **A 35**, 287 (1981)
- [2] G. Biedermann, S. Orecchio, V. Romano, R. Zingales, *Acta Chem. Scand.*, **A 40**, 161 (1986)
- [3] R. Zingales, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, 229 (1990)
- [4] G. Biedermann and V. Romano, *Acta Chem. Scand.* **A 29**, 615 (1975)
- [5] M. Fiore, S. Orecchio, V. Romano, R. Zingales, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* 799 (1993)
- [6] S. Orecchio, D. Piazzese, V. Romano, R. Zingales, *Ann. Chim. (Rome)* **88**, 129 (1998)
- [7] D. Amorello, V. Romano, R. Zingales, *Ann. Chim. (Rome)*, in corso di pubblicazione
- [8] A. I. Vogel, “*Quantitative Inorganic Analysis*”, - Longmans (1961) 331
- [9] I. M. Kolthoff, *Rec. Trav. Chim. Pays-Bas* **43**, 768 (1924)
- [10] J. J. Lingane “*Electroanalytical Chemistry*”, Interscience Publishers, N.Y. (1958)
- [11] G. S. Forbes, L. P. Hall, *J. Amer. Chem. Soc.*, **46**, 385 (1924)

**AGGREGATI MISTI DI SALI SODICI DI ACIDI BILIARI**

*Emilio Bottari, Alessio Buonfigli e Maria Rosa Festa*

*Dipartimento di Chimica, Edificio Cannizzaro, Università “La Sapienza”,  
P.le A. Moro 5, 00185 Roma.*

La vasta indagine condotta in precedenza sui sali sodici degli acidi biliari ha permesso di mettere in evidenza il differente comportamento fra i composti di- idrossicolanici ed i tri-idrossicolanici.

I primi hanno mostrato tendenza a formare aggregati micellari molto voluminosi con numeri di aggregazione dell'anione vicini al centinaio e molto spesso multipli di tre. Questa tendenza era meno spiccata per il desossicolato (DC), ma molto più pronunciata per i coniugati con glicina e taurina, soprattutto per il taurodesossicolato (TDC) che presentava numeri di aggregazione nell'anione sempre multipli di tre.

Questa spiegazione dei dati sperimentali trovava un supporto determinante da indagini di tipo strutturale come la diffrazione a raggi x, da cui si poteva constatare che le fibre tirate da soluzioni ad incipiente gelificazione avevano struttura elicoidale, con unità strutturale di base costituita da un trimero.

I tri- idrossicolanici si comportavano in maniera del tutto differente.

Essi formavano aggregati micellari più piccoli, arrivando all'incirca a numero di aggregazione 20 per una concentrazione poco meno di  $0,100 \text{ mol dm}^{-3}$  ed, al contrario dei precedenti, le loro micelle avevano numeri di aggregazione pari.

In questa comunicazione gli autori focalizzano l'analisi su soluzioni contenenti i sali di sodio sia di un di- idrossicolanico (glicodesossicolato) che di un tri- idrossicolanico (glicocolato).

Soluzioni contenenti rapporti differenti dei due sali biliari sono state analizzate a  $25^\circ\text{C}$  ed in mezzo ionico costante costituito da  $0,750 \text{ mol dm}^{-3}$  di  $\text{N}(\text{CH}_3)_4\text{Cl}$ , che permetteva di variare entro ampi limiti le concentrazioni dei reagenti minimizzando le variazioni dei coefficienti di attività.

Misure di solubilità dei sali di piombo (II) mettevano in evidenza un aumento di solubilità rispetto a quella dei singoli sali presenti da soli in soluzione.

Misure di forza elettromotrice (f.e.m.) erano condotte con elettrodi di vetro, uno rispondente allo ione sodio e l'altro rispondente allo ione idrogeno e con un elettrodo ad amalgama di piombo per misurare la concentrazione libera degli anioni  $\text{GDC}^-$  e  $\text{GC}^-$ .

Dai primi risultati si può supporre che vengono a formarsi micelle con numeri di aggregazione minori rispetto a quelli osservati per il glicodesossicolato ( $\text{GDC}^-$ ) ed in cui entrano anche il glicocolato e, naturalmente, ioni sodio.

Ulteriori serie di misure e un più completo trattamento dei dati sperimentali che sarà affinato mediante un adatto programma di calcolo, permetterà di ottenere un quadro completo ed analitico del sistema.

## PROPRIETÀ ACIDO-BASE DELLA (POLI)ETILENEIMMINA

Francesco Crea, Pasquale Crea, Alessandro De Robertis e Silvio Sammartano

Dipartimento di Chimica Inorganica, Chimica Analitica e Chimica Fisica  
Università degli Studi di Messina, Salita Sperone. 31. I-89166 Messina, Vill. S. Agata

Tra i differenti composti che si ottengono dalla polimerizzazione dell'etilenediammina ve ne è uno, il BPEI [Branched (Poly)Ethylene Imine], che presenta una struttura ramificata e contiene il 50% di gruppi amminici secondari ed il 25% di gruppi amminici primari e terziari. Per la sua particolare struttura, il polimero ha numerose applicazioni, tra le quali in campo ambientale per il trattamento di acque e siti inquinati ed in quello farmaceutico-industriale per purificare le proteine legate al DNA, come agente flocculante e per immobilizzare i batteri.

In letteratura sono presenti diversi articoli [1-5] che trattano dello studio e della interpretazione delle proprietà chimico-fisiche di differenti PEI (lineari, ramificati, dendrimeri) basati sul modello sito-legame di Ising [5], specialmente per quanto riguarda le correlazioni tra la struttura e la protonazione degli ammino gruppi; di contro non sono riportati dati quantitativi, tra l'altro, sulla protonazione del PEI.

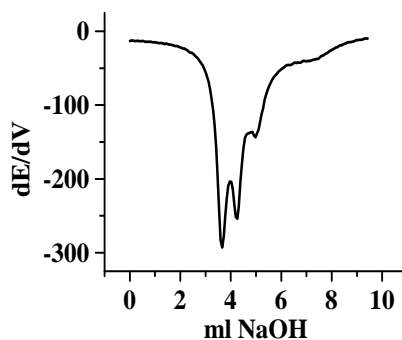
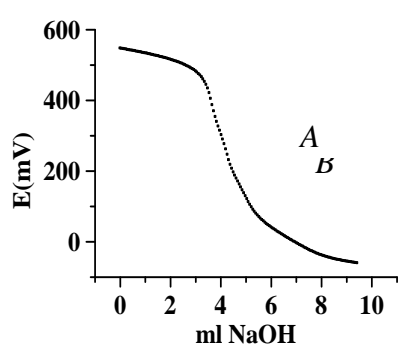


Fig. 1 – Titolazione alcalimetrica

In questa comunicazione riportiamo i risultati di uno studio potenziometrico (elettrodo  $H^+$ -ISE) e calorimetrico sulla termodinamica di protonazione ( $\log K_n^H$ ,  $\Delta H_n$ ,  $n$  = numero di protoni legati) del BPEI, condotto a  $T =$

25 °C e a differenti valori di forza ionica (NaCl). Il legante utilizzato è quello commerciale Fluka (peso molecolare medio = 750 KDa). Le titolazioni alcalimetriche (Fig. 1A:  $E$  vs. ml titolante; Fig. 1B:  $dE/dV$  vs. ml titolante) sono state condotte su soluzioni contenenti il legante, NaCl ed un eccesso di HCl standard, quest'ultimo aggiunto per protonare totalmente i gruppi amminici e per determinare il valore di  $E^\circ$  della catena elettrodica. I dati potenziometrici sono stati interpretati in accordo con l'equazione modificata di Henderson-Hasselbach [6] e con l'equazione proposta da Högfeld [7].

Tab. 1 – Costanti di protonazione di BPEI.  
 $I=0.1 \text{ mol L}^{-1}$ . SD in parentesi.

	$\alpha=0$	$\alpha=1$
$\log K_1^H$	2.601(7)	2.445(5)
$\log K_2^H$	5.93(1)	5.68(1)
$\log K_3^H$	8.4393(6)	7.76(1)
$\log K_4^H$	9.73(1)	9.28(7)

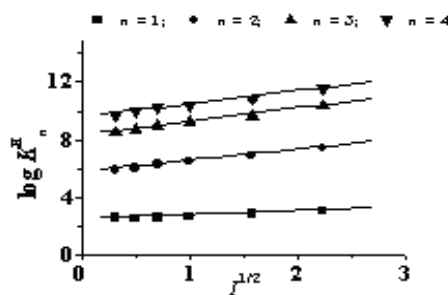


Fig. 2 –  $-\log K_n^H$  vs.  $(I/\text{mol L}^{-1})^{1/2}$



La Tab. 1 riporta i valori delle costanti di protonazione ( $\pm$  SD) ottenute ad  $I = 0,1$  mol L<sup>-1</sup> (NaCl),  $\alpha = 0$  ed  $\alpha = 1$ ; analoghi calcoli sono stati condotti per determinare i valori di  $\log K_n^H$  ad  $I = 0,25$ ;  $0,50$ ;  $1,0$  e  $5,0$  mol L<sup>-1</sup> (NaCl). La Fig. 2 mostra la dipendenza di  $\log K_n^H$  da  $I$ , per  $\alpha = 0$ . La dipendenza delle costanti di protonazione dalla forza ionica del mezzo sono state studiate mediante un'equazione SIT [8] modificata. Per mezzo di misure calorimetriche sono stati determinati i valori di  $\Delta H$  e  $T\Delta S$  per tutte le reazioni di protonazione. Ad  $I = 1.0$  mol L<sup>-1</sup> abbiamo determinato  $\Delta H_1 = -25,5$ ;  $\Delta H_2 = -36,5$ ;  $\Delta H_3 = -22,2$ ;  $\Delta H_4 = -28,9$  and  $T\Delta S_1 = 32,8$ ;  $T\Delta S_2 = 14,4$ ;  $T\Delta S_3 = 14,7$ ;  $T\Delta S_4 = -13,9$ . Questi valori sono in accordo, per i differenti amino gruppi, con quanto precedentemente trovato su poliammide a basso peso molecolare [9].

### Bibliografia

- 1) G.J.M. Koper, R.C.v. Duijvenbode and D.D.P.W. Stam. Synthesis and protonation behavior of Comblike Poly(ethyleneimine), *Macromolecules*, **36** 2500-2507, 2003.
- 2) R.G. Smits, G.J.M. Koper and M. Mandel. The influence of Nearest- and Next-Nearest-Neighbor Interactions on the Potentiometric Titration of Linear Poly(ethylenimine), *J. Phys. Chem.*, **97** 5745-5751, 1993.
- 3) J. Nagaya, M. Homma, A. Tanioka and A. Minakata. Relationship between protonation and ion condensation for branched poly(ethylenimine), *Biophysical Chemistry*, **60** 45-50, 1996.
- 4) R.G. Smits, M.E. Kuil and M. Mandel. Molar Mass and Ionic Strength Dependence of the Apparent Diffusion Coefficient of a Flexible Polyelectrolyte at Dilute and Semidilute Concentrations: Linear Poly(ethylenimine), *Macromolecules*, **26** 6808-6816, 1993
- 5) M. Borkovec and G.J.M. Koper. Proton Binding Characteristics of Branched Polyelectrolytes, *Macromolecules*, **30** 2151-2158, 1997.
- 6) Katchalsky, A.; Spitnik, P. Potentiometric Titrations of Polymethacrylic Acid. *J. Polym. Sci.*, **2** 432-446, 1947.
- 7) E. Högfeldt, T. Miyajima, J.A. Marinsky and M. Muhammed. Application of a simple three- parameter model to titration data for some linear polyelectrolytes. *Acta Chem. Scand.* **43** 496-499, 1989
- 8) G. Biedermann. Ionic media. In *On the nature of seawater*. Dhlem workshop, Berlin, 1975 pp 339-362
- 9) A. De Robertis, C. Foti, O. Giuffrè and S. Sammartano. The dependence on ionic strength of enthalpies of protonation for polyamines, in NaCl(aq). *J. Chem. Eng. Data*, **47**, 1205-1212, 2002.

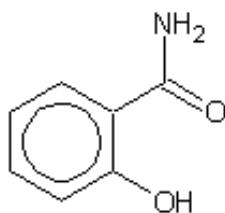
## EFFETTO DELLA FORZA IONICA SUGLI EQUILIBRI DI COMPLESSAZIONE TRA IONI RAME(II) E SALICILAMMIDE

*Emilia Furia e Raffaella Porto*

*Dipartimento di Chimica, Università degli Studi della Calabria, 87030 Rende (CS)*

Il presente lavoro di ricerca si inserisce in un progetto più generale il cui obiettivo è lo studio della speciazione della salicilammide (HL) con alcuni metalli di interesse ambientale.

Il legante mostra proprietà farmacologiche: è noto, infatti, che la salicilammide abbia effetti analgesici ed antipiretici. Tuttavia, malgrado la sua importanza, le informazioni riportate in letteratura sono scarse.



HL

Le reazioni di complessazione sono studiate a 25°C in mezzo ionico di NaClO<sub>4</sub>, la cui concentrazione, *I*, viene variata tra 0.5 e 3 M, al fine di verificare l'effetto della forza ionica sugli equilibri di formazione, in soluzione, di specie complesse.

Gli equilibri di complessazione sono studiati mediante titolazioni potenziometriche con la cella



dove RE = Ag / AgCl / 0.01 M AgClO<sub>4</sub> / (*I* - 0.01) M NaClO<sub>4</sub> / *I* M NaClO<sub>4</sub>,  
e TS = *C<sub>M</sub>* M Cu(ClO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>, *C<sub>L</sub>* M HL, *C<sub>A</sub>* M HClO<sub>4</sub>, *C<sub>B</sub>* M NaOH, (*I* - 2*C<sub>M</sub>* - *C<sub>A</sub>* - *C<sub>B</sub>*) M NaClO<sub>4</sub>.

I valori di forza ionica scelti sono 0.5, 1, 2 e 3 M.

Da un esame preliminare, con metodi grafici e numerici (SUPERQUAD)<sup>1</sup>, dei dati sperimentali è stato stabilito che la salicilammide è un acido monoprotico, e che gli equilibri di complessazione con il rame(II) portano alla formazione dei complessi mononucleari CuL<sup>+</sup> e CuL<sub>2</sub> e delle specie polinucleari e miste Cu<sub>2</sub>(OH)<sub>2</sub>L<sub>2</sub> e CuOHL.

La costante acida di HL ↔ L<sup>-</sup> + H<sup>+</sup>, *K<sub>a</sub>*, è determinata da misure in assenza di ioni rame(II).

I valori delle costanti di formazione, determinate in condizioni di mezzo ionico costante, sono elaborati con la Teoria dell'Interazione Specifica (SIT)<sup>2,3</sup> per l'estrapolazione a forza ionica zero. Il coefficiente di interazione specifico tra la salicilammide ed il perclorato di sodio è determinato sulla base delle variazioni della solubilità di HL con la concentrazione del mezzo ionico.

1) P.GANS, A.SABATINI and A.VACCA, *J.Chem.Soc.(Dalton)*, 1195 (1985).

2) L.CIAVATTA, *Ann.Chim.(Rome)*, **70**, 551 (1980).

3) L.CIAVATTA, *Ann.Chim.(Rome)*, **80**, 255 (1990).

## STUDIO DELLA CAPACITA' SEQUESTRANTE DELLA BIOMASSA NEI CONFRONTI DELLO IONE RAME(II)

Concetta De Stefano<sup>a)</sup>, Alba Giacalone<sup>b)</sup>, Antonio Gianguzza<sup>b)</sup>, Santino Orecchio<sup>b)</sup>, Alberto Pettignano<sup>b)</sup>, Daniela Piazzese<sup>b)</sup> e Silvio Sammartano<sup>a)</sup>

<sup>a)</sup> Dipartimento di Chimica Inorganica, Chimica Analitica e Chimica Fisica. Università di Messina, Salita Sperone 31, I-98166, Messina (Vill. S. Agata).

<sup>b)</sup> Dipartimento di Chimica Inorganica e Analitica "Stanislao Cannizzaro". Università di Palermo, Viale delle Scienze, Parco d'Orleans, I-90128, Palermo.

Il processo di *sequestrazione* viene utilizzato in molte applicazioni per la rimozione, la separazione, l'arricchimento o il recupero di metalli nocivi dalle acque di scarico industriali e per la decontaminazione delle acque di scarico urbane, oltre che di suoli e sedimenti<sup>[1-6]</sup> attraverso l'uso di agenti sequestranti sintetici e/o naturali. La sequestrazione è un processo che avviene anche naturalmente nei suoli e negli ambienti acquatici, grazie alla presenza di un gran numero di siti leganti polifunzionali nelle varie frazioni della sostanza organica componente della biomassa (bio-polimeri)<sup>[7-13]</sup>. E' noto che la sostanza organica disciolta (DOM) può facilitare il trasporto o la mobilizzazione dei metalli nei suoli e nelle acque sotterranee, poiché si comporta come un "carrier", formando complessi solubili metallo-sostanza organica<sup>[7]</sup>. Le frazioni umiche e fulviche della DOM nelle acque e nei suoli sono le principali responsabili della complessazione di ioni metallici, perché agiscono come resine polielettrolitiche di tipo carbossilico<sup>[14-15]</sup>. Tra i bio-polimeri ha assunto negli ultimi anni grande interesse lo studio della capacità sequestrante dell'acido alginico, uno dei componenti principali delle alghe brune, co-polimero degli acidi mannuronico e guluronico contenente un gruppo carbossilico per unità monomeric<sup>[10-12,16,17]</sup>.

In questo lavoro si riportano i risultati preliminari di uno studio sulla capacità sequestrante delle frazioni umiche e fulviche estratte da suoli, di acidi umici e fulvici standard (da IHSS, International Humic Substances Society) e dell'alginato estratto da *Macrocystis Pyrifera* nei confronti dello ione  $\text{Cu}^{2+}$ . La differenza fondamentale nello studio delle proprietà leganti degli oligo-elettroliti rispetto ai poli-elettroliti è dovuta alla carica notevolmente più alta dei poli-anioni, in particolare per alti pesi molecolari del polielettrolita. Di fondamentale importanza è dunque definire la carica effettiva del poli-anione impegnato nella interazione acido-base in differenti intervalli di pH. Studi precedenti effettuati dal nostro gruppo su polielettroliti carbossilici<sup>[18 e rif. interni]</sup> hanno dimostrato che per la definizione della carica è possibile utilizzare un modello di validità generale la cui formulazione matematica descrive l'intero sistema per mezzo di tre valori di  $\log K^H$  ("modello a tre parametri")<sup>[19]</sup>. Questo modello insieme con una versione modificata della classica equazione di Henderson Hasselbach<sup>[20]</sup> è stato utilizzato per determinare le costanti di protonazione degli acidi umici e fulvici e dell'acido alginico in funzione del grado di dissociazione ( $\alpha$ ) del polielettrolita.

Le indagini sperimentali sui sistemi fulvico/umico/alginico-Cu sono state effettuate per via potenziometrica a 25 °C mediante ISE-Cu, nell'intervallo di forza ionica 0.01-0.5 mol L<sup>-1</sup> in mezzo ionico NaNO<sub>3</sub> ad un valore di pH ≤ 5, per evitare l'idrolisi dello ione Cu(II). La variazione di pH nel corso della titolazione è stata valutata mediante elettrodo a vetro ed è stata tenuta in considerazione nella procedura di calcolo per la determinazione delle costanti formazione Cu-L. I calcoli hanno messo in evidenza la formazione di specie complesse di stechiometria Cu:L = 1:1 (L = umato o fulvato) e Cu:L = 1:1 e 1:2 (L = alginato), la cui stabilità è dell'ordine di 10<sup>5</sup>. Ad esempio:  $\log K^{\text{Cu}} = 5.42 \pm 0.08$  a I = 0.1 mol L<sup>-1</sup> (NaNO<sub>3</sub>) per il sistema Cu-acido umico (estratto da torba, IHSS);  $\log K^{\text{Cu}} = 4.73 \pm 0.01$  per il sistema Cu-acido fulvico (estratto da suolo, IHSS) nelle stesse condizioni.

**Riferimenti bibliografici**

1. Yates, L.M., Von Wandruszka, R., (1999). Decontamination of polluted water by treatment with a crude humic acid blend. *Environ. Sci. Technol.*, **33**, 2076.
2. Christensen, J.B., Christensen, T.H., (1999). Complexation of Cd, Ni and Zn by DOC in polluted groundwater: a comparison of approaches using resin exchange, aquifer material sorption and computer speciation models. *Environ. Sci. Technol.*, **33**:3857.
3. Kalbitz, K., Wennrich, R., (1998). Mobilization of heavy metals and arsenic in polluted wetland soils and its dependence on dissolved organic matter. *Sci. Total Environ.*, **209**, 27.
4. Temminghoff, E.J.M., Van der Zee, S.E.A., De Haan, F.A.M. (1997). Copper mobility in a copper contaminated sandy soil as affected by pH and solid and dissolved organic matter. *Environ. Sci. Technol.*, **31**, 1109.
5. McCarthy, J.F., Zachara, J.M., (1989). Subsurface transport of contaminants, *Environ. Sci. Technol.*, **23**, 496.
6. Lixiang, X.Z., Wong, J.W.C., (2003). Behaviour of heavy metals in soil: effect of dissolved organic matter, in *Geochemical and hydrological reactivity of heavy metals in soils*, H.M. Selim and W.L. Kingery (eds), 245-270, Lewis Publisher, Boca Raton.
7. Selim, H.M., Kingery, W.L. (eds), (2003). *Geochemical and hydrological reactivity of heavy metals in soils*, Lewis Publisher, Boca Raton.
8. Tipping, E., (2002). *Cation binding by humic substances*, Cambridge Environmental Chemistry series, n. 12, Cambridge University Press (UK).
9. Gaffney, S., Marley, N.M., Clark, S.B. (eds), *Humic and Fulvic Acids. Isolation, Structure and Environmental Role* (1996), ACS Symposium Series 651, Am. Chem. Soc., Washington DC. 207.
10. Volesky, B., (1990), *Biosorption of heavy metals*, CRC Press, Boca Raton, Florida (USA).
11. Eccles H., Hunt S. (eds). (1986) *Immobilisation of ions by biosorption* Chichester: Ellis Horwood.
12. Forster, C.F., Wase, D.A.J., (1997). *Biosorbents for metal ions*. Taylor & Francis, London
13. Buffle J., (1988). *Complexation Reactions in Aquatic Systems: An Analytical Approach*. Ellis Horwood, Chichester.
14. Cabannis, S.E., (1991). Carboxylic acid content of a fulvic acid determined by potentiometry and aqueous Fourier transform infrared spectrometry. *Anal. Chim. Acta*, **255**, 23.
15. Masini J.C., Abate, G., Lima, E.C., Hahn, L., Nakamura, M., Lichtig, J., Nagatomy, H.R., (1998). Comparison of methodologies for determination of carboxylic groups in humic acids. *Anal. Chim. Acta*, **364**, 223.
16. Konishi, Y., Shimaoka, J., Asai, S., (1998). Sorption of rare earth ions on biopolymer gel beds of alginic acid. *Reactive and Functional Polymers*, **36**, 197.
17. Chu, K.H., Phang, S.M., Samuel, V.B., (1997). Biosorption of cadmium by algal biomass: adsorption and desorption characteristics. *Wat. Sci. Tech.* **35**, 115.
18. De Stefano, C. Gianguzza, A., Piazzese, D., Sammartano, S. (2004). Speciation of Organic Matter in Natural Waters: interaction of polyacrylates and polymethacrylates with major cation components of seawater. *Mar. Chem.*, **86**, 33.
19. Högfeldt, E. Miyajima, T. Marinsky, J.A. Muhammed, M. (1989). Application of a simple three parameter model to titration data for some polyelectrolytes. *Acta Chem. Scand.* **43**, 496.
20. Katchalsky, A., Spitnik, P. (1947). Potentiometric titrations of polymethacrylic acid. *J. Polymer Science* **2**, 432.

## STUDY OF THE THERMAL DECOMPOSITION OF IMINODIACETIC ACID BY TG-DSC-MS

*V. Vinciguerra<sup>a</sup>, A. Napoli<sup>a</sup>, R. Bucci<sup>b</sup>, F. Marini<sup>b</sup>*

<sup>a</sup> *Dipartimento di Scienze Ambientali, Università della Tuscia, Viterbo (Italy)*

<sup>b</sup> *Dipartimento di Chimica, Università "La Sapienza", Roma (Italy)*

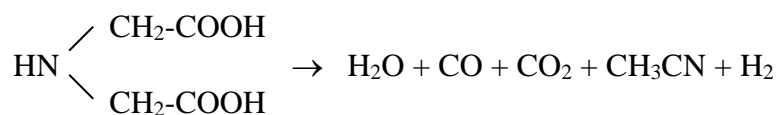
The thermal decomposition of iminodiacetic acid in helium atmosphere has been studied by means of TG-DSC-MS, i.e. thermogravimetry-differential scanning calorimetry (TG-DSC) coupled with evolved gas analysis using mass spectrometry (MS).

The TG-DSC-MS is useful to interpret the complicated successive reactions and to determine the mechanism of the thermal decomposition.

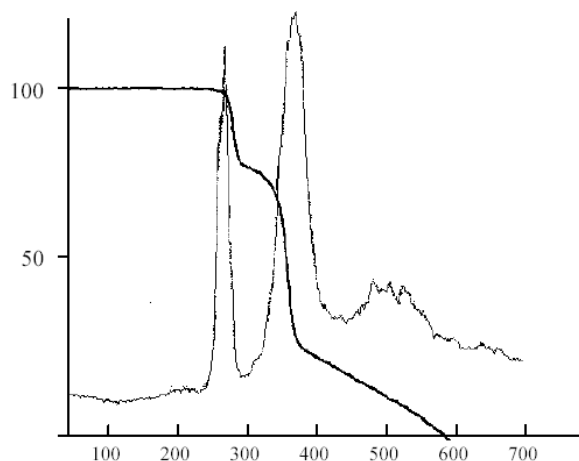
The thermal process in He atmosphere proceeds by two steps with weight loss at 262°C and at 331°C.

The mass spectra evidence ions with ratios  $m/z$  28 ( $\text{CO}^+$ ) and 44 ( $\text{CO}_2^+$ ) together with water ( $\text{H}_2\text{O}^+$ ) and hydrogen evolution. Also the species  $\text{CH}_3\text{CN}$  is evidenced.

The following mechanism of decomposition is proposed:



Further decomposition leads the formation of HCN and hydrocarbons, starting from  $\text{CH}_3\text{CN}$ .



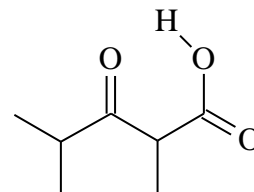
Overall TG and TIC (total ion current, MS) curves for iminodiacetic acid

## A POTENTIOMETRIC, SPECTROPHOTOMETRIC AND NMR STUDY OF EQUILIBRIA OF Fe(III) AND Al(III) WITH A FAMILY OF FLUOROQUINOLONES

Guido Crisponi, *Valeria Marina Nurchi* and *Alessandra Caredda*

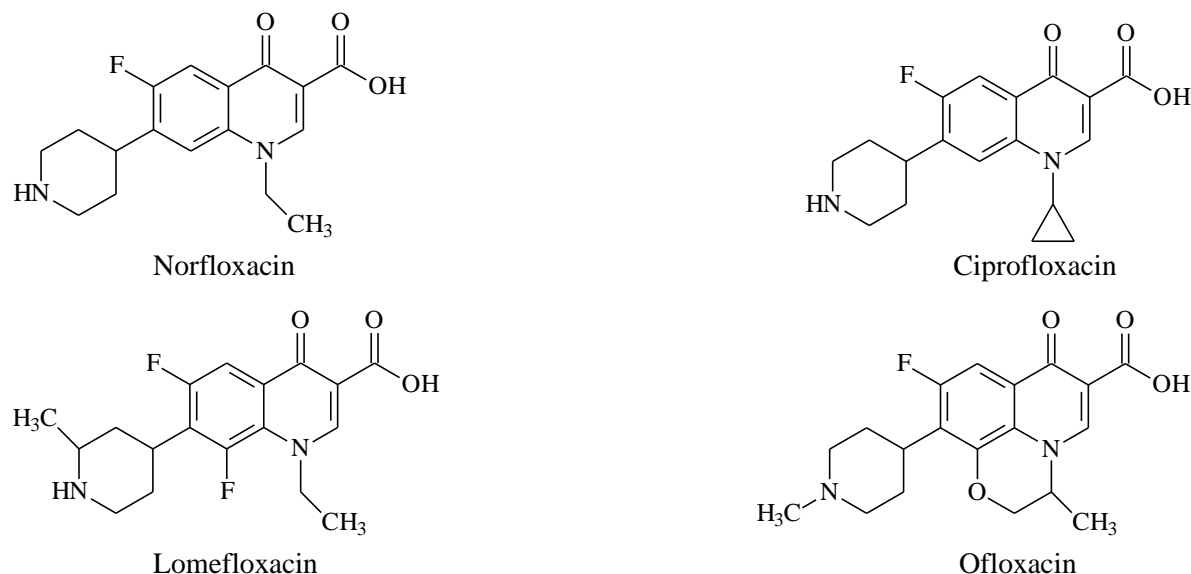
*Centro per lo Studio dei Metalli in Medicina, Dipartimento di Scienze Chimiche, Università di Cagliari, Cittadella Universitaria, 09042 Monserrato-Cagliari, ITALY, [nurchi@unica.it](mailto:nurchi@unica.it)*

Fluoroquinolones are antibacterials with a broad spectrum against Gram-negative as well as Gram-positive bacteria, and an excellent tissue distribution. Their characterizing group interacts with different metal ions [1-3]. Our particular interest toward iron(III) and aluminium(III) chelating agents led us to study the solution equilibria of these two metal ions with the fluoroquinolones reported in Scheme 1. As a first step we examined the protonation equilibria; these received a wide attention in the last ten years, but the results are somewhat contradictory [4-10]. We performed potentiometric and spectrophotometric measurements in water and 50/50 methanol/water solutions, and quantum-mechanical calculations in order to determine the protonation site at very low pH values. A micro ionisation model was also taken into account.



The equilibria with iron(III), studied by potentiometric-spectrophotometric titrations, and with aluminium(III), studied by potentiometric and NMR measurements, will be discussed.

**Scheme 1**



- 1) I. Turel, *Coord. Chem. Rev.*, **232**, 27 (2002)
- 2) I. Turel, N. Bukovec and E. Farkas, *Polyhedron*, **15**, 269 (1996)
- 3) P. Djurdjevic, M. J. Stankov and J. Odovic, *Polyhedron*, **19**, 1085 (2000)
- 4) D. L. Ross and C. M. Riley, *Int. Journal of Pharmaceutics*, **63**, 237 (1990)
- 5) K. Takacs-Novak, B. Noszal, I. Hermeicz, G. Kereszturi, B. Podanyi and G. Szasz, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, **79** (11), 1023 (1990)
- 6) D. A. Buckingham, C. R. Clark and A. Nangia, *Aust. J. Chem.*, **43**, 301 (1990)
- 7) D. L. Ross and C. M. Riley, *Int. Journal of Pharmaceutics*, **83**, 267 (1992)
- 8) S. C. Wallis, L. R. Gahan, B. G. Charles and T. W. Hambley, *Aust. J. Chem.*, **47**, 799 (1994)
- 9) J. Hernandez-Borrell and M. T. Montero, *J. Chem. Ed.*, **74** (11), 1311 (1997)
- 10) H. Park, K. Chung, H. Lee, J. Lee and K. Bark, *Bull. Korean Chem. Soc.*, **21** (9), 849 (2000)

**NUOVI POTENZIALI FARMACI PER Al(III): STUDIO TERMODINAMICO**

Valerio B. Di Marco<sup>a</sup>, Maria Grazia Ferlin<sup>b</sup>, Annalisa Dean<sup>a</sup>, Andrea Tapparo<sup>a</sup>, Haitao Li<sup>c</sup>, Robert A. Yokel<sup>c</sup>, G. Giorgio Bombi<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Dipartimento di Scienze Chimiche, via Marzolo 1, 35131 Padova

<sup>b</sup> Dipartimento di Scienze Farmaceutiche, via Marzolo 8, 35131 Padova

<sup>c</sup> College of Pharmacy, 511C Pharmacy Building, University of Kentucky Medical Center, Rose Street, Lexington, KY 40536-0082, U.S.A.

La terapia delle patologie umane legate all'accumulo da metalli in generale prevede la somministrazione di idonei agenti chelanti in grado di rimuovere, con un certo grado di selettività, il metallo dall'organismo. I farmaci attualmente in uso per la terapia delle patologie prodotte da un eccessivo assorbimento di alluminio (o di ferro), desferal e deferiprone, non sono pienamente soddisfacenti; la ricerca internazionale è pertanto molto attiva nello studio di molecole alternative [1,2], tra cui quelle amministrabili oralmente risultano nettamente preferibili [3-5] sia per un maggiore comfort da parte dei pazienti, sia per i costi inferiori di terapia.

Il contributo chimico alla ricerca di nuovi farmaci chelanti consiste nella sintesi di nuove molecole (quasi sempre non disponibili commercialmente) e nello studio delle proprietà dei leganti liberi e dei loro complessi metallici (si veda ad esempio [6-7]). Tali studi sono basati principalmente sull'uso di tecniche all'equilibrio (potenziometria, UV-Vis, NMR) finalizzate all'ottenimento di dati termodinamici riguardanti il numero, la stechiometria e le costanti di formazione dei complessi presenti in soluzione; le misure termodinamiche possono essere utilmente affiancate da misure "in vitro", aventi lo scopo di ottenere dei dati direttamente applicabili alle condizioni fisiologiche in vivo (efficienza chelante, coefficiente di ripartizione acqua-ottanolo, potenziali di riduzione).

In tale contesto, vengono qui riportati la sintesi degli acidi N-metil-3-idrossi-4-piridincarbossilico (1M3H4P) e N-metil-4-idrossi-3-piridincarbossilico (1M4H3P), molecole che presentano proprietà molto promettenti per un loro potenziale utilizzo come farmaci chelanti ([8] e riferimenti ivi citati), e i risultati potenziometrici, UV-Vis, NMR ed "in vitro" dello studio delle loro interazioni con Al(III). La forza complessante di 1M3H4P e 1M4H3P è incoraggiante e suggerisce la strategia per ulteriori sintesi di nuovi derivati.

**Riferimenti bibliografici**

- [1] G. Faa, G. Crisponi, *Coord. Chem. Rev.* 1999, 184, 291-310.
- [2] Z.D. Liu, R.C. Hider, *Med. Res. Rew.* 2002, 22, 26-64.
- [3] A.V. Hoffbrand, *J. Lab. Clin. Med.* 1998, 131, 290-291.
- [4] M.J. Pippard, D.J. Weatherall, *Brit. J. Haematol.* 2000, 111, 2-5.
- [5] R.C. Hider, R. Choudhury, B.L. Rai, L.S. Dehkordi, S. Singh, *Acta Haematol.* 1996, 95, 6-12.
- [6] B.L. Rai, H. Khodr, R.C. Hider, *Tetrahedron* 1999, 55, 1129-1142.
- [7] C. Bazzicalupi, A. Bencini, A. Bianchi, F. Vieri, C. Giorgi, L. Messori, M. Migliorini, P. Paoletti, B. Valtancoli, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* 1998, 359-367.
- [8] V.B. Di Marco, R.A. Yokel, M.G. Ferlin, A. Tapparo, G.G. Bombi, *Eur. J. Inorg. Chem.* 2002, 2648-2655.

**COMUNICAZIONI POSTER**

**CHIMICA ANALITICA E AMBIENTE**



**DETERMINAZIONE DELLA COMPONENTE NITRICA NEL MATERIALE PARTICELLARE PM<sub>2.5</sub> MEDIANTE UN NUOVO ANALIZZATORE AUTOMATICO**

*Pasquale Avino, Maurizio Manigrasso e Roberto Schirò*

*ISPESL - Dipartimento Insediamenti Produttivi ed Interazione con l'Ambiente, via Urbana 167, 00184 Roma. -mail: pasquale.avino@uniroma1.it*

Il particolato atmosferico, PM<sub>10</sub> e PM<sub>2.5</sub>, risulta a tutt'oggi uno dei parametri per lo studio della qualità dell'aria di più difficile interpretazione sia per le molteplici sostanze di cui è composto sia per le numerose e complesse reazioni chimico-fisiche che avvengono sulla sua superficie. In particolare, tra le molte sostanze di cui è formato il particolato sono molto interessanti le classi di sostanze quali nitrati, solfati, carbone organico e carbone elementare. Punto essenziale per una valida strategia di controllo dell'inquinamento è l'identificazione delle sorgenti delle varie frazioni. Sia per la determinazione di inquinanti gassosi, tra i quali, per esempio, ozono e CO, che per la determinazione di particolato fine, esistono differenti metodi automatizzati che permettono un continuo monitoraggio della situazione in atto. Attualmente, il metodo più comune per lo studio della composizione delle particelle è il campionamento su filtri e successiva analisi in laboratorio ma si stanno ormai sviluppando tecniche di monitoraggio automatico anche per alcuni costituenti del particolato, come per esempio il sistema qui presentato ed utilizzato per determinare i nitrati nel particolato PM<sub>2.5</sub>. In questa relazione viene descritto l'impiego di un analizzatore che permette di determinare la frazione di nitrati presente nel particolato atmosferico. Lo strumento mod. 8400N "Ambient Particulate Nitrate Monitor" (Rupprecht & Patashnick Co Inc., Albany, NY) misura le concentrazioni di massa di nitrato contenuto nel particolato ambientale PM<sub>2.5</sub> in tempo reale. In questo modo vengono misurate tutte le forme di nitrati inorganici senza interferenza dello ione ammonio.

