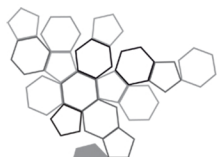


METODOLOGIE ANALITICHE UTILIZZATE PER LA DETERMINAZIONE DI SOSTANZE ORGANOALOGENATE IN CAMPIONI DI BIOTA

Delibera del Consiglio SNPA n.264/24 del 26.11.2024



Sistema Nazionale
per la Protezione
dell'Ambiente

METODOLOGIE ANALITICHE UTILIZZATE PER LA DETERMINAZIONE DI SOSTANZE ORGANOALOGENATE IN CAMPIONI DI BIOTA

Delibera del Consiglio SNPA n.264/24 del 26.11.2024

PUBBLICAZIONI TECNICHE SNPA | 2024

ISBN 978-88-448-1243-0 | Roma, Dicembre 2024

Il Sistema Nazionale a rete per la Protezione dell'Ambiente (SNPA) è operativo dal 14 gennaio 2017, data di entrata in vigore della legge 28 giugno 2016, n. 132 di "Istituzione del Sistema Nazionale a rete per la Protezione dell'Ambiente e disciplina dell'Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale" (ISPRA).

Il SNPA è composto dall'ISPRA, ente pubblico nazionale di ricerca che ne coordina le attività, e dalle agenzie per la protezione dell'ambiente delle Regioni e delle Province autonome di Trento e Bolzano.

Attraverso la cooperazione a rete, il Sistema lavora per raggiungere prestazioni tecniche ambientali uniformi sull'intero territorio nazionale, a vantaggio della tutela dell'ambiente e a beneficio della popolazione, dell'attività delle imprese e del sistema pubblico in generale. Le prestazioni tecniche riguardano le attività ispettive e di controllo ambientale, il monitoraggio dello stato dell'ambiente, il controllo delle fonti e dei fattori di inquinamento, il supporto alle attività in campo ambientale dello Stato, delle Regioni e degli enti locali, la ricerca finalizzata a tali scopi nonché la raccolta, l'organizzazione e diffusione dei dati e delle informazioni ambientali che sono riferimenti ufficiali dell'attività di tutta la pubblica amministrazione.

Il Sistema produce documenti tecnici quali Report ambientali SNPA, Linee guida SNPA, Pubblicazioni tecniche SNPA e pareri vincolanti in base alla legge. Organo deliberativo del Sistema è, ai sensi dell'art. 10 della legge n. 132/2016, il Consiglio del Sistema Nazionale, presieduto dal Presidente dell'ISPRA e composto dai rappresentanti legali delle agenzie e dal Direttore generale dell'Istituto.

Le persone che agiscono per conto delle componenti del Sistema non sono responsabili per l'uso che può essere fatto delle informazioni contenute in queste pubblicazioni.

Citare questo documento come segue:

SNPA, Metodologie analitiche utilizzate per la determinazione di sostanze organoalogenate in campioni di biota, Pubblicazioni tecniche SNPA, 2024.

ISBN 978-88-448-1243-0

© Pubblicazioni tecniche SNPA <2024>

La collana Pubblicazioni tecniche SNPA raccoglie elaborazioni prodotte dal Sistema e derivanti dalle attività di approfondimento scientifico e tecnico, anche progettuale, che accrescono la conoscenza su una tematica e sono propedeutiche alla eventuale produzione di Report ambientali SNPA o di Linee guida SNPA.

Riproduzione autorizzata citando la fonte.

Coordinamento della pubblicazione online:

Daria Mazzella – ISPRA

Copertina:

Alessia Marinelli – Ufficio Grafica ISPRA

Dicembre 2024

Abstract

La pubblicazione deriva dalla raccolta, selezione e rielaborazione delle metodologie analitiche effettivamente applicate nei laboratori SNPA per la determinazione, nella matrice biota, di contaminanti organoalogenati in conformità ai requisiti normativi di prestazione analitica. Per la determinazione di una stessa sostanza sono proposte una varietà di possibili opzioni per le varie fasi di preparazione del campione, estrazione, purificazione e determinazione strumentale, offrendo così la possibilità di eseguire la prova a laboratori con dotazioni strumentali diversificate.

This volume derives from the collection, selection and re-elaboration of the analytical methodologies actually employed in the SNPA laboratories for the determination, in the biota matrix, of organohalogen contaminants in compliance with the regulatory analytical performance requirements. For the determination of the same substance, a variety of possible options are proposed for the various analytical steps of sample preparation, extraction, purification and instrumental determination, thus offering the possibility of carrying out the test in laboratories with diversified instrumental equipment.

Parole chiave: sostanze organoalogenate, biota, diossine, Polibromodifenileteri, eptaclor ossido.

Keywords: organohalogen compounds, biota, dioxins, Polybrominated diphenyl ethers, Heptachlor epoxide.

Redattori/Autori

Giulio Sesta (ISPRA, curatore del documento)

Giorgio Pestilli (ARTA Abruzzo)

Bruno Bove (ARPA Basilicata)

Christian Bachmann (ARPA Bolzano)

Rosaria Chiappetta (ARPA Calabria)

Mariano Peri (ARPA Campania)

Giulia Montanari, Elisa Montanari, Diego Tamoni, Maria Ferrari (ARPA Emilia-Romagna)

Stefano De Martin, Sara Briguglio, Daniele Macor, Fabio Adamo, Omar Polo Perucchin, Denis Fabbro (ARPA Friuli-Venezia Giulia)

Luca Amendola, Luca Fantozzi, Mariateresa Saurini (ARPA Lazio)

Nicola Dell'Amico, Riccardo Narizzano, Carla Devia, Fabio Ghioni (ARPA Liguria)

Valeria Frattini (ARPA Lombardia)

Giuseppa Mariotti (ARPA Marche)

Maria Roberti (ARPA Molise)

Vittorio Esposito, Francesco Catucci (ARPA Puglia)

Sara Jenifer Coluccia (ARPA Piemonte)

Paola Madau (ARPA Sardegna)

Vittoria Giudice, Maria Antoci (ARPA Sicilia)

Paolo Altemura, Roberto Signorini, Massimo Carli, Alessandra Iarrobino, Valeria Filippi, Elisa Sprugnoli (ARPA Toscana)

Elena Bruni, Damiano Bracchitta (ARPA Trento)

Eugenia Peirone (ARPA Umbria)

Lorena Masieri (ARPA Valle d'Aosta)

Biagio Gianni, Filomena Scamardella, Alessandro Ragazzo, Aurora Favretto, Tecla Bellon (ARPA Veneto)

Percorso istruttorio

Documento elaborato nell'ambito delle articolazioni istruttorie del Consiglio SNPA:

Rete Tematica RR TEM 16 – Laboratori

Linea di Attività RR TEM 16-2 - Sviluppo e armonizzazione di metodologie analitiche condiviso con:

Rete Tematica RR TEM 09 - Acque superficiali e sotterranee

Linea di Attività RR TEM 09-1 - Applicazione Direttiva acque

Rete Tematica RR TEM 10 – Acque marine, marino-costiere e di transizione

Coordinamento Tecnico Operativo (CTO)

Documento adottato dal Consiglio SNPA, con Delibera del Consiglio SNPA n. 264/2024 del 26.11.2024

SOMMARIO

PREMESSA	9
SINTESI.....	10
ABBREVIAZIONI	12
1 DETERMINAZIONE DI ESACLOROBENZENE, ESACLOROBUTADIENE, DDT TOTALE E DICOFOL IN CAMPIONI DI BIOTA, MEDIANTE GASCROMATOGRAFIA - SPETTROMETRIA DI MASSA GC-MS/MS.....	13
1.1 CAMPO DI APPLICAZIONE	13
1.2 PRINCIPIO DEL METODO.....	13
1.3 INTERFERENZE E CAUSE DI ERRORE.....	14
1.4 PREPARAZIONE DEL CAMPIONE	14
1.5 PROCEDIMENTO ANALITICO	15
1.5.1 Preparazione delle soluzioni standard	15
1.5.2 Campioni di controllo e standard interni.....	16
1.5.2.1 <i>Campioni di controllo</i>	16
1.5.2.2 <i>Fortificazione dei campioni con standard interni di processo o surrogati.....</i>	16
1.5.3 Estrazione di tipo QuEChERS	16
1.5.3.1 <i>Esempio 1 metodo QuEChERS.....</i>	17
1.5.3.2 <i>Esempio 2 metodo QuEChERS.....</i>	17
1.5.3.3 <i>Esempio 3 metodo QuEChERS.....</i>	17
1.5.3.4 <i>Esempio 4 metodo QuEChERS.....</i>	18
1.5.4 Estrazione di tipo tradizionale.....	18
1.5.4.1 <i>Esempio di estrazione PFE</i>	18
1.5.4.2 <i>Purificazione su cartuccia di silice</i>	19
1.5.4.3 <i>Purificazione mediante Cromatografia di Gel Permeazione.....</i>	20
1.5.5 Determinazione di HCBd mediante tecniche per analiti volatili.....	21
1.5.6 Analisi GC-MS/MS.....	22
1.5.6.1 <i>Condizioni strumentali</i>	22
1.6 ANALISI DELLE SOLUZIONI STANDARD E DEI CAMPIONI	23
1.6.1 Criteri di identificazione	24
1.6.2 Calcoli.....	24
1.6.2.1 <i>Modalità di quantificazione</i>	24
1.6.2.2 <i>Determinazione dei fattori di risposta relativi.....</i>	24
1.6.2.3 <i>Linearità del rapporto di risposta relativo.....</i>	25
1.6.2.4 <i>Verifica della taratura.....</i>	25
1.6.2.5 <i>Calcolo della concentrazione degli analiti.....</i>	25
1.6.2.6 <i>Calcolo del recupero.....</i>	26
1.6.3 Valutazione del bianco di procedimento	26

2 DETERMINAZIONE DI EPTACLOR ED EPTACLOR EPOSSIDO IN CAMPIONI DI BIOTA MEDIANTE GASCROMATOLOGRAFIA - SPETTROMETRIA DI MASSA GC-MS/MS O GC/HRMS	27
2.1 CAMPO DI APPLICAZIONE	27
2.2 PRINCIPIO DEL METODO	27
2.3 INTERFERENZE E CAUSE DI ERRORE	27
2.4 PREPARAZIONE DEL CAMPIONE	28
2.5 PROCEDIMENTO ANALITICO	28
2.5.1 Preparazione delle soluzioni standard	28
2.5.2 Campioni di controllo e standard interni	29
2.5.2.1 Campioni di controllo	29
2.5.2.2 Fortificazione dei campioni con standard interni di processo o surrogati	29
2.6 PROCEDIMENTO N° 1 (PFE, GPC-SPE, GC-MS/MS)	29
2.6.1 Estrazione e purificazione - Procedimento n° 1	29
2.6.2 Analisi GC-MS/MS - Procedimento n° 1	31
2.7 PROCEDIMENTO N° 2 (DIBATTIMENTO CON SOLVENTI, ACIDO SOLFORICO O GPC, GC-HRMS)	32
2.7.1 Determinazione del contenuto di lipidi	32
2.7.2 Estrazione e purificazione- Procedimento n° 2	33
2.7.2.1 Purificazione fase 1 – opzione 1 (campioni con lipidi <5%)	33
2.7.2.2 Purificazione fase 1 – opzione 2 (campioni con lipidi >5%)	33
2.7.2.3 Purificazione fase 2	33
2.7.3 ANALISI GC-HRMS - Procedimento n° 2	33
2.8 ANALISI DELLE SOLUZIONI STANDARD E DEI CAMPIONI	34
2.8.1 Criteri di identificazione	35
2.8.2 Calcoli	35
2.8.2.1 Modalità di quantificazione	35
2.8.2.2 Determinazione dei fattori di risposta relativi	35
2.8.2.3 Verifica della taratura	36
2.8.2.4 Calcolo della concentrazione degli analiti	36
2.8.2.5 Calcolo del recupero	37
2.8.3 Valutazione del bianco di procedimento	37
3 DETERMINAZIONE DI DIFENILETERI BROMURATI IN CAMPIONI DI BIOTA MEDIANTE GASCROMATOLOGRAFIA - SPETTROMETRIA DI MASSA GC/HRMS O GC-MS/MS	38
3.1 CAMPO DI APPLICAZIONE	38
3.2 PRINCIPIO DEL METODO	38
3.3 INTERFERENZE E CAUSE DI ERRORE	39
3.4 PREPARAZIONE DEL CAMPIONE	39
3.5 PROCEDIMENTO ANALITICO	40
3.5.1 Preparazione delle soluzioni standard	40
3.5.2 Campioni di controllo e standard interni	40

3.5.2.1	Campioni di controllo	40
3.5.2.2	Fortificazione dei campioni con standard interni di processo o surrogati	41
3.5.3	Estrazione e purificazione	41
3.5.4	Determinazione strumentale.....	41
3.5.4.1	Criteri di identificazione.....	41
3.5.5	Calcoli.....	42
3.5.5.1	Determinazione dei fattori di risposta relativi.....	42
3.5.5.2	Verifica della taratura.....	42
3.5.5.3	Calcolo della concentrazione degli analiti.....	43
3.5.5.4	Calcolo del recupero.....	43
3.5.5.5	Valutazione del bianco di procedimento.....	44
3.6	PROCEDIMENTI LABORATORI SNPA.....	44
3.6.1	Procedimento n° 1 (PFE, SPE automatizzata, GC-HRMS o GC-MS/MS).....	44
3.6.1.1	Estrazione e purificazione - Procedimento n° 1.....	44
3.6.1.2	Analisi GC-MS/MS - Procedimento n° 1.....	45
3.6.1.3	Analisi GC-HRMS - Procedimento n° 1.....	46
3.6.2	Procedimento n° 2 (opzione soli PBDE e opzione PBDE+PCDD/F, GC-HRMS)	47
3.6.2.1	Estrazione e purificazione - Procedimento n° 2 opzione 1 (solo PBDE).....	47
3.6.2.2	Estrazione e purificazione - Procedimento n° 2 opzione 2 (PBDE+PCDD/F).....	47
3.6.2.3	Analisi GC-HRMS - Procedimento n° 2.....	48
3.6.3	Esempio di applicazione metodo EPA 1614A 2010.....	49
4	DETERMINAZIONE DI DIOSSINE E COMPOSTI DIOSSINA-SIMILI IN CAMPIONI DI BIOTA MEDIANTE	
	GASCROMATOGRAFIA - SPETTROMETRIA DI MASSA AD ALTA RISOLUZIONE.....	54
4.1	CAMPO DI APPLICAZIONE	54
4.2	PRINCIPIO DEL METODO.....	55
4.3	INTERFERENZE E CAUSE DI ERRORE.....	56
4.4	PREPARAZIONE DEL CAMPIONE	56
4.5	PROCEDIMENTO ANALITICO	56
4.5.1	Preparazione delle soluzioni standard	57
4.5.2	Campioni di controllo e standard interni.....	57
4.5.2.1	Campioni di controllo	57
4.5.2.2	Fortificazione dei campioni con standard interni di processo.....	57
4.5.3	Estrazione e purificazione	57
4.5.4	Determinazione strumentale.....	58
4.5.4.1	Criteri di identificazione.....	58
4.5.5	Calcoli.....	58
4.5.5.1	Determinazione dei fattori di risposta relativi.....	59
4.5.5.2	Verifica della taratura.....	59
4.5.5.3	Calcolo della concentrazione degli analiti.....	59

4.5.5.4	Calcolo del recupero.....	60
4.5.5.5	Valutazione del bianco di procedimento.....	60
4.6	PROCEDIMENTI LABORATORI SNPA.....	60
4.6.1	Procedimento n° 1 (PFE, SPE automatizzata, GC-HRMS o GC-MS/MS).....	61
4.6.1.1	Estrazione e purificazione - Procedimento n° 1.....	61
4.6.1.2	Analisi GC-HRMS - Procedimento n° 1.....	61
4.6.2	Procedimento n° 2 (MAE, SPE automatizzata, GC-HRMS).....	65
4.6.2.1	Estrazione e purificazione - Procedimento n° 2.....	65
4.6.2.2	Analisi GC-HRMS per PCDD/F- Procedimento n° 2.....	67
4.6.2.3	Analisi GC-HRMS per PCB-DL- Procedimento n° 2.....	71
4.6.3	Procedimento n° 3 - Esempio di applicazione metodo EPA 1613B 1994.....	75
4.6.4	Procedimento n° 4 (Soxhlet, SPE automatizzata, GC/HRMS e GC-MS/MS).....	76
4.6.4.1	Preparazione del campione - Procedimento n° 4.....	76
4.6.4.2	Estrazione - Procedimento n° 4.....	76
4.6.4.3	Purificazione - Procedimento n° 4.....	76
4.6.4.4	Analisi Strumentale PCDD/F - Procedimento n° 4.....	77
4.6.4.5	Analisi Strumentale PCB-DL - Procedimento n° 4.....	77
5	RIFERIMENTI.....	79

PREMESSA

La Direttiva Quadro sulle Acque 2000/60/CE, recepita all'interno dell'ordinamento nazionale attraverso la Parte Terza del Decreto legislativo 3 aprile 2006, n. 152 (e ss. mm. ii.) prevede l'esecuzione di monitoraggi per la classificazione dello stato di qualità dei corpi idrici. Tale norma prevede l'obbligo del monitoraggio di alcuni contaminanti chimici nella matrice biota e definisce per questi dei valori di Standard di Qualità Ambientale (SQA). Attualmente sono in vigore i valori di SQA così come modificati dal D.Lgs. 172/2015. Il D.Lgs. 219/2010, recependo la direttiva 2009/90/CE, introduce nel Decreto legislativo 3 aprile 2006, n. 152 dei "Requisiti minimi di prestazione per i metodi di analisi", tra i quali quello per cui "il limite di quantificazione dei metodi deve essere uguale od inferiore al 30% dei valori dello standard di qualità (SQA-MA)".

Rispetto a matrici ambientali come acque e sedimenti, per la matrice biota vi è, nei laboratori di chimica ambientale, una expertise analitica meno consolidata, a causa di diversi fattori. In generale vi è una minor consuetudine con l'analisi di tale matrice a causa della necessità di campionamenti specifici e particolari, dipendenti anche dalla specie di biota da prelevare; l'analisi del biota pone notevoli problematiche analitiche a causa delle grosse quantità di interferenti che necessariamente risultano coestrate insieme agli analiti ricercati e ciò richiede l'impiego di combinazioni di tecniche di purificazione specifiche; i valori di SQA definiti per alcune sostanze nella matrice biota sono molto bassi, richiedendo quindi il raggiungimento di livelli di quantificazione estremamente ridotti che sono ai limiti delle possibilità anche della strumentazione più sofisticata di ultima generazione.

In considerazione di quanto esposto è stata ravvisata l'utilità di mettere a disposizione dei laboratori una raccolta di procedure analitiche impiegabili per la determinazione nel biota delle sostanze previste dalla normativa vigente, con particolare riferimento a quelle riportate in tabella 1/A del paragrafo A.2.6 dell'allegato 1 alla parte terza del D.Lgs. 152/2006. Per sostanze quali idrocarburi policiclici aromatici e metalli in tracce è da tempo disponibile la pubblicazione ISPRA Manuali e Linee Guida 176/2018 mentre era percepita la necessità di una pubblicazione tecnica per le altre sostanze per le quali è prescritto il monitoraggio nel biota e che sono tutte organoalogenate. È stata quindi effettuata una ricognizione in due tempi, con un livello di approfondimento crescente, delle procedure e strumentazioni impiegate dai laboratori del Sistema. La presente pubblicazione tecnica deriva quindi dalla raccolta, selezione e rielaborazione delle metodologie effettivamente applicate nei laboratori SNPA per la determinazione nella matrice biota di contaminanti organoalogenati in conformità ai requisiti normativi di prestazione analitica. La possibilità di attingere alle esperienze dei diversi laboratori SNPA ha consentito di poter proporre, per la determinazione di una stessa sostanza, una varietà di possibili opzioni per le varie fasi di preparazione del campione, estrazione, purificazione e determinazione strumentale, offrendo così la possibilità di eseguire la prova a laboratori con dotazioni strumentali diversificate.

Nei casi in cui è stata ritenuta probabile per la maggior parte dei laboratori l'applicazione di una metodica multi-analita, la trattazione delle procedure è stata congiunta per più sostanze. Nel caso, ad esempio, delle sostanze Esaclorobutadiene (HCBd), Esaclorobenzene (HCB), DDT totale e Dicofof, accomunate dalla possibilità di essere determinate congiuntamente come semivolatili e dai limiti di quantificazione richiesti non particolarmente bassi, è stata fatta una trattazione congiunta nel primo capitolo.

Nei casi in cui l'applicazione di un metodo multianalita non è stata ritenuta probabile per la maggior parte dei laboratori la trattazione è stata "dedicata" per un singolo analita o per una singola classe di analiti. È il caso di Eptacloro ed il suo epossido i quali, dato il limite di quantificazione estremamente basso richiesto, sono stati trattati in maniera specifica nel capitolo 2; è il caso dei PoliBromoDifenilEteri (PBDE) che sono stati trattati in maniera specifica nel capitolo 3; è il caso di diossine e composti diossina-simili che sono stati trattati in maniera specifica nel capitolo 4.

Premettendo che l'effettiva conformità di un metodo allo scopo deve essere verificata e dimostrata dal laboratorio che lo adotta e applica, è da segnalare come le procedure descritte, così come applicate nei laboratori SNPA che le hanno sviluppate, siano in grado di raggiungere i requisiti di prestazione analitica attualmente vigenti; tuttavia i requisiti di prestazione dipendono dal valore di SQA per cui, in caso di variazione, in particolare al ribasso, dei valori normativi di SQA, non è scontato che le procedure proposte siano in grado di soddisfare i nuovi requisiti di prestazione. In caso di contenute variazioni dei requisiti di prestazione le procedure descritte potrebbero essere ancora in grado di garantirli, in caso di variazioni maggiori potrebbe essere necessario apportare delle modifiche di varia entità alle procedure descritte. In ogni caso è responsabilità del laboratorio che applica il metodo compiere tali modifiche e verifiche.

Oltre agli analiti summenzionati, la normativa vigente prevede la determinazione nel biota di altri composti organoalogenati, acido perfluorottansolfonico (PFOS) ed esabromociclododecano (HBCDD) i quali, insieme ad ulteriori analiti che gli aggiornamenti normativi dovessero introdurre, saranno oggetto della prosecuzione del lavoro di raccolta e rielaborazione delle metodiche analitiche impiegate dai laboratori SNPA.

SINTESI

La presente pubblicazione tecnica deriva dalla raccolta, selezione e rielaborazione delle metodologie analitiche effettivamente applicate nei laboratori SNPA per la determinazione nella matrice biota dei contaminanti organoalogenati previsti dalla normativa vigente, con particolare riferimento a quelle riportate in tabella 1/A del paragrafo A.2.6 dell'allegato 1 alla parte terza del D.Lgs. 152/2006, in conformità ai requisiti normativi di prestazione analitica.

La possibilità di attingere alle esperienze dei diversi laboratori SNPA ha consentito di poter proporre, per la determinazione di una stessa sostanza, una varietà di possibili opzioni per le varie fasi di preparazione del campione, estrazione, purificazione e determinazione strumentale, offrendo così la possibilità di eseguire la prova a laboratori con dotazioni strumentali diversificate.

Le procedure descritte, così come applicate nei laboratori SNPA che le hanno sviluppate, sono in grado di raggiungere i requisiti di prestazione analitica definiti dalla normativa attualmente vigente e che dipendono dal valore di SOA stabilito per la sostanza.

Nel capitolo 1 vengono trattati gli aspetti generali relativi alla determinazione nei tessuti di biota di Esaclorobenzene, Esaclorobutadiene, DDT totale e Dicofol mediante gascromatografia con rivelazione in spettrometria di massa a triplo quadrupolo e vengono poi descritte alcune procedure impiegate dai laboratori SNPA. È prevista sia la possibilità di liofilizzare il campione sia l'analisi del campione umido. Sono descritti sia procedimenti di tipo QuEChERS sia procedimenti di estrazione di tipo tradizionale.

Il procedimento di estrazione tradizionale presentato prevede una procedura a Fluido Pressurizzato (PFE), seguita da una fase di purificazione che può essere una cromatografia di gel permeazione (GPC, seguita o meno da purificazione su cartuccia di ammina primaria e secondaria, PSA) o una estrazione su fase solida (SPE) con silice.

I procedimenti QuEChERS descritti prevedono invece un'estrazione mediante dibattimento con acetonitrile (ACN) e sali, seguita da una purificazione in una o più fasi, quali una *dispersive* SPE, il congelamento dell'estratto o una SPE su cartuccia.

È prevista la possibilità di effettuare la quantificazione sia mediante standard interni di processo, che correggono il risultato anche per il recupero analitico, sia mediante standard interni di iniezione, impiegando gli standard surrogati per la verifica del recupero.

La determinazione strumentale descritta avviene mediante GC/MS/MS a triplo quadrupolo ma è possibile impiegare tecniche come la spettrometria di massa ad alta risoluzione.

Per il solo Esaclorobutadiene è prevista anche la possibilità di eseguire la determinazione mediante tecniche specifiche per analiti volatili, quali l'estrazione Purge&Trap oppure dello spazio di testa statico, accoppiate a GC/MS.

Nel capitolo 2 vengono trattati gli aspetti generali relativi alla determinazione nei tessuti di biota di Eptacloro ed Eptacloro epossido mediante gascromatografia con rivelazione in spettrometria di massa a triplo quadrupolo o ad alta risoluzione e vengono poi descritte alcune procedure impiegate dai laboratori SNPA. A causa dei bassi limiti di quantificazione richiesti è necessario impiegare procedure che consentano un elevato fattore di concentrazione degli analiti, cosa che richiede una purificazione accurata degli estratti e rende difficilmente impiegabili tecniche di tipo QuEChERS. Vengono quindi descritti due procedimenti, che impiegano tecniche di estrazione e purificazione di tipo tradizionale, effettivamente applicati da laboratori del SNPA.

Il primo procedimento prevede l'estrazione a fluido pressurizzato del campione umido, previa miscelazione con solido igroscopico inerte, seguita da cromatografia di gel permeazione (GPC) e da un ulteriore step di purificazione mediante estrazione in fase solida su cartuccia di carbone attivo/PSA (ammina primaria e secondaria). La determinazione strumentale prevede l'impiego della gascromatografia accoppiata a spettrometro di massa a triplo quadrupolo.

Il secondo procedimento prevede l'estrazione del campione liofilizzato mediante dibattimento con una miscela di solventi e la purificazione dell'estratto in due step; il primo step prevede il dibattimento con acido solforico concentrato oppure, nel caso di specie di biota contenenti più del 5% di lipidi, la purificazione mediante cromatografia di gel permeazione; il secondo step prevede una purificazione su cartuccia di silice e florisil. La determinazione strumentale prevede l'impiego della gascromatografia accoppiata a spettrometria di massa ad alta risoluzione.

Per entrambi i procedimenti la quantificazione viene effettuata per diluizione isotopica, impiegando standard interni di estrazione (composti analoghi agli analiti ma marcati con carbonio-13) e standard interni di iniezione per la determinazione del recupero degli standard di estrazione.

Nel capitolo 3 vengono trattati gli aspetti generali relativi alla determinazione nei tessuti di biota dei polibromodifenileteri mediante gascromatografia con rivelazione in spettrometria di massa ad alta risoluzione o a triplo quadrupolo e vengono poi descritte alcune procedure impiegate dai laboratori SNPA. Anche nel caso dei PBDE, a causa dei bassi limiti di quantificazione richiesti, è necessario impiegare procedure che consentano un elevato fattore di concentrazione degli analiti, cosa che richiede una purificazione accurata degli estratti e rende difficilmente impiegabili tecniche di tipo QuEChERS senza combinarle con ulteriori tecniche di purificazione. Vengono quindi descritti tre procedimenti, che impiegano tecniche di estrazione e purificazione di tipo tradizionale, effettivamente applicati da laboratori del SNPA.

Il primo procedimento, mediante il quale vengono estratti PBDE e diossine, prevede l'estrazione a fluido pressurizzato del campione liofilizzato, seguita da purificazione mediante purificatore automatico programmabile mediante una combinazione di tipologie di estrazione in fase solida su cartuccia di silice, allumina basica e carbone. La determinazione strumentale prevede l'impiego della

gascromatografia con due opzioni di rivelazione: spettrometria di massa a triplo quadrupolo e spettrometria di massa ad alta risoluzione.

Il secondo procedimento prevede due opzioni: la determinazione dei soli PBDE mediante estrazione del campione liofilizzato per dibattimento con una miscela di solventi e la purificazione dell'estratto per dibattimento con acido solforico concentrato oppure la determinazione dei PBDE insieme alle diossine mediante estrazione assistita dalle microonde seguita da purificazione con purificatore automatico programmabile mediante una combinazione di tipologie di estrazione in fase solida su cartucce di silice, allumina basica e carbone. La determinazione strumentale prevede l'impiego della gascromatografia accoppiata a spettrometria di massa ad alta risoluzione.

Come terzo esempio di procedimento impiegato da laboratori SNPA per la determinazione di PBDE in campioni di biota viene riportato un insieme di integrazioni e modifiche apportate al metodo EPA 1614A 2010.

Per tutti i procedimenti la quantificazione viene effettuata per diluizione isotopica, impiegando standard interni di estrazione (composti analoghi agli analiti ma marcati con carbonio-13) e standard interni di iniezione per la determinazione del recupero degli standard di estrazione.

Nel capitolo 4 vengono trattati gli aspetti generali relativi alla determinazione nei tessuti di biota di diossine e dei composti diossina simili mediante gascromatografia con rivelazione in spettrometria di massa ad alta risoluzione o a triplo quadrupolo e vengono poi descritte alcune procedure impiegate dai laboratori SNPA.

Il procedimento n°1, concepito per l'estrazione congiunta di PBDE e diossine, prevede l'estrazione a fluido pressurizzato del campione liofilizzato, seguita da purificazione mediante purificatore automatico programmabile mediante una combinazione di tipologie di estrazione in fase solida su cartuccia di silice, allumina basica e carbone. La determinazione strumentale prevede l'impiego della gascromatografia con rivelazione mediante spettrometria di massa ad alta risoluzione.

Il procedimento n°2 prevede una estrazione assistita dalle microonde, una parziale purificazione mediante dibattimento con acido solforico concentrato seguito da una serie di diverse opzioni e combinazioni di tecniche di purificazione. La prima alternativa di purificazione prevede una cromatografia di gel permeazione seguita da una SPE (con frazionamento) realizzata o in modo manuale (con doppia colonna silice/allumina) o in modalità automatizzata (con purificatore automatico programmabile) su cartucce di dimensione standard. La seconda alternativa di purificazione prevede direttamente una SPE automatizzata multicolonna impiegando però cartucce di dimensione maggiorata. La determinazione strumentale avviene mediante HRGC/HRMS.

Come terzo esempio di procedimento impiegato da laboratori SNPA per la determinazione di PCDD, PCDF e PCB-DL in campioni di biota viene riportato un insieme di integrazioni e modifiche apportate ai metodi EPA 1613B 1994 e EPA 1668C 2010.

Il quarto esempio di procedimento impiegato da laboratori SNPA per la determinazione di PCDD, PCDF e PCB-DL (e PBDE) prevede l'estrazione del campione liofilizzato mediante Soxhlet automatizzato e una purificazione automatizzata (LCtech modello Dextech) su colonne di silice multistrato e florisil. La determinazione di PCDD/F avviene in GC con rivelazione mediante spettrometria di massa ad alta risoluzione a settore magnetico mentre la determinazione dei PCB-DL (e PBDE) avviene mediante GC con rivelazione mediante spettrometria di massa a triplo quadrupolo.

Per tutti i procedimenti la quantificazione viene effettuata per diluizione isotopica, impiegando standard interni di estrazione (composti analoghi agli analiti ma marcati con carbonio-13) e standard interni di iniezione per la determinazione del recupero degli standard di estrazione.

Abbreviazioni

¹³ C	carbonio 13
DCM	diclorometano
DDT	Dicloro-difenil-tricloroetano
GPC	Gel Permeation Chromatography, cromatografia di gel permeazione
GC	gascromatografia
GC/MS	gascromatografia con rivelazione per spettrometria di massa
GC-HRMS	gascromatografia con rivelazione per spettrometria di massa ad alta risoluzione
GC-MS/MS	gascromatografia con rivelazione per spettrometria di massa tandem
HCB	Esaclorobenzene
HCBD	Esaclorobutadiene
HRGC	gascromatografia ad alta risoluzione
IPA	idrocarburi policiclici aromatici
MAE	Microwave Assisted Extraction
MID	Multiple Ion Detection
MRM	Multiple Reaction Monitoring (modalità di acquisizione in GC-MS/MS)
PBDE	polibromodifenileteri
PCB	policlorobifenili
PCB-DL	policlorobifenili diossina simili
PCB-nDL	policlorobifenili non diossina simili
PCDD	policlorodibenzodiossine
PCDF	policlorodibenzofurani
PCDD/F	policlorodibenzodiossine e policlorodibenzofurani
PFE	Pressurized Fluid Extraction
PSA	ammina primaria e secondaria
PTV	Programmable Temperature Vaporization
QuEChERS	Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe
RPM	rounds per minute, giri al minuto
SNPA	Sistema Nazionale Protezione Ambiente
SPE	solid phase extraction, estrazione in fase solida

1 DETERMINAZIONE DI ESACLOROBENZENE, ESACLOROBUTADIENE, DDT TOTALE E DICOFOL IN CAMPIONI DI BIOTA, MEDIANTE GASCROMATOLOGRAFIA - SPETTROMETRIA DI MASSA GC-MS/MS

1.1 CAMPO DI APPLICAZIONE

Le procedure descritte sono applicate per la determinazione, nei tessuti di biota, dei composti riportati di seguito, mediante gascromatografia con rivelazione in spettrometria di massa a triplo quadrupolo (GC-MS/MS).

Tabella 1-1: elenco degli analiti in esame con n° di registro CAS e SQA nel biota previsto dalla normativa

Analita	N° registro CAS	SQA Biota (µg/kg di peso umido) D.Lgs. 172/2015
Esaclorobenzene (HCB)	118-74-1	10
Esaclorobutadiene (HCBd)	87-68-3	55
DDT totale:		50 (<5% grassi) 100 (>5% grassi)
<i>1,1,1-tricloro 2,2 bis (p-clorofenil)etano (p,p' DDT)</i>	50-29-3	
<i>1,1,1-tricloro-2 (o-clorofenil)-2-(p-clorofenil)etano (o,p' DDT)</i>	789-02-6	
<i>1,1-dicloro-2,2 bis (p-clorofenil)etilene(p,p' DDE)</i>	72-55-9	
<i>1,1-dicloro-2,2 bis (p-clorofenil)etano (p,p' DDD)</i>	72-54-8	
Dicofol	115-32-2	33

Le procedure descritte consentono di determinare i composti sopra elencati nella matrice biota conformemente ai requisiti minimi di prestazione individuati dal D.Lgs. 219/2010 in relazione ai valori di SQA attualmente vigenti (D.Lgs. 172/2015). La maggior parte delle opzioni analitiche descritte di seguito consentono di raggiungere performance superiori a quelle attualmente richieste e potrebbero continuare ad essere idonee allo scopo anche in caso di modifiche normative al ribasso dei valori di SQA. In ogni caso è richiesta la verifica da parte del laboratorio della conformità del metodo ai requisiti di prestazioni analitiche.

1.2 PRINCIPIO DEL METODO

La procedura presenta diverse modalità alternative utilizzabili per le varie fasi analitiche. È prevista sia la possibilità di liofilizzare il campione sia l'analisi del campione umido. Sono descritti sia procedimenti di tipo QuEChERS sia procedimenti di estrazione di tipo tradizionale (è descritta quella a fluido pressurizzato), seguita da purificazioni come la cromatografia di gel permeazione (GPC) o la estrazione in fase solida su cartuccia. La scelta del procedimento analitico può dipendere anche dal contenuto lipidico del campione o dalla sensibilità richiesta; elevate percentuali di grassi o l'esigenza di limiti di quantificazione particolarmente bassi possono precludere l'impiego di procedimenti QuEChERS e richiedere tecniche tradizionali di estrazione e purificazione.

Il procedimento di estrazione tradizionale presentato prevede una procedura a Fluido Pressurizzato (PFE) (ma sono in generale applicabili anche altre tecniche quali, ad esempio, l'estrazione con solvente assistita da microonde o da ultrasuoni), seguita da una fase di purificazione che può essere una cromatografia di gel permeazione (GPC, seguita o meno da purificazione su cartuccia di ammina primaria e secondaria, PSA) o una estrazione su fase solida (SPE) con silice.

I procedimenti QuEChERS descritti prevedono invece un'estrazione mediante dibattimento con acetonitrile (ACN) e sali, seguita da una purificazione in una o più fasi, quali una *dispersive* SPE, il congelamento dell'estratto o una SPE su cartuccia.

È prevista la possibilità di effettuare la quantificazione sia mediante standard interni di processo, che correggono il risultato anche per il recupero analitico, sia mediante standard interni di iniezione, impiegando gli standard surrogati per la verifica del recupero.

La determinazione strumentale descritta avviene mediante GC/MS/MS a triplo quadrupolo ma è possibile impiegare tecniche come la spettrometria di massa ad alta risoluzione.

Per il solo Esaclorobutadiene è prevista anche la possibilità di eseguire la determinazione mediante tecniche specifiche per analiti volatili, quali l'estrazione Purge&Trap oppure dello spazio di testa statico, accoppiate a GC/MS.

1.3 INTERFERENZE E CAUSE DI ERRORE

La natura e quantità delle sostanze interferenti coestratte possono variare in relazione alla composizione della matrice del campione e quindi alla specie di organismo analizzato.

L'utilizzo di reagenti ad elevata purezza e di solventi "grado pesticidi", unitamente alla determinazione analitica attraverso separazione cromatografica mediante colonne capillari ad alta risoluzione e rivelazione in spettrometria di massa in modalità Multiple Reaction Monitoring, aiutano a minimizzare i problemi di interferenza.

La vetreria di laboratorio riutilizzabile non deve essere eccessivamente usurata e deve essere pulita scrupolosamente prima del riutilizzo. Per quanto possibile, è raccomandabile tenere separata la vetreria utilizzata per la preparazione dei "bianchi fortificati", al fine di evitare contaminazioni incrociate.

