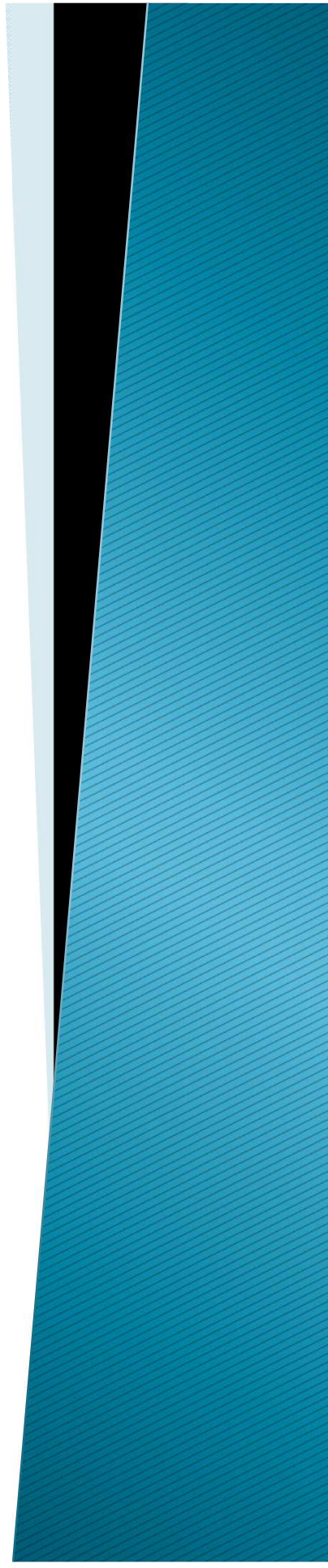


# **Problemi connessi con la determinazione di analiti in tracce**



Lo sviluppo che l'**analisi chimica strumentale** sta vedendo in questi tempi da un lato viene a rispondere ad un'esigenza sempre più emergente, ad esempio dalle Istituzioni preposte alla **tutela e al controllo della salute e della qualità ambientale e degli alimenti**, d'altro canto spinge l'interesse dei ricercatori e degli studiosi verso campi finora poco considerati se non addirittura inesplorati.



Partiamo, come esempio, dal **monitoraggio** degli ambienti acquatici: è un monitoraggio di interesse primario, in quanto da un lato i corpi acquosi sono da sempre recettori di sversamenti, in parte naturali, ma con una componente antropogenica che con l'espansione demografica, economica, industriale e tecnologica è divenuta preponderante.



- ▶ La qualità ambientale può venir valutata analizzando alcune specie che si possano considerare **'indicatori' di inquinamento**. Tali sono ad esempio i **metalli pesanti** (Cu, Pb, Cd e Zn sono tra i più comunemente determinati).
- ▶ **Specie organiche persistenti** comunemente monitorate sono inoltre i **PAH** e i **PCB**, indicatori di inquinamento antropogenico.



Fattori da tenere presenti sono la **solubilità**  
e

l'**idrofilicità** delle specie, che condizionano  
l'effetto diluente del corpo acquoso.

▶ PAH e PCB sono idrofobici e poco solubili,  
ma condizionano comunque la qualità  
dell'ambiente acquatico: tendono infatti ad  
accumularsi nel sedimento (nel quale vanno  
infatti monitorati).



In corrispondenza dell'**interfase acqua-sedimento**, queste specie possono comunque ritornare nella fase acquosa, grazie anche all'azione dei '**sediment dwelling organisms**', entrando in una catena alimentare che dai microrganismi arriva ai macroorganismi, fino alla nostra tavola.



- ▶ Per ottenere un'informazione sul **bioaccumulo** di specie contaminanti, il monitoraggio analitico può focalizzarsi su organismi e su organi bersaglio.
- ▶ La scelta dell'**organismo bersaglio** non è triviale: la mobilità dell'organismo condiziona la risposta che vogliamo ottenere.



- ▶ Evidentemente organismi più stazionari, quali i **molluschi**, sono più informativi sulla qualità dell'ambiente nel quale sono stati campionati, mentre i **pesci**, che possono avere attitudini stanziali ma anche migratorie, danno problemi da questo punto di vista.





- ▶ La scelta inoltre di un **organo bersaglio** (epatopancreas, fegato ecc.) facilita l'approccio analitici in quanto gli analiti vi si troveranno concentrati, e forniranno risposte più precise ed accurate. D'altronde se si vogliono avere informazioni sulla **qualità alimentare dell'organismo**, evidentemente l'approccio analitico riguarderà l'organismo campionato **'tal quale'**.



Mentre le possibilità analitiche attuali sono notevoli, vi sono aspetti da tenere in dovuto conto:

- ▶ le **incertezze nel campionamento** per le analisi di tracce;
- ▶ la **relazione** esistente tra **ciò che si può misurare** e **ciò che è nocivo per la salute dell'uomo**.



- ▶ C'è continua evoluzione nei **limiti di rilevabilità** (si è passati dal mg al sub-picogrammo), dimensioni dei campioni e tempo di analisi;
- ▶ ciò consente oggi **l'analisi di elementi e molecole in tracce** anche in matrici complesse, quali tipicamente sono le **matrici alimentari e ambientali**.

Logicamente quanto più diluiti sono gli analiti, tanto maggiore è **l'errore analitico**; principali sorgenti d'errore sono:

1. **campionamento**,
2. **contaminazione**,
3. **selettività**.