Il sistema, basato sul metodo di Stolzenburg and Hering [1], impiega per la misura della concentrazione di nitrati su particolato un tempo totale di circa 10 minuti. Il flusso di aria campionata passa attraverso un impattore che taglia la frazione granulometrica a 2.5 µm, un denuder di carbone attivo ed un umidificatore a Nafion: il campione è collezionato su un substrato di metallo con una velocità di campionamento di 1 L/min. Dopo il periodo di campionamento (meno di circa 9 min), la cella di campionamento è riempita di azoto (gas carrier) ed il particolato depositato è analizzato per vaporizzazione. Gli ossidi di azoto che si sviluppano sono determinati con un analizzatore a chemiluminescenza equipaggiato con un catalizzatore a molibdeno [2]. Il sistema è calibrato con soluzioni standard di nitrato di sodio applicato direttamente sul substrato di campionamento.

**Bibliografia**

- [1] M.R. Stolzenburg and S.V. Hering, A new method for the automated measurement of atmospheric fine particle nitrate, *Environ. Sci. Technol.*, 34 (2000) 907.
- [2] M. Yamamoto and H. Kosaka, Determination of nitrate in deposited aerosol particles by thermal decomposition and chemiluminescence, *Anal. Chem.*, 66 (1994) 362.

**DETERMINAZIONE DEI METALLI NEL CEMENTO E NEI SUOI COSTITUENTI  
AL FINE DI INDIVIDUARNE LA FORMULAZIONE**

*L. Campanella<sup>1</sup>, F. Borzetti<sup>1</sup>, R. Dragone<sup>2</sup>, R. Grossi<sup>1</sup>*

*1 Dipartimento di Chimica Università “La Sapienza”, p.le Aldo Moro, 5 – 00185 Roma*

*2 Istituto IMIP – CNR, sez. MICE c/o Dip. di Chimica Università “La Sapienza” -Roma*

Scopo del presente lavoro è stato la determinazione dei metalli nel cemento e nei suoi costituenti e, da questa, la formulazione del cemento stesso.

In generale il cemento è una miscela di più composti, la cui formulazione può essere determinata solo attraverso un'analisi completa dei suoi costituenti.

In campo industriale, tale operazione è assolutamente necessaria per il controllo del prodotto finito, nonostante la ricetta utilizzata sia già nota. In fase di produzione, infatti, sono a volte necessari interventi correttivi per assicurare la “costanza” del cemento nel rispetto delle leggi e per soddisfare le esigenze di mercato. A tal fine il poter disporre di opportuni indicatori (marker), che possano definire in modo rapido e preciso la composizione e quindi la qualità del cemento, rappresenta un vantaggio per le industrie del settore. In questo senso vi è la necessità di individuare dei traccianti, ovvero degli elementi, che, presenti nel cemento, possano discriminare attraverso la variazione dei loro rapporti stechiometrici, tra le diverse composizioni e quindi definirne la qualità.

In questo lavoro, svolto presso il laboratorio del Centro Ricerche della Buzzi Unicem di Guidonia, le concentrazioni di metalli come traccianti (al fine della formulazione) sono state determinate in due tipi di cemento: il tipo IV “pozzolanico” e il tipo II “Portland al calcare”.

Un primo esame della banca dati del Centro Ricerche della Buzzi-Unicem relativo ai diversi materiali che compongono i cementi di interesse, ha permesso di indirizzare lo studio verso alcuni traccianti. La loro validità è stata verificata sperimentalmente in laboratorio tramite la preparazione di opportune miscele che simulavano le due tipologie di cemento.

Successivamente, sia sui singoli costituenti che sulle miscele, sono stati determinati i traccianti, espressi come ossidi ( $K_2O$ ,  $Na_2O$ ,  $V_2O_5$ ,  $Mn_2O_3$ ,  $TiO_2$ ), per poi risalire dalle loro concentrazioni alle percentuali dei costituenti nelle miscele.

Il metodo proposto ha fornito alcuni buoni risultati nelle prove di laboratorio.

Per questo, dopo ulteriori verifiche sperimentali su prodotti industriali, tale lavoro può essere considerato come studio preparatorio in vista di un'estensione dell'applicazione dal cemento di laboratorio a quelli di fabbrica.

**APPLICAZIONI ALIMENTARI E AMBIENTALI DEI TEST RESPIROMETRICI**

*L. Campanella<sup>1</sup>, M. Castelli<sup>3</sup>, R. Dragone<sup>2</sup>*

*1 Dipartimento di Chimica Università “La Sapienza” P.le Aldo Moro, 5 –00185 Roma*

*2 Istituto IMIP – CNR, sez.MICE c/o Dip. di Chimica Università “La Sapienza” –Roma*

*3 Istituto Superiore di Sanità V.le Regina Elena, 299 -Roma*

Nel nostro laboratorio è stato da tempo messo a punto un biosensore di tossicità integrale, basato sulla misura dell'attività respiratoria cellulare, che ha trovato numerose applicazioni ed ha riscosso l'interesse della comunità scientifica. In questo lavoro tale biosensore è stato applicato per studiare alcune problematiche ambientali e alimentari molto attuali e pressanti. In particolare si è applicato il test respirometrico per:

*Applicazioni alimentari*

Valutazione dei rischi connessi all'impiego delle microonde nel trattamento di alimenti:

- Verifica della comparsa o meno dei caratteri di tossicità dovuta all'azione delle microonde (Mw) sul  $\beta$ -carotene, esaminando anche la formazione di composti derivanti da trasformazioni degradative della molecola (indagine spettrofotometrica);
- Verificare la tossicità dell'olio di semi e di oliva riscaldati in un forno a Mw in condizioni analoghe a quelle impiegate nella cottura di alcuni cibi, monitorando anche nel contempo la formazione dei radicali con un biosensore a superossido dismutasi.

*Applicazioni ambientali*

- Monitorare la tossicità integrale di un'acqua proveniente dall'acquedotto di Latina, tenuto conto che la zona pontina nel periodo estivo è caratterizzata da sovraffollamento rispetto al numero degli abitanti residenti, in particolare valutando i rischi sanitari collegati alla presenza nelle acque di superficie, dopo depurazione, di residui di farmaci.

Per quanto riguarda i residui di farmaci presenti nelle acque dopo depurazione, è da rilevare che da alcuni studi promossi dalla CEE è stata evidenziata la presenza, nelle acque di superficie, di alcuni principi farmacologicamente attivi (es. diclofenac, uno dei farmaci di cui attualmente uso ed abuso sono più diffusi in Europa) che non sono completamente eliminati dagli impianti di depurazione. In particolare è stata simulata la presenza del diclofenac (principio attivo ad azione antinfiammatoria) in un'acqua depurata, per valutarne la tossicità integrale residua.

Concludendo, il biosensore respirometrico applicato a nuove situazioni, tutte diverse tra loro, ha confermato la sua versatilità e utilità nelle operazioni di screening che richiedono tempi rapidi di risposta.

**FOTODEGRADAZIONE DI COLORANTI AZOICI**

*L. Campanella, V. Amoroso, F. Bellanti, I. Giardina, M.P. Sammartino, G. Visco*

*Dip.to di Chimica, Università “La Sapienza”, p.le A. Moro, 5 – 00185 – ROMA*

L'attuale normativa, sia Italiana che Europea, vieta lo scarico di reflui contenenti coloranti azoici e soprattutto delle ammine aromatiche utilizzate per la loro sintesi. Il massiccio uso di tali coloranti in molti settori industriali nonché la loro elevata recalcitranza, comporta la necessità di disporre di metodologie di depurazione dei reflui che assicurino una elevata efficienza operando su considerevoli volumi di soluzione.

È stato dimostrato che i processi di ossidazione avanzata (AOPs, ossidazione omogenea avanzata e fotocatalisi eterogenea) sono competitivi con i metodi biologici, fisici e chimici convenzionali nella rimozione di molti inquinanti da reflui industriali e civili.

Nella presente comunicazione sono riportati i risultati ottenuti nella fotodegradazione, UV assistita e catalizzata da biossido di titanio, di tre coloranti azoici con differente struttura (AB29, AV7, RV5).

Sono stati utilizzati quattro diversi sistemi catalitici:  $\text{TiO}_2$  disperso in soluzione da solo o in presenza di ossalato ferroso (reazione di Fenton),  $\text{TiO}_2$  immobilizzato in membrana da solo o in presenza di un polimero conduttore (polianilina).

La scelta del sistema catalitico ottimale è stata effettuata valutando la decolorazione delle soluzioni di colorante mediante spettrofotometria UV-vis. L'effettiva mineralizzazione è stata controllata, mediante HPLC, monitorando la scomparsa dei picchi relativi all'analita ed agli intermedi che si formano durante la fotodegradazione. Un ulteriore controllo è stato effettuato misurando la  $\text{CO}_2$  formata durante il processo, con un metodo indiretto basato sulla sua precipitazione come carbonato di bario e determinando, mediante ICP, l'eccesso di bario.

Al fine di valutare la tossicità dei campioni in un ipotetico trattamento depurativo che non arrivi alla mineralizzazione, sono stati identificati alcuni intermedi mediante GC-MS.

È stata infine valutata l'efficienza del trattamento fotodegradativo su un campione reale, ossia su un refluo proveniente da un bagno di concia.

Tra i sistemi catalitici utilizzati, il biossido di titanio da solo in sospensione si è rivelato il più efficiente.

Operando con soluzioni acquose a concentrazione 0,1 mmol/L dei tre coloranti, in circa 3 ore, si è ottenuta la loro mineralizzazione al 78%, 89% e 94% rispettivamente per AB29, AV7 e RV5. La presenza di cromo nel campione reale trattato ha comportato l'esigenza di trattamenti più prolungati.

**INDAGINI RELATIVE ALLA CARATTERIZZAZIONE DI UN SITO  
CONTAMINATO DA CROMO ESAVALENTE. ANALISI DI RISCHIO DELLE  
ACQUE SOTTERRANEE: DUE MODELLI A CONFRONTO**

*Carlucci Giuseppe<sup>1</sup>, Luchetti Lucina<sup>2</sup>, Di Risio Franco<sup>2</sup>, Carlucci Rocco<sup>2</sup>*

*<sup>1</sup>Dipartimento di Scienze del Farmaco - Facoltà di Farmacia - Università degli Studi  
"G. D'Annunzio" Chieti - Via dei Vestini 66100 Chieti*

*<sup>2</sup>ARTA - Agenzia Regionale per la Tutela dell'Ambiente via Spezioli 52 - 66100 Chieti*

Il D.M. 471/99, stabilisce, regola le procedure e le modalità per la messa in sicurezza, bonifica e il ripristino ambientale dei siti inquinati. A tal fine disciplina i limiti di accettabilità della contaminazione dei suoli, delle acque superficiali, delle acque sotterranee in relazione alla specifica determinazione d'uso dei siti. In particolare per il cromo esavalente la concentrazione limite accettabile nelle acque sotterranee non deve superare il valore di 5 µ/L. La presenza di cromo esavalente nelle acque sotterranee è dovuta probabilmente alla lisciviazione di terreno contaminato da parte di acque di infiltrazione.

Con l'obiettivo di individuare e circoscrivere la sorgente della contaminazione, è stato messo a punto un procedimento conoscitivo costituito da varie fasi quali: la definizione delle caratteristiche geologiche ed idrogeologiche dell'area; l'analisi chimica delle acque sotterranee e dei terreni entro un sito industriale dimesso e nel settore posto a monte; l'analisi chimica su acque di scarico di una rete di raccolta in cui confluiscono, oltre alle precipitazioni meteoriche, acque provenienti da un depuratore di un'industria galvanica.

In questo lavoro vengono riportati i risultati ottenuti dalla caratterizzazione di un sito industriale contaminato e l'analisi di rischio per le acque sotterranee, tenendo conto dei parametri chimico-fisici relativi ai contaminanti (cromo esavalente e cianuri), dei parametri idrogeologici del sito e del percorso di esposizione, l'analisi di fuga "*fate and transport*". Viene inoltre proposta la comparazione di due modelli per la valutazione dell'indice di rischio con l'utilizzo dei modelli Rome e Giuditta.

## SEPARAZIONE E CARATTERIZZAZIONE DI MATERIALE PARTICOLATO DI INTERESSE AMBIENTALE MEDIANTE TECNICHE COMBinate SdFFF-ETAAS

G. Blo<sup>a</sup>, A. Ceccarini<sup>b</sup>, C. Conato<sup>a</sup>, C. Contado<sup>a</sup>, F. Dondi<sup>a</sup>, F. Fagioli<sup>a</sup>, R. Fuoco<sup>b</sup>, A. Pagnoni<sup>a</sup>, F. Vincenzi<sup>a</sup>.

<sup>a</sup> Dipartimento di Chimica, Università di Ferrara, via L. Borsari 46, 44100 Ferrara.

<sup>b</sup> Dipartimento di Chimica e Chimica Industriale, Università di Pisa, via Risorgimento 35, 56126 Pisa

Il materiale particolato sospeso (SPM) ha un ruolo determinante nel trasporto e nella diffusione di inquinanti inorganici in sistemi naturali. Particolarmente importante nei processi di trasporto risulta il contributo della frazione colloidale di diametro inferiore al micron che, oltre a rimanere in sospensione per tempi lunghi, offre un'area superficiale elevata, determinante nei processi di adsorbimento di contaminanti inorganici.

Le tecniche di frazionamento del particolato sospeso, utilizzate per la caratterizzazione di sistemi dispersi, quali la *Split-flow thin-channel fractionation* (SPLITT) e *Sedimentation field-flow fractionation* (SdFFF) [1], portano ad una elevata diluizione del campione da parte della soluzione di trasporto. Volendo analizzare la componente inorganica nelle frazioni separate per una correlazione con il diametro medio delle particelle, risultano indispensabili tecniche analitiche di elevata sensibilità così da evitare lunghe e laboriose procedure di preconcentrazione del campione prima del frazionamento dimensionale, che rischiano di modificare l'informazione analitica sia in termini di contaminazione che in termini di distribuzione delle dimensioni delle particelle.

Nel presente lavoro un sistema di separazione SdFFF è stato accoppiato in linea con uno spettrometro di assorbimento atomico con fornello di grafite per la determinazione del contenuto di metalli nelle frazioni eluite. Tale accoppiamento è stato possibile grazie ad un sistema di deposizione denominato Capillary Injection Device (CID) che ha permesso la preconcentrazione, direttamente all'interno del fornello di grafite, di volumi di soluzione eluente dell'ordine del millilitro [2].

Il sistema è stato valutato ed ottimizzato iniettando nella SdFFF campioni di silice con granulometria inferiore al micron caricate con quantità note di metalli di interesse ambientale quali, ad esempio, cadmio e cobalto. Preconcentrando nel fornello di grafite volumi di eluente in uscita dalla SdFFF dell'ordine del millilitro, a tempi regolari, è stato possibile correlare la percentuale di metallo legato alle particelle sospese con la loro dimensione.

La presente metodologia è stata utilizzata per la caratterizzazione di campioni reali di materiale particolato sospeso di corpi idrici e di particolato atmosferico.

1- G. Blo, C. Contado, F. Fagioli and F. Dondi, "Size-Elemental Characterization of Suspended Particle Matter by Split-Flow Thin Cell Fractionation and Slurry Analysis-Electrothermal Atomic Absorption Spectroscopy Slurry Analysis.", *Analyst*, 2000, 125, 1335-39.

2- A. Ceccarini, R. Fuoco, C. Vecchio, "Capillary injection device for in situ pre-concentration of trace elements in Graphite Furnace-Atomic Absorption Spectrometry", *Spectrochimica Acta part B - Atomic Spectroscopy*, vol. 56 (2001) pp. 2439-2448.

## SEGNALI DI DIMINUZIONE DEL Pb NELL'AMBIENTE: DOPO L'ANTARTIDE LE NEVI DELL'APPENNINO E IL MARE ADRIATICO

*Silvia Illuminati, Cristina Truzzi, Anna Annibaldi, Luca Lambertucci, Giuseppe Scarponi*

*Dipartimento di Scienze del Mare, Università Politecnica delle Marche  
Via Breccie Bianche, 60131 Ancona*

Dieci anni fa circa, dopo che un'analoga osservazione era stata riportata per il Polo Nord,<sup>1</sup> abbiamo rilevato che il contenuto di Pb nelle nevi antartiche ha subito una brusca riduzione a partire dalla metà degli anni '80, riconducibile alla progressiva eliminazione del metallo dalla benzina nei paesi dell'emisfero sud.<sup>2-4</sup>

In seguito a questa scoperta, a partire dal 2000 e in concomitanza con il processo di riduzione dell'uso della benzina addizionata di Pb in Italia (processo culminato con l'eliminazione totale dal gennaio 2002), abbiamo seguito un programma di studio che ha riguardato rispettivamente la neve dell'Appennino centrale e l'acqua del Mare Adriatico centro-settentrionale (fascia costiera e altura).

Ogni anno, nel periodo invernale, sono stati raccolti campioni di neve fresca presso la cima del Monte Cornaccione (Frontignano, Marche) a quota 1700 m, circa 100 m più in alto degli impianti di risalita. L'acqua di mare è stata prelevata sistematicamente in tre siti della costa anconetana (foce fiume Esino, zona raffineria Api e Portonovo nel comprensorio turistico-balneare del Monte Conero), con frequenza inizialmente bisettimanale, poi settimanale ed infine quindicinale. Infine sono state effettuate tre campagne oceanografiche nel Mare Adriatico negli ultimi tre anni, che hanno consentito di studiare il mare aperto in un transetto che va dalla foce del Po al centro Adriatico.

I campioni prelevati sono stati analizzati mediante voltammetria di ridissoluzione anodica con scansione ad onda quadra (SWASV) per la determinazione simultanea di Cd, Pb e Cu.<sup>5</sup> Risultati di particolare interesse ambientale sono stati ottenuti per il piombo e questi costituiscono l'oggetto della presente comunicazione.

Tutti i dati ottenuti stanno ad indicare che nel corso degli ultimi anni, la contaminazione ambientale da piombo ha subito un netto declino. In particolare, i risultati ottenuti sulla matrice nevosa evidenziano una diminuzione di oltre un ordine di grandezza (da migliaia a centinaia di pg/g), la concentrazione in acqua di mare costiera (dell'ordine di qualche decina di ng/l) ha subito nello stesso periodo un decremento solo leggermente più contenuto, infine dalle misure in mare aperto il Pb è sceso dell'80% circa nel solo periodo dal 2002 al 2003 (le analisi dei campioni raccolti nel 2004 sono ancora in corso).

I risultati ottenuti verranno esaminati alla luce dei dati statistici sulla riduzione delle emissioni di Pb in atmosfera degli ultimi cinque anni in Italia.

### Bibliografia

- 1 C.F. Boutron, U. Görlach, J.P. Candelone, M.A. Bolshov, R.J. Delmas, *Nature*, **353** (1991), 153-156.
- 2 G. Scarponi, C. Barbante, P. Cescon. *Analisis*, **22** (1994) M47-M50.
- 3 G. Scarponi, C. Barbante, C. Buretta, P. Cescon. XII Congr. Naz. Div. Chim. Anal., S.C.I., Firenze 20-22/9/1995. Atti p. A11.
- 4 C. Barbante, C. Turetta, G. Capodoglio, G. Scarponi. *Intern. J. Environ. Anal. Chem.*, **68** (1997) 457-477.
- 5 C. Truzzi, L. Lambertucci, G. Gambini, G. Scarponi. *Ann. Chim.*, **92** (2002) 313-326.

**DETERMINAZIONE DEGLI IDROCARBURI C<sub>≤12</sub> E C<sub>>12</sub> NEI TERRENI**

*Dr. Marcello Morello - Dr. Fabio Sandri- Dr. Massimiliano Pereno- Dera Bosco*

*ARPA Piemonte - Dipartimento di Torino*

**Premessa**

La metodica analitica che si propone nasce dalla necessità imposta dalla normativa nazionale, Decreto 471/99, di esprimere gli idrocarburi nei terreni sulla frazione passante il vaglio a 2 mm e secca a 105°C nelle loro componenti con catena C<sub>≤12</sub> e C<sub>>12</sub>.

Questa richiesta normativa determina le seguenti difficoltà:

- Possibilità di perdita delle frazioni idrocarburiche più volatili nelle attività preparative.
- Compromissione nella efficacia di estrazione di idrocarburi nel terreno legata all'umidità presente.
- Ridotta riproducibilità nella preparazione dell'aliquota da utilizzare nell'analisi, mediante sistemi di setacciatura.
- Difficoltà di reperire standard di riferimento adeguati utilizzabili con tecniche analitiche strumentali, in grado di identificare e quantificare le due frazioni C<sub>≤12</sub> e C<sub>>12</sub>.

Valutazione delle tecniche analitiche disponibili:

**Gravimetrica:** E' adatta alla determinazione degli idrocarburi totali ad eccezione di quelli più volatili, non distingue le frazioni  $\leq$  e  $>$  C 12, ha il vantaggio di essere una determinazione assoluta che non necessita di standard di riferimento.

**FTIR:** E' adatta alla determinazione degli idrocarburi totali, non distingue le frazioni  $\leq$  e  $>$  C 12 e presenta i seguenti svantaggi:

Necessita di uno standard di riferimento affine al contaminante, uno standard inadatto può comportare errori significativi sia in difetto sia in eccesso, anche del 100%;

Per la scelta dello standard idoneo è necessaria un'analisi gascromatografica dell'estratto;

Richiede l'impiego del freon;

E' necessaria una doppia analisi per verificare l'assenza di bande dei grassi vegetali (utilizzando pastiglia di KBr o di cella idonea).

**Gascromatografia:** E' adatta alla determinazione degli idrocarburi con catena fino a C<100 (iniettore on-column e colonne simdist), distingue le frazioni C<sub>≤12</sub> e C<sub>>12</sub> ma presenta i seguenti svantaggi:

Necessita di uno standard di riferimento affine al contaminante, uno standard inadatto può comportare errori significativi sia in difetto che in eccesso;

Ciascuna di queste tecniche analitiche è singolarmente insufficiente alla determinazione degli idrocarburi nei terreni con le modalità richieste dalla normativa italiana, ne consegue la necessità di integrarle opportunamente al fine di sfruttarne le singole potenzialità.

**Principio della determinazione della metodica proposta**

Ottenuto l'estratto d'idrocarburi dal terreno e portato a volume noto, si separano due frazioni:

La prima destinata alla determinazione gravimetrica mediante evaporazione del solvente in condizioni controllate, che pur causando una alterazione della composizione del contaminante per la parziale perdita delle componenti più volatili, permette successivamente la preparazione di uno standard di riferimento simile alla composizione idrocarburica dell'estratto utilizzabile sia all'IR che in GC.



La seconda frazione di estratto, la cui composizione non è stata alterata, è utilizzata per la quantificazione degli idrocarburi totali, se si usa l'IR, e/o per la quantificazione degli idrocarburi  $C_{\leq 12}$  o  $C_{>12}$  mediante gascromatografia, utilizzando come riferimento lo standard ottenuto dall'analisi gravimetrica.

### **Preparazione del campione da estrarre**

La preparazione della aliquota di terreno da estrarre incide notevolmente sull'incertezza di misura.

Si propongono a tal fine 3 preparative differenti in base alle caratteristiche della matrice e della frazione idrocarburica da determinare.

1. Se la matrice tal quale presenta una granulometria inferiore ai 2 mm o caratteristiche che ne permettono la disgregazione e setacciatura a 2 mm, si opera fino ottenere almeno 100 grammi di campione, successivamente suddivisi in due aliquote da 50 grammi.

Con questo grado di vagliatura le aliquote di circa 50 grammi sono fra loro omogenee entro una variabilità massima dello 0.5% (determinata sull'umidità).

Sulla prima aliquota si determina l'umidità del campione necessaria per esprimere il risultato sul secco a 105°C.

Sulla seconda aliquota si procede all'estrazione e successiva quantificazione con il principio precedentemente descritto.

2. Se la matrice presenta una granulometria superiore ai 2 mm e non permette la setacciatura diretta (umidità eccessiva) e la frazione idrocarburica d'interesse non è volatile, si procede all'essiccazione all'aria del campione, macinazione in mortaio, setacciatura a 2mm e successivamente come indicato al punto 1.

3. Se matrice presenta una granulometria superiore ai 2 mm e la componente volatile è presente è necessario procedere all'estrazione dell'inquinante sul campione umido tal quale. Questa scelta può essere condotta anche solo per la determinazione della componente volatile preferendo le preparazioni precedenti per le componenti non volatili.

Al fine di rendere l'aliquota di campione analizzata, circa 100 grammi, rappresentativa, si propone una setacciatura a 5 mm, (fattibile nel 95% dei casi) e successiva correzione del risultato con approccio statistico che si basa su due ipotesi:

- a) che l'umidità presente nella frazione 2-5 mm sia trascurabile rispetto a quella presente nella frazione <2 mm;
- b) che l'analita sia distribuito sulla superficie di particelle sferiche, non porose e con una distribuzione di massa omogenea in ciascun intervallo di granulometria considerata.

La setacciatura deve essere protratta fino ad ottenere circa 400 grammi di terreno setacciato a 5 mm.

Da questa aliquota si ottengono due sotto campioni di circa 200 grammi, fra loro omogenei entro un variabilità massima dello 1 % (determinata sull'umidità).

Il primo sottocampione viene essiccato a 105°C per la determinazione dell'umidità, macinato in mortaio con pestello in gomma ed utilizzato per una caratterizzazione granulometrica con setacci a 5 mm, 2mm, 0.5mm 0.25 mm.

Il secondo sottocampione viene utilizzato per la preparazione dell'estratto in solvente e quantificato come precedentemente descritto, previa miscelazione di un agente disidratante come il solfato di sodio anidro.

## POTENZIALITÀ DEI METODI DI “PASSIVE APPROACH” PER L’ANALISI DI RISCHIO DEI METALLI NEI SITI CONTAMINATI

*Gianniantonio Petruzzelli, Francesca Pedron*

*Istituto per lo Studio degli Ecosistemi Sezione di Chimica del Suolo CNR  
Area della Ricerca Via Moruzzi 1 Pisa*

L’analisi di rischio è uno strumento di rilevante importanza nelle operazioni di bonifica dei siti contaminati, che attraverso una valutazione di diversi scenari di rischio per l’uomo e per l’ambiente, fornisce le informazioni necessarie per la selezione delle migliori tecnologie di intervento a costi sostenibili.

In prospettiva futura si prevede un sempre maggiore impiego dell’analisi di rischio negli interventi di decontaminazione, questo implica la necessità di un approfondimento delle informazioni chimiche ed ecotossicologiche da inserire nei processi di “risk assessment” per ottenere dei risultati sempre più rispondenti alla necessità di una gestione sostenibile delle operazioni di bonifica.

La chimica analitica svolge un ruolo primario nella protezione dell’ambiente, che è legato tradizionalmente alle fasi di caratterizzazione e monitoraggio. L’adozione del paradigma della valutazione del rischio offre una ulteriore speciale opportunità di contribuire alla descrizione dei percorsi di esposizione che legano la sorgente dell’inquinamento ai potenziali recettori finali.

La maggior parte di questi percorsi di esposizione è notevolmente influenzata dalla biodisponibilità, la cui conoscenza deve essere considerata come essenziale nella valutazione del rischio per l’uomo e l’ambiente (1).

Tra i percorsi che l’analisi di rischio prende in considerazione un ruolo fondamentale è svolto dal passaggio dei contaminanti dal suolo alla pianta e quindi all’uomo attraverso la catena alimentare. Considerando ad esempio i metalli pesanti, è ormai accertato che la concentrazione totale nel suolo non è in grado di definire correttamente il rischio legato al loro inserimento nella catena alimentare; questo è dovuto alla molteplicità delle interazioni chimiche, fisiche e biologiche con la fase solida del suolo.

I processi di biodisponibilità che individuano la capacità di un contaminante di interagire con il mondo biologico vengono, nel caso dei metalli, spesso descritti mediante metodologie di estrazione con diversi tipi di reagenti.

In particolare l’impiego di metodiche di estrazione sequenziale si è rivelato uno strumento particolarmente efficace per la valutazione della potenziale mobilità e della reattività dei metalli pesanti nel suolo, in grado di fornire informazioni essenziali già nella fase di caratterizzazione di un sito contaminato.

Per lo studio dei percorsi legati all’analisi di rischio si deve però tenere conto che la scelta dei reagenti in questi test, è stata originariamente effettuata per valutare non la tossicità, ma la carenza di metalli nel suolo che poteva indurre fenomeni di deficienza di alcuni elementi essenziali (Fe, Cu, Zn) nei vegetali, quindi, i reagenti utilizzati sono tendenzialmente piuttosto aggressivi.

Nella valutazione del rischio si deve invece considerare che l’azione delle piante a livello della rizosfera non è così energica come quella di un estraente chimico (ad esempio EDTA). E’ nata pertanto la richiesta di nuove procedure analitiche in grado di valutare più adeguatamente i processi di biodisponibilità, tra le quali un particolare interesse rivestono i metodi di “passive approach” in grado di quantificare la concentrazione dei metalli nella fase liquida del suolo (2).

Le metodologie di approccio passivo, prevedono o il prelievo diretto della soluzione presente nel sistema dei pori, la cui analisi fornisce la misura della biodisponibilità dei metalli, al

momento del campionamento, o l'impiego di estraenti blandi, in genere soluzioni di sali alcalini (già impiegati nei primi step di molte estrazioni sequenziali), in modo da prendere in considerazione anche gli effetti derivanti dalla possibile riduzione della concentrazione dei metalli nella soluzione del terreno, in seguito all'assorbimento da parte dei vegetali ed il conseguente rilascio di altri metalli, debolmente legati, dalla fase solida del suolo.

Questi metodi hanno la specifica caratteristica di non modificare la natura delle superfici del terreno e la loro azione può quindi essere generalizzata per un ampio spettro di suoli pedologicamente differenti. L'estrazione passiva consente inoltre di valutare, in alcuni casi, la biodisponibilità dei metalli anche per altri organismi del suolo (3).

I metodi per il prelievo dell'acqua circolante nel sistema dei pori, pur essendosi solo recentemente sviluppati consentono l'ottenimento di dati attendibili non solo mediante l'impiego di "artificial roots", nelle prove di fattibilità di alcune tecnologie (scala mesocosmo per la phytoremediation), ma possono essere impiegati direttamente anche in campo utilizzando lisimetri a suzione, che si basano sulla creazione di una continuità tra il sistema dei pori del suolo ed il filtro del lisimetro stesso.

Una verifica dell'attendibilità dei metodi impiegati deve trovare riscontro in un'elevata correlazione con una misura diretta della biodisponibilità verificabile mediante la valutazione dell'assorbimento di un metallo da parte dei vegetali.

L'impiego di prove di crescita di vegetali sui suoli contaminati in sequenza ai test di biodisponibilità, rappresenta un passaggio molto interessante nella determinazione del rischio ambientale, che consente di prendere in esame direttamente anche quei fenomeni di trattenimento dei metalli da parte del terreno legati ai processi di "ageing".

Alcuni esempi di applicazione di approccio passivo su differenti suoli contaminati dimostrano come questa procedura risulti particolarmente adeguata per definire la quantità di metalli biodisponibili nel percorso suolo-pianta-catena alimentare da prendere in considerazione nell'analisi di rischio per i siti contaminati da metalli pesanti .

### Riferimenti bibliografici

1. Janssen C.R., Heijerick D.G., De Schamphelaere K.A.C., Allen H.E. *Environ.Int.* 28,793–800 (2003)
2. Chapman P.M., Wang F., Janssen C.R., Goulet R.R., Kamunde C.N. *Hum.Ecol.Risk Assess.* 9,641-697 (2003)
3. Janssen R.P.T., Postuma L., Baerselman R., Den Hollander H.A. *Environ.Toxicol.Chem.* 16, 2479-2488 (1997)

**LIVELLI DI CONTAMINAZIONE DA POLICLOROBIFENILI (PCB) DI AREE COSTIERE DEL MAROCCO**

*Rossano Piazza<sup>1</sup>, Bouchta El Moumni<sup>2</sup>, Luca Giorgio Bellucci<sup>3</sup>, Mauro Frignani<sup>3</sup>, Silvia Ferrari<sup>1</sup>, Roberta Zangrando<sup>4</sup>, Ivo Moret<sup>1,4</sup>, Andrea Gambaro<sup>1,4</sup>, Paolo Cescon<sup>1,4</sup>*

<sup>1</sup>*Dip. Scienze Ambientali, Università Cà Foscari, Dorsoduro 2137, Venezia (Italy)*

<sup>2</sup>*Université Abdelmaleck Essaadi, Dept. of Earth Sciences and Oceanology, Tangier (Morocco)*

<sup>3</sup>*ISMAR-Sezione di Geologia Marina, Via Gobetti 101 – 40129 Bologna (Italy)*

<sup>4</sup>*Istituto per la Dinamica dei Processi Ambientali, CNR, Dorsoduro 2137, Venezia (Italy)*

I Policlorobifenili (PCBs) sono prodotti industriali stabili di cui in passato si è fatto largo uso. Tra i 209 possibili congeneri, alcuni hanno mostrato gradi di tossicità confrontabili con quelli delle Policlorodibenzodiossine e dei Policlorodibenzofurani; a causa del loro elevato carattere lipofilico essi hanno tendenza al bioaccumulo ed entrano nella catena alimentare. Il problema della tossicità dei PCBs è reso ancora più grave dalla loro scarsa reattività, che porta ad una elevata persistenza ambientale. Questi composti sono usati come traccianti della contaminazione ambientale, essendo molto stabili e di origine esclusivamente antropica.

La conoscenza dei livelli di concentrazione nei sedimenti superficiali e nei livelli sedimentari più profondi, può consentire una valutazione spazio-temporale della contaminazione dell'area studiata, permettendo di ricostruire gli andamenti temporali della contaminazione e di formulare ipotesi sui meccanismi di diffusione e di trasporto nell'ambiente.

In questo lavoro sono stati analizzati 10 campioni di sedimento provenienti da 4 aree costiere del Marocco: le lagune di Nador (NAD) e di Moulay Bouselham (MB), il tratto finale del fiume Martil (MR) ed il Porto di Tangeri (TG). Ad esse è stato aggiunto un campione di suolo prelevato nei pressi della zona industriale di Tetuan (TS). Le due lagune hanno un'importante valenza ambientale, le altre aree sono state scelte perché sono soggette a diverse tipologie di potenziale inquinamento. Per quanto riguarda le due lagune ed il porto di Tangeri, oltre ai sedimenti superficiali sono stati analizzati alcuni campioni dei livelli profondi.

Le carote di sedimento sono state prelevate mediante tubi in plexiglass, estruse e sezionate ad intervalli di 2-4 cm. Dopo essiccamento fino a peso costante a temperatura ambiente, i campioni sono stati sottoposti alla seguente metodologia analitica<sup>1</sup>: estrazione in bagno ad ultrasuoni (esano/diclorometano 4/1 v/v), disidratazione, concentrazione in flusso di azoto, desolfurazione con mercurio, purificazione mediante cromatografia liquido-liquido (fasi stazionarie: Allumina/Florisil, eluente n-esano), concentrazione in flusso di azoto ed analisi gascromatografica con detector a spettrometria di massa ad alta risoluzione (HRGC-HRMS). Il sistema ad alta risoluzione ha consentito la quantificazione dei triclorobifenili, senza che si rendessero necessarie ulteriori procedure di purificazione. L'analisi qualitativa ha consentito di identificare 54 congeneri di PCB (45 picchi cromatografici). La quantificazione dei congeneri è avvenuta utilizzando 5 congeneri marcati (<sup>13</sup>C-PCB), uno per ogni famiglia di omologhi, da 3 a 7 atomi di cloro. I singoli valori ottenuti sono stati corretti utilizzando fattori di risposta che tengono conto della diversa risposta strumentale. La valutazione dell'accuratezza è stata fatta analizzando un sedimento certificato (NIST, Standard Reference Material 1941b).

La precisione, valutata da 3 ripetizioni dell'analisi dello stesso sedimento certificato, è stata stimata essere dello 0.1%, come deviazione standard relativa, considerando la somma di

tutti i congeneri e variabile tra lo 0.3% (esaclorobifenili) e il 4.8% (triclorobifenili) considerando le diverse famiglie di omologhi.

I risultati ottenuti mostrano livelli di contaminazione molto diversi, a seconda delle varie aree indagate. Le due lagune presentano bassi livelli di concentrazione (0.96-2.04 ng/gr.), anche se MB presenta un trend temporale crescente. L'area TS, vicina ad attività industriali, presenta livelli di contaminazione maggiori (4.84-8.22 ng/gr.) che comunque non appaiono elevati se messi a confronto con le aree industriali di altri Paesi <sup>1-4</sup>. Al contrario, l'area portuale di Tangeri presenta valori di concentrazione assai elevati (164-452 ng/gr.), comparabili con i livelli riscontrati nelle aree più contaminate del pianeta.

