

The logo for ENEA, featuring the word "ENEA" in a bold, white, sans-serif font. To the left of the text is a stylized graphic of a sun or starburst with a bright yellow and orange center, radiating outwards.

AGENZIA NAZIONALE  
PER LE NUOVE TECNOLOGIE, L'ENERGIA  
E LO SVILUPPO ECONOMICO SOSTENIBILE

# Metodi analitici per la determinazione di composti antivegetativi in ambiente marino

Dr. Giuseppe Di Landa – UTTP-CHIA

**Workshop Progetto CARISMA**

**Roma 13 dicembre 2012**



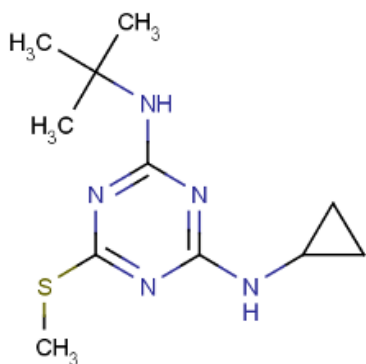
# Pitture antivegetative (AF) in uso

- Nella formulazione contengono come componente AF principale il rame metallico e/o un suo composto ( $\text{Cu}_2\text{O}$ ,  $\text{CuSCN}$ )
- Si utilizza un biocida secondario (*booster biocide* o *co-biocide*) per incrementare l'efficienza antivegetativa verso l'intera gamma di organismi responsabili del fouling

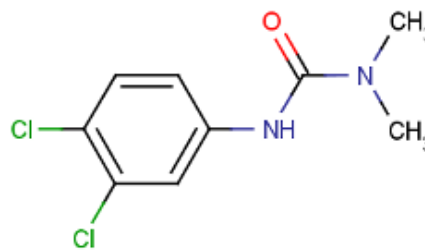
Nome comune	Nome chimico	Classe	Log $k_{ow}$	Persistenza, $t_{1/2}$
Irgarol 1051	2-methylthio-4- <i>tert</i> -butylamino-6-cyclopropilamino- <i>s</i> -triazine	<i>s</i> -Triazine	2.38	100-350 d (sw)
Diuron	3-(3,4-dichlorophenyl)1,1-dimethylurea	Phenylurea	2.85	1 m-1 y (sw)
Dichlofluanid	<i>N</i> -dichlorofluoromethylthio- <i>N',N'</i> -dimethyl- <i>N</i> -phenylsulfamide	Organochlorine	3.7	18 h (sw)
Chlorothalonil	2,4,5,6-tetrachloro-isophthalonitrile	Organochlorine	2.64	1.8-8 d (sw)
Sea-Nine 211	4,5-dichloro-2- <i>n</i> -octyl-4-isothiazolin-3-one	Isothiazolone	2.85	< 1 d (sw)
Zinc pyrithione	Zinc 2-pyridinethiol-1-oxide	Organometallic salt	0.97	< 1 d (sw)

# Biocidi booster più comuni

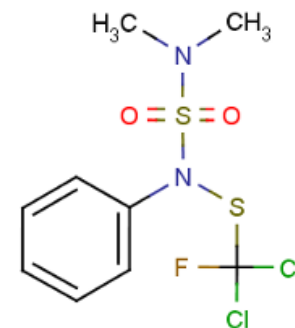
- Questi composti presentano proprietà chimico-fisiche molto differenti e pertanto differenti saranno il destino ambientale, il comportamento e gli effetti tossici



