

Capitolo 8

Stir bar sorptive extraction (SBSE) e head space sorptive extraction (HSSE)

Giorgia Purcaro, Sabrina Moret

8.1 Introduzione

La microestrazione in fase solida (SPME), introdotta nella seconda metà degli anni Novanta del secolo scorso, ha rivoluzionato le tecniche di estrazione e si è diffusa rapidamente grazie alla semplicità di utilizzo e alle ottime prestazioni (vedi cap. 7). Tuttavia, la quantità di fase estraente nella fibra SPME è molto limitata (una fibra di 100 μm di spessore corrisponde a un volume di circa 0,5 μL), di conseguenza l'efficienza di estrazione per soluti parzialmente solubili in acqua è piuttosto bassa. Per ovviare a tale limite, fu proposta nel 1999 la *stir bar sorptive extraction* (SBSE), una tecnica per l'estrazione e l'arricchimento di composti organici da matrici acquose in una fase liquida non miscibile (Baltussen et al, 1999), che utilizza ancorette magnetiche (*stir bar*, Fig. 8.1) incapsulate in una camicia di vetro e rivestite da uno strato assorbente (da 0,5 a 1 mm di spessore) di PDMS, con un volume di fase estraente 50-250 volte maggiore rispetto a quello utilizzato nelle fibre SPME. I principi teorici alla base della tecnica SBSE sono identici a quelli della SPME, già descritti in dettaglio nel cap. 7, al quale si rimanda.

In seguito è stata introdotta la *head space sorptive extraction* (HSSE), che costituisce un'estensione della SBSE e consente il campionamento in fase gassosa (Tienpont et al, 2000; Bicchi et al, 2000). Entrambe le tecniche sono basate sull'estrazione dei composti di interesse per assorbimento. A differenza delle tecniche basate sull'adsorbimento, nelle quali l'analita interagisce con i siti attivi su una superficie, il soluto migra nella fase assorbente; di conseguenza nella SBSE e nella HSSE non è rilevante solo la superficie, ma anche il volume della fase. La fase più utilizzata per l'estrazione è il polidimetilsilossano (PDMS), caratterizzato da elevata stabilità termica, che si comporta come un liquido in un ampio intervallo di temperature

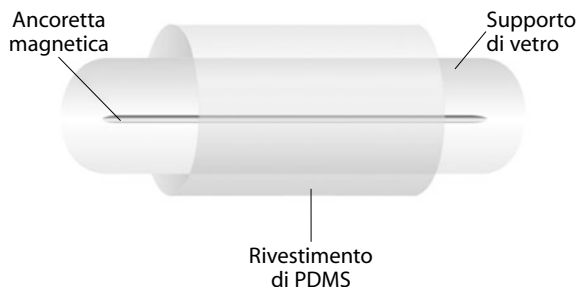


Fig. 8.1 Rappresentazione schematica di una stir bar. (Modificata con autorizzazione da Lancas et al, 2009)

Tabella 8.1 Struttura e applicazioni di recenti rivestimenti disponibili in commercio per SBSE

Fase di rivestimento	Struttura	Analiti	Matrice	Modalità di campionamento	Desorbimento	Analisi
PDMS (Twister)						
PA (Twister acrilato)		VOCS	Alimenti e cosmetici	Immersione/HS	TD	GC-MS
PEG (EG silicone Twister)						
PDMS (Twister)						
PA (Twister acrilato)		PPCP	Acque reflue	Immersione	LD	LC-MS/MS
PEG (EG silicone Twister)						
PEG (EG silicone Twister)						
PA (Twister acrilato)		Bisfenoli	PCP	Immersione	TD	GC-MS
PA (Twister acrilato)		Benzotiazoli	Acque reflue non trattate	Immersione	TD	GC-MS

GC-MS, gascromatografia-spettrometria di massa; HS, spazio di testa; LD, desorbimento liquido; LC-MS/MS, cromatografia liquida-spettrometria di massa tandem; PA, poli acrilato; PCP, prodotti per la cura della persona; PEG, polietilenglicole; PPCP, prodotti per la cura della persona e farmaceutici; TD, desorbimento termico; VOC, composti organici volatili.

Da Gilart et al, 2014.

(da -20 a 320 °C) e presenta interessanti proprietà di diffusione. I vantaggi del PDMS come fase estraente sono: possibilità di predire la capacità di arricchimento nella fase per un determinato analita; possibilità di ottenere intervalli di linearità molto più ampi (non si hanno problemi di spostamento dell'analita da parte di interferenti che presentano maggiore affinità per la fase); desorbimento degli analiti più rapido e in condizioni blande (Lancas et al, 2009).

Le stir bar commercialmente disponibili (lunghe 1 o 4 cm) sono denominate Twister e sono prodotte dalla Gerstel. Fino a poco tempo fa le stir bar commercializzate erano unicamente rivestite di PDMS, che non permette di ottenere recuperi soddisfacenti per i composti polari. A differenza della tecnica SPME, per la quale sono disponibili numerosi tipi di fasi e loro diverse combinazioni per garantire un'efficace estrazione di un'ampia gamma di analiti, per la SBSE vi è scarsa disponibilità di fasi estraenti e ciò ne ha determinato una minore diffusione.

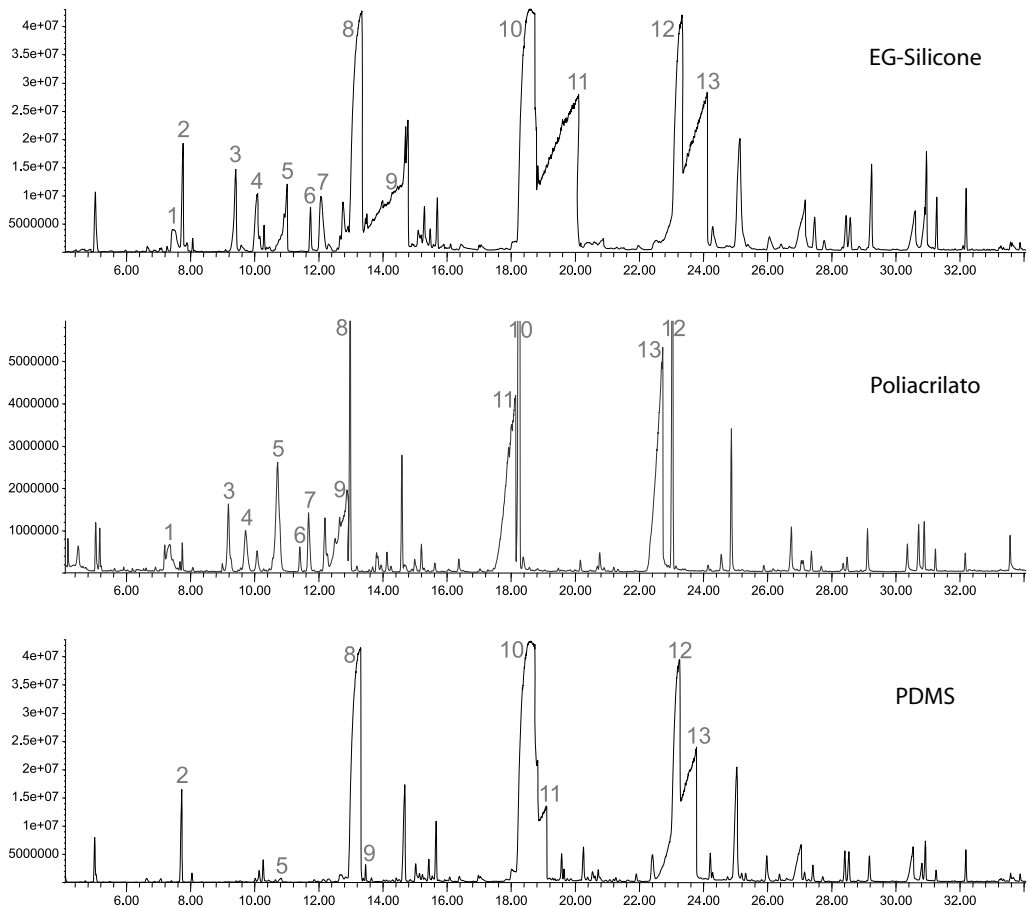


Fig. 8.2 Cromatogrammi ottenuti dall'estrazione con EG-silicone, poliacrilato e PDMS Twister da un campione di whisky. Picchi: 1 = fenolo; 2 = etilesanoato; 3 = *o*-cresolo; 4 = *p*-cresolo; 5 = 2-feniletanolo; 6 = *o*-etilfenolo; 7 = 2,4-xilenolo; 8 = etilottanoato; 9 = acido ottanoico; 10 = etildecanoato; 11 = acido decanoico; 12 = etildodecanoato; 13 = acido dodecanoico. (Da Nie, Kleine-Benne, 2011. Riproduzione autorizzata)