Due degli analiti in esame, Esaclorobenzene ed Esaclorobutadiene, sono particolarmente volatili, in particolare HCB. La liofilizzazione del campione, rispetto ad altre modalità di disidratazione, è più conservativa nei confronti di analiti termolabili e volatili. È possibile quindi lavorare sul campione liofilizzato, previa verifica che le specifiche condizioni operative applicate non comportino perdite degli analiti più volatili. Ciò può essere realizzato o mediante liofilizzazione e analisi di campioni freschi derivanti da un circuito di Proficiency Testing che abbia assegnato dei valori per HCB e HCBd oppure mediante fortifica di campioni freschi, esenti da analiti, che vengono congelati, liofilizzati e analizzati. Alternativamente è possibile estrarre il campione umido senza liofilizzarlo, evitando in questo modo perdite anche minime dovute al vuoto applicato. Nel caso di tecniche che prevedano uno spazio di testa nel contenitore del campione, come l'estrazione assistita da ultrasuoni o con microonde, è necessario verificare che le specifiche condizioni operative impiegate non comportino perdite degli analiti, in particolare i più volatili. Un'altra fase che può risultare critica per il recupero degli analiti più volatili è la concentrazione dell'estratto. È preferibile non prostrarla fino al raggiungimento di volumi troppo piccoli, in particolare per le fasi intermedie di concentrazione che vengono effettuate preliminarmente a step di purificazione. Anche l'iniezione in gascromatografia può costituire una fase critica in quanto, se eseguita in modalità solvent vent, richiede una attenta ottimizzazione delle condizioni operative per evitare la perdita degli analiti volatili nella fase di eliminazione del solvente. Un'iniezione in modalità splitless evita questo rischio. Nel caso venga impiegata la modalità solvent vent, può essere utile il raffreddamento dell'iniettore con un criogenico.

L'analita DDT risente sia di una eccessiva temperatura dell'iniettore, che può provocare degradazione del composto, sia del progressivo accumularsi nel liner dell'iniettore di sostanze altobollenti dovute alla matrice. Il risultato è una diminuzione della risposta strumentale di questo analita, ragione per cui è necessario prevedere, durante la sequenza strumentale, l'analisi di soluzioni standard per verificare la costanza della risposta del DDT. In caso di diminuzione della risposta è necessario procedere alla pulizia dell'iniettore e alla sostituzione dei suoi materiali di consumo e se necessario alla taratura, nonché alla reiniezione dei campioni analizzati tra l'ultimo controllo della risposta superato ed il primo controllo fallito. Nel caso di quantificazione mediante standard interni isotopicamente marcati del tutto analoghi all'analita la diminuzione del segnale non inficia, entro certi limiti, la corretta quantificazione in quanto riguarda le risposte sia dell'analita sia del suo standard interno. In questo caso la pulizia del sistema sarà necessaria solo nel caso non vengano più rispettati criteri relativi all'area minima degli standard di controllo.

Poiché il Dicofol è soggetto a degradazione (in particolare a p,p'-diclorobenzofenone ed in particolare in ambienti alcalini) durante le varie fasi analitiche di macinazione estrazione, purificazione e determinazione strumentale (in particolare nella fase di iniezione) può essere vantaggioso l'uso di uno standard interno marcato isotopicamente (ad esempio Dicofol-d8) per compensare le perdite per degradazione durante le varie fasi analitiche, nonché privilegiare gli ambienti leggermente acidi per estratti e soluzioni (ad esempio 0.05% acido formico).

1.4 PREPARAZIONE DEL CAMPIONE

Salvo diversa indicazione della normativa vigente, la determinazione delle sostanze in questione viene eseguita sui pesci. In coerenza con quanto è stato stabilito e ad oggi praticato per il monitoraggio del biota in ottemperanza alla Direttiva Strategia Marina, l'analisi deve essere condotta sul tessuto muscolare di individui adulti, delle taglie commerciali di cui al Regolamento (CE) n. 1967/2006 del Consiglio del 21 dicembre 2006. Nel caso in cui le dimensioni degli esemplari campionati siano inferiori a cm 15, le analisi possono essere effettuate sugli organismi in toto raccolti in pool.

Prima della dissezione devono essere eseguite e registrate le misurazioni biometriche quali lunghezza totale, lunghezza standard (esclusa la pinna caudale), altezza (escluse le pinne), peso degli esemplari e, nel caso di pool, i valori medi con deviazione standard e gli intervalli di variabilità. Una volta eseguite le operazioni necessarie a prelevare la parte di biota da sottoporre ad analisi (a seconda dell'organismo: pulitura, eviscerazione, sfilettatura etc.) il campione risultante viene generalmente omogeneizzato (sebbene sia possibile eseguire l'eventuale liofilizzazione anche sulle parti intere). Ai fini dell'omogeneizzazione il campione viene solitamente dapprima tagliato grossolanamente per essere più efficacemente sminuzzato con un macinatore a lame (a bicchiere o a immersione). L'omogeneizzato fresco così ottenuto può essere analizzato o conservato in congelatore tal quale oppure può essere sottoposto a liofilizzazione. La liofilizzazione consente una più agevole conservazione del campione per le successive analisi. Se necessario il campione liofilizzato può essere setacciato, ad esempio su maglia da 2mm, per eliminare parti grossolane non triturate (ad es. lisce o squame) ed eventualmente ulteriormente rimacinato.

Poiché i risultati devono essere espressi rispetto alla massa di campione fresco, nel caso si analizzi il campione liofilizzato, è essenziale determinare il contenuto di acqua del campione in modo da poter ricondurre i risultati al peso umido.

Oltre al contenuto di acqua, poiché l'SQA relativo al DDT totale è attualmente previsto come variabile in funzione del contenuto di grassi nel pesce, è necessario determinare la frazione lipidica percentuale. La determinazione può essere eseguita secondo vari metodi di cui si riportano di seguito degli esempi.

Esempio 1. La determinazione del contenuto di lipidi può avvenire sul campione tal quale oppure sul campione liofilizzato. Il grasso viene estratto con una miscela di 2-propanolo - cicloesano (2:1) in presenza di sodio solfato anidro per eliminare l'acqua. L'estrazione dei grassi avviene in ultrasuoni per 30 minuti, poi si centrifuga e si recupera il surnatante, facendolo passare ancora su sodio solfato anidro. In seguito, si fa evaporare il solvente con apposite attrezzature e si fa seccare in stufa a 105 °C. Alla fine, si determina il peso della frazione lipidica.

Esempio 2. La determinazione del contenuto di lipidi avviene sul campione liofilizzato. Si pesa una quantità di campione liofilizzato corrispondente a 1 g di campione umido all'interno di una vial in vetro da 40 mL e si aggiungono 10 mL di una miscela esano/diclorometano – 50/50. Si sottopone ad estrazione in bagno ultrasuoni per 30 minuti agitando di tanto in tanto, quindi si centrifuga a 2500 RPM per 10 minuti. Si trasferisce 1 mL dell'estratto, pari a 0,1 g di matrice, all'interno di una vial da 40 mL, di cui si è annotato precedentemente il peso, e si evapora delicatamente a freddo sotto flusso di azoto fino a completa secchezza. Si pesa nuovamente la vial e, per differenza con la tara, si ottiene il peso netto di grasso in 0,1 g di matrice, da cui, si calcola la percentuale di grasso del campione.

Esempio 3. un'aliquota di campione di circa 5 g viene sottoposta ad estrazione utilizzando un estrattore soxhlet programmabile (marca Buchi, modello B-811) con esano/acetone (90/10) per 150 cicli, quindi l'estratto viene concentrato a secchezza mediante evaporatore rotante. Si porta a peso costante in stufa ad una temperatura di 60 °C per 12-24 ore e si calcola il contenuto lipidico percentuale dividendo il peso del residuo lipidico per il peso del campione fresco sottoposto ad estrazione e moltiplicando per 100.

1.5 PROCEDIMENTO ANALITICO

La seguente descrizione dei procedimenti analitici riporta esempi di condizioni operative di dettaglio impiegabili nella determinazione degli analiti che sono da ritenere indicative e non vincolanti. È possibile apportare o meno variazioni più o meno rilevanti alla procedura, ferma restando la responsabilità del laboratorio di verificare in ogni caso l'adeguatezza del metodo allo scopo.

1.5.1 Preparazione delle soluzioni standard

A causa dell'eterogeneità dei formati dei principi attivi disponibili in commercio e delle loro differenti solubilità nei solventi organici non è possibile uniformare le istruzioni per la preparazione delle soluzioni standard madri dei singoli analiti nativi in esame e dei relativi standard interni. Nella scelta delle operazioni devono essere tenute in considerazione la forma fisica del materiale di riferimento (solido puro o soluzione certificata), la purezza, la quantità di sostanza contenuta, la solubilità nei vari solventi degli analiti, le concentrazioni da realizzare nelle soluzioni. Piuttosto che partire dai principi attivi solidi è solitamente più agevole utilizzare, quando disponibili commercialmente, fiale da 1 mL di soluzione certificata. Nella realizzazione di soluzioni standard si può verificare il caso che le soluzioni madri certificate siano costituite da solventi immiscibili con il solvente prescelto per l'iniezione in gascromatografia; in questo caso viene effettuata una solubilizzazione intermedia del contenuto della fiala in un volume limitato di un solvente quale l'isopropanolo per poi portare a volume il matraccio tarato con il solvente di iniezione.

Per gli analiti in questione il periodo di validità delle soluzioni standard preparate in laboratorio è generalmente di almeno un anno se conservate a temperature inferiori a -18 °C. Il periodo di validità della soluzione standard può essere esteso in base ai risultati delle prove di stabilità eseguite in laboratorio.

Come standard interni di processo l'ideale sarebbe poter disporre di un composto marcato isotopicamente per ogni analita. Esempi commercialmente disponibili possono essere:

- p,p' DDT-D8
- o,p' DDT-D8

- p,p' DDE-D8
- Dicofol-D8
- alfa-HCH-D6
- HCB ¹³C₆
- p,p' DDT ¹³C₁₂
- o,p' DDT ¹³C₁₂
- Esaclorobutadiene ¹³C₄

1.5.2 Campioni di controllo e standard interni

1.5.2.1 Campioni di controllo

A prescindere dalle tecniche di estrazione e purificazione impiegate la procedura impiegata deve prevedere l'utilizzo di campioni di controllo che siano sottoposti alla stessa intera procedura a cui sono sottoposti i campioni in analisi. Per ogni batch di campioni incogniti sono preparati i seguenti campioni di controllo:

- Uno o più bianchi di procedimento che possono essere
 - un bianco di procedimento costituito dai soli materiali e reattivi impiegati (ad esempio, nel caso dell'estrazione PFE, costituito dalla cella ASE senza campione con la sola terra di diatomee)
 - Un bianco di procedimento costituito da un campione reale "bianco" esente da contaminazione per gli analiti in esame per analisi pregresse
- Repliche dei campioni incogniti (non meno di una replica per ogni 10 campioni, preferibilmente una ogni 5 campioni) per valutare la ripetibilità in matrice;
- Uno o più campioni di riferimento che possono essere:
 - un bianco di procedimento fortificato con gli analiti ricercati
 - una matrice reale "bianca" fortificata con gli analiti ricercati (un campione reale disponibile in buona quantità, già caratterizzato e con scarsissime concentrazioni degli analiti ricercati).
 - una matrice reale dotata di valori assegnati (materiale di riferimento certificato o residuo di proficiency test dotato di valori assegnati per gli analiti di interesse)
 - una matrice reale già caratterizzata dal laboratorio per gli analiti ricercati (un campione reale disponibile in buona quantità, già caratterizzato e contenente concentrazioni degli analiti ricercati ricadenti nell'intervallo di interesse)

La fortificazione dei campioni di riferimento con miscele di analiti viene effettuata in modo da realizzare una concentrazione finale nell'estratto che si collochi non oltre la metà dell'intervallo di taratura strumentale.

1.5.2.2 Fortificazione dei campioni con standard interni di processo o surrogati

Tutti i campioni, sia quelli incogniti sia quelli di controllo, vengono fortificati prima dell'inizio dell'estrazione con predeterminati volumi delle soluzioni di standard interni di processo o di standard surrogati per la verifica del recupero (a seconda che la quantificazione venga effettuata con standard interni di processo o di iniezione).

1.5.3 Estrazione di tipo QuEChERS

I metodi tipo QuEChERS generalmente prevedono la dispersione, eventualmente previa aggiunta di acqua, del campione umido finemente sminuzzato in una provetta usa e getta centrifugabile, l'estrazione degli analiti per dibattimento mediante aggiunta di un volume noto (che costituisce il volume finale dell'estratto) di un solvente organico miscibile con acqua, generalmente acetonitrile, l'aggiunta di sali per favorire la separazione della fase organica e il trasferimento in essa degli analiti, il dibattimento e la centrifugazione. Un'aliquota di fase organica viene prelevata, trasferita in una seconda provetta centrifugabile più piccola e sottoposta a uno sbrigativo trattamento di purificazione che può essere o un semplice congelamento seguito da centrifugazione per far precipitare la componente lipidica, o una *dispersive* SPE (dibattimento dell'estratto con aliquota di adsorbenti solidi finemente suddivisi come C18 o PSA, ammina primaria e secondaria) seguita da centrifugazione. L'aliquota di estratto recuperabile viene quindi sottoposta a determinazione strumentale. I metodi di tipo QuEChERS sono sicuramente più rapidi e economici rispetto ai metodi tradizionali, tuttavia raggiungono una sensibilità molto inferiore per via dello sfavorevole rapporto tra massa del campione e volume finale dell'estratto (che coincide con il volume di acetonitrile aggiunto all'inizio del procedimento). Prima dell'impiego di metodi QuEChERS deve essere attentamente valutata la capacità del metodo, tenendo conto anche del recupero analitico che si riesce a ottenere, di soddisfare i requisiti del limite di quantificazione.

L'estrazione QuEChERS viene condotta sul campione omogeneizzato fresco o su un'aliquota liofilizzata ricostituita con un'idonea aggiunta di acqua ultrapura tale da ripristinare il contenuto d'acqua del campione.

Ai fini della valutazione della procedura da eseguire è inoltre essenziale conoscere il contenuto lipidico del campione. Quando questo è troppo elevato la tecnica di purificazione della procedura QuEChERS rischia di non essere sufficiente a garantire una pulizia degli estratti sufficiente a garantire un regolare funzionamento a medio termine del sistema analitico GC/MS. Come regola empirica, nel caso di LOQ richiesti non eccessivamente bassi, si può considerare che un contenuto di lipidi superiore al 5% (peso umido) richiede l'impiego di una procedura tradizionale.

Le procedure QuEChERS descritte di seguito prevedono l'estrazione con acetonitrile di una aliquota di circa 5-10g di campione omogeneizzato fresco (o di una corrispondente aliquota di liofilizzato ricostituita) mediante dibattimento con sali di estrazione (una miscela di solfato di magnesio-cloruro di sodio-citrati oppure una miscela di solfato di magnesio e acetato di sodio); la purificazione avviene generalmente mediante *dispersive* SPE con diverse tipologie di adsorbenti specifici per la rimozione dei grassi. A seconda della procedura la *dispersive* SPE può essere preceduta o meno da una fase di congelamento, che aiuta la precipitazione dei lipidi coestratti, e può essere seguita o meno da un dibattimento finale con sali o da una purificazione finale tramite SPE in cartuccia.

1.5.3.1 Esempio 1 metodo QuEChERS

Si pesa una quantità di campione liofilizzato pari a 5 g di campione umido in una provetta da centrifuga in polipropilene da 50 mL "tipo Falcon", si aggiunge acqua purificata in quantità tale da riportare il campione al peso di 5 g, si aggiungono gli standard di processo marcati al Deuterio (DDE-d8, DDT-D8, Dicofol-D8, gamma-HCH-D6), si aggiungono 10 mL di Acetonitrile, si tappa e si agita vigorosamente per almeno 2 minuti.

Successivamente si aggiunge la miscela dei sali (4 g solfato di magnesio, 1 g sodio citrato, 0,5 g sodio citrato esaidrato, 1 g NaCl) e immediatamente si agita vigorosamente per ulteriori 2 minuti. Si centrifuga la vial per 5 minuti a 6000 giri al minuto (RPM), si trasferisce la fase organica in una nuova Falcon PP da 15 mL, si tappa e si pone in congelatore a -20 °C per almeno 4 ore.

La purificazione di tipo *dispersive* SPE avviene in due fasi. La prima fase prevede l'utilizzo di una provetta da 15 mL contenente un adsorbente specifico per la rimozione dei lipidi (ad esempio i prodotti Enhanced Matrix Removal - Lipid di Agilent Technologies p.n. 5982-1010). A tale adsorbente si aggiungono 5 mL di acqua purificata, si agita fino a completa idratazione della fase stazionaria, quindi si aggiungono 5 mL dell'estratto organico proveniente dal congelatore e si agita nuovamente in modo vigoroso per 2 minuti. Si centrifuga la vial per 5 minuti a 6000 RPM. La seconda fase di purificazione prevede l'impiego di una provetta in polipropilene da centrifuga da 15 mL contenente una miscela di sali (NaCl/MgSO₄ anidro - 0,4 g/1,6 g). In essa vengono trasferiti 5 mL del surnatante proveniente dalla fase precedente si agita immediatamente e quindi si centrifuga nuovamente, ottenendo così l'estratto purificato.

In vial da autocampionatore 1 mL di estratto viene evaporato delicatamente a freddo sotto flusso di azoto a piccolissimo volume, quindi viene ripreso con 1 mL di etilacetato, addizionato dello standard di iniezione (Crisene-D12 in etilacetato) ed infine sottoposto ad analisi strumentale (GC-MS/MS).

1.5.3.2 Esempio 2 metodo QuEChERS

Questo metodo è analogo al metodo 1 sopra descritto con una differenza per quanto riguarda la fase di estrazione. L'aliquota sottoposta ad estrazione è costituita da 1,5 g di biota liofilizzato cui vengono aggiunti gli standard di processo (HCB, p,p' DDE e p,p' DDT marcati isotopicamente) e 4 mL di acqua purificata. Dopo agitazione per reidratare il campione vengono aggiunti 15 mL di acetonitrile con l'1% di acido acetico. Si lascia a riposo per una notte.

L'estrazione avviene impiegando due buste di sali AOAC per estrazione QuEChERS (6,0 g ± 0,3 g magnesio solfato anidro 1,5 g ± 0,1 g sodio acetato anidro). Si agita con vortex per due minuti e quindi si centrifuga.

La fase di purificazione mediante *dispersive* SPE avviene in maniera analoga al metodo 1 con la differenza che nello step 2 è prevista la possibilità di impiegare come adsorbente di purificazione il solo solfato di magnesio (3,5 g) in alternativa alla miscela NaCl/MgSO₄ anidro - 0,4 g/1,6 g.

0,5 mL dell'estratto finale vengono portati a secco e ripresi con 0,5 mL di isoottano contenente 5 ng/mL di standard di iniezione (Ethion e decaclorobifenile).

1.5.3.3 Esempio 3 metodo QuEChERS

Viene sottoposta ad estrazione una aliquota pari a 5,0 g ± 0,1 g di campione di biota umido al quale vengono aggiunti 10 mL di acetonitrile e lo standard di processo, Pirimicarb-D6, in provetta da centrifuga in polipropilene da 50 mL. Dopo miscelazione per 1-3 minuti in miscelatore automatico viene aggiunta la miscela di adsorbenti QuEChERS (solfato di magnesio, cloruro di sodio e sali citrati tampone), si miscela nuovamente per 3 min quindi si centrifuga per 5 min a 3000 g.

Per la purificazione 8 mL di surnatante vengono trasferiti in provetta da centrifuga da 15 mL e mantenuti in freezer per 8 ore. Quindi si centrifuga rapidamente e si trasferiscono 6 mL dell'estratto freddo in una nuova provetta da centrifuga da 15 mL contenente la miscela di adsorbenti di purificazione (PSA, Solfato di magnesio). Si miscela per 1 min in miscelatore automatico, si centrifuga 5 min a 3000 g. L'estratto viene stabilizzato acidificando immediatamente con 60 µL di acido formico 5 % in acetonitrile. Si filtra l'estratto con filtro in nylon da 0,2 µm e si trasferisce in vial da 2 mL con tappo a vite.

1.5.3.4 Esempio 4 metodo QuEChERS

Viene sottoposta ad estrazione una aliquota di 10 g di campione di biota umido al quale vengono aggiunti una barretta ceramica di omogeneizzazione e 10 mL di Acetonitrile. Si agita manualmente per 1 minuto, quindi si aggiunge una bustina di sali di estrazione contenente: 4 g Magnesio solfato, 1 g Sodio cloruro, 1 g Sodio Citrato, 0,5 g citrato bisodico esaidrato). Si agita meccanicamente per 5 minuti e poi si centrifuga per 10 minuti a 6500 rpm.

La purificazione consiste in una prima fase di *dispersive* SPE ed in una eventuale seconda fase di SPE su cartuccia in caso di residui lipidici. Il surnatante derivante dall'estrazione è trasferito in una provetta *dispersive* SPE da 15 mL contenente una miscela di adsorbenti per la rimozione di grassi e cere: 150 mg ammina primaria e secondaria (PSA), 150 mg di silice funzionalizzata con catene alchiliche a 18 atomi di carbonio e con i silanoli liberi disattivati (C18 endcapped), 900 mg solfato di magnesio. Si agita meccanicamente per 5 minuti, quindi si centrifuga per 10 minuti a 6500 rpm.

La purificazione su cartuccia prevede l'uso di una Colonna SPE Carbon/PSA da 6 mL (500 mg carbone grafitato / 500 mg ammina primaria e secondaria). Si condiziona con 6 mL di miscela Acetone/Toluene 3/1 v/v scartando l'eluato. Si carica in cartuccia il surnatante organico proveniente dalla *dispersive* SPE raccogliendo l'eluato in vial di vetro da 40 mL. Si caricano ulteriori 5 mL di acetonitrile eluando e raccogliendo. Si aggiungono all'eluato 100 µL di decanolo come keeper, si concentra a piccolo volume sotto flusso di azoto e si riprende con la soluzione di standard interno.

1.5.4 Estrazione di tipo tradizionale

Vengono di seguito presentati degli esempi di procedure di tipo tradizionale per le fasi di estrazione e di purificazione. Viene riportato un esempio di estrazione a fluido pressurizzato (PFE) ma possono essere impiegati altri tipi di estrazione quali quelle assistite da microonde o ultrasuoni. Come tipologie di purificazione dell'estratto vengono presentati esempi di cromatografia di gel permeazione, seguite o meno da un'ulteriore purificazione su cartuccia, e di SPE su cartuccia di silice.

Il laboratorio può impiegare la combinazione di tecniche che preferisce previa verifica dell'adeguatezza della procedura complessiva allo scopo analitico.

1.5.4.1 Esempio di estrazione PFE

Nella procedura di seguito descritta, allo scopo di evitare del tutto i rischi di perdita degli analiti più volatili, in particolare HCBd, viene analizzato il campione umido omogeneizzato ma non liofilizzato. Come segnalato al paragrafo 1.3 è tuttavia possibile lavorare sul campione liofilizzato previa verifica del corretto recupero degli analiti più volatili.

Nella procedura di seguito descritta dopo l'estrazione a fluido pressurizzato si esegue la purificazione su una cartuccia di silice disattivata. L'eluato viene concentrato ad un volume non troppo piccolo per evitare la perdita di analiti volatili. Ad un'aliquota del volume finale viene aggiunto lo standard interno di iniezione e il campione viene avviato alla determinazione strumentale mediante GC/MS/MS.

Si preleva dalla massa del campione omogeneizzato la quantità di campione necessario all'analisi e alle repliche eventualmente previste nella sequenza analitica, quindi si conserva la parte rimanente del campione in congelatore a temperatura di -18 °C o inferiore.

Si pesa esattamente 6,00 g ± 0,10 g di campione omogeneizzato in una provetta da centrifuga Falcon da 50 mL e si aggiunge lo standard surrogato CB 155.

Si aggiunge circa 6 g di terra di diatomee e si miscela, aiutandosi con una bacchetta di vetro, fino ad assorbire completamente l'acqua contenuta nel campione e fino ad ottenere una polvere secca priva di grumi.

Si trasferisce il campione miscelato alla terra di diatomee in una cella ASE decontaminata di volume sufficiente (22 mL o 33 mL).

Si trasferiscono le celle così preparate nell'autocampionatore dell'estrattore ASE 200, si inserisce il vial di raccolta dell'estratto in vetro da 60 mL.

Si sottopone la cella al procedimento di estrazione automatizzata impostando un metodo di estrazione che presenti le seguenti caratteristiche.

Tabella 1-2: condizioni operative per l'estrazione a fluido pressurizzato

Parametro	Valore
Pressione	1500 psi
Temperatura	135 °C
Heat Time	7 min
Static time	7 min
Cycles	2

Parametro	Valore
Solvent B n-esano	50%
Solvent C diclorometano	50%
Flush volume	120%
Purge time	90 sec

Viene impostata una schedula di estrazione che preveda un risciacquo del circuito dopo ogni cella (RINSE ON ad ogni riga della schedula) in maniera da minimizzare il rischio di contaminazione tra un campione e il successivo. È utile inserire una o due celle completamente vuote all'inizio o prima della schedula ASE per ripulire il circuito dello strumento da eventuali contaminazioni dovuti a precedenti estrazioni.

Al termine della sequenza potranno essere prelevati dal carosello inferiore i vial di raccolta contenenti l'estratto già filtrato. Nel caso le lavorazioni sugli estratti non possano essere condotte in giornata è possibile conservare i vial in congelatore, preferibilmente dopo aver sostituito i tappi dotati di setto con dei tappi integri.

Lavaggio celle

Dopo ogni utilizzo per l'estrazione di campioni reali la cella deve essere smontata in tutti i suoi componenti che devono essere lavati con solvente, asciugati e riasssemblati prima di poter essere riutilizzati. Le parti delle celle vengono immerse completamente in esano in contenitori dedicati e inseriti in un bagno ad ultrasuoni per 20-30 minuti. Al termine del primo lavaggio i componenti delle celle vengono estratti, il solvente di lavaggio viene smaltito e viene aggiunto acetone per un secondo lavaggio. Dopo il secondo lavaggio i componenti vengono depositi sotto cappa per far evaporare il solvente. Una volta asciugati i componenti vengono rimontati e conservati fino al prossimo utilizzo.

Disidratazione estratto

All'estratto proveniente dall'ASE viene aggiunto del sodio solfato anidro granulare preventivamente purificato in muffola, il vial viene tappato, l'estratto viene dibattuto e quindi decantato e trasferito in un nuovo vial da 60 mL. Si lava il sodio solfato con due aliquote successive di soluzione di estrazione n-esano-diclorometano 1:1 da 5-8 mL riunendole all'estratto.

Prima del successivo step di purificazione su cartuccia l'estratto viene parzialmente concentrato sotto flusso di azoto in bagno termostatico alla temperatura di 40 °C fino ad un volume di circa 5 mL.

1.5.4.2 Purificazione su cartuccia di silice

Preparazione silice disattivata al 5%

Per preparare la silice disattivata con acqua (95:5 m/m) si impiega della silice preventivamente purificata in muffola a 600 °C per una notte e quindi conservata in stufa a 130 °C fino al momento dell'utilizzo. Si pesa in beuta con tappo a smeriglio un quantitativo, in grammi, di silice purificata pari a m_{sil} e, allo scopo di ottenere una miscela silice:H₂O 95:5 m/m, viene aggiunto un volume, in millilitri, di H₂O purificata pari a $0.053 \cdot m_{sil}$ (considerando una densità di 1 per l'acqua).

In alternativa, se è più comodo considerare un volume prefissato di acqua V_{acq} in mL si peserà nella beuta un'aliquota, in grammi, di silice m_{sil} pari a $19 \cdot V_{acq}$. Una volta pesata la corretta quantità di silice nella beuta viene aggiunta l'acqua, si tappa e si agita a lungo per omogeneizzare, eventualmente aiutandosi con una bacchetta di vetro.

Purificazione su cartuccia di silice

Viene impiegata una siringa usa e getta da 60 mL per la quale viene realizzato un filtro inserendo nell'ugello di scarico, usando delle pinzette, un ciuffo di cotone purificato mediante estrazione con solvente. Nella cartuccia viene quindi depositato uno strato di 10 g di silice disattivata con acqua al 5%.

Si versa nella cartuccia un'aliquota di solvente di eluizione (n-esano-diclorometano 6:4 v/v) allo scopo di imbibire lo strato di silice, eliminando eventuali bolle d'aria smuovendo lo strato con una bacchetta di vetro. La cartuccia viene preconditionata mediante eluizione di 40 mL di solvente di eluizione ed il livello del solvente viene quindi portato a pelo con la superficie dello strato di silice.

Viene caricato l'estratto concentrato del campione e si inizia la raccolta in un vial ASE eluendo a 2-3 gocce al secondo. Una volta che il livello dell'estratto del campione sia arrivato a pelo sullo strato di silice si carica uno sciacquo del contenitore del campione di 3-5 mL. Una volta portato a pelo anche lo sciacquo si completa l'eluizione con 30 mL di solvente di eluizione n-esano-diclorometano 6:4 v/v, raccogliendo fino a svuotamento completo della cartuccia. L'estratto viene disidratato per dibattimento con sodio solfato anidro e quindi trasferito in un nuovo vial ASE prepesato sulla bilancia analitica.

L'estratto così purificato viene concentrato in evaporatore a soffio d'azoto in bagno termostatico ad acqua fino ad un volume finale di circa 5 mL. Il volume finale viene poi determinato esattamente pesando sulla bilancia analitica il vial contenente l'estratto e considerando il valore di densità del n-esano (0.656 g/mL).

Si preleva 1mL di estratto mediante micropipetta tarata e si trasferisce in vial da autocampionatore GC ambrato. Si aggiungono gli standard interni di iniezione (miscela di IPA perdeuterati) al vial GC e si dibatte per miscelare.

Nel caso il volume a cui vengono aggiunti gli standard interni di iniezione non sia esattamente 1 mL sarà necessario comunque conoscerlo esattamente (ad esempio mediante gravimetria).

1.5.4.3 Purificazione mediante Cromatografia di Gel Permeazione

La purificazione mediante Cromatografia di Gel Permeazione (GPC) è estremamente utile nel caso di estratti di biota che contengano elevate quantità di lipidi. Si presta a essere utilizzata come tecnica primaria di purificazione nel caso di metodi analitici multicomponente in quanto, non basandosi su reazioni chimiche, non comporta rischi di perdita di analiti degradabili ed è possibile applicarla ad una amplissima varietà di analiti. La tecnica si basa sulla discriminazione dimensionale delle molecole per mezzo di un gel idrofobico poroso (stirene divinilbenzene).

Le colonne impiegate possono essere sia in vetro da impaccare a mano (operazione da svolgere con molta cura), sia in acciaio, già condizionate in fabbrica in uno specifico solvente. È molto importante assicurarsi che la fase stazionaria sia ben condizionata nello specifico solvente scelto e che così rimanga costantemente. I solventi impiegabili sono di diversa tipologia ma generalmente, dati i volumi di campione da iniettare, i flussi di lavoro sono dell'ordine dei 5 mL/min e le quantità di solventi consumate sono significative.

È consigliabile impiegare strumentazione specificamente dedicata alla GPC preparativa che, per via delle tipologie di solventi, dei flussi di lavoro, dei volumi di iniezione e di frazioni raccolte, presentano caratteristiche diverse rispetto a un HPLC analitico. Per poter eseguire in maniera automatizzata la purificazione di una serie di campioni è necessario dotarsi di un autocampionatore adatto alla GPC e di un raccogliitore di frazioni.

È necessario individuare accuratamente la frazione (i tempi di raccolta dell'eluato) in cui vengono eluiti gli analiti sia impiegando miscele standard specifiche per GPC (disciolte nello stesso solvente o miscela di solventi in cui viene eseguita la tecnica), sia eseguendo prove di recupero relative alla sola fase di purificazione per GPC. È necessario verificare costantemente la stabilità dei tempi di eluizione (utile in questo senso la termostatazione della colonna) ed è consigliabile lasciare un margine di sicurezza nella raccolta anche a fronte di una purificazione leggermente inferiore (a meno che non si adotti la quantificazione mediante diluizione isotopica nel qual caso è possibile impostare tempi di raccolta più rigorosi).

Il campione deve essere disciolto nel solvente usato per l'eluizione, deve essere filtrato a 5 μm e non deve essere eccessivamente viscoso (quindi sciolto in un volume sufficientemente di solvente). Una prima frazione viene scartata e contiene i composti coestratti di maggiori dimensioni molecolari rispetto agli analiti (come i lipidi), mentre una seconda frazione, contenente i composti di interesse, viene raccolta e concentrata.

Per rimuovere le interferenze residue ancora presenti nella frazione GPC concentrata può essere applicata una tecnica di purificazione che si basa su un diverso principio, come l'adsorbimento su gel di silice o su ammina primaria e secondaria o su carbone attivo, o può anche essere eseguita una seconda purificazione per GPC.

Esempio 1 purificazione GPC

Il procedimento è concepito per campioni in cui la percentuale di grasso è superiore al 5% (per valori inferiori si considera impiegabile anche una procedura QuEChERS). Si pesa una quantità di campione liofilizzato pari a 2,5 g di fresco in una provetta da 40 mL in vetro, si aggiunge la mix di standard di processo deuterati (DDE-D8, DDT-D₈, Dicofol-D₈, gamma-HCH-D₈), 0,5 g di solfato di sodio anidro e 12,5 mL di miscela estraente (cicloesano/DCM 85/15).

Si sottopone ad estrazione in bagno ad ultrasuoni per 30 minuti agitando di tanto in tanto, quindi si centrifuga a 2500 RPM per 20 minuti.

L'estratto così ottenuto presenta un contenuto di matrice pari a 0,2 g/mL; 5 mL di estratto vengono caricati nel loop della GPC previa filtrazione su filtro PTFE 0,45 μm , si esegue la cromatografia con eluente cicloesano/DCM - 85/15 raccogliendo la frazione corrispondente ai pesticidi clorurati. Questa viene poi concentrata a piccolo volume e ripresa con 1 mL di etilacetato, addizionata dello standard di iniezione (Crisene-D12 in etilacetato) ed infine sottoposto ad analisi strumentale (GC-MS/MS).

Esempio 2 purificazione GPC

Il procedimento prevede l'impiego di un sistema tipo Power Prep per eseguire, in serie e in maniera automatizzata, sia una cromatografia di gel permeazione sia una purificazione SPE su carbone grafitizzato e PSA. Con alcuni accorgimenti di impostazione dello strumento, ed un'ulteriore fase di SPE online con la sola PSA, è possibile realizzare un metodo di purificazione multi-analita per determinare anche gli IPA e l'HBCDD.

L'estratto proveniente dall'estrazione ASE deve essere preliminarmente sottoposto ad un cambio di solvente per avere una composizione uguale a quella della fase mobile GPC. Si concentra l'estratto a piccolo volume quindi lo si trasferisce in una provetta tarata e si eseguono lavaggi ripetuti con fase mobile GPC (cicloesano: etilacetato 50:50) fino ad arrivare a 7 mL di volume.

Si prepara quindi lo strumento Power Prep predisponendo i solventi per eluizione e lavaggio circuiti: (1) solvente per pulizia linee: esano; (2) fase GPC: cicloesano: etilacetato 50:50 (3) solvente per pulire la colonna: DCM);

Dopo il lavaggio delle linee si installa la cartuccia carbone/PSA il cui eluato verrà raccolto nella frazione F3 (ed eventualmente si installa anche la cartuccia PSA il cui eluato verrà raccolto nella frazione F2);

Si caricano i 7 mL di campione nell'apposito vial e si avvia il metodo di GPC-SPE.

Inizialmente si esegue il condizionamento della colonna GPC e della cartuccia SPE. Quindi viene iniettato il campione e i suoi risciacqui (effettuati con alcuni mL di fase GPC per pulire la provetta e le linee) eseguendo l'eluizione sulla colonna GPC ad

un flusso di 5 mL/min. Una prima frazione GPC (24 minuti) viene scartata in quanto contiene i grassi da rimuovere. La successiva frazione (eluata dal minuto 24 al minuto 38) di 70 mL viene raccolta in una bottiglia denominata F1 e contiene i pesticidi di interesse (oltre a composti come Fluorantene ed Esabromociclododecano). Tale frazione è destinata alla determinazione di analiti a concentrazioni molto basse, a tale scopo deve essere concentrata a volume molto piccolo e quindi richiede di essere ulteriormente purificata per non inficiare la determinazione strumentale. La purificazione ulteriore prevede il passaggio dell'intera frazione su cartuccia di carbone grafitato e PSA e la raccolta dell'estratto ulteriormente purificato nella frazione F3. Questa frazione è destinata all'analisi delle sostanze in oggetto (HCBD, HCB, DDT totale, Dicofol) nonché di Eptacloro ed Eptacloro epossido ed eventualmente altri analiti. In questa frazione non è però possibile determinare sostanze che vengono trattenute dalla fase stazionaria di carbone grafitizzato (come IPA e esabromociclododecano).

Proseguendo l'eluizione della colonna GPC si possono raccogliere altri analiti come gli IPA (dal minuto 38 al 66, 140 mL) che, come ulteriore purificazione successiva alla GPC, vengono eluiti su colonna PSA e raccolti nella frazione F2.

Se con il presente metodo di purificazione GPC/SPE si desidera determinare anche gli IPA e l'HBCDD bisogna considerare che quest'ultimo e alcuni IPA, come il fluorantene, sono eluiti dalla colonna GPC nella frazione F1 dei pesticidi ma verrebbero persi se eluiti sulla cartuccia carbone/PSA in quanto eccessivamente trattenuti. La soluzione consiste nel prelevare un decimo della frazione F1 e purificarlo non su carbone/PSA ma sulla sola PSA. In questo caso, appena eluita la frazione F1, si interrompe l'eluizione sulla colonna GPC ed un decimo della frazione F1 (7 mL) viene eluito sulla cartuccia di sola PSA raccogliendolo nella bottiglia denominata F2. Quindi viene ripresa l'eluizione sulla colonna GPC, passando l'eluato dal minuto 38 al minuto 66 (140 mL) sulla colonna di sola PSA e raccogliendo sempre in F2. Nella frazione F2 ci saranno quindi gli IPA ed un decimo circa degli analiti eluiti in F1. Sebbene la frazione F2, risultante dalla purificazione con la sola PSA, contenga quindi solo un decimo del contenuto totale nel campione di analiti come fluorantene e HCBDD, la loro corretta quantificazione è possibile grazie al fatto che anche i relativi standard interni marcati isotopicamente saranno contenuti in proporzioni analoghe rispetto alle quantità addizionate prima dell'estrazione. Ovviamente per questi composti la sensibilità analitica diminuisce di un fattore 10 per cui tale soluzione tecnica è applicabile a condizione che i limiti di quantificazione così ottenuti per tali analiti siano ancora sufficienti.

Nel caso quindi si adotti la soluzione sopra descritta per determinare anche IPA e HBCDD, l'eluizione GPC viene interrotta dopo l'eluizione dei pesticidi (F1), un decimo di F1 viene eluito su cartuccia di PSA e raccolto in F2, viene ripresa l'eluizione GPC facendo passare l'eluato su cartuccia di sola PSA e raccogliendo sempre in F2, infine si eluiscono i 9/10 residui di F1 su cartuccia di carbone/PSA raccogliendo nella frazione F3.

La frazione F3 potrà essere concentrata a piccolo volume per analisi di analiti a "bassa concentrazione" o con scarsa risposta in GC-MS/MS (ad es. Eptacloro ed Eptacloro epossido). Dopo l'eluizione della frazione dei pesticidi F3 viene eseguita una fase finale di pulizia della colonna GPC.