### **Bibliografia**

- 1) Moret I., Piazza R., Benedetti M., Gambaro A., Barbante C. and Cescon P. (2001) *Chemosphere* 43, 559-565.
- 2) Fillmann G., Readman J.W., Tolosa I., Bartocci J., Villeneuve J.-P, Cattini C. and Mee L.D. (2002) *Mar. Poll. Bull.* 44 122-133.
- 3) Picer M. (2000) *Croatia Chemica Acta* 73, 123-186.
- 4) Frignani M., Bellucci L.G., Carraro C. and Favotto M. (2004) *Chemosphere* 54, 1563-1572.

## ASPETTI SPECIATIVI DELL'ASSIMILAZIONE DI NUTRIENTI AZOTATI DA PARTE DEL PARTICELLATO MARINO

*Edoardo Reisenhofer<sup>1</sup>, Stefano Cozzi<sup>2</sup>, Gianpiero Adami<sup>1</sup>, Pierluigi Barbieri<sup>1</sup>, Luca Di Monte<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>*Dipartimento di Scienze Chimiche, Università di Trieste, Via Giorgieri 1, 34127 Trieste*

<sup>2</sup>*CNR - I.S.MAR., Sezione di Trieste, Viale Romolo Gessi 2, 34123 Trieste*

L'attenzione per la qualità ambientale ha portato al continuo sviluppo di studi per la caratterizzazione di ecosistemi antropizzati, con attenzione ai processi dinamici che vi avvengono, in termini di indicatori chimici. Gli ambienti marini costieri risultano particolarmente esposti a causa della concentrazione di insediamenti abitativi e produttivi: il Golfo di Trieste ne è un tipico esempio.

Il nostro gruppo di ricerca ha studiato la distribuzione di specie metalliche, di nutrienti eutrofizzanti e di specie organiche persistenti nelle acque del Golfo [1-4], nei sedimenti [5-10] e in organismi bersaglio intesi quali bioindicatori [11-13], onde identificare sorgenti e tipologia d'inquinamento, discriminando i vari siti esaminati e modellizzando le variazioni spazio-temporali in funzione di fattori meteorologici e stagionali [14-15].

Un recente fattore d'impatto è costituito dal diffusore di un impianto di trattamento che convoglia off-shore le acque reflue urbane della Provincia di Trieste. Già in uno studio precedente volto a caratterizzare analiticamente il carico eutrofico del diffusore e a valutarne l'impatto ambientale, ha evidenziato da un lato l'abbattimento del contenuto organico ma d'altro lato anche elevati apporti di azoto ammoniacale.

Nel presente studio si è approfondita l'indagine sull'apporto di nutrienti, con particolare attenzione alle forme azotate: si è quindi preso in considerazione anche il contributo di urea imputabile al depuratore, che ci si attendeva cospicuo data l'origine delle acque trattate; si è inoltre cercato di comprendere il significato delle varie forme dell'azoto sul suo destino nelle acque in cui veniva rilasciato. Si è osservato che l'apporto di urea, un parametro non considerato nel monitoraggio istituzionale, è nel nostro caso non inferiore a quello dell'azoto ammoniacale: ne consegue che le emissioni del depuratore in termini di azoto a bassi stati di ossidazione possono essere anche due volte superiori a quanto istituzionalmente collezionato nei monitoraggi pregressi in quest'area.

Si sono impostati esperimenti per verificare quale sia il significato ambientale delle varie forme di azoto. L'assimilazione dell'azoto inorganico da parte del particellato è stata determinata impiegando nutrienti marcati con <sup>15</sup>N (ossia Na<sup>15</sup>NO<sub>3</sub>, <sup>15</sup>NH<sub>4</sub>Cl e (<sup>15</sup>NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CO), aggiunti a campioni d'acqua marina prelevati a quote di superficie, intermedie e di fondale, e posti in duplicato in bottiglie di policarbonato, trasparenti e scure. Per minimizzare artefatti durante l'incubazione, la quantità di nutriente non deve eccedere il 10% di quanto già naturalmente presente nel campione. Dopo l'aggiunta, le bottiglie vengono riposizionate alle quote di prelievo, quindi alla stessa temperatura e irradianza, ed incubate 'in situ' per 3 ore. I campioni nelle bottiglie scure consentono di valutare l'effetto dell'assenza di luce sull'assimilazione delle varie forme di azoto. Questi esperimenti di incubazione sono stati confrontati con esperimenti su campioni trattati con antibiotico, in cui l'attività batterica risultava inibita. Successivamente i campioni, filtrati su Wathman GF/F di porosità nominale 0.7µm, vengono analizzati con uno spettrometro da massa Europa 20/20 interfacciato con l'analizzatore elementare Europa ANCA Solid/Liquid preparation Unit orientato al trattamento di campioni solidi.

I risultati analitici suggeriscono che la forma nitrica viene assorbita molto lentamente nell'ambiente dei fondali, a bassa irradianza solare: c'è quindi il tempo perché si diluisca prima di entrare nella catena trofica degli organismi marini. La forma ammoniacale viene

invece metabolizzata in tempi brevi da batteri e fitoplankton e riconvertita in forma organica: in definitiva, lo scarico a mare di forme azotate a basso stato di ossidazione, ammonio e urea, risulta essere un fattore ambientale negativo, perché tende ad alimentare piuttosto il comparto batterico marino, che non quello fitoplanktonico.

### Bibliografia

- [1]. E. Reisenhofer, G. Adami and A. Favretto, "Heavy metals and nutrients in coastal, surface seawaters (Gulf of Trieste, North Adriatic Sea): an environmental study by factor analysis", *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, 354, 729-734 (1996).
- [2]. P. Barbieri, G. Adami, A. Favretto and E. Reisenhofer, "A chemometric survey of three sites in Muggia Bay (Northern Adriatic Sea): meteorological effects on heavy metal patterns in surface coastal waters", *Fresenius' J. Analytical Chem.*, 361, 349-352 (1998).
- [3]. G. Adami, P. Barbieri, S. Predonzani, D. Rivetti and E. Reisenhofer, "Nutrient distribution in locations of the Gulf of Trieste (Northern Adriatic Sea) suspected of pollution", *Toxicological and environmental chemistry*, 68, 307-320 (1999).
- [4]. P. Barbieri, G. Adami, S. Predonzani, E. Reisenhofer and D.L. Massart, "Survey of environmental complex systems: pattern recognition of physicochemical data describing coastal water quality in the Gulf of Trieste", *J. Environ. Monitoring*, 1, 69-74 (1999).
- [5]. G. Adami, P. Barbieri, E. Reisenhofer and S. Predonzani, "Heavy metals in surface sediments of Marano Lagoon and their relevance on clam hatcheries. A chemometric investigation", *Annali di Chimica* 87, 709-720 (1997).
- [6]. G. Adami, P. Barbieri, S. Piselli, S. Predonzani and E. Reisenhofer, "New data on organic pollutants in surface sediments in the harbour of Trieste", *Annali di Chimica*, 88, 745-754 (1998).
- [7]. P. Barbieri, G. Adami, S. Predonzani and E. Reisenhofer, "Heavy metals in surface sediments near urban and industrial sewage discharges in the Gulf of Trieste", *Toxicological and environmental chemistry*, 71, 105-114 (1999).
- [8]. G. Adami, P. Barbieri and E. Reisenhofer, "A comparison on five sediment decomposition procedures for determining anthropogenic trace metal pollution", *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 75, 251-260 (1999).
- [9]. G. Adami, P. Barbieri, S. Piselli, S. Predonzani and E. Reisenhofer, "Detecting and characterizing sources of persistent organic pollutants (PAHs AND PCBs) in surface sediments of an industrialized area (harbour of Trieste, Northern Adriatic)", *Journal of Environ. Monitoring*, 2, 261-265 (2000).
- [10]. G. Adami, P. Barbieri, and E. Reisenhofer, "An improved index for defining metal pollution in surface sediments", *Toxicol. and Environ. Chemistry*, 77, 189-197 (2000).
- [11]. L. Favretto, B. Campisi, E. Reisenhofer, and G. Adami, "Terrigenous debris and mussel pollution. A differentiation based on trace element concentration by means of multivariate analysis", *Analytica Chimica Acta*, 344, 251-259 (1997).
- [12]. G. Adami, F. Aleffi, P. Barbieri, A. Favretto, S. Predonzani and E. Reisenhofer, "Bivalves and heavy metals in polluted sediments: a chemometric approach", *Water, Air, Soil Pollution*, 99, 615-622 (1997).
- [13]. G. Adami, P. Barbieri, M. Fabiani, S. Piselli, S. Predonzani, E. Reisenhofer, "Levels of cadmium and zinc in hepatopancreas of reared *Mytilus galloprovincialis* from the Gulf of Trieste (Italy)", *Chemosphere*, 48, 671-677 (2002).
- [14]. P. Barbieri, C.A. Andersson, D.L. Massart, S. Predonzani, G. Adami and E. Reisenhofer, "Modeling bio-geochemical interactions in the surface water of the Gulf of Trieste by three-way principal component analysis (PCA)", *Analytica Chim. Acta*, 398, 227-235 (1999).
- [15]. S. Cozzi, G. Adami, P. Barbieri, C. Cantoni, G. Catalano, F. Crisciani, V. Fiorotto, P. Olivo, R. Purini, F. Raicich, E. Reisenhofer, "Matching monitoring and modelling in the Gulf of Trieste", *Marine Pollution Bulletin*, 48, 587-603 (2004).

## STUDIO DI ADSORBENTI PER LA CONCENTRAZIONE DI SOSTANZE ORGANICHE TOSSICHE IN ATMOSFERA

*M.V. Russo, G. Cinelli, V. Di Lorenzo*

*Facoltà di Agraria (DISTAAM), Università degli Studi del Molise*

*Via De Sanctis, 86100 Campobasso*

*E-mail: mvrusso@unimol.it*

### **Riassunto**

L'inquinamento atmosferico in questi ultimi anni ha assunto proporzioni significative ed ha creato un notevole allarme sociale. Agli inquinanti naturali si aggiungono gli inquinanti prodotti da attività umane (origine antropica) che, se fossero uniformemente distribuiti, non porterebbero a particolari modifiche della composizione dell'aria. Il problema dell'inquinamento di origine antropica, per la maggior parte delle sostanze, deriva proprio dal fatto di essere attualmente concentrato in zone limitate (soprattutto urbane) e di non essere in grado di diffondersi nell'intera atmosfera per la presenza di barriere geomorfologiche o create dall'uomo, che ne limitano la diffusione su larga scala. Si assiste pertanto ad un vero accumulo accentuato in alcuni giorni anche dalle particolari condizioni meteorologiche.

Tra le diverse sostanze organiche presenti nell'atmosfera quelle che meritano una particolare attenzione sono, IPA, BTX, acidi organici, aldeidi, PCBs, PCTs, PCDDs, PCDFs, PCPPs, pesticidi organoclorurati e organofosforici per la loro elevata tossicità e per il pericolo che essi rappresentano in funzione della non biodegradabilità e della capacità di accumulo negli organismi viventi con una azione carcinogenica e teratogenica. Nella comunicazione è stato studiato un'adsorbente sintetico, apolare, per intrappolare alcuni di soluti di interesse ambientale. Sono state studiati i volumi di breakthrough dei pesticidi clorurati e fosforiti, degli idrocarburi policiclici aromatici e dei BTX e il recupero percentuale. Questo adsorbente si è dimostrato molto efficace rispetto agli attuali materiali adsorbenti commerciali. Infatti il volume di breakthrough per gli IPA è  $>$  di 300 L, per i pesticidi è  $>$  di 800 L, con un flusso di campionamento di 1.8 e 1.5 L min<sup>-1</sup>, rispettivamente, e con una umidità relativa dell'90%. Per quanto concerne i BTX il volume di breakthrough è  $>$  di 80 L, con un flusso di campionamento di 0.5 L min<sup>-1</sup> e con un'umidità relativa del 90% circa. Il recupero dei diversi soluti è  $>$  del 95% con 2 o 1 mL di solfuro di carbonio, rispettivamente per gli IPA e i pesticidi e i BTX. Alcune applicazioni in campo reale sono riportate.



**ANALISI DI METALLI IN SEDIMENTI PORTUALI MEDIANTE LA-ICP-MS**

*Antonio Salluzzo\*, Maria Rosaria Zampoli\*, Tiziana Farneti\*, Gerardo Vignola\*\**

*\*Divisione PROT-CHIM, ENEA C.R. Portici, Loc. Granatello, Portici (Na)*

*\*\*Universita' Parthenope di Napoli*

La prima applicazione della tecnica LA-ICP-MS di Gray nel 1985 (1) ha segnato la creazione di una delle tecniche più versatili d'introduzione diretta di campioni solidi, sia per analisi qualitative sia quantitative, degli elementi in tracce negli ultimi anni (2). Utilizzando l'ablazione laser (laser ablation – LA) è possibile introdurre direttamente il materiale solido all'interno del plasma accoppiato induttivamente alla massa (ICP-MS) con grandi vantaggi: poca manipolazione del campione e quindi minore possibilità d'alterazione dello stesso; nessuna necessità di ricorrere a procedure di mineralizzazione, in genere complesse e laboriose con possibilità, anche, di parziale perdita selettiva di alcuni analiti (3); eliminazione dei problemi analitici dovute alle interferenze prodotte dai reattivi necessari per la dissoluzione dei campioni (4).

Attualmente, la tecnica LA è correntemente usata per una gran varietà di applicazioni come l'analisi puntuale di elementi in traccia in matrici come vetri, campioni geologici, metalli, materiali ceramici, polimeri e pulviscolo atmosferico.

Di contro, la tecnica LA non può essere considerata come generalmente utilizzabile per la determinazione di elementi in qualsiasi matrice solida. I maggiori problemi sui campioni reali derivano dalla grande variabilità dei risultati, dipendente dall'omogeneità, dalla qualità dello stato superficiale del solido e, soprattutto dalla difficoltà di reperire standard certificati che abbiano un comportamento, nel processo di ablazione, del tutto analogo ai campioni (5).

Da circa un anno nei nostri laboratori vengono valutate le potenzialità di tale tecnica nell'analisi diretta in campo ambientale degli elementi in tracce.

In tale lavoro, in particolare, vengono presentati i risultati ottenuti per la determinazione di As, Cr, Cu, Zn, Cd e Pb in matrici quali i sedimenti marini. I campioni sono stati prelevati durante una campagna di caratterizzazione dei fanghi nel porto di Salerno, preliminare alle operazioni di dragaggio previste nel Piano Operativo Triennale 2002-2004 dell'Autorità Portuale locale.

Su una ventina di campioni sono stati confrontati i valori di concentrazione di tali metalli ottenuti sia mediante la dissoluzione e analisi delle soluzioni acquose acide con un analizzatore ICP-MS Elan 6000 P.Elmer, sia mediante introduzione diretta del campione allo stato solido nel plasma con il Laser Ablation System LSX 200 CETAC. Quest'ultimo è un laser Nd: YAG allo stato solido pulsato (Q-pulse) che emette nell'UV ad una lunghezza d'onda pari a 266 nm.

Preliminarmente all'analisi, è stata allontanata la frazione granulometrica >2 mm e il campione destinato all'analisi dei metalli è reso omogeneo mediante macinazione in molino a sfere. Un'aliquota è stata sottoposta a mineralizzazione in forno a microonde con HNO<sub>3</sub>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e HF secondo il metodo US-EPA n.3052 e analizzata mediante ICP-MS con nebulizzatore cross-flow quale sistema di introduzione liquidi (metodo 1); in questo caso i dati analitici sono stati validati mediante l'utilizzo di materiali certificati di composizione analoga ai campioni.

Contemporaneamente un'altra aliquota di campione (~500 mg) è stata sottoposta alla pressione di 6 tons ottenendo, in questo modo, delle pasticche compatte e pronte per l'analisi diretta con la tecnica LA-ICP-MS (metodo 2).

L'ottimizzazione dei parametri strumentali legati al processo di ablazione è stata effettuata utilizzando quale campione il materiale di riferimento certificato PACS-2 Marine-Sediment; le rette di calibrazione, infine, sono state ottenute utilizzando come standard gli stessi

materiali di riferimento certificati (GBW 07313-Marine Sediment, PACS-2-Marine Sediment e SL-1 Lake Sediment).

I risultati ottenuti hanno portato alle seguenti conclusioni di carattere generale:

- L'accuratezza del dato analitico, che si ottiene mediante la tecnica dell'ablazione Laser, per ogni campione e per ogni elemento è risultata minore (maggiori valori di RSD) se confrontata con i dati ottenuti per i materiali certificati di riferimento utilizzati per le calibrazioni; come era prevedibile, questo è da attribuire, ad una migliore omogeneità dei materiali certificati. Nonostante ciò i valori che sono stati ottenuti si possono considerare generalmente accettabili, naturalmente in dipendenza del grado di accuratezza ricercato.
- La ricerca di più isotopi per lo stesso elemento ha escluso alterazioni delle misure dovute ad eventuali interferenze di tipo isobariche, sempre presenti, seppur in misura diversa, quando si effettua l'analisi utilizzando il nebulizzatore quale sistema di introduzione campione.
- Per tutti i metalli sussiste una generale buona corrispondenza tra i valori ottenuti con le due metodiche; laddove vi sono differenze, i valori ricavati dalla LA-ICP-MS sono sempre in difetto.

In definitiva, le prove effettuate, seppur di numero limitato, confermano le potenzialità peraltro già dimostrate per altre tipologie di campioni, della tecnica dell'ablazione laser che, quindi si pone come metodica interessante e alternativa rispetto alle metodiche classiche, anche nel campo delle analisi ambientali.

Certo è che, comunque, nel caso specifico, c'è ancora la necessità e la possibilità di migliorare sia l'accuratezza sia la precisione del metodo, per questo in futuro, si prevede di focalizzare l'attenzione su tali punti:

- migliorare le tecniche di omogeneizzazione del campione;
- vagliare nuove metodiche per la preparazione delle pasticche (aggiungendo, laddove necessario, dei collanti per rendere più compatta la pasticca o aumentando le pressioni in gioco);
- cercare nuovi materiali certificati per allargare i range di calibrazione;
- operare la calibrazione utilizzando diversi spikes del campione ottenuti aggiungendo quantità note dei metalli di interesse: in questo modo si otterrebbe il duplice effetto di utilizzare il range di calibrazione voluto e di effettuare la calibrazione agendo sulla stessa matrice, in modo che il processo di ablazione risulti analogo sia sugli standard sia sui campioni.

- 1) A.L. Gray. Analyst 110 (1985) 551-556.
- 2) D. Gunther, S.E. Jackson, H. P. Longrich. Spectrochimica Acta Part B 54 (1999) 381-409.
- 3) Yi-Ling Lee, Chao-chiang Chang, Shih-Jen Jiang. Spectrochimica Acta Part B 58 (2003) 523-530.
- 4) S.Durrant. J.Anal. At. Spectrometry 14 (1999) 1385-1403.
- 5) S. Tanaka, et al. J. Anal. At. Spectrometry 13 (1998) 135-140.

**TRASPORTO DI MICROINQUINANTI INORGANICI NELLA LAGUNA DI VENEZIA ATTRAVERSO L'AEROSOL**

G. Toscano<sup>a</sup>, G. Capodaglio<sup>a,b</sup>, W. R. L. Cairns<sup>b</sup>, P. Cescon<sup>a,b</sup>, A. Gambaro<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup> Dipartimento di Scienze Ambientali, Università di Venezia, Calle larga S. Marta, Dorsoduro 2137, 30123 Venezia

<sup>b</sup> Istituto per la Dinamica dei Processi Ambientali del CNR, Dorsoduro 2137, 30123 Venezia

La Laguna di Venezia è un area fortemente antropizzata sottoposta all'input di numerosi inquinanti e negli ultimi anni è stata oggetto di numerosi studi sui processi che influenzano le caratteristiche dell'ecosistema lagunare.

Solo di recente sono state condotte ricerche finalizzate alla valutazione dell'apporto di inquinanti attraverso il particolato atmosferico nell'area della Laguna di Venezia (Capodoglio e al. 2002).

In questo lavoro sono presentati i risultati di uno studio condotto sulla caratterizzazione chimica e sull'evoluzione temporale della concentrazione di microcomponenti inorganici nell'aerosol entrante nella Laguna di Venezia.

A questo scopo sono stati effettuati campionamenti di particolato atmosferico di diametro aerodinamico inferiore a 10  $\mu\text{m}$ , della durata di circa 15 giorni, da marzo 2002 a luglio 2003 in tre stazioni della Laguna di Venezia (Faro, Moranzani e Teolo). Sono stati utilizzati campionatori ad alto volume (Tish Environmental Inc., Village of Cleves, OH, USA) operanti a una velocità di flusso di 1,13  $\text{m}^3/\text{min}$  e muniti di impattore a cascata che ha consentito di suddividere il particolato in 6 classi dimensionali (10-7,2  $\mu\text{m}$ ; 7,2-3  $\mu\text{m}$ ; 3-1,5  $\mu\text{m}$ ; 1,5-0,95  $\mu\text{m}$ ; 0,95-0,49  $\mu\text{m}$ ; minore di 0,49  $\mu\text{m}$ ). I campioni di aerosol, raccolti su filtri in cellulosa, sono stati mineralizzati tramite un forno a microonde Milestone (Ethos 1600) e analizzati per la determinazione di Li, Al, V, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Rb, Cd, Cs, Pb e U tramite spettrometria di massa con sorgente al plasma accoppiato induttivamente (ICP-MS) (Yang e al. 2002).

Il contributo dei bianchi derivante dai filtri, la manipolazione ed il trasporto è stato valutato separatamente. I risultati ottenuti mostrano che tale contributo è trascurabile rispetto a quello dei campioni. Le concentrazioni degli elementi ottenute per i bianchi che tengono conto di tutti i contributi sono state utilizzate per la stima dei limiti di rivelabilità (LOD) quantificati come concentrazione media dell'elemento più tre volte la deviazione standard. L'accuratezza della metodologia analitica è stata controllata attraverso analisi di un campione di materiale certificato (particolato atmosferico certificato NIST 1648). I risultati ottenuti sono in ottimo accordo con i valori certificati e i fattori di recupero per la maggior parte degli elementi sono circa il 90%.

L'evoluzione temporale della concentrazione di  $\text{PM}_{10}$  totale per unità di volume presenta nella stazione di Teolo una variabilità molto elevata rispetto ai siti di Faro e Moranzani, che al contrario mostrano una concentrazione quasi costante durante tutto il periodo di campionamento.

I risultati ottenuti per la distribuzione tra le classi dimensionali degli elementi in tracce nell'aerosol entrante nell'area lagunare ha consentito di formulare alcune ipotesi sulla loro origine.

Elementi in tracce quali Fe, Mn, Al, Li presentano le maggiori concentrazioni associate alle particelle con diametro aerodinamico superiore a 3  $\mu\text{m}$  e sono da considerare di origine principalmente crostale, mentre elementi quali V, Pb, Cd presentano concentrazioni più elevate associate alle particelle più fini (diametro aerodinamico inferiore a 1  $\mu\text{m}$ ) e sono da considerare di origine principalmente antropica.

Allo scopo di valutare il contributo del particolato atmosferico al trasporto di inquinanti nell'atmosfera della Laguna di Venezia sono stati calcolati i flussi degli elementi in tracce dalle concentrazioni (espresse in  $\text{ng/m}^3$ ) e dalla velocità media del vento misurati in ogni periodo di campionamento.

Dai risultati ottenuti si può osservare che le sorgenti locali di aerosol (industriali e urbane) sono quelle che contribuiscono in maggior misura; tuttavia per alcuni elementi inquinanti, il trasporto attraverso l'aerosol marino sembra contribuire in maniera significativa all'input totale verso la Laguna di Venezia.

1. G. Capodaglio, A. Gambaro, G. Toscano, C. Barbante, P. Cescon MBCAC IV, 4<sup>th</sup> Mediterranean Basin Conference on Analytical Chemistry. Portorož, Slovenia- September 15-20, 2002.
2. Gambaro, L. Manodori, S. Ferrari, G. Toscano, A. Varga, I. Moret, G. Capodaglio Determination of trace elements and organic pollutants (PCB, PAH) in the atmospheric aerosol of the Venice Lagoon. In "Scientific research and safeguarding of Venice Lagoon: Corila Research Program – 2001 results", 2002, pp. 447-457.
3. K. X., Yang, K. Swami, L. Husain. Spectrochimica Acta Part B 57 (2002) 73-84.

## DISTRIBUZIONE DI Fe E Zn NEL SETTORE OCCIDENTALE DEL MARE DI ROSS

C. Turetta<sup>1</sup>, F. Corami<sup>2</sup>, A. Gambaro<sup>1,2</sup>, G. Capodaglio<sup>1,2</sup>, P. Cescon<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Istituto per la Dinamica dei Processi Ambientali-CNR, Venezia (I)

<sup>2</sup> Dipartimento di Scienze Ambientali-UCF, Venezia (I)

Il Mare di Ross riveste un ruolo essenziale nella circolazione generale dell'Oceano meridionale. In esso si possono riconoscere diverse masse d'acqua, di notevole importanza per la circolazione oceanica, derivanti dall'interazione tra le acque della corrente Circumpolare Antartica (CDW) e le acque dello shelf<sup>[1]</sup>.

In particolare nello shelf si formano acque ipersaline (HSSW) e acque super fredde (ISW), che contribuiscono alla formazione delle acque di fondo (AABW); queste, a causa della loro densità, sprofondano influenzando la composizione delle acque oceaniche di fondo. Durante l'estate australe si forma inoltre una massa di acqua superficiale, Antarctic surface water (AASW) derivante dal mescolamento di acque dello shelf con acque di fusione della banchisa.

Durante la campagna oceanografica antartica 2000-2001 (XVI spedizione italiana in Antartide) sono stati prelevati campioni di acqua di mare lungo quattro profili di profondità (10 quote) per la caratterizzazione delle principali masse d'acqua riconoscibili nel mare di Ross. Un profilo, D1, è stato campionato nell'area del Drigalsky Basin, nella zona in cui è presente una polynia permanente, dove si formano le acque ipersaline (HSSW); due profili, CA e CA2, nell'area di Cape Adare dove si ha il riversamento dell'HSSW dalla piattaforma verso le zone profonde del mare di Ross contribuendo alla formazione della AABW e dove la CDW penetra all'interno di quest'area ad una quota variabile tra i 200 ed i 600 metri. Infine il profilo B è stato campionato nel Joides Basin, un bacino relativamente confinato, con una particolare orografia che rende scarso il trasporto orizzontale privilegiando quello verticale.

I campioni prelevati sono stati filtrati con filtri a membrana (porosità 0.45 µm) e conservati in bottiglie di FEP (capacità 2 l) a -20° C, fino al momento dell'analisi in Italia. Le analisi degli elementi in traccia nella fase disciolta sono state fatte mediante HR-ICP-SFMS<sup>[2]</sup> con lo scopo di caratterizzare le differenti masse d'acqua sulla base del contenuto degli elementi ed in relazione a parametri chimico-fisici quali temperatura, salinità e ossigeno disciolto. In questo lavoro sarà esaminata la distribuzione di ferro e zinco. I valori di concentrazione ottenuti per i due elementi sono consistenti con le loro caratteristiche geochimiche e con i valori attesi.

Le caratteristiche geochimiche del ferro<sup>[3]</sup> sono quelle di un elemento *recycled* e *scavenged*: la sua distribuzione è infatti controllata dall'attività biologica e dai processi di ossidoriduzione, ed è rapidamente rimosso dalla colonna d'acqua per precipitazione come idrossido in ambienti ossigenati. Gli strati superficiali nelle stazioni campionate sono caratterizzati da concentrazioni di Fe più basse rispetto agli strati sottostanti (fig. 1): ciò è legato da una parte all'*uptake* fitoplanctonico e dall'altra al fatto che si tratta di acque con alte concentrazioni di ossigeno disciolto dove il Fe(III), la forma stabile in acque ossigenate, essendo presente come ossido idrato di Fe è poco solubile a pH naturale dell'acqua di mare. I minimi di concentrazione si trovano in corrispondenza dei massimi di ossigeno disciolto, mentre in corrispondenza dell'intrusione della CDW, una massa d'acqua meno giovane e quindi meno ossigenata, si hanno concentrazioni più elevate di Fe. Nel profilo D1 il picco di concentrazione del Fe a quota -300 si ritiene sia legato ad un fattore locale e, più precisamente, alla presenza del ghiacciaio Drigalsky la cui base si trova proprio a questa profondità; processi erosivi possono portare al rilascio di Fe e di altri metalli.

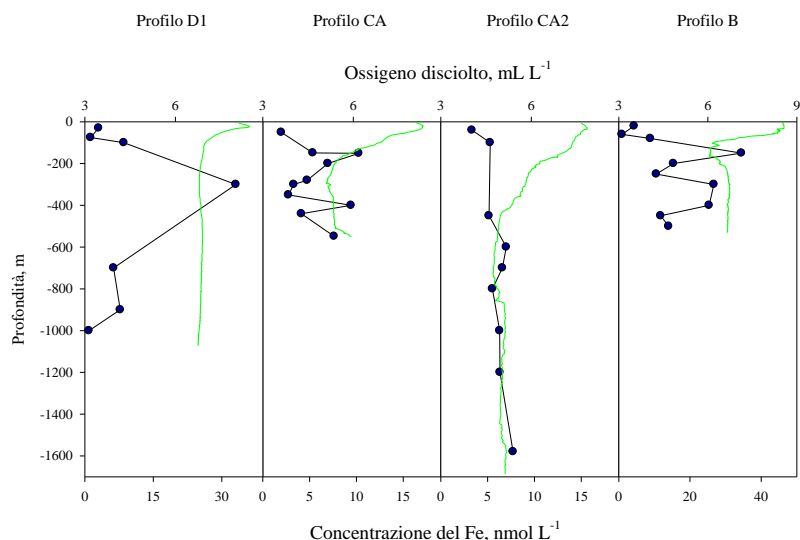


Fig. 1. Distribuzione della concentrazione del Fe (●) lungo i quattro profili di profondità in relazione all'andamento dell'ossigeno disciolto (—).

Lo zinco mostra una distribuzione tipica di un *nutrient o recycled element* esibendo un profilo caratterizzato da una diminuzione di concentrazione superficiale e da un aumento in profondità. Lo zinco infatti essendo un costituente essenziale in diversi processi metabolici viene assimilato in superficie dagli organismi fitoplanctonici e trasportato in profondità dove viene rigenerato. Anche per lo Zn si evidenzia a quota -300 del profilo D1 un picco rilevante di concentrazione correlabile al ghiacciaio Drigalsky.

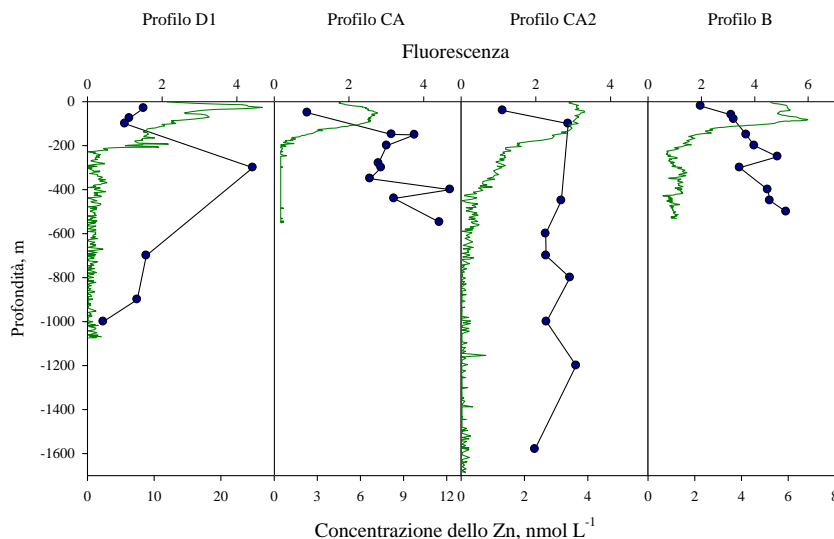


Fig. 2. Distribuzione della concentrazione dello Zn (●) lungo i quattro profili di profondità in relazione all'andamento della temperatura (—).

### Bibliografia

1. Orsi A.H., Whitworth III T., Nowlin Jr W.D. *Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers*, 42, 641-673 (1995).
2. Turetta C., Cozzi G., Barbante C., Capodaglio G., Cescon P. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, in press.
3. Bruland K.W. *Chemical Oceanography*, 8, 157-220 (1983).

## L'ISTITUTO VIRTUALE PER I MATERIALI DI RIFERIMENTO (VIRM)

I. Weir<sup>1</sup>, K. Kramer<sup>2</sup>, R. Morabito<sup>3</sup>, D. Jenkins<sup>4</sup>, H. Emons<sup>5</sup>, C. Càmara<sup>6</sup>, A. Bortoli<sup>7</sup>

<sup>1</sup>Optimat, UK, <sup>2</sup>Mermayde, NL, <sup>3</sup>ENEA-PROT, Via Anguillarese, 301, 00060 Roma, [morabito@casaccia.enea.it](mailto:morabito@casaccia.enea.it), <sup>4</sup>LGC, UK, <sup>5</sup>IRMM, BE, <sup>6</sup>University of Madrid, ES, <sup>7</sup>QualityConsult, IT

### Cosa è il VIRM

A partire dal 1° gennaio 2003, l'Unione Europea sta finanziando un progetto relativo alla costituzione di un Istituto Virtuale per i Materiali di Riferimento (Progetto VIRM - EC Contract: G7RT-CT-2002-05104). Scopo dell'Istituto Virtuale Europeo per i Materiali di Riferimento (VIRM) è offrire **il luogo d'incontro** per tutte le parti interessate nel settore dei materiali di riferimento in Europa. Nella costruzione di questo Istituto è attivamente coinvolto un consorzio di esperti europei, appartenenti a organizzazioni di ricerca e sviluppo, università, laboratori pubblici e privati, produttori di Materiali di Riferimento e industrie. Il VIRM nasce con il proposito di facilitare la disseminazione di informazione, conoscenza e supporto nel reperimento e nell'utilizzo di Materiali di Riferimento e la consulenza di esperti sui Materiali di Riferimento e le tematiche attinenti. L'obiettivo è quello di diventare uno strumento indispensabile per chi si occupa di Controllo di qualità delle misure analitiche. Il carattere innovativo del VIRM consiste nella sua struttura virtuale, che consente di combinare un'esigenza minimale di infrastrutture logistiche con la massima efficacia di una rete ICT a livello Europeo. Il VIRM raggiunge *tutti* i Paesi Europei.

### Che cosa offre il VIRM

Il VIRM offre attraverso il suo sito web un vasto repertorio di strumenti utili nel campo dei Materiali di Riferimento e del Controllo di Qualità. I membri dell'Istituto godranno di accesso illimitato ai servizi comuni e riceveranno la newsletter con cadenza bisettimanale con informazioni utili sia per gli utilizzatori che per i produttori di Materiali di Riferimento. I servizi includono: **database** con possibilità di effettuare ricerche (ad es. "Cerca un MR"); **raccolta** di articoli scientifici (in versione scaricabile), "reports" e "position papers"; **incontri virtuali di discussione** su importanti tematiche inerenti i Materiali di Riferimento; **collegamenti** in rete a progetti e/o a linee guida su Materiali di Riferimento, QA/QC, analisi di routine, etc.; **eventi** (conferenze, workshop, corsi, etc.); **produttori** di Materiali di Riferimento; **organizzatori** di "PT Schemes"; **aiuto e consigli** per gli utilizzatori finali; **glossario**; **Punti di Contatto Nazionali** ("National Contact Points" - NCPs) per superare le barriere linguistiche; **Newsletter** elettronica; Corsi di **addestramento**.

### Attività

#### Sito web

Il sito web dell'Istituto Virtuale è il cuore della rete VIRM. Offre servizi completi di ricerca (persone, progetti, Materiali di Riferimento, etc) ed è il centro dal quale tutti i membri potranno diffondere informazioni attinenti ai Materiali di Riferimento ([www.VIRM.net](http://www.VIRM.net)).

#### Newsletter

La Newsletter viene inviata due volte la settimana tramite e-mail con tutte le più recenti informazioni (riguardo conferenze, nuovi Materiali di Riferimento, etc.) che provengono dalla comunità scientifica dei Materiali di Riferimento.

#### Gruppi di Interesse Speciale (SIG)

I SIG sono uno strumento che consente, tra l'altro, di promuovere la discussione tra specialisti sull'uso appropriato dei Materiali di Riferimento e sulle necessità di nuove produzioni.

### Helpdesk - VIRM

L'Helpdesk costituisce l'unica entità fisica dell'Istituto Virtuale. Lo staff assicura l'aggiornamento continuo del sito web ed è disponibile per quesiti di natura tecnica e scientifica, che saranno inoltrati a membri esperti del VIRM (info@VIRM.net).

### Punti di Contatto Nazionali (National Contact Points-NCP)

Gli NCP sono presenti in tutti i Paesi d'Europa. Si occuperanno di diffondere le informazioni e rispondere ai quesiti nelle differenti lingue europee.

### Collegamenti

Il VIRM costituirà un collegamento tra tutte i soggetti interessati della comunità dei Materiali di Riferimento e consentirà il collegamento con i produttori e utilizzatori di Materiali di Riferimento, con le organizzazioni internazionali, etc.

