



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MESSINA
DIPARTIMENTO DI SCIENZE CHIMICHE, BIOLOGICHE,
FARMACEUTICHE ED AMBIENTALI
DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE CHIMICHE
DOCTOR OF PHILOSOPHY IN CHEMICAL SCIENCES
SSD CHIMICA ANALITICA (CHIM/01)

**Sviluppo di metodiche cromatografiche multidimensionali
per l'analisi di contaminanti alimentari**

**Development of multidimensional chromatographic
methods for the analysis of food contaminants**

Tesi di dottorato di:
Alessia ARENA

Tutor:
Chiar.mo Prof. Mariosimone ZOCCALI

Coordinatore:
Chiar.ma Prof.ssa Concetta DE STEFANO

XXXVI CICLO (AA 2022-2023)

INDICE

	Pag.
Scopo del lavoro di ricerca	9
Aim of the research project	10

CAPITOLO 1

LA GREEN ANALYTICAL CHEMISTRY

1.0 Introduzione	13
1.1 I principi cardine di GC e GAC	13
1.0 Preparazione del campione <i>green</i>	18
Riferimenti Bibliografici	20

CAPITOLO 2

ACCOPIAMENTO MULTIDIMENSIONALE TRA CROMATOGRAFIA LIQUIDA E GASSOSA

2.0 Introduzione	22
2.1 Tecniche di trasferimento	24
2.1.1 <i>Retention Gap</i>	25
2.1.2 <i>Vaporizing chamber</i>	31
2.2 Applicazioni	36
2.3 Conclusioni	39
Riferimenti Bibliografici	40

CAPITOLO 3

GASCROMATOGRAFIA BIDIMENSIONALE *COMPREHENSIVE*

3.0 Introduzione	47
3.1 Principi teorici	48
3.2 Aspetti strumentali	51
3.2.1 Combinazioni di colonne	54
3.2.2 Modulatori	56
3.2.2.1 Modulatori <i>heater-based</i>	57

3.2.2.2 Modulatori <i>cryo-based</i>	60
3.3 Rivelatori	64
3.3.1 Rivelatore a ionizzazione di fiamma	64
3.3.2 Spettrometria di massa	65
3.4 Conclusioni	70
Riferimenti Bibliografici	71

CAPITOLO 4

I CONTAMINANTI ALIMENTARI

4.0 Introduzione	76
4.1 Idrocarburi minerali	79
4.1.1 Fonti di contaminazione	81
4.1.2 Tossicità e legislazione	82
4.2 Ftalati	83
4.2.2 Tossicità e legislazione	85
4.3 Pesticidi	86
4.3.1 Fonti di contaminazione	86
4.3.2 Tossicità e legislazione	87
4.4 Idrocarburi policiclici aromatici	88
4.4.1 Fonti di contaminazione	89
4.4.2 Tossicità e legislazione	90
Riferimenti Bibliografici	93
Sezione Sperimentale	100

CAPITOLO 5

ANALISI DELLA CONTAMINAZIONE DA OLI MINERALI MEDIANTE CROMATOGRAFIA MULTIDIMENSIONALE LC-GC

5.1 Investigazione della contaminazione da idrocarburi minerali in integratori alimentari ricchi in acidi grassi omega-3	
5.1.1 Introduzione	103
5.1.2 Parte sperimentale	104

5.1.2.1 Reagenti	104
5.1.2.2 Preparazione del campione	105
5.1.2.3 Strumentazione analitica	105
5.1.2.4 Standard interni e quantificazione	106
5.1.3 Risultati e discussioni	109
5.1.4 Conclusioni	113
Riferimenti Bibliografici	114
5.2 Determinazione della contaminazione da idrocarburi minerali in oli essenziali agrumari	
5.2.1 Introduzione	117
5.2.2 Parte sperimentale	118
5.2.2.1 Reagenti	118
5.2.2.2 Preparazione del campione	118
5.2.2.3 Strumentazione analitica	119
5.2.2.4 Analisi GC-MS	119
5.2.3 Risultati e discussioni	119
5.2.4 Conclusioni	126
Riferimenti Bibliografici	127

CAPITOLO 6

ANALISI DELLA CONTAMINAZIONE DA FTALATI IN OLI VEGETALI MEDIANTE GASCROMATOLOGRAFIA BIDIMENSIONALE *COMPREHENSIVE*

6.1 Introduzione	130
6.2 Parte sperimentale	132
6.2.1 Reagenti	132
6.2.2 Preparazione del campione	132
6.2.3 Strumentazione analitica	133
6.3 Risultati e discussioni	134
6.3.1 Ottimizzazione delle condizioni analitiche	134
6.3.2 Figure di merito	136
6.3.3 Analisi di campioni commerciali	138

6.3.4 Valutazione del livello di <i>greeness</i>	139
6.4 Conclusioni	140
Riferimenti Bibliografici	141

CAPITOLO 7

ANALISI DELLA CONTAMINAZIONE DA PESTICIDI IN OLI VEGETALI MEDIANTE GASCROMATOLOGRAFIA BIDIMENSIONALE COMPREHENSIVE

7.1 Determinazione di residui di pesticidi in oli extra vergine di oliva	
7.1.1 Introduzione	145
7.1.2 Parte sperimentale	148
7.1.2.1 Reagenti	148
7.1.2.2 Preparazione del campione	148
7.1.2.3 Strumentazione analitica	148
7.1.3 Risultati e discussioni	149
7.1.3.1 Figure di merito	158
7.1.3.2 Analisi di campioni commerciali	159
7.1.4 Conclusioni	160
Riferimenti Bibliografici	161
7.2 Determinazione di residui di pesticidi in olio di semi di canapa	
7.2.1 Introduzione	164
7.2.2 Parte sperimentale	166
7.2.2.1 Reagenti	166
7.2.2.2 Preparazione del campione	167
7.2.2.3 Strumentazione analitica	167
7.2.3 Risultati e discussioni	168
7.2.3.1 Figure di merito	169
7.2.3.2 Analisi di campioni commerciali	184
7.2.4 Conclusioni	185
Riferimenti Bibliografici	186

CAPITOLO 8

DETERMINAZIONE DI IDROCARBURI POLICICLICI AROMATICI IN OLI EXTRA VERGINE DI OLIVA MEDIANTE CROMATOGRAFIA MULTIDIMENSIONALE LC-GC

8.1 Introduzione	190
8.2 Parte sperimentale	191
8.2.1 Reagenti	191
8.2.2 Preparazione del campione	192
8.2.3 Strumentazione analitica	192
8.3 Risultati e discussioni	193
8.3.1 Ottimizzazione del metodo	193
8.3.2 Figure di merito	197
8.3.3 Analisi di campioni commerciali	200
8.4 Conclusioni	200
Riferimenti Bibliografici	201
Elenco delle pubblicazioni	203

Tutte le immagini sono state riprodotte con il permesso di Elsevier e The Royal Society of Chemistry.

Scopo del lavoro di ricerca

Sebbene i principali obiettivi durante lo sviluppo di un metodo analitico siano da sempre elevata selettività, sensibilità e velocità di analisi, gli anni 2000 videro l'introduzione del concetto di *Green Analytical Chemistry* (GAC) [1]. Da allora, una attenzione sempre crescente è stata rivolta all'ambiente ed in particolare è stata riconosciuta la crucialità dell'ottimizzazione di metodi analitici sostenibili che, in accordo con i principi della GAC, si ponessero come obiettivi la riduzione o eliminazione di solventi organici nocivi, la miniaturizzazione e automazione delle tecniche estrattive e la riduzione dei tempi di analisi [1].

Inoltre, dal momento che la contaminazione degli alimenti, sia di origine microbiologica che chimica, rappresenta la principale fonte di preoccupazione per i consumatori, continue ricerche vengono effettuate al fine di risalire alle fonti di contaminazione ed individuare le modalità per prevenirle. Grandi sforzi vengono costantemente dedicati allo sviluppo di strategie analitiche in grado di rilevare e identificare contaminanti, generalmente presenti in tracce.

Pertanto, il mio lavoro di ricerca, presentato in questo elaborato di tesi, si è incentrato sullo sviluppo di tecniche analitiche multidimensionali, precedute da protocolli semplificati di preparazione del campione, per l'analisi di xenobiotici alimentari. Le tecniche multidimensionali impiegate durante il triennio di dottorato sono state: cromatografia liquida accoppiata *on-line* alla gascromatografia (LC-GC) e gascromatografia bidimensionale *comprehensive* accoppiata a spettrometria di massa tandem (GC×GC-MS/MS). In particolare, facendo ricorso all'LC-GC, la cromatografia liquida fornisce una preparazione del campione altamente selettiva che consente di eliminare le interferenze presenti in una miscela complessa ed isolare una sostanza, o un gruppo mirato di sostanze, prima di sottoporle all'analisi GC. Altri approcci analitici hanno previsto l'utilizzo della GC×GC-MS/MS. In particolare, grazie all'incremento del rapporto segnale/rumore, dovuto all'impiego della modulazione criogenica, ed alla elevata selettività della spettrometria di massa a triplo quadrupolo, è stato possibile semplificare le fasi di preparazione del campione che sono state ridotte ad una semplice diluizione o ad un'estrazione miniaturizzata, entrambe caratterizzate pertanto da consumo minimo di solventi organici. L'utilizzo della suddetta strumentazione multidimensionale ha consentito di effettuare studi

relativi alla sicurezza alimentare. A questo proposito, sono stati investigati vari tipi di contaminanti, quali idrocarburi minerali, pesticidi, plastificanti (ftalati) ed idrocarburi policiclici aromatici.

Aim of the research project

Although the main characteristics of any analytical method have always been high selectivity, sensitivity, and analysis speed, 2000 was the year of birth of Green Analytical Chemistry (GAC) [1]. In accordance with its principles, GAC aims to reduce or eliminate harmful organic solvents, miniaturize, and automate extraction techniques, promote the operator safety, and reduce analysis time. Since then, ever-increasing attention has been paid to the environment, and the cruciality of the optimization of sustainable analytical methods has been recognized.

Furthermore, since food contamination, both of microbiological and chemical origin, represents the main source of concern for consumers, continuous researches are carried out in order to investigate the contamination sources and identify ways to prevent them. Great efforts are dedicated to the development of analytical strategies able to detect and identify these contaminants, commonly present at trace level.

Therefore, the research presented in this thesis was focused on the development of simplified sample preparation prior to multidimensional analytical techniques, for the analysis of food xenobiotics. The multidimensional techniques used during the three-year doctoral period were liquid chromatography coupled on-line to gas chromatography (LC-GC) and comprehensive two-dimensional gas chromatography coupled to tandem mass spectrometry (GC×GC-MS/MS). By using LC-GC, liquid chromatography provides a highly selective sample preparation that allows the elimination of the matrix interferences and the isolation of a specific substance, or a targeted group of substances, before their injection into the GC. Other approaches have exploited the potential of GC×GC-MS/MS, particularly, to the increase of the signal/noise ratio, related to the use of cryogenic modulation, and the high selectivity of triple quadrupole mass spectrometry. In this way, it was possible to simplify the sample preparation steps that were reduced to a simple dilution-and-shoot approach or to a miniaturized extraction, both characterized by a reduction of organic solvents consumption. The use of the aforementioned multidimensional instrumentation has allowed studies related to food safety. In this regard, some types of contaminants were

investigated, such as mineral oil hydrocarbons, pesticides, plasticizers (phthalates), and polycyclic aromatic hydrocarbons.

Riferimenti Bibliografici

[1] J. Namiesnik. Trends in environmental analytics and monitoring. *Crit. Rev. Anal. Chem.* 2000, 30, 221-269.

CAPITOLO 1

La Green Analytical Chemistry

1.0 Introduzione

Nel corso degli ultimi decenni l'atteggiamento della popolazione mondiale nei confronti dell'ambiente è profondamente cambiato a seguito di un aumento di consapevolezza dell'impatto ambientale delle attività antropiche. In particolare, la riduzione delle riserve di combustibili fossili, i problemi legati allo smaltimento dei rifiuti solidi, le emissioni di gas nell'atmosfera e lo scioglimento dei ghiacciai, hanno spinto molte persone a nutrire serie preoccupazioni riguardo la salvaguardia dell'ambiente.

Questo scenario ha, contestualmente, determinato la nascita dei concetti di *Green chemistry* (GC) e *Green analytical chemistry* (GAC), rispettivamente nel 1998 [1] e nel 2000 [2]. La preoccupazione per gli effetti collaterali deleteri di molti reagenti ampiamente utilizzati in passato nei laboratori chimici, ha spinto la comunità scientifica a pensare seriamente alla sostituzione dei composti tossici con materiali innocui o, perlomeno, con prodotti meno dannosi, comportando una riduzione sia dei danni ambientali che delle preoccupazioni riguardo la sicurezza degli operatori. Oltre agli sforzi per ridurre l'impatto negativo delle analisi chimiche sull'ambiente, si stanno compiendo passi importanti nello sviluppo di strumenti e metodologie necessari per il miglioramento della qualità delle analisi, in termini di accuratezza, sensibilità, selettività e precisione, senza effetti collaterali per gli operatori e l'ambiente.

Pertanto, la GAC rappresenta un forte stimolo per il progresso della chimica analitica. La sfida più importante per il futuro di questa disciplina sarà quello di raggiungere un compromesso pragmatico ed etico tra la qualità dei risultati ed il miglioramento della compatibilità dei metodi analitici con la sostenibilità ambientale.

1.1 I principi cardine di GC e GAC

Nel 1998 Anastas e Warner [1] formularono i 12 principi della GC di seguito elencati:

1. **Riduzione della produzione di rifiuti:** è meglio prevenire la produzione di rifiuti piuttosto che trattarli o bonificarli una volta generati;
2. **Economia dell'atomo:** i metodi di sintesi organica dovrebbero essere progettati in modo da incorporare nel prodotto finale quanto più possibile dei reagenti e degli intermedi chimici utilizzati;

3. **Sintesi chimiche più sicure:** se possibile, i metodi di sintesi dovrebbero essere progettati per impiegare e produrre sostanze caratterizzate da tossicità ridotta o nulla per la salute sia dell'uomo che dell'ambiente;

4. **Progettazione di sostanze chimiche più sicure:** i prodotti chimici dovrebbero essere progettati per assolvere efficacemente la funzione desiderata, riducendone allo stesso tempo la tossicità;

5. **Solventi e ausiliari più sicuri:** l'uso di sostanze ausiliarie, come solventi e tecniche di separazione, dovrebbe essere reso superfluo o altrimenti risultare innocuo;

6. **Progettazione finalizzata all'efficienza energetica:** se possibile, le reazioni di sintesi dovrebbero essere condotte a temperatura e pressione ambiente, in modo da ridurre al minimo l'impatto ambientale ed economico;

7. **Uso di materie prime rinnovabili:** ogni qualvolta sia tecnicamente ed economicamente possibile, è consigliabile utilizzare materie prime rinnovabili;

8. **Riduzione delle reazioni di derivatizzazione:** se non indispensabili, l'impiego di agenti bloccanti, di protezione o deprotezione o modifiche temporanee di processi chimico-fisici, dovrebbe essere evitato o ridotto al minimo, dal momento che tali passaggi richiedono il consumo di reagenti tossici aggiuntivi;

9. **Catalisi:** I reagenti catalitici sono da preferire a quelli stechiometrici;

10. **Progettazione finalizzata alla degradazione:** i prodotti chimici dovrebbero essere progettati in modo che si degradino in prodotti innocui e non persistano nell'ambiente;

11. **Analisi *real-time* per la prevenzione dell'inquinamento:** sarebbe opportuno sviluppare metodiche analitiche che consentano il monitoraggio e il controllo in tempo reale dei processi chimici allo scopo di identificare tempestivamente la formazione di sostanze pericolose;

12. **Chimica più sicura per la prevenzione di incidenti:** le sostanze impiegate in un processo chimico dovrebbero essere scelte in modo da ridurre al minimo il rischio di incidenti di natura chimica come esplosioni e incendi.

Appare evidente che i 12 principi furono progettati principalmente per soddisfare le esigenze della chimica di sintesi, concentrandosi sul miglioramento dell'efficienza di reazione, riducendo l'uso di reagenti tossici e la generazione di sottoprodotti.

Sebbene vi sia anche un riferimento diretto ai metodi analitici, considerando la riduzione del consumo di solventi organici, la sostituzione dei reagenti tossici con altri innocui, la riduzione dei rifiuti prodotti e del consumo energetico, questi principi non possono coprire l'intero processo analitico, tra cui la raccolta e il pre-trattamento del campione, e pertanto, non sono pienamente applicabili alla GAC.

Nel 2013 Galuszka, Migaszewski e Namiesnik utilizzarono alcuni dei principi della GC e li integrarono con dei nuovi, istituendo i principi, ormai universalmente riconosciuti, che determinarono l'affermazione della GAC [3]:

1. Dovrebbero essere applicate tecniche analitiche dirette per evitare il trattamento del campione;
2. Si dovrebbero ridurre al minimo sia il numero che la quantità dei campioni;
3. Si dovrebbe preferire l'esecuzione di analisi *in-situ*;
4. L'integrazione dei processi analitici consente il risparmio di energia e la riduzione di reagenti;
5. Dovrebbero essere scelti metodi automatizzati e miniaturizzati;
6. La derivatizzazione dovrebbe essere evitata;
7. Dovrebbe essere evitata la produzione di grandi volumi di rifiuti organici e dovrebbe essere garantita una loro adeguata gestione;
8. I metodi multi-analita o multi-parametro sono da preferire;
9. Il consumo di energia dovrebbe essere ridotto al minimo;
10. Dovrebbero essere preferiti i reagenti ottenuti da fonti rinnovabili;
11. I reagenti tossici devono essere eliminati o sostituiti;
12. La sicurezza dell'operatore dovrebbe essere aumentata.

Per l'analisi di un dato analita, tra tutti i metodi disponibili che soddisfano le esigenze dell'utente, rappresentate ad esempio da limite di rilevabilità e accuratezza, la scelta del metodo più ecologico è un requisito fondamentale per la GAC. Questo è il motivo per cui ben 5 dei 12 principi della GAC fanno riferimento al metodo. Idealmente, le tecniche analitiche dirette, automatizzate e miniaturizzate rappresentano l'opzione più ecologica (principi 1 e 5). Molto importante risulta anche l'integrazione dei processi e delle operazioni analitiche (principio 4), dal momento che tale approccio rende possibile ottenere molteplici informazioni da una singola analisi.

Tuttavia, come precedentemente riportato, uno degli svantaggi di rendere *green* le analisi di laboratorio è la necessità di trovare un compromesso tra i parametri prestazionali del metodo e i requisiti della GAC. Infatti, come mostrato in Figura 1.1, la maggior parte delle linee guida proposte nei 12 principi possono causare la diminuzione di accuratezza, precisione e sensibilità. L'affidabilità dei metodi analitici può essere, inoltre, facilmente messa in discussione con la miniaturizzazione delle dimensioni del campione [3]. Le miniaturizzazioni, infatti, dovrebbero essere effettuate con la consapevolezza della possibilità di perdere la rappresentatività del campione, soprattutto nel caso di materiali eterogenei.

STEPS IN ANALYSIS	PARAMETERS OF THE ANALYTICAL PROCESS					
	Representativeness	Accuracy	Precision	Selectivity	Sensitivity	Detectability
<i>Sampling</i>						
Minimal sample size	↓	↓	↓	↓	↓	↓
Minimal sample number	↓	0	0	0	0	0
<i>Sample treatment</i>						
Without derivatization	0	↓	↓	↓	↓	↓
Minimal use of energy	0	↓	↓	↓	↓	↓
Reagents from renewable source	0	↓	↓	↓	↓	↓
Without toxic reagents	0	↓	↓	↓	↓	↓
Safety for operator	0	↓	↓	↓	↓	↓
<i>Measurement</i>						
Direct	↓	↓	↓	↓	↓	↓
In-situ	↑*	↓	↓	↓	↓	↓
Integrated operations and processes	0	↑	↑	0	↑	0
Automation	0	↑	↑	↑	↓	↑
Miniaturized instruments	↓	↓	↓	↓	↓	↓
Multi-analyte and multi-parameter	0	0	0	0	0	0
Minimal use of energy	0	↓	↓	↓	↓	↓

NOTE: ↓ - decrease; ↑ - increase; 0 - neutral effect.

* method dependent

Figura 1.1. Conseguenze dei principi della GAC sulle *performance* analitiche [3].

Dal momento che, in molti casi, per un singolo campione è necessario determinare più di un analita o di un singolo parametro, dovrebbero essere preferiti metodi multi-analita o multi-parametro (principio 8) che risultano essere di particolare importanza, ad esempio, nel monitoraggio ambientale quando è necessario determinare vari elementi potenzialmente tossici. È, inoltre, preferibile evitare la derivatizzazione ed altri passaggi aggiuntivi (principio 6) che consumano reagenti e generano rifiuti. Se la derivatizzazione non può essere evitata, può essere integrata con altri processi (ad esempio filtrazione ed estrazione) in un unico sistema [4].

Altro punto cardine della GAC è rappresentato dall'eliminazione o sostituzione dei reagenti organici, in quanto tossici e persistenti, con i loro equivalenti maggiormente rispettosi dell'ambiente (principio 11). Oltre ad acqua ed etanolo, i liquidi ionici e i fluidi supercritici sono considerati solventi *green* alternativi. Diversi liquidi ionici, per lo più basati su cationi di azoto quaternario, hanno trovato ampia applicazione nelle tecniche cromatografiche ed elettromigratorie, nell'elettrochimica e nella spettroscopia [5-7]. Dal punto di vista delle tecniche estrattive, le alternative *green* alle estrazioni tradizionali con solventi sono rappresentate dall'estrazione con fluidi supercritici (SFE) e dall'estrazione con acqua subcritica. I vantaggi della CO₂ supercritica come solvente alternativo hanno reso l'SFE una delle tecniche di preparazione del campione più popolari in cromatografia [8].

I metodi analitici differiscono nel volume dei rifiuti prodotti. I più ecologici sono quelli che non generano rifiuti o che ne generano solo un piccolo volume, tipicamente inferiore a 50 mL (g) [9]. In linea generale, tanto più numerose sono le fasi di una procedura analitica, tanto maggiore sarà il volume dei reagenti consumati e dei rifiuti prodotti. Un'altra questione importante è garantire il corretto trattamento dei rifiuti analitici (principio numero 7). La tossicità dei rifiuti può essere ridotta attraverso il riciclaggio e la degradazione, preferibilmente eseguiti *on-line*.



Figura 1.2. I 12 principi della GAC secondo l'acronimo SIGNIFICANCE [10].

Secondo quanto riportato in Figura 1.2, al fine di facilitarne il ricordo mnemonico, modificando leggermente l'incipit dei principi, Galuszka *et al.* proposero l'acronimo *SIGNIFICANCE* [3]. L'esistenza di questi principi ricorda ai chimici analiti di soddisfare le esigenze dell'industria e della società riducendo, al tempo stesso, l'impatto delle analisi sia sugli esseri umani che sull'ambiente.

1.2 Preparazione del campione *green*

Sebbene il primo principio della GAC suggerisca di applicare tecniche analitiche dirette, esso trascura le mature tecnologie di preparazione del campione (già disponibili al momento della sua definizione). Ad esempio, la microestrazione in fase solida, un metodo di preparazione del campione completamente *green* che non prevede l'uso né di solventi né di reagenti, funziona anche meglio delle tecniche dirette e può essere utilizzata per il campionamento di campioni complessi [11]. Inoltre, il principio non tiene conto dei casi in cui l'analisi diretta non rappresenta un'opzione applicabile e risulta necessaria la conversione del campione in una forma idonea all'analisi, come, ad esempio, nel caso di campioni solidi e/o complessi, come quelli alimentari o biologici. Pertanto, in molte applicazioni il primo principio della GAC non può essere pienamente soddisfatto dal momento che, spesso, la preparazione del campione è essenziale per:

- la trasformazione del campione in una forma adatta alla tecnica di analisi;
- l'estrazione selettiva dell'analita *target* da matrici complesse;
- la pre-concentrazione dell'analita per ottenere la sensibilità richiesta;
- la purificazione del campione.

Questi motivi spinsero Lopez-Lorente *et al.*, nel 2022, ad introdurre i 10 principi della *green sample preparation* (GSP), riportati in Figura 1.3 [12]. L'approccio della GSP fornisce linee guida chiare ed efficaci per il miglioramento completo e sistematico dell'ecologia dei metodi di preparazione del campione e, in ultima analisi, delle metodologie analitiche. Alcuni concetti della GSP (principi 2, 4, 5, 7, 8 e 10) coprono obiettivi comuni alla GAC, sebbene, siano stati adattati alle esigenze e ai requisiti della preparazione del campione.

Il principio 1 della GSP, che descrive la preparazione del campione *in-situ*, è diverso da quanto definito nel principio 3 dalla GAC, relativo alla sola misurazione *in-situ*.

Questo primo principio favorisce la preparazione del campione *in-situ*, mediante ricorso a dispositivi/materiali che consentano di eseguire tutte le fasi di preparazione del campione, o parte di esse, risparmiando tempo ed energia (principi 6 e 8) e riducendo al minimo la quantità di campioni/materiali da trasportare al laboratorio per l'analisi. A seguito della preparazione del campione, la GSP invita, inoltre, alla scelta della configurazione più ecologica per l'analisi (principio 9).

-
- | | |
|--|--|
| | 1. Favor in situ sample preparation |
| | 2. Use safer solvents and reagents |
| | 3. Target sustainable, reusable, and renewable materials |
| | 4. Minimize waste |
| | 5. Minimize sample, chemical, and material amounts |
| | 6. Maximize sample throughput |
| | 7. Integrate steps and promote automation |
| | 8. Minimize energy consumption |
| | 9. Choose the greenest possible post-sample preparation configuration for analysis |
| | 10. Ensure safe procedures for the operator |

Figura 1.3. I 10 principi della GSP [12].

Al contrario della GAC che considera solo il carattere ecologico e rinnovabile dei reagenti, come solventi e agenti di derivatizzazione, la GSP, considerando che la preparazione del campione spesso implica l'uso di materiali solidi, ad esempio adsorbenti nei processi di (micro)estrazione, mira all'uso di materiali sostenibili, rinnovabili e riutilizzabili (principio 3), correlati alla minimizzazione dei rifiuti e alla protezione dell'operatore (principi 4 e 10). Infine, con il principio 6, viene introdotto per la prima volta il concetto di “produttività” dei campioni, legato al numero di campioni preparati ed elaborati per unità di tempo.

È importante sottolineare che, analogamente a GC e GAC, i dieci principi della GSP non sono isolati ma costituiscono un sistema integrato.

Riferimenti Bibliografici

- [1] P.T. Anastas, J.C. Warner. *Green Chemistry: Theory and Practice*. Oxford University Press, Oxford, 1998.
- [2] J. Namiesnik. Trends in environmental analytics and monitoring, *Crit. Rev. Anal. Chem.*, 2000, 30, 221-269.
- [3] A. Galuszka, Z. Migaszewski, J. Namiesnik. The 12 principles of green analytical chemistry and the SIGNIFICANCE mnemonic of green analytical practices. *TrAC-Trend Anal Chem*, 2013 50, 78-84.
- [4] Y. Liu, C.D. Garcia, C.S. Henry. Recent progress in the development of ITAS for clinical analysis. *Analyst*, 2003, 128, 1002-1008.
- [5] M. Koel, Ionic liquids in chemical analysis. *Crit. Rev. Anal. Chem.*, 2005, 35, 177-192.
- [6] J. Liu, J.Å. Jönsson, G. Jiang. Application of ionic liquids in analytical chemistry. *TrAC-Trend Anal Chem*, 2005, 24, 20-27.
- [7] P. Sun, D.W. Armstrong, Ionic liquids in analytical chemistry. *Anal. Chim. Acta*, 2010, 661, 1-16.
- [8] Y. Hsieh. Supercritical fluids and green bioanalysis. *Bioanalysis*, 2010, 2, 1-4.
- [9] L.H. Keith, L.U. Gron, J.L. Young. Green analytical methodologies. *Chem. Rev.* 2007, 107, 2695-2708.
- [10] M. Shi, X. Zheng, N. Zhang, Y. Guo, M. Liu, L. Yin. Overview of sixteen green analytical chemistry metrics for evaluation of the greenness of analytical methods. *TrAC-Trend Anal Chem*, 2023, 166, 117211.
- [11] H. Lord, J. Pawliszyn. Evolution of solid phase microextraction technology. *J. Chromatogr. A*, 2000, 885, 153-193.
- [12] A.I. Lopez-Lorente, F. Pena-Pereira, S. Pedersen-Bjergaard, V.G. Zuñin, S.A. Ozkan, E. Psillakis. The ten principles of green sample preparation. *TrAC-Trend Anal Chem*, 2022, 148, 116530.

CAPITOLO 2

Accoppiamento multidimensionale tra cromatografia liquida e gassosa

2.0 Introduzione

La natura eterogenea delle matrici naturali, sia ambientali che alimentari, a volte rende complessa o addirittura impossibile la completa separazione degli analiti che le compongono mediante tecniche cromatografiche monodimensionali. Inoltre, considerato che spesso alcune famiglie chimiche di costituenti e/o di contaminanti sono presenti in tracce, spesso risulta necessario ricorrere ad un particolare protocollo di preparazione del campione che consenta di isolare delle frazioni più omogenee di composti prima di sottoporle ad analisi cromatografica.

A questo proposito, l'impiego di una fase di cromatografia liquida (LC), generalmente anteposta alla gascromatografia (GC), consente di sfruttare sia l'elevata capacità di campione che l'elevata efficienza di separazione della tecnica, fornendo una preparazione del campione altamente selettiva che consente di isolare da una miscela complessa una o più specifiche frazioni che contengono i composti di interesse. L'accoppiamento LC-GC si rivela utile soprattutto quando si analizzano campioni contenenti interferenti non volatili e può, inoltre, consentire la pre-separazione di analiti strutturalmente simili. Tuttavia, la tecnica risulta inutile quando è necessario analizzare un'ampia gamma di composti chimici, come ad esempio i pesticidi, dal momento che viene a mancare l'efficienza di separazione e le frazioni ottenute, caratterizzate da un elevato volume di solvente, risultano difficili da trasferire al GC. L'ottenimento di una pre-separazione consente, infine, l'utilizzo di rivelatori GC non selettivi, come nel caso del rivelatore a ionizzazione di fiamma (FID).

L'accoppiamento *off-line* tra LC e GC prevede la raccolta della frazione eluita dalla prima dimensione LC, manualmente o tramite un raccogliatore di frazioni, la loro eventuale concentrazione o evaporazione, per rimuovere solventi incompatibili, prima dell'iniezione in GC. Tali passaggi richiedono molto tempo, sono impegnativi dal punto di vista operativo, possono essere caratterizzati da bassa ripetibilità, da un rischio elevato di perdita di composti, assieme ad una possibile contaminazione del campione. L'accoppiamento *on-line* risulta invece un sistema molto più affidabile e sensibile dal momento che l'intera frazione di interesse eluita dalla colonna LC viene automaticamente trasferita al GC. Inoltre, la completa automazione della *tecnica* risulta particolarmente utile per le analisi in *batch* di un gran numero di campioni. Ulteriori vantaggi della LC-GC *on-line* sono elevata ripetibilità, basso consumo di

solventi, rispetto ad una convenzionale preparazione del campione (mediante, ad esempio, estrazione in fase solida), riduzione della manipolazione del campione e dei rischi correlati quali perdita di analiti, contaminazione e formazione di artefatti dovuti all'interazione con l'ossigeno o l'umidità atmosferica [1]. Non ultimo, le colonne per LC sono generalmente utilizzabili per centinaia o addirittura migliaia di analisi. Infine, la finestra di eluizione della frazione di interesse può essere determinata con precisione, ad esempio mediante rilevatori ultravioletti (UV), facilitando lo sviluppo del metodo.

Il primo accoppiamento tra un sistema LC e uno GC venne presentato nel 1979 da Major a Pittsburgh in occasione di una conferenza di *Analytical Chemistry and Applied Spectroscopy* [2] e successivamente pubblicato nel 1980 [3]. Lo studio prevedeva l'utilizzo di un campionatore automatico, utilizzato come interfaccia, che iniettava in un iniettore GC convenzionale. In particolare, durante l'analisi LC, l'eluente era diretto allo scarico finché, all'inizio del trasferimento, un segnale elettronico avviava l'iniezione per cui la siringa era sollevata dallo scarico e inserita nell'iniettore del GC per poi ritornare nella posizione di *stand-by* alla fine del trasferimento. Uno schema di questo primo sistema di trasferimento è riportato in Figura 2.1. Esso venne utilizzato per determinare i residui dell'erbicida atrazina in un campione di sorgo, accoppiando una colonna LC convenzionale (15 cm × 4 mm) ad un sistema GC, equipaggiato con un FID, con un volume di trasferimento pari a 8 µL di solvente.

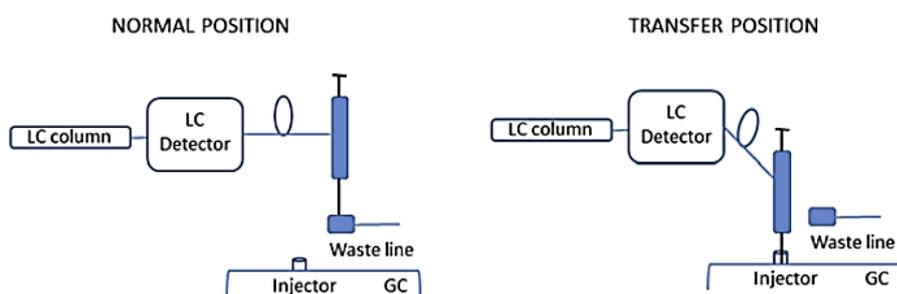


Figura 2.1. Schema dell'interfaccia di trasferimento usata da Major. A sinistra è riportata la posizione di *stand-by* durante la qual la siringa è inserita nella linea di scarico, mentre a destra la posizione di trasferimento, con la siringa inserita nell'iniettore GC [4].

Nel 1983, Apffel e McNair utilizzarono questa soluzione per l'analisi di idrocarburi in campioni petrolchimici, ottenendo il frazionamento in base alla famiglia

chimica nel sistema LC e la seguente caratterizzazione in quello GC [5]. L'anno seguente, Grob e collaboratori presentarono una nuova tipologia di interfaccia, chiamata *on-column*, che sfruttava l'impiego di una colonna capillare priva di fase stazionaria, detta *retention gap*, collegata tra l'iniettore e la colonna analitica GC [6]. Poco dopo, Cortes *et al.* presentarono una soluzione simile, successivamente classificata come interfaccia *loop-type* [7]. Essi impiegarono per la prima volta una colonna LC capillare impaccata, costruita utilizzando un capillare in silice fusa con un diametro interno di 250 μm impaccato con particelle di ottadecil-silice (7 μm d_p). Venne trasferito un volume di 10 μL di acetonitrile (ad un flusso di 1 mL min^{-1}). L'approccio venne applicato alla determinazione di policlorobifenili nel *coal tar*.

Nel 1989, Carlo Erba (Italia) presentò il primo strumento LC-GC commerciale, dal nome Dualchrom 3000, basato sull'evoluzione delle interfacce *on-column* e *loop-type*. Nel 1992, Staniewski *et al.* introdussero un sistema LC-GC che prevedeva l'impiego come interfaccia di un iniettore *programmed-temperature vaporizing* (PTV), per l'analisi di idrocarburi policiclici aromatici ed erbicidi in campioni di acqua [8]. Nel 1999 venne presentato un iniettore PTV modificato come camera di intrappolamento, poi denominato *Through Oven Transfer Adsorption Desorption* (TOTAD) [9]. Infine, nel 2009 Biedermann *et al.* introdussero l'interfaccia Y [10], progettata per migliorare le prestazioni di quella *on-column*. La spiegazione dettagliata delle suddette interfacce è riportata nel paragrafo seguente.

2.1 Tecniche di trasferimento LC-GC

Sebbene alcuni dei primi tentativi di accoppiamento prevedessero l'introduzione di una piccola quantità di eluente LC nel GC, apparvero sin da subito evidenti i relativi problemi di sensibilità e quantificazione. Da allora, diverse sono state le alternative ad essere state proposte nel corso degli anni e, in particolare, sforzi notevoli sono stati dedicati allo sviluppo di interfacce che fossero in grado di gestire grandi quantità di solvente. Inoltre, a seconda dell'accoppiamento con LC in fase normale (NPLC) o in fase inversa (RPLC) si deve anche tenere in considerazione la compatibilità dei solventi LC con la GC, in aggiunta alla necessità di focalizzare gli analiti di interesse in una stretta banda in testa alla colonna analitica GC.

La scelta di una particolare tecnica di trasferimento che prenda in considerazione il volume della frazione trasferita, come anche la volatilità degli analiti di interesse,

rappresenta certamente un punto cruciale dell'accoppiamento LC-GC. Per semplicità, nel presente elaborato le tecniche di trasferimento sono state raggruppate in tecniche basate sull'utilizzo di una *retention gap* o di una *vaporizing chamber* [10].

2.1.1 *Retention Gap*

Queste tecniche prevedono l'utilizzo di una pre-colonna priva di fase stazionaria e opportunamente disattivata, anche nota come *retention gap*, che viene anteposta alla colonna analitica. La lunghezza della pre-colonna cambia se il trasferimento della frazione LC viene effettuato ad una temperatura che sia superiore o inferiore al punto di ebollizione del solvente. Come regola generale per ogni μL di solvente introdotto è necessaria una lunghezza di circa 12-30 cm con un diametro interno (ID) di 0,32 mm [10]. Pertanto, generalmente le *retention gap* sono lunghe dai 30 ai 50 m e con un ID molto grande (0.53 mm) per consentire di accogliere una grande capacità di solvente, evitando l'allagamento della colonna di separazione e, contestualmente, il fenomeno di allargamento di banda.

Durante lo sviluppo di un metodo LC-GC basato sull'impiego di una *retention gap*, in base alla presenza o meno di soluti volatili di interesse nella frazione trasferita, si può fare ricorso a due tecniche di eliminazione del solvente quali *fully concurrent eluent evaporation* e *partially concurrent eluent evaporation*. Il termine *concurrent*, letteralmente tradotto come "concomitante", si riferisce all'evaporazione, totale o parziale, dell'eluente durante il processo di trasferimento. In particolare, con l'evaporazione *fully concurrent* l'intero volume della frazione trasferita viene eliminato durante il trasferimento, pertanto, teoricamente un volume illimitato di eluente può essere trasferito alla pre-colonna. Con questa tecnica sono stati trasferiti fino a 20 mL di esano ad un flusso di 1 mL min^{-1} [11]; tuttavia, in questa applicazione il primo picco caratterizzato da una corretta simmetria eluiva a circa 134°C . Pertanto, l'applicabilità dell'evaporazione *fully concurrent* risulta limitata al trasferimento degli analiti altobollenti.

Durante l'evaporazione *partially concurrent*, proposta per la prima volta nel 1985 da Munari *et al.* [12], solo parte del solvente viene eliminata garantendo che una piccola porzione della frazione trasferita inondi la *retention gap*, che può essere pertanto più corta (5-10 m). Per ottenere tale condizione, è necessario che la velocità di trasferimento sia leggermente superiore alla velocità di evaporazione. In

conclusione, l'evaporazione *fully concurrent* è più semplice da praticare rispetto alla *partially concurrent* che risulta, tuttavia, preferibile da applicare se il campione da analizzare contiene analiti caratterizzati da una volatilità inferiore a quella di un alcano di circa 15-18 atomi di carbonio [1]. Nonostante l'apparente maggiore complessità, l'evaporazione *partially concurrent* è stata utilizzata in più della metà delle applicazioni sviluppate. Secondo la tecnica di evaporazione applicata e l'interfaccia utilizzata può essere trasferita una frazione che va da un volume di solvente di qualche centinaio di μL , utilizzando l'interfaccia *on-column* con un'evaporazione dell'eluente *partially concurrent*, fino a diversi mL utilizzando l'interfaccia *loop-type* con un'evaporazione *fully concurrent*. Di seguito sono riportate le tipologie di interfacce basate sull'utilizzo di una *retention gap*.

- **Interfaccia *on-column***

Una rappresentazione schematica dell'interfaccia *on-column* è mostrata in Figura 2.2. Il capillare proveniente dall'LC è collegato ad una valvola multi-porta che, al momento del trasferimento della frazione di interesse, devia l'eluente da una linea di scarico (*stand-by position*) al GC (*transfer position*). Pertanto, la frazione viene spinta nella *retention gap* dalla pompa LC mentre il gas *carrier* entra nell'intercapedine tra il capillare e la *retention gap* stessa, tipicamente di diametro e lunghezza sufficienti al fine di evitare l'allagamento della colonna analitica.

Il trasferimento viene effettuato ad una temperatura del forno inferiore rispetto al punto di ebollizione del solvente con lo scopo di evitarne reflussi nella fornitura del *carrier*. Una volta nella *retention gap*, l'eluente LC viene spinto dal gas *carrier* fino alla formazione di un sottile strato di liquido, secondo quel fenomeno noto come *solvent flooding* (Figura 2.3). A seguito del riscaldamento del forno, a partire dalla parte posteriore di questa zona "allagata" inizia la progressiva evaporazione del solvente guidata dal *carrier*. Per consentire la rapida rimozione dei vapori di solvente generati a seguito del riscaldamento, una valvola *solvent vapor exit* (SVE) viene installata tra la *retention-gap* e la colonna analitica. In base al volume totale di frazione trasferita ed alla temperatura di ebollizione del solvente, un'evaporazione efficace richiede generalmente un paio di minuti.

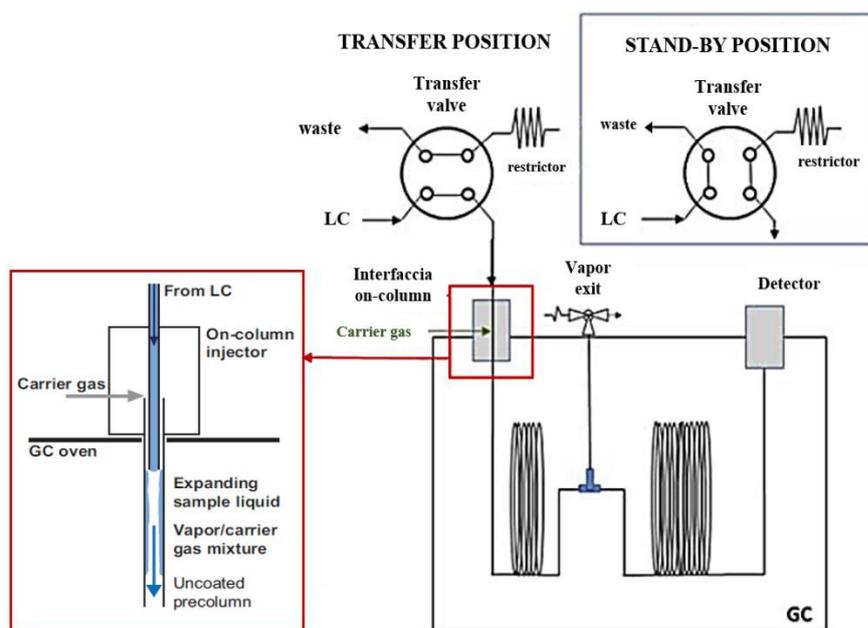


Figura 2.2. Rappresentazione schematica dell'accoppiamento LC-GC mediante interfaccia *on-column*. Sono riportati anche i dettagli delle posizioni di stand-by e trasferimento assieme ad un'espansione dell'interfaccia [4].

Pertanto, la cromatografia inizia con un ritardo, corrispondente essenzialmente alla durata di evaporazione del solvente. Durante questo processo risulta di particolare importanza che gli analiti bassobollenti (volatili) non vengano persi assieme ai vapori di solvente e quindi eliminati attraverso la valvola SVE. Grazie al fenomeno del *solvent trapping* gli analiti volatili sono intrappolati in una piccola porzione di solvente condensato che non viene eliminato [13]. Esiste ovviamente un limite al *solvent trapping*, infatti gli analiti estremamente volatili, come il metano, vengono difficilmente intrappolati [1]. Tuttavia, ad esempio, l'intrappolamento dell'ottano da parte dell'esano è praticamente completo, il che significa che mediante il *solvent trapping* vengono perfettamente trattenuti tutti gli analiti che eluiscono dalla colonna GC dopo il solvente, formando picchi caratterizzati da una stretta ampiezza di banda. Gli analiti polari nei solventi non polari, o viceversa, vengono intrappolati in modo incompleto; quindi, parte di essi passano nella colonna analitica prima che l'evaporazione del solvente sia completata formando dei picchi a forma di sedia [14]. Il *solvent trapping* è un processo efficace e ben riproducibile, più selettivo di qualsiasi metodo *off-line*, come l'evaporazione in corrente di gas o mediante uso di un evaporatore rotante.

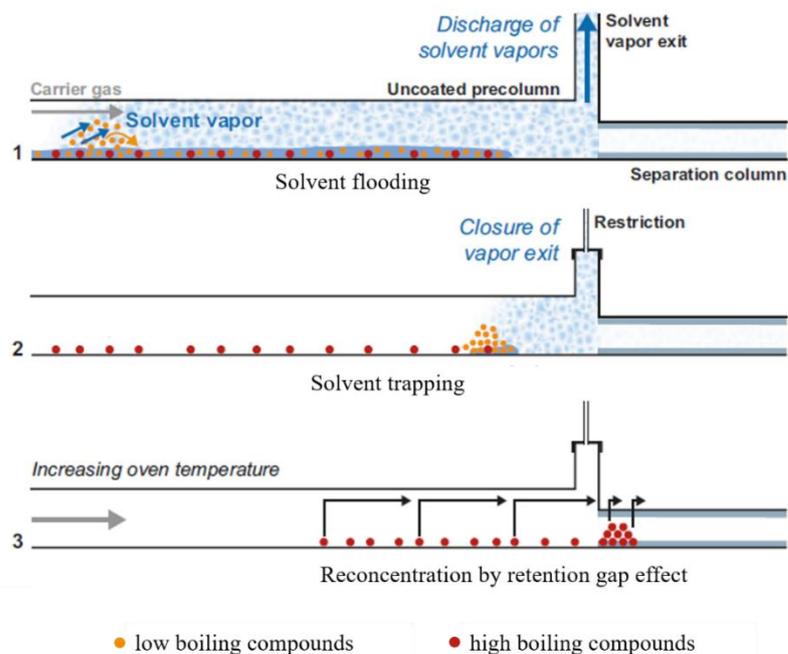


Figura 2.3. Le fasi principali del trasferimento LC-GC mediante evaporazione dell'eluente *partially concurrent*. 1. *solvent flooding* della pre-colonna durante l'evaporazione del solvente; 2. momento di chiusura della valvola SVE e *solvent trapping effect*; 3. all'aumentare della temperatura del forno, gli analiti altobollenti si muovono lungo la pre-colonna vengono riconcentrati in testa alla colonna analitica mediante il *reconcentration by retention gap effect* [1].

Man mano che il gas *carrier* saturo dei vapori di solvente raggiunge la colonna analitica, secondo quel fenomeno noto come *phase soaking effect*, il film di fase stazionaria in testa alla colonna si rigonfia determinando un aumento del potere di ritenzione che favorisce l'intrappolamento dei composti volatili. Una volta terminata l'evaporazione del solvente, essi verranno rilasciati insieme all'avvio della programmata di temperatura del forno.

Contestualmente, durante l'eliminazione dei vapori di solvente gli analiti altobollenti restano fermi nel punto in cui sono stati depositati distribuendosi nella pre-colonna in una ampia fascia. Grazie al graduale aumento della temperatura del forno essi vengono rimobilizzati e focalizzati in una stretta banda mediante il *retention gap effect*, al quale si aggiunge il *phase ratio focusing effect* dovuto alla differenza del potere di ritenzione tra la *retention gap* e la colonna analitica.

Uno svantaggio dell'interfaccia *on-column* è il cosiddetto *memory effect*. Esso è dovuto al trasferimento relativamente lento dell'eluente LC che comporta la formazione di una gocciolina di liquido all'uscita della linea di trasferimento che,

mediante forze capillari, viene tirata indietro nella intercapedine tra la linea di trasferimento e la pre-colonna. Una volta terminato il trasferimento, questa piccola quantità di liquido viene spinta nuovamente dal gas *carrier*. Tuttavia, una bassa percentuale di solvente si asciuga nella linea di trasferimento depositando soluti ad elevato punto di ebollizione che vengono poi rimobilizzati dall'eluente LC della corsa successiva, comportando il *memory effect* per un valore equivalente a circa lo 0,5-3% del processo di trasferimento precedente [15]. Questo problema è stato evidenziato e risolto quasi completamente mediante introduzione della interfaccia *Y* da parte di Biedermann e Grob nel 2009 [15].

- Interfaccia *Y*

In questa tipologia di interfaccia (Figura 2.4) un raccordo a *Y* viene utilizzato per collegare la linea di trasferimento, che trasporta l'eluente LC, con la linea del gas *carrier* e la *retention gap*. Il *carrier* spinge il liquido nella pre-colonna termostata dove inizia l'evaporazione del solvente. Utilizzando tale interfaccia, il *memory effect* viene ridotto al di sotto dello 0,02% dal momento che, al termine del trasferimento, la linea stessa di trasferimento viene sottoposta a contro-lavaggio ad opera del gas *carrier*. Inoltre, l'interfaccia *Y* è caratterizzata dall'assenza di volumi morti.

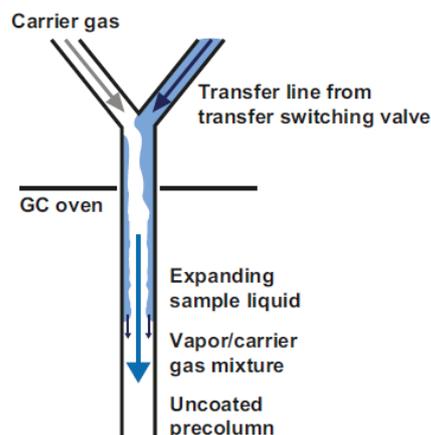


Figura 2.4. Schema rappresentativo dell'interfaccia *Y* [1].

- Interfaccia *loop-type*

Questa interfaccia prevede l'utilizzo di una valvola di trasferimento multi-porta collegata ad un *loop* ad anello con un volume interno pari al volume della frazione che si desidera trasferire dall'LC al GC. Nella posizione di *stand-by* la valvola dirige l'eluente allo scarico. Quando l'eluizione della frazione LC è completata, tramite

commutazione della valvola, il gas *carrier* spinge la frazione accumulata nel *loop* alla *retention gap*, ad una temperatura del forno pari o superiore al punto di ebollizione dell'eluente. Mediante il meccanismo dell'evaporazione *fully concurrent*, il solvente evapora in maniera concomitante alla sua introduzione generando una contropressione che evita l'allagamento della *retention gap*. Man mano che il solvente evapora e viene eliminato mediante una valvola SVE, la frazione liquida avanza gradualmente fino alla sua completa conversione in vapore. A questo punto il flusso del *carrier* riprende normalmente e l'analisi GC può avere inizio. Uno schema di un'interfaccia *loop-type* è riportato in Figura 2.5.

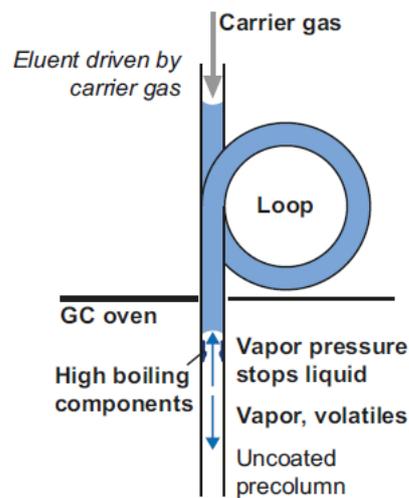


Figura 2.5. Schema rappresentativo della interfaccia *loop-type* [1].

Con questa interfaccia, eliminando tutto il solvente trasferito, è possibile utilizzare una pre-colonna molto corta (2-3 m), tuttavia, come precedentemente anticipato, con l'evaporazione *fully concurrent* non si verifica alcun fenomeno di intrappolamento del solvente per cui le sostanze volatili vengono perse. Il modo più efficace per ridurre parzialmente la perdita di sostanze volatili è quello di aggiungere un piccolo volume di un co-solvente che possieda un punto di ebollizione maggiore rispetto quello dell'eluente principale. In questo modo, il co-solvente non viene eliminato durante l'evaporazione e forma una sottile strato di liquido che consente di intrappolare i composti volatili [16].