Le due frazioni, F2 e F3, subiscono processi diversi:

- F3 (pesticidi e analiti da ricercare a concentrazione molto bassa): prima dell'evaporazione si aggiunge 1 goccia di esadecano, per evitare che l'estratto arrivi a secco, perdendo gli analiti più volatili, quindi si evapora con soffio di azoto fin quasi a secchezza e si aggiungono 10 µL di 6-metilcrisene e 90 µL di toluene. Questa frazione è destinata all'analisi dei pesticidi in oggetto (nonché dell'Eptacloro ed Eptacloro epossido, eventualmente anche per altri analiti ma non gli IPA).
- F2 (IPA e HBCDD) si evapora con soffio di azoto fino a poco meno di 1 mL, si aggiungono 100 µL di 6-metilcrisene (standard di iniezione) e si porta a 1 mL con toluene;

La taratura "in matrice" viene realizzata impiegando gli estratti di un campione di biota privo degli analiti di interesse e sottoposto all'intera procedura descritta.

1.5.5 Determinazione di HCBD mediante tecniche per analiti volatili

Data la pronunciata volatilità, per il solo Esaclorobutadiene, è possibile impiegare anche tecniche di estrazione Purge&Trap o spazio di testa, previa verifica da parte del laboratorio di riuscire a raggiungere con tali tecniche il limite di quantificazione richiesto. Si riporta di seguito un esempio di procedura impiegabile con la tecnica Purge&Trap accoppiata a GC-MS a singolo quadrupolo. Si sottopone ad estrazione un'aliquota di campione di 0,5 g-1,0 g di campione liofilizzato alla quale vengono addizionati 5 mL di acqua in vials da 40 mL dotati di tappo con setto compatibili con autocampionatore P&T. Le condizioni operative sono quelle indicate per i campioni di suolo nei metodi EPA 5035A 2002 e EPA 8260D 2018. La quantificazione avviene costruendo una curva di taratura a 5 punti in matrice (ad es. cefalo liofilizzato che non presenta concentrazioni rilevabili di analita) fortificata con standard commerciale dell'analita (HCBD) singolo. Le concentrazioni previste per i 5 livelli corrispondono a 20-30-50-75 e 100 µg/kg (peso secco). Lo standard interno usato per la quantificazione è 1,4-dichlorobenzene-D₄, aggiunto alla concentrazione di 25 µg/kg, come da EPA 8260D 2018. Insieme ai campioni incogniti vengono analizzati anche dei campioni bianchi fortificati a due livelli, 40 e 100 µg/kg per i quali si considera accettabile un recupero compreso tra 60-80%. Il metodo raggiunge prestazioni analitiche conformi ai requisiti relativi ai valori di SQA attualmente vigenti. Di seguito si riportano alcune condizioni operative strumentali impiegate per l'applicazione del metodo P&T GC/MS.

Tabella 1-3: condizioni operative analisi P&T-GC/MS

Condizioni P&T-GC/MS	
Colonna GC:	DB-VRX 60 m x 0,25 mm x 1,4 µm
Flusso gas di trasporto:	0,6 mL/min (elio)
Temperatura iniziale colonna:	35 °C
Tempo isoterma iniziale:	6 min
Rampa temperatura n°1	8 °C/min fino a 110 °C
Tempo isoterma n°1	10 min a 110 °C
Rampa temperatura n°2	5 °C/min da 110 °C fino a 220 °C
Tempo isoterma n°2	5 min a 220 °C
Iniettore	Multi Mode Inlet in modalità di iniezione Split
Septum purge flow	40 mL/min
Temperatura iniezione	40 °C
Purge time	11 min
Temperatura transfer line	140 °C
Rivelatore	Spettrometro di Massa a singolo quadrupolo
modalità acquisizione delle masse	SIM (selected ion monitoring)
Modalità di ionizzazione	impatto elettronico (EI)
Tempo di ritenzione Esaclorobutadiene	46.7 min
Ione di quantificazione	225,0 m/z
Primo ione qualificatore	223,0 m/z
Secondo ione qualificatore	227,0 m/z

1.5.6 Analisi GC-MS/MS

Vengono di seguito presentati degli esempi di condizioni operative di analisi strumentale in gascromatografia accoppiata ad un rivelatore a spettrometria di massa a triplo quadrupolo. Il campione è introdotto nel gascromatografo in modalità splitless, il gas di trasporto impiegato è elio (He), l'analisi avviene in modalità MRM (multiple reaction monitoring).

1.5.6.1 Condizioni strumentali

Nelle tabelle seguenti sono riportati, a titolo di esempio, parametri operativi e condizioni strumentali per la fase cromatografica e la fase di rivelazione, impiegabili per la determinazione degli analiti in esame.

Tabella 1-4: condizioni operative analisi GC-MS/MS

Gas-Cromatografo	
Colonna capillare	DB-17MS 20 m x 0,18 mm x 0,18 µm
Flusso gas di trasporto	0,6 mL/min (elio)
Temperatura iniziale colonna	43 °C
Tempo isoterma iniziale	2,81 min
Programma temperatura colonna	incremento fino a 120 °C a 45,56 °C/min; da 120 °C fino a 190 °C a 30 °C/min; da 190 °C fino a 247 °C a 7 °C/min; da 247 °C a 262 °C a 3 °C/min; da 262 °C a 315 °C a 50 °C/min per 3,5 min
Iniettore Multi Mode Inlet	
Modalità iniezione	Splitless, 1 µL
Septum purge flow	3 mL/min
Liner	Splitless, conicità singola, 900 µL, senza lana di vetro
Temperatura iniezione	260 °C per 1 min poi 900 °C/min fino a 290 °C per 1,8 min poi 900 °C/min fino a 320 °C
Purge time (to split vent)	@2,81 min
Purge flow (to split vent)	60 mL/min

Gas-Cromatografo	
Gas saver	@4 min (20 mL/min)
Temperatura transfer line	280°C
Rivelatore di Massa	
Acquisizione delle masse	Modalità MRM (Multiple Reaction Monitoring)
Temperatura sorgente	270 °C
Modalità di ionizzazione	Impatto Elettronico (EI)
Energia di collisione	70 eV
Taratura delle masse	Perfluorotributilammina (FC-43)
Solvent delay	5,5 min

Tabella 1-5: masse selezionate per l'analisi MRM degli analiti

Composto	Tempo ritenzione (min)	ione precursore (m/z)	ione prodotto (m/z)	Dwell time (ms)	Collision Energy (V)	Intensità relativa
Esaclorobutadiene	6,163	224,8	189,9	80	15	100%
Esaclorobutadiene		226,9	191,9	100	15	48,6%
Esaclorobutadiene		226,9	189,9	200	15	32,0%
Acenaftene-d10	8,012	164,1	162,1	30	15	100%
Acenaftene-d10		162,1	160,1	30	20	90,8%
Esaclorobenzene	9,283	283,8	213,9	50	30	100%
Esaclorobenzene		281,8	211,9	50	30	79,8%
Esaclorobenzene		285,8	250,9	50	15	41,3%
CB 155	12,902	359,9	289,9	50	25	100%
CB 155		287,9	217,9	50	35	68,5%
CB 155		361,9	289,9	50	25	61,3%
p,p'DDE	14,020	246,0	176,2	30	30	100%
p,p'DDE		315,8	246,0	40	15	33,2%
p,p'DDE		317,8	248,0	40	15	21,0%
Pirene-d10	14,558	212,0	210,0	30	30	
o,p'DDT	15,293	235,0	165,1	20	20	100%
o,p'DDT		237,0	165,2	20	20	63,1%
o,p'DDT		235,0	199,1	20	15	35,6%
p,p'DDD	15,462	235,0	165,1	33	20	100%
p,p'DDD		237,0	165,2	33	20	63,4%
p,p'DDD		235,0	199,1	33	15	26,0%
p,p'DDT	16,202	235,0	165,1	50	20	100%
p,p'DDT		237,0	165,2	50	20	63,3%
p,p'DDT		235,0	199,1	50	15	25,9%
Dicofol	13,170	139	111	30	15	100%
Dicofol		139	75	30	25	82,6%
Dicofol		251	139	30	25	96,4%

1.6 ANALISI DELLE SOLUZIONI STANDARD E DEI CAMPIONI

L'iniezione delle soluzioni a concentrazioni note di analiti e standard interni consente la realizzazione delle tarature relative agli analiti di interesse. I calcoli per la taratura possono essere eseguiti sia manualmente sia attraverso il software in dotazione allo strumento ed in ogni caso deve essere considerato il rapporto tra l'area del picco dell'analita e quella del rispettivo standard interno al variare della concentrazione dell'analita. Verificare che il coefficiente di correlazione lineare (r) sia non meno di 0,95 per ogni composto.

Prima di iniettare gli estratti dei campioni è necessario verificare l'assenza di contaminazione strumentale analizzando dei bianchi strumentali (solventi); è necessario verificare la validità della taratura iniettando uno o più standard (in particolare a bassa e media concentrazione) controllando la coerenza di tempi di ritenzione, aree, rapporti ionici.

Insieme ai campioni incogniti devono essere iniettati e valutati i campioni di controllo (bianchi di procedimento, repliche, campioni di riferimento etc.). La verifica della validità della taratura (sia come risposte che come tempi di ritenzione) deve essere effettuata all'inizio e alla fine della sequenza di analisi strumentale nonché durante la sequenza almeno ogni 20 iniezioni.

1.6.1 Criteri di identificazione

Un picco cromatografico è inequivocabilmente identificato come analita, quando soddisfa tutti i seguenti criteri:

- Rapporto segnale/rumore
Tutti gli ioni relativi alle transizioni MRM di ciascun analita e dello standard interno sono presenti con rapporto S/N adeguato (ad es. > 3).
- Tempi di ritenzione (RT)
Il valore di RT è compreso in un intervallo stabilito intorno al valore medio, definito in fase di taratura per l'analita in esame (ad es. stabilito ± 0.1 min). Se il tempo di ritenzione dell'analita indagato non rientra entro il suddetto intervallo di accettabilità l'analita è considerato non presente. In caso di identificazione positiva procedere al calcolo del rapporto ionico.
- Rapporto ionico
Misurare almeno un rapporto di abbondanza ionica tra le transizioni considerate calcolando la deviazione relativa del rapporto ionico ΔR con la formula seguente:

$$\Delta R = \frac{R - R_{st}}{R_{st}}$$

dove:

R_{camp} = rapporto ionico dell'analita nella soluzione campione;

R_{st} = media dei rapporti ionici dell'analita negli standard iniettati.

L'identificazione è confermata se il valore di ΔR rientra in un intervallo stabilito (ad es. $\pm 30\%$).

I risultati relativi ad eventuali analiti caratterizzati da un rapporto S/N adeguato per entrambe le transizioni ioniche considerate e che soddisfino tutti i criteri di identificazione sopra descritti, ad eccezione del criterio del rapporto ionico, sono espressi come "Non determinabile: segnale interferito".

1.6.2 Calcoli

1.6.2.1 Modalità di quantificazione

La quantificazione degli analiti al GC/MS/MS viene eseguita sulla base del rapporto di intensità tra l'area dell'analita e quella del rispettivo standard interno aggiunto in quantità nota. Le soluzioni di taratura, caratterizzate da concentrazioni variabili degli analiti da quantificare, impiegano tutte la medesima concentrazione per gli standard interni.

La quantificazione può essere effettuata o mediante standard interni di processo o mediante standard interni di iniezione. Il primo caso può consistere in due differenti modalità: si può trattare di vera e propria diluizione isotopica (gli standard interni sono molecole del tutto analoghe a quelle "native" ma "marcate" isotopicamente in quanto alcuni atomi sono sostituiti da isotopi stabili) o si può trattare di quantificazione basata su standard interni di processo (molecole non presenti nella matrice, chimicamente simili ma non uguali agli analiti, per le quali si può presumere un comportamento simile ad essi durante le fasi di estrazione, purificazione e determinazione strumentale). Nel caso della quantificazione mediante standard interni di iniezione questi vengono aggiunti all'estratto finale e possono essere utilizzati per determinare le concentrazioni sia degli analiti che degli standard surrogati aggiunti prima dell'estrazione per verificare il recupero degli standard interni di processo.

Gli standard interni di iniezione, aggiunti a valle del procedimento di estrazione e purificazione, correggono eventuali variazioni della risposta strumentale mentre gli standard interni di processo, aggiunti a monte del procedimento di estrazione e purificazione, quando impiegati per la quantificazione, correggono anche per il recupero nel singolo campione in esame. Anche la quantificazione mediante standard interni di processo richiede l'impiego di standard interni di iniezione allo scopo di misurare il recupero dello standard di processo.

1.6.2.2 Determinazione dei fattori di risposta relativi

Per ogni i-esimo analita viene calcolato, per ogni livello della taratura, il rapporto di risposta relativo (RF_i) dell'analita i-esimo rispetto al relativo standard interno, in accordo con la formula di seguito riportata:

$$RF_i = \frac{A_i \times m_{std\ int}}{A_{std\ int} \times m_i}$$

dove:

A_i = area della transizione ionica dell'analita i-esimo di interesse;

$A_{std\ int}$ = area della transizione ionica dell'appropriato standard interno;

m_i = massa di analita iniettato;

$m_{std\ int}$ = massa di appropriato standard interno iniettato;

Gli RF_i sono fattori adimensionali, pertanto le unità di misura usate per esprimere m_i , e $m_{std\ int}$ devono essere le stesse.

1.6.2.3 Linearità del rapporto di risposta relativo

Calcolare il valore medio dei fattori di risposta (\overline{RF}_i) e la deviazione standard relativa percentuale (RSD) per i valori dei fattori di risposta ottenuti per ogni soluzione di taratura per ogni analita:

$$RSD (\%) = \frac{\text{deviazione standard}}{\overline{RF}_i} \times 100$$

Il valore di RSD dei fattori di risposta delle soluzioni di taratura per ciascun analita non deve superare il 20%.

1.6.2.4 Verifica della taratura

Consiste nella verifica dei valori dei fattori di risposta RF da utilizzare per la quantificazione, attraverso l'analisi di una soluzione di taratura intermedia. La verifica della taratura è necessaria all'inizio ed alla fine di ogni serie di campioni e comunque da ripetere ogni 10 campioni.

La verifica ha esito positivo se i valori dei fattori di risposta ottenuti per ogni analita in una soluzione intermedia, sono compresi in un intervallo stabilito (ad es. entro $\pm 30\%$) dei valori medi di RF stabiliti durante la taratura iniziale per tutti gli analiti delle soluzioni standard di taratura. La verifica viene effettuata utilizzando la seguente formula:

$$\Delta (\%) = \frac{(RF_{soluz\ interm} - \overline{RF})}{\overline{RF}} \times 100$$

dove:

\overline{RF} = fattore di risposta relativo medio stabilito durante la taratura iniziale;

$RF_{soluz\ interm}$ = fattore di risposta relativo stabilito durante la verifica di taratura con una soluzione di taratura intermedia rispetto all'intervallo di taratura.

Se vengono rispettati i criteri sopra esposti, il valore del fattore di risposta di un dato analita è considerato indipendente dalla concentrazione nell'intervallo di concentrazioni di taratura utilizzato e il valore medio \overline{RF} può essere usato per tutti i calcoli. In caso contrario, si dovranno calcolare nuovi valori medi dei fattori di risposta con una nuova serie di iniezioni delle soluzioni di taratura.

1.6.2.5 Calcolo della concentrazione degli analiti

Nel caso di quantificazione mediante standard interni di processo aggiunti all'inizio del procedimento analitico, calcolare la concentrazione dei singoli composti usando la formula seguente:

$$C_i (\text{ng/g}) = \frac{A_i \times m_{std\ proc}}{A_{std\ proc} \times \overline{RF}_i \times m_{camp}}$$

dove:

C_i (ng/g) = concentrazione in ng/g dell'analita i-esimo nel campione;

A_i = area della transizione ionica dell'analita i-esimo nell'estratto iniettato;

$A_{std\ proc}$ = area della transizione ionica dell'appropriato standard interno di processo nell'estratto iniettato;

m_{camp} = quantità di campione sottoposta ad estrazione, espressa in grammi;

$m_{std\ proc}$ = massa, in ng, di appropriato standard interno di processo aggiunto al campione all'inizio dell'analisi;

\overline{RF}_i = fattore di risposta relativo medio dell'analita i-esimo rispetto all'appropriato standard interno.

Nel caso di quantificazione mediante standard interni di iniezione aggiunti all'estratto del campione a valle del procedimento di estrazione e purificazione, calcolare la massa del singolo i-esimo composto nell'estratto iniettato usando la formula seguente:

$$m_i = \frac{A_i \times m_{std\ inj}}{A_{std\ inj} \times \overline{RF}_i}$$

dove:

m_i = massa in ng dell'analita i-esimo contenuta nell'estratto del campione contenente la massa $m_{std\ inj}$ di standard di iniezione

A_i = area della transizione ionica dell'analita i-esimo nell'estratto del campione;

$A_{std\ inj}$ = area della transizione ionica dell'appropriato standard interno di iniezione nell'estratto del campione;

$m_{std\ inj}$ = massa, in ng, di appropriato standard interno di iniezione aggiunto all'estratto finale a valle di estrazione e purificazione;

RF_i = rapporto di risposta relativo medio dell'analita i-esimo rispetto all'appropriato standard interno di iniezione.

Questa formula è utilizzabile anche per il calcolo della massa di standard surrogato aggiunto al campione all'inizio del procedimento analitico allo scopo di verificare il recupero.

Calcolare poi la concentrazione, in ng/g, dell'analita i-esimo nel campione con la seguente formula:

$$C_i = \frac{m_i}{m_{camp}}$$

dove:

C_i = concentrazione in ng di analita i-esimo per grammo di campione.

m_{camp} = quantità di campione prelevata per l'analisi, espressa in grammi;

Nel caso che l'estratto finale al quale sono stati aggiunti gli standard interni di iniezione e che è stato effettivamente analizzato in GC/MS sia rappresentativo solo di una parte dell'estratto del campione (e quindi la massa m_i , come sopra calcolata, sia rappresentativa solo di una parte dell'estratto del campione), sarà necessario effettuare una moltiplicazione per risalire alla massa totale dell'analita i-esimo nel campione.

Poiché di solito il software di quantificazione del dato di massa esegue automaticamente i calcoli relativi alla taratura e alla quantificazione, esso fornisce direttamente, come risultato, la concentrazione relativa ad ogni analita nel volume dell'estratto o sulla massa del campione. Può allora essere più facile lavorare non con i fattori di risposta relativi e le aree ma con i risultati, in ng per mL di estratto o in ng per g di campione, forniti direttamente dal software.

1.6.2.6 Calcolo del recupero

Calcolare la percentuale di recupero dello standard surrogato nel campione in esame con la seguente formula:

$$R_{surr}(\%) = \frac{m_{misurata}}{m_{aggiunta}} \times 100$$

dove:

$R_{surr}(\%)$ = percentuale di recupero dello standard surrogato;

$m_{misurata}$ = massa, in ng, dello standard di processo nell'estratto del campione in esame, determinato mediante standard interno di iniezione;

$m_{aggiunta}$ = massa, in ng, dello standard di processo aggiunta all'inizio dell'analisi.

In ogni campione deve essere verificato che il recupero medio dell'analita rientri in un intervallo di accettabilità (ad es. 60-140%). Nel caso in cui un dato analita fornisca un recupero maggiore dell'estremo superiore dell'intervallo di accettabilità ma i campioni in esame non rivelino presenza per l'analita stesso non è necessario rianalizzare i campioni in esame. Nel caso in cui si ottenga un recupero inferiore all'estremo inferiore dell'intervallo di accettabilità è necessario procedere alla ripetizione dell'analisi del campione in esame.

1.6.3 Valutazione del bianco di procedimento

I risultati forniti dal bianco di procedimento sono valutati attraverso gli stessi criteri adottati per i campioni in esame. In caso di positività di uno o più analiti si deve effettuare nuovamente l'analisi di tutti quei campioni che presentino una positività per tali analiti superiore al limite di quantificazione.

2 DETERMINAZIONE DI EPTACLOR ED EPTACLOR EPOSSIDO IN CAMPIONI DI BIOTA MEDIANTE GASCROMATOLOGRAFIA - SPETTROMETRIA DI MASSA GC-MS/MS O GC/HRMS

2.1 CAMPO DI APPLICAZIONE

la presente procedura è applicata per la determinazione, nei tessuti di biota, dei composti riportati di seguito, mediante gascromatografia con rivelazione in spettrometria di massa a triplo quadrupolo (GC-MS/MS) o ad alta risoluzione (GC-HRMS).

Tabella 2-1: Elenco degli analiti in esame con n° di registro CAS e SQA nel biota previsto dalla normativa

Analita	N° registro CAS	SQA Biota ($\mu\text{g}/\text{kg}$ di peso umido) D.Lgs. 172/2015
Eptacloro	76-44-8	0,0067
Eptacloro epossido (cis-, isomero B, eso-)	1024-57-3	

Le procedure descritte consentono di determinare i composti sopra elencati nella matrice biota conformemente ai requisiti minimi di prestazione individuati dal D.Lgs. 219/2010 in relazione ai valori di SQA attualmente vigenti (D.Lgs. 172/2015). In caso di modifiche normative dei valori di SQA in diminuzione le prestazioni analitiche delle procedure descritte potrebbero essere ancora sufficienti, ma è necessaria la verifica da parte del laboratorio della conformità del metodo ai nuovi requisiti.

2.2 PRINCIPIO DEL METODO

In generale per la determinazione nella matrice biota degli analiti in esame sono impiegabili diverse possibili alternative per le fasi di estrazione, purificazione e determinazione strumentale. A causa dei bassi limiti di quantificazione richiesti è necessario impiegare procedure che consentano un elevato fattore di concentrazione degli analiti, il che richiede di estrarre un'aliquota di campione relativamente grande, concentrando l'estratto a un volume finale relativamente piccolo. Queste esigenze richiedono che il procedimento preveda una purificazione accurata degli estratti e rendono difficilmente impiegabili tecniche di tipo QuEChERS. Vengono quindi descritti di seguito due procedimenti, che impiegano tecniche di estrazione e purificazione di tipo tradizionale, effettivamente applicati da laboratori del SNPA.

Il primo procedimento prevede l'estrazione a fluido pressurizzato del campione umido, previa miscelazione con solido igroscopico inerte, seguita da cromatografia di gel permeazione (GPC) e da un ulteriore step di purificazione mediante estrazione in fase solida su cartuccia di carbone attivo/PSA (ammina primaria e secondaria). La determinazione strumentale prevede l'impiego della gascromatografia accoppiata a spettrometro di massa a triplo quadrupolo

Il secondo procedimento prevede l'estrazione del campione liofilizzato mediante dibattimento con una miscela di solventi e la purificazione dell'estratto in due step; il primo step prevede il dibattimento con acido solforico concentrato oppure, nel caso di specie di biota contenenti più del 5% di lipidi, la purificazione mediante cromatografia di gel permeazione; il secondo step prevede una purificazione su cartuccia di silice e florisil. La determinazione strumentale prevede l'impiego della gascromatografia accoppiata a spettrometria di massa ad alta risoluzione.

Per entrambi i procedimenti la quantificazione viene effettuata per diluizione isotopica, impiegando standard interni di estrazione (composti analoghi agli analiti ma marcati con carbonio-13) e standard interni di iniezione per la determinazione del recupero degli standard di estrazione.

Oltre a quelle menzionate sono impiegabili anche altre tecniche o combinazioni di tecniche per le fasi analitiche di estrazione, purificazione e determinazione strumentale. Quelli descritti di seguito sono esempi di procedimenti effettivamente impiegati in laboratori SNPA per la determinazione degli analiti in questione con prestazioni analitiche conformi ai requisiti normativi.

2.3 INTERFERENZE E CAUSE DI ERRORE

La natura e quantità delle sostanze interferenti coestratte possono variare in relazione alla composizione della matrice del campione e quindi alla specie di organismo analizzato.

L'utilizzo di reagenti ad elevata purezza e di solventi "grado pesticidi", unitamente alla determinazione analitica attraverso separazione cromatografica mediante colonne capillari ad alta risoluzione e rivelazione in spettrometria di massa in modalità Multiple Reaction Monitoring o in alta risoluzione aiutano a minimizzare i problemi di interferenza.

La vetreria di laboratorio riutilizzabile non deve essere eccessivamente usurata e deve essere pulita scrupolosamente prima del riutilizzo. Per quanto possibile, è raccomandabile tenere separata la vetreria utilizzata per la preparazione dei "bianchi fortificati" al fine di evitare contaminazioni incrociate.

L'impiego della quantificazione mediante diluizione isotopica consente di ottenere risultati intrinsecamente corretti per fattori quali il recupero nel singolo campione, variazioni nella risposta strumentale rispetto alla taratura, progressiva contaminazione del sistema di determinazione strumentale da parte di residui altobollenti coestratti etc. in quanto tali fenomeni influenzeranno il segnale dello standard interno in maniera analoga al segnale dell'analita nativo. Impiegando la tecnica della diluizione isotopica sarà comunque sempre necessario verificare che vengano rispettati alcuni criteri minimi relativi ad area dei picchi e recupero.

2.4 PREPARAZIONE DEL CAMPIONE

Salvo diversa indicazione della normativa vigente, la determinazione delle sostanze in questione viene eseguita sui pesci. In coerenza con quanto è stato stabilito e ad oggi praticato per il monitoraggio del biota in ottemperanza alla Direttiva Strategia Marina, l'analisi deve essere condotta sul tessuto muscolare di individui adulti, delle taglie commerciali di cui al Regolamento (CE) n. 1967/2006 del Consiglio del 21 dicembre 2006. Nel caso in cui le dimensioni degli esemplari campionati siano inferiori a cm 15, le analisi possono essere effettuate sugli organismi in toto raccolti in pool.

Prima della dissezione devono essere eseguite e registrate le misurazioni biometriche quali lunghezza totale, lunghezza standard (esclusa la pinna caudale), altezza (escluse le pinne), peso degli esemplari e, nel caso di pool, i valori medi con deviazione standard e gli intervalli di variabilità. Una volta eseguite le operazioni necessarie a prelevare la parte di biota da sottoporre ad analisi (a seconda dell'organismo: pulitura, eviscerazione, sfilettatura etc.) il campione risultante viene generalmente omogeneizzato (sebbene sia possibile eseguire l'eventuale liofilizzazione anche sulle parti intere). Ai fini dell'omogeneizzazione il campione viene solitamente dapprima tagliato grossolanamente per essere poi più efficacemente sminuzzato con un macinatore a lame (a bicchiere o a immersione). L'omogeneizzato fresco così ottenuto può essere analizzato o conservato in congelatore tal quale oppure può essere sottoposto a liofilizzazione. La liofilizzazione consente una più agevole conservazione del campione per le successive analisi. Se necessario il campione liofilizzato può essere setacciato, ad esempio su maglia da 2mm, per eliminare parti grossolane non triturate (ad es. lische o squame) ed eventualmente ulteriormente rimacinato.

Poiché i risultati devono essere espressi rispetto alla massa di campione fresco, nel caso si analizzi il campione liofilizzato, è essenziale determinare il contenuto di acqua del campione in modo da poter ricondurre i risultati al peso umido.

2.5 PROCEDIMENTO ANALITICO

La seguente descrizione del procedimento riporta esempi di condizioni operative di dettaglio impiegabili nell'esecuzione della metodica che sono da ritenere indicative e non vincolanti. È possibile apportare variazioni più o meno rilevanti alla procedura, ferma restando la responsabilità del laboratorio di verificare in ogni caso l'adeguatezza del metodo allo scopo.

2.5.1 Preparazione delle soluzioni standard

A causa dell'eterogeneità dei formati dei principi attivi disponibili in commercio e delle loro differenti solubilità nei solventi organici non è possibile uniformare le istruzioni per la preparazione delle soluzioni standard madre dei singoli analiti nativi in esame e dei relativi standard interni. Nella scelta delle operazioni devono essere tenute in considerazione la forma fisica del materiale di riferimento (solido puro o soluzione certificata), la purezza, la quantità di sostanza contenuta, la solubilità nei vari solventi degli analiti, le concentrazioni da realizzare nelle soluzioni. Piuttosto che partire dai principi attivi solidi è solitamente più agevole utilizzare, quando disponibili commercialmente, fiale da 1mL di soluzione certificata. Nella realizzazione di soluzioni standard si può verificare il caso che le soluzioni madre certificate siano costituite da solventi immiscibili con il solvente prescelto per l'iniezione in gascromatografia; in questo caso viene effettuata una solubilizzazione intermedia del contenuto della fiala in un volume limitato di un solvente quale l'isopropanolo per poi portare a volume il matraccio tarato con il solvente di iniezione.

Per gli analiti in questione il periodo di validità delle soluzioni standard preparate in laboratorio è generalmente di almeno un anno se conservate a temperature inferiori a -18 °C. Il periodo di validità della soluzione standard può essere esteso in base ai risultati delle prove di stabilità eseguite in laboratorio.

Come standard interni di estrazione l'ideale sarebbe poter disporre di un composto marcato isotopicamente per ogni analita. I procedimenti descritti impiegano i seguenti composti marcati con ^{13}C , che sono commercialmente disponibili:

- Eptacloro $^{13}\text{C}_{10}$
- cis-Eptacloro epossido $^{13}\text{C}_{10}$

2.5.2 Campioni di controllo e standard interni

2.5.2.1 Campioni di controllo

A prescindere dalle tecniche di estrazione e purificazione impiegate la procedura impiegata deve prevedere l'impiego di campioni di controllo che siano sottoposti alla stessa intera procedura a cui sono sottoposti i campioni in analisi. Per ogni batch di campioni incogniti sono preparati i seguenti campioni di controllo:

- Uno o più bianchi di procedimento che possono essere
 - un bianco di procedimento costituito dai soli materiali e reattivi impiegati (ad esempio, nel caso dell'estrazione PFE, costituito dalla cella ASE senza campione con la sola terra di diatomee).
 - Un bianco di procedimento costituito da una matrice reale "bianca" esente da contaminazione per gli analiti in esame per analisi pregresse.
- Repliche dei campioni incogniti (non meno di una replica per ogni 10 campioni, preferibilmente una ogni 5 campioni) per valutare la ripetibilità in matrice.
- Uno o più campioni di riferimento che possono essere:
 - un bianco di procedimento fortificato con gli analiti ricercati.
 - una matrice reale "bianca" fortificata con gli analiti ricercati (un campione reale disponibile in buona quantità, già caratterizzato e con scarsissime concentrazioni degli analiti ricercati).
 - una matrice reale dotata di valori assegnati (materiale di riferimento certificato o residuo di proficiency test dotato di valori assegnati per gli analiti di interesse).
 - una matrice reale già caratterizzata dal laboratorio per gli analiti ricercati (un campione reale disponibile in buona quantità, già caratterizzato e contenente concentrazioni degli analiti ricercati ricadenti nell'intervallo di interesse)

La fortificazione dei campioni di riferimento con miscele di analiti viene effettuata in modo da realizzare una concentrazione finale nell'estratto che si collochi non oltre la metà dell'intervallo di taratura strumentale.

2.5.2.2 Fortificazione dei campioni con standard interni di processo o surrogati

Tutti i campioni, sia quelli incogniti sia quelli di controllo, vengono fortificati prima dell'inizio dell'estrazione con predeterminati volumi delle soluzioni a concentrazioni note di standard interni di estrazione marcati isotopicamente che verranno impiegati per la quantificazione degli analiti.

2.6 PROCEDIMENTO N° 1 (PFE, GPC-SPE, GC-MS/MS)

Nella procedura di seguito descritta, dopo l'estrazione a fluido pressurizzato del campione di biota, si impiega un sistema tipo Power Prep per eseguire, in serie e in maniera automatizzata, una cromatografia di gel permeazione e una purificazione SPE su carbone grafitizzato e ammina primaria e secondaria (PSA).

2.6.1 Estrazione e purificazione - Procedimento n° 1

Il campione di biota omogeneizzato viene sottoposto all'estrazione in forma umida. Tre grammi di campione umido vengono miscelati con 4 g di terra di diatomee e trasferiti in un provettone da centrifuga in polipropilene da 50 mL tipo "Falcon". Il campione viene miscelato alla terra di diatomee, aiutandosi con una bacchetta di vetro, fino ad assorbire completamente l'acqua contenuta nel campione ottenendo una polvere secca priva di grumi. Viene quindi effettuata la fortifica del campione con miscela di standard interni marcati isotopicamente (miscela di Eptacloro $^{13}\text{C}_{10}$ e *cis*-Eptacloro epossido $^{13}\text{C}_{10}$). Quindi si trasferisce la miscela campione-terra di diatomee in una cella di un estrattore a fluido pressurizzato. Si procede in maniera analoga per tutti i campioni in analisi, le loro repliche e i campioni per il controllo di qualità.

Si trasferiscono le celle così preparate nell'autocampionatore dell'estrattore e si avvia il procedimento di estrazione automatizzata impostando un metodo che presenti le seguenti caratteristiche.

Tabella 2-2: condizioni operative per l'estrazione a fluido pressurizzato

Parametro	Valore
Pressione	1800 psi
Temperatura	100 °C
Heat Time	5 min
Static time	10 min
Cycles	1

Parametro	Valore
Solvent B n-esano	50%
Solvent C Acetone	50%
Flush volume	60 mL
Purge time	60 sec

Viene impostata una schedula di estrazione che preveda un risciacquo del circuito dopo ogni cella (RINSE ON ad ogni riga della schedula) in maniera da minimizzare il rischio di contaminazione tra un campione e il successivo. È utile inserire una o due celle completamente vuote all'inizio o prima della schedula ASE per ripulire il circuito dello strumento da eventuali contaminazioni dovuti a precedenti estrazioni.

Al termine della sequenza potranno essere prelevati dal carosello inferiore i vial di raccolta contenenti l'estratto già filtrato. Nel caso le lavorazioni sugli estratti non possano essere condotte in giornata è possibile conservare i vial in congelatore, preferibilmente dopo aver sostituito i tappi dotati di setto con dei tappi integri.

La purificazione mediante Cromatografia di Gel Permeazione (GPC) è estremamente utile nel caso di estratti di biota che contengano elevate quantità di lipidi. Si presta a essere utilizzata come tecnica primaria di purificazione nel caso di metodi analitici multicomponente in quanto, non basandosi su reazioni chimiche, non comporta rischi di perdita di analiti degradabili ed è possibile applicarla ad una amplissima varietà di analiti. La tecnica si basa sulla discriminazione dimensionale delle molecole per mezzo di un gel idrofobico poroso (stirene-divinilbenzene).

Le colonne impiegate possono essere sia in vetro da impaccare a mano (operazione da svolgere con molta cura), sia in acciaio, già condizionate in fabbrica in uno specifico solvente. È molto importante assicurarsi che la fase stazionaria sia ben condizionata nello specifico solvente scelto e che così rimanga costantemente. I solventi impiegabili sono di diversa tipologia ma generalmente, dati i volumi di campione da iniettare, i flussi di lavoro sono dell'ordine dei 5 mL/min e le quantità di solventi consumate sono significative.

È consigliabile impiegare strumentazione specificamente dedicata alla GPC preparativa che, per via delle tipologie di solventi, dei flussi di lavoro, dei volumi di iniezione e di frazioni raccolte, presentano caratteristiche diverse rispetto a un HPLC analitico. Per poter eseguire in maniera automatizzata la purificazione di una serie di campioni è necessario dotarsi di un autocampionatore adatto alla GPC e di un raccoglitore di frazioni.

È necessario individuare accuratamente la frazione (i tempi di raccolta dell'eluato) in cui vengono eluiti gli analiti sia impiegando miscele standard specifiche per GPC (disciolte nello stesso solvente o miscela di solventi in cui viene eseguita la tecnica), sia eseguendo prove di recupero relative alla sola fase di purificazione per GPC. È necessario verificare costantemente la stabilità dei tempi di eluizione (utile in questo senso la termostatazione della colonna) ed è consigliabile lasciare un margine di sicurezza nella raccolta anche a fronte di una purificazione leggermente inferiore (a meno che non si adotti la quantificazione mediante diluizione isotopica nel qual caso è possibile impostare tempi di raccolta più rigorosi).

Il campione deve essere disciolto nel solvente usato per l'eluizione, deve essere filtrato a 5 µm e non deve essere eccessivamente viscoso (quindi sciolto in un volume sufficientemente di solvente). Una prima frazione viene scartata e contiene i composti coestratti di maggiori dimensioni molecolari rispetto agli analiti (come i lipidi), mentre una seconda frazione, contenente i composti di interesse, viene raccolta e concentrata.

Per rimuovere le interferenze residue ancora presenti nella frazione GPC concentrata può essere applicata una tecnica di purificazione che si basa su un diverso principio, come l'adsorbimento su gel di silice o su ammina primaria e secondaria o su carbone attivo, o può anche essere eseguita una seconda purificazione per GPC.

Il procedimento n°1 prevede l'impiego di un sistema tipo Power Prep per eseguire, in serie e in maniera automatizzata, sia una cromatografia di gel permeazione sia una purificazione SPE su carbone grafitizzato e PSA. Con alcuni accorgimenti di impostazione dello strumento, ed un'ulteriore fase di SPE online con la sola PSA, è possibile realizzare un metodo di purificazione multi-analita per determinare anche gli IPA e l'HBCDD.

L'estratto proveniente dall'estrazione PFE deve essere preliminarmente sottoposto ad un cambio di solvente per avere una composizione uguale a quella della fase mobile GPC. Si concentra l'estratto a piccolo volume con evaporatore rotante (30 °C, 120 rpm, 180 mbar) quindi lo si trasferisce in una provetta tarata e si eseguono lavaggi ripetuti con fase mobile GPC (cicloesano:etilacetato 50:50) fino ad arrivare a 7 mL di volume.

Si prepara quindi lo strumento Power Prep predisponendo i solventi per eluizione e lavaggio circuiti. (1) solvente per pulizia linee: esano; (2) fase GPC: cicloesano: etilacetato 50:50 (3) solvente per pulire la colonna: DCM);

Dopo il lavaggio delle linee si installa la cartuccia carbone/PSA il cui eluato verrà raccolto nella frazione F3. Nell'eventualità che si vogliano determinare anche IPA e HBCDD, si installa anche la cartuccia PSA il cui eluato verrà raccolto nella frazione F2.

Si caricano i 7 mL di campione nell'apposito vial e si avvia il metodo di GPC-SPE.