All'atto pratico, le cause di errore, anche se note, sono ineliminabili.



Ad una concentrazione di analita di 1 ppb  
l'**incertezza media** rilevata con metodi  
diversi  
in laboratori diversi è prossima a  $\pm 50\%$ ,  
e sale rapidamente a concentrazioni  
inferiori.

## Schema del processo analitico totale:

1. Enunciazione generale del problema
2. Enunciazione specifica del problema e definizione di un obiettivo
3. Scelta del procedimento analitico
4. **Campionamento**
5. **Trattamento del campione**
6. **Misura analitica**
7. **Valutazione dei dati**
8. Conclusioni
9. Relazione finale

Abbiamo quindi visto che nelle analisi in tracce in matrici complesse l'errore sta sempre in agguato.

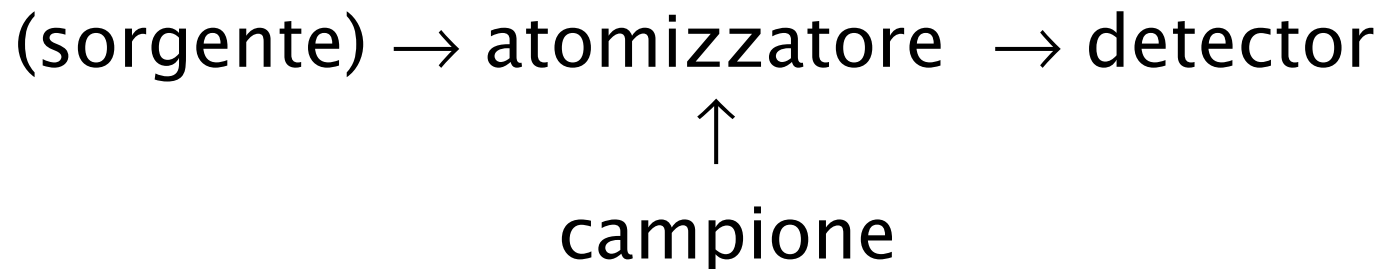
Le possibilità analitiche sono – si potrebbe dire – infinite: ossia non esiste un metodo per

un particolare caso analitico. Ma certamente certe metodiche sono più appropriate per certi tipi di analisi.



Per l'analisi di metalli (Cu, Zn, Pb, Fe, Cd nel latte, Pb, Cd nelle bevande, Na, K, Ca, Mg nei preparati per bambini), l'approccio analitico più usato è la **spettrometria di emissione assorbimento atomico**.

Lo schema strumentale è:





## EMISSIONE

- ▶ Con **atomizzatori a fiamma** si possono determinare **40–50 elementi** con **limiti di rilevabilità da 1 a 1000 ng mL<sup>-1</sup>**.
- ▶ I migliori risultati in emissione si ottengono con gli **alcalini e alcalino terrosi**, i peggiori con As, B, Be, Cd, Sb, Se, Si e Zn.
- ▶ Possibili **interferenze chimiche** dovute alla matrice.

- ▶ Con il **plasma (ICP–AES)** i limiti di **rilevabilità** scendono a  **$0.1 \div 50 \text{ ng mL}^{-1}$** ;
- ▶ Date le temperature molto elevate (fino a  $10.000 \text{ °K}$ ) le interferenze chimiche sono minime rispetto all'atomizzazione in fiamma.
- ▶ Lo spettro è ricco di righe (specie in presenza di Fe e Co), per cui le possibili **interferenze spettrali** richiedono strumentazione di elevata qualità.

- ▶ L'**ICP-AES** è utilizzabile per ogni campione **solubilizzabile** (campioni alimentari, agricoli, biologici, ambientali, metalli rilasciati negli oli ecc.).
- ▶ Il problema può essere la solubilizzazione del campione.