Per superare tale limite, la Gerstel ha recentemente immesso sul mercato nuove stir bar con rivestimenti in polietilenglicole (PEG)-silicone modificato (EG-silicone Twister) e in poliacrilato (PA) con una parte di PEG (poliacrilato Twister). Le strutture di tali nuovi rivestimenti sono riportate in Tabella 8.1, insieme ad alcune recenti applicazioni (Gilart et al, 2014).

La Fig. 8.2 riporta un confronto tra le estrazioni di un campione di whisky ottenute con le tre diverse stir bar commercialmente disponibili.

In letteratura sono presenti diversi studi dedicati allo sviluppo di nuovi rivestimenti più affini agli analiti polari, con differenti conformazioni e dimensioni (Gilart et al, 2014; David, Sandra, 2007; Kawaguchi et al, 2013). Per esempio, Liu e collaboratori hanno proposto l'uso di una tecnologia sol-gel per depositare uno strato sottile di PDMS sull'ancoretta magnetica (Liu et al, 2004, 2005). Lambert e collaboratori hanno rivestito un'ancoretta magnetica con ADS (*alkyl-diol-silica*) per l'estrazione di caffeina e suoi metaboliti da un campione biologico (Lambert et al, 2005). Bicchi e collaboratori hanno descritto l'uso di una stir bar con rivestimento a due fasi (uno strato esterno in PDMS e uno interno in carbone), e hanno studiato una doppia modalità di estrazione, per immersione o nello spazio di testa, dimostrando un aumento dei recuperi per composti altamente volatili rilasciati da materiale vegetale e per soluti polari in campioni di acqua (Bicchi et al, 2005). Inoltre, negli ultimi anni è cresciuto l'interesse per rivestimenti per stir bar a base di materiali monolitici, che oltre al vantaggio di avere struttura porosa, alta permeabilità, grande disponibilità nel mercato di monomeri con differente polarità e funzionalità, sono semplici ed economici da preparare; con questi materiali si riesce a ottenere un elevato volume di fase estraente e, di conseguenza, un aumento dei recuperi (Gilart et al, 2014).

8.2 Teoria e principi della SBSE

Analogamente alla SPME, la SBSE è una tecnica di equilibrio basata sulla costante di ripartizione dei soluti tra la fase siliconica e la fase acquosa. Diversi studi (Dugay et al, 1998; De Bruin et al, 1998; Beltran et al, 1998) hanno posto questo equilibrio in relazione con le costanti di ripartizione ottanolo-acqua ($K_{o/w}$). Come descritto nell'eq. 8.1, la costante di ripartizione tra PDMS e acqua ($K_{PDMS/w}$) è definita dal rapporto all'equilibrio tra la concentrazione del soluto nella fase estraente di PDMS (C_{PDMS}) e la concentrazione in acqua (C_w). Tale relazione può essere espressa anche come rapporto tra la massa di soluto nella fase di PDMS (m_{PDMS}) e la massa di soluto nella fase acquosa (m_w) moltiplicato per β , che rappresenta il rapporto tra i volumi delle fasi ($\beta = V_w/V_{PDMS}$).

$$K_{o/w} \approx K_{PDMS/w} = \frac{C_{PDMS}}{C_w} = \frac{m_{PDMS}}{m_w} \frac{V_w}{V_{PDMS}} = \frac{m_{PDMS}}{m_w} \beta \quad (8.1)$$

Il recupero, espresso come rapporto tra la quantità di soluto estratto nella fase PDMS (m_{PDMS}) e la quantità di soluto originariamente presente in acqua ($m_0 = m_{PDMS} + m_w$), è determinato, quindi, dalla costante di ripartizione $K_{PDMS/w}$ e dal rapporto tra le fasi β , come descritto nell'equazione:

$$\frac{m_{PDMS}}{m_0} = \frac{K_{PDMS/w} / \beta}{1 + (K_{PDMS/w} / \beta)} \quad (8.2)$$

Dall'eq. 8.2 appare evidente, quindi, che l'efficienza di estrazione aumenta all'aumentare della costante $K_{PDMS/w}$ e diminuisce all'aumentare della polarità del soluto. Inoltre, quan-

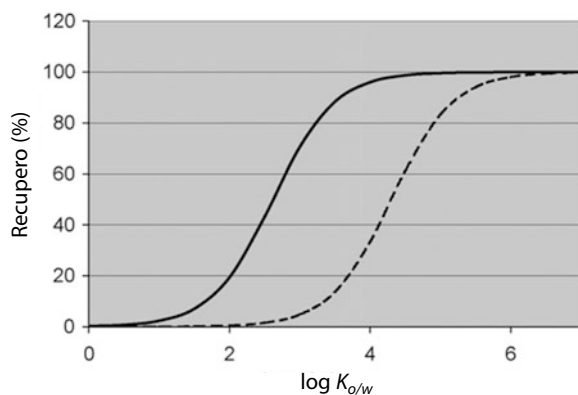


Fig. 8.3 Recupero teorico (%) in funzione di $\log K_{o/w}$ per SPME (linea tratteggiata; 100 μm di fibra con 0,5 μL di PDMS) e SBSE (linea continua; 1 cm \times 0,5 mm d_{fr} , 25 μL PDMS) e 10 mL di campione. (Da David, Sandra, 2007. Riproduzione autorizzata)

to maggiore è la quantità di PDMS utilizzata, tanto maggiore sarà l'efficienza di estrazione, poiché il rapporto tra i volumi delle fasi (β) diminuisce. Di conseguenza, l'utilizzo della SBSE permette una maggior efficienza di estrazione rispetto alla SPME per la diversa quantità di PDMS utilizzata (Fig. 8.3) (David, Sandra, 2007; Prieto et al, 2010).

