UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE CHIMICHE

CORSO DI LAUREA IN CHIMICA

METODI DI ANALISI DI PFAS PROPOSTI NEL 2022: RICERCA BIBLIOGRAFICA

Relatore: Prof. Valerio Di Marco

Laureando: Nicolò Peruzzi

1217911

Anno Accademico 2021/2022

INDICE

1. INTRODUZIONE 1
   1.1. PFAS 1
   1.2. Tossicità 2
   1.3. Metodo di analisi attuale 2
      1.3.1. Metodo 537.1 3
      1.3.2. Metodo 533 3
      1.3.3. Concentrazione dei campioni 3
      1.3.4. Analisi 3
      1.3.5. Risultati 3
   1.4. Decontaminazione 5
   1.5. Scopo della tesi 6
2. NUOVI METODI DI ANALISI PROPOSTI NEL 2022 7
   2.1. Matrice acquosa 7
   2.2. Matrice liquida non (necessariamente) acquosa 11
   2.3. Matrice atmosferica 14
   2.4. Matrice solida 15
   2.5. Matrice biologica 16
   2.6. Matrice alimentare 18
3. SENSORI 21
4. CONCLUSIONI 25
5. BIBLIOGRAFIA 27

1. INTRODUZIONE

1.1. PFAS

La sigla PFAS (*per-* e *polyfluoroalkyl substances*) descrive una classe di sostanze antropogeniche che consistono in composti alchilici in cui il fluoro sostituisce tutti (perfluoro-) o alcuni (polifluoro-) idrogeni della catena alifatica.
Sono presenti oltre 9000 sostanze che appartengono a questa classe, elencate nella lista principale della United States Environmental Protection Agency (EPA). [1]
La produzione e l'utilizzo di queste sostanze risale al 1938 quando sono state scoperte alla DuPont, un'azienda chimica con sede a Wilmington. [2]
I PFAS sono quindi caratterizzati da porzioni di molecola con formula $-C_nF_{2n+1}$ (n>1) nelle quali è presente il legame C-F che fornisce caratteristiche chimiche uniche. [3]
Soprattutto a causa dell'elevata elettronegatività del fluoro, la più alta di tutti gli elementi, il legame C-F è considerato tra i più forti. Tuttavia, la bassa polarizzabilità del fluoro contribuisce a diminuire l'energia superficiale nella catena, portando a basse forze di coesione intermolecolare, riduzione della viscosità e alta volatilità. Inoltre, i PFAS possono contenere gruppi terminali idrofilici come acidi carbossilici, acidi solfonici, alcol, ammidi o gruppi fosfati, che donano caratteristiche di solubilità uniche ai composti, rendendoli sia idrofili che lipofili.[2]
Grazie a queste peculiarità i PFAS hanno proprietà chimiche e fisiche che includono repellenza ad acqua, olio e sporco, elevata stabilità termica e chimica, miglioramento delle caratteristiche dei tensioattivi e riduzione dell'attrito ad una serie di prodotti. Queste proprietà permettono loro di essere applicati a svariati campi, che includono liquidi schiumogeni AFFF, cosmetici, elettronica, industria alimentare, medicina, placcatura di metalli, carta e imballaggi, edilizia, semiconduttori, tessili e casalinghi. [4]
Questi composti possono essere a catena corta se hanno meno di 7 atomi di carbonio, o a catena lunga se il numero di carboni presenti nella catena principale è superiore a 7; quelli con 8 atomi di carbonio sono i più comuni e tra questi vi sono in particolare l'acido perfluorottanico (PFOA) e l'acido perfluorottansolfonico (PFOS) mostrati in Figura 1. [4]

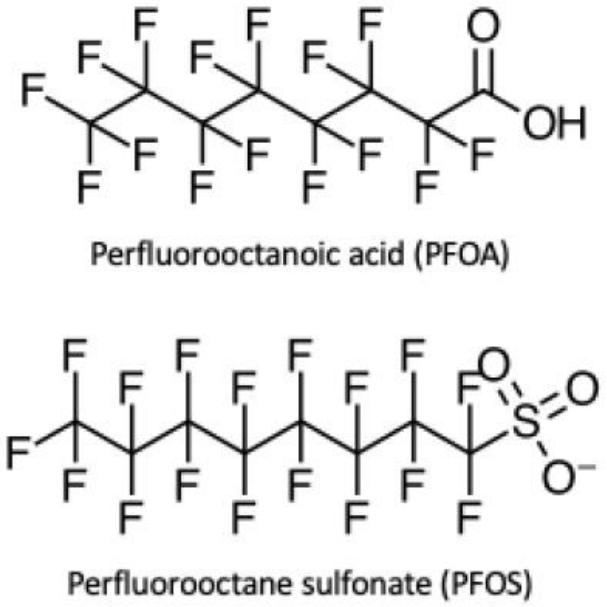

Figura 1 - Struttura chimica di PFOA e PFOS

PFOA e PFOS rientrano negli allegati A (*Eliminazione di PFOA e suoi sali*) e B (*Restrizioni sui PFOS e sui sali*) della Convenzione di Stoccolma sulla regolazione degli inquinanti organici persistenti, implicando che la loro produzione e il loro uso dovrebbero essere limitati e queste sostanze essere eliminate. Ciò ha effettivamente portato all'interruzione della produzione in Occidente e una diminuzione del loro utilizzo. [5]
I PFAS sono anche chiamati "sostanze chimiche eterne" poiché la loro stabilità chimica li rende metabolicamente inerti, non biodegradabili, persistenti e facilmente assorbili dagli organismi [6] con il risultato che molte di queste sostanze sono state rilevate nell'ambiente, in animali selvatici e nelle persone. Inoltre, alcuni PFAS possono anche essere diffusi nell'atmosfera arrivando a contaminare ambienti lontani come l'Artide e l'Antartide. [7]

1.2. Tossicità

I PFAS hanno un'alta affinità con le proteine e i più alti livelli sono generalmente misurati nel sangue, nel fegato e nei reni. La presenza dei PFAS nel sangue è diventata preoccupante verso la fine degli anni Sessanta, quando veniva costantemente trovato il fluoro nei campioni di sangue umano. Le analisi riscontravano maggiore concentrazione di PFAS nelle persone che vivevano in aree in cui l'acqua potabile era contaminata o nei lavoratori degli impianti di produzione.
Il facile accumulo nell'organismo è dovuto ai tempi relativamente lunghi di semivita che variano da 1.5 a 9.1 anni per i PFAS, con punte di 21.7 anni per PFOS. [7]
L'esposizione ai PFAS può avvenire attraverso molte vie, tra le quali l'esposizione cutanea, l'ingestione e l'inalazione di polvere. Tuttavia, la principale via di esposizione per le persone è rappresentata dall'alimentazione. [1]
Alcuni studi hanno rivelato diverse conseguenze tossicologiche dovute all'esposizione di PFAS come immunotossicità, neurotossicità, cancerogenicità, interferenza endocrina ed effetti riproduttivi e sullo sviluppo. Infatti, hanno un'influenza sul tessuto osseo causando mineralizzazione, rimodellamento o portando a mancanze nella morfogenesi ossea. [8]
È stata individuata una correlazione con la funzione tiroidea e l'immunosoppressione, e l'esposizione è legata allo sviluppo di cancro nei reni e nei testicoli.
Inoltre, un'altra importante conseguenza è che possono causare gravidanze con esiti negativi o, in caso di esposizione durante il periodo gestazionale, difetti cardiaci congeniti nell'uomo [1] e uno sviluppo comportamentale negativo nei bambini. [8]
Poiché i PFAS più comuni e probabilmente più tossici sono PFOA, PFOS, acido perfluorononanoico e perfluoroesano solfonico, l'Autorità Europea per la Sicurezza Alimentare ha suggerito un valore di assunzione settimanale tollerabile per la somma di questi composti pari a 4.4 ng/kg di peso corporeo. [7]
Inoltre, in Europa è presente la Direttiva sull'acqua potabile che prevede un valore limite di 0.5 μg/L per la somma dei PFAS e di 0.1 μg/L per ogni singolo PFAS.
La Direttiva Quadro sulla Acque dell'UE include PFOS e derivati come sostanze pericolose fissando un valore limite di 0.65 ng/L nelle acque superficiali interne e 0.13 ng/L nelle acque di mare. [3] La U.S. EPA ha stabilito di non superare una concentrazione consigliata di 70 ng/L di PFAS nelle acque potabili.

1.3. Metodo di analisi attuale

Il metodo analitico standard utilizzato attualmente per l'analisi dei PFAS in acqua potabile è il Metodo 537 pubblicato dall'USEPA nel 2009 e aggiornato fino al 2020

(537.1). Nel 2019 l'EPA ha pubblicato il Metodo 533 che è focalizzato sui PFAS a catena corta, con un numero di carboni da C4 a C12.
Entrambi i metodi si basano sull'estrazione in fase solida (SPE) seguita dall'analisi mediante cromatografia liquida accoppiata ad uno spettrometro di massa (LC/MS/MS). [9]

1.3.1. Metodo 537.1

Questo metodo prevede di utilizzare 250 mL di acqua campionata alla quale sono addizionati PFAS standard nativi. 18 mL di acqua sono inseriti in cartucce da 500 mg di stirene-divenilbenzene (SDVB) precedentemente condizionate con 15 mL di metanolo, mantenuto nelle stesse per 1 minuto. L'eluato viene conservato per la successiva concentrazione ed analisi.

1.3.2. Metodo 533

In questo metodo i campioni vengono preparati in 250 mL di soluzione acquosa di acetato d'ammonio in concentrazione 1 g/L. Il pH deve essere tra 6 e 8, regolato aggiungendo acido acetico. Ai campioni sono addizionati i PFAS standard nativi, e poi il tutto è caricato in cartucce da 500 mg di stirene-divenilbenzene (SDVB). Ogni cartuccia è precondizionata con 10 mL di metanolo, 10 mL di un tampone 0.1 M di fosfato e con 3 mL di tampone fosfato con 2 mL di acqua.
L'operazione viene ripetuta per ottenere 2 frazioni da 5 mL ciascuna di eluente il quale viene conservato per la successiva concentrazione ed analisi.

1.3.3. Concentrazione dei campioni

Gli eluenti sono concentrati in un concentratore automatizzato a 65° con un flusso di azoto di 9 psi.

1.3.4. Analisi

I campioni vengono diluiti in 1 mL di metanolo con un rapporto di diluizione in volume 1:3 di campione e metanolo rispettivamente. Per la separazione viene usata una colonna HSS T3 (2.1 mm x 100 mm, 1.8 μm) e i campioni vengono ionizzati mediante elettrospray (ESI) selezionato in modalità negativa. L'analisi dei PFAS viene eseguita con un sistema di cromatografia liquida ad altissima pressione (UHPLC) accoppiato con uno spettrometro di massa a quadrupolo con tempo di volo e con spettrometria di massa ad alta risoluzione.
Viene applicata un'eluizione a gradiente con "soluzione A" 0.1% di acido formico in metanolo e "soluzione B" 0.1% di acido formico in acqua. Come gas di desolvatazione viene utilizzato azoto con portata 750 L/h; la temperatura alla sorgente è 120 °C mentre quella alla desolvatazione è pari a 250 °C. L'intervallo di massa è fissato da 50 a 950 Da con una velocità di scansione di 0.055/s.

1.3.5. Risultati

I recuperi ottenuti col metodo 537.1 sono riassunti in Tabella 1, mentre quelli relativi al metodo 533 sono mostrati in Figura 2. Il recupero medio è sempre compreso tra 80% e 120% a varie concentrazioni.