## ASSORBIMENTO

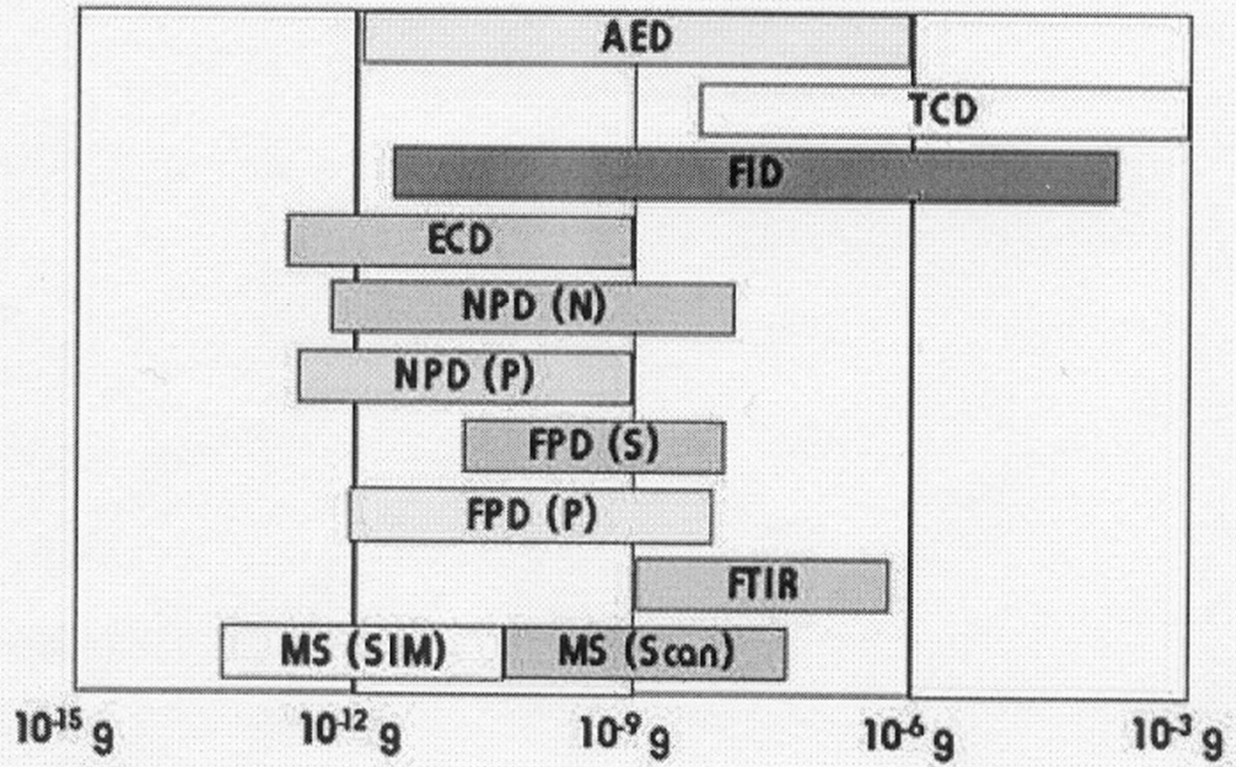
- ▶ L'atomizzatore può essere a fiamma o 'flameless' (a fornetto di grafite): in entrambi i casi ci possono essere interferenze dovute alla matrice.
- ▶ Modificanti chimici vengono impiegati per diminuire la volatilità degli analiti o aumentare la volatilità della matrice.

- ▶ **Atomizzatore a fiamma:**  
bassa sensibilità Mn a 279.5: 0.052 mg/L  
elevato consumo di campione (3–5 mL min<sup>-1</sup>).
- ▶ **Atomizzatore a fornetto di grafite:**  
maggiore sensibilità (pg)  
bassissimo consumo di campione (μL).

Cromatografia gas-liquido (GC)  
Cromatografia liquido-liquido (HPLC)

- ▶ Sono i **metodi separativi** più impiegati, principalmente per **analiti organici**.
- ▶ La **GC** ha applicazioni nella ricerca di additivi, di residui di pesticidi nella frutta e vegetali ecc.: è tecnica di **elevata sensibilità**.

## GC detectors sensitivities and ranges



L' HPLC (high performance liquid chromatography) a fase inversa si impiega in tutti i campi in cui si debbano analizzare composti polari: tests su alimenti e sostanze nocive, vitamine, amminoacidi negli alimenti per bambini, aflatossine nel latte, micotossine nei cereali.



I metodi cromatografici sono **selettivi**.  
Per incrementarne la **specificità**, si può  
impiegare come detector uno spettrometro  
di  
massa: **gas-massa (GC-MS)**, o **liquido-  
massa  
(LC-MS)**: **metodi ibridati**.

## SPETTROMETRIA DI MASSA

- ▶ La **spettrometria di massa (MS)** si basa sulla generazione di **ioni gassosi** dalle molecole di analiti.
- ▶ Gli ioni vengono poi separati sulla base del loro diverso **rapporto massa/carica ( $m/z$ )**.
- ▶ Il detector registra lo **spettro** che è un diagramma dell'abbondanza relativa degli ioni in funzione del rapporto  $m/z$ .

La **MS** è la tecnica più sensibile per l'analisi molecolare. Nelle determinazioni quantitative è applicata allo sviluppo di **metodi definitivi e di riferimento** per la quantificazione di specie quali i **farmaci di abuso** e le **diossine**.

- ▶ Le **diossine** sono tra i **composti più tossici** che si conoscono. Formatesi nei processi di incenerimento dei rifiuti, se immesse nell'ambiente possono accumularsi nei **tessuti grassi di animali** usati per l'alimentazione.
- ▶ L'analisi **GC-MS** delle **TCDD**, considerando gli effetti economici connessi al rilevamento nel latte o nei tessuti animali, richiede misure attendibili a livello di **ppt** !!!

Lo sviluppo che l'analisi chimica strumentale sta vedendo in questi tempi ...

...spinge l'interesse dei ricercatori e degli studiosi verso **campi finora poco considerati** se non addirittura inesplorati.