2.1.2 Vaporizing chamber

Nelle tecniche raggruppate sotto la denominazione di *vaporizing chamber* l'eluente LC viene trasferito ad una camera riscaldata di vaporizzazione, che può essere rappresentata da un segmento capillare (come nell'interfaccia *wire*) o da un iniettore PTV. Pertanto, l'interfaccia *wire* può essere considerata un ibrido tra le tecniche *vaporizing chamber* e *retention gap*. D'altra parte, nell'ambito delle tecniche che utilizzano come camera di vaporizzazione un iniettore PTV, si distingue tra l'utilizzo dell'iniettore come originariamente progettato ed una sua versione modificata denominata TOTAD. Di seguito è riportata una spiegazione maggiormente dettagliata delle interfacce che prevedono l'utilizzo di una *vaporizing chamber*.

- Interfaccia *in-line vaporizer/overflow* o *wire*

Nel 1995, con lo scopo di aumentare la sensibilità rispetto all'interfaccia *loop-type* e risolvere i problemi di *memory effect*, Grob e Bronz presentarono l'interfaccia *wire* accoppiata ad un'evaporazione *fully concurrent* [17].

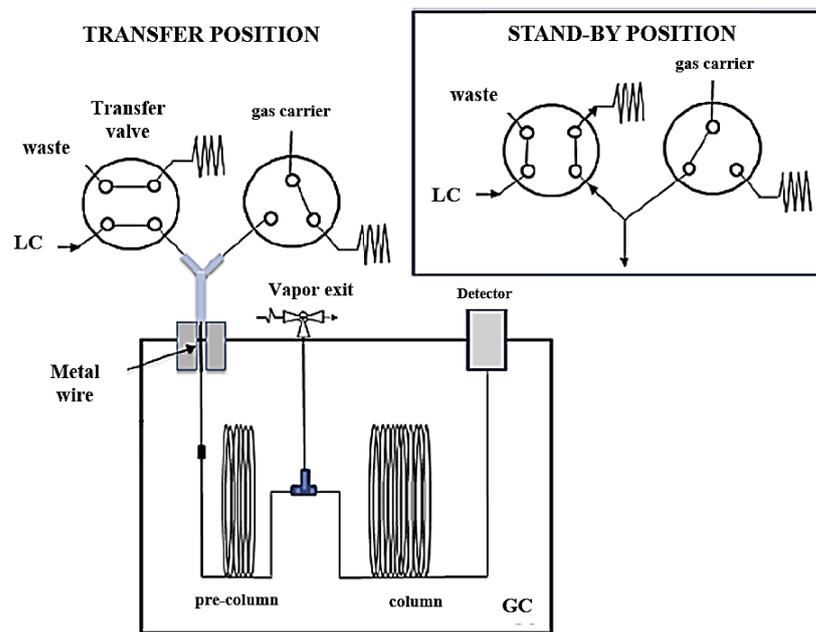


Figura 2.6. Schema rappresentativo della interfaccia *wire* [4].

In questa tipologia di interfaccia, mostrata in Figura 2.6, la frazione viene spinta dalla pompa LC in una camera di vaporizzazione al cui interno è presente un corto capillare metallico, lungo circa 4 cm e con ID di 0,32 mm, riscaldato a 250-350°C.

Appena sopra di esso, un raccordo a Y è collegato a due valvole multi-porta che regolano rispettivamente il trasferimento della frazione LC e la fornitura del gas *carrier*. I vapori di solvente, generati nella camera di vaporizzazione, vengono scaricati attraverso una valvola SVE posizionata tra una breve pre-colonna, di lunghezza di circa 1,5 m, e la colonna analitica. La temperatura del forno e la chiusura della SVE sono i parametri più importanti che necessitano di attenta ottimizzazione. La temperatura di trasferimento deve essere molto vicina al *dew point* del solvente per massimizzare l'effetto di *phase soaking* nella pre-colonna consentendo l'intrappolamento delle sostanze volatili. È inoltre importante ricordare che questo effetto si verifica solo se il solvente LC ha una polarità molto vicina alla fase stazionaria GC, situazione molto comune quando si applica la NPLC utilizzando una colonna GC non polare. Per una frazione di pentano dal volume di 500 μL (trasferita a 400 $\mu\text{L min}^{-1}$), una temperatura del forno pari a 48°C ha consentito il recupero completo del dodecano, cosa non ottenibile utilizzando l'interfaccia *loop-type* [1]. Pertanto, a metà anni '90 l'interfaccia *wire* ha sostituito quella *loop-type*, dal momento che offriva una migliore ritenzione degli analiti volatili ed era più flessibile circa il volume della frazione da trasferire.

- Interfaccia *Programmed-Temperature Vaporizer (PTV)*

La prima interfaccia basata sull'impiego di un auto-iniettore venne presentata da Major nel 1979 [2]. In questo approccio, il volume della frazione era limitato (0.1-3 μL) dal momento che veniva iniettata in un iniettore *split/splitless* a vaporizzazione istantanea. Nel 1992, Staniewski *et al.* riportarono il primo utilizzo di un iniettore *programmed-temperature vaporizer (PTV)* come interfaccia LC-GC [8]. In questo caso, la frazione LC veniva trasferita ad un PTV, equipaggiato con un *liner* impaccato con un materiale adsorbente (Tenax), attraverso un capillare di silice fusa che attraversava il setto dell'iniettore. A seguito della vaporizzazione della frazione, l'eliminazione dei vapori di solvente avveniva mediante apertura della linea di *split* dell'iniettore, mentre i soluti erano ritenuti dal materiale di impaccamento del *liner*. Una volta conclusa l'evaporazione, a seguito della chiusura della linea di *split*, l'iniettore veniva riscaldato consentendo il trasferimento in colonna dei soluti in modalità *splitless*.

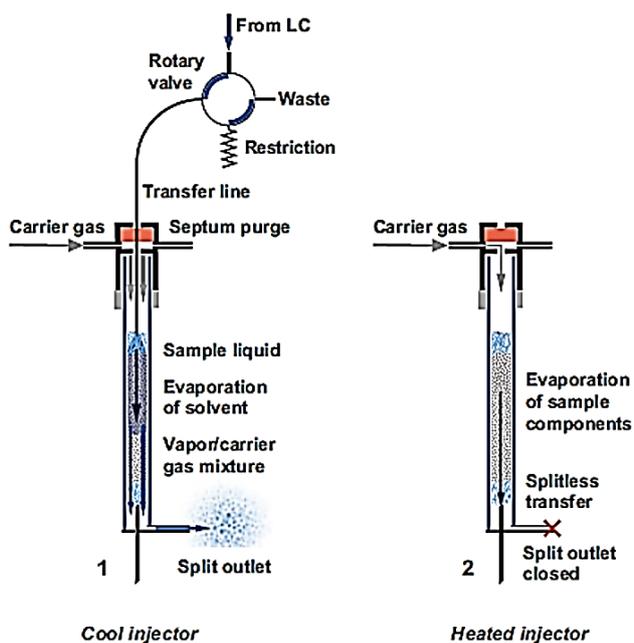


Figura 2.7. Rappresentazione schematica dell'interfaccia PTV. 1: Evaporazione del solvente ed eliminazione dei suoi vapori attraverso lo split. 2: Evaporazione degli analiti e loro trasferimento in modalità *splitless* [1].

L'interfaccia PTV rappresenta una valida alternativa alla *on-column*, dal momento che il materiale di impaccamento del *liner* è in grado di ritenere più liquido per unità di volume e risulta, inoltre, più stabile rispetto alla *retention gap* soprattutto nei confronti dei solventi acquosi e dei sottoprodotti non volatili, impedendo loro di raggiungere la colonna GC. Tuttavia, risulta necessario prestare particolare attenzione alle condizioni di desorbimento ed alla selezione del materiale di impaccamento al fine di evitare, rispettivamente, la degradazione dei composti termolabili, per via dell'elevata temperatura finale raggiunta dall'iniettore, e consentire il desorbimento degli analiti altobollenti, evitando fenomeni di discriminazione che risultano maggiormente comuni rispetto alle interfacce *on-column* o *Y* [18]. Inoltre, l'evaporazione del solvente in un letto impaccato non avviene in modo sistematico e riproducibile come all'interno della *retention gap*, rendendo il *solvent trapping* meno efficiente e influenzando le prestazioni dell'interfaccia nei confronti degli analiti volatili presenti nel campione [1].

D'altro canto, l'interfaccia PTV risulta molto più adatta per il ben più complesso accoppiamento RPLC-GC. Innanzitutto, i solventi polari usati in RPLC possono

causare l'idrolisi dei legami silossanici e quindi ridurre la disattivazione sia della *retention gap* che della colonna analitica. Inoltre, la velocità di evaporazione di acqua, acetonitrile e metanolo, comunemente impiegati in RPLC, risulta più bassa e pertanto richiede un tempo maggiore. Entrambi questi inconvenienti possono essere risolti utilizzando l'interfaccia PTV. Il primo di accoppiamento RPLC-GC mediante impiego dell'interfaccia PTV è stato descritto nel 1995 da Senorans *et al.* [19].

- Interfaccia *Through Oven Transfer Adsorption-Desorption (TOTAD)*

Nel 1999, Villén *et al.* [9] presentarono una nuova tipologia di interfaccia chiamata *Through Oven Transfer Adsorption Desorption (TOTAD)* caratterizzata da un iniettore PTV modificato posizionato orizzontalmente su un lato del forno GC (Figura 2.8). Il PTV era equipaggiato con un *liner* riempito con circa 2 cm di Tenax tenuto in posizione su entrambe le estremità da lana di vetro disattivata. Il gas *carrier* veniva fornito tramite l'ingresso abituale dell'iniettore o tramite l'uscita dello *split*. I due rami erano collegati da una serie di valvole che permettevano di utilizzare alternativamente una via o l'altra.

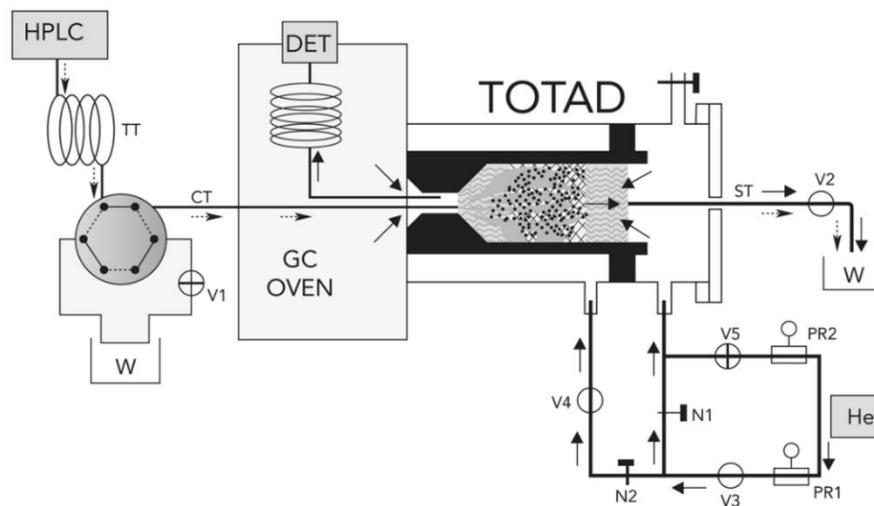


Figura 2.8. Rappresentazione schematica dell'interfaccia TOTAD. W: scarico; TC: capillare di trasferimento (0.32 mm ID); ST: tubo in acciaio inossidabile (1.09 mm i.d.); V1-V5: valvole; PR1-PR2: regolatori di pressione; N1-N2: valvole a spillo; DET: rivelatore [9].

Il capillare di trasferimento LC, attraversando il forno GC, convogliava con la colonna analitica sul fondo dell'iniettore tramite una ferula a doppio buco. In particolare, la linea di trasferimento era inserita nella lana di vetro utilizzata per mantenere in posizione il Tenax. Durante la fase di trasferimento il solvente che

raggiunge l'interfaccia riscaldata viene spinto nel *liner* dal *carrier* che entra dalla porta dello *split*; gli analiti vengono ritenuti dal Tenax mentre i vapori di solvente sono eliminati tramite un capillare in acciaio inossidabile (ST) montato sulla testa dell'iniettore. Una volta che l'eliminazione del solvente è completata, il flusso del *carrier* viene invertito e gli analiti vengono desorbiti termicamente e spinti nella colonna di separazione. L'interfaccia TOTAD, originariamente sviluppata per RPLC-GC [20], è stata applicata anche in NPLC-GC per l'analisi delle cere in olio [21].

- Interfaccia *Swing*

Nel 2000, Grob e coautori proposero l'interfaccia *swing*, che prevedeva l'utilizzo di due iniettori PTV, come tecnica per trasferire grandi volumi di frazioni contenenti acqua [22]. Secondo quanto riportato nei paragrafi precedenti, le interfacce hanno il compito di evaporare ed eliminare il solvente e trattenere gli analiti. Eseguire entrambi questi processi all'interno della stessa camera impone di trovare un compromesso in termini di temperatura di trasferimento, in particolare nel caso di solventi acquosi. L'impiego di due iniettori PTV, ciascuno dotato di un ingresso per il gas *carrier*, consente di poter ottimizzare le due fasi indipendentemente l'una dall'altra.

In particolare, come mostrato in Figura 2.9, nell'interfaccia *swing* la vaporizzazione avviene nella camera sempre riscaldata, riempita di un materiale adsorbente (ad esempio Carbofrit), del primo iniettore PTV. I vapori di solvente generati vengono rilasciati attraverso una pre-colonna di ritenzione termostata e un secondo iniettore PTV inizialmente mantenuto ad una temperatura appena sufficientemente elevata da impedire la ricondensazione del solvente. Durante l'evaporazione gli analiti altobollenti vengono ritenuti nella pre-colonna di ritenzione mentre i più volatili restano nel secondo PTV equipaggiato con un *liner* dotato di un impaccamento trifasico a potere di ritenzione crescente. Al termine dell'evaporazione, il flusso del *carrier* viene fornito tramite il secondo PTV e, a seguito del suo riscaldamento, i soluti vengono desorbiti dal letto impaccato e, attraverso la pre-colonna di ritenzione, raggiungono la colonna di separazione.

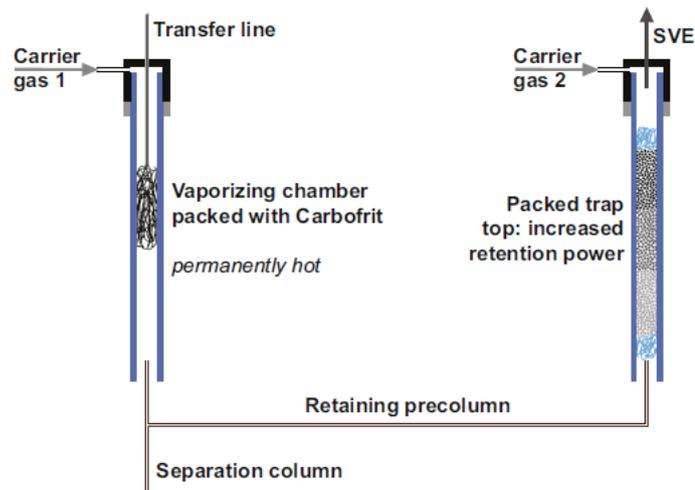


Figura 2.9. Rappresentazione schematica dell'interfaccia *swing* [1].

2.2 Applicazioni

L'approccio LC-GC è stato ampiamente utilizzato per l'analisi di xenobiotici in campioni ambientali, alimentari e biologici. Sin dalle sue prime applicazioni le potenzialità dell'accoppiamento sono state sfruttate per l'analisi degli idrocarburi minerali (MOH). In questo specifico caso, la fase LC viene utilizzata per separare la frazione degli oli minerali saturi (MOSH) da quelli aromatici (MOAH). Contestualmente, dal momento che gli oli minerali vengono estratti insieme alla frazione lipidica degli alimenti, l'utilizzo di una colonna di silice permette di ritenere una grande quantità di lipidi e isolare le frazioni idrocarburiche. Tuttavia, la capacità ritenitiva della colonna è strettamente correlata al tipo di solvente impiegato come fase mobile. Ad esempio, utilizzando esano come eluente, una colonna 10 cm × 2 mm ID riesce a ritenere 25 mg di olio. L'aggiunta di un modificatore organico diminuisce la capacità di ritenzione in base alla natura chimica del modificatore, scendendo, ad esempio, a 15 mg con il 20% di diclorometano ed a 5 mg con l'aggiunta dell'1% di MTBE [23]. Con una colonna 25 cm × 2 mm ID, utilizzando come fase mobile esano con un gradiente fino al 30% di diclorometano, è possibile ritenere circa 20 mg di lipidi, tenendo conto che una parte della colonna deve rimanere libera per consentire l'isolamento dei MOSH dai MOAH [24]. Il trasferimento viene principalmente effettuato utilizzando l'interfaccia Y e l'evaporazione *partially concurrent*, sebbene sia stata descritta anche un'analisi dei MOSH negli oli vegetali utilizzando l'interfaccia PTV [25]. Le prestazioni delle due interfacce sono state confrontate e non è stata

trovata alcuna sostanziale differenza [26]. L'interesse per il frazionamento dei MOH nelle sotto-frazioni MOSH e MOAH è iniziato piuttosto presto [27], anche se un metodo LC-GC di routine è stato sviluppato solo nel 2009, contemporaneamente allo sviluppo dell'interfaccia Y [9,28]. Il metodo è stato utilizzato anche per la determinazione dei MOH negli animali [29,30] e nei tessuti umani [31,32].

Altri xenobiotici sono stati analizzati utilizzando l'accoppiamento LC-GC. Nel 1987 è stata descritta un'applicazione che, mediante un rivelatore *electron-capture dissociation*, determinava la somma di policlorobifenili (PCB) nei pesci utilizzando l'interfaccia *on-column* e la tecnica della *retention gap* senza l'impiego della valvola SVE [33]. Pietrogrande *et al.* utilizzarono un sistema Dualchrom dotato di un'interfaccia *loop-type* mediante evaporazione *totally concurrent* per l'analisi di PCB [34]. Tuttavia, poiché il sistema era dotato di un FID, venne eseguita anche un'analisi *off-line* GC-MS per confermarne l'identità. Il gruppo di Villén utilizzò l'interfaccia TOTAD per l'analisi dei pesticidi in campioni di acqua [35,36] e olio d'oliva [37,38].

Nel 1991 venne proposto un metodo per l'analisi degli idrocarburi policiclici aromatici (IPA) negli oli vegetali che prevedeva la pre-separazione su una colonna di gel di silice (10 cm × 2 mm ID), pentano ed MTBE come fasi mobili ed il trasferimento di una frazione di 300 µL tramite interfaccia *loop-type* [39]. Il rilevamento è stato effettuato mediante spettrometria di massa (MS). Durante il trasferimento, il profilo di pressione all'interno della sorgente ionizzante venne misurato dal trasduttore dell'interfaccia. Poiché durante il passaggio dei vapori di solvente il vuoto sembrava collassare, venne raccomandato di utilizzare un corto capillare a ridotto ID all'ingresso dell'interfaccia GC-MS. Tuttavia, gli autori non tennero in considerazione che il dispositivo di misurazione del vuoto è calibrato per il *carrier* e non per i vapori di solvente. Pertanto, a meno che lo spettrometro di massa non si spenga automaticamente, non vi è alcuna preoccupazione ad utilizzarlo come rivelatore [1]. L'analisi degli IPA è stata effettuata anche su molti campioni ambientali utilizzando un analizzatore MS, con quadrupolo o a trappola ionica [40,41].

Anche diversi composti naturali sono stati caratterizzati nel corso degli anni. Un sistema LC-GC accoppiato con MS a trappola ionica è stato impiegato per caratterizzare oli essenziali di bergamotto, limone, mandarino, arancia dolce, arancia

amara [42-45]. Gli autori dimostrarono come il pre-frazionamento dei terpeni migliorasse la caratterizzazione complessiva degli analiti evitando diverse coeluzioni.

L'interfaccia TOTAD è stata utilizzata per l'accoppiamento RPLC-GC nell'analisi di terpeni e lattoni in diversi campioni come olio essenziale di arancia, aroma e succo di arancia [46,47], come anche per la caratterizzazione di componenti minori (steroli, tocoferoli, squalene e dialcoli triterpenici) in oli commestibili [48]. In particolare, i metodi standard per la determinazione degli steroli, ampiamente analizzati per il controllo dell'autenticità degli oli, prevedono una fase di saponificazione per rimuovere gli esteri del glicerolo e liberare gli steroli esterificati con acidi grassi. Gli steroli vengono poi isolati mediante cromatografia preparativa su strato sottile (TLC) o estrazione in fase solida (SPE). Poiché la metodica standard richiede molta manodopera e un grande consumo di solventi, venne proposto un metodo alternativo in grado di fornire gli stessi risultati [49]. Considerando che la saponificazione rappresenta un'importante fonte di errore, oli e grassi furono sottoposti a transesterificazione a temperatura ambiente per 15 minuti, liberando gli steroli dai loro esteri. Mediante analisi HPLC risultò possibile separare gli esteri metilici degli acidi grassi dagli steroli, con cui venivano co-estratti, sostituendo così la TLC preparativa o la SPE. In particolare, utilizzando una colonna di gel di silice da 25 cm × 2 mm ID, esano ed isopropanolo come fasi mobili, vennero separati i diversi tipi di steroli, compresi i $\Delta 5$ dai $\Delta 7$. Infine, tramite trasferimenti multipli mediante l'interfaccia *loop-type* risultò possibile analizzare diverse frazioni dalla stessa pre-separazione LC.

Anche le cere sono state analizzate mediante LC-GC con l'impiego di diverse interfacce. Utilizzando l'interfaccia *loop-type* venne ottimizzato il trasferimento di una frazione da 900 μL su una pre-colonna GC da 4 m [50]. Tuttavia, diversi anni dopo, lo stesso autore propose l'impiego dell'interfaccia *on-column* con evaporazione dell'eluente *partially concurrent* [51]. Mediante la TOTAD, una frazione dal volume di 1,33 mL venne facilmente trasferita in 2,66 minuti a 150 °C, grazie all'elevata temperatura di ebollizione delle cere che venivano ben ritenute nel *liner* del PTV impaccato con Tenax, successivamente riscaldato a 350 °C [52].

2.3 Conclusioni

L'accoppiamento multidimensionale tra cromatografia liquida e gascromatografia si presenta come un'eccellente metodica analitica volta alla purificazione ed all'arricchimento del campione, risultando particolarmente utile per lo studio approfondito di composti o gruppi di composti target. Inoltre, un accoppiamento *on-line* completamente automatizzato consente di aumentare la precisione del metodo in aggiunta alla riduzione o totale eliminazione del rischio di perdita o contaminazione del campione che altrimenti si rischierebbe con un accoppiamento *off-line*.

Tuttavia, risulta necessario il ricorso ad un operatore esperto che comprenda i meccanismi di trasferimento, sia in NPLC-GC che in RPLC-GC, al fine scegliere correttamente l'interfaccia da utilizzare a seconda dell'applicazione.

Riferimenti Bibliografici

- [1] Advanced Gas Chromatography in Food Analysis, edited by Peter Q. Tranchida. Book Chapter 8, Multidimensional LC-GC. The Royal Society of Chemistry, 2020. ISBN: 978-1-78801-575-2.
- [2] R.E. Majors, E.L. Johnson, S. P Cram, A.C. III Brown, E. Freitas. Abstract of papers, in: Pittsburgh Conference on Analytical Chemistry and Applied Spectroscopy. Ohio, 1979. Abstract 116.
- [3] R. Majors. Multidimensional high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. Sci.*, 1980, 18, 571-579.
- [4] Hyphenations of capillary chromatography with mass spectrometry, edited by Peter Q. Tranchida and Luigi Mondello. Cap 2.3, Classical and comprehensive 2D LC-GC. Elsevier, 2020. ISBN: 978-0-12-809638-3.
- [5] J. A. Apffel and H. McNair. Hydrocarbon group-type analyses by on-line multidimensional chromatography: II. Liquid chromatography-gas chromatography. *J. Chromatogr.*, 1983, 279, 139.
- [6] K. Grob, D. Fröchlich, B. Schilling, H.P. Neukom, P. Nägeli. Coupling of high-performance liquid chromatography with capillary gas chromatography. *J. Chromatogr.* 1984, 295, 55-61.
- [7] H.J. Cortes, C. D Pfeiffer, B.E. Richter. On-line multidimensional chromatography using packed capillary LC and capillary GC. *J. High Res. Chromatogr.*, 1985, 8, 469-474.
- [8] J. Staniewski, H.-G. Janssen, C.A. Cramers, J.A. Rijks. Programmed-temperature injector for large-volume sample introduction in capillary gas chromatography and for liquid chromatography-gas chromatography interfacing. *J. Microcolumn Sep.*, 1992, 4 331-338.
- [9] M. Perez, J. Alario, A. Vázquez, J. Villén. On-line reversed phase LC-GC by using the new TOTAD (through oven transfer adsorption desorption) interface: application to parathion residue analysis. *J. Microcolumn Sep.*, 1999, 11, 582-589.

- [10] M. Biedermann, K. Grob, Memory effects with the on-column interface for on-line coupled high performance liquid chromatography-gas chromatography: the Y-interface, *J. Chromatogr. A*, 2009, 1216 (49), 8652-8658.
- [11] K. Grob, H., G. Schmarr and A. Mosandl. Early solvent vapor exit in GC for coupled LC-GC involving concurrent eluent evaporation. *J. High Resolut. Chromatogr.*, 1989, 12, 375-382.
- [12] F. Munari, A. Trisciani, G. Mapelli, S. Triestianu, K. Grob, J.M. Colin. Analysis of petroleum fractions by on-line micro HPLC-HRGC coupling, involving increased efficiency using retention gaps by partially concurrent solvent evaporation. *J. High Res. Chromatogr.*, 1985 8 (9), 601-606.
- [13] K. Grob. Solvent trapping in capillary gas chromatography: Two-step chromatography. *J Chromatogr.*, 1982, 253, 17.
- [14] K. Grob. Partial solvent trapping in capillary gas chromatography. *J. Chromatogr.*, 1982, 251, 235.
- [15] M. Biedermann, K. Grob. Memory effects with the on-column interface for on-line coupled high performance liquid chromatography-gas chromatography: the Y-interface. *J. Chromatogr. A*, 2009, 1216, 8652-8658.
- [16] K. Grob. On-line Coupled LC-GC, Hüthig, Heidelberg, Germany, 1991.
- [17] K. Grob, M. Bronz. On-line LC-GC transfer via a hot vaporizing chamber and vapor discharge by overflow; increased sensitivity for the determination of mineral oil in foods. *J. Microcolumn Sep.*, 1995, 7 (4), 421-427.
- [18] G. Purcaro, M. Zoccali, P.Q. Tranchida, L. Barp, S. Moret, L. Conte, L. Mondello. A comparison of two different multidimensional liquid-gas chromatography interfaces for the determination of mineral oil saturated hydrocarbons in foodstuffs. *Anal. Bioanal. Chem.*, 2013, 405, 1077-1084.
- [19] F.J. Senorans, G. Reglero, M. Herraiz. Use of a programmed temperature injector for on-line reversed-phase liquid chromatography-capillary gas chromatography. *J. Chromatogr. Sci.*, 1995, 33, 446-450.

- [20] A. Aragón, J.M. Cortés, R.M. Toledano, J. Villén, A. Vázquez. Analysis of wax esters in edible oils by automated on-line coupling liquid chromatography-gas chromatography using the through oven transfer adsorption desorption (TOTAD) interface. *J. Chromatogr. A*, 2011, 1218 (30), 4960-4965.
- [21] R.M. Toledano, J.M. Cortés, J.C. Andini, A. Vázquez, J. Villén. On-line derivatization with on-line coupled normal phase liquid chromatography-gas chromatography using the through oven transfer adsorption desorption interface: application to the analysis of total sterols in edible oils. *J. Chromatogr. A*, 2012, 1256, 191-196.
- [22] E. Pocurull, M. Biedermann, K. Grob. Introduction of large volumes of water-containing samples into a gas chromatograph: improved retention of volatile solutes through the swing system. *J. Chromatogr. A*, 2000, 876, 135-145.
- [23] K. Grob, I. Kaelin, A. Artho. Coupled LC-GC: the capacity of silica gel (HP)LC columns for retaining fat. *J. High Res. Chromatogr.*, 1991, 14, 373-376.
- [24] Biedermann M, Grob K. On-line coupled high performance liquid chromatography-gas chromatography for the analysis of contamination by mineral oil. Part 1: method of analysis. *J Chromatogr A.*, 2012, 1255, 56-75.
- [25] P. Q. Tranchida, M. Zoccali, G. Purcaro, S. Moret, L. Conte, M. Beccaria, P. Dugo L. Mondello. A rapid multidimensional liquid-gas chromatography method for the analysis of mineral oil saturated hydrocarbons in vegetable oils. *J. Chromatogr. A*, 2011, 1218, 7476.
- [26] G. Purcaro, M. Zoccali, P. Q. Tranchida, L. Barp, S. Moret, L. Conte, P. Dugo L. Mondello. Comparison of two different multidimensional liquid-gas chromatography interfaces for determination of mineral oil saturated hydrocarbons in foodstuffs. *Anal. Bioanal. Chem.*, 2013, 405, 1077.
- [27] K. Grob, M. Biedermann, A. Caramaschi, B. Pacciarelli. LC-GC analysis of the aromatics in a mineral oil fraction: batching oil for jute bags. *J. High Res. Chromatogr.*, 1991, 14, 33-39.

- [28] M. Biedermann, K. Fiselier, K. Grob. Aromatic hydrocarbons of mineral oil origin in foods: method for determining the total concentration and first results. *J. Agric. Food Chem.*, 2009, 57, 8711-8721.
- [29] L. Barp, M. Biedermann, K. Grob, F. Blas- Y- Estrada, U. C. Nygaard, J. Alexander, J.P. Cravedi. Accumulation of mineral oil saturated hydrocarbons (MOSH) in female Fischer 344 rats: Comparison with human data and consequences for risk assessment. *Sci. Tot. Environ.*, 2017, 575, 1263.
- [30] L. Barp, M. Biedermann, K. Grob, F. Blas- Y- Estrada, U. C. Nygaard, J. Alexander and J.P. Cravedi. Mineral oil saturated hydrocarbons (MOSH) in female Fischer 344 rats; accumulation of wax components; implications for risk assessment *Sci. Tot. Environ.*, 2017, 583, 319.
- [31] L. Barp, C. Kornauth, T. Würger, M. Rudas, M. Biedermann, A. Reiner, N. Concin K. Grob. Mineral oil in human tissues, Part I: concentrations and molecular mass distributions. *Food Chem. Tox.*, 2014, 72, 312.
- [32] K. Grob. Toxicological Assessment of Mineral Hydrocarbons in Foods: State of Present Discussions. *J. Agric. Food Chem.*, 2018, 66, 6968.
- [33] K. Grob, E. Müller, W. Meier. HRC & CC. *J. High Resolut. Chromatogr. Chromatogr. Commun.*, 1987, 10, 41.
- [34] M.C. Pietrogrande, M. Michi, M.N. Plasencia, F. Dondi. Analysis of PCB by on-line coupled HPLC-HRGC. *Chromatographia*, 2002, 55, 189-196.
- [35] M. Perez, J. Alario, A. Vazquez, J. Villén. Pesticide residue analysis by off-line SPE and on-line reversed-phase LC-GC using the through-oven-transfer adsorption/desorption interface. *Anal. Chem.*, 2000, 72, 846-852.
- [36] J. Alario, M. Perez, A. Vazquez, J. Villén. Very-large-volume sampling of water in gas chromatography using the through oven transfer adsorption desorption (TOTAD) interface for pesticide-residue analysis. *J. Chromatogr. Sci.*, 2001, 39, 65-69.
- [37] R. Sanchez, A. Vázquez, D. Riquelme, J. Villén. Direct analysis of pesticide residues in olive oil by on-line reversed phase liquid chromatography-gas

chromatography using an automated through oven transfer adsorption desorption (TOTAD) interface. *J. Agric. Food Chem.*, 2003, 51, 6098-6102.

[38] R. Sanchez, A. Vazquez, J.C. Andini, J. Villén. Automated multiresidue analysis of pesticides in olive oil by on-line reversed-phase liquid chromatography-gas chromatography using the through oven transfer adsorption-desorption interface. *J. Chromatogr. A*, 2004, 1029, 167-172.

[39] J. J. Vreuls, G. J. de Jong, U. T. Brinkman. *Chromatographia*, 1991, 30, 113.

[40] A.J. Bulterman, J.J. Vreuls, R.T. Ghijsen, U.A.Th. Brinkman. Selective and sensitive detection of organic contaminants in water samples by online trace enrichment gas-chromatography mass-spectrometry. *J. High Res. Chromatogr.*, 1993, 16, 397-403.

[41] E. Brander, C. Wold. The identification and quantification of a high molecular weight light stabilizer in polycarbonate by application of an online coupling of size exclusion chromatography in stopped flow mode with pyrolysis gas chromatography time of flight mass spectroscopy. *J. Chromatogr. A*, 2014, 1362, 309-312.

[42] L. Mondello, K.D. Bartle, G. Dugo, P. Dugo. Automated HPLC-HRGC: a powerful method for essential oil analysis. Part III. Aliphatic and Terpene aldehydes of orange oil. *J. High Res. Chromatogr.*, 1994, 17, 312-314.

[43] L. Mondello, K.D. Bartle, P. Dugo, P. Gans, G. Dugo. Automated LC-GC: a powerful method for essential oils analysis. Part IV. Coupled LC-GC-MS (ITD) for bergamot oil analysis. *J. Microcolumn Sep.*, 1994, 6, 237-244.

[44] L. Mondello, P. Dugo, K.D. Bartle. Automated HPLC-HRGC: a powerful method for essential oils analysis. Part V. identification of terpene hydrocarbons of bergamot, lemon, Mandarin, sweet orange, bitter orange, grapefruit, clementine, and Mexican lime oils by coupled HPLC-HRGC-MS(ITD). *Flavour Fragr. J.*, 1995, 10, 33-42.

[45] L. Mondello, G. Dugo, P. Dugo, K.D. Bartle. On-Line HPLC-HRGC in the analytical chemistry of citrus essential oils. *Perfum. Flavor.*, 1996, 21, 25-49.

[46] M.L. Ruiz de Castillo, M.L. Caja, G.P. Blanch, M. Herraiz. Chiral evaluation of aroma-active compounds in real complex samples. *J. Food Sci.*, 2003, 68, 770-774.

- [47] M.L. Caja, G.P. Blanch, M. Herraiz, M.L. Ruiz de Castillo. On-line reversed-phase liquid chromatography-gas chromatography coupled to mass spectrometry for enantiomeric analysis of chiral compounds in fruit beverages. *J. Chromatogr. A*, 2004, 1054, 81-85.
- [48] L.M. Cortes, R. Sánchez, J. Villén, A. Vázquez. Analysis of unsaponifiable compounds of edible oils by automated on-line coupling reversed-phase liquid chromatography-gas chromatography using the through oven transfer adsorption desorption interface. *J. Agric. Food Chem.*, 2006, 54, 6963-6968.
- [49] M. Biedermann, K. Grob, C. Mariani. Transesterification and on-line LC-GC for determining the sum of free and esterified sterols in edible oils and fats. *Fat Sci. Techn.*, 1993, 95, 127.
- [50] A. Artho, K. Grob, C. Mariani. On-Line LC-GC for the analysis of the minor components in edible oils and fats-the direct method involving silylation. *Fat Sci. Technol.*, 1993, 95, 176-180.
- [51] M. Biedermann, P. Haase-Aschoff, K. Grob. Wax ester fraction of edible oils: analysis by on-line LC-GC-MS and GC×GC-FID. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 2008, 110, 1084-1094.
- [52] A. Aragón, J.M. Cortés, R.M. Toledano, J. Villén, A. Vázquez. Analysis of wax esters in edible oils by automated on-line coupling liquid chromatography-gas chromatography using the through oven transfer adsorption desorption (TOTAD) interface. *J. Chromatogr. A*, 2011, 1218 (30), 4960-4965.

CAPITOLO 3

Gascromatografia bidimensionale comprehensive

3.0 Introduzione

L'invenzione della gascromatografia (GC) da parte di James e Martin risale al 1952 [1] con la pubblicazione di un articolo scientifico riportante, tra i vari esempi, la separazione di otto acidi grassi su una colonna impaccata di 11 piedi (3,35 m), ad una temperatura di 137 °C, usando azoto come gas *carrier*, per una durata totale di analisi di 100 minuti. Valutando visivamente il cromatogramma si potrebbe concludere che la colonna impiegata possedeva una *peak capacity* pari a circa 30 [2]. Questo parametro esprime il numero massimo di picchi che idealmente possono essere risolti in una determinata finestra temporale in specifiche condizioni sperimentali quali lunghezza, diametro interno e spessore della fase stazionaria della colonna, assieme a tipologia di fase mobile, temperatura e pressione.

Poco dopo l'invenzione della GC, nel 1958 avvenne l'introduzione delle colonne tubolari aperte (OTC) da parte di Golay [3]. La loro natura tubolare aperta consentì l'uso di colonne più lunghe che offrivano certamente un potere separativo maggiore rispetto quelle impaccate. A seconda delle condizioni operative, la *peak capacity* di un approccio GC monodimensionale utilizzando una colonna classica da 30 m × 0,25 mm ID × 0,25 µm d_f, rientra nell'intervallo 400-600 ed è, pertanto, maggiore di circa un ordine di grandezza rispetto quella delle colonne impaccate. In teoria, se una colonna GC possiede una *peak capacity* pari a 500, ciò significa che 500 picchi potrebbero potenzialmente essere disposti uno accanto all'altro nello spazio monodimensionale. Tuttavia, dal momento che i campioni del mondo reale sono spesso costituiti da un numero elevato di composti con caratteristiche chimiche diverse, se si desidera un livello di risoluzione del 98%, secondo le regole teoriche, la *peak capacity* del metodo dovrebbe superare di un fattore 100 il numero dei composti presenti nel campione [4]. Di conseguenza, per separare completamente un campione contenente 50 analiti è necessaria una *peak capacity* pari a 5000.

Dall'invenzione delle OTC, tra gli sviluppi più importanti nel campo della GC ricordiamo l'invenzione della GC multidimensionale mediante colonne capillari da parte di McEwen nel 1964 [5]. Nonostante ciò, le separazioni cromatografiche multidimensionali erano già state impiegate fin dagli albori della cromatografia. Nel 1944, Consden, Gordon e Martin effettuarono la prima separazione bidimensionale di un estratto proteico idrolizzato mediante cromatografia su strato sottile [6]. Il foglio di

carta venne sottoposto ad una prima separazione in una direzione seguita da una seconda separazione ad angolo retto rispetto alla prima.

Tuttavia, soltanto nel 1987 Giddings discusse i requisiti di base che due o più separazioni multiple devono soddisfare in modo da poter essere definite “multidimensionali” [7]. In particolare:

- i componenti del campione sono sottoposti a due o più fasi di separazione;
- due componenti qualsiasi separati nella prima dimensione (1D) devono rimanere separati nella seconda dimensione (2D);
- la separazione nella 2D deve essere significativamente più veloce di quella in 1D .

La GC multidimensionale può essere suddivisa in due categorie: GC *heart-cutting* (GC-GC), in cui una singola frazione (o alcune specifiche frazioni) dell'eluente di 1D viene trasferita nella 2D per un'ulteriore separazione, e GC bidimensionale *comprehensive* (GC×GC), in cui la totalità degli analiti che eluiscono dalla 1D vengono sottoposti ad un'ulteriore separazione in 2D . Il salto dalla GC-GC, nata nel 1958 ad opera di Simmons e Snyder [8], alla GC×GC è stato compiuto nel 1991 a seguito della rivoluzionaria invenzione del modulatore da parte di Liu e Phillips [9]. Ad oggi, la GC×GC è presente sulla scena analitica da più di 30 anni ed ha subito notevoli evoluzioni, alcune delle quali verranno descritte nei paragrafi successivi.

3.1 Principi teorici

Una separazione *comprehensive* prevede tipicamente la connessione in serie di due colonne a diversa polarità interfacciate dal modulatore. La scelta più comune consiste nell'utilizzo di un accoppiamento di colonne di tipo apolare-polare. Con tale combinazione, in 1D gli analiti vengono separati in base alla loro pressione di vapore (volatilità), mentre in 2D la loro separazione dipende dalla affinità nei confronti della fase stazionaria (polarità) (Figura 3.1). Pertanto, considerando che le due separazioni sono tra di loro indipendenti, dalla prima regola di Giddings deriva il concetto di ortogonalità.

L'aumento della selettività, dovuto ai due diversi meccanismi di separazione, rappresenta uno dei principali benefici della GC×GC in aggiunta all'aumento del potere separativo (*peak capacity*) ed all'ottenimento di cromatogrammi strutturati.

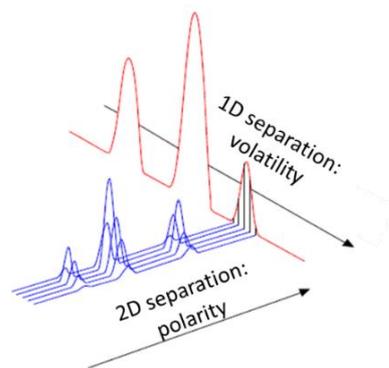


Figura 3.1. Ortogonalità della GC×GC.

In GC×GC la *peak capacity* totale viene teoricamente calcolata moltiplicando la *peak capacity* della ¹D per quella della ²D. Per tale ragione Blomberg *et al.* per definire la *comprehensive two-dimensional GC* (C2D-GC) suggerirono di utilizzare l'acronimo GC×GC [10]. Tuttavia, il valore risultante risulta superiore alla *peak capacity* reale principalmente perché esiste sempre un certo grado di correlazione tra le due dimensioni analitiche. Viene comunque accettato che gli approcci GC×GC possano potenzialmente consentire un aumento della *peak capacity* di almeno un ordine di grandezza rispetto ad analisi GC monodimensionali con OTC [11].

Tornando al concetto di multidimensionalità, nel 1995 Giddings [12] introdusse il concetto di dimensionalità del campione, proprietà intrinseca (diversa dal numero di componenti) che ne determina l'adattabilità alle tecniche multidimensionali. Essa può essere definita come il numero di variabili indipendenti che devono essere specificate per identificare univocamente i componenti presenti nel campione. Ad esempio, l'ipotetico campione riportato in Figura 3.2, contenente composti diversi per forma, colore e dimensione, ha una dimensionalità pari a tre. Se un campione di questo tipo contenesse un elevato numero di analiti, le possibilità di separarli tutti mediante un approccio monodimensionale sarebbero nulle. Se la separazione venisse eseguita in base alle dimensioni, il colore e la forma interferirebbero; se la separazione avvenisse in base al colore, dimensione e forma interferirebbero, come anche la dimensione e il colore interferirebbero se la separazione venisse eseguita in base alla forma.

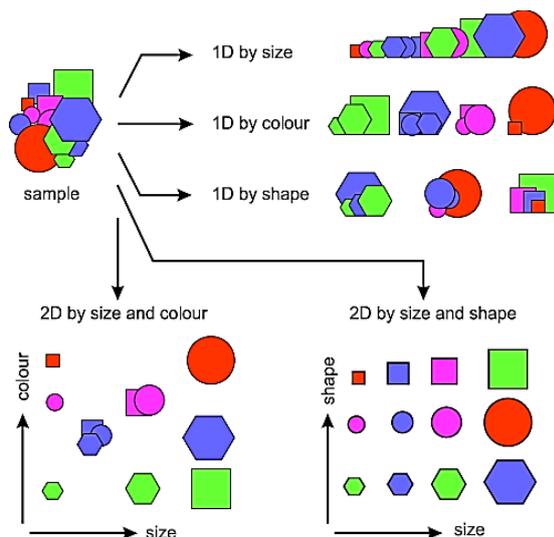


Figura 3.2. Corrispondenza tra separatore e dimensionalità del campione [13].

L'unica possibilità di separare tutti i costituenti di questo campione è quella di utilizzare un sistema di separazione bidimensionale ortogonale. Qualora esista una corrispondenza tra la dimensionalità del campione ed il sistema di separazione, gli analiti separati appariranno come nella parte bassa della Figura 3.2.

Di conseguenza, se ad esempio applicassimo lo stesso concetto ad una frazione di petrolio, una miscela di idrocarburi contenente grandi quantità di isomeri di alcani, alcheni, cicloalcani ed idrocarburi aromatici, il campione possederebbe una dimensionalità pari a quattro. Mediante l'ortogonalità della GC×GC gli idrocarburi si disporranno sul piano bidimensionale ottenendo un cromatogramma altamente strutturato in cui è facilmente possibile raggruppare omologhi, congeneri ed isomeri strutturalmente correlati. Un esempio della separazione strutturata di un campione di *coal tar* è mostrato in Figura 3.3, dove è possibile osservare idrocarburi lineari, mono-, di-, tri- e tetra-aromatici.

Ricapitolando, i principali vantaggi della GC×GC sono:

- miglioramento del potere separativo, dovuto ad un aumento della *peak capacity*;
- aumento della selettività, in quanto l'intero campione viene sottoposto a separazione su due fasi stazionarie chimicamente diverse;
- aumento della sensibilità, a seguito della focalizzazione degli analiti soprattutto quando si utilizza la modulazione criogenica);

- miglioramento dell'identificazione, dovuto all'ottenimento di un pattern ordinato di composti nel piano bidimensionale;
- aumento della velocità di analisi ed ottenimento di un numero maggiore di dati per unità di tempo.

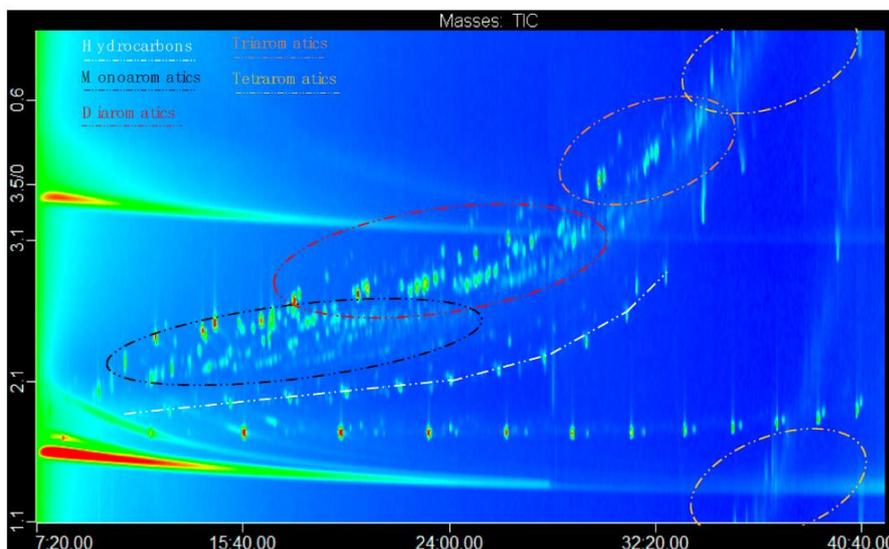


Figura 3.3. Cromatogramma GC×GC-HRToF-MS di un campione di *coal tar* [14].

3.2 Aspetti strumentali

Come precedentemente accennato, un'analisi GC×GC prevede che due colonne, interfacciate dal modulatore, siano connesse in serie. La funzione del modulatore è quella di effettuare dei tagli continui dell'eluato proveniente dalla ¹D e di reiniettarli nella ²D. Il tempo richiesto per completare l'intero processo viene definito come "periodo di modulazione" (PM) ed è comunemente compreso tra 3 e 8 s. Al fine di ottenere un'analisi completa e preservare la separazione della ¹D, la separazione degli analiti nella ²D deve essere completata prima che un altro "taglio" venga iniettato. In questo modo viene evitata la sovrapposizione di picchi generati da diversi cicli di modulazione, secondo quel fenomeno noto come *wraparound* che si verifica quando il tempo di eluizione di uno specifico analita è maggiore rispetto al tempo di modulazione. Per preservare la risoluzione ottenuta dalla ¹D sono necessarie 3-4 modulazioni per picco [15]. Gli effetti della scelta del corretto tempo di modulazione per preservare la separazione avvenuta nella ¹D sono mostrati in Figura 3.4 con la separazione di 1-octene-3-one and 1-octene-3-ol a diversi PM, rispettivamente 3, 4, 8 e 12 s. Con un PM di 3 secondi la separazione dei composti viene preservata

completamente, per poi diminuire utilizzando PM più lunghi (4 e 8 s) e scomparire del tutto utilizzando un PM di 12 s.

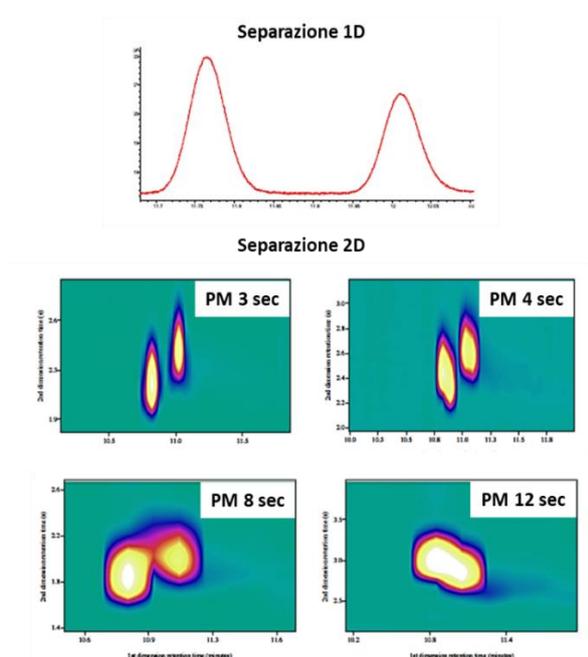


Figura 3.4. Effetto del diverso tempo di modulazione sulla conservazione della separazione 1D tra 1-octene-3-one and 1-octene-3-ol [13].

Un cromatogramma GC×GC può essere considerato come il risultato di separazioni GC molto veloci posizionate una dopo l'altra. Ad esempio, considerando un tempo di analisi di 4000 s ed un PM di 5 s, il cromatogramma risultante sarà composto da 800 separazioni che avvengono sulla colonna di ²D.

L'effetto della modulazione di un picco corrispondente ad un singolo analita può essere osservato nella Figura 3.5A.

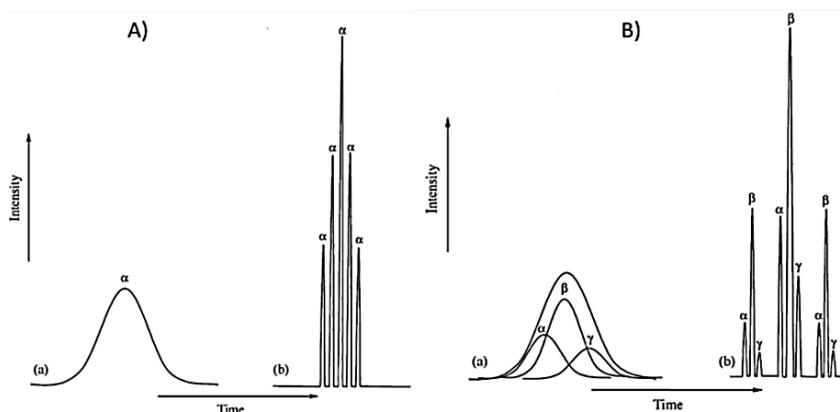


Figura 3.5. A) picco a singolo componente non modulato (a) e modulato (b); B) picco multicomponente non modulato (a) e modulato (b) [16].

Quest'ultimo viene tagliato in cinque frazioni ad intervalli specifici che corrispondono al PM. La somma delle aree dei 5 picchi risultanti è ovviamente uguale a quella del singolo picco non modulato. La Figura 3.5B riporta invece la risoluzione di un picco generato dalla coeluizione di 3 analiti (α , β , γ).

Le prestazioni del processo di modulazione possono essere valutate attraverso l'osservazione dei cromatogrammi nativi. Tuttavia, la visualizzazione del cromatogramma bidimensionale risulta di fondamentale importanza per una valutazione complessiva della separazione GC×GC, come ad esempio l'eventuale presenza di *wraparound*, la quantità di spazio occupato e la formazione di pattern ordinati di classi chimiche. Sia la visualizzazione che le successive fasi di integrazione e identificazione dei picchi nel cromatogramma bidimensionale richiedono il ricorso a software specializzati. La generazione di un grafico bidimensionale è un processo piuttosto semplice, in quanto ciascuna separazione che avviene nella 2D viene ruotata ortogonalmente, rispetto all'asse x del cromatogramma 1D (Figura 3.6).