Inizialmente si esegue il condizionamento della colonna GPC e della cartuccia SPE. Quindi viene iniettato il campione e i suoi risciacqui (effettuati con alcuni mL di fase GPC per pulire la provetta e le linee), eseguendo l'eluizione sulla colonna GPC ad un flusso di 5 mL/min. Una prima frazione GPC (24 minuti) viene scartata in quanto contenente i grassi da rimuovere. La successiva frazione (eluata dal minuto 24 al minuto 38) di 70 mL viene raccolta in una bottiglia denominata F1 e contiene gli analiti di interesse (oltre a composti come fluorantene ed esabromociclododecano). Poiché tale frazione è destinata alla determinazione di analiti a concentrazioni molto basse, essa deve essere concentrata a volume molto piccolo e quindi richiede di essere ulteriormente purificata per non inficiare la determinazione strumentale. La purificazione ulteriore prevede il passaggio dell'intera frazione su cartuccia di carbone grafitato e PSA e la raccolta dell'estratto ulteriormente purificato nella frazione F3. Questa frazione è destinata all'analisi delle sostanze in oggetto (Eptacloro ed Eptacloro epossido) nonché di HCB, HCB, DDT totale, Dicofol ed eventualmente altri analiti. In questa frazione non è però possibile determinare sostanze che vengono trattenute dalla fase stazionaria di carbone grafitato (come IPA e esabromociclododecano).

Proseguendo l'eluizione della colonna GPC si possono raccogliere altri analiti come gli IPA (dal minuto 38 al 66, 140 mL) che, come ulteriore purificazione successiva alla GPC, vengono eluiti su colonna PSA e raccolti nella frazione F2.

Se con il presente metodo di purificazione GPC/SPE si desidera determinare anche gli IPA e l'HBCDD bisogna considerare che quest'ultimo e alcuni IPA, come il fluorantene, sono eluiti dalla colonna GPC nella frazione F1 dei pesticidi ma verrebbero persi se eluiti sulla cartuccia carbone/PSA in quanto eccessivamente trattenuti. La soluzione consiste nel prelevare un decimo della frazione F1 e purificarlo non su carbone/PSA ma sulla sola PSA. In questo caso, appena eluita la frazione F1, si interrompe l'eluizione sulla colonna GPC ed un decimo della frazione F1 (7 mL) viene prelevato ed eluito sulla cartuccia di sola PSA raccogliendolo nella bottiglia denominata F2. Quindi viene ripresa l'eluizione sulla colonna GPC, passando l'eluato dal minuto 38 al minuto 66 (140 mL) sulla colonna di sola PSA e raccogliendo sempre in F2. Nella frazione F2 ci saranno così gli IPA ed un decimo circa degli analiti eluiti in F1. Sebbene la frazione F2, risultante dalla purificazione con la sola PSA, contenga quindi solo un decimo del contenuto totale nel campione di analiti come fluorantene e HCBDD, la loro corretta quantificazione è possibile grazie al fatto che anche i relativi standard interni marcati isotopicamente saranno contenuti in proporzioni analoghe rispetto alle quantità addizionate prima dell'estrazione. Ovviamente per questi composti la sensibilità analitica diminuisce di un fattore 10 per cui tale soluzione tecnica è applicabile a condizione che i limiti di quantificazione così ottenuti per tali analiti siano ancora sufficienti.

Nel caso quindi si adotti la soluzione sopra descritta per determinare anche IPA e HBCDD, l'eluizione GPC viene interrotta dopo l'eluizione dei pesticidi (F1), un decimo di F1 viene eluito su cartuccia di PSA e raccolta in F2, viene ripresa l'eluizione GPC facendo passare l'eluato su cartuccia di sola PSA e raccogliendo sempre in F2, infine si eluiscono i 9/10 residui di F1 su cartuccia di carbone/PSA raccogliendo nella frazione F3.

La frazione F3 potrà essere concentrata a piccolo volume per analisi di analiti a "bassa concentrazione" o con scarsa risposta in GC-MS/MS (ad es. Eptacloro ed Eptacloro epossido). Dopo l'eluizione della frazione dei pesticidi F3 viene eseguita una fase finale di pulizia della colonna GPC.

Le due frazioni, F2 e F3, subiscono processi diversi:

- F3 (analiti da ricercare a concentrazione molto bassa): prima dell'evaporazione si aggiunge 1 goccia di esadecano, per evitare che l'estratto arrivi a secco, perdendo gli analiti più volatili, quindi si evapora con soffio di azoto fin quasi a secchezza e si aggiungono 10 µL di 6-metilcrisene (standard di iniezione) e 90 µL di toluene. Questa frazione è destinata all'analisi di Eptacloro ed Eptacloro epossido (eventualmente anche per altri analiti, come altri pesticidi organoclorurati, ma non gli IPA).
- F2 (IPA e HBCDD): si evapora con soffio di azoto fino a poco meno di 1 mL, si aggiungono 100 µL di 6-metilcrisene (standard di iniezione) e si porta a 1 mL con toluene;

L'intero procedimento viene effettuato anche sui campioni di controllo.

2.6.2 Analisi GC-MS/MS - Procedimento n° 1

Vengono di seguito presentati degli esempi di condizioni operative di analisi strumentale in gascromatografia accoppiata ad un rivelatore a spettrometria di massa a triplo quadrupolo. Il campione è introdotto nel gascromatografo in modalità splitless, il gas di trasporto impiegato è elio (He), l'analisi avviene in modalità MRM (multiple reaction monitoring).

Nelle tabelle seguenti sono riportati, a titolo di esempio, parametri operativi e condizioni strumentali per la fase cromatografica e la fase di rivelazione, impiegabili per la determinazione degli analiti in esame.

Tabella 2-3: condizioni operative GC/MS/MS

Gas-Cromatografo	
Colonna capillare	DB-5MS-UI 60 m x 0,25 mm x 0,25 µm
Flusso gas di trasporto	1,5 mL/min (elio)
Temperatura iniziale colonna	70 °C
Tempo isoterma iniziale	0,1 min

Gas-Cromatografo	
Programma temperatura colonna	incremento fino a 90 °C a 80 °C/min, per 4,8 min; da 90 °C fino a 155 °C a 40 °C/min, per 1 min; da 155 °C fino a 240 °C a 9 °C/min, per 10,5 min; da 240 °C a 265 °C a 2,8 °C/min, per 2 minuti; da 265 °C a 320 °C a 3,1 °C/min per 10 min
Iniettore Multi Mode Inlet	
Modalità iniezione	Splitless, 2µL
Septum purge flow	3 mL/min
Liner	Splitless, conicità singola, 900µL, senza lana di vetro
Temperatura iniezione	310 °C per 1min
Rivelatore di Massa	
Acquisizione delle masse	Modalità MRM (Multiple Reaction Monitoring)
Modalità di ionizzazione	Impatto Elettronico (EI)
Energia di collisione	70 eV
Taratura delle masse	Perfluorotributilammina (FC-43)
Solvent delay	5,5 min
elettromoltiplicatore	Delta EMV: 1100 V

Tabella 2-4: transizioni MRM per la determinazione degli analiti in esame

Composto	ione precursore (m/z)	ione prodotto (m/z)	Collision Energy (V)
Eptacloro- ¹³ C	279	243	30
Eptacloro	274	237	15
Eptacloro	272	237	15
Eptacloro epossido- ¹³ C	359	269	15
Eptacloro epossido	355	265	15
Eptacloro epossido	353	263	15

Le soluzioni di taratura vengono realizzate alle concentrazioni (per gli analiti Eptacloro ed i suoi epossidi) di 0,05-0,10 e 0,50 ng/mL che corrispondono, in base al peso di 3 g di campione umido e al volume finale dell'estratto di 0,1 mL, a concentrazioni sul campione umido di 0,0017-0,0033 e 0,0167 ng/g. La taratura "in matrice" viene realizzata impiegando estratti di un campione di biota privo degli analiti di interesse sottoposto all'intera procedura descritta.

2.7 PROCEDIMENTO N° 2 (DIBATTIMENTO CON SOLVENTI, ACIDO SOLFORICO O GPC, GC-HRMS)

Nella procedura di seguito descritta viene eseguita un'estrazione solido-liquido del campione liofilizzato mediante dibattimento con solventi, seguita da una purificazione in due fasi. La prima fase si differenzia a seconda del contenuto di lipidi del campione. Nel caso di campioni con contenuto di lipidi inferiore al 5% la prima fase della purificazione prevede il dibattimento dell'estratto con acido solforico concentrato. Nel caso di campioni che presentano un contenuto di lipidi superiore al 5% la prima fase della purificazione avviene mediante GPC. La seconda fase della purificazione prevede l'eluizione dell'estratto su una colonna impaccata con florisil e gel di silice. La determinazione strumentale avviene mediante gascromatografia con rivelazione per spettrometria di massa ad alta risoluzione.

2.7.1 Determinazione del contenuto di lipidi

La determinazione del contenuto di lipidi viene eseguita per stabilire il procedimento di purificazione da impiegare per la prima fase della purificazione dell'estratto. Essa avviene sul campione liofilizzato. Si pesa una quantità di campione liofilizzato corrispondente a 1 g di campione umido all'interno di una vial in vetro da 40 mL e si aggiungono 10 mL di una miscela esano/diclorometano – 50/50. Si sottopone ad estrazione in bagno ultrasuoni per 30 minuti agitando di tanto in tanto, quindi si centrifuga a 2500 RPM per 10 minuti. Si trasferisce 1 mL dell'estratto, corrispondente a 0,1 g di campione umido, all'interno di una vial da 40 mL, precedentemente pesata su bilancia analitica, e si evapora delicatamente a freddo sotto flusso di azoto fino a completa secchezza. Si pesa nuovamente la vial e, per differenza con la tara, si ottiene il peso netto di grasso in 0,1 g di matrice, da cui si calcola la percentuale di grasso del campione.

2.7.2 Estrazione e purificazione- Procedimento n° 2

All'interno di una vial in vetro da 40 mL con tappo a vite e setto silicone/PTFE viene pesata una quantità di biota liofilizzato corrispondente a 2 g di organismo fresco. Vengono addizionati gli standard interni di estrazione (10 µL di Eptacloro e Eptacloro Epossido cis marcati con ¹³C alla concentrazione di 0,1 µg/mL in nonano, preparati per diluizione da Eptacloro ¹³C₁₀ 100 µg/mL in nonano e Cis-Eptacloro Epossido ¹³C₁₀ 100 µg/mL in nonano). Si aggiungono 20 mL di una miscela diclorometano/esano 50/50 v/v e si procede all'estrazione agitando vigorosamente per 20 minuti. L'estratto viene recuperato e l'estrazione viene ripetuta con altri 20 mL della stessa miscela. Gli estratti riuniti vengono concentrati, a 40 °C sotto flusso di azoto, fino a raggiungere un volume di 10 mL. La purificazione è suddivisa in due fasi, la prima delle quali si differenzia in base al contenuto di lipidi del campione.

2.7.2.1 Purificazione fase 1 – opzione 1 (campioni con lipidi <5%)

Se il contenuto di lipidi è inferiore al 5%, dopo l'estrazione si procede ad una diluizione dell'estratto con 10 mL di n-esano (ottenendo quindi un volume di estratto di 20 mL), quindi si procede ad una prima fase della purificazione mediante attacco acido dell'estratto con 2 mL di acido solforico concentrato, agitando vigorosamente per 1 minuto. Si centrifuga a 3500 rpm per 1 min e si recupera la fase organica. Si aggiungono poi 10 mL di esano nella vial con l'acido, si agita per 1 min, si centrifuga per 1 min e si riuniscono le fasi organiche. Si concentra l'estratto così riunito fino a circa 1 mL sotto flusso di azoto a 40 °C. Si verifica che l'estratto risulti incolore, se ciò non fosse si ripete l'attacco acido nella modalità descritta.

2.7.2.2 Purificazione fase 1 – opzione 2 (campioni con lipidi >5%)

Se il contenuto di lipidi è superiore al 5% la prima fase della purificazione viene eseguita mediante cromatografia di gel permeazione. Si utilizza una colonna impaccata con diametro interno di 2,5cm e come eluente una miscela cicloesano:diclorometano (85:15), operando ad un flusso di 5 mL/min.

L'estratto del campione proveniente dal dibattimento con solvente viene portato quasi a secco e gli viene quindi aggiunto 1 mL di soluzione cicloesano:DCM (85:15). L'estratto viene sottoposto a filtrazione con filtro 0,45 µm di PTFE e viene caricato nel loop di iniezione da 5 mL del sistema GPC. La frazione eluita fino a 18 minuti contiene i lipidi e viene quindi scartata. La frazione compresa tra 18 e 50 minuti (160 mL) contiene gli analiti di interesse e viene raccolta in un pallone da 250 mL. Tale frazione viene concentrata al rotavapor e trasferita, con esano, in una vial da 40 mL nella quale viene proseguita la concentrazione sotto flusso di azoto a 40 °C, fino al volume di 1 mL.

2.7.2.3 Purificazione fase 2

La seconda fase della purificazione prevede una purificazione mediante SPE. Si lava con 10 mL di diclorometano una colonnina in vetro e la si impacca con (dal basso): cotone; 1 g sodio solfato anidro; 2 g florisil; 2 g gel di silice. Si lava la colonnina così preparata con 20 mL di DCM e poi con 20 mL di esano. Si carica il campione in testa alla colonna, lavando la vial con 0,5-1 mL di esano. Si mette una vial di raccolta da 40 mL sotto alla colonnina. Si eluisce con 20 mL di miscela esano/DCM 50:50.

L'eluato raccolto viene evaporato fino a secchezza sotto flusso di azoto a 40 °C. Si aggiungono 10 µL di standard interni di iniezione (PCB 52 marcato con ¹³C 0,05 µg/mL in nonano, preparato per diluizione da una soluzione certificata di PCB indicatori marcati ¹³C₁₂ a 1 µg/mL in nonano) e 90 µL di isotano (per un volume finale di 100µL). Si trasferisce l'estratto in una vial da GC con inserto destinata all'analisi.

2.7.3 ANALISI GC-HRMS - Procedimento n° 2

La determinazione strumentale avviene mediante gascromatografia accoppiata a spettrometria di massa ad alta risoluzione impiegando un rivelatore a settore magnetico. L'introduzione del campione avviene in modalità large volume injection impiegando un iniettore di tipo PTV.

Un volume pari a 25 µL dell'estratto del campione (avente un volume finale di 100 µL) viene iniettato in modalità solvent vent. Viene impiegato un iniettore PTV, impostato a 42 °C, utilizzando un liner Restek Topaz Baffled ed una siringa da 10 µL, realizzando 5 iniezioni successive da 5 µL ciascuna.

Viene utilizzata una colonna Restek Rtx-Dioxin 2 (60 m x 0,25 mm ID x 0,25 µm) con un flusso costante di 1 mL/min di gas di trasporto elio. La rampa di temperatura del forno gascromatografico è descritta nella tabella seguente:

Tabella 2-5: rampa di temperatura del forno gascromatografico

	Velocità (°C/min)	Temperatura (°C)	Mantenimento (min)
Inizio	/	150	1,00
Rampa 1	11,0	320	3,55

Lo spettrometro di massa a settore magnetico impiegato è un Thermo Scientific modello DFS, utilizzando una energia di ionizzazione di 40 eV.

Per ogni analita vengono monitorati due ioni che vengono entrambi utilizzati per la quantificazione.

L'identificazione dei singoli analiti è data dalla verifica del rapporto di intensità tra i due ioni (vedi tolleranza in tabella) e dalla verifica del tempo di ritenzione, che deve essere $\pm 20\%$ rispetto al primo standard con cui è stata costruita la retta di taratura, oppure di uno standard iniettato prima dell'analisi dei campioni.

Nello standard utilizzato per la taratura a concentrazione più bassa il rapporto S/N deve essere > 10 .

Il limite di quantificazione è di 1 ng/kg.

Nella tabella seguente sono riportati i valori di massa esatta dei due ioni monitorati per ogni analita, il rapporto di intensità ionica atteso, il relativo criterio di accettabilità, lo standard interno impiegato per la quantificazione e il criterio di accettabilità del recupero degli standard di estrazione.

Tabella 2-6: masse esatte, rapporti ionici e criteri di accettabilità del recupero.

Analita	Quan. Mass (m ₁)	Qual. Mass (m ₂)	Ratio (m ₂ /m ₁)	Tolleranza	Quantificato su	Recupero IS ammesso nei campioni
Eptacloro	271,8102	273,8072	0,78	0,25	¹³ C-Eptacloro	/
Eptacloro epossido CIS	350,8466	352,8442	1,62	0,25	¹³ C-Eptacloro epossido CIS	/
¹³ C-Eptacloro	276,8269	278,8240	0,785	0,25	¹³ C-PCB 52	5% - 120%
¹³ C-Eptacloro epossido CIS	362,8778	364,8748	0,798	0,25	¹³ C-PCB 52	27% - 137%
¹³ C-PCB 52	301,9626	303,9597	1,421	0,25	/	/

La quantificazione avviene mediante diluizione isotopica e la curva di taratura impiegata prevede 6 livelli, da 0.01 µg/L a 10 µg/L (0.01-0.05-0.1-0.5-1-10 µg/L)

Per la preparazione delle soluzioni di taratura degli analiti nativi si parte dalle seguenti soluzioni madre certificate:

- Eptacloro 100 µg/mL in cicloesano;
- Eptacloro epossido CIS 100 µg/mL in cicloesano.

Tali soluzioni madre vengono riunite e diluite con cicloesano per realizzare una miscela dei due analiti a 1 ng/µL. Da questa vengono realizzate, mediante diluizione con nonano, tre soluzioni a varie concentrazioni (1 pg/µL, 10 pg/µL e 100 pg/µL) che vengono utilizzate per realizzare le soluzioni di taratura come illustrato nella tabella seguente.

Tabella 2-7: volumi e concentrazioni delle soluzioni impiegate per realizzare la taratura.

Livello taratura	1	2	3	4	5	6
Conc. nativi	0,01 µg/L	0,05 µg/L	0,1 µg/L	0,5 µg/L	1 µg/L	10 µg/L
/						
Ept. e Ept.-Epos. CIS 1 pg/µL	1 µL	5 µL	10 µL	/	/	/
Ept. e Ept.-Epos. CIS 10 pg/ µL	/	/	/	5 µL	10 µL	/
Ept. e Ept.-Epos CIS 100 pg/ µL	/	/	/	/	/	10 µL
I.S. Estrazione 0,1 ng/ µL	10 µL	10 µL	10 µL	10 µL	10 µL	10 µL
I.S. iniezione 0,05 ng/ µL	10 µL	10 µL	10 µL	10 µL	10 µL	10 µL
Isottano	79 µL	75 µL	70 µL	75 µL	70 µL	70 µL

2.8 ANALISI DELLE SOLUZIONI STANDARD E DEI CAMPIONI

L'iniezione delle soluzioni a concentrazioni note di analiti e standard interni consente la realizzazione delle tarature relative agli analiti di interesse. I calcoli per la taratura possono essere eseguiti sia manualmente sia attraverso il software in dotazione allo strumento ed in ogni caso deve essere considerato il rapporto tra l'area del picco dell'analita e quella del rispettivo standard interno al variare della concentrazione dell'analita. Verificare che il coefficiente di correlazione lineare (r) sia non meno di 0,95 per ogni composto.

Prima di iniettare gli estratti dei campioni è necessario verificare l'assenza di contaminazione strumentale analizzando dei bianchi strumentali (solventi); è necessario verificare la validità della taratura iniettando uno o più standard (in particolare a bassa e media concentrazione) controllando la coerenza di tempi di ritenzione, aree, rapporti ionici.

Insieme ai campioni incogniti devono essere iniettati e valutati i campioni di controllo (bianchi di procedimento, repliche, campioni di riferimento etc.). La verifica della validità della taratura (sia come risposte che come tempi di ritenzione) deve essere effettuata all'inizio e alla fine della sequenza di analisi strumentale nonché durante la sequenza almeno ogni 20 iniezioni.

2.8.1 Criteri di identificazione

Un picco cromatografico è inequivocabilmente identificato come analita, quando soddisfa tutti i seguenti criteri:

- Rapporto segnale/rumore
Tutti gli ioni o le transizioni MRM di ciascun analita e dello standard interno sono presenti con rapporto S/N adeguato (ad es. > 3).
- Tempi di ritenzione (RT)
Il valore di RT è compreso in un intervallo stabilito intorno al valore medio, definito in fase di taratura per l'analita in esame (ad es. tempo stabilito \pm 0.1 min). Se il tempo di ritenzione dell'analita indagato non rientra entro il suddetto intervallo di accettabilità, l'analita è considerato non presente. In caso di identificazione positiva procedere al calcolo del rapporto ionico.
- Rapporto ionico
Misurare almeno un rapporto di abbondanza ionica tra gli ioni o le transizioni considerate calcolando la deviazione relativa del rapporto ionico ΔR con la formula seguente:

$$\Delta R = \frac{R_{\text{camp}} - R_{\text{st}}}{R_{\text{st}}}$$

dove:

R_{camp} = rapporto ionico dell'analita nella soluzione campione;

R_{st} = media dei rapporti ionici dell'analita negli standard iniettati.

L'identificazione è confermata se il valore di ΔR rientra in un intervallo stabilito (ad es. \pm 30%).

I risultati relativi ad eventuali analiti caratterizzati da un rapporto S/N adeguato per entrambe le transizioni ioniche considerate e che soddisfino tutti i criteri di identificazione sopra descritti, ad eccezione del criterio del rapporto ionico, sono espressi come "Non determinabile: segnale interferito".

2.8.2 Calcoli

2.8.2.1 Modalità di quantificazione

La quantificazione degli analiti al GC/MS viene eseguita sulla base del rapporto di intensità tra l'area dell'analita e quella del rispettivo standard interno aggiunto in quantità nota. Le soluzioni di taratura, caratterizzate da concentrazioni variabili degli analiti da quantificare, impiegano tutte la medesima concentrazione per gli standard interni.

Nei procedimenti descritti la quantificazione viene effettuata mediante standard interni detti di estrazione o di processo utilizzando il principio della diluizione isotopica (gli standard interni sono molecole del tutto analoghe a quelle "native" ma "marcate" isotopicamente in quanto alcuni atomi sono sostituiti da isotopi stabili). Gli standard interni di estrazione o di processo, aggiunti a monte del procedimento di estrazione e purificazione, permettono la quantificazione degli analiti nativi, correggendo sia eventuali variazioni della risposta strumentale sia per il recupero analitico nel singolo campione in esame. Anche la quantificazione per diluizione isotopica richiede l'impiego di standard interni di iniezione che, aggiunti a valle del procedimento di estrazione e purificazione, permettono di misurare e verificare il recupero degli standard interni di processo.

2.8.2.2 Determinazione dei fattori di risposta relativi

Per ogni i-esimo analita viene calcolato, per ogni livello della taratura, il rapporto di risposta relativo (RF_i) dell'analita i-esimo rispetto al relativo standard interno, in accordo con la formula di seguito riportata:

$$RF_i = \frac{A_i \times m_{\text{std int}}}{A_{\text{std int}} \times m_i}$$

dove:

A_i = area della transizione o dello ione dell'analita i-esimo di interesse;

$A_{\text{std int}}$ = area della transizione o dello ione dell'appropriato standard interno;

m_i = massa di analita iniettato;

$m_{\text{std int}}$ = massa di appropriato standard interno iniettato;

Gli RF_i sono fattori adimensionali, pertanto le unità di misura usate per esprimere m_i e $m_{\text{std int}}$ devono essere le stesse.

Linearità del rapporto di risposta relativo

Calcolare il valore medio dei fattori di risposta (\overline{RF}_i) e la deviazione standard relativa percentuale (RSD) per i valori dei fattori di risposta ottenuti per ogni soluzione di taratura per ogni analita:

$$RSD (\%) = \frac{\text{deviazione standard}}{\overline{RF}_i} \times 100$$

Il valore di RSD dei fattori di risposta delle soluzioni di taratura per ciascun analita non deve superare il 20%.

2.8.2.3 Verifica della taratura

Consiste nella verifica dei valori dei fattori di risposta RF da utilizzare per la quantificazione, attraverso l'analisi di una soluzione di taratura intermedia. La verifica della taratura è necessaria all'inizio ed alla fine di ogni serie di campioni e comunque da ripetere ogni 10 campioni incogniti analizzati.

La verifica ha esito positivo se i valori dei fattori di risposta ottenuti per ogni analita in una soluzione intermedia, sono compresi entro $\pm 30\%$ dei valori medi di RF stabiliti durante la taratura iniziale per tutti gli analiti delle soluzioni standard di taratura. La verifica viene effettuata utilizzando la seguente formula:

$$\Delta (\%) = \frac{(RF_{\text{soluz interm}} - \overline{RF})}{\overline{RF}} \times 100$$

dove:

\overline{RF} = fattore di risposta relativo medio stabilito durante la taratura iniziale;

$RF_{\text{soluz interm}}$ = fattore di risposta relativo stabilito durante la verifica di taratura con una soluzione di taratura intermedia rispetto all'intervallo di taratura.

Se vengono rispettati i criteri sopra esposti, il valore del fattore di risposta di un dato analita è considerato indipendente dalla concentrazione nell'intervallo di concentrazioni di taratura utilizzato e il valore medio \overline{RF} può essere usato per tutti i calcoli. In caso contrario, si dovranno calcolare nuovi valori medi dei fattori di risposta con una nuova serie di iniezioni delle soluzioni di taratura.

2.8.2.4 Calcolo della concentrazione degli analiti

La concentrazione degli analiti viene determinata sulla base degli standard interni di processo aggiunti all'inizio del procedimento analitico, usando la formula seguente:

$$C_i (\text{ng/g}) = \frac{A_i \times m_{\text{std proc}}}{A_{\text{std proc}} \times \overline{RF}_i \times m_{\text{camp}}}$$

dove:

$C_i (\text{ng/g})$ = concentrazione in ng/g dell'analita i -esimo nel campione;

A_i = area della transizione o dello ione dell'analita i -esimo nell'estratto iniettato;

$A_{\text{std proc}}$ = area della transizione o dello ione dell'appropriato standard interno di processo nell'estratto iniettato;

m_{camp} = quantità di campione sottoposta ad estrazione, espressa in grammi;

$m_{\text{std proc}}$ = massa, in ng, di appropriato standard interno di processo aggiunto al campione all'inizio dell'analisi;

\overline{RF}_i = fattore di risposta relativo medio dell'analita i -esimo rispetto all'appropriato standard interno.

La verifica del recupero degli standard di processo prevede la loro quantificazione mediante standard interni di iniezione aggiunti all'estratto del campione a valle del procedimento di estrazione e purificazione. Calcolare la massa del singolo i -esimo standard di processo nell'estratto iniettato usando la formula seguente:

$$m_i = \frac{A_i \times m_{\text{std inj}}}{A_{\text{std inj}} \times \overline{RF}_i}$$

dove:

m_i = massa in ng dello standard di processo i -esimo contenuta nell'estratto del campione contenente la massa $m_{\text{std inj}}$ di standard di iniezione

A_i = area della transizione o dello ione dello standard di processo i -esimo nell'estratto del campione;

$A_{\text{std inj}}$ = area della transizione o dello ione dell'appropriato standard interno di iniezione nell'estratto del campione;

$m_{\text{std inj}}$ = massa, in ng, di appropriato standard interno di iniezione aggiunto all'estratto finale a valle di estrazione e purificazione;

\overline{RF}_i = rapporto di risposta relativo medio dello standard di processo i-esimo rispetto all'appropriato standard interno di iniezione. Nel caso che l'estratto finale al quale sono stati aggiunti gli standard interni di iniezione e che è stato effettivamente analizzato in GC/MS sia rappresentativo solo di una parte dell'estratto del campione (e quindi la massa m_i , come sopra calcolata, sia rappresentativa solo di una parte dell'estratto del campione), sarà necessario effettuare una moltiplicazione per risalire alla massa totale dello standard di processo i-esimo aggiunto inizialmente al campione.

Poiché di solito il software di quantificazione del dato di massa esegue automaticamente i calcoli relativi alla taratura e alla quantificazione, esso fornisce direttamente, come risultato, la concentrazione relativa ad ogni analita nel volume dell'estratto o sulla massa del campione. Può allora essere più facile lavorare non con i fattori di risposta relativi e le aree ma con i risultati, in ng per mL di estratto o in ng per g di campione, forniti direttamente dal software.

2.8.2.5 Calcolo del recupero

Calcolare la percentuale di recupero dello standard interno di processo nel campione in esame con la seguente formula:

$$R_{std\ proc.}(\%) = \frac{m_{misurata}}{m_{aggiunta}} \times 100$$

dove:

$R_{std,proc.}(\%)$ = percentuale di recupero dello standard interno di processo;

$m_{misurata}$ = massa, in ng, dello standard di processo nell'estratto del campione in esame, determinato mediante standard interno di iniezione;

$m_{aggiunta}$ = massa, in ng, dello standard di processo aggiunta all'inizio dell'analisi.

In ogni campione deve essere verificato che il recupero medio dello standard di processo rientri in un intervallo di accettabilità (ad es. 60-140%). Nel caso in cui lo standard di processo per un dato analita fornisca un recupero maggiore dell'estremo superiore dell'intervallo di accettabilità ma i campioni in esame non rivelino presenza per l'analita stesso non è necessario rianalizzare i campioni in esame. Nel caso in cui si ottenga un recupero inferiore all'estremo inferiore dell'intervallo di accettabilità è necessario procedere alla ripetizione dell'analisi del campione in esame.

2.8.3 Valutazione del bianco di procedimento

I risultati forniti dal bianco di procedimento sono valutati attraverso gli stessi criteri adottati per i campioni in esame. In caso di positività di uno o più analiti si deve effettuare nuovamente l'analisi di tutti quei campioni che presentino una positività per tali analiti superiore al limite di quantificazione.

3 DETERMINAZIONE DI DIFENILETERI BROMURATI IN CAMPIONI DI BIOTA MEDIANTE GASCROMATOLOGRAFIA - SPETTROMETRIA DI MASSA GC/HRMS O GC-MS/MS

3.1 CAMPO DI APPLICAZIONE

la presente procedura è applicata per la determinazione, nei tessuti di biota, dei composti riportati di seguito, mediante gascromatografia con rivelazione in spettrometria di massa ad alta risoluzione (GC-HRMS) o a triplo quadrupolo (GC-MS/MS).

Tabella 3-1: Elenco degli analiti in esame con n° di registro CAS e SQA nel biota previsto dalla normativa

Analita	N° registro CAS	SQA Biota ($\mu\text{g}/\text{kg}$ di peso umido) D.Lgs. 172/2015
BDE-28 (2,4,4'-Tribromodifeniletere)	41318-75-6	0,0085
BDE-47 (2,2',4,4'-Tetrabromodifeniletere)	5436-43-1	
BDE-99 (2,2',4,4',5-Pentabromodifeniletere)	60348-60-9	
BDE-100 (2,2',4,4',6-Pentabromodifeniletere)	189084-64-8	
BDE-154 (2,2',4,4',5,6'-Esabromodifeniletere)	207122-15-4	
BDE-153 (2,2',4,4',5,5'-Esabromodifeniletere)	68631-49-2	

Le procedure descritte consentono di determinare i composti sopra elencati nella matrice biota conformemente ai requisiti minimi di prestazione individuati dal D.Lgs. 219/2010 in relazione ai valori di SQA attualmente vigenti (D.Lgs. 172/2015). In caso di modifiche normative dei valori di SQA in diminuzione le prestazioni analitiche delle procedure descritte potrebbero essere ancora sufficienti ma è necessaria la verifica da parte del laboratorio della conformità del metodo ai nuovi requisiti.

3.2 PRINCIPIO DEL METODO

In generale per la determinazione nella matrice biota degli analiti in esame sono impiegabili diverse possibili alternative per le fasi di estrazione, purificazione e determinazione strumentale. A causa dei bassi limiti di quantificazione richiesti è necessario impiegare procedure che consentano un elevato fattore di concentrazione degli analiti, il che richiede di estrarre un'aliquota di campione relativamente grande, concentrando l'estratto a un volume finale relativamente piccolo. Queste esigenze richiedono che il procedimento preveda una purificazione accurata degli estratti e rendono difficilmente impiegabili tecniche di tipo QuEChERS senza combinarle con ulteriori tecniche di purificazione. Vengono quindi descritti di seguito tre procedimenti, che impiegano tecniche di estrazione e purificazione di tipo tradizionale, effettivamente applicati da laboratori del SNPA.

Il primo procedimento, mediante il quale vengono estratti PBDE e diossine, prevede l'estrazione a fluido pressurizzato del campione liofilizzato, seguita da purificazione mediante purificatore automatico programmabile mediante una combinazione di tipologie di estrazione in fase solida su cartuccia di silice, allumina basica e carbone. La determinazione strumentale prevede l'impiego della gascromatografia con due opzioni di rivelazione: spettrometria di massa a triplo quadrupolo e spettrometria di massa ad alta risoluzione.

Il secondo procedimento prevede due opzioni: la determinazione dei soli PBDE mediante estrazione del campione liofilizzato per dibattimento con una miscela di solventi e la purificazione dell'estratto per dibattimento con acido solforico concentrato oppure la determinazione dei PBDE insieme alle diossine mediante estrazione assistita dalle microonde seguita da purificazione con purificatore automatico programmabile mediante una combinazione di tipologie di estrazione in fase solida su cartucce di silice, allumina basica e carbone. La determinazione strumentale prevede l'impiego della gascromatografia accoppiata a spettrometria di massa ad alta risoluzione.

Come terzo esempio di procedimento impiegato da laboratori SNPA per la determinazione di PBDE in campioni di biota viene riportato un insieme di integrazioni e modifiche apportate al metodo EPA 1614A 2010.

Per tutti i procedimenti la quantificazione viene effettuata per diluizione isotopica, impiegando standard interni di estrazione (composti analoghi agli analiti ma marcati con carbonio-13) e standard interni di iniezione per la determinazione del recupero degli standard di estrazione.

Oltre a quelle menzionate sono impiegabili anche altre tecniche o combinazioni di tecniche per le fasi analitiche di estrazione, purificazione e determinazione strumentale. Quelli descritti di seguito sono esempi di procedimenti effettivamente impiegati in laboratori SNPA per la determinazione degli analiti in questione con prestazioni analitiche conformi ai requisiti normativi.

I procedimenti impiegati dai laboratori SNPA che vengono qui presentati si rifanno, in diversi punti, al metodo EPA 1614A 2010 "Brominated Diphenyl Ethers in Water, Soil, Sediment, and Tissue by HRGC/HRMS", che costituisce un riferimento internazionale valido e dettagliato al quale attingere per approfondimenti e integrazioni alle condizioni operative descritte di seguito.

3.3 INTERFERENZE E CAUSE DI ERRORE

La determinazione di concentrazioni molto basse di PBDE risente della contaminazione di fondo difficilmente azzerabile anche in un ambiente di laboratorio. In quest'ottica, per la determinazione di PBDE a concentrazioni molto basse, è necessario adottare diversi accorgimenti analitici. Ove possibile i reagenti dovrebbero essere purificati mediante estrazione o lavaggio con solventi. La vetreria riutilizzabile, dopo lavaggio con detergenti, dovrebbe essere sciacquata con solventi quali metanolo, acetone e, se necessario, diclorometano, sebbene sia preferibile minimizzare per quanto possibile l'impiego di solventi clorurati, limitandolo alle fasi di estrazione e purificazione, laddove non sostituibili. La pulizia in muffola di vetreria impiegata per l'analisi di campioni particolarmente contaminati dovrebbe essere minimizzata per via del rischio di creare siti attivi sulla superficie interna del vetro che potrebbero adsorbire irreversibilmente gli analiti. Per quanto possibile, è raccomandabile tenere separata la vetreria utilizzata per la preparazione dei "bianchi fortificati" al fine di evitare contaminazioni incrociate. Inoltre, l'affinità di questa classe di analiti per tutti i materiali organici, paraffinici, sia liquidi che cerosi, ampiamente utilizzati nella componentistica dei sistemi automatici di purificazione del campione, in particolare per tubi e valvole, e per la lubrificazione delle pompe, rende elevato il rischio di una contaminazione di fondo, per sporcamento, di queste apparecchiature, che necessitano di pulizia accurata e specifica ad ogni ciclo di funzionamento.

L'utilizzo di reagenti ad elevata purezza e di solventi "grado pesticidi" o superiore, unitamente alla determinazione analitica attraverso separazione cromatografica mediante colonne capillari ad alta risoluzione e rivelazione in spettrometria di massa in modalità Multiple Reaction Monitoring o in alta risoluzione aiutano a minimizzare i problemi di interferenza.

L'impiego della quantificazione mediante diluizione isotopica consente di ottenere risultati intrinsecamente corretti per fattori quali il recupero nel singolo campione, variazioni nella risposta strumentale rispetto alla taratura, progressiva contaminazione del sistema di determinazione strumentale da parte di residui altobollenti coestratti etc. in quanto tali fenomeni influenzeranno il segnale dello standard interno in maniera analoga al segnale dell'analita nativo. Impiegando la tecnica della diluizione isotopica sarà comunque sempre necessario verificare che vengano rispettati alcuni criteri minimi relativi ad area dei picchi e recupero.

Nell'analisi gascromatografica dei PBDE deve essere tenuta in considerazione anche la problematica della termolabilità dei congeneri a maggior grado di bromurazione che, specie in presenza di residui altobollenti da precedenti iniezioni di campioni, risentono di fenomeni di adsorbimento e degradazione nell'iniettore ed in colonna, determinando cali nella risposta strumentale. Per minimizzare questi fenomeni è utile la sostituzione di liner e il taglio della prima parte di precolonna o colonna. Nel caso vengano ricercati altri congeneri, oltre ai 6 indicati al paragrafo 3.1, in particolare nel caso dei congeneri a maggior grado di bromurazione e segnatamente nel caso del decabromobifenile (BDE-209), una delle soluzioni impiegate per minimizzare la degradazione degli analiti è l'uso di colonne con lunghezza mediamente più corta dell'usuale, come 10-15 m. Nel caso dei PBDE, in considerazione della caratteristica degli atomi di bromo di esistere in due isotopi stabili, un ulteriore criterio di identificazione è costituito dalla valutazione del pattern isotopico generato dalla presenza di più atomi di bromo nella molecola. In particolare, è possibile valutare che il rapporto di abbondanza tra due ioni caratteristici del pattern isotopico dell'analita sia compatibile con il valore definito in fase di taratura.

3.4 PREPARAZIONE DEL CAMPIONE

Salvo diversa indicazione della normativa vigente, la determinazione delle sostanze in questione viene eseguita sui pesci. In coerenza con quanto è stato stabilito e ad oggi praticato per il monitoraggio del biota in ottemperanza alla Direttiva Strategia Marina, l'analisi deve essere condotta sul tessuto muscolare di individui adulti, delle taglie commerciali di cui al Regolamento (CE) n. 1967/2006 del Consiglio del 21 dicembre 2006. Nel caso in cui le dimensioni degli esemplari campionati siano inferiori a cm 15, le analisi possono essere effettuate sugli organismi in toto raccolti in pool.