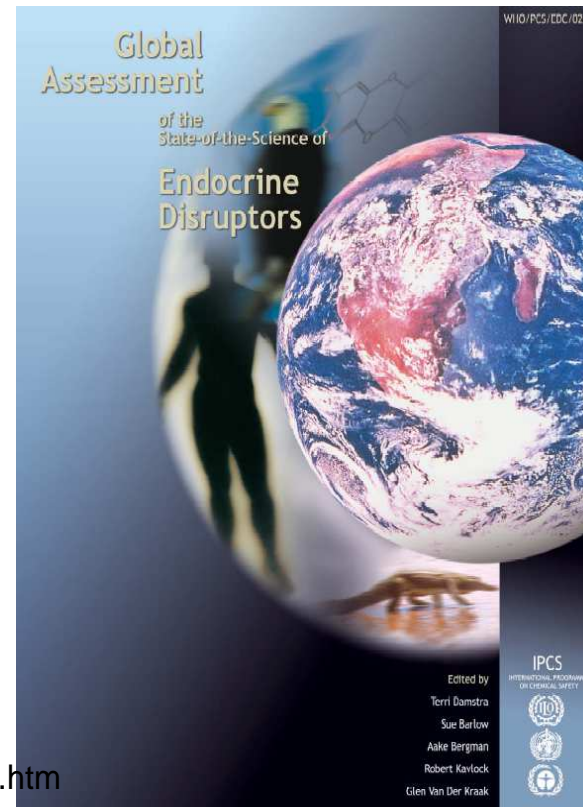


# I composti potenzialmente attivi sul sistema endocrino: *endocrine disruptors*

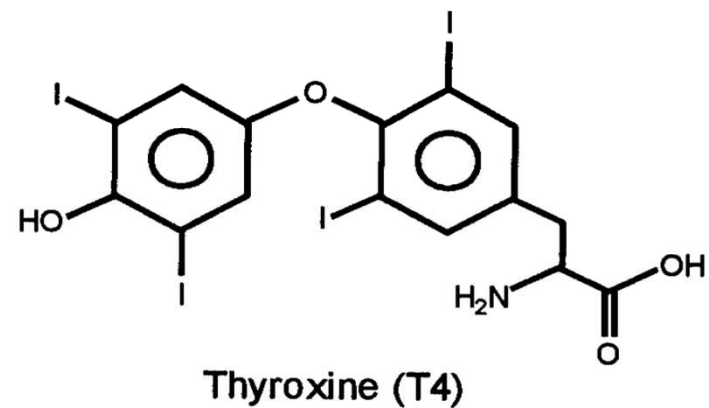
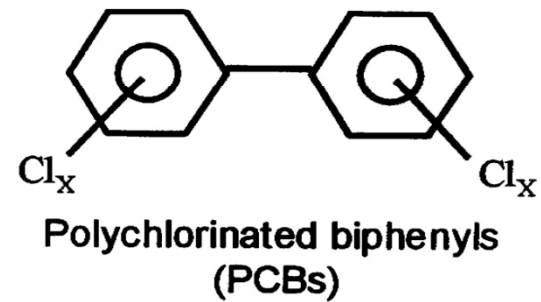
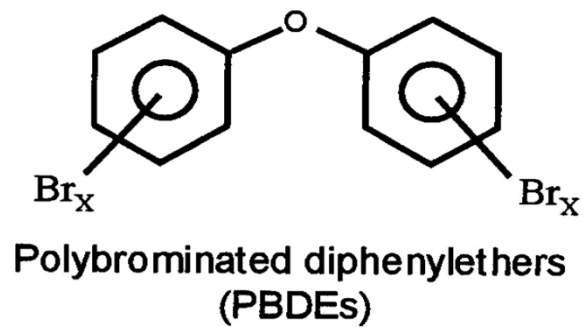
GLOBAL ASSESSMENT OF  
THE STATE-OF-THE-SCIENCE  
OF ENDOCRINE DISRUPTORS

WHO, ILO, UNEP - August 2002

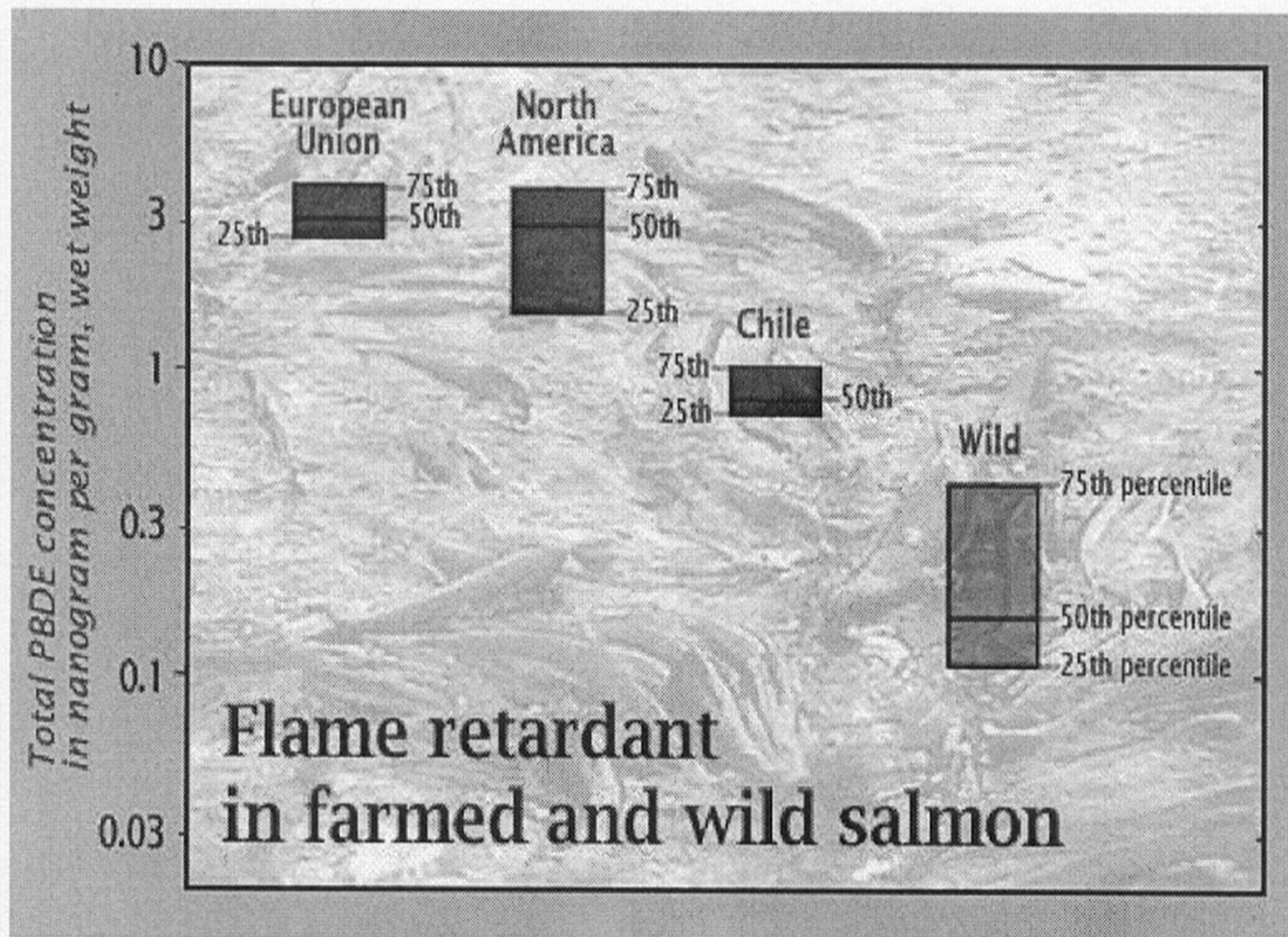
[http://www.who.int/pcs/emerg\\_site/edc/global\\_edc\\_TOC.htm](http://www.who.int/pcs/emerg_site/edc/global_edc_TOC.htm)