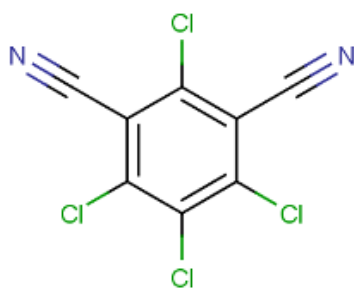
**Irgarol 1051**



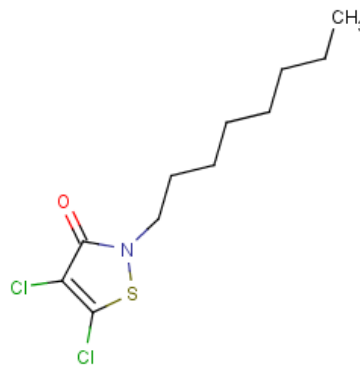
**Diuron**



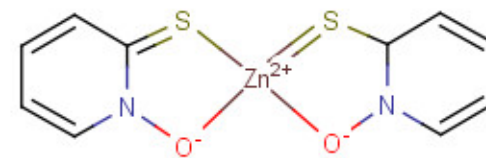
**Dichlofluanid**



**Chlorothalonil**



**Sea-Nine 211 (DCOIT)**



**Zinc pyriithione**

- La maggior parte dei metodi sono stati sviluppati nell'ambito del progetto EU intitolato "Assessment of Antifouling Agents In Coastal Environments (ACE)"
- I biocidi booster sono presenti nell'ambiente marino a livelli relativamente bassi (*trace analytes*) per cui è necessario sviluppare metodi con un limite di rivelabilità (LOD) dell'ordine dei ng/L ed anche inferiori se possibile
- Tipo di campioni di origine marina:
  - acqua di mare, sedimento, biota
- E' necessario ricorrere a tecniche di preparazione preliminari all'analisi del campione per ottenere un'adeguata preconcentrazione e secondariamente rimuovere le interferenze
- Per l'acqua di mare corrono volumi di campione dell'ordine dei litri

# Sample Preparation (seawater)



- Le principali tecniche impiegate per i campioni acquosi prevedono:
  - Liquid-Liquid Extraction (LLE)
  - Solid Phase Extraction (SPE)
- Tecniche di estrazione alternative sono state riportate in letteratura:
  - Solid Phase Microextraction (SPME)
  - Single Drop Microextraction (SDME)
  - Passive samplers
  - Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)
- Generalmente si sviluppano metodi multi-componente o multi-residuo



# Liquid-Liquid Extraction (LLE)

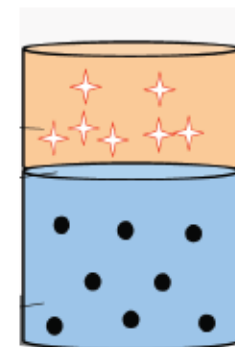
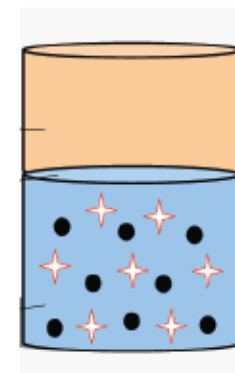
Utilizzo di un solvente organico immiscibile con l'acqua per ottenere la partizione degli analiti di differente polarità

## Vantaggi:

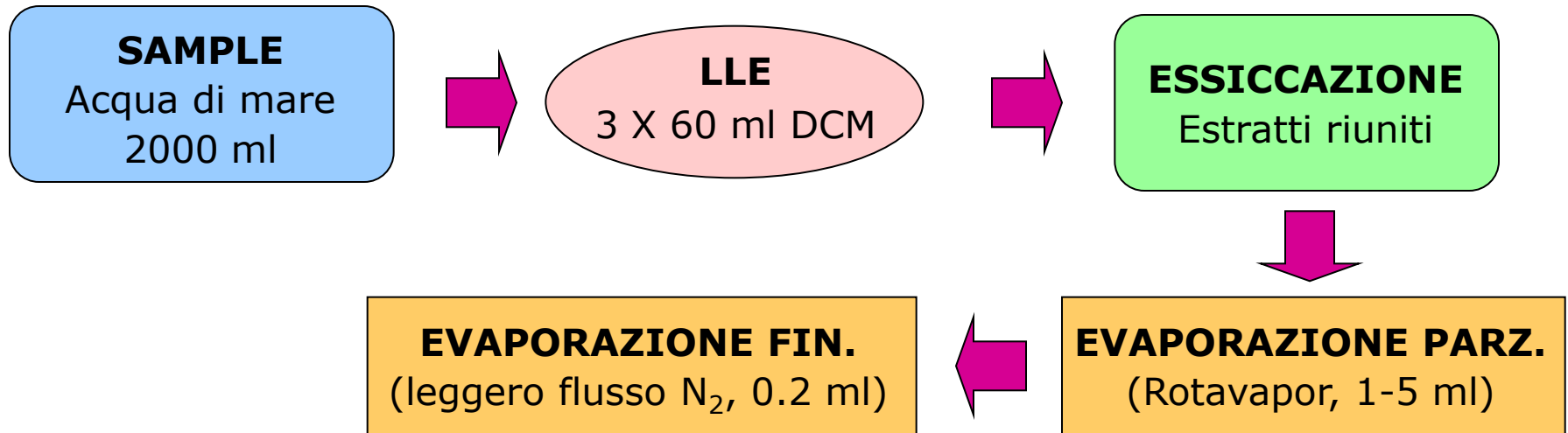
- Basso costo
- Attrezzatura facilmente reperibile (imbuto separatore)
- Rimuove efficacemente interferenti inorganici e sali

