

ALLEGATO 1

Metodiche di analisi per la determinazione di metalli pesanti, idrocarburi policiclici aromatici (IPA) e policlorobifenili (PCB) in latte e muscolo

Valutazione dei metalli pesanti

I metalli pesanti (cromo-Cr, nickel-Ni, zinco-Zn, arsenico-As, cadmio-Cd e piombo-Pb) ad eccezione del mercurio (Hg) sono stati determinati mediante spettrometria di massa a plasma accoppiato induttivamente (ICP-MS) in accordo con Lo Dico et al. (2015) e convalidati secondo Lo Dico et al. (2018).

Circa 1 g dei campioni sono stati trasferiti in contenitori di PTFE (politetrafluoroetilene) precedentemente decontaminati con 3 ml di acido nitrico ultra puro al 65% (V/V) e 5 ml di acqua. La digestione dei campioni è stata effettuata utilizzando un digestore a microonde Multiwave 3000 (Anton-Paar, Graz, Austria).

Gli estratti sono stati diluiti a 50 ml, filtrati e analizzati dalla serie 7700x ICP-MS (Agilent Technologies, Santa Monica CA, USA). Il campione estratto è stato pompato da una pompa peristaltica da tubi disposti su un autocampionatore ASX-500 Series (Agilent Technologies, Santa Monica (CA), USA), combinato con una camera di nebulizzazione ciclonica al quarzo (raffreddata ad acqua a 2° C).

Per questa prova, è stato utilizzato un pool di campioni digeriti ed è stata realizzata una curva di calibrazione per valutare la linearità con 8 punti standard (BlankCal – 0,01 – 0,05 – 0,1 – 0,5 - 1 - 1 - 5 - 10 - 50 µg/l).

Nelle tabelle 1 e 2 sono riportati i parametri di convalida per il rilevamento ICP-MS in carne (tabella 1) e latte (tabella 2).

Tabella 1. Parametri di convalida per il rilevamento ICP-MS nella carne.

Metalli	LOD (mg/Kg)	LOQ (mg/Kg)	Ripetibilità (mg/Kg)	Recupero %	Range di Applicabilità (mg/Kg)	Incertezza Estesa
Cromo (Cr)	0,07	0,09	0,02	106,3	0,1-2,5	±0,04
Nichel (Ni)	0,05	0,06	0,133	92,0	0,10-25,0	±0,26
Zinco (Zn)	0,067	0,079	0,682	94,0	0,10-25,0	±1,81
Arsenico (As)	0,003	0,004	0,0016	100,3	0,005-0,500	±0,006
Cadmio (Cd)	0,003	0,004	0,0002	102,0	0,005-0,500	±0,002
Piombo (Pb)	0,0033	0,0036	0,0016	100,3	0,005-0,500	±0,006

Tabella 2. Parametri di validazione per il rilevamento ICP-MS nel latte.

Metalli	LOD (mg/Kg)	LOQ (mg/Kg)	Ripetibilità (mg/Kg)	Recupero %	Range di Applicabilità (mg/Kg)	Incertezza Estesa
Cromo (Cr)	0,07	0,09	0,02	106,3	0,1-2,5	±0,04
Nichel (Ni)	0,05	0,06	0,133	92,0	0,10-25,0	±0,26
Zinco (Zn)	0,067	0,079	0,090	94,0	0,10-25,0	±0,22
Arsenico (As)	0,0028	0,0035	0,0015	99,7	0,050-0,500	±0,002
Cadmio (Cd)	0,0011	0,0013	0,0013	100,3	0,002-0,500	±0,001
Piombo (Pb)	0,0026	0,0028	0,0013	100,3	0,008-0,500	±0,001

Per la rilevazione di Mercurio (Hg) sono state prelevate delle aliquote dal campione scongelato e omogeneizzate. Le aliquote di $0,09 \pm 0,01$ g (p/p) di ogni campione sono state aggiunte in barchette di nichel e introdotte in un analizzatore diretto DMA-80[®] (Milestone, Bergamo, Italia). Il DMA-80 si basa sui principi della decomposizione termica del campione, dell'amalgama del mercurio e della rilevazione dell'assorbimento atomico. La quantità di mercurio presente nei campioni è stata rilevata e quantificata secondo curve di calibrazione di 5 punti di concentrazione (0,050-2 mg/Kg). Gli standard per la calibrazione dello strumento sono stati preparati sulla base di una soluzione di riferimento mono-elemento certificata ICP standard (VWR, Milano, Italia). Il mercurio è stato misurato quantitativamente mediante assorbimento atomico a 253,65 nm. Nella tabella 3 sono riportati i parametri di convalida per la rilevazione del mercurio (Hg) in carne e latte.