La maggiore capacità della SBSE rispetto alla SPME è ben evidenziata dall'esempio riportato in Fig 8.4, relativo all'analisi di un campione di acqua fortificato con una miscela standard di idrocarburi policiclici aromatici (IPA) (Sandra et al, 2000). L'analisi SBSE è stata condotta impiegando una stir bar da 10 mm, immersa in 60 mL di acqua (addizionata con il 5%

Quantità

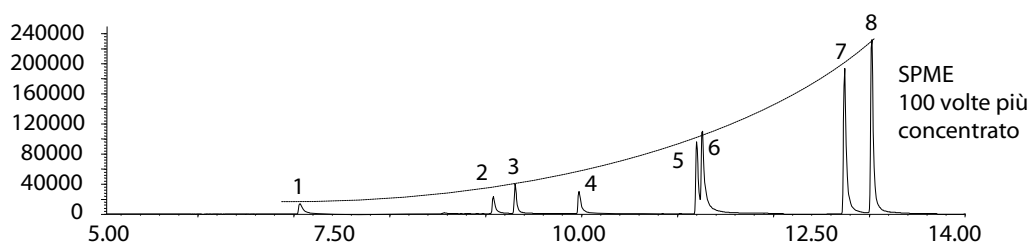
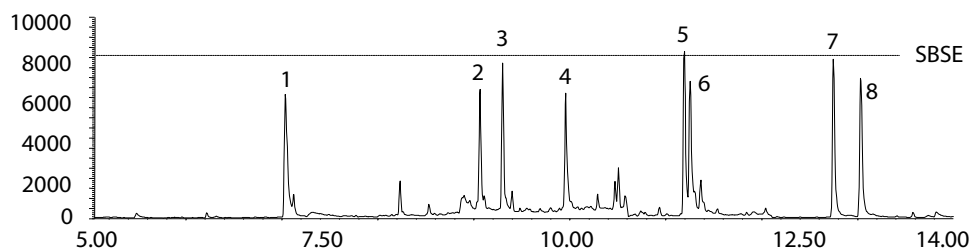


Fig. 8.4 Confronto (GC-MS) tra i recuperi di IPA aggiunti in acqua ottenuti con SBSE e con SPME. Picchi: 1 = naftalene; 2 = acenaftilene; 3 = acenaftene; 4 = fluorene; 5 = fenantrene; 6 = antracene; 7 = fluorantene; 8 = pirene. (Da Sandra et al, 2000. Riproduzione autorizzata)

di metanolo per prevenire l'adsorbimento degli analiti sulle pareti dei recipienti) fortificata con 30 ng/L di IPA. L'analisi mediante SPME è stata condotta utilizzando una fibra PDMS da 100 μm ed estraendo la stessa quantità di acqua fortificata con una quantità di IPA 100 volte superiore. In entrambi i casi sono stati utilizzati lo stesso tempo di estrazione (30 min) e la stessa velocità di agitazione, mentre il desorbimento è stato effettuato a 250 °C per la SBSE e a 300 °C per la SPME. Come si può osservare in Fig. 8.4, la SBSE estrae tutti i componenti in ugual misura, mentre la SPME estrae gli analiti più apolari (altobollenti) in misura maggiore rispetto a quelli più polari. Appare quindi evidente che, oltre a un effetto discriminante lievemente superiore per i diversi analiti, con la SBSE si ottiene una sensibilità estremamente maggiore, considerando la diversa diluizione dei campioni utilizzati per le due tecniche.

8.3 Estrazione e ottimizzazione

Durante l'estrazione la stir bar può essere posta a contatto con un soluto mediante immersione (SBSE classica) oppure mediante campionamento dello spazio di testa (HSSE) (Fig. 8.5).

8.3.1 SBSE

Per l'estrazione la stir bar viene posta in una vial a contatto con un'adeguata quantità di campione liquido (in genere 10 mL); quindi si chiude e si agita per 30-240 minuti. Il tempo di estrazione dipende dal volume di campione, dalla velocità di agitazione e dalle dimensioni della stir bar e va ottimizzato a seconda dell'applicazione. Generalmente l'ottimizzazione è condotta considerando il recupero dell'analita di interesse nel tempo. Il recupero maggiore è ottenuto in condizioni di equilibrio, ma – come nella tecnica SPME – spesso si scelgono condizioni di pre-equilibrio per ridurre i tempi di analisi. Al termine dell'estrazione, la stir bar viene risciacquata con acqua distillata, per rimuovere eventuali tracce di sali, zuccheri, proteine o altri interferenti, asciugata con carta pulita e, quindi, sottoposta a desorbimento.

Diversamente dalla SPME, che non richiede particolari sistemi per il desorbimento termico (si può utilizzare qualsiasi iniettore GC), la SBSE necessita di un sistema di desorbimento dedicato, o almeno di opportuni accorgimenti per adattare allo scopo iniettori PTV (*programmed temperature vaporization*). Come nella SPME, il desorbimento può essere sia termico sia effettuato tramite immersione in un solvente opportuno.

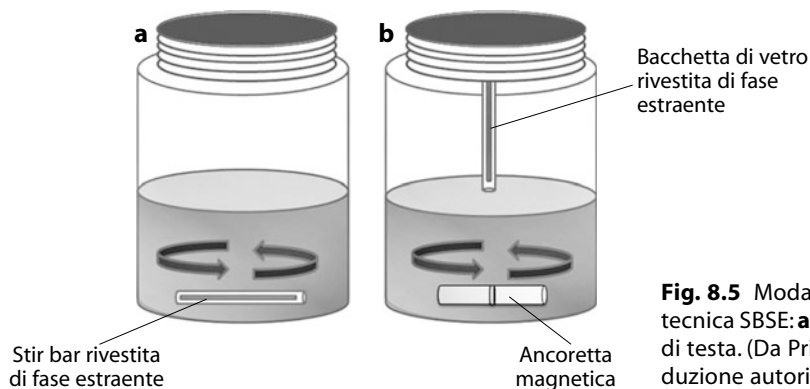


Fig. 8.5 Modalità di estrazione con tecnica SBSE: **a** immersione; **b** spazio di testa. (Da Prieto et al, 2010. Riproduzione autorizzata)

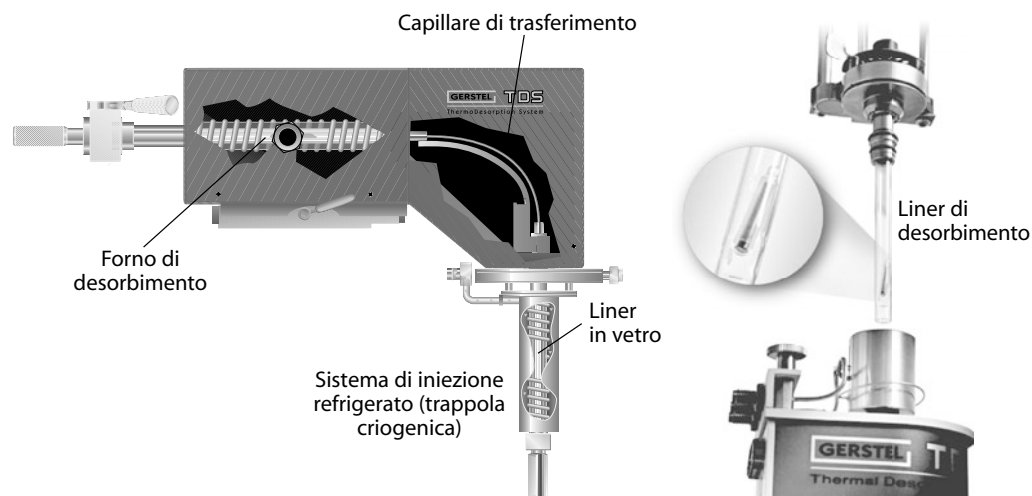


Fig. 8.6 Sistemi automatizzati di desorbimento termico (Gerstel). *A sinistra* TDS (Thermal desorption system); *a destra* TDU (Thermal desorption unit). (Da <http://www.gerstel.com>. Riproduzione autorizzata)

Nel caso del desorbimento termico, la stir bar è introdotta in un apposito sistema di desorbimento (4 mm di diametro interno \times 187 mm di lunghezza), al quale vengono applicate temperature variabili da 150 a 300 °C per 5-15 minuti. A causa dell'elevata quantità di materiale estraente presente, nella SBSE il processo di desorbimento termico richiede più tempo rispetto al desorbimento di una fibra SPME. Attualmente sono disponibili in commercio due sistemi di desorbimento termico automatizzati (Fig. 8.6), entrambi della Gerstel: il classico TDS (Thermal desorption system) e il TDU (Thermal desorption unit), una speciale unità di desorbimento disegnata per le Twister. Il sistema può essere montato su un gascromatografo con iniettore PTV, che viene utilizzato come trappola criogenica per focalizzare e quindi desorbire termicamente gli analiti (Kawaguchi et al, 2012).