## Limiti:

- Non si ottiene concentrazione degli analiti
- Utilizzo di grossi volumi di solventi (clorinati)
- Mancanza di selettività
- Difficile da automatizzare



- Solvente più utilizzato per LLE è il diclorometano (DCM)
- Volume di acqua di mare: 1 – 4 L
- Si può omettere la filtrazione del campione



- Essiccazione estratti organici:
  - Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anidro
  - Congelamento overnight
- LLE: agitazione magnetica per 0.5-1 h o in imbuto separatore per pochi min

**Conditioning:** Preparazione della fase stazionaria prima dell'aggiunta del campione

**Load:** Gli analiti di interesse ed anche eventuali interferenti adsorbono sulla superficie della fase stazionaria durante il passaggio del campione (flusso  $<10\text{ml/min}$ )

**Washing:** Eliminazione degli interferenti indesiderati

**Elution:** Desorbimento selettivo dalla fase stazionaria/cartuccia e raccolta degli analiti desiderati

**C L W E**

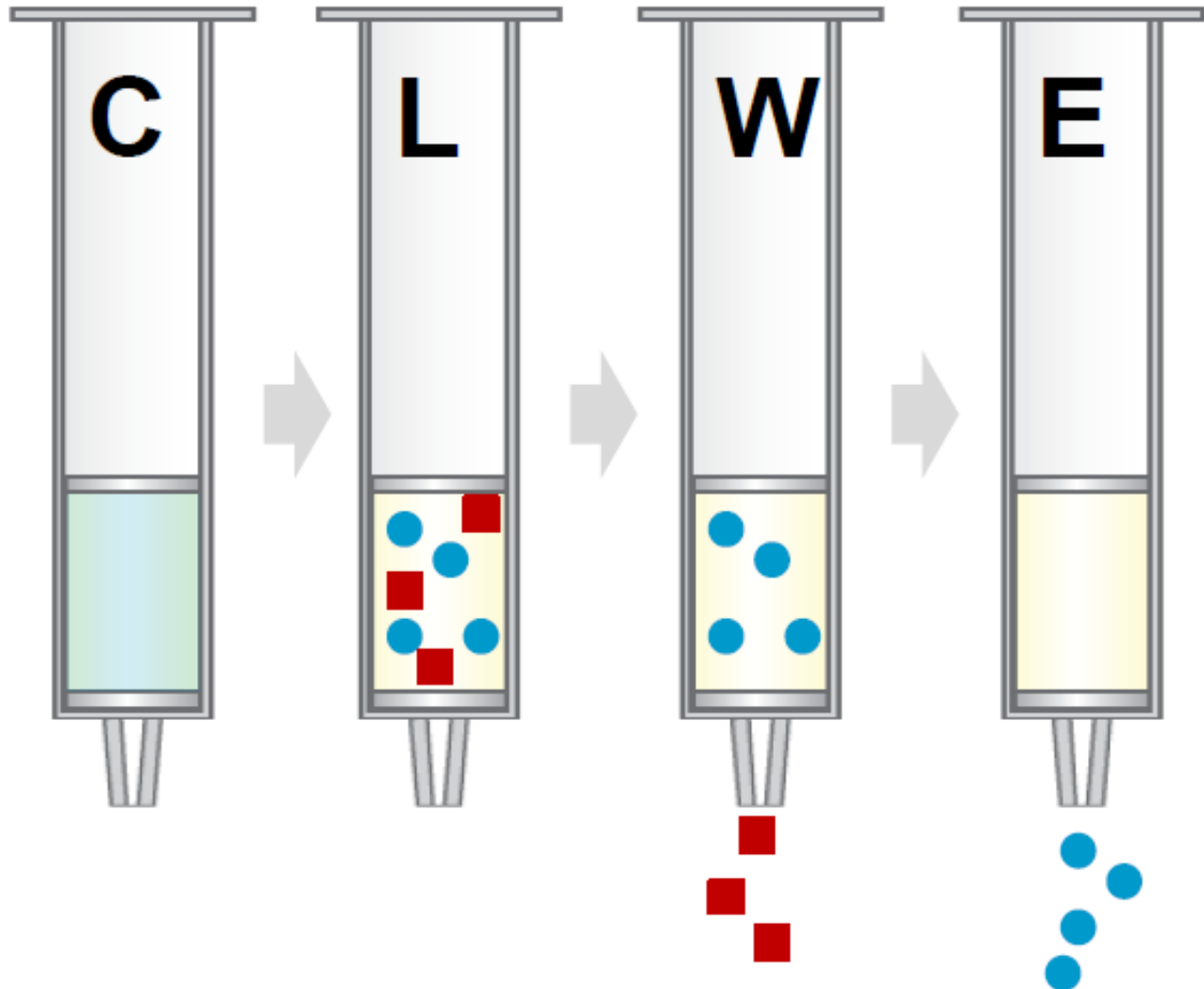




# SPE Workflow



Sample  
Pre-treatment





- Silica based materials
  - C<sub>18</sub> bonded silica
- Polymeric materials
  - Poly(N-vinylpirrolidone-divinylbenzene) copolymer (PVP-DVB; Oasis HLB)
  - Polystyrene-divinylbenzene copolymer (PS-DVB; Lichrolut EN)
  - Hydroxilated polystyrene-divinylbenzene copolymer (PS-DVB-OH; Isolute ENV+)
  - Methacrylate-divinylbenzene copolymer (MA-DVB; Excelpak SPE-GLF)
  - Fasi specifiche (Isolute Triazine; Envirelut Herbicide o Pesticide)
- Graphitized Carbon Black (GCB)

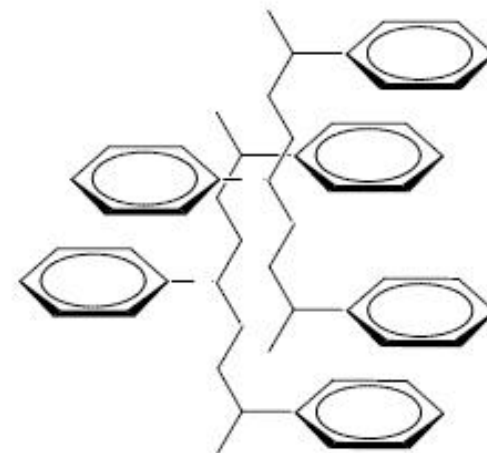
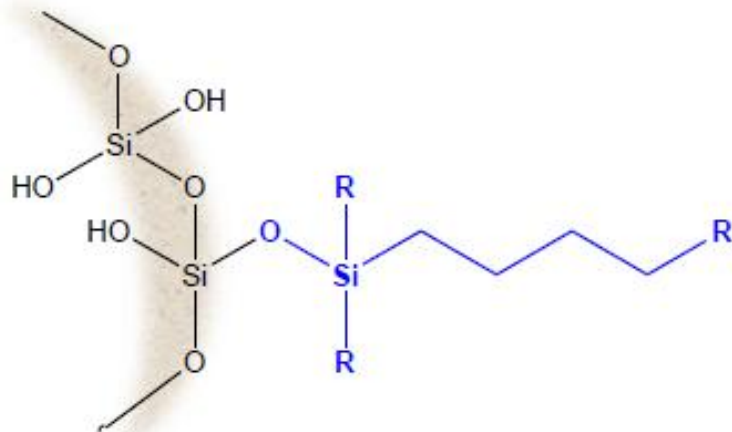
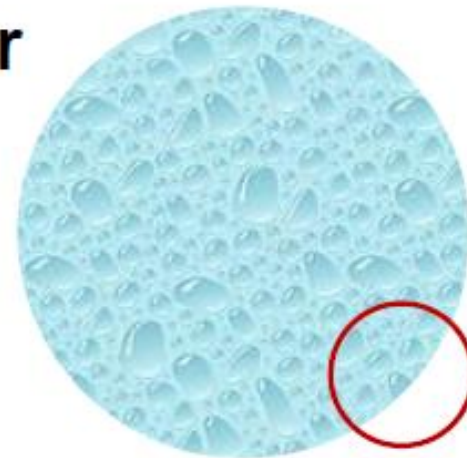