Tabella 1 – Recuperi dei PFAS nativi nel metodo 537.1 estratti a 2-31 ng/L (Tabella tratta da [10]*).*

PFAS Compound	2 ppt	4 ppt	24 ppt	32 ppt	EPA window
PFBS	94%	93%	98%	99%	70%-130%
PFHxA	99%	104%	101%	109%	70%-130%
GenX	102%	98%	106%	123%	
PFHpA	99%	103%	102%	103%	70%-130%
PFHxS	95%	97%	97%	102%	70%-130%
ADONA	90%	97%	99%	104%	70%-130%
PFOA	116%	109%	105%	103%	70%-130%
PFNA	95%	107%	111%	110%	70%-130%
PFOS	93%	96%	95%	101%	70%-130%
9Cl-PF3ONS	88%	88%	95%	100%	70%-130%
PFDA	91%	99%	105%	111%	70%-130%
N-MeFOSAA	93%	97%	92%	92%	70%-130%
PFUdA	93%	101%	104%	108%	70%-130%
N-EtFOSAA	95%	110%	98%	98%	70%-130%
11Cl-PF3OUDS	86%	88%	86%	91%	70%-130%
PFDoA	90%	92%	99%	101%	70%-130%
PFTrDA	86%	89%	97%	93%	70%-130%
PFTeDA (PFTA)	84%	82%	91%	93%	70%-130%

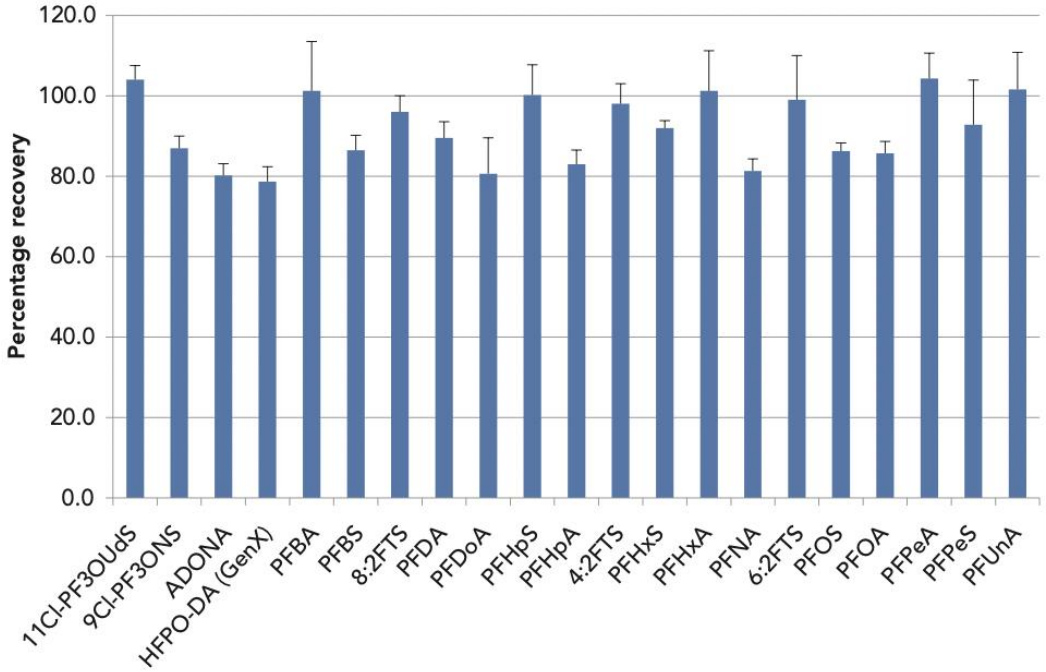

Figura 2 – Recupero dei PFAS nativi nel metodo 533 estratti a 25 ng/L (Figura tratta da [10]).

Il recupero di entrambi i metodi rientra nell'intervallo di accettabilità 70-130% fissato dall'EPA per questi metodi. [10]

Per il metodo 537.1 il limite minimo di segnalazione (MRL) varia tra 0.71 e 2.8 ng/L e il limite di rilevabilità (DL) tra 0.53 e 6.3 ng/L [11]; per il metodo 533 è dato un MRL che varia tra 1.4 e 14 ng/L. [12]

1.4. Decontaminazione

I processi attualmente proposti per la bonifica dei PFAS sono l'adsorbimento, la filtrazione tramite membrana, processi fotochimici, elettrochimici e di ossidazione. [13]
L'adsorbimento fisico può avvenire tramite l'uso di carbone attivo in polvere (PAC) e carbone attivo granulato (GAC). La limitazione principale di tale metodo, così come della filtrazione su membrana, consiste nel fatto che gli inquinanti non sono eliminati ma solo trasferiti da una matrice all'altra, e vi è quindi la necessità di dover comunque trattare il carbone attivo (o la membrana di filtrazione) una volta che l'estrazione è avvenuta.
La fotolisi richiede l'uso di lunghezze d'onda inferiori a 250 nm per una scissione efficiente a causa della forza del legame C-F, [14] ma tali radiazioni risultano poco pratiche.
L'utilizzo di metodi elettrochimici sembra il più ottimale per la decontaminazione in quanto non richiede l'aggiunta di sostanze reagenti, causa un minore inquinamento secondario, può avvenire in condizioni di reazione blande, e il processo può essere automatizzato. Le tre tecnologie elettrochimiche principali sono l'elettro-ossidazione, l'elettro-adsorbimento e l'elettro-coagulazione (Figura 3).
L'elettro-ossidazione comporta il trasferimento elettronico dal PFAS all'anodo o l'ossidazione mediante il radicale OH•. In entrambi i casi si hanno processi di ossidazione (diretta o indiretta), durante i quali i PFAS subiscono processi di degradazione.
L'elettro-adsorbimento è un processo che combina la separazione tramite adsorbimento con un processo elettrochimico, migliorando la capacità e la velocità di adsorbimento grazie all'attrazione elettrostatica e guadagnando la rigenerazione del materiale, di cui è fatto l'elettrodo, mediante l'applicazione di un potenziale inverso. Poiché non avviene alcun processo elettrochimico redox (la corrente è utilizzata solo per mantenere il doppio strato elettrico), il consumo di energia è basso. Il meccanismo di decontaminazione prevede che, con l'applicazione del campo elettrico, i PFAS caricati negativamente migrino verso l'anodo accelerandone la rimozione. I migliori materiali per l'elettro-adsorbimento sono il grafene e i nanotubi di carbonio che presentano un'eccellente stabilità elettrochimica.
L'elettro-coagulazione utilizza materiali metallici come ferro o alluminio all'anodo che sotto l'azione di un campo elettrico esterno producono cationi, i quali, tramite idrolisi e polimerizzazione, formano complessi idrossilici amorfi o materiale solido. I PFAS sono adsorbiti su tali materiali che vengono poi portati in superficie. [13]

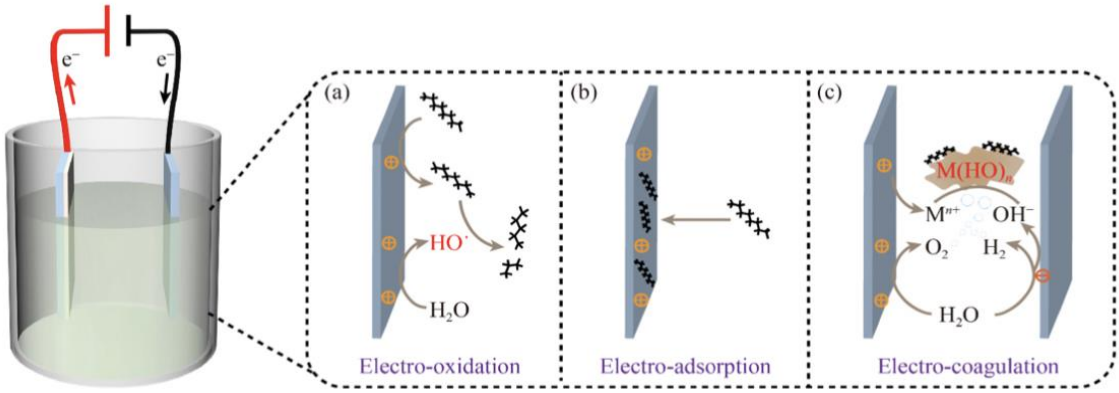

Figura 3 – Illustrazione schematica di (a) elettro-ossidazione, (b) elettro-adsorbimento e (c) elettro-coagulazione. (Figura tratta da [13])

1.5. Scopo della tesi

Questo lavoro di ricerca bibliografica si propone di investigare le novità più recenti (pubblicazioni del 2022) che riguardano nuovi metodi di analisi proposti per i PFAS. Inizialmente, la preoccupazione principale dovuta alla presenza di PFAS nell'ambiente si riteneva essere solamente l'acqua potabile; successivamente, si sono iniziate a valutare matrici diverse, come acque sotterranee, acque reflue, acque superficiali, suolo, alimenti, liquidi biologici, e aria, portando quindi molti laboratori a sviluppare nuovi metodi adattando quelli per l'acqua potabile e migliorandoli.
Si è ritenuto di classificare i nuovi metodi in base alla matrice a cui sono applicati. Nel capitolo 2, quindi, i metodi sono raggruppati per tipo di campione analizzato.

2. NUOVI METODI DI ANALISI PROPOSTI NEL 2022

2.1. Matrice acquosa

Nei nuovi metodi proposti, così come in numerosissimi metodi preesistenti, il pretrattamento del campione si svolge attraverso un'estrazione in fase solida (SPE), che è il metodo di preparazione di gran lunga più comune grazie alla semplicità di funzionamento, all'affidabilità, alla sensibilità e al ridotto utilizzo di solventi organici; al contrario, i metodi di estrazione liquido-liquido (LLE) sono ormai quasi abbandonati perché richiedono l'uso di un grande volume di solventi che perlopiù sono tossici, inquinanti e/o costosi.
Tuttavia, si è osservato che la colonna SPE non è sufficiente a trattenere alcuni PFAS a catena corta, causando per questi una scarsa efficienza di estrazione. Inoltre, questi adsorbenti sono costosi e il loro utilizzo richiede tempi lunghi, per cui si sono iniziati ad esplorare nuovi metodi di preparazione del campione nell'analisi delle matrici acquose, tra cui l'estrazione in fase solida magnetica dispersiva (DMSPE) che presenta come vantaggio la facilità d'uso e l'uso di piccole quantità di adsorbente la cui scelta è cruciale in queste tecniche.
S.K. Selahle et al. [15] hanno modificato MIL-101(Cr) con nanoparticelle di Fe_3O_4 tramite il metodo di coprecipitazione per usarlo nel DMSPE dei PFAS in acque di fiume prima di analizzarle con HPLC-DAD e in seguito con UHPLC-MS/MS per confermare i risultati. L'analisi è stata eseguita con uno strumento accoppiato con un rivelatore ad array di diodi e per la separazione dei PFAS è stata usata una colonna Agilent Zorbax Eclipse Plus C18. Nell'analisi di conferma è stata usata la stessa colonna per la separazione.
I risultati hanno mostrato che Fe_3O_4@MIL-101(Cr), rispetto ai singoli componenti di cui è costituito, ha dato percentuali di recupero più alte per tutti gli analiti. In realtà anche lo stesso MIL-101 (Cr) ha prodotto percentuali di recupero elevate ma, a differenza dell'addotto con le nanoparticelle, è difficile da separare dalle soluzioni acquose. L'addotto, grazie alle sue proprietà magnetiche, è invece facilmente separabile dai campioni eliminando la fase di centrifugazione e quindi rendendo il metodo più rapido e più semplice. I materiali utilizzati nel lavoro sono mostrati in Figura 4.

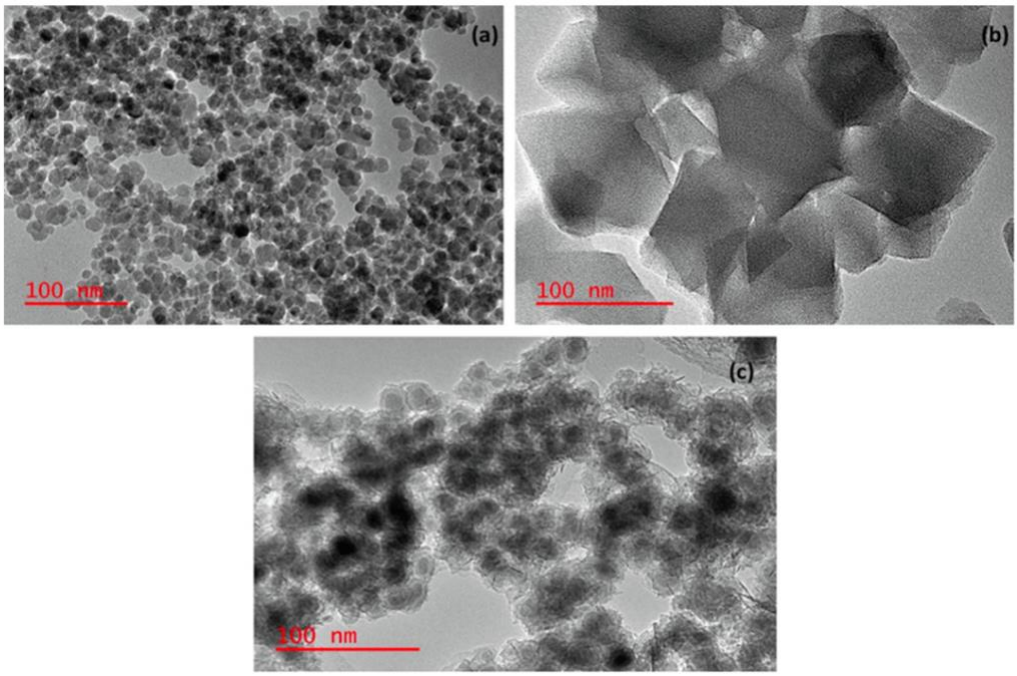

Figura 4 – Immagini TEM di (a) Fe_3O_4, (b) MIL-101(Cr) e (c) Fe3O4@MIL-101(Cr) (Figura tratta da [15]).

