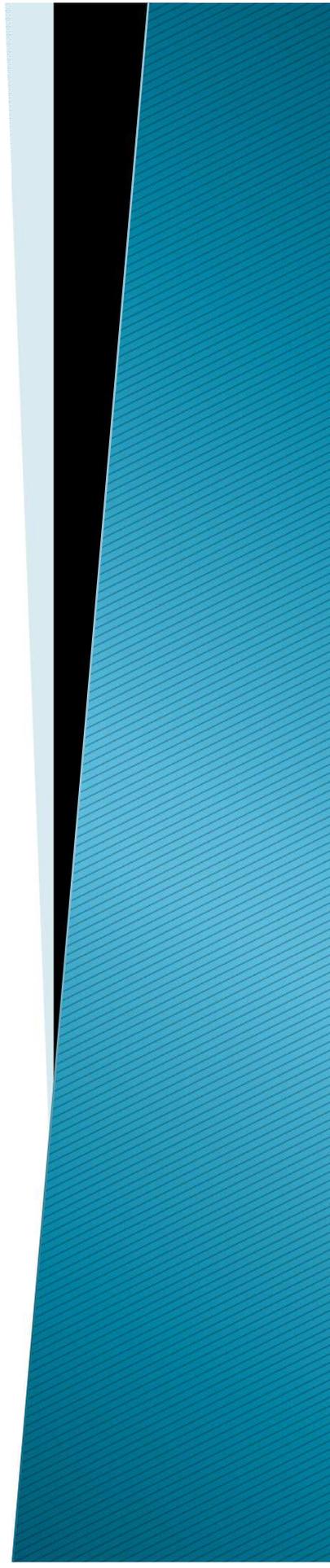
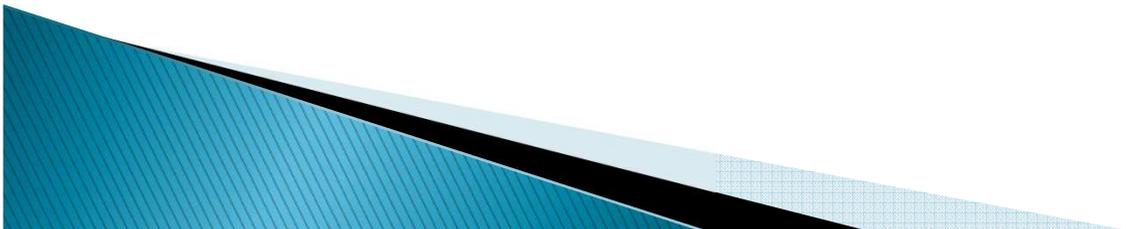


Problemi connessi con la determinazione di analiti in tracce



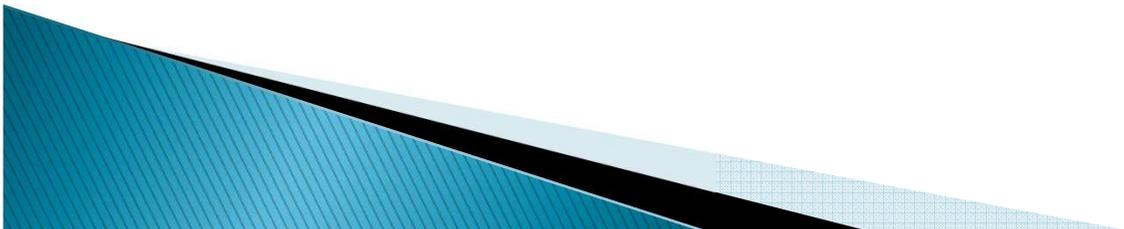
Lo sviluppo che l'**analisi chimica strumentale** sta vedendo in questi tempi da un lato viene a rispondere ad un'esigenza sempre più emergente, ad esempio dalle Istituzioni preposte alla **tutela e al controllo della salute e della qualità ambientale e degli alimenti**, d'altro canto spinge l'interesse 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.