# Silica based versus polymeric SPE

**Silica**

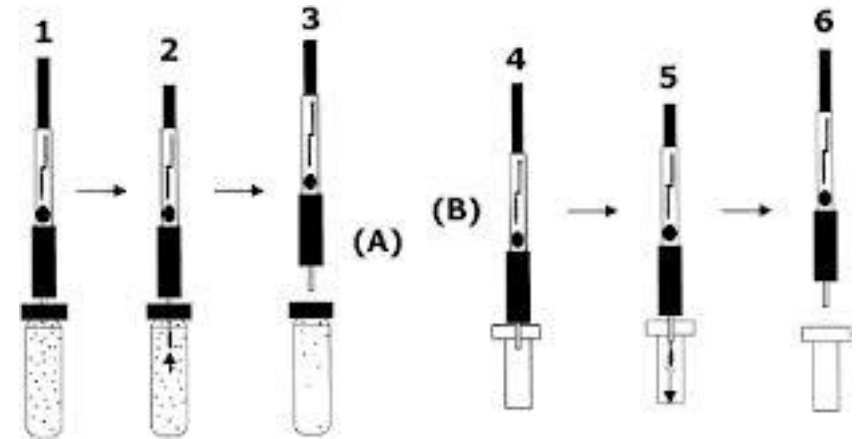
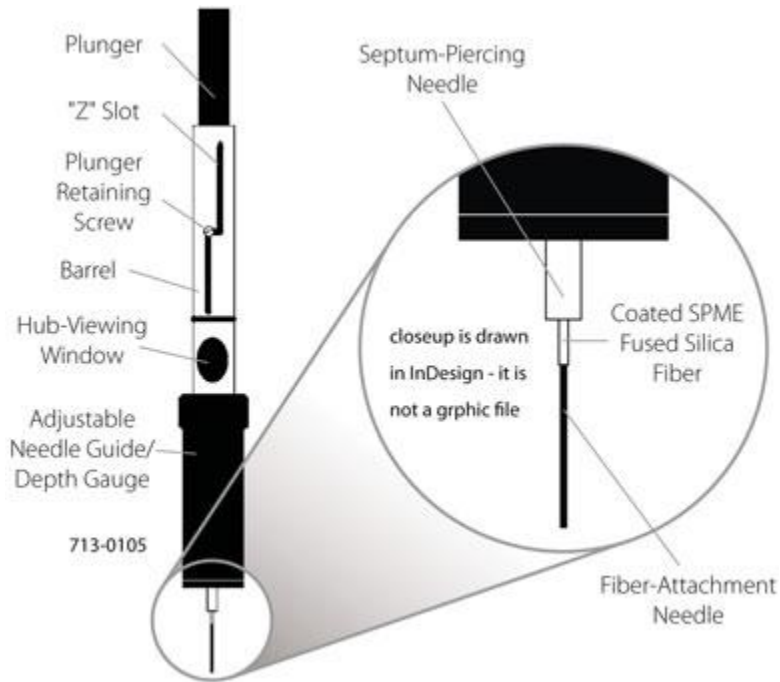


**Polymer**



- Confronto tra cartucce C18 e PS-DVB/ PS-DVB-OH per l'estrazione di irgarol 1051, diuron e prodotti di degradazione (Gatidou et al 2005):
  - PS-DVB/ PS-DVB-OH: minore sorbent mass necessaria per l'estrazione (200 vs 500-1000 mg)
  - PS-DVB/ PS-DVB-OH: recuperi più alti per sostanze polari (ad es. prodotti di degradazione) grazie ai differenti meccanismi di adsorbimento (interazioni dipolo-dipolo, legami ad H, interazioni  $\pi$ - $\pi$ )
  - Recuperi soddisfacenti (>70%) con entrambi i tipi di cartuccia, tranne per 3,4 dichloroaniline
  - Solvente di eluizione più efficiente risulta il MeOH rispetto a DCM-AcN, 5:1, v/v
- Cartucce GCB: riescono ad estrarre i principali biocidi AF (tranne ZnPT) ma l'eluizione è difficoltosa (2 ml MeOH + 18 ml DCM: MeOH, 8:2, v/v). Scarsa riproducibilità batch-to-batch del materiale. (Martinez et al. 2000)

- L'evaporazione dell'estratto organico ottenuto dopo l'eluizione rappresenta uno step critico e può determinare perdite per alcuni biocidi. Parametri da controllare:
  - Temperatura bagno ad acqua
  - Flusso di N<sub>2</sub> deve essere molto leggero
  - Alcuni autori decidono di non evaporare a secchezza
- Envirelut Pesticide: permette di usare 1 ml MeOH per eluire efficacemente i biocidi AF evitando totalmente lo step di evaporazione (Sanchez Rodriguez et al. 2011)
- Determinazione del dichlofluanid: è necessario preservare il campione dalla degradazione di tale sostanza al pH dell'acqua di mare ( $t_{1/2} = 18$  h) durante la conservazione. Si acidifica a pH < 4.