Il metanolo si è dimostrato essere il solvente più adatto per l'eluizione dei PFAS dalla superficie di Fe_3O_4@MIL-101(Cr). Il recupero relativo (%RR) per gli analiti è rientrato nell'intervallo 90.8-99,1% per DMSE/HPLC-DAD e nell'intervallo 94.1-99.8% per DMSE/UHPLC-MS/MS. Il metodo ha dimostrato di presentare una linearità in un intervallo molto ampio, compreso tra 1.0 a 5000 ng/L per DMSE/HPLC-DAD e tra 0.05 a 2000 ng/L per DMSE/UHPLC-MS/MS, con $R^2 > 0.99$. Il limite di rilevabilità (LOD) è risultato compreso tra 0.3 e 0.66 ng/L per DMSE/HPLC-DAD e tra 0.011 e 0.04 ng/L per DMSE/UHPLC-MS/MS; nell'articolo vengono anche forniti i limiti di quantificazione (LOQ), che sono compresi tra 1.0 e 2.2 ng/L per DMSE/HPLC-DAD e tra 0.05 e 0.12 ng/L per DMSE/UHPLC-MS/MS.
I risultati ottenuti con l'analisi di conferma con UHPLC-MS/MS hanno confermato che il metodo DMSPE/HPLC-DAD può essere utilizzato per l'analisi dei PFAS in quanto l'applicazione del DMSPE basato su Fe_3O_4@MIL-101(Cr) ha migliorato le capacità di analisi dell'HPLC-DAD. Inoltre, è stato evidenziato che il nanocomposito Fe_3O_4@MIL-101(Cr) può essere riutilizzato per 5 cicli di adsorbimento-desorbimento senza avere diminuzioni dei recuperi dopo l'estrazione. [15]
Se i campioni acquosi risultano contenere pochi PFAS, *Enders et al.* [8] propongono di aumentare il volume di campione iniettato nella colonna LC e sviluppare un metodo con un'attenta gestione delle condizioni cromatografiche ma senza bisogno di fasi di pre-concentrazione SPE o di manipolazione del campione. Gli autori hanno presentato un metodo HRAM per 45 PFAS e 23 standard interni. Per la separazione è stata utilizzata una colonna F5 di Phenomenex in quanto ha fornito una separazione e una ritenzione migliore nelle condizioni di gradiente seguite dal metodo proposto, consentendo allo stesso tempo una durata di analisi più breve pur gestendo un volume di iniezione relativamente grande.
Per l'analisi di massa è stato usato un Orbitrap Exploris 240 con una scansione completa in modalità negativa seguita da una scansione tra 9.5 e 11.5 minuti per gli zwitterioni. Una novità di questo metodo è l'introduzione di standard recentemente rilasciati dai laboratori Fluoryx (PEPA, PFO3OA, PFO4DA e PFO5DoA). Per ogni analita e standard sono state eseguite 10 curve replicate in modo da selezionarne una come curva di calibrazione e le altre 9 come ripetizioni per il controllo della qualità della curva. Per 41 analiti l'MRL è variato da 2 a 50 ng/L e il DL da 0.32 a 20.34 ng/L, per due analiti l'MRL è risultato pari a 100 ng/L e il DL a 40.72 ng/L, mentre per altri due analiti l'MRL e il DL sono risultati molto grandi (rispettivamente 500 ng/L e 138.66 ng/L). Gli autori hanno quindi dimostrato che il loro metodo riesce a raggiungere i limiti richiesti per l'analisi dell'acqua potabile senza la fase di pre-concentrazione e quindi comportando un risparmio di tempo e denaro. [8]
Sempre nell'ottica di abbreviare i tempi dell'analisi, *Wu et al.* [16] hanno proposto di utilizzare la ionizzazione nano-elettrospray (Nano-ESI), al posto dell'ESI tradizionale, nello spettrometro di massa, dato che la Nano-ESI ha un'elevata sensibilità, richiede tempi brevi e volumi molto ridotti, e riduce gli effetti matrice. *Wu et al.* hanno quindi combinato il sistema d'iniezione Nano-ESI e la determinazione con l'HRMS (Nano-ESI-HRMS). Il sistema di iniezione è costituito da un sistema ESI dotato di un emettitore ultrasottile (dai 10 a 100 μm di diametro) che può essere caricato ad alta tensione promuovendo una ionizzazione efficiente e diminuendo l'interferenza dei sali. Grazie alla mancanza di separazione cromatografica il tempo di esecuzione è di 1-2 minuti.
È stata eseguita un'analisi di 22 PFAS per confrontare i risultati che si ottengono tra questo metodo e l'LC/MS/MS. Per l'analisi LC/MS/MS sono stati analizzati 22 PFAS *target* utilizzando un HPLC accoppiato con uno spettrometro di massa a triplo quadrupolo, mentre per l'analisi tramite Nano-ESI-HRMS è stato utilizzato uno spettrometro di massa ad alta risoluzione Q Exactive dotato di iniettore Nano-ESI.

L'analisi LC/MS/MS ha presentato LOD all'interno dell'intervallo 1.1-135.6 ng/L, coi valori più bassi riferiti ai PFSA C4-C8 e PFCA C6-C8 (per i quali i LOD variano tra 1.1 e 15.2 ng/L), e quelli maggiori per gli altri PFAS (per i quali i LOD sono superiori a 60 ng/L). Invece, per il sistema Nano-ESI-HRMS sono stati ottenuti LOD tra 3.2 e 36.2 ng/L che indicano un'elevata e più costante sensibilità verso tutti i PFAS con catene di lunghezza diversa. Questo metodo presenta anche recuperi medi tra 87% e 120% per 16 PFAS, tra 120% e 130% per 5 PFAS e 133% per il PFUdA; valori che si discostano di poco dall'intervallo fissato dal metodo EPA 537.1. L'analisi quantitativa dei 22 PFAS con entrambi i metodi ha permesso di ottenere risultati concordanti (R^2 > 0.91). Questi risultati hanno confermato l'affidabilità del nuovo metodo che ha consentito un'analisi di PFAS rapida senza compromettere sensibilità e accuratezza. [16]
Altri autori, come *L.-A. Koronaiou et al.* [17] si sono invece concentrati nello sviluppare e ottimizzare un flusso di lavoro per identificare 27 PFAS in campioni di acqua potabile, acqua di fiume ed acque reflue basandosi sull'estrazione in fase solida ed in seguito dall'analisi con LC-Orbitrap HRMS.
L'analisi è stata eseguita con un Orbitrap Q Exactive equipaggiato con una ionizzazione elettrospray riscaldata (HESI-II). L'MS è stato impostato in modalità di ionizzazione negativa e per la separazione degli analiti è stata utilizzata una colonna Thermo Hypersil GOLD aQ (50 × 2.1 mm, 1.9 µm). La separazione ha seguito un'eluizione a gradiente di 15 min utilizzando acqua e metanolo come fasi mobili, entrambi acidificati con acido formico 0.1%. Per la quantificazione è stata utilizzata la modalità MS full-scan (FS), in un intervallo di scansione di 100–1000 *m/z* e la risoluzione è stata impostata a 70000.
Inizialmente sono state confrontate due colonne, Thermo Hypersil GOLD aQ (50 × 2.1 mm, 1.9 µm) e la Restek Raptor ARC-18 (150 mm × 2.1 mm, 2.7 µm). Entrambe hanno dato risultati accettabili ma il miglior comportamento in termini di separazione, velocità di analisi e forma dei picchi è stato ottenuto dalla prima.
Per l'ottimizzazione della fase mobile, si è notato che l'aggiunta di acido formico, rispetto a quella di acido acetico o ammonio acetato, permette di migliorare la forma dei picchi per PFBA e PFPeA; per gli altri standard il miglioramento è stato meno evidente.
Il rapporto metanolo/acqua 90/10, come solvente, si è rivelato essere la scelta migliore per massimizzare i segnali dei vari PFAS; la Figura 5 riassume il lavoro eseguito sulla scelta del solvente ottimale.

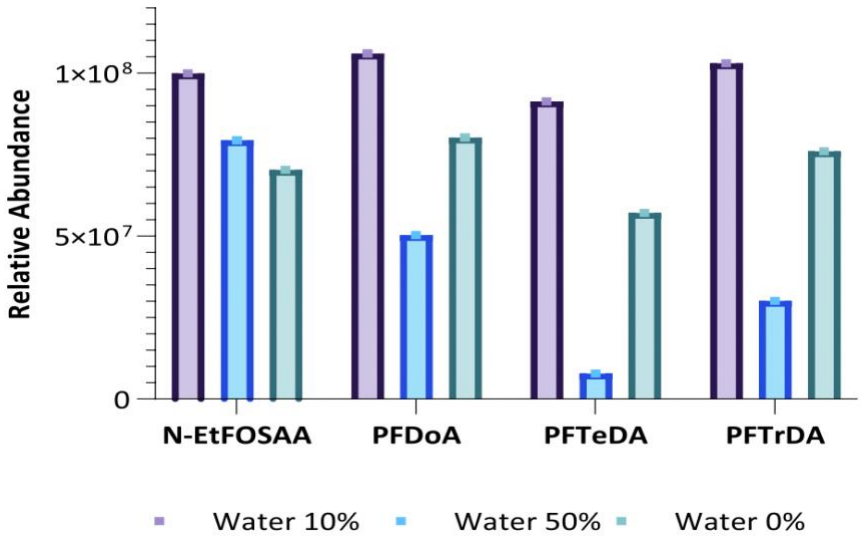

Figura 5 – Effetto sulla risposta del segnale del 10%, 50% e nessuna aggiunta di acqua a metanolo (Figura tratta da [17]).

Sono poi state usate cartucce WAX, rispetto a cartucce HLB, perché hanno fornito recuperi migliori per il 70% dei PFAS e soprattutto per PFOS e PFOA. Grazie a queste ottimizzazioni dei parametri gli autori sono riusciti ad ottenere recuperi rientranti all'interno dell'intervallo limite accettabile di 70-120%; i recuperi minori sono stati riscontrati con PFTrDA e PFDS. Anche le curve di calibrazione hanno mostrato linearità con $R^2 > 0.99$. Il limite medio di quantificazione del metodo (MQL) è stato di 0.05 ng/L e il limite inferiore di calibrazione del metodo (LCML) è stato verificato essere 0.5 ng/L. [17]
Liping Yang et al. [18] hanno sviluppato una derivatizzazione dei PFAS per introdurre gruppi cromofori UV-Vis e quindi rilevabili con LC-UV. Questa derivatizzazione ha l'obiettivo di permettere di usare una tecnica (l'LC-UV) decisamente più economica dell'LC-MS. Lo svantaggio principale dell'LC-UV è rappresentato dai suoi valori di LOD piuttosto elevati; tuttavia, la tecnica diviene interessante per quei campioni nei quali la concentrazione dei PFAS è elevata, e per i quali quindi l'uso dell'LC-MS coi suoi LOD molto bassi non è necessario (tra l'altro, usare l'LC-MS con campioni relativamente concentrati può rappresentare una fonte di incertezza dovuta alle operazioni di diluizione).
La derivatizzazione è stata eseguita con il metodo classico della carbodiimmide per ottenere derivati di PFCA-DCA. È stata scelta la derivatizzazione di DCA perché può essere condotta in fase acquosa in condizioni di reazioni blande, e perché DCA è un intermedio economico e mostra un forte assorbimento UV a ~ 255 nm. È stata eseguita un'analisi su sei derivati PFCA-DCA utilizzando un HPLC accoppiato con un rilevatore UV impostato a 255 nm e una colonna SUPERCOSIL LC-18. Un esempio di cromatogramma ottenuto e lo spettro UV-Vis del DCA sono mostrati in Figura 6.

