

### **ALLEGATO 3**

#### **Metodiche analitiche BIOTA (metalli e organica)**

##### **Metalli in traccia**

La determinazione delle concentrazioni dei metalli nei campioni di biota è stata effettuata utilizzando uno spettrometro di massa con sorgente al plasma (ICP-MS, iCAPQ Thermo Fisher Scientific), previa liofilizzazione e mineralizzazione dei campione.

I campioni sono stati liofilizzati (tramite LIO-5PASCAL) e successivamente polverizzati in un mortaio d'agata. Un'aliquota di circa 0,25 gr di campione, liofilizzato e pestato, è stata posta in vessels di quarzo e sottoposta a digestione acida (8ml di HNO<sub>3</sub>) per mezzo di un mineralizzatore (Discover CEM).

Le analisi quantitative sono state condotte utilizzando una curva di calibrazione esterna costruita interpolando le letture di un bianco e di 4-8 standard a concentrazione nota ottenuti per diluizione da soluzioni a concentrazione certificata.

I parametri operativi dello strumento sono stati scelti in modo da ottenere il massimo rapporto segnale/rumore e gli isotopi da determinare sono stati selezionati con priorità in base alla maggiore abbondanza isotopica percentuale e comunque valutando l'incidenza delle interferenze. Tutte le procedure di preparazione ed analisi dei campioni sono state effettuate utilizzando cappe chimiche, materiale plastico preventivamente pulito, reagenti con alto grado di purezza (*ultragate for trace elements analysis*), in modo da limitare al massimo il rischio di contaminazione del campione. La precisione analitica, calcolata sulla base della deviazione standard associata a tre letture consecutive eseguite per ciascun campione (RSD%; n=3) è in media migliore del 6%. L'accuratezza della procedura di preparazione e della metodica analitica è stata messa a punto e validata utilizzando degli standard di riferimento internazionale (Reference Standard Material, RSM), TORT-2 Lobster hepatopancreas; DORM-4 fish protein). Il valore dello standard, calcolato come differenza % tra il valore trovato e quello certificato, varia tra 0,5-10% (metodo interno).

##### **Mercurio**

L'analisi dei campioni biologici è avvenuta mediante lo spettrofotometro DMA-80 (Direct-Mercury-Analyzer Tricell) seguendo la procedura EPA 7473. Circa 0,05 gr di campione secco è stato pesato, direttamente sulle navicelle in nickel, con una bilancia analitica a quattro cifre decimali ed introdotto nella fornace del DMA-80 dove è stato decomposto

termicamente in corrente d'ossigeno. Al fine di prevenire la contaminazione da Hg, tutti gli strumenti impiegati sono stati precedentemente lavati con HNO<sub>3</sub> (10%) e sciacquati per tre volte con acqua MilliQ. Un materiale certificato (TORT-2; valore certificato di THg = 0,27±0,06 µg g<sup>-1</sup>) è stato analizzato al fine di testare l'accuratezza analitica (stimata essere 1%) e la precisione ( 2% dev. st., n = 5) (Falco et al., 2016).

### **Idrocarburi Policiclici Aromatici**

Gli Idrocarburi Policiclici Aromatici (IPA) sono estratti da campioni di biota con una miscela di Esano:Acetone 80:20, concentrati a circa 1 ml, sottoposti a procedura di saponificazione e purificati su colonna di gel di silice ed analizzati in GC-MS in modalità SIM. La procedura prevede lo spiking del campione in fase di preparazione con standard di estrazione (SS) composto da sette IPA deuterati, ed interno (IS) composto da tre IPA deuterati, in grado di monitorare i valori del recupero dei diversi analiti nelle varie fasi di lavoro (estrazione, purificazione ed analisi).

Procedimento:

La prima fase prevede un'estrazione mediante ASE 200 (Accelerated Solvent Extractor Dionex) secondo il metodo EPA 3545 A (pressurized fluid extraction).

1g di campione liofilizzato, pesato con la precisione di ± 0,01g, viene trasferito insieme a 2g di terra di diatomee in un tubo d'estrazione in acciaio da 33 mL per ASE a cui viene aggiunto 1 ml di standard SS. Si sottopone ad estrazione accelerata con una miscela Esano- Acetone 80:20 per pesticidi (miscela estraente)

L'estratto raccolto in un tubo in vetro pyrex con tappo in PTFE e sotto tappo in Teflon, viene aggiunto di 20 ml di una soluzione di Idrossido di Sodio 6 M e agitato vigorosamente per un minuto mediante vortex manuale. Dopo essere stato centrifugato per 5 minuti a 3000 rpm viene recuperata la parte organica contenente il campione. Questa fase viene ripetuta due volte.

L'estratto delipidizzato, raccolto in una vial in vetro scuro da 40 ml viene completamente portato a secco mediante TurboVap II sotto corrente di azoto anidro. Si effettua il cambio di solvente aggiungendo 1 ml di Cicloesano per pesticidi.