In alternativa, il desorbimento può essere effettuato utilizzando un appropriato solvente: la stir bar viene posta in una vial di piccole dimensioni (2 mL) con solventi apolari (esano) o polari (metanolo, acetonitrile); quindi si procede con un'analisi GC o LC (Prieto et al, 2010; Kawaguchi et al, 2013). La stir bar può essere riutilizzata fino a 20-50 volte, a seconda della matrice analizzata.

Nell'analisi di sostanze odorose nelle acque (quali 2-metilisoborneolo, geosmina, 2,4,6-tricloroanisolo, 2,3,6-tricloroanisolo, 2,3,4-tricloroanisolo e 2,4,6-tribromoanisolo) si è inoltre osservato che, se dopo l'estrazione la stir bar viene opportunamente conservata a 4 °C, gli analiti sono trattenuti senza perdite per una settimana. Tale aspetto è molto importante per il campionamento e l'estrazione *in situ*, poiché richiede semplicemente la spedizione della stir bar, anziché del campione da analizzare, al laboratorio (Benanou et al, 2003).

Le variabili che influenzano la SBSE sono le stesse considerate per la tecnica SPME: tempo e temperatura di estrazione; pH; aggiunta di sali, modificanti organici o agenti derivatizzanti; velocità di agitazione; volumi del campione e della fase estraente (Prieto et al, 2010). Per migliorare la selettività della SBSE, si possono dunque adottare alcune strategie in grado di controllare la ripartizione degli analiti nella fase PDMS. Normalmente, la SBSE è utilizzata per l'estrazione da campioni acquosi di componenti organici presenti in basse concentrazioni.

Campioni con elevate quantità di solventi, detergenti e altri composti organici devono essere diluiti prima dell'estrazione. Per migliorare le estrazioni da campioni acquosi di composti altamente apolari, come IPA e policlorobifenili (PCB), solitamente si aggiunge un modificante organico per minimizzare l'adsorbimento di questi composti sulle pareti della vial. Per l'estrazione di analiti entro un ampio intervallo di polarità, è necessario ottimizzare la concentrazione del modificante organico da aggiungere ed effettuare, eventualmente, una doppia estrazione (una senza e una con modificante) (David, Sandra, 2007; Prieto et al, 2010). Campioni particolarmente concentrati (per esempio alcune bevande e aromi sintetici) possono essere diluiti con acqua prima dell'estrazione, per ridurne la viscosità e il contenuto di alcol (per superalcolici), ed evitare così la saturazione della fase PDMS. Per assicurare l'estrazione di composti acidi o basici, occorre sopprimere la ionizzazione modificando opportunamente il pH.

La Fig. 8.7 presenta i tracciati relativi a un campione di whisky, diluito 1:10 in acqua, con e senza acidificazione prima dell'estrazione (Pfannkoch et al, 2001). Si può osservare che il picco dell'acido dodecanoico (picco 2) co-eluisce con parecchi piccoli picchi, incluso quello del farnesolo, e che nel campione acidificato scompaiono alcuni picchi relativi ad acetali labili (indicati in figura con un asterisco).

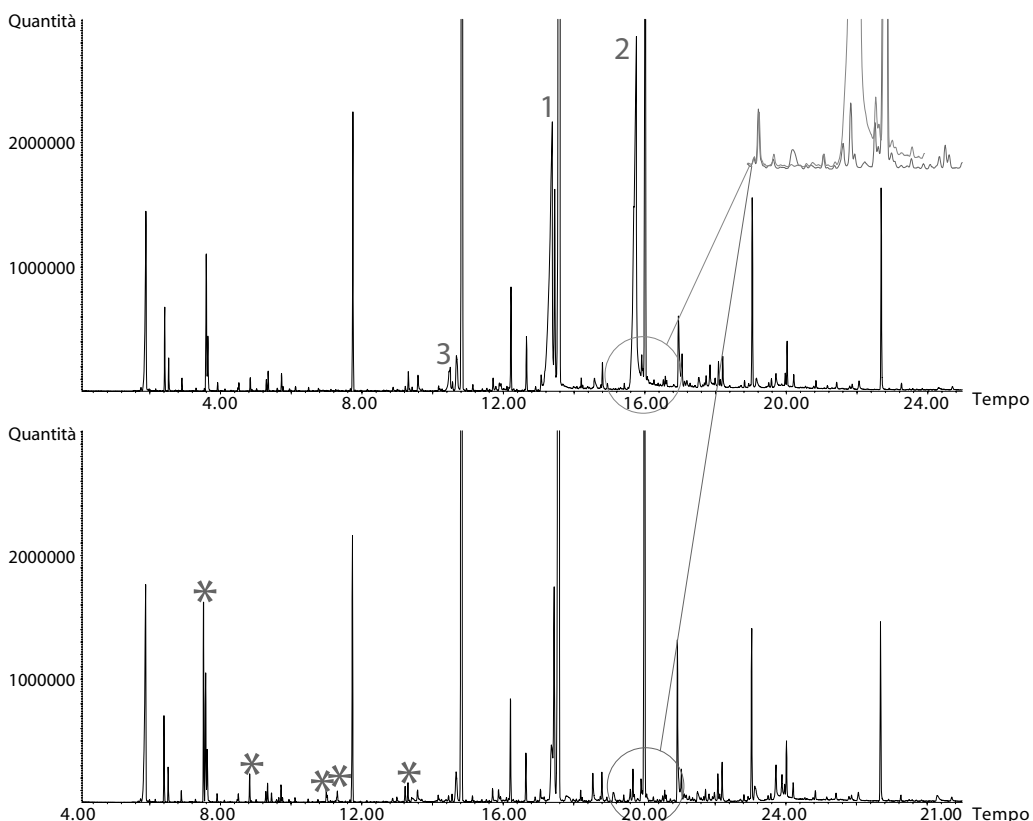


Fig. 8.7 SBSE di un campione di whisky acidificato a pH 2 (*in alto*) e non acidificato (*in basso*). Picchi: 1 = acido decanoico; 2 = acido dodecanoico; 3 = acido ottanoico. (Da Pfannkoch et al, 2001. Riproduzione autorizzata)

La tecnica SBSE può essere utilizzata anche in combinazione con una pre- o una post-derivatizzazione, in particolare per composti polari e termolabili. I derivatizzanti hanno solitamente elevati valori di $K_{o/w}$ e favoriscono quindi un aumento dei recuperi e, di conseguenza, della sensibilità per gli analiti polari (che possiedono un basso valore di $K_{o/w}$). Le tipiche reazioni di derivatizzazione utilizzabili in ambienti acquosi sono: acilazione di fenoli con anidride acetica, esterificazione di acidi e acilazione di ammine con etilcloroformiato, ossimazione di aldeidi e chetoni con pentafluorobenzil idrossilamina (PFBHA). Una derivatizzazione post-estrazione (per esempio in combinazione con il desorbimento termico), come la sililazione (che non può essere effettuata in ambiente acquoso), permette invece di migliorare le performance cromatografiche. Questi diversi tipi di derivatizzazione possono essere usati anche in combinazione per aumentare la sensibilità nella determinazione di composti contenenti diversi gruppi funzionali (Kawaguchi et al, 2006; Prieto et al, 2010).