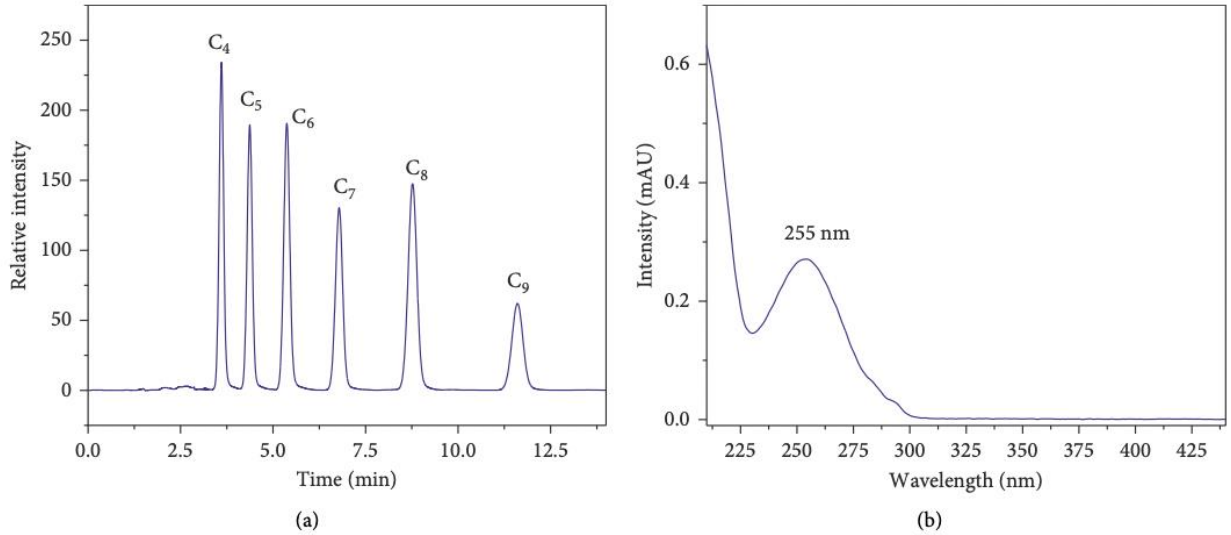

Figura 6 – (a) Cromatogramma LC dei composti derivatizzati e (b) spettro UV-Vis del DCA (figura tratta da [18]*).*

Le curve di calibrazione presentavano $R^2 > 0.99$, il LOD strumentale è risultato pari a 0.2-0.5 mg/L in matrice organica e 0.6-1.5 mg/L in matrice acquosa, e i recuperi sono rientrati nell'intervallo 79.9%-84.6% per la matrice organica e 66.8%-75.8% per quella acquosa. [18]
Un altro aspetto che è stato valutato nell'analisi dei PFAS riguarda la cosiddetta analisi *untarget*, cioè mirata non alla quantificazione di PFAS specifici ma solamente del loro insieme. *A. Valdiviezo et al.* [19] hanno utilizzato la spettrometria di mobilità ionica (IMS) accoppiata all'analisi LC-MS per l'analisi *untarget* di PFAS in campioni acquosi ambientali. L'IMS presenta numerosi vantaggi, che includono la rapidità della separazione analitica (solitamente millisecondi), e la capacità di distinguere gli analiti in base a dimensione, forma e carica. A proposito di questo vantaggio, si nota che la

mobilità ionica permette la misurazione della sezione trasversale di collisione (CCS) di uno ione, che è parametro molto importante ed è una caratteristica distintiva dei vari ioni; ciò permette di aumentare il grado di affidabilità nell'identificazione dei PFAS, le quali sono molecole molto simili. L'IMS può essere accoppiato a LC per la separazione di specie simili, e alla spettrometria di massa ad alta risoluzione (HRMS) per la loro analisi.
Lo studio condotto dagli autori ha riguardato 31 campioni di acque superficiali, ed aveva l'obiettivo di dimostrare che con il metodo LC/MS/MS si sottostima la reale esposizione ai PFAS, dato che tale metodo *target* non determina tutti i PFAS potenzialmente presenti. Va peraltro tenuto presente che il metodo proposto è da considerare come preliminare, in quanto non fornisce una quantificazione assoluta dei livelli di PFAS, e inoltre l'identificazione si basa sulla disponibilità di dati CCS, che al momento è ancora limitata. Tuttavia, questo metodo può essere applicato per una rapida caratterizzazione dell'esposizione prima di utilizzare metodi mirati per la quantificazione dei contaminanti. [19]
Tali analisi *untarget* hanno evidenziato che il numero di PFAS nelle matrici ambientali è elevato, la qual cosa era parzialmente prevedibile considerato che numerosi composti non vengono rimossi efficacemente dalle tecnologie convenzionali di trattamento dell'acqua. Ad esempio, recentemente sono stati rivelati alcuni perfluorati e polifluorurati solfonati (PFSA) C1-3 che sono estremamente idrofili e molto mobili nell'ambiente, almeno in parte invisibili alla ionizzazione dell'elettrospray nell'interfaccia LC-MS. Tra questi c'è il trifluorometansolfonato (TFMS).
X. Z. Niu et al. [20] hanno sviluppato un metodo a cromatografia liquida in modalità mista (MMLC) per 10-canforsulfonato (10-CS), TFMS, perfluorobutansolfonato (PFBS) e 2-ACO-DFEtS. L'obiettivo è stato quello di mettere a punto un metodo da utilizzare sia per TFMS sia per le altre tre sostanze in maniera simultanea. L'analisi è stata eseguita con un cromatografo liquido ad alta pressione LC accoppiato ad uno spettrometro di massa Q-Exactive F con ionizzazione elettrospray in modalità negativa. L'estrazione è stata fatta in fase solida con cartucce Oasis WAX che si è dimostrata più efficace di una resina stirene-divinilbenzene. È stata scelta una fase mobile senza tampone perché si è osservato una buona ritenzione per TFMS ed è stata ottimizzata con una frazione acquosa del 60% alla quale tutti gli analiti sono ben separati e il tempo di ritenzione è risultato compreso tra 5 e 13 minuti. Inoltre, è stata ottimizzata la misura scegliendo 10 °C come temperatura della colonna, poiché in tali condizioni le differenze di ritenzione e la risoluzione complessiva sono risultate le migliori. L'ESI è stato impostato a 4 kV, valore a cui ha fornito la risposta massima.
Ogni regressione della calibrazione ha fornito un coefficiente $R^2 \geq 0{,}99$. I recuperi hanno dato valori compresi tra 60 e 92% e il LOQ era compreso tra 0.02 a 0.06 ng/L.
Quindi questo metodo può essere utilizzato per l'analisi dei livelli in tracce di PMOC ultra-idrofili, soprattutto a catena corta, coprendo una lacuna nelle metodologie analitiche ambientali. [20]

2.2. Matrice liquida non (necessariamente) acquosa

Alcune metodiche recenti sviluppate per l'analisi di PFAS sono applicabili a matrici liquide anche non acquose, e sono state sviluppate con l'obiettivo principale di sviluppare dei metodi rapidi e semplici di monitoraggio. In particolare, questi metodi sono stati dedicati al monitoraggio di alcuni composti che hanno sostituito (o stanno sostituendo) PFOA e PFOS, e cioè i fluorottansolfonammidi (FOSA), i fluorottani sulfonamido-etanolo (FOSE) e gli alcol fluorotelomeri (FTOH). Questi presentano una tossicità ed un'emivita inferiore ai due PFAS originari, ma possono degradarsi a PFAS persistenti, per cui il loro monitoraggio rimane importante.

Le tecniche di spettrometria di massa a ionizzazione ambientale (AIMS) presentano le caratteristiche richieste per eseguire dei monitoraggi rapidi, in quanto permettono analisi dirette dei campioni con un pretrattamento minimo o assente. Tra le varie tecniche AIMS, una delle più semplici è la spettrometria di massa con ionizzazione *paper-spray* (PSI-MS). Essa si basa sul deposito di un campione liquido su un pezzo di carta triangolare: il campione viene analizzato con l'aggiunta di un solvente e l'applicazione di un voltaggio, il quale produce uno spray di goccioline cariche nell'apice della carta.
R. Serò et al. [21] hanno sviluppato un nuovo metodo AIMS che combina la tecnica *paper-spray* (PS) con la fotoionizzazione a pressione atmosferica e la spettrometria di massa ad alta risoluzione (PS-APPI-HRMS) per un'analisi rapida di FTOH, FOSE e FOSA. Lo schema del processo che ha luogo su carta è mostrato in Figura 7.

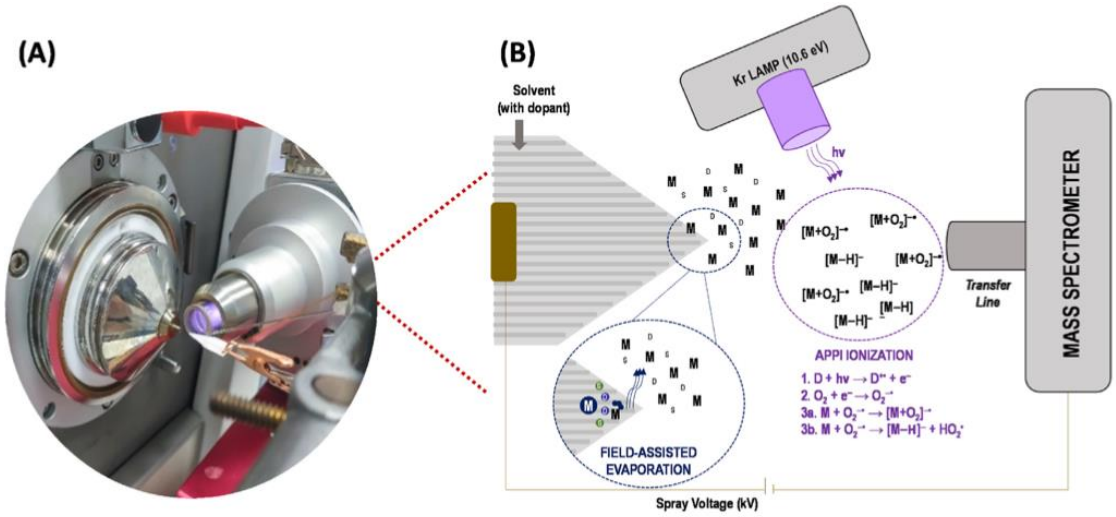

Figura 7 – (A) Configurazione sperimentale della sorgente di fotoionizzazione a pressione atmosferica con ionizzazione a paper-spray. (B) Schema del processo di ionizzazione e meccanismo di PS-APPI. (Figura tratta da [21])

Il pezzo di carta W31 triangolare (alto 10 mm e largo 8 mm) viene fissato con una *clip* di rame, e l'apice è in linea con l'ingresso dello spettrometro di massa ad una distanza di 4 mm ± 1 mm. I fotoni sono emessi a 10.0 e 10.6 eV di energia da una lampada al krypton posizionata a 30° e ad 1 cm dall'apice della carta e dall'ingresso MS. Per l'analisi sono state caricate aliquote da 10 mL delle soluzioni standard e dei campioni sulla carta, che è stata lasciata asciugare prima dell'analisi; la volatilità dei composti analizzati limita il tempo di asciugatura, che è stato riscontrato essere al massimo di due minuti: a tempi più lunghi si è infatti evidenziata una significativa diminuzione della risposta dei FTOH.
In seguito, sono stati depositati 70 mL di toluene ed è stata applicata l'alta tensione di 2.5 kV alla *clip* per generare lo *spray* di goccioline. Tale voltaggio rappresenta un compromesso in quanto gli FTOH a catena più corta hanno mostrato massima efficienza di ionizzazione a circa 2.5 kV, mentre per 10:2 FTOH, FOSA e FOSE la migliore risposta è stata osservata a circa 3.0 kV.
Gli ioni generati sono stati registrati per 2.5 min e l'analisi è stata eseguita con uno spettrometro di massa quadrupolo-Orbitrap. Prima dell'analisi l'unico trattamento eseguito sul campione è stata l'aggiunta di una soluzione di standard interni seguita dall'agitazione.
Per massimizzare l'intensità ionica in base alla posizione della lampada al krypton e la composizione del solvente sono state fatte delle prove con 8:2 FTOH e N-EtFOSA come modelli. L'angolo è stato regolato tra 20 e 45° e la distanza della punta tra 0.3 e 1.5 cm; dai risultati in Figura 8 si nota che il segnale ionico migliore si osserva a 30°

ed 1 cm come detto. Oltre al toluene sono stati valutati anche acetone, clorobenzene, tetraidrofurano e anisolo, ma il toluene è quello che ha fornito il segnale più intenso per tutti e due gli analiti.