## PBDE structure is similar to PCBs and thyroid hormone



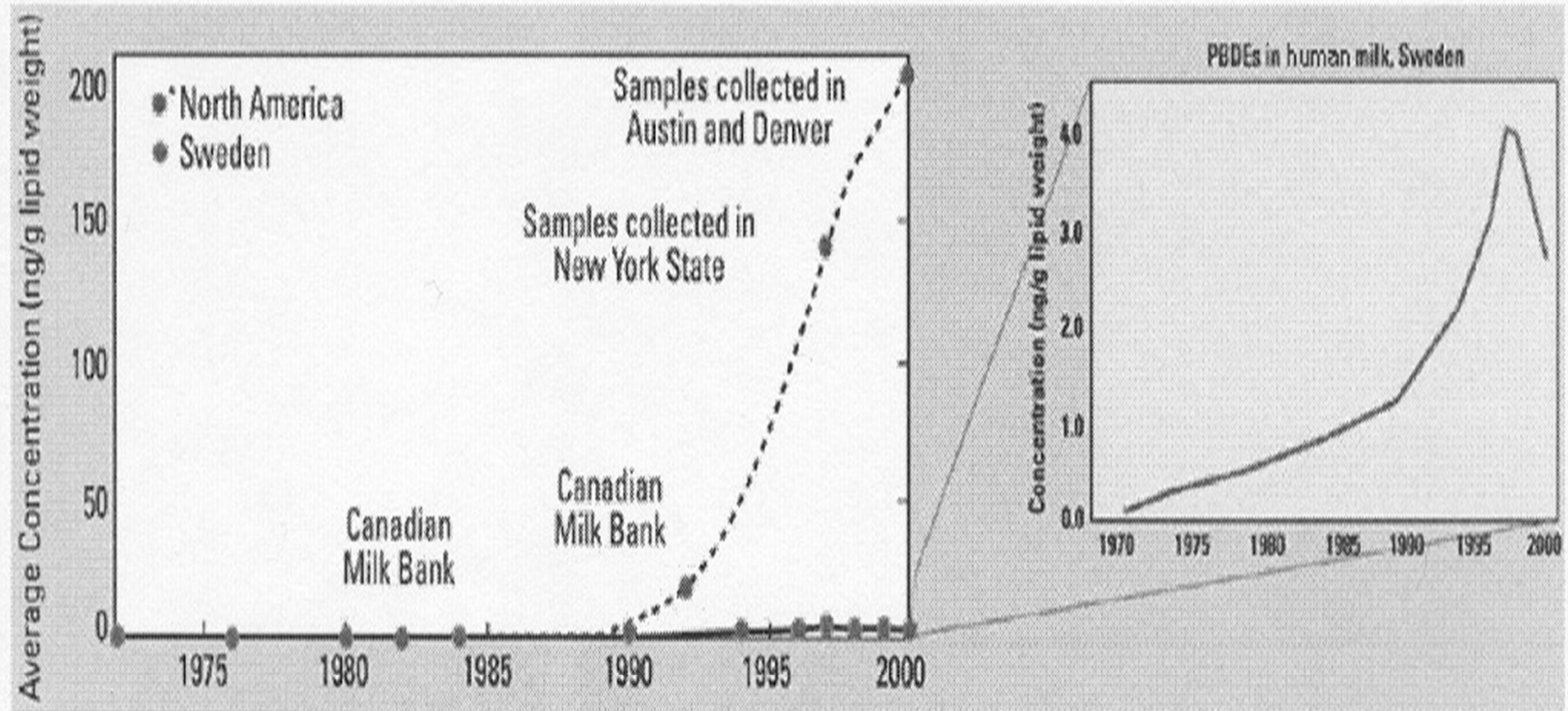






**Table 1. Concentrations (ng/g lipid weight) of PBDE congeners identified in human milk from the Faroe Islands. The samples were pooled with 10 mothers in each pool.**