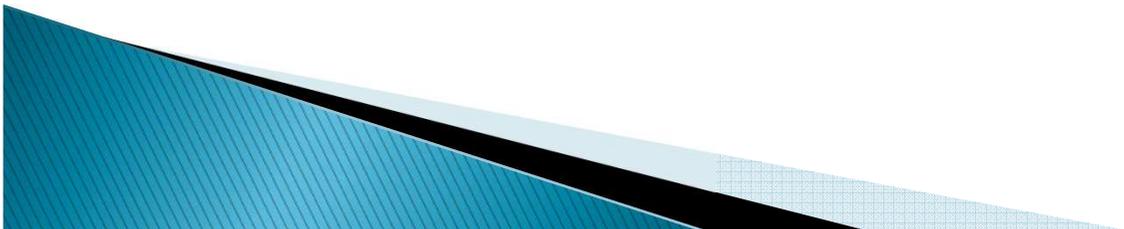
- ▶ La qualità ambientale può venir valutata analizzando alcune specie che si possano considerare **'indicatori' di inquinamento**. Tali sono ad esempio i **metalli pesanti** (Cu, Pb, Cd e Zn sono tra i più comunemente determinati).
- ▶ **Specie organiche persistenti** comunemente monitorate sono inoltre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



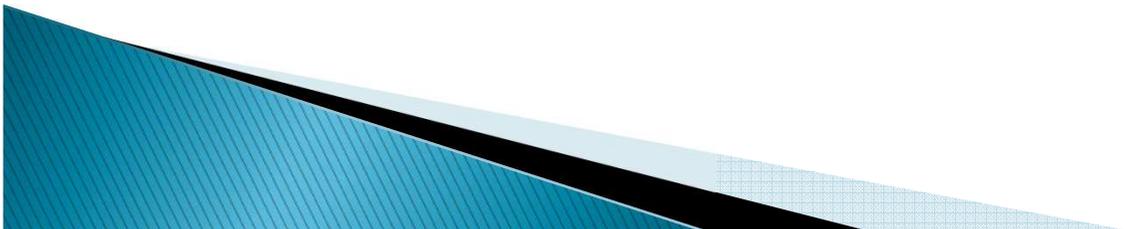
- ▶ Per ottenere un'informazione sul **bioaccumulo** di specie contaminanti, il monitoraggio analitico può focalizzarsi su organismi e su organi bersaglio.
- ▶ La scelta dell'**organismo bersaglio** non è triviale: la mobilità dell'organismo condiziona la risposta che vogliamo ottenere.



- ▶ 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**.

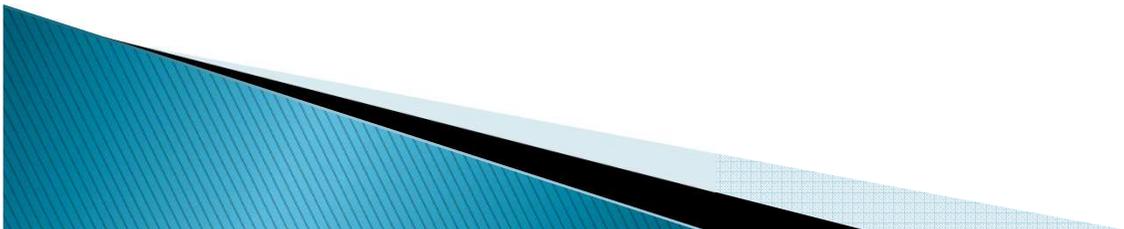


- ▶ C'è continua evoluzione nei **limiti di rilevabilità** (si è passati dal mg al sub-picogrammo), dimensioni dei campioni e tempo di analisi;
- ▶ ciò consente oggi **l'analisi di elementi e molecole in tracce** anche in matrici complesse, quali tipicamente sono le **matrici alimentari e ambientali**.

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.

EMISSIONE

- ▶ Con **atomizzatori a fiamma** si possono determinare **40–50 elementi** con **limiti di rilevabilità da 1 a 1000 ng mL⁻¹**.
- ▶ 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÷50 ng mL⁻¹**;
- ▶ Date le temperature molto elevate (fino a 10.000 °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