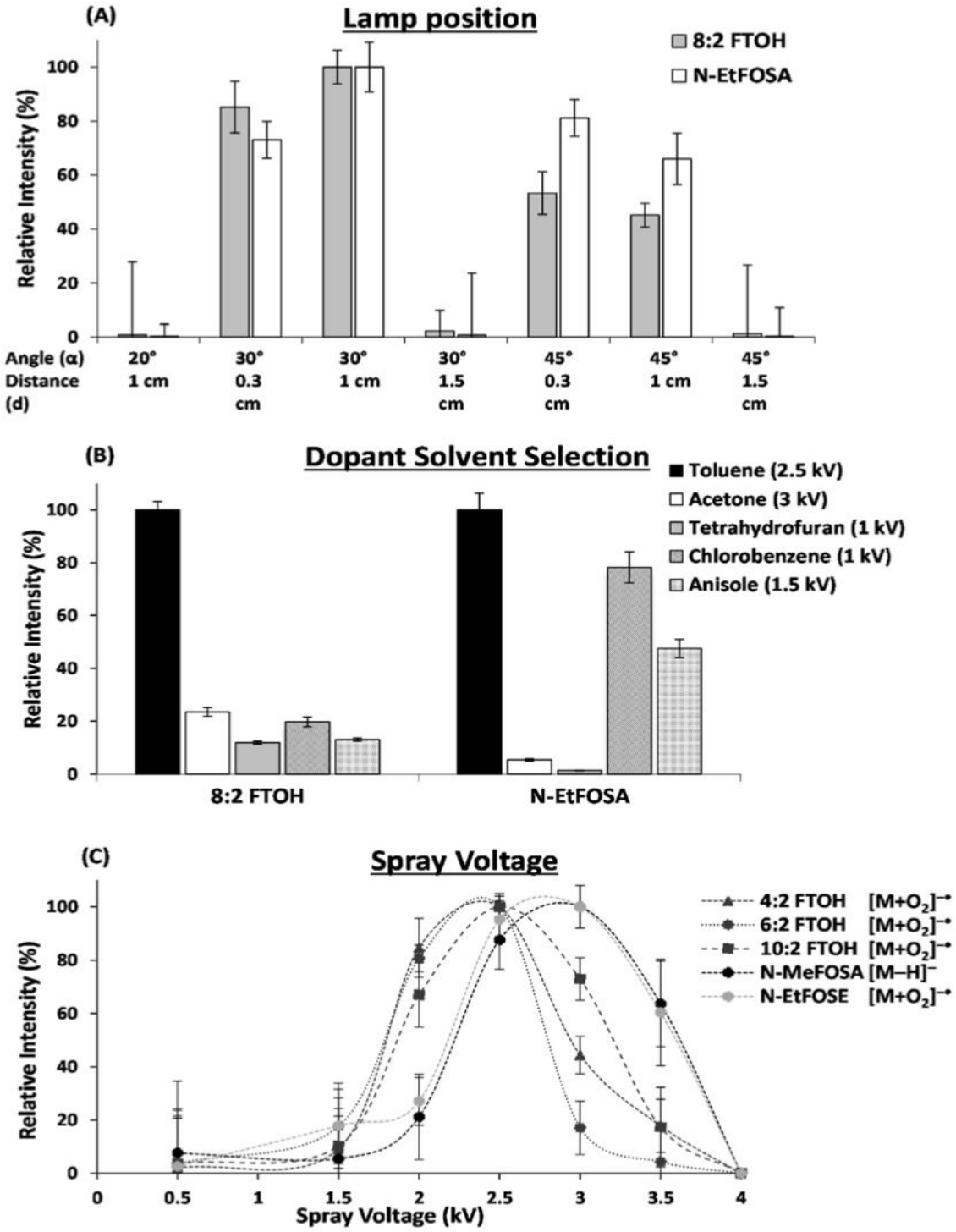

Figura 8 – Effetto della (A) posizione della lampada, (B) selezione del solvente, (C) tensione sulla risposta PS-APPI-HRMS degli analiti. (Figura tratta da [21])

I LOD sono risultati compresi tra 3 e 27 mg/L ad eccezione di FTOH 4:2 che ha avuto un LOD di 315 mg/L, mentre il LOQ è rientrato nell'intervallo tra 10 e 90 µL sempre ad eccezione di FTOH 4:2 per il quale è risultato pari 1000 µL. La retta di calibrazione è risultata lineare con $R^2 > 0.998$.
Questi dati hanno dimostrato delle buone prestazioni per il metodo PS-APPI-HRMS proposto, che potrebbe essere applicato per il monitoraggio rapido di PFAS. [21]

2.3. Matrice atmosferica

Come si è accennato nel capitolo 1, l'atmosfera, e in particolare il particolato atmosferico (*particulate matter*, PM), è un'altra importante e possibile fonte di PFAS per gli esseri viventi, in quanto molti PFAS possono adsorbirsi su di esso. Infatti, sebbene questi composti abbiano una bassa volatilità per la loro natura ionica, essi sono stati individuati nel PM probabilmente a causa della solubilizzazione in goccioline di particelle liquide. Il PM è una miscela di particelle solide e liquide di varie dimensioni che sono sospese nell'atmosfera. I metodi di analisi si concentrano su quelle di diametro inferiore a 2.5 µm, in quanto la loro ridotta dimensione permette di penetrare meglio il sistema respiratorio, e quindi rende i PFAS (e altri inquinanti eventualmente adsorbiti) più pericolosi. Solitamente i PFAS nell'atmosfera hanno una concentrazione molto inferiore rispetto ad altre matrici, rendendo più impegnativa l'analisi ma allo stesso tempo hanno un impatto importante nella salute umana a causa dell'esposizione continua a cui si è sottoposti.
I. Kourtchev et al. [22] hanno sviluppato un metodo analitico per la determinazione di PFAS nel particolato (PM2.5) sfruttando l'estrazione in fase solida (SPE) in linea accoppiata alla cromatografia liquida (LC) dotata di spettrometro di massa ad alta risoluzione con un iniettore elettrospray in modalità negativa (ESI-HRMS). Per l'analisi è stato utilizzato uno spettrometro Q Exactive equipaggiato con ESI che però è soggetto ad effetti matrice. Per rimuovere le sostanze interferenti è stata usata l'SPE in linea: questa configurazione consente una maggiore rapidità e una riduzione delle possibili contaminazioni rispetto all'SPE non in linea. Come colonna di preconcentrazione è stata scelta una C18, mentre la separazione cromatografica è stata condotta mediante UHPLC. I risultati hanno mostrato una linearità per la maggior parte degli analiti con $R^2 \geq 0.995$ tranne che per PFDA, PFUdA e PFPeA. In base all'analita il LOD è variato tra 0.08 e 0.5 pg/mL e il LOQ tra 0.25 e 1.7 pg/mL. I valori di recupero dei PFAS sono rientrati nell'intervallo tra 93% e 109%, come mostrato in Figura 9.

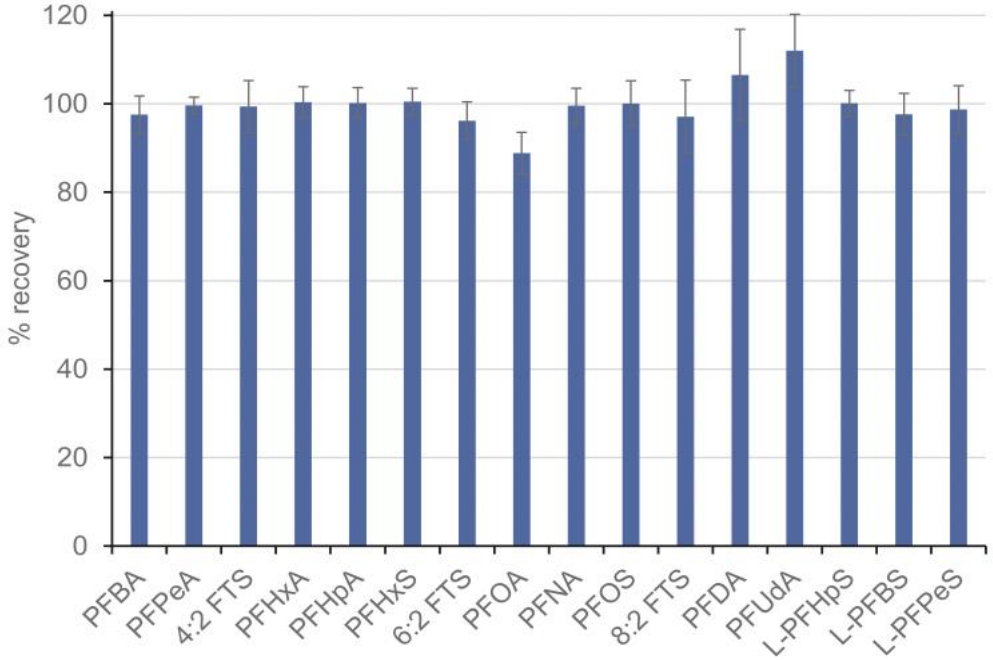

Figura 9 – Percentuale di recupero di 16 PFAS (Figura tratta da [22]*).*

I risultati ottenuti hanno confermato la validità del metodo per l'analisi dei PFAS nel PM. [22]

2.4. Matrice solida

Tra le matrici solide di maggior interesse vi sono i cosiddetti biosolidi, ovvero i fanghi trattati provenienti dagli impianti di depurazione delle acque. Tali fanghi sono utilizzabili come concimi, quindi riversandoli direttamente sui terreni agricoli, ottenendo così vantaggi sia dal punto di vista economico che ambientale. Questo processo, infatti, reintegra i nutrienti essenziali e la materia organica nel suolo e allo stesso tempo riduce il carico nelle discariche, rappresentando quindi una soluzione ottimale per eliminare i fanghi dagli impianti.
Tuttavia, recentemente è stato preso in considerazione il loro impatto ambientale, in quanto nei biosolidi si possono presentare numerosi contaminanti organici, compresi i PFAS. In tal modo, tali contaminanti possono trasferirsi alle colture e quindi entrare nella catena alimentare di uomini e animali. Risulta pertanto importante mettere a punto dei metodi di analisi efficaci per tali matrici.
L'analisi dei PFAS nei biosolidi può essere molto difficile da condurre in quanto questi ultimi contengono nutrienti inorganici, acidi umici, acidi grassi, lipidi, proteine e polisaccaridi che ne rendono la composizione molto variabile. Inoltre, aumenta la possibilità che vi siano effetti matrice e interferenze, rendendo difficile in particolare l'analisi in tracce.
Dickman R. A. et al. [23] hanno ottimizzato una tecnica di estrazione e sviluppato un approccio di analisi quantitativa utilizzando come campioni fanghi attivati di scarto (WAS) e solidi primari stabilizzati con calce (PS). I WAS derivano da un processo di trattamento biologico in cui la materia organica floccula e si deposita; i fanghi depositati vengono stabilizzati con calce ottenendo PS.
Per l'analisi LC-HRMS è stata eseguita un'estrazione in fase solida (SPE) per la pulizia dei campioni mediante ultrasuoni e cartucce C18, seguita da un sistema di cromatografia liquida ad alte prestazioni accoppiato ad uno spettrometro di massa ad alta risoluzione (Orbitrap) e ad uno ionizzatore elettrospray in modalità negativa.
I recuperi del metodo variano dal 14 al 165%. PFBA è l'analita che mostra il recupero del 14%: gli autori interpretano questo dato considerando che tale composto ha una catena a quattro atomi di carbonio, per cui probabilmente un'elevata solubilità in acqua e probabilmente una bassa affinità verso la cartuccia C18.
I valori di LOD e LOQ sono risultati essere compresi rispettivamente tra 0.5 e 7.7 ng/g e tra 1.9 e 25.7 ng/g per tutti gli analiti tranne l'8:2 FTS che ha presentato un LOQ di 278.1 ng/g. Le rette di taratura sono risultate lineari tra 1 a 250 ng/g con $R^2 > 0.98$, tranne per PFBS e 4:2 FTS le cui rette sono risultate lineari tra 5 e 250 ng/g con $R^2 = 0.99$. [23]
Come descritto in precedenza, l'analisi *target* dei PFAS include acidi perfluorati carbossilici e solfonici (PFCA e PFSA) ma ignora i PFAS che possono degradare ed essere precursori di PFCA e PFSA, per cui si ottiene una sottostima della contaminazione totale di PFAS. Un dato cumulativo più affidabile può essere ottenuto misurando altri parametri, in particolare il fluoro organico estraibile (EOF) e il test per i precursori ossidabili totali (TOP). L'EOF quantifica la quantità di fluoro estratto in un campione, compresi i precursori; ovviamente il maggior difetto di questo parametro è che non è specifico per PFAS, in quanto altri composti fluorurati possono essere rilevati. Inoltre, ha una bassa sensibilità, e non fornisce informazioni sulle strutture dei composti. Il test TOP valuta invece la quantità di precursori sconosciuti ossidandoli con radicali idrossilici formando PFCA che può essere poi analizzato. Tuttavia, non tutti i PFAS si ossidano, per cui anche questa tecnica ha una bassa sensibilità.
M. Guckert et al. [6] hanno combinato i tre metodi descritti per valutarne la validità e per analizzare la contaminazione di PFAS nei sedimenti. L'EOF è stato misurato mediante un sistema CIC costituito da un autocampionatore, un'unità di assorbimento

e un cromatografo ionico. L'analisi strumentale per il test TOP e l'analisi *target* sono state eseguite con tre metodi distinti: la cromatografia ionica accoppiata allo spettrometro di massa quadrupolo-TOF, e altri due metodi con cromatografia liquida a fase inversa LC/MS/MS, uno per analisi PAP e l'altro per i restanti analiti. Per l'analisi IC-QTOF gli autori hanno sfruttato un sistema HPLC accoppiato ad uno spettrometro di massa a quadrupolo con rilevatore a tempo di volo e con ionizzazione elettrospray in modalità negativa. Per entrambi i metodi LC/MS/MS è stato usato un sistema HPLC accoppiato ad uno spettrometro di massa a triplo quadrupolo.
Per l'analisi EOF il LOQ è risultato pari a 10 µg/kg e il LOD a 5 µg/kg. La quantificazione è avvenuta mediante calibrazione esterna e la retta di calibrazione ha presentato un R^2 maggiore di 0.99. Il recupero degli standard è risultato essere pari a 88% ± 6 %.
Per le analisi *target* il LOQ risultato di 2.77 µg/kg e 2.85 µg/kg per il test TOP (il LOD non è stato fornito). I recuperi per l'analisi *target* sono variati dal 71 al 135% e quelli per il test TOP dal 59 al 91% (analisi ossidativa) e dal 79 al 125% (analisi nativa); la quantificazione è avvenuta con retta di calibrazione compresa nell'intervallo 0.01-10 µg/kg per l'analisi *target* e 0.1-100 µg/kg per il test TOP, con $R^2 > 0.99$ in entrambi i casi.
Gli autori hanno proposto questo approccio, che prevede di determinare tutti i parametri prima detti, considerato che ciascuno di essi presenta vantaggi e svantaggi. [6]