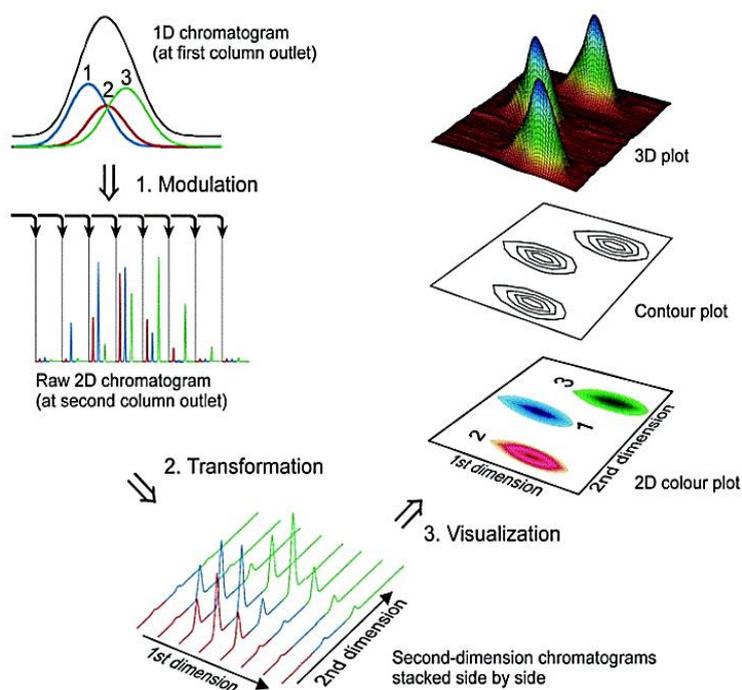


Figura 3.6. Il processo di ricostruzione di un cromatogramma GC×GC bidimensionale e tridimensionale [17].

A questo punto, i picchi modulati sono allineati lungo l'asse y e sono definiti da un tempo di ritenzione solitamente espresso in secondi. I picchi modulati, relativi a processi di modulazione sequenziali, vengono accorpati se presentano lo stesso tempo di ritenzione ²D (entro un certo intervallo di tolleranza temporale). Se come rivelazione viene impiegata una tecnica di spettrometria di massa, anche le somiglianze spettrali possono essere prese in considerazione per la ricostruzione del picco ²D. Lo spazio di separazione planare risultante contiene picchi colorati di forma ovale (*blob*) ciascuno definito due tempi di ritenzione (di ¹D e ²D) e da un'area. L'intensità del colore e la dimensione dei *blob* sono relative alla quantità totale di ciascun composto presente nel campione. Una sovrapposizione erronea di due molecole diverse è statisticamente improbabile, in quanto richiederebbe che esse avessero tempi di ritenzione uguali sia in ¹D che in ²D. Sebbene molto poco utilizzato, risulta possibile anche generare grafici tridimensionali contenenti picchi a forma di cono proiettati in uno spazio definito da un asse z.

3.2.1 Combinazioni di colonne

Sebbene il modulatore sia indispensabile per il successo delle separazioni bidimensionali, in GC×GC le colonne cromatografiche svolgono un ruolo altrettanto significativo. Diversi sono i parametri da attenzionare. Tra questi, la scelta delle fasi stazionarie risulta indispensabile per ottenere un'efficace separazione e, soprattutto, massimizzare lo spazio separativo bidimensionale, specialmente nel caso di campioni estremamente complessi. La scelta più comune consiste nell'utilizzo di una combinazione di colonne a bassa [ad esempio poly(5%diphenyl/95% dimethylsiloxane)] e media polarità [poly(35%diphenyl/65% dimethylsiloxane)], combinazione che, in molti casi, fornisce un risultato soddisfacente. Qualora la separazione non risultasse adeguata, un'inversione di polarità potrebbe portare all'ottenimento di risultati migliori. Ovviamente, una conoscenza preliminare della composizione del campione da analizzare fornisce indicazioni sulla scelta più opportuna da effettuare.

Oltre alla selezione delle fasi stazionarie, occorre prestare attenzione alle dimensioni delle colonne. Generalmente la colonna ¹D è di dimensioni di 20-30 m × 0,25 mm ID, mentre per la ²D vengono comunemente utilizzate colonne *narrow-bore* molto corte, tipicamente di 1-1,5 × 0,1 mm ID [18,19], dal momento che la separazione

nella ²D deve essere completata in un tempo inferiore al PM per evitare fenomeni di *wraparound*. Ad esempio, con un accoppiamento tra una colonna di ¹D 30 m × 0,25 mm ID e una di ²D 1 m × 0,1 mm ID, ad una temperatura iniziale di 180 °C e una pressione all'iniettore di 194,9 kPa, usando idrogeno come gas *carrier*, le velocità lineari in ¹D e ²D sarebbero rispettivamente pari a circa 35 e 330 cm s⁻¹, pertanto più o meno ideali in ¹D ma lontane dall'ottimale in ²D [20]. Questo problema può essere risolto utilizzando una colonna ²D con ID maggiore. Ad esempio, considerando un set di colonne 30 m × 0,25 mm ID + 1 m × 0,18 mm ID, con un flusso di 1,6 mL min⁻¹ (idrogeno) e una temperatura di 50 °C, le velocità lineari generate in ¹D e ²D sarebbero circa 40 e 110 cm s⁻¹ che possono essere considerate prossime all'ideale in entrambe le dimensioni analitiche. Un ulteriore vantaggio derivante dall'utilizzo di una colonna ²D con ID maggiore è, senza dubbio, la maggiore *sample capacity* dal momento che le colonne con 0.10 mm di ID si sovraccaricano facilmente.

Esistono, inoltre, ulteriori opzioni che possono essere impiegate per ottimizzare la velocità lineare in ²D tra cui:

- una riduzione della pressione del *carrier* all'iniettore che, tuttavia, comporterà sia un prolungamento del tempo di analisi che temperature di eluizione più elevate in ¹D;
- l'utilizzo in ²D di una colonna più lunga che determinerà un aumento dei tempi di ritenzione in ²D, richiedendo un PM maggiore col rischio di perdere parzialmente la risoluzione della ¹D, in aggiunta ad una riduzione della sensibilità.

Anche l'ottimizzazione della temperatura è un fattore importante che influenza qualsiasi separazione GC×GC. Normalmente, in ¹D la programma di temperatura viene resa relativamente lenta al fine di aumentare le interazioni degli analiti con la fase stazionaria e, pertanto, l'ampiezza alla base dei picchi facilitandone il taglio in 3-4 modulazioni. Tuttavia, bisogna considerare che un eccessivo aumento dell'ampiezza alla base comporterebbe anche un aumento del numero di modulazioni per picco (*oversampling*) con conseguente riduzione della sensibilità. In alternativa si potrebbe pensare di allungare il PM facendo però attenzione a non incorrere in fenomeni di *wraparound*.

3.2.2 Modulatori

Il modulatore può essere considerato come il componente chiave della strumentazione GC×GC, dal momento che è responsabile del trasferimento degli analiti dalla ¹D alla ²D determinando una separazione *comprehensive*. Oltre al PM, un altro importante parametro che esprime le prestazioni del modulatore è il *duty cycle*, definito come la frazione di analiti che viene trasferita dalla ¹D alla ²D. Un modulatore che trasferisce completamente tutto l'eluato ¹D alla ²D ha *duty cycle* unitario (=1). I modulatori possono essere sostanzialmente classificati in due categorie:

- **modulatori termici**, che mediante un controllo della temperatura intrappolano porzioni di eluato proveniente dalla ¹D e le rilasciano nella ²D;
- **modulatori a flusso** in cui intrappolamento e rilascio avvengono tramite controllo dei flussi di gas.

Quest'ultima categoria di modulatori, secondo una classificazione riportata da Tranchida *et al.* nel 2016 [21], possono essere a loro volta distinti in sistemi che utilizzano valvole “in linea”, caratterizzati dalla presenza di una valvola di collegamento tra la ¹D e la ²D che devia i flussi, e sistemi “fuori linea” basati sulla manipolazione della pressione tra le due dimensioni analitiche, ma senza collegamento diretto. Synovec *et al.* nel 2019 [22] proposero una nuova classificazione dei modulatori a flusso distinguendoli in *differential flow* e *diverting flow*. Nel primo caso, le due dimensioni analitiche sono alimentate da due flussi indipendenti di gas *carrier* che consentono la modulazione. Secondo il modello introdotto da Seeley [23], gli attuali modulatori *differential flow* raccolgono l'eluato dalla ¹D in un breve *loop* di raccolta che viene poi svuotato nella ²D tramite il flusso di gas ausiliario. Nel modulatore *diverting flow*, l'impiego di una valvola consente di deviare alternativamente il trasferimento dell'eluato dalla ¹D alla ²D o ad un ramo di scarico. In questo caso, pertanto, il trasferimento tra le due colonne analitiche è parziale e soltanto una parte dell'eluato viene modulato e reiniettato nella ²D, con conseguente basso *duty cycle* (<1).

Infine, a seconda della direzione del flusso, il modulatore può essere definito *forward fill/flush* quando la reiniezione nella ²D avviene nella stessa direzione della fase di riempimento, e *reversed fill/flush* se l'iniezione viene eseguita nella direzione opposta al riempimento.

Di seguito verranno riportati i principali modulatori termici secondo il loro ordine di sviluppo al fine di creare una cronostoria di come la GC×GC si sia evoluta in questo campo. Tutti i modulatori termici possiedono un *duty cycle* unitario determinando, tra i loro principali vantaggi, dei maggiori rapporti segnale/rumore (*s/n*) degli analiti e pertanto una maggiore sensibilità di rilevamento. I modulatori termici possono essere ulteriormente suddivisi in *heater-based* e *cryo-based* [24].

3.2.2.1 Modulatori *heater-based*

I modulatori “basati sul riscaldamento” intrappolano l’eluato proveniente dalla ¹D a temperatura ambiente o superiore. Tra questi vanno inclusi:

- Modulatore a desorbimento termico (*thermal desorption modulator, TDM*)

Il primo modulatore sviluppato da Phillips e collaboratori nel 1991 [9] venne costruito utilizzando la parte iniziale (15 cm) della colonna ²D che, rivestita con una pellicola metallica elettricamente conduttiva, venne posizionata all'esterno del forno GC (Figura 3.7).

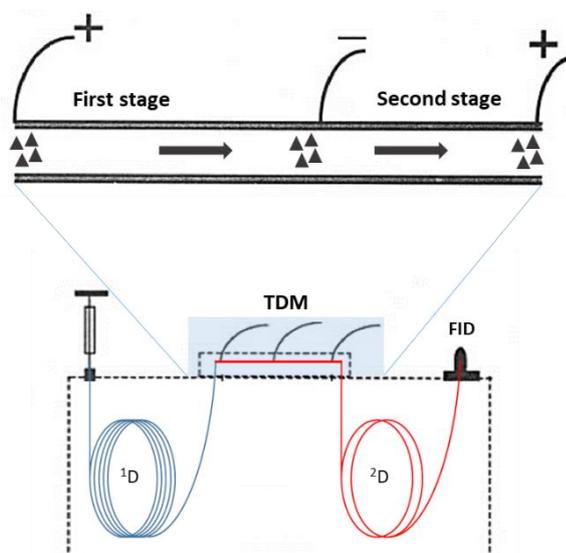


Figura 3.7. Rappresentazione schematica del modulatore a desorbimento termico.

Il TDM era un modulatore *dual-stage* il cui principio di funzionamento prevedeva un totale di 4 distinte fasi:

- accumulo (primo stadio – fase I): in testa al modulatore si forma una banda cromatografica di eluato che, trovandosi ad una temperatura molto più bassa rispetto al forno GC, si focalizza;

- reiniezione (primo stadio – fase II): un impulso elettrico della durata di 20 ms, applicato sulla pellicola metallica, consente la rimobilizzazione indotta dal calore della banda;

- accumulo (secondo stadio – fase I): la banda rimobilizzata raggiunge la parte fredda finale del filamento del modulatore e viene nuovamente focalizzata;

- reiniezione (secondo stadio – fase II): un secondo impulso elettrico, a distanza di 100 ms dal primo, reinietta la banda focalizzata in ²D.

I risultati sperimentali ottenuti con questo primo modulatore si dimostrarono accettabili, tuttavia, gli impulsi applicati spesso comportavano sovrapposizione degli analiti. Questi problemi vennero presto riconosciuti da Phillips e il TDM venne modificato aumentando la lunghezza del primo stadio di intrappolamento, nonché il tempo che intercorreva tra gli impulsi elettrici. Come risultato di queste modifiche, il secondo stadio (più breve) forniva delle soddisfacenti focalizzazioni e reiniezioni degli analiti nella ²D. Tuttavia, questo primo modello di modulatore termico era piuttosto fragile in quanto i capillari metallici (verniciati in oro) non si dimostrarono molto robusti, spesso si verificavano bruciature e, pertanto, andavano sostituiti. Inoltre, l'applicazione della vernice metallica doveva essere eseguita in un laboratorio specializzato. Il TDM non venne mai prodotto commercialmente.

- Modulatore termico rotante (*rotating thermal modulator o sweeper*)

Uno dei modulatori termici più significativi ed anche il primo ad essere commercializzato dalla Zoex Corporation fu il modulatore termico rotante (RTM) anche noto come *sweeper*. Descritto per la prima volta nel 1996 [25], venne sottoposto ad ulteriori sviluppi tecnici nel corso degli anni fino ad apparire nella sua versione finale nel 1999 [26]. Illustrato in Figura 3.8, era costituito da un riscaldatore rotante dotato di una scanalatura che gli consentiva di scorrere sul capillare del modulatore che, dotato di uno spesso rivestimento di fase stazionaria, era situato tra la ¹D e la ²D.

Il processo di modulazione *dual-stage* era ottenuto attraverso la rotazione del riscaldatore sul capillare del modulatore. Sia l'intrappolamento che la focalizzazione degli analiti si verificavano alla temperatura del forno GC.

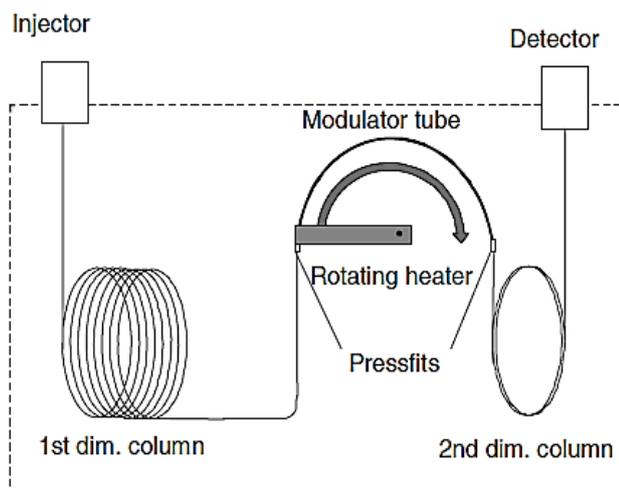


Figura 3.8. Rappresentazione schematica del modulatore termico rotante [27].

In particolare, quando gli analiti eluivano dalla 1D si accumulavano nella spessa fase stazionaria del capillare del modulatore. A questo punto il riscaldatore, mantenuto ad una temperatura di circa $100^{\circ}C$ al di sopra di quella del forno, iniziava a ruotare sull'estremità a monte del capillare riscaldandone una porzione. In questo modo, la “fetta” di analiti intrappolata veniva spinta a valle del capillare ad opera del gas *carrier* che ovviamente si muoveva più velocemente del riscaldatore. Gli analiti, pertanto, alla temperatura del forno GC, subivano una forte focalizzazione in una sezione del capillare non ancora esposta al riscaldatore. Durante la seconda fase del processo di modulazione, mentre il riscaldatore continuava la sua rotazione, la banda focalizzata raggiungeva la parte a valle del capillare del modulatore (non rivestita di fase stazionaria) e veniva iniettata nella 2D .

Per quanto riguarda la sensibilità, venne riscontrato che l'intensità del segnale aumentava fino a un fattore 30 rispetto alla GC convenzionale [21]. Tuttavia, lo *sweeper* non si dimostrò adatto ad intrappolare i composti più volatili. Inoltre, per una corretta reiniezione delle bande focalizzate di analiti era necessario che il riscaldatore avesse una temperatura di circa $100^{\circ}C$ maggiore rispetto quella del forno, il che comportava l'impossibilità di modulare i composti molto altobollenti.

Sebbene lo *sweeper* venne impiegato per diverse applicazioni, solo due dei cinque prototipi funzionarono ininterrottamente per due anni. In seguito all'introduzione dei primi modulatori criogenici, l'uso del RTM diminuì rapidamente.

3.2.2.2 Modulatori *cryo-based*

Secondo il principio di funzionamento di questi modulatori l'intrappolamento degli analiti avviene al di sotto della temperatura ambiente mediante vari meccanismi di raffreddamento.

- Modulatore criogenico longitudinale (*longitudinally modulated cryogenic system*)

Il modulatore criogenico longitudinale (LMCS) venne applicato ad un'analisi GC×GC per la prima volta nel 1998 da Marriott e Kinghorn, i quali descrissero la separazione di un campione di cherosene [28]. Il LMCS è costituito da una trappola mobile, raffreddata da un flusso criogenico di CO₂, posizionata all'estremità finale della 1^aD o all'inizio della 2^aD (Figura 3.9). Quando la trappola è ferma avviene il processo di intrappolamento degli analiti, al termine del quale la trappola si muove longitudinalmente lungo la colonna esponendo al calore del forno GC la regione precedentemente raffreddata, consentendo così la reiniezione nella 2^aD della banda focalizzata.

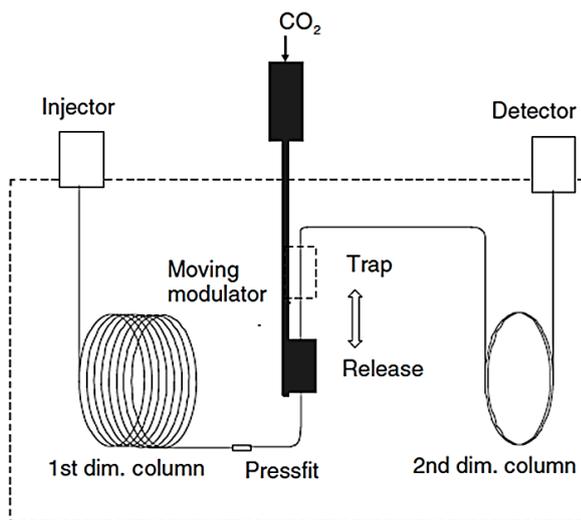


Figura 3.9. Rappresentazione schematica del modulatore criogenico longitudinale [27].

Gli autori dimostrarono che il LMCS fosse una valida alternativa all'RTM, se non un metodo di modulazione superiore, riportando per il pentadecano un notevole incremento dei rapporti *s/n* da 7:1 del picco non modulato a 56:1 per quello modulato. Altri vantaggi evidenziati includevano l'assenza del capillare del modulatore, e pertanto una singola connessione tra le due dimensioni analitiche, e l'indipendenza tra la temperatura del forno e quella del modulatore (il principale problema del RTM).

Tuttavia, l'impiego di CO₂ come gas criogenico determinava un aumento dei costi per analisi. Inoltre, considerando che la rimobilizzazione degli analiti avviene alla temperatura del forno GC, la mancanza di un riscaldamento aggiuntivo potrebbe rappresentare un limite durante l'analisi di composti altobollenti ad elevato peso molecolare. Infine, il movimento del modulatore rappresenta un ulteriore svantaggio che potrebbe comportare episodi di rottura della colonna, sebbene il LMCS possa essere utilizzato continuativamente per lunghi periodi di tempo. Sebbene l'LMCS rappresentasse un miglioramento significativo rispetto ai modulatori termici fino a quel momento sviluppati, era in grado di raffreddare la trappola solo fino a una temperatura di circa -50°C, che era insufficiente per intrappolare i composti volatili.

Pertanto, la fase successiva nell'evoluzione dei modulatori criogenici ha comportato sia l'utilizzo di agenti criogenici più efficaci che la riduzione dell'uso di parti mobili.

- Modulatore criogenico *static dual-stage (quad-jet)*

Nel 2000, Ledford e Billesbach presentarono un nuovo modulatore termico [29] che venne chiamato *quad-jet* dal momento che impiegava due coppie di getti freddi e caldi, posti in testa alla 2^D e pulsati in modo alternato (Figura 3.10). Ciascuna coppia di getti riscaldava e raffreddava sempre la stessa zona della colonna, rispettivamente in un punto a monte e uno più a valle.

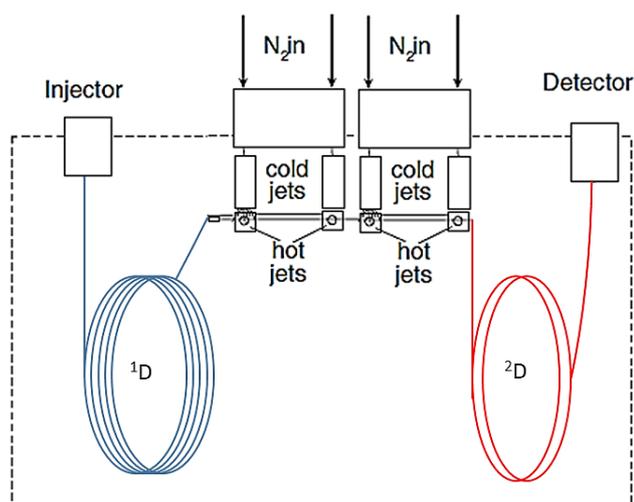


Figura 3.10. Rappresentazione schematica del modulatore *quad-jet* [27].

La modulazione *dual-stage* era eseguita come segue: quando gli analiti eluivano dalla ¹D, il primo stadio di accumulo era ottenuto attraverso l'attivazione del primo getto freddo a N₂ liquido posizionato a monte. Al termine del primo processo di intrappolamento, il getto caldo (a monte) del primo stadio e il getto freddo (a valle) del secondo stadio venivano attivati simultaneamente, trasferendo gli analiti intrappolati al secondo stadio di focalizzazione. Al termine del secondo processo di intrappolamento, attivando il secondo getto caldo (a valle) e nuovamente il primo getto freddo (a monte) era possibile, rispettivamente, rilasciare gli analiti intrappolati nella ²D ed iniziare un nuovo ciclo di intrappolamento.

Rispetto al LMCS, il *quad-jet* era caratterizzato da una maggiore efficienza di intrappolamento e reiniezione, dovute rispettivamente alle minori temperature (fino a -90 °C) raggiunte dall'N₂ liquido e alla presenza dei getti caldi. Era inoltre un modulatore “statico” privo di parti mobili. Tuttavia, la necessità di elevate quantità di N₂ liquido, contenuto in ingombranti *dewar*, rappresentava uno svantaggio. Versioni più aggiornate del *quad-jet* prevedono specifiche unità di refrigerazione per l'N₂ e, pertanto, sono prive di materiali di consumo.

- Modulatore criogenico *static dual-jet*

Nel 2001, Beens *et al.* proposero un sistema *dual-jet* (Figura 3.11) che sostanzialmente rappresentava una versione semplificata del *quad-jet* ottenuta eliminando i getti caldi [30].

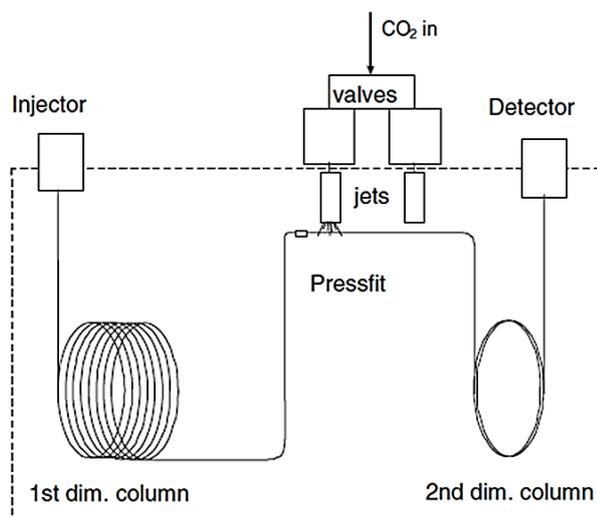


Figura 3.11. Rappresentazione schematica del modulatore *dual-jet* [27].

Invece dell' N_2 liquido come agente criogenico venne utilizzata la CO_2 liquida pressurizzata, sfruttando il calore del forno GC per la rimobilizzazione degli analiti. Per l'alcano C_{14} venne calcolata una larghezza della banda di iniezione nella 2D di soli 10 ms, risultato molto migliore rispetto alle prestazioni sia dello *sweeper* che dell'LMCS. Le temperature di intrappolamento non eccessivamente basse raggiunte dalla CO_2 liquida pressurizzata eliminarono la necessità di fare ricorso ai getti caldi, tuttavia, allo stesso tempo non consentivano l'intrappolamento di composti altamente volatili (ad esempio C_5 e C_6).

- Modulatore *static dual-stage dual-jet loop*

Questo modulatore, che rappresenta un altro popolare dispositivo criogenico *dual-stage*, venne proposto da Ledford *et al.* nel 2002 [31]. Il suo principio di funzionamento è molto simile al *quad-jet*, utilizzando però soltanto due getti (uno caldo e uno freddo) e realizzando la modulazione *dual-stage* lungo un corto segmento di colonna capillare (1-1,5 m) definito *delay loop* (Figura 3.12). Il *loop* del modulatore viene creato avvolgendo a doppio giro la colonna capillare intorno ad un supporto metallico. Sebbene per creare il *loop* possano essere utilizzate indistintamente l'ultima parte della 1D o l'inizio della 2D è preferibile utilizzare un segmento di una colonna priva di fase stazionaria, meno dispendiosa da sostituire in caso di rotture.

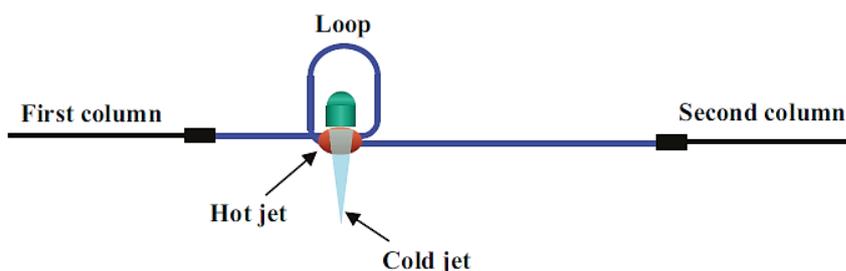


Figura 3.12. Rappresentazione schematica del modulatore *dual-jet loop* [21].

Per l'intrappolamento degli analiti come gas criogenico viene utilizzato N_2 liquido situato in un *dewar* che, attraverso un braccio metallico, viene soffiato ininterrottamente sul *delay loop* per l'intera durata dell'analisi creando due punti freddi. Di conseguenza, gli accumuli di prima e seconda fase avvengono simultaneamente. Al termine della fase di intrappolamento, un getto caldo (solitamente di aria o N_2) della durata di circa 100-250 ms viene soffiato ortogonalmente al getto

freddo in accordo al PM, rimobilizzando gli analiti intrappolati. Anche in questo caso, entrambe le fasi di reiniezione di prima e seconda fase avvengono contemporaneamente. Recentemente, la Zoex Corporation ha commercializzato una versione più aggiornata di questo modulatore (ZX-2) che non necessita di N₂ liquido. In questo caso, il raffreddamento dell'N₂ avviene ad opera di un'unità di refrigerazione (*chiller*) che, raggiungendo una temperatura massima di -90 °C, consente l'intrappolamento di analiti molto bassobollenti, come il C₇.

3.3 Rivelatori

Altro componente importante di un sistema GC×GC è il rivelatore. Come accennato in precedenza, in ²D è necessario impiegare colonne corte ed elevate velocità lineari al fine di completare la separazione di una modulazione prima della successiva. A questo aspetto si aggiunge la stretta ampiezza alla base delle bande cromatografiche dei picchi focalizzati, generalmente di 100-200 ms [32]. L'insieme di questi due fattori richiede che il rivelatore impiegato possieda una frequenza di campionamento di almeno 100 Hz per consentire una ricostruzione affidabile e riproducibile dei picchi necessaria per scopi quantitativi, con almeno 10 punti per picco [33].

3.3.1 Rivelatore a ionizzazione di fiamma

Il rivelatore a ionizzazione di fiamma (FID) con una velocità di acquisizione fino a 500 Hz [34] è sufficientemente veloce per l'accoppiamento alla GC×GC. Per questo motivo, è stato il primo rivelatore utilizzato [9].

Introdotta nel 1958, il suo principio di funzionamento si basa su un processo di combustione. Gli analiti, provenienti dalla corsa cromatografica, vengono miscelati ad aria (comburente) e idrogeno (combustibile) e bruciati da una fiamma accesa tramite un ugello metallico che funge da elettrodo negativo (Figura 3.13). Dalla combustione degli analiti vengono prodotti degli ioni che sono raccolti da un elettrodo collettore, con una differenza di potenziale di +300 eV, e amplificati da un circuito ad alta resistenza. La maggior parte dei FID opera a temperature pari o superiori a 250 °C, dal momento che durante il processo di combustione si produce H₂O. Il riscaldamento pertanto è indispensabile per prevenire sia la condensazione dell'H₂O che degli analiti altobollenti.

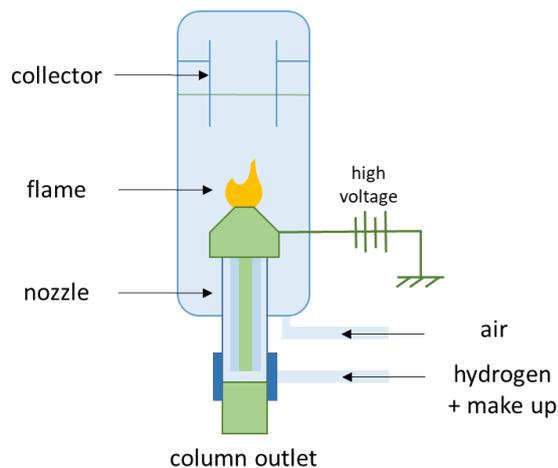


Figura 3.13. Sezione trasversale di un rivelatore a ionizzazione di fiamma.

Oltre alla elevata velocità di acquisizione, il FID possiede una sensibilità sufficientemente bassa (nell'ordine dei picogrammi), una buona linearità in un intervallo di concentrazione molto ampio (fino a sette ordini di grandezza) ed un volume interno significativamente piccolo. Il FID è anche estremamente robusto, facile da usare, stabile, ripetibile e con basso rumore di fondo. Ovviamente, la mancanza di informazioni strutturali e quindi l'impossibilità di effettuare analisi qualitative rappresentano i principali svantaggi di questo rivelatore.

3.3.2 Spettrometria di massa

La capacità di identificare qualitativamente gli analiti, aggiungendo una terza dimensione alla GC×GC, rende la spettrometria di massa uno dei rivelatori maggiormente accoppiati alla tecnica. Come è noto, la spettrometria di massa prevede che le molecole neutre degli analiti subiscano un processo di ionizzazione con formazione di ioni che vengono poi separati da un analizzatore di massa in base al loro rapporto massa/carica (m/z). La ionizzazione e la frammentazione che avvengono a livello della sorgente ionizzante sono dei processi altamente ripetibili che portano all'ottenimento di caratteristici spettri di massa per ciascun analita che consentono l'identificazione univoca di un composto mediante confronto con gli spettri registrati in apposite librerie di massa. È possibile distinguere diversi analizzatori di massa in base al loro principio di funzionamento.

▪ *Singolo quadrupolo*

Il singolo quadrupolo (SQ) deve il suo nome alla sua particolare struttura costituita da quattro barre metalliche cilindriche, due cariche positivamente e due negativamente, posizionate equidistanti da un asse z (Figura 3.14).

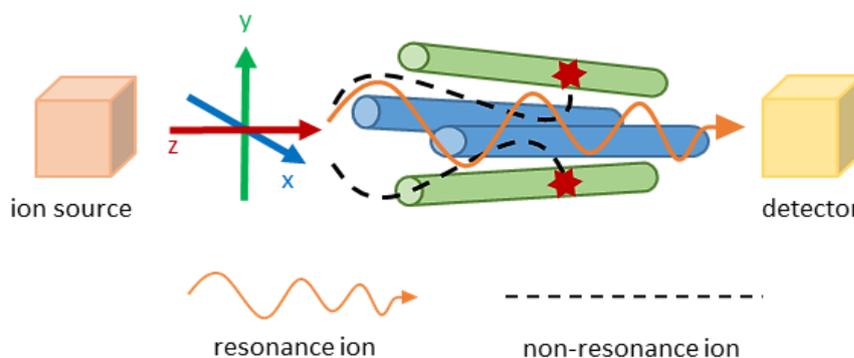


Figura 3.14. Rappresentazione schematica di un MS con analizzatore a singolo quadrupolo.

Gli ioni generati nella sorgente ionizzante sono accelerati in direzione dell'asse z ed entrano nel quadrupolo tramite un piccolo orifizio. Alle quattro barre del quadrupolo vengono applicate una corrente continua e una alternata ad elevata frequenza che generano un campo elettrico estremamente variabile all'interno dell'analizzatore. Conseguentemente, gli ioni attraversano il campo elettrico oscillando tra gli assi x e y. A determinati valori di corrente, gli ioni ad uno specifico intervallo m/z (precedentemente scelto dall'operatore) entrano in risonanza e mantengono un'oscillazione stabile mentre attraversano tutto il quadrupolo. Gli ioni a m/z diverso dall'intervallo impostato diventano instabili e vanno a collidere sulle barre. Pertanto, il SQ funge essenzialmente da filtro consentendo il passaggio solo di determinati ioni verso il rivelatore. Questo analizzatore di massa può operare in due diverse modalità di acquisizione:

- *total ion current* (TIC o scan), che consente il monitoraggio di tutti gli ioni generati nella sorgente entro uno specifico intervallo m/z . In questo caso i voltaggi applicati sono configurati in modo tale da consentire la scansione dell'intero intervallo;
- *selected ion monitoring* (SIM), in cui il quadrupolo viene impostato per monitorare e consentire il passaggio solo di uno o più ioni ad un determinato m/z .

Questa ultima modalità di acquisizione offre, pertanto, una migliore selettività ed anche sensibilità rispetto alla modalità TIC.

Il SQ, impiegato nella modalità a scansione, venne accoppiato per la prima volta alla GC×GC nel 1999 da Frysinger e Gains per l'analisi di un campione di diesel [35]. Tuttavia, esso possiede una bassa risoluzione spettrale pari a 2,43 scansioni s⁻¹. Per ovviare a questo problema, i ricercatori decisero di rallentare notevolmente la programmata di temperatura (0.5 °C min⁻¹) in modo da ottenere picchi con ampiezze alla base di almeno 1 sec, a discapito di un tempo totale di analisi di più di 7 ore. Nonostante questo, vennero ottenute soltanto 2-3 scansioni per picco certamente non sufficienti per una corretta ricostruzione a scopi quantitativi, seppur idonee per un'identificazione accettabile. Qualche anno dopo, Shellie e Marriott [36] utilizzarono il SQ nella modalità SIM per l'analisi dei composti volatili del ginseng mediante GC×GC. Utilizzando un intervallo di massa ridotto (41-228,5 *m/z*) fu possibile ottenere una velocità di acquisizione discretamente elevata, pari a 20 Hz, che consentì di raccogliere quattro punti per picco. Il primo esempio di utilizzo del SQ a scopi quantitativi in combinazione con la GC×GC venne riportato da Debonneville e Chaintreau [37]. Anche in questo caso venne utilizzata la modalità SIM con una velocità di acquisizione di 30.7 Hz, ritenuta sufficiente ai fini della quantificazione. Tuttavia, tale frequenza di acquisizione risultava ancora insufficiente per una corretta ricostruzione dei picchi GC×GC di 100-200 ms.

È bene sottolineare che gli attuali analizzatori a SQ, a determinati intervalli di massa (ad esempio 50-330 *m/z*), possiedono delle elevate frequenze di acquisizione spettrale (circa 50 Hz).

- *Triplo quadrupolo*

Sebbene la spettrometria di massa rappresenti un potente strumento in grado di identificare qualitativamente gli analiti, spesso un singolo analizzatore possiede delle limitazioni. Pertanto, soprattutto in occasione dell'analisi di matrici complesse, di analiti in tracce o di composti difficili da separare cromatograficamente, si rende necessario fare ricorso ad una tecnica che sia maggiormente sensibile e selettiva, quale la spettrometria di massa tandem (MS/MS). Un esempio è rappresentato dall'analizzatore a triplo quadrupolo (TQ) così chiamato in quanto costituito da due

quadrupoli, comunemente indicati come Q₁ e Q₃, interfacciati in serie da un terzo quadrupolo (q₂) che funge da cella di collisione.

La modalità di acquisizione più comunemente sfruttata del TQ è la *multiple reaction monitoring* (MRM) in cui Q₁ e Q₃ funzionano entrambi in modalità SIM. Come mostrato in Figura 3.15, uno o più ioni precursori vengono filtrati in Q₁ per essere poi sottoposti in q₂ ad un processo di frammentazione (*collision induced dissociation*) ad opera di un gas inerte, generalmente argon. Alcuni specifici ioni prodotti dalla frammentazione vengono poi monitorati in Q₃. La modalità MRM consente un notevole aumento della selettività dovuto alla riduzione, o alla completa eliminazione, delle interferenze provenienti dalla matrice.

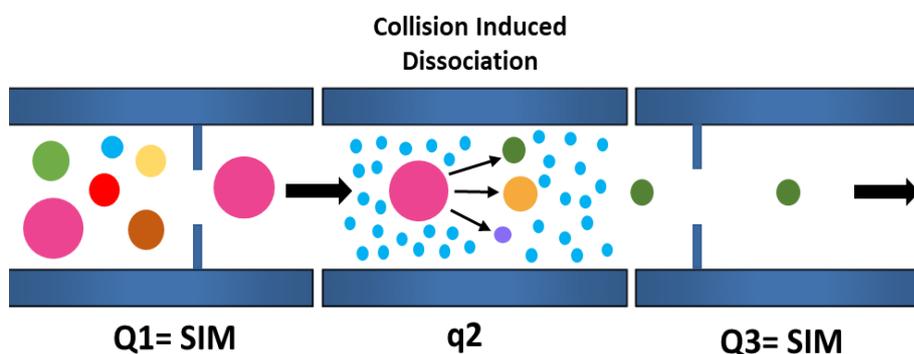


Figura 15. Rappresentazione schematica della modalità di acquisizione MRM.

Altre possibili modalità di acquisizione nella spettrometria di massa a triplo quadrupolo (QqQMS) sono:

- *product ion scan* (Q₁: SIM, Q₃: scan), in cui il primo quadrupolo seleziona uno ione precursore che viene frammentato in q₂ per effettuare poi in Q₃ una scansione degli ioni prodotti (in un determinato intervallo m/z). Questa modalità consente di ottenere informazioni sull'identità della molecola;
- *precursor ion scan* (Q₁: scan, Q₃: SIM), durante la quale Q₃ monitora un singolo ione derivato dalla frammentazione di tutti gli ioni trasmessi da Q₁ (ad un determinato intervallo m/z). Questa modalità consente di individuare classi di molecole strutturalmente simili;
- *neutral loss scan* (Q₁: scan, Q₃: scan), durante la quale Q₁ e Q₃ lavorano in modalità scansione. Dopo la frammentazione, in Q₃ viene monitorata una perdita di

massa costante. Questa modalità consente di individuare facilmente classi di molecole che hanno in comune parti strutturalmente simili.

Il primo accoppiamento GC×GC-QqQMS venne pubblicato nel 2008 da Poliak *et al.* [38]. In questa applicazione vennero confrontate la GC×GC-MS e la GC×GC-QqQMS riguardo l'analisi del pesticida diazinon nel coriandolo ad un livello di concentrazione di $100 \mu\text{g kg}^{-1}$.

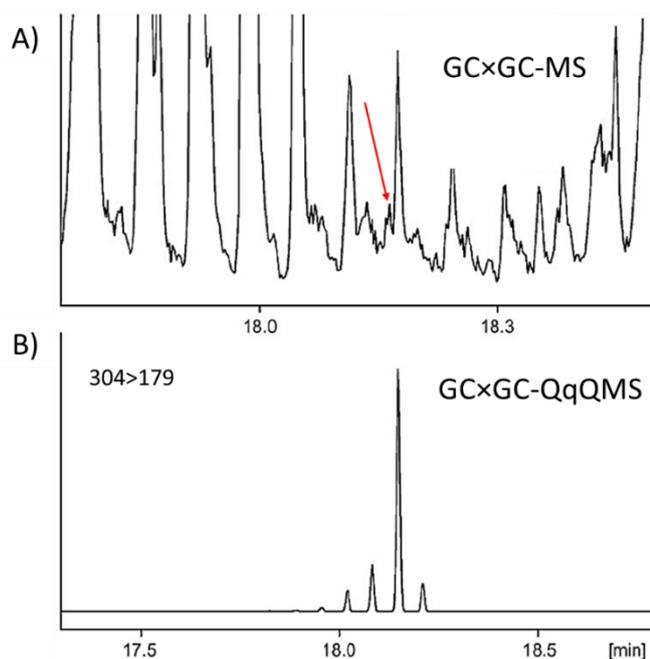


Figura 3.16. A) Cromatogramma GC×GC-MS di un campione di coriandolo fortificato col pesticida diazinon (indicato dalla freccia rossa) ad un livello di $100 \mu\text{g kg}^{-1}$; B) Cromatogramma GC×GC-QqQMS acquisito monitorando la transizione MRM 304>179 del diazinon [38].

Come è possibile osservare in Figura 3.16, il risultato delle analisi GC×GC-MS risultava caratterizzato da una intensa coeluizione tra l'analita target e le interferenze della matrice con conseguente difficoltà di riconoscimento nei database di massa spettrali utilizzati. La scansione venne eseguita utilizzando un intervallo m/z di 50-400 ed una frequenza di produzione spettrale di poco superiore a 6 Hz. In questo caso, a causa dell'utilizzo di una colonna ^2D con dimensioni $2,2 \text{ m} \times 0,32 \text{ mm ID}$ e uno spesso film di fase stazionaria ($1 \mu\text{m}$), non risultò necessaria un'elevata velocità di acquisizione dal momento che le ampiezze dei picchi erano piuttosto ampie.

Considerando invece l'analisi GC×GC-QqQMS, il monitoraggio della transizione 304>179 ha consentito un eccezionale aumento di specificità e sensibilità.

In uno studio successivo, Tranchida *et al.* valutarono un sistema QqQMS di ultima generazione [38]. In questo caso, lo spettrometro possedeva una velocità di scansione molto veloce con un massimo di 600 transizioni MRM s⁻¹.

3.4 Conclusioni

Ad oggi la GC×GC, considerate le innumerevoli evoluzioni a cui è andata in contro, alcune delle quali sono state presentate in questo capitolo, può essere considerata una tecnica matura che offre numerosi vantaggi rispetto alle separazioni GC monodimensionali, primo fra tutti l'elevato potere separativo.

Per ottenere risultati soddisfacenti e sfruttare a pieno le numerose potenzialità della tecnica è necessaria un'attenta ottimizzazione di diversi parametri, quali scelta delle fasi stazionarie, programmata di temperatura, velocità lineari e tempo di modulazione. Dal punto di vista della modulazione, quella criogenica rappresenta certamente la forma più efficiente di modulazione se si considera il notevole miglioramento della sensibilità, non ottenibile con una modulazione a flusso. Inoltre, l'utilizzo dell'N₂ come gas criogenico, con temperature fino a -90 °C, consente un soddisfacente intrappolamento degli analiti bassobollenti (C₅-C₈). Prestazioni ancora migliori potrebbero essere ottenute aumentando la portata di flusso del getto freddo. Tuttavia, questo potrebbe rendere più complessa la modulazione degli analiti altobollenti ad elevato peso molecolare (C₄₀-C₅₀ o superiori) la cui rimobilizzazione può essere migliorata aumentando la temperatura (350-400 °C) e la durata del getto caldo (300-400 ms).

Riferimenti Bibliografici

- [1] A.T. James, A.J.P. Martin. Gas-liquid partition chromatography: the separation and micro-estimation of volatile fatty acids from formic acid to dodecanoic acid. *Biochem. J.*, 1952, 50, 679-690.
- [2] Hyphenations of capillary chromatography with mass spectrometry, edited by Peter Q. Tranchida and Luigi Mondello. Cap 2.2, *Comprehensive 2D Gas Chromatography*. Elsevier, 2020. ISBN: 978-0-12-809638-3.
- [3] M.J.E. Golay. *Gas Chromatography 1958*. Amsterdam Symposium, May 19-23, 1958, D. H. Desty, ed., Butterworths, London, 1958, 36-55.
- [4] J. C. Giddings. Sample dimensionality: a predictor of order-disorder in component peak distribution in multidimensional separation. *J. Chromatogr. A*, 1995, 703, 3.
- [5] D.J. McEwen. Backflushing and Two-Stage Operation of Capillary Columns in Gas Chromatography. *Anal. Chem.*, 1964, 36, 279-282.
- [6] R. Consden, A.H. Gordon, A.J.P. Martin. Qualitative analysis of proteins: a partition chromatographic method using paper. *Biochem. J.*, 1944, 38, 224.
- [7] J.C. Giddings, Concepts and comparison in multidimensional separations, *J. High Resolut. Chromatogr.*, 1987, 10, 319-323.
- [8] M.C. Simmons, L.R. Snyder. Two-Stage Gas-Liquid Chromatography. *Anal. Chem.*, 1958, 30, 32-35.
- [9] Z. Liu, J.B. Phillips. Comprehensive two-dimensional gas chromatography using an on-column thermal modulator interface. *J. Chromatogr. Sci.*, 1991, 29, 227-231.
- [10] J. Blomberg, P.J. Schoenmakers, J. Beens, R. Tijssen. Comprehensive two-dimensional gas chromatography (GC×GC) and its applicability to the characterisation of complex (petrochemical) mixtures. *J. High Resolut. Chromatogr.*, 1997, 20, 539-544.
- [11] L.M. Blumberg, F. David, M.S. Klee, P. Sandra. Comparison of one-dimensional and comprehensive two-dimensional separations by gas chromatography. *J. Chromatogr. A*, 2008, 1188, 2-16.

- [12] J.C. Giddings. Sample dimensionality – a predictor of order-disorder in component peak distribution in multidimensional separation. *J. Chromatogr. A*, 1995, 703, 3-15.
- [13] J. Beens. *Comprehensive two-dimensional gas chromatography-The state of separation arts*. 2009. Chromedia.
- [14] I. Aloisi, M. Zoccali, P.Q. Tranchida, L. Mondello. Analysis of Organic Sulphur Compounds in Coal Tar by Using Comprehensive Two-Dimensional Gas Chromatography-High Resolution Time-of-Flight Mass Spectrometry. *Separations* 2020, 7(2), 26.
- [15] R. E. Murphy, M. R. Schure, J. P. Foley. Effect of Sampling Rate on Resolution in Comprehensive Two-Dimensional Liquid Chromatography. *Anal. Chem.*, 1998, 70, 1585.
- [16] P.Q. Tranchida, P. Dugo, G. Dugo, L. Mondello. Comprehensive two-dimensional chromatography in food analysis. *J. Chromatogr. A*, 2004, 1054, 3.
- [17] J. Dallüge, J. Beens, U.A.T. Brinkman. Comprehensive two-dimensional gas chromatography: a powerful and versatile analytical tool. *J Chromatogr. A*, 2003, 1000, 69-108.
- [18] J. Beens, J. Blomberg, P.J. Schoenmakers. Proper Tuning of Comprehensive Two-Dimensional Gas Chromatography (GC×GC) to Optimize the Separation of Complex Oil Fractions. *J. High Resolut. Chromatogr.*, 2000, 23, 182.
- [19] R. Shellie, P. Marriott, P. Morrison. Concepts and preliminary observations on the triple-dimensional analysis of complex volatile samples by using GC× GC-TOFMS. *Anal. Chem.*, 2001, 73, 1336.
- [20] P.Q. Tranchida, A. Casilli, P. Dugo, G. Dugo, L. Mondello. Generation of improved gas linear velocities in a comprehensive two-dimensional gas chromatography system. *Anal. Chem.*, 2007, 79, 2266-2275.
- [21] P.Q. Tranchida, G. Purcaro, P. Dugo, L. Mondello. Modulators for comprehensive two-dimensional gas chromatography. *TrAC-Trend Anal Chem*, 2011, 30, 9.

- [22] H.D. Bahaghighat, C.E. Freye, R.E. Synovec. Recent advances in modulator technology for comprehensive two-dimensional gas chromatography. *TrAC-Trend Anal Chem*, 2019, 113, 379-391.
- [23] J.V. Seeley, F. Kramp, C.J. Hicks. Comprehensive two-dimensional gas chromatography via differential flow modulation. *Anal. Chem.*, 2000, 72, 4346-4352.
- [24] M. Edwards, A. Mostafa, T. Górecki. Modulation in comprehensive two-dimensional gas chromatography: 20 years of innovation. *Anal Bioanal Chem*, 2011, 401, 2335-2349.
- [25] J.B. Phillips, E. Ledford. Thermal modulation: a chemical instrumentation component of potential value in improving portability. *Field Anal. Chem. Technol.*, 1996, 1, 23.
- [26] J.B. Phillips, R.B. Gaines, J. Blomberg, F.W.M. van der Wielen, J.M. Dimandja, V. Green, J. Granger, D. Patterson, L. Racovalis, H.J. de Geus, J. de Boer, P. Haglund, J. Lipsky, V. Sinha, E.B. Ledford Jr.. A robust thermal modulator for comprehensive two-dimensional gas chromatography. *J. High Resolut. Chromatogr.*, 1999, 22, 3.
- [27] M. Adahchour, J. Beens, R.J.J. Vreuls, U.A.Th. Brinkman. Recent developments in comprehensive two-dimensional gas chromatography (GC×GC) II. Modulation and detection. *TrAC-Trend Anal Chem*, 2006, 25, 6.
- [28] R.M. Kinghorn, P.J. Marriott. Comprehensive two-dimensional gas chromatography using a modulating cryogenic trap. *J High Resolut Chromatogr*, 1998, 21, 620-622.
- [29] E.B. Ledford Jr., C. Billesbach. *J. High Resolut. Chromatogr.* 21 (2000) 202.
- [30] J. Beens, M. Adahchour, R.J.J. Vreuls, K. van Altna, U.A.T. Brinkman. *J High Resolut Chromatogr*, 2001, 919, 127-132.
- [31] E.B. Ledford, C. Billesbach, J. Termaat, *Pittcon 2002*, 17- 22 March 2002, New Orleans, USA.

- [32] J.B. Phillips, J. Beens. Comprehensive two-dimensional gas chromatography: a hyphenated method with strong coupling between the two dimensions. *J Chromatogr. A*, 1999, 856, 331-347.
- [33] G. Purcaro, P.Q. Tranchida, C. Ragonese, L. Conte, P. Dugo, G. Dugo, L. Mondello. Evaluation of a rapid-scanning quadrupole mass spectrometer in an apolar \times ionic-liquid comprehensive two-dimensional gas chromatography system. *Anal. Chem.*, 2010, 82, 8583.
- [34] P.J. Marriott, in: L. Mondello (Ed.), *Detection Technologies and Applications in Comprehensive Two-dimensional Gas Chromatography. Comprehensive Chromatography in Combination with Mass Spectrometry*, John Wiley & Sons Inc., Hoboken, NJ, USA, 2011, 243.
- [35] G.S. Frysinger, R.B. Gaines. Comprehensive Two-Dimensional Gas Chromatography with Mass Spectrometric Detection (GC \times GC/MS) Applied to the Analysis of Petroleum. *J. High Resolut. Chromatogr.*, 1999, 22, 251.
- [36] R.A. Shellie, P.J. Marriott, C.W. Huie. Comprehensive two-dimensional gas chromatography (GC \times GC) and GC \times GC-quadrupole MS analysis of Asian and American ginseng. *J. Sep. Sci.*, 2003, 26, 1185.
- [37] C. Debonneville, A. Chaintreau. Quantitation of suspected allergens in fragrances part II. Evaluation of comprehensive gas chromatography-conventional mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, 2004, 1027, 109.
- [38] M. Poliak, A. B. Fialkov and A. Amirav. Pulsed flow modulation two-dimensional comprehensive gas chromatography-tandem mass spectrometry with supersonic molecular beams. *J. Chromatogr. A*, 2008, 1210, 108.
- [39] P.Q. Tranchida, F.A. Franchina, M. Zoccali, S. Pantò, D. Sciarrone, P. Dugo, L. Mondello. Untargeted and targeted comprehensive two-dimensional GC analysis using a novel unified high-speed triple quadrupole mass spectrometer. *J. Chromatogr. A*, 2013, 1278, 153.

CAPITOLO 4

I contaminanti alimentari

4.0 Introduzione

Nel corso degli ultimi decenni, la globalizzazione del commercio alimentare, il cambiamento delle condizioni climatiche, delle pratiche agricole e l'inquinamento ambientale hanno rappresentato e rappresentano ancora oggi importanti fattori di rischio per la sicurezza alimentare. Secondo la definizione universalmente accolta del Regolamento CE 315/93, il concetto di contaminante alimentare può essere espresso come “*qualsiasi sostanza non intenzionalmente aggiunta all'alimento, ma che sia presente in esso come risultato del processo produttivo (comprese le operazioni svolte in agricoltura, zootecnia e medicina veterinaria) e dei processi di fabbricazione, trasformazione, preparazione, trattamento, confezionamento, trasporto o conservazione di tale alimento, o in seguito alla contaminazione ambientale*” [1]. Materiale estraneo come, per esempio, frammenti di insetti, peli di animali, ecc., non sono contemplati in questa definizione.