Processo all'equilibrio che riguarda la partizione degli analiti tra il campione liquido e la fase polimerica (fibra) in accordo con i loro coefficienti di ripartizione,  $k_d$



- Scelta di una fase stazionaria appropriata ossia con  $k_d$  favorevole:
  - Polydimethylsiloxane (PDMS)
  - Polyacrilate (PA)
  - Fasi miste (CW-DVB; PDMS-DVB)
- Ottimizzazione delle condizioni che influenzano il  $k_d$  risulta fondamentale:
  - Forza ionica (salting out effect)
  - pH
  - Velocità di agitazione
  - Tempo di esposizione della fibra
  - temperatura
- Preparazione del campione semplificata: sono sufficienti piccoli volumi di campione (5-10 ml); tecnica solvent-free; possibile automazione; tecnica di preparazione più adatta al GC/GC-MS



- Tecnica analitica adatta alla separazione e determinazione della maggior parte dei biocidi AF, tranne il diuron e ZnPT
  - Diuron è un composto termolabile e si determina di solito con LC
  - Processo di derivatizzazione preliminare per det. diuron in GC
- Condizioni comunemente utilizzate per analisi GC di biocidi AF:
  - Colonne GC capillari (ad es. 30m X 0.25 mm X 0.25  $\mu$ m) con fasi stazionarie generiche (methylpolysiloxane o 5% phenyl-methylpolysiloxane)
  - Programmata di T da 60-80 ° C a 280-320 ° C
  - Iniezione in modalità splitless: 2  $\mu$ l; iniezione di volumi maggiori (10  $\mu$ l) con programmata elettronica della pressione in testa alla colonna
- I detector GC classici sono stati in alcuni casi adoperati:
  - Electron capture detector (ECD)
  - Flame thermoionic detector (FTD)
  - Flame ionization detector (FID)
  - Nitrogen phosphorous detector (NPD)

- Tecnica analitica più frequentemente utilizzata
  - Fornisce un maggior grado di fiducia nell'identificazione di questi analiti nei campioni ambientali
  - Offre un buon incremento di sensibilità lavorando in modalità selected ion monitoring (SIM) o, più recentemente, in tandem (MS/MS)
- Analizzatori di massa comunemente accoppiati al GC:
  - Quadrupolo
  - Trappola ionica
- Sorgenti ioniche:
  - Impatto elettronico (EI). Risulta la modalità di ionizzazione preferita da molti autori per la buona frammentazione e l'esistenza di librerie di spettri affidabili
  - Ionizzazione chimica in modalità ioni - (NCI) permette un incremento di sensibilità per alcune molecole (chlorothalonil, dichlofluanid, Sea nine 211)

- Tecnica analitica che si è sviluppata nell'ultimo decennio ed ormai ampiamente accettata ed utilizzata nelle analisi ambientali
  - Permette di ottenere un aumento di sensibilità rispetto alla GC-MS
  - E' molto selettiva e permette efficacemente di discriminare gli analiti target da possibili interferenti
  - Rende possibile determinare la maggior parte dei biocidi AF
- Analizzatori di massa comunemente accoppiati al LC:
  - Singolo quadrupolo
  - Triplo quadrupolo
  - Trappola ionica
- Tecniche di ionizzazione:
  - Electrospray ionization (ESI)
  - Atmospheric pressure chemical ionization (APCI)



- Separazione degli analiti mediante HPLC in fase inversa
  - C18 è la fase comunemente utilizzata
  - C8 è stata utilizzata in qualche lavoro
  - Dimensioni particelle fase stazionaria più comuni: 5  $\mu\text{m}$
  - Particelle di dimensione inferiore (2.4 e 3  $\mu\text{m}$ ) riportate negli articoli più recenti. Finora non è stato mai utilizzato UHPLC
  - Eluenti: MeOH o AcN miscelato ad un tampone volatile adatto a MS con ionizzazione a pressione atmosferica (ammonium acetate, formic acid o ammonium formate)
  - Eluizione generalmente in gradiente ma anche in isocratica