## **Struttura del Progetto**

L'Unione Europea finanzia, nell'ambito del V Programma Quadro, un consorzio di 22 partner (Core Group Members - CG) per realizzare un Istituto Virtuale Europeo per i Materiali di Riferimento che sia una organizzazione economicamente e legalmente indipendente. Tutti i membri sono esperti provenienti dal mondo della ricerca, delle istituzioni, del privato e dell'industria con comprovata esperienza e competenza nel campo dei Materiali di Riferimento.

Il centro nevralgico del progetto VIRM è il Comitato Direttivo ("Steering Committee" - SC), composto da sei partner del CG. Questo comitato ha il compito di provvedere al coordinamento scientifico, finanziario e amministrativo del Progetto. In tutti i Paesi membri dell'Unione Europea, nei paesi candidati (NAS) e in altri Paesi Europei sono identificati i Punti di Contatto Nazionali (NCP). L'Helpdesk ha sede in Italia ed è affidato all'Associazione QualityConsult.

## **Come diventare un Membro del VIRM?**

L'appartenenza all'Istituto Virtuale consentirà l'accesso a tutti i servizi offerti dal VIRM: abbonamento alla newsletter, uso dei database, documentazione scaricabile, *helpdesk* etc. La registrazione come Membro è *gratuita* durante la fase iniziale del progetto (2003-2004). Visitate e provate il sito web [www.VIRM.net](http://www.VIRM.net) dove ci si può registrare direttamente on-line, compilando una apposita scheda.

## **Contatti**

Il Punto di Contatto Nazionale per l'Italia è:

QualityConsult, "Associazione per lo sviluppo della qualità ambientale"

Tel: 3355972191; Fax: 1782204648; e-mail: [qualityconsult@tiscali.it](mailto:qualityconsult@tiscali.it).

Per ogni quesito o commento contattate l'Helpdesk internazionale all'indirizzo: [info@VIRM.net](mailto:info@VIRM.net).

QualityConsult, oltre ad essere Punto di Contatto Nazionale Italiano, svolge anche la funzione di Helpdesk internazionale e, pertanto, i laboratori membri italiani godranno del particolare privilegio di avere a disposizione un Helpdesk internazionale che parla anche la loro lingua.

Il Progetto VIRM è finanziato dalla Unione Europea nell'ambito del Quinto Programma Quadro con Contratto: G7RT-CT-2002-05104.



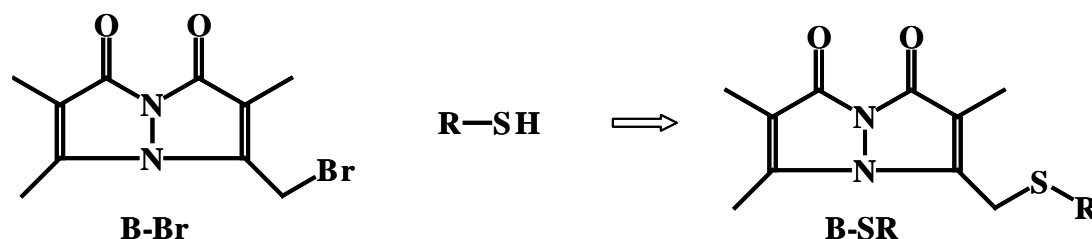
**ANALISI DELLA SPECIAZIONE DELLO ZOLFO IN AMBIENTE MARINO  
TRAMITE HPLC E SPETTROMETRIA DI ASSORBIMENTO  
E FLUORESCENZA MOLECOLARE**

*Daniele Fabbri, Raffaella Ruffilli, Valentina Baravelli*

*Laboratorio di Chimica Analitica, C.I.R.S.A. Università di Bologna, via S.Alberto 163, 48100 Ravenna*

In ambiente marino lo zolfo è presente essenzialmente come solfato, ma in acque subossiche ed anossiche lo zolfo si trova in numerose forme chimiche, fra cui solfuro, tiosolfato, zolfo elementare ( $S_8$ ) e polisolfuri ( $Sx^{2-}$ ). La formazione di queste specie è mediata da processi biologici, e governata da numerosi fattori chimici, quali la concentrazione di ossigeno e la presenza di metalli, per cui la chimica dello zolfo negli ecosistemi marini è piuttosto complessa. I solfuri ed, in particolare, i polisolfuri svolgono un ruolo importante in molti processi ambientali. Ad esempio, i polisolfuri sembrano influenzare la biodisponibilità di metalli pesanti in ambienti marini anossici, attraverso la formazione di complessi solubili in acqua oppure di specie lipofile, come  $HgS_5$ . Si ritiene, inoltre, che i polisolfuri siano implicati nei processi diagenetici di incorporazione dello zolfo nel materiale organico, che determinano la presenza dello zolfo nei combustibili fossili. Nonostante l'importanza dei polisolfuri nei meccanismi di interazione fra il ciclo dello zolfo e quello dei metalli e del carbonio nell'ambiente marino, non esistono ancora metodiche analitiche adeguate per la determinazione delle forme molecolari dei polisolfuri ( $S_2^{2-}$ ,  $S_3^{2-}$ ,  $S_4^{2-}$ ,  $S_5^{2-}$ ).

Con questo studio si vuole dare un contributo preliminare allo sviluppo di metodologie in cromatografia liquida per lo studio della speciazione dello zolfo in ambiente marino. Poiché i polisolfuri si formano dalla reazione fra solfuro e zolfo elementare, e possono decomporsi producendo tiosolfato, l'attenzione è stata rivolta verso queste specie chimiche. L'analisi dello zolfo elementare può essere convenientemente eseguita con HPLC e rivelazione UV, sfruttando l'assorbimento della specie  $S_8$ , la forma molecolare prevalente. Per l'analisi delle forme ioniche abbiamo sfruttato la derivatizzazione con monobromobimano (B-Br), ampiamente utilizzata per l'analisi di tioli.



La procedura analitica è relativamente semplice. Solfuri e tiosolfati reagiscono rapidamente e completamente con B-Br formando, rispettivamente, B-S-B e  $B-S_2O_3^-$ , che sono analizzati in HPLC utilizzando miscela acetonitrile /acqua come fase mobile, e rivelatore UV-Vis oppure fluorimetrico. Attraverso l'uso di soluzioni standard sono state determinate le principali prestazioni analitiche (riproducibilità, limite di rivelabilità, intervallo dinamico lineare), la metodologia è stata poi testata positivamente su acque interstiziali di sedimenti lagunari.

Per quanto riguarda la determinazione dei polisolfuri, non erano disponibili soluzioni standard delle specie molecolari  $Sx^{2-}$ . Le analisi sono state, quindi, effettuate su soluzioni di polisolfuro preparate in laboratorio facendo reagire  $Na_2S$  e  $S_8$  in ambiente basico. La determinazione quali-quantitativa delle forme molecolari di polisolfuro è stata tentativamente effettuata confrontando i risultati delle analisi HPLC-UV della soluzione di polisolfuro trattata con B-Br, con misure di spettrometria di assorbimento molecolare e studi degli equilibri chimici delle specie di zolfo coinvolte.

**COMUNICAZIONI POSTER**

**CHIMICA ANALITICA E ALIMENTI**

## DETERMINAZIONE DEL CONTENUTO DI SELENIO IN DIVERSE VARIETÀ DI RISO MEDIANTE ANALISI VOLTAMMETRICA

*Luigi Falciola<sup>a</sup>, Paola Fermo<sup>b</sup>, Mario Merlino<sup>c</sup>, Patrizia Mussini<sup>a</sup>, e Monica Panigati<sup>b</sup>*

*<sup>a</sup> Università Degli Studi di Milano, Dipartimento di Chimica Fisica ed Elettrochimica, via Golgi 19, 20133 Milano; <sup>b</sup> Università Degli Studi di Milano, Dipartimento di Chimica Inorganica, Metallorganica e Analitica, via Venezian 21, 20133 Milano; <sup>c</sup>Università Degli Studi di Milano, Istituto di Chimica Farmaceutica e Tossicologica, Facoltà di Farmacia, Viale Abruzzi 42, 20131 Milano; e-mail: monica.panigati@unimi.it*

Da diversi anni numerosi studi dimostrano come il Selenio intervenga come cofattore di importanti processi enzimatici antiossidativi e per questo motivo, possa essere considerato un potenziale agente antitumorale, più in generale, quale agente preventivo dei processi di invecchiamento. Il Selenio biodisponibile viene assunto prevalentemente attraverso l'alimentazione ma essendo caratterizzato da un margine di sicurezza ridotto diventa estremamente importante determinarne con la massima accuratezza il contenuto nei diversi alimenti, in particolare nei cereali, che costituiscono la base di molte diete, non solo di quella mediterranea. È stato infatti osservato che, assunto in dosi eccessive, questo micronutriente risulta particolarmente tossico (la dose giornaliera raccomandata U.S. RDA prevede infatti una quantità non superiore a 70 µg/giorno per gli uomini e 55 µg/giorno per le donne) [1].

L'obiettivo di questo lavoro è stato quello di determinare il contenuto di Selenio in tre diverse varietà di riso coltivate nella zona del Vercellese: nel **riso bianco**, in una varietà di **riso nero** ed in una di **riso rosso**.

Il campione veniva inizialmente mineralizzato e tra i diversi metodi di “digestione” riportati in letteratura è stato utilizzato per la prima volta un metodo “combinato” che ha permesso di ottenere una buona distruzione della matrice e buoni recuperi dell'analita. Il metodo consiste in una prima “digestione” per via umida a caldo con HNO<sub>3</sub> concentrato in presenza di Mg(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, seguita da uno stadio di incenerimento in muffola a 450°C. Il prodotto della calcinazione veniva poi ridisciolti in HCl 6 M a 110°C, diluito con acqua deionizzata e quindi analizzato. Numerosi sono i metodi analitici che si possono utilizzare per determinare il Selenio. In particolare, la tecnica voltammetrica di *stripping* catodico (CSV) (basata sulla formazione e successiva riduzione, su goccia di mercurio, di un composto intermetallico HgSe o, in presenza di ioni rame, Cu<sub>x</sub>Se) permette di ottenere limiti di rilevabilità estremamente soddisfacenti (inferiori a 100 pM) [2]. Questo metodo che si raccomanda a causa della sua elevata sensibilità pone però il problema della ottimizzazione di molteplici variabili [3-5], in relazione alla specifica matrice, che può contenere numerose specie interferenti sia derivanti dal campione originario sia dallo specifico metodo di digestione. In particolare accanto all'ottimizzazione dei parametri tipici delle tecniche di *stripping* (potenziale e tempo di deposizione, tempo di “quiete”, velocità e modalità di *stripping*, agitazione, dimensioni della goccia di mercurio...) nel caso del Selenio si aggiungono alcuni problemi specifici [2,3] come (a) la scelta di una concentrazione ottimale degli ioni Cu<sup>2+</sup> e (b) l'effetto di modulazione da parte dei cloruri (presenti in concentrazione significativa in seguito alla digestione del campione) e del pH. In questa presentazione verrà discussa la procedura di ottimizzazione dei parametri critici d'analisi e riportati i dati relativi al contenuto di Selenio nei differenti campioni di riso da noi considerati. Si tratta del primo caso di applicazione della CSV con aggiunta di rame all'analisi del Selenio in campioni mineralizzati secondo la procedura sopra descritta. I dati elettroanalitici sono stati infine confrontati con quelli ottenuti mediante spettrometria HG-ICP.

**Bibliografia**

- [1] A. Kumar, K. Krishnaswamy, *J. Agric. Food Chem.* (1997), 45, 2565
- [2] G. Mattsson, L. Nyholm, Å. Olin, *J. Electroanal. Chem.* (1994), 379, 49
- [3] P.Zuman, G. Somer, *Talanta* (2000), 51, 645
- [4] L. Campanella, T. Ferri, *J. Electroanal. Chem.* (1984) 164, 241
- [5] T. Ferri, C. De Luca, L. Ticconi, *Analytical Letters* (2001), 34, 975

**DETERMINAZIONE MEDIANTE VOLTAMMETRIA CICLICA, DELLA  
CAPACITA' ANTIOSSIDANTE DI ESTRATTI VEGETALI**

*L. Campanella, T. Gatta, E. Martini, G. Rita, M. Tomassetti*

*Dipartimento di Chimica, Università di Roma "La Sapienza", P.le A. Moro 5,  
00185 Roma Italia*

Le interazioni tra sistemi biologici e radicali liberi sono numerose e molto complesse, ma, generalmente, non favorevoli ai primi. Per questo in campo farmaceutico e alimentare, negli ultimi anni, c'è stato un crescente sforzo di ricerca riguardo ai cosiddetti antiossidanti, soprattutto quelli di origine naturale, utili sia per impedire la perossidazione lipidica degli alimenti, che per proteggere l'organismo umano dai danni provocati dall'azione dei radicali liberi.

Sono state scelte alcune tra le matrici vegetali più comuni e note in letteratura per la loro elevata attività antiossidante: tè verde, tè nero, rosmarino, caffè; accanto a questi prodotti, molto conosciuti e studiati, si è ritenuto interessante analizzare prodotti alimentari "nuovi" provenienti dalla foresta Amazzonica (Brasile), di cui solo recentemente, ma con grande interesse, si stanno occupando le industrie alimentari e farmaceutiche: acerola e açai inoltre sono state analizzate due tisane, miscele di antiossidanti naturali denominate "Herb Tea" e "Quality Tea" prodotte dalla "Traditional Medicinal Inc." (USA).

A partire da ciascuna di queste matrici vegetali sono stati preparati estratti metabolici, acetonicici ed acquosi utilizzando quindi solventi considerati fra loro complementari nell'estrazione delle sostanze antiossidanti presenti nelle matrici vegetali. Dei tre estratti prodotti da ogni matrice e della matrice stessa, si è determinata la capacità antiossidante, espressa in unità di acido ascorbico (assunto come composto antiossidante di riferimento), mediante un nuovo metodo elettrochimico basato sulla misura dell'area anodica di un voltammogramma ciclico.

I risultati ottenuti per ciascuna matrice vegetale e per i rispettivi estratti, sono stati confrontati per cercare di capire se il consumo, da parte dell'uomo, di estratti naturali, piuttosto che delle rispettive matrici di estrazione, possa costituire un vantaggio e in che misura, a livello di assorbimento di sostanze antiossidanti. Inoltre, a partire dai risultati relativi al potere antiossidante dei vari estratti preparati, si è tentato di stabilire a quali tra i composti antiossidanti presenti nella matrice, ove ce ne fosse più di uno, sia maggiormente ascrivibile il potere antiossidante mostrato dal particolare estratto.

## LA COMPOSIZIONE DELLA FRAZIONE LIPIDICA NELLE MESCOLANZE DI LATTE VACCINO E CAPRINO

*Marco Antonilli e Maria Rosa Festa*

*Dipartimento di Chimica Edificio Cannizzaro, Università “La Sapienza”  
P.le A. Moro 5, 00185 Roma.*

La limitata produzione di latte di capra, malgrado l'aumentata richiesta, può indurre alla tentazione di frode realizzata aggiungendo a quello di capra quantità variabili di latte di mucca, più facilmente reperibile.

Questo lavoro focalizza la sua attenzione sulla composizione della frazione lipidica come indicatore della genuinità e dell'integrità del latte di capra.

Un'accurata analisi gas cromatografica della frazione lipidica di campioni di latte crudo di capra e di mucca e di mescolanze preparate in laboratorio, mostra le analogie e le differenze fra i due tipi di latte e la valutazione di alcuni parametri caratterizzanti permette di rivelare la presenza di grassi estranei e di apprezzare fino al 5 % di latte di mucca aggiunto a quello di capra.

Dopo avere estratto il grasso, viene transesterificato e analizzato per via gas cromatografica usando una colonna adatta per gli esteri metilici degli acidi grassi, un iniettore a temperatura programmabile ed un rivelatore a ionizzazione di fiamma (FID). L'analisi è stata condotta con una adatta programmazione della temperatura.

Sono stati rivelati circa 90 picchi cromatografici, di cui almeno 40 sono stati identificati. Per tutti i picchi è stata effettuata l'analisi quantitativa, usando la tecnica dello standard interno. I cromatogrammi sono stati elaborati con un software.

Le differenze qualitative e quantitative fra i cromatogrammi di latte caprino e latte vaccino hanno permesso di supporre una differenziazione.

Sono state così analizzate miscele di latte caprino e vaccino partendo dal 100 % dell'uno e dell'altro ed aggiungendo il 5, 10, 25, 50, 75, 90 e il 95 % dell'uno e dell'altro. Le miscele sono state analizzate secondo il metodo descritto.

I risultati delle analisi oltre che in termini qualitativi e quantitativi dei singoli componenti, sono stati valutati partendo dai dati primari e calcolando i rapporti fra le aree dei vari picchi.

Alcuni dei rapporti si sono rivelati parametri discriminanti, in quanto fornivano valori sempre crescenti o sempre decrescenti con l'aumento della frazione di latte di mucca aggiunto alla mescolanza. Altri rapporti fornivano valori ben costanti intorno ad un valore medio.

Gli uni e gli altri possono essere proposti come caratterizzanti per apprezzare le aggiunte di latte estraneo, o addirittura di grasso di altra natura.

I dati ricavati dall'analisi, nel senso della distinzione fra il latte di capra e quello di mucca, sono stati elaborati con l'ausilio dell'analisi statistica multivariata (programma Parvus). Un primo tentativo ha fornito risultati molto promettenti. I campioni corrispondenti a latte di capra si disponevano in posizione distinta rispetto a quelli di latte di mucca e tutti e due si addensavano fra loro.

In tal modo sono stati ottenuti buoni risultati sia per via grafica (Analisi Componente Principale = PCA) che per via numerica in classificazione e predizione applicando i metodi Linear Discriminant Analysis (=LDA), KNN, K Nearest Neighbours.

**CARATTERIZZAZIONE CHIMICO-FISICA DI AMIDI DI VARIA ORIGINE**

M. Cocchi,<sup>1</sup> G. Foca,<sup>1</sup> G.C. Franchini,<sup>2</sup> A. Marchetti,<sup>1</sup> S. Sighinolfi,<sup>1</sup> L. Tassi,<sup>1</sup> A. Ulrici<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Dipartimento di Chimica, Università di Modena-Reggio Emilia, via G. Campi 183, 41100 Modena

<sup>2</sup> Dipartimento di Scienze Agrarie, Università di Modena-Reggio Emilia, via J. F. Kennedy 17, 42100 Reggio Emilia

Fra i prodotti alimentari maggiormente diffusi a livello planetario, l'amido rappresenta certamente la specie di più largo consumo, occupando una posizione preminente nella scala dei valori nutrizionali. Cereali (grano, mais, riso) e tuberose di varia origine rappresentano le principali fonti di approvvigionamento per questa materia prima che differisce significativamente per composizione, morfologia, proprietà termiche, reologiche, e proprietà chimico-fisiche correlate (come la retrogradazione).

In questo lavoro sono stati caratterizzati alcuni amidi puri (di grano, riso, mais, patata) mediante applicazione di tecniche diverse, quali: misure morfologiche (SEM), analisi diffrattometriche (XRD) e determinazione del grado di cristallinità, analisi termiche (TG), swelling power (SP) e indice di solubilità (SI), analisi spettroscopiche UV-Vis, IR e Raman, risposta ai trattamenti di gelatinizzazione in ambiente neutro e basico per NH<sub>4</sub>OH ed NaOH.

I risultati ottenuti mediante analisi diffrattometriche sottolineano difformità spettrali principalmente attribuibili al polimorfismo della matrice (frazione amilopectinica), e consentono di categorizzare gli amidi studiati nelle 2 classi principali di appartenenza: classe A (amidi da cereale), classe B (amidi da tuberose). Da notare che il grado di cristallinità di questi prodotti si riduce al 50% circa del valore iniziale, caratteristico degli amidi nativi, per effetti sommativi di stress chimici, meccanici e termici dovuti ai vari processi di estrazione e trattamento con solventi cui sono soggetti gli sfarinati di partenza. L'analisi morfologica (SEM) evidenzia differenze significative nella forma, dimensione e distribuzione granulometrica delle varie specie esaminate. Inoltre consente di discriminare fra materiali che hanno subito trattamenti tecnologici di vario tipo, in particolare di gelatinizzazione.

L'analisi spettroscopica IR e Raman (in trasmittanza, da dispersioni in pastiglie di KBr) fornisce risultati riproducibili e scarsamente differenziati (ad impatto visivo) per l'origine e la provenienza varietale delle matrici indagate. Tuttavia, l'analisi ed una adeguata elaborazione del segnale analitico mediante l'applicazione di tecniche chemiometriche consente di realizzare una eccellente classificazione dei prodotti studiati [1,2].

Lo *swelling power* e la solubilità in acqua degli amidi sono stati valutati a 100 °C, secondo le metodologie standard di letteratura, ed i risultati evidenziano un trend caratteristico di valori nella sequenza (valida per entrambi gli indici):

grano < riso < mais << patata

Le differenze nei valori di queste proprietà, che collocano l'amido di patata fra quelli più solubili in assoluto, sono da attribuire alla presenza di una elevata concentrazione di gruppi fosfato (fosfo-amidati) nella matrice [3].

I trattamenti di gelatinizzazione effettuati a 60 °C in condizioni sperimentali diverse, portano a prodotti con caratteristiche analoghe qualora si operi in soluzioni neutre o a pH basico per NH<sub>4</sub>OH, generando matrici ancora perfettamente idonee per gli usi alimentari. Viceversa, tali caratteristiche risultano fundamentalmente diverse per trattamento con NaOH, producendo materiali alquanto alterati adatti per impieghi tecnologici non alimentari (riempitivi per colle, vernici, ecc.).

- [1] M. Cocchi, G. Foca, M. Lucisano, A. Marchetti, M.A. Pagani, L. Tassi, A. Ulrici, *J. Agric. Food Chem.*, **52** (2004) 1062.
- [2] M. Cocchi, G. Foca, S. Sighinolfi, L. Tassi, A. Ulrici, *J. Agric. Food Chem.*, in press.
- [3] M. Cocchi, G. Foca, G.C. Franchini, A. Marchetti, L. Tassi, A. Ulrici, *Food Chem.*, submitted.



**VALIDAZIONE DI UN METODO DI PROVA PER LA DETERMINAZIONE DEI  
RESIDUI DI AVERMECTINE NEL LATTE BOVINO MEDIANTE HPLC CON  
RIVELAZIONE SPETTROFLUORIMETRICA**

*Pasquale Gallo, Mauro Esposito, Eduardo Imparato, Marco Salini, Luigi Serpe*

*Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Mezzogiorno - Dipartimento di Chimica  
Via Salute, 2 80055 Portici*

Gli Istituti Zooprofilattici Sperimentali (I.I.ZZ.SS.) costituiscono una rete deputata al controllo delle produzioni animali e degli alimenti di origine animale sul territorio nazionale. Da alcuni anni i settori chimici degli I.I.ZZ.SS. hanno avviato delle procedure per l'armonizzazione dei metodi di prova adottati, mediante specifici progetti di ricerca, circuiti inter-laboratorio e gruppi di lavoro. Nell'ambito di questa strategia, il progetto di ricerca corrente del Ministero della Sanità IZSLER 005/98, era volto all'armonizzazione, validazione e trasferimento di alcuni metodi prova tra i laboratori di chimica degli I.I.ZZ.SS. Presso il Dipartimento di Chimica dell'IZS del Mezzogiorno è stata eseguita la validazione di un metodo multiresiduo per la determinazione di alcune avermectine nel latte bovino, secondo i criteri della Decisione dell'Unione Europea SANCO/1805/2000, da cui è successivamente derivata la Decisione 657/2002/CE.

La categoria di sostanze considerate in questo studio, le avermectine, è costituita da una famiglia di lattoni macrociclici isolati da *Streptomyces avermitilis*, dotati di una potente attività insetticida, acaricida ed antielmintica; appartengono a questa classe l'Abamectina, l'Eprinomectina, la Doramectina e l'Ivermectina, mentre la Moxidectina è invece una milbemicina.

Tutte queste sostanze sono usate in medicina veterinaria per il trattamento sia di animali di allevamento che di animali da compagnia; tuttavia, la tossicità mostrata ad alti dosaggi, ha portato l'Unione Europea, mediante il Regolamento 2377/90/CE e successive modificazioni, a stabilire per queste sostanze dei limiti massimi di residuo (MRL) nelle matrici biologiche (fegato, muscolo, rene, grasso), nelle uova e nel latte bovino e bufalino, che sono soggetti alle attività di controllo ufficiale da parte degli I.I.ZZ.SS.

Il metodo di prova sviluppato presso il nostro laboratorio è un metodo di conferma per la determinazione di abamectina, eprinomectina, doramectina, ivermectina e moxidectina nel latte di massa bovino, che prevede un'estrazione con acetonitrile, una purificazione mediante estrazione in fase solida (SPE) su colonna C18, una fase di derivatizzazione e la successiva determinazione analitica in HPLC in fase inversa, con rivelatore spettrofluorimetrico.

La validazione del metodo è stata eseguita analizzando campioni di latte di massa bovino proveniente da allevati con animali non trattati, ed eseguendo delle fortificazioni a tre diversi livelli di concentrazione dei 5 analiti considerati; in base ai risultati delle prove sono stati valutati:

- la precisione, espressa come ripetibilità e riproducibilità intra-laboratorio
- il limite di decisione ( $CC\alpha$ )
- la capacità di rivelazione ( $CC\beta$ )
- la specificità del metodo
- la stabilità degli analiti in soluzione e in matrice

Ai fini della strategia di armonizzazione dei metodi di prova tra i laboratori chimici della rete degli I.I.ZZ.SS., il metodo di prova, dopo la validazione, è stato trasmesso ad altri laboratori per la relativa implementazione interna. Tre Istituti hanno quindi partecipato ad uno studio collaborativo organizzato dal nostro Dipartimento; a tale scopo sono stati preparati dei campioni omogenei di latte bovino, ed alcuni sono stati fortificati con l'ivermectina e l'abamectina a due diversi livelli di concentrazione. Per evitare problemi di omogeneità

derivanti da sotto-campionamenti sono state preparate delle confezioni *single shot*, il cui contenuto doveva essere utilizzato direttamente e completamente per l'esecuzione dell'analisi. Ad ognuno dei laboratori partecipanti sono stati inviati cinque campioni, uno corrispondente al livello di contaminazione zero e quattro corrispondenti ai due livelli di fortificazione, ciascuno in duplicato. I risultati delle prove di tutti i laboratori sono stati raccolti ed elaborati. Il grado di omogeneità del lotto dei campioni distribuiti e la stabilità degli analiti sono stati valutati presso il nostro laboratorio analizzando i campioni in cinque replicati, prima dell'invio e dopo la raccolta dei risultati dello studio collaborativo.

## IPA E PCB, MICROINQUINANTI EMERGENTI: INDAGINE SUL LATTE CRUDO E SUGLI OLI VEGETALI

*\*Messori A., \*Manghi P., \*Di Silvestro G., \*Vatteroni C., \*\*Pinelli C., \*Cagnasso P.*

*\*Laboratorio Centrale - Ricerca & Sviluppo \*\*Assicurazione Qualità, PARMALAT S.P.A.*

Il latte è un alimento così importante nell'alimentazione dell'uomo e di così largo consumo che la sua salubrità è costantemente al centro delle preoccupazioni del consumatore, dell'attenzione del legislatore e dei suoi organi di controllo, nonché dei produttori e delle aziende di trasformazione. Garantire la sicurezza igienico-sanitaria di questo alimento significa non soltanto assumere comportamenti preventivi tali da ridurre al massimo l'eventuale presenza di sostanze farmacologicamente attive, fissare i valori limite di alcuni parametri sanitari quali micotossine e pesticidi, e monitorare adeguatamente l'eventuale presenza di microinquinanti organici ambientali emergenti come PCB e IPA. Si tratta di due diverse classi di molecole derivanti prevalentemente da attività antropiche, che presentano differenti origine e caratteristiche chimico-fisiche; hanno in comune la tossicità e la resistenza nell'ambiente.

Queste molecole, estremamente ubiquitarie, possono entrare accidentalmente nella catena alimentare (latte, carne, ecc...) e arrivare all'uomo. Qui tendono ad accumularsi nel tessuto adiposo e negli organi più ricchi in grasso dove sono metabolizzati scarsamente ed escreti molto lentamente.

I PCB sono prodotti di origine industriale la cui produzione è stata vietata negli anni 70. Sono un insieme di 209 tra isomeri e congeneri con caratteristiche chimico-fisiche e tossicologiche influenzate dal diverso numero e posizione dei sostituenti cloro sulla molecola bifenile. La tossicità, in particolare, è funzione della sostituzione in posizione orto. Le legislazioni di alcuni paesi europei e le linee guida del Ministero della Sanità italiano riferiscono a sette congeneri (PCB 28, 52, 101, 118, 138, 153, 180) come rappresentativi del profilo totale della contaminazione.

Gli IPA costituiscono una classe di oltre 100 composti organici derivanti da combustioni incomplete in condizioni di scarsità di ossigeno, riconducibili a sistemi di riscaldamento, emissioni di veicoli, combustioni di bio-masse, ecc...

Per monitorare le produzioni di latte alimentare e di oli vegetali e garantirne la qualità, anche in funzione di questi microinquinanti, è stato sviluppato un metodo analitico di determinazione che prevede un'unica purificazione in GPC per estrarre entrambe le classi di molecole e successiva distinta separazione in GC con rivelazione in massa.

Relativamente al latte, in nessuno dei 170 campioni (di masse di raccolta) analizzati è stata rilevata la presenza di IPA e PCB. Uno studio mirato, su una "zona a rischio", ha permesso di individuare un campione con tracce di PCB entro i limiti di accettabilità legale e tossicologica (13,2 µg/Kg grasso). L'analisi successiva dei singoli conferenti della massa ha permesso di verificare l'effettiva maggior diffusione dei sette congeneri normati.

In nessuno dei 40 campioni di oli e grassi (margarine, olio di soia, oliva, girasole, e burro) analizzati è stata rilevata la presenza di PCB. Tracce di IPA sono stati riscontrati in alcuni campioni di margarina e olio di girasole.

## APPLICAZIONE DI UN DISEGNO SPERIMENTALE PER LA MESSA A PUNTO DI UN METODO DI ANALISI DELLE VITAMINE LIPOSOLUBILI NELLO YOGURT

*Messori A., Bassi E., Manghi P., Monici M., Gandolfi I., Cagnasso P.*

*Parmalat Research & Development, Parmalat S.p.A., Via S. Vitale 22, I-43038 Castellaro di Sala Baganza (PR), Italy*

Sviluppare un metodo analitico significa affrontare una problematica nuova, che richiede sempre un notevole impegno di risorse, in termini di persone, strumenti, materiali e tempo. Tale impegno è tanto maggiore quanto più la matrice è complessa, quanto maggiore è il numero degli analiti da determinare e delle variabili da considerare.

Nella pratica comune, soprattutto in passato, per ottimizzare un metodo analitico si considerava una variabile alla volta, impostando lo studio secondo criteri soggettivi. L'elaborato finale era poi la sintesi, altrettanto soggettiva, dei risultati di un numero di prove sequenziali. In questo modo risultava difficile programmare, a priori, il tempo e i mezzi necessari per ottenere un risultato complessivo soddisfacente e soprattutto valutare se le prove eseguite avevano realmente permesso di ottenere l'ottimizzazione del metodo.

L'approccio statistico a tale problema ha consentito di razionalizzare il lavoro e di valutare oggettivamente i risultati. Il disegno sperimentale poi è uno strumento statistico che consente di programmare gli esperimenti e di valutare contemporaneamente le variabili: l'analista deve definire quelle presumibilmente implicate e decidere in quali "intervalli" (di tempo, temperatura, concentrazione, ecc...) esaminarle. Dopo queste considerazioni preliminari si esegue un numero ben preciso e limitato di prove seguendo regole statistiche ben definite. L'applicazione di un disegno sperimentale permette quindi di ottimizzare il metodo di analisi e di definire l'importanza delle variabili studiate: dall'analisi statistica dei dati si ottiene infatti una funzione che descrive il sistema (superficie di responso) [1].

Utilizzando questo approccio abbiamo ottimizzato l'analisi delle vitamine A ed E nello yogurt, una matrice complessa che presenta una struttura abbastanza compatta, concentrazioni rilevanti di proteine, grassi, zuccheri e microrganismi che, in quanto elementi vivi, liberano prodotti del loro metabolismo. L'analisi prevede la saponificazione del prodotto a caldo e in corrente di azoto per "liberare le vitamine in atmosfera controllata", una successiva estrazione con solvente organico seguita dall'analisi in HPLC [2].

Nel nostro laboratorio abbiamo costruito un disegno sperimentale per ottimizzare le condizioni di saponificazione del grasso, processo che consente anche di trasformare le vitamine nella forma alcool. Abbiamo considerato le seguenti variabili: temperatura, tempo di saponificazione, concentrazione di KOH (agente di saponificazione), presenza di azoto, agitazione, aggiunta di antiossidanti e mantenuta costante la concentrazione di grasso. Questi fattori sono stati classificati in base alla loro maggiore o minore influenza sul sistema grazie all'applicazione preliminare di un piano sperimentale di screening (24 esperimenti). Da questo è emerso che le variabili che maggiormente influenzano il recupero delle vitamine sono l'atmosfera di azoto, in grado di proteggerle dall'ossidazione, la temperatura e il tempo di saponificazione, la concentrazione di KOH. Questi parametri sono stati utilizzati per la costruzione di un "disegno centrale composito a facce centrate" (22 esperimenti). Da questo piano sperimentale è emerso che la concentrazione della KOH e il tempo di saponificazione sono i parametri che maggiormente influiscono l'efficacia d'estrazione. In particolare, è stato verificato che per ottenere un recupero ottimale della vitamina A è necessario impiegare 14,2 ml di KOH 9M e 13,5 per quello della vitamina E. E' stato inoltre osservato che il tempo di saponificazione sembra non influire sulla degradazione delle vitamine, poichè in entrambi i

casi la risposta aumenta all'aumentare del tempo di analisi senza raggiungere un punto di massimo (Fig. 1).

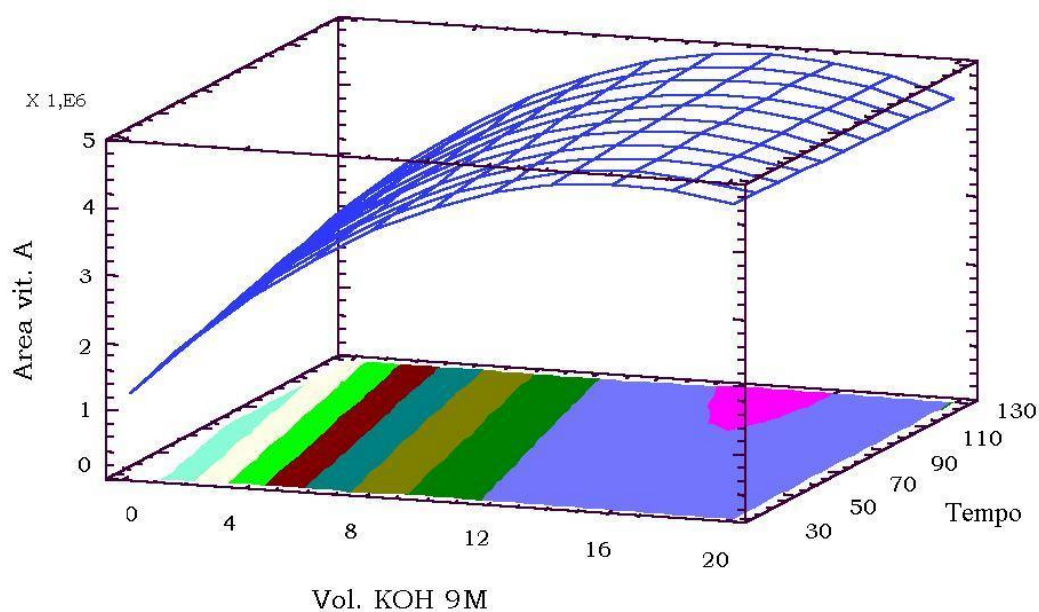


Fig. 1: superficie di responso della vitamina A a 60°C

Alla luce dei risultati ottenuti è stato scelto per ogni variabile il valore in grado di ottimizzare la risposta delle vitamine compatibilmente con le esigenze pratiche del laboratorio. I valori scelti sono stati 14 ml di KOH 9M, 90 minuti di saponificazione a 60°C. Le condizioni operative individuate sono state utilizzate per la determinazione delle vitamine liposolubili in campioni di yogurt all'1%. La conoscenza accurata del comportamento del sistema ci ha consentito di individuare rapidamente le condizioni operative per campioni di yogurt con quantità di grasso pari allo 0,1% e al 3-4 %, che si sono confermate ottimali.

- [1] R.G.Brereton, in *Chemometrics applications of mathematics and statistics to laboratory system*, Ellis Horwood
- [2] C.H. Hollman et al., *Intercomparison of methods for the determination of vitamins in foods*, Analyst, may 1993, vol.118, 475-480.

## VALUTAZIONE DI UN METODO RAPIDO PER IL TRATTAMENTO TERMICO DEL LATTE: TEST DELLA $\epsilon$ -FRUTTOSIL-LISINA

*Vatteroni C., Monici M., Bassi E., Gandolfi I., Cagnasso P.*

*Ricerca&Sviluppo Laboratorio Centrale PARMALAT S.P.A.- Via S.Vitale,22 Sala Baganza (PR)*

*Bonicolini F., Bicchiega M.*

*CDR Analisi e sviluppo sistemi cibernetici. Settore biochimico. Arezzo (Italy)*

Per monitorare gli effetti dei differenti trattamenti termici, l'industria alimentare utilizza indici analitici quali la furosina, il lattulosio, le proteine solubili del siero (1,2), la cui determinazione richiede lunghi tempi di analisi.