I contaminanti alimentari possono essere classificati in base alla fonte di contaminazione ed al meccanismo con cui entrano a contatto con il prodotto alimentare. Generalmente essi vengono classificati in chimici, fisici e biologici; tuttavia, in accordo con tendenze più moderne, è possibile distinguere tra contaminazione naturale, ambientale e derivante da una o più fasi della filiera produttiva [2,3].

Tra i contaminanti *naturali*, anche noti come biologici, rientrano parassiti, microrganismi (batteri e miceti) e loro metaboliti, quali ad esempio le tossine. Tra le specie batteriche vanno menzionate *Bacillus* sp., *Salmonella* sp, *Listeria* sp, *Staphylococcus* sp, *Campylobacter* sp, *Clostridium* sp. ed *Escherichia coli*, i quali possono dar luogo all'insorgenza di infezioni e tossinfezioni alimentari. Le micotossine rappresentano metaboliti secondari prodotti da molti funghi appartenenti al phylum *Ascomycota*. I principali funghi che causano frequenti e problematiche contaminazioni di alimenti e mangimi sono membri dei generi *Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillium* [4,5]. Mentre *Aspergillus* e *Penicillium* crescono frequentemente su alimenti e mangimi in condizioni di conservazione, le specie appartenenti a *Fusarium* spesso infettano colture in crescita (grano, orzo e mais) [6,7]. Attualmente sono state identificate e segnalate oltre 300 micotossine; tuttavia, solo poche di queste contaminano regolarmente alimenti e mangimi. La contaminazione da micotossine è

considerata un problema imprevedibile, anche dove vengono implementate buone pratiche agricole, di stoccaggio e di lavorazione, ponendo una sfida difficile alla sicurezza alimentare. La maggior parte di esse sono chimicamente e termicamente stabili, per cui non vengono eliminate facilmente durante le fasi di lavorazione degli alimenti, comprese bollitura, frittura e pastorizzazione [5]. Inoltre, la contaminazione dei mangimi può rappresentare un ulteriore pericolo per la sicurezza alimentare a causa del possibile trasferimento di micotossine a prodotti di origine animale come latte, carne e uova, con conseguente assunzione di micotossine da parte dell'uomo. Gli effetti nocivi delle micotossine sulla salute umana variano da semplici disturbi gastrointestinali, all'avvelenamento acuto di vari organi, principalmente fegato e reni, ed effetti a lungo termine come immunodeficienza e cancro [8]. Per via della loro elevata tossicità, molte autorità sanitarie e governative nazionali e internazionali come la *Food and Drug Administration* (FDA) degli Stati Uniti, l'Organizzazione mondiale della sanità (OMS), l'Organizzazione per l'agricoltura alimentare (FAO) e l'Autorità europea per la Sicurezza Alimentare (EFSA) stanno prestando molta attenzione a questo tipo di contaminazione in alimenti e mangimi.

Dal punto di vista dei contaminanti ambientali, l'aumento dell'urbanizzazione e dell'industrializzazione ha determinato nell'ambiente terrestre un grande aumento di inquinanti che possono essere facilmente bioaccumulati nella catena alimentare determinando effetti tossici nocivi per la salute umana. I contaminanti ambientali includono tutte quelle sostanze che sono naturalmente presenti o vengono rilasciate in aria, acqua e suolo a seguito di attività antropiche industriali o agricole. Tra questi ritroviamo, pesticidi, idrocarburi policiclici aromatici (IPA), policlorobifenili (PCB), diossine, composti clorurati e metalli pesanti, quali ad esempio mercurio, alluminio, cadmio, piombo, zinco ed arsenico. Diossine, pesticidi organoclorurati, IPA e PCB rientrano nella categoria degli inquinanti organici persistenti (*persistent organic pollutants*, POP) che possono trovarsi in forma di vapore o adsorbiti dalle particelle atmosferiche e sono caratterizzati da un effetto duraturo sull'ambiente in quanto non vengono degradati da attività termica, chimica o microbica [9].

Considerando invece la filiera produttiva, varie sono le fasi a livello delle quali può verificarsi una contaminazione degli alimenti, primo fra tutto il trasporto delle materie prime. In questo caso, gli alimenti possono essere contaminati sia dagli

scarichi dei motori diesel e benzina (che emettono monossido di carbonio) o a seguito di contaminazione con il veicolo impiegato per il trasporto per via, ad esempio, di particolari sostanze chimiche utilizzate per la disinfezione del mezzo [10]. Durante il processo produttivo, gli alimenti possono essere accidentalmente contaminati anche da residui di disinfettanti e detergenti, come perossido di idrogeno e ipoclorito di sodio, rimasti sulla superficie delle attrezzature impiegate per la manipolazione delle materie prime. Anche i trattamenti termici comunemente impiegati per la lavorazione degli alimenti, sia a livello domestico che industriale, possono rappresentare una fonte di contaminazione. L'utilizzo di temperature elevate, in associazione a fattori esterni, può portare alla formazione di composti tossici che hanno un impatto sulla sicurezza e sulla qualità degli alimenti. Composti come cloropropanoli, acrilammide e furani si formano durante i metodi di lavorazione degli alimenti come riscaldamento, tostatura, grigliatura, cottura al forno, inscatolamento, fermentazione [11]. In particolare, durante la frittura di grassi e proteine possono formarsi composti eterociclici policiclici aromatici con proprietà mutagene, come ammine aromatiche eterocicliche ed IPA. Una classe emergente di contaminanti indotti dal calore, formata quando il cibo salato viene a contatto con l'olio ad elevata temperatura, è rappresentata dagli esteri degli acidi grassi del clorofenolo, come il 3-monocloro-1,2-propandiolo (3-MCPD).

Sebbene gli imballaggi possiedano molti vantaggi, tra cui la protezione fisica degli alimenti ed il prolungamento della loro durata di conservazione, rappresentano un'ulteriore possibile fonte di contaminazione per via dell'impiego di additivi, stabilizzanti, antiossidanti e plastificanti come, ad esempio, ftalati e bisfenolo A (BPA) [2], che vengono miscelati ai polimeri per rendere il materiale risultante più durevole. Prodotti alimentari come zucchero, mais, farina, riso e la maggior parte dei cereali sono generalmente confezionati in carta o cartone, per cui risultano esposti ad una possibile contaminazione chimica tramite trasferimento dell'inchiostro da stampa. Qualsiasi composto chimico con massa molecolare inferiore a 1000 amu può migrare e attraversare gli strati polimerici o cartacei, arrivare all'alimento e dissolversi in esso. Questo dipende dalla composizione del materiale dell'imballaggio, dalle condizioni di esposizione ed anche dalle caratteristiche degli alimenti [11]. Quando le lattine vengono utilizzate come recipienti per alimenti, anche la corrosione del metallo rappresenta una possibile fonte di contaminazione a causa della migrazione di ioni

metallici, come ferro e stagno [12]. Al fine di evitare questo processo, il lato interno delle lattine viene comunemente rivestito con particolari prodotti, come resine epossidiche e loro sottoprodotti (BPA), noti interferenti endocrini [13].

Il monitoraggio e lo studio dei contaminanti alimentari rappresentano al giorno d'oggi una delle priorità cruciali per la comunità scientifica internazionale e le autorità predisposte al controllo, dal momento che eventuali sostanze estranee presenti nei prodotti alimentari esporrebbero i consumatori a gravi rischi per la salute.

In particolare, la Commissione Europea ha provveduto all'istituzione del *Rapid Alert System for Food and Feed* (RASFF) che, secondo quanto definito dall'articolo 50 del Regolamento 178/2002, è un sistema di allarme per la notifica di un rischio diretto o indiretto per la salute umana dovuto ad alimenti o mangimi [14]. Negli anni successivi, con il Regolamento CE 1935/2004 [15], il sistema è stato esteso anche ai rischi legati a materiali e oggetti destinati a venire a contatto con gli alimenti (MOCA). Il RASFF rappresenta principalmente uno strumento per lo scambio di informazioni tra le autorità competenti dell'Unione Europea nei casi in cui sia stato identificato un rischio per la salute umana nella filiera degli alimenti e dei mangimi, e siano state adottate misure, quali richiamo o sequestro di particolari prodotti. La CE pubblica sul proprio sito web panoramiche settimanali delle notifiche di allerta e relazioni annuali riassuntive che forniscono una panoramica del numero di notifiche, delle categorie di prodotti alimentari e dei pericoli a cui le notifiche si riferivano.

Di seguito è riportato un approfondimento riguardo alcuni contaminanti quali idrocarburi minerali, ftalati, pesticidi ed idrocarburi policiclici aromatici.

4.1 Idrocarburi minerali

La contaminazione da idrocarburi negli alimenti rappresenta un'importante minaccia spesso sottovalutata per i consumatori. Diversamente da altri xenobiotici, come i pesticidi, per i quali origine e impiego sono strettamente regolamentati, la fonte di contaminazione degli idrocarburi minerali può essere inaspettata e spesso risulta difficile da prevedere. Essa può verificarsi durante qualsiasi fase della produzione alimentare, a seguito di una contaminazione ambientale, o può essere dovuta a particolari pratiche agricole, processi di trasformazione degli alimenti e migrazione dai materiali di imballaggio.

Gli idrocarburi minerali vengono principalmente originati da processi petrogenici che consistono nella trasformazione diagenetica di materiale prevalentemente vegetale depositato nelle profondità della crosta terrestre, con formazione di petrolio grezzo dal quale, attraverso processi di distillazione e varie fasi di raffinazione, si ottengono diversi prodotti petroliferi per uso umano. Oltre l'origine petrogenica, prodotti equivalenti possono essere sintetizzati da carbone, gas naturale o biomassa.

Gli idrocarburi minerale (MOH) sono una miscela molto complessa di isomeri principalmente distinti in due classi di composti, quali idrocarburi saturi di olio minerale (MOSH) e idrocarburi aromatici di olio minerale (MOAH) [16]. Da un punto di vista strutturale, i MOAH (Figura 4.1) possiedono due o più anelli benzenici e sono caratterizzati da un forte grado di alchilazione, generalmente maggiore dell'80%, che li differenzia dagli IPA [17].

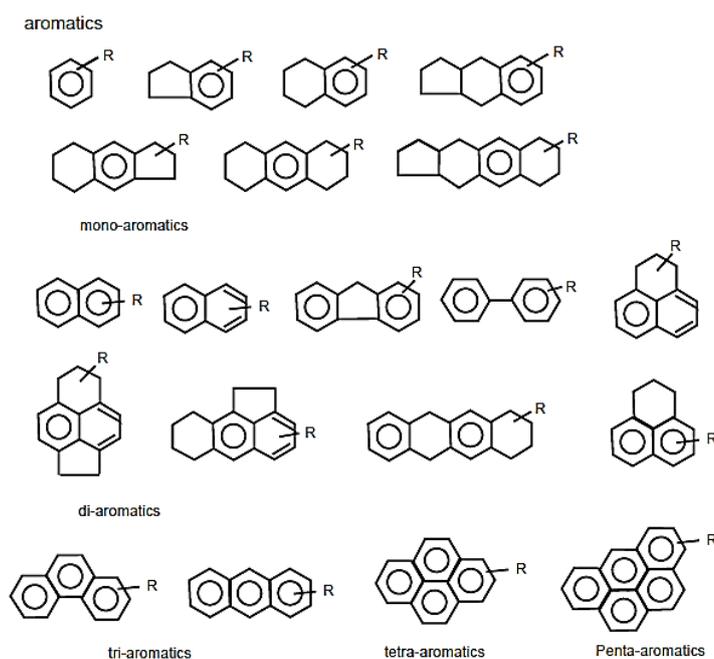


Figura 4.1. Rappresentazione delle principali strutture dei MOAH.

I MOSH (Figura 4.2) includono idrocarburi alifatici, sia lineari che ramificati (alcani e isoalcani, detti anche paraffine e isoparaffine) e composti ciclici (cicloalcani o nafteni) con possibile alchilazione laterale.

La composizione degli idrocarburi minerali varia notevolmente: gli oli per uso alimentare sono dichiarati privi di MOAH, ma la maggior parte delle altre tipologie contiene il 10-30% di MOAH [16].

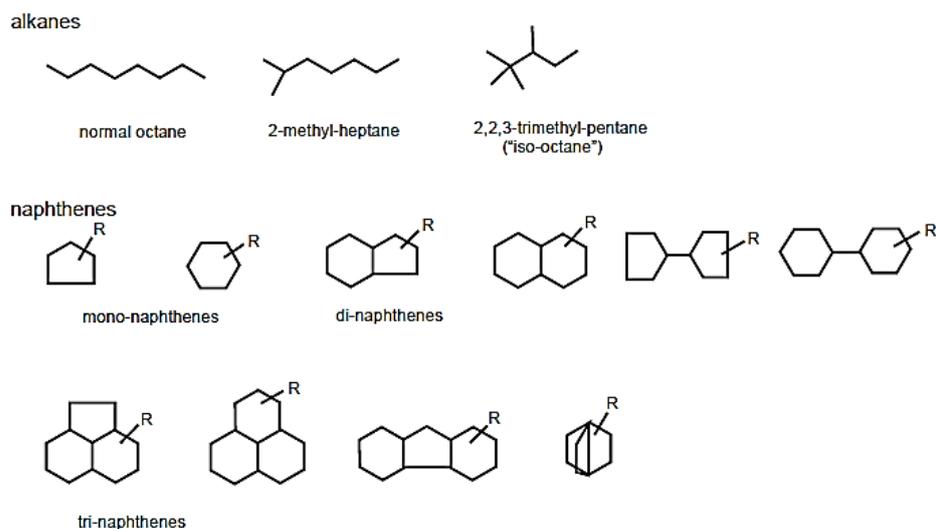


Figura 4.2. Rappresentazione delle principali strutture dei MOSH.

4.1.1 Fonti di contaminazione

I MOH possono contaminare gli alimenti attraverso molteplici fonti [16]. Le fonti di contaminazione ambientale, spesso visibili nei prodotti vegetali, sono rappresentate da particolato originato dalla combustione incompleta di gasolio, olio combustibile, detriti di pneumatici e bitume stradale. Ulteriori contaminazioni possono essere dovute a macchinari utilizzati per la raccolta delle materie prime e la lavorazione degli alimenti, ad esempio oli lubrificanti in pompe, dosatori a siringa e altri impianti industriali. Anche i solventi, comunemente utilizzati come agenti di pulizia, costituiti da singoli alcani o miscele complesse di MOH contenenti alcani a catena ciclica e aperta, possono contaminare i prodotti alimentari.

Gli alimenti trasformati possono essere contaminati da oli minerali destinati ad uso alimentare, come lubrificanti, agenti distaccanti per prodotti da forno, agenti antipolvere per cereali, rivestimenti protettivi per frutta e verdura cruda, cere microcristalline utilizzate, ad esempio, come agenti di rivestimento nei dolci. I MOCA rappresentano un'altra importante fonte di contaminazione. In particolare, vanno menzionati carta e cartone riciclati, comunemente utilizzati come imballaggio per diversi prodotti alimentari secchi, gli inchiostri da stampa a base di olio minerale applicati su carta e cartone, oli minerali utilizzati come additivi nella produzione di plastica, adesivi per imballaggi alimentari, sacchi di juta o sisal comunemente

ammorbiditi con olio minerale, lubrificanti per la fabbricazione di lattine e rivestimenti in cera applicati direttamente sugli alimenti.

4.1.2 Tossicità e legislazione

A cavallo tra il 2007 e il 2008, circa 100.000 tonnellate di olio di girasole ucraino sono state ritrovate contaminate da oli minerali a concentrazioni spesso superiori ai 1000 mg kg⁻¹. Pertanto, nel giugno 2008 La Commissione europea (CE) impose un limite di 50 mg kg⁻¹ alle paraffine minerali in olio di girasole ucraino [18]. Tale limite venne, tuttavia, abrogato nel 2014 [19] in quanto, nel periodo 2010-2014 non vennero segnalati campioni non conformi. Fatta eccezione per questo limite temporaneo imposto per l'olio di girasole ucraino, attualmente non ci sono limiti legali per il contenuto di oli minerali in imballaggi o alimenti. Nel 2011, l'Istituto federale tedesco per la valutazione dei rischi (BfR) dimostrò che gli idrocarburi saturi con catena carboniosa da C₁₀ a C₁₆ non si accumulano nei tessuti, concludendo che il loro trasferimento negli alimenti non dovrebbe superare i 12 mg kg⁻¹ [20].

Nel giugno 2012 l'EFSA pubblicò un parere sui MOH negli alimenti [16] riportando dati riguardo l'esposizione cronica ai MOH per diverse classi di età ed informazioni riguardanti assorbimento, eventuale deposizione, metabolismo ed escrezione. A questo proposito, venne concluso che l'assorbimento degli alcani può avvenire attraverso il sistema portale e/o linfatico. In particolare, per gli alcani lineari l'assorbimento varia dal 90% per C₁₄-C₁₈ al 25% per C₂₆-C₂₉. L'assorbimento diminuisce ulteriormente con l'aumentare del numero di carbonio, fino a diventare trascurabile quando si supera il C₃₅. Dati limitati suggeriscono che i cicloalcani sono assorbiti a livelli simili di quelli lineari con peso molecolare comparabile, mentre l'assorbimento degli alcani ramificati è leggermente inferiore. Una volta assorbiti, vengono inizialmente ossidati nei corrispondenti alcoli grassi dal sistema del citocromo P450, successivamente biotrasformati in acidi grassi e, in alcuni casi, sottoposti alla normale via di β -ossidazione. Tuttavia, a causa dei bassi tassi di biotrasformazione, in particolare per alcuni alcani ramificati e ciclici, i MOSH con numero di atomi di carbonio compreso tra 16 e 35 possono accumularsi in diversi tessuti, tra cui tessuto adiposo, linfonodi, milza e fegato.

A seguito di studi effettuati su ratti Fisher 344 [21], è stato osservato che il bioaccumulo di MOSH può portare alla formazione di microgranulomi nel fegato e nei

linfonodi mesenterici (MLN). I microgranulomi nei MLN sono considerati di bassa preoccupazione tossicologica dal momento che non sono stati associati ad una risposta infiammatoria o necrotica, non progrediscono verso lesioni avverse e, inoltre, gli studi disponibili non hanno mostrato alcun effetto sulle funzioni immunitarie.

Negli esseri umani esposti ai MOSH è stata osservata la formazione di microgranulomi in fegato, milza, linfonodi ed altri organi. Tuttavia, questi cambiamenti non sono stati associati a reazioni infiammatorie o ad altre conseguenze avverse [22]. I MOSH non sono cancerogeni, sebbene quelli a lunga catena a dosi elevate possano agire come promotori tumorali. Riguardo invece i MOAH, la loro mutagenicità è dovuta ai 3-7 anelli aromatici. Molti MOAH con tre o più anelli aromatici ed un basso grado di alchilazione possono essere attivati dagli enzimi P450 in agenti cancerogeni genotossici chimicamente reattivi, in grado di formare anche addotti del DNA. Alcuni MOAH altamente alchilati, pur non essendo essi stessi cancerogeni, possono agire come promotori tumorali. Alcuni MOAH semplici, come il naftalene, possiedono azione citotossica e proliferativa.

Nel marzo 2023 l'EFSA ha avviato una consultazione pubblica sulla bozza di parere scientifico riguardante la valutazione del rischio dei MOH negli alimenti [23]. Gli esperti hanno concluso provvisoriamente che i MOSH non rappresentano un problema per la salute, tuttavia, le conseguenze del loro accumulo a lungo termine non sono state sufficientemente studiate e risultano, pertanto, incerte. È stato invece confermato che alcuni composti appartenenti al gruppo dei MOAH rappresentano un possibile problema per la salute per via della loro azione mutagena.

4.2 Ftalati

Gli ftalati sono un'ampia classe di esteri dialchilici o alchil-arilici dell'acido ortoftalico (acido 1,2-benzendicarbossilico) con diverse proprietà fisico-chimiche che ne spiegano gli innumerevoli usi. A temperatura ambiente sono liquidi oleosi quasi incolori e inodori che mostrano elevata solubilità in grassi e alcol mentre la loro solubilità in acqua è limitata. In particolare, è stata osservata una correlazione negativa tra l'aumento della lunghezza della catena alchilica e l'idrofilia [24].

In accordo con la lunghezza delle catene laterali R e R' (Figura 4.3) possono essere classificati in base al peso molecolare. Gli ftalati a basso peso molecolare (LMW)

includono quelli con 3-6 atomi di carbonio nella catena laterale, vale a dire i composti di-butil ftalato (DBP), benzil butilftalato (BBP) e di-(etilesil)ftalato (DEHP).

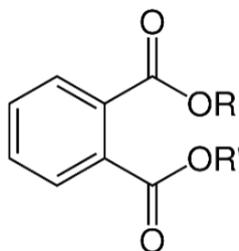


Figura 4.3. Struttura chimica generale degli ftalati.

Sono utilizzati in prodotti in polivinilcloruro (PVC), dispositivi medici, adesivi, vernici, inchiostri da stampa e compresse con rivestimento enterico. Ftalati con catena alchilica più corta, come il di-metil ftalato (DMP) e il dietil ftalato (DEP), sono ampiamente utilizzati come fissativi in fragranze, additivi in cosmetici, prodotti per la cura della persona, giocattoli per bambini e dispositivi medici come cateteri per via endovenosa e sacche trasfusionali. In tali dispositivi, possono raggiungere fino all'80% del peso del prodotto [25]. Gli ftalati ad alto peso molecolare (HMW), con R e R' da 7 a 13 atomi di carbonio, includono principalmente di-isononil ftalato (DINP) e di-isodecil ftalato (DIDP). Questi ultimi sono ampiamente utilizzati nell'industria come plastificanti al fine di aumentare morbidezza, flessibilità, estensibilità, malleabilità, durata e tolleranza alla temperatura di materiali polimerici rigidi come il PVC [26].

Ogni anno nel mondo vengono prodotte milioni di tonnellate di ftalati [27], di cui il DEHP rappresenta circa il 50% della produzione mondiale totale, seguito da DBP, DIDP e DINP. A causa della loro diffusa applicazione industriale, gli ftalati sono contaminanti ubiquitari in tutti i comparti ambientali quali aria, fiumi, acque marine, sedimenti, suolo e biota [28]. Dal momento che non sono chimicamente legati al materiale polimerico, possono essere facilmente rilasciati nell'ambiente durante le varie fasi di produzione, trasporto, stoccaggio e smaltimento dei polimeri plastici, come anche possono migrare dalla superficie dei materiali di imballaggio in bevande o alimenti [29], specialmente in quelli ad elevato contenuto di grassi per via della loro natura lipofila.

4.2.1 Tossicità e legislazione

A causa della loro diffusa applicazione, esiste una significativa esposizione della popolazione agli ftalati principalmente per via inalatoria e cutanea da prodotti per la cura della persona e dai dispositivi medici in plastica [30]. Tuttavia, la dieta rappresenta certamente la fonte più importante di esposizione. A causa della loro tossicità, gli ftalati sono stati classificati dall'Agenzia per la Protezione dell'Ambiente degli Stati Uniti come *chemical of concern*, ovvero sostanze chimiche preoccupanti [31]. Essi, dopo la trasformazione in metaboliti primari e secondari, agirebbero come interferenti endocrini modulando negativamente le funzioni ormonali e riproduttive [32,33]. Inoltre, sono stati ampiamente correlati a diverse forme di cancro a pelle, fegato, prostata e seno [34,35]. Diversi studi epidemiologici hanno mostrato una relazione negativa tra l'elevata esposizione agli ftalati ed il quoziente intellettivo dei bambini [36], mentre è stata dimostrata una relazione positiva tra l'esposizione ambientale e asma e allergie [37]. Nonostante la comprovata tossicità, ad oggi il contenuto degli ftalati negli alimenti non è stato ancora regolamentato. La Commissione Europea mediante il Regolamento UE 10/2011 ha limitato il livello di alcuni ftalati nei materiali destinati al contatto con gli alimenti [38]. Sono stati stabiliti dei limiti di migrazione specifica per DBP ($0,3 \text{ mg kg}^{-1}$), BBP (30 mg kg^{-1}), DEHP ($1,5 \text{ mg kg}^{-1}$) e per la somma di DiNP e DiDP (9 mg kg^{-1}), le cui strutture sono mostrate in Figura 4.4. Inoltre, nel 2019 l'Autorità Europea per la Sicurezza Alimentare (EFSA) ha aggiornato la dose giornaliera tollerabile (DGT) per cinque ftalati [39]. In particolare, per DBP, BBP, DEHP e DiNP è stata fissata una DGT di $50 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$ di peso corporeo, mentre per il DiDP la DGT è pari a $150 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$ di peso corporeo.

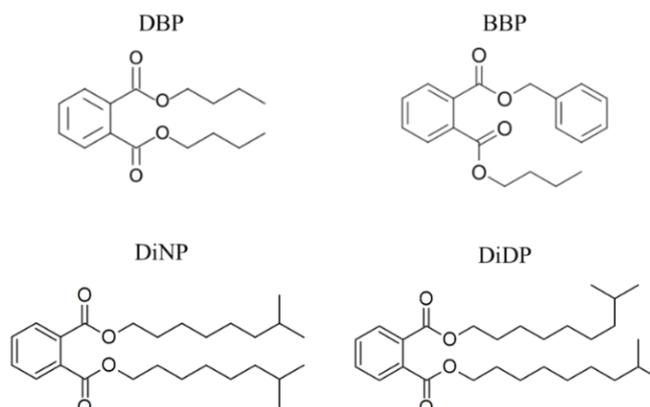


Figura 4.4. Ftalati regolamentati nei materiali a contatto con gli alimenti secondo il decreto UE 10/2011.

4.3 Pesticidi

Il termine pesticida viene comunemente utilizzato come nome generale per indicare regolatori di crescita delle piante, fungicidi, erbicidi, insetticidi, rodenticidi, molluschicidi e nematocidi. Già a partire dal 1860, i cosiddetti pesticidi di "prima generazione", come zolfo, arsenico e nicotina, furono applicati alle colture, tuttavia, il loro uso venne quasi subito interrotto a causa della tossicità o dell'inefficacia dovuta alla resistenza dei parassiti. Fu dagli anni '40 del Novecento che i pesticidi furono prodotti e utilizzati in modo estensivo [40]. Dopo la Seconda guerra mondiale, emerse un gruppo maggiormente efficace di pesticidi sintetici, noti come di "seconda generazione", che includevano alcuni organoclorurati, come diclorodifeniltricloroetano (DDT) e dieldrin, che divennero popolari grazie a basso costo, facilità di applicazione ed efficacia. Se applicati correttamente, i pesticidi possiedono indubbiamente enormi vantaggi quali aumentare la resa delle colture e migliorare qualità, sicurezza e durata di conservazione dei prodotti agricoli. Per i consumatori, questo comporta l'accesso ad un'ampia varietà di alimenti a prezzi accessibili, coltivati localmente o importati da altri stati o paesi. Tuttavia, l'applicazione impropria, la selezione errata o un uso eccessivo su colture (prima che i residui della precedente applicazione si siano dilavati) o sul raccolto, comportano una quantità elevata di residui sui prodotti destinati ai consumatori [41].

4.3.1 Fonti di contaminazione

Per l'uomo l'esposizione ai pesticidi può verificarsi quando questi vengono applicati a colture agricole in prossimità di aree residenziali, per via della loro persistenza nell'ambiente, o a seguito dell'ingestione di alimenti contaminati, acqua potabile e prodotti animali (a causa del loro bioaccumulo), dell'inalazione o del contatto con la pelle [42].

Le attività agricole rappresentano circa il 70-80% dell'uso di pesticidi. La loro applicazione sui soli ortaggi nei paesi sviluppati si aggira intorno al 25% [43]. Tuttavia, è stato stimato che solo lo 0,1% dei pesticidi raggiunge effettivamente il proprio bersaglio mentre il restante 99,9%, per via della scarsa biodegradabilità, si diffonde e persiste negli ambienti circostanti, quali acqua, aria e suolo [44]. Infatti, sebbene alcuni pesticidi siano stati vietati da molti anni, in alcuni paesi la loro presenza è ancora rilevata in alcuni corsi d'acqua. Il DDT può rimanere nel terreno per anni fino ad

entrare nella catena alimentare e contaminare il cibo. Altri composti chimici come i pesticidi organoclorurati (OCP) sono stati ampiamente studiati negli ultimi anni a causa del loro elevato uso agricolo [45] e segnalati come chimicamente stabili e semi-volatili, persistenti e resistenti al degrado, il che implica che durano più a lungo negli ambienti e possono essere trasportati facilmente nell'atmosfera attraverso il vento. Il loro carattere lipofilo li rende facilmente attaccabili ai tessuti grassi animali e umani, pertanto, si ritrovano principalmente negli alimenti grassi quali pesce, carne e latticini.

4.3.2 Tossicità e legislazione

I pesticidi possiedono un ampio impatto sulla salute umana. Gli effetti tossici variano da manifestazioni acute, come nausea, vomito, mal di testa e irritazione della pelle e degli occhi, a croniche, come cancro, disturbi neurologici, endocrini, di sviluppo, riproduttivi, diabete, difetti alla nascita e malattie cardiovascolari [46]. Secondo quanto riportato da Bhalla e colleghi, ogni anno circa 250000-370000 persone muoiono a causa dell'ingestione diretta o indiretta di pesticidi [47]. Inoltre, l'applicazione di pesticidi può causare danni anche ad altri organismi non bersaglio, inclusi uccelli, api e pesci, oltre ovviamente a danni ambientali, attraverso la contaminazione di suolo, acqua, piante, ed allo sviluppo di fenomeni di resistenza negli organismi bersaglio [48].

Per questi motivi, i pesticidi devono essere regolamentati al fine di garantire che la loro presenza non determini rischi inaccettabili per uomo, animali o ambiente. La regolamentazione dei pesticidi ricevette poca attenzione fino agli anni '40, quando l'uso di pesticidi sintetici, come il DDT, divenne molto diffuso in agricoltura. Il DDT è stato vietato per tutti gli usi agricoli nelle nazioni sviluppate negli anni '80 e da allora venne riconosciuta la necessità dell'introduzione di una legislazione sul tema dei pesticidi. Nell'Unione Europea, le legislazioni frammentate dei vari Stati membri, mediante il Regolamento CE 396/2005, sono state sostituite con un'unica norma armonizzata sui pesticidi. Tale regolamento utilizza l'approccio dei livelli massimi residuali (LMR) definiti come “i livelli massimi di residui di pesticidi (espressi in mg kg⁻¹) ammessi per legge all'interno o sulla superficie di alimenti o mangimi, fatte salve le buone prassi agricole e l'esposizione minima possibile dei consumatori al fine di tutelare quelli maggiormente vulnerabili” [49]. Ciascun LMR viene calcolato a seguito di una valutazione esaustiva delle proprietà tossiche del principio attivo e della

destinazione d'uso. Ad oggi, la legislazione europea copre circa 665 pesticidi utilizzati in agricoltura e oltre 350 tra prodotti freschi, sia animali che vegetali, e derivati. Il Regolamento 396/2005 stabilisce, inoltre, che venga applicato un LMR generico predefinito di $0,01 \text{ mg kg}^{-1}$ per tutti quei pesticidi per i quali non sia stato ancora fissato un LMR specifico.

Per determinare se un pesticida rappresenti un rischio inaccettabile per il consumatore, la FAO ha stabilito dei valori specifici di Dose Giornaliera Accettabile (DGA) e Dose Acuta di Riferimento (DAR). L'ADI stima "la quantità di un pesticida, espressa in mg kg^{-1} , a cui l'uomo può essere esposto giornalmente nel corso della sua vita, attraverso l'ingestione di alimenti o cibi contaminati, senza pregiudicare i rischi per la salute sulla base di tutti i fatti noti al momento della valutazione". D'altra parte, la DAR è stabilita per la popolazione generale basata su bambini e neonati, comprese le donne considerate in età fertile. Essenzialmente, viene definita come il livello di esposizione al quale è probabile che si verifichino effetti dannosi negli individui più sensibili della popolazione durante un'esposizione di 24 ore. Nei casi in cui i residui di pesticidi superino i rispettivi LMR, l'esposizione deve essere confrontata con la DGA e/o la DAR per valutare l'effettivo rischio per il consumatore.

4.4 Idrocarburi policiclici aromatici

Gli IPA costituiscono un'ampia classe di composti organici contenenti due o più anelli aromatici fusi costituiti da carbonio e idrogeno. Si originano mediante temperature elevate ($500\text{-}700 \text{ }^\circ\text{C}$) da fonti sia naturali che antropiche, sebbene la loro formazione possa verificarsi anche a temperature più basse ($100\text{-}150 \text{ }^\circ\text{C}$). Questo processo, tuttavia, richiede un periodo di tempo maggiore sulla scala geologica e comporta la produzione di una quantità maggiore di IPA alchilati (MOAH). Pertanto, il rapporto tra IPA alchilati e non può rappresentare un'indicazione dell'origine di contaminazione. Gli IPA sono chimicamente stabili e molto scarsamente degradati dall'idrolisi. In presenza di luce, sono suscettibili all'ossidazione e alla fotodegradazione. Sono composti lipofili con scarsa solubilità in acqua, che generalmente diminuisce con l'aumentare della massa molecolare.

4.4.1 Fonti di contaminazione

Le fonti naturali ed antropiche di IPA nell'ambiente sono numerose. Essi si formano durante la combustione incompleta o la pirolisi della materia organica e pertanto sono emessi da una serie di fonti come la lavorazione di carbone, petrolio greggio, petrolio e gas naturale, la produzione di alluminio, ferro e acciaio, il riscaldamento in centrali elettriche e abitazioni (mediante stufe a gas, carbone o legna), la combustione di rifiuti, incendi, eruzioni vulcaniche, processi idrotermali, scarichi di autoveicoli ed olio lubrificante per motori [50].

Nell'atmosfera, gli IPA contenenti 5 o più anelli aromatici si trovano prevalentemente in associazione con il particolato di solito su particelle di piccole dimensioni ($< 2.5 \mu\text{m}$) come ceneri volanti e fuliggine. Quelli a 2 o 3 anelli sono quasi interamente in fase vapore, mentre quelli a 4 anelli possono trovarsi in entrambe le forme. L'associazione degli IPA più pesanti con il particolato rende le ricadute atmosferiche una delle principali vie di contaminazione [51,52]. Nel suolo, poiché l'adsorbimento di IPA da parte della frazione organica è forte, il conseguente assorbimento da parte di piante ed ortaggi risulta limitato. Pertanto, le concentrazioni di questi contaminanti sono generalmente maggiori sulla superficie della pianta (buccia, foglie esterne) che nei tessuti interni. La superficie cerosa di frutta e verdura può concentrare IPA a basso peso molecolare principalmente attraverso l'adsorbimento superficiale. Nonostante alcuni IPA possano essere degradati dall'attività microbica, nel suolo la loro emivita varia da mesi a diversi anni.

Per i non fumatori, l'esposizione agli IPA avviene principalmente per inalazione di aria ed ingestione di cibo contaminato. Gli IPA possono essere veicolati negli alimenti attraverso le ricadute ambientali, per mancanza di buone pratiche di fabbricazione, come anche durante la produzione alimentare a seguito di particolari trasformazioni tecnologiche che comportano processi di riscaldamento, quali ad esempio grigliatura o affumicatura. Il livello della contaminazione è legato al tempo ed alla temperatura di lavorazione, come anche alla distanza dalla fonte di calore e al tipo di processo. Considerando l'elevata natura lipofila di questi composti, la principale fonte alimentare di assunzione umana è rappresentata da oli e grassi vegetali (come la margarina) utilizzati direttamente come condimenti o come grassi per cucinare, o

indirettamente a seguito della loro incorporazione in altri alimenti, come biscotti e torte.

4.4.2 Tossicità e legislazione

Gli effetti degli IPA sulla salute umana dipendono principalmente dalla durata e dalla via di esposizione, dalla quantità di IPA a cui si è esposti e dalla loro tossicità innata. Altri fattori, come lo stato di salute preesistente e l'età, possono anche avere un impatto sulla salute. L'esposizione professionale ad alti livelli di inquinanti contenenti IPA provoca sintomi come irritazione oculare, nausea, vomito, diarrea e confusione, irritazione e infiammazione della pelle [53,54]. Gli effetti sulla salute derivanti dall'esposizione cronica o a lungo termine possono includere diminuzione della funzione immunitaria, danni a reni e fegato, problemi respiratori, sintomi simili all'asma, anomalie della funzione polmonare, mentre il contatto ripetuto con la pelle può indurre arrossamento e infiammazione [55].

La struttura degli IPA, la dimensione e la natura delle particelle atmosferiche su cui vengono adsorbiti, influenzano l'adsorbimento a livello polmonare [56], mentre quello attraverso la mucosa intestinale è influenzato principalmente dalla composizione della dieta. In particolare, l'adsorbimento viene potenziato da alimenti lipofili e inibito da cibi ricchi di fibre. Una volta assorbiti nell'organismo, gli IPA vengono sottoposti ad interventi metabolici ed enzimatici al fine di eliminarli. I metaboliti formati, come epossidi e diidrodiooli, sono molto attivi e possono formare addotti con proteine o DNA. Ad esempio, il benzo[a]pirene-7,8-diol-9,10-epossido, il metabolita più importante del benzo[a]pirene, presenta la più alta attività di induzione tumorale. La maggior parte dei metaboliti sono escreti attraverso le feci, mentre una percentuale minore di urina. Non tutti gli IPA mostrano la stessa attività tossica. Secondo uno studio dello *Scientific Committee of Food* (SCF) pubblicato nel 2002, 15 IPA (sui 33 considerati) mostrano chiare evidenze sia di genotossicità che di cancerogenicità. In particolare, alcuni erano genotossici ma non cancerogeni, mentre pochi, valutati come non cancerogeni, possono tuttavia agire come sinergizzanti [50].

Dal un punto di vista legislativo, nel 1994 la *Environmental Protection Agency* (EPA) degli Stati Uniti stilò una lista di 16 IPA prioritari (naphthalene, acenaphthene, acenaphthylene, fluorene, phenanthrene, anthracene, fluoranthene, pyrene, benzo(a)anthracene, chrysene, benzo(b)fluoranthene, benzo(k)fluoranthene, BaP,

dibenzo(a,h)anthracene, benzo(g,h,i)perylene, indeno(1,2,3-cd)pyrene), specificando l'esigenza dell'utilizzo del B(a)P come tracciante della presenza di altri composti genotossici o cancerogeni [57].

La necessità dell'introduzione di una legislazione armonizzata tra gli stati membri dell'Unione Europea sorse nel 2001 in seguito al ritrovamento in Repubblica Ceca di un lotto altamente contaminato di olio di sansa di oliva. Con il parere dell'SCF del 2002, venne individuato un nuovo elenco di 15 IPA ad alto peso molecolare, in seguito definiti come prioritari dell'Unione europea [50].

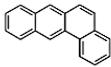
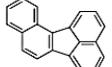
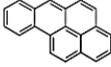
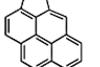
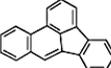
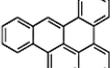
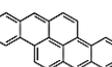
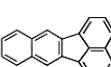
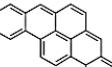
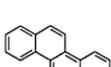
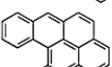
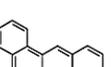
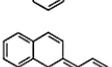
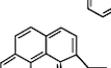
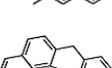
1	Benz[<i>a</i>]anthracene (BaA) (Mw 228)		9	Benzol[<i>j</i>]fluoranthene (BjF) (Mw 252)	
2	Benzo[<i>a</i>]pyrene (BaP) (Mw 252)		10	Cyclopent[<i>cd</i>]pyrene (CPP) (Mw 226)	
3	Benzo[<i>b</i>]fluoranthene (BbF) (Mw 252)		11	Dibenzo[<i>a,e</i>]pyrene (DeP) (Mw 302)	
4	Benzo[<i>ghi</i>]perylene (BgP) (Mw 276)		12	Dibenzo[<i>a,h</i>]pyrene (DhP) (Mw 302)	
5	Benzo[<i>k</i>]fluoranthene (BkF) (Mw 252)		13	Dibenzo[<i>a,i</i>]pyrene (DiP) (Mw 302)	
6	Chrysene (CHR) (Mw 228)		14	Dibenzo[<i>a,l</i>]pyrene (DlP) (Mw 302)	
7	Dibenz[<i>a, h</i>]anthracene (DhA) (Mw 278)		15	5-Methylchrysene (5MC) (Mw 242)	
8	Indenol[1,2,3- <i>cd</i>]pyrene (IcP) (Mw 276)		+ 1	Benzo[<i>c</i>]fluorene (BcL) (Mw 216)	

Figura 4.5. IPA previsti dal Regolamento 108/2005 della Commissione Europea.

Nel 2005, gli Stati membri sono stati tenuti a monitorare i 15 IPA prioritari dell'UE insieme ad un ulteriore IPA, il benzo(c)fluorene, introdotto dal *Joint Food and Agriculture Organization/World Health Organization Expert Committee on Food Additives* (JEFCA) [58]. Questi 15+1 IPA prioritari sono mostrati in Figura 4.5. Nel frattempo, il Regolamento UE n. 208/2005 [59] ha fissato per la prima volta un limite per la presenza di BaP in diverse classi di alimenti [50]. Dopo aver valutato i dati raccolti dagli Stati membri, nel 2007 l'EFSA ha sollevato dubbi circa l'idoneità del

BaP come marker univoco di contaminazione da IPA negli alimenti [60]. A tal proposito, nel 2008 venne pubblicato un nuovo parere che suggeriva l'utilizzo della somma di otto IPA ad alto peso molecolare [chiamati IPA8: BaA, Ch, BbF, benzo(k)fluorantene (BkF), BaP, dibenzo(a,h)antracene (DBahA), benzo(g,h,i)perilene (BghiP) e indeno(1,2,3-cd)pirene (IP)] o di un sottogruppo di quattro (IPA4), che includeva BaA, Ch, BbF e BaP. Venne alla fine concluso che gli IPA8 non fornissero molto valore aggiunto rispetto agli IPA4 [61].

Infine, il Regolamento 835/2011 ha fissato nuovi limiti, considerando sia il BaP che il gruppo IPA4. In particolare, per oli vegetali e grassi, è stato mantenuto il limite di $2 \mu\text{g kg}^{-1}$ per il BaP, mentre è stato introdotto un limite di $10 \mu\text{g kg}^{-1}$ per la somma degli IPA4 [62].

L'EFSA ha riferito che, per un individuo adulto di 60 kg, l'esposizione alimentare giornaliera complessiva è di circa 235 ng per BaP, 641 ng (per BaP e Ch), 1168 ng (per gli IPA4) e 1729 ng (per hli IPA8) [61].

Riferimenti Bibliografici

- [1] Council Regulation (EEC) No 315/93 of 8 February 1993 laying down Community procedures for contaminants in food.
- [2] I.A. Rather, W.Y. Koh, W.K. Paek, J. Lim. The Sources of Chemical Contaminants in Food and Their Health Implications. *Front. Pharmacol.*, 2017, 8, 830.
- [3] K. Lebelo, N. Malebo, M.J. Mochane, M. Masinde. Chemical Contamination Pathways and the Food Safety Implications along the Various Stages of Food Production: A Review. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 2021, 18, 5795.
- [4] M.J. Sweeney, D.W. Dobson. Mycotoxin production by *Aspergillus*, *Fusarium* and *Penicillium* species. *Int. J. Food Microbiol.*, 1998, 43, 141-158.
- [5] S. Marin, A.J. Ramos, G. Cano-Sancho, V. Sanchis. Mycotoxins: Occurrence, toxicology, and exposure assessment. *Food Chem. Toxicol.*, 2013, 60, 218-237.
- [6] T. Tanaka, A. Hasegawa, S. Yamamoto, U.S. Lee, Y. Sugiura, Y. Ueno. Worldwide contamination of cereals by *Fusarium* mycotoxins nivalenol, deoxynivalenol and zearalenone. I. Survey of 19 countries. *J. Agric. Food Chem.*, 1988, 36, 979-983.
- [7] J.W. Bennett, M. Klich. Mycotoxins. *Clin. Microbiol. Rev.*, 2003, 16, 497-516.
- [8] A. Alshannaq, J.H. Yu. Occurrence, Toxicity, and Analysis of Major Mycotoxins in Food. *Int. J. Environ. Res. Pu He*, 2017, 14, 632.
- [9] N. Gaur, K. Narasimhulu, Y. PydiSetty. Recent advances in the bioremediation of persistent organic pollutants and its effect on environment. *J. Clean. Prod.*, 2018, 198, 1602-1631.
- [10] C. Nerín, E. Canellas, J. Romero, A. Rodriguez. A clever strategy for permeability studies of methyl bromide and some organic compounds through high-barrier plastic films. *Int. J. Environ. Anal. Chem.*, 2007, 87, 863-874.
- [11] C. Nerín, M. Aznar, D. Carrizo. Food contamination during food process. *Trends Food Sci. Technol.*, 2016, 48, 63-68.

- [12] A. Buculei, G. Gutt, A. Sonia, D. Adriana, G. Constantinescu. Study regarding the tin and iron migration from metallic cans into foodstuff during storage. *J. Agroaliment. Process. Technol.*, 2012, 18, 299-303.
- [13] A. Cabado, S. Aldea, C. Porro, G. Ojea, J. Lago, C. Sobrado. Migration of BADGE (bisphenol A diglycidyl-ether) and BFDGE (bisphenol F diglycidyl-ether) in canned seafood. *Food Chem. Toxicol.*, 2008, 46, 1674-1680.
- [14] REGULATION (EC) No 178/2002 OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL of 28 January 2002 laying down the general principles and requirements of food law, establishing the European Food Safety Authority and laying down procedures in matters of food safety.
- [15] REGULATION (EC) No 1935/2004 OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL of 27 October 2004 on materials and articles intended to come into contact with food and repealing Directives 80/590/EEC and 89/109/EEC.
- [16] European Food Safety Authority (EFSA), Scientific Opinion on mineral Oil Hydrocarbons in Food, EFSA Panel on Contaminants in Food Chain (CONTAM), *EFSA J.*, 2012, 10(6), 2704.
- [17] M. Biedermann, K. Grob. On-line coupled high performance liquid chromatography–gas chromatography for the analysis of contamination by mineral oil. Part 2: Migration from paperboard into dry foods: Interpretation of chromatograms. *J Chromatogr A*, 2012, 1255, 76-99.
- [18] Commission Regulation (EC) 1151/2009, Imposing special conditions governing the import of sunflower oil originating in or consigned from Ukraine due to contamination risks by mineral oil and repealing Decision 2008/433/EC.
- [19] Commission Implementing Regulation (EU) 853/2014 of 5 August 2014 repealing Regulation (EC) 1151/2009 imposing special conditions governing the import of sunflower oil originating in or consigned from Ukraine.
- [20] Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR). Sitzung der BfR Kommission für Bedarfsgegenstände (BeKo) – Protokoll der Sitzung vom 14 April 2011.

- [21] L. Barp, M. Biedermann, K. Grob, F. Blas-Y-Estrada, U.C. Nygaard, J. Alexander, J.P Cravedi. Mineral oil saturated hydrocarbons (MOSH) in female Fischer 344 rats; accumulation of wax components; implications for risk assessment. *Sci. Total Environ.*, 2017, 583, 319-333.
- [22] M. Biedermann, L. Barp, C. Kornauth, T. Würger, M. Rudas, A. Reiner, N. Concini, K. Grob. Mineral oil in human tissues, Part II: Characterization of the accumulated hydrocarbons by comprehensive two-dimensional gas chromatography. *Sci Total Environ*, 2015, 506-507, 644-655.
- [23] EFSA (2023) Draft opinion Update of the risk assessment of mineral oil hydrocarbons (MOH) in food. <https://connect.efsa.europa.eu/RM/s/publicconsultation2/a0109000006qqHf/pc0400>.
- [24] J. Yang, Y. Li, Y. Wang, J. Ruan, J. Zhang, C. Sun. Recent advances in analysis of phthalate esters in foods. *TrAC-Trends Anal Chem*, 2015, 72, 10-26.
- [25] R.U. Halden 2010. Plastics and health risks. *Annu. Rev. Public Health* 31:179-94.
- [26] A. Giuliani, M. Zuccarini, A. Cichelli, H. Khan, M. Reale. Critical Review on the Presence of Phthalates in Food and Evidence of Their Biological Impact. *Int. J. Environ. Res. Pu. He.*, 2020, 17, 5655.
- [27] R. Jamarani, H.C. Erythropel, D. Burkat, J.A. Nicell, R.L. Leask, M. Maric. Rheology of green plasticizer/poly(vinyl chloride) blends via time-temperature superposition. *Processes*, 2017, 5(3), 43.
- [28] S. Net, R. Sempéré, A. Delmont, A. Paluselli, B. Ouddane. Occurrence, fate, behavior and ecotoxicological state of phthalates in different environmental matrices. *Environ. Sci. Tech.*, 2015, 49, 4019-4035.
- [29] X.L. Cao. Phthalate esters in foods: sources, occurrence, and analytical methods, *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.*, 2010, 9, 21-43.
- [30] F.A. Zeman, C. Boudet, K. Tack, A.F. Barneaud, C. Brochot, A.R.R. Péry, A. Oleko, S. Vandentorren. *J. Int. Hyg. Environ. Health*, 2013, 216, 271-279.
- [31] Unites States Environmental Protection Agency (EPA). 2012. Phthalates Action [Phttps://www.epa.gov/assessing-and-managing-chemicals-under-](https://www.epa.gov/assessing-and-managing-chemicals-under-)

tsca/phthalates#:~:text=EPA%20is%20concerned%20about%20phthalates,which%20pose%20potentially%20high%20exposure.

[32] L. Caporossi, A. Alteri, G. Campo, E. Paci, G. Tranfo, S. Capanna, B. Papaleo. Cross sectional study on exposure to BPA and phthalates and semen parameters in men attending a fertility center. *Int J Env Res Pub He*, 2020, 17(2), 489.

[33] E. De Hond, H. Tournaye, P. De Sutter, W. Ombelet, W. Baeyens, A. Covaci, T. D'Hooghe. Human exposure to endocrine disrupting chemicals and fertility: A case control study in male subfertility patients. *Environ Inter*, 2015, 84, 154-160.

[34] M. Zhu, C. Huang, X. Ma, R. Wu, W. Zhu, X. Li, Z. Liang, F. Deng, J. Wu, S. Geng, C. Xie, C. Zhong. Phthalates promote prostate cancer cell proliferation through activation of ERK5 and p38. *Environ Toxicol Pharmacol*, 2018, 63, 29-33.

[35] M. Fiore, C.G. Oliveri, R. Caltabiano, A. Buffone, P. Zuccarello, L. Cormaci, M. Ferrante. Role of emerging environmental risk factors in thyroid cancer: A brief review. *Int J Env Res Pub He*, 2019, 16 (7), 1185.

[36] N. Li, G.D. Papandonatos, A.M. Calafat, K. Yolton, B.P. Lanphear, A. Chen, J.M. Braun. Identifying periods of susceptibility to the impact of phthalates on children's cognitive abilities. *Environ Res*, 2019, 172, 604-614.

[37] C.G. Bornehag, J. Sundell, C.J. Weschler, T. Sigsgaard, B. Lundgren, M. Hasselgren, L. Hagerhed-Engman. The association between asthma and allergic symptoms in children and phthalates in house dust: a nested case-control study, *Environ. Health Perspect.*, 2004, 112, 1393-1397.

[38] COMMISSION REGULATION (EU) No 10/2011 of 14 January 2011 on plastic materials and articles intended to come into contact with food. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/ALL/?uri=celex%3A32011R0010>.

[39] European Food Safety Authority (EFSA). Adopted 18 September 2019. Update of the risk assessment of di-butylphthalate (DBP), butyl-benzyl-phthalate (BBP), bis(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP), di-isononylphthalate (DINP) and diisodecylphthalate (DIDP) for use in food contact materials.