# Nostra procedura analitica biocidi AF

## SAMPLE

Acqua di mare  
500 ml, filtrazione 0.45  $\mu\text{m}$

**Condition:** 2 X 2.5 ml MeOH,  
2 X 2.5 ml H<sub>2</sub>O

**Load:** 500 ml seawater, flusso <10  
ml/min

**Wash:** 2 X 3 ml H<sub>2</sub>O

**Dry:** sotto vuoto (-50 kPa) per 20 min

## SOLID PHASE EXTRACTION (SPE)

Styrene-divinylbenzene copolymer  
Elution: 3 X 3 ml MeOH

## EVAPORATION STEP

A secchezza sotto lieve flusso N<sub>2</sub>, 35 ° C  
Aggiunta IS (atrazine-d5, 100 ng)  
Ricostituzione in 500  $\mu\text{l}$  eluente HPLC  
filtrazione 0.2  $\mu\text{m}$

## LC-MS

ESI in modalità ioni +  
SIM (2-3 ioni per composto)

- Strumentazione: API 150 EX MS singolo quadrupolo (AB Sciex) dotato di sorgente TurboIonspray + sistema HPLC serie 200 con autosampler(PE)
- Separazione HPLC
  - Colonna LUNA C18 (50 X 4.6 mm; 3  $\mu$ m)
  - Eluizione in gradiente con MeOH (A) e 10 mM NH<sub>4</sub>Ac (B) ad un flusso di 0.75 ml/min. Gradiente lineare da 55% A a 86% A in 12.5 min, poi lavaggio al 90% A per 5 min
  - Utilizzo di uno splitter post-colonna di opportuna lunghezza per introdurre 110  $\mu$ l/min in sorgente ESI
  - Volume di iniezione: 50  $\mu$ l
- Condizioni MS
  - Time scheduled acquisition in modalità SIM con dwell time 170-200 ms per ciascun ione
  - **Diuron**: m/z=233, 235, 72
  - **irgarol 1051**: m/z=254, 198

- Il metodo è selettivo applicando il sistema degli Identification Points (IP) secondo E.C. Decision 2002/657/EC:
  - Almeno 3 IP sono richiesti per confermare la presenza di un analita ossia 3 ioni monitorati nel caso si usi un singolo quadrupolo
  - L'intensità relativa degli ioni monitorati può variare entro  $\pm 20\%$  rispetto a quella osservata in uno standard di calibrazione
- I recuperi ottenuti in campioni di acqua di mare non contaminata (reference), spiked con gli analiti di interesse, risultano soddisfacenti ( $> 70\%$ ) e la ripetibilità accettabile
  - I recuperi sono  $104 \pm 5\%$  e  $111 \pm 3\%$ , rispettivamente per **irgarol** e **diuron**
- I limiti di rivelabilità (LOD) dell'intero protocollo analitico risultano  $0.2$  e  $1$  ng/L rispettivamente per **irgarol**, **diuron**
- Curve di calibrazione risultano lineari a basse conc. mentre ad alte conc. è necessario interpolare con una quadratica
- QC/QA: standard di calibrazione ogni 5-6 campioni

- Abbiamo cercato di esaminare i diversi approcci analitici per determinare i biocidi booster in acqua di mare
- Le tecniche di estrazione più comunemente utilizzate per determinare questi composti sono LLE e SPE sebbene alcune tecniche alternative come SPME sono state applicate con successo
- La determinazione analitica si basa su tecniche cromatografiche ben note come GC e LC utilizzando condizioni più o meno standard per fase mobile e stazionaria
- Abbiamo preferito mettere a punto un metodo analitico focalizzato alla determinazione dei biocidi AF più persistenti in acqua di mare (**irgarol 1051** e **diuron**) e che quindi è più probabile trovare a livelli significativi nel corso di una campagna di monitoraggio
- Il metodo proposto si basa su pre-concentrazione mediante off-line SPE seguita da analisi mediante LC-MS ed è stato validato con successo. Si dimostra adeguato per monitorare anche livelli ambientali bassi di **irgarol 1051** e **diuron**



Grazie per l'attenzione