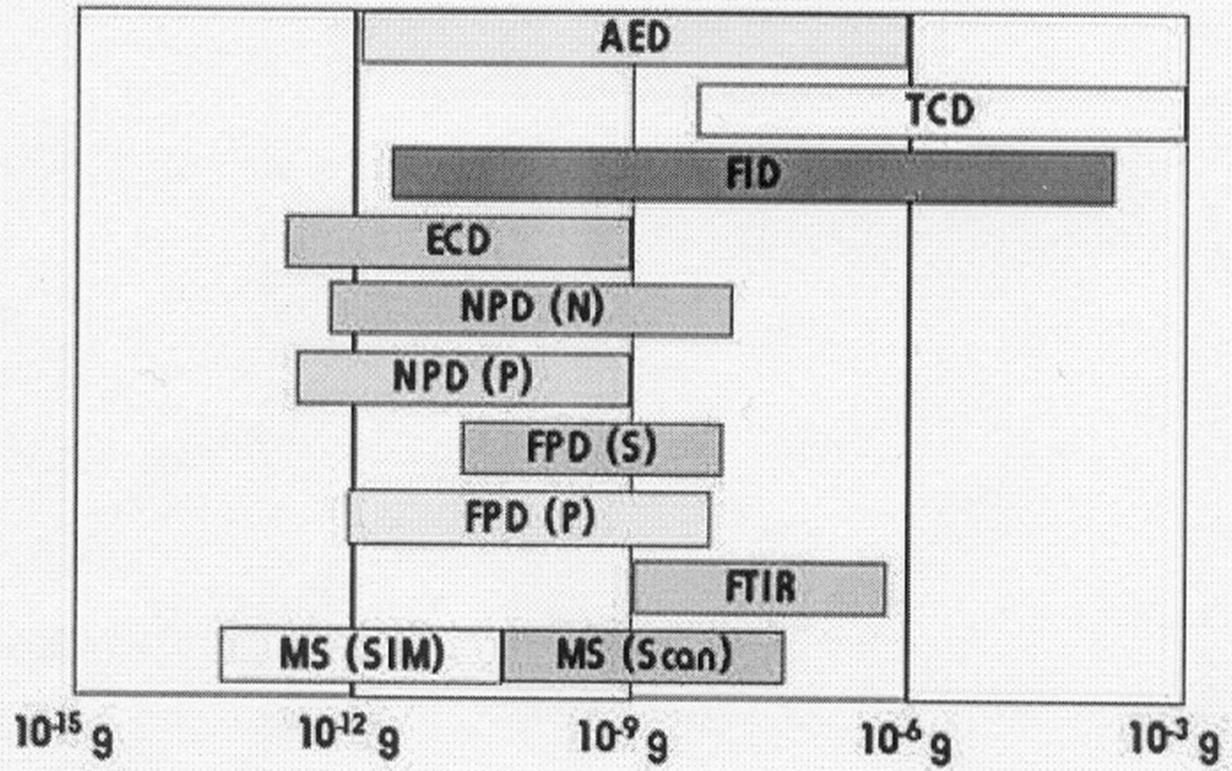
- ▶ L'atomizzatore può essere a fiamma o 'flameless' (a fornetto di grafite): in entrambi i casi ci possono essere interferenze dovute alla matrice.
- ▶ Modificanti chimici vengono impiegati per diminuire la volatilità degli analiti o aumentare la volatilità della matrice.

- ▶ **Atomizzatore a fiamma:**
bassa sensibilità Mn a 279.5: 0.052 mg/L
elevato consumo di campione (3–5 mL min⁻¹).
- ▶ **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 ifenati**.

SPETTROMETRIA DI MASSA

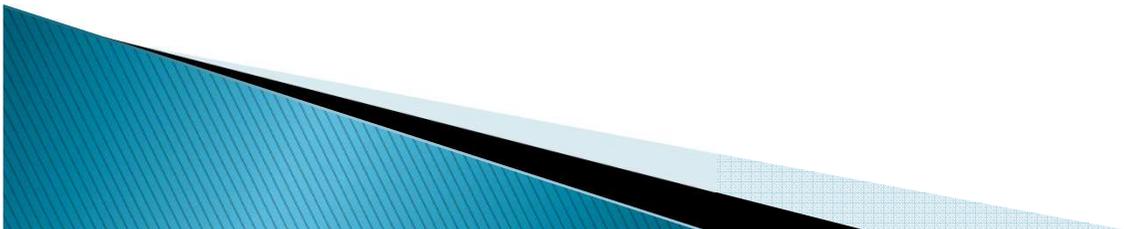
- ▶ La **spettrometria di massa (MS)** si basa sulla generazione di **ioni gassosi** dalle molecole di analiti.
- ▶ Gli ioni vengono poi separati sulla base del loro diverso **rapporto massa/carica (m/z)**.
- ▶ Il detector registra lo **spettro** che è un diagramma dell'abbondanza relativa degli ioni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