Prima della dissezione devono essere eseguite e registrate le misurazioni biometriche quali lunghezza totale, lunghezza standard (esclusa la pinna caudale), altezza (escluse le pinne), peso degli esemplari e, nel caso di pool, i valori medi con deviazione standard e gli intervalli di variabilità. Una volta eseguite le operazioni necessarie a prelevare la parte di biota da sottoporre ad analisi (a seconda dell'organismo: pulitura, eviscerazione, sfilettatura etc.) il campione risultante viene generalmente omogeneizzato (sebbene sia possibile eseguire l'eventuale liofilizzazione anche sulle parti intere). Ai fini dell'omogeneizzazione il campione viene solitamente dapprima tagliato grossolanamente per essere poi più efficacemente

sminuzzato con un macinatore a lame (a bicchiere o a immersione). L'omogeneizzato fresco così ottenuto può essere analizzato o conservato in congelatore tal quale oppure può essere sottoposto a liofilizzazione. La liofilizzazione consente una più agevole conservazione del campione per le successive analisi. Se necessario il campione liofilizzato può essere setacciato, ad esempio su maglia da 2mm, per eliminare parti grossolane non triturate (ad es. lisce o squame) ed eventualmente ulteriormente rimacinato.

Poiché i risultati devono essere espressi rispetto alla massa di campione fresco, nel caso si analizzi il campione liofilizzato, è essenziale determinare il contenuto di acqua del campione in modo da poter ricondurre i risultati al peso umido. È inoltre consigliabile eseguire anche la determinazione del contenuto lipidico che può essere utile nel confronto dei risultati riferiti a specie diverse o a parti diverse del pesce sottoposto ad analisi.

3.5 PROCEDIMENTO ANALITICO

La seguente descrizione del procedimento riporta esempi di condizioni operative di dettaglio impiegabili nell'esecuzione della metodica che sono da ritenere indicative e non vincolanti. È possibile apportare variazioni più o meno rilevanti alla procedura, ferma restando la responsabilità del laboratorio di verificare in ogni caso l'adeguatezza del metodo allo scopo.

3.5.1 Preparazione delle soluzioni standard

A causa dell'eterogeneità dei formati dei principi attivi disponibili in commercio e delle loro differenti solubilità nei solventi organici non è possibile uniformare le istruzioni per la preparazione delle soluzioni standard madri dei singoli analiti nativi in esame e dei relativi standard interni. Nella scelta delle operazioni devono essere tenute in considerazione la forma fisica del materiale di riferimento (solido puro o soluzione certificata), la purezza, la quantità di sostanza contenuta, la solubilità nei vari solventi degli analiti, le concentrazioni da realizzare nelle soluzioni. Piuttosto che partire dai principi attivi solidi è solitamente più agevole utilizzare, quando disponibili commercialmente, fiale da 1 mL di soluzione certificata. Nella realizzazione di soluzioni standard si può verificare il caso che le soluzioni madri certificate siano costituite da solventi immiscibili con il solvente prescelto per l'iniezione in gascromatografia; in questo caso viene effettuata una solubilizzazione intermedia del contenuto della fiala in un volume limitato di un solvente quale l'isopropanolo per poi portare a volume il matraccio tarato con il solvente di iniezione.

Per gli analiti in questione il periodo di validità delle soluzioni standard preparate in laboratorio è generalmente di diversi anni se conservate a temperature inferiori a -18 °C e al riparo dalla luce (di solito i certificati del produttore riportano scadenze a 10 anni per le soluzioni concentrate non aperte conservate a temperatura ambiente). Il periodo di validità della soluzione standard può essere valutato ed eventualmente esteso in base ai risultati delle prove di stabilità eseguite in laboratorio.

Per la determinazione dei PBDE in diluizione isotopica è necessario disporre di un composto marcato isotopicamente per ogni analita. I procedimenti descritti impiegano composti marcati con ¹³C, analoghi ai composti nativi, per tutti gli analiti ricercati (congeneri 28, 47, 100, 99, 154, 153).

3.5.2 Campioni di controllo e standard interni

3.5.2.1 Campioni di controllo

A prescindere dalle tecniche di estrazione e purificazione impiegate la procedura impiegata deve prevedere l'impiego di campioni di controllo che siano sottoposti alla stessa intera procedura a cui sono sottoposti i campioni in analisi. Per ogni batch di campioni incogniti sono preparati i seguenti campioni di controllo:

- Uno o più bianchi di procedimento che possono essere
 - un bianco di procedimento costituito dai soli materiali e reattivi impiegati (ad esempio, nel caso dell'estrazione PFE, costituito dalla cella ASE senza campione con la sola terra di diatomee).
 - Un bianco di procedimento costituito da una matrice reale "bianca" esente da contaminazione per gli analiti in esame per analisi pregresse.
- Repliche dei campioni incogniti (non meno di una replica per ogni 10 campioni, preferibilmente una ogni 5 campioni) per valutare la ripetibilità in matrice.
- Uno o più campioni di riferimento che possono essere:
 - un bianco di procedimento fortificato con gli analiti ricercati.
 - una matrice reale "bianca" fortificata con gli analiti ricercati (un campione reale disponibile in buona quantità, già caratterizzato e con scarsissime concentrazioni degli analiti ricercati).
 - una matrice reale dotata di valori assegnati (materiale di riferimento certificato o residuo di proficiency test dotato di valori assegnati per gli analiti di interesse).
 - una matrice reale già caratterizzata dal laboratorio per gli analiti ricercati (un campione reale disponibile in buona quantità, già caratterizzato e contenente concentrazioni degli analiti ricercati ricadenti nell'intervallo di interesse)

La fortificazione dei campioni di riferimento con miscele di analiti viene effettuata in modo da realizzare una concentrazione finale nell'estratto che si collochi non oltre la metà dell'intervallo di taratura strumentale.

3.5.2.2 Fortificazione dei campioni con standard interni di processo o surrogati

Tutti i campioni, sia quelli incogniti sia quelli di controllo, vengono fortificati prima dell'inizio dell'estrazione con predeterminati volumi delle soluzioni a concentrazioni note di standard interni di estrazione marcati isotopicamente che verranno impiegati per la quantificazione degli analiti. Nel caso si desideri verificare il recupero del procedimento a valle della fase di estrazione è possibile aggiungere una quantità nota di standard marcati all'estratto prima della fase di purificazione.

3.5.3 Estrazione e purificazione

Per la determinazione nella matrice biota degli analiti in esame sono impiegabili diverse possibili alternative per le fasi di estrazione e purificazione ma, a causa dei bassi limiti di quantificazione richiesti è necessario impiegare procedure che consentano un elevato fattore di concentrazione degli analiti e che, conseguentemente, prevedano una purificazione accurata degli estratti.

Alla sezione 3.6 sono riportate le descrizioni delle tecniche di estrazione e concentrazione impiegate da alcuni laboratori SNPA per la determinazione di PBDE in campioni di biota. Si tratta di estrazione con fluido pressurizzato, estrazione mediante dibattimento con solventi, purificazione con acido solforico concentrato (liquido o supportato su terra di diatomee) e purificazione mediante sistema automatico Power Prep (successione di purificazioni su cartucce di silice, allumina basica e carbone). Si rimanda alla sezione 3.6 per i dettagli dell'esecuzione delle tecniche summenzionate.

3.5.4 Determinazione strumentale

L'iniezione delle soluzioni a concentrazioni note di analiti e standard interni consente la realizzazione delle tarature relative agli analiti di interesse. I calcoli per la taratura possono essere eseguiti sia manualmente sia attraverso il software in dotazione allo strumento ed in ogni caso deve essere considerato il rapporto tra l'area del picco dell'analita e quella del rispettivo standard interno al variare della concentrazione dell'analita. Verificare che il coefficiente di correlazione lineare (r) sia non meno di 0,95 per ogni composto.

Prima di iniettare gli estratti dei campioni è necessario verificare l'assenza di contaminazione strumentale analizzando dei bianchi strumentali (solventi); è necessario verificare la validità della taratura iniettando uno o più standard (in particolare a bassa e media concentrazione) controllando la coerenza di tempi di ritenzione, aree, rapporti ionici.

Insieme ai campioni incogniti devono essere iniettati e valutati i campioni di controllo (bianchi di procedimento, repliche, campioni di riferimento etc.). La verifica della validità della taratura (sia come risposte che come tempi di ritenzione) deve essere effettuata all'inizio e alla fine della sequenza di analisi strumentale nonché durante la sequenza almeno ogni 20 iniezioni.

3.5.4.1 Criteri di identificazione

Un picco cromatografico è inequivocabilmente identificato come analita, quando soddisfa tutti i seguenti criteri:

- Rapporto segnale/rumore
Tutti gli ioni o le transizioni MRM di ciascun analita e dello standard interno sono presenti con rapporto S/N adeguato (ad es. > 3).
- Tempi di ritenzione (RT)
Il valore di RT è compreso in un intervallo stabilito intorno al valore medio, definito in fase di taratura per l'analita in esame (ad es. tempo stabilito \pm 0.1 min). Se il tempo di ritenzione dell'analita indagato non rientra entro il suddetto intervallo di accettabilità l'analita è considerato non presente. In caso di identificazione positiva procedere al calcolo del rapporto ionico.
- Rapporto ionico
Misurare almeno un rapporto di abbondanza ionica tra gli ioni o le transizioni considerate calcolando la deviazione relativa del rapporto ionico ΔR con la formula seguente:

$$\Delta R = \frac{R_{\text{camp}} - R_{\text{st}}}{R_{\text{st}}}$$

dove:

R_{camp} = rapporto ionico dell'analita nella soluzione campione;

R_{st} = media dei rapporti ionici dell'analita negli standard iniettati.

L'identificazione è confermata se il valore di ΔR rientra in un intervallo stabilito (ad es. \pm 30%).

Nel caso di composti polibromurati come gli analiti in esame, che comportano la presenza di pattern isotopici caratteristici dipendenti dal numero di atomi di bromo presenti nella molecola (o nel suo frammento ionico), viene valutata l'abbondanza relativa degli isotopi del bromo (o rapporto isotopico, per analisi in HRMS). Viene valutato il rapporto tra le abbondanze misurate per due ioni (m/z) appartenenti al pattern isotopico dell'analita polibromurato ed il risultato viene confrontato con l'abbondanza relativa, teorica o definita in fase di taratura e dipendente dal numero di atomi di bromo presenti, che deve ricadere entro limiti prestabiliti.

I risultati relativi ad eventuali analiti caratterizzati da un rapporto S/N adeguato per entrambi i segnali ionici considerati e che soddisfino tutti i criteri di identificazione sopra descritti, ad eccezione del criterio del rapporto ionico, sono espressi come "Non determinabile: segnale interferito".

3.5.5 Calcoli

La quantificazione degli analiti in GC/MS viene eseguita sulla base del rapporto di intensità tra l'area dell'analita e quella del rispettivo standard interno aggiunto in quantità nota. Le soluzioni di taratura, caratterizzate da concentrazioni variabili degli analiti da quantificare, impiegano tutte la medesima concentrazione per gli standard interni.

Nei procedimenti descritti la quantificazione viene effettuata mediante standard interni detti di estrazione o di processo utilizzando il principio della diluizione isotopica (gli standard interni sono molecole del tutto analoghe a quelle "native" ma "marcate" isotopicamente in quanto alcuni atomi sono sostituiti da isotopi stabili). Gli standard interni di estrazione o di processo, aggiunti a monte del procedimento di estrazione e purificazione, permettono la quantificazione degli analiti nativi, correggendo sia eventuali variazioni della risposta strumentale sia per il recupero analitico nel singolo campione in esame. La quantificazione per diluizione isotopica richiede l'impiego anche di standard interni di iniezione o di siringa che, aggiunti a valle del procedimento di estrazione e purificazione, permettono di misurare e verificare il recupero degli standard interni di processo.

3.5.5.1 Determinazione dei fattori di risposta relativi

Per ogni i-esimo analita viene calcolato, per ogni livello della taratura, il rapporto di risposta relativo (RF_i) dell'analita i-esimo rispetto al relativo standard interno, in accordo con la formula di seguito riportata:

$$RF_i = \frac{A_i \times m_{std\ int}}{A_{std\ int} \times m_i}$$

dove:

A_i = area della transizione ionica dell'analita i-esimo di interesse;

A_{std int} = area della transizione ionica dell'appropriato standard interno;

m_i = massa di analita iniettato;

m_{std int} = massa di appropriato standard interno iniettato;

Gli RF_i sono fattori adimensionali, pertanto le unità di misura usate per esprimere m_i e m_{std int} devono essere le stesse.

Linearità del rapporto di risposta relativo

Calcolare il valore medio dei fattori di risposta (\overline{RF}_i) e la deviazione standard relativa percentuale (RSD) per i valori dei fattori di risposta ottenuti per ogni soluzione di taratura per ogni analita:

$$RSD (\%) = \frac{\text{deviazione standard}}{\overline{RF}_i} \times 100$$

Il valore di RSD dei fattori di risposta delle soluzioni di taratura per ciascun analita non deve superare il 20%.

3.5.5.2 Verifica della taratura

Consiste nella verifica dei valori dei fattori di risposta RF da utilizzare per la quantificazione, attraverso l'analisi di una soluzione di taratura intermedia. La verifica della taratura è necessaria all'inizio ed alla fine di ogni serie di campioni e comunque da ripetere ogni 10 campioni incogniti analizzati.

La verifica ha esito positivo se i valori dei fattori di risposta ottenuti per ogni analita in una soluzione intermedia, sono compresi entro $\pm 30\%$ dei valori medi di RF stabiliti durante la taratura iniziale per tutti gli analiti delle soluzioni standard di taratura. La verifica viene effettuata utilizzando la seguente formula:

$$\Delta (\%) = \frac{(RF_{soluz\ interm} - \overline{RF})}{\overline{RF}} \times 100$$

dove:

\overline{RF} = fattore di risposta relativo medio stabilito durante la taratura iniziale;

$RF_{soluz\ interm}$ = fattore di risposta relativo stabilito durante la verifica di taratura con una soluzione di taratura intermedia rispetto all'intervallo di taratura.

Se vengono rispettati i criteri sopra esposti, il valore del fattore di risposta di un dato analita è considerato indipendente dalla concentrazione nell'intervallo di concentrazioni di taratura utilizzato e il valore medio \overline{RF} può essere usato per tutti i calcoli. In caso contrario, si dovranno calcolare nuovi valori medi dei fattori di risposta con una nuova serie di iniezioni delle soluzioni di taratura.

3.5.5.3 Calcolo della concentrazione degli analiti

La concentrazione degli analiti viene determinata sulla base degli standard interni di processo aggiunti all'inizio del procedimento analitico, usando la formula seguente:

$$C_i(\text{ng/g}) = \frac{A_i \times m_{\text{std proc}}}{A_{\text{std proc}} \times \overline{RF}_i \times m_{\text{camp}}}$$

dove:

$C_i(\text{ng/g})$ = concentrazione in ng/g dell'analita i-esimo nel campione;

A_i = area del segnale ionico dell'analita i-esimo nell'estratto iniettato;

$A_{\text{std proc}}$ = area del segnale ionico dell'appropriato standard interno di processo nell'estratto iniettato;

m_{camp} = quantità di campione sottoposta ad estrazione, espressa in grammi;

$m_{\text{std proc}}$ = massa, in ng, di appropriato standard interno di processo aggiunto al campione all'inizio dell'analisi;

\overline{RF}_i = fattore di risposta relativo medio dell'analita i-esimo rispetto all'appropriato standard interno.

La verifica del recupero degli standard di processo prevede la loro quantificazione mediante standard interni di iniezione aggiunti all'estratto del campione a valle del procedimento di estrazione e purificazione. Calcolare la massa del singolo i-esimo standard di processo nell'estratto iniettato usando la formula seguente:

$$m_i = \frac{A_i \times m_{\text{std inj}}}{A_{\text{std inj}} \times \overline{RF}_i}$$

dove:

m_i = massa in ng dello standard di processo i-esimo contenuta nell'estratto del campione contenente la massa $m_{\text{std inj}}$ di standard di iniezione

A_i = area del segnale ionico dello standard di processo i-esimo nell'estratto del campione;

$A_{\text{std inj}}$ = area del segnale ionico dell'appropriato standard interno di iniezione nell'estratto del campione;

$m_{\text{std inj}}$ = massa, in ng, di appropriato standard interno di iniezione aggiunto all'estratto finale a valle di estrazione e purificazione;

\overline{RF}_i = rapporto di risposta relativo medio dello standard di processo i-esimo rispetto all'appropriato standard interno di iniezione.

Nel caso che l'estratto finale al quale sono stati aggiunti gli standard interni di iniezione e che è stato effettivamente analizzato in GC/MS sia rappresentativo solo di una parte dell'estratto del campione (e quindi la massa m_i , come sopra calcolata, sia rappresentativa solo di una parte dell'estratto del campione), sarà necessario effettuare una moltiplicazione per risalire alla massa totale dello standard di processo i-esimo aggiunto inizialmente al campione.

Poiché di solito il software di quantificazione del dato di massa esegue automaticamente i calcoli relativi alla taratura e alla quantificazione, esso fornisce direttamente, come risultato, la concentrazione relativa ad ogni analita nel volume dell'estratto o sulla massa del campione. Può allora essere più facile lavorare non con i fattori di risposta relativi e le aree ma con i risultati, in ng per mL di estratto o in ng per g di campione, forniti direttamente dal software.

3.5.5.4 Calcolo del recupero

Calcolare la percentuale di recupero dello standard di processo surrogato nel campione in esame con la seguente formula:

$$R_{\text{std proc}}(\%) = \frac{m_{\text{misurata}}}{m_{\text{aggiunta}}} \times 100$$

dove:

$R_{\text{std proc}}(\%)$ = percentuale di recupero dello standard interno di processo;

m_{misurata} = massa, in ng, dello standard di processo nell'estratto del campione in esame, determinato mediante standard interno di iniezione;

m_{aggiunta} = massa, in ng, dello standard di processo aggiunta all'inizio dell'analisi.

In ogni campione deve essere verificato che il recupero medio dello standard di processo rientri in un intervallo di accettabilità (ad es. 60-140%). Nel caso in cui lo standard di processo per un dato analita fornisca un recupero maggiore dell'estremo superiore dell'intervallo di accettabilità ma i campioni in esame non rivelino presenza per l'analita stesso non è necessario rianalizzare i campioni in esame. Nel caso in cui si ottenga un recupero inferiore all'estremo inferiore dell'intervallo di accettabilità è necessario procedere alla ripetizione dell'analisi del campione in esame.

3.5.5.5 Valutazione del bianco di procedimento

I risultati forniti dal bianco di procedimento sono valutati attraverso gli stessi criteri adottati per i campioni in esame. In caso di positività di uno o più analiti si deve effettuare nuovamente l'analisi di tutti quei campioni che presentino una positività per tali analiti superiore al limite di quantificazione.

3.6 PROCEDIMENTI LABORATORI SNPA

In questa sezione vengono riportate descrizioni e dettagli operativi di procedure analitiche effettivamente utilizzate da laboratori SNPA per la determinazione degli analiti in oggetto in campioni di biota in conformità ai requisiti di prestazioni analitiche stabiliti dalla normativa attualmente vigente.

Il primo procedimento, concepito per l'estrazione congiunta di PBDE e diossine, prevede l'estrazione a fluido pressurizzato del campione liofilizzato, seguita da purificazione mediante purificatore automatico programmabile mediante una combinazione di tipologie di estrazione in fase solida su cartuccia di silice, allumina basica e carbone. La determinazione strumentale prevede l'impiego della gascromatografia con due opzioni di rivelazione: spettrometria di massa a triplo quadrupolo e spettrometria di massa ad alta risoluzione.

Il secondo procedimento prevede due opzioni: la determinazione dei soli PBDE mediante estrazione del campione liofilizzato per dibattimento con una miscela di solventi e la purificazione dell'estratto per dibattimento con acido solforico concentrato oppure la determinazione dei PBDE insieme alle diossine mediante estrazione assistita dalle microonde seguita da purificazione con purificatore automatico programmabile mediante una combinazione di tipologie di estrazione in fase solida su cartucce di silice, allumina basica e carbone. La determinazione strumentale prevede l'impiego della gascromatografia accoppiata a spettrometria di massa ad alta risoluzione.

Come terzo esempio di procedimento impiegato da laboratori SNPA per la determinazione di PBDE in campioni di biota viene riportato un insieme di integrazioni e modifiche apportate al metodo EPA 1614A 2010.

3.6.1 Procedimento n° 1 (PFE, SPE automatizzata, GC-HRMS o GC-MS/MS)

Nella procedura di seguito descritta, dopo l'estrazione a fluido pressurizzato del campione di biota, si impiega un sistema tipo Power Prep per eseguire, in serie e in maniera automatizzata, purificazioni SPE su silice, allumina basica e carbone.

3.6.1.1 Estrazione e purificazione - Procedimento n° 1

Il campione di biota liofilizzato ed omogeneizzato mediante mulino a lame viene sottoposto ad estrazione a fluido pressurizzato. Tre grammi di campione liofilizzato vengono trasferiti in cella di estrazione ASE. Viene quindi effettuata la fortifica del campione con miscela di standard interni marcati isotopicamente (congeneri 28, 47, 100, 99, 154, 153). Si procede in maniera analoga per tutti i campioni in analisi, le loro repliche e i campioni per il controllo di qualità.

Si trasferiscono le celle così preparate nell'autocampionatore dell'estrattore e si avvia il procedimento di estrazione automatizzata impostando un metodo che impiega una miscela di estrazione costituita da esano-diclorometano 1:1 v:v.

Al termine della sequenza potranno essere prelevati dal carosello inferiore i vial di raccolta contenenti l'estratto già filtrato. Nel caso le lavorazioni sugli estratti non possano essere condotte in giornata è possibile conservare i vial in congelatore, preferibilmente dopo aver sostituito i tappi dotati di setto con dei tappi integri.

Il procedimento n°1, prevedendo l'estrazione congiunta di PBDE e diossine, prevede l'impiego di un sistema tipo Power Prep per eseguire, in serie e in maniera automatizzata delle procedure di purificazione in fase solida (SPE) su silice, allumina basica e carbone grafitizzato

L'estratto proveniente dall'estrazione PFE deve essere preliminarmente disidratato mediante sodio solfato anidro e quindi concentrato a piccolo volume.

Le colonne impiegate per la purificazione SPE mediante Power Prep sono le seguenti:

- colonna di silice tipo Jumbo (SNAP Extra High Capacity Silica ABN – codice produttore FMSNDXLD SABNTFC)
- allumina basica (SNAP Basic Alumina (11 g) Column - codice produttore FMSNCLBAS011)
- carbone (SNAP Carbon/Celite Column codice produttore FMSNCACCE34-034)

Il programma di eluizione power prep delle tre colonne prevede:

-condizionamento colonna di silice con 100 mL n-esano, flusso 10 mL/min

-caricamento campione con 10 mL n-esano, flusso 5 mL/min
 -lavaggio con 220 mL di n-esano, flusso 10 mL/min
 -eluizione e raccolta PCB+PBDE dalla colonna di silice con 40 mL esano/diclorometano 85/15, flusso 10 mL/min
 -eluizione colonna allumina con 50 mL di n-esano, flusso 10 mL/min
 -eluizione e raccolta PCDD/F colonna carbone con 40 mL toluene, flusso 5 mL/min.
 L'estratto PCB+PBDE viene concentrato delicatamente a secchezza e quindi ripreso con 50 µL di std siringa BDE 138 marcato con ¹³C₁₂ + 50 µL di std di siringa miscela di PCB 70, 111 e 170 marcati con ¹³C₁₂.
 L'estratto PCDD/F viene concentrato delicatamente a secchezza e quindi ripreso con 100 µL di std siringa contenenti policlorodibenzo-diossine e -furani marcati con ¹³C₁₂.
 L'intero procedimento viene effettuato anche sui campioni di controllo.

3.6.1.2 *Analisi GC-MS/MS - Procedimento n° 1*

Vengono di seguito presentati degli esempi di condizioni operative di analisi strumentale in gascromatografia accoppiata ad un rivelatore a spettrometria di massa a triplo quadrupolo. Il campione è introdotto nel gascromatografo in modalità splitless, il gas di trasporto impiegato è elio (He), l'analisi avviene in modalità MRM (multiple reaction monitoring). Nelle tabelle seguenti sono riportati, a titolo di esempio, parametri operativi e condizioni strumentali per la fase cromatografica e la fase di rivelazione, impiegabili per la determinazione degli analiti in esame.

Tabella 3-2: condizioni operative GC/MS/MS – Procedimento n°1

Gas-Cromatografo	
Colonna capillare	DB-5MS- 60 m x 0,25 mm x 0,25 µm
Temperatura iniziale colonna	70 °C
Tempo isoterma iniziale	1 min
Programma temperatura colonna	incremento fino a 300 °C a 25 °C/min, isoterma per 30 min;

Tabella 3-3: transizioni MRM per la determinazione degli analiti in esame

Composto	ione precursore (m/z)	ione prodotto (m/z)
BDE-28M	417,8	258
	419,8	260
BDE-28	405,8	246
	407,8	248
BDE-47M	497,7	338
	499,7	339
BDE-47	485,7	326
	483,7	324
BDE-100M	575,6	415,8
	577,6	417,8
BDE-100	565,6	405,8
	563,6	403,8
BDE-99M	575,6	415,8
	577,6	417,8
BDE-99	563,6	403,8
	565,6	405,8
BDE-154M	655,5	497,7
	657,5	497,7
BDE-154	643,5	483,7
	641,5	481,7
BDE-153M	655,5	497,7
	657,5	497,7
BDE-153	643,5	483,7
	641,5	481,7

Composto	Ione precursore (m/z)	Ione prodotto (m/z)
SI_BDE-138M	655,5	497,7
	655,5	495,7

La taratura viene realizzata come da tabella 5 del metodo EPA 1614A 2010 preparando 5 soluzioni in nonano/toluene a 1, 5, 50, 500, 2500 ng/mL per ognuno degli analiti in questione e una concentrazione fissa di 100 ng/mL per gli standard interni di estrazione marcati isotopicamente.

In queste condizioni il limite di quantificazione è di 0,0030 µg/kg (peso secco) per ciascun congenere.

Ai fini del controllo di qualità è fissato un criterio di accettazione del recupero analitico di almeno il 50%.

3.6.1.3 Analisi GC-HRMS - Procedimento n° 1

Vengono di seguito presentati degli esempi di condizioni operative di analisi strumentale in gascromatografia accoppiata ad un rivelatore a spettrometria di massa ad alta risoluzione. Gli ioni di massa accurata monitorati sono quelli individuati da tabella 7 del metodo EPA 1614A 2010.

Tabella 3-4: condizioni operative GC-HRMS – Procedimento n°1

Gas-Cromatografo	
Colonna capillare	DB-5MS- 60 m x 0,25 mm x 0,25 µm
Temperatura iniziale colonna	70 °C
Tempo isoterma iniziale	1 min
Programma temperatura colonna	incremento fino a 300 °C a 25 °C/min, isoterma per 30 min;

Tabella 3-5: ioni monitorati in GC-HRMS per la determinazione degli analiti in esame

Composto	m/z	Tipologia di ione (m/z)
BDE-28M	497,7514	M+2
	499,7493	M+4
BDE-28	483,7132	M+2
	485,7111	M+4
BDE-47M	497,7514	M+2
	499,7493	M+4
BDE-47	483,7132	M+2
	485,7111	M+4
BDE-100M	575,6619	M+4
	577,6598	M+6
BDE-100	563,6216	M+4
	565,6196	M+6
BDE-99M	575,6619	M+4
	577,6598	M+6
BDE-99	563,6216	M+4
	565,6196	M+6
BDE-154M	655,5704	M+4
	657,5683	M+6
BDE-154	641,5322	M+4
	643,5302	M+6
BDE-153M	655,5704	M+4
	657,5683	M+6
BDE-153	641,5322	M+4
	643,5302	M+6
SI_BDE-138M	655,5704	M+4
	657,5683	M+6

La taratura viene realizzata come da tabella 5 del metodo EPA 1614A 2010 preparando 5 soluzioni in nonano/toluene a 1, 5, 50, 500, 2500 ng/mL per ognuno degli analiti in questione e una concentrazione fissa di 100 ng/mL per gli standard interni di estrazione marcati isotopicamente.

In queste condizioni il limite di quantificazione è di 0,0030 µg/kg (peso secco) per ciascun congenere.

Ai fini del controllo di qualità i criteri di accettazione del recupero analitico sono quelli riportati in tabella 6 del metodo EPA 1614A 2010. In particolare, il recupero, nei campioni incogniti, degli standard interni marcati di estrazione dev'essere compreso tra il 25% e il 150%; nei bianchi di procedimento fortificati il recupero degli standard interni marcati di estrazione deve essere compreso tra il 30% ed il 140% mentre quello degli analiti nativi aggiunti deve essere compreso tra il 50% e il 150%.

3.6.2 Procedimento n° 2 (opzione soli PBDE e opzione PBDE+PCDD/F, GC-HRMS)

Il procedimento n°2 prevede una prima opzione in cui è prevista la determinazione dei soli PBDE ed una seconda opzione per la determinazione congiunta di PBDE e diossine.

3.6.2.1 Estrazione e purificazione - Procedimento n° 2 opzione 1 (solo PBDE)

Il campione di biota liofilizzato ed omogeneizzato mediante mulino a lame viene sottoposto ad estrazione mediante dibattimento con solventi. Un'aliquota di campione liofilizzato corrispondente a 5 grammi di biota fresco viene pesata in una vial in vetro da 40 mL con tappo a vite e setto silicone/PTFE. Viene quindi effettuata la fortifica del campione con miscela di standard interni marcati isotopicamente (10 µL di miscela a 0.1 µg/mL in nonano dei congeneri 28, 47, 100, 99, 154, 153). Si aggiungono 20 mL di una miscela diclorometano/esano 50/50 v/v e si procede all'estrazione agitando vigorosamente per 20 minuti. L'estratto viene recuperato e l'estrazione viene ripetuta con altri 20 mL della stessa miscela. Gli estratti riuniti vengono concentrati, a 40 °C sotto flusso di azoto, fino a raggiungere un volume di 10 mL. Si procede in maniera analoga per tutti i campioni in analisi, le loro repliche e i campioni per il controllo di qualità.

All'estratto vengono aggiunti 4 mL di H₂SO₄ concentrato al 96% e si pone in agitazione molto blanda su un agitatore rotante per 20 min. Si centrifuga quindi a 3500 rpm per 3 min e si recupera la fase organica. Si aggiungono poi 5 mL di esano nella vial con l'acido, si agita a mano per 1 min, si centrifuga per 1 min e si riuniscono le fasi organiche.

Sulla base del colore dell'estratto organico, l'attacco acido può essere ripetuto con un volume variabile di tra 2 e 4 mL di acido. Si concentra l'estratto così riunito fino a circa 100 µL sotto flusso di azoto a 40 °C, trasferendolo in una vial in vetro scuro da autocampionatore. Vengono aggiunti all'estratto 10 µL dello standard interno di siringa BDE 139 marcato con ¹³C (0,1 µg/mL). Il volume finale viene portato a 0,5 mL con isottano. Tale procedura di purificazione si applica anche ai campioni di controllo qualità.

3.6.2.2 Estrazione e purificazione - Procedimento n° 2 opzione 2 (PBDE+PCDD/F)

Il campione di biota liofilizzato ed omogeneizzato mediante mulino a lame viene sottoposto ad estrazione assistita da microonde. Un'aliquota di campione liofilizzato corrispondente a 5 grammi di biota fresco viene pesata in una vial in vetro da 100 mL monouso per estrattore a microonde marca Milestone modello Ethos X. Viene quindi effettuata la fortifica del campione con miscela di standard interni marcati isotopicamente (10 µL di miscela a 0.1 µg/mL in nonano dei congeneri 28, 47, 100, 99, 154, 153). Si aggiungono 20 mL di toluene e si procede all'estrazione in microonde. Il programma di estrazione utilizzato ha una durata di 40 min, e prevede una rampa dalla T iniziale a 120 °C in 10 min, per poi mantenere tale temperatura per 30 min (in agitazione). Tale procedura è la stessa che viene utilizzata per estrarre PCDD/PCDF/PCB sempre nel biota, le analisi possono essere associate. L'estratto viene lasciato raffreddare e recuperato, effettuando due lavaggi con 5 mL di toluene.

Gli estratti riuniti vengono concentrati, a 40 °C sotto flusso di azoto oppure con un evaporatore rotante, fino a raggiungere un volume di pochi µL, e ripresi con 10 mL di esano. Si procede in maniera analoga per tutti i campioni in analisi, le loro repliche e i campioni per il controllo di qualità.

La purificazione prevede una preliminare purificazione parziale mediante un solo dibattimento con acido solforico come descritto per l'opzione 1. L'estratto parzialmente purificato con acido solforico viene concentrato sotto flusso di azoto a 40 °C fino a circa 1mL.

La purificazione prosegue quindi attraverso l'impiego di un sistema automatizzato Power Prep mediante l'utilizzo di colonne impaccate con silice (acida/basica/neutra), allumina e carbone. Queste colonne vengono acquistate già pronte per lo strumento Power-Prep, che utilizza dei programmi automatizzati di lavaggio/carico campione/eluzione con diversi solventi. In particolare, vengono utilizzate le colonne:

- Colonne preimpaccate monouso di silice (acida, neutra e basica) XL;
- Colonne preimpaccate monouso di allumina basica;
- Colonne preimpaccate monouso di carbone.

Si riportano di seguito e condizioni operative del programma di purificazione che utilizza come solventi esano, esano/diclorometano 85/15, diclorometano, toluene.

Tabella 3-6: Programma purificatore Power Prep – Procedimento n°1 – opzione 2

Step	Flow (mL/min)	Vol. (mL)	M1-M8	Descrizione
1	10	20	01222006	Carica esano
2	10	30	01212006	condizionamento Allumina
3	10	20	01221116	condizionamento Carbone Forward
5	10	100	01122006	condizionamento Silica
6	10	10	06122006	Carica Campione
7	10	90	01112006	Eluisci esano
9	10	30	01112001	Eluisci esano PCB leggeri
10	10	10	02222006	Cambio al 85:15
11	10	38	02212001	Eluisci 85:15 PCB
12	10	10	03222006	Cambio DCM
13	10	125	03211111	DCM eluisci
16	10	10	05222006	Cambia a Toluene
17	5	38	05221222	Eluizione diossine con Toluene
18	5	2	01221222	Purge
19	1	0,1	00000000	Spegni Valvole

I PBDE vengono eluiti nella posizione 1, assieme ai PCB, e sono raccolti in un pallone da 250 mL.

L'eluato nel pallone viene concentrato al rotavapor e trasferito in una vial in vetro da 40 mL.

Si concentra l'estratto così ottenuto fino a circa 100 µL sotto flusso di azoto a 40 °C, trasferendolo in una vial in vetro scuro da autocampionatore. Vengono aggiunti all'estratto 10µL dello standard interno di siringa BDE 139 marcato con ¹³C (0,1 µg/mL). Il volume finale viene portato a 0,5 mL con isoottano. Tale procedura di purificazione si applica anche ai campioni di controllo qualità.

3.6.2.3 Analisi GC-HRMS - Procedimento n° 2

Vengono di seguito presentati degli esempi di condizioni operative di analisi strumentale in gascromatografia accoppiata ad un rivelatore a spettrometria di massa ad alta risoluzione a trappola orbitale. Il campione è introdotto nel gascromatografo in modalità large volume utilizzando un iniettore PTV, il gas di trasporto impiegato è elio (He).

Nelle tabelle seguenti sono riportati, a titolo di esempio, parametri operativi e condizioni strumentali per la fase cromatografica e la fase di rivelazione, impiegabili per la determinazione degli analiti in esame.

Tabella 3-7: condizioni operative GC-HRMS – Procedimento n°2

Gas-Cromatografo	
Colonna capillare	TG-5SILMS – (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm)
Flusso gas di trasporto	1 mL/min
Temperatura iniziale colonna	100 °C per 1 min
Rampa 1 temperatura colonna	incremento a 25 °C/min fino a 250 °C, isoterma per 0 min;
Rampa 2 temperatura colonna	incremento a 5 °C/min fino a 320 °C, isoterma per 3 min;
Iniettore PTV	
Modalità iniezione	Large volume
Volume iniettato	5 µL
Liner	Restek Topaz Baffled
Temperatura iniziale iniezione	45 °C per 0.40 min (flusso 50 mL/min)
Rampa riscaldamento iniettore per il trasferimento	14 °C/s fino a 320 °C, splitless time 2,00 min
Pulizia iniettore post trasferimento	320 °C per 10 min (flusso 50 mL/min)
Modalità di ionizzazione	EI
Energia di ionizzazione	35 eV

Tabella 3-8: ioni monitorati in GC-HRMS per la determinazione dei PBDE - Procedimento n°2

Composto	lone di quantificazione (m/z)	lone di conferma (m/z)	standard di quantificazione
BDE-28M	419,8409	4178,4237	13C-PBDE 139
BDE-28	405,80214	407,80014	13C-PBDE 28
BDE-47M	499,7493	497,7514	13C-PBDE 139
BDE-47	485,7111	483,7132	13C-PBDE 47
BDE-100M	575,6619	577,6598	13C-PBDE 139
BDE-100	563,6212	565,6196	13C-PBDE 100
BDE-99M	575,6619	577,6598	13C-PBDE 139
BDE-99	563,6212	565,6196	13C-PBDE 99
BDE-154M	495,7352	493,7372	13C-PBDE 139
BDE-154	483,696	481,698	13C-PBDE 154
BDE-153M	495,7352	493,7372	13C-PBDE 139
BDE-153	483,696	481,698	13C-PBDE 153
SI_BDE-139M (st.interno siringa)	495,7352	493,7372	13C-PBDE 139
BDE 183	563,6042	5616,0544	13C-PBDE 183
BDE 183M	575,6436	573,6457	13C-PBDE 139

La quantificazione avviene mediante diluizione isotopica e la curva di taratura impiegata prevede 6 livelli, da 0,01 ng/0,5 mL a 5 ng/0,5 mL (0,01-0,05-0,1-0,5-1-5 ng/0,5mL)

Per la preparazione delle soluzioni di taratura degli analiti nativi si utilizzano tre soluzioni a varie concentrazioni (10 pg/ μ L, 100 pg/ μ L e 1000 pg/ μ L) come illustrato nella tabella seguente.

Tabella 3-9: volumi e concentrazioni delle soluzioni impiegate per realizzare la taratura.

Livello taratura	1	2	3	4	5	6
Conc. nativi	0,01 ng/0,5 mL	0,05 ng/0,5 mL	0,1 ng/0,5 mL	0,5 ng/0,5 mL	1 ng/0,5 mL	5 ng/0,5 mL
/						
Mix PBDE nativi 10 pg/ μ L	1 μ L	5 μ L	10 μ L	/	/	/
Mix PBDE nativi 100 pg/ μ L	/	/	/	5 μ L	10 μ L	/
Mix PBDE nativi 1000 pg/ μ L	/	/	/	/	/	5 μ L
I.S. Estrazione 0.1 ng/ μ L	10 μ L	10 μ L	10 μ L	10 μ L	10 μ L	10 μ L
I.S. iniezione (BDE-139M) 0.1 ng/ μ L	10 μ L	10 μ L	10 μ L	10 μ L	10 μ L	10 μ L
Isottano	479 μ L	475 μ L	470 μ L	475 μ L	470 μ L	475 μ L
Volume totale	500 μ L	500 μ L	500 μ L	500 μ L	500 μ L	500 μ L

In queste condizioni il limite di quantificazione è di 0,0020 μ g/kg (peso fresco) per ciascun congenere.