2.5. Matrice biologica

La determinazione dei PFAS in matrici biologiche, quali ad esempio il siero umano, è di estrema importanza per gli effetti tossicologici che la presenza di tali composti può causare.
D.-G. Heo et al. [7] hanno sviluppato un metodo basato sulla cromatografia liquida ad alte prestazioni accoppiata con spettrometria di massa per la determinazione della concentrazione nel siero umano di PFOA e PFOS.
Il problema principale di questa analisi è la mancanza di una matrice bianca, in quanto tutti gli esseri umani contengono probabilmente piccole quantità di tali composti. Per questo motivo, altri studi hanno optato per matrici surrogate come il siero bovino o suino che però hanno composizioni differenti e ciò può causare incertezze nella misura. Per risolvere questo problema, gli autori hanno sviluppato un metodo basato sulla spettrometria di massa che sfrutta come calibratori PFOA e PFOS marcati con $^{13}C_8$, i quali sono distinti dai PFOS e PFOA presenti nel siero fornendo diversi valori di m/z ma una risposta identica.
Per la preparazione dei campioni con un'estrazione sensibile e selettiva hanno combinato la precipitazione proteica con estrazione in fase solida (SPE). Come eluente hanno individuato acetonitrile al 50% con metanolo e contenente 0.2% di acido formico. L'acetonitrile al 50% ha mostrato migliore compatibilità con la cartuccia Strata™-X-AW SPE e migliore precipitazione di proteine mentre l'aggiunta di acido formico ha migliorato il recupero.
Per quantificare solo la concentrazione di PFOS lineare hanno separato, mediante cromatografia, il PFOS lineare da quello ramificato con un tempo di ritenzione di 5.5 minuti.
Per l'analisi hanno usato uno spettrometro di massa a triplo quadrupolo accoppiato con HPLC con ionizzatore ESI in modalità negativa e una colonna C18. Lo schema del procedimento è mostrato in Figura 10.

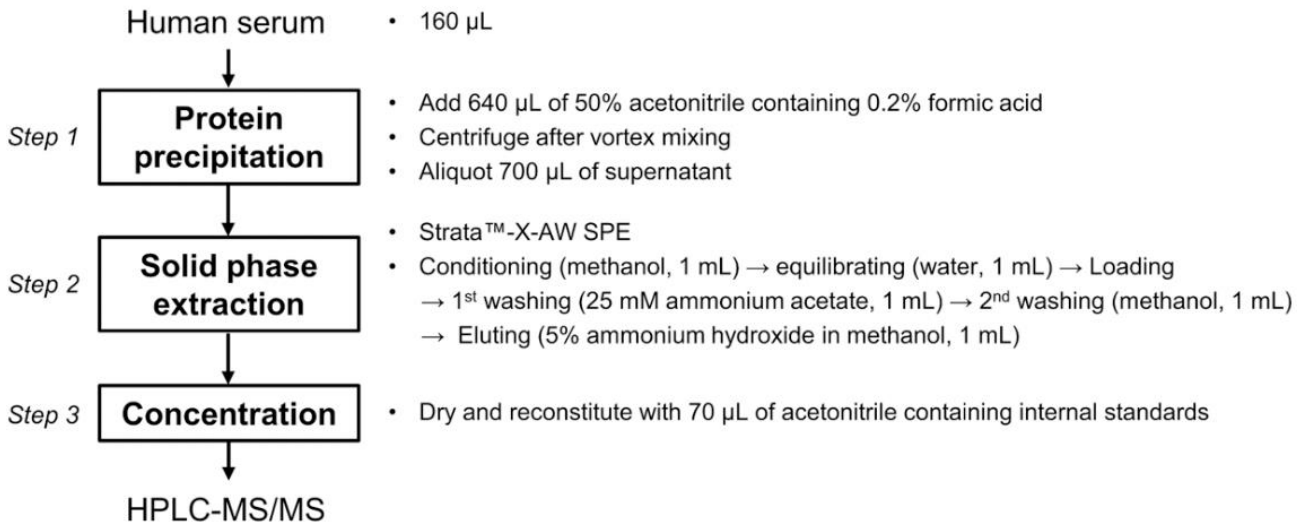

Figura 10 – Procedura ottimizzata di preparazione del campione per la determinazione di PFOA e PFOS nel siero umano (figura tratta da [7]).

I risultati hanno mostrato che il limite inferiore di quantificazione (LLOQ) è pari a 0.05 ng/mL; le curve di calibrazione per PFOA e PFOS sono risultate ottimamente lineari, con $R^2 > 0.99$.
I recuperi di PFOA sono stati pari a 103.2%, 101.4% e 103.1%, mentre per PFOS sono stati 87.0%, 88.2% e 102.9%. I tre valori sono riferiti rispettivamente a livelli di controllo di qualità bassi, medi e alti. [7]
Oltre ai PFAS sono stati individuati nel sangue umano e nei campioni di latte materno i ritardanti di fiamma organofosforici (OPFR), un'altra categoria di inquinanti organici con potenziali rischi per la salute umana. A causa dei problemi nella ripetizione dell'analisi sullo stesso campione biologico e il volume di campione insufficiente per determinare singolarmente i vari inquinanti, è di elevata importanza un metodo di determinazione simultanea multi-inquinante per valutare contemporaneamente il livello di esposizione di PFAS e OPFR.
Li et al. [24] hanno quindi sviluppato e validato un metodo per la determinazione di 16 PFAS e 7 OPFR nel siero umano. Solitamente il pretrattamento di questi inquinanti organici si fonda sull'estrazione in fase solida; per ottimizzare questo processo, riducendo il volume dei campioni di siero e dei solventi e per migliorare la velocità, il metodo descritto si basa invece sull'estrazione in fase liquida (LLE).
Per valutare il miglior solvente di estrazione sono stati confrontati i recuperi di vari solventi come MTBE, EA e n-esano; quello che ha fornito risultati migliori è stato MTBE con una singola estrazione usando 8 mL di solvente.
Tuttavia, i composti da analizzare coprono un ampio spettro di polarità e, a causa dell'elevata ionizzazione dei PFAS, essi non possono essere estratti direttamente dai campioni con solventi organici. Quindi si ricorre ad un reagente di accoppiamento ionico come il TBAH, il quale è in grado di formare coppie ioniche con i PFAS e ridurne così le caratteristiche di ionizzazione.
Per la separazione è stata utilizzata una colonna C18; come fase mobile è stata scelta una soluzione 2 mmol/L di acetato d'ammonio e metanolo perché questa ha fornito picchi con forma migliore e ha garantito la separazione efficiente dei composti entro 8 minuti di analisi.
L'analisi è stata eseguita su un sistema UPLC accoppiato ad uno spettrometro di massa a triplo quadrupolo in modalità di ionizzazione elettrospray positiva e negativa. Le rette di calibrazione sono risultate lineari con un $R^2 > 0.99$. Il LOD ed il LOQ sono stati compresi rispettivamente negli intervalli 0.004-0.650 ng/mL e 0.01-2.17 ng/mL. Infine, sono stati ottenuti recuperi compresi tra il 70.0% e il 118.9%. [24]

Questi contaminanti, oltre che nel siero umano, sono stati individuati anche nelle specie marine che sono esposte ad essi per assorbimento diretto o con l'alimentazione. Infatti, a causa del rilascio degli scarichi degli impianti industriali che producono o utilizzano PFAS, tali composti risultano essere presenti anche negli oceani, assieme a numerosi altri inquinanti.
E. L. Pulster et al. [4] hanno determinato la presenza e la concentrazione di PFAS nel plasma dei pesci Piastrella utilizzando una nuova tecnica di estrazione con una piastra a 96 pozzetti seguita dalla cromatografia liquida accoppiata alla spettrometria di massa ad alta prestazione. Il metodo di estrazione è basato sull'aggiunta di 100 µL di plasma nei 96 pozzetti della piastra seguita dall'aggiunta di 10 µL di standard interno. I campioni sono stati miscelati sulla piastra, sono stati aggiunti 390 µL di metanolo e la piastra è stata centrifugata. Il surnatante è stato trasferito in una seconda piastra a pozzetti pulita che è stata poi inserita direttamente nell'autocampionatore. L'analisi è stata eseguita con un UHPLC accoppiato ad uno spettrometro di massa a triplo quadrupolo con ionizzazione elettrospray. La separazione è avvenuta con una colonna C18.
I risultati ottenuti sono raccolti nella Tabella 2.

Tabella 2 – Intervalli delle curve di calibrazione (ng/L), limiti di rilevabilità (LOD) e limiti di quantificazione (LOQ) per ogni PFAS rilevato (tabella tratta da [4]).

Analyte#	Internal Standard	Min	Max	Avg. w/ SD	Slope	Y-intercept	R^2	LOD[a]	LOQ[b]
Syn32	M4PFHpA	0.19	3.22	1.22 ± 1.20	0.46	-0.05	0.9998	0.04	0.48
PFOS	M8PFOS	0.06	10.75	3.42 ± 4.13	1.33	-0.006	0.9999	0.02	0.07
PFNA	M9PFNA	0.02	5.00	1.30 ±1.85	0.94	0.001	1.0000	0.01	0.03
PFDA	M6PFDA	0.26	8.11	2.76 ± 2.99	1.04	-0.05	0.9998	0.05	0.10
PFDoDA	MPFDoDA	0.25	10.09	3.51 ± 3.50	0.97	-0.05	0.9996	0.01	0.05
PFUnDA	M7PFUnDA	0.26	10.93	3.66 ± 3.98	1.03	-0.13	0.9996	0.01	0.05
PFTrDA	M2PFTeDA	0.03	10.27	2.63 ± 3.76	0.97	0.003	0.9999	0.01	0.05
PFTeDA	M2PFTeDA	0.02	7.23	1.84 ± 2.55	0.91	-0.03	0.9999	0.01	0.03
PFOA	M8PFOA	0.27	11.97	4.02 ± 4.34	1.12	-0.12	1.000	0.01	0.03
PFHxDA	M2PFTeDA	0.42	9.12	3.44 ± 3.34	0.95	-0.13	1.000	0.009	0.02

Questo metodo risulta meno costoso di quelli tradizionali, permettendo così potenzialmente di condurre studi su larga scala. [4]

2.6. Matrice alimentare

Come detto nel capitolo 1, la principale via d'esposizione ai PFAS è l'alimentazione.
Genualdi S. et al. [25] hanno ottimizzato un metodo che avevano sviluppato in precedenza per l'analisi di PFAS negli alimenti. In particolare, il loro metodo precedente, basato sulla spettrometria di massa a triplo quadrupolo, non permetteva di determinare due PFAS a catena corta, l'acido perfluorobutanoico (PFBA) e l'acido perfluoropentanoico (PFPeA), per cui gli autori hanno sviluppato un metodo di conferma con la spettrometria di massa ad alta risoluzione.
Per l'estrazione dei PFAS dagli alimenti è stato utilizzato *QuEChERS*, un metodo rapido (*Quick*), facile (*Easy*), economico (*Cheap*), efficace (*Effective*), robusto (*Rugged*) e sicuro (*Safe*). In caso di matrici semplici è stato utilizzato l'estratto diretto mentre per matrici più complesse è stata necessaria un'estrazione in fase solida (SPE) con cartucce WAX per rimuovere gli interferenti. Gli analiti sono stati separati con una colonna C18 e una precolonna sempre C18; a causa dei numerosi componenti negli alimenti, la colonna deve essere lunga 150 mm per ottenere una risoluzione sufficiente tra gli analiti e i potenziali interferenti. La fase mobile è costituita da una soluzione 5

mM di acetato di ammonio e 5 mM di 1-metil piperidina in acqua e metanolo. Come strumento MS/MS gli autori hanno utilizzato uno spettrometro di massa QTRAP che è un ibrido tra un triplo quadrupolo e una trappola ionica, con sorgente a ionizzazione elettrospray; l'analisi è stata eseguita in modalità *Multi-Reaction-Monitoring* (MRM).
La presenza di PFBA e PFPeA è stata evidenziata grazie ad una transizione MRM, che tuttavia non è ritenuta sufficientemente affidabile, e pertanto si è utilizzata come tecnica di conferma la spettrometria di massa ad alta risoluzione. Quest'ultima è stata eseguita con cromatografo UPLC accoppiato ad uno spettrometro di massa Q-Exactive Orbitrap.
Per PFBA e PFPeA la risposta migliore su Q-Exactive è stata di 200 ng/kg o 1000 ng/kg a seconda dell'analita, mentre il LOD del metodo è compreso tra 31 e 67 ng/kg per PFBa e 17 e 31 ng/kg per PFPeA (Tabella 3).