Tabella 3. Parametri di convalida per la rilevazione DMA-80 di Mercurio (Hg) nella carne e nel latte.

Matrice	LOD (mg/Kg)	LOQ (mg/Kg)	Ripetibilità (mg/Kg)	Recupero %	Range di Applicabilità (mg/Kg)	Incertezza Estesa
Carne	0,041	0,050	0,021	103	0,050-2,00	±0,020
Latte	0,041	0,050	0,021	103	0,050-2,00	±0,020

Idrocarburi policiclici aromatici (IPA) e policlorobifenili (PCB)

Nel presente studio sulla contaminazione alimentare è stato considerato essenziale valutare i POP. In questo caso, sono stati considerati gli IPA e i PCB, essendo questi tra le specie di inquinanti più rappresentative di aree vicine alle raffinerie di petrolio. Essendo una specie idrofoba e altamente lipofila, la valutazione del loro bioaccumulo nel grasso animale (e nel latte) può portare ad una corretta stima dello stato di contaminazione alimentare. La determinazione degli IPA e dei PCB è stata condotta in gas-cromatografia con rivelatore a spettrometria di massa a triplo e quadruplo con iniettore PTV split / splitless.

Valutazione degli IPA

Estrazione e purificazione dei campioni

Per l'estrazione è stata prelevata un'aliquota di $5,00 \pm 0,10$ g di campione omogeneizzato e pesato in una provetta monouso da 50 ml da una bilancia analitica. Alla stessa provetta sono stati aggiunti 50 μ l di miscela SI IPA (B (a) A-d12 e B (a) P-d12) a 100 μ g/l (preparati al momento dell'uso) e una miscela di sali tampone per la fase di estrazione (SUPELCO Acetate Extraction Tube cat. 55234-U o equivalente). Il campione è stato centrifugato per 5 minuti ad una velocità di 4000 rpm. Il surnatante formatosi è stato trasferito, per la purificazione, in una provetta da centrifuga da 15 ml contenente la fase di purificazione (SUPELCO QuE Z-Sep / C18 Cleanup Tube cat. 55401-U o equivalente) e mescolato per un minuto per poi essere centrifugato nuovamente per 5 minuti ad una velocità di 4000 rpm. Dopo aver rimosso di nuovo tutto il surnatante, è stato trasferito in un tubo di vetro da 10 ml ed evaporato a secco in un flusso di azoto ad una temperatura di 30-35°C. Il residuo formatosi purificato è stato poi recuperato con 500 μ l di siringa standard Chrysene-d12 a 10 μ g/l preparata al momento dell'uso e trasferito in fiale ambrate da 2 ml con inserto conico per autocampionatore GC.

Analisi GC/MS-MS

Per eseguire il rilevamento è stato utilizzato un analizzatore automatico GC / MSMS (Thermo Scientific TSQ Quantum XLS Triple Quadrupole GC / MSMS). Nello strumento sono stati inseriti un'aliquota di 2 μ l e uno standard di controllo a 10 μ g/l (standard di calibrazione: 1-2-5-10-20-50-100 μ g/l). Per il calcolo della concentrazione dell'analita nella matrice è stato calcolato un fattore di conversione pari a 0,5 / Peso del campione. In tabella 4 si riportano i parametri di convalida per la rilevazione GC/MS-MS di IPA nella carne e nel latte.

Tabella 4. Parametri di convalida per la rilevazione GC/MS-MS di IPA nella carne e nel latte.