Sono stati quindi considerati metodi rapidi, in grado di fornire dati affidabili con 'significato pratico-tecnologico', correlabili a quelli classici, presi come riferimento. In particolare, stiamo valutando l'applicabilità e l'affidabilità del test della  $\epsilon$ -fruttosil-lisina, presentato al Congrilaït 2002 di Parigi (3,4), per la rilevazione di latte in polvere a latte crudo e pastorizzato, per la valutazione delle tecnologie di trattamento termico maggiormente impiegate (pastorizzazione e trattamento UHT diretto e indiretto) e per l'ottimizzazione dei parametri tecnologici.

La  $\epsilon$ -fruttosil-lisina è un prodotto, intermedio stabile della Reazione di Maillard. La determinazione viene eseguita con uno strumento dedicato, della ditta CDR, che si basa su una speciale tecnologia fotometrica; l'analisi, estremamente semplice e rapida, non richiede alcun trattamento preliminare del campione.

Per la valutazione di questo parametro si sono eseguite determinazioni in parallelo di furosina e fruttosil-lisina su latti crudi, latti interi pastorizzati e UHT interi.

Dai dati sperimentali si osserva che il test della  $\epsilon$ -fruttosil-lisina, può essere considerato un parametro in grado di discriminare le diverse classi di latte e di individuare aggiunte a latte crudo di latte in polvere ricostituito del 10%.

### **Bibliografia**

- (1) L. Pellegrino, P. Resmini (Italy), W. Luf (Austria), 'Assessment (indices) of heat treatment of milk. Heat-Induced Changes in milk', *FIL-IDF, second edition, revision of Bulletin 238/1989*, 20chapter.
- (2) P.M. Toppino, 'Per valutare l'entità di furosina', *Riv.Latte*, 50, 2143 (1994).
- (3) F. Bonicolini, M. Bicchiega, 'Maillard reaction evaluation by  $\epsilon$ -fructosyl-lysine during milk thermal processing: first step', poster *Congrilaït 2002 Paris*
- (4) L. Bates, J.M. Ames, D.B. MacDougall, P. Taylor, 'The use of a laboratory scale reaction cell and a quadratic response surface regression model to predict colour development in a starch-glucose-lysine model system', *J.Food Sci.*, 63, 991-996, (1998).

**VALIDAZIONE DI METODI HPLC PER LA DETERMINAZIONE QUANTITATIVA  
DI ADDITIVI VIETATI IN ALIMENTI AD USO ZOOTECNICO.  
APPLICAZIONE: OLAQUINDOX**

*Gili M.<sup>1</sup>, Strambaci B.<sup>1</sup>, Gamba V.<sup>2</sup>, Abete M.C.<sup>3</sup>*

<sup>1</sup> *Laboratorio Ricerca Residui, Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Via Bologna 148, 10154 Torino.*

<sup>2</sup> *Reparto Bromatologico, Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna, Via Bianchi 7/9, 25124 Brescia.*

<sup>3</sup> *C.Re.A.A., Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Via Bologna 148, 10154 Torino.*

I prodotti di origine animale subiscono una continua evoluzione connessa alle tendenze di mercato e alle richieste del consumatore. Ciò comporta la ricerca di continue soluzioni da parte dei produttori operanti nel settore dell'industria mangimistica atte alla realizzazione di alimenti zootecnici che appaghino le esigenze dei consumatori. Per far fronte ad alcune problematiche sanitarie, frequenti soprattutto negli allevamenti intensivi, nella formulazione di mangimi, sono sovente impiegati come additivi principi attivi, quali antibiotici e coccidiostatici. Nell'impiego di tali sostanze è però necessario tener conto delle potenziali ricadute negative sulla sicurezza degli alimenti, in relazione alla loro presenza residuale.

Negli ultimi anni, l'Unione Europea ha revisionato l'elenco degli additivi autorizzati, eliminando alcuni promotori di crescita quali carbadox e olaquinox (Regolamento CE n. 2788/98) e diversi coccidiostatici quali nicarbazina, metilclorpidolo, amprolium e dimetridazolo (Regolamento CE n. 2205/01). In ottemperanza alle norme cogenti, il Ministero della Salute prevede, nell'ambito dei Piani di monitoraggio (PNR e PNAA), l'esecuzione di controlli ufficiali per la ricerca analitica di queste molecole.

A tal fine, nel nostro laboratorio sono stati sviluppati e validati metodi interni in grado di evidenziare e quantificare la presenza anche a basse concentrazioni degli additivi vietati.

Nel presente lavoro si riporta il protocollo di validazione, conforme alla normativa vigente, utilizzato per la determinazione di olaquinox in alimenti ad uso zootecnico mediante HPLC.

Durante il processo di validazione sono stati valutati i seguenti indici di prestazione su mangimi per conigli, mangimi per suini e acque di abbeverata:

- Linearità della risposta, mediante tre curve indipendenti di soluzioni standard in solvente, a cinque livelli nel range 0.5÷20 ng/μL corrispondenti a 2.5÷100 mg/Kg in matrice, con costruzione della retta di taratura mediante l'algoritmo dei minimi quadrati non pesati, e verifica della linearità ( $R \geq 0.999$ , distribuzione dei fattori di risposta  $y_i/x_i$ , nell'intervallo  $y/x_{\text{medio}} \pm 10\%$ ).
- Limite di rilevazione (LOD), determinato sperimentalmente su 6 campioni negativi di ogni matrice. Il valore di LOD, espresso come concentrazione di analita per unità di matrice, è pari a 0.2 mg/Kg (mangimi) e 0.03 mg/Kg (acqua di abbeverata).
- Limite di quantificazione (LOQ): Il LOQ calcolato, pari a 0.11 mg/Kg (acqua) e 0.7 mg/Kg (mangimi), risulta nettamente inferiore al limite di rilevabilità riportato nel PNR 2004 (10 mg/Kg).
- Specificità, su 6 campioni di ogni matrice; la scelta dei campioni ha privilegiato mangimi composti o complementari additivati (es. robenidina, avilamicina, flavofosfolipol, ionofori). L'analisi dei singoli cromatogrammi, nell'intervallo  $\Delta t = \pm 2,5\% t_R$ , ha permesso di stabilire l'assenza di interferenti, escludendo l'eventualità di falsi positivi e di errori di quantificazione.

- Recupero %, determinato mediante 6 prove indipendenti a tre livelli del campo di misura compreso il LOQ, pari a 83%.
- Ripetibilità ristretta: il valore di RSD% medio, determinato mediante 6 prove indipendenti a tre livelli del campo di misura compreso il LOQ, è pari a 7 % e risulta in accordo alla legge di Horwitz.
- Robustezza, valutando come fattori critici il tempo di estrazione e la temperatura di evaporazione dell'estratto del campione.
- Stabilità delle soluzioni di standard
- Stima dell'incertezza di misura del metodo  
L'incertezza di misura è stata calcolata in accordo alla “Linea guida per la valutazione e l'espressione dell'incertezza di misura dei metodi chimici” del Gruppo di Lavoro II.ZZ.SS., attraverso le seguenti fasi:
  1. Identificazione dei contributi all'incertezza di misura
  2. Calcolo dei contributi: Incertezza di ripetibilità, pesata, volume, titolo dello standard, preparazione della soluzione di standard, curva di taratura, recupero.
  3. Calcolo dell'incertezza composta
  4. Calcolo dell'incertezza estesa del metodo

Il metodo validato secondo questi criteri risulta conforme ai requisiti richiesti dalla norma ISO 17025 e, attraverso la predisposizione di carte di controllo del recupero, consente ai laboratori deputati ai controlli ufficiali la verifica del mantenimento delle condizioni di ripetibilità e accuratezza.



## DETERMINAZIONE DELL'ATTIVITA' ANTIOSSIDANTE TOTALE DI DIVERSE PREPARAZIONI ALIMENTARI A BASE DI PEPERONI

*Luna Greco, Rossella Riccio, Sabina Bergero, Marco Trevisan*

*Istituto di Chimica Agraria ed Ambientale Sez. di Chimica Vegetale, Università Cattolica del  
Sacro Cuore, Piacenza. luna.greco@unicatt.it*

**Introduzione.** Frutta e verdura sono matrici naturalmente ricche in composti antiossidanti e le sostanze antiradicaliche in esse maggiormente presenti sono rappresentate da acido ascorbico, tocoferoli, carotenoidi, flavonoidi e tioli (Rice-Evans & Miller, 1996). L'attività antiossidante di un prodotto alimentare dipende dalla composizione dell'alimento stesso, ma anche dai metodi colturali e dai criteri di conservazione nonché dai differenti metodi di preparazione (Hunter & Fletcher, 2002). La valutazione dell'influenza dei processi tecnologici sulla concentrazione di antiossidanti naturali, presenti in una matrice alimentare, è la chiave per trovare le condizioni tecnologiche (di trasformazione e di conservazione) tali da preservare o aumentare la loro attività iniziale e la loro biodisponibilità.

**Materiali e metodi.** Il lavoro proposto prevede l'utilizzo di un metodo analitico di determinazione dell'attività antiossidante totale di prodotti ottenuti dalla lavorazione di peperoni rossi e gialli. Tale determinazione è condotta attraverso l'estrazione dei composti lipo e idrosolubili e la loro successiva separazione e caratterizzazione mediante analisi cromatografica abbinata ad un rivelatore elettrochimico (Riccio et al., in press).

Sono stati sottoposti ad analisi i seguenti campioni di peperone: fresco, a filetti, peperonata, in agrodolce, grigliati, in acqua e sale.

L'analisi statistica è stata effettuata mediante il programma SAS.

**Risultati e discussione.** Tutti i campioni sono stati analizzati in triplicato. I valori dell'attività antiossidante totale (TAA), ottenuta sommando attività antiossidante idrofila e lipofila, dell'attività antiossidante lipofila (LAA) e dell'attività antiossidante idrofila (HAA) sono espressi in  $\mu\text{mol}$  equivalenti di Trolox per g di campione.

	TAA	LAA	HAA
Fresco	$9.92 \pm 0.55$ <i>a</i>	$0.88 \pm 0.09$ <i>d</i>	$9.04 \pm 0.46$ <i>a</i>
Filetti	$4.80 \pm 0.31$ <i>c</i>	$0.77 \pm 0.08$ <i>d</i>	$4.03 \pm 0.24$ <i>c</i>
Peperonata	$4.65 \pm 0.36$ <i>c</i>	$1.63 \pm 0.13$ <i>a,b</i>	$3.02 \pm 0.23$ <i>d</i>
Grigliati	$8.49 \pm 0.41$ <i>b</i>	$1.79 \pm 0.14$ <i>a</i>	$6.70 \pm 0.27$ <i>b</i>
Agrodolci	$4.25 \pm 0.19$ <i>c</i>	$1.34 \pm 0.13$ <i>b,c</i>	$2.91 \pm 0.06$ <i>d</i>
Acqua e sale	$4.20 \pm 0.09$ <i>c</i>	$1.25 \pm 0.04$ <i>c</i>	$2.96 \pm 0.06$ <i>d</i>

Tab. 1 Attività antiossidante totale (TAA), lipofila (LAA) e idrofila (HAA) di tutti i campioni analizzati espressa come  $\mu\text{mol}$  equivalenti di Trolox per g di campione. Lettere diverse rappresentano differenze statisticamente significative tra i campioni ( $p < 0.005$ ).

Così come riportato in tabella, i peperoni freschi hanno presentato la maggiore TAA. Elevata TAA ha mostrato anche il campione di peperoni grigliati. Non sono state riscontrate differenze significative tra le TAA di tutti gli altri campioni analizzati; i peperoni a filetti, quelli in agrodolce e quelli in acqua e sale infatti sono, per condizioni di trasformazione e di conservazione, prodotti molto simili tra di loro.

Dall'analisi della peperonata, la cui preparazione prevedeva una fase di cottura prolungata, ci si poteva aspettare una TAA più bassa, ma l'aggiunta di altri ingredienti, tra i quali pomodoro, influenzerebbe positivamente la TAA del prodotto finale, dando un buon contributo in

licopene, presente invece in quantità non determinabile (n.d.) in tutti gli altri campioni analizzati (Tabella 2).

	acido ascorbico ( $\mu\text{mol eq. di Trolox/g}$ )	TAA (%)	$\beta$ -carotene ( $\mu\text{mol eq. di Trolox/g}$ )	TAA (%)	licopene ( $\mu\text{mol eq. di Trolox/g}$ )	TAA (%)
Fresco	$7.95 \pm 0.33$	80	$0.25 \pm 0.01$	3	n.d.	0
Filetti	$3.13 \pm 0.25$	65	$0.13 \pm 0.01$	3	n.d.	0
Peperonata	$2.18 \pm 0.12$	47	$0.10 \pm 0.01$	2	$0.66 \pm 0.04$	14
Grigliati	$5.70 \pm 0.19$	67	$0.21 \pm 0.02$	3	n.d.	0
Agrodolci	$2.50 \pm 0.13$	59	$0.17 \pm 0.01$	3	n.d.	0
Acqua e sale	$2.64 \pm 0.14$	63	$0.28 \pm 0.02$	7	n.d.	0

Tab.2 Contenuto in acido ascorbico,  $\beta$ -carotene e licopene dei campioni analizzati e loro contributo (%) alla TAA.

Il peperone fresco ha presentato una bassa quantità di antiossidanti lipofili, mentre ha mostrato un valore maggiore anche rispetto agli altri campioni il peperone grigliato; questo è spiegabile se si considera che tale prodotto, oltre che essere conservato in olio, alimento di per sé ricco di antiossidanti, subisce durante la preparazione una fase di grigliatura e un passaggio in salamoia della durata di 48 h, operazioni tecnologiche che porterebbero presumibilmente alla concentrazione dei nutrienti in esso presenti. Tale concentrazione avverrebbe anche negli altri prodotti analizzati, che presentano tutti valori della LAA molto vicini tra di loro, ma lievemente superiori rispetto al fresco.

Andamento diametralmente opposto ha mostrato la concentrazione in antiossidanti idrofili che è risultata diminuire moltissimo con il trattamento del prodotto. Possiamo infatti vedere come, fatta eccezione per il peperone grigliato, la cui preparazione prevedeva però l'aggiunta di acido ascorbico, la HAA sia maggiore nel peperone fresco e diminuisca, in alcuni casi anche più della metà, con la trasformazione. L'HAA sarebbe quindi molto più sensibile ai trattamenti termici rispetto alla componente lipofila che però contribuisce solo in minima parte alla TAA di tutti i prodotti analizzati. Si può vedere inoltre come l'acido ascorbico contribuisca dall'80 % (per il campione fresco) al 50 % (per la peperonata) alla TAA, confermando l'elevato contenuto di questa vitamina nel peperone.

**Conclusioni.** Questa procedura, grazie alle peculiarità del rivelatore, risulta essere un metodo diretto di analisi dell'attività antiossidante di un alimento, poiché quantizza gli antiossidanti senza l'ausilio né di un substrato ossidabile né di un radicale libero. Tale metodo di valutazione dell'attività antiossidante si è rivelato altamente sensibile e selettivo, permettendoci di mettere in evidenza la stretta correlazione tra i diversi processi tecnologici e la TAA di un alimento, nel nostro caso il peperone.

**Ringraziamenti.** Questo lavoro è stato reso possibile dalla Fondazione Invernizzi che lo ha parzialmente finanziato.

### Bibliografia.

- K.J. Hunter e J.M. Fletcher. The antioxidant activity and composition of fresh, frozen, jarred and canned vegetables. *Inn. Food Sci. Emer. Tech.*; 3: 399-406, 2002.
- C.A. Rice-Evans e N.J. Miller. Antioxidant activities of flavonoids as bioactive components of food. *Bioch. Soc. Trans.*; 24(3): 790-795, 1996.
- R. Riccio, F. Ferrari, A.A.M. Del Re e M. Trevisan. Determination of total antioxidant activity in fruit and vegetable based beverages. In press.

## DETERMINAZIONE DEL CONTENUTO DI ISOFLAVONI IN ALIMENTI COMMERCIALI A BASE DI SOIA MEDIANTE HPLC

*Sheila Morandi e Anna Arnoldi*

*Dipartimento di Scienze Molecolari Agroalimentari, Laboratorio di Chimica degli Alimenti e Spettrometria di Massa, Università degli Studi di Milano, via Celoria, 2-20133 Milano  
e-mail: [sheila.morandi@unimi.it](mailto:sheila.morandi@unimi.it)*

Gli isoflavoni, molto abbondanti nei semi di soia, sono molecole appartenenti alla classe dei fitoestrogeni e nella pianta agiscono da fitoalessine, sono cioè sintetizzati in risposta ad insulti esterni. Tali molecole esistono sia in forma agliconica che come glicosidi, semplici e complessi (malonil- ed acetil-glicosidi): gli isoflavoni maggiormente presenti nei semi sono i glicosidi semplici genistina e daidzina, oltre al derivato complesso malonilgenistina, mentre i derivati della gliciteina sono componenti minori.

Nella loro struttura è presente un anello fenolico responsabile dell'interazione con i recettori estrogenici; infatti, gli isoflavoni presentano attività farmacologica estrogeno-simile, e vengono utilizzati nella terapia ormonale sostitutiva nelle donne in post-menopausa<sup>1</sup>; sono stati anche proposti come chemoprotettori in alcuni tipi di tumore ormono-dipendente. Oltre all'attività ormonale, gli isoflavoni hanno proprietà farmacologiche di tipo non ormonale, tra cui l'inibizione delle tirosin-chinasi, della topoisomerasi II, della proliferazione cellulare e sono agenti pro-apoptotici.

Molti autori, accanto ai possibili effetti positivi degli isoflavoni, ne hanno messo in evidenza alcune proprietà tossicologiche, come la tireotossicità, dovuta ad inibizione della sintesi degli ormoni tiroidei. Inoltre, si è visto che in neonati alimentati con formule a base di soia si ha un aumento dell'insorgenza di gozzo e dell'ipotiroidismo, spesso associato a tiroiditi autoimmuni<sup>2</sup>. Considerando gli effetti collaterali legati all'assunzione di isoflavoni, il Ministero della Sanità Italiano ha fissato, con la circ. n° 3 del 18/7/2002, un limite massimo all'assunzione giornaliera di tali sostanze come integratori alimentari, pari a 80 mg/die<sup>3</sup>.

Scopo di questo lavoro era la valutazione del contenuto totale di isoflavoni in alimenti a base di soia commercializzati in Italia, al fine di stimare la reale esposizione di particolari classi di consumatori, come ad esempio vegetariani, ipercolesterolemici e celiaci. Gli alimenti analizzati sono derivati del latte di soia, succedanei della carne e latti per l'infanzia; inoltre, sono stati considerati anche alimenti senza glutine a base di soia, destinati all'alimentazione di soggetti celiaci. Poiché gli isoflavoni sono molecole termolabili, gli alimenti necessariamente consumati dopo cottura sono stati analizzati sia crudi che cotti.

I campioni, precedentemente liofilizzati, sono estratti con CH<sub>3</sub>CN ed H<sub>2</sub>O acidificata con HCl, mantenuti a temperatura ambiente per 2 h sotto agitazione magnetica<sup>4</sup>. Dopo aver filtrato ed evaporato il solvente sottovuoto, il residuo è stato sciolto in 1 ml di CH<sub>3</sub>OH 50%, filtrato su filtro di nylon da 0.45 µm ed iniettato in HPLC.

Inizialmente è stata effettuata la caratterizzazione dei singoli isoflavoni mediante LC-ESI-MS/MS, confronto con alcuni standard e con dati presenti in letteratura<sup>5</sup>. La caratterizzazione è stata condotta su un campione di semi di soia e su un concentrato di isoflavoni, utilizzato come integratore dietetico.

L'analisi e la quantificazione dei campioni alimentari è stata condotta mediante HPLC-VWD HP-1050, utilizzando una colonna Lichrosphere® 100 RP-18, 250x4.6 mm, volume di iniezione 20 µl, ed una fase mobile costituita da (A) H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>COOH 0.1% e (B) CH<sub>3</sub>CN/CH<sub>3</sub>COOH 0.1% con un gradiente lineare dal 15 al 35% di (B) in 50 min, seguiti da 10 min al 35% di (B), flusso 1 ml/min<sup>5</sup>; i cromatogrammi sono stati registrati a 254 nm. Per la quantificazione si è allestita una retta di calibrazione esterna per ognuno dei seguenti standard: genistina, daidzina, genisteina e daidzeina.

I dati sperimentali hanno mostrato che il contenuto in isoflavoni degli alimenti analizzati è compreso tra 21 e 803  $\mu\text{g/g}$ . Gli alimenti per celiaci contengono quantità minori di isoflavoni (77-220  $\mu\text{g/g}$ ), data la minor quantità di farina di soia o di isolati proteici usati per la preparazione di questi prodotti; mentre, nei formulati per la prima infanzia si rilevano concentrazioni comprese tra 103 e 427  $\mu\text{g/g}$ .

Prendendo in considerazione l'ipotetica DGA suggerita dal Ministero della Sanità, pari ad 80 mg/die, si può affermare che nel caso degli adulti non esiste una reale preoccupazione; mentre, nel caso di bambini alimentati con prodotti a base di soia, il consumo di una sola porzione di bevanda alla soia provoca l'assunzione di una quantità di isoflavoni maggiore del limite massimo consigliato considerando il peso corporeo.

Ancora più preoccupante è la situazione di neonati alimentati con formulati a base di soia, dove la quantità giornaliera di isoflavoni assunti da un neonato, nei primi sei mesi di vita, si aggira intorno ai 12.5-25.6 mg.

### **Bibliografia**

1. Coward, L. et al. *J. Agric. Food Chem.* **1993**, *41*, 1961-1967
2. Sirtori, C. R. *Drug Saf.* **2001**, *24*, 665-682
3. Gazzetta Ufficiale, **12.08.2002**, n.° 188
4. Song, T. et al. *Am. J. Clin. Nutr.*, **1998**, *68* (suppl.), 1474-1479
5. Wang, H.J. et al. *J. Agric. Food Chem.* **1994**, *42*, 1666-1673

**VALUTAZIONE DELLA PRESENZA DI FARINE ANIMALI NEI MANGIMI PER RUMINANTI MEDIANTE LA DETERMINAZIONE DELLA CARNOSINA UTILIZZANDO LA CROMATOGRAFIA IONICA CON RIVELAZIONE AMPEROMETRICA PULSATA (HPAEC-IPAD)**

*Donatella Nardiello e Tommaso R. I. Cataldi*

*Dipartimento di Chimica, Università degli Studi della Basilicata,  
Via N. Sauro, 85 - 85100 Potenza ([cataldi@unibas.it](mailto:cataldi@unibas.it))*

La L-carnosina ( $\beta$ -alanil-L-istidina) è tra i composti azotati più abbondantemente presenti nella frazione non proteica dei muscoli scheletrici e cardiaci e nei tessuti nervosi dei vertebrati [1]. Sebbene siano stati ipotizzati diversi ruoli attribuibili alla carnosina, la sua specifica funzione nei sistemi biologici non è del tutto chiara. La carnosina interviene nella regolazione della glicogenolisi, nell'attivazione della miosina, nella neurotrasmissione [2] ma è importante soprattutto come antiossidante naturale [3,4], e per questo motivo viene appositamente aggiunta alle soluzioni oftalmiche per la cura e la prevenzione delle cataratte [4]. Appartenendo esclusivamente al mondo animale, la carnosina può essere considerata una sostanza indicatrice della presenza di componenti animali nei mangimi. È noto che per evitare la diffusione della *Encefalopatia Spongiforme Trasmissibile* (TSE) è severamente proibita la presenza di additivi e proteine animali nei mangimi per ruminanti [5]; secondo la legislazione europea, il metodo ufficiale per il controllo dei mangimi è l'esame microscopico [6]. Tuttavia, essendo questo tipo di analisi piuttosto laboriosa e dispendiosa, sono state proposte delle metodiche alternative per la valutazione della presenza di farine animali [7].

In questa comunicazione è descritto un metodo analitico sensibile e selettivo per la determinazione della carnosina e dei dipeptidi istidinici correlati, anserina ed omocarnosina, basato sulla cromatografia a scambio anionico e la rivelazione amperometrica pulsata e integrata (HPAEC-IPAD) su elettrodo di lavoro in oro. Il metodo proposto, oltre a non richiedere alcun processo di derivatizzazione, combinato ad una semplice procedura di trattamento del campione, si è dimostrato utile ed affidabile per individuare le possibili adulterazioni nei mangimi [8]. I parametri che influenzano la separazione cromatografica e la rivelazione elettrochimica quali il tipo di colonna, la composizione della fase mobile e la forma d'onda del potenziale, sono stati attentamente valutati. La metodica, basata su una semplice eluizione isocratica con NaOH 100 mM e sull'uso di una forma d'onda a sei impulsi di potenziale, permette la determinazione della carnosina nell'intervallo di concentrazione 0.1-100  $\mu$ M, con un limite di rivelabilità pari a 0.5  $\mu$ g di carnosina/g di mangime. A differenza dei mangimi per animali domestici, la presenza di carnosina non è stata osservata in nessun dei campioni di mangime analizzati destinati ad ovini e bovini. Successivamente tale metodica analitica è stata utilizzata per la determinazione della carnosina nei campioni di carne e potrebbe essere applicata all'analisi di campioni biologici per conoscere i dettagli delle funzioni metaboliche, non del tutto esplorate, svolte dalla carnosina.

### **Riferimenti bibliografici**

1. E.A. Decker, Nutr. Rev. 53 (1995) 49.
2. S.H. Snyder, Science 209 (1980) 976.
3. S. Zhou, E.A. Decker, J. Agric. Food Chem. 47 (1999) 51.
4. M.A. Babizhayev, Biochim. Biophys. Acta 1004 (1989) 363.
5. EC Council Decision 766/2000. Off. J. Eur. Communities L306 (2000) 32
6. Commission Directive 98/88/EG. Off. J. Eur. Communities L318 (1998) 45.
7. J. Schönherr, J. Agric. Food Chem. 50 (2002) 1945.
8. D. Nardiello, T.R.I Cataldi, J. Chromatogr. A 1035/2 (2004) 285.

## CONFRONTO DI METODOLOGIE ANALITICHE PER LA DETERMINAZIONE DI POLICLOROBIFENILI UTILIZZANDO MATERIALE CERTIFICATO DI MITILO

*M. Amici, E. Calabretta, A.M. Cicero, G. Romanelli*

*Istituto Centrale per la Ricerca Scientifica e Tecnologica Applicata al Mare  
Via di Casalotti,300 – 00166 Roma; [g.romanelli@icram.org](mailto:g.romanelli@icram.org)*

Scopo del lavoro è confrontare l'efficienza estrattiva di composti Policlorobifenili (PCBs) in tessuti di organismi marini utilizzando tre differenti tecniche estrattive quali l'Estrazione in Soxhlet, l'Estrazione Accelerata con Solvente (ASE) e l'Estrazione a freddo con solvente; il confronto è stato operato utilizzando materiali di riferimento certificati di mitilo a diversa concentrazione di PCBs: IAEA 142 (range 0,5-10 µg/kg); SRM 2977 NIST (range 2-20 µg/kg); SRM 2978 NIST (range 5-60 µg/kg). I Policlorobifenili analizzati sono il 28, 52, 101, 118, 153, 138, 128 e il 180.

Le metodiche studiate differiscono nella fase di estrazione e di rimozione dei grassi; i passaggi successivi di purificazione con Florisil e la determinazione gas-cromatografica sono invece effettuati secondo le stesse modalità. La quantità di sostanza analizzata è di 1-2 grammi di materiale liofilizzato.

Per l'estrazione in Soxhlet viene utilizzato esano, a ricadere per 9 ore; la rimozione dei lipidi viene effettuata mediante aggiunta di H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrato per una notte. La fase organica, portata a piccolo volume, è purificata su Florisil.

L'Estrazione Accelerata con Solvente utilizza esano a temperatura e pressione elevate, in presenza di gel di silice per la rimozione dei lipidi. L'estratto, portato a piccolo volume, è quindi purificato su Florisil.

L'Estrazione a freddo con solvente esano è preceduta dalla fase di saponificazione dei grassi, ottenuta per aggiunta al campione di KOH 1M in EtOH e facendo bollire a ricadere per 2 ore. L'estratto, portato a piccolo volume, viene purificato su Florisil.

Gli estratti, trasferiti con 3x1 ml di esano su colonna di Florisil, sono eluiti con esano. L'eluato raccolto e portato a secco, è ripreso con 1 ml di isottano e iniettato al Gas Cromatografo con rivelatore ECD. La determinazione quali-quantitativa viene ottenuta iniettando su due colonne (Ultra 2 e DB 608); il risultato è dato dalla media dei valori ottenuti. Per la calibrazione si utilizza una retta costruita riportando i valori di 5 soluzioni standard a concentrazioni vicine a quelle dei campioni in esame.

### **Risultati**

I risultati sono espressi come media di 4 repliche con relative deviazioni standard.

SRM 2978. I recuperi migliori sono stati ottenuti con le tecniche ASE ed Estrazione a freddo con solvente (rispettivamente R%: 92-119; R%: 71-108); l'Estrazione in Soxhlet mostra recuperi più bassi per quasi tutti i singoli congeneri (R%: 54-117). Per quanto riguarda invece la riproducibilità, la tecnica migliore risulta essere l'estrazione in Soxhlet seguita da ASE ed Estrazione a freddo con solvente.

SRM 2977. I recuperi più alti sono stati ottenuti con le tecniche ASE ed estrazione in Soxhlet (rispettivamente R%: 75-107; R%: 70-101); l'Estrazione a freddo con solvente mostra recuperi più bassi per quasi tutti i congeneri ad eccezione del PCB 28 (R%: 61-128). Per quanto riguarda invece la riproducibilità, la tecnica migliore risulta anche in questo caso l'estrazione in Soxhlet, seguita da ASE ed Estrazione a freddo con solvente.

IAEA 142. I recuperi migliori sono quelli ottenuti con la tecnica ASE (R%: 61-115), che è anche la più riproducibile.

Nella Tab.1 e Fig.1 sono riportati i risultati ottenuti per il Materiale di Riferimento 2977.

## Conclusioni

L'Estrazione Accelerata con Solvente risulta essere la tecnica estrattiva migliore per tutti e tre i Materiali Certificati, presentando recuperi molto buoni e buona riproducibilità negli intervalli di concentrazione considerati. Tale tecnica risulta inoltre essere automatizzata, rapida ed utilizza piccoli volumi di solvente; la strumentazione, idonea all'analisi di un numero elevato di campioni, è tuttavia molto costosa.

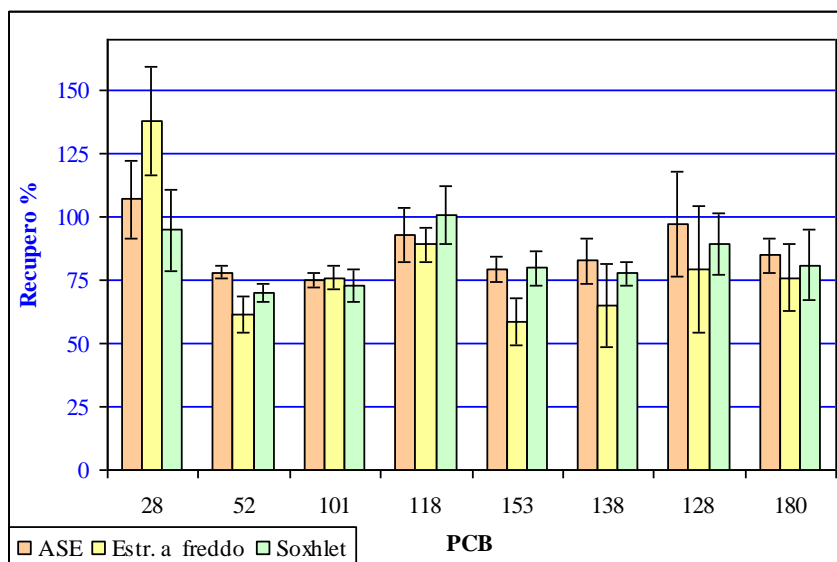
L'estrazione in Soxhlet ha dato buoni recuperi per i tre Materiali di Riferimento, con una ottima riproducibilità. La strumentazione non è costosa, ma la tecnica comporta l'utilizzo di grandi volumi di solvente e tempi di estrazione e di rimozione dei lipidi molto lunghi.

L'estrazione a freddo con solvente mostra recuperi buoni, ma scarsa riproducibilità. La fase critica sembra essere la rimozione dei grassi per saponificazione, che è funzionale all'estrazione. La strumentazione utilizzata non è costosa, ma utilizza grandi volumi di solvente e ha tempi di estrazione e saponificazione lunghi, sebbene inferiori a quelli che caratterizzano l'estrazione in Soxhlet.

**Tab. 1 – SRM 2977** Confronto tra valori certificati e valori ottenuti con le tre metodiche, con relative Dev. St.

PCB	Val. certificato µg/Kg	Estrazione ASE µg/Kg	Estrazione a freddo µg/Kg	Estrazione Soxhlet µg/Kg
28	5,37 ± 0,44	5,74 ± 0,81	7,41 ± 1,15	5,08 ± 0,86
52	8,37 ± 0,54	6,53 ± 0,22	5,15 ± 0,59	5,86 ± 0,30
101	11,2 ± 1,2	8,40 ± 0,32	8,49 ± 0,53	8,19 ± 0,73
118	10,5 ± 1,0	9,75 ± 1,10	9,35 ± 0,70	10,56 ± 1,20
153	14,1 ± 1,0	11,17 ± 0,68	8,29 ± 1,29	11,23 ± 1,00
138	16,6 ± 1,6	13,71 ± 1,46	10,78 ± 2,74	12,91 ± 0,78
128	2,49 ± 0,28	2,42 ± 0,51	1,98 ± 0,62	2,22 ± 0,30
180	6,79 ± 0,67	5,75 ± 0,46	5,16 ± 0,89	5,49 ± 0,94

**Fig. 1 - SRM 2977** Confronto dei recuperi ottenuti con le tre metodiche



## Bibliografia

1. Tanabe S. et al., *Intern. J. Environ. Anal. Chem.*, (1987) 29: 199-213
2. Dionex, Application Note 322, <http://www.dionex.com>
3. Wayne W. et al., *Fresenius J. Anal. Chem.*, (2000) 367: 401-406
4. Villeneuve J.P. et al., *The Science of the Total Environment*, (1999) 237/238: 57-65

## IDENTIFICAZIONE E DETERMINAZIONE MEDIANTE LC-MS DI PRODOTTI DI TRASFORMAZIONE DI FUNGICIDI ANTIBOTRITICI NEI CONTROLLI SULLA SICUREZZA DEI PRODOTTI ALIMENTARI

A. Vanni, P. Sales, L. Anfossi

Laboratorio di Bioanalitica, Dipartimento di Chimica Analitica, Università di Torino  
Via P. Giuria 5, 10125 Torino

I fungicidi antibotritici sono impiegati in agricoltura direttamente sia sul frutto (mela, pera, fragola, uva, pomodoro,...) sia sulla pianta (melo, pero, vite,...) per proteggere i raccolti dalla *Botrytis Cinerea*. La loro presenza su frutti ed ortaggi destinati all'alimentazione umana è sottoposta a regolamentazione di legge, ma i controlli riguardano attualmente soltanto la verifica della presenza e la quantificazione del principio attivo. Tuttavia è noto che i fitofarmaci sono soggetti nell'ambiente a degradazioni di varia natura e che i loro prodotti di trasformazione possono presentare una tossicità persino più elevata di quella del principio attivo di partenza, spesso associata ad una maggiore persistenza che, a sua volta, si traduce in maggiori quantità di residuo accumulato sul prodotto destinato all'alimentazione.

Risulta di grande interesse, quindi, per aumentare la sicurezza dei prodotti alimentari, sottoporli a controlli analitici finalizzati alla verifica non solo della quantità di principio attivo presente (regolata da una corretta somministrazione del fitofarmaco), ma anche all'accertamento della presenza di suoi composti di biodegradazione che possono, infatti, manifestare maggiore tossicità e più elevata stabilità.

Lo scopo di questo lavoro è stato dunque di individuare la presenza di eventuali prodotti di degradazione di pesticidi (precedentemente individuati mediante uno studio di tipo abiotico) su campioni di frutta e verdura in collaborazione con l'ente di controllo preposto (A.R.P.A.) al fine di sviluppare un metodo di controllo che consenta di verificare anche a distanza di tempo, quando il principio attivo non risulta più identificabile, l'avvenuto trattamento dell'alimento.

Sono state quindi considerate 30 matrici alimentari che hanno riguardato prevalentemente campioni ottenuti da colture tradizionali di frutta (fragole, mele, pere, kiwi) e di verdura (pomodori, peperoni). In un particolare aspetto della ricerca è stata inoltre considerata una porzione di 10 campioni definiti come provenienti da colture biologiche (zucchine, cipolle, patate, carciofi, mele, arance, banane) e per questo particolarmente interessanti, data l'importanza commerciale che questo tipo di prodotti sta sempre più assumendo, visto anche il loro preferenziale impiego nella produzione degli alimenti destinati alla prima infanzia.