8.3.2 HSSE

La tecnica HSSE prevede la sospensione della stir bar nello spazio di testa di una vial contenente matrici solide o liquide, per un tempo prestabilito (Fig. 8.5). In questo modo, analogamente alla tecnica SPME, i composti presenti nella fase gassosa vengono catturati nel film di PDMS (il cui volume varia da 25 a 250 μL , a seconda delle dimensioni). La stir bar può essere utilizzata anche per effettuare un campionamento dinamico (D-HS), sostituendo gli adsorbenti tradizionalmente impiegati (per maggiori dettagli, vedi cap. 9) (Splivallo et al, 2007). Come nella SBSE, anche utilizzando la tecnica HSSE è consigliato il risciacquo della stir bar con acqua distillata, dopo l'estrazione. La stir bar viene, quindi, desorbita termicamente in appositi sistemi, analogamente a quanto descritto per la tecnica SBSE, per effettuare l'analisi GC o GC-MS (Bicchi et al, 2008).

I principi alla base di questa tecnica sono gli stessi descritti per la SBSE; in particolare, il recupero degli analiti dipende dalle loro caratteristiche chimico-fisiche e dall'affinità con la fase PDMS (costante di ripartizione ottanolo-acqua), dal tempo e dalla temperatura di campionamento e dal rapporto tra spazio di testa e quantità di PDMS. Il campione viene solitamente sottoposto ad agitazione per favorire la presenza degli analiti nella fase gassosa. Utilizzando la tecnica HSSE, l'estrazione di composti non volatili è minima, e ciò allunga la vita della fase estraente.

Come accennato in precedenza, sono state sperimentate stir bar multifase (DP Twister – *dual phase*), che combinano la capacità di concentrazione di due o più fasi estraenti e operano in diverse modalità (assorbimento e adsorbimento). Queste stir bar consistono in un corto tubo di PDMS, chiuso alle estremità da due tappi magnetici, al cui interno viene impaccato carbone attivo come adsorbente (Fig. 8.8). Le stir bar multifase permettono di migliorare il recupero di componenti polari da matrici complesse o multi-ingredienti e il recupero di componenti estremamente volatili (C1-C4) (Bicchi et al, 2005).

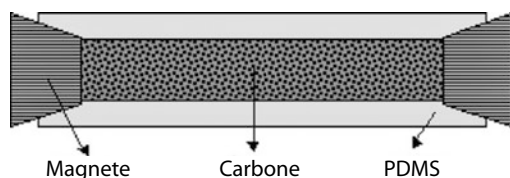


Fig. 8.8 Rappresentazione schematica di una dual phase stir bar. (Da Bicchi et al, 2005. Riproduzione autorizzata)

8.4 Applicazioni

Di seguito sono descritte alcune applicazioni riportate in letteratura; numerose altre applicazioni, suddivise per settore, sono reperibili sul sito della Gerstel (<http://www.gerstel.com/>).

8.4.1 Applicazioni ambientali

Le prime applicazioni della tecnica SBSE sono state sviluppate nel settore ambientale, in particolare per l'analisi di composti volatili e semivolatili. Numerose applicazioni riguardano la determinazione di IPA (David, Sandra, 2007; Lancas et al, 2009; Kawaguchi et al, 2006) seguita da desorbimento termico (successiva analisi GC-MS) o liquido (successiva analisi LC con detector spettrofluorimetrico). L'utilizzo della SBSE permette di raggiungere sensibilità molto basse, dell'ordine di 1 ng/L, con buona ripetibilità. La SBSE è stata applicata anche per la determinazione di PCB nelle acque, raggiungendo sensibilità dell'ordine dei sub-ng/L (Popp et al, 2005), e per l'analisi multiresiduale di IPA, PCB e pesticidi (León et al, 2006). Nell'applicazione multiresiduale, l'estrazione è stata condotta overnight (14 h) con una stir bar di 2 cm rivestita con 0,5 mm di PDMS in 100 mL di campione saturato con cloruro di sodio. Gli analiti sono stati desorbiti termicamente prima dell'analisi GC-MS. Sono stati raggiunti limiti di rilevabilità dell'ordine di 0,1-10 ng/L (León et al, 2003; León et al, 2006).

Un'interessante applicazione riguarda la determinazione di composti odorosi nelle acque potabili. Composti quali 2-metilisoborneolo (MIB), geosmina, anisoli brominati e clorinati – che originano dai corrispondenti fenoli – hanno una soglia di percezione inferiore a 10 ng/L. Utilizzando la SBSE, questi composti possono essere estratti con elevati recuperi dalle acque potabili e con maggiori sensibilità, riproducibilità e accuratezza rispetto a tecniche molto più laboriose, come il “purge and trap” (Benanou et al, 2003).

Sebbene sia stata originariamente sviluppata per l'analisi di campioni acquosi, la SBSE può essere anche utilizzata per la determinazione di composti semivolatili in campioni di terreno o sedimenti. In questo caso, i campioni vanno prima sottoposti a una classica estrazione liquido-solido; quindi l'estratto, ottenuto con un solvente miscibile in acqua, viene diluito in acqua e sottoposto a nuova estrazione tramite SBSE (Alvarez-Aviles et al, 2005; Rodil, Popp, 2006).

Recenti applicazioni della SBSE in campo ambientale comprendono la determinazione di contaminanti emergenti nelle acque, come i composti benzofenonici (utilizzati nelle creme solari come schermo ai raggi UV e come agenti per trattenere il profumo). Questi composti, caratterizzati da un gruppo idrossilico fenolico, presentano una significativa attività estrogenica, responsabile di effetti negativi sulla riproduzione e sugli ormoni funzionali dei pesci. Per la loro determinazione nelle acque, la SBSE viene effettuata previa derivatizzazione *in situ* con anidride acetica ed è seguita da desorbimento termico e successiva analisi GC-MS (Kawaguchi et al, 2008). Recentemente è stata proposta un'applicazione nel campo della scienza forense per la separazione e l'identificazione di residui di liquidi infiammabili (come benzina e carburante diesel) in casi di incendio. La pre-concentrazione e l'estrazione degli analiti vengono condotte con la tecnica HSSE, utilizzando una stir bar rivestita di PDMS, a 50 °C per 1 ora, e sono seguite da desorbimento termico e analisi GC-MS (Cacho et al, 2014).

8.4.2 Applicazioni nel settore alimentare

Le applicazioni della SBSE nel settore dei prodotti alimentari riguardano principalmente l'analisi di costituenti minori (sostanze volatili, additivi ecc.), la determinazione in tracce di composti responsabili di *off-flavours* (aldeidi, aloanisolo ecc.) e di contaminanti (pesticidi).

Sia la SBSE (in immersione) sia la HSSE (nello spazio di testa) sono state utilizzate per l'analisi di componenti volatili – quali alcoli, aldeidi, chetoni, terpeni, fenoli e lattoni – in prodotti ortofruccicoli (fragole, uva, lamponi, mele, pesche ecc.) (David, Sandra, 2007; Kawaguchi et al, 2013). Inoltre, sono state descritte numerose applicazioni per l'analisi degli aromi in caffè, tabacco, farina di frumento, pesto genovese, birra, vino, whisky, sherry, brandy e saké. Generalmente la tecnica SBSE permette l'estrazione di composti odorosi e profumi presenti a concentrazioni molto basse, ma molto importanti dal punto di vista della percezione olfattiva globale del prodotto (David, Sandra, 2007; Kawaguchi et al, 2013).

In Fig. 8.9 è riportato il tracciato (GC-MS) ottenuto da un campione di sansa di mela (buccia, semi e polpa) essiccata. Dopo reidratazione, il campione (4,5 g) è stato trasferito in una vial da 50 mL, addizionato di standard interno (2-ottanolo, I.S. in figura) e acqua (30 mL) e omogeneizzato. L'estrazione è stata effettuata con una stir bar (20 mm) rivestita di PDMS (0,5 mm di spessore) a temperatura ambiente per 3 ore. L'analisi finale è stata condotta tramite GC-MS. Sono stati identificati 124 composti, 33 dei quali (riportati in figura) sono stati semiquantificati (Rodríguez Madrera, Suárez Valles, 2011).