- [40] K. Lebelo, N. Malebo, M.J. Mochane, M. Masinde. Chemical Contamination Pathways and the Food Safety Implications along the Various Stages of Food Production: A Review. *Int. J. Environ. Res. Pu. He.*, 2021, 18, 5795.
- [41] C. Chen, T. Qian, C. Tao, C. Li, Y. Li. Evaluation of pesticide residues in fruits and vegetables from Xiamen, China. *Food Control*, 2011, 22, 1114-1120.
- [42] G.T. Bakirci, D.B.Y. Acay, F. Bakirci, S. Otles. Pesticide residues in fruits and vegetables from the Aegean region, Turkey. *Food Chem*, 2014, 160, 379-392.
- [43] V.L. Zikankuba, G. Mwanyika, J.E. Ntwenya, A. James. Pesticide regulations and their malpractice implications on food and environment safety. *Cogent Food Agric.*, 2019, 5, 1-15.
- [44] P. Deb. *Environmental Pollution and the burden of Food-Borne Diseases*. Elsevier Inc.: Amsterdam, The Netherlands, 2018; 15, 473-500.
- [45] A.M. Taiwo. A review of environmental and health effects of organochlorine pesticide residues in Africa. *Chemosphere*, 2019, 220, 1126-1140.
- [46] S. Mostafalou, M. Abdollahi. Pesticides and human chronic diseases: Evidences, mechanisms, and perspectives. *Toxicol Appl Pharm*, 2013, 268, 157-177.
- [47] T.C. Bhalla, S.S. Monika. International laws and food-borne illness. In *Food Safety and Human Health*; Singh, R.L., Mondal, S., Eds.; Elsevier Inc.: Amsterdam, The Netherlands, 2019; 319-371.
- [48] H. Kohler, R. Triebkorn. Wildlife ecotoxicology of pesticides: Can we track effects to the population level and beyond? *Science*, 2013, 341, 759-765.
- [49] REGOLAMENTO (CE) N. 396/2005 DEL PARLAMENTO EUROPEO E DEL CONSIGLIO del 23 febbraio 2005 concernente i livelli massimi di residui di antiparassitari nei o sui prodotti alimentari e mangimi di origine vegetale e animale e che modifica la direttiva 91/414/CEE del Consiglio.
- [50] Scientific Committee on Food (SCF), Opinion of the Scientific Committee on Food on the Risks to Human Health of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Food. 4 December 2002. European Commission (EC), Brussels, 2002.

- [51] N.T. Edwards. Polycyclic hydrocarbons (PAHs) in the terrestrial environment. A review. *J. Environ. Qual.*, 1983, 12, 427-441.
- [52] T. Nielsen, H.E. Jørgensen, J.C. Larsen, M. Poulsen. City air pollution of polycyclic aromatic hydrocarbons and other mutagens: occurrence, sources and health effects. *Sci. Tot. Environ.*, 1996, 189/190, 41-49.
- [53] A. Kocbach Bølling, J. Pagels, K.E. Yttri, L. Barregard, G. Sallsten, P.E. Schwarze, C. Boman. Health effects of residential wood smoke particles: The importance of combustion conditions and physicochemical particle properties. Part. *Fibre Toxicol.*, 2009, 6, 29.
- [54] K.H. Kim, S.A. Jahan, E. Kabir, R.J.C. Brown. A review of airborne polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and their human health effects. *Environ. Int.*, 2013, 60, 71-80.
- [55] M.A. Khairy, M. Kolb, A.R. Mostafa, A. EL-Fiky, M. Bahadir. Risk assessment of polycyclic aromatic hydrocarbons in a Mediterranean semi-enclosed basin affected by human activities (Abu Qir Bay, Egypt). *J. Hazard. Mater.*, 2009, 170, 389-397.
- [56] G. Purcaro, L. Barp, S. Moret. Determination of hydrocarbon contamination in foods: A review. *Anal. Methods*, 2016, 8, 5755.
- [57] United States Environmental Protection Agency (US EPA). *Water Quality Standards Handbook*; US EPA: Washington, DC, USA, 1994.
- [58] European Commission (EC). 2005/108 of 4 February 2005 on the further investigation into the levels of polycyclic aromatic hydrocarbons in certain foods. *Off. J. Eur. Union* 2005, L34, 43-45.
- [59] European Commission (EC). Commission Regulation (EC) of No 208/2005 of 4 February 2005 amending Regulation (EC) No 466/2001 as regards polycyclic aromatic hydrocarbons. *Off. J. Eur. Union* 2005, L34, 3-5.
- [60] European Food Safety Authority (EFSA). Findings of the EFSA Data Collection on Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Food. *EFSA J.* 2007, 5, 1-55.

[61] European Food Safety Authority (EFSA). Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Food-Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food Chain. EFSA J. 2008, 6, 1-114.

[62] European Commission (EC). Commission Regulation (EU) No 835/2011 of 19 August 2011 amending Regulation (EC) No 1881/2006 as regards maximum levels for polycyclic aromatic hydrocarbons in foodstuffs. Off. J. Eur. Union 2011, L215, 4-8.

Sezione Sperimentale

CAPITOLO 5

Analisi della contaminazione da oli minerali mediante cromatografia multidimensionale LC-GC

I seguenti paragrafi riportano le pubblicazioni scientifiche relative all'analisi della contaminazione da oli minerali in campioni alimentari, nello specifico integratori di acidi grassi omega-3 ed oli essenziali agrumari, comunemente impiegati per la formulazione di cosmetici, profumi ed integratori alimentari. Le analisi sono state condotte mediante cromatografia multidimensionale *online* liquido-gassosa (LC-GC) accoppiata ad un rivelatore a ionizzazione di fiamma (FID).

Secondo quanto riportato nel capitolo precedente, per via di una diversa tossicità tra gli idrocarburi minerali saturi (MOSH) e quelli aromatici (MOAH), risulta necessario che le due frazioni vengano separate e quantificate indipendentemente l'una dall'altra. A tale scopo, la cromatografia liquida, operata in fase normale, funge sia da fase di pre-separazione dei MOSH dai MOAH (in accordo alla loro diversa affinità con la fase stazionaria polare della colonna LC), che da fase di preparazione del campione, al fine di ritenere i materiali interferenti, principalmente lipidi, presenti nelle matrici alimentari. Dal momento che gli oli minerali sono costituiti da un'ampia varietà di composti isomeri, a seguito di un'analisi LC-GC-FID, il cromatogramma di una contaminazione da MOSH o MOAH si presenterà con la forma tipica di una "gobba" irrisolta di composti.

5.1 Investigazione della contaminazione da idrocarburi minerali in integratori alimentari ricchi in acidi grassi omega-3.

In questo studio è stata indagata la presenza di oli minerali in diciassette campioni commerciali di integratori di acidi grassi omega-3 caratterizzati da diversa formulazione (liquida o in capsule *soft-gel*) e composizione (oli di pesce, vegetali o di microalghe). Le analisi sono state eseguite mediante cromatografia liquida accoppiata *on-line* alla gascromatografia con rivelatore a ionizzazione di fiamma, tecnica considerata come il metodo più efficiente per la determinazione dei MOH negli alimenti. Il trasferimento degli analiti è stato eseguito utilizzando la tecnica della *retention gap* ed un'evaporazione *partially concurrent*.

Questa sezione è stata tradotta e adattata dalla seguente pubblicazione: A. Arena, M. Zoccali, A. Trozzi, P.Q. Tranchida, L. Mondello. Occurrence of mineral oil hydrocarbons in omega-3 fatty acid dietary supplements. *Foods*, 2021, 10, 2424. <https://doi.org/10.3390/foods10102424>.

5.1.1 Introduzione

La prima pubblicazione incentrata sull'analisi dei MOH negli alimenti risale al 1991 [2]. Da allora, diversi sono stati gli studi pubblicati incentrati sull'analisi di diversi tipi di alimenti. Nel 2013 Purcaro *et al.* indagarono la presenza di MOSH in diversi campioni alimentari (riso, zucchero a velo, pasta e olio d'oliva), rilevando contaminazioni comprese tra il limite di quantificazione (LoQ) e 65,2 mg kg⁻¹ [3]. Nel 2016, Moret *et al.* analizzarono il contenuto di MOH in prodotti a base di cereali di diversa composizione [4]. Tra i prodotti analizzati, la pasta all'uovo presentava il livello di MOSH più elevato (15,9 mg kg⁻¹), seguita dai dolci (10,4 mg kg⁻¹) e dal pane (7,5 mg kg⁻¹). La più alta concentrazione di MOAH venne invece ritrovata in un campione di pasta all'uovo (3,6 mg kg⁻¹) e in uno di pane al latte (3,6 mg kg⁻¹). Nello stesso anno, Zoccali *et al.* sottoposero ad analisi undici campioni di oli vegetali (oli di oliva, extravergine di oliva, sansa e girasole), con quantità rilevate di MOSH comprese tra 4 (olio extravergine di oliva) e 2540 mg kg⁻¹ (olio di girasole) e di MOAH comprese tra <LoQ e 356 mg kg⁻¹ (olio di girasole) [5]. Nel 2018, Canavar *et al.* si incentrarono sull'analisi di MOH in alimenti secchi confezionati in cartone riciclato [6]. In questo caso, la concentrazione di MOSH variava da 0,1 a 42,9 mg kg⁻¹, mentre il contenuto di MOAH variava da non rilevato a 2,7 mg kg⁻¹. Un ulteriore studio, mirato sull'analisi di alimenti confezionati provenienti da supermercati in Belgio, venne eseguito da Van Heyst *et al.* nel 2018. I MOSH vennero rilevati in 142 campioni con una contaminazione fino a 84,8 mg kg⁻¹, mentre 23 campioni risultarono contaminati da MOAH fino a 2,2 mg kg⁻¹ [7]. Nel 2020 Liu *et al.* analizzarono i MOH in dieci campioni di latte in polvere, trovando un contenuto di MOSH ed idrocarburi saturi oligomericici poliolefinici (POSH) compreso nell'intervallo 0,61-5,46 mg kg⁻¹ [8]. Infine, nel 2020, Zoccali *et al.* e Stauf *et al.* analizzarono diversi tipi di oli e grassi vegetali, rilevando alti livelli di contaminazione sia da MOSH che da MOAH, specialmente nei campioni di burro di cacao ed olio di mais [9,10].

Riguardo gli integratori alimentari ricchi di acidi grassi omega-3, negli ultimi anni si è registrato un considerevole aumento del loro consumo per via dei loro molteplici effetti benefici per la salute. Secondo quanto riportato dall' "*Omega-3 Supplements Market Size, Share & Trends Analysis Report*", nel 2019 il mercato globale degli integratori omega-3 è stato valutato a 5,18 miliardi di dollari, con una previsione di

crescita annuale dell'8.4% dal 2020 al 2027 [11]. Al giorno d'oggi, gli integratori alimentari di omega-3 possono contenere oli di pesce, krill o di fegato di merluzzo, sebbene esistano anche prodotti vegetariani che contengono olio di alghe. Gli acidi grassi polinsaturi omega-3 a catena lunga (PUFA), come gli acidi eicosapentaenoico (EPA) e docosaesaenoico (DHA) sono lipidi biologicamente attivi che svolgono un ruolo essenziale in molti processi fisiologici, in particolare nel funzionamento neuronale e nelle vie infiammatorie [12-14]. Attraverso le loro proprietà antiossidanti, i PUFA omega-3 possono migliorare le funzioni vascolari e ridurre il danno aterosclerotico [15]. Inoltre, EPA e DHA, da soli o in associazione con terapie convenzionali, possono esercitare attività antitumorale [16]. Nel 2010, l'Organizzazione delle Nazioni Unite per l'alimentazione e l'agricoltura (FAO) raccomandò un consumo giornaliero di 250 mg di EPA e DHA per i maschi adulti e le femmine non gravide e non in allattamento [17]. Secondo il Dipartimento della Salute degli Stati Uniti, un tipico integratore di pesce fornisce orientativamente 1 g di olio di pesce, contenente 180 mg di EPA e 120 mg di DHA [18].

Sebbene pesci e loro prodotti derivati possano contenere vari livelli di metalli pesanti tossici [19], gli integratori alimentari di acidi grassi omega-3 non sono stati ritrovati come contaminati da tali sostanze. La sola presenza di policlorobifenili (PCB) è stata determinata, sebbene al di sotto del limite legale [20] probabilmente perché rimossi a seguito dei passaggi di distillazione e/o deodorizzazione degli oli [21]. Tuttavia, nel 2019, Matsuo *et al.* rilevarono che 17 dei 26 prodotti a base di olio di pesce analizzati erano contaminati da PCB, con una concentrazione media di 2,2 $\mu\text{g kg}^{-1}$ [22]. Il presente studio ha avuto come obiettivo quello di indagare la contaminazione da MOH negli integratori alimentari di omega-3, in accordo con quanto previsto dalle linee guida europee [23].

5.1.2 Parte sperimentale

5.1.2.1 Reagenti

I solventi esano (per HPLC e GC, grado 97%) e diclorometano (CH_2Cl_2) (grado 99,9%) sono stati acquistati da Merck Life Science (Merck KGaA, Darmstadt, Germania). Per la separazione e la quantificazione delle frazioni di MOSH e MOAH, è stata utilizzata una soluzione madre contenente 9 composti standard quali undecano (C_{11}), tridecano (C_{13}), bicicloesile (CyCy), 5-colestano (Cho), 1-metilnaftalene

(1MN), 2-metilnaftalene (2MN), pentilbenzene (5B), perilene (Per), 1,3,5-tri-terzbutilbenzene (TBB). I composti C₁₁, CyCy, 1MN, 2MN, 5B e TBB erano a una concentrazione di 300 µg mL⁻¹ ciascuno. C₁₃ era a una concentrazione di 150 µg mL⁻¹, mentre Cho e Per erano a una concentrazione di 600 µg mL⁻¹. È stata preparata una soluzione (IS) combinando 0.1 mL della soluzione madre con esano fino a un volume finale di 3 mL. Per la valutazione della discriminazione è stata utilizzata la seguente miscela contenente 10 alcani di riferimento: decano (C₁₀), C₁₁, C₁₃, esadecano (C₁₆), eicosano (C₂₀), tetracosano (C₂₄), pentacosano (C₂₅), pentatriacontano (C₃₅), tetracontano (C₄₀), pentacontano (C₅₀), tutti ad una concentrazione di 100 µg mL⁻¹ (Merck Life Science).

5.1.2.2 Preparazione del campione

Diciassette campioni di integratori alimentari ricchi di acidi grassi omega-3 sono stati preparati come segue: 250 mg di olio sono stati pesati, a seguire sono stati aggiunti 25 µL della miscela IS ed entrambi sono stati diluiti fino a un volume finale di 1 mL con esano. Per i campioni contenuti in capsule *soft-gel*, le capsule sono state rotte, la porzione di olio è stata utilizzata mentre la capsula è stata scartata.

Tutti i campioni, analizzati in triplicato ($n = 3$), sono riportati in Tabella 1, insieme alle relative composizioni, al tipo di formulazione, ai livelli di contaminazione di ritrovati ed ai valori di CV%.

5.1.2.3 Strumentazione analitica

Le analisi sono state condotte utilizzando un sistema LC-GC *online* dotato di un'interfaccia a Y costruita in laboratorio [24]. Lo strumento era composto da un sistema Shimadzu Prominence LC-20A (Kyoto, Giappone) dotato di: un modulo di comunicazione (CBM-20A) un degasatore (DGU-20A), due pompe a doppia testa a pistoni reciprocanti (LC-20AD), un autocampionatore (SIL-20AC), un forno (CTO-20A) ed un rivelatore a serie di fotodiodi (SPD-M30A). L'uscita del rivelatore era collegata, tramite un capillare di collegamento (1,15 m × 0,13 mm ID), alla porta numero 2 di una valvola FCV-20AH₂ (Shimadzu) a sei porte e due posizioni, collegata e controllata dal software LC. La porta 3 della valvola era diretta allo scarico, mentre la porta numero 1, attraverso un capillare privo di fase stazionaria (0,7 m × 0,1 mm ID), era collegata ad un gascromatografo GC2010 (Shimadzu) dotato di un iniettore *split/splitless* (impiegato per la fornitura di gas *carrier*) ed un rivelatore a ionizzazione

di fiamma (FID). Il processo di trasferimento LC-GC è stato eseguito utilizzando la tecnica della *retention gap* mediante l'approccio del *partially concurrent solvent evaporation*. All'interno del forno GC erano localizzati due connettori a Y. Il primo era collegato alla porta 1 della valvola FCV-20AH₂, come anche all'iniettore (tramite un capillare in silice fusa) ed a una pre-colonna disattivata priva di fase stazionaria di dimensioni 10 m × 0,53 mm ID. Il secondo connettore a Y era collegato alla pre-colonna, ad una valvola a tre porte e due posizioni (SVE), impiegata per l'evaporazione del solvente, ed alla colonna analitica, una SLB-5ms [polimero di silfenilene, virtualmente equivalente in polarità a poli(5% difenil/95% metilsilossano)] di dimensioni 20 m × 0,25 mm ID × 0,10 m d_f (Merck Life Science).

Le condizioni LC erano le seguenti: una colonna LiChrospher Si 60 Å delle dimensioni 25 cm × 2,1 mm ID × 5 μm d_p (Merck Life Science) è stata operata in fase normale ad un flusso di 0,3 mL min⁻¹. È stata impiegata la seguente eluizione in gradiente: 100% di esano dall'inizio a fino a 0,8 min, aumentando fino al 30% di CH₂Cl₂ in 0,7 min, per 8 min. Il volume di iniezione del campione era di 100 μL. La frazione dei MOSH è stata trasferita da 2,00 a 3,50 min, mentre quella dei MOAH da 4,5 a 8,1 min. Dopo 10 min di corsa, la colonna è stata lavata in *backflush* con CH₂Cl₂ e quindi ricondizionata con esano.

La programmata di temperatura del forno GC era: da 60°C (6 min per i MOSH e 8 min per i MOAH) a 360°C a 10°C min. Il gas *carrier* l'elio, è stato fornito a una pressione iniziale di 80,2 kPa (2,5 min) per consentire la rimozione del solvente, aumentata fino a 500 kPa a 200 kPa min⁻¹. Per l'analisi dei MOAH la pressione iniziale era sempre 80,2 kPa ma mantenuta per 5 min. La velocità lineare media era di 130 cm s⁻¹. La frequenza di campionamento del FID (360 °C) era di 8,3 Hz.

5.1.2.4 Standard interni e quantificazione

La miscela IS è stata utilizzata sia per verificare il corretto trasferimento delle due frazioni sia per la quantificazione delle gobbe di MOSH e MOAH. La Figura 5.1.1 mostra il cromatogramma LC, acquisito a 230 nm, della miscela IS assieme al gradiente di CH₂Cl₂ e alle frazioni MOSH e MOAH.

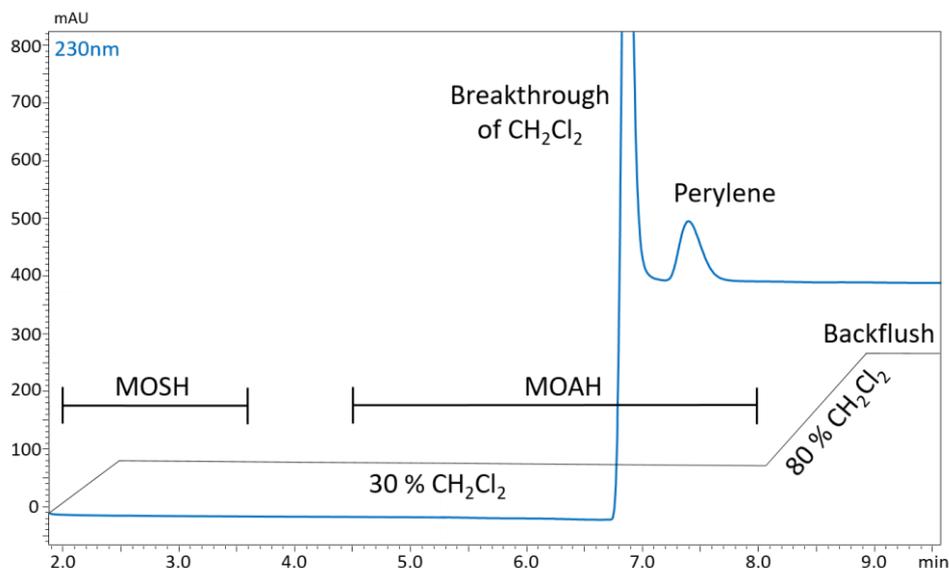


Figura 5.1.1. Cromatogramma LC acquisito a 230 nm della miscela IS, assieme al gradiente di CH₂Cl₂ e alle frazioni MOSH e MOAH.

Gli analiti C₁₁, CyCy, C₁₃ e Cho sono impiegati come standard interni per la frazione dei MOSH (Figura 5.1.2). In particolare, il CyCy è stato utilizzato come standard interno per la quantificazione dei MOSH dal momento che non si trova in quantità rilevanti negli oli minerali e nei materiali di imballaggio. Il C₁₁, presente alla stessa concentrazione del CyCy, è stato utilizzato per verificare l'eventuale perdita di CyCy dovuta ad una eccessiva eliminazione del solvente tramite la valvola a tre porte e due posizioni. Il C₁₃ è stato utilizzato come secondo standard di verifica dal momento che eluisce immediatamente dopo il CyCy creando una tipica coppia di picchi facilmente riconoscibili. Infine, il Cho è stato utilizzato come marker per contrassegnare la fine della frazione MOSH.

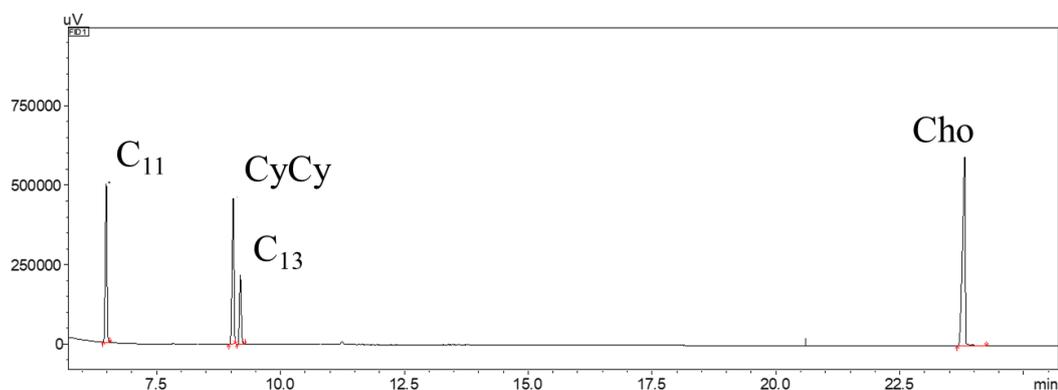


Figura 5.1.2. Cromatogramma degli standard interni della frazione dei MOSH.

Gli analiti 5B, 1MN, 2MN, TBB e Per sono impiegati come standard interni per la frazione dei MOAH (Figura 5.1.3). In particolare, come marcatori dell'inizio e della fine della frazione dei MOAH sono stati usati rispettivamente i composti TBB e Per (unico standard visualizzabile al PDA a 230 nm, Figura 5.1.1).

Il composto 5B è stato utilizzato per monitorare l'eventuale perdita di analiti volatili, mentre 1MN è stato utilizzato per la quantificazione della gobba MOAH. 1MN e 2MN, presenti nella miscela alla stessa concentrazione, formano una coppia di picchi facilmente riconoscibili.

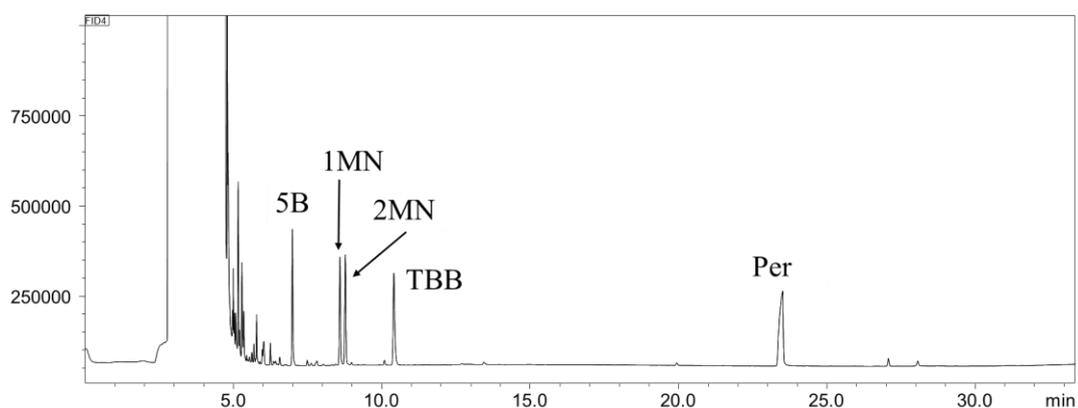


Figura 5.1.3. Cromatogramma degli standard interni della frazione dei MOAH.

La quantificazione è stata effettuata utilizzando un FID, rivelatore che fornisce lo stesso fattore di risposta per unità di massa per composti di struttura simile (in questo caso idrocarburi), consentendo la semplificazione della procedura di quantificazione mediante l'uso di appropriati standard interni, rispettivamente CyCy per la frazione MOSH e 1MN per quella dei MOAH [25]. Questo risulta particolarmente utile per tutte quelle sostanze, come gli oli minerali, per le quali non sono disponibili standard puri. L'area di ciascuna "gobba" di contaminazione è stata integrata da valle a valle utilizzando la funzione di "integrazione manuale" del software GC-FID, mentre gli idrocarburi naturali, presenti sulla sommità della gobba e facilmente riconoscibili per via del loro caratteristico andamento (con gli idrocarburi dispari più abbondanti dei pari) sono stati sottratti dal risultato finale. Un'analisi senza iniezione di campione è stata acquisita quotidianamente per utilizzare la linea di base per la corretta integrazione. Le sotto-frazioni di MOSH e MOAH sono state determinate mediante iniezione di una miscela di 10 alcani di riferimento (da C₁₀ a C₅₀). La precisione intermedia è stata valutata su un periodo di 48 giorni ottenendo un valore di

coefficiente di variazione (CV) del 10%, entro il valore del 20% riportato dalle linee guida UE per i campioni di grassi/oli [23] (in totale sono stati considerati 6 campioni preparati in giorni diversi).

Infine, secondo quanto richiesto dalle linee guida europee [23], per gli alimenti oleosi e grassi è stato necessario ottenere un LoQ di 2 mg kg^{-1} . In accordo con quanto riportato da Biedermann e Grob [8], al fine di generare una gobba integrabile con incertezza accettabile è necessario iniettare nel GC circa 50 ng di MOSH o MOAH. Il metodo ha, pertanto, previsto un volume di iniezione LC di 100 μL e, considerando il fattore di diluizione applicato durante la preparazione del campione, una quantità assoluta di 25 mg di olio è stata iniettata.

5.1.3 Risultati e discussioni

Secondo quanto riportato dall'EFSA [1], i MOSH con numero di atomi di carbonio compreso tra 16 e 35 possono accumularsi in diverse parti del corpo umano come tessuto adiposo, linfonodi, milza e fegato, mentre i MOAH possiedono capacità mutagene grazie ai loro 3-7 anelli aromatici. Nel 2014, Barp *et al.* analizzarono i MOH nel tessuto adiposo addominale sottocutaneo, nei linfonodi mesenterici (MLN), nella milza, nel fegato e nei polmoni di 37 soggetti umani [26]. Le più alte concentrazioni di MOSH furono ritrovate nei MLN e nella milza, rispettivamente con 1390 e 1400 mg kg^{-1} . Pertanto, a causa dei loro potenziali effetti negativi sulla salute, la contaminazione da MOH negli alimenti sta diventando motivo di grande preoccupazione. Nel presente studio sono stati analizzati diciassette prodotti commerciali, preparati utilizzando oli di pesce, vegetali e microalghe. Di questi, 14 campioni erano contenuti in capsule di *soft-gel*, mentre tre campioni erano liquidi. I dati quantitativi relativi alle analisi MOSH e MOAH sono riportati in Tabella 5.1.1.

La Figura 5.1.4 riporta il campione maggiormente contaminato (campione 2), con un livello di MOSH pari a $375,7 \text{ mg kg}^{-1}$. Come richiesto dalla guida UE [23], i valori di contaminazione sono stati espressi in sotto-frazioni, di specifici intervalli di atomi di carbonio, definite dalla posizione dei segnali di eluizione dalla colonna GC della miscela di alcani di riferimento. In questo caso, la gobba di contaminazione era centrata nell'intervallo $>C_{16} \leq C_{35}$ ($60,9 \text{ mg kg}^{-1}$ nell'intervallo $>C_{16} \leq C_{20}$, $278,8 \text{ mg kg}^{-1}$ nell'intervallo $>C_{20} \leq C_{25}$ e $36,0 \text{ mg kg}^{-1}$ nell'intervallo $>C_{25} \leq C_{35}$).

Tabella 5.1.1. Campioni analizzati con composizione, formulazione, concentrazione di MOSH e MOAH e coefficiente di variazione (CV%).

Campione	Composizione (olio)	Formulazione	MOSH (mg kg ⁻¹)	CV (%) (MOSH)	MOAH (mg kg ⁻¹)
1	vegetale + pesce	capsula <i>soft-gel</i>	33,0	5	< LoQ
2	vegetale + pesce	capsula <i>soft-gel</i>	375,7	3	< LoQ
3	vegetale + pesce	capsula <i>soft-gel</i>	6,3	2	< LoQ
4	pesce	capsula <i>soft-gel</i>	43,9	3	< LoQ
5	pesce	capsula <i>soft-gel</i>	92,9	4	< LoQ
6	pesce	liquida	14,4	8	< LoQ
7	pesce	capsula <i>soft-gel</i>	42,3	2	9,9
8	pesce	capsula <i>soft-gel</i>	2,4	8	< LoQ
9	pesce	capsula <i>soft-gel</i>	18,4	1	< LoQ
10	pesce	capsula <i>soft-gel</i>	16,3	1	< LoQ
11	pesce	capsula <i>soft-gel</i>	4,2	3	< LoQ
12	pesce + vegetale	capsula <i>soft-gel</i>	65,4	4	< LoQ
13	pesce	capsula <i>soft-gel</i>	73,5	< 1	6,6
14	pesce + vegetale	liquida	3,1	6	< LoQ
15	pesce	capsula <i>soft-gel</i>	20,2	< 1	< LoQ
16	microalghe + vegetale	liquida	3,8	2	< LoQ
17	non riportato	capsula <i>soft-gel</i>	32,8	1	< LoQ

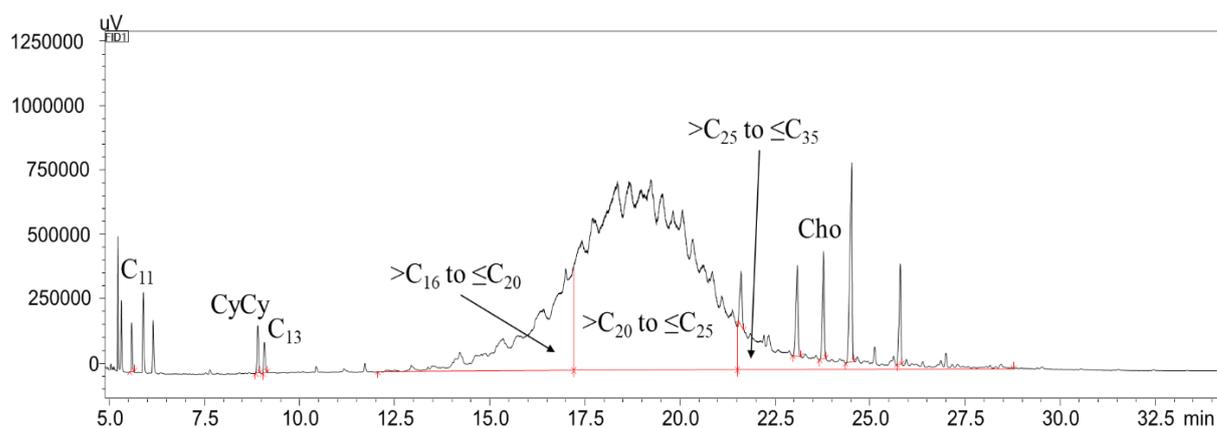


Figura 5.1.4. Espansione del cromatogramma LC-GC della frazione dei MOSH del campione 2, insieme a standard interni e relative sotto-frazioni.

La frazione MOSH del campione 5 è invece mostrata in Figura 5.1.5. In questo caso la contaminazione era ad un livello di 92,9 mg kg⁻¹ (13,3 mg kg⁻¹ nell'intervallo >C₂₀≤C₂₅ e 79,6 mg kg⁻¹ nell'intervallo >C₂₅≤C₃₅).

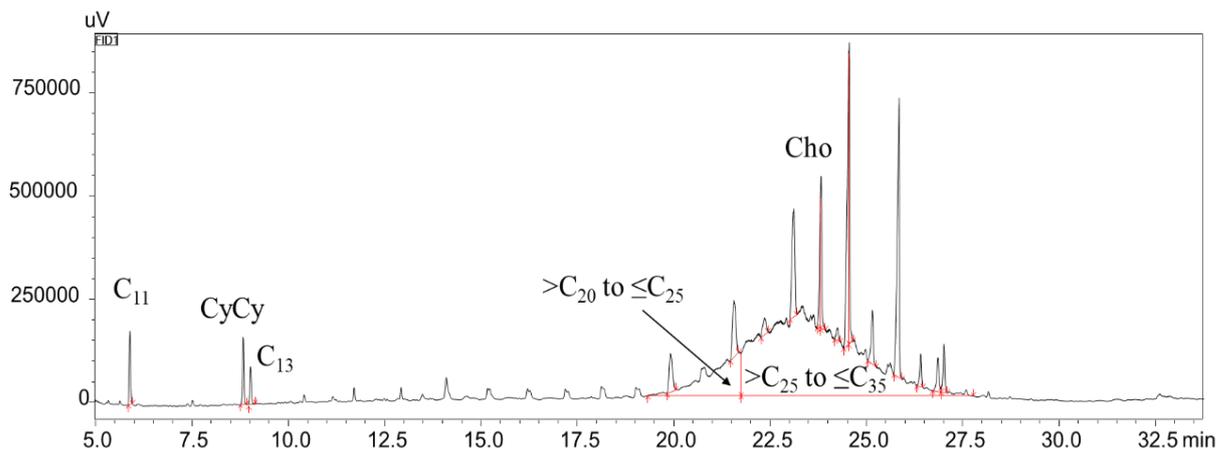


Figura 5.1.5. Espansione del cromatogramma LC-GC della frazione dei MOSH del campione 5, insieme a standard interni e relative sotto-frazioni.

Anche il campione 12 era caratterizzato da una moderata contaminazione al livello di $65,4 \text{ mg kg}^{-1}$ ($6,3 \text{ mg kg}^{-1}$ nell'intervallo $>C_{20}\leq C_{25}$, $55,6 \text{ mg kg}^{-1}$ nell'intervallo $>C_{25}\leq C_{35}$ e $3,5 \text{ mg kg}^{-1}$ nell'intervallo $>C_{35}\leq C_{40}$). Il campione 13 presentava una contaminazione al livello di $73,5 \text{ mg kg}^{-1}$, con la gobba dei MOSH completamente centrata nell'intervallo $>C_{25}\leq C_{35}$. Una quantità molto bassa di MOSH è stata rilevata nei campioni 3, 8, 11, 14 e 16, rispettivamente $6,3$, $2,4$, $4,2$, $3,1$ e $3,8 \text{ mg kg}^{-1}$. Uno dei campioni meno contaminati (campione 3) è mostrato nella Figura 5.1.6.

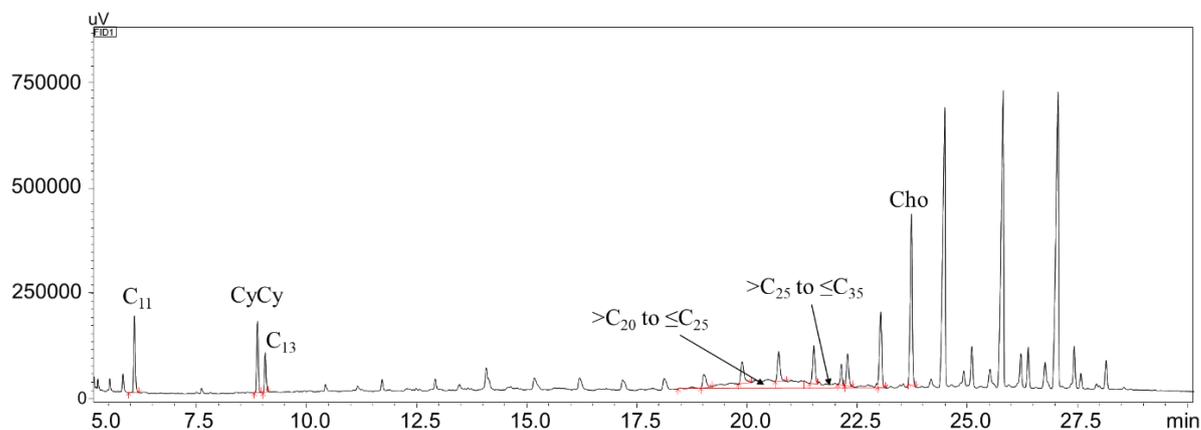


Figura 5.1.6. Espansione del cromatogramma LC-GC della frazione dei MOSH del campione 3, insieme a standard interni e relative sotto-frazioni.

L'istogramma in Figura 5.1.7 riporta le sotto-frazioni della contaminazione da MOSH di tutti i campioni analizzati. Come si può notare, tutti i campioni presentavano una contaminazione nell'intervallo $>C_{25}\leq C_{35}$, con un valore medio di $26,9 \text{ mg kg}^{-1}$; sei

campioni erano caratterizzati da una contaminazione nell'intervallo $>C_{20} \leq C_{25}$, con un valore medio di $50,8 \text{ mg kg}^{-1}$; in nove campioni è stata riscontrata una contaminazione nell'intervallo $>C_{35} \leq C_{40}$, con un valore medio di $2,6 \text{ mg kg}^{-1}$. Solo il campione 2 presentava una contaminazione nell'intervallo $>C_{16} \leq C_{20}$ ($60,9 \text{ mg kg}^{-1}$). Infine, la contaminazione nell'intervallo $>C_{40} \leq C_{50}$ era presente solo nei campioni 1 e 6, a bassi livelli di concentrazione quali $1,8$ e $0,6 \text{ mg kg}^{-1}$, rispettivamente.

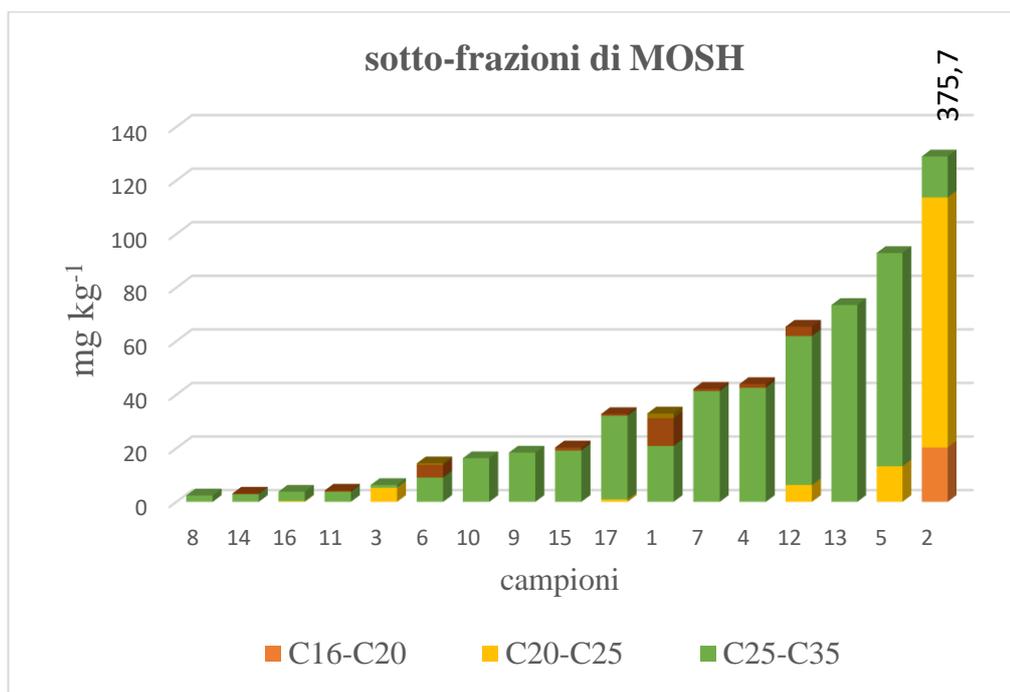


Figura 5.1.7. Confronto tra le sotto-frazioni di MOSH riscontrate nei campioni analizzati.

Infine, per quanto riguarda la contaminazione da MOAH, questa è stata riscontrata solo nei campioni 7 e 13 (entrambi costituiti da olio di pesce), rispettivamente a livelli di $9,9$ e $6,6 \text{ mg kg}^{-1}$.

L'ingestione orale attraverso la dieta è considerata la principale fonte di esposizione ai MOH per i consumatori. Considerando che il valore medio di contaminazione da MOSH riscontrato nei 17 campioni analizzati era pari a $49,9 \text{ mg kg}^{-1}$, una quantità giornaliera di 1 g di olio comporterebbe l'ingestione di una quantità media di MOSH di $49,9 \mu\text{g}$. Secondo quanto riportato nel *Scientific Opinion on Mineral Oil Hydrocarbons in Food*, l'EFSA ha riferito che l'assorbimento dei MOSH, attraverso il sistema portale e/o linfatico, diminuisce all'aumentare del numero di atomi di carbonio,

variando dal 90% per l'intervallo $>C_{14}\leq C_{18}$ al 25% per quello $>C_{26}\leq C_{29}$, diminuendo ulteriormente fino a superare il C_{35} quando diventa trascurabile [1]. Inoltre, come riportato da Barp *et al.*, nel fegato e nella milza umane le concentrazioni massime di MOSH variavano tra C_{25} e C_{28} [27]. Nella presente ricerca, tutti i campioni analizzati presentavano una contaminazione di MOSH nell'intervallo $>C_{25}\leq C_{35}$ che, pertanto, rappresenta grande preoccupazione per la salute umana considerando gli accumuli in fegato e milza. Inoltre, sebbene a basse concentrazioni, due campioni sono stati ritrovati contaminati anche da MOAH che, come accennato in precedenza, presentano potenziali effetti mutageni e cancerogeni.

5.1.4 Conclusioni

Tutti i campioni commerciali sottoposti ad analisi in questo studio sono stati caratterizzati da una contaminazione da MOSH a vari livelli, nello specifico da 2,4 a 375,7 mg kg⁻¹. Solo due campioni presentavano anche una contaminazione da MOAH.

In relazione ai risultati ottenuti, considerando il bioaccumulo dei MOSH e la relativa attività infiammatoria ed il potenziale cancerogeno dei MOAH, sarebbe opportuno che le industrie farmaceutiche prestassero maggiore attenzione alla possibile presenza di questi contaminanti nelle materie prime, oltre alla determinazione di altri xenobiotici e prodotti correlati all'ossidazione (inclusi metalli pesanti, perossidi e valori di anisidina). Inoltre, l'attenzione dovrebbe essere focalizzata anche sulle tecniche impiegate per l'estrazione degli oli e sulla possibile migrazione di oli lubrificanti dalle capsule *soft-gel* e/o dalla confezione.

Riferimenti bibliografici

- [1] European Food Safety Authority (EFSA). Scientific Opinion on Mineral Oil Hydrocarbons in Food. EFSA J. 2012, 10, 2704.
- [2] K. Grob, M. Lanfranchi, J. Egli, A. Artho. Determination of food contamination by mineral oil from jute sacks using coupled LC-GC. J. Assoc. Off. Anal. Chem., 1991, 74, 506-512.
- [3] G. Purcaro, M. Zoccali, P.Q. Tranchida, L. Barp, S. Moret, L.S. Conte, P. Dugo, L. Mondello. Comparison of two different multidimensional liquid–gas chromatography interfaces for determination of mineral oil saturated hydrocarbons in foodstuffs. Anal. Bioanal. Chem., 2013, 405, 1077-1084.
- [4] S. Moret, M. Scolaro, L. Barp, G. Purcaro, L.S. Conte. Microwave assisted saponification (MAS) followed by on-line liquid chromatography (LC)–gas chromatography (GC) for high-throughput and high-sensitivity determination of mineral oil in different cereal-based foodstuffs. Food Chem. 2016, 196, 50-57.
- [5] M. Zoccali, L. Barp, M. Beccaria, D. Sciarrone, G. Purcaro, L. Mondello. Improvement of mineral oil saturated and aromatic hydrocarbons determination in edible oil by liquid-liquid-gas chromatography with dual detection. J. Sep. Sci., 2016, 39, 623-631.
- [6] O. Canavar, O. Kappenstein, A. Luch. The analysis of saturated and aromatic mineral oil hydrocarbons in dry foods and from recycled paperboard packages by online HPLC-GC-FID. Food Addit. Contam. A, 2018, 35, 2471-2481.
- [7] A. Van Heyst, M. Vanlancker, J. Vercammen, K. van den Houwe, B. Mertens, M. Elskens, E. van Hoeck. Analysis of mineral oil in food: Results of a Belgian market survey. Food Addit. Contam. A, 2018, 35, 2062-2075.
- [8] L. Liu, B. Lia, J. Ouyangb, Y. Wu. Mild mixed-solvent extraction for determination of total mineral oil hydrocarbon contaminants in milk powder products. Food Chem., 2020, 333, 127488.
- [9] M. Zoccali, P.Q. Tranchida, L. Mondello. A lab-developed interface for liquid-gas chromatography coupling based on the use of a modified programmed-temperature-vaporizing injector. J. Chromatogr. A, 2020, 1622, 461096.

- [10] A. Stauff, J. Schnapka, F. Heckel, R. Matissek. Mineral oil hydrocarbons (MOSH/MOAH) in edible oils and possible minimization by deodorization through the example of cocoa butter. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 2020, 122, 1900383.
- [11] Market Analysis Report. Omega 3 Supplements Market Size, Share & Trends Analysis Report by Source (Fish Oil, Krill Oil), by Form (Soft Gels, Capsules), by Functionality, by End-user, by Distribution Channel, by Region, And Segment Forecasts, 2020–2027. 2020. Available online: <https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/omega-3-supplement-market>.
- [12] S.C. Dyllal. Long-chain omega-3 fatty acids and the brain: A review of the independent and shared effects of EPA, DPA and DHA. *Front. Aging Neurosci.*, 2015, 7, 1-15.
- [13] D. Cutuli. Functional and structural benefits induced by omega-3 polyunsaturated fatty acids during aging. *Curr. Neuropharmacol.*, 2017, 15, 534-542.
- [14] R.N. Thota, J.J.A Ferguson, K.A. Abbott, C.B. Dias, M.L. Garg. Science behind the cardio-metabolic benefits of omega-3 polyunsaturated fatty acids: Biochemical effects vs. clinical outcomes. *Food Funct.*, 2018, 9, 3576-3596.
- [15] G. Colussi, C. Catena, M. Novello, L.A. Sechi. Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids in Blood Pressure Control and Essential Hypertension. In *Update on Essential Hypertension*; Lizbeth, S.-S., Ed.; InTech: Rijeka, Croatia, 2016.
- [16] S. Punia, K.S. Sandhub, A.K. Sirohaa, S.B. Dhull. Omega 3-metabolism, absorption, bioavailability, and health benefits-A review. *Pharma Nutr.*, 2019, 10, 100162.
- [17] R. Uauy, M. Gerber, M. Skeaff, P. Wolmarans. *Fats and Fatty Acids in Human Nutrition-Report of an Expert Consultation*; Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO): Rome, Italy, 2010. *Foods*, 2021, 10, 2424.
- [18] U.S. Department of Health & Human Services, National Institutes of Health, Office of Dietary Supplements. Available online: https://ods.od.nih.gov/Research/Dietary_Supplement_Label_Database.aspx.
- [19] A.C. Bosch, B. O'Neill, G.O. Sigge, S.E. Kerwath, L.C. Hoffman, Heavy metals in marine fish meat and consumer health: A review. *J. Sci. Food Agric.*, 2016, 96, 32-48.

- [20] J. Lee, M.K. Kim, B. Kim, J. Kim, K. Lee. Analysis of polychlorinated biphenyls (PCBs), heavy metals and omega-3 fatty acids in commercially available Korean functional fish oil supplements. *Int. J. Food Sci. Tech.*, 2016, 51, 2217-2224.
- [21] J.J. Olli, H. Breivik, O. Thorstad. Removal of organic environmental pollutants from fish oil using short-path distillation with a working fluid. *Chemosphere*, 2013, 92, 273-278.
- [22] Y. Matsuo, K. Nakai, I. Sakuma, K. Akutsu, N. Tatsuta, M. Ishiyama, T. Higuchi, N. Ryuda, D. Ueno. Estimation of Polychlorinated Biphenyls Intake through Fish Oil-Derived Dietary Supplements and Prescription Drugs in the Japanese Population. *J. Food Qual. Hazards Control*, 2019, 6, 146-152.
- [23] S. Bratinova, E. Hoekstra. *Guidance on Sampling, Analysis and Data Reporting for the Monitoring of Mineral Oil Hydrocarbons in Food and Food Contact Materials*; Publications Office of the European Union: Luxembourg, 2019; ISBN 978-92-76-00172-0.
- [24] M. Zoccali, T.M.G. Salerno, P.Q. Tranchida, L. Mondello. Use of a low-cost, lab-made γ -interface for liquid-gas chromatography coupling for the analysis of mineral oils in food samples. *J. Chromatogr. A*, 2021, 1648, 462191.
- [25] N. Sdrigotti, G. Bauwens, G. Purcaro. A Review of MOSH and MOAH Analysis in Food. *LC-GC Europe*, 2021, 34, 2.
- [26] L. Barp, C. Kornauth, T. Wüger, M. Rudas, M. Biedermann, A. Reiner, N. Concin, K. Grob. Mineral oil in human tissues, Part I: Concentrations and molecular mass distributions. *Food Chem. Toxicol.*, 2014, 72, 312-321.
- [27] L. Barp, M. Biedermann, K. Grob, F. Blas-Y-Estrada, U.C Nygaard, J. Alexander, J.P. Cravedi. Accumulation of mineral oil saturated hydrocarbons (MOSH) in female Fischer 344 rats: Comparison with human data and consequences for risk assessment. *Sci.Total Environ.*, 2017, 575, 1263-1278.

5.2 Determinazione della contaminazione da idrocarburi minerali in oli essenziali agrumari.

Il presente studio riporta e discute le criticità relative alla determinazione dei MOH negli oli essenziali (OE) agrumari del genere *Citrus*. Diciotto campioni sono stati sottoposti ad analisi, in particolare undici *cold pressed* (CP) e sette distillati.

Tenendo conto della diversa composizione di ciascun OE, in termini di idrocarburi mono- e sesquiterpenici, al fine di evitare il sovraccarico della colonna LC sono state iniettate diverse quantità di campione, portando così a diversi limiti di quantificazione (LoQ), rispettivamente pari a 2 mg kg⁻¹ (per l'OE di bergamotto) e 5 mg kg⁻¹ (per tutti gli altri campioni indagati). Mentre negli OE distillati non sono state ritrovate tracce di contaminazione, in quelli CP, sono stati rilevati vari gradi di contaminazione da MOSH, compresi tra 10,7 e 338,4 mg kg⁻¹ (solo un campione ne era privo). Sono state determinate le sotto-frazioni MOSH, con l'intervallo >C25-≤C35 sempre presente, con una concentrazione media di 74,5 mg kg⁻¹. Per tutti i campioni analizzati il livello dei MOAH era sempre inferiore al LoQ.

5.2.1 Introduzione

Gli oli essenziali (OE) agrumari derivano dagli agrumi appartenenti al genere *Citrus*. Vengono estratti industrialmente dalle scorze comunemente mediante un processo di estrazione meccanica per pressione, che rompe gli orticoli liberando l'olio che viene poi separato per centrifugazione dall'emulsione acquosa; alternativamente sono prodotti tramite processi di distillazione in corrente di vapore, distillazione a secco, o altre tecniche che non includano il riscaldamento [1]. Sono costituiti principalmente da una frazione volatile (che va dall'85% negli OE di lime al 99% in quelli di arancia dolce) caratterizzata da idrocarburi mono- e sesquiterpenici (composti rispettivamente da 10 e 15 atomi di C), insieme a derivati ossigenati, aldeidi alifatiche, alcoli ed esteri [1]. Gli OE sono caratterizzati da un'elevata importanza economica in quanto impiegati in diversi prodotti industriali, principalmente cosmetici, profumi ed alimenti.

Questa sezione è stata tradotta e adattata dalla seguente pubblicazione: A. Arena, M. Zoccali, I. Bonaccorsi, M. Mondello, P.Q. Tranchida, L. Mondello. Determination of mineral oil hydrocarbon contamination in *Citrus* essential oils by using on-line liquid-gas chromatography: critical aspects. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2024, 416(3), pp. 801-808. <https://doi.org/10.1007/s00216-023-04873-7>.

Essi, inoltre, sono sempre più consumati come integratori alimentari e, se commercializzati come tali nell'Unione Europea (UE), rientrano nell'ambito di applicazione della direttiva CE 2002/46 [2].

L'obiettivo del presente progetto di ricerca è stato quello di valutare l'applicabilità della tecnica standard LC-GC-FID per la determinazione della contaminazione da MOH negli OE agrumari, discutendo ed evidenziando le criticità e le limitazioni del metodo. Infatti, seppur a bassi livelli di concentrazione, gli idrocarburi mono- e sesquiterpenici, i principali costituenti degli OE, erano stati precedentemente descritti come possibili interferenze per l'analisi dei MOH nel cartone [9,10].