Year	1987	1994-1995	1998-1999
No. of mothers	10	10	10
BDE-47	0.5	1.2	1.7
BDE-99	0.20	0.50	1.0
BDE-100	0.25	0.60	1.0
BDE-153	0.60	1.4	3.6
sPBDE	1.5	3.6	7.2



**Figure 1. PBDEs in human milk: North America versus Europe.** In the mid-1990s, documentation of the rapidly rising levels of brominated flame retardants in the breast milk of Swedish women led to sharply reduce usage, and eventually a ban, on many PBDE formulations. Now preliminary North American data point to much higher levels, which are increasing at an exponential rate. Source: Canadian Milk Bank and New York state data: Ryan and Patry; Denver, Colo. and Austin, Tex. data: Pöpke; Swedish data: Norén.

## Gli ftalati

Produzione europea:

1 Milione di tonnellate/anno

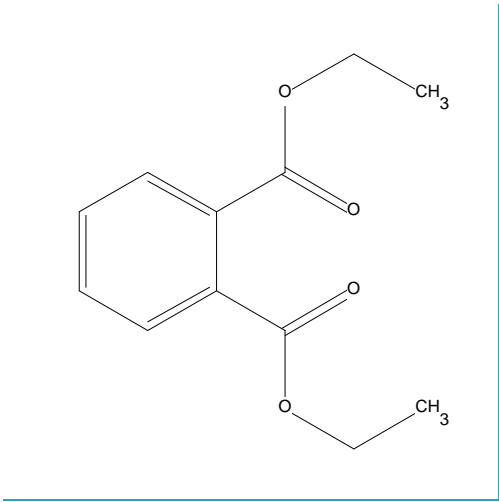


900.000 tonnellate:

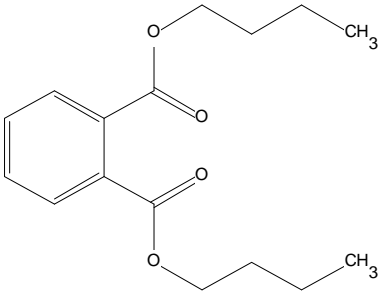
plastificanti

# Gli ftalati

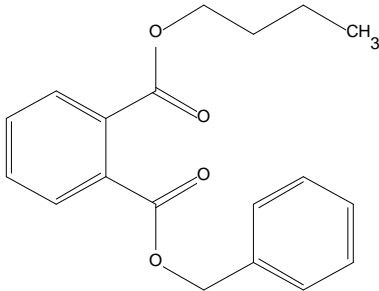
**DEP**



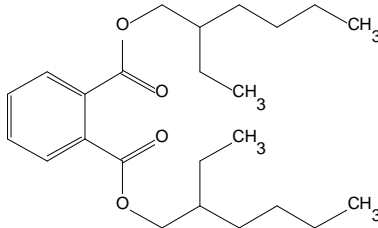
**DnBP**



**BBP**



**DEHP**



**I plastificanti** sono additivi nella manifattura delle materie plastiche.

**Duplica funzione:**

- conferire lavorabilità al polimero in fase di produzione
- conferire flessibilità e morbidezza al tatto al materiale finito

**Proprietà di un plastificante:**

- stabilità, fluidità, bassa tensione di vapore





- ▶ Gli ftalati sono composti potenzialmente attivi sul sistema endocrino: **endocrine disruptors**.
- ▶ Nonostante non ci siano prove definitive sugli effetti dell'esposizione degli ftalati nell'uomo, studi su cavie hanno messo in relazione questi composti con l'insorgere di **cancro a fegato e reni**. "reasonably anticipated to be a **human carcinogen**" (U.S. Nat. Inst. of Environm. Health Sciences)

# Tecniche analitiche impiegate: GC-MS



- Gascromatografo HP 6890:

EPC

HP5973 MSD

Autocampionatore per liquidi Agilent 7683

- Colonna cromatografica:

HP-5MS (*crosslinked* 5% fenil-metilsilossano), 30 m., 0.25 mm. I.D., 0.25  $\mu$ m film thickness.

- Iniettore:

Liner da 0.75 mm. I.D. specifico per SPME

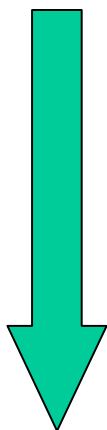
Setto Merlin MicroSeal High Pressure™

- Software:

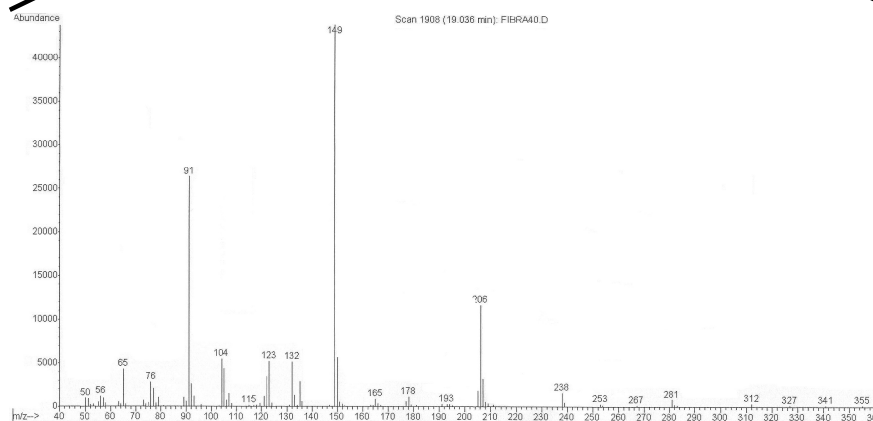
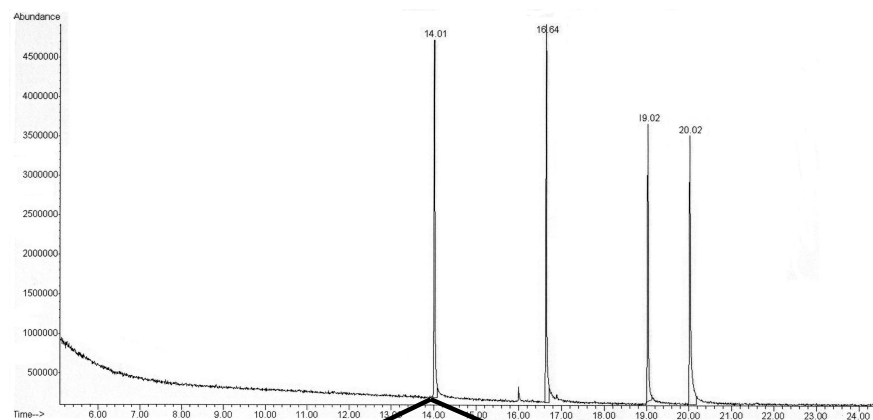
Agilent Enhanced Chemstation