Si effettua una purificazione del campione secondo metodo EPA 3630 C (Silica gel clean up): l'estratto viene trasferito su colonna di gel di silice contenente uno strato di sodio solfato anidro di 1 cm (previamente attivata con 25 ml di esano per pesticidi) ed eluito prima con 10

ml di esano che vengono scartati, e successivamente con 20 ml di una miscela Cicloesano÷Acetone 70:30 che vengono raccolti in una vial e concentrati a circa 1 ml. L'eluato è infine trasferito in una vial da 1 ml per autocampionatore dove è portato completamente a secco mediante corrente di azoto e ripreso con 400 µl della miscela standard IS.

1 µl di tale soluzione è iniettato al GC-MS in modalità SIM (metodo EPA 8270D: semivolatile organic compounds by gas chromatography/mass spectrometry GC/MS)

#### *Condizioni gas-cromatografiche*

Temperatura Max di esercizio della colonna: 350°C

Gas di trasporto: He; Flusso: 1,2 ml/min

Modalità Iniezione:

Splitless

Splitless time: 1,50 min

Temperatura Iniettore: 280°C.

Temperatura Sorgente: 280°C.

Programmata termica del Forno

	15°C/min.		7°C/min.	
80°C	-----	200°C	-----	305°C
1,5min.				10 min.

Run Time: 34,50 minuti      Volume di iniezione: 1µl.

#### **Policlorobifenili (PCB)**

I Policlorobifenili (PCB) sono estratti da campioni di muscolo di pesce liofilizzato e pestato, con una miscela di Esano ÷ Acetone 80:20, concentrati a circa 1 ml, purificati su colonna Florisil ed analizzati in GC-Ion Trap in modalità MS-MS.

La procedura prevede lo spiking del campione in fase di preparazione con standard di estrazione(SS)composto da PCB-105 C<sup>13</sup> ed interno (IS) composto da PCB-209, in grado di monitorare i valori del recupero dei diversi analiti nelle varie fasi di lavoro (estrazione, purificazione ed analisi).

#### *Procedimento*

La prima fase prevede un'estrazione mediante ASE 200 (Accelerated Solvent Extractor Dionex) secondo il metodo EPA 3545 A (pressurized fluid extraction).

1g di campione liofilizzato, pesato con la precisione di  $\pm 0,01g$ , viene trasferito insieme a 2g di terra di diatomee in un tubo d'estrazione in acciaio da 33 mL per ASE a cui viene aggiunto 1 ml di standard SS. Si sottopone ad estrazione accelerata con una miscela Esano- Acetone 80:20 per pesticidi (miscela estraente).

L'estratto raccolto in un tubo in vetro pyrex con tappo in PTFE e sotto tappo in Teflon, viene aggiunto di 20 ml di una soluzione di Idrossido di Sodio 6 M e agitato vigorosamente per un minuto mediante vortex manuale. Dopo essere stato centrifugato per 5 minuti a 3000 rpm viene recuperata la parte organica contenente il campione. Questa fase viene ripetuta due volte.

L'estratto delipidizzato, raccolto in una vial in vetro scuro da 40 ml viene completamente portato a secco mediante TurboVap II sotto corrente di azoto anidro Si riprende il campione con 1 ml una miscela Esano: Isoottano 1:1 per pesticidi.

Si effettua una purificazione del campione secondo metodo EPA 3620C (florisil clean up): l'estratto viene trasferito su colonna Florisil da 1g-6ml contenente uno strato di sodio solfato anidro di 1 cm (previamente attivata con 10 ml di esano per pesticidi) ed eluito con 20 ml di Esano: isottano 1:1 che vengono raccolti in una vial e concentrati a circa 1 ml. L'eluato è infine trasferito in una vial da 1 ml per autocampionatore dove è portato completamente a secco mediante corrente di azoto e ripreso con 600  $\mu$ l della miscela standard IS.

1  $\mu$ l di tale soluzione è iniettato al GC-Ion trap in modalità ms-ms (**metodo EPA 8081-2007**: Organochlorine pesticides by gas-chromatography).

Condizioni gascromatografiche

Temp. Max di esercizio della colonna: 350°C

Gas di trasporto: He; Flusso: 1,4 ml/min

Modalità Iniettore: Splitless; Splitless time 1.50 min; Temp. Iniettore: 250°C.

Temp. Detector: 300°C.

Programmata termico del Forno:

	18°C/min.	10°C/min.	50°C/min.
70°C	-----	170°C -----	300°C -----315°C
1min.			7.14min

Volume di iniezione: 1 $\mu$ l.

## Bibliografia

- Falco, F., Salvagio Manta, D., Bonsignore, M., Mazzola, S. (2016). Determinazione di mercurio mediante DMA-80. Technical Report. IAMC-CNR, Capo Granitola <http://eprints.bice.rm.cnr.it/id/eprint/13783>
- **method EPA 3545 A** “pressurized fluid extraction”
- **method EPA 3630 C** “Silica gel clean up”
- **method EPA 8270D** “semivolatile organic compounds by gas chromatography/mass spectrometry GC/MS”
- **method EPA 3620C** “florisil clean up”
- **method EPA 8081-2007** “Organochlorine pesticides by gas-chromatography”