5.2.2 Parte sperimentale

5.2.2.1 Reagenti

I solventi esano (per HPLC e GC, grado 97%) e diclorometano (CH_2Cl_2) (grado 99,9%) sono stati acquistati da Merck Life Science (Merck KGaA, Darmstadt, Germania). Per la separazione e quantificazione delle frazioni di MOSH e MOAH, una soluzione madre contenente 9 composti standard quali undecano (C_{11}), tridecano (C_{13}), bicicloesile (CyCy), 5-colestano (Cho), 1-metilnaftalene (1MN), 2-metilnaftalene (2MN), pentilbenzene (5B), perilene (Per), 1,3,5-tri-terzbutilbenzene (TBB) è stata diluita 1:30 con esano (miscela IS). Per la valutazione della discriminazione è stata utilizzata la seguente miscela contenente 10 alcani di riferimento: decano (C_{10}), C_{11} , C_{13} , esadecano (C_{16}), eicosano (C_{20}), tetracosano (C_{24}), pentacosano (C_{25}), pentatriacontano (C_{35}), tetracontano (C_{40}), pentacontano (C_{50}), tutti ad una concentrazione di $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ (Merck Life Science).

5.2.2.2 Preparazione del campione

Sono stati analizzati diciotto OE agrumari, in particolare, 10 *cold-pressed* (CP), nello specifico due campioni di bergamotto, due di limone, tre di mandarino (verde, giallo, rosso), arancia dolce, arancia amaro, pompelmo, lime, e 7 OE distillati (D), nello specifico, due di bergamotto, limone, mandarino verde, arancia dolce, pompelmo, lime. I campioni sono stati preparati come segue: 250 mg (per l'OE di bergamotto) e 100 mg (per tutti gli altri OE) sono stati pesati in un matraccio tarato da

1 mL, sono stati aggiunti 25 µL della miscela IS ed entrambi diluiti a un volume finale di 1 mL con esano. Tutti gli OE analizzati ($n = 3$) sono riportati nella Tabella 1.

5.2.2.3 Strumentazione analitica

Le analisi sono state condotte utilizzando un sistema LC-GC *online* dotato di un'interfaccia a Y costruita in laboratorio come riportato nel paragrafo precedente.

5.2.2.4 Analisi GC-MS

Le analisi GC-MS sono state eseguite su un GC-QP2020 NX (Shimadzu). Lo strumento era dotato di un iniettore *split/splitless* (280 °C) e un campionatore automatico (AOC-20i). La separazione è stata ottenuta su una colonna SLB-5ms delle dimensioni 30 m × 0,25 mm ID × 0,25 µm d_f .

La temperatura del forno GC è stata programmata come segue: da 50 a 360 °C a 3 °C min⁻¹. Il gas *carrier*, l'elio è stato utilizzato ad una velocità lineare costante di 30 cm s⁻¹. Il volume di iniezione era di 1 µL con un rapporto di splittaggio di 1:50. Nello spettrometro di massa la modalità di ionizzazione impiegata è stata la ionizzazione elettronica (70 eV). Le temperature dell'interfaccia e della sorgente erano rispettivamente di 220 °C e 250 °C. La modalità di acquisizione era SCAN con un intervallo di massa di m/z 40-500 ed una frequenza di produzione spettrale di 5 Hz.

5.2.3 Risultati e discussioni

Come risaputo, l'analisi dei MOH consiste nell'isolamento e nella separazione delle frazioni MOSH e MOAH mediante impiego di una colonna LC impaccata con gel di silice ed utilizzando un gradiente di esano/diclorometano [10]. Una volta separate, le due frazioni sono trasferite ad un GC-FID per la quantificazione. Lo scopo della colonna di silice è anche quello di trattenere le interferenze naturali, come i trigliceridi, presenti nei campioni alimentari, sebbene potrebbero essere necessari ulteriori approcci di preparazione e purificazione del campione al fine di rimuovere tali interferenze [11,12]. La composizione chimica del campione da analizzare influisce notevolmente il volume massimo di iniezione, influenzando di conseguenza il LoQ. Infatti, come riportato dalla prima edizione della guida UE [13], una quantità di campione compresa tra 50 e 100 ng deve essere iniettata ottenere un LoQ compreso tra 0,5 e 1,25 mg kg⁻¹. In base alle raccomandazioni del JRC su LoD/LoQ [14], la seconda edizione della guida UE [5] raccomanda tre diversi approcci per stimare il

LoQ quali: la deviazione standard dell'analisi di 10 campioni privi di contaminazione (o ad un livello di concentrazione vicino a quello che si aspetta essere il LoQ del metodo); la deviazione standard dell'intercetta di una retta di calibrazione a basse concentrazioni; la deviazione standard delle differenze nell'abbondanza del segnale delle repliche (campioni bianchi o campioni fortificati a bassa concentrazione). A tale scopo, per fortificare il campione bianco dovrebbe essere utilizzato un campione di MOH ben caratterizzato che copra approssimativamente l'intero intervallo di tempo di ritenzione. Tuttavia, considerando che per un dato intervallo di MOSH e/o MOAH, la larghezza e la forma della gobba sono fortemente influenzate dalla volatilità degli idrocarburi, nella presente ricerca per il calcolo del LoQ è stato utilizzato l'approccio riportato nella prima edizione della guida UE.

Per valutare eventuali fenomeni di discriminazione tra composti alto e bassobollenti, iniettando una miscela di alcani di riferimento, sono stati calcolati i rapporti C_{10}/C_{20} e C_{50}/C_{20} . I valori ottenuti, rispettivamente 1,1 e 0,9, erano in accordo con quanto previsto dalla normativa UE secondo la quale devono essere compresi tra 0,8 e 1,2. Le aree dei MOSH sono state determinate integrando l'intera gobba di contaminazione (coprendo l'intervallo di eluizione tra $\geq C_{10}$ e $\leq C_{50}$) ed eliminando i picchi presenti sulla sommità della gobba corrispondenti agli alcani naturali. In accordo con i tempi di ritenzione della miscela standard C_{10} - C_{50} , l'area totale della gobba è stata poi suddivisa per il calcolo delle sotto-frazioni.

Gli OE agrumari sono principalmente composti da una frazione volatile (dall'85% nel lime al 99% nell'arancia dolce) caratterizzata da composti ad elevate concentrazioni quali, ad esempio, i monoterpeni limonene (arancia amara 72,9-96,3%, pompelmo 84,8-96,2%, arancia dolce 76,7-96,6%, lime 33,0-71,0%, mandarino 58,9-92,6%, limone 48,7-76,0%, bergamotto 23,5-50,5%), β -pinene (lime 3,7-23,8%, limone 6,7-18,2%) e γ -terpinene (lime 3,5-19,2%, mandarino 3,4-20,7) ed i monoterpeni ossigenati linalolo (bergamotto 6,8-36,1%) ed acetato di linalile (bergamotto 11,8-40,6%) [1]. Considerando i campioni esaminati, l'OE di bergamotto rappresenta quello con il più basso contenuto di mono- e sesquiterpeni ed il più alto quantitativo di composti ossigenati. Come accennato precedentemente, la composizione degli OE influenza notevolmente la quantità massima di campione iniettabile, derivante dalla capacità della colonna LC di trattenere le specie interferenti,

in questo caso principalmente mono- e sesquiterpeni insaturi. Inizialmente, sono stati iniettati 50 mg del bergamotto CP (volume di iniezione 100 μ L di un olio diluito 1:2). Tuttavia, come si può osservare in Figura 5.2.1A e B (espansione di A), la separazione GC è compromessa per via di una massiccia coeluizione, da 5 a circa 20 min, di composti interferenti che sovraccaricano la colonna GC e impediscono l'analisi quantitativa. Al fine di approfondire qualitativamente la natura di questi composti interferenti, la frazione MOSH è stata raccolta (scollegando l'uscita della colonna LC) ed iniettata in un sistema GC-MS, confermando la presenza di mono- e sesquiterpeni.

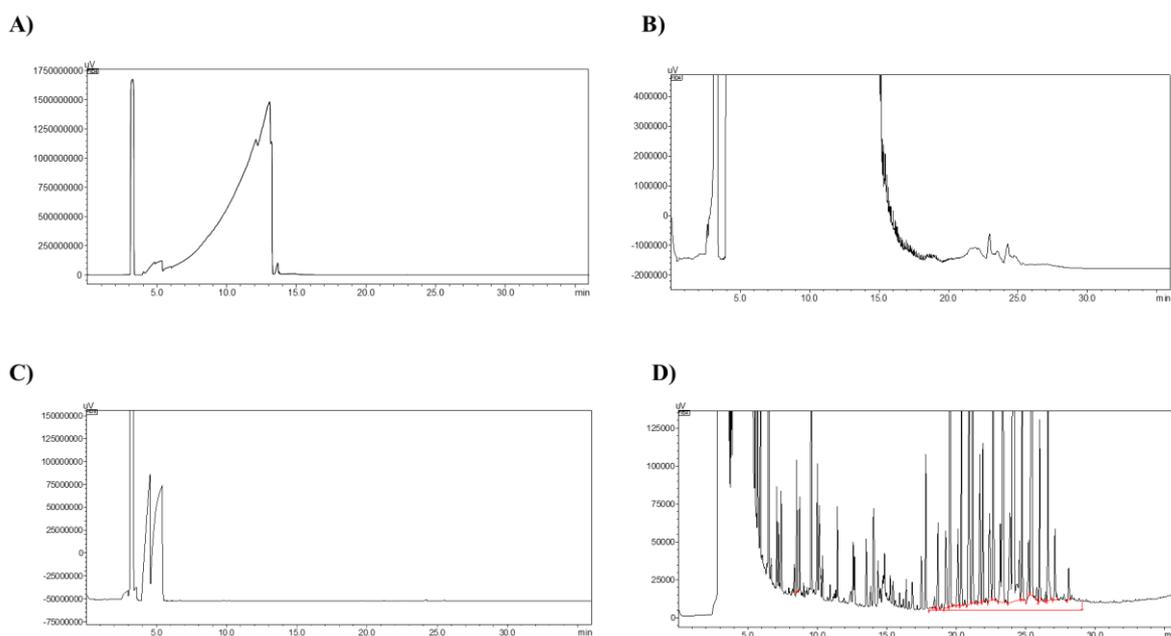


Figura 5.2.1. Analisi LC-GC-FID della frazione MOSH del campione 1. **A e B** (espansione di A): 50 mg di campione iniettati. **C e D** (espansione di C): 25 mg di campione iniettati.

Pertanto, è stata iniettata una quantità inferiore di campione, vale a dire 25 mg (volume di iniezione 100 μ L di un olio diluito 1:4) e, come si evince nelle Figure C e D (espansione di C), è stato ottenuto un profilo "convenzionale" di MOSH privo di interferenze. Considerando il fattore di diluizione applicato e la quantità assoluta di campione iniettato, è stato raggiunto un LoQ di circa 2 mg kg⁻¹. Si può concludere che la colonna di silice utilizzata può ritenere circa 25 mg di OE bergamotto con i relativi mono- e sesquiterpeni. I dati quantitativi relativi alle analisi dei MOSH sono riportati in Tabella 5.2.1.

Tabella 5.2.1. Campioni analizzati con contaminazione totale da MOSH, insieme a coefficienti di variazione (CV) e relative sotto-frazioni.

N°	Campione	mg kg ⁻¹ (CV)	sotto-frazioni	mg kg ⁻¹
1	bergamotto CP	10,7 (1,6%)	C ₂₀ -C ₂₅	1,4
			C ₂₅ -C ₃₅	7,8
			C ₃₅ -C ₄₀	1,5
2	bergamotto CP	11,9 (1,2%)	C ₂₀ -C ₂₅	0,8
			C ₂₅ -C ₃₅	8,4
			C ₃₅ -C ₄₀	2,7
3	limone CP	338,4 (1,4%)	C ₂₀ -C ₂₅	62,5
			C ₂₅ -C ₃₅	275,9
4	limone CP	333,2 (2,2%)	C ₂₀ -C ₂₅	156,9
			C ₂₅ -C ₃₅	168,0
			C ₃₅ -C ₄₀	8,3
5	mandarino giallo CP	< LoD	-	-
6	mandarino rosso CP	45,1 (4,7%)	C ₂₀ -C ₂₅	7,3
			C ₂₅ -C ₃₅	37,8
7	mandarino verde CP	19,1 (0,7%)	C ₂₀ -C ₂₅	5,7
			C ₂₅ -C ₃₅	13,4
8	arancia dolce CP	38,2 (4,3%)	C ₂₀ -C ₂₅	3,2
			C ₂₅ -C ₃₅	26,4
			C ₃₅ -C ₄₀	8,5
9	arancia amara CP	50,2 (1,8%)	C ₂₅ -C ₃₅	43,8
			C ₃₅ -C ₄₀	6,4
10	pompelmo CP	118,0 (1,9%)	C ₂₀ -C ₂₅	24,9
			C ₂₅ -C ₃₅	93,1
11	lime CP	126,2 (5,0%)	C ₂₀ -C ₂₅	55,4
			C ₂₅ -C ₃₅	70,8
12	bergamotto D	< LoD	-	-
13	bergamotto D	< LoD	-	-

14	limone D	< LoD	-	-
15	mandarino D	< LoD	-	-
16	arancia dolce D	< LoD	-	-
17	pompelmo D	< LoD	-	-
18	lime D	< LoD	-	-

D: distillato; CP: *cold pressed*

Nel campione 1 (bergamotto CP) è stata determinata una concentrazione di MOSH di 10,7 mg kg⁻¹ [coefficiente di variazione (CV): 1.6%]. Nonostante dalla nuova edizione della guida EU non sia più raccomandato, la contaminazione è stata espressa in sotto-frazioni di specifici intervalli di atomi di carbonio da C₁₀ a C₅₀ [28]. L'espressione dei risultati in sotto-frazioni è correlata al diverso assorbimento dei MOSH attraverso il sistema portale e/o il linfatico. Il campione 1 era caratterizzato dalle seguenti sotto-frazioni: > C₂₀≤ C₂₅: 1,4 mg kg⁻¹; > C₂₅≤ C₃₅: 7,8 mg kg⁻¹ e > C₃₅≤ C₄₀: 1,5 mg kg⁻¹. Il secondo OE di bergamotto CP analizzato era caratterizzato da un livello di MOSH pari a 11,9 mg kg⁻¹ (CV: 1,2%).

Per quanto riguarda tutti gli altri OE analizzati, essendo che il contenuto di monoterpeni è significativamente più elevato, anche iniettando 25 mg di OE (come per il bergamotto) l'analisi GC risultava fortemente influenzata dalla presenza di interferenti. A titolo di esempio, l'analisi di un OE di limone (campione 3) è riportata in Figura 5.2.2A e B (espansione di A), evidenziando un esteso sovraccarico della colonna GC. Di conseguenza, è stata iniettata una quantità di campione inferiore, vale a dire 10 mg (100 µL di un olio diluito 1:10), con l'ottenimento di un profilo "convenzionale" di MOSH (Figure C e D). Pertanto, in questo caso, la colonna LC è risultata in grado di ritenere circa 10 mg di OE con i relativi mono- e sesquiterpeni. Considerando la quantità assoluta di campione iniettato, è stato raggiunto un LoQ di circa 5 mg kg⁻¹. Il campione 3 era caratterizzato da un'elevata contaminazione pari a 338,4 mg kg⁻¹ (CV: 1,4%).

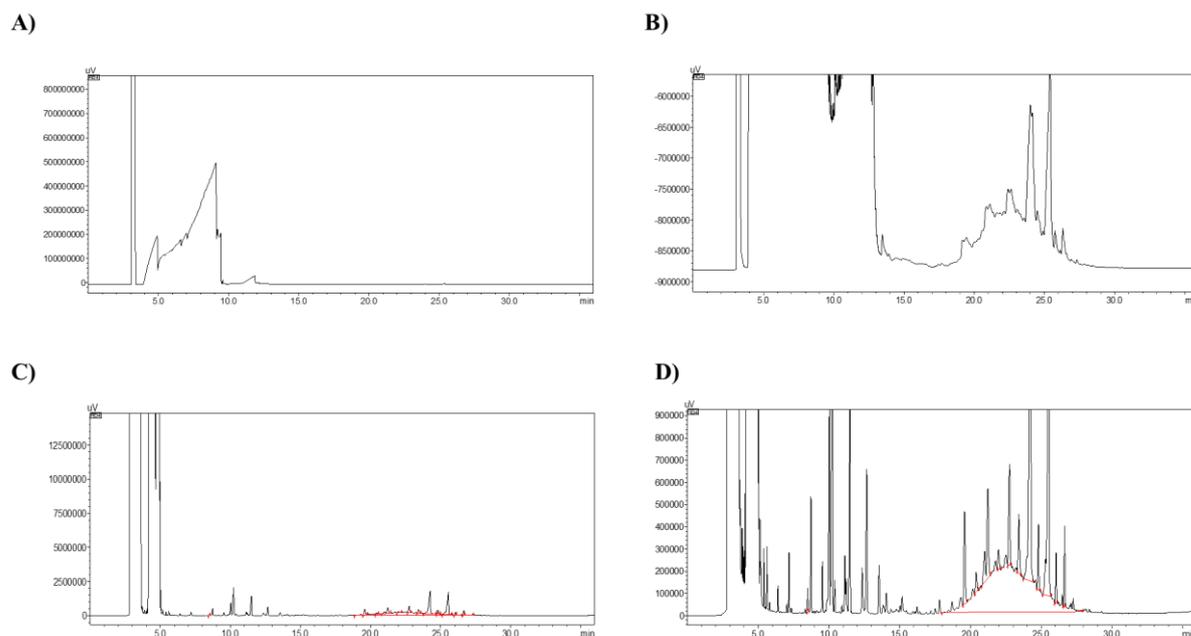


Figura 5.2.2. Analisi LC-GC-FID della frazione MOSH del campione 3. **A e B** (espansione di A): 25 mg di campione iniettati. **C e D** (espansione di C): 10 mg di campione iniettati.

Anche il secondo campione di OE di limone presentava con una concentrazione elevata di MOSH pari a $333,2 \text{ mg kg}^{-1}$ (CV: 2,2%), come anche gli OE di lime e pompelmo, rispettivamente di $126,2 \text{ mg kg}^{-1}$ (CV: 5,0%) e $118,0 \text{ mg kg}^{-1}$ (CV: 1,9%). Gli OE di arancia dolce e amara erano contaminati rispettivamente da $38,2$ (CV: 4,3%) e $50,2 \text{ mg kg}^{-1}$ (CV: 1,8%), mentre quelli di mandarino rosso e verde da $45,1$ (CV: 4,7%) e $19,1 \text{ mg kg}^{-1}$ (CV: 0,7%). L'unico campione con un valore MOSH inferiore al LoD era l'OE di mandarino giallo.

Riguardo le sotto-frazioni, tutti i campioni analizzati presentavano una contaminazione da MOSH nell'intervallo $>C_{25} \leq C_{35}$, compresa tra $7,8$ e $275,7 \text{ mg kg}^{-1}$, con un valore medio di $74,5 \text{ mg kg}^{-1}$. Come riportato da Barp *et al.* [15], tale frazione è oggetto di preoccupazione in relazione all'accumulo in fegato e milza.

Gli OE distillati sono stati analizzati tenendo in considerazione la quantità massima iniettabile ottimizzata per quelli CP, ovvero 25 mg per il bergamotto e 10 mg per tutti gli altri campioni. In accordo con quanto ci si poteva aspettare, nessuna contaminazione è stata rilevata in nessuno dei campioni ottenuti mediante un processo di distillazione.

Anche nel caso delle analisi dei MOAH, non sono state apportate modifiche in relazione alle quantità di campione iniettate. La Figura 5.2.3 mostra una sovrapposizione dei cromatogrammi delle analisi di MOSH e MOAH relative al campione 1 (OE di limone). Come si può vedere, il cromatogramma GC dei MOAH risultava caratterizzato da un grave sovraccarico dovuto all'eluizione di mono- e sesquiterpeni insaturi come anche di composti ossigenati, identificati nuovamente mediante GC-MS, a seguito della raccolta *off-line* della frazione. In particolare, il sovraccarico andava dai 3 ai 15 min e corrispondeva, pertanto, con la regione di eluizione degli standard interni utilizzati per l'analisi quantitativa. L'unico composto standard chiaramente visibile è il perilene (a circa 23 min) che segna la fine della frazione MOAH in LC. Nonostante l'incapacità di effettuare l'analisi quantitativa, considerando che i MOAH dovrebbero eluire nello stesso intervallo di atomi di carbonio dei MOSH, la loro presenza non è stata rilevata in nessuno dei campioni analizzati, considerando il LoQ di 2 mg kg^{-1} per l'OE di bergamotto, e 5 mg kg^{-1} per gli altri OE.

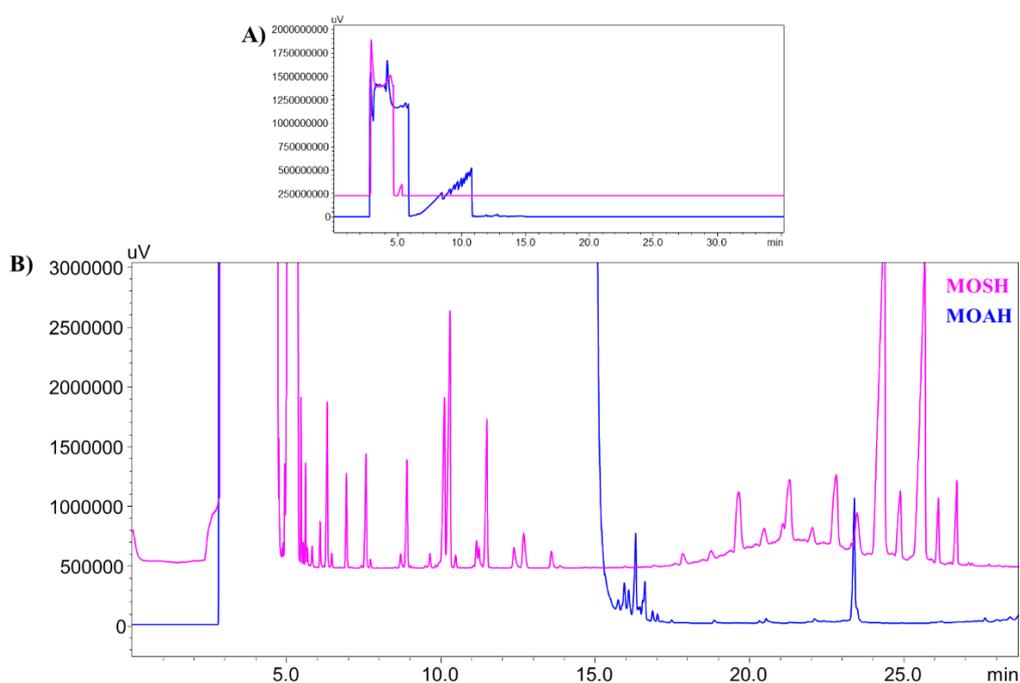


Figura 5.2.3. Sovrapposizione dei cromatogrammi MOSH e MOAH relativi al campione 1. B: espansione di A.

Nell'ambito della presente indagine, è possibile ipotizzare che le principali fonti di contaminazione di MOSH siano rappresentate dall'inquinamento ambientale (vicinanza delle coltivazioni ad aree urbane trafficate o siti industriali), dall'utilizzo di trattamenti fitosanitari sugli agrumi, o in alternativa dovute ai metodi di produzione, come ad esempio una migrazione di lubrificanti dai macchinari di estrazione [16,17].

Sulla base dei risultati ottenuti, al fine di abbassare i valori di LoQ una possibile soluzione potrebbe essere quella di impiegare un approccio *off-line* di preparazione del campione facendo, ad esempio, ricorso ad una colonna di vetro impaccata di silice che potrebbe certamente accogliere una maggiore quantità di campione, garantendo una superiore ritenzione di mono- e sesquiterpeni insaturi e quindi una frazione MOSH priva di interferenze.

Per quanto riguarda invece l'impossibilità della quantificazione dei MOAH mediante standard interni, il problema potrebbe essere risolto mediante costruzione di una curva di calibrazione.

5.2.4 Conclusioni

Dato l'ampio utilizzo degli OE agrumari nel settore alimentare, lo scopo di questa ricerca è stato quello di valutare la fattibilità dell'analisi dei MOH in tali campioni mediante cromatografia LC-GC *on-line*. A tal proposito, la composizione di tali campioni, ricchi soprattutto in monoterpeni, ha determinato non poche difficoltà comportando la coeluizione di significative interferenze nelle frazioni di interesse (trasferite dall'LC al GC) che impedivano la quantificazione. Presumibilmente, sarà necessario lo sviluppo di un metodo *off-line* di pretrattamento del campione per raggiungere il LoQ proposto dalle linee guida UE pari a $0,5 \text{ mg kg}^{-1}$ per la categoria a basso contenuto di grassi in cui rientrano gli OE [5].

Tra 18 campioni analizzati solo quelli *cold-pressed* sono stati ritrovati contaminati da MOSH (alcuni a livelli piuttosto elevati), mentre gli OE distillati, come previsto, non lo erano. Per quanto riguarda invece i MOAH, nessuna contaminazione è stata rilevata a livelli superiore al LoQ del metodo.

Riferimenti Bibliografici

- [1] G. Dugo, L. Mondello. Citrus oils composition, advanced analytical techniques, contaminants, and biological activity. CRC Press Taylor & Francis Group 6000 Broken Sound Parkway NW, Suite 300 Boca Raton, FL 33487-2742; 2011.
- [2] I.S. Tamburlin, E. Roux, M. Feuillée, J. Labbé, Y. Aussaguès, F.E. El Fadle, F. Fraboul, G. Bouvier. Toxicological safety assessment of essential oils used as food supplements to establish safe oral recommended doses. *Food Chem Toxicol*, 2021, 157, 112603.
- [3] Scientific opinion on mineral oil hydrocarbons in food. *EFSA J.* 2012, 10(6), 2704.
- [4] Draft opinion update of the risk assessment of mineral oil hydrocarbons (MOH) in food. EFSA, 2023.
https://connect.efsa.europa.eu/RM/s/publicconsultation2/a010900000_6qqHf/pc0400.
- [5] S. Bratinova, P. Robouch, E. Hoekstra. Guidance on sampling, analysis, and data reporting for the monitoring of mineral oil hydrocarbons in food and food contact materials - 2nd Edition, Luxembourg: Publications Office of the European Union, 2023.
- [6] S. Bratinova, E. Hoekstra. Guidance on Sampling, Analysis and Data Reporting for the Monitoring of Mineral Oil Hydrocarbons in Food and Food Contact Materials; Publications Office of the European Union: Luxembourg, 2019; ISBN 978-92-76-00172-0.
- [7] EN 16995:2017 Foodstuffs – vegetable oils and foodstuff on basis of vegetable oils – Determination of mineral oil saturated hydrocarbons (MOSH) and mineral oil aromatic hydrocarbons (MOAH) with on-line HPLC-GCFID analysis. 2017.
- [8] Vegetable oils- Determination of mineral oil saturated hydrocarbons (MOSH) and aromatic hydrocarbons (MOAH) with online coupled HPLC-GC-FID analysis- Method for low limit of quantification. ISO/CD 20122.
<https://www.iso.org/standard/86091.html>.
- [9] M. Biedermann, K. Grob. On-line coupled high performance liquid chromatography–gas chromatography for the analysis of contamination by mineral oil.

Part 2: migration from paperboard into dry foods: interpretation of chromatograms. *J Chromatogr A*. 2012, 1255, 76-99.

[10] M. Biedermann, K. Grob. On-line coupled high performance liquid chromatography-gas chromatography for the analysis of contamination by mineral oil. Part 1: method of analysis. Maurus Biedermann, Koni Grob. *J Chromatogr A.*, 2012, 1255, 56-75.

[11] K. Fiselier, D. Fiorini, K. Grob. Activated aluminum oxide selectively retaining long chain n-alkanes. Part I, description of the retention properties. *Anal Chim Acta*, 2009, 634(1), 96-101.

[12] M. Biedermann, C. Munoz, K. Grob. Epoxidation for the analysis of the mineral oil aromatic hydrocarbons in food. An update. *J Chromatogr A*. 2020, 1624, 461236.

[13] S. Bratinova, E. Hoekstra. Guidance on sampling, analysis, and data reporting for the monitoring of mineral oil hydrocarbons in food and food contact materials, Luxembourg: Publications Office of the European Union, 2019.

[14] T. Wenzl, J. Haedrich, A. Schaechtele, P. Robouch, J. Stroka. Guidance document on the estimation of LOD and LOQ for measurements in the field of contaminants in feed and food. Publications Office of the European Union, Luxembourg, 2016. EUR 28099, 2016.

[15] L. Barp, M. Biedermann, K. Grob, F. Blas-Y-Estrada, U.C. Nygaard, J. Alexander, J.P. Cravedi. Accumulation of mineral oil saturated hydrocarbons (MOSH) in female Fischer 344 rats: comparison with human data and consequences for risk assessment. *Sci Total Environ*, 2020, 1263-1278.

[16] L. Menegoz Ursol, C. Conchione, D. Peroni, A. Carretta, S. Moret. A study on the impact of harvesting operations on the mineral oil contamination of olive oils. *Food Chem*, 2023, 406,135032.

[17] H.P. Neukom, K. Grob, M. Biedermann, A. Noti. Food contamination by C20-C50 mineral paraffins from the atmosphere. *Atmos Environ.*, 2002, 36(30), 4839-4847.

CAPITOLO 6

Analisi della contaminazione da ftalati in oli vegetali mediante gascromatografia bidimensionale *comprehensive*

6.1 Introduzione

La diffusione globale della plastica come contenitore per alimenti, prodotti cosmetici e sanitari ha reso necessario il ricorso ad additivi chimici necessari per aumentarne malleabilità, lavorabilità, durata e resistenza nel tempo [1]. Tra questi, gli esteri dell'acido ftalico (PAE), comunemente noti come ftalati, sono ampiamente impiegati. Per quanto riguarda gli aspetti tossicologici, secondo quanto già riportato nel Capitolo 3, varie indagini hanno suggerito che gli ftalati, dopo la trasformazione in metaboliti primari e secondari, agirebbero come composti che alterano il sistema endocrino, essendo in grado di modulare negativamente le funzioni e le vie ormonali [2,3]. Inoltre, sono stati ampiamente correlati a diverse forme di cancro [4,5].

Dal momento che il contenuto di ftalati negli alimenti è generalmente basso e le interferenze derivanti dalla matrice analizzata sono difficili da eliminare, spesso si rende necessario fare ricorso a fasi di estrazione del campione e successiva purificazione degli estratti per la corretta separazione e quantificazione di questi contaminanti [7]. Le tecniche di estrazione con solventi sono state gli approcci più comunemente utilizzati, seguiti principalmente da una determinazione mediante GC-MS. Gli approcci di preparazione del campione hanno incluso la convenzionale estrazione liquido-liquido (LLE), utilizzata con o senza fasi di purificazione aggiuntive [8,9], il protocollo QuEChERS (quick, easy, cheap, effective, rugged and safe) inizialmente utilizzato per l'estrazione di pesticidi dagli alimenti [10] ma applicato con successo anche per l'estrazione di 23 ftalati da gelatina d'uva, condimento in polvere, pasta all'uovo e salsa di pompelmo [11]. Sebbene le procedure LLE e QuEChERS forniscano una buona efficienza di estrazione ed un'efficace purificazione degli estratti, richiedono un elevato consumo di solventi. Tale problema può essere risolto utilizzando tecniche di estrazione miniaturizzate come la microestrazione in fase liquida (LPME) caratterizzata dall'uso di una bassa quantità di un solvente immiscibile con acqua impiegato, come fase accettore, per l'estrazione di analiti da pochi mL di una fase acquosa donatrice [12].

Questa sezione è stata tradotta e adattata dalla seguente pubblicazione: A. Arena, M. Zoccali, L. Mondello, P.Q. Tranchida. Direct analysis of phthalate esters in vegetable oils by means of comprehensive two-dimensional gas chromatography combined with triple quadrupole mass spectrometry. *Food Chemistry*, 2022, 396, 133721. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.133721>.

Nel 2003, Psillakis e Kalogerakis svilupparono il metodo *hollow-fibre* LPME, combinato all'analisi GC, per la determinazione di ftalati in campioni di acqua [13]. In alternativa, sono state utilizzate tecniche di estrazione basate sull'impiego di materiali adsorbenti, come l'estrazione in fase solida (SPE) e la microestrazione in fase solida (SPME) [14,15]. Nel 2016 Zhou *et al.* svilupparono un metodo multi-classe per la determinazione di diversi inquinanti ambientali, in particolare 23 idrocarburi policiclici aromatici, 17 ftalati e 3 alchilfenoli, negli oli vegetali commestibili [16]. I campioni erano estratti con acetonitrile saturo di esano e, previa concentrazione, gli estratti erano analizzati mediante GC-MS/MS. Considerando solo gli ftalati, i limiti di rilevamento (LoD) erano compresi tra 0,1 e 4,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Più recentemente, Pereira e collaboratori indagarono la presenza di ftalati in sedici campioni di olio d'oliva provenienti dal mercato europeo [17]. Una LLE è stata seguita dall'analisi GC-MS per la loro determinazione. Gli analiti DEHP e DiNP sono stati rilevati in tutti i campioni con concentrazioni massime rispettivamente di 7,52 e 6,29 mg kg^{-1} . Nel 2020, Kiralan *et al.* studiarono gli oli di oliva e di sansa provenienti dal mercato turco, anche in questo caso eseguendo una LLE prima dell'analisi GC-MS [18]. Il composto DEHP era l'analita più abbondante in tutti i campioni di olio d'oliva, con valori compresi tra il limite inferiore di quantificazione (LoQ-0,23 mg kg^{-1}) e 602 mg kg^{-1} .

Dal momento che al giorno d'oggi le tendenze più comuni della *Green analytical chemistry* includono semplicità e rapidità dei metodi analitici assieme alla riduzione del consumo di solventi organici [19], lo scopo del presente studio è stato lo sviluppo di un metodo diretto, che non prevedesse alcuna fase di preparazione del campione (a parte la diluizione), per l'analisi di nove ftalati in oli vegetali mediante gascromatografia bidimensionale *comprehensive* a modulazione criogenica (CM-GC×GC) accoppiata alla spettrometria di massa a triplo quadrupolo (QqQMS). È interessante notare che un approccio privo di preparazione del campione venne proposto da Fiselier e collaboratori nel 2005, per l'analisi di sostanze migrate dai materiali di imballaggio agli alimenti, prevedendo l'impiego di un set-up strumentale piuttosto sofisticato [20].

6.2 Parte sperimentale

6.2.1 Reagenti

Il solvente esano (grado $\geq 97\%$) è stato acquisito da Merck Life Science (Merck KGaA, Darmstadt, Germania). Gli standard dimetilftalato ($\geq 99\%$, DMP), dietilftalato (99,5%, DEP), dipropilftalato (standard analitico, DPP), dibutilftalato (99%, DBP), benzilbutilftalato ($>98\%$, BBP), diciolesilftalato (99%, DCHP), dietilesilftalato (99%, DEHP), diisonilftalato (99%, DiNP), diisodecilftalato ($\geq 99\%$, DiDP), 3,5-di-terz-4-butildrossitoluene (BHT), sono stati acquistati da Merck Life Science. Per ogni standard è stata preparata una soluzione madre (1000 mg L^{-1}) in esano, conservata poi a 4°C . Il BHT, anch'esso preparato a 1000 mg L^{-1} e conservato a 4°C , è stato utilizzato come standard interno (IS).

Data l'assenza in commercio di un olio certificato contenente ftalati, per la misurazione delle figure di merito è stato impiegato un campione di olio extravergine di oliva (EVOO) senza ftalati rilevati. L'esano impiegato per la preparazione dei campioni è stato analizzato per accertare l'assenza di ftalati in esso contenuti. Anche il sistema analitico è stato controllato quotidianamente (eseguendo un'analisi senza iniezione) per monitorare l'assenza di una contaminazione residua delle precedenti analisi. Tutta la vetreria è stata accuratamente lavata, risciacquata con esano e mantenuta a 100°C prima dell'uso.

6.2.2 Preparazione del campione

Sono stati analizzati un totale di ventisette oli vegetali di diversa tipologia, nello specifico venti campioni di EVOO forniti dal progetto AGER2-Rif 2016-0169, cinque oli di mais, uno di girasole ed un olio di arachidi, questi ultimi tutti acquistati da un supermercato locale a Messina (Italia). Gli EVOO erano contenuti in bottiglie di vetro mentre il resto dei campioni era in bottiglie di plastica.

Dieci mg di olio sono stati pesati in un matraccio da 1 mL, sono stati aggiunti $10 \mu\text{L}$ di IS (1 mg L^{-1}) ed entrambi sono stati diluiti fino a un volume finale di 1 mL con esano. La calibrazione del metodo è stata misurata mediante costruzione di rette in matrice ai seguenti livelli di concentrazione: 0,3, 1,0, 2,0, 4,0, 8,0 mg kg^{-1} per DMP, DEP, DPP e DCHP; 0,1, 0,3, 0,6, 1,2, 2,4 mg kg^{-1} per DBP; 10, 30, 60, 120, 240 mg kg^{-1} per BBP; 0,5, 1,5, 3,0, 6,0, 12 mg kg^{-1} per DEHP; 3,0, 9,0, 18, 36, 72 mg kg^{-1} per DiNP e DiDP.

6.2.3 Strumentazione analitica

Le analisi sono state effettuate utilizzando un sistema CM GC×GC-QqQMS costituito da due gascromatografi GC-2010 (Shimadzu Corporation, Kyoto, Giappone) ed uno spettrometro di massa a triplo quadrupolo TQ8040 (Shimadzu). Il primo forno GC era dotato di un autocampionatore (AOC-20i) e di un iniettore *programmed temperature vaporizer* (PTV) Optic 4 (GL Sciences, Eindhoven, Paesi Bassi). Il PTV è stato programmato con la seguente temperatura: da 30 °C a 300 °C a 5 °C s⁻¹. Il volume di iniezione era di 2 µL, in modalità *splitless* (3 min). La colonna di prima dimensione (¹D) era una SLB-5ms [(polimero di silfenilene, equivalente in polarità a poli(5% difenil/95% dimetilsilossano)] con dimensioni 10 m × 0,25 mm ID × 0,10 µm *d_f*. Per creare il loop del modulatore è stata utilizzata una colonna priva di fase stazionaria delle dimensioni di 1,0 m × 0,10 mm ID. La colonna di seconda dimensione (²D) era una SLB-35ms [(equivalente in polarità al poli(35% difenil/65% dimetilsilossano)] con dimensioni 1,5 m × 0,10 mm ID × 0,10 µm *d_f*. Le colonne sono state acquisite da Merck Life Science. I collegamenti tra le colonne ¹D e ²D e il loop del modulatore sono stati realizzati utilizzando due *µ-union* SilTite (Trajan, Ringwood, Vittoria, Australia). È stato utilizzato un modulatore *dual stage* (su licenza di Zoex Corporation, Houston, TX, USA), con un tempo di modulazione di 4 s. La durata e la temperatura del getto caldo erano rispettivamente di 250 ms e 300 °C. La temperatura di entrambi i forni GC è stata programmata come segue: da 80 (1 min) a 360 °C (8 min) a 10 °C min. Il gas carrier, l'elio, è stato fornito ad una pressione iniziale di 422 kPa (velocità lineare media costante).

Nel QqQMS, come modalità di ionizzazione è stata utilizzata quella elettronica (70 eV). Le temperature dell'interfaccia e della sorgente ionizzante erano rispettivamente di 280 e 250 °C. Il gas di collisione era argon ad una pressione di 200 kPa. Le analisi sono state acquisite mediante la modalità *multiple reaction monitoring* (MRM). Le transizioni *quantifier* e *qualifier* e le rispettive energie di collisione sono riportate in Tabella 6.1. Tutti i dati sono stati raccolti dal software GCMS Solution v.4.45 (Shimadzu), mentre il software ChromSquare ver. 2.4 (Shimadzu) è stato utilizzato per l'elaborazione dei dati GC×GC.

Tabella 6.1. Transizioni MRM ed energie di collisione (CE, eV), insieme alle relative finestre di eluizione.

Analita	Finestra di eluizione (min)	Transizione <i>quantifier</i> (CE)	Transizione <i>qualifier</i> (CE)
DMP	4,8-5,7	163>77 (20)	163>133 (10)
BHT (IS)	5,5-5,8	205>177 (10)	205>145 (10)
DEP	6,3-7,5	149>65 (25)	149>93 (15)
DPP	8,2-9,2	149>65 (25)	149>93 (20)
DBP	10-10,7	149>65 (25)	149>93 (20)
BBP	13,3-14,3	149>65(20)	149>93 (15)
DCHP	14,5-15,1	149>65 (20)	149>93 (20)
DEHP	15,1-15,6	149>65 (20)	149>93 (20)
DiNP	16-19,5	293>149 (5)	149>65 (20)
DiDP	16-19,5	307>149 (5)	149>65 (20)

6.3 Risultati e discussioni

6.3.1 Ottimizzazione delle condizioni analitiche

L'obiettivo della presente ricerca è stato lo sviluppo di un metodo analitico per la determinazione di nove ftalati target in oli vegetali, senza alcun pretrattamento del campione (a parte la diluizione). Dal momento che gli ftalati sono contaminanti ubiquitari, l'assenza di fasi di pretrattamento riduce il rischio di contaminazione crociata e migliora precisione del metodo.

Come riportato in precedenza, un approccio simile è stato sviluppato nel 2005 da Fiselier e collaboratori [20]. Un iniettore *internal thermal desorption* è stato utilizzato per l'analisi di sostanze migrate dagli imballaggi in oli commestibili. In breve, un campione diluito, contenente non più del 20% di olio, era iniettato in un iniettore *split/splitless* convenzionale riscaldato ad una temperatura di 260 °C in modo da volatilizzare tutti gli analiti di interesse a discapito dei componenti altobollenti della matrice (principalmente trigliceridi). Tuttavia, parte di essi riusciva comunque ad entrare in colonna e, pertanto, doveva essere rimossa. A tale scopo, la configurazione strumentale prevedeva l'installazione di una pre-colonna rivestita di fase stazionaria che, alla fine di ogni analisi, veniva lavata dal gas *carrier* in direzione contraria al

flusso. Il sistema era piuttosto complesso: la pre-colonna, tramite due connessioni a Y, era collegata alla colonna analitica, ad una valvola per consentire l'uscita del vapore di solvente e ad una fornitura aggiuntiva di gas per il lavaggio. Anche il *liner* richiedeva una pulizia quotidiana.

Nella presente ricerca, a parte la ridotta complessità strumentale, la quantità di olio iniettata è inferiore (20 µg). La parte iniziale del lavoro ha riguardato l'ottimizzazione della procedura di iniezione che rappresenta una fase di fondamentale importanza del processo cromatografico e deve garantire una corretta volatilizzazione degli analiti e il loro trasferimento alla colonna analitica. Con l'obiettivo di evitare o ridurre la discriminazione degli analiti, è stata impiegata la modalità di iniezione *splitless* a freddo mantenendo l'iniettore 30 °C durante l'iniezione. Inoltre, al fine di evitare il rischio di *carryover* degli analiti altobollenti coestratti dalla matrice, come i trigliceridi, l'iniettore era equipaggiato con un *liner* privo di materiale di impaccamento che potrebbe causare degradazione degli analiti come anche una loro forte o irreversibile ritenzione [21,22,23].

Per quanto riguarda la combinazione di colonne, in ¹D è stata installata una colonna con un film sottile di fase stazionaria (0,10 µm), requisito indispensabile per consentire l'eluizione degli analiti ad elevato peso molecolare coestratti (monitorata operando nella modalità di acquisizione a scansione) mediante una temperatura finale del forno GC di 360 °C per 8 min. La modulazione è stata eseguita da 5,0 a 19,5 min. La temperatura iniziale del forno GC era di 80 °C dal momento che l'analita maggiormente volatile (DMP) eluiva a circa 125 °C, mentre quello più ritenuto (DiDP) eluiva a circa 250 °C. Come è noto, in GC monodimensionale i composti DiNP e DiDP formano gobbe di composti coeluenti, generati dalla presenza di molti isomeri [14]. Come è possibile osservare in Figura 6.1, il cromatogramma GC×GC presenta un basso grado di coeluizione di questi composti che risultano, inoltre, separati anche spettralmente grazie alle transizioni *quantifier* impiegate.

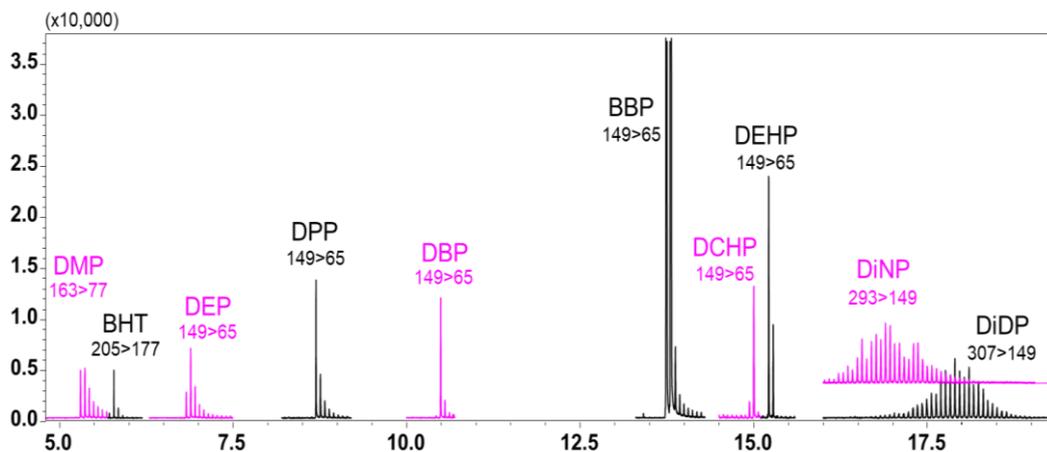


Figura 6.1. Cromatogramma MRM di un campione fortificato di EVOO.

5.3.2 Figure di merito

Tutte le figure di merito di seguito discusse sono elencate nelle Tabelle 6.2, 6.3 e 6.4. Per la valutazione della linearità all'interno dell'intervallo di calibrazione, sono state costruite curve in matrice a cinque punti ($n = 3$, ad eccezione del livello più basso dove $n = 6$) utilizzando un campione fortificato di EVOO precedentemente analizzato e privo di ftalati endogeni. I punti di calibrazione sono stati scelti in relazione al Regolamento della Commissione Europea (UE 10/2011) che, tuttavia, fa riferimento alla migrazione degli ftalati dai materiali a contatto con gli alimenti [6]. Il metodo dei minimi quadrati è stato applicato per stimare i coefficienti di regressione.

I valori di LoD e LoQ sono stati calcolati moltiplicando la deviazione standard dell'area dell'analita (normalizzata per lo standard interno) relativa all'EVOO fortificato al livello di concentrazione più basso, rispettivamente 3 e 10 volte, e quindi dividendo il risultato per la pendenza della curva di calibrazione. I valori di LoD variavano da $0,02 \text{ mg kg}^{-1}$ per DMP e DBP, a $0,63 \text{ mg kg}^{-1}$ per DiNP, mentre i valori di LoQ variavano da $0,06$ a $2,10 \text{ mg kg}^{-1}$.

La precisione ($n = 3$) è stata misurata analizzando un campione di EVOO fortificato a due livelli: il livello di concentrazione più basso, corrispondente al limite di migrazione specifica di ciascun ftalato, e il livello più elevato corrispondente al punto più alto della curva di calibrazione. La precisione *intra-day* ($n = 6$) ed *inter-day* è stata calcolata analizzando un campione fortificato di EVOO al livello di concentrazione più basso. Per precisione *inter-day*, sono state eseguite nove misurazioni indipendenti in tre giorni diversi (tre replicate al giorno).

Tabella 6.2. Figure di merito (parziali) del metodo proposto.

Analita	Intervallo di calibrazione (mg kg ⁻¹)	Equazione di calibrazione	R ²	LoD (mg kg ⁻¹)	LoQ (mg kg ⁻¹)
DMP	0,3-8,0	$y = 227,38x + 0,1566$	0,9906	0,02	0,06
DEP	0,3-8,0	$y = 191,52x + 0,2392$	0,9924	0,09	0,30
DPP	0,3-8,0	$y = 294,3x - 0,1369$	0,9984	0,04	0,15
DBP	0,1-2,4	$y = 455,09x + 0,6082$	0,9978	0,02	0,06
BBP	10,0-240,0	$y = 215,18x - 3,5347$	0,9974	0,60	1,99
DCHP	0,3-8,0	$y = 247,73x - 0,0023$	0,9983	0,03	0,09
DEHP	0,5-12,0	$y = 239,11x + 0,5825$	0,9978	0,05	0,16
DiNP	3,0-7,2	$y = 50,593x + 0,7396$	0,9936	0,63	2,10
DiDP	3,0-7,2	$y = 72,211x - 0,4247$	0,9959	0,20	0,68

I valori di precisione *intra-day* variavano dal 3% per il BBP al 5% per il DiNP, mentre quelli di *inter-day* variavano dal 6% per il DEP al 9% per il DDP.

I valori di accuratezza sono stati riportati come deviazioni di errore percentuale tra i valori sperimentali e quelli attesi. Considerando il livello inferiore, i valori ottenuti erano compresi tra il 9,2% per il DEP e l'8,6% per il DPP, mentre per il livello superiore erano compresi tra il 7,5% per il DiDP e il 10,4% per il DPP.

Tabella 6.3. Figure di merito del metodo proposto (continuazione).

Analita	Accuratezza basso livello (%)	Accuratezza alto livello (%)	Precisione <i>intra-day</i> (CV)	Precisione <i>inter-day</i> (CV)
DMP	-3,9	-6,4	3	8
DEP	-9,2	-6,9	4	6
DPP	8,6	10,4	4	9
DBP	-2,8	-2,3	5	7
BBP	-5,8	-5,2	3	7
DCHP	-1,4	-2,6	3	7
DEHP	-0,5	-3,0	3	8
DiNP	-2,1	-2,4	5	8
DiDP	-1,6	-7,5	2	7

L'effetto matrice è stato calcolato agli stessi livelli dell'accuratezza per un campione di EVOO ed un olio di semi di mais. I valori sono stati calcolati confrontando la risposta di ciascun analita in soluzioni di solo solvente con le soluzioni in matrice. I valori ottenuti per EVOO e olio di mais, riportati in Tabella 4, sono in accettabile accordo tra loro, con uno scostamento massimo del 16% al livello superiore (valore minimo 4%; valore medio 9%), e una differenza massima del 15% al livello inferiore (valore minimo 1%; valore medio 6%). Sulla base dei risultati ottenuti, si può concludere che le rette di calibrazione in matrice costruite su un campione di EVOO possono essere utilizzate anche per la quantificazione degli ftalati negli oli di semi.

Tabella 6.4. Percentuali di effetto matrice (%ME) calcolate a due livelli di concentrazione per EVOO e olio di mais.

Analita	%ME basso livello		%ME alto livello	
	EVOO	Olio di Mais	EVOO	Olio di Mais
DMP	17	20	16	12
DEP	44	41	46	35
DPP	72	78	68	73
DBP	25	19	30	21
BBP	7	1	3	-4
DCHP	34	23	28	17
DEHP	19	20	18	13
DiNP	60	45	51	35
DiDP	55	50	54	42

6.3.3 Analisi di campioni commerciali

Il metodo GC×GC-QqQMS è stato applicato all'analisi di 27 oli vegetali, in particolare venti campioni di EVOO, cinque oli di mais, uno di girasole e uno di arachidi. I contaminanti target sono stati quantificati in nove campioni, riportati in Tabella 6.5, con un contributo principale fornito da DEHP, DiNP e DiDP, a conferma della loro ampia diffusione. In accordo con altri studi presenti in letteratura, è interessante notare che gli ftalati non sono stati rilevati nei campioni contenuti in bottiglie di plastica, ad eccezione dell'olio di arachidi dove il DEHP è stato quantificato ad un livello di 0,23

mg kg⁻¹. D'altra parte, i campioni EVOO, tutti contenuti in bottiglie di vetro con tappo salvagoccia in plastica, erano i più contaminati [14,17,18].

Tabella 6.5. Ftalati (mg kg⁻¹) quantificati nei campioni analizzati (il valore riportato rappresenta la media di 3 replicate).