Tabella 3 – Limiti di rilevabilità del metodo per 5 alimenti in ng/kg (tabella tratta da [25]).

Sample type	PFBA	PFPeA	PFHxA	PFHpA	PFOA	PFNA	PFDA	PFBS	PFPeS	PFHxS	PFHpS	PFOS	ADONA	HFPO-DA	9Cl-PF3ONS	11Cl-PF3OUdS
infant formula	58	17	18	12	12	7	12	3	15	14	20	7	11	10	6	4
cereal	67	22	40	43	17	11	12	9	20	13	21	28	7	21	13	3
gelatin	56	29	25	19	17	21	17	21	28	17	28	27	16	34	18	17
cream cheese	63	29	30	11	24	13	22	7	21	22	23	7	9	20	13	16
pancake syrup	31	31	48	31	22	29	15	20	23	35	36	20	25	32	20	17

*These values represent MDLs calculated during the method validation, the UCL reported during the sample set was 344 ng/kg and all PFBA detects must be confirmed using HR-MS

I recuperi per PFBA sono risultati compresi tra il 19 e il 116%, mentre per PFPeA oscillavano tra il 78 e il 117% in base all'alimento, come riportato in Tabella 4. [25]

Tabella 4 – Recupero dei PFAS di controllo da un gruppo di campioni (tabella tratta da [25]).

Sample type	PFBA	PFPeA	PFHxA	PFHpA	PFOA	PFNA	PFDA	PFBS	PFPeS	PFHxS	PFHpS	PFOS	ADONA	HFPO-DA	9Cl-PF3ONS	11Cl-PF3OUd
green peas	98	95	99	93	92	87	74	95	96	92	92	93	92	95	77	61
green peas	94	93	93	88	89	87	71	93	96	92	99	94	90	97	76	61
white sugar	97	100	102	108	94	99	97	99	92	94	101	96	91	117	97	98
whit sugar	98	97	101	101	90	100	96	99	97	95	111	98	84	70	103	103
fruit cocktail	94	96	100	103	86	99	99	95	102	96	111	96	86	89	100	102
fruit cocktail	91	94	100	101	85	97	96	94	98	94	108	97	86	85	98	101
tomato sauce	85	78	81	83	85	93	87	97	83	81	82	87	87	96	69	39
tomato sauce	86	80	83	84	88	93	89	96	87	85	84	90	87	97	78	54
grapefruit juice	105	107	109	105	104	107	107	106	109	107	109	103	102	106	107	109
grapefruit juice	106	107	106	104	105	107	106	103	103	106	106	103	104	96	105	100
canned corn	19	111	101	92	97	106	97	100	100	100	101	93	101	110	97	99
canned corn	19	117	104	100	102	110	101	106	108	103	107	102	101	99	101	103
baby food apples with fruit	89	100	101	99	102	102	103	104	96	103	107	100	101	94	101	101
baby food apples with fruit	98	100	106	102	100	102	101	102	104	115	103	110	98	100	108	106
non-dairy cream substitute	101	101	114	107	99	99	85	99	94	102	108	102	90	101	104	103
non-dairy cream substitute	107	104	110	107	102	104	89	105	99	103	116	106	92	106	103	107
milk chocolate candy bar	116	102	117	110	96	111	79	102	99	104	132	106	80	95	100	109
milk chocolate candy bar	111	98	111	105	94	106	74	98	90	95	125	109	79	90	99	104

Per tenere monitorato il livello di PFAS negli alimenti, *D. F. K. Rawn et al.* [1] hanno sviluppato a metà degli anni 2000 un metodo per la determinazione di PFAS aventi una lunghezza della catena di carbonio compresa tra 7 a 14. Successivamente, a causa della nuova diffusione di analoghi PFAS a catena più corta, hanno adattato la metodologia sviluppata per i composti a catena più lunga per includere quelli a catena

corta e in matrici alimentari diverse. Il metodo proposto punta a determinare 13 acidi perfluorocarbossilici con catena da 4 a 18 atomi di carbonio, otto solfonati con catene da 4 a 12, due esteri fosfato, due esteri difosfato e sei acidi telomerici.
Per l'estrazione dei campioni il metodo originale prevedeva l'uso di metanolo seguito da una centrifugazione, ma tale metodo non si è rivelato adeguato con l'aumento del numero di analiti. Gli autori hanno quindi scelto l'acetonitrile accoppiato all'uso di cartucce SPE-WAX per la pulizia, in quanto hanno fornito recuperi migliori.
L'analisi è stata eseguita con un cromatografo liquido ad alta pressione accoppiato ad uno spettrometro di massa a triplo quadrupolo con ionizzazione elettrospray in modalità negativa. Per la separazione hanno usato una colonna C18.
Per la determinazione dei PFAS hanno lavorato in modalità RMR ma hanno deciso di utilizzare una singola transizione per ciascun composto perché, se venissero mantenute due transizioni, con l'aumento del numero di analiti il tempo condiviso per ogni picco non sarebbe stato sufficiente per fornire abbastanza punti per la retta e consentire risultati quantitativi.
Di ogni analita sono state sviluppate curve di calibrazione a 6 punti e tutte hanno dato un coefficiente lineare $R^2 \geq 0.99$ tranne L-PFDoS per il quale $R^2 = 0.96$. I LOQ erano compresi tra 0.018 ng/g (per L-PFDS) e 5.28 ng/g (per FHEA), mentre i LOD ottenuti variavano da 0.006 ng/g a 1.76 ng/g rispettivamente per L-PFDS e FHEA in entrambi i casi. I recuperi medi hanno fornito valori compresi tra il 26% per il ^{13}C FDEA e l'80% per il ^{13}C PFHxA. [1]
L'esposizione alimentare umana ai PFAS può avvenire non solo perché gli alimenti stessi contengono i composti, ma anche in maniera indiretta poiché i PFAS possono trovarsi nei materiali utilizzati nella produzione, confezionamento e preparazione degli alimenti. L'autorità europea per la sicurezza alimentare EFSA ha previsto che il latte e i prodotti caseari sono vie d'esposizione cronica ai PFAS per le popolazioni vulnerabili. La causa dell'elevata contaminazione nel latte si è attribuita alla capacità del PFAA di legarsi alle proteine β-lattoglobuline nel latte vaccino.
N. I. Hill et al. [26] hanno sviluppato un nuovo metodo di digestione con solvente e pulizia del campione e lo hanno applicato a campioni di latte crudo.
Sono stati testati tre diversi trattamenti di estrazione e pulizia:

1. 0.1% di acido formico in metanolo seguito da pulizia con solo cartucce ENVI-Carb;
2. 0.1% di acido formico in metanolo seguita da pulizia con polvere Oasis WAX caricata con resina nelle cartucce ENVI-Carb;
3. 0.1% di idrossido di ammonio in metanolo seguito da pulizia con polvere Oasis WAX caricata nelle cartucce ENVI-Carb.

La presenza di acido formico o idrossido di ammonio serve a denaturare e precipitare le proteine che possono legare i PFAS come la β-lattoglobulina. Gli autori hanno condotto numerose prove, evidenziando come una combinazione dei trattamenti 1 e 3 sia quella ottimale per massimizzare i recuperi di tutti i PFAS.
L'analisi LC-MS/MS dei 27 PFAS è stata eseguita con un cromatografo liquido UFLC, equipaggiato di colonna C18, accoppiato ad uno spettrometro di massa QTRAP operante in modalità negativa. I recuperi sono risultati compresi tra il 69 ± 9% e il 141± 5%, ed il LOD varia da 0.8 a 22 ng/L per quasi tutti i PFAS tranne per PFBA per il quale è risultato pari a 144 ng/L. [26]

3. SENSORI

Come visto nei capitoli 1 e 2, la tecnica standard e più diffusa per analizzare i PFAS è la cromatografia liquida ad alte prestazioni (HPLC) accoppiata alla spettrometria di massa (MS). Questa tecnica possiede i vantaggi di fornire elevata precisione, sensibilità e selettività ma ha lo svantaggio di impiegare molto tempo e manodopera per il pretrattamento dei campioni come l'estrazione in fase solida (o liquido-liquido), rendendola quindi costosa e difficilmente applicabile per analisi in situ e per monitoraggi in tempo reale.
Alcuni degli articoli pubblicati nel 2022 considerano quindi delle tecniche completamente differenti per l'analisi dei PFAS, e in particolare l'uso di sensori. Essi sfruttano la tendenza di nanomateriali di assorbire PFAS sulla loro superficie per poi aggregarsi; il risultato è una modifica delle proprietà fisiche, chimiche o ottiche che possono essere sfruttate come indicatore.
Un materiale promettente è l'allumina anodica nanoporosa (NAA) prodotta dall'ossidazione elettrochimica dell'alluminio. Essa è costituita da array di nanopori cilindrici disposti esagonalmente, come mostrato in Figura 11.

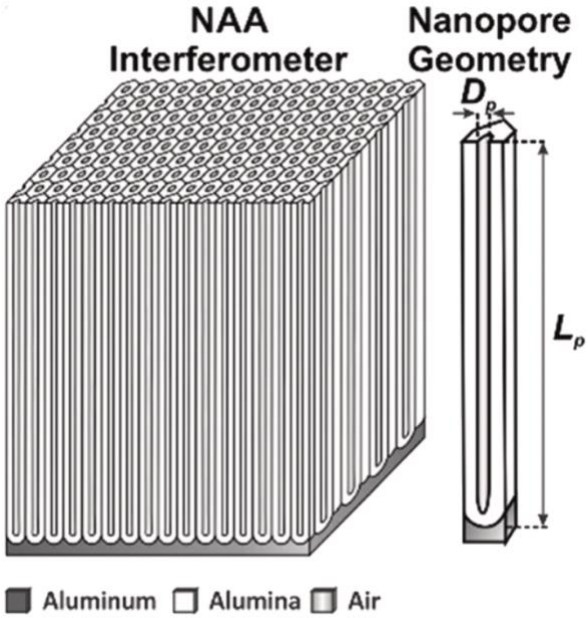

Figura 11 – Struttura idealizzata degli interferometri NAA con la definizione delle loro principali caratteristiche geometriche: diametro dei pori (Dp) e lunghezza dei pori (Lp) (Figura tratta da [27]).

Le sue proprietà ottiche possono essere combinate con la spettrometria di interferenza riflettometrica (RIfS), una tecnica ottica basata su interazioni tra luce bianca e film sottili a stato solido, per fornire un sistema di analisi alternativo alla massa.
In particolare, *C. S. Law et al.* [27] hanno sviluppato un metodo che combina interferometri ottici NAA perfluorosilanizzati e RIfS per il monitoraggio della formazione di monostrati (SAM) al contatto con PFOA.
Le interazioni tra PFOA e interferometri NAA sono state quantificate in tempo reale attraverso i cambiamenti nello spessore ottico effettivo (ΔOTeff) utilizzando RIfS. I suoi spettri sono stati misurati con uno nanospettrofotometro a fibra ottica.
Per l'analisi gli interferometri sono stati installati in un sistema di celle a flusso. Gli autori hanno prima stabilito una linea di base stabile iniettando acqua ultrapura, poi hanno iniettato una soluzione di PFOA, notando quindi un aumento di ΔOTeff degli interferometri NAA. Questo è causato dall'interazione F-F tra PFOA e le molecole FOTS, immobilizzate nell'interferometro, che forma monostrati autoassemblanti per

ridurre al minimo il contatto con l'acqua e ridurre le energie di legame. Quando l'interazione ha raggiunto la saturazione ΔOTef, che risulta evidente per la formazione di un *plateau*, il metodo prevede di re-iniettare acqua ultrapura nel sistema per rimuovere le molecole di PFOA non legate e stabilire il ΔOTeff finale (Figura 12).