3.6.3 Esempio di applicazione metodo EPA 1614A 2010

Il metodo EPA 1614A 2010 è un metodo che descrive in modo dettagliato le diverse fasi analitiche per la determinazione dei PBDE anche in campioni di biota ed è impiegato da alcuni laboratori SNPA. Il metodo prevede l'estrazione in soxhlet di un'aliquota di biota fresco omogeneizzato, addizionato di standard interni di processo e miscelato con sodio solfato anidro. Sull'estratto evaporato viene determinato il contenuto di lipidi. La purificazione prevede una successione di fasi: purificazione su colonna (detta anthropogenic isolation column costituita da gel di silice, silicato di potassio, sodio solfato anidro, gel di silice acida), seguito da cromatografia di gel permeazione (GPC) ed eventualmente SPE su florisil e/o allumina. La determinazione avviene in GC-HRMS con un'energia di ionizzazione compresa tra 28 e 40 eV.

Si riportano di seguito le integrazioni o modifiche adottate da un laboratorio SNPA nell'applicazione del metodo EPA 1614A 2010.

Il Limite di Quantificazione viene calcolato per ciascun campione. Nel caso di batch analitici per cui la concentrazione del bianco analitico sia superiore ad un terzo del Valore Limite applicabile, e nel caso non sia disponibile una quantità sufficiente

di campione per eseguire la ripetizione delle analisi, è possibile decidere se praticare la sottrazione del bianco analitico ai valori misurati per la totalità dei campioni del batch in analisi, previa attenta analisi delle cause.

Il campione non viene estratto umido e miscelato con sodio solfato anidro ma viene liofilizzato. L'estrazione non avviene mediante soxhlet ma si ricorre alla tecnica PFE (Pressurized Fluid Extraction).

La vetreria dopo il lavaggio viene successivamente condizionata con acetone ed esano. Inoltre, la vetreria può essere sottoposta a silanizzazione, trattamento che assicura la rimozione di ogni traccia di inquinante ed elimina i siti attivi presenti. In questo caso ogni ulteriore lavaggio della vetreria prima del suo impiego risulta superfluo.

Nella determinazione dei PBDE in campioni di biota, come matrice di riferimento da impiegare per i campioni di controllo qualità (bianco di procedimento, bianco fortificato) viene impiegato olio di oliva o di pesce per simulare il contenuto lipidico dei campioni.

Riguardo alla problematica, segnalata nel metodo EPA 1614A 2010, relativa alla colorazione grigiastra che il solfato anidro di sodio dovesse assumere dopo riscaldamento in muffola, si stabilisce di approvvigionarsi di un reagente di purezza tale da non risentire del fenomeno citato.

Riguardo ai bianchi fortificati (campioni OPR, Ongoing Precision Recovery), da inserire in ogni batch analitico, si stabilisce di ritenere accettabili solo gli OPR con la totalità dei congeneri nativi rientranti nei limiti definiti dalla tabella 6 del metodo EPA 1614A 2010 (cfr. anche 3.6.1.3); per i congeneri marcati al ^{13}C e per la verifica nel tempo dell'accuratezza entro ± 2 deviazioni standard (punto 15.5.4 del metodo) è ammesso uno scostamento del 10% per un singolo congenere solo se esso riguarda meno di 1/5 dei congeneri.

La colonna GC impiegata è la sola DB-5MS.

Quando ritenuto necessario (ad esempio nel caso vengano estratti in maniera congiunta PCDD/F e PBDE o IPA), prima della purificazione l'estratto PFE viene concentrato a 10 mL e separato in tre aliquote: la prima, denominata SPLIT 50%, di 5mL, destinata alla determinazione di PCDD/F+PCB-DL, la seconda, denominata SPLIT 25%, destinata alla determinazione di altri analiti, una terza aliquota destinata alla conservazione in archivio (conseguentemente nel calcolo dei recuperi degli standard marcati isotopicamente vengono applicati dei fattori correttivi pari a 2 o 4 a seconda dell'aliquota considerata).

La purificazione viene eseguita mediante l'impiego di Power Prep.

La rimozione dei lipidi viene eseguita mediante eluizione dell'estratto su una colonna contenente gel di silice e terra di diatomee mescolata ad acido solforico concentrato (rapporto 20 g:40 g) eluendo con esano.

La verifica della risoluzione (criterio ≥ 10000) viene effettuata prima dell'inizio della sequenza analitica. Poiché lo spettrometro impiegato non è in grado di monitorare la risoluzione durante tutto il corso dell'acquisizione dei dati ma solo ad inizio di ogni finestra MID (multiple ion detection), a valle di ogni sequenza analitica viene effettuata la verifica della risoluzione esaminando le registrazioni dei singoli file contenenti i dati grezzi HRMS. È ammesso uno scostamento in difetto del 10% per le finestre MID intermedie, effettuando una ri-analisi del singolo campione eventualmente interessato da scostamenti superiori al 10%. Vengono di seguito riportate alcune condizioni operative utilizzate per le fasi di estrazione, purificazione, determinazione analitica.

Tabella 3-10: Metodi di estrazione con apparecchiatura ASE:

Matrice	Solvente	Oven temp. (°C)	Pressure (psi)	Static time (min)	Flush volume (%)	Nitrogen purge (sec)	Static cycles (n)
Pesce, carne, tessuti	toluene	135	1500	10	60	300	4
Alimenti con elevato tenore di zuccheri	toluene	125	1500	10	60	300	4
alimenti	DCM/acetone 50:50	125	1500	10	60	300	4
Pulizia celle	toluene	135	1500	5	60	300	2
Alimenti contenenti grasso (silice acida)	esano	100	1500	10	60	300	4

Matrice	Solvente	Oven temp. (°C)	Pressure (psi)	Static time (min)	Flush volume (%)	Nitrogen purge (sec)	Static cycles (n)
Latte, alimenti	esano/acetone 3:2	110	1500	10	60	300	4

Tabella 3-11: Metodi di purificazione con apparecchiatura Power Prep (i PBDE vengono raccolti nella frazione che contiene anche i PCB)

N° STEP	Flusso (mL/min)	Volume erogato (mL)	Operazione
1	10	10	Carica esano
2	10	30	Bagna allumina
3	10	20	Bagna carbone forw
4	10	20	Bagna carbone rev
5	10	100	Bagna e condiziona silice
6	5	12	Carica campione
7	5	80	Eluizione esano
8	10	12	Cambia al 5% DCM in esano
9	10	140	Eluizione PCB al 5% DCM in esano
10	10	12	Cambia al 50% DCM
11	5	140	Eluizione allumina al 50%
12	10	12	Cambia Et Ac/toluene
13	4	4	Eluizione Et Ac/toluene
14	10	12	Cambia esano
15	10	10	Eluisci esano
16	10	12	Cambia toluene
17	5	40	Eluizione diossina con toluene
18	5	2	Purge
19	1	0,01	Spegni valvole

Immagine 3-1: Condizioni operative per la separazione gascromatografica, con iniezione PTV (vaporizzazione a temperatura programmata), su colonna DB-5ms 30m.

Instrument Method: epal614_gc_dx_PTV_ramp

TRACE GC Ultra Method	
Oven Method	
Maximum Temperature (C):	340.0
Prep-Run Timeout (min):	20.00
Equilibration Time (min):	1.00
Enable Cryogenics:	Off
Initial Temperature (C):	100.0
Initial Time (min):	3.00
Number of Ramps:	1
Rate #1 (C/min):	5.0
Final Temperature #1 (C):	320.0
Hold Time #1 (min):	10.00
Post Run Temperature:	Off

Right PTV Method	
Mode:	PTV Splitless
Base Temperature:	On
Base Temperature (C):	80.0
Split Flow:	Off
Split Flow Flow (mL/min):	10.0
Splitless Time (min):	2.00
Solvent Valve Temperature:	Off
Surge Pressure (kPa):	3.00
Surge Duration (min):	0.00
Constant Purge:	Off
Stop Purge For: (min):	1.60
Evaporation Phase:	Off
Cleaning Phase:	On
Ramped Pressure:	On
Sub-ambient:	Off
Backflush:	On
Inject Pressure (kPa):	70.00
Inject Time (min):	0.10
Transfer Pressure (kPa):	210.00
Transfer Rate (C/sec):	10.0
Transfer Temperature (C):	300.0
Transfer Time (min):	1.30
Clean Rate (C/sec):	14.5
Clean Temperature (C):	320.0
Clean Time (min):	10.00
Clean Flow (mL/min):	50.0
Right Carrier Method	
Mode:	Constant Flow
Initial Value:	On
Initial Value (mL/min):	1.00
Initial Time:	1.00
Gas Saver:	On
Gas Saver Flow (mL/min):	20.0
Gas Saver Time:	2.00

Immagine 3-2: esempio di cromatogramma di muscolo di pesce.

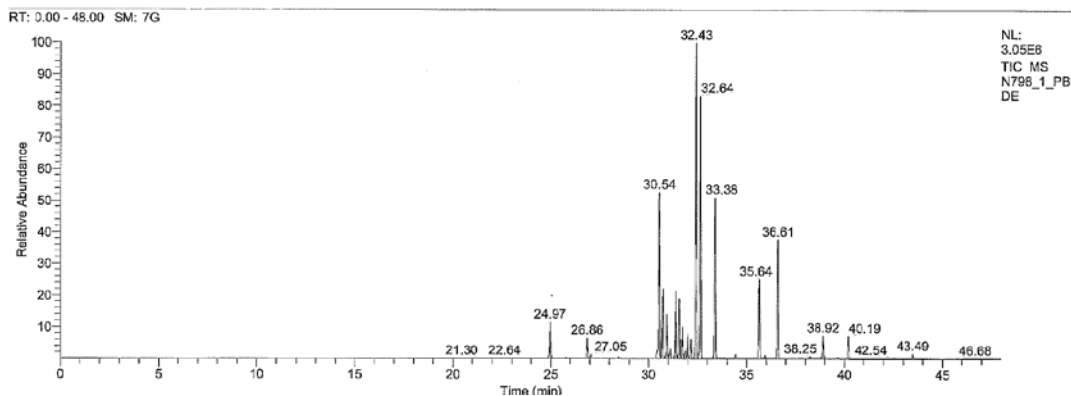


Immagine 3-2: esempio di cromatogramma di olio di pesce

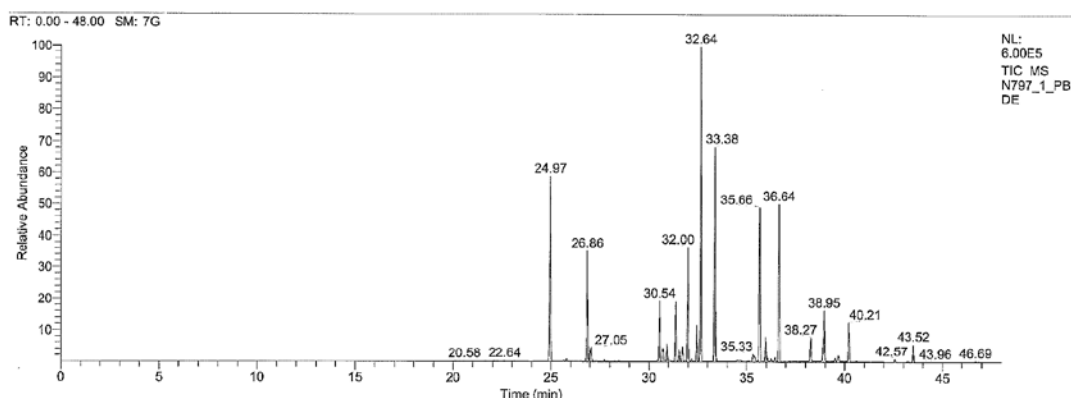


Tabella 3-12: Congeneri determinati tramite GC-HRMS

Analita	Standard $^{13}\text{C}_{12}$
22'4'-TriBDE (17)	
244'-TriBDE (28)	BDE_28 $^{13}\text{C}_{12}$ STD
22'44'-TetraBDE (47)	BDE_47 $^{13}\text{C}_{12}$ STD
23'44'-TetraBDE (66)	
23'4'6'-TetraBDE (71)	
22;44'5'-PentaBDE (99)	BDE_99 $^{13}\text{C}_{12}$ STD
22'44'6'-PentaBDE (100)	BDE_100 $^{13}\text{C}_{12}$ STD
22'344'-PentaBDE (85)	
22'44'56'-EsaBDE (154)	BDE_154 $^{13}\text{C}_{12}$ STD
22'344'5'-EsaBDE (138)	
22'44'55'-EsaBDE (153)	BDE_153 $^{13}\text{C}_{12}$ STD
22'44'5'6'-EptaBDE (183)	BDE_183 $^{13}\text{C}_{12}$ STD
233'44'56'-EptaBDE (190)	

4 DETERMINAZIONE DI DIOSSINE E COMPOSTI DIOSSINA-SIMILI IN CAMPIONI DI BIOTA MEDIANTE GASCROMATOGRAFIA - SPETTROMETRIA DI MASSA AD ALTA RISOLUZIONE

4.1 CAMPO DI APPLICAZIONE

La presente procedura è applicata per la determinazione, nei tessuti di biota, dei composti riportati di seguito (allegato X della direttiva 2000/60/CE), mediante gascromatografia con rivelazione in spettrometria di massa ad alta risoluzione (GC-HRMS).

Tabella 4-1: Elenco degli analiti in esame con n° di registro CAS e SQA nel biota previsto dalla normativa

Diossine e composti diossina-simili	Analita	CAS	SQA Biota (D.Lgs. 172/2015)
7 dibenzo-p-diossine policlorurate (PCDD)	2,3,7,8-T4CDD	1746-01-6	0,0065 µg/kg peso umido, TEQ
	1,2,3,7,8-P5CDD	40321-76-4	
	1,2,3,4,7,8-H6CDD	39227-28-6	
	1,2,3,6,7,8-H6CDD	57653-85-7	
	1,2,3,7,8,9-H6CDD	19408-74-3	
	1,2,3,4,6,7,8-H7CDD	35822-46-9	
	1,2,3,4,6,7,8,9-O8CDD	3268-87-9	
10 dibenzofurani policlorurati (PCDF)	2,3,7,8-T4CDF	51207-31-9	
	1,2,3,7,8-P5CDF	57117-41-6	
	2,3,4,7,8-P5CDF	57117-31-4	
	1,2,3,4,7,8-H6CDF	70648-26-9	
	1,2,3,6,7,8-H6CDF	57117-44-9	
	1,2,3,7,8,9-H6CDF	72918-21-9	
	2,3,4,6,7,8-H6CDF	60851-34-5	
	1,2,3,4,6,7,8-H7CDF	67562-39-4	
	1,2,3,4,7,8,9-H7CDF	55673-89-7	
	1,2,3,4,6,7,8,9-O8CDF	39001-02-0	
12 bifenili policlorurati diossina-simili (PCB-DL)	PCB 77 (3,3',4,4'-T4CB)	32598-13-3	
	PCB 81 (3,3',4',5-T4CB)	70362-50-4	
	PCB 105 (2,3,3',4,4'-P5CB)	32598-14-4	
	PCB 114 (2,3,4,4',5-P5CB)	74472-37-0	
	PCB 118 (2,3',4,4',5-P5CB)	31508-00-6	
	PCB 123 (2,3',4,4',5'-P5CB)	65510-44-3	
	PCB 126 (3,3',4,4',5-P5CB)	57465-28-8	
	PCB 156 (2,3,3',4,4',5-H6CB)	38380-08-4	
	PCB 157 (2,3,3',4,4',5'-H6CB)	69782-90-7	

Diossine e composti diossina-simili	Analita	CAS	SQA Biota (D.Lgs. 172/2015)
	PCB 167 (2,3',4,4',5,5'-H6CB)	52663-72-6	
	PCB 169 (3,3',4,4',5,5'-H6CB)	32774-16-6	
	PCB 189 (2,3,3',4,4',5,5'-H7CB)	39635-31-9	

Lo SQA è espresso in equivalenti di tossicità conformemente ai fattori di tossicità equivalente definiti dall'Organizzazione mondiale della sanità. Lo SQA per il biota si riferisce al pesce, ai crostacei ed ai molluschi (Nota 12 alla tabella 1/A, paragrafo A.2.6 dell'allegato I alla parte terza del D.Lgs. 3 aprile 2006 n. 152, come modificata dal D.Lgs. 172/2015). Il tenore massimo per i crostacei si applica al muscolo delle appendici e dell'addome. Nel caso dei granchi e dei crostacei analoghi (*Brachyura* e *Anomura*), si applica al muscolo delle appendici (punto 5.3 dell'allegato al regolamento n. 1259/2011 della Commissione). Le procedure descritte consentono di determinare i composti sopra elencati nella matrice biota conformemente ai requisiti minimi di prestazione individuati dal D.Lgs. 219/2010 in relazione ai valori di SQA attualmente vigenti (D.Lgs. 172/2015). In caso di modifiche normative dei valori di SQA in diminuzione le prestazioni analitiche delle procedure descritte potrebbero essere ancora sufficienti ma è necessaria la verifica da parte del laboratorio della conformità del metodo ai nuovi requisiti.

4.2 PRINCIPIO DEL METODO

In generale per la determinazione nella matrice biota degli analiti in esame sono impiegabili diverse possibili alternative per le fasi di estrazione, purificazione e determinazione strumentale. A causa dei bassi limiti di quantificazione richiesti è necessario impiegare procedure che consentano un elevato fattore di concentrazione degli analiti, il che richiede di estrarre un'aliquota di campione relativamente grande, concentrando l'estratto a un volume finale relativamente piccolo. Queste esigenze richiedono che il procedimento preveda una purificazione accurata degli estratti. Vengono quindi descritti di seguito quattro procedimenti, che impiegano tecniche di estrazione e purificazione di tipo tradizionale, effettivamente applicati da laboratori del SNPA.

Il procedimento n°1, concepito per l'estrazione congiunta di PBDE e diossine, prevede l'estrazione a fluido pressurizzato del campione liofilizzato, seguita da purificazione mediante purificatore automatico programmabile mediante una combinazione di tipologie di estrazione in fase solida su cartuccia di silice, allumina basica e carbone. La determinazione strumentale prevede l'impiego della gascromatografia con rivelazione mediante spettrometria di massa ad alta risoluzione.

Il procedimento n°2 prevede una estrazione assistita dalle microonde, una parziale purificazione mediante dibattimento con acido solforico concentrato seguito da una serie di diverse opzioni e combinazioni di tecniche di purificazione. La prima alternativa di purificazione prevede una cromatografia di gel permeazione seguita da una SPE (con frazionamento) realizzata o in modo manuale (con doppia colonna silice/allumina) o in modalità automatizzata (con purificatore automatico programmabile) su cartucce di dimensione standard. La seconda alternativa di purificazione prevede direttamente una SPE automatizzata multicolonna impiegando però cartucce di dimensione maggiorata. La determinazione strumentale avviene mediante HRGC/HRMS.

Come terzo esempio di procedimento impiegato da laboratori SNPA per la determinazione di PCDD, PCDF e PCB-DL in campioni di biota viene riportato un insieme di integrazioni e modifiche apportate ai metodi EPA 1613B 1994 e EPA 1668C 2010.

Il quarto esempio di procedimento impiegato da laboratori SNPA per la determinazione di PCDD, PCDF e PCB-DL (e PBDE) prevede l'estrazione del campione liofilizzato mediante Soxhlet automatizzato e una purificazione automatizzata (Lctech modello Dextech) su colonne di silice multistrato e florisil. La determinazione di PCDD/F avviene in GC con rivelazione mediante spettrometria di massa ad alta risoluzione a settore magnetico mentre la determinazione dei PCB-DL (e PBDE) avviene mediante GC con rivelazione mediante spettrometria di massa a triplo quadrupolo.

Per tutti i procedimenti la quantificazione viene effettuata per diluizione isotopica, impiegando standard interni di estrazione (composti analoghi agli analiti ma marcati con carbonio-13) e standard interni di iniezione per la determinazione del recupero degli standard di estrazione. Alcuni procedimenti impiegano inoltre standard di purificazione (anch'essi misurati mediante gli standard interni di iniezione) per controllare la resa della purificazione degli estratti.

Oltre a quelle menzionate sono impiegabili anche altre tecniche o combinazioni di tecniche per le fasi analitiche di estrazione, purificazione e determinazione strumentale. Quelli descritti di seguito sono esempi di procedimenti effettivamente impiegati in laboratori SNPA per la determinazione degli analiti in questione con prestazioni analitiche conformi ai requisiti normativi.

I procedimenti impiegati dai laboratori SNPA che vengono qui presentati si rifanno, in alcuni punti, al metodo EPA 1613B 1994 "Tetra- through Octa-Chlorinated Dioxins and Furans by Isotope Dilution HRGC/HRMS" e al metodo EPA 1668C 2010 "Chlorinated Biphenyl Congeners in Water, Soil, Sediment, Biosolids, and Tissue by HRGC/HRMS che costituiscono un riferimento internazionale valido e dettagliato al quale attingere per approfondimenti e integrazioni alle condizioni operative descritte di seguito.

4.3 INTERFERENZE E CAUSE DI ERRORE

La determinazione di concentrazioni molto basse di diossine e composti diossina simili risente della contaminazione di fondo difficilmente azzerabile anche in un ambiente di laboratorio. In quest'ottica, per la determinazione di questi analiti a concentrazioni molto basse, è necessario adottare diversi accorgimenti analitici. Ove possibile i reagenti dovrebbero essere purificati mediante estrazione o lavaggio con solventi. La vetreria riutilizzabile, dopo lavaggio con detergenti, dovrebbe essere sciacquata con solventi quali metanolo, acetone e, se necessario, diclorometano, sebbene sia preferibile minimizzare per quanto possibile l'impiego di solventi clorurati, limitandolo alle fasi di estrazione e purificazione, laddove non sostituibili. La pulizia in muffola di vetreria impiegata per l'analisi di campioni particolarmente contaminati dovrebbe essere minimizzata per via del rischio di creare siti attivi sulla superficie interna del vetro che potrebbero adsorbire irreversibilmente gli analiti. Per quanto possibile, è raccomandabile tenere separata la vetreria utilizzata per la preparazione dei "bianchi fortificati" al fine di evitare contaminazioni incrociate.

Inoltre, l'affinità di questa classe di analiti per tutti i materiali organici, paraffinici, sia liquidi che cerosi, ampiamente utilizzati nella componentistica dei sistemi automatici di purificazione del campione, in particolare per tubi e valvole, e per la lubrificazione delle pompe, rende elevato il rischio di una contaminazione di fondo, per sporcamento, di queste apparecchiature, che necessitano di pulizia accurata e specifica ad ogni ciclo di funzionamento.

L'utilizzo di reagenti ad elevata purezza e di solventi "grado pesticidi" o superiore, unitamente alla determinazione analitica attraverso separazione cromatografica mediante colonne capillari ad alta risoluzione e rivelazione in spettrometria di massa in alta risoluzione aiutano a minimizzare i problemi di interferenza.

L'impiego della quantificazione mediante diluizione isotopica consente di ottenere risultati intrinsecamente corretti per fattori quali il recupero nel singolo campione, variazioni nella risposta strumentale rispetto alla taratura, progressiva contaminazione del sistema di determinazione strumentale da parte di residui altobollenti coestratti etc. in quanto tali fenomeni influenzeranno il segnale dello standard interno in maniera analoga al segnale dell'analita nativo. Impiegando la tecnica della diluizione isotopica sarà comunque sempre necessario verificare che vengano rispettati alcuni criteri minimi relativi ad area dei picchi e recupero.

Nel caso degli analiti in esame, in considerazione della caratteristica degli atomi di cloro di esistere in due isotopi stabili, un ulteriore criterio di identificazione è costituito dalla valutazione del pattern isotopico generato dalla presenza di più atomi di cloro nella molecola. In particolare, è possibile valutare che il rapporto di abbondanza tra due ioni caratteristici del pattern isotopico dell'analita sia compatibile con il valore definito in fase di taratura.

4.4 PREPARAZIONE DEL CAMPIONE

Salvo diversa indicazione della normativa vigente, la determinazione delle sostanze in questione viene eseguita su pesci, crostacei e molluschi. Per quanto riguarda i pesci, in coerenza con quanto è stato stabilito e ad oggi praticato per il monitoraggio del biota in ottemperanza alla Direttiva Strategia Marina, l'analisi deve essere condotta sul tessuto muscolare di individui adulti, delle taglie commerciali di cui al Regolamento (CE) n. 1967/2006 del Consiglio del 21 dicembre 2006. Nel caso in cui le dimensioni degli esemplari campionati siano inferiori a cm 15, le analisi possono essere effettuate sugli organismi in toto raccolti in pool.

Prima della dissezione devono essere eseguite e registrate le misurazioni biometriche quali lunghezza totale, lunghezza standard (esclusa la pinna caudale), altezza (escluse le pinne), peso degli esemplari e, nel caso di pool, i valori medi con deviazione standard e gli intervalli di variabilità. Una volta eseguite le operazioni necessarie a prelevare la parte di biota da sottoporre ad analisi (a seconda dell'organismo: pulitura, eviscerazione, sfilettatura etc.) il campione risultante viene generalmente omogeneizzato (sebbene sia possibile eseguire l'eventuale liofilizzazione anche sulle parti intere). Ai fini dell'omogeneizzazione il campione viene solitamente dapprima tagliato grossolanamente per essere poi più efficacemente sminuzzato con un macinatore a lame (a bicchiere o a immersione). L'omogeneizzato fresco così ottenuto può essere analizzato o conservato in congelatore tal quale oppure può essere sottoposto a liofilizzazione. La liofilizzazione consente una più agevole conservazione del campione per le successive analisi. Se necessario il campione liofilizzato può essere setacciato, ad esempio su maglia da 2mm, per eliminare parti grossolane non triturate (ad es. lisce o squame) ed eventualmente ulteriormente rimacinato.

Poiché i risultati devono essere espressi rispetto alla massa di campione fresco, nel caso si analizzi il campione liofilizzato, è essenziale determinare il contenuto di acqua del campione in modo da poter ricondurre i risultati al peso umido. È inoltre consigliabile eseguire anche la determinazione del contenuto lipidico che può essere utile nel confronto dei risultati riferiti a specie diverse o a parti diverse del pesce sottoposto ad analisi.

4.5 PROCEDIMENTO ANALITICO

Le procedure e le condizioni operative di dettaglio impiegabili nell'esecuzione delle determinazioni sono da ritenere indicative e non vincolanti. È possibile apportare variazioni più o meno rilevanti alla procedura, ferma restando la responsabilità del laboratorio di verificare in ogni caso l'adeguatezza del metodo allo scopo.

4.5.1 Preparazione delle soluzioni standard

A causa dell'eterogeneità dei formati dei principi attivi disponibili in commercio e delle loro differenti solubilità nei solventi organici non è possibile uniformare le istruzioni per la preparazione delle soluzioni standard madre dei singoli analiti nativi in esame e dei relativi standard interni. Nella scelta delle operazioni devono essere tenute in considerazione la forma fisica del materiale di riferimento (solido puro o soluzione certificata), la purezza, la quantità di sostanza contenuta, la solubilità nei vari solventi degli analiti, le concentrazioni da realizzare nelle soluzioni. Piuttosto che partire dai principi attivi solidi è solitamente più agevole utilizzare, quando disponibili commercialmente, fiale da 1mL di soluzione certificata.

Per gli analiti in questione il periodo di validità delle soluzioni standard preparate in laboratorio è generalmente di almeno un anno se conservate a temperature inferiori a -18 °C. Il periodo di validità della soluzione standard può essere esteso in base ai risultati delle prove di stabilità eseguite in laboratorio.

Per la determinazione di PCDD, PCDF e PCB-DL in diluizione isotopica è necessario disporre di un composto marcato isotopicamente per ogni analita. I procedimenti descritti impiegano composti marcati con ¹³C, analoghi ai composti nativi, per tutti gli analiti ricercati e riportati al paragrafo 4.1.

4.5.2 Campioni di controllo e standard interni

4.5.2.1 Campioni di controllo

A prescindere dalle tecniche di estrazione e purificazione impiegate la procedura impiegata deve prevedere l'impiego di campioni di controllo che siano sottoposti alla stessa intera procedura a cui sono sottoposti i campioni in analisi. Per ogni batch di campioni incogniti sono preparati i seguenti campioni di controllo:

- Uno o più bianchi di procedimento che possono essere
 - un bianco di procedimento costituito dai soli materiali e reattivi impiegati (ad esempio, nel caso dell'estrazione PFE, costituito dalla cella ASE senza campione con la sola terra di diatomee).
 - Un bianco di procedimento costituito da una matrice reale "bianca" esente da contaminazione per gli analiti in esame per analisi pregresse.
- Repliche dei campioni incogniti (non meno di una replica per ogni 10 campioni, preferibilmente una ogni 5 campioni) per valutare la ripetibilità in matrice.
- Uno o più campioni di riferimento che possono essere:
 - un bianco di procedimento fortificato con gli analiti ricercati.
 - una matrice reale "bianca" fortificata con gli analiti ricercati (un campione reale disponibile in buona quantità, già caratterizzato e con scarsissime concentrazioni degli analiti ricercati).
 - una matrice reale dotata di valori assegnati (materiale di riferimento certificato o residuo di proficiency test dotato di valori assegnati per gli analiti di interesse).
 - una matrice reale già caratterizzata dal laboratorio per gli analiti ricercati (un campione reale disponibile in buona quantità, già caratterizzato e contenente concentrazioni degli analiti ricercati ricadenti nell'intervallo di interesse)

La fortificazione dei campioni di riferimento con miscele di analiti viene effettuata in modo da realizzare una concentrazione finale nell'estratto che si collochi non oltre la metà dell'intervallo di taratura strumentale.

4.5.2.2 Fortificazione dei campioni con standard interni di processo

Tutti i campioni, sia quelli incogniti sia quelli di controllo, vengono fortificati prima dell'inizio dell'estrazione con predeterminati volumi delle soluzioni a concentrazioni note di standard interni di estrazione marcati isotopicamente che verranno impiegati per la quantificazione degli analiti.

4.5.3 Estrazione e purificazione

Per la determinazione nella matrice biota degli analiti in esame sono impiegabili diverse possibili alternative per le fasi di estrazione e purificazione ma, a causa dei bassi limiti di quantificazione richiesti è necessario impiegare procedure che consentano un elevato fattore di concentrazione degli analiti e che, conseguentemente, prevedano una purificazione accurata degli estratti.

Alla sezione 4.6 sono riportate le descrizioni delle procedure di estrazione e purificazione impiegate da alcuni laboratori SNPA per la determinazione di PCDD, PCDF e PCB-DL in campioni di biota. Si tratta di procedimenti che impiegano tecniche di estrazione a fluido pressurizzato o assistita da microonde o mediante soxhlet automatizzato; tecniche di purificazione con acido solforico concentrato (liquido o supportato su terra di diatomee o silice) o mediante cromatografia di gel permeazione o mediante SPE multicolonna manuale o automatizzata mediante strumenti programmabili. Si rimanda alla sezione 4.6 per i dettagli dell'esecuzione delle tecniche summenzionate.

4.5.4 Determinazione strumentale

La determinazione strumentale per diossine e composti diossina simili avviene generalmente mediante gascromatografia accoppiata a spettrometria di massa ad alta risoluzione, generalmente a settore magnetico. L'iniezione delle soluzioni a concentrazioni note di analiti e standard interni consente la realizzazione delle tarature relative agli analiti di interesse. I calcoli per la taratura possono essere eseguiti sia manualmente sia attraverso il software in dotazione allo strumento ed in ogni caso deve essere considerato il rapporto tra l'area del picco dell'analita e quella del rispettivo standard interno al variare della concentrazione dell'analita. Verificare che il coefficiente di correlazione lineare (r) sia non meno di 0,95 per ogni composto.

Prima di iniettare gli estratti dei campioni è necessario verificare l'assenza di contaminazione strumentale analizzando dei bianchi strumentali (solventi); è necessario verificare la validità della taratura iniettando uno o più standard (in particolare a bassa e media concentrazione) controllando la coerenza di tempi di ritenzione, aree, rapporti ionici.

Insieme ai campioni incogniti devono essere iniettati e valutati i campioni di controllo (bianchi di procedimento, repliche, campioni di riferimento etc.). La verifica della validità della taratura (sia come risposte che come tempi di ritenzione) deve essere effettuata all'inizio e alla fine della sequenza di analisi strumentale nonché durante la sequenza almeno ogni 20 iniezioni.

4.5.4.1 Criteri di identificazione

Un picco cromatografico è inequivocabilmente identificato come analita, quando soddisfa tutti i seguenti criteri:

- Rapporto segnale/rumore
Tutti gli ioni di ciascun analita e dello standard interno sono presenti con rapporto S/N adeguato (ad es. > 3).
- Tempi di ritenzione (RT)

Il valore di RT è compreso in un intervallo stabilito intorno al valore medio, definito in fase di taratura per l'analita in esame (ad es. tempo stabilito \pm 0.1 min). Se il tempo di ritenzione dell'analita indagato non rientra entro il suddetto intervallo di accettabilità l'analita è considerato non presente. In caso di identificazione positiva procedere al calcolo del rapporto ionico.

Rapporto ionico

Misurare almeno un rapporto di abbondanza ionica tra gli ioni considerati calcolando la deviazione relativa del rapporto ionico ΔR con la formula seguente:

$$\Delta R = \frac{R_{\text{camp}} - R_{\text{st}}}{R_{\text{st}}}$$

dove:

R_{camp} = rapporto ionico dell'analita nella soluzione campione;

R_{st} = media dei rapporti ionici dell'analita negli standard iniettati.

L'identificazione è confermata se il valore di ΔR rientra in un intervallo stabilito (ad es. \pm 30%).

Nel caso di composti policlorurati come gli analiti in esame, che comportano la presenza di pattern isotopici caratteristici dipendenti dal numero di atomi di cloro presenti nella molecola (o nel suo frammento ionico), viene valutata l'abbondanza relativa degli isotopi del cloro (o rapporto isotopico, per analisi in HRMS). Viene valutato il rapporto tra le abbondanze misurate per due ioni (m/z) appartenenti al pattern isotopico dell'analita policlorurato ed il risultato viene confrontato con l'abbondanza relativa, teorica o definita in fase di taratura e dipendente dal numero di atomi di cloro presenti, che deve ricadere entro limiti prestabiliti.

I risultati relativi ad eventuali analiti caratterizzati da un rapporto S/N adeguato per entrambi i segnali ionici considerati e che soddisfino tutti i criteri di identificazione sopra descritti, ad eccezione del criterio del rapporto ionico, sono espressi come "Non determinabile: segnale interferito".

4.5.5 Calcoli

La quantificazione degli analiti in GC/MS viene eseguita sulla base del rapporto di intensità tra l'area dell'analita e quella del rispettivo standard interno aggiunto in quantità nota. Le soluzioni di taratura, caratterizzate da concentrazioni variabili degli analiti da quantificare, impiegano tutte la medesima concentrazione per gli standard interni.

Nei procedimenti descritti la quantificazione viene effettuata mediante standard interni detti di estrazione o di processo utilizzando il principio della diluizione isotopica (gli standard interni sono molecole del tutto analoghe a quelle "native" ma "marcate" isotopicamente in quanto alcuni atomi sono sostituiti da isotopi stabili). Gli standard interni di estrazione o di processo, aggiunti a monte del procedimento di estrazione e purificazione, permettono la quantificazione degli analiti nativi, correggendo sia eventuali variazioni della risposta strumentale sia per il recupero analitico nel singolo campione in esame. La quantificazione per diluizione isotopica richiede l'impiego anche di standard interni di iniezione o di siringa che, aggiunti a valle

del procedimento di estrazione e purificazione, permettono di misurare e verificare il recupero degli standard interni di processo.

4.5.5.1 Determinazione dei fattori di risposta relativi

Per ogni i-esimo analita viene calcolato, per ogni livello della taratura, il rapporto di risposta relativo (RF_i) dell'analita i-esimo rispetto al relativo standard interno, in accordo con la formula di seguito riportata:

$$RF_i = \frac{A_i \times m_{std\ int}}{A_{std\ int} \times m_i}$$

dove:

A_i = area dello ione dell'analita i-esimo di interesse;

A_{std int} = area dello ione dell'appropriato standard interno;

m_i = massa di analita iniettato;

m_{std int} = massa di appropriato standard interno iniettato;

Gli RF_i sono fattori adimensionali, pertanto le unità di misura usate per esprimere m_i e m_{std int} devono essere le stesse.

Linearità del rapporto di risposta relativo

Calcolare il valore medio dei fattori di risposta (\overline{RF}_i) e la deviazione standard relativa percentuale (RSD_i) per i valori dei fattori di risposta ottenuti per ogni soluzione di taratura per ogni analita:

$$RSD (\%) = \frac{\text{deviazione standard}}{\overline{RF}_i} \times 100$$

Il valore di RSD dei fattori di risposta delle soluzioni di taratura per ciascun analita non deve superare il 20%.

4.5.5.2 Verifica della taratura

Consiste nella verifica dei valori dei fattori di risposta RF da utilizzare per la quantificazione, attraverso l'analisi di una soluzione di taratura intermedia. La verifica della taratura è necessaria all'inizio ed alla fine di ogni serie di campioni e comunque da ripetere ogni 10 campioni incogniti analizzati.

La verifica ha esito positivo se i valori dei fattori di risposta ottenuti per ogni analita in una soluzione intermedia, sono compresi entro un intervallo stabilito (ad es. ± 30%) dei valori medi di RF stabiliti durante la taratura iniziale per tutti gli analiti delle soluzioni standard di taratura. La verifica viene effettuata utilizzando la seguente formula:

$$\Delta (\%) = \frac{(RF_{soluz\ interm} - \overline{RF})}{\overline{RF}} \times 100$$

dove:

\overline{RF} = fattore di risposta relativo medio stabilito durante la taratura iniziale;

RF_{soluz interm} = fattore di risposta relativo stabilito durante la verifica di taratura con una soluzione di taratura intermedia rispetto all'intervallo di taratura.

Se vengono rispettati i criteri sopra esposti, il valore del fattore di risposta di un dato analita è considerato indipendente dalla concentrazione nell'intervallo di concentrazioni di taratura utilizzato e il valore medio \overline{RF} può essere usato per tutti i calcoli. In caso contrario, si dovranno calcolare nuovi valori medi dei fattori di risposta con una nuova serie di iniezioni delle soluzioni di taratura.