Campione		DPP	DEHP	DiNP	DiDP
5	EVOO	0,34	< LoQ	< LoD	< LoD
6	EVOO	< LoD	0,60	6,50	8,00
7	EVOO	< LoD	0,31	7,60	< LoD
8	EVOO	< LoD	< LoQ	2,40	< LoD
9	EVOO	< LoD	< LoQ	< LoD	< LoD
10	EVOO	< LoD	0,22	< LoD	< LoD
11	EVOO	< LoD	0,24	< LoD	< LoD
12	EVOO	< LoD	0,25	< LoD	< LoD
13	Mais	< LoD	< LoQ	< LoD	< LoD
14	Arachidi	< LoD	0,23	< LoD	< LoD
23	EVOO	1,29	< LoD	< LoQ	< LoD

Il campione maggiormente contaminato è riportato in Figura 6.2. In questo caso, è stata quantificata una concentrazione totale di ftalati pari a 15,10 mg kg⁻¹ con il DiDP il più abbondante (8 mg kg⁻¹). Pertanto, considerando che la somma di DiNP e DiDP era pari a 14,50 mg kg⁻¹, il livello di contaminazione in questo campione superava il limite di migrazione specifica fissato a 9 mg kg⁻¹. Come è possibile osservare, l'ortogonalità del metodo GC×GC, fornita dai due diversi meccanismi di separazione, ha consentito la separazione cromatografica di DiNP e DiDP.

6.3.4 Valutazione della greeness

L'approccio analitico *Eco-Scale* proposto da Gałuszka *et al.* nel 2012 [24], è stato impiegato per la valutazione del livello di *greeness* della procedura sviluppata. In breve, l'approccio è basato sull'assegnazione di punti di penalità (PP) ai parametri di un processo analitico che non sono in accordo con un'analisi *green*. Ad un processo interamente *green* viene assegnato un valore massimo di 100, mentre 0 è assegnato a un processo totalmente non ecologico.

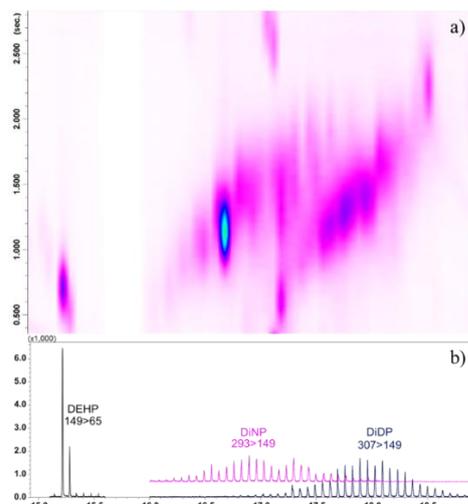


Figura 6.2. Cromatogramma MRM del campione 6. A) espansione del plot bidimensionale; b) corrispondente espansione del cromatogramma nativo.

In tal senso, al metodo analitico qui presentato sono stati assegnati i seguenti PP:

1. Reagente: esano, quantità < 10 mL, grave pericolosità: totale PP 8.
2. Energia: > 1,5 kWh per campione. Il tempo di esecuzione totale per ciascuna analisi è 37 min, tuttavia, il consumo della strumentazione GC×GC-QqQMS impiegata è più alto di un normale GC-MS, quindi sono stati assegnati 2 PP.
3. Rischio professionale: totale PP 0.
4. Rifiuti: <1 ml: totale PP 1.

Con un totale di 11 punti di penalità, il punteggio totale analitico secondo *Eco-Scale* risulta 89 che può essere classificato come “eccellente”.

6.4 Conclusioni

Il metodo presentato in questo studio si inserisce perfettamente nel contesto delle recenti tendenze incentrate sullo sviluppo di metodi analitici sostenibili in quanto non ha comportato alcuna fase di preparazione del campione (a parte la diluizione dell'olio) ed era caratterizzato da semplicità, limitato consumo di solventi organici (<1 mL di esano). Inoltre, la maggiore sensibilità della GC×GC a modulazione criogenica e la maggiore specificità della QqQMS hanno consentito la determinazione degli analiti target senza fare ricorso a fasi di *clean-up* o pre-concentrazione degli estratti. Complessivamente, a seguito della validazione del metodo, 27 sono stati i campioni di oli vegetali sottoposti ad analisi e 9 di questi (8 EVOO e un olio di arachidi) sono risultati contaminati dagli analiti DPP, DEHP, DiNP e DiDP.

Riferimenti Bibliografici

- [1] Y. Zhang, J. Guo, J. Xue, C. Bai, Y. Guo, Y. Phthalate metabolites: Characterization, toxicities, global distribution, and exposure assessment. *Environ Pollut*, 2021, 291, 118106.
- [2] L. Caporossi, A. Alteri, G. Campo, E. Paci, G. Tranfo, S. Capanna, E. Papaleo, D. Pignini, P. Viganò, B. Papaleo. Cross sectional study on exposure to BPA and phthalates and semen parameters in men attending a fertility center. *Int J Env Res Pub He*, 2020, 17(2), 489.
- [3] De Hond, E., Tournaye, H., De Sutter, P., Ombelet, W., Baeyens, W., Covaci, A., B. Cox, T.S. Nawrot, N. van Larebeke, T. D’Hooghe. Human exposure to endocrine disrupting chemicals and fertility: A case control study in male subfertility patients. *Environ Int*, 2015, 84, 154-160.
- [4] M. Fiore, C.G. Oliveri, R. Caltabiano, A. Buffone, P. Zuccarello, L. Cormaci, M. Ferrante. Role of emerging environmental risk factors in thyroid cancer: A brief review. *Int J Env Res Pub He*, 2019, 16 (7), 1185.
- [5] M. Zhu, C. Huang, X. Ma, R. Wu, W. Zhu, X. Li, Z. Liang, F. Deng, J. Wu, S. Geng, C. Xie, C. Zhong. Phthalates promote prostate cancer cell proliferation through activation of ERK5 and p38. *Environ Toxicol Pharm*, 2018, 63, 29-33.
- [6] COMMISSION REGULATION (EU) No 10/2011 of 14 January 2011 on plastic materials and articles intended to come into contact with food. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32011R0010&from=IT>.
- [7] J. Yang, Y. Li, Y. Wang, J. Ruan, J. Zhang, C. Sun. Recent advances in analysis of phthalate esters in foods. *TrAC-Trends Anal Chem*, 2015, 72, 10-26.
- [8] M. He, C. Yang, R. Geng, X. Zhao, L. Hong, X. Piao, T. Chen, M. Quinto, D. Lia. Monitoring of phthalates in foodstuffs using gas purge microsyringe extraction coupled with GCMS. *Anal Chim Acta*, 2015, 879, 63-68.
- [9] J. Leitz, T. Kuballa, J. Rehm, D.W. Lachenmeie. Chemical analysis and risk assessment of diethyl phthalate in alcoholic beverages with special regard to unrecorded alcohol. *PLoS ONE*, 2019, 4(12), 8127.

- [10] M. Anastassiades, S.J. Lehotay, D. Stajnbaher, F.J. Schenck. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and dispersive solid-phase extraction for the determination of pesticide residues in produce. *J AOAC Int*, 2003, 86, 412-431.
- [11] D. Xu, X. Deng, E. Fang, X. Zheng, Y. Zhou, L. Lin, Z. Huang. Determination of 23 phthalic acid esters in food by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A*, 2014, 1324, 49-56.
- [12] M. Asensio-Ramos, L.M. Ravelo-Perez, M.A. Gonzalez-Curbelo, J. Hernandez-Borges, J. Liquid phase microextraction applications in food analysis. *J Chromatogr A*, 2011, 1218(42), 7415-7437.
- [13] E. Psillakis, N. Kalogerakis. Hollow-fibre liquid-phase microextraction of phthalate esters from water. *J Chromatogr A*, 2003, 999, 145-153.
- [14] L. Barp, G. Purcaro, F.A. Franchina, M. Zoccali, D. Sciarrone, P.Q. Tranchida, L. Mondello. Determination of phthalate esters in vegetable oils using direct immersion solid phase microextraction and fast gas chromatography coupled with triple quadrupole mass spectrometry. *Anal Chim Acta*, 2015, 887, 237-244.
- [15] G. Cinelli, P. Avino, I. Notardonato, A. Centola, M.V. Russo. Study of XAD-2 adsorbent for the enrichment of trace levels of phthalate esters in hydroalcoholic food beverages and analysis by gas chromatography coupled with flame ionization and ion-trap mass spectrometry detectors. *Food Chem*, 2014, 146, 181-187.
- [16] R.Z. Zhou, J. Jiang, T. Mao, Y.S. Zhao, Y. Lu, Y. Multiresidue analysis of environmental pollutants in edible vegetable oils by gas chromatography–tandem mass spectrometry. *Food Chem*, 2016, 207, 43.
- [17] J. Pereira, M. do Ceu Selbourne, F. Poças, F. Determination of phthalates in olive oil from European market. *Food Control*, 2019, 98, 54-60.
- [18] S.S Kiralan, I. Toptanci, T.O. Abacigilc, M.F. Ramadan. Phthalates levels in olive oils and olive pomace oils marketed in Turkey. *Food Addit Contam A*, 2020, 37, 1332-1338.

- [19] P.T Anastas, J.C Warner. Green chemistry: Theory and practice. 1998, New York: Oxford University Press Inc.
- [20] K. Fiselier, M. Biedermann, K. Grob. Injector-internal thermal desorption from edible oils. Part 2: Chromatographic optimization for the analysis of migrants from food packaging material. *J Sep Sci*, 2005, 28, 2144-2152.
- [21] K. Grob. On-column injection in capillary gas chromatography: basic technique, retention gaps, solvent effects. 1998, 2nd Edition. ISBN 978-3-527-29701-6. Hardcover, Wiley-VCH.
- [22] E. Hoh, K. Mastovska. Large volume injection techniques in capillary gas chromatography. *J Chromatogr A*, 2008, 1186, 2-15.
- [23] M. Piparo, L. Flamant, G. Jousset, P. Cardinael, P. Giusti. Careful investigations of PTV injection parameters for the analysis of vacuum gas oil by hightemperature comprehensive GC×GC. *Energy Fuels*, 2020, 34, 12010-12017.
- [24] A. Gałuszka, P. Konieczka, Z.D. Migaszewski, J. Namiesnik. Analytical Eco-Scale for assessing the greenness of analytical procedures. *TrAC-Trends Anal Chemistry*, 2012, 37, 61-72.

CAPITOLO 7

Analisi della contaminazione da pesticidi in oli vegetali mediante gascromatografia bidimensionale *comprehensive*

I seguenti paragrafi riportano le pubblicazioni scientifiche relative all'analisi della contaminazione da pesticidi in matrici grasse, nello specifico oli extravergini di oliva e oli di semi di canapa, entrambi dalle note proprietà benefiche per la salute. Le analisi sono state effettuate mediante GC×GC accoppiata a spettrometria di massa a triplo quadrupolo.

7.1 Determinazione di residui di pesticidi in oli extravergine di oliva.

Il presente studio riporta lo sviluppo di un metodo analitico basato su una singola fase di preparazione del campione (estrazione liquido-liquido impiegando 500 µL di acetonitrile, senza ulteriori processi di purificazione o concentrazione) seguita da analisi GC×GC a modulazione criogenica accoppiata alla spettrometria di massa a triplo quadrupolo per la determinazione di settanta pesticidi in olio extravergine di oliva, sfruttando la maggiore specificità e sensibilità di questa tecnica. I limiti di quantificazione ottenuti erano sempre al di sotto dei limiti massimi residuali previsti dalla legislazione europea. La precisione *intra-day* era compresa tra 0,3 e 4,9%, mentre quella *inter-day* era compresa tra 1,6 e 6,1%. Il confronto tra le analisi pre- e post-estrazione ha mostrato dei valori di *recovery* compresi tra il 14 e il 120%. L'accuratezza, misurata sia nella fase iniziale del lavoro che dopo 3 mesi, era compresa tra il 79 ed il 121%. Infine, si è osservato un effetto matrice sempre positivo, tra il 16 e il 197%.

7.1.1 Introduzione

La GC×GC rappresenta una tecnica ben consolidata sempre più utilizzata per la caratterizzazione di campioni complessi e per l'analisi di analiti in tracce [1,2] tra cui i residui di pesticidi negli alimenti [3]. È risaputo che, rispetto alla GC monodimensionale, la GC×GC a modulazione criogenica (CM) fornisce un notevole miglioramento dei rapporti segnale/rumore (*s/n*) degli analiti [4,5].

Questa sezione è stata tradotta e adattata dalla seguente pubblicazione: A. Arena, M. Zoccali, L. Mondello, P.Q. Tranchida. A method for the determination of 70 pesticides in extra virgin olive oil based on a limited-volume solvent extraction step prior to comprehensive two-dimensional gas chromatography-tandem mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2023, 415, 2459-2469. <https://doi.org/10.1007/s00216-022-04494-6>.

Parallelamente all'evoluzione della tecnica, numerosi sviluppi hanno interessato la spettrometria di massa e, in particolare, la spettrometria di massa a triplo quadrupolo (QqQMS), caratterizzata da rapide frequenze di acquisizione, ha reso molto semplice l'accoppiamento alla GC×GC. Pertanto, le caratteristiche intrinseche della CM-GC×GC-QqQMS, quali maggiore potere di separazione, specificità, ed aumento dei valori *s/n*, possono consentire una riduzione delle fasi di preparazione del campione, in particolare quelle di *clean-up* e concentrazione, rientrando tra gli obiettivi della *Green analytical chemistry* [6].

Secondo l'Organizzazione per l'alimentazione e l'agricoltura delle Nazioni Unite (FAO), nel 2019 la produzione mondiale di olio extravergine d'oliva (EVOO) ha raggiunto i 3 milioni di tonnellate, con la Spagna come maggior produttore seguita da Italia e Grecia [7]. L'elevata produzione di questo alimento è anche indubbiamente legata alle sue innumerevoli proprietà benefiche per la salute umana, in accordo con quanto riportato nel Regolamento Europeo UE 432/2012 [8]. Appare pertanto evidente che una così grande importanza economica richieda il controllo degli ulivi, spesso soggetti a varie malattie causate da erbe infestanti, parassiti e funghi, mediante l'applicazione di pesticidi al fine di mantenere elevati livelli di produzione di olio. Ovviamente, l'uso di pesticidi è associato a possibili rischi per la salute umana [9]. A causa della crescente consapevolezza da parte dei consumatori sul tema della sicurezza alimentare e per via dell'uso sempre più diffuso di pesticidi, l'Unione europea (UE), ai sensi del Regolamento 396/2005, ha stabilito dei limiti massimi residuali (LMR) per i pesticidi in alimenti e mangimi [10]. Questi limiti, riportati nel database dell'UE [11] sono diversi per ogni pesticida e non tutti quelli usati in agricoltura sono regolamentati. In questo caso, deve essere assunto un LMR pari a $10 \mu\text{g kg}^{-1}$. Nel caso dell'olio di oliva, il suddetto regolamento stabilisce i LMR relativi al frutto (olive destinate alla produzione di olio) e non al prodotto finito. Pertanto, secondo quanto riportato dal Regolamento UE 1274/2011 [12], per ottenere i corrispondenti LMR per l'olio, per i pesticidi liposolubili deve essere applicato un fattore moltiplicativo pari a 5 che tiene conto di una resa media di produzione di olio del 20%.

I bassi LMR ed allo stesso tempo l'elevato numero di pesticidi da monitorare richiedono lo sviluppo di metodi analitici che siano sufficientemente sensibili e selettivi. Inoltre, se la GC viene utilizzata per l'analisi dei pesticidi in olio d'oliva, le

interferenze della matrice, rappresentate quasi esclusivamente da triacilgliceroli (TAG) con un valore medio del 98-99% [13], rendono necessario il ricorso a fasi di pretrattamento del campione (estrazione e *clean-up*) deputate alla loro riduzione o totale rimozione, dal momento che potrebbero comportare il deterioramento della strumentazione analitica.

Diversi sono stati gli approcci di preparazione del campione ad essere stati impiegati per la determinazione di pesticidi in oli vegetali. Nel 2007, Franchich *et al.* proposero un metodo per la determinazione di 100 pesticidi in olio di oliva mediante una fase di estrazione liquido-liquido (LLE) con una miscela di esano/acetonitrile, seguita da una purificazione mediante cromatografia a permeazione di gel prima di un'analisi GC-QqQMS [14]. I limiti di rilevamento (LoD) erano compresi tra 0,1 e 1,9 $\mu\text{g kg}^{-1}$, i valori di *recovery* erano tra il 70 e il 110% con una precisione sempre inferiore al 18%. Il metodo è stato utilizzato per l'analisi di otto campioni e solo il pesticida α -endosulfan è stato rilevato ad una concentrazione di 30 $\mu\text{g kg}^{-1}$. In un'altra indagine, per la determinazione di 213 pesticidi in oli vegetali è stata impiegata una estrazione con acetonitrile seguita da una fase di congelamento con ghiaccio secco e da una estrazione dispersiva in fase solida (*d*-SPE), prima dell'analisi GC-QqQMS [15]. Il metodo proposto ha fornito una *recovery* nell'intervallo 70-120% per il 76% dei pesticidi, una precisione $\leq 5\%$ per circa il 90% dei composti ed un limite di quantificazione (LoQ) sempre inferiore a 10 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Quattordici sono stati i pesticidi rilevati ed una concentrazione tra i 10 e i 156 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (sempre inferiore ai LMR).

Per aggirare la complessità della preparazione del campione, è stata anche proposta la microestrazione in fase solida dello spazio di testa (HS-SPME) per l'analisi di nove insetticidi e quattro loro metaboliti in campioni di olio d'oliva, utilizzando la GC accoppiata ad un rivelatore termoionico a fiamma [16]. Il metodo ha permesso il rilevamento degli analiti target a concentrazioni inferiori a 10 $\mu\text{g kg}^{-1}$. I valori di *recovery* erano tra l'80 e il 106%, con valori di precisione inferiori al 12% in tutti i casi, mentre i valori di LoQ erano compresi tra 16 e 30 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Il metodo è stato utilizzato per l'analisi di trenta campioni di olio vergine di oliva e sei sono stati i pesticidi rilevati, tutti a concentrazioni inferiori ai LMR europei.

Il metodo CM-GC×GC-QqQMS qui proposto, caratterizzato da una singola fase di preparazione del campione (LLE utilizzando 500 μL di acetonitrile) senza ulteriori

fasi di *clean-up* odì concentrazione, si è dimostrato idoneo per la determinazione di 70 pesticidi in EVOO.

7.1.2 Parte sperimentale

7.1.2.1 Reagenti

I pesticidi (elencati in Tabella 2) con purezza superiore al 98% sono stati acquisiti da Merck Life Science (Merck KGaA, Darmstadt, Germania). Acetonitrile (ACN, grado $\geq 99,9\%$) e triphenyl phosphate (TPP) sono stati acquistati da Merck Life Science. Una soluzione madre (100 mg L^{-1}) per ciascun pesticida è stata preparata in ACN e conservata in vial ambrate a $-20 \text{ }^\circ\text{C}$. Il TPP è stato impiegato come standard interno (IS): una soluzione madre (10000 mg L^{-1}) è stata preparata e conservata a $-20 \text{ }^\circ\text{C}$. Dal momento che un olio certificato contenente pesticidi non era disponibile in commercio, per la valutazione delle figure di merito è stato impiegato un campione di EVOO privo di pesticidi rilevati ($< \text{LoD}$).

7.1.2.2 Preparazione del campione

Venti campioni di EVOO sono stati ottenuti dai fornitori coinvolti nel progetto AGER2-Rif 2016-0169. La preparazione del campione è stata la seguente: 500 mg di olio sono stati pesati in una provetta eppendorf, sono stati aggiunti $2.5 \text{ } \mu\text{L}$ di soluzione IS (10 mg L^{-1}) e $500 \text{ } \mu\text{L}$ di ACN. La provetta è stata agitata manualmente per 1 minuto, quindi per 3 min a 3000 rpm utilizzando un agitatore IKA MS 3, e infine centrifugata per 5 min a 10000 rpm utilizzando una centrifuga Neya 16R (Neya Centrifuges, Carpi, Italia). La fase organica superiore è stata raccolta e direttamente analizzata.

7.1.2.3 Strumentazione analitica

Lo strumento era composto da due gascromatografi GC-2010 (Shimadzu Corporation, Kyoto, Giappone) ed uno spettrometro di massa a triplo quadrupolo TQ8040 (Shimadzu). Il primo forno GC era dotato di un campionatore automatico AOC-20i ed un iniettore *programmed temperature vaporizer* (PTV) Optic 4 (GL Sciences, Eindhoven, Paesi Bassi).

La colonna di prima dimensione (^1D) era una $10 \text{ m} \times 0,25 \text{ mm ID} \times 0,10 \text{ } \mu\text{m } d_f$ SLB-5ms [(polimero di silfenilene, equivalente in polarità a poli(5% difenil/95% dimetilsilossano)]. Per creare il loop del modulatore è stata utilizzata una colonna priva di fase stazionaria delle dimensioni $1,0 \text{ m} \times 0,10 \text{ mm ID}$. La colonna di seconda

dimensione (²D) era una SLB-35ms [(equivalente in polarità a poli(35% difenil/65% dimetilsilossano)] di dimensioni 1,5 m × 0,10 mm ID × 0,10 μm d_f. Tutte le colonne sono state acquisite da Merck Life Science. Le connessioni tra le colonne ¹D e ²D, e il loop del modulatore, sono state realizzate utilizzando due μ-union SilTite (Trajan, Ringwood, Victoria, Australia). È stato impiegato un tempo di modulazione di 4 s, con un getto caldo di temperatura e durata rispettivamente di 300 °C e 250 ms. La temperatura del forno è stata programmata da 80 °C (1 min) a 360 °C (8 min) a 10 °C min⁻¹. Il gas *carrier*, l'elio, è stato fornito ad una pressione iniziale di 422 kPa (velocità lineare media costante).

Nel QqQMS, come modalità di ionizzazione è stata utilizzata quella elettronica (70 eV). Le temperature dell'interfaccia e della sorgente ionizzante erano rispettivamente di 280 e 250 °C. Il gas di collisione era argon ad una pressione di 200 kPa. Le analisi sono state acquisite mediante la modalità *multiple reaction monitoring* (MRM). Le transizioni *quantifier* e *qualifier* e le rispettive energie di collisione sono riportate in Tabella 2. Tutti i dati sono stati raccolti dal software GCMS Solution v.4.45 (Shimadzu), mentre il software ChromSquare ver. 2.4 (Shimadzu) è stato utilizzato per l'elaborazione dei dati GC×GC.

7.1.3 Risultati e Discussioni

Nelle fasi iniziali di ottimizzazione del lavoro, si è tentato di estendere all'analisi dei pesticidi il metodo sviluppato dallo stesso gruppo di ricerca [17] (e presentato nel Capitolo 5 della presente tesi) basato sulla diluizione di oli vegetali seguita dalla diretta iniezione in un sistema CM-GC×GC-QqQMS per la determinazione di ftalati. In particolare, 10 mg di olio sono stati diluiti con esano fino a un volume finale di 1 mL ed è stata utilizzata la modalità di iniezione *splitless* a freddo mediante un iniettore PTV. È stato iniettato un volume di 2 μL, portando ad una quantità di olio in colonna pari a 20 μg. La riproduzione di tali condizioni sperimentali non ha consentito il raggiungimento di risultati soddisfacenti, soprattutto in relazione ai bassi LMR europei dei pesticidi. Inoltre, un maggiore volume di iniezione o una minore diluizione dell'olio avrebbero comportato delle quantità maggiori di TAG in colonna, un fattore certamente indesiderabile. Per tale ragione, è stata effettuata una singola LLE miniaturizzata utilizzando 500 mg di EVOO e 500 μL di ACN. Al termine della fase di centrifugazione, 4 μL della fase organica superiore di ACN sono stati direttamente

iniettati nel sistema PTV-GC×GC-QqQMS, con il raggiungimento di soddisfacenti valori di LoQ.

Il primo pesticida ad eluire è stato il mevinphos a circa 128 °C, mentre l'ultimo era il tetradifon a circa 231°C. Il cromatogramma GC×GC nativo, acquisito in modalità MRM, di un campione EVOO fortificato ad un livello di concentrazione di 400 µg kg⁻¹ è riportato in Figura 7.1.1.

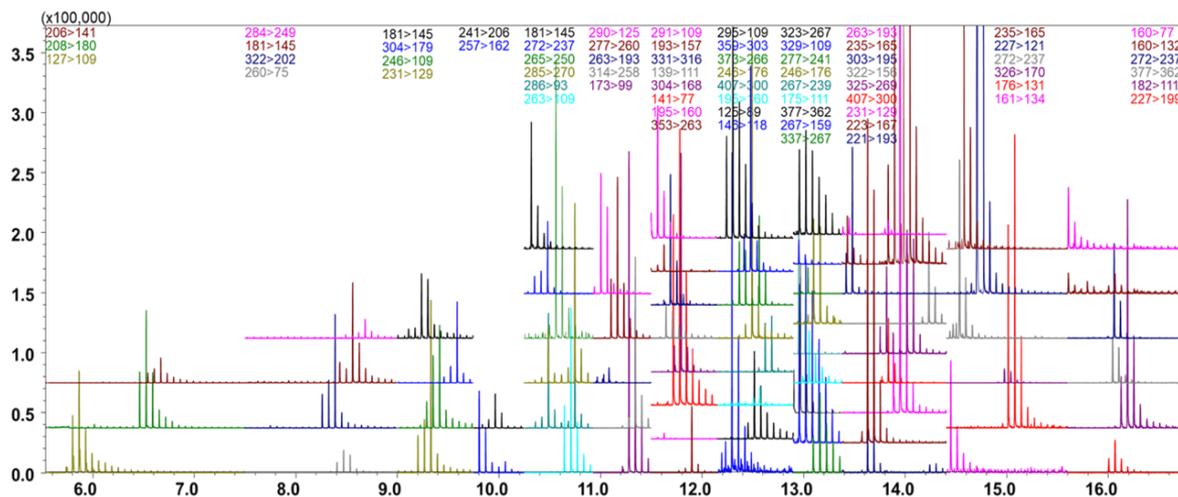


Figura 7.1.1. Cromatogramma GC×GC, acquisito in modalità MRM, di un campione EVOO fortificato ad un livello di 400 µg kg⁻¹.

Il database dei pesticidi dell'UE [11] riporta i LMR per un totale di 507 pesticidi correlati alle olive destinate per la produzione di olio. Considerando i 70 pesticidi analizzati, un LMR specifico è riportato per 45 di questi (33 sono liposolubili), mentre per i restanti 25 (indicati in Tabella 1), è stato considerato un limite predefinito di 10 µg kg⁻¹. Per i pesticidi liposolubili, i LMR UE sono stati moltiplicati per un fattore 5. Invece, per i 25 pesticidi non presenti nel database, il coefficiente di ripartizione ottanolo/acqua (log *k_{ow}*) è riportato in Tabella 7.1.1. Quando il log *k_{ow}* supera 3, è ragionevole presumere che, dopo la frangitura, il pesticida si concentri totalmente nell'olio. Tuttavia, un composto con un log *k_{ow}* relativamente elevato può essere considerato anche non liposolubile sulla base di altri elementi, come studi sul metabolismo o sull'alimentazione [18,19]. Per questo motivo, per i 25 pesticidi non presenti nel database non è stato applicato il fattore moltiplicativo e quindi è stato mantenuto il LMR predefinito di 10 µg kg⁻¹.

Tabella 7.1.1. Valori di log k_{ow} dei 25 pesticidi non riportati nel database EU.

Analita	log k_{ow}	Analita	log k_{ow}
Chloroneb	3,4	Tetrachlorvinphos	3,5
Sulfotep	3,9	Prothiofos	4,9
Fonofos	3,9	Iodofenphos	5,5
Endosulfan ether	4,0	Bromfenvinphos	3,2
Isazophos	3,9	2,4'-DDD	6,2
Isodrin	4,5	Sulprofos	4,9
Bromophos methyl	5,2	Chlorthiophos	6,0
4,4'-Dichlorobenzophenone	4,9	cis-Nonachlor	5,2
Pirimiphos ethyl	4,8	Ethylan	6,6
Fenson	3,7	Piperonyl butoxide	3,7
Bromfenvinfos-methyl	2,4	Mirex	5,3
2,4'-DDE	7,0	Leptophos	6,3
trans-Nonachlor	5,2	Tetrachlorvinphos	3,5

È ovvio che l'elevata specificità della modalità MRM non giustificherebbe la necessità della GC×GC. Tuttavia, l'impiego della modulazione criogenica con il conseguente effetto di compressione di banda, ha consentito una preparazione del campione ridotta e semplificata che, nonostante non prevedesse fasi di concentrazione degli estratti, ha consentito il raggiungimento dei LMR imposti dal regolamento EU. Inoltre, sfruttando la diversa selettività delle colonne GC×GC, risulta aumentata anche la possibilità di separare dagli analiti target dalle interferenze coestratte dalla matrice.

7.1.3.1 Figure di merito

Le figure di merito valutate sono state: linearità nell'intervallo di calibrazione, precisione *intra-day* ed *inter-day*, accuratezza a breve e lungo termine (dopo tre mesi di lavoro), *recovery* ed effetto matrice. I valori medi del rapporto *quantifier/qualifier* (derivato dall'analisi di composti standard) insieme ai tempi di ritenzione sono stati utilizzati per l'identificazione dei pesticidi.

Sono state costruite curve di calibrazione in matrice a sei punti ($n = 6$) analizzando un campione fortificato a vari livelli di concentrazione di EVOO (privo di pesticidi

rilevabili). Durante la validazione del metodo, tra le analisi in solvente e quelle in matrice non sono stati osservati spostamenti sostanziali dei tempi di ritenzione; tuttavia, le finestre di acquisizione MRM erano sufficientemente ampie. Gli intervalli di calibrazione, riportati in Tabella 7.1.2, sono stati scelti in relazione ai LMR presenti del database EU dei pesticidi. Le curve di calibrazione hanno mostrato un coefficiente di correlazione (R^2) nell'intervallo 0,9943-0,9996.

I valori di LoD e LoQ sono stati calcolati moltiplicando la deviazione standard dell'area dell'analita (normalizzata per lo standard interno) relativa all'EVOO fortificato al livello di concentrazione più basso, rispettivamente 3 e 10 volte, e quindi dividendo il risultato per la pendenza della curva di calibrazione. I valori LoD variavano da 0,09 $\mu\text{g kg}^{-1}$ per il pesticida phosalone a 4,59 $\mu\text{g kg}^{-1}$ per il chlorfenson, mentre i valori LoQ variavano da 0,31 a 15,31 $\mu\text{g kg}^{-1}$ per gli stessi pesticidi. Come è possibile osservare in Tabella 7.1.2, i valori LoQ erano sempre al di sotto dei LMR UE. Per soli otto pesticidi il punto più basso di calibrazione era uguale al LMR.

Tabella 7.1.2. Elenco dei pesticidi analizzati, insieme a transizioni MRM e rispettive energie di collisione (CE, eV), LMR europei ($\mu\text{g kg}^{-1}$), intervallo di calibrazione ($\mu\text{g kg}^{-1}$), LoDs and LoQs ($\mu\text{g kg}^{-1}$).

Analita	Quantifier (CE)	Qualifier (CE)	LMR	Intervallo di calibrazione	LoD	LoQ
Chloroneb ^a	206>191 (12)	206>141 (20)	10	5-400	0,70	2,34
Methacrifos	208>180 (8)	240>208 (4)	20	10-400	0,83	2,75
Mevinphos	127>109 (12)	192>127 (12)	10	5-400	0,19	0,62
Hexachlorobenzene ^b	284>249 (24)	284>214 (28)	50	20-400	4,37	14,57
Alfa BHC ^b	181>145 (16)	219>183 (8)	50	5-400	0,38	1,27
Sulfotep ^a	322>202 (10)	322>294 (4)	10	5-400	0,63	2,11
Phorate	260>75 (8)	231>129 (24)	20	10-400	1,44	4,80
Beta BHC ^b	181>145 (16)	219>183 (8)	50	10-400	0,39	1,30
Diazinon ^b	304>179 (10)	179>122 (24)	100	10-400	0,48	1,61
Fonofos ^a	246>109 (18)	246>137 (6)	10	5-400	0,16	0,53
Terbufos	231>129 (26)	231>175 (14)	10	5-400	0,44	1,45
Endosulfan ether ^a	241>206 (16)	239>204 (16)	10	10-400	0,97	3,25
Isazophos ^a	257>162 (8)	257>119 (18)	10	5-400	0,84	2,80
Delta BHC ^b	181>145 (16)	219>183 (8)	50	5-400	0,15	0,50
Heptachlor ^b	272>237 (20)	274>239 (16)	50	10-400	0,97	3,25
Tolclofos-methyl ^b	265>250 (14)	265>93 (24)	50	5-400	0,30	0,99
Fenchlorphos	285>270 (16)	287>272 (18)	10	5-400	0,36	1,21
Chlorpyrifos Methyl ^b	286>93 (22)	286>271 (14)	50	10-400	0,78	2,61
Methyl parathion	263>109 (14)	125>47 (12)	100	5-400	0,36	1,20

*Analisi della contaminazione da pesticidi in oli vegetali mediante gascromatografia
bidimensionale comprensive*

Pirimiphos methyl ^b	290>125 (22)	290>233 (12)	50	5-400	0,40	1,33
Fenitrothion	277>260 (6)	277>109 (14)	20	5-400	0,30	0,99
Aldrin ^b	263>193 (28)	263>191 (34)	50	20-400	0,71	2,36
Chlorpyrifos ^b	314>258 (14)	197>169 (14)	50	5-400	0,50	1,67
Malathion	173>99 (14)	173>127 (6)	20	5-400	0,26	0,86
Parathion ^b	291>109 (14)	291>137 (6)	250	10-400	1,36	4,53
Isodrin ^a	193>157 (20)	193>123 (26)	10	10-400	0,89	2,95
Bromophos methyl ^a	331>316 (14)	329>314 (18)	10	5-400	0,56	1,91
4,4'-dichlorobenzophenone ^a	139>111 (14)	139>75 (26)	10	10-400	2,27	7,56
Pirimiphos ethyl ^a	304>168 (12)	318>166 (12)	10	5-400	0,61	2,04
Fenson ^a	141>77 (16)	268>141 (6)	10	5-400	0,35	1,18
Endosulfan alfa ^b	195>160 (8)	195>125 (24)	250	20-400	4,04	13,47
Heptachlor epoxide ^b	353>263 (14)	355>265 (20)	50	20-400	3,01	10,02
Bromfenvinfos-methyl ^a	295>109 (16)	297>109 (16)	10	5-400	0,52	1,72
Bromophos ethyl ^b	359>303 (16)	303>285 (18)	100	5-400	0,25	0,84
trans-Chlordane ^b	373>266 (22)	373>264 (28)	100	10-400	0,38	1,25
cis-Chlordane ^b	373>266 (22)	373>264 (28)	100	10-400	0,60	2,01
2,4'-DDE ^a	246>176 (30)	248>176 (28)	10	5-400	1,32	4,39
trans-Nonachlor ^a	407>300 (24)	407>335 (16)	10	10-400	0,95	3,15
Endosulfan beta ^b	195>160 (8)	195>125 (24)	250	20-400	2,13	7,10
Chlorbenseide ^b	125>89 (16)	125>99 (18)	50	10-400	0,47	1,55
Quinalphos ^b	146>118 (10)	157>129 (14)	100	10-400	0,22	0,75
Chlorfenvinphos ^b	323>267 (16)	267>159 (18)	100	10-400	0,35	1,15
Tetrachlorvinphos ^a	329>109 (20)	331>109 (22)	10	10-400	1,04	3,47
Dieldrin ^b	277>241 (8)	263>193 (34)	50	20-400	4,38	14,59
4,4'-DDE ^b	246>176 (30)	318>249 (24)	50	5-400	0,41	1,38
Prothiofos ^a	267>239 (10)	309>239 (14)	10	5-400	0,58	1,93
Chlorfenson ^b	175>111 (12)	175>75 (28)	50	20-400	4,59	15,31
Iodofenphos ^a	377>362 (22)	377>332 (32)	10	5-400	0,49	1,63
Bromfenvinphos ^a	267>159 (14)	323>267 (12)	10	5-400	0,62	2,05
Profenofos ^b	337>267 (14)	339>269 (18)	100	10-400	0,49	1,63
Endrin ^b	263>193 (28)	263>191 (30)	50	20-400	2,99	9,97
2,4'-DDD ^a	235>165 (24)	237>165 (28)	10	5-400	0,95	3,18
4,4'-DDD ^b	235>165 (24)	237>165 (28)	50	5-400	0,69	2,31
2,4'-DDT ^b	235>165 (24)	237>165 (28)	50	5-400	0,48	1,61
Fenamiphos	303>195 (8)	288>260 (6)	50	10-400	0,32	1,05
Sulprofos ^a	322>156 (8)	156>108 (28)	10	5-400	0,66	2,21
Chlorthiophos ^a	325>269 (14)	269>205 (18)	10	5-400	0,23	0,75
cis-Nonachlor ^a	407>300 (24)	407>109 (22)	10	10-400	1,01	3,35
Ethion	231>129 (24)	153>97 (14)	10	5-400	0,43	1,43
Ethylan ^a	223>167 (14)	223>179 (22)	10	5-400	0,77	2,58
Pyrazophos ^b	221>193 (12)	221>177 (16)	100	20-400	0,99	3,32
4,4'-DDT ^b	235>165 (24)	237>165 (28)	50	5-400	0,86	2,85
2,4'-Methoxychlor ^b	227>121 (16)	121>91 (12)	50	5-400	0,21	0,72

Endosulfan sulfate ^b	272>237 (18)	387>253 (16)	250	5-400	0,79	2,62
Piperonyl butoxide ^a	176>131 (12)	176>117 (20)	10	5-400	0,37	1,23
Triazophos ^b	161>134 (8)	161>106 (14)	50	20-400	1,36	4,55
Mirex ^a	272>237 (18)	274>239 (18)	10	5-400	0,43	1,42
Leptophos ^a	377>362 (24)	375>360 (24)	10	10-400	1,17	3,89
Phosalone	182>111 (14)	182>138 (8)	20	10-400	0,09	0,31
Tetradifon	227>199 (16)	356>159 (18)	10	10-400	0,96	3,21

^a: pesticidi non presenti nel database europeo; ^b: pesticidi *fat-soluble*.

La precisione *intra-day* ($n = 6$) è stata calcolata analizzando un campione di EVOO fortificato a due livelli di concentrazione, rispettivamente 50 e 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$, con valori che variavano da 0,3 al 4,9% a 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (media = 2,1%) e da 0,6 a 3,8% a 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (media = 2,2%). La precisione *inter-day* ($n = 6$) è stata calcolata al solo livello di 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$, con valori compresi tra l'1,6 al 6,1% (media = 3,5%).

Gli esperimenti di *recovery* sono stati eseguiti a tre diversi livelli di concentrazione, quali 20, 50 e 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (Tabella 7.1.3). I valori ($n = 3$) sono stati ottenuti confrontando le aree normalizzate dei singoli analiti relative alle analisi dei campioni fortificati pre- e post-estrazione. Ad una concentrazione di 20 $\mu\text{g kg}^{-1}$, è stato misurato una *recovery* media del 70% con valori che variavano dal 15% (mirex) al 120% (triazophos). Per trentatré composti, è stata ottenuta una *recovery* compresa tra il 15 e il 69% mentre per trentasette pesticidi tra il 70 e 120%. Alla concentrazione di 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$, la *recovery* media era del 63%, in particolare dal 14% (mirex ed hexachlorobenzene) al 118% (malathion e tetrachlorvinfos). Una *recovery* compresa tra 14 e il 69% è stata ottenuta per trentanove composti, mentre per trentuno era tra il 70 e il 118%. Infine, al livello di 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$, il valore medio è stato del 66%, con valori dal 14 (mirex ed hexachlorobenzene) al 120% (mevinphos). Per quaranta composti, è stata ottenuta una *recovery* compresa tra il 14 e il 69% e tra il 70 e 120% per trenta analiti. In conclusione, i valori medi di *recovery* per i livelli di concentrazione di 20, 50 e 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$ erano rispettivamente del 70, 63 e 66%.

In accordo con la normativa SANTE/11312/2021 [20], valori medi di *recovery* che fuoriescono dell'intervallo ottimale del 70-120% possono comunque essere accettati purché caratterizzati da una precisione soddisfacente (con $\text{RSD} \leq 20\%$). Nel contesto della presente ricerca, i valori di RSD erano sempre inferiori al 3%. I risultati ottenuti confermano l'importanza di eseguire studi di linearità mediante calibrazione in matrice, al fine di compensare sia basse *recovery* che eventuali effetti matrice [21].

Inoltre, sebbene per dieci pesticidi i valori di *recovery* erano inferiori al 30%, è stato comunque possibile soddisfare i LMR richiesti dal Regolamento UE.

Tabella 7.1.3. Elenco dei pesticidi analizzati insieme a valori di precisione e percentuali di *recovery*.

Analita	Precisione <i>intra-day</i> 50 µg kg ⁻¹	Precisione <i>intra-day</i> 100 µg kg ⁻¹	Precisione <i>inter-day</i> 100 µg kg ⁻¹	Recovery 20 µg kg ⁻¹	Recovery 50 µg kg ⁻¹	Recovery 100 µg kg ⁻¹
Chloroneb	0,8	3,5	3,4	82	75	74
Methacrifos	1,1	2,3	4,0	114	110	109
Mevinphos	1,9	2,1	2,2	112	116	120
Hexachlorobenzene	3,2	2,2	4,1	16	14	14
Alfa BHC	2,0	1,7	1,9	70	63	65
Sulfotep	2,2	2,0	3,6	119	113	115
Phorate	0,9	2,7	3,2	88	79	81
Beta BHC	0,7	2,4	2,1	70	63	67
Diazinon	1,7	2,6	3,6	87	78	81
Fonofos	1,4	3,3	2,8	79	71	73
Terbufos	1,9	1,7	2,3	80	72	76
Endosulfan ether	1,6	2,9	4,1	59	52	56
Isazophos	0,9	2,5	3,5	119	109	112
Delta BHC	0,4	2,0	1,9	77	81	68
Heptachlor	2,1	1,3	3,9	35	32	32
Tolclofos-methyl	0,3	2,4	4,2	84	74	82
Fenclorphos	3,9	2,0	3,3	63	54	59
Chlorpyrifos Methyl	1,2	1,3	3,7	76	76	73
Methyl parathion	2,3	2,0	2,7	117	107	117
Pirimiphos methyl	1,3	3,5	2,6	89	78	83
Fenitrothion	1,6	2,6	2,5	119	104	112
Aldrin	4,0	2,4	2,9	20	16	17
Chlorpyrifos	1,8	2,8	2,1	72	64	63
Malathion	0,7	2,5	2,3	119	118	117
Parathion	3,1	2,7	5,3	119	101	117
Isodrin	3,5	2,9	5,7	23	22	23
Bromophos methyl	2,2	2,7	3,5	56	49	53
4,4'-dichlorobenzophenone	3,1	1,1	4,1	47	41	45
Pirimiphos ethyl	3,1	3,2	4,2	82	71	67
Fenson	1,6	1,3	2,3	99	87	93
Endosulfan alfa	4,9	2,7	4,6	25	29	31
Heptachlor epoxide	2,1	2,5	4,1	60	49	48
Bromfenvinfos-methyl	2,5	3,4	3,0	115	102	103
Bromophos ethyl	2,6	1,0	2,3	49	40	41
trans-Chlordane	2,3	2,3	5,1	40	33	32
cis-Chlordane	2,4	0,9	2,0	40	33	35

*Analisi della contaminazione da pesticidi in oli vegetali mediante gascromatografia
bidimensionale comprehensive*

2,4'-DDE	2,4	1,6	3,0	35	27	28
trans-Nonachlor	2,1	2,9	2,7	31	28	29
Endosulfan beta	3,9	2,4	4,2	62	46	47
Chlorbenside	1,4	0,9	2,2	36	33	35
Quinalphos	1,8	2,7	4,8	93	80	85
Chlorfenvinphos	1,1	2,1	5,8	105	91	99
Tetrachlorvinphos	3,3	1,6	4,4	115	118	109
Dieldrin	2,0	3,4	2,7	46	40	41
4,4'-DDE	1,8	1,6	2,2	24	22	21
Prothiofos	3,7	2,8	2,7	44	37	38
Chlorfenson	1,3	0,8	3,5	79	71	71
Iodofenphos	2,5	2,9	4,8	53	46	53
Bromfenvinphos	1,6	2,4	4,5	107	91	101
Profenofos	2,1	2,5	3,3	64	58	63
Endrin	3,2	3,8	5,6	40	35	53
2,4'-DDD	3,8	1,2	4,1	55	55	67
4,4'-DDD	1,2	0,7	3,6	28	24	25
2,4'-DDT	2,6	2,1	2,5	53	44	44
Fenamiphos	1,5	3,1	5,3	103	97	104
Sulprofos	3,1	2,7	4,4	80	65	70
Chlorthiophos	2,6	2,6	3,3	70	60	60
cis-Nonachlor	2,1	2,1	5,7	37	30	31
Ethion	1,2	1,2	1,6	98	83	90
Ethylan	0,7	0,7	2,4	60	54	56
Pyrazophos	2,2	2,2	3,9	52	58	57
4,4'-DDT	1,4	1,4	1,9	31	27	27
2,4'-Methoxychlor	1,5	1,5	2,5	72	63	66
Endosulfan sulfate	0,6	0,6	3,6	99	93	99
Piperonyl butoxide	1,1	1,1	2,6	86	74	75
Triazophos	2,4	2,4	3,2	120	101	114
Mirex	2,6	2,6	2,1	15	14	14
Leptophos	2,7	2,7	4,9	37	32	30
Phosalone	1,7	1,7	6,1	112	94	96
Tetradifon	2,6	2,6	2,7	49	44	50

L'accuratezza ($n = 3$) è stata misurata nella fase iniziale del lavoro (accuratezza a breve termine) e dopo tre mesi di lavoro (accuratezza a lungo termine) analizzando un campione fortificato di EVOO a due livelli di concentrazione, $50 \mu\text{g kg}^{-1}$ e $100 \mu\text{g kg}^{-1}$. Per la valutazione dell'accuratezza a lungo termine, sono state preparate delle nuove soluzioni standard. I valori ottenuti sono riportati in Tabella 7.1.4 sotto forma di percentuale. Considerando l'accuratezza a breve termine a $50 \mu\text{g kg}^{-1}$, i valori variavano tra l'84 (endrin) e il 110% (hexachlorobenzene) con un valore medio del

101%. Per quanto riguarda l'accuratezza a breve termine a 100 µg kg⁻¹, i valori variavano tra il 79 (tetrachlorvinphos) e il 105% (pyrazophos) con una media del 93%. Prendendo invece in considerazione l'accuratezza a lungo termine, a 50 µg kg⁻¹ i valori misurati erano compresi nell'intervallo 91-121% per i pesticidi bromophos ethyl e endosulfan ether, con un valore medio del 105%. Infine, a 100 µg kg⁻¹ l'accuratezza variava tra il 98 (fenitrothion) e il 119% per otto composti, con un valore medio del 112%. Confrontando i valori di accuratezza, si è rilevato un lieve seppur accettabile aumento dei valori a lungo termine.

Tabella 7.1.4. Elenco dei pesticidi analizzati insieme a valori di accuratezza a breve e lungo termine e percentuali di effetto matrice.

Analita	Accuratezza a breve termine 50 µg kg ⁻¹	Accuratezza a breve termine 100 µg kg ⁻¹	Accuratezza a lungo termine 50 µg kg ⁻¹	Accuratezza a lungo termine 100 µg kg ⁻¹	Effetto Matrice %
Chloroneb	102	96	120	113	59
Methacrifos	102	100	99	109	112
Mevinphos	93	97	102	109	97
Hexachlorobenzene	110	98	100	104	81
Alfa BHC	102	95	117	114	125
Sulfotep	100	97	118	110	148
Phorate	102	96	119	113	17
Beta BHC	100	94	118	115	110
Diazinon	101	100	104	107	132
Fonofos	103	92	120	116	138
Terbufos	101	94	108	116	76
Endosulfan ether	103	96	121	109	98
Isazophos	96	92	115	108	126
Delta BHC	103	92	118	117	96
Heptachlor	103	99	99	102	103
Tolclofos-methyl	102	98	94	104	187
Fenclorphos	103	91	109	114	47
Chlorpyrifos Methyl	103	91	114	108	80
Methyl parathion	105	90	104	106	175
Pirimiphos methyl	101	93	120	114	93
Fenitrothion	102	90	94	98	43
Aldrin	106	99	93	107	98
Chlorpyrifos	102	94	110	119	74
Malathion	101	97	113	119	149
Parathion	104	86	101	111	108
Isodrin	107	84	119	113	101
Bromophos methyl	101	91	116	119	81

*Analisi della contaminazione da pesticidi in oli vegetali mediante gascromatografia
bidimensionale comprehensive*

4,4'-dichlorobenzophenone	98	95	94	109	112
Pirimiphos ethyl	101	95	111	110	54
Fenson	100	97	97	104	74
Endosulfan alfa	103	98	92	105	131
Heptachlor epoxide	105	98	117	118	197
Bromfenvinfos-methyl	100	91	94	101	43
Bromophos ethyl	103	91	91	109	88
trans-Chlordane	103	95	105	118	63
cis-Chlordane	102	93	107	115	62
2,4'-DDE	102	94	95	104	81
trans-Nonachlor	101	94	102	105	69
Endosulfan beta	107	94	99	113	93
Chlorbenside	103	94	94	108	47
Quinalphos	100	101	117	116	107
Chlorfenvinphos	99	88	94	101	37
Tetrachlorvinphos	109	79	97	103	48
Dieldrin	108	94	118	119	139
4,4'-DDE	99	92	95	109	79
Prothiofos	100	93	94	113	16
Chlorfenson	105	97	97	115	77
Iodofenphos	101	98	97	117	43
Bromfenvinphos	97	87	106	111	112
Profenofos	95	91	117	117	71
Endrin	84	103	112	114	100
2,4'-DDD	89	87	117	118	74
4,4'-DDD	100	97	100	119	98
2,4'-DDT	101	92	106	119	47
Fenamiphos	106	84	101	119	75
Sulprofos	103	85	97	113	89
Chlorthiophos	103	88	97	110	30
cis-Nonachlor	102	97	104	118	32
Ethion	101	95	99	110	65
Ethylan	101	94	102	115	30
Pyrazophos	108	105	103	111	32
4,4'-DDT	101	89	97	107	34
2,4'-Methoxychlor	100	93	99	115	97
Endosulfan sulfate	100	100	100	114	102
Piperonyl butoxide	102	93	98	110	31
Triazophos	96	97	118	111	34
Mirex	99	94	108	118	75
Leptophos	99	85	108	113	22
Phosalone	98	83	112	119	53
Tetradifon	101	96	98	112	22

I valori dell'effetto matrice (ME) sono stati calcolati come differenza tra la pendenza della retta di calibrazione costruita mediante fortificazione post-estrazione (PE) e quella della retta in solvente (S), diviso per la pendenza della retta S; il valore è stato quindi espresso in percentuale, secondo la seguente formula: %ME = [(pendenza retta calibrazione PE - pendenza retta calibrazione S) / pendenza retta S] × 100. I risultati ottenuti, riportati in Tabella 7.1.4, mostrano che per tutti i pesticidi indagati è stato osservato un effetto matrice positivo che variava dal 16 (prothiofos) al 197% (heptachlor epoxide) con una media dell'82%. Questo fenomeno, riportato da Anastassiades *et al.* nel 2003 [22], è definito “*matrix-induced chromatographic response enhancement*” e dipende dalla presenza di numerosi siti attivi presenti nel sistema GC (principalmente nel *liner* e nella colonna analitica) che vengono occupati dai componenti coestratti della matrice senza interferire con la corretta eluizione e quantificazione degli analiti target.

7.1.3.2 Analisi di campioni commerciali

Una volta ottimizzato e validato, il metodo CM-GC×GC-QqQMS è stato utilizzato per l'analisi di venti campioni di EVOO (S1-20). Le concentrazioni dei pesticidi rilevati ($n = 3$) sono riportati in Tabella 7.1.5, insieme ai valori di RSD ed ai corrispettivi LMR. In totale, quattro sono stati i pesticidi rilevati in undici campioni.

Tabella 7.1.5. Pesticidi quantificati in undici dei venti campioni analizzati, insieme a RSD (in parentesi). ^a: pesticidi non presenti nel database EU; ^b: pesticidi *fat-soluble*).