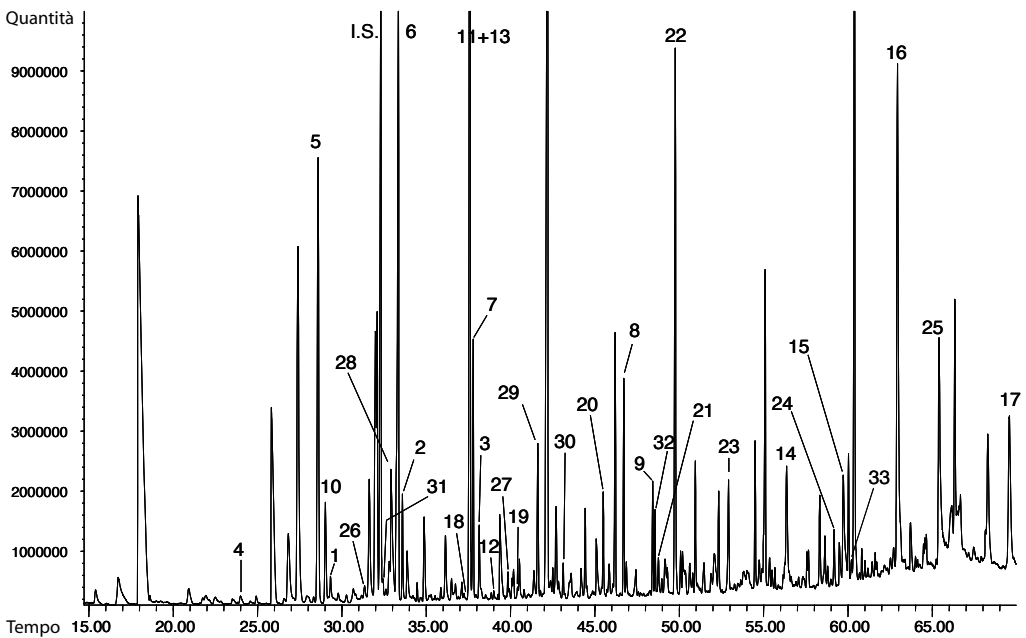


Fig. 8.9 Cromatogramma relativo agli aromi analizzati in sansa di mela. Picchi: 1 = 1-esanolo; 2 = 1-octen-3-olo; 3 = 1-ottanolo; 4 = 2-esenale; 5 = 2-eptenale; 6 = 2-ottenale; 7 = 2-nonenale; 8 = E,Z-2,4-decadienale; 9 = E,E-2,4-decadienale; 10 = 6-metil-5-epten-2-one; 11 = 3,5-ottadien-2-one; 12 = 6-metil-3,5-eptadienone; 13 = acido ottanoico; 14 = acido dodecanoico; 15 = acido nonanoico; 16 = acido decanoico; 17 = acido dodecanoico; 18 = linalolo; 19 = β -ciclocitrale; 20 = citrale; 21 = β -damascenone; 22 = nerilacetone; 23 = β -ionone; 24 = pseudo-ionone; 25 = farnesolo (isomero 2); 26 = metilottanoato; 27 = metildecanoato; 28 = etilottanoato; 29 = etildecanoato; 30 = etilbenzoato; 31 = esilbutirato; 32 = 2-feniletilacetato; 33 = γ -decalattone. (Da Rodríguez Madrera, Suárez Valles, 2011. Riproduzione autorizzata)

Nel settore enologico, un'applicazione molto interessante prevede l'utilizzo di una stir bar posta in un apposito supporto per determinare gli aromi rilasciati in bocca durante la degustazione di vini (Demyttenaere et al, 2003). La SBSE è stata proposta anche per l'analisi in tracce di sostanze responsabili di *off-flavours* in matrici alimentari; per esempio, è stata utilizzata per la determinazione del 2,4,6-tricloroanisolo nel vino, responsabile del sentore di tappo, e, previa derivatizzazione *in situ*, per la determinazione di aldeidi (nonenale, decadienale ecc.) nella birra, responsabili dell'odore di stantio (Kawaguchi et al, 2013).

Per quanto riguarda l'analisi di contaminanti in tracce, la tecnica SBSE è stata utilizzata per la determinazione di pesticidi in numerosi campioni alimentari, tra i quali succhi di frutta, vino, aceto, prodotti ortofrutticoli, zafferano e tabacco (David, Sandra, 2007; Yang et al, 2013; Kawaguchi et al, 2013; Lancas et al, 2009).

È interessante anche l'approccio sequenziale per l'analisi di 80 inquinanti organici nelle acque (Ochiai et al, 2008). La procedura (Fig. 8.10) prevede una prima estrazione del campione tale quale, che consente di separare gli analiti con $\log K_{o/w} > 4$, e una seconda estrazione (con una seconda stir bar) dello stesso campione, previa aggiunta del 30% di NaCl, che estrae composti con $\log K_{o/w} < 4$. Dopo le estrazioni entrambe le stir bar sono posizionate in un unico liner per il de-

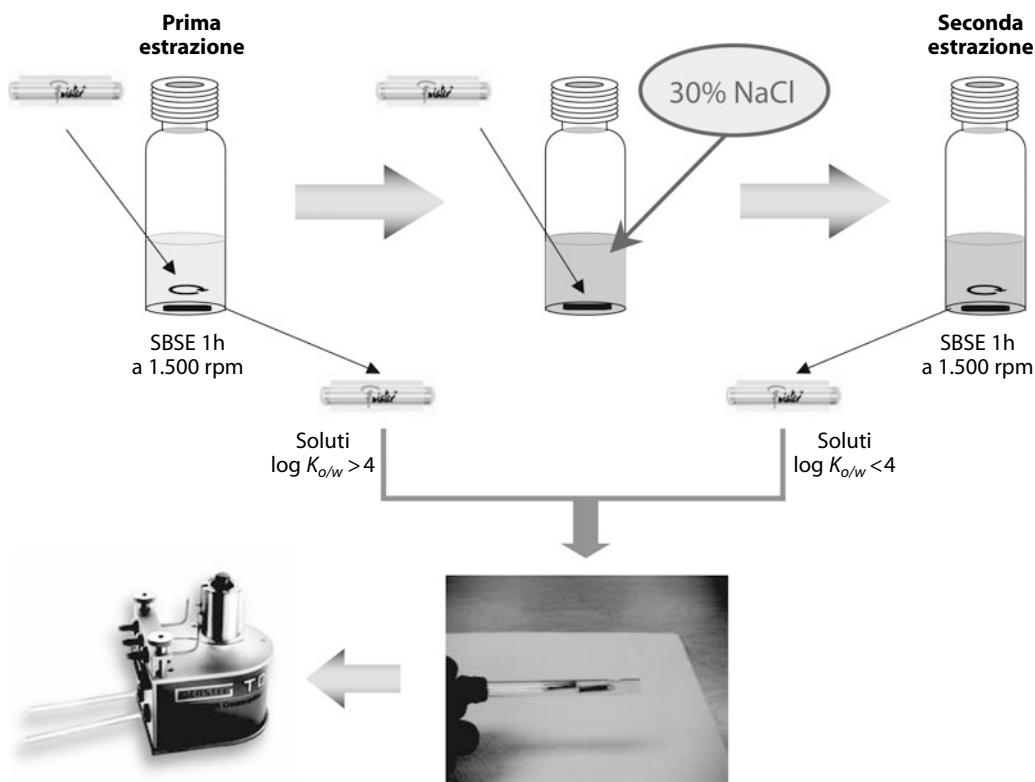


Fig. 8.10 Diagramma di procedura sperimentale per SBSE sequenziale. (Da Ochiai et al, 2008. Riproduzione autorizzata)