I principi attivi che sono stati presi in considerazione appartengono a due classi di fungicidi antibotritici ampiamente utilizzati: i dicarbossidiimidici (tra cui il Procimidone, l'Iprodione e il Vinclozolin di cui in nostri lavori precedenti<sup>1,2</sup> abbiamo studiato e definito i loro possibili pathways degradativi, mediante la realizzazione in laboratorio di condizioni abiotiche per mezzo delle quali è stato possibile simulare le condizioni chimico-fisiche delle matrici naturali) e gli anilinopirimidinici (tra cui il Cyprodinil, del quale è in fase di studio il processo di degradazione abiotico). L'impiego dello spettrometro di massa (MS) come rivelatore ha reso possibile l'identificazione dei relativi prodotti di degradazione ottenuti, per i quali, date le differenze strutturali, è stato necessario impiegare i due sistemi d'interfacciamento, Atmospheric Pressure Chemical Ionisation (APCI) e Elettrospray (API-ES).



L'identificazione e la determinazione analitica dei residui dei fitofarmaci e relativi prodotti di degradazione e' stata realizzata mediante l'applicazione di un protocollo d'analisi suddiviso in tre stadi:

- (1) estrazione con acetato di etile e solfato di sodio degli analiti <sup>3</sup>;
- (2) separazione cromatografica a gradiente mediante HPLC dei composti di interesse dalla matrice;
- (3) rivelazione ed identificazione dei composti estratti con rivelatore multicanale a serie di fotodiodi (DAD) e spettrometro di massa (APCI e API-ES).

Sono stati ottimizzati sia il processo di estrazione dai diversi tipi di vegetali per i pesticidi considerati e gli eventuali prodotti di degradazione sia le condizioni operative di separazione cromatografica e di rivelazione mediante spettrometria di massa degli analiti di cui sopra, necessaria per la loro identificazione e determinazione.

Il metodo di estrazione riportato in letteratura<sup>3</sup> è stato modificato per migliorarne la riproducibilità, introducendo un passaggio di sonicazione del campione in presenza di acetato di etile e solfato di sodio, seguito da filtrazione su PFTE ed evaporazione del solvente. Il campione viene poi ricostituito in un solvente adatto all'iniezione diretta in LC-MS.

Per quanto riguarda la separazione cromatografica, data la naturale e molto variabile acidità dei campioni che comporta notevoli problemi di riproducibilità dei tempi di ritenzione, è stato necessario utilizzare una soluzione tampone. Per avere la migliore compatibilità possibile con la successiva determinazione in MS si è scelto il formiato di ammonio a pH 7.00. Le condizioni ottimizzate prevedono, quindi, la separazione in gradiente tampone / acetonitrile.

In queste condizioni, è stato possibile individuare e quantificare sia i fitofarmaci sia i loro prodotti di degradazione sulle matrici considerate.

### **Bibliografia**

1. A.Vanni, R. Gamberini, A. Calabria, P. Nappi, “*Determination and identification of metabolites of the fungicides Iprodione and Procymidone in compost*”, Chemo., 41, (2000),1431-1439.
2. A. Vanni, F. Fontana, “*Photodegradation process of Pyrimethanil induced by iron(III) in aqueous solutions*”, J. of Environ. Monit., 5 (2003), 635-639
3. C. Jansson, T. Pihlström, B-G. Österdahl, K. E. Markides, “*A new multi-residue method for analysis of pesticide residues in fruit and vegetables using liquid chromatography with tandem mass spectrometric detection*”, J. Chromat. A., 1023 (2004) 93-94

**DETERMINAZIONE DEI COLORANTI SUDAN I, SUDAN II,  
SUDAN III E SUDAN IV IN PRODOTTI ALIMENTARI**

*Valeria Melai, Fabrizio Matteucci, Ernesto Di Antonio, Mariangela Di Viesti,  
Giampiero Scortichini*

*Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise "G. Caporale",  
Via Campo Boario, 64100 Teramo*

Nel maggio 2003 la Francia ha notificato, attraverso il sistema di allarme rapido per gli alimenti, l'individuazione del colorante Sudan I in peperoncini rossi originari dell'India. Questo colorante è considerato genotossico in base a dati sperimentali ed è classificato nella categoria 3 delle sostanze cancerogene dall'Agenzia Internazionale per la Ricerca sul Cancro (IARC). Vista la pericolosità di tale sostanza, la Decisione della Commissione 2003/460/CE ha stabilito che gli Stati membri effettuino controlli sui peperoncini rossi e prodotti derivati al fine di verificarne l'assenza [1]. Dal 21 gennaio 2004, secondo la Decisione della Commissione 2004/92/CE, i controlli sono stati estesi ai coloranti Sudan II, Sudan III e Sudan IV [2].

Il presente lavoro ha riguardato la messa a punto di un metodo di screening in cromatografia liquida con rivelazione ultravioletta (HPLC-UV) ed un metodo di conferma in gascromatografia-spettrometria di massa (GC-MS) per la determinazione simultanea dei quattro coloranti vietati. Sono stati analizzati diversi prodotti alimentari riconducibili a quattro categorie analitiche: a) peperoncino e spezie; b) cereali e derivati; c) carni insaccate; d) prodotti sott'olio e conserve.

La metodica proposta ha previsto, per i campioni in esame, una fase di estrazione con cloroformio e successiva iniezione in HPLC con rivelazione UV a 474 nm per il Sudan I, 488 nm per il Sudan II e 502 nm per il Sudan III e IV. La separazione cromatografica è stata realizzata su colonna a fase inversa LiChrospher 250 x 4.6 mm, 5 µm, impiegando come fase mobile un gradiente binario acetonitrile-acido acetico al 14% in acqua, al flusso di 1 ml/min.

Per l'analisi di conferma, sono state raccolte quattro frazioni di eluato in uscita dalla colonna HPLC, contenenti gli analiti in esame. Gli estratti così purificati sono stati analizzati mediante GC-MS a trappola ionica, monitorando due transizioni ioniche per ciascun analita in esame. È stata utilizzata una colonna capillare DB-5MS, 30 m x 0.25 mm x 0.2 µm con iniettore split/splitless.

Il metodo è stato validato conformemente alle prescrizioni della Decisione 2002/657/CE [3].

- [1] Decisione della Commissione del 20 giugno 2003 recante misure di emergenza relative al peperoncino rosso e ai prodotti derivati (2003/460/CE), G.U.C.E. L154 (2003) 114.
- [2] Decisione della Commissione del 21 gennaio 2004 recante misure di emergenza relative al peperoncino e ai prodotti derivati (2004/92/CE), G.U.C.E. L27 (2004) 52.
- [3] Decisione della Commissione del 12 agosto 2002 che attua la direttiva 96/23/CE del Consiglio relativa al rendimento dei metodi analitici e all'interpretazione dei risultati (2002/657/CE), G.U.C.E. L221 (2002) 8.

**PROTEOMIC AND FOOD SAFETY: THE DETERMINATION OF ALLERGENS IN FISH DESTINED TO INFANT FOODS**

*S.Materazzi, S.Aquili, R.Curini, G.D'Ascenzo*  
*Dept. of Chemistry – University of Roma “La Sapienza”*

*M.G.Sabbieti, D.Agas, L.Marchetti and G.Materazzi*  
*Dept. of Morphological and Biocomparative Sciences – University of Camerino*

Food safety is a key social issue, especially after the recent sad reports on bovine spongiform encephalopathy (BSE), the PCB and dioxin contamination found in animal feeds.

The European Union considers the achievement of the highest standards in food safety as a priority task as clearly stated in the “White paper on Food Safety”.

The determination of substances with already known or suspected toxicity along the whole food chain is a difficult task, mainly owing to the low concentration levels at which they exhibit an adverse activity and to the matrix complexity.

A food allergen may be defined as a substance that reacts with IgE antibodies, induces allergic sensitisation or induces allergic reactions. Some allergens only induce allergic sensitisation but do not provoke symptoms, while others bind IgE but do not induce mast cell degranulation.

Allergenic reactions deriving from the ingestion of fish or fish- derivatives are mainly due to the presence of high molecular weight proteins, which cause an IgE-mediated response, like the parvalbumin fraction, the type I collagen and the myofibrillar protein fraction (myosin, troponin, tropomyosin, etc.).

Since consumer's demand for fish has highly increased in the recent years, aquaculture is gaining importance as a source of fish, and the increasing presence of commercially available aquaculture products underlined the need to guarantee the safety, traceability, authenticity and health benefits of such products.

Proteomic consequently becomes a very interesting tool for the investigation of the changes in the quantities and post-translational modifications of the proteins, but the changes may also be brought about by growth, differentiation, senescence, changes in the environment, etc.

A significant number of literature reports shows the bidimensional gel electrophoresis (2D-PAGE) followed by the mass spectrometry (MALDI-TOF-MS, ESI-MS/MS) as the best tool for the characterization of fish proteins and the changes occurring in them along the industrial processes they are subjected to.

In such a frame, our study will try to contribute to the infant-food safety improvement by developing and validating analytical methodologies for the quantification of allergenic substances, determined in growing fish and in the final fish-derivative products destined to the infant nutrition.

**METODO INNOVATIVO PER LA DETERMINAZIONE IN ULTRATRACCE DI  
FORMALDEIDE IN PRODOTTI ITTICI CONGELATI:  
ESTRAZIONE SPME CON DERIVATIZZAZIONE *IN SITU* ED ANALISI  
GC-ITMS/MS**

*F. Bianchi, M. Careri, M. Musci, A. Mangia*

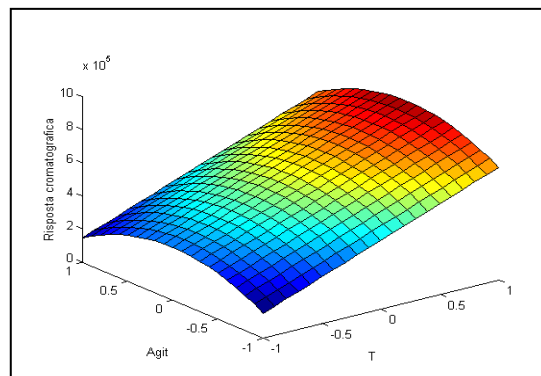
*Dipartimento di Chimica Generale ed Inorganica, Chimica Analitica, Chimica Fisica,  
Università degli Studi di Parma, Parco Area delle Scienze 17/A, 43100 Parma*

La sicurezza degli alimenti è diventata un'esigenza prioritaria in Europa, come ribadito dal Libro Bianco sulla sicurezza alimentare [1] nel quale si afferma come la politica europea sugli alimenti debba essere fondata su standard elevati di sicurezza per promuovere e tutelare la salute dei consumatori. In quest'ambito, notevole interesse è rivestito da aldeidi volatili con attività tossica, quali la formaldeide, classificata dallo IARC nel gruppo 2A quale possibile cancerogeno per l'uomo. In prodotti ittici, tale sostanza è nota formarsi *post-mortem* per azione enzimatica a carico della trimetilammina-*N*-ossido (TMAO), naturalmente presente in tali matrici [2]. La conservazione dei prodotti ittici a basse temperature favorisce l'elevato accumulo di formaldeide con conseguente incremento del processo di degradazione delle proteine e quindi del deterioramento della qualità dei prodotti commercializzati.

L'Agenzia Americana per la Protezione Ambientale (US-EPA) ha stabilito un valore di *acceptable daily intake* (ADI) pari a 0.2 mg/kg di peso corporeo. A livello nazionale, nel 1985 il Ministero della Sanità ha invece fissato, a scopo puramente cautelativo, valori limite di 60 mg/kg di formaldeide per pesci appartenenti alla famiglia dei Gadidi e 10 mg/kg per i crostacei [3].

Il metodo ufficiale di analisi, di tipo colorimetrico, presenta un limite di rivelazione di 1 mg/kg [4], ma non offre sufficiente sensibilità per la determinazione di tale contaminante a basse concentrazioni, utili ai fini di una possibile valutazione della freschezza dell'alimento. E' pertanto di interesse lo sviluppo di nuovi metodi sensibili ed affidabili per la determinazione accurata di tale composto.

Nel presente lavoro, la presenza di formaldeide in prodotti ittici è stata determinata mediante microestrazione in fase solida (SPME) abbinata alla gascromatografia-spettrometria di massa tandem con sistema a trappola ionica (GC-ITMS/MS). Ulteriore selettività è stata ottenuta operando in ionizzazione chimica, con metanolo quale reagente liquido. A causa della elevata volatilità, nonché reattività e basso peso molecolare, la formaldeide è stata determinata previa derivatizzazione *in-situ* della fibra Carboxen-PDMS (75  $\mu$ m), utilizzando come agente derivatizzante la pentafluorobenzilidrossilammina. Una fase preliminare dello studio ha riguardato l'ottimizzazione delle condizioni di estrazione mediante pianificazione sperimentale (disegno centrale composito). A tal scopo, sono stati considerati tre fattori a due livelli: temperatura di estrazione, tempo di estrazione ed agitazione della matrice. I risultati ottenuti hanno consentito di valutare la significatività degli effetti principali e di interazione dei fattori considerati.



Superficie di responso per l'ottimizzazione dell'estrazione SPME della formaldeide

Misure replicate al punto centrale del dominio sperimentale hanno permesso di valutare l'errore sperimentale e la presenza di effetti di curvatura della superficie di responso (Figura).

Sulla base di questi risultati, che hanno evidenziato una curvatura significativa, al piano fattoriale iniziale sono stati aggiunti gli esperimenti di un piano a stella: è stato così possibile individuare i fattori responsabili della curvatura della superficie di responso e calcolare un modello di regressione, che è stato utilizzato per individuare le condizioni di estrazione ottimali all'interno del dominio sperimentale considerato (estrazione eseguita a 80 ° C per 30 min con una velocità di agitazione intermedia nel range in esame).

Successivamente, in accordo alle linee guida EURACHEM il metodo SPME-GC-ITMS/MS è stato validato nelle condizioni ottimali individuate, in termini di limiti di rivelazione e di quantificazione, intervallo di linearità di risposta, precisione, esattezza e selettività [5]. Gli eccellenti risultati ottenuti in termini di limite di rivelazione, inferiore a 10 ng/kg, e l'elevata selettività della tecnica di rivelazione rendono il metodo particolarmente adeguato per un monitoraggio della formaldeide a livello di ultratracce in prodotti ittici.

Le potenzialità della tecnica SPME-GC-IT-MS/MS sono state infine dimostrate dall'applicabilità a numerosi prodotti ittici congelati.

### Riferimenti

- [1] European Commission, (2000a, January 12) White paper on food safety, (COM 1999, 719 final)
- [2] F. Badii, N.K.Howell, Food Hydrocoll. 16 (2002) 313
- [3] MINSAN – telegramma n. 703/3266/6/1377 del 08.11.1985
- [4] Official Methods of Analysis (1990) 15<sup>th</sup> Ed., AOAC, Arlington, VA, 931.08
- [5] The Fitness for Purpose of Analytical Methods: A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics, Eurachem Guide, 1<sup>st</sup> Internet Version, 1998; <http://eurachem.ul.pt/>

---

Lavoro svolto nell'ambito del Progetto COFIN 2002 (MIUR): Sicurezza degli alimenti. Nuovi metodi di controllo per contaminanti naturali in tracce

## CARATTERIZZAZIONE E DETERMINAZIONE DI ACIDI ORGANICI ED ANTOCIANI IN VINI ROSSI ITALIANI MEDIANTE ELETTROFORESI CAPILLARE ED HPLC

C. Corradini<sup>1</sup>, R. Galanti<sup>2</sup>, L. Licchelli<sup>1</sup>, I. Nicoletti<sup>2</sup>

*1 Dipartimento di Chimica Generale ed Inorganica, Chimica Analitica, Chimica Fisica, Università di Parma*

*2 Istituto di Metodologie Chimiche, C.N.R. – Area della Ricerca di Roma-1, Roma*

Negli ultimi anni diversi studi epidemiologici hanno evidenziato una significativa riduzione dell'incidenza delle malattie cardiovascolari da un moderato consumo di vino. Tali risultanze scientifiche hanno determinato una rivalutazione sul piano salutistico dell'alimento vino con il riconoscimento del suo valore nutrizionale, attribuito all'azione protettiva degli agenti antiossidanti. Come è noto, questo alimento contiene una varietà di composti biologicamente attivi, tra i quali i più significativi sono i polifenoli. Il contenuto totale ed il rapporto delle varie classi di questi composti varia significativamente tra i diversi vini in relazione al tipo di vitigno, all'area di produzione, alle condizioni climatiche, alle tecniche agronomiche ed alle procedure di vinificazione adottate.

E' inoltre crescente, sia tra i produttori che i consumatori, la consapevolezza che un vino di qualità può nascere solo da vitigni selezionati e da un vinificazione condotta seguendo procedure rigorosamente fissate e facilmente controllabili. E' quindi di primaria importanza disporre di marker molecolari in grado di costituire indicatori molecolari per definire le caratteristiche di qualità e tipicità dei vini.

Il presente studio è stato incentrato sulla determinazione quali e quantitativa del profilo degli acidi organici e della frazione antocianica. Inoltre al fine di fornire una ulteriore valutazione dei vini analizzati è stato determinato il loro contenuto in resveratrolo impiegando un metodo HPLC precedentemente messo a punto e validato[1].

Gli acidi organici presenti nel vino, derivano in parte da quelli presenti nell'uva ed in parte come sottoprodotti della fermentazione. L'indagine in particolare è stata focalizzata sulla determinazione dell'acido acetico e succinico, quali prodotti secondari della fermentazione alcolica ed in relazione alla presenza di acido malico e lattico, entrambi correlati alla fermentazione malolattica. A tal fine è stato ottimizzato e validato un metodo elettroforetico capillare in cui gli analiti in esame migrano selettivamente in un capillare di silice fusa in cui il flusso elettroosmotico è diretto in direzione anodica per effetto del coating dinamico realizzato impiegando esadimetrina bromuro, quale policatione funzionalizzato con ammine quaternarie. Il metodo elettroforetico messo a punto consente la separazione degli acidi tartarico, malico, succinico, acetico e lattico in meno di quattro minuti. Il metodo elettroforetico è stato validato in termini di ripetibilità dei tempi di migrazione, limite di rivelazione e quantificazione, mentre l'accuratezza è stata determinata mediante il metodo delle aggiunte. Un esempio dei profili elettroforetici mediante tale metodo elettroforetico è riportato in figura 1.

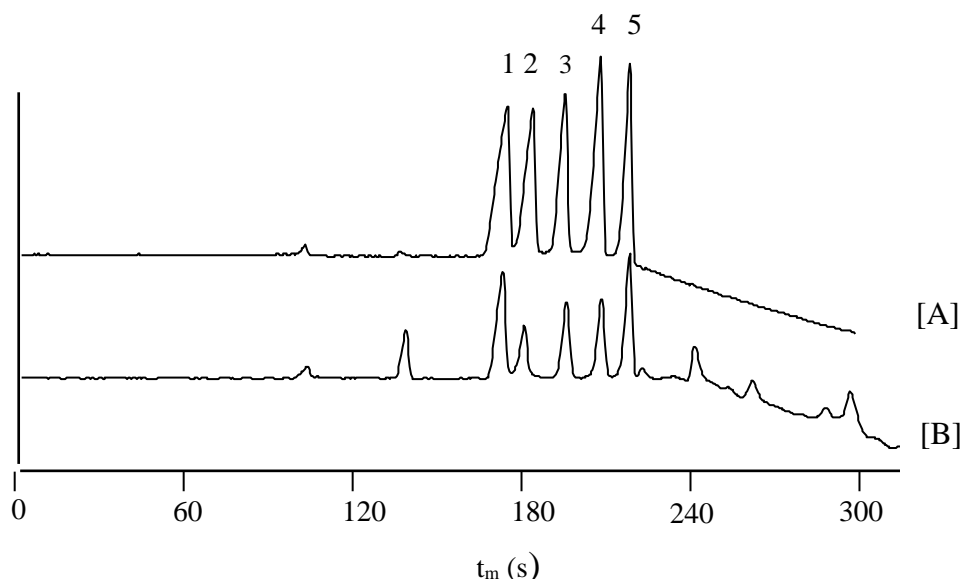
Gli antociani sono i maggiori responsabili della colorazione nel vino. La loro presenza dipende essenzialmente dal tipo di vinificazione, essendo presenti prevalentemente nelle bucce e nei raspi. Il tenore di antociani presenti nel vino rosso è pertanto legato, oltre a tipo di vitigno e al clima, alle procedure di vinificazione.

La frazione antocianica presente nei vini rossi oggetto del presente studio è stata determinata mediante HPLC, impiegando una colonna narrowbore a fase inversa. (colonna Polaris C18A, 5 $\mu$ , 150x2.0 mm D.I.) ed opportuno programma di eluizione a gradiente riportato in Tabella I, in cui l'eluente A è costituito da una miscela di acqua - acido formico ( rapporto 9:1 v/v) e l'eluente B da una miscela di acetonitrile-acqua-acido formico (in rapporto 5:4:1 v/v). Le

separazioni sono state ottenute ad un flusso di 200  $\mu\text{L}/\text{min}$  e colonna termostata a 30  $^{\circ}\text{C}$  ( $\pm 0,1$   $^{\circ}\text{C}$ ). Il rivelatore a serie di diodi è stato selezionato a  $\lambda = 518$  nm e gli spettri sono stati acquisiti nel range 200-600 nm. La cella del rivelatore è del tipo “semi-micro” con volume di 2.5  $\mu\text{l}$  e lunghezza di 5mm.

L'indagine è stata condotta su venti diversi vini rossi prodotti in Italia, tutti relativi alla vendemmia 2002, con l'attribuzione delle denominazioni DOCG, DOC e IGT.

I risultati ottenuti verranno illustrati nella presente comunicazione poster ed ampiamente discussi.



**Figura 1.** Elettroferogramma relativo alla separazione di: [A] miscela standard di acido tartarico (1), acido malico (2), acido succinico (3), acido acetico (4) ed acido lattico (5); [B] vino rosso DOC Primitivo di Manduria.

Condizioni elettroforetiche: Capillare di silice fusa (lunghezza effettiva 200.0 mm, lunghezza totale 312 mm, diametro interno 75  $\mu\text{m}$ ), preventivamente trattato con esadimetrina bromuro; elettrolita, acido benzoico 22 mM, pH 6.10 con il 32% (v/v) di metanolo; potenziale applicato, -10 kV; temperatura, 25 $^{\circ}\text{C}$  ( $\pm 1^{\circ}\text{C}$ ); rivelazione, UV indiretta a 214 nm in direzione anodica.

**Tabella I** – Programma di eluizione a gradiente degli antociani su colonna narrowbore RP-18

Tempo (min)	A %	B %
0.01	92	8
12	82	18
17	82	18
23	77	23
30	65	35
35	50	50
45	50	50
46	92	8
60	92	8

### Riferimenti

[1] M. Careri, C. Corradini, L. Eviri, I. Nicoletti, I. Zagnoni, J. Agric. Food Chem., 51 (2003) 5226.

## CARATTERIZZAZIONE CHIMICO-FISICA DI GEL DI FRUTTOOLIGOSACCARIDI E INULINE

C. Corradini<sup>1</sup>, E. Vittadini<sup>2</sup>, E. Chiavaro<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Dipartimento di Chimica Generale ed Inorganica, Analitica, Chimica Fisica

<sup>2</sup> Dipartimento di Ingegneria Industriale  
Università di Parma

Fruttooligosaccaridi (FOS) ed L'inulina sono carboidrati appartenenti alla classe dei fruttani. Strutturalmente i fruttani sono oligomeri e polimeri del fruttosio uniti da legami glicosidici,  $\beta$ -(2 $\rightarrow$ 1), con un  $\alpha$ -D glucosio in posizione terminale. Il grado di polimerizzazione (DP) può variare da 3 a 10 (FOS), mentre i fruttani a più alto peso molecolare di interesse in campo alimentare sono rappresentati da inuline con grado di polimerizzazione massimo di 60 unità di fruttosio. I fruttani sono naturalmente presenti come carboidrati di riserva in diverse varietà di vegetali, cereali e frutta.

In anni recenti, l'abilità di fruttooligosaccaridi ed inulina di promuovere la proliferazione di bifidobatteri nel colon è stata ampiamente investigata e scientificamente documentata [1-2]. Conseguentemente, è stato dato sempre maggior risalto al ruolo che possono assumere questi carboidrati come prebiotici, naturalmente presenti in alcuni alimenti od aggiunti quali ingredienti nella formulazione di alimenti funzionali. Inoltre, FOS ed inulina presentano dal punto di vista alimentare innumerevoli benefici effetti quali la capacità di ridurre i livelli di lipidi e colesterolo nel sangue e di favorire l'assorbimento del calcio. Recentemente, l'inulina è stata utilizzata come sostituto di macronutrienti in particolare come *fat-replacer* in prodotti lattiero-caseari, da forno e prodotti spalmabili, in aggiunta alle proprietà nutrizionali [3].

L'inulina disponibile commercialmente è una miscela polidispersa di fruttani con DP variabile da 3 a 60, prodotta mediante tecnologia *spray-dry* in grado di formare gel ad elevate concentrazioni (20-30 % w/v) quando miscelata con acqua. Recenti studi sono stati condotti allo scopo di caratterizzare dal punto di vista chimico-fisico la polvere di inulina mentre scarsi riferimenti sono presenti sulle proprietà dei suoi gel e sulla loro stabilità [4-6].

Obiettivo della presente ricerca è stato lo studio delle proprietà chimico-fisiche e della stabilità di gel di inulina termicamente indotti a partire prodotti reperibili in commercio quali FOS (massimo valore di DP 10) ed inuline, costituite da miscele polidisperse in cui sono contemporaneamente presenti le frazioni oligo e polisaccaridica o in cui è preminentemente presente la sola frazione polisaccaridica.

A tale scopo sono stati preparati gel a tre diverse concentrazioni di inulina, dissolvendo in acqua una quantità di inulina in polvere tale da raggiungere valori di concentrazione pari a 20, 30 e 40% (p/v), sottoponendo la sospensione ad agitazione manuale in bagno termostato ad acqua alla temperatura di 60 °C e successivamente raffreddando a temperatura ambiente, sono stati ottenuti gel a diversa consistenza. I gel così preparati sono stati conservati a temperatura di 4 °C in appositi contenitori sigillati e analizzati immediatamente dopo la preparazione e a tempi di conservazione pari a 30 e a 60 giorni.

Fos ed inuline impiegate nella sperimentazione sono state preventivamente caratterizzate mediante cromatografia a scambio anionico forte ad alti valori di pH, in congiunzione con un rivelatore amperometrico pulsato (HPAEC-PAD). A tal fine è stato ottimizzato un programma di eluizione a gradiente in grado di verificare la contemporanea presenza delle frazioni oligo e polisaccaridica e di valutarne qualitativamente la loro distribuzione.

La caratterizzazione chimico-fisica dei gel è stata condotta mediante determinazione ai tempi prefissati del valore dell'attività dell'acqua (Rotronics-HYGROSKOP BT), del contenuto di umidità mediante stufa da vuoto a 60 °C per 24 ore.



Inoltre, sono stati determinati mediante TAXT2 Texture Analyzer i parametri di *texture* (durezza, adesività, elasticità) mentre la % di acqua congelabile è stata misurata mediante l'impiego di un calorimetro a scansione differenziale (DSC Q100MFC, TA Instruments) operante nel range di temperatura da – 60 °C a 40 °C con velocità di riscaldamento pari a 10 °C/min, per integrazione dell'area sottesa al picco intorno a 0 °C attribuibile allo scongelamento dell'acqua.

I risultati ottenuti sono stati correlati con la le diverse composizioni delle miscele polidisperse verificate mediante determinazione cromatografica

### Riferimenti

- [1]. Roberfloid, M.B. (1999), *J. Nutrition*, **129**, 1398S-1401S
- [2]. Havenaar, R. et al., (1999), *Food Rev. Int.*, **15**, 109-120.
- [3]. Niness, K.R. (1999), *J. Nutrition*, **129**, 1402S-1406S
- [4]. Bot, A. et al. (2004), *Food Hydr.*, **18**, 547-556.
- [5]. Blecker, C. et al. (2003), *J. Therm. Anal. Calor.*, **71**, 215-224.
- [6]. Kim, Y. et al. (2001), *Carb. Polym*, **46**, 135-145.

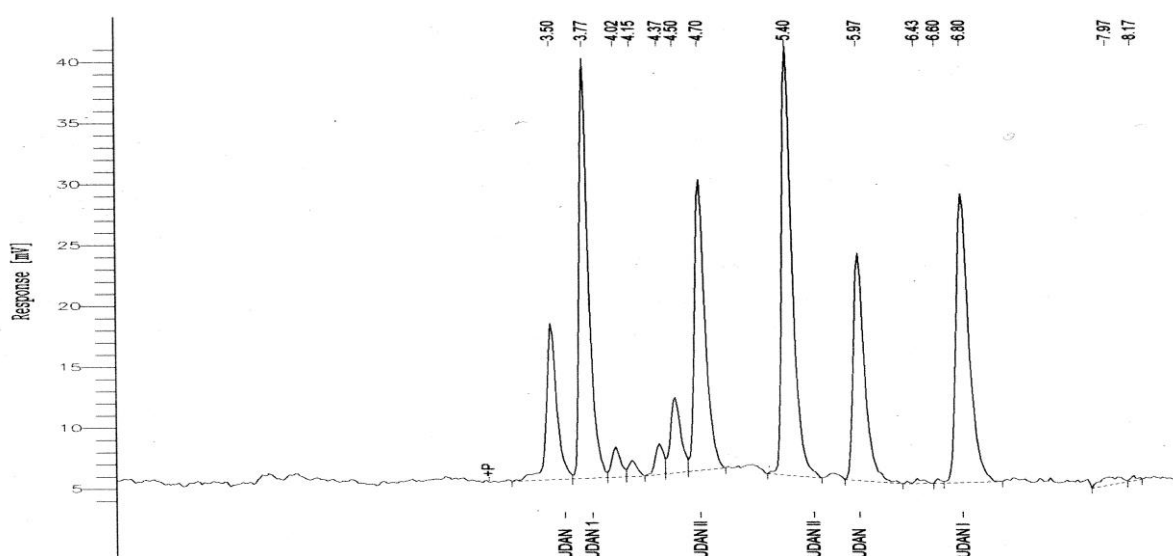
## PRESENZA DI COLORANTE SUDAN I, II, III E IV, SUDAN ORANGE G E RED 7B IN SPEZIE E ALIMENTI: RISULTATI DI UN ANNO DI CONTROLLI

M. Bonini, E. Errani\*, F. Gangini, V. Menna

*Agenzia Regionale per la Prevenzione e l'Ambiente dell'Emilia-Romagna, Sezione di Bologna, via Triachini 17 – 40138 Bologna Italy*

Nel giugno 2003 un'allerta europea segnalava la possibile presenza di colorante rosso Sudan I nel peperoncino in polvere proveniente da alcuni stati extraeuropei. Trattandosi di un composto potenzialmente cancerogeno<sup>(1)(2)</sup>, non consentito per l'uso alimentare da molti anni, la Commissione CEE<sup>(3)</sup> ne proibiva l'importazione in tutta Europa, ed il nostro laboratorio ha rapidamente approntato una metodica di analisi sia per il peperoncino e le spezie a base di peperoncino (paprika, curry) che per i prodotti aromatizzati con peperoncino: sughi pronti e condimenti, chili, tabasco, ketchup, pasta, crackers, insaccati, olio, formaggi, prodotti di erboristeria...

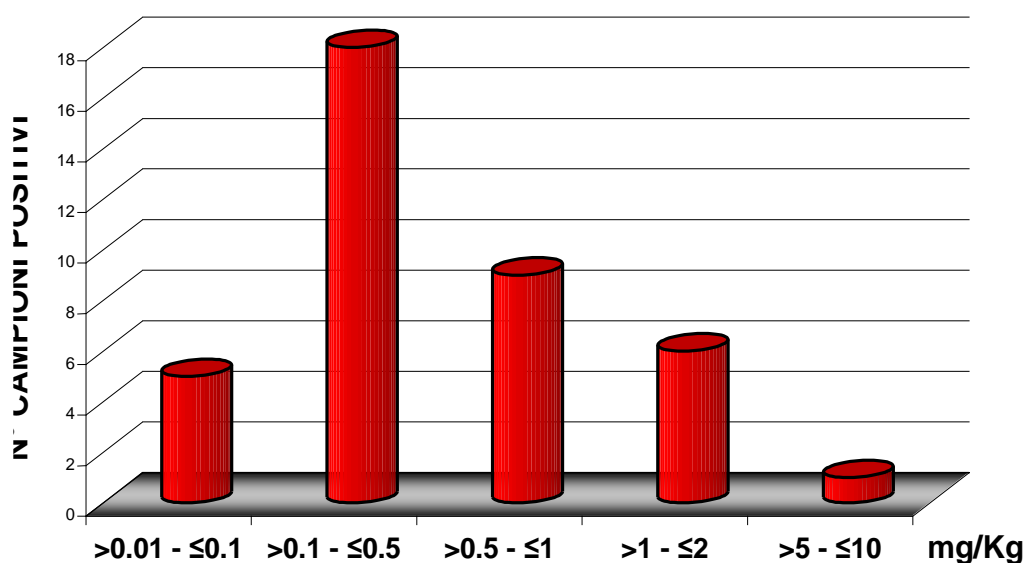
Il campione (da 5 a 50 g) viene estratto a freddo con toluene o etere di petrolio, l'estratto evaporato, l'eventuale grasso presente ripartito con metanolo, ripreso con acetonitrile (2-5 ml) ed analizzato in HPLC (colonna C18 25 cm, fase mobile acetonitrile 100%, rivelatore UV-VIS a 480 nm). La conferma dell'identità del Sudan I è fatta usando un diverso eluente, oppure mediante HPLC-DAD, o anche in GC-MS (ioni caratteristici 77, 115, 145, 163, 248). Mentre sul peperoncino le quantità rinvenute erano molto elevate, richiedendo semmai una diluizione dell'estratto, sugli alimenti contenenti peperoncino si è reso necessario concentrare l'estratto 25 volte (50 g di campione portati a 2 ml finali) per raggiungere una sensibilità di 0.01 mg/Kg (LOQ). I recuperi sono dell'ordine del 99±3 % per il peperoncino, e dell'80±5 % per sughi e alimenti aromatizzati.



Sono stati analizzati al 30/06/2004 circa 439 campioni, di cui ben 96 (22 %) positivi. Nel grafico è riportata la quantità di Sudan I, suddivisa in classi di valori, rinvenuta nei condimenti, tipologia di alimento particolarmente interessata alla contaminazione. Andamenti analoghi si riscontrano nei peperoncini (177 campioni) e nelle specialità varie (165 campioni). Attualmente la Regione Emilia-Romagna, a seguito di disposizioni comunitarie<sup>(4)</sup>, ha disposto per il 2004 un piano di monitoraggio sul Sudan, estendendo la ricerca anche agli altri composti della famiglia (Sudan II, Sudan III, Sudan IV) ed la validazione del metodo è stata estesa a questi composti e ad altri coloranti suggeriti in letteratura<sup>(5)</sup>.

Nessuno degli oltre 70 campioni finora analizzati ha mostrato la presenza degli altri coloranti.

### SUDAN I NEI CONDIMENTI (97 campioni analizzati)



Altri organismi hanno proposto tecniche di estrazione e purificazione con solventi tossici, o laboriose purificazioni per TLC e analisi in GC-MS, o analisi in LC-MS-MS<sup>(6)</sup>, certamente più sensibili ma non alla portata di tutti i laboratori; il metodo proposto da noi è relativamente semplice, rapido e consente di rivelare agevolmente livelli di contaminante di 0.01 mg/kg. In attesa di disposizioni ufficiali dalle autorità competenti circa le metodiche da utilizzare, il metodo proposto è stato adottato da molti altri laboratori pubblici e privati, per la sua semplicità e rapidità.

#### Bibliografia

- (1) [http://www.osha.gov/dts/chemicalsampling/data/CH\\_268420.html](http://www.osha.gov/dts/chemicalsampling/data/CH_268420.html)
- (2) <http://www.cdc.gov/niosh/rtecs/ql4ac4a0.html>
- (3) Decisione della Commissione 2003/460/CE del 20 giugno 2003 recante misure di emergenza relative al peperoncino rosso e ai prodotti derivati, GUCE L154 del 21.6.2003
- (4) Decisione della Commissione 2004/92/CE del 21 gennaio 2004 recante misure di emergenza relative al peperoncino e ai prodotti derivati, GUCE L27 del 30/01/2004
- (5) O.Veretout, L.Demesse, L.Bzymanski, Recherche et dosage des colorants Soudan et Bixine dans les piments et produits à base de piments, Ministero della Salute, nota prot. D.G.V.A/V/8127/8 del 23 marzo 2004
- (6) F. Calbiani, M. Careri, L. Elviri, A. Mangia, L. Pistarà, I. Zagnoni: Development and in-house validation of a liquid chromatography–electrospray–tandem mass spectrometry method for the simultaneous determination of Sudan I, Sudan II, Sudan III and Sudan IV in hot chilli products, J. Chromatogr. A, 1042 (2004) 123–130

## INDAGINE SULL'IDONEITA' DI PELLICOLE PER ALIMENTI IN RELAZIONE AL CONTENUTO ED ALLA CESSIONE DI PLASTIFICANTI

M. Bonini, E. Errani\*, G. Zerbinati, Agenzia Regionale per la Prevenzione e l'Ambiente dell'Emilia-Romagna, Sezione di Bologna, via Triacchini 17 – 40138 Bologna Italy

S. Girotti, Unità Complessa di Scienze Chimiche, Radiochimiche e Metallurgiche, Università degli Studi di Bologna, via S. Donato 5 – 40138 Bologna Italy

Le pellicole in PVC per la conservazione degli alimenti sono largamente utilizzate in ambito domestico ed industriale: per ottenere le peculiari proprietà meccaniche (elasticità, adesività), tali pellicole sono additivate con elevate quantità (5-30 %) di plastificanti, in particolar modo ftalati e adipati, il cui utilizzo ha portato a studiare in modo approfondito il loro effetto sulla salute dell'uomo<sup>(1)</sup>. In termini di tossicità acuta, potenzialità cancerogena, nonché la possibile azione estrogenica in particolare di di-2-etilesil-ftalato (DEHP) e di 2-etilesil-adipato (DEHA), i plastificanti più usati.