Matrice	LOD (μ g/Kg)	LOQ (μ g/Kg)	Ripetibilità (μ g/Kg)	Recupero %	Range di Applicabilità (μ g/Kg)	Incertezza estesa
Carne	0,20	0,50	0,06	75	0,50-10	$\pm 0,21$
Latte	0,20	0,50	0,06	75	0,50-10	$\pm 0,21$

Valutazione dei PCB

Estrazione e purificazione dei campioni

Un'aliquota di $10,00 \pm 0,10$ g di campione è stata pesata in un tubo monouso da 50 ml ed omogeneizzata per l'estrazione. Successivamente sono stati aggiunti 10 ml di acetato di etile e, dopo aver agitato per 5 minuti, si è aggiunta la miscela di sali tampone per la fase di estrazione (SUPELCO Acetato Extraction Tube cat. 55234-U o equivalente), a questo punto la provetta è stata prima agitata per 30 minuti e poi centrifugata per circa 5 minuti ad una velocità di 4000 rpm. Il surnatante è stato successivamente trasferito in una provetta di vetro da 10 ml ed evaporato a secco in un flusso di azoto a $T=40-45 \pm 5$ °C. Pesati circa $0,2 \pm 0,01$ grammi di grasso, 20 μ l di PCB198 standard interno sono stati aggiunti a 10 μ g/l e 2 ml di esano e mescolati dal vortex. Due cartucce sono state preparate per la purificazione del campione:

- una cartuccia di silice SPE a cui sono stati aggiunti 4 ml di esano
- una cartuccia Extrelut NT3 acidificata con 3 ml di acido solforico (95-98%)

Entrambe le cartucce sono state lasciate a bagno per un'ora. Le cartucce di silice SPE sono state lavate con 5 ml di esano, scartando l'eluato e avendo cura di mantenere uno strato di almeno 1

cm. L'estratto sulla cartuccia di silice SPE è stato caricato, la provetta è stata lavata con 1,5 ml di esano e trasferita nella parte superiore della colonna Extrelut e quindi lasciata a contatto per circa 10 minuti. Dopo l'eluizione con 10 ml di esano, l'eluato è stato prima raccolto in provette da 10 ml ed evaporato a secco in un flusso di azoto, poi prelevato con 500 µl di Standard Surrogate PCB 155 a 0,4 µg/l (preparato al momento dell'uso). Infine, trasferito in una fiala da 2 ml con un inserto conico, il grasso purificato è stato inserito nell'autocampionatore GC.

Analisi GC/MS-MS

Per eseguire il rilevamento è stato utilizzato un analizzatore automatico GC / MSMS (Thermo Scientific TSQ Quantum XLS Triple Quadrupole GC / MSMS). Nello strumento sono stati inseriti un'aliquota di 2 µl e uno standard di controllo a 0,4 µg/l (standard di calibrazione: 0,10 - 0,20 - 0,40 - 0,80 - 1,6 - 3,2 µg/l). Per il calcolo della concentrazione dell'analita nella matrice è stato calcolato un fattore di conversione pari a 0,5/peso del grasso. In tabella 5 si riportano i parametri di convalida per il rilevamento GC/MS-MS di PCB nella carne e nel latte.

Tabella 5. Parametri di convalida per il rilevamento GC/MS-MS di PCB nella carne e nel latte.

Matrice	LOD (ng/g)	LOQ (ng/g)	Ripetibilità (ng/g)	Recupero %	Range di Applicabilità (µg/Kg)	Incertezza Estesa
Carne	0,25	0,50	0,29	93	0,50-8	±0,58
Latte	0,25	0,50	0,29	93	0,50-8	±0,58

Bibliografia

-Helsel, D.R. (2005). *Nondetects and Data Analysis: Statistics for Censored Environmental Data*. John Wiley & Sons, Hoboken, NJ, USA.

-Lo Dico, G.M., Camilleri, G., Macaluso, A., Vella, A., Giangrosso, G., Vazzana, M., Ferrantelli, V. (2015). Simultaneous determination of As, Cu, Cr, Se, Sn, Cd, Sb and Pb levels in infant formulas by ICP-MS after microwave-assisted digestion: Method validation. *J. Environ. Anal. Toxicol*, 2015, 5, 1-5. doi:10.4172/2161-0525.1000328

-Lo Dico, G.M., Galvano, F., Dugo, G., D'Ascenzi, C., Macaluso, A., Vella, A., Giangrosso G., Camilleri, G., Ferrantelli, V. (2018). Toxic metal levels in cocoa powder and chocolate by ICP-MS method after microwave-assisted digestion food Chem. 245, 1163-1168. doi:10.1016/j.foodchem.2017.11.052