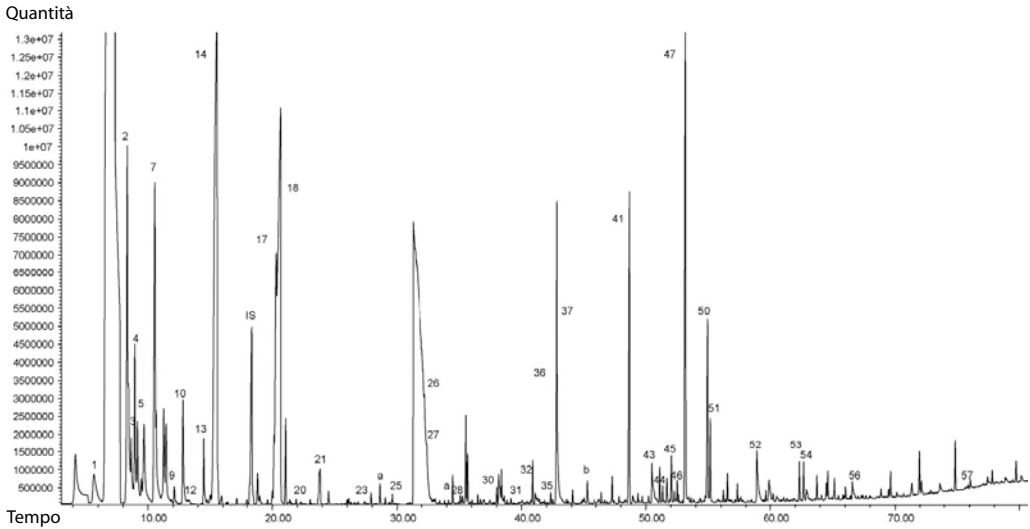


Fig. 8.11 Cromatogramma (TIC) di un aceto di vino rosso. Picchi: 1 = metilacetato; 2 = acetaldeide dietilacetale; 3 = propanoato di etile; 4 = etilisobutanoato; 5 = propilacetato; 6 = diacetile; 7 = isobutilacetato; 8 = etilbutanoato; 9 = etil-2-metilbutanoato; 10 = etilisovalerato; 11 = butilacetato; 12 = esanale; 13 = isobutanolo; 14 = isoamilacetato; 15 = etilvalerato; 16 = amilacetato; 17 = 2-metil-1-butanolo; 18 = 3-metil-1-butanolo; 19 = etilesanoato; 20 = esilacetato; 21 = 3-idrossi-2-butanone; 22 = etileptanoato; 23 = etilattato; 24 = 1-esanolo; 25 = *cis*-3-esen-1-olo; 26 = etilottanoato; 27 = 2-furfuraldeide; 28 = benzaldeide; 29 = etilnonanoato; 30 = 5-metil-2-furfuraldeide; 31 = etilfuranato; 32 = γ -butirilattone; 33 = acetofenone; 34 = etilbenzoato; 35 = furfural alcol; 36 = acido iso-valerico; 37 = sdietiluccinato 38 = α -terpineolo; 39 = benzilacetato; 40 = etilfenilacetato; 41 = 2-fenil-etilacetato; 42 = α -ionone; 43 = acido esanoico; 44 = guaiacolo; 45 = benzil alcol; 46 = *trans*- β -metil- γ -ottalattone; 47 = 2-feniletanolo; 48 = β -ionone; 49 = 4-metil guaiacolo; 50 = acido eptanoico; 51 = *cis*- β -metil- γ -ottalattone; 52 = acido ottanoico; 53 = eugenolo; 54 = 4-etilfenolo; 55 = acido nona-noico; 56 = acido decanoico; 57 = vanillina. (Da Callejón et al, 2008. Riproduzione autorizzata)

sorbimento simultaneo. Tale approccio permette di migliorare significativamente i recuperi (solo 5 composti con recuperi <80%) rispetto alla singola estrazione effettuata con aggiunta di sale (23 composti con recuperi <80%) o senza aggiunta di sale (41 composti con recuperi <80%).

Anche la tecnica HSSE è stata utilizzata in numerose applicazioni per la determinazione di aromi e *off-flavours*, in particolare in matrici vegetali e bevande (quali tè, caffè, vino e birra), e per la caratterizzazione di piante aromatiche e medicinali (Bicchi et al, 2008).

La HSSE (seguita da desorbimento termico e analisi GC-MS) è stata utilizzata per determinare la frazione aromatica dell'aceto di vino, che presenta un profilo molto complesso, anche a causa della bassa concentrazione in cui i componenti sono presenti (Callejón et al, 2008). In particolare, 5 mL di campione sono stati posti in una vial da 20 mL, si è aggiunta una quantità di NaCl ottimizzata per ottenere l'effetto *salting-out*, e si è proceduto all'estrazione a 62 °C per 60 minuti mediante una stir bar lunga 10 mm e con uno spessore di PDMS pari a 0,5 mm. Questa applicazione ha permesso di identificare ben 53 composti (5 dei quali individuati per la prima volta) in diversi campioni di aceto di vino (Fig. 8.11).

8.4.3 Applicazioni biomediche

La SBSE può essere utilizzata anche per l'analisi di componenti volatili e semivolatili in campioni biologici quali urina, plasma, saliva ecc. Poiché gli analiti di interesse sono componenti polari (metaboliti), viene spesso utilizzata la derivatizzazione *in situ*. Un'applicazione molto interessante riguarda l'analisi di barbiturici in urine e di ftalati in fluidi corporei. La SBSE è stata proposta anche per la determinazione di contaminanti ambientali in campioni biologici, come PCB in sperma, fenoli e clorofenoli in urina e pesticidi in latte materno (Kawaguchi et al, 2006; Lancas et al, 2009). Con o senza derivatizzazione *in situ*, la SBSE è stata utilizzata per la determinazione di farmaci, steroidi e sostanze d'abuso (inclusi i loro metaboliti), spesso preceduta da idrolisi enzimatica (David, Sandra, 2007; Lancas et al, 2009).

I metaboliti idrossi-IPA, utilizzati come indicatori dell'esposizione a IPA, sono stati analizzati mediante SBSE e derivatizzazione *in situ* con anidride acetica, seguita da desorbimento termico in GC-MS (modalità SIM, *selected ion monitoring*) raggiungendo limiti di rilevanza di 0,01 ng/mL (Desmet et al, 2003). La SBSE è stata proposta anche per differenti indagini diagnostiche, in particolare per la determinazione dell'acido tuberculostearico (marker della tubercolosi) e del rapporto testosterone/epitestosterone nelle urine (marker dell'HIV) (Stopforth et al, 2005, 2007).