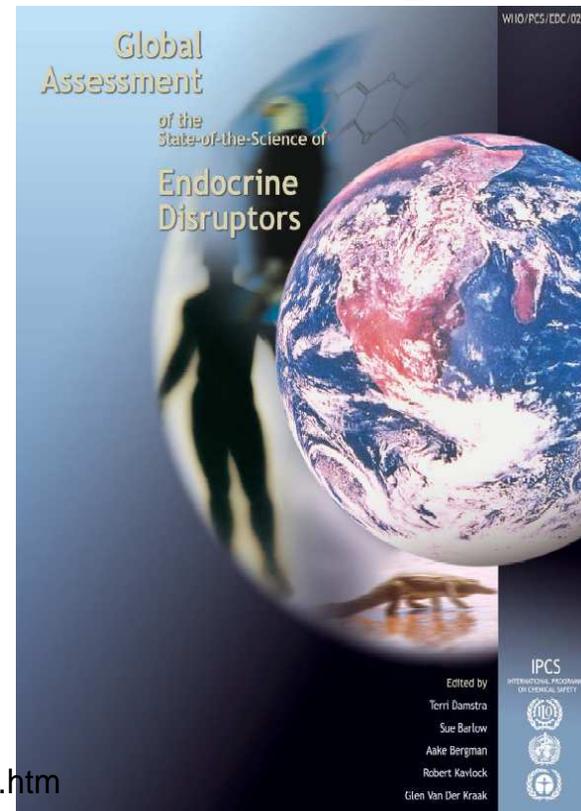


I composti potenzialmente attivi sul sistema endocrino: *endocrine disruptors*

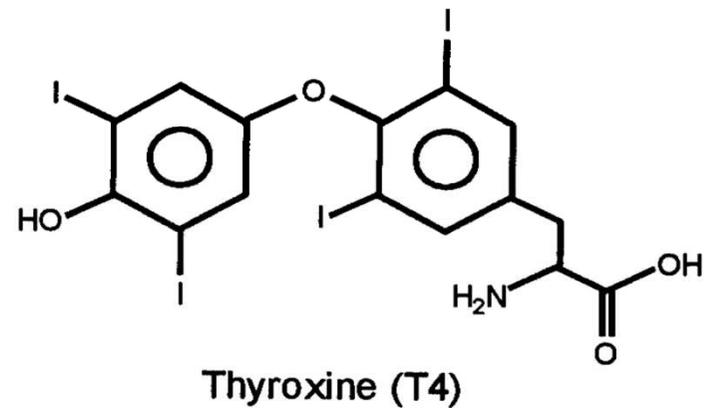
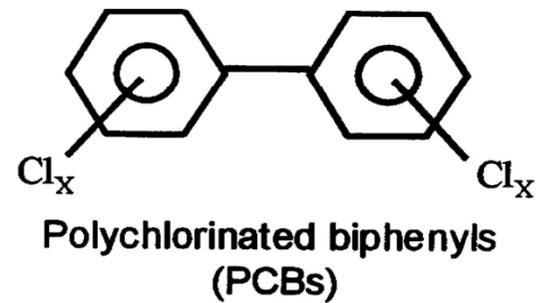
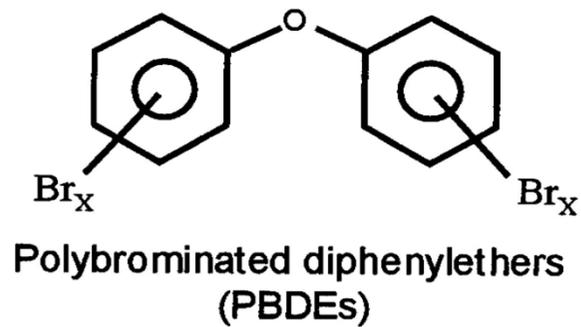
GLOBAL ASSESSMENT OF
THE STATE-OF-THE-SCIENCE
OF ENDOCRINE DISRUPTORS