4.5.5.3 Calcolo della concentrazione degli analiti

La concentrazione degli analiti viene determinata sulla base degli standard interni di processo aggiunti all'inizio del procedimento analitico, usando la formula seguente:

$$C_i (\text{ng/g}) = \frac{A_i \times m_{std\ proc}}{A_{std\ proc} \times \overline{RF}_i \times m_{camp}}$$

dove:

C_i(ng/g) = concentrazione in ng/g dell'analita i-esimo nel campione;

A_i = area del segnale ionico dell'analita i-esimo nell'estratto iniettato;

A_{std proc} = area del segnale ionico dell'appropriato standard interno di processo nell'estratto iniettato;

m_{camp} = quantità di campione sottoposta ad estrazione, espressa in grammi;

m_{std proc} = massa, in ng, di appropriato standard interno di processo aggiunto al campione all'inizio dell'analisi;

\overline{RF}_i = fattore di risposta relativo medio dell'analita i-esimo rispetto all'appropriato standard interno.

La verifica del recupero degli standard di processo prevede la loro quantificazione mediante standard interni di iniezione aggiunti all'estratto del campione a valle del procedimento di estrazione e purificazione. Calcolare la massa del singolo i-esimo standard di processo nell'estratto iniettato usando la formula seguente:

$$m_i = \frac{A_i \times m_{std\ inj}}{A_{std\ inj} \times \overline{RF}_i}$$

dove:

m_i = massa in ng dello standard di processo i-esimo contenuta nell'estratto del campione cui è stata aggiunta la massa $m_{std\ inj}$ di standard di iniezione

A_i = area del segnale ionico dello standard di processo i-esimo nell'estratto del campione;

$A_{std\ inj}$ = area del segnale ionico dell'appropriato standard interno di iniezione nell'estratto del campione;

$m_{std\ inj}$ = massa, in ng, di appropriato standard interno di iniezione aggiunto all'estratto finale a valle di estrazione e purificazione;

\overline{RF}_i = rapporto di risposta relativo medio dello standard di processo i-esimo rispetto all'appropriato standard interno di iniezione.

Nel caso che l'estratto finale al quale sono stati aggiunti gli standard interni di iniezione e che è stato effettivamente analizzato in GC/MS sia rappresentativo solo di una parte dell'estratto del campione (e quindi la massa m_i , come sopra calcolata, sia rappresentativa solo di una parte dell'estratto del campione), sarà necessario effettuare una moltiplicazione per risalire alla massa totale dello standard di processo i-esimo aggiunto inizialmente al campione.

Nel caso in cui la quantificazione venga eseguita non su un singolo ione caratteristico ma sulla somma delle aree di due ioni caratteristici (primario e secondario), le aree delle formule precedenti, sia per gli analiti che per gli standard interni, devono essere intese come somme di aree.

Poiché di solito il software di quantificazione del dato di massa esegue automaticamente i calcoli relativi alla taratura e alla quantificazione, esso fornisce direttamente, come risultato, la concentrazione relativa ad ogni analita nel volume dell'estratto o sulla massa del campione. Può allora essere più semplice lavorare non con i fattori di risposta relativi e le aree ma con i risultati, in ng per mL di estratto o in ng per g di campione, forniti direttamente dal software.

4.5.5.4 Calcolo del recupero

Calcolare la percentuale di recupero dello standard interno di processo nel campione in esame con la seguente formula:

$$R_{std\ proc.}(\%) = \frac{m_{misurata}}{m_{aggiunta}} \times 100$$

dove:

$R_{std\ proc.}(\%)$ = percentuale di recupero dello standard interno di processo;

$m_{misurata}$ = massa, in ng, dello standard di processo nell'estratto del campione in esame, determinato mediante standard interno di iniezione;

$m_{aggiunta}$ = massa, in ng, dello standard di processo aggiunta all'inizio dell'analisi.

In ogni campione deve essere verificato che il recupero medio dello standard di processo rientri in un intervallo di accettabilità (ad es. 60-140%). Nel caso in cui lo standard di processo per un dato analita fornisca un recupero maggiore dell'estremo superiore dell'intervallo di accettabilità ma i campioni in esame non rivelino presenza per l'analita stesso non è necessario rianalizzare i campioni in esame. Nel caso in cui si ottenga un recupero inferiore all'estremo inferiore dell'intervallo di accettabilità è necessario procedere alla ripetizione dell'analisi del campione in esame.

4.5.5.5 Valutazione del bianco di procedimento

I risultati forniti dal bianco di procedimento sono valutati attraverso gli stessi criteri adottati per i campioni in esame. In caso di positività di uno o più analiti si deve effettuare nuovamente l'analisi di tutti quei campioni che presentino una positività per tali analiti superiore al limite di quantificazione.

4.6 PROCEDIMENTI LABORATORI SNPA

In questa sezione vengono riportate descrizioni e dettagli operativi di procedure analitiche effettivamente utilizzate da laboratori SNPA per la determinazione degli analiti in oggetto in campioni di biota in conformità ai requisiti di prestazioni analitiche stabiliti dalla normativa attualmente vigente.

Il primo procedimento, concepito per l'estrazione congiunta di PBDE e diossine, prevede l'estrazione a fluido pressurizzato del campione liofilizzato, seguita da purificazione mediante purificatore automatico programmabile mediante una combinazione di tipologie di estrazione in fase solida su cartuccia di silice, allumina basica e carbone. La determinazione strumentale prevede l'impiego della gascromatografia con rivelazione mediante spettrometria di massa ad alta risoluzione.

Il secondo procedimento prevede estrazione del campione liofilizzato mediante estrazione assistita dalle microonde seguita da purificazione con sistema automatico Power Prep mediante una combinazione di tipologie di estrazione in fase solida su

cartucce di silice, allumina basica e carbone. La determinazione strumentale prevede l'impiego della gascromatografia accoppiata a spettrometria di massa ad alta risoluzione.

Come terzo esempio di procedimento impiegato da laboratori SNPA per la determinazione di PCDD, PCDF e PCB-DL in campioni di biota viene riportato un insieme di integrazioni e modifiche apportate ai metodi EPA 1613B 1994 e EPA 1668C 2010.

Il quarto esempio di procedimento impiegato da laboratori SNPA per la determinazione di PCDD, PCDF e PCB-DL (e PBDE) prevede l'estrazione del campione liofilizzato mediante Soxhlet automatizzato e una purificazione automatizzata (Lctech modello Dextech) su colonne di silice multistrato e florisil. La determinazione di PCDD/F avviene in GC con rivelazione mediante spettrometria di massa ad alta risoluzione a settore magnetico mentre la determinazione dei PCB-DL (e PBDE) avviene mediante GC con rivelazione mediante spettrometria di massa a triplo quadrupolo.

4.6.1 Procedimento n° 1 (PFE, SPE automatizzata, GC-HRMS o GC-MS/MS)

Nella procedura di seguito descritta, dopo l'estrazione a fluido pressurizzato del campione di biota, si impiega un sistema tipo Power Prep per eseguire, in serie e in maniera automatizzata, purificazioni SPE su silice, allumina basica e carbone.

4.6.1.1 Estrazione e purificazione - Procedimento n° 1

Il campione di biota liofilizzato ed omogeneizzato mediante mulino a lame viene sottoposto ad estrazione a fluido pressurizzato. Tre grammi di campione liofilizzato vengono trasferiti in cella di estrazione ASE. Viene quindi effettuata la fortifica del campione con miscela di standard interni marcati isotopicamente (7 PCB non DL marcati isotopicamente con ^{13}C : 7 congeneri non dioxin like "marker" 28, 52, 101, 118, 138, 153, 180; 12 PCB-DL marcati isotopicamente con ^{13}C : congeneri 81, 77, 123, 118, 114, 105, 126, 167, 156, 157, 169, 189; 7 PCDD marcati isotopicamente con ^{13}C ; 10 PCDF marcati isotopicamente con ^{13}C). Si procede in maniera analoga per tutti i campioni in analisi, le loro repliche e i campioni per il controllo di qualità.

Si trasferiscono le celle così preparate nell'autocampionatore dell'estrattore e si avvia il procedimento di estrazione automatizzata impostando un metodo che impiega una miscela di estrazione costituita da esano-diclorometano 1:1 v:v.

Al termine della sequenza potranno essere prelevati dal carosello inferiore i vial di raccolta contenenti l'estratto già filtrato. Nel caso le lavorazioni sugli estratti non possano essere condotte in giornata è possibile conservare i vial in congelatore, preferibilmente dopo aver sostituito i tappi dotati di setto con dei tappi integri.

Il procedimento n°1 prevede l'impiego di un sistema tipo Power Prep per eseguire, in serie e in maniera automatizzata delle procedure di purificazione in fase solida (SPE) su silice, allumina basica e carbone grafitizzato

L'estratto proveniente dall'estrazione PFE deve essere preliminarmente disidratato mediante sodio solfato anidro e quindi concentrato a piccolo volume.

Le colonne impiegate per la purificazione SPE mediante Power Prep sono le seguenti:

- colonna di silice tipo Jumbo (SNAP Extra High Capacity Silica ABN – codice produttore FMSNDXLD SABNTFC)
- allumina basica (SNAP Basic Alumina (11 g) Column - codice produttore FMSNCLBAS011)
- carbone (SNAP Carbon/Celite Column codice produttore FMSNCACCE34-034)

Il programma di eluizione power prep delle tre colonne prevede:

-condizionamento colonna di silice con 100 mL n-esano, flusso 10 mL/min

-caricamento campione con 10 mL n-esano, flusso 5 mL/min

-lavaggio con 220 mL n-esano, flusso 10 mL/min

-eluizione e raccolta PCB(+PBDE) dalla colonna di silice con 40 mL esano/diclorometano 85/15, flusso 10 mL/min

-eluizione colonna allumina con 50 mL di n-esano, flusso 10 mL/min

-eluizione e raccolta PCDD/F colonna carbone con 40 mL toluene, flusso 5 mL/min.

L'estratto PCB (contenente anche i PBDE) viene concentrato delicatamente a secchezza e quindi ripreso con 100 μL di std siringa BDE 138 marcato con $^{13}\text{C}_{12}$ + 50 μL di std di siringa miscela di PCB 70, 111 e 170 marcati con $^{13}\text{C}_{12}$.

L'estratto PCDD/F viene concentrato delicatamente a secchezza e quindi ripreso con 100 μL di std siringa contenenti $^{13}\text{C}_{12}$ - 1,2,3,4-TCDD and $^{13}\text{C}_{12}$ -1,2,3,7,8,9-HxCDD a 100 ng/mL in nonano (EPA 1613B 1994).

L'intero procedimento viene effettuato anche sui campioni di controllo.

4.6.1.2 Analisi GC-HRMS - Procedimento n° 1

Vengono di seguito presentati degli esempi di condizioni operative di analisi strumentale in gascromatografia accoppiata ad un rivelatore a spettrometria di massa ad alta risoluzione.

Tabella 4-2: condizioni operative GC-HRMS – Procedimento n°1

Gas-Cromatografo	
Colonna capillare	DB-5MS- 60 m x 0,25 mm x 0,25 µm
Temperatura iniziale colonna	120 °C
Tempo isoterma iniziale	1 min
Programma temperatura colonna	incremento fino a 220 °C a 10 °C/min, isoterma per 1 min;
	incremento fino a 235 °C a 3 °C/min, isoterma per 7 min;
	incremento fino a 310 °C a 4.7 °C/min, isoterma per 10 min;

Le masse esatte monitorate nell'analisi strumentale per PCDD/F sono quelle riportate in tabella 8 del metodo EPA 1613B 1994. Le tipologie di ioni che vengono monitorati, per analiti nativi e standard interni, sono corrispondenti, in funzione del grado di clorosostituzione della molecola, allo ione molecolare in cui tutti gli atomi di cloro sono ^{35}Cl ($m/z=M$) e ai relativi picchi isotopici in cui uno o due atomi di cloro sono ^{37}Cl ($m/z=M+2$ e $m/z=M+4$). L'acquisizione impiega come lock masses quelle del perfluorokerosene (PFK).

Le masse esatte monitorate nell'analisi strumentale per PCB-DL sono quelle riportate in tabella 7 del metodo EPA 1668C 2010. Vengono determinati i 12 congeneri dioxin like e i 7 congeneri marker CB 28, 52, 101, 118, 138, 153, 180. Le tipologie di ioni che vengono monitorati, per analiti nativi e standard interni, sono corrispondenti, in funzione del grado di clorosostituzione della molecola, allo ione molecolare in cui tutti gli atomi di cloro sono ^{35}Cl ($m/z=M$) e ai relativi picchi isotopici in cui uno, due o tre atomi di cloro sono ^{37}Cl ($m/z=M+2$, $m/z=M+4$ e $m/z=M+6$). L'acquisizione impiega come lock masses quelle del perfluorokerosene (PFK).

La taratura per PCDD/F viene realizzata come da tabella 4 del metodo EPA 1613B 1994 preparando 5 soluzioni alle concentrazioni descritte nella tabella seguente.

Tabella 4-3: concentrazioni taratura PCDD/F – Procedimento n°1

sostanza	Concentrazione (ng/mL)				
	liv. 1	liv. 2	liv. 3	liv. 4	liv. 5
<i>nativi</i>					
2,3,7,8-TCDD	0,5	2	10	40	200
2,3,7,8-TCDF	0,5	2	10	40	200
1,2,3,7,8-PeCDD	25	10	50	200	1000
1,2,3,7,8-PeCDF	25	10	50	200	1000
2,3,4,7,8-PeCDF	25	10	50	200	1000
1,2,3,4,7,8-HxCDD	25	10	50	200	1000
1,2,3,6,7,8-HxCDD	25	10	50	200	1000
1,2,3,7,8,9-HxCDD	25	10	50	200	1000
1,2,3,4,7,8-HxCDF	25	10	50	200	1000
1,2,3,6,7,8-HxCDF	25	10	50	200	1000
1,2,3,7,8,9-HxCDF	25	10	50	200	1000
2,3,4,6,7,8-HxCDF	25	10	50	200	1000
1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	25	10	50	200	1000
1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	25	10	50	200	1000
1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	25	10	50	200	1000
OCDD	50	20	100	400	2000
OCDF	50	20	100	400	2000
<i>standard di estrazione</i>					
$^{13}\text{C}_{12}$ -2,3,7,8-TCDD	100	100	100	100	100
$^{13}\text{C}_{12}$ -2,3,7,8-TCDF	100	100	100	100	100

sostanza	Concentrazione (ng/mL)				
	liv. 1	liv. 2	liv. 3	liv. 4	liv. 5
¹³ C ₁₂ -1,2,3,7,8-PeCDD	100	100	100	100	100
¹³ C ₁₂ -PeCDF	100	100	100	100	100
¹³ C ₁₂ -2,3,4,7,8-PeCDF	100	100	100	100	100
¹³ C ₁₂ -1,2,3,4,7,8-HxCDD	100	100	100	100	100
¹³ C ₁₂ -1,2,3,6,7,8-HxCDD	100	100	100	100	100
¹³ C ₁₂ -1,2,3,4,7,8-HxCDF	100	100	100	100	100
¹³ C ₁₂ -1,2,3,6,7,8-HxCDF	100	100	100	100	100
¹³ C ₁₂ -1,2,3,7,8,9-HxCDF	100	100	100	100	100
¹³ C ₁₂ -1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	100	100	100	100	100
¹³ C ₁₂ -1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	100	100	100	100	100
¹³ C ₁₂ -1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	100	100	100	100	100
¹³ C ₁₂ -OCDD	200	200	200	200	200
<i>Standard Purificazione</i>					
³⁷ Cl ₄ -2,3,7,8-TCDD	05	2	10	40	200
<i>Standard Interni di Iniezione</i>					
¹³ C ₁₂ -1,2,3,4-TCDD	100	100	100	100	100
¹³ C ₁₂ -1,2,3,7,8,9-HxCDD	100	100	100	100	100

La taratura per PCB-DL viene realizzata come da tabella 5 del metodo EPA 1668C 2010 preparando 6 soluzioni alle concentrazioni descritte nella tabella seguente.

Tabella 4-4: concentrazioni taratura PCB-DL – Procedimento n°1

nome congenere	Congenere n°	Concentrazione (ng/mL)					
		CS-0.2	CS-1	CS-2	CS-3	CS-4	CS-5
nativi							
3,3',4,4'-TeCB	77	0,20	1,0	5,0	50	400	2000
3,4,4',5'-TeCB	81	0,20	1,0	5,0	50	400	2000
2,3,3',4,4'-PeCB	105	0,20	1,0	5,0	50	400	2000
2,3,4,4',5'-PeCB	114	0,20	1,0	5,0	50	400	2000
2,3',4,4',5'-PeCB	118	0,20	1,0	5,0	50	400	2000
2',3,4,4',5'-PeCB	123	0,20	1,0	5,0	50	400	2000
3,3',4,4',5'-PeCB	126	0,20	1,0	5,0	50	400	2000
2,3,3',4,4',5'-HxCB	156	0,20	1,0	5,0	50	400	2000
2,3,3',4,4',5'-HxCB	157	0,20	1,0	5,0	50	400	2000
2,3',4,4',5,5'-HxCB	167	0,20	1,0	5,0	50	400	2000
3,3',4,4',5,5'-HxCB	169	0,20	1,0	5,0	50	400	2000
2,3,3',4,4',5,5'-HpCB	189	0,20	1,0	5,0	50	400	2000
standard di estrazione							
¹³ C ₁₂ -3,3',4,4'-TeCB	77L	100	100	100	100	100	100
¹³ C ₁₂ -3,4,4',5'-TeCB	81L	100	100	100	100	100	100
¹³ C ₁₂ -2,3,3',4,4'-PeCB	105L	100	100	100	100	100	100
¹³ C ₁₂ -2,3,4,4',5'-PeCB	114L	100	100	100	100	100	100
¹³ C ₁₂ -2,3',4,4',5'-PeCB	118L	100	100	100	100	100	100
¹³ C ₁₂ -2',3,4,4',5'-PeCB	123L	100	100	100	100	100	100
¹³ C ₁₂ -3,3',4,4',5'-PeCB	126L	100	100	100	100	100	100
¹³ C ₁₂ -2,3,3',4,4',5'-HxCB	156L	100	100	100	100	100	100
¹³ C ₁₂ -2,3,3',4,4',5'-HxCB	157L	100	100	100	100	100	100
¹³ C ₁₂ -2,3',4,4',5,5'-HxCB	167L	100	100	100	100	100	100
¹³ C ₁₂ -3,3',4,4',5,5'-HxCB	169L	100	100	100	100	100	100
¹³ C ₁₂ -2,3,3',4,4',5,5'-HpCB	189L	100	100	100	100	100	100
standard di purificazione							
¹³ C ₁₂ -2,4,4'-TrCB	28L	100	100	100	100	100	100
¹³ C ₁₂ -2,3,3',5,5'-PeCB	111L	100	100	100	100	100	100
¹³ C ₁₂ -2,2',3,3',5,5',6'-HpCB	178L	100	100	100	100	100	100
standard interni di iniezione							
¹³ C ₁₂ -2,5-DiCB	9L	100	100	100	100	100	100
¹³ C ₁₂ -2,2',5,5'-TeCB	52L	100	100	100	100	100	100
¹³ C ₁₂ -2,2',4',5,5'-PeCB	101L	100	100	100	100	100	100
¹³ C ₁₂ -2,2',3',4,4',5'-HxCB	138L	100	100	100	100	100	100
¹³ C ₁₂ -2,2',3,3',4,4',5,5'-OcCB	194L	100	100	100	100	100	100

Ai fini del controllo di qualità i criteri di accettazione del recupero analitico, della verifica della taratura, sono quelli riportati in tabella 6 del metodo EPA 1668C 2010. In particolare, il recupero, nei campioni incogniti, degli standard interni marcati di estrazione dev'essere compreso tra il 15% e il 145%; nei bianchi di procedimento fortificati il recupero degli standard interni marcati di estrazione deve essere compreso tra il 40% ed il 145% mentre quello degli analiti nativi aggiunti deve essere compreso tra il 60% e il 135%.

In queste condizioni il limite di quantificazione per PCDD e PCDF è di 0,0003 µg/kg (peso secco) per ciascun congenere. Il limite di quantificazione per PCB-DL e PCB-nDL è di 0,01 µg/kg (peso secco) per ciascun congenere.

Il limite di quantificazione espresso in tossicità equivalente per la sommatoria di PCB-DL è di 0,0008 µg/kg (peso secco) espressa con il criterio medium bound e di 0,0015 µg/kg (peso secco) espressa con il criterio upper bound.

Il limite di quantificazione espresso in tossicità equivalente per la sommatoria di PCDD/F è di 0,0005 µg/kg (peso secco) espressa con il criterio medium bound e di 0,0010 µg/kg (peso secco) espressa con il criterio upper bound.

Il limite di quantificazione espresso in tossicità equivalente per la sommatoria di PCDD/F+PCB-DL è di 0,0013 µg/kg (peso secco) espressa con il criterio medium bound e di 0,0025 µg/kg (peso secco) espressa con il criterio upper bound.

4.6.2 Procedimento n° 2 (MAE, SPE automatizzata, GC-HRMS)

Il procedimento n°2 prevede una estrazione assistita dalle microonde, una parziale purificazione mediante dibattimento con acido solforico concentrato seguito da una serie di diverse opzioni e combinazioni di tecniche di purificazione. La prima alternativa di purificazione prevede una cromatografia di gel permeazione seguita da una SPE (con frazionamento) realizzata o in modo manuale (con doppia colonna silice/allumina) o in modalità automatizzata (con Power Prep) su cartucce di dimensione standard. La seconda alternativa di purificazione prevede direttamente una SPE automatizzata multicolumna impiegando però cartucce di dimensione maggiorata. La determinazione strumentale avviene mediante HRGC/HRMS.

4.6.2.1 Estrazione e purificazione - Procedimento n° 2

Il campione di biota liofilizzato ed omogeneizzato mediante mulino a lame viene sottoposto ad estrazione assistita da microonde. Un'aliquota di campione liofilizzato corrispondente a 5 grammi di biota fresco viene pesata in una vial in vetro da 100 mL monouso per estrattore a microonde marca Milestone modello Ethos X. Viene quindi effettuata la fortifica del campione con miscela di standard interni marcati isotopicamente (20 µL di miscela di diossine e furani isotopicamente marcati a 0,1 µg/mL in nonano, tranne l'octaclorodibenzo-p-diossina marcata a 0,2 µg/mL). Si aggiungono 20 mL di toluene e si procede all'estrazione in microonde. Il programma di estrazione utilizzato ha una durata di 40 min, e prevede una rampa dalla T iniziale a 120 °C in 10 min, per poi mantenere tale temperatura per 30 min (in agitazione). In queste condizioni è possibile estrarre anche i PBDE dal biota e le analisi possono essere associate. L'estratto viene lasciato raffreddare e recuperato, effettuando due lavaggi con 5 mL di toluene.

Gli estratti riuniti vengono concentrati, a 40 °C sotto flusso di azoto oppure con un evaporatore rotante, fino a raggiungere un volume di pochi microlitri, e ripresi con 10 mL di esano. Si procede in maniera analoga per tutti i campioni in analisi, le loro repliche e i campioni per il controllo di qualità.

Prima della fase di purificazione si aggiungono all'estratto 50 µL di 2,3,7,8-³⁷Cl₄ alla concentrazione di 0,8 ng/µL.

La purificazione prevede una preliminare purificazione mediante dibattimento con acido solforico. All'estratto di 10 mL si aggiungono 4 mL di H₂SO₄ concentrato al 96% e si pone in agitazione su un agitatore rotante a circa 10 giri/min per 20 min. Si centrifuga a 3500 rpm per 3 min e si recupera la fase organica. Si aggiungono poi 5 mL di esano nella vial con l'acido, si agita a mano per 1 min, si centrifuga per 1 min e si riuniscono le fasi organiche. Si concentra l'estratto così riunito fino a circa 1 mL sotto flusso di azoto a 40 °C.

Dopo il dibattimento con acido solforico la purificazione dell'estratto può seguire alternative diverse.

La prima alternativa di purificazione prevede l'esecuzione di una cromatografia di gel permeazione seguita da una purificazione SPE, con frazionamento, realizzata o in modo manuale (con doppia colonna silice/allumina) o in modalità automatizzata (con Power Prep).

La seconda alternativa di purificazione prevede, dopo il dibattimento con acido solforico, una purificazione SPE automatizzata con Power prep ma eseguita con colonne di silice XL di elevata capacità.

Si riportano di seguito le condizioni operative delle varie fasi di purificazione menzionate.

Cromatografia di gel permeazione. L'estratto proveniente dal dibattimento con acido solforico viene concentrato e portato quasi a secchezza, quindi ricostituito con 1 mL di fase mobile GPC, cicloesano-diclorometano 85:15. La colonna GPC impiegata ha diametro interno 2,5 cm ed il flusso di eluente è 5 mL/min. L'estratto viene sottoposto a filtrazione su membrana in PTFE da 0,45 µm e caricato nel loop di iniezione da 5 mL. La frazione fino a 18 minuti viene scartata, la frazione da 18 a 50 minuti viene raccolta in un pallone da 250 mL. Tale frazione viene concentrata al rotavapor e trasferita, con esano, in una vial da 40 mL. Il campione viene concentrato, sotto flusso di azoto a 40 °C, fino al volume di 1 mL.

Purificazione SPE manuale. Sull'estratto purificato tramite GPC si esegue una purificazione manuale a doppia colonna silice + allumina. La silice viene attivata in stufa a 130 °C per una notte e conservata in essiccatore fino al momento dell'utilizzo. L'allumina basica utilizzata è attivata in muffola a 450 °C per una notte, poi anch'essa viene mantenuta in stufa a 130 °C per una notte e conservata in essiccatore fino al momento dell'utilizzo.

Vengono utilizzate colonne in vetro da 300 mm di lunghezza e 10 mm di diametro.

La colonna di silice viene preparata ponendo un batuffolo di cotone sul fondo di una colonna cromatografica di vetro e impaccando, dal fondo della colonna alla cima, con 1 cm di sodio solfato anidro, 2 g di gel di silice e un ulteriore strato di 1 cm di sodio solfato anidro.

La colonna di allumina basica viene preparata ponendo un batuffolo di cotone sul fondo di una colonna cromatografica di vetro e impaccando, dal fondo della colonna alla cima, con 1 cm di sodio solfato anidro, 4 g di allumina basica e un ulteriore strato di 1 cm di sodio solfato anidro.

Entrambe le colonne vengono condizionate con 2 x 10 mL di diclorometano e 2 x 10 mL di esano. La colonna di gel di silice viene posizionata sopra a quella di allumina, si pone un pallone di raccolta e si carica il campione in testa alla colonna di silice. Si eluisce con 20 mL di esano raccogliendo nel pallone posto in uscita della colonna di allumina. Si rimuove quindi la colonna di silice e si eluisce la colonna di allumina con ulteriori 20 mL di esano, seguiti da 10 mL di esano/diclorometano 99/1. Il pallone di raccolta (che costituisce la frazione contenente i PCB) viene rimosso e al suo posto viene posizionata una vial da 40 mL. Si eluisce quindi la colonna di allumina con 25 mL di esano/diclorometano 1:1 raccogliendo nel vial. Questa frazione contiene PCDD/PCDF e parte dei PCB-diossina simili.

L'eluato contenente le diossine viene concentrato sotto flusso di azoto a 40 °C, fino al volume di circa 200 µL.

L'eluato nel pallone che contiene i PCB viene concentrato usando un evaporatore rotante, previa aggiunta di 3 mL di isottano (per evitare di andare a secco). Il contenuto del pallone viene trasferito in una vial pulita, lavandolo con altro esano fresco e raccogliendo tutti i lavaggi. Infine, l'estratto purificato finale viene concentrato sotto debole flusso di azoto fino a circa 200 µL. La frazione contenente PCDD/F viene ulteriormente concentrata poco prima della determinazione strumentale: l'estratto viene portato a secco e subito ripreso con 90 µL di isottano e 10 µL di miscela di standard interni di iniezione (¹³C₁₂-1,2,3,4-TCDD e ¹³C₁₂-1,2,3,7,8,9-HxCDD, a 200 ng/mL in nonano). L'estratto viene trasferito in vial da autocampionatore GC con inserto da 300 µL e analizzato.

Dopo l'analisi per PCDD/F tale frazione verrà riunita alla frazione per la determinazione dei PCB-DL e portata al volume finale di 1 mL, quindi l'estratto riunito viene sottoposto a nuova analisi HRGC/HRMS. A tal fine la frazione concentrata dei PCB-DL (200 µL) viene riunita alla frazione PCDD/F già analizzata, viene aggiunto lo standard interno di iniezione per i PCB-DL (10 µL di ¹³C₁₂-PCB 209 0,1 µg/mL in isottano) e si porta al volume finale di 1 mL con isottano.

Purificazione automatica con Power Prep. Sull'estratto purificato tramite GPC si esegue una purificazione attraverso l'impiego di un sistema automatizzato Power Prep mediante l'utilizzo di colonne con silice (acida/basica/neutra), allumina e carbone. Queste colonne vengono acquistate già pronte per lo strumento Power-Prep, che utilizza dei programmi automatizzati di lavaggio/carico campione/eluzione con diversi solventi. In particolare, vengono utilizzate le colonne:

- Colonne preimpaccate monouso di silice (acida, neutra e basica);
- Colonne preimpaccate monouso di allumina basica;
- Colonne preimpaccate monouso di carbone.

I solventi utilizzati sono esano, esano/diclorometano 85/15, diclorometano, toluene.

Il Power Prep viene predisposto all'uso installando le colonnine di purificazione nel sistema nelle specifiche posizioni. Ci si assicura che, per ogni campione, il tubicino di campionamento arrivi fino al fondo della provetta e si posizionano le vial e i palloni di raccolta delle frazioni. Quindi si carica ed avvia il metodo preimpostato per la purificazione per PCDD/PCDF/PCB.

All'inizio di ogni sessione giornaliera e al termine di ogni ciclo di purificazione viene effettuato un ciclo di lavaggio del sistema (senza colonnine installate) con esano o diclorometano.

Si riportano di seguito e condizioni operative del programma di purificazione per la determinazione delle diossine.

Tabella 4-5: Programma Power Prep – colonne di dimensione standard – procedimento n°2

Step	Flow (mL/min)	Vol. (mL)	M1-M8	Descrizione
1	10	20	01222006	Carica esano
2	10	30	01212006	condizionamento Allumina
3	10	20	01221116	condizionamento Carbone Forward
5	10	60	01122006	condizionamento Silica
6	10	10	06122006	Carica campione
7	10	50	01112006	Eluisci esano
9	10	30	01112001	Eluisci esano PCB leggeri
10	10	10	02222006	Cambio al 85:15
11	10	38	02212001	Eluisci 85:15 PCB
12	10	10	03222006	Cambio DCM
13	10	50	03211116	DCM eluisci
16	10	10	05222006	Cambia a toluene
17	50	38	05221222	Eluizione diossine con toluene
18	50	20	01221222	Purge
19	10	0.1	00000000	Spegni Valvole

Al termine della purificazione si ottiene una frazione contenente i PCB contenuta in un pallone da 250 mL ed una frazione contenente PCDD/F contenuta in una vial da 40mL.

L'eluato nel pallone che contiene i PCB viene concentrato usando un evaporatore rotante e trasferito in una vial pulita. Infine, l'estratto con i PCB viene concentrato sotto debole flusso di azoto fino a circa 200 µL.

La frazione contenente PCDD/F viene concentrata poco prima della determinazione strumentale: l'estratto viene portato a secco e subito ripreso con 90 µL di isoottano e 10 µL di miscela di standard interni di iniezione (¹³C₁₂-1,2,3,4-TCDD e ¹³C₁₂-1,2,3,7,8,9-HxCDD, a 200 ng/mL in nonano). L'estratto viene trasferito in vial da autocampionatore GC con inserto da 300 µL e analizzato.

Dopo l'analisi per PCDD/F tale frazione verrà riunita alla frazione per la determinazione dei PCB-DL e portata al volume finale di 1 mL, quindi l'estratto riunito viene sottoposto a nuova analisi HRGC/HRMS. A tal fine la frazione concentrata dei PCB-DL (200 µL) viene riunita alla frazione PCDD/F già analizzata, viene aggiunto lo standard interno di iniezione per i PCB-DL (10 µL di ¹³C₁₂-PCB 209 0,1 µg/mL in isoottano) e si porta al volume finale di 1 mL con isoottano.

Purificazione automatica con Power Prep con cartucce di silice XL. Impiegando cartucce preimpaccate monouso di silice di capacità maggiorata (XL) è possibile eseguire, per gli estratti di biota, la purificazione Power Prep come unica purificazione successiva al dibattimento con acido solforico. Questa purificazione viene eseguita in modo analogo a quanto descritto sopra per le colonne di dimensioni standard ma impiegando volumi maggiori per le fasi di condizionamento ed eluizione

Tabella 4-6: Programma Power Prep – colonne di dimensione maggiorata – procedimento n°2

Step	Flow (mL/min)	Vol. (mL)	M1-M8	Descrizione
1	10	20	01222006	Carica esano
2	10	30	01212006	condizionamento Allumina
3	10	20	01221116	condizionamento Carbone Forward
5	10	100	01122006	condizionamento Silica
6	10	10	06122006	Carica campione
7	10	190	01112006	Eluisci esano
9	10	30	01112001	Eluisci esano PCB leggeri
10	10	10	02222006	Cambio al 85:15
11	10	38	02212001	Eluisci 85:15 PCB
12	10	10	03222006	Cambio DCM
13	10	50	03211116	DCM eluisci
16	10	10	05222006	Cambia a toluene
17	50	38	05221222	Eluizione diossine con toluene
18	50	20	01221222	Purge
19	10	0.1	00000000	Spegni Valvole

Le frazioni risultanti vengono concentrate e addizionate di standard di iniezione come descritto per il procedimento Power Prep con colonne di dimensioni standard.

4.6.2.2 Analisi GC-HRMS per PCDD/F- Procedimento n° 2

Vengono di seguito presentati degli esempi di condizioni operative di analisi strumentale in gascromatografia accoppiata ad un rivelatore a spettrometria di massa ad alta risoluzione. Il campione è introdotto nel gascromatografo in modalità large volume utilizzando un iniettore PTV, il gas di trasporto impiegato è elio (He).

Nelle tabelle seguenti sono riportati, a titolo di esempio, parametri operativi e condizioni strumentali per la fase cromatografica e la fase di rivelazione, impiegabili per la determinazione degli analiti in esame.

Tabella 4-7: condizioni operative GC-HRMS per PCDD/F – Procedimento n°2

Gas-Cromatografo	
Colonna capillare	Rtx-Dioxin2– (60 m x 0,25 mm x 0,25 µm)
Flusso gas di trasporto	1,4 mL/min, He
Temperatura iniziale colonna	80 °C per 1 min
Rampa 1 temperatura colonna	incremento a 25 °C/min fino a 240 °C, isoterma per 1 min;
Rampa 2 temperatura colonna	incremento a 1,5 °C/min fino a 315 °C, isoterma per 1 min;

Gas-Cromatografo	
Iniettore PTV	
Modalità iniezione	Large volume
Volume iniettato	12 µL (3 iniezioni da 4µL)
Temperatura iniziale iniezione	40 °C (flusso He 50 mL/min)
Rampa riscaldamento iniettore per il trasferimento	14,5 °C/s fino a 320 °C, splitless time 4,00 min
Pulizia iniettore post trasferimento	320 °C per 5 min (flusso He 50 mL/min)
Temperatura interfaccia	290 °C

Per ottenere la risoluzione di almeno 10000 per lo spettrometro di massa viene utilizzato come gas di riferimento l'FC43 (perfluoro-tributilammina). Il segnale che viene impiegato è quello dello ione a m/z 313,9834.

L'acquisizione GC/MS comincia al minuto 12 della corsa cromatografica e termina al minuto 69. L'acquisizione strumentale dello spettrometro di massa avviene in modalità MID (Multiple Ion Detection) sfruttando la tecnica "lock plus cali" che permette di ottenere condizioni estremamente stabili per acquisizioni di dati di lunghe sequenze operative monitorando la risoluzione e registrandola nel log relativo al file di acquisizione. Nella tabella seguente sono riportate le masse esatte monitorate in ogni finestra, la tipologia di massa e la sostanza a cui la massa fa riferimento monitorata, i tempi di inizio e fine di ogni finestra. Per ogni analita vengono monitorate due masse ed entrambe vengono utilizzate nella quantificazione.

Tabella 4-8: finestre Multiple Ion Detection per PCDD/F- Procedimento n°2

Finestra	m/z esatta	Tipo m/z	Sostanza
1 inizio: 20.00 min fine: 27.50 min	303,90108	M	TCDF
	305,89813	M+2	TCDF
	313,98389	LOCK MASS	FC43
	315,94133	M	TCDF labeled
	317,93838	M+2	TCDF labeled
	319,89599	M	TCDD
	321,89304	M+2	TCDD
	327,88419	M	TCDD purificazione
	331,93625	M	TCDD labeled
	333,93330	M+2	TCDD labeled
	339,85915	M+2	PeCDF
	341,85620	M+4	PeCDF
2 inizio: 27.50 min fine: 34.50 min	351,98017	CALI MASS	FC43
	313,98336	LOCK MASS	FC43
	339,85915	M+2	PeCDF
	341,85620	M+4	PeCDF
	351,89941	M+2	PeCDF labeled
	353,89646	M+4	PeCDF labeled
	355,85407	M+2	PeCDD
	357,85112	M+4	PeCDD
	363,98017	CALI MASS	FC43
	367,89433	M+2	PeCDD labeled
	369,89138	M+4	PeCDD labeled
3 inizio: 34.50 min fine: 42.90 min	409,79740		HpCDPE
	373,82018	M+2	HxCDF
	375,81723	M+4	HxCDF
	375,98017	LOCK MASS	FC43
	385,86044	M+2	HxCDF labeled
	387,85749	M+4	HxCDF labeled
	389,81510	M+2	HxCDD
	391,81215	M+4	HxCDD
	401,85535	M+2	HxCDD labeled
403,85240	M+4	HxCDD labeled	

Finestra	m/z esatta	Tipo m/z	Sostanza
4 inizio: 42.90 min fine: 53.00 min	413,97698	CALI MASS	FC43
	445,75550		OCDPE
	407,78121	M+2	HpCDF
	409,77826	M+4	HpCDF
	413,97751	LOCK MASS	FC43
	419,82147	M+2	HpCDF labeled
	421,81852	M+4	HpCDF labeled
	423,77612	M+2	HpCDD
	425,77317	M+4	HpCDD
	435,81638	M+2	HpCDD labeled
	437,81343	M+4	HpCDD labeled
	463,97378	CALI MASS	FC43
5 inizio: 53.00 min fine: 60.00 min	479,71650		NCDEPE
	425,97698	LOCK MASS	
	441,74224	M+2	OCDF
	443,73929	M+4	OCDF
	453,78250	M+2	OCDF labeled
	455,77955	M+4	OCDF labeled
	457,73715	M+2	OCDD
	459,73420	M+4	OCDD
	463,97378	CALI MASS	
	469,77741	M+2	OCDD labeled
	471,77446	M+4	OCDD labeled
	513,67750		DCDPE

La curva di taratura impiegata prevede un minimo di 5 livelli. Le soluzioni di taratura vengono preparate per diluizione in isotano delle soluzioni standard commercialmente disponibili per l'esecuzione del metodo EPA 1613, (ad esempio le Method 1613 Calibration Solutions CS0.1-CS0.2-CS0.5-CS1-CS2-CS3-CS4-CS5 di Cambridge Isotope Laboratories). Nella tabella seguente sono riportati composizione e concentrazioni delle possibili soluzioni di taratura impiegate.