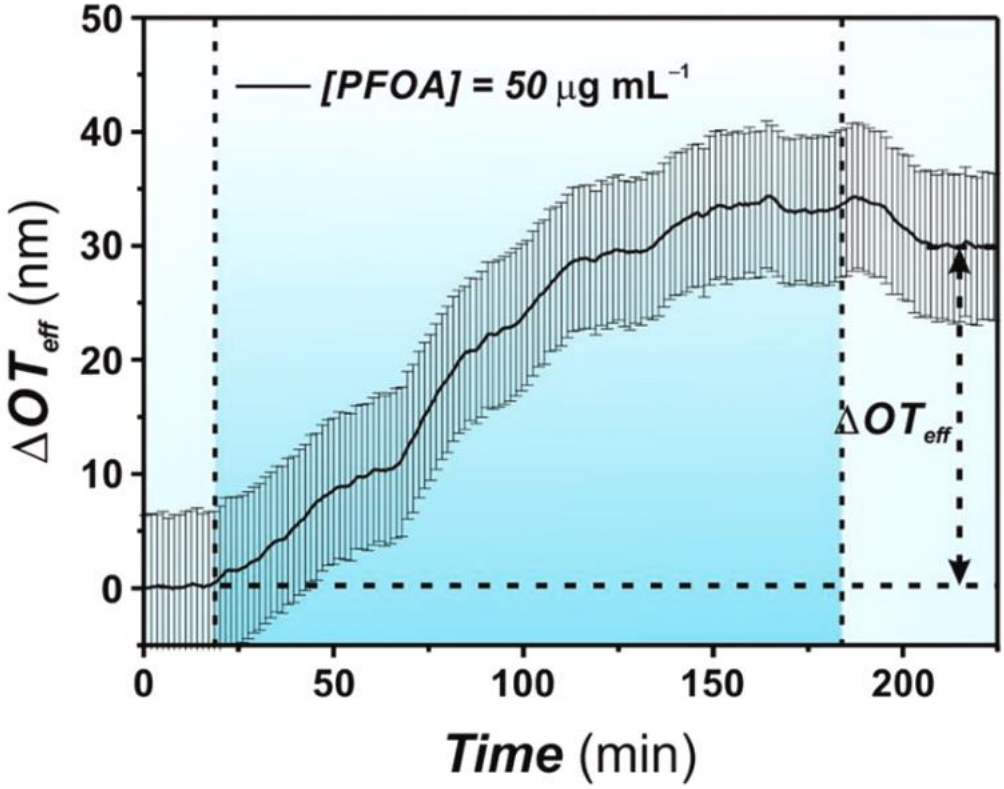

Figura 12 - Monitoraggio rappresentativo in tempo reale di ΔOTeff in risposta all'interazione PFOA–FOTS (figura tratta da [27]).

L'analisi della risposta ottica ha permesso di stabilire un LOD di 0.53 ± 0.080 µg/mL e una linearità con R^2 = 0.97. Le prestazioni del metodo sono considerate inferiori a quelle richieste per l'analisi della qualità dell'acqua potabile; tuttavia, è stato dimostrato che il metodo è semplice e diretto, e può rappresentare un valido *screening* per i PFAS presenti dopo il trattamento delle acque. [27]

Esistono anche altri sensori per PFAS che invece prevedono l'utilizzo di polimeri ad *imprinting* molecolare (MIP) come metodo di riconoscimento. Essi sono applicati a *platform* di riconoscimento potenziometrico, voltammetrico, fluorometrico e fotoelettrochimico. Ma, anche se la maggior parte di questi sensori basati su MIP determinano i PFAS con concentrazioni inferiori ai 70 ng/L (limite di avviso EPA), non hanno una specificità ottima e sono soggetti a falsi positivi. Al contrario i sensori basati su anticorpi specifici verso il PFOA forniscono migliore specificità, ma il LOD del sensore resta peggiore rispetto ai requisiti EPA. Per risolvere questi problemi, *R. Ranaweera et al.* [28] avevano già sviluppato un metodo di preconcentrazione basato sull'assorbimento spontaneo di PFAS sulla superficie delle bolle idrogeno generate elettronicamente e sulla successiva formazione di un aerosol di goccioline, arricchite di PFAS, quando la bolla si rompe. Infatti, dopo la rottura, solo lo sottile strato di liquido con un'elevata concentrazione che si trova attorno alla bolla si libera nell'aria trasferendo i PFAS lì presenti nell'aerosol. Gli stessi autori hanno quindi migliorato questo metodo di preconcentrazione utilizzando bolle di gas generate anodicamente, invece che catodicamente, facendo così aumentare il fattore di arricchimento PFAS da 15 a 105%.

L’aerosol è formato in una cella elettrochimica a due scomparti ognuno dei quali è dotato di un elettrodo di Nichel; le bolle sono generate mediante elettrolisi dell’acqua e, una volta esplose, vengono raccolte su un vetrino a parte.
Durante l’arricchimento dell’aerosol il raggio della bolla svolge un ruolo importante: minori sono le dimensioni, maggiore è l'efficienza di preconcentrazione. Il miglioramento dell’efficienza è dovuto anche al fatto che le bolle vengono generate all’anodo dove l'interazione tra anodo caricato positivamente e PFAS caricati negativamente è maggiore. [28]

4. CONCLUSIONI

Sebbene i PFAS più comuni, come PFOA e PFOS, siano ora sotto costante monitoraggio da parte di autorità regionali e nazionali, vi sono molte altre sostanze fluorurate che li hanno sostituiti e che presentano anch'esse dei problemi e dei pericoli. Nel medio periodo risulta quindi essenziale ridurre l'utilizzo di tali sostanze e cercare delle alternative non tossiche, mentre nel breve periodo è importante monitorare la presenza di tali composti in tutte le matrici dove essi possono essere presenti. Per questo motivo, la letteratura è molto ricca di articoli nei quali sono proposti nuovi metodi di analisi dei PFAS nelle più svariate matrici.
In questo lavoro di tesi sono stati considerati i nuovi metodi di analisi di PFAS proposti in letteratura nel 2022.
La maggioranza degli articoli descritti si concentra sullo sviluppo di nuovi metodi per la matrice acquosa, che rimane una di quelle di maggior interesse data la notevole presenza di inquinanti; vi sono comunque articoli riferiti al monitoraggio dei PFAS negli alimenti, nel siero umano o in altre matrici.
Gli obiettivi principali che si propongono i vari autori sono il miglioramento della velocità dei metodi e la diminuzione del loro costo, cercando allo stesso tempo di conservare i buoni LOD, recuperi, precisioni, sensibilità.
Gli approcci seguiti per raggiungere tali obiettivi sono stati diversi. Molti autori si sono concentrati sulla fase di pretrattamento dei campioni, proponendo nuovi materiali e solventi per l'estrazione in fase solida; altri autori sono invece intervenuti nel metodo di ionizzazione o di separazione cromatografica, quasi sempre accoppiati a strumenti di rivelazione ad alta risoluzione.
Si ritiene che nei prossimi anni l'attenzione si sposterà allo sviluppo di analisi *untarget* in modo da poter identificare tutti i nuovi PFAS che si stanno diffondendo, con l'obiettivo successivo di procedere con la loro quantificazione.
Sebbene le tecniche di cromatografia accoppiate alla spettrometria di massa restino quelle di riferimento, un ruolo chiave sarà molto probabilmente svolto anche dai sensori di PFAS grazie alla loro semplicità, portabilità ed economicità.

5. BIBLIOGRAFIA

[1] Rawn, D.F.K.; Ménard, C.; Yu Feng, S. *F. Add. Contam.: Part A* **2022**, *39:4*, 752-756.

[2] Enders, J.R.; O'Neill, G.M.; Whitten, J.L.; Muddiman, D.C. *Anal. Bioanal. Chem.* **2022,** *414*, 1227–1234.

[3] Huerta, B.; McHugan, B.; Regan, F. *Anal. Methods* **2022**, *14*, 2090-2099.

[4] Pulster, E.L.; Wichterman, A.E.; Snyder, S.M.; Fogelson, S.; Da Silva, B.F.; Costa, K.A.; Aufmuth, J.; Deak, K.L; Murawski, S.A.; Bowden, J.A. *Sci. Tot. Environ.* **2022,** *809,* 1-10

[5] Heo, D.; Lee, D.; Kwon, Y.; Seol, M.; Moon, J.S.; Chung, S.M.; Kim, *J. Jour. Chrom. B* **2022**, *1192*, 1-8.

[6] Wallace, S.; Lambrakos, S.G.; Shabaev, A.; Massa, L. *Struct. Chem.* **2022**, *33*, 247-256.

[7] Guckert, M.; Scheurer, M.; Schaffer, M.; Reemtsma, T.; Nödler, K. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2022**.

[8] Enders, J.R.; Weed, R.A.; Griffith, E.H.; Muddiman, D.C. *Rap. Comm. M. Spect*. **2022**, *36*, 1-10.

[9] Fiorenza, S.; Denly, E.; CEAC, R.J.V; Nigro, N.; Leahy, M.C.; Neslund, C.; Blye, D.R.; Farmer, N. *Rem.* **2022**, *32*, 9-17.

[10] Addink, R.; Hall, T. *LCGC Nor. Am.* **2021**, *39*, 430-434.

[11] Shoemaker, J.A.; Grimmett, P.E.; Boutin, B.K. *EPA Document #: EPA/600/R-18/352* **2018.**

[12] Rosenblum, L.; Wendelken, S.C. *EPA Document No.815-B-19-020* **2019.**

[13] Liu, F.; Jiang, S.; You, S.; Liu, Y. *Front. Environ. Sci. Eng.* **2023**, *17*, 2-20.

[14] Leonello, D.; Fendrich, M.A.; Parrino, F.; Patel, N.; Orlandi, M.; Miotello, *Appl. Sci.* **2021**, *11*, 1-20.

[15] Selahle, S.K.; Mpupa, A.; Nomngongo, P.N.; *Ar. Jou. Chem.* **2022**, *15*, 1-15.

[16] Wu, C.; Qi, W.; Chen, H.; Li, M. *Wat. Res.* **2022**, *219*, 2-13.

[17] Koronaiou, L.; Nannou, C.; Xanthopoulou, N.; Seretoudi, G.; Bikiaris, D.; Lambropoulou, D.A. *Micr. Jou.* **2022**, *179*, 1-11.

[18] Yang, L.; Binbin, S.; Haochen, C.; Zhu, L.; Shan, G. *Int. Jou. An. Chem* **2022**, *2022*, 1-8.

[19] Valdiviezo, A.; Aly, N.A.; Luo, Y.; Cordova, A.; Casillas, G.; Foster, M.; Baker, E.S.; Rusyn, I. *Jou. Environ. Sci.* **2022**, *115*, 352-362.

[20] Niu, X.; Abrell, L.; Sierra-Alvarez, R.; Field, J.A.; Chorover, J. *Jou. Chrom. A* **2022**, *1664*, 1-7.

[21] Seró, R.; Ayala-Cabrera, J.F.; Santos, F.J.; Moyano, E. *An. Chim. Ac.* **2022**, *1204*, 1-11.

[22] Kourtchev, I.; Hellebust, S.; Heffernan, E.; Wenger, J.; Towers, S.; Diapouli, E.; Eleftheriadis, K. *Sci. Tot. Environ.* **2022**, *835*, 1-13.

[23] Dickman, R.A.; Aga, D.S. *Anal. Bioan. Chem.* **2022**, *414*, 4497-4507.

[24] Li, J.; Li, Q.; Li, J.; Zhang, Y. *Rap. Comm. M. Spect.* **2022**, *36*, 1-10.

[25] Genualdi, S.; Beekman, J.; Carlos, K.; Fisher, C.M.; Young, W.; DeJager, L.; Begley, T. *Anal. Bioan. Chem.* **2022**, *414*, 1189-1199.

[26] Hill, N.I.; Becanova, J.; Lohmann, R. *Anal. Bioan. Chem.* **2022**, *414*, 1235-1243.

[27] Law, C.S.; Wang, Gunenthiran S.; Lim, S.Y.; Abell, A.D.; Ahrens, L.; Kumeria, T.; Santos, A.; Voelcher, N.H. *Sens. Act.: B. Chem.* **2022**, *355*, 1-10.

[28] Ranaweera, R.; An, S.; Cao, Y.; Luo, L. *Anal. Bioan. Chem.* **2022**.