WHO, ILO, UNEP - August 2002

http://www.who.int/pcs/emerg_site/edc/global_edc_TOC.htm



PBDE structure is similar to PCBs and thyroid hormone



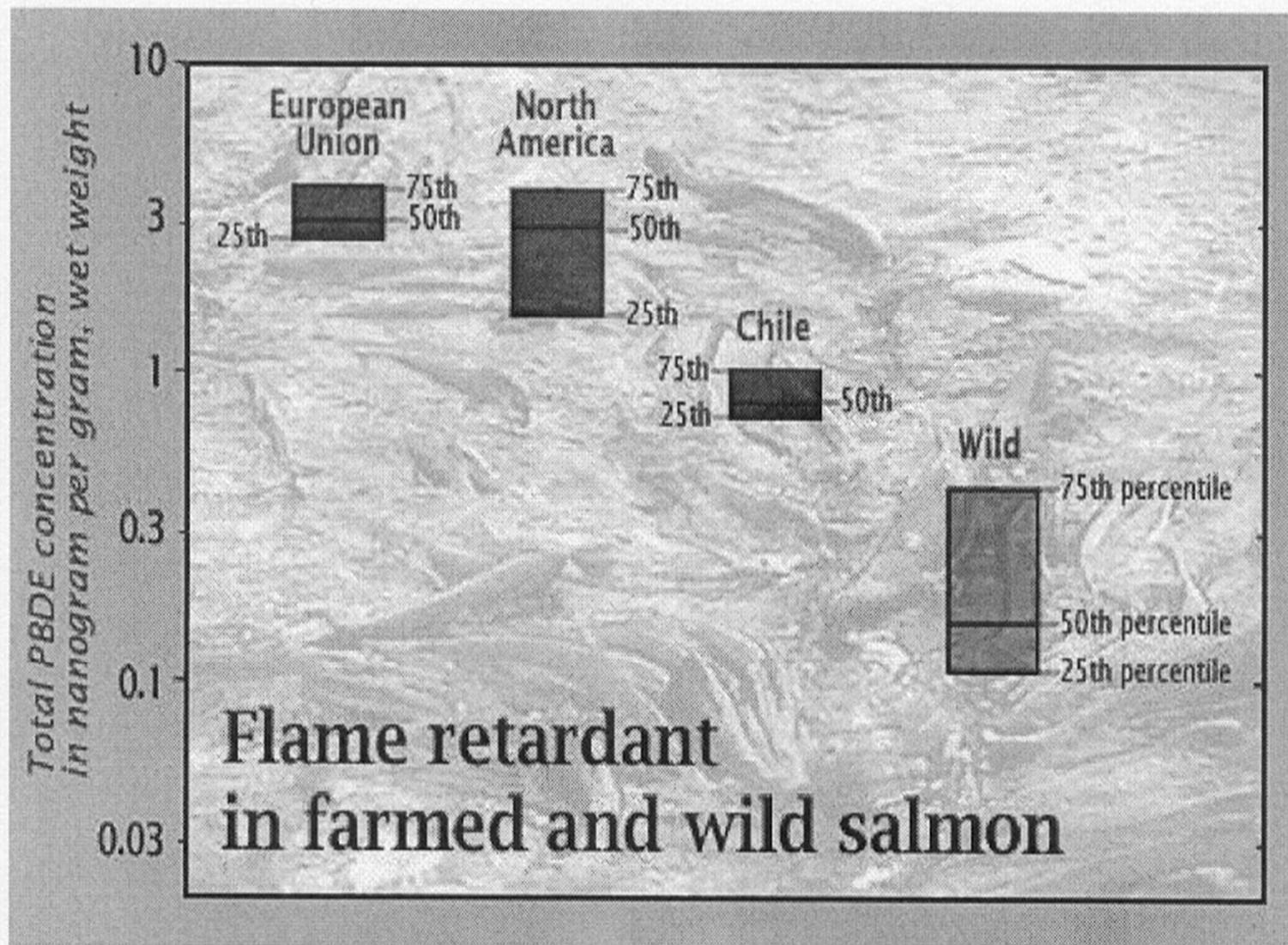


Table 1. Concentrations (ng/g lipid weight) of PBDE congeners identified in human milk from the Faroe Islands. The samples were pooled with 10 mothers in each pool.