Tabella 4-9: soluzioni impiegate per realizzare la taratura per PCDD/F (concentrazione in ng/mL) - Procedimento n°2.

Sostanza	CS0,05	CSL	CS0,5	CS1	CS2	CS3	CS4	CS5
Composti nativi								
2,3,7,8-TCDD	0,05	0,1	0,25	0,5	2	10	40	200
1,2,3,7,8-PeCDD	0,25	0,5	1,25	2,5	10	50	200	1000
1,2,3,4,7,8-HxCDD	0,25	0,5	1,25	2,5	10	50	200	1000
1,2,3,6,7,8-HxCDD	0,25	0,5	1,25	2,5	10	50	200	1000
1,2,3,7,8,9-HxCDD	0,25	0,5	1,25	2,5	10	50	200	1000
1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	0,25	0,5	1,25	2,5	10	50	200	1000
OCDD	0,5	1,0	2,5	5,0	20	100	400	2000
2,3,7,8-TCDF	0,05	0,1	0,25	0,5	2	10	40	200
1,2,3,7,8-PeCDF	0,25	0,5	1,25	2,5	10	50	200	1000
2,3,4,7,8-PeCDF	0,25	0,5	1,25	2,5	10	50	200	1000
1,2,3,4,7,8-HxCDF	0,25	0,5	1,25	2,5	10	50	200	1000
1,2,3,6,7,8-HxCDF	0,25	0,5	1,25	2,5	10	50	200	1000
1,2,3,7,8,9-HxCDF	0,25	0,5	1,25	2,5	10	50	200	1000
2,3,4,6,7,8-HxCDF	0,25	0,5	1,25	2,5	10	50	200	1000
1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	0,25	0,5	1,25	2,5	10	50	200	1000
1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	0,25	0,5	1,25	2,5	10	50	200	1000

Sostanza	CS0,05	CSL	CS0,5	CS1	CS2	CS3	CS4	CS5
OCDF	0,5	1,0	2,5	5,0	20	100	400	2000
Standard di estrazione								
¹³ C ₁₂ -2,3,7,8-TCDD	100	100	100	100	100	100	100	100
¹³ C ₁₂ -1,2,3,7,8-PeCDD	100	100	100	100	100	100	100	100
¹³ C ₁₂ -1,2,3,4,7,8-	100	100	100	100	100	100	100	100
¹³ C ₁₂ -1,2,3,6,7,8-	100	100	100	100	100	100	100	100
¹³ C ₁₂ -1,2,3,4,6,7,8-	100	100	100	100	100	100	100	100
¹³ C ₁₂ -OCDD	200	200	200	200	200	200	200	200
¹³ C ₁₂ -2,3,7,8-TCDF	100	100	100	100	100	100	100	100
¹³ C ₁₂ -1,2,3,7,8-PeCDF	100	100	100	100	100	100	100	100
¹³ C ₁₂ -2,3,4,7,8-PeCDF	100	100	100	100	100	100	100	100
¹³ C ₁₂ -1,2,3,4,7,8-	100	100	100	100	100	100	100	100
¹³ C ₁₂ -1,2,3,6,7,8-	100	100	100	100	100	100	100	100
¹³ C ₁₂ -1,2,3,7,8,9-	100	100	100	100	100	100	100	100
¹³ C ₁₂ -2,3,4,6,7,8-	100	100	100	100	100	100	100	100
¹³ C ₁₂ -1,2,3,4,6,7,8-	100	100	100	100	100	100	100	100
¹³ C ₁₂ -1,2,3,4,7,8,9-	100	100	100	100	100	100	100	100
Standard interni di iniezione								
¹³ C ₁₂ -1,2,3,4-TCDD	100	100	100	100	100	100	100	100
¹³ C ₁₂ -1,2,3,7,8,9-	100	100	100	100	100	100	100	100
Standard interni di purificazione								
³⁷ Cl ₄ -2,3,7,8-TCDD	0,05	0,1	0,25	0,5	2	10	40	200

La quantificazione avviene mediante **diluzione isotopica** per i 15 composti (tra PCDD e PCDF) per i quali vengono impiegati gli analoghi isotopicamente marcati come standard interni di processo. Per ogni analita viene calcolato il fattore di risposta (RF). Se il fattore di risposta per ogni composto è costante (coefficiente di variazione minore del 20%) per l'intero intervallo di taratura per quel composto può essere usato il fattore di risposta medio; in alternativa può essere usata la curva di taratura completa sull'intero intervallo di taratura.

Per la quantificazione di 1,2,3,7,8,9-HxCDD, di OCDF e dei composti non 2,3,7,8-sostituiti (oltre che per la verifica dei recuperi degli standard interni di processo) si impiega invece la **taratura con standard interno**. Il congenere 1,2,3,7,8,9-HxCDD viene calcolato sul marcato ¹³C-1,2,3,6,7,8-HxCDD e l'OCDF sul marcato ¹³C-OCDD. Per ogni composto viene calcolato il fattore di risposta (RF). Se il fattore di risposta per ogni composto è costante (coefficiente di variazione minore del 35%) per l'intero intervallo di taratura per quel composto può essere usato il fattore di risposta medio; in alternativa può essere usata la curva di taratura completa sull'intero intervallo di taratura.

Nelle condizioni descritte si ottiene un campo di applicazione che, per ogni analita, è riportato nella tabella seguente (il limite di quantificazione è il limite inferiore di ciascun intervallo).

Tabella 4-10: campo di applicazione per la determinazione di PCDD/F in campioni di biota - Procedimento n°2.

Composti nativi	ng/kg
2378-TCDD	0,2-800
12378-PeCDD	1-4000
123478-HxCDD	1-4000
123678-HxCDD	1-4000
123789-HxCDD	1-4000

Composti nativi	ng/kg
1234678-HpCDD	1-4000
OCDD	2-8000
2378-TCDF	0,2-800
12378-PeCDF	1-4000
23478-PeCDF	1-4000
123478-HxCDF	1-4000
123678-HxCDF	1-4000
123789-HxCDF	1-4000
234678-HxCDF	1-4000
1234678-HpCDF	1-4000
1234789-HpCDF	1-4000
OCDF	2-8000
NATO 1989	
TE-Medium Bound	1,00-4008
TE-Upper Bound	2,00-8016
WHO 1998	
TE-Medium Bound	1,25-5000
TE-Upper Bound	2,50-10000
WHO 2005	
TE-Medium Bound	1,14-4562
TE-Upper Bound	2,28-9124

4.6.2.3 Analisi GC-HRMS per PCB-DL - Procedimento n° 2

Come già descritto l'analisi strumentale per la determinazione dei PCB-DL viene eseguita su un campione risultante dalla riunificazione della frazione già analizzata per la determinazione di PCDD/F e della frazione ottenuta dalle fasi di purificazione per la determinazione di PCB-DL. L'estratto riunito ha un volume finale di 1 mL e contiene lo standard interno di iniezione per i PCB-DL (¹³C₁₂-PCB 209).

Vengono di seguito riportate le condizioni operative impiegate per la determinazione dei PCB-DL mediante gascromatografia accoppiata ad un rivelatore a spettrometria di massa ad alta risoluzione. Il campione è introdotto nel gascromatografo in modalità large volume utilizzando un iniettore PTV, il gas di trasporto impiegato è elio (He).

Tabella 4-11: condizioni operative GC-HRMS per PCB-DL - Procedimento n°2

Gas-Cromatografo	
Colonna capillare	Rtx-PCB- (60 m x 0,25 mm x 0,25 µm)
Flusso gas di trasporto	1,5 mL/min, He
Temperatura iniziale colonna	100 °C per 1 min
Rampa 1 temperatura colonna	incremento a 25 °C/min fino a 200 °C, isoterma per 1 min;
Rampa 2 temperatura colonna	incremento a 1,5 °C/min fino a 245 °C, isoterma per 0 min;
Rampa 3 temperatura colonna	incremento a 2,5 °C/min fino a 265 °C, isoterma per 0 min;
Rampa 4 temperatura colonna	incremento a 5 °C/min fino a 310 °C, isoterma per 20 min;
Iniettore PTV	
Modalità iniezione	Large volume
Volume iniettato	15 µL (3 iniezioni da 5 µL)
Temperatura iniziale iniezione	42 °C (flusso He 50 mL/min)
Rampa riscaldamento iniettore per il trasferimento	14,5 °C/s fino a 320 °C, splitless time 4,00 min
Pulizia iniettore post trasferimento	320 °C per 5 min (flusso He 50 mL/min)
Temperatura interfaccia	290 °C

Per ottenere la risoluzione target di almeno 10000 per lo spettrometro di massa viene utilizzato come gas di riferimento l'FC43 (perfluoro-tributilammina). Il segnale che viene impiegato è quello dello ione a m/z 313,9834.

L'acquisizione GC/MS comincia al minuto 12 della corsa cromatografica e termina al minuto 69. L'acquisizione strumentale dello spettrometro di massa avviene in modalità MID (Multiple Ion Detection) sfruttando la tecnica "lock plus cali" che permette di ottenere condizioni estremamente stabili per acquisizioni di dati di lunghe sequenze operative monitorando la risoluzione e registrandola nel log relativo al file di acquisizione. Nella tabella seguente sono riportate le masse esatte monitorate in ogni finestra, la tipologia di massa e la sostanza a cui la massa fa riferimento monitorata, i tempi di inizio e fine di ogni finestra. Per ogni analita vengono monitorate due masse ed entrambe vengono utilizzate nella quantificazione.

Tabella 4-12: finestre Multiple Ion Detection per PCB-DL- Procedimento n°2

Finestra	m/z esatta	Tipo m/z	Sostanza
1 inizio: 12.00 min fine: 21.00 min	188,03930	M	PCB – mono
	190,03630	M+2	PCB – mono
	213,99030	LOCK MASS	FC43
	222,00030	M	PCB – di
	223,99740	M+2	PCB – di
	249,85000		
	251,85000		
	255,96130	M	PCB – tri
	257,95840	M+2	PCB – tri
	268,00160	M	PCB – tri labeled
	269,99860	M+2	PCB – tri labeled
	283,80962		
	285,80667		
	313,98336	CALI MASS	FC43
2 inizio: 21.00 min fine: 39.00 min	255,96130	M	PCB – tri
	257,95840	M+2	PCB – tri
	263,98656	LOCK MASS	FC43
	268,00160	M	PCB – tri labeled
	269,99860	M+2	PCB – tri labeled
	289,92240	M	PCB – tetra
	291,91940	M+2	PCB – tetra
	301,96260	M	PCB – tetra labeled
	303,95970	M+2	PCB – tetra labeled
	325,88040	M+2	PCB – penta
	327,87750	M+4	PCB – penta
	337,92070	M+2	PCB – penta labeled
	339,91780	M+4	PCB – penta labeled
	359,84150	M+2	PCB – esa
	361,83850	M+4	PCB – esa
363,98017	CALI MASS	FC43	
3 inizio: 39.00 min fine:	289,92240	M	PCB – tetra
	291,91940	M+2	PCB – tetra
	301,96260	M	PCB – tetra labeled
	303,95970	M+2	PCB – tetra labeled

Finestra	m/z esatta	Tipo m/z	Sostanza
55.50 min	313,98390	LOCK MASS	FC43
	325,88040	M+2	PCB – penta
	327,87750	M+4	PCB – penta
	337,92070	M+2	PCB – penta labeled
	339,91780	M+4	PCB – penta labeled
	359,84150	M+2	PCB – esa
	361,83850	M+4	PCB – esa
	371,88170	M+2	PCB – esa labeled
	373,87880	M+4	PCB – esa labeled
	393,80250	M+2	PCB – epta
	395,79950	M+4	PCB – epta
	405,84280	M+2	PCB – epta labeled
	407,83980	M+4	PCB – epta labeled
	413,97750	CALI MASS	FC43
	427,76350	M+2	PCB – octa
	429,76060	M+4	PCB – octa
461,72460	M+2	PCB – nona	
463,72160	M+4	PCB – nona	
4 inizio: 55.50 min fine: 69.00 min	401,74700		
	403,74400		
	413,97698	LOCK MASS	FC43
	461,72460	M+2	PCB – nona
	463,72160	M+4	PCB – nona
	495,68560	M+2	PCB – deca
	497,68260	M+4	PCB – deca
	501,97110	CALI MASS	FC43
	507,72580	M+2	PCB – deca labeled
509,72290	M+4	PCB – deca labeled	

La curva di taratura è a 8 livelli e copre un intervallo da 100 a 100000 pg/mL (100-500-1000-2500-5000-10000-50000-100000 pg/mL). Nella tabella seguente sono riportati composizione e concentrazioni delle soluzioni di taratura impiegate.

Tabella 4-13: soluzioni impiegate per realizzare la taratura PCB-DL - Procedimento n°2.

sostanza	100 pg/mL	500 pg/mL	1000 pg/mL	2500 pg/mL	5000 pg/mL	10000 pg/mL	50000 pg/mL	100000 pg/mL
Composti nativi								
PCB 77	100	500	1000	2500	5000	10000	50000	100000
PCB 81	100	500	1000	2500	5000	10000	50000	100000
PCB 105	100	500	1000	2500	5000	10000	50000	100000
PCB 114	100	500	1000	2500	5000	10000	50000	100000
PCB 118	100	500	1000	2500	5000	10000	50000	100000

sostanza	100 pg/mL	500 pg/mL	1000 pg/mL	2500 pg/mL	5000 pg/mL	10000 pg/mL	50000 pg/mL	100000 pg/mL
PCB 123	100	500	1000	2500	5000	10000	50000	100000
PCB 126	100	500	1000	2500	5000	10000	50000	100000
PCB 156	100	500	1000	2500	5000	10000	50000	100000
PCB 157	100	500	1000	2500	5000	10000	50000	100000
PCB 167	100	500	1000	2500	5000	10000	50000	100000
PCB 169	100	500	1000	2500	5000	10000	50000	100000
PCB 189	100	500	1000	2500	5000	10000	50000	100000
Standard interno di estrazione								
¹³ C-PCB 77	100	100	100	100	100	100	100	100
¹³ C-PCB 81	100	100	100	100	100	100	100	100
¹³ C-PCB 105	100	100	100	100	100	100	100	100
¹³ C-PCB 114	100	100	100	100	100	100	100	100
¹³ C-PCB 118	100	100	100	100	100	100	100	100
¹³ C-PCB 123	100	100	100	100	100	100	100	100
¹³ C-PCB 126	100	100	100	100	100	100	100	100
¹³ C-PCB 156	100	100	100	100	100	100	100	100
¹³ C-PCB 157	100	100	100	100	100	100	100	100
¹³ C-PCB 167	100	100	100	100	100	100	100	100
¹³ C-PCB 169	100	100	100	100	100	100	100	100
¹³ C-PCB 189	100	100	100	100	100	100	100	100
Standard interno di iniezione								
¹³ C-SS Decaclorobifenile	100	100	100	100	100	100	100	100

La quantificazione avviene mediante **diluizione isotopica** per tutti i 12 PCB-DL in quanto per tutti vengono impiegati gli analoghi isotopicamente marcati come standard interni di estrazione.

Per la verifica dei recuperi degli standard interni di processo si impiega invece la **taratura con standard interno di iniezione** (decaclorobifenile marcato con ¹³C).

Nella tabella seguente vengono riportati i limiti di quantificazione tipicamente ottenibili per i PCB-DL impiegando le condizioni operative descritte. Da notare che il LOQ è determinato, più che dalle performance del metodo, dai bianchi di procedimento in quanto i PCB, essendo contaminanti ubiquitari, risentono di contaminazione diffusa.

Tabella 4-14: limiti di quantificazione ottenibili PCB-DL - Procedimento n°2.

PCB Dioxin Like	LOQ (ng/kg peso umido)
PCB77	10
PCB81	2
PCB105	30
PCB114	10
PCB118	100
PCB123	4
PCB126	1.6
PCB156	20
PCB157	2

PCB Dioxin Like	LOQ (ng/kg peso umido)
PCB167	10
PCB169	1
PCB189	2
I-TE (WHO-TEF 1998) ng/kg	LOQ ng/kg
Medium Bound	0.10045
Upper Bound	0.2009
I-TE (WHO-TEF 2005) ng/kg	LOQ ng/kg
Medium Bound	0.09847
Upper Bound	0.19694

4.6.3 Procedimento n° 3 - Esempio di applicazione metodo EPA 1613B 1994

Il metodo EPA 1613B 1994 descrive in modo dettagliato le diverse fasi analitiche per la determinazione di PCDD e PCDF anche in campioni di biota ed è impiegato da alcuni laboratori SNPA. Il metodo prevede l'estrazione in soxhlet di un'aliquota di biota fresco omogeneizzato, addizionato di standard interni di processo e miscelato con sodio solfato anidro. Sull'estratto evaporato viene determinato il contenuto di lipidi. La purificazione prevede una successione di fasi: dapprima una purificazione su colonna detta anthropogenic isolation column (costituita da gel di silice, silicato di potassio, sodio solfato anidro, gel di silice acida) o su colonna di gel di silice acido, seguito da diverse opzioni: cromatografia di gel permeazione (GPC), SPE su florisil e/o allumina, silice e carbone grafitato. La determinazione avviene in GC-HRMS con un'energia di ionizzazione compresa tra 28 e 40 eV. Il metodo EPA 1668C 2010 è un metodo analogo per la determinazione di PCB in campioni, anche, di biota mediante HRGC/HRMS.

Si riportano di seguito le integrazioni o modifiche adottate da un laboratorio SNPA nell'applicazione dei metodi EPA 1613B 1994 e EPA 1668C 2010. Laddove presenti i riferimenti ai paragrafi del metodo sono intesi come relativi al metodo EPA 1613B 1994.

Il Limite di Quantificazione viene calcolato per ciascun campione. Nel caso di batch analitici per cui la concentrazione del bianco analitico sia superiore ad un terzo del Valore Limite applicabile, e nel caso non sia disponibile una quantità sufficiente di campione per eseguire la ripetizione delle analisi, è possibile decidere se praticare la sottrazione del bianco analitico ai valori misurati per la totalità dei campioni del batch in analisi, previa attenta analisi delle cause.

Il campione non viene estratto umido e miscelato con sodio solfato anidro ma viene liofilizzato. L'estrazione non avviene mediante soxhlet ma si ricorre alla tecnica PFE (Pressurized Fluid Extraction).

La vetreria dopo il lavaggio viene successivamente condizionata con acetone ed esano. Inoltre, la vetreria può essere sottoposta a silanizzazione, trattamento che assicura la rimozione di ogni traccia di inquinante ed elimina i siti attivi presenti. In questo caso ogni ulteriore lavaggio della vetreria prima del suo impiego risulta superfluo.

Nella determinazione dei PBDE in campioni di biota, come matrice di riferimento da impiegare per i campioni di controllo qualità (bianco di procedimento, bianco fortificato) viene impiegato olio di riso per simulare il contenuto lipidico dei campioni.

Riguardo alla problematica, segnalata nel metodo EPA 1613B 1994 al paragrafo 7.2.1, relativa alla colorazione grigiastria che il solfato anidro di sodio dovesse assumere dopo riscaldamento in muffola, si stabilisce di approvvigionarsi di un reagente di purezza tale da non risentire del fenomeno citato.

Riguardo ai bianchi fortificati (campioni OPR, Ongoing Precision Recovery), da inserire in ogni batch analitico, si stabilisce di ritenere accettabili solo gli OPR con la totalità dei congeneri nativi rientranti nei limiti definiti dalla tabella 6 del metodo EPA 1613B 1994 (cfr. anche 3.6.1.3); per i congeneri marcati al ¹³C e per la verifica nel tempo dell'accuratezza entro ± 2 deviazioni standard (punto 15.5.4 del metodo) è ammesso uno scostamento del 10% per un singolo congenere solo se esso riguarda meno di 1/5 dei congeneri.

La colonna GC impiegata per la determinazione di PCDD/F è la DB-5MS, per PCB-DL è la HT8 o la J&W DB-XLB (con eventuale conferma su DB-5MS).

Quando ritenuto necessario (ad esempio nel caso vengano estratti in maniera congiunta PCDD/F e PBDE o IPA), prima della purificazione l'estratto PFE viene concentrato a 10 mL e separato in tre aliquote: la prima, denominata SPLIT 50%, di 5mL, destinata alla determinazione di PCDD/F+PCB-DL, la seconda, denominata SPLIT 25%, destinata alla determinazione di altri analiti, una terza aliquota destinata alla conservazione in archivio (conseguentemente nel calcolo dei recuperi degli standard marcati isotopicamente vengono applicati dei fattori correttivi pari a 2 o 4 a seconda dell'aliquota considerata).

In luogo della anthropogenic isolation column la rimozione dei lipidi viene eseguita mediante eluizione dell'estratto su una colonna contenente gel di silice e terra di diatomee mescolata ad acido solforico concentrato (rapporto 20g:40g) eluendo con esano.

La purificazione ed il frazionamento descritti dai paragrafi 13.3 (silice), 13.4 (allumina), 13.5 (carbone) del metodo EPA 1613B 1994 vengono eseguiti mediante l'impiego di un purificatore automatizzato programmabile Power Prep.

La verifica della risoluzione (criterio ≥ 10000) viene effettuata prima dell'inizio della sequenza analitica. Poiché lo spettrometro impiegato non è in grado di monitorare la risoluzione durante tutto il corso dell'acquisizione dei dati ma solo ad inizio di ogni finestra MID (multiple ion detection), a valle di ogni sequenza analitica viene effettuata la verifica della risoluzione esaminando le registrazioni dei singoli file contenenti i dati grezzi HRMS. È ammesso uno scostamento in difetto del 10% per le finestre MID intermedie, effettuando una ri-analisi del singolo campione eventualmente interessato da scostamenti superiori al 10%.

4.6.4 Procedimento n° 4 (Soxhlet, SPE automatizzata, GC/HRMS e GC-MS/MS)

Il quarto esempio di procedimento impiegato da laboratori SNPA per la determinazione di PCDD, PCDF e PCB-DL (e PBDE) prevede l'estrazione del campione liofilizzato mediante Soxhlet modificato e automatizzato seguita da una purificazione SPE automatizzata (LCtech modello Dextech) su colonne di silice multistrato e florisil. La determinazione di PCDD/F avviene in GC con rivelazione mediante spettrometria di massa ad alta risoluzione a settore magnetico mentre la determinazione dei PCB-DL (e PBDE) avviene mediante GC con rivelazione mediante spettrometria di massa a triplo quadrupolo.

4.6.4.1 Preparazione del campione - Procedimento n° 4

Il campione di biota viene conservato congelato a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ fino al momento della omogeneizzazione mediante molino a lame per alimenti. Per evitare il surriscaldamento del campione e per rendere la macinazione più agevole il campione viene lavorato a scongelamento non ancora completato. Nel primo ciclo (1500-1800 giri/min per 40 secondi) avviene un'iniziale triturazione, nel secondo ciclo (2500 giri/min per 40 secondi, con inversione del senso di rotazione) si realizza una maggiore macinazione. Si procede quindi a spandere il campione omogeneizzato sui piattelli del liofilizzatore, pesandolo su bilancia tecnica e registrandone il peso, infine congelandolo. Successivamente i piatti con il campione congelato sono disposti nei diversi ripiani del liofilizzatore e viene avviato un programma di liofilizzazione specifico per il biota (pressione condensatore 1 mbar, temperatura campioni: $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, pressione durante l'essiccamento primario e secondario 0,2 mbar, durata programma da 48 h fino a 72 h). Una volta completata la liofilizzazione i campioni vengono nuovamente pesati in modo da determinare il Fattore di Liofilizzazione (FL), utilizzato per convertire al peso fresco i risultati ottenuti sul campione liofilizzato. Viene quindi completata l'omogeneizzazione del biota liofilizzato utilizzando un frullatore.

4.6.4.2 Estrazione - Procedimento n° 4

L'estrazione del campione liofilizzato avviene mediante sistema di estrazione automatizzato basato sulla tecnica Soxhlet a caldo (il campione è immerso in solvente caldo) mediante l'impiego di uno strumento marca VELP Scientifica modello Solvent Extractor SER 148.

Un'aliquota di circa 3 g di campione liofilizzato viene pesato all'interno di ditali in cellulosa e addizionato di standard interni di estrazione isotopicamente marcati (PCDD/F, PCB e PBDE). Quindi si procede con l'alloggiamento all'interno dello strumento del ditale contenente il campione e del bicchiere di estrazione contenente 75 mL di una soluzione di n-esano- acetone 4:1. Si realizza poi una chiusura ermetica del sistema e si avvia il programma di estrazione. Una volta riscaldato il solvente i ditali vengono immersi. Il programma prevede:

1. 90 minuti in *Immersion* a $130\text{ }^{\circ}\text{C}$. In questa fase il campione è immerso nel solvente;
2. 45 minuti in *Washing* a $130\text{ }^{\circ}\text{C}$. In questa fase il ditale è sollevato ed i vapori del solvente, riconsensati, ricadono nel ditale realizzando uno sciacquo del campione che trasporta gli analiti nel bicchiere di estrazione;
3. 15 minuti in *Recovery* a $130\text{ }^{\circ}\text{C}$. In questa fase viene chiuso il rubinetto in teflon per trattenere i vapori riconsensati del solvente nella parte superiore dello strumento, ottenendo così una concentrazione dell'estratto.

Una volta raffreddati i bicchieri di estrazione, gli estratti vengono filtrati su imbuto contenenti lana di vetro e sodio solfato anidro e raccolti in palloni da 250 mL.

4.6.4.3 Purificazione - Procedimento n° 4

La purificazione dell'estratto avviene mediante sistema di purificazione SPE automatizzata marca LCtech, modello Dextech. L'estratto, ridotto al Rotavapor a circa 2-3 mL, viene aspirato con l'apposita siringa e iniettato all'interno del loop del sistema di purificazione Dextech. Tale sistema è configurato con una colonna multistrato in silice acida (smart column LCtech) ed una colonna Florisil (Waters Sep-Pack) per la separazione di PCDD/F da PCB e PBDE. I solventi utilizzati sono esano e una miscela di esano – diclorometano 50-50. Vengono raccolte due frazioni, quella in esano contenente i PCB e i PBDE e quella in esano-diclorometano 50-50 contenente PCDD/Fs. Le frazioni vengono portate a piccolo volume mediante rotavapor e poi a secco sotto flusso di azoto. Ciascuna frazione viene subito ripresa in 100 μL di Isotano, addizionata di standard di siringa (30 μL di standard di siringa per PCDD/F per la frazione PCDD/F e 20 μL di standard di siringa per PCB + 20 μL di standard di siringa per PBDE) e trasferiti in vials con riduttore. Le due vials PCB + PBDE e PCDD/Fs sono pronte per le analisi strumentali.

4.6.4.4 *Analisi Strumentale PCDD/F - Procedimento n° 4*

La determinazione di PCDD e PCDF viene eseguita mediante GC-HRMS con rivelazione per spettrometria ad alta risoluzione a settore magnetico (marca Thermo Fisher Scientific, modello DFS).

Le condizioni operative dello strumento prevedono:

- Colonna capillare: J&W DB 5MS UI 60 m x 0,250 mm x 0,25 µm.
- Iniettore split/splitless in modalità splitless
- Volume di iniezione: 2 µL ;
- Carrier Gas: elio;
- Temperatura sorgente: 290 °C;
- Gas di riferimento: Perfluoro tributilammina (FC43) che fluisce in continuo all'interno della sorgente durante l'analisi in modo da operare una calibrazione continua delle masse da monitorare;
- Temperatura della camera del gas di riferimento: 90 °C
- Risoluzione ≥ 10000
- Modalità di MID (Multiple Ion Detection): LOCK
- Modalità di Acquisizione: Centr.

La corsa gascromatografica è svolta secondo la rampa di temperatura riportata nella tabella seguente:

Tabella 4-15 programma termico colonna GC per PCDD/F – procedimento n°4

fase	Rate (°C/min)	Temp. (°C)	Hold Time (min)
Initial		120	3,0
Ramp 1	10,0	230	0,0
Ramp 2	1,0	245	0,0
Ramp 3	2,0	265	0,0
Ramp 4	15,0	300	20

L'analisi quantitativa è effettuata utilizzando il software TargetQuant che prevede il metodo della diluizione isotopica. Nelle condizioni operative descritte il limite di quantificazione per i PCDD e PCDF è di 1,7 ng/kg (peso umido).

4.6.4.5 *Analisi Strumentale PCB-DL - Procedimento n° 4*

Per la determinazione di PCB e PBDE l'analisi strumentale viene eseguita mediante GC-MS/MS con rivelatore a triplo quadrupolo (marca Agilent, modello 7010), impiegando le seguenti condizioni operative:

Tabella 4-16 condizioni GC analisi PCB-DL – procedimento n°4

Iniettore PTV	
Modalità iniezione	pulsed splitless; pulsed pressure 40 psi
Volume iniettato	2 µL
Colonna	Colonna capillare di media polarità del tipo 5% difenil-polimetil-silossano: 60m x 0,25mm, 0,25µm di polifenilmetilsilicone Ultra Inert (tipo J&W HP-5MS o DB 5.MS o equivalente)
Solvent Delay	10 min
Modalità di acquisizione	MRM
Gas Carrier	Elio

Programma termico Oven

Tabella 4-17 programma termico colonna GC per PCB-DL – procedimento n°4

fase	Rate °C/min	Value °C	Hold Time min	Run Time min
Initial		60 °C	2	0,2
Ramp 1	15	140	0	7,3333
Ramp 2	4	280	0	42,333
Ramp 2	30	320	9	52,667

Le transizioni utilizzate sono le seguenti:

Tabella 4-18 transizioni MRM per analisi GC-MS/MS di PCB-DL – procedimento n°4

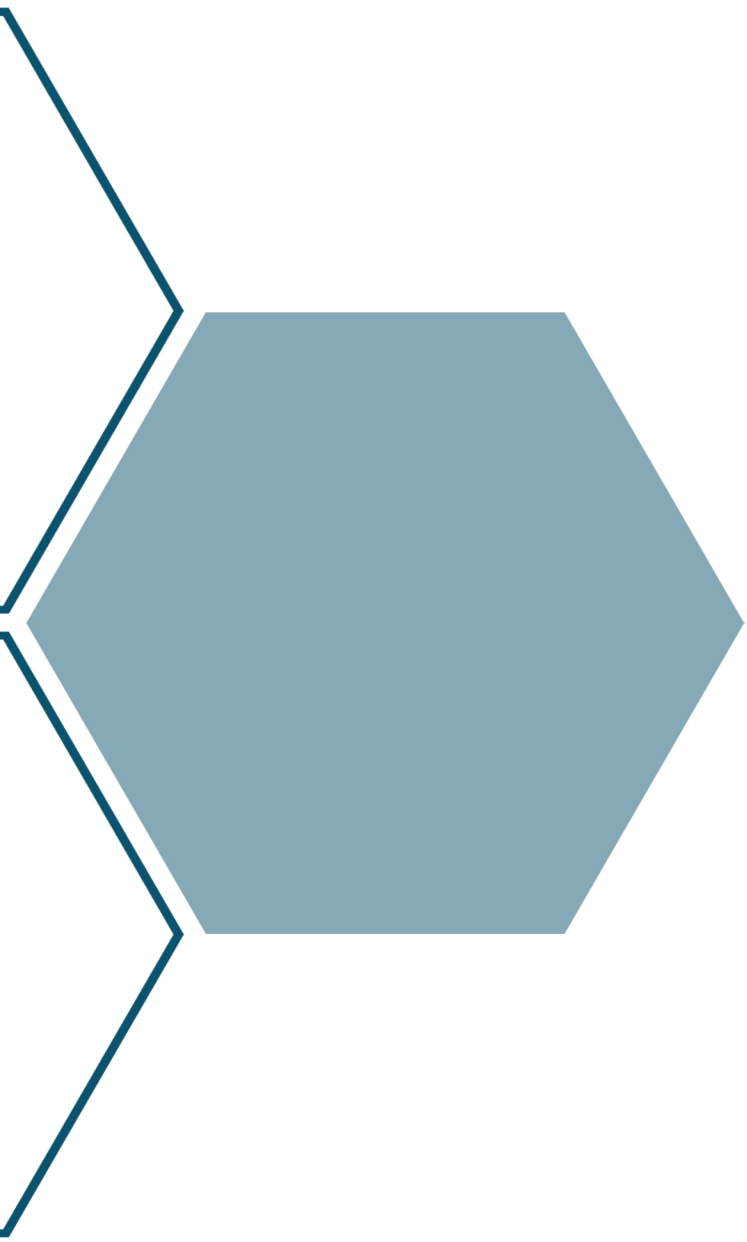
	Gruppo		PCBs	1 ^a transizione Quantificazione (m/z)	2 ^a transizione Qualifica (m/z)	
PCB NATIVI	tri	Analiti	PCB 28	255,5 → 185,9	255,5 → 219,9	
	tetra		PCB 52	291,5 → 221,9	291,5 → 256,8	
			PCB 81	291,5 → 221,9	291,5 → 256,8	
			PCB 77	291,5 → 221,9	291,5 → 256,8	
	penta		PCB 95	324,5 → 253,9	324,5 → 288,7	
			PCB 101	324,5 → 253,9	324,5 → 288,7	
			PCB 99	324,5 → 253,9	324,5 → 288,7	
			PCB 110	324,5 → 253,9	324,5 → 288,7	
			PCB 123	324,5 → 253,9	324,5 → 288,7	
			PCB 118	324,5 → 253,9	324,5 → 288,7	
			PCB 114	324,5 → 253,9	324,5 → 288,7	
			PCB 105	324,5 → 253,9	324,5 → 288,7	
			PCB 126	324,5 → 253,9	324,5 → 288,7	
			esa	PCB 151	359,5 → 289,9	359,5 → 324,7
				PCB 149	359,5 → 289,9	359,5 → 324,7
	PCB 146			359,5 → 289,9	359,5 → 324,7	
	PCB 153			359,5 → 289,9	359,5 → 324,7	
	PCB 138			359,5 → 289,9	359,5 → 324,7	
	PCB 128			359,5 → 289,9	359,5 → 324,7	
	PCB 167			359,5 → 289,9	359,5 → 324,7	
	PCB 156			359,5 → 289,9	359,5 → 324,7	
	PCB 157			359,5 → 289,9	359,5 → 324,7	
	epta		PCB 169	359,5 → 289,9	359,5 → 324,7	
			PCB 187	393,4 → 323,7	393,4 → 358,6	
			PCB 183	393,4 → 323,7	393,4 → 358,6	
			PCB 177	393,4 → 323,7	393,4 → 358,6	
			PCB 180	393,4 → 323,7	393,4 → 358,6	
PCB 170		393,4 → 323,7	393,4 → 358,6			
PCB MARCATI	tri	Surrogati	PCB 28 ¹³ C	267,9 → 198,0	-	
	tetra		PCB 52 ¹³ C, PCB 81 ¹³ C, PCB 77 ¹³ C	303,9 → 232,0	-	
	penta		PCB 101 ¹³ C, PCB 123 ¹³ C, PCB 118 ¹³ C, PCB 114 ¹³ C, PCB 105 ¹³ C, PCB 126 ¹³ C	337,8 → 267,8	-	
	esa		PCB 153 ¹³ C, PCB 138 ¹³ C, PCB 167 ¹³ C, PCB 156 ¹³ C, PCB 157 ¹³ C, PCB 169 ¹³ C	371,8 → 301,9	-	
	epta		PCB 180 ¹³ C, PCB 189 ¹³ C	405,8 → 335,8	-	
	tri, tetra	Std di siringa	PCB 70 ¹³ C	303,9 → 232,0	-	
	penta, esa		PCB 111 ¹³ C	337,8 → 267,8	-	
	epta		PCB 170 ¹³ C	405,8 → 335,8	-	

Per l'analisi quantitativa si utilizza il software Mass Hunter.

Nelle condizioni operative descritte il limite di quantificazione per i PCB-DL è di 1,7 ng/kg (peso umido).

5 RIFERIMENTI

- EPA1614A 2010 - Brominated Diphenyl Ethers in Water, Soil, Sediment, and Tissue by HRGC/HRMS.
- EPA1613B 1994 - Tetra- through Octa-Chlorinated Dioxins and Furans by Isotope Dilution HRGC/HRMS.
- EPA1668C 2010 - Chlorinated Biphenyl Congeners in Water, Soil, Sediment, Biosolids, and Tissue by HRGC/HRMS.
- Direttiva 2000/60/CE del Parlamento Europeo e del Consiglio, del 23 ottobre 2000, che istituisce un quadro per l'azione comunitaria in materia di acque.
- Decreto legislativo 3 aprile 2006, n. 152, Norme in materia ambientale, Parte Terza, norme in materia di difesa del suolo e lotta alla desertificazione, di tutela delle acque dall'inquinamento e di gestione delle risorse idriche
- Decreto legislativo 13 ottobre 2015, n. 172, Attuazione della direttiva 2013/39/UE, che modifica le direttive 2000/60/CE per quanto riguarda le sostanze prioritarie nel settore della politica delle acque.
- Decreto legislativo 10 dicembre 2010, n. 219 Attuazione della direttiva 2008/105/CE relativa a standard di qualità ambientale nel settore della politica delle acque, recante modifica e successiva abrogazione delle direttive 82/176/CEE, 83/513/CEE, 84/156/CEE, 84/491/CEE, 86/280/CEE, nonché modifica della direttiva 2000/60/CE e recepimento della direttiva 2009/90/CE che stabilisce, conformemente alla direttiva 2000/60/CE, specifiche tecniche per l'analisi chimica e il monitoraggio dello stato delle acque.
- Direttiva 2009/90/CE della Commissione del 31 luglio 2009 che stabilisce, conformemente alla direttiva 2000/60/CE del Parlamento europeo e del Consiglio, specifiche tecniche per l'analisi chimica e il monitoraggio dello stato delle acque
- Direttiva 2008/105/CE - Standard di qualità ambientale nel settore della politica delle acque.
- Direttiva 2008/56/CE del Parlamento Europeo e del Consiglio del 17 giugno 2008 che istituisce un quadro per l'azione comunitaria nel campo della politica per l'ambiente marino (direttiva quadro sulla strategia per l'ambiente marino).
- Decisione 2017/848 della Commissione del maggio 2017 che definisce i criteri e le norme metodologiche relativi al buono stato ecologico delle acque marine nonché le specifiche e i metodi standardizzati di monitoraggio e valutazione;
- Decreto legislativo 13 ottobre 2010, n. 190 Attuazione della direttiva 2008/56/CE che istituisce un quadro per l'azione comunitaria nel campo della politica per l'ambiente marino.
- ISPRA Manuali e Linee Guida 176/2018. Analisi di sostanze prioritarie in matrici marine. Parte II. Idrocarburi policiclici aromatici e metalli ed elementi in traccia. Roma, febbraio 2018.



PT SNPA
2024