# Tecniche analitiche impiegate: GC-MS

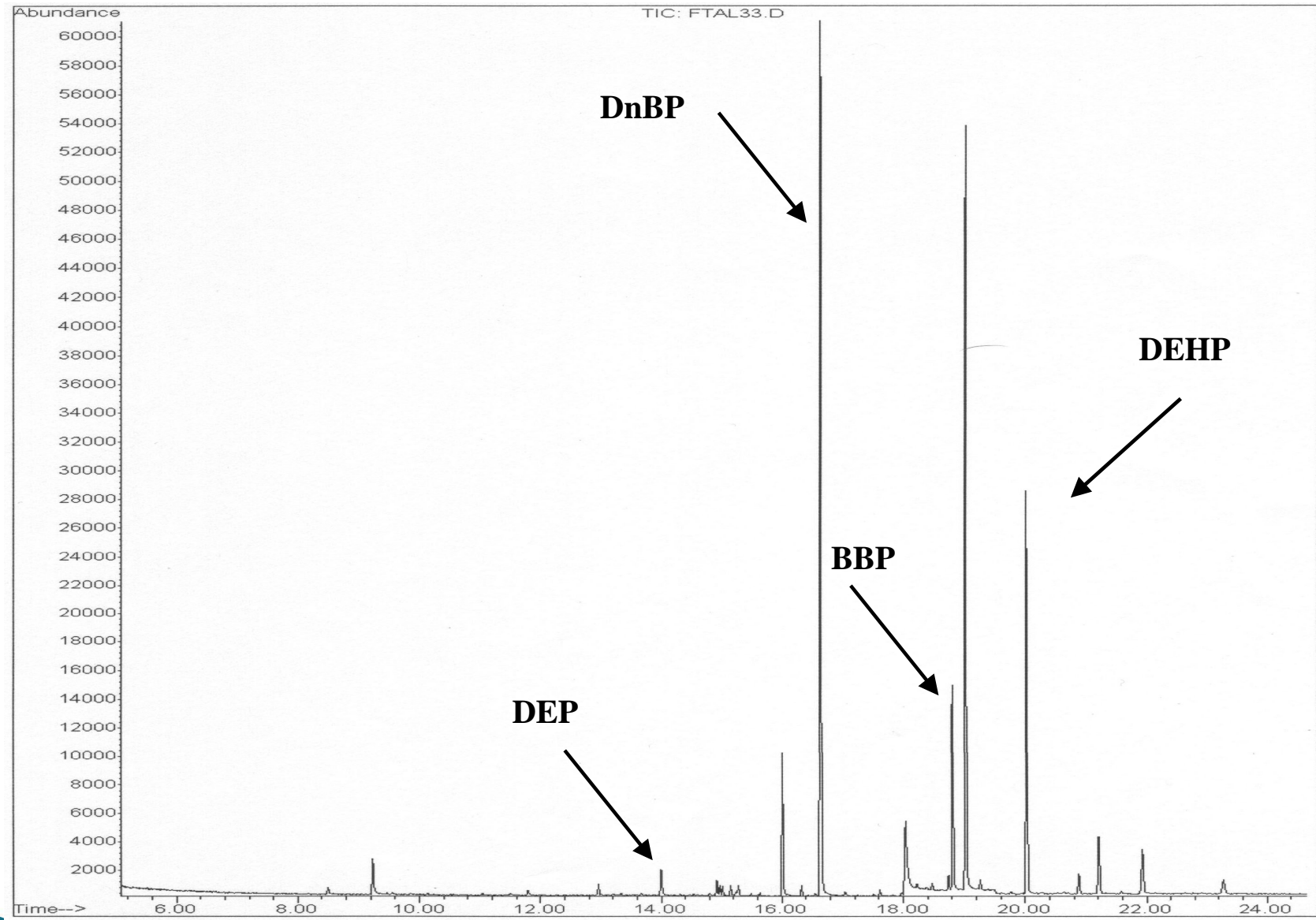
**Gascromatografia**



**Spettrometria di massa**

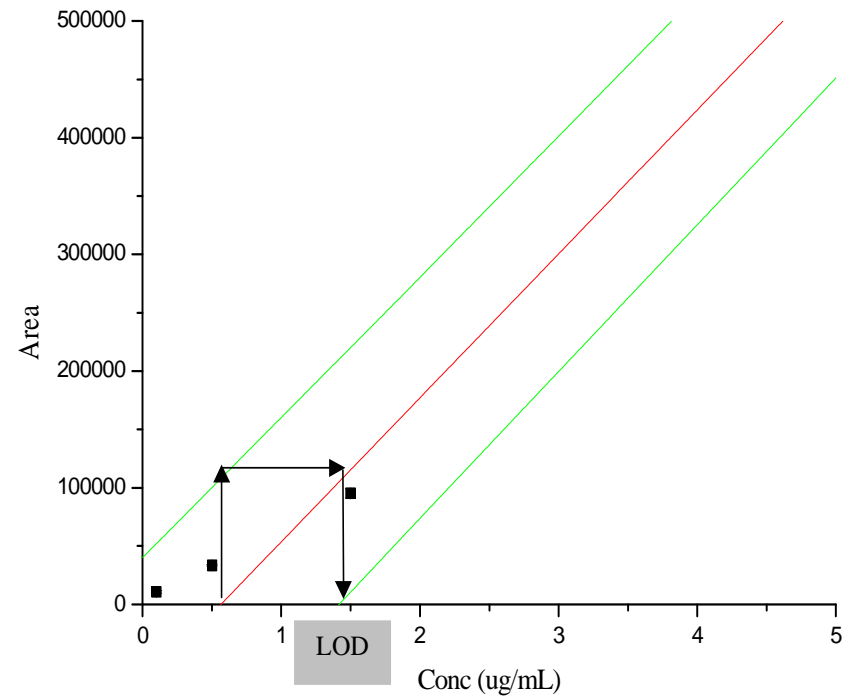






# Curve di calibrazione GC-MS

## Determinazione del LOD



# Tecniche analitiche impiegate: SPME

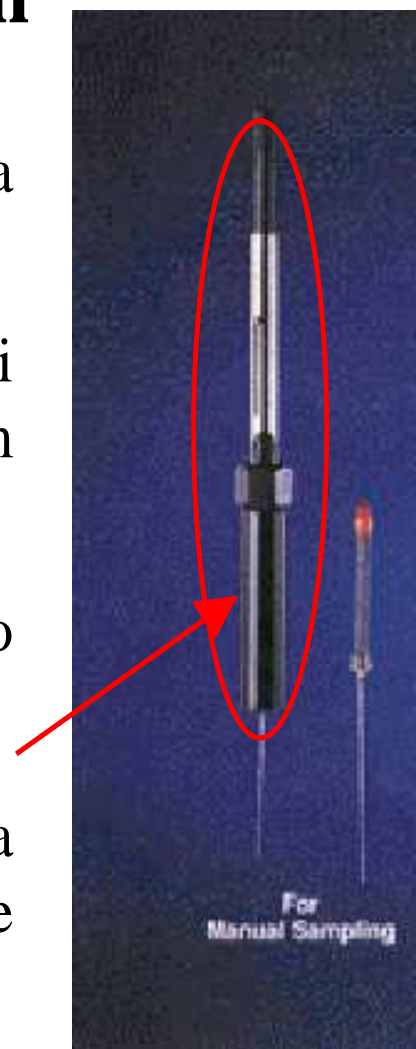
## Solid Phase MicroExtraction

È una tecnica di preconcentrazione introdotta da Pawlyszyn e collaboratori nel 1991.

La parte attiva dello strumento è una fibra cilindrica di silice fusa della lunghezza di 1 cm, rivestita da un film polimerico.

La fibra è legata ad un pistoncino di acciaio inossidabile ed è protetta all'interno di un ago cavo.

Il tutto è installato su un supporto manuale che ha l'aspetto di una microsiringa e permette di esporre e ritirare la fibra.



# Valutazione del dato analitico

- ▶ Precisione (ripetibilità e riproducibilità) della misura.
- ▶ Accuratezza della misura.
- ▶ Valore vero (valore di riferimento accettato).
- ▶ Materiali di riferimento certificati: CRM (certified reference materials).

Substance		BCR-063R Skim milk powder (natural)		
Ca	g/kg	13.49	±	0.10
Cd	µg/kg			
Cl	g/kg	9.94	±	0.30
Co	µg/kg			
Cu	mg/kg	0.602	±	0.019
Fe	mg/kg	2.32	±	0.23
Hg	µg/kg			
I	mg/kg	0.81	±	0.05
K	g/kg	17.68	±	0.19
Mg	g/kg	1.263	±	0.024
Mn	mg/kg			
Mo	mg/kg		(0.33)	
N (total)	g/kg	62.3	±	0.8
N (Kjeldahl)	g/kg		(60.87)	
Na	g/kg	4.37	±	0.031
Ni	µg/kg			
P	g/kg	11.10	±	0.13
Pb	µg/kg	18.5	±	2.7
Se	µg/kg		(129)	
Tl	µg/kg			
Zn	mg/kg	49.0	±	0.6