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

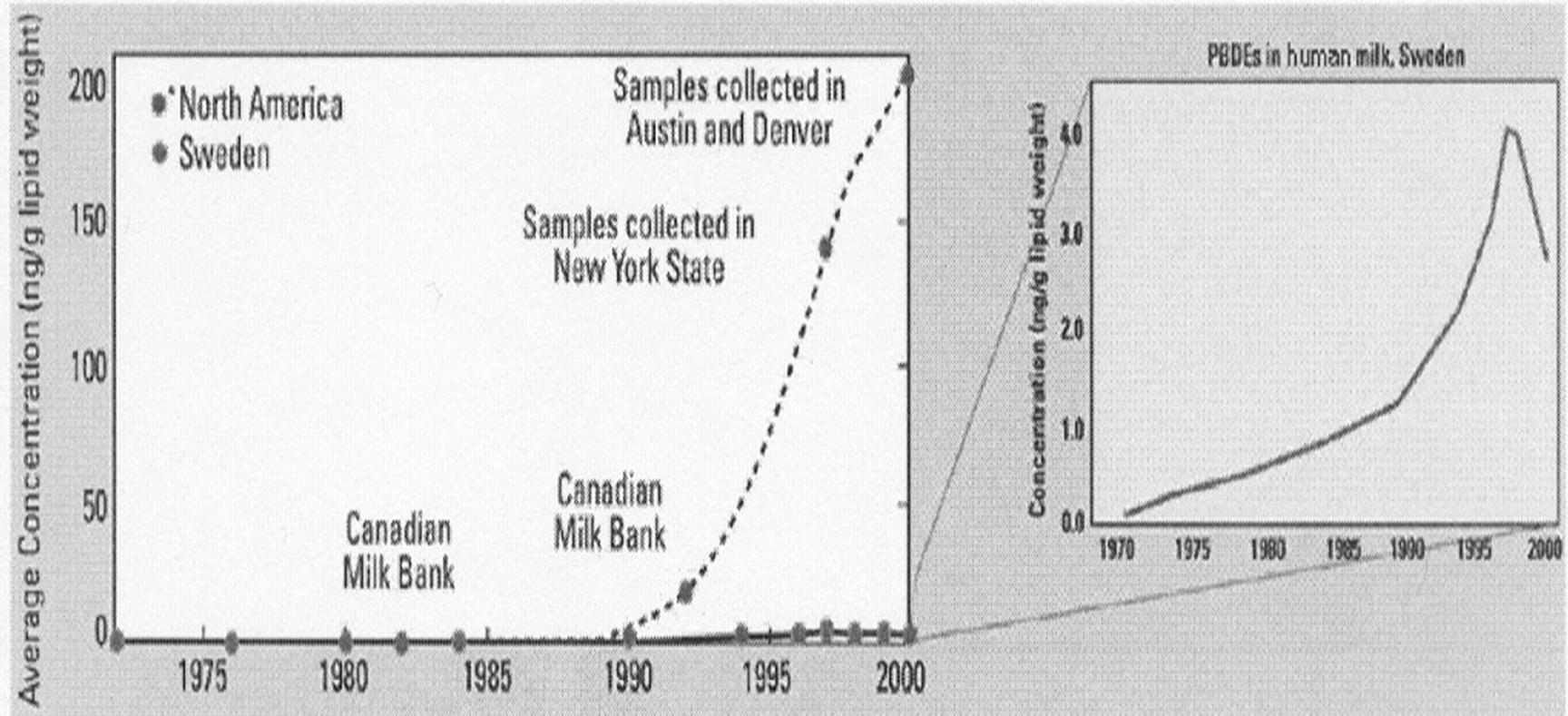


Figure 1. PBDEs in human milk: North America versus Europe. In the mid-1990s, documentation of the rapidly rising levels of brominated flame retardants in the breast milk of Swedish women led to sharply reduce usage, and eventually a ban, on many PBDE formulations. Now preliminary North American data 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



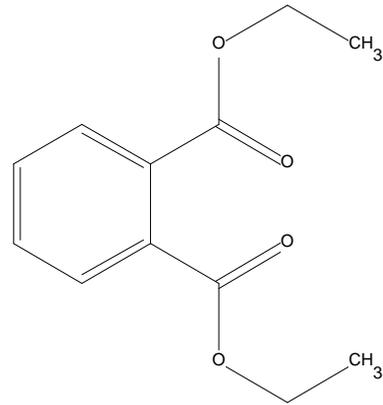
900.000 tonnellate:

plastificanti

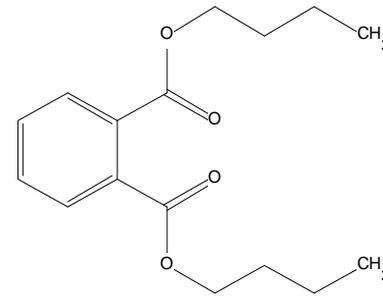


Gli ftalati

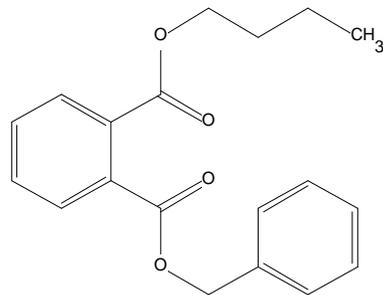
DEP



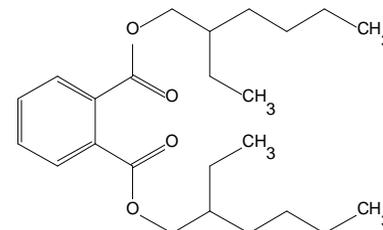
DnBP



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 μm film thickness.