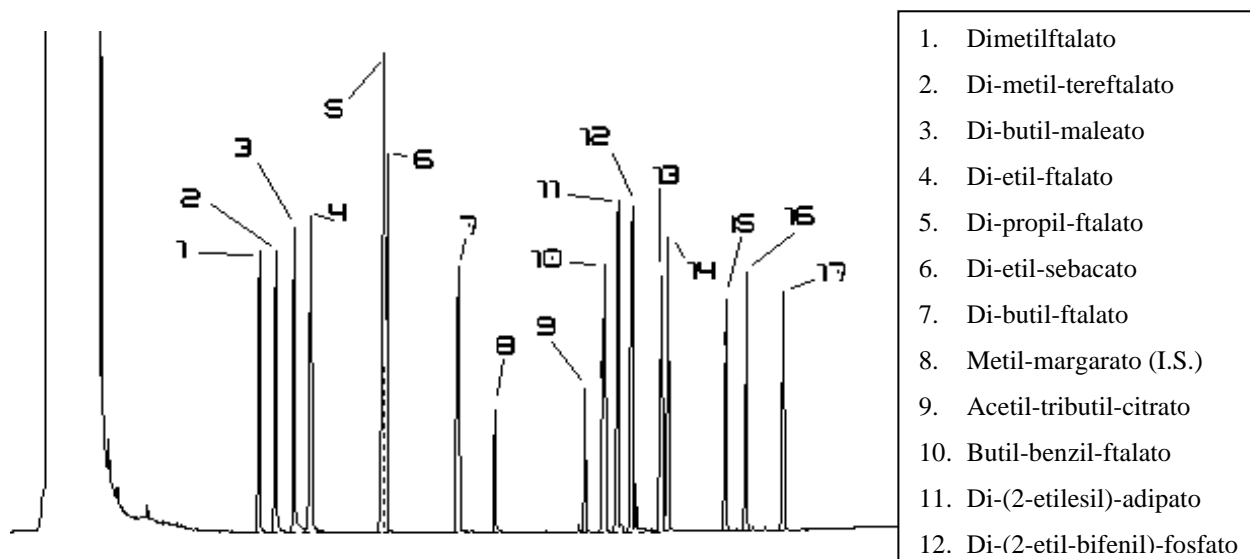
Proprio la presunta tossicità degli ftalati ha portato recentemente all'emanazione di norme che ne vietano di fatto l'impiego nei film destinati a contatto con alimenti grassi o oleosi<sup>(2)</sup>

La normativa vigente<sup>(3)</sup> prevede limiti di migrazione globale per le plastiche per uso alimentare, e limiti di migrazione specifica per alcuni additivi. Tali valori di migrazione sono determinati in liquidi simulanti, in condizioni definite di tempo e temperatura. Non esistono invece metodiche ufficiali per la determinazione simultanea dei plastificanti nei film per alimenti, ma solo lavori sperimentali<sup>(4)(5)</sup>.

Per valutare sia la presenza effettiva di additivi che la quantità migrata in condizioni modello, è stato messo a punto un metodo di estrazione dei plastificanti in Soxhlet (1 g in 50 ml di etile acetato), e un'analisi dell'estratto in GC-FID (INJ 250°C splitless, DET 320°C, colonna MDN-5 30m x 0.25 ID, carrier HE @125 Kpa, programma 50°C/2 min, 40°C/min fino a 150°C, 8°C/min fino a 310°C/5 min): tale metodo consente di separare in 25 min e determinare sino a 16 plastificanti potenzialmente presenti nelle pellicole, con limiti di rilevabilità che vanno da 0.07 a 0.7 % in peso sulla plastica.

L'efficienza del processo estrattivo è circa dell' 88±10%, mentre l'analisi GC è lineare in un range da 10 a 100 mg/l di soluzione

Il cromatogramma illustra la separazione dei 16 plastificanti analizzati (20 mg/l ciascuno)



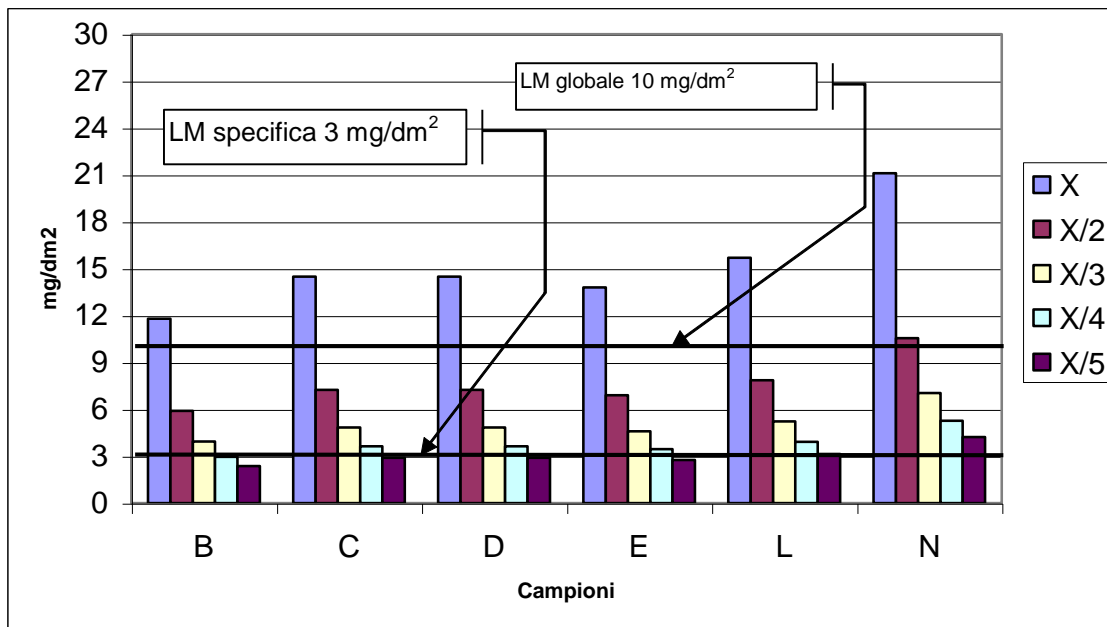
Sono stati analizzati 9 campioni di film estensibili in PVC, di varie marche, reperiti presso la grande distribuzione. Tutti i campioni esaminati presentano un contenuto complessivo in

plastificanti variabile tra il 3 e il 10 % in peso e i composti rilevati sono stati principalmente tre:

1. acetil-tributil-citrato (ATBC) (1,5 ÷ 2 % in peso, sempre in associazione a DEHA);
2. di-etiesil-adipato (DEHA) (2 ÷ 8% in peso; in alcuni campioni rappresenta la totalità della quota di additivazione in plastificanti);
3. di-butyl-ftalato (DBP) (variabile sino allo 0,5% in peso).

I livelli di plastificanti estratti in Soxhlet sono stati confrontati con quelli ottenuti dalle prove di migrazione con simulanti grassi previsti dalla legge (etanolo 95%, e isoottano), sia nelle condizioni limite di legge (10 giorni a 5°C) sia per tempi più lunghi, (20, 30, 40 e 60 giorni), per valutare una possibile cinetica di rilascio per tempi prolungati, comunque ipotizzabili per l'uso corrente.

I risultati relativi alle prove di migrazione hanno confermato l'elevato potere estraente del solvente simulante oleoso nei confronti dei plastificanti: per alcuni film si è verificato un superamento dei limiti di migrazione specifici imposti dalla legge, soprattutto per il DEHA, nonostante l'applicazione di particolari fattori di riduzione previsti (X/3, X/4, X/5), nell'ipotesi di una minore capacità estrattiva per taluni alimenti



I risultati ottenuti con tempi fino a 60 giorni non evidenziano invece un aumento della migrazione: si può quindi ipotizzare che l'utilizzo dei film per avvolgere o contenere alimenti, anche per tempi prolungati, non rappresenterebbe un fattore di rischio per un'ulteriore assunzione di plastificanti con la dieta.

#### Bibliografia

- (1) Sheftel V. O., "Indirect Food additives and Polymers. Migration and Toxicology". Lewis Publishers, Washington DC (USA), (2000)
- (2) D.M. 17/12/1999 n.538, pubblicato su G.U. n.28 del 4/2/2000
- (3) D.M. 28/3/2003 n.123, pubblicato nella G.U. del 31/05/2003.
- (4) M. Denaro, A. Maggio, "Determinazione di plastificanti in alcuni film estensibili per alimenti", Atti del II° Congresso Nazionale di Chimica degli Alimenti, 1033-1037, (1995).
- (5) L. Piergiovanni, P. Fava, S. Colli, "Studio della migrazione negli alimenti del di-2-etilesil-adipato da film di PVC plastificato", Incontro di Packaging Education- "A proposito di adipati e ftalati", Milano (1999)

**VERIFICA SUL CAMPO DI UN SISTEMA OLFATTIVO ARTIFICIALE PER IL CONTROLLO DEL PACKAGING ALIMENTARE**

*Michele Suman<sup>†</sup>, Ugo Bersellini<sup>†</sup>, Carlotta Ricci<sup>††</sup>, Enrico Dalcanale\**

<sup>†</sup> *Central Research Labs - Barilla G.R. F.lli SpA, via Mantova 166 – 43100 Parma (Italy)*

*[m.suman@barilla.it](mailto:m.suman@barilla.it); [u.bersellini@barilla.it](mailto:u.bersellini@barilla.it)*

<sup>††</sup> *Soatec Srl - Via Battisti 35, 43040 Felegara di Medesano (PR)-Italy*

*[carlottaricci@tin.it](mailto:carlottaricci@tin.it)*

*\* Dipartimento di Chimica Organica ed Industriale, Università di Parma, Parco Area delle Scienze, 17/A - 43100 Parma; [enrico.dalcanale@unipr.it](mailto:enrico.dalcanale@unipr.it)*

I Sistemi Olfattivi Artificiali (SOA) hanno avuto un notevole sviluppo negli ultimi anni e, grazie all'evoluzione dei sistemi software e dei metodi di elaborazione dati, è stato possibile "produrre" strumenti affidabili e quindi utilizzabili nei laboratori di controllo qualità, dove è richiesta una risposta rapida e precisa [1]. Il packaging è da considerarsi parte integrante della qualità di un prodotto alimentare e rappresenta inoltre il primo impatto organolettico che può condizionare sensibilmente le scelte dei consumatori.

Gli imballi in uso, in genere, sono multistrati flessibili stampati e/o verniciati, all'interno dei quali è possibile ritrovare un gran numero di sostanze organiche volatili potenzialmente capaci di sprigionare odori, come ad esempio residui monomerici, solventi, additivi per materie plastiche ed inchiostri, vernici di sovrastampa, adesivi e primer di accoppiamento.

Le analisi tradizionalmente eseguite per valutare la qualità degli imballi alimentari sono l'analisi gascromatografica [2] e l'analisi sensoriale olfattiva [3]; entrambe queste tecniche contribuiscono a qualificare nel complesso l'odore di un imballo ma sono soggette ad alcuni limiti quali ad esempio la necessità di tempi lunghi per singola analisi e di personale addetto esperto.

L'utilizzo di un SOA, altrimenti detto "naso elettronico", dotato di Sensori MOS (Metal Oxide Semiconductors) somma i vantaggi delle due tecniche citate fornendo risultati oggettivi, tempi di risposta rapidi (10 minuti) con numerose determinazioni eseguibili nell'arco della giornata attraverso una procedura semplice, adatta ad essere eseguita presso un comune laboratorio di controllo qualità.

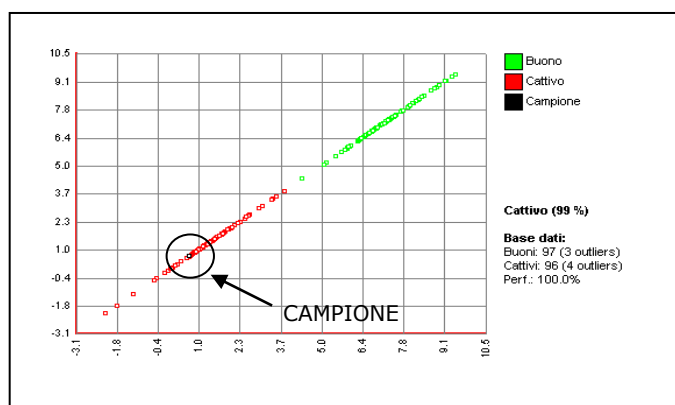
Il sistema si basa sulla costruzione di una serie di banche dati di riferimento, una per ogni tipologia di materiale, nelle quali sono inseriti campioni di imballo conformi e campioni non conformi, questi ultimi preparati aggiungendo in laboratorio quantità note di solventi e sostanze possibili inquinanti. Tra i prodotti chimici utilizzati si possono citare: acetato di etile, acetone, acetato di n-propile, acetilacetone, metossipropanolo, metossipropilacetato, dowanol, etossipropanolo, butilacrilato, i-butilmetacrilato, metilisobutilchetone, ottano, piridina, acetale, xilene, i-propilacetato, toluene.

Il SOA è stato valutato anche dal punto di vista della capacità di fornire indicazioni utili in caso di situazioni anomale, ovvero in termini di risposta ad inquinanti non inizialmente monitorati, con l'effettiva possibilità di un immediato aggiornamento delle banche dati e la conseguente operazione di inclusione nelle successive fasi di addestramento [4].

Dopo quasi due anni di sperimentazione presso un laboratorio di controllo qualità utilizzato come pilota, i positivi risultati ottenuti hanno convinto l'azienda a dotarsi di altri strumenti analoghi, che recentemente sono entrati in servizio per garantire la sicurezza d'uso dei materiali e il rispetto dei limiti indicati negli standard in modo capillare e sistematico.

Esempio di riconoscimento di campioni incogniti per materiale accoppiato polipropilene+polipropilene metallizzato

SOLVENTE	RICONOSCIMENTO INCOGNITI	
	FIALA 1	FIALA 2
ACETONE	Cattivo	Cattivo
DOWANOL	Cattivo	Cattivo
ETOSSIPROPANOLO	Cattivo	Cattivo
ACETATO DI ISO-PROPILE	Cattivo	Cattivo
METACRILATO DI ISO-BUTILE	Cattivo	Cattivo
ACRILATO DI n-BUTILE	Cattivo	Cattivo
XILENE	Cattivo	Cattivo
METILISOBUTILCHETONE	Cattivo	Cattivo
ETOSSIPROPILACETATO	Cattivo	Cattivo
OTTANO	Cattivo	Cattivo
PIRIDINA	Cattivo	Cattivo
ACETALE	Buono 100%	Buono 100%



### Riferimenti bibliografici

- [1] Suman, M.; Ricci, C.; Dalcanale, E.; Sensi L.; Bersellini U., *Italia Imballaggio* 2002, Vol-4, pp. 195-206.
- [2] UNI – Metodo Ufficiale U59.0B.162.0
- [3] UNI – Normativa 10192
- [4] Ricci, C.; Bersellini U.; Dalcanale, E. *Italia Imballaggio* 2003, Vol-3, pp. 283-288.

**COMPARISON OF PREPARATION TECHNIQUES FOR THE ANALYSIS OF  
SULFUR COMPOUNDS IN BEVERAGES USING A PULSED FLAME  
PHOTOMETRIC DETECTOR**

*Michael L. Duffy*<sup>(1)</sup>, *Laura Chambers*<sup>(1)</sup> and *Gigi Cobelli*<sup>(2)</sup>

<sup>(1)</sup> *OI Analytical, PO Box 9010, College Station, TX 77842, U.S.A.; www.oico.com*

<sup>(2)</sup> *SRA Instruments Italia S.r.l., Viale Assunta 101, 20063 Cernusco sul Naviglio (MI), ITALY; www.srainstruments.com*

Very low concentrations of sulfur compounds can greatly affect the flavours and fragrances of beverages. The offending sulfur compounds can be native in the starting materials as in some alcoholic beverages, can be introduced with the CO<sub>2</sub> as in carbonated beverages, or can even migrate into the beverage from the packaging materials or storage containers.

Analysis of the sulfur compounds in beverages is typically done by GC methodology. Some of the common sample introduction techniques include direct injection, extraction followed by direct injection, static headspace, dynamic headspace, solid phase micro extraction (SPME), and the new stir bar sorptive extraction (SBSE) technique, or Twister™, recently introduced by Gerstel.

Some of the common detectors used for selective sulfur analysis are FPD, PFPD (pulsed flame photometric detector), SCD, AED, MS, and tandem configurations (GC/MS/PFPD).

The PFPD has advantages over the other sulfur-selective detectors because provide increased sensitivity, equimolar sulfur response and reduced gas consumption.

This paper demonstrates the use the PFPD with two different sample preparation techniques – static headspace and Twister– for detection of sulfur compounds in beverages.

Data showing the sensitivity level reached and the investigation of the combined PFPD/MS detector configuration will be presented together with a detailed instrumental description.



**USING THE GPC AUTOPREP 2000 SYSTEM FOR CLEANUP OF OLIVE OIL  
PRIOR TO PESTICIDE ANALYSIS BY GC/XSD OR GC/PFPD**

*Michael Halvorson, Ph.D.*<sup>(1)</sup>, *Laura Chambers*<sup>(1)</sup>, *Michael L. Duffy*<sup>(1)</sup> and  
*Fabrizio Ghisolfi*<sup>(2)</sup>

<sup>(1)</sup> *OI Analytical, PO Box 9010, College Station, TX 77842, U.S.A.; [www.oico.com](http://www.oico.com)*

<sup>(2)</sup> *SRA Instruments Italia S.r.l., Viale Assunta 101, 20063 Cernusco sul Naviglio (MI), ITALY; [www.srainstruments.com](http://www.srainstruments.com)*

Gel Permeation Chromatography (GPC) using polystyrene divinylbenzene beads is widely employed for removing higher molecular weight co-extractives from food and environmental matrices prior to gas chromatography (GC), GC/mass spectrometry (MS), or high-performance liquid chromatography (HPLC) analysis for pesticides and other environmental contaminants.

The OI Analytical GPC AutoPrep 2000 totally automates separation of interfering co-extractives from target analytes. This system uses an autosampler for injecting sample extracts and collecting cleaned fractions into a variety of sample collection vessels.

This study evaluates GPC AutoPrep 2000 system performance for the cleanup of olive oil prior to analyzing for pesticides. Methylene chloride:hexane (50:50 v/v) extracted pesticides from olive oil. This solvent mixture was also used as the mobile phase during the GPC cleanup procedure. After GPC cleanup, a Labconco RapidVap® N2 Evaporation System (Figure 2) evaporated sample extracts to dryness. The samples were reconstituted in appropriate solvent for analysis. Sample analysis used a GC with a halogen-specific detector (XSD™) for chlorinated pesticides and a pulsed Flame photometric detector (PFPD) for the phosphorus- and sulfur-containing pesticides. Recoveries for several pesticides were determined.

**OXIDATIVE STATUS OF EXTRA VIRGIN OLIVE OILS.  
HPLC EVALUATION**

*P. Rovellini and N. Cortesi*

*Stazione Sperimentale per le Industrie degli Oli e dei Grassi*

*Via Giuseppe Colombo 79, 20133 Milano, Italy*

*Corresponding author: Tel. +39 02 706497.1, Fax: +39 02 2363953;*

*E-mail: [rovellini@ssog.it](mailto:rovellini@ssog.it) [www.ssog.it](http://www.ssog.it)*

A new high performance liquid chromatographic method (HPLC/DAD technique) has been developed for the quantitative evaluation of the principal oxidized fatty acids present in extra virgin olive oil. The proposed method gives a complete picture of the oxidative status and deterioration of fatty acids (present in triacylglycerols) during storage. The main advantage of this method is that it can detect and quantify the various forms of the oxidized primary and secondary fatty acids (hydroperoxy, hydroxy, keto, epoxy, epidioxy compounds) in a single analysis.

Hundreds of extra-virgin olive oils were analysed and the results were used to compile an extensive data-base of the oxidized fatty acid contents of the oils. Most newly-produced extra-virgin olive oils had a total oxidized fatty acid content of < 2%; most of the expired oils had percentages > 4%.

The method developed provides a more extensive assessment of the oxidative status of virgin olive oil than the POV or DeltaK tests. It only measures esterified oxidized fatty acids. By using this quick method, qualitative and quantitative information about primary (hydroperoxides) and secondary oxidized compounds (hydroxy, keto, epoxy, epidioxy compounds) can be obtained in a single analysis.

It can be applied to study evolution of fatty acid oxidation during different technological processes and storage conditions in olive oils of different commercial classes.

It can discriminate between high and low quality extra-virgin olive oils, and can be used to determine how long the oil has been stored.

This method can be used to monitor auto-oxidation and photo-oxidation processes, and to predict the stability of a lipid matrix. It is suitable for use at an industrial level for routine analyses.

## **SVILUPPO DI UN SISTEMA UNICO DI ESTRAZIONE E PURIFICAZIONE “ASE-FLORISIL” PER LA DETERMINAZIONE DI PCB IN MANGIMI PER PESCI.**

*G. Chessa, G. Ledda, A. Leonardi e G. Calaresu*

*IZS- Sardegna , Dipartimento Igiene degli Allevamenti e delle Produzioni, via Duca degli Abruzzi, 8 – 07100 Sassari*

Più del 90% dell'esposizione umana alla diossina e ai PCB deriva dagli alimenti. L'esposizione può essere altamente variabile a seconda dell'origine dell'alimento. Gli alimenti di origine animale contribuiscono per l'80% all'esposizione complessiva.. Carne, uova, latte e pesci d'acquacoltura possono presentare elevate livelli di PCB e diossine principalmente derivanti dalla contaminazione presente nei mangimi. A questo proposito, la direttiva del consiglio 1999/29/EC del 22 aprile 1999 sulle sostanze indesiderabili e prodotti nella nutrizione degli animali prevede che le materie prime per alimenti animali ed i mangimi non possono essere considerati di qualità “sana, genuina e mercantile” se il livello di diossine e PCB risulta alto ed in grado quindi di costituire un rischio inaccettabile per la salute dell'uomo e degli animali. Un importante lavoro del Comitato Scientifico sulla Nutrizione Animale (SCAN), riferito alla contaminazione da diossine e PCB negli alimenti per animali, è arrivato alla conclusione che le materie prime maggiormente contaminate sono l'olio di pesce e la farina di pesce.

Ciò ha determinato negli ultimi anni la necessità di sviluppare nuovi metodi d'analisi capaci di rilevare anche minime quantità di tali contaminanti, in linea con le più severe normative europee.

Le procedure analitiche più comuni per la determinazione dei PCB e composti diossino-simili in queste matrici sono piuttosto lunghe e laboriose, e sono facilmente suscettibili di errore da parte dell'operatore. Richiedono la completa estrazione della componente lipidica dei campioni e la successiva purificazione dell'estratto. Tali contaminanti sono infatti liposolubili e si concentrano nei grassi, rendendo così più difficoltose le procedure d'analisi.

Da quanto esposto emerge, quindi, la necessità di disporre di un metodo di analisi rapido e semplice ma al tempo stesso accurato e sensibile per l'identificazione e la quantificazione dei PCB negli alimenti.

In questo lavoro è stato sviluppato un metodo rapido e affidabile per l'analisi dei PCB in mangimi per pesci d'acquacoltura mediante una procedura accoppiata di estrazione e purificazione ASE/Florisil, seguita quindi da conferma strumentale attraverso GC-ECD o GC-MS.

L'ASE® (*Accelerated Solvent Extraction*) è una tecnica d'estrazione con solventi di composti organici da matrici complesse; offre enormi potenzialità e prevede l'utilizzo dei tradizionali solventi liquidi a temperature e pressioni elevate permettendo così estrazioni rapide e sicure con un minimo volume di solvente utilizzato.

Si è pensato quindi di mettere insieme le caratteristiche dell'ASE con quelle di un materiale adsorbente largamente utilizzato per l'analisi dei PCB: il Florisil. Tale adsorbente infatti è impiegato in campo analitico per la sua notevole capacità di trattenere i grassi, ma il suo utilizzo in colonna cromatografica richiede normalmente tempi molto lunghi.

La scelta di accoppiare una tecnica estrattiva estremamente veloce e affidabile come l'ASE con un materiale adsorbente dalle ottime caratteristiche quale è il Florisil ha dato degli ottimi risultati.

In un unico stadio si realizzano sia l'estrazione che la purificazione. Il campione, posto nella parte superiore della cella ASE, viene estratto della sua componente lipidica e successivamente, sotto l'azione delle alte pressioni esercitate, corre attraverso il Florisil.

Si ottiene così un estratto privo di grassi, pronto all'analisi gascromatografica senza la necessità di ulteriori passaggi. L'ASE svolge la sua funzione di estrazione rapida ed affidabile mentre il Florisil permette una efficiente purificazione dell'estratto.

I tempi d'analisi sono notevolmente ridotti (circa 30 minuti), molto inferiori ai metodi classici. Il sistema è interamente automatizzato e ciò consente di ottenere dati con una buona riproducibilità.

Da sottolineare infine il bassissimo consumo di solvente con l'indubbio vantaggio di un notevole risparmio economico.

**COMUNICAZIONI POSTER**

**CHIMICA ANALITICA E SCIENZE FORENSI**

## L'ANALISI MULTIVARIATA NELLA CLASSIFICAZIONE DI LUBRIFICANTI PER ARMI

*Giovanni Mori, Marco Giannetto*

*Dipartimento di Chimica Generale ed Inorganica, Chimica Analitica, Chimica Fisica.  
Università di Parma. Parco Area delle Scienze 17/A I-43100 Parma*

In letteratura sono riportati numerosi studi riguardanti l'elaborazione chemiometrica di dati spettrofotometrici, finalizzata alla discriminazione tra diverse tipologia di polimeri, grassi vegetali o animali etc. [1,2]. A tal scopo, l'analisi delle componenti principali o l'analisi delle funzioni discriminanti, si rivelano molto utili non solo per la discriminazione tra campioni molto numerosi, ma soprattutto al fine di individuare la variabili spettroscopiche che caratterizzano e differenziano tra loro i diversi campioni di composizione molto simile.

Tale approccio chemiometrico è particolarmente utile quando una comparazione immediata tra gli spettri di diversi campioni, accomunati dall'appartenenza alla stessa classe, risulta pressoché impossibile.

E' stato condotto uno studio finalizzato alla identificazione di lubrificanti estratti da armi da fuoco, tramite confronto con una serie di spettri FT-IR di lubrificanti per armi commercialmente disponibili. Le formulazioni di tali prodotti, costituiti prevalentemente da idrocarburi saturi, rendono impossibile la loro identificazione immediata da una valutazione oggettiva degli spettri FT-IR, in cui si osservano principalmente bande di assorbimento comuni a tutte le formulazioni, come gli stretching del legame C-H (a circa  $3000\text{ cm}^{-1}$ ), ed i corrispondenti assorbimenti relativi ai moti di bending (tra  $1350$  e  $1500\text{ cm}^{-1}$ ).

Informazioni più specifiche possono essere tratte dall'intervallo spettrale del fingerprint tra  $400$  e  $1000\text{ cm}^{-1}$ . Le assorbanze registrate in questo intervallo sono state normalizzate ed utilizzate come variabili per l'analisi delle componenti principali e per l'analisi delle funzioni discriminanti, che hanno consentito di individuare le caratteristiche spettrali di 10 marche di lubrificanti per armi.

Il metodo può rivelarsi molto utile per scopi forensi, per associare lubrificanti di armi rinvenute a lubrificanti eventualmente repertati nell'ambito delle indagini.

Proprio per questo scopo è stato anche valutato l'effetto, sullo spettro IR, dei vapori di cianacrilato cui l'arma potrebbe essere esposta in una prima fase delle indagini, in cui su di essa si ricercano impronte digitali.

### **Riferimenti**

- [1] M.J. Adams, *Chemometrics in Analytical Spectroscopy*, The Royal Society of Chemistry, 1995.
- [2] B.S. Everitt, G. Dunn, *Applied Multivariate Data Analysis*, Edward Arnold Ed.,1991.

**ESALTAZIONE CHIMICA DI IMPRONTE DIGITALI LATENTI SU  
SUPERFICI METALLICHE**

*Eva Regolini<sup>a</sup>, Aldo Mattei<sup>b</sup>, Luciano Garofano<sup>b</sup>, Giovanni Mori<sup>a</sup>*

*<sup>a</sup>Dipartimento di Chimica Generale ed Inorganica, Chimica Analitica, Chimica Fisica, Università di Parma, Parco Area delle Scienze 17/A 43100 Parma*

*<sup>b</sup>Raggruppamento Carabinieri Investigazioni Scientifiche, Reparto di Parma, Via Parco Ducale 3, 43100 Parma*

Una tecnica diffusa per l'evidenziazione di frammenti papillari presenti su armi e cartucce, si basa su una reazione di ossido-riduzione che interessa la superficie metallica della cartuccia [1]. La tecnica sfrutta le differenti proprietà conduttrici esistenti tra la superficie ricoperta dalla componente grassa che forma le creste dell'impronta, rispetto alla superficie metallica scoperta che invece corrisponde ai solchi : le soluzioni utilizzate per l'evidenziazione reagiscono con la porzione metallica della superficie non protetta dall'impronta e lasciano inalterata l'area sottostante le creste, che non subisce alcun tipo di modificazione. Come risultato dell'evidenziazione, si ottiene un'immagine negativa dell'impronta con le valli rappresentate da linee di colore scuro che contrastano con le creste, che mantengono il colore chiaro della superficie metallica.

Tuttora problematica, però, rimane l'esaltazione di contatti papillari su cartucce sparate e sulle relative armi, nonostante le numerose tecniche riportate in letteratura. La difficoltà di tali rilevamenti è data dalle elevate temperature raggiunta da questi reperti durante lo sparo, che distruggono l'impronta o ne alterano profondamente le caratteristiche chimiche.

Il lavoro è consistito nella ricerca dei metodi che riunissero sufficienti caratteristiche di affidabilità e garantissero una evidenziazione efficace e nella successiva verifica sperimentale della validità degli stessi.

A tal fine, si sono ricercate le condizioni migliori di applicabilità delle varie metodiche [2,3], in modo da ottenere, per ciascuna di esse le procedure ottimali, sia per quanto riguarda la preparazione delle soluzioni di lavoro, sia relativamente alle condizioni operative.

Le tecniche impiegate prevedono l'utilizzo di sali d'argento in soluzione sia basica che acida, la deposizione di palladio metallico e l'impiego di sali di rame in soluzione di acido selenico (gun-blue), per la reazione di ossido-riduzione necessaria all'esaltazione.

Sono stati effettuati esperimenti su cartucce con impronte fresche depositate in giornata, su cartucce con impronte lasciate invecchiare 15 e 30 giorni e su bossoli esplosi.

Le superfici metalliche che sono state analizzate riguardano due differenti leghe: l'ottone e l'ergal.

Ci si è occupati di questo tipo di superfici in quanto la maggior parte dei reperti rinvenuti, nel caso di bossoli e cartucce è costituita da ottone, mentre l'ergal è uno fra i componenti più utilizzati nella produzione di armi, che presenta maggiori difficoltà di evidenziazione con le metodiche tradizionali.

Tutte le metodiche esaminate sono in grado di esaltare un contatto papillare di origine sebacea; è stato possibile rilevare anche impronte digitali di origine eccrina con la tecnica che si basa sull'immersione in soluzione acida di argento nitrate.

Analizzando i risultati ottenuti per impronte fresche in comparazione con gli esiti raggiunti per impronte datate, è possibile affermare che l'età dell'impronta non influisce in maniera rilevante sull'esaltazione realizzata con reazioni ossido-riduttive (almeno entro i trenta giorni).

Anzi, in particolari casi, come durante il trattamento con soluzioni basiche di argento nitrate su cartucce lasciate invecchiare un mese, si sono notati dei miglioramenti nella definizione dell'immagine del contatto papillare.

Senza dubbio, il metodo che si basa sull'evidenziazione dell'impronta digitale per immersione in soluzione di gun-blue è risultato essere il più vantaggioso per diverse ragioni, tra cui: 1) la facilità per l'operatore di controllare la reazione di evidenziazione, 2) il grado di dettaglio dell'immagine ottenuta è sicuramente maggiore rispetto alle diverse metodologie considerate, 3) il basso costo della tecnica utilizzata.

Un dato di assoluto rilievo che è emerso dalla sperimentazione effettuata e che pone le basi per un futuro sviluppo, è che fin dalle prime prove effettuate, si è dimostrato che con questo metodo l'impronta può essere rilevata anche dopo l'esplosione del colpo, anche se innegabilmente, l'immagine del contatto può risultare danneggiata.

Gli esiti di questo lavoro consentono comunque di poter affermare che, a seguito di un'azione criminosa perpetrata con armi da fuoco, il bossolo esplosivo può divenire elemento determinante nell'identificazione personale dell'autore del delitto.

### **Riferimenti**

- [1] A.A. Cantu, D.A. Leben, R. Ramotowski, J.R. Simms, *J. Forensic Sci* 43 (1998) 249.
- [2] Y. Migron, G. Hocherman, E. Sprinter, J. Almog, D. Mandler, *J. Forensic Sci* 43 (1998) 543.
- [3] C. Bersellini, L. Garofano, M. Giannetto, F. Lusardi, G. Mori, *J. Forensic Sci* 46 (2001) 871.



## NUOVE METODOLOGIE ANALITICHE PER LA DETERMINAZIONE DEI RESIDUI ORGANICI DELLO SPARO (O-GSRs)

*D. Anceschi,<sup>a</sup> M. Careri,<sup>a</sup> G. Mori,<sup>a</sup> A. Gregori,<sup>b</sup> L. Garofano<sup>b</sup>*

<sup>a</sup> *Dipartimento di Chimica Generale ed Inorganica, Chimica Analitica, Chimica Fisica, Università degli Studi di Parma, Parco Area delle Scienze 17/A, 43100 Parma*

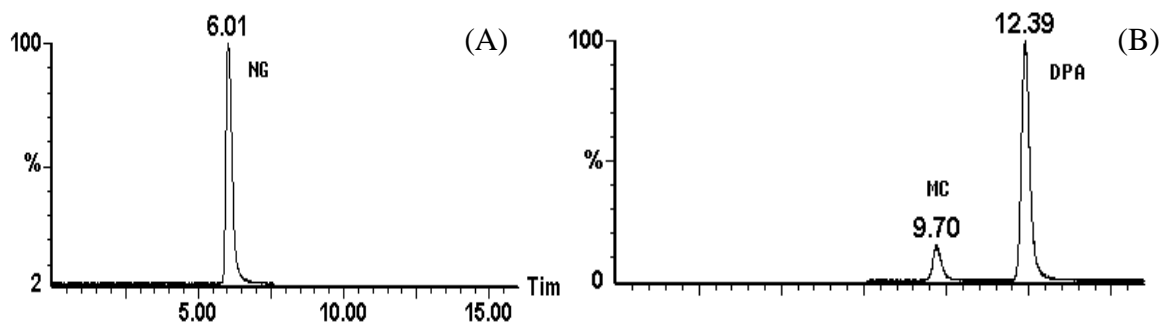
<sup>b</sup> *Raggruppamento Carabinieri Investigazioni Scientifiche, Reparto di Parma, Via Parco Ducale 3, 43100 Parma*

In ambito forense, la caratterizzazione dei prodotti derivanti dalla esplosione di colpi d'arma da fuoco si basa generalmente sull'analisi mediante SEM-EDX della componente inorganica proveniente dall'innesco della capsula.

Lo scopo di questo lavoro è lo sviluppo di un metodo complementare al primo, basato sull'impiego della tecnica LC-ESI-MS/MS con triplo quadrupolo (QqQ), per la ricerca di residui organici incombusti della carica di lancio, essenzialmente costituiti da nitroglicerina (NG), metil centralite (MC) e difenilammina (DPA).

La sperimentazione, del tutto preliminare, ha preso in considerazione l'analisi di campioni prelevati dalle mani di soggetti che hanno sparato con una pistola Beretta mod. 85 F, cal. 9x17mm, armata con munizionamento del tipo 9x17mm FMJ RN (Fiocchi), valutando anche l'influenza delle variabili tempo (trascorso tra lo sparo e il prelievo) e numero di spari. I prelievi sono stati eseguiti utilizzando una garza di cotone imbevuta di etanolo, solvente nel quale è nota la stabilità della nitroglicerina.