Bibliografia

- Alvarez-Aviles O, Cuadra L, Rosario O (2005) *Optimization of microwave-assisted extraction/stir bar sorptive extraction/thermal desorption/gas chromatography/mass spectrometry methodology for the organic chemical characterization of particulate matter*. Paper Anyl 259, presented at the 229th American Chemistry Society National Meeting (San Diego, March 13-17, 2005)
- Baltussen E, Sandra P, David F, Cramers C (1999) Stir bar sorptive extraction (SBSE), a novel extraction technique for aqueous samples: Theory and principles. *Journal of Microcolumn Separations*, 11(10): 737-747
- Beltran J, Lopez FJ, Cepria O, Hernandez F (1998) Solid-phase microextraction for quantitative analysis of organophosphorus pesticides in environmental water samples. *Journal of Chromatography A*, 808(1-2): 257-263
- Benanou D, Acobas F, de Roubin MR et al (2003) Analysis of off-flavors in the aquatic environment by stir bar sorptive extraction-thermal desorption-capillary GC/MS/olfactometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 376(1): 69-77
- Bicchi C, Cordero C, Iori C et al (2000) Headspace sorptive extraction (HSSE) in the headspace analysis of aromatic and medicinal plants. *Journal of High Resolution Chromatography*, 23 (9): 539-546
- Bicchi C, Cordero C, Liberto E et al (2005) Dual-phase twisters: A new approach to headspace sorptive extraction and stir bar sorptive extraction. *Journal of Chromatography A*, 1094(1-2): 9-16
- Bicchi C, Cordero C, Liberto E et al (2008) Headspace sampling of the volatile fraction of vegetable matrices. *Journal of Chromatography A*, 1184(1-2): 220-233
- Cacho JI, Campillo N, Aliste M et al (2014) Headspace sorptive extraction for the detection of combustion accelerants in fire debris. *Forensic Science International*, 238: 26-32
- Callejón R.M, González AG, Troncoso AM, Morales ML (2008) Optimization and validation of headspace sorptive extraction for the analysis of volatile compounds in wine vinegars. *Journal of Chromatography A*, 1204(1): 93-103
- David F, Sandra P (2007) Stir bar sorptive extraction for trace analysis. *Journal of Chromatography A*, 1152(1-2): 54-69
- De Bruin LS, Josephy PD, Pawliszyn JB (1998) Solid-phase microextraction of monocyclic aromatic amines from biological fluids. *Analytical Chemistry*, 70(9): 1986-1992

- Demyttenaere JCR, Moriña RM, Sandra P (2003) Monitoring and fast detection of mycotoxin-producing fungi based on headspace solid-phase microextraction and headspace sorptive extraction of the volatile metabolites. *Journal of Chromatography A*, 985(1-2): 127135
- Desmet K, Tienpont B, Sandra P (2003) Analysis of 1-hydroxypyrene in urine as PAH exposure marker using in-situ derivatisation stir bar sorptive extraction-thermal desorption-capillary gas chromatography-mass spectrometry. *Chromatographia*, 57(9-10): 681-685
- Dugay J, Miège C, Hennion M-C (1998) Effect of the various parameters governing solid-phase microextraction for the trace-determination of pesticides in water. *Journal of Chromatography A*, 795(1): 27-42
- Gilart N, Marcé RM, Borrull F, Fontanals N (2014) New coatings for stir-bar sorptive extraction of polar emerging organic contaminants. *Trends in Analytical Chemistry*, 54: 11-23
- Kawaguchi M, Ito R, Honda H et al (2008) Simultaneous analysis of benzophenone sunscreen compounds in water sample by stir bar sorptive extraction with in situ derivatization and thermal desorption-gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1200(2): 260-263
- Kawaguchi M, Ito R, Nakazawa H, Takatsu A (2012) Environmental and biological applications of stir bar sorptive extraction. In: Pawliszyn J (ed) *Comprehensive sampling and sample preparation*, Vol. 3. Elsevier, Amsterdam
- Kawaguchi M, Ito R, Saito K, Nakazawa H (2006) Novel stir bar sorptive extraction methods for environmental and biomedical analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 40 (3): 500-508
- Kawaguchi M, Takatsu A, Ito R, Nakazawa H (2013) Applications of stir-bar sorptive extraction to food analysis. *Trends in Analytical Chemistry*, 45: 280-293
- Lambert J-P, Mullett WM, Kwong E, Lubda D (2005) Stir bar sorptive extraction based on restricted access material for the direct extraction of caffeine and metabolites in biological fluids. *Journal of Chromatography A*, 1075(1-2): 43-49
- Lancas FM, Queiroz MEC, Grossi P, Olivares IRB (2009) Recent developments and applications of stir bar sorptive extraction. *Journal of Separation Science*, 32(5-6): 813-824
- León VM, Álvarez B, Cobollo MA et al (2003) Analysis of 35 priority semivolatile compounds in water by stir bar sorptive extraction-thermal desorption-gas chromatography-mass spectrometry: I. Method optimisation. *Journal of Chromatography A*, 999(1-2): 91-101
- León VM, Llorca-Pórcel J, Álvarez B et al (2006) Analysis of 35 priority semivolatile compounds in water by stir bar sorptive extraction-thermal desorption-gas chromatography-mass spectrometry: Part II: Method validation. *Analytica Chimica Acta*, 558(1-2): 261-266
- Liu W, Hu Y, Zhao J et al (2005) Determination of organophosphorus pesticides in cucumber and potato by stir bar sorptive extraction. *Journal of Chromatography A*, 1095(1-2): 1-7
- Liu W, Wang H, Guan Y (2004) Preparation of stir bars for sorptive extraction using sol-gel technology. *Journal of Chromatography A*, 1045(1-2): 15-22
- Nie Y, Kleine-Benne E (2011) Using three types of twister phases for stir bar sorptive extraction of whisky, wine and fruit juice. *Gerstel AppNote 3/2011* <http://www.gerstel.com/pdf/p-gc-an-2011-03.pdf>
- Ochiai N, Sasamoto K, Kanda H (2008) A novel extraction procedure for stir bar sorptive extraction (SBSE): sequential sbse for uniform enrichment of organic pollutants in water samples. *Gerstel AppNote 12/2008* <http://www.gerstel.de/pdf/p-gc-an-2008-12corrected>
- Pfannkoch E, Whitecavage J, Hoffmann A (2001) Stir bar sorptive extraction: enhancing selectivity of the PDMS phase. *Gerstel AppNote 2/2001* <http://www.gerstel.com/pdf/p-gc-an-2001-02.pdf>
- Popp P, Keil P, Montero L, Rückert M (2005) Optimized method for the determination of 25 polychlorinated biphenyls in water samples using stir bar sorptive extraction followed by thermodesorption-gas chromatography/mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1071(1-2): 155-162
- Prieto A, Basauri O, Rodil R et al (2010) Stir-bar sorptive extraction: A view on method optimisation, novel applications, limitations and potential solutions. *Journal of Chromatography A*, 1217(16): 2642-2666
- Rodil R, Popp P (2006) Determination of trace level chemical warfare agents in water and slurry samples using hollow fibre-protected liquid-phase microextraction followed by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1124(1-2) 82-90

- Rodríguez Madrera R, Suárez Valles B (2011) Determination of volatile compounds in apple pomace by stir bar sorptive extraction and gas chromatography-mass spectrometry (SBSE-GC-MS). *Journal of Food Science*, 76(9): C1326-C1334
- Sandra P, Baltussen E, David F, Hoffmann A (2000) Stir bar sorptive extraction (SBSE) applied to environmental aqueous samples. *Gerstel AppNote 2/2000* <http://www.gerstel.com/pdf/p-gc-an-2000-02.pdf>
- Splivallo R, Bossi S, Maffei M, Bonfante P (2007) Discrimination of truffle fruiting body versus mycelian aromas by stir bar sorptive extraction. *Phytochemistry*, 68(20): 2584-2598
- Stopforth A, Grobbelaar CJ, Crouch AM, Sandra P (2007) Quantification of testosterone and epitestosterone in human urine samples by stir bar sorptive extraction-thermal desorption-gas chromatography/mass spectrometry: Application to HIV-positive urine samples. *Journal of Chromatography A*, 30(2): 257-265
- Stopforth A, Tredoux A, Crouch A et al (2005) A rapid method of diagnosing pulmonary tuberculosis using stir bar sorptive extraction-thermal desorption-gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1071(1-2): 135-139
- Tienpont B, David F, Bicchi C, Sandra P (2000) High capacity headspace sorptive extraction. *Journal of Microcolumn Separations*, 12(11): 577-584
- Yang C, Wang J, Li D (2013) Microextraction techniques for the determination of volatile and semivolatile organic compounds from plants: A review. *Analytica Chimica Acta*, 799: 8-22