- Iniettore:

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

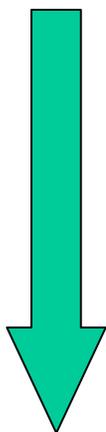
Setto Merlin MicroSeal High Pressure™

- Software:

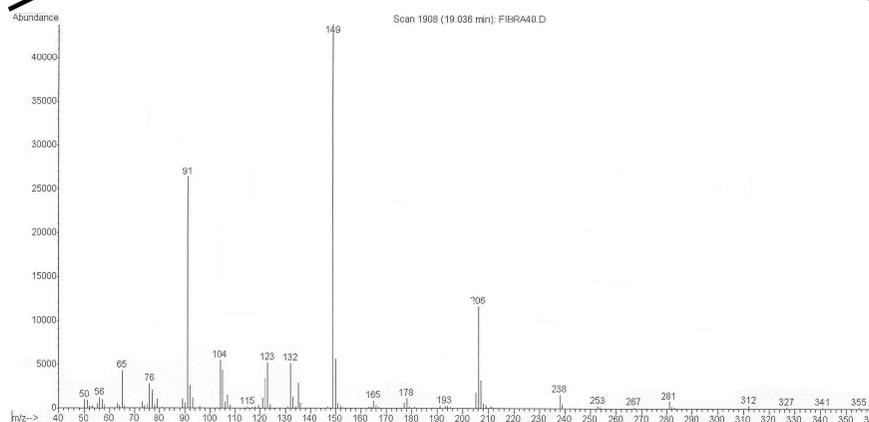
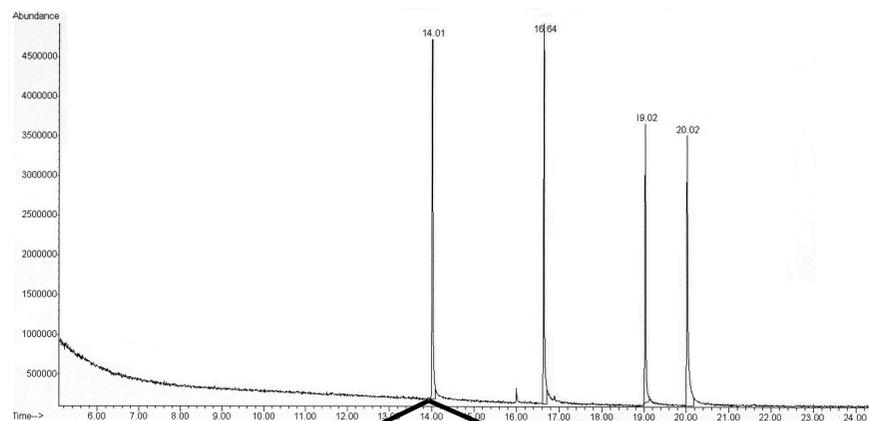
Agilent Enhanced Chemstation