Mediante LC di ripartizione in fase inversa e rivelazione ESI di ioni negativi (ESI(-)) per NG e di ioni positivi per MC e DPA (ESI(+)), è stata ottenuta una buona separazione cromatografica degli analiti con tempi di analisi inferiori ai 13 minuti.



Separazione di O-GSRs (10 µg/l). Tecnica LC-QqQ-MS/MS. (A): ESI (-); (B): ESI (+)

L'abbinamento della separazione cromatografica alla rivelazione in spettrometria di massa tandem con sorgente ESI ed acquisizione del segnale in selected-reaction-monitoring, con monitoraggio di almeno due transizioni per composto, si è dimostrata promettente nel fornire una determinazione selettiva di O-GSRs. In particolare, il metodo sviluppato ha consentito di rilevare DPA sulle mani, anche a distanza di quattro ore dall'esplosione di due colpi.

I risultati delle analisi hanno evidenziato che il numero di colpi sparati ed il tempo intercorso tra gli spari ed il prelievo hanno una notevole influenza sulla quantità di residui organici rilevabili. E' stata inoltre osservata una notevole variabilità per quanto concerne la capacità dell'epidermide di trattenere i residui incombusti.

## IDENTIFICAZIONE DI UNA INCONSUETA SOSTANZA DA TAGLIO IN CAMPIONI DI METAMFETAMINA

*Serena Detti\**, *Egidio Lumaca\**, *Cristiana Melchioni\**, *Salvatore Pani\**, *Leonardo Nuccetelli#*,  
*Morela Strano#*

*Direzione Centrale Polizia Criminale – Servizio Polizia Scientifica - \*Sezione Indagini sulle  
Droghe d'Abuso e #Sezione Indagini Inorganiche e Documentali - viale dell'Aeronautica 7,  
00144 ROMA*

La metamfetamina<sup>1</sup> (metilamfetamina, N,α–dimetilfenilettilammina, C<sub>10</sub>H<sub>15</sub>N) droga d'abuso<sup>2</sup> psicostimolante, è usualmente sequestrata sul mercato clandestino come cloridrato pressoché puro, in polvere microcristallina o, prevalentemente, in forma di grossi cristalli incolori il cui nome in gergo è *ice*, *shaboo*, *crystal meth* (figura 1).

La determinazione qualitativa e quantitativa della metamfetamina, oggetto di sequestro da parte dei reparti di polizia operanti sul territorio nazionale, viene effettuata avvalendosi delle tecniche gascromatografiche (GC-FID e GC-MS).<sup>1</sup>

Recentemente, presso la Sezione Indagini sulle Droghe d'Abuso del Servizio Polizia Scientifica di Roma, sono stati analizzati dei campioni di metamfetamina aventi valori di purezza percentuale variabili dallo 80% fino a valori inferiori allo 1%.

La metamfetamina, che fino ad oggi era venduta sul mercato illecito come prodotto puro, è ora venduta anche con l'aggiunta di sostanze diluenti.<sup>3</sup>

Usualmente, le sostanze da taglio rinvenute nelle sostanze stupefacenti, sono di natura organica.

Nel caso in esame, è stato necessario utilizzare la cromatografia a scambio ionico e analisi strutturali, quali la microscopia elettronica a scansione (SEM) e la microanalisi ai raggi X (EDX), per determinare una inusuale sostanza da taglio di tipo inorganico: il solfato doppio di potassio e alluminio dodecaidrato KAl(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>·12H<sub>2</sub>O o allume di rocca (figura 2).<sup>4</sup>



Figura 1: cristalli di Shaboo,  
metamfetamina cloridrato



Figura 2: cristalli di KAl(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>·12H<sub>2</sub>O  
(allume)

La scelta del solfato di potassio e alluminio sembra dettata dalla somiglianza morfologica di questo sale con la metamfetamina.

In effetti, dei 27 campioni sequestrati, 17 sono risultati contenere metamfetamina cloridrato pura (MA·HCl, 70-80%, espressa come base), mentre 10 campioni, aventi contenuto di MA·HCl variabile dal 55% fino a valori inferiori allo 1%, contenevano anche allume di potassio.

**Riferimenti**

- [1] A.C. Moffat, *Clarke's Isolation and Identification of Drugs*, II ed. The Pharmaceutical Press, 1986, pag. 763.
- [2] Tabella I del D.P.R. 309 del 9 ottobre 1990.
- [3] Sezione Indagini sulle Droghe d'Abuso, Servizio Polizia Scientifica di Roma, *Microgram Bulletin*, vol. **36** (12), 2003, pag. 277, "Methamphetamine cut with Alum in Rome and Florence, Italy".
- [4] G. Heigenmann, I. Ubaldini, *Nuovo Dizionario di Merceologia Applicata*, U. Hoepli Ed. 1973, vol **1**, pag 326.

## DISCRIMINAZIONE DI FIBRE MEDIANTE SPETTROSCOPIA UV-VIS E FTIR

A. Gregori<sup>1</sup>, L. Bosio<sup>1</sup>, G. Ciotola<sup>1</sup>, R. Sorbi<sup>2</sup>, E. Campioli<sup>1</sup>, L. Garofano<sup>1</sup>

(1) Raggruppamento Carabinieri Investigazioni Scientifiche, Parma

(2) Università di Parma, Dipartimento di Fisica

[risprchimica@carabinieri.it](mailto:risprchimica@carabinieri.it)

Le fibre interpretano un ruolo particolarmente importante nelle scienze forensi: durante un delitto, il trasferimento di fibre tessili a seguito del contatto tra criminale e vittima è un evento altamente probabile, per cui, nell'ambito di un'indagine, queste possono rappresentare prove di notevole importanza. La ricerca delle fibre target è affidata ad un sistema di ricerca automatizzata, il Fibre Finder (Qfifi Leica) che, basandosi sull'acquisizione del colore dei target mediante il sistema HSI (Tono, Saturazione, Intensità) è in grado di riconoscere, negli strip da analizzare, le fibre che presentano i parametri di colore da rilevare. Si tratta, quindi, di un metodo oggettivo di misura che velocizza notevolmente le operazioni di ricerca. Lo scopo di questo lavoro è quello di determinare il settaggio migliore dello strumento, ovvero i parametri di HSI, temperatura della lampada e la finestra dei filtri video che, in relazione al colore, tipo e spessore della fibra, ottimizzano la misura e permettono la discriminazione di colori di tonalità simile, riducendo al minimo il rischio di falsi positivi e/o falsi negativi. Essendo un sistema di ricerca basato sul colore risulta indispensabile una corretta definizione del target: in primo luogo il nastro adesivo utilizzato per lo strip deve essere uguale a quello del target; secondariamente la preparazione del target deve essere fatta in modo tale che le fibre non si sovrappongano per non avere zone di ombra che potrebbero falsare i valori di acquisizione; in terzo luogo, occorre definire la temperatura della lampada, i limiti superiore e inferiore dei filtri video e i margini di tolleranza sui valori di HSI.

Infine le fibre trovate devono essere sottoposte ad una verifica più approfondita che consiste nell'analisi spettrofotometrica per la determinazione dello spettro di assorbimento, del punto colore e, mediante microspettroscopia FTIR, dei loro componenti.

## INDICE DEGLI AUTORI

Abelmoschi M.L. ....	157	Arena G. ....	215
Abete M.C. ....	332	Arnoldi A. ....	257; 336
Abollino O. ....	110; 165	Aruga R. ....	125
Aceto M. ....	57; 110	Atzei D. ....	26; 30; 97
Adami G. ....	94; 227; 307	Avino P. ....	294
Addari D. ....	26		
Agas D. ....	344	Bacaloni A. ....	270
Agostino A. ....	57	Badea M. ....	44; 185
Ahonen H.J. ....	225	Baggiani C. ....	68; 229
Aigotti R. ....	91; 252; 255	Bagni G. ....	152; 218
Alarcón S. ....	16	Baiocchi C. ....	91; 249; 252; 255; 261
Alberti G. ....	38; 64	Bandiera N. ....	46
Aldini R. ....	211	Baraldi P. ....	55; 162
Alfieri E. ....	183	Baravalle P. ....	68; 229
Amendola L. ....	247	Baravelli V. ....	318
Amici M. ....	339	Barbante C. ....	109
Amine A. ....	185; 186; 190	Barbera S. ....	268
Ammida N.G.H. ....	217	Barberis R. ....	110
Amorello D. ....	282	Barbieri A. ....	244
Amoroso V. ....	297	Barbieri P. ....	94; 227; 307
Anceschi D. ....	366	Barchi D. ....	50
Andreoli R. ....	243	Bassi E. ....	329; 331
Andriollo N. ....	95	Baussant T. ....	152
Anfossi L. ....	18; 188; 196; 341	Becagli S. ....	143
Angeletti R. ....	246	Bellandi S. ....	143
Angelotti T. ....	250	Bellanti F. ....	297
Angioi S. ....	7; 114; 253	Bellantoni D. ....	169
Annibaldi A. ....	15; 300	Bello C. ....	69
Antonelli M.L. ....	272	Bellucci L.G. ....	305
Antonilli M. ....	323	Benassai S. ....	143
Aquili S. ....	344	Benetti C. ....	246
Arduini F. ....	190	Benincasa M.-A. ....	237; 239

Bergamaschi E. ....	243	Bro R. ....	277
Bergero S. ....	334	Brongo A. ....	144
Berrettoni M. ....	80	Brunetti B. ....	171; 173
Bersellini U. ....	355	Brunori C. ....	138
Bertelli D. ....	275	Bruzzoniti M.C. ....	160
Besia G. ....	44	Bucci R. ....	290
Bevilacqua L. ....	69	Bufo S.A. ....	87
Biagiotti V. ....	185	Buonfigli A. ....	284
Bianchi F. ....	71; 279; 345	Burgio M. ....	185
Bianco G. ....	250	Buzzi M. ....	73
Bianco Prevot A. ....	142		
Biancotto G. ....	246	Cafaro C. ....	247
Bicchiega M. ....	331	Cagnasso P. ....	44; 328; 329; 331
Bidolli G. ....	259	Cairns W. ....	109; 312
Biesuz R. ....	38; 64	Caivano C. ....	219
Blo G. ....	241; 299	Calabretta E. ....	339
Bobba M. ....	126	Calace N. ....	112
Boccaleri E. ....	57	Calaresu G. ....	360
Bodecchi L.M. ....	201	Calbiani F. ....	9; 264
Bombi G.G. ....	4; 292	Calvo Quintana J. ....	186
Bonaduce I. ....	59	Calza P. ....	249
Bonanni A. ....	169; 193	Càmara C. ....	316
Bondioli F. ....	162	Campana G. ....	209
Bonicolini F. ....	331	Campanella L. ....	107; 137; 169; 192; 193; 295; 296; 297; 322
Bonini M. ....	351; 353	Candigliota T. ....	44
Bontempelli G. ....	13; 167	Capodaglio G. ....	109; 140; 312; 314
Borghetti A. ....	61	Cappiello A. ....	5
Bortoli A. ....	316	Carbonara T. ....	89
Borzetti F. ....	295	Caredda A. ....	291
Bosco D. ....	301	Careri M. ....	9; 71; 264; 266; 279; 345; 366
Bottari E. ....	284	Carlucci G. ....	205; 298
Bourais I. ....	190	Carlucci R. ....	298
Boutron C. ....	109	Carpani I. ....	80
Branca P. ....	261		

Carpino F. ....	239	Compagnone D. ....	16; 77; 203; 221
Cartoni G. ....	237	Conato C. ....	241; 299
Caruso M. ....	250	Contado C. ....	194; 241; 299
Casale A. ....	232	Conte R. ....	73
Caschera D. ....	181	Conti P. ....	80
Casella I.G. ....	53; 170	Contursi M. ....	53; 170
Casolari S. ....	20; 73; 230; 236	Corami F. ....	314
Castelli M. ....	296	Corbellini M. ....	128
Cataldi T.R.I. ....	51; 87; 234; 250; 338	Corradi M. ....	61
Catinella S. ....	135	Corradini C. ....	71; 347; 349
Cattaneo R. ....	171; 173	Corradini D. ....	69
Cattarin S. ....	28	Cortesi N. ....	359
Cavaliere C. ....	268	Cozzi F. ....	94
Cavazzini A. ....	75	Cozzi G. ....	109
Cavazzini D. ....	266	Cozzi S. ....	307
Ceccarini A. ....	144; 299	Crea F. ....	232; 285
Ceci E. ....	101	Crea P. ....	285
Centonze D. ....	120	Credaro A. ....	62
Cerri O. ....	178	Crisponi G. ....	291
Cescon P. ....	109; 140; 305; 312; 314	Curini R. ....	48; 344
Chambers L. ....	357; 358	Curulli A. ....	181
Checchini L. ....	116		
Chessa G. ....	360	D'Agata R. ....	215
Chiavarini S. ....	138	D'Agostino G. ....	38
Chiavaro E. ....	349	D'Ascenzo G. ....	103; 344
Cicero A.M. ....	339	Dainese N. ....	246
Cinelli G. ....	309	Dalcanale E. ....	355
Cinosi A. ....	95	Danet A. ....	206
Cioffi N. ....	230	David S. ....	262
Ciriello R. ....	219	De Bari M.D. ....	89
Cobelli G. ....	357	De Gregorio M. ....	77
Cocchi M. ....	118; 128; 201; 277; 324	De Robertis A. ....	232; 285
Colombini M.P. ....	35; 36; 46; 59	De Stefano C. ....	288
Coluccia S.J. ....	261	De Tommaso G. ....	42

Dean A. ....	292	Fabbri Daniele .....	318
Del Bubba M. ....	116	Fabbri Debora .....	142
Del Carlo M. ....	77; 203	Faberi A. ....	272
Del Giallo M.L. ....	78	Fagioli F. ....	241; 299
dell'Atti D. ....	207	Fago G. ....	272
Desimoni E. ....	171; 173	Falciola L. ....	40; 320
Detti S.....	146; 367	Famiglini G. ....	5
Di Antonio E. ....	343	Fantauzzi M. ....	30; 97
Di Lorenzo V.....	309	Farneti T.....	310
Di Marco V.B. ....	4; 292	Fattori I. ....	143
Di Monte L. ....	307	Favero G. ....	169
Di Pasquale D. ....	205	Ferlin M.G. ....	292
Di Risio F. ....	298	Fermo P. ....	320
Di Rosa F.....	122	Ferrari C. ....	109
Di Silvestro G. ....	44; 328	Ferrari G. ....	118; 201
Di Viesti M. ....	343	Ferrari S. ....	305
Dini M.G. ....	105	Ferrario F. ....	257
Diring S. ....	59	Ferroglio C. ....	18; 136; 196; 213
Ditaranto N. ....	230	Festa M.R. ....	284; 323
Dondi F.....	75; 241; 299	Fini F. ....	21
Dossi C. ....	62	Fiorucci F. ....	259
Dossi N. ....	13; 167	Foca G. ....	128; 324
Dragone R. ....	192; 295; 296	Foglia P. ....	272
Duffy M.L. ....	357; 358	Folesani G. ....	61
Durante C. ....	277	Folliero F. ....	270
		Fonti J. ....	224
El Moumni B. ....	305	Foresti M.L. ....	28
Elsener B. ....	26; 30; 97	Frache R. ....	99
Elviri L. ....	9; 264; 266	Fraioli V. ....	146
Emons H. ....	316	Francescani S. ....	144
Eremin S.A. ....	21	Franchini G.C. ....	324
Errani E. ....	351; 353	Franchini I. ....	324
Esposito M. ....	326	Frignani M. ....	305
		Fumagalli R. ....	279



Fumarola G. ....	80	Giraudi G. ....	18; 136; 188; 196; 203; 213
Fuoco R. ....	144; 299	Girotti S. ....	21; 353
Furia E. ....	287	Gobbetti M. ....	89
		Gosetti F. ....	7; 114; 253
Gabrielli P. ....	109	Grandi M. ....	277
Galanti R. ....	347	Grassi I. ....	171
Galceran M.T. ....	235	Greco L. ....	334
Gallo P. ....	326	Gregori A. ....	366
Gamba V. ....	332	Gregori E. ....	193
Gambaro A. ....	140; 305; 312; 314	Grossi R. ....	295
Gambino V. ....	282	Grotti M. ....	99
Gandolfi I. ....	44; 329; 331	Gualcito M.R. ....	223
Gangini F. ....	351	Guardigli M. ....	198
Garofano L. ....	155; 364; 366	Guascito M.R. ....	29
Gaspari V. ....	109	Guerrieri A. ....	219
Gastaldi D. ....	252; 255		
Gatta T. ....	169; 193; 322	Hakkila K. ....	73; 208
Gatti G.C. ....	46	Halvorson M. ....	358
Gennaro M.C. ....	7; 114; 253	Heimler D. ....	105
Gennuso E. ....	259	Hernandez S. ....	152; 218
Gentili A. ....	48; 103	Hong S. ....	109
Ghini S. ....	21	Hoogewerff J.A. ....	118
Ghisolfi F. ....	358		
Giacalone A. ....	288	Iammarino M. ....	120
Giacomino A. ....	110; 165	Ianni C. ....	157
Gianguzza A. ....	288	Illuminati S. ....	300
Giannarelli S. ....	144	Imbimbo B.P. ....	135
Giannetti L. ....	50	Imparato E. ....	326
Giannetto M. ....	82; 183; 363	Innocenti M. ....	28; 143; 178
Gianotti V. ....	7; 114; 253	Insogna S. ....	247
Giardina I. ....	297	Iorgulescu M. ....	221
Gili M. ....	332	Iuliano M. ....	42
Giordani E. ....	116		
Giovannoli C. ....	68; 136; 188; 213; 229	Jenkins D. ....	316

Kaciulis S. ....	181	Longo L. ....	29
Kankare J. ....	225	Losito I. ....	89; 254; 260
Karp M. ....	23	Lucarelli F. ....	78
Kaulich B. ....	94	Lucchiari M. ....	150
Kramer K. ....	316	Luchetti L. ....	298
		Lukkari J. ....	225
La Gioia C. ....	165	Lumaca E. ....	146; 367
Laganà A. ....	268; 270; 272	Luneia R. ....	46
Lagomarsino C. ....	99	Lupu A. ....	221
Lambertucci L. ....	300		
Lamperi L. ....	116	Maffini M. ....	160
Lanteri S. ....	80	Maggi A. ....	44
Larese F. ....	227	Magi E. ....	99
Larger P. ....	160	Magliulo M. ....	200
Laschi S. ....	175	Magrì A.L. ....	137
Lattanzi P. ....	97	Malagoli S. ....	46
Laviola M.C. ....	51	Malandrino M. ....	110; 165
Ledda G. ....	360	Malitesta C. ....	29; 223
Legnani P. ....	80	Manfredini M. ....	201
Lelario F. ....	87	Manghi P. ....	328; 329
Lelli R. ....	200	Mangia A. ....	9; 71; 160; 264; 279; 345
Leonardi A. ....	360	Manigrasso M. ....	294
Leoni E. ....	80	Manini P. ....	243
Lepri L. ....	116	Mannelli I. ....	224
Li H. ....	292	Mannini A. ....	143
Licchelli L. ....	347	Manodori L. ....	140
Liparota M.C. ....	33; 126	Manzini D. ....	118; 277
Lo Coco F. ....	227	Marchese S. ....	48
Lo Magro S. ....	120	Marchetti A. ....	118; 201; 277; 324
Lobinski R. ....	66	Marchetti L. ....	344
Locatelli C. ....	177	Marconi E. ....	44
Locati D. ....	257	Marengo E. ....	7; 33; 126; 130
Loglio F. ....	28	Margiotta G. ....	87
Loia D. ....	261	Mariani A. ....	180

Marini F. ....	290	Modugno F. ....	35
Marrazza G. ....	78; 218	Monaci L. ....	254
Martini E. ....	107; 322	Mondello L. ....	85
Mascini Marcello.....	77; 203	Monici M. ....	329; 331
Mascini Marco ..... 78; 79; 152; 175; 207; 218; 224		Monticelli D. ....	62
Massanisso P. ....	122	Montoya A. ....	21
Massolino C. ....	91	Moore L.R. ....	239
Mastria V. ....	82	Morabito R. ....	122; 138; 316
Materazzi G. ....	344	Morandi S. ....	257; 336
Materazzi S. ....	344	Morello M. ....	301
Mattei A. ....	364	Moret I. ....	140; 305
Matteucci F. ....	343	Moretto L.M. ....	12
Maurino V. ....	150	Moretto N.....	135
Mazzeo P. ....	205	Mori G. ....	82; 183; 363; 364; 366
Mazzoni V. ....	237	Moscone D. ....	44; 185; 186; 190
McDevitt C.A. ....	194	Mucchino C. ....	160
Medana C. ....	91; 249; 252; 255; 261	Mukherjee S. ....	194
Melai V. ....	343	Muscarella M. ....	120
Melchioni C. ....	146; 367	Musci M. ....	279; 345
Melucci D. ....	20; 73; 230; 235	Mussini P. ....	40; 320
Menna E. ....	236	Mussini T. ....	40
Menna V. ....	351	Mutinelli F. ....	246
Mentasti E. ....	110; 165	Mutti A. ....	61; 243; 262
Mercader J.V. ....	21	Napoli A. ....	290
Merlino M. ....	320	Nardiello D. ....	234; 338
Messia M.C. ....	44	Neagu D. ....	206
Messori A. ....	328; 329	Neri B. ....	50
Miccoli L. ....	51	Nicoletti I. ....	347
Micheli L. ....	44; 206; 217	Niessen W.M.A. ....	243
Michelini E. ....	23; 73; 209	Niessner R. ....	2
Minero C. ....	150	Nucetelli L. ....	367
Minunni M. ....	79; 207; 224	Nurchi V.M. ....	291
Mirasoli M. ....	20; 23; 200; 208		

Orecchio S. ....	288	Petroselli A. ....	15
Ottonello S. ....	135	Petruzzelli G. ....	303
Paccagnella F. ....	55	Pettignano A. ....	288
Pacioni D. ....	112	Peveri T. ....	135
Padeletti G. ....	181	Pezzatini G. ....	28
Pagnoni A. ....	299	Piazza R. ....	140; 305
Palchetti I. ....	175	Piazzese D. ....	288
Palermo C. ....	120	Pierri M. ....	53
Palleschi G. ....	16; 44; 181; 185; 186; 190; 206; 217; 221	Pietroletti M. ....	112
Palma P. ....	5	Pigani L. ....	178; 180; 225
Palmisano F. ....	254; 260	Pilo M. ....	180
Pandolfi G. ....	146	Pinelli C. ....	328
Panfili G. ....	44	Pinelli P. ....	105
Pani S. ....	367	Piro R. ....	246
Panigati M. ....	320	Pistarà L. ....	9; 264
Pascale M. ....	16	Piu P. ....	180
Pasini P. ....	209; 211	Pizzariello A. ....	13; 167
Pasti L. ....	75	Pizzol M. ....	183
Pastorini E. ....	268	Placentino C.M. ....	254
Pati S. ....	260	Planchon F. ....	109
Pavone L. ....	262	Plessi M. ....	275
Pazzi M. ....	91; 147; 252; 255; 261	Polati S. ....	7; 114; 253
Pedron F. ....	303	Poli D. ....	243; 262
Pelizzetti E. ....	150; 249	Poptic E. ....	239
Pellegrini I. ....	94	Portanti O. ....	200
Pepe A. ....	77	Porto R. ....	287
Pereno M. ....	301	Pozzi A. ....	62
Perret D. ....	103	Pramauro E. ....	142
Persia S. ....	112	Prato M. ....	236
Persico G. ....	146	Profumo A. ....	64
Pesavento M. ....	38; 64	Puccini P. ....	135
Petronio B.M. ....	112	Puignou L. ....	235
		Regolini E. ....	364

Reisenhofer E. ....	94; 227; 307	Sabatini L. ....	244
Reschiglian P. ....	20; 73; 230; 235; 236	Sabbadini M. ....	13
Restivo V. ....	36	Sabbatini L. ....	230
Ribechini E. ....	35	Sabbieti M.G. ....	344
Riccardi B. ....	135	Sales P. ....	341
Ricci C. ....	355	Salini M. ....	326
Ricci F. ....	73	Salluzzo A. ....	310
Ricci F. ....	190	Salomé M. ....	94
Riccio R. ....	334	Salvietti E. ....	28
Righetti P.G. ....	130	Sammartano S. ....	285; 288
Rita G. ....	322	Sammartino M.P. ....	297
Rivarò P. ....	157	Samperi R. ....	268; 270
Rizzi A. ....	135	Sandri F. ....	301
Robotti E. ....	126; 130	Sanna G. ....	180
Roda A. ....	20; 23; 73; 198; 200; 208; 209; 211; 244	Sanna P. ....	259
Roda B. ....	73; 230	Santiccioli S. ....	178
Roda E. ....	209; 211	Santucci A. ....	79
Romanelli G. ....	339	Sanz R. ....	235
Romani A. ....	105	Sarzanini C. ....	160
Romano P. ....	250	Scanu R. ....	180
Romano V. ....	282	Scarponi G. ....	15; 300
Rossi A. ....	26; 30; 97	Schirò R. ....	294
Rossi F. ....	40	Scopece P. ....	12
Rossi G.L. ....	266	Scortichini G. ....	343
Rossi V. ....	137	Secchi A. ....	82
Rovellini P. ....	359	Seeber R. ....	178; 180; 225
Roz M. ....	114	Seraglia R. ....	135
Rubino A. ....	51	Sergi M. ....	48; 103
Ruffilli R. ....	318	Serpe L. ....	326
Ruggieri F. ....	205	Serra M. ....	180
Russo M.V. ....	309	Sighinolfi S. ....	118; 277; 324
Rustioni M. ....	95	Simoni P. ....	200
		Siviero A. ....	5
		Soggia F. ....	99; 157

Spampinato S. ....	209	Turetta C. ....	314
Spano N. ....	180	Udisti R. ....	143; 178
Spiriti M.M. ....	79; 224	Ugo P. ....	12
Spoto G. ....	215	Ulrici A. ....	128; 324
Stercoli A. ....	71	Valentini F. ....	181
Strambaci B. ....	332	Valloton B. ....	158
Strano M. ....	367	Vanni A. ....	18; 188; 341
Suman M. ....	355	Varga A. ....	109
Susmel S. ....	13; 167	Vasapollo G. ....	29
Taddia M. ....	158	Vatteroni C. ....	328; 331
Tagliavini D. ....	262	Vecchio S. ....	137
Tansinda P. ....	262	Venier M. ....	227
Tantillo G.M. ....	101	Vignola G. ....	310
Tapparo A. ....	292	Vignolini P. ....	105
Tassi L. ....	128; 324	Villetti G. ....	135
Tavella S. ....	138	Vincenti M. ....	147
Tazzari P.L. ....	73	Vincenzi F. ....	299
Tentolini U. ....	103	Vinciguerra V. ....	290
Terzi F. ....	178; 225	Violante F.S. ....	244
Todini N. ....	107	Vione D. ....	150
Tomassetti M. ....	107; 137; 169; 193; 322	Virta M. ....	23; 208
Tombelli S. ....	79; 207; 224	Visco G. ....	297
Tonelli D. ....	80	Visconti A. ....	16; 77
Toniolo R. ....	13; 167	Viticoli M. ....	181
Torsi G. ....	177	Vittadini E. ....	349
Torta F. ....	266	Wei Y. ....	144
Toscano G. ....	312	Weir I. ....	316
Tosi M. ....	244	Willemsen F. ....	122
Totti S. ....	21	Williams P.S. ....	194; 239
Tozzi C. ....	68; 136; 203; 213; 229	Wolfender J.-L. ....	133
Traldi P. ....	4		
Trevisan M. ....	334		
Truzzi C. ....	15; 300		

Yokel R.A. ....	292	Zattoni A. ....	230; 235; 236
Zagnoni I. ....	9; 264; 266	Zborowski M. ....	194; 239
Zambonin P.G. ....	89; 230; 254; 260	Zerbinati G. ....	353
Zampoli M.R. ....	310	Zingales R. ....	282
Zanardi C. ....	178; 180; 225	Zoboli G. ....	46
Zangrando R. ....	140; 305	Zoccolillo L. ....	247
Zannini P. ....	55	Zucca A. ....	180







**A SIMPLE AND SENSITIVE ASSAY FOR ANALYZING RESIDUES OF  
AMINOGLYCOSIDE ANTIBIOTICS IN BOVINE MILK: HOT WATER EXTRACTION  
FOLLOWED BY LIQUID CHROMATOGRAPHY-TANDEM MASS SPECTROMETRY**

*Antonio Di Corcia, Dipartimento di Chimica, Università "La Sapienza", Piazza Aldo Moro 5, 00185 Roma, Italy. Fax: +39-06-490631. E-Mail: [antonio.dicorcia@uniroma1.it](mailto:antonio.dicorcia@uniroma1.it)*

*Sara Bogialli, Dipartimento di Chimica, Università "La Sapienza" di Roma.*

*Roberta Curini, Dipartimento di Chimica, Università "La Sapienza" di Roma.*

*Aldo Laganà, Dipartimento di Chimica, Università "La Sapienza" di Roma.*

*Monica Mele, Dipartimento di Chimica, Università "La Sapienza" di Roma.*

*Manuela Nazari, Dipartimento di Chimica, Università "La Sapienza" di Roma.*

A simple, specific and sensitive procedure for determining six largely used aminoglycoside antibiotics (AGs) in bovine whole milk is here presented. This method is based on the matrix solid-phase dispersion technique with heated water as extractant followed by Liquid Chromatography (LC)-tandem Mass Spectrometry (MS) equipped with an Electrospray ion source. Target compounds were extracted from milk by water heated at 70 °C. After acidification and filtration, 0.2 ml of the aqueous extract was injected in the LC column. MS data acquisition was performed in the multi reaction monitoring mode, selecting two (three, when possible) precursor ion > product ion transitions for each target compound. Heated water appeared to be an excellent extractant, since absolute recovery data ranged between 70% and 92%. Using aminosidine (an AGs not used in veterinary medicine) as surrogate internal standard, the accuracy of the analysis at three spike levels varied between 80 and 107% with RSDs not larger than 15%. On the basis of a signal-to-noise ratio of 10, limits of quantification were estimated to range between 3 (apramycin and dihydrostreptomycin) and 13 ppb (streptomycin). These LOQs are well below the tolerance levels set by both the European Union and the U.S.A. Food and Drug Administration. The effects of temperature, volume and flow-rate of the extractant on the analyte recovery were studied.

TRACE COPPER MONITORING IN ITALIAN "GRAPPA" BY ANODIC STRIPPING  
VOLTAMMETRY AT PLATINUM MICROELECTRODES*M. Antonietta Baldo, Salvatore Daniele**Department of Physical Chemistry, University of Venice  
S. Marta 2137, I-30123 Venice, Italy, e-mail: toni@unive.it*

According to European Community regulations for alcoholic distillates, the name "Grappa" is reserved to the spirits produced in Italy by distillation of marc of pressed grapes. The alcoholic content in these distillates may range from about 40% (v/v), for most commercially available products, up to 86%, for the row distilled spirits. Grappa products are often obtained through the traditional discontinuous distillation apparatus which still uses alembics made completely of copper, thus the distillate may have a quite high copper content that could be harmful to consumer's health. Although the EC legislation does not establish a maximum permissible copper level for the alcoholic distillates, the control of this metal ion content is fundamental both from a toxicological point of view and with regard the overall quality control of the product.

Atomic spectroscopic techniques, mainly atomic absorption spectrometry (AAS), are widely employed and recommended as standard methods for trace heavy metals analysis, including copper, in alcoholic beverages. A few applications of electrochemical techniques, based especially on anodic stripping voltammetry (ASV) at the classical hanging mercury drop electrode, have also been reported so far in the literature for the analysis of some distillates, such as sugar cane spirits, rum, cognac, whisky [1]. Although these classical procedures offer the desired sensitivity and good reproducibility also in such complex organic matrices, they suffer from some practical difficulties, as the inconvenience of handling HMDE, and are not suitable for on-line measurements during the production. Moreover, because of the high toxicity of mercury, nowadays the use of traditional mercury-based electrodes is not recommendable and severely restricted. In fact, in order to make stripping methods more popular and widely used for *in situ* trace metal monitoring in real samples, in the last few years the development and application of stripping analytical procedures based on the use of suitable "mercury-free" sensors has been greatly encouraged [2-5].

In line with this tendency, in this communication we present an investigation on the performance of platinum disk microelectrodes for rapid trace copper monitoring in Italian Grappa samples by the ASV technique. The choice of a microelectrode in stripping analysis brings, in fact, a number of well-known advantageous properties [2,3,5]; moreover, platinum microdisks, which have found so far widespread application in electroanalysis, may result a simple solid substrate of choice for copper preconcentration. For this element, in fact, relatively low negative potentials are required during the deposition step, so avoiding problems connected with the hydrogen evolution reaction. In this work, the suitability of Pt microdisks for the detection of Cu(II) ions is tested, preliminarily, in synthetic hydro-alcoholic mixtures with different ethanol content, afterwards the investigation is extended to both commercial and raw grappa samples having an alcoholic content ranging from 40 to 75% (v/v). In particular, the matrix effect on the ASV signals is examined in detail, in order to optimise the experimental stripping procedure for such alcoholic media. By applying the analytical methodology proposed here, reliable data are obtained for monitoring both the labile and total copper content in the grappa products analysed.

[1] P.J.S. Barbeira, N.R. Stradiotto, *Fresenius J. Anal. Chem.*, 361, (1998) 507-511.[2] J. Wang, *Stripping Analysis*, VCH, Deerfield Beach, (1985).[3] M.A. Baldo, S. Daniele, G.A. Mazzocchin, *Electroanalysis*, 10, (1998) 410-415.[4] J. Wang, J. Lu, S.B. Hocevar, P.A.M. Farias, *Anal. Chem.*, 72, (2000) 3218-3223.[5] M.A. Baldo, S. Daniele, *Anal. Lett.*, 37, (2004) 995-1011.

## LE AMMINE BIOATTIVE NEL VINO: DETERMINAZIONE MEDIANTE TECNICHE CROMATOGRAFICHE E DI ACCOPPIAMENTO

*E. Chiacchierini\*, A. Laganà\*\*, D. Di Corcia\*\*, G. Mele\*, D. Restuccia\*, G. Vinci\**

\*Dipartimento di Controllo e Gestione delle Merci e del loro Impatto sull'Ambiente, Università di Roma "La

Sapienza", Via del Castro Laurenziano 9 - 00161 Roma - Italia

\*\*Dipartimento di Chimica, Università di Roma "La Sapienza",

P.le Aldo Moro 5 - 00185 Roma - Italia

Le ammine bioattive sono un prodotto del metabolismo cellulare di animali, piante e batteri il che implica che sono naturalmente presenti negli alimenti. Queste comprendono le poliammine naturali e le ammine biogene. Le poliammine naturali sono dei bioregolatori per importanti funzioni cellulari, quali: sintesi proteica, crescita e proliferazione cellulare. Mentre le ammine biogene hanno origine dalla decarbossilazione degli amminoacidi ad opera dei microrganismi. Le ammine biogene si formano sia negli alimenti freschi ad opera degli enzimi batterici sia nei fermentati in seguito alle reazioni enzimatiche indotte dai microrganismi utilizzati nel processo di fermentazione. Quindi la determinazione quantitativa delle ammine bioattive negli alimenti è un indicatore del livello di contaminazione microbiologica, importante per accertare l'esistenza di rischi per la salute; infatti il consumo di alimenti contenenti elevate quantità di ammine può provocare mal di testa, nausea e palpitazioni specialmente se vengono assunte contemporaneamente con farmaci o alcool.

In letteratura sono riportati vari metodi per la determinazione di ammine bioattive negli alimenti, che prevedono due step: estrazione e determinazione quantitativa. L'estrazione delle ammine può essere effettuata mediante soluzioni acide (acido perclorico, tricloroacetico, cloridrico), o con solventi organici (metanolo). Per la determinazione quantitativa delle ammine i sistemi di rivelazione più comunemente usati sono i metodi cromatografici tra cui la cromatografia a scambio ionico, la gas cromatografia (GC) e la cromatografia liquida, accoppiate con opportuni rivelatori tra cui l'UV-visibile, spettrofluorimetro ed elettrochimico. Recentemente sono state utilizzate nuove metodiche che prevedono l'accoppiamento della cromatografia liquida con la spettrometria di massa.

Il presente lavoro riguarda la determinazione di ammine bioattive (metilamina, etilamina, triptamina,  $\beta$ -feniletilamina, putrescina, cadaverina, istamina, serotonina, tiramina, spermidina, spermina) in campioni di vino (bianco e rosso) mediante tecniche cromatografiche (HPLC-UV) e di accoppiamento (LC-MS).

Per l'analisi HPLC-UV: i campioni di vino sono acidificati ( $\text{HClO}_4$ ) e quindi derivatizzati con dansil-cloruro prima di essere iniettati al cromatografo; per l'analisi LC-MS: i campioni di vino sono acidificati (HFBA) ed iniettati direttamente. Entrambi i metodi mostrano buoni risultati di linearità, riproducibilità e precisione in relazione alle 11 ammine analizzate (9 ammine in LC-MS, in quanto la metilamina e l'etilamina sono volatili e con basso peso molecolare). I risultati ottenuti mostrano che la putrescina è la più abbondante delle ammine sia nel vino rosso che nel bianco, seguita da istamina e tiramina, le altre ammine non vengono trovate sistematicamente nei campioni.