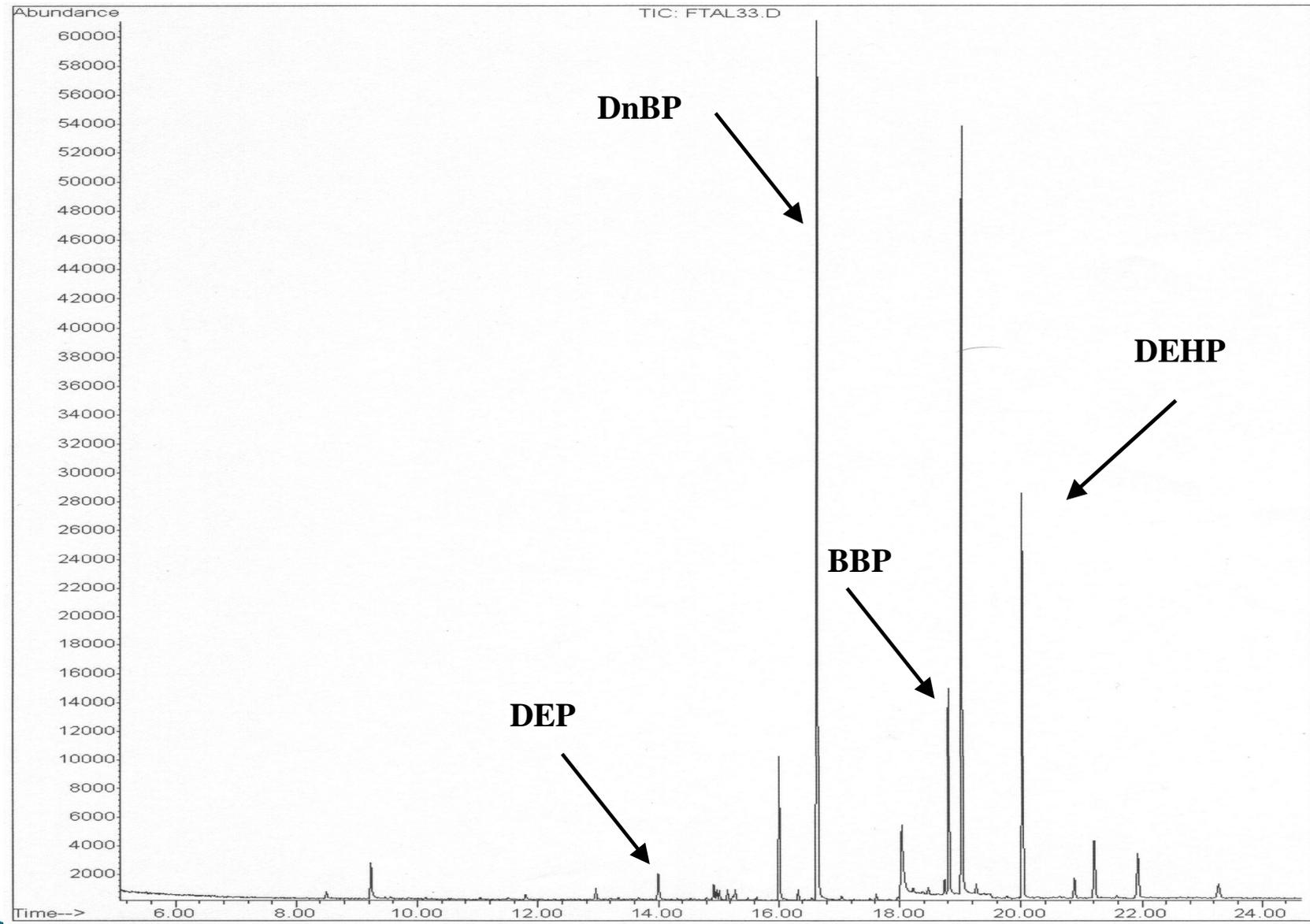
Tecniche analitiche impiegate: GC-MS

Gascromatografia



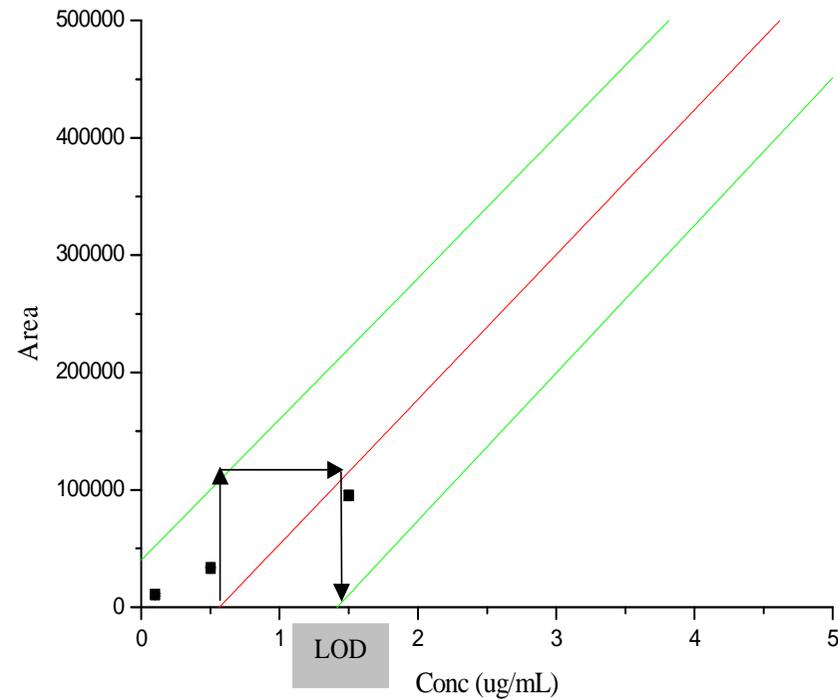
Spettrometria di massa





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