Campione	Bromfenvinfos-methyl ^a (LMR 10 µg kg ⁻¹)	Quinalphos ^b (LMR 10 µg kg ⁻¹)	Prothiofos ^a (LMR 10 µg kg ⁻¹)	Phosalone (LMR 10 µg kg ⁻¹)
S2	7 (1,9)	< LoD	15 (4,7)	< LoD
S3	< LoD	14 (4,2)	< LoD	< LoD
S7	< LoD	57 (2,1)	< LoD	< LoD
S8	< LoD	30 (1,3)	< LoD	< LoD
S9	< LoD	< LoD	< LoD	115 (2,9)
S10	< LoD	< LoD	< LoD	44 (1,2)
S12	6 (1,1)	< LoD	10 (1,8)	37 (2,2)
S13	< LoD	< LoD	< LoD	17 (1,3)
S14	8 (1,8)	< LoD	17 (4,1)	34 (2,2)
S15	< LoD	< LoD	< LoD	45 (0,9)
S16	< LoD	< LoD	< LoD	47 (3,8)

Il pesticida bromfenvinfos-methyl (non riportato nella banca dati dell'UE) è stato rilevato nei campioni 2, 12 e 14 in tutti i casi ad un livello inferiore al suo LMR. Il

quinalphos è stato quantificato in tre campioni, in un solo caso ad un livello superiore al suo LMR di $100 \mu\text{g kg}^{-1}$, pari a $139 \mu\text{g kg}^{-1}$. Il prothiofos, non riportato nella banca dati UE e pertanto caratterizzato da un LMR di $10 \mu\text{g kg}^{-1}$, è stato rilevato in tre campioni, con valori compresi tra 10 e $17 \mu\text{g kg}^{-1}$. Infine, il phosalone è stato quantificato in sette campioni, con valori compresi tra 17 e $115 \mu\text{g kg}^{-1}$ e, pertanto, quasi sempre al di sopra del suo LMR ($20 \mu\text{g kg}^{-1}$), tranne in un caso.

In conclusione, il 55% dei campioni analizzati conteneva livelli quantificabili di residui di pesticidi, ed otto di questi campioni superavano i limiti europei. La Figura 7.1.2 mostra uno dei campioni contaminati con i pesticidi bromfeninfos-methyl, prothiofos e phosalone a concentrazioni rispettivamente di 8, 17 e $34 \mu\text{g kg}^{-1}$.

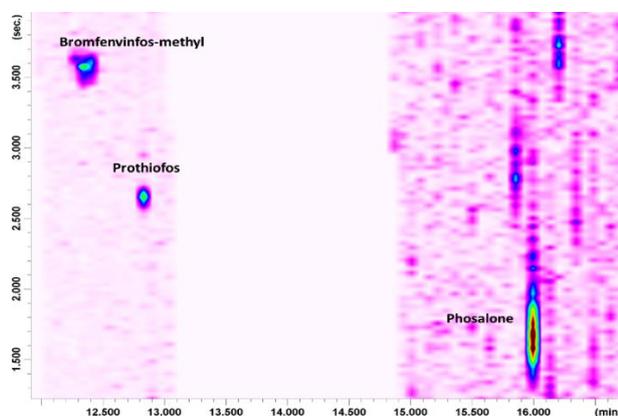


Figura 7.1.2. Espansione del cromatogramma GC×GC del campione 14.

7.1.4 Conclusioni

La presente ricerca ha dimostrato l'utilità della GC×GC a modulazione criogenica accoppiata alla rivelazione con QqQMS. La preparazione del campione ha previsto l'ottimizzazione di una estrazione LLE miniaturizzata, a seguito della quale gli estratti sono stati direttamente iniettati nel sistema GC×GC senza fare ricorso ad ulteriori fasi di concentrazione o *clean-up*, consentendo sia un risparmio di tempo che un minore consumo di solventi organici. In particolare, il ricorso alla modulazione criogenica, tramite aumento dei valori *s/n*, ha comportato un sostanziale miglioramento della sensibilità del metodo, indispensabile per il raggiungimento dei più bassi LMR ($10 \mu\text{g kg}^{-1}$). Contestualmente, l'impiego della QqQMS, con la modalità di acquisizione MRM, ha invece determinato un aumento della specificità riducendo il rischio di interferenze di segnale derivanti dai componenti coestratti dalla matrice.

Riferimenti Bibliografici

- [1] C. Cordero, J. Kiefl, P. Schieberle, S. Reichenbach, C. Bicchi. Comprehensive two-dimensional gas chromatography and food sensory properties: potential and challenges. *Anal Bioanal Chem.*, 2015, 407(1), 169-191.
- [2] G.S. Ochoa, M.C. Billingsley, R.E. Synovec. Using solid-phase extraction to facilitate a focused tile-based Fisher ratio analysis of comprehensive two-dimensional gas chromatography time-of flight mass spectrometry data: comparative analysis of aerospace fuel composition. *Anal Bioanal Chem.*, 2022, 415(13), 2411-2423.
- [3] A. Ferracane, M. Zoccali, F. Cacciola, T.M.G. Salerno, P.Q. Tranchida, L. Mondello. Determination of multi-pesticide residues in vegetable products using a “reduced-scale” Quechers method and flow-modulated comprehensive two-dimensional gas chromatography-triple quadrupole mass spectrometry. *J Chromatogr A.*, 2021, 1645, 462126.
- [4] M.S. Klee, J. Cochran, M. Merrick, L.M. Blumberg. Evaluation of conditions of comprehensive two-dimensional gas chromatography that yield a near-theoretical maximum in peak capacity gain. *J Chromatogr A.*, 2015, 1383, 151-159.
- [5] T.J. Trinklein, C.G. Warren, R.E. Synovec. Determination of the signal-to-noise ratio enhancement in comprehensive three-dimensional gas chromatography. *Anal Chem.*, 2021, 93, 8526-8535.
- [6] P.T. Anastas, J.C. Warner. *Green chemistry: theory and practice*. New York: Oxford University Press Inc.; 1998. 10. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Available online: <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL/visualize>.
- [7] Food and Agriculture Organization of the United Nations. Available online: <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL/visualize>.
- [8] Commission Regulation EU N° 432/2012 establishing a list of permitted health claims made on foods, other than those referring to the reduction of disease risk and to children’s development and health. *OJEU*, L136. 2012; <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/ALL/?uri=CELEX%3A32012R0432>.

- [9] E. Hakme, A. Lozano, C. Ferrer, F.J. Díaz-Galiano, A.R. Fernández-Alba. Analysis of pesticide residues in olive oil and other vegetable oils. *TrAC-Trend Anal Chem.*, 2018, 100, 167-179.
- [10] Commission Regulation (EC) No 396/2005 of the European Parliament and of the Council of 23 February 2005 on maximum residue levels of pesticides in or on food and feed of plant and animal origin. *OJEU*, L 70/1. 2005; <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/ALL/?uri=celex%3A32005R0396>.
- [11] European Pesticides Database. <https://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticides-database/products/?event=details&p=226>.
- [12] Commission implementing regulation (EU) No 1274/2011 of 7 December 2011 concerning a coordinated multiannual control program of the Union for 2012, 2013, and 2014 to ensure compliance with maximum residue levels of pesticides and to assess the consumer exposure to pesticide residues in and on food of plant and animal origin. *OJEU*, L 325/24. 2011; <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX%3A32011R1274>.
- [13] USDA National Nutrient database for Standard Reference, 2007. <http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp/search>.
- [14] A.G. Frenich, J.L.F. Moreno, J.L.M. Vidal, F.J.A. Liébanas. Application of gas chromatography coupled to triple quadrupole mass spectrometry for the multiresidue analysis of pesticides in olive oil. *J Agric Food Chem.*, 2007, 55(21), 8346-52.
- [15] P. Parrilla Vázquez, E. Hakme, S. Uclés, V. Cutillas, M. Martínez Galera, A.R. Mughari, A.R. Fernández-Alba. Large multiresidue analysis of pesticides in edible vegetable oils by using efficient solid-phase extraction sorbents based on quick, easy, cheap, effective, rugged and safe methodology followed by gas chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A.*, 2016, 1463, 20-31.
- [16] C. Tsoutsi, I. Konstantinou, D. Hela, T. Albanis. Screening method for organophosphorus insecticides and their metabolites in olive oil samples based on headspace solid-phase microextraction coupled with gas chromatography. *Anal Chim Acta.*, 2006, 573-574, 216-222.

- [17] A. Arena, M. Zoccali, L. Mondello, P.Q. Tranchida. Direct analysis of phthalate esters in vegetable oils by means of comprehensive two-dimensional gas chromatography combined with triple quadrupole mass spectrometry. *Food Chem.*, 2022, 133721.
- [18] Fediol: the EU Oil & Protein meal Industry. Establishing processing factors for fat soluble pesticides in crude vegetable oils and fats. Ref. 11SAF181_rev1, 27 March 2018.
- [19] European Food Safety Authority. Peer review of the pesticide risk assessment for the triazole derivative metabolites in light of confirmatory data submitted. *EFSA J.* 2018.
- [20] European Commission DG-SANTE. Analytical quality control and method validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed. SANTE/11312/2021.
- [21] J.V. Dias, V. Cutillas, A. Lozano, I.R. Pizzutti, A.R. Fernández-Alba. Determination of pesticides in edible oils by liquid chromatography-tandem mass spectrometry employing new generation materials for dispersive solid phase extraction clean-up. *J Chromatogr A.*, 2016, 1462, 8-18.
- [22] M. Anastassiades, K. Maštovská, S.J. Lehotay. Evaluation of analyte protectants to improve gas chromatographic analysis of pesticides. *J Chromatogr A.*, 2003, 1015(1-2), 163-184.

7.2 Determinazione di residui di pesticidi in olio di semi di canapa.

La metodica analitica di seguito riportata è stata utilizzata per la determinazione di residui di pesticidi in oli di semi di canapa ad uso alimentare, di crescente interesse tra i consumatori nel corso degli ultimi anni. In accordo con il paragrafo precedente, la miniaturizzazione della preparazione del campione, ridotta ad una singola estrazione senza fare ricorso ad ulteriori di fasi di purificazione o di pre-concentrazione, è stata seguita da analisi GC×GC a modulazione criogenica accoppiata a spettrometria di massa a triplo quadrupolo. Come figure di merito sono state misurate linearità, limiti di rilevabilità e quantificazione, accuratezza, precisione, *recovery* ed effetto matrice. Particolare attenzione è stata dedicata alla valutazione dell'effetto matrice, con la definizione della quantità di matrice coestratta. Tre sono state le normative internazionali (Canada, California, Europa) prese in considerazione.

7.2.1 Introduzione

La canapa (*Cannabis sativa Linn*) è una pianta erbacea annuale, appartenente alla famiglia delle *Cannabaceae*, caratterizzata da un contenuto di delta-9-tetraidrocannabinolo inferiore allo 0,3% (peso/peso), in accordo con la Commissione Europea e la Food & Drug Administration statunitense [1,2] ed un elevato livello di cannabidiolo (0,5-3% peso/peso a seconda delle varietà) [3]. Tradizionalmente, la canapa ha trovato numerose applicazioni nell'industria tessile per la produzione di abbigliamento, tessuti e corde, grazie alla flessibilità, forza e resistenza delle sue fibre rispetto ad altre naturali, come cotone e lino. Inoltre, le fibre di canapa rappresentano una soluzione sostenibile nell'industria della carta e nelle costruzioni edili [4].

La *Cannabis sativa L.* è stata aggiunta al catalogo dei *novel food* da parte dell'Unione Europea (UE); tuttavia, alcuni prodotti da essa derivati sono stati per centinaia di anni consumati nell'UE e pertanto non sono considerati *novel* [5].

Questa sezione è stata tradotta e adattata dalla seguente pubblicazione: A. Arena, A. Ferracane, M. Zoccali, M. Obkircher, H. Sprecher, P.Q. Tranchida, L. Mondello. Direct extraction with acetonitrile of hemp seed oil for the analysis of pesticides by using comprehensive two-dimensional gas chromatography-triple quadrupole mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 2023, 464432. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2023.464432>.

Tra le parti commestibili della *Cannabis sativa*, i suoi semi sono certamente i più sfruttati, per la loro equilibrata composizione nutrizionale di proteine, carboidrati e lipidi (circa 30% di ciascun macronutriente), in aggiunta ad un 10% di fibre insolubili [6]. I semi della canapa sono comunemente usati per produrre olio di semi di canapa (HSO) e farina. In particolare, l'HSO viene impiegato per un'ampia gamma di scopi, dalla cucina alla cosmetica, come ingrediente in integratori alimentari e prodotti per la cura del corpo e della pelle. Da un punto di vista alimentare, esso è ricco di acidi grassi polinsaturi, come gli acidi linoleico e α -linolenico [7], e possiede un rapporto di acidi grassi omega-6 e omega-3 pari a 3:1, in accordo con quanto raccomandato per una dieta sana [8]. Altri componenti importanti dell'HSO sono i tocoferoli che agiscono come antiossidanti naturali.

Secondo quanto riportato dal *Industrial Hemp Market Size, Share & Trends Analysis Report* [9], nel 2021 il mercato globale della canapa industriale è stato stimato ad un totale di 4,13 miliardi di dollari con un tasso di crescita annuale previsto del 16,8% dal 2022 al 2030. Con l'aumento della popolarità della canapa e dei prodotti da essa derivati, negli ultimi anni i produttori sono diventati maggiormente propensi ad utilizzare sia stimolatori della crescita che pesticidi per aumentare la resa delle piante [10]. Dal punto di vista legislativo, il governo sanitario del Canada ha regolamentato 96 residui di pesticidi nella canapa, con limiti di quantificazione (LoQ) specifici a seconda del tipo di prodotto, quali piante fresche (0,01-1,5 mg kg⁻¹), infiorescenze (0,02-3,0 mg kg⁻¹) e oli: 0,01-2,5 mg kg⁻¹ [11]. Nello stato della California 66 sono i pesticidi ad essere regolamentati con specifici LoQ che vanno da 0,1 a 5,0 mg kg⁻¹ per i prodotti inalabili e da 0.1 a 40.0 mg kg⁻¹ per altri prodotti a base di canapa [12]. L'UE ha invece stabilito dei limiti massimi residuali (LMR), disponibili nel database dei pesticidi dell'UE [13], per un totale di 507 pesticidi relativi, tuttavia, ai soli semi di canapa. Secondo quanto riportato dal Regolamento SANTE/10704/2021 [14], per ottenere i corrispondenti LMR nell'olio è necessario applicare un fattore di trasformazione che tenga conto della resa percentuale (massa della merce trasformata divisa per la massa del corrispondente prodotto non trasformato, moltiplicato per 100). Secondo Da Porto *et al.* [15], considerando che dai semi di canapa si ottiene una resa media del 30% di olio, deve essere applicato un fattore di trasformazione pari a 3,3.

Da un punto di vista analitico, l'analisi dei contaminanti a livello di tracce nei prodotti a base di canapa richiede fasi adeguate di preparazione del campione spesso lunghe e dispendiose. Nel 2018, Moulin e colleghi hanno sviluppato tre diversi metodi analitici per la determinazione di pesticidi in foglie, fiori secchi e HSO, tutti basati su una fase di estrazione liquido-liquido (LLE), seguita da diverse fasi di purificazione [16]. Considerando solo l'HSO, 1 g di olio è stato estratto con 5 mL di acetone-acetonitrile (1:1, v/v) e centrifugato. Il surnatante è stato trasferito in una provetta da centrifuga contenente un materiale adsorbente, agitato e centrifugato, eseguendo una estrazione dispersiva in fase solida (dSPE). Lo strato di acetone-acetonitrile è stato trasferito in una seconda provetta contenente NaCl-MgSO₄ che è stata poi nuovamente agitata e centrifugata. Recentemente, Michlig *et al.* hanno utilizzato il metodo QuEChERSER aggiornato (*quick, easy, cheap, effective, rugged, safe, efficient, and robust*) per l'analisi di 93 pesticidi in HSO [17]. La preparazione del campione prevedeva il trattamento di 2 g di campione con 10 mL di acetonitrile/acqua (4:1, v/v), anteposto alle fasi di separazione e rilevazione. Nel 2021, un dispositivo denominato *Coated Blade Spray* (CBS) è stato impiegato per l'analisi dei residui di pesticidi nell'HSO [18]. Nello specifico, il CBS veniva direttamente immerso in 0,3 mL di HSO per 30 minuti, risciacquato con 1 mL di isoottano e quindi introdotto direttamente in un sistema spettrometria di massa tandem (MS/MS).

In accordo al paragrafo precedente, l'obiettivo del presente studio è stato quello di dimostrare l'applicabilità di una fase ridotta di preparazione del campione (LLE miniaturizzata utilizzando solo 0,5 mL di acetonitrile) ad una matrice vegetale oleosa molto più impegnativa dell'EVOO a causa della sua complessa composizione [17]. L'estrazione è stata preceduta ad analisi GC×GC a modulazione criogenica accoppiate ad una rivelazione a spettrometria di massa a triplo quadrupolo (QqQMS). A causa dei diversi modi di esprimere i limiti residuali, in particolare “LoQ” per le normative del Canada e della California e “LMR” per quella europea, nei paragrafi successivi le seguenti espressioni sono state uniformate utilizzando l'abbreviazione LMR.

7.2.2 Parte Sperimentale

7.2.2.1 Reagenti

Le miscele certificate di materiali standard di riferimento “California Set 1, 2, 3, 4, 5, 6”, “Cannabis Pesticides - AOAC Set 1” e “Cannabis Pesticides - AOAC, Canada

Set 1, 2 e 3” (per un totale di 97 pesticidi, riportati in Tabella 1) sono state acquistate da Merck Life Science (Merck KGaA, Darmstadt, Germania). Acetonitrile (ACN) di grado $\geq 99,9\%$ e trifetil fosfato (TEP) sono stati acquistati da Merck Life Science.

Sono state preparate delle soluzioni madre in ACN sia per le miscele di pesticidi (100 mg L^{-1}) che per lo standard interno (IS) TEP (10000 mg L^{-1}) e conservate in vial ambrate a $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ fino all'uso. Dal momento che un HSO certificato contenente pesticidi non era disponibile in commercio, per la misurazione delle figure di merito è stato utilizzato un campione di HSO senza pesticidi rilevabili.

7.2.2.2 Preparazione del campione

Dieci diversi campioni di HSO (quattro provenienti da agricoltura biologica), acquistati presso erboristerie ubicate a Messina (Italia) e tramite internet, sono stati oggetto del presente studio. La preparazione del campione è stata effettuata come precedentemente pubblicato da Arena *et al.* [21]. In breve, 500 mg di olio, dopo essere stati addizionati con 2 μL della soluzione IS (5 mg L^{-1}), sono stati estratti con 500 μL di ACN. Dopo la centrifugazione, la fase organica superiore di ACN è stata direttamente iniettata nel sistema GC \times GC.

Le soluzioni standard di calibrazione sono state preparate in ACN (calibrazione in solvente), mentre la calibrazione in matrice (MM) è stata eseguita utilizzando un campione di HSO senza pesticidi rilevabili.

7.2.2.3 Strumentazione analitica

Il sistema GC \times GC-MS era composto da un doppio forno (GC-2010 Shimadzu Corporation, Kyoto, Giappone), un modulatore criogenico Zoex II (privo di azoto liquido), ed uno spettrometro di massa a triplo quadrupolo (TQ8040 Shimadzu). L'iniezione del campione è stata eseguita mediante l'uso di un autocampionatore AOC-20i e di un iniettore *programmed temperature vaporizing* (PTV) Optic 4 (GL Sciences, Eindhoven, Paesi Bassi). L'iniezione è stata eseguita a una temperatura iniziale di $30 \text{ }^\circ\text{C}$ aumentata a $5 \text{ }^\circ\text{C s}^{-1}$ fino a $300 \text{ }^\circ\text{C}$ e mantenuta fino alla fine dell'analisi GC. Il volume di iniezione era di 4 μL , nella modalità *splitless* (è stato utilizzato un *liner* vuoto con un volume di 735 μL). Una colonna apolare SLB-5ms [equivalente in polarità a poli(5%difetil/95% dimetilsilossano)] di dimensioni $10 \text{ m} \times 0,25 \text{ mm ID} \times 0,10 \text{ } \mu\text{m d}_f$ è stata utilizzata come prima dimensione analitica (^1D). La seconda dimensione (^2D) era una colonna semipolare SLB-35ms [equivalente in polarità a

poli(35% difenil/65% dimetilsilossano)] di dimensioni 1,5 m × 0,10 mm ID × 0,10 µm df. Le due colonne sono state collegate utilizzando due μ -union SilTite (Trajan, Ringwood, Victoria, Australia) utilizzando una colonna priva di fase stazionaria (1.0 m × 0.10 mm ID) impiegata per creare il *loop* del modulatore. È stato utilizzato un periodo di modulazione di 4 s, con un getto caldo della durata di 250 ms ad una temperatura di 300 °C. La separazione è stata ottenuta mantenendo entrambi i forni GC a 40 °C per due minuti e successivamente aumentati a 10 °C min⁻¹ fino a 360 °C (10 min). Come gas *carrier* è stato utilizzato l'elio fornito ad una pressione iniziale di 248.8 kPa (velocità lineare costante). Nello spettrometro di massa, la ionizzazione elettronica è stata eseguita a 70 eV. Le temperature dell'interfaccia e della sorgente ionizzante erano rispettivamente 280 e 250 °C. Il gas di collisione era argon a una pressione di 200 kPa. Tutti i dati sono stati raccolti utilizzando il software GCMS Solution v.4.45 (Shimadzu). Il software ChromSquare versione 2.4 (Shimadzu) è stato utilizzato per l'elaborazione dei dati GC×GC. L'identità e il tempo di ritenzione di ciascun analita sono stati stabiliti utilizzando la modalità di acquisizione a scansione (intervallo di massa: 45-900 *m/z*; frequenza di acquisizione: 3,3 Hz), utilizzando il database spettrale Pesticides 2.0 (Shimadzu). Tali informazioni sono state utilizzate per l'ottimizzazione delle modalità *selected ion monitoring* (SIM) e *multiple reaction monitoring* (MRM). Le transizioni MRM (due composti sono stati monitorati in modalità SIM, selezionando tre ioni) insieme alle energie di collisione sono riportate in Tabella 1.

7.2.3 Risultati e Discussioni

Come riportato nel paragrafo precedente, l'utilizzo di una iniezione *splitless* a freddo, mediante un iniettore PTV, e della GC×GC a modulazione criogenica hanno consentito la riduzione delle fasi di preparazione del campione [21]. La selezione dei pesticidi è stata effettuata non solo in considerazione delle tre legislazioni internazionali considerate, ma anche al fine di coprire diverse famiglie chimiche di pesticidi (ad esempio organoclorurati, organofosfati, piretroidi, carbammati) e polarità, in base ovviamente alla disponibilità del laboratorio. A tal proposito, dei 97 pesticidi considerati in questo studio, 69 sono presenti nella lista UE (su 507), 58 in quella canadese (su 96) e 43 in quella californiana (su 66). Come precedentemente riportato,

considerando che i LMR dell'UE si riferiscono ai semi di canapa, per ottenere i LMR in olio è stato applicato un fattore di conversione pari a 3,3 [14,15].

La Figura 7.2.1 mostra il cromatogramma nativo GC×GC-QqQMS di un campione di HSO fortificato al livello di concentrazione di 0,5 mg kg⁻¹.

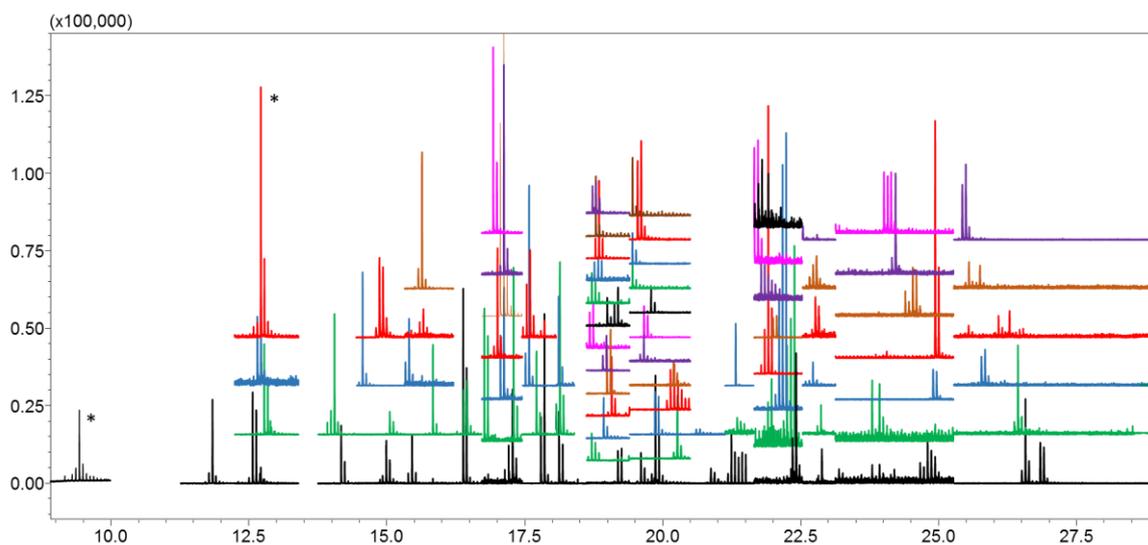


Figura 7.2.1. Cromatogramma GC×GC nativo, acquisito in modalità MRM [(ad eccezione di due pesticidi acquisiti in SIM (*)), di un campione HSO fortificato ad un livello di concentrazione di 0.5 mg kg⁻¹.

7.2.3.1 Figure di merito

Le seguenti figure di merito sono state oggetto di studio: linearità nell'intervallo di calibrazione, limite di quantificazione (LoQ), accuratezza, *recovery intra-day* ed *inter-day*, precisione ed effetto matrice (Tabelle 7.2.1 e 7.2.2).

La linearità è stata valutata all'interno di intervalli di calibrazione diversi per ciascun pesticida (da 0,01 a 40 mg kg⁻¹) e misurata mediante costruzione di rette di calibrazione in matrice. Per ciascun pesticida il suo LoQ, pari al livello più basso della retta di calibrazione, era corrispondente a quella concentrazione in grado di produrre un *s/n* uguale o superiore a 10. I valori di LoQ variavano da 0,01 a 0,5 mg kg⁻¹, sempre inferiori ai LMR californiani. Tuttavia, alcuni LoQ superavano i limiti della legislazione canadese in 5 casi, per i pesticidi dimethoate, thiamethoxam, tetrachlorvinphos, bifenazate, pyraclostrobin, e in 12 casi di quella europea, per i pesticidi dimethoate, heptachlor-epoxide, tetrachlorvinphos, chlorfenapyr, profenofos, ancymidol, endosulfan-sulfate, fenhexamid, propiconazole, spiromesifen, leptophos, tetradifon, con dimethoate and tetrachlorvinphos in comune.

Tabella 7.2.1. Elenco dei pesticidi analizzati con tempo di ritenzione (t_R), MRL (mg kg^{-1}), intervallo di calibrazione (mg kg^{-1}), transizioni quantifier (MRM 1) e qualifier (MRM 2) [con energia di collisione - CE (eV)].

Analita	t_R	LMR	Intervallo di calibrazione	MRM 1 (CE)	MRM 2 (CE)
Dichlorvos	9,43	0,1 ^a /0,05 ^b /0,03 ^c	0,025 – 1,0	*109-185-79	
Mevinphos	11,84	0,1 ^a /0,025 ^b /0,03 ^c	0,01 – 2,0	127>109 (12)	192>127 (12)
Methacrifos	12,57	ND ^{a,b} /0,07 ^c	0,05 – 2,0	208>180 (8)	240>208 (4)
Acephate	12,65	5 ^a /0,05 ^b /0,07 ^c	0,05 – 2,0	136>94 (14)	94>64 (6)
Etridiazole	12,71	ND ^a / 0,15 ^b /0,17 ^c	0,01 – 0,5	*211-183-140	
Chloroneb	12,78	ND ^{a,b} /0,03 ^c	0,025 – 2,0	206>191 (12)	206>141 (20)
Propoxur	14,05	0,1 ^a / 0,01 ^b /0,17 ^c	0,01 – 1,0	152>110 (8)	152>64 (28)
Ethoprophos	14,17	0,1 ^a /0,01 ^b /0,03 ^c	0,01 – 1,0	200>158 (6)	158>97 (18)
Sulfotep	14,56	ND ^{a,b} /0,03 ^c	0,025 – 1,0	322>202 (10)	322>294 (4)
Flonicamid	14,87	2 ^a /0,025 ^b /0,20 ^c	0,01 – 1,0	174>146 (10)	174>126 (20)
Alfa-BHC	14,99	ND ^{a,b} /0,03 ^c	0,025 – 1,0	181>145 (16)	219>183 (8)
Hexachlorobenzene	15,05	ND ^{a,b} /0,07 ^c	0,05 – 2,0	284>249 (24)	284>214 (28)
Dimethoate	15,40	0,1 ^a /0,01 ^b /0,02 ^c	0,05 – 2,0	125>79 (8)	125>47 (14)
Carbofuran	15,46	0,1 ^a /0,01 ^b /0,07 ^c	0,01 – 1,0	164>149 (8)	164>131 (18)
Terbufos	15,63	ND ^{a,b} /0,03 ^c	0,01 – 2,0	231>129 (26)	2310>175 (14)
Quintozene	15,66	0,2 ^a /ND ^b /0,17 ^c	0,1 – 2,0	265>237 (10)	295>237 (16)
Diazinon	15,83	0,2 ^a /ND ^b /0,07 ^c	0,01 – 2,0	304>179 (10)	179>122 (24)
Pirimicarb	16,38	ND ^a /0,01 ^b /0,07 ^c	0,01 – 1,0	238>166 (12)	238>72 (24)
Endosulfan-ether	16,45	ND ^{a,b} /0,03 ^c	0,025 – 1,0	241>206 (16)	239>204 (16)
trans-Spiroxamine	16,76	0,1 ^a /ND ^b /0,17 ^c	0,05 – 1,0	100>58 (12)	100>72 (8)
Tolclofos-methyl	16,92	ND ^{a,b} /0,03 ^c	0,01 – 2,0	265>250 (14)	265>93 (24)
Parathion-methyl	17,00	0,1 ^a /ND ^b /0,07 ^c	0,025 – 2,0	263>109 (14)	125>47 (12)
Flurprimidol	17,11	ND ^{a,b} /0,07 ^c	0,01 – 2,0	269>107 (20)	270>107 (20)
Metalaxyl	17,12	15 ^a /0,01 ^b /0,03 ^c	0,01 – 40,0	249>190 (8)	249>146 (22)
Fenchlorphos	17,13	ND ^{a,b} /0,03 ^c	0,025 – 1,0	285>270 (16)	287>272 (18)
Carbaryl	17,27	0,5 ^a /0,025 ^b /0,17 ^c	0,025 – 2,0	144>116 (12)	144>89 (38)

*Analisi della contaminazione da pesticidi in oli vegetali mediante gascromatografia
bidimensionale comprehensive*

cis-Spiroxamine	17,29	0,1 ^a /ND ^b /0,17 ^c	0,05 – 1,0	100>58 (12)	100>72 (8)
Methiocarb	17,59	0,1 ^a /0,01 ^b /0,10 ^c	0,01 – 1,0	168>153 (8)	168>109 (14)
Malathion	17,60	5 ^a /0,01 ^b /0,07 ^c	0,01 – 10,0	173>99 (14)	173>127 (6)
Chlorpyrifos	17,71	0,1 ^a /0,5 ^b /0,03 ^c	0,01 – 1,0	197>169 (14)	314>258 (14)
Fenthion	17,86	ND ^a /0,01 ^b /0,07 ^c	0,01 – 1,0	278>109 (20)	278>169 (14)
MGK 264	18,11	ND ^{a,b} /0,03 ^c	0,025 – 1,0	164>93 (10)	164>80 (24)
Bromophos-methyl	18,12	ND ^{a,b} /0,03 ^c	0,025 – 1,0	331>316 (14)	329>314 (18)
4,4'- dichlorobenzophenone	18,14	ND ^{a,b} /0,03 ^c	0,025 – 1,0	139>111 (14)	139.00>75.00
Heptachlor-epoxide	18,46	ND ^{a,b} /0,03 ^c	0,1 – 2,0	353>263 (14)	355>265 (20)
trans-Chlorfenvinphos	18,71	ND ^{a,b} /0,07 ^c	0,05 – 2,0	323>267 (16)	267>159 (18)
trans-Bromfenvinphos	18,71	ND ^{a,b} /0,03 ^c	0,025 – 1,0	267>159 (14)	323>267 (12)
Thiamethoxam	18,74	4,5 ^a /0,01 ^b /0,07 ^c	0,05 – 10,0	212>139 (15)	212>125 (12)
Cyprodinil	18,79	ND ^a /0,01 ^b /0,07 ^c	0,01 – 1,0	224>208 (16)	224>131 (14)
Bromfenvinfos-methyl	18,80	ND ^{a,b} /0,03 ^c	0,025 – 1,0	295>109 (16)	297>109 (16)
Methoprene	18,83	ND ^{a,b} /0,17 ^c	0,1 – 2,0	191>135 (8)	191>121 (8)
Fluopyram	18,84	ND ^a /0,01 ^b /0,03 ^c	0,01 – 1,0	173>145 (30)	173>95 (30)
DDD (somma di isomeri)	18,90- 19,00 [#]	ND ^{a,b} /0,17 ^c	0,025 – 1,0	235>165 (24)	237>165 (28)
Bromophos-ethyl	18,98	ND ^{a,b} /0,07 ^c	0,05 – 1,0	359>303 (16)	303>285 (18)
trans-Chlordane	18,99	0,1 ^a /ND ^b /0,07 ^c	0,05 – 1,0	373>266 (22)	373>264 (28)
2,4'-DDE	19,05	ND ^{a,b} /0,17 ^c	0,01 – 1,0	246>176 (30)	248>176 (28)
Chlorbenseide	19,07	ND ^{a,b} /0,03 ^c	0,01 – 1,0	125>89 (16)	125>99 (18)
cis-Chlordane	19,19	0,1 ^a /ND ^b /0,07 ^c	0,05 – 1,0	373>266 (22)	373>264 (28)
Tetrachlorvinphos	19,25	ND ^a /0,01 ^b /0,03 ^c	0,05 – 1,0	329>109 (20)	329>314 (18)
cis-Bromfenvinphos	19,45	ND ^{a,b} /0,03 ^c	0,025 – 1,0	267>159 (14)	323>267 (12)
cis-Chlorfenvinphos	19,45	ND ^{a,b} /0,07 ^c	0,05 – 1,0	323>267 (16)	267>159 (18)
Prothiofos	19,51	ND ^{a,b} /0,03 ^c	0,025 – 1,0	267>239 (10)	309>239 (14)
Chlorfenson	19,61	ND ^{a,b} /0,03 ^c	0,01 – 2,0	175>111 (12)	175>75 (28)
Profenofos	19,66	ND ^{a,b} /0,07 ^c	0,2 - 2,0	337>267 (14)	339>269 (18)
4,4'-DDE	19,72	ND ^{a,b} /0,017 ^c	0,01 – 1,0	246>176 (30)	248>176 (28)

*Analisi della contaminazione da pesticidi in oli vegetali mediante gascromatografia
bidimensionale comprehensive*

Buprofezin	19,78	ND ^{a,b} /0,03 ^c	0,025 – 1,0	172>57 (14)	172>131 (6)
Kresoxim-methyl	19,86	1 ^a /0,15 ^b /0,03 ^c	0,01 – 2,0	206>116 (6)	206>131 (14)
2,4'-DDT	19,86	ND ^{a,b} /0,17 ^c	0,025 – 1,0	235>165 (24)	237>165 (28)
Chlorfenapyr	20,19	0,1 ^a /1,5 ^b /0,07 ^c	0,1 – 2,0	247>227 (16)	247>200 (24)
Fludioxonil	20,20	30 ^a /0,01 ^b /0,99 ^c	0,01 – 40,0	248>182 (14)	248>154 (20)
Ethylan	20,26	ND ^{a,b} /0,03 ^c	0,025 – 1,0	223>167 (14)	223>179 (22)
4,4'-DDT	20,74	ND ^{a,b} /0,17 ^c	0,05 – 1,0	235>165 (24)	237>165 (28)
Ancymidol	20,77	ND ^{a,b} /0,03 ^c	0,1 – 2,0	228>121 (15)	121>78 (25)
Sulprofos	20,87	ND ^{a,b} /0,03 ^c	0,025 – 1,0	322>156 (8)	156>108 (28)
Trifloxystrobin	21,24	30 ^a /0,01 ^b /0,03 ^c	0,01 – 40,0	222>190 (4)	222>162 (10)
Fensulfothion	21,32	ND ^a /0,01 ^b /0,03 ^c	0,01 – 1,0	293>153 (8)	293>125 (14)
Endosulfan-sulfate	21,34	ND ^a /2,5 ^b /0,33 ^c	0,5 – 40,0	272>237 (18)	387>253 (16)
Propiconazole	21,72	20 ^a /ND ^b /0,03 ^c	0,1 – 40,0	259>69 (14)	259>191 (8)
Spiromesifen	21,78	12 ^a /ND ^b /0,07 ^c	0,2 – 40,0	272>254 (6)	272>209 (18)
Fenhexamid	21,79	10 ^a /ND ^b /0,07 ^c	0,2 – 40,0	177>78 (30)	301>97 (21)
Piperonyl-butoxide	21,91	8 ^a /1,25 ^b /0,03 ^c	0,01 – 10,0	176>131 (12)	176>117 (20)
Phenothrin (somma di isomeri)	21,95- 22,72 [#]	ND ^{a,b} /0,17 ^c	0,1 – 2,0	183>168 (14)	183>153 (14)
Tebuconazole	22,06	2 ^a /0,01 ^b /0,07 ^c	0,01 – 10,0	250>125 (22)	250>153 (12)
Bifenthrin	22,23	0,5 ^a /ND ^b /0,07 ^c	0,025 – 1,0	181>166 (12)	181>153 (8)
Tetramethrin (somma di isomeri)	22,30- 22,70 [#]	ND ^{a,b} /0,03 ^c	0,01 – 2,0	164>107 (14)	164>77 (22)
Phosmet	22,41	0,2 ^a /ND ^b /0,17 ^c	0,05 – 2,0	160>133 (14)	160>77 (24)
Bifenazate	22,70	5 ^a /0,01 ^b /0,17 ^c	0,1 – 10,0	300>258 (8)	300>199 (20)
Chlorantraniliprole	22,76	40 ^a /ND ^b /0,03 ^c	0,025 – 40,0	278>249 (20)	280>251 (20)
Acetamiprid	22,78	5 ^a /0,05 ^b /0,03 ^c	0,025 – 10,0	152>116 (18)	1520>89 (26)
Leptophos	22,86	ND ^{a,b} /0,03 ^c	0,1 – 2,0	377>362 (24)	375>360 (24)
Tetradifon	22,88	ND ^{a,b} /0,07 ^c	0,1 – 2,0	227>199 (16)	356>159 (18)
trans-Permethrin	23,79	20 ^a /ND ^b /0,17 ^c	0,1 – 40,0	183>153 (15)	183>165 (12)
cis-Permethrin	23,93	20 ^a /ND ^b /0,17 ^c	0,1 – 40,0	183>153 (15)	183>165 (12)
Pyridaben	24,07	3 ^a /0,02 ^b /0,03 ^c	0,01 – 1,0	147>117 (22)	147>132 (14)

*Analisi della contaminazione da pesticidi in oli vegetali mediante gascromatografia
bidimensionale comprehensive*

Coumaphos	24,22	0,1 ^a /0,01 ^b /0,03 ^c	0,01 – 2,0	362>109 (16)	362>226 (14)
Cyfluthrin I	24,39	1 ^a /ND ^b /0,07 ^c	0,05 – 10,0	226>206 (14)	226>199 (6)
Cyfluthrin II	24,59	1 ^a /ND ^b /0,07 ^c	0,05 – 10,0	226>206 (14)	226>199 (6)
Cypermethrin (somma di isomeri)	24,80- 25,75 [#]	1 ^a /ND ^b /0,17 ^c	0,1 – 10,0	181>152 (22)	181>127 (22)
Boscalid	24,90	10 ^a /0,01 ^b /3,3 ^c	0,01 – 40,0	342>140 (14)	342>112 (28)
Etofenprox	24,94	0,1 ^a /ND ^b /0,03 ^c	0,01 – 2,0	163>135 (10)	163>107 (18)
Benzovindiflupyr	25,48	ND ^a /0,01 ^b /0,03 ^c	0,01 – 2,0	237>174 (25)	159>42 (20)
Fenvalerate	25,54	ND ^{a,b} /0,17 ^c	0,1 – 2,0	225>119 (15)	225>147 (9)
Pyraclostrobin	25,83	ND ^a /0,01 ^b /0,07 ^c	0,05 – 2,0	164>132 (14)	164>104 (26)
Deltamethrin	26,28	ND ^{a,b} /0,66 ^c	0,1 – 2,0	252>93 (20)	253>172 (8)
Azoxystrobin	26,43	40 ^a /0,01 ^b /0,03 ^c	0,01 – 40,0	344>183 (24)	344>329 (16)
Dimethomorph I	26,57	20 ^a /ND ^b /0,07 ^c	0,01 – 40,0	301>165 (14)	301>139 (14)
Dimethomorph II	26,90	20 ^a /ND ^b /0,07 ^c	0,01 – 40,0	301>165 (14)	301>139 (14)

ND: non disponibile; ^a: California; ^b: Canada; ^c: Europa; *: acquisiti in SIM; #: isomeri trans e cis.

L'accuratezza del metodo (Tabella 7.2.2), espressa come percentuale, è stata misurata ($n = 5$) fortificando un campione privo di pesticidi rilevabili a due livelli di concentrazione (0,05 e 0,5 mg kg⁻¹). I valori ottenuti erano compresi nell'intervallo 81-118%. In particolare, al livello di 0,05 mg kg⁻¹ i valori di accuratezza erano compresi tra 83% (coumaphos) e 117% (kresoxim-methyl), con una deviazione standard relativa (RSD) compresa tra 1% (sulfotep) e 11% (methacrifos). Al livello di concentrazione di 0,5 mg kg⁻¹ i valori di accuratezza erano compresi tra 81% (MGK 264) e 118% (chloroneb), con una RSD compresa tra 1% (hexachlorobenzene) e 9% (dimetomorph I). Il valore medio di accuratezza a 0,05 mg kg⁻¹ era del 102%, mentre a 0,5 mg kg⁻¹ era del 100%. Va notato che per 21 composti [(quintozene, heptachlor epoxide, methoprene, chlorfenapyr, profenofos, ancymidol, endosulfan-sulfate, fenhexamid, propiconazole, spiromesifen, bifenazate, phenothrin sum of isomers, leptophos, tetradifon, cyfluthrin I and II, trans-permethrin, cis-permethrin, cypermethrin (somma di isomeri), fenvalerate, deltamethrin], l'accuratezza è stata misurata solo a 0,5 mg kg⁻¹ dal momento che il loro LoQ era superiore a 0,05 mg kg⁻¹.

Tabella 7.2.2. Elenco dei pesticidi con rispettivi valori di accuratezza, *recovery intra-day* ed *inter-day* ed effetto matrice (%ME).

Analita	Livello (mg kg ⁻¹)	Accuratezza		Recovery intra-day		Recovery inter-day		%ME
		%	RSD	%	RSD	%	RSD	
Dichlorvos	0,05	97	5	56	4	58	6	166
	0,5	90	5	86	5	88	9	
Mevinphos	0,05	106	9	91	4	94	6	82
	0,5	96	5	87	3	90	9	
Methacrifos	0,05	107	11	97	10	99	8	108
	0,5	96	3	87	3	80	11	
Acephate	0,05	96	8	66	6	75	12	34
	0,5	110	4	72	4	77	10	
Etridiazole	0,05	112	4	67	11	72	10	157
	0,5	106	1	89	7	85	6	
Chloroneb	0,05	88	7	59	8	52	11	25
	0,5	118	2	76	8	73	7	
Propoxur	0,05	112	3	72	4	74	4	175
	0,5	99	3	91	4	92	4	
Ethoprophos	0,05	108	7	64	6	65	7	143
	0,5	101	4	63	2	65	9	
Sulfotep	0,05	116	1	88	1	90	4	101
	0,5	102	3	115	6	118	10	
Flonicamid	0,05	100	10	91	10	91	7	88
	0,5	104	2	93	5	95	6	
Alfa-BHC	0,05	112	2	37	9	37	7	-21
	0,5	110	2	39	4	41	4	
Hexachlorobenzene	0,05	88	6	11	8	11	10	81
	0,5	107	1	14	5	15	4	
Dimethoate	0,05	114	6	84	5	78	10	106

*Analisi della contaminazione da pesticidi in oli vegetali mediante gascromatografia
bidimensionale comprehensive*

	0,5	91	5	102	4	108	7	
Carbofuran	0,05	96	10	62	10	59	10	126
	0,5	111	5	68	5	71	7	
Terbufos	0,05	94	6	55	6	58	8	54
	0,5	101	1	49	1	52	8	
Quintozene	0,05	NQ	-	NQ	-	NQ	-	-59
	0,5	101	4	24	9	28	11	
Diazinon	0,05	86	2	57	6	58	5	16
	0,5	109	2	60	3	59	4	
Pirimicarb	0,05	104	4	76	5	76	4	130
	0,5	101	6	76	6	72	9	
Endosulfan-ether	0,05	103	7	43	5	44	5	95
	0,5	100	4	38	3	40	7	
trans-Spiroxamine	0,05	83	6	89	8	87	7	-56
	0,5	88	3	50	2	50	2	
Tolclofos-methyl	0,05	88	3	50	2	50	2	-15
	0,5	99	6	50	2	47	6	
Parathion-methyl	0,05	99	8	92	11	90	9	-13
	0,5	110	2	85	1	90	9	
Flurprimidol	0,05	88	1	67	1	67	1	10
	0,5	102	5	68	5	69	8	
Metalaxyl	0,05	100	4	93	1	93	9	60
	0,5	96	4	94	4	95	7	
Fenchlorphos	0,05	113	5	48	2	45	5	-36
	0,5	103	5	46	4	47	8	
Carbaryl	0,05	93	4	47	11	48	11	-1
	0,5	93	3	47	10	45	10	
cis-Spiroxamine	0,05	96	9	56	5	59	11	-59
	0,5	90	2	41	3	40	3	

*Analisi della contaminazione da pesticidi in oli vegetali mediante gascromatografia
bidimensionale comprehensive*

Methiocarb	0,05	101	1	52	11	50	12	6
	0,5	98	6	47	6	48	10	
Malathion	0,05	100	9	82	10	85	10	14
	0,5	97	6	84	1	82	6	
Chlorpyrifos	0,05	92	5	51	3	55	12	-34
	0,5	103	6	41	6	47	7	
Fenthion	0,05	102	6	67	5	66	5	-19
	0,5	97	8	63	4	64	8	
MGK 264	0,05	94	2	127	7	127	5	31
	0,5	81	1	122	2	123	3	
Bromophos-methyl	0,05	101	2	70	10	71	7	75
	0,5	96	5	71	7	75	9	
4,4'- dichlorobenzophenone	0,05	101	2	46	2	45	4	184
	0,5	92	4	38	10	36	9	
Heptachlor-epoxide	0,05	NQ	-	NQ	-	NQ	-	120
	0,5	84	5	90	5	87	7	
trans- Chlorfenvinphos	0,05	116	2	67	5	63	5	-50
	0,5	107	3	57	6	55	6	
trans- Bromfenvinphos	0,05	86	6	66	5	66	5	-51
	0,5	97	2	58	5	57	5	
Thiamethoxam	0,05	83	7	82	7	77	12	13
	0,5	86	1	94	4	93	2	
Cyprodinil	0,05	104	3	28	10	26	10	-75
	0,5	91	3	31	2	31	2	
Bromfenvinfos- methyl	0,05	87	7	47	12	48	11	145
	0,5	94	4	56	10	53	11	
Methoprene	0,05	NQ	-	NQ	-	NQ	-	73
	0,5	108	4	81	5	80	3	

*Analisi della contaminazione da pesticidi in oli vegetali mediante gascromatografia
bidimensionale comprehensive*

Fluopyram	0,05	110	6	109	10	110	7	64
	0,5	96	2	90	6	86	8	
DDD (somma di isomeri)	0,05	114	2	34	8	35	7	-44
	0,5	107	6	38	4	36	6	
Bromophos-ethyl	0,05	110	5	29	10	29	8	-60
	0,5	104	6	27	7	29	10	
trans-Chlordane	0,05	89	8	20	11	20	9	-71
	0,5	93	6	23	5	22	7	
2,4'-DDE	0,05	99	2	27	4	27	3	-69
	0,5	96	4	24	5	23	5	
Chlorbenseide	0,05	101	7	26	5	25	6	-73
	0,5	102	3	29	5	29	5	
cis-Chlordane	0,05	108	4	27	6	27	5	-69
	0,5	98	2	27	1	28	7	
Tetrachlorvinphos	0,05	105	5	40	10	41	9	-79
	0,5	104	2	57	4	53	10	
cis-Bromfenvinphos	0,05	88	3	44	9	47	12	-68
	0,5	83	4	53	2	57	12	
cis-Chlorfenvinphos	0,05	91	1	41	11	42	9	-75
	0,5	104	3	53	7	54	7	
Prothiofos	0,05	112	2	89	2	92	7	-64
	0,5	99	5	106	6	105	5	
Chlorfenson	0,05	112	4	48	9	52	7	-26
	0,5	111	4	50	2	49	3	
Profenofos	0,05	NQ	-	NQ	-	NQ	-	18
	0,5	100	8	38	8	37	8	
4,4'-DDE	0,05	109	7	18	7	18	9	-98
	0,5	114	1	18	10	19	7	

*Analisi della contaminazione da pesticidi in oli vegetali mediante gascromatografia
bidimensionale comprehensive*

Buprofezin	0,05	96	7	32	4	35	10	-53
	0,5	100	5	43	5	42	5	
Kresoxim-methyl	0,05	117	1	82	1	81	4	-7
	0,5	115	3	92	1	90	3	
2,4'-DDT	0,05	93	2	34	3	34	4	-89
	0,5	95	1	42	7	40	7	
Chlorfenapyr	0,05	NQ	-	NQ	-	NQ	-	-39
	0,5	104	9	70	8	73	6	
Fludioxonil	0,05	109	4	84	9	91	9	-15
	0,5	93	3	86	2	84	2	
Ethylan	0,05	111	3	42	9	44	8	-48
	0,5	97	3	38	6	37	5	
4,4'-DDT	0,05	108	3	29	10	29	8	-78
	0,5	103	3	26	7	26	7	
Ancymidol	0,05	NQ	-	NQ	-	NQ	-	-33
	0,5	103	3	55	21	53	12	
Sulprofos	0,05	106	3	48	9	46	9	-57
	0,5	107	2	43	4	42	7	
Trifloxystrobin	0,05	114	5	74	6	75	5	-16
	0,5	104	1	94	3	91	6	
Fensulfothion	0,05	115	2	73	9	75	8	27
	0,5	104	2	81	6	84	4	
Endosulfan-sulfate	0,05	NQ	-	NQ	-	NQ	-	-96
	0,5	105	5	75	9	75	8	
Propiconazole	0,05	NQ	-	NQ	-	NQ	-	-58
	0,5	102	6	63	18	65	14	
Spiromesifen	0,05	NQ	-	NQ	-	NQ	-	-96
	0,5	103	7	54	3	53	5	

*Analisi della contaminazione da pesticidi in oli vegetali mediante gascromatografia
bidimensionale comprehensive*

Fenhexamid	0,05	NQ	-	NQ	-	NQ	-	17
	0,5	99	2	47	12	44	10	
Piperonyl-butoxide	0,05	110	3	58	7	57	7	-34
	0,5	97	2	53	7	56	7	
Phenothrin (somma di isomeri)	0,05	NQ	-	NQ	-	NQ	-	-79
	0,5	91	6	93	6	96	8	
Tebuconazole	0,05	113	3	37	4	37	5	-64
	0,5	100	4	44	6	45	7	
Bifenthrin	0,05	108	5	43	10	43	7	-44
	0,5	96	7	38	7	37	9	
Tetramethrin (somma di isomeri)	0,05	101	4	76	7	74	8	-58
	0,5	102	4	69	8	69	7	
Phosmet	0,05	97	8	67	12	71	11	-24
	0,5	91	4	73	2	77	7	
Bifenazate	0,05	NQ	-	NQ	-	NQ	-	-65
	0,5	109	1	100	10	101	7	
Chlorantraniliprole	0,05	93	5	53	10	54	10	-22
	0,5	101	4	70	4	69	8	
Acetamiprid	0,05	114	3	80	6	82	45	22
	0,5	103	1	97	2	96	3	
Leptophos	0,05	NQ	NQ	NQ	-	NQ	-	-76
	0,5	110	8	23	11	23	12	
Tetradifon	0,05	NQ	-	NQ	-	NQ	-	-60
	0,5	110	3	38	8	37	6	
trans-Permethrin	0,05	NQ	-	NQ	-	NQ	-	-44
	0,5	100	8	41	10	39	10	
cis-Permethrin	0,05	NQ	-	NQ	-	NQ	-	-42
	0,5	96	3	38	10	37	8	

*Analisi della contaminazione da pesticidi in oli vegetali mediante gascromatografia
bidimensionale comprehensive*

Pyridaben	0,05	114	1	21	7	22	7	-51
	0,5	104	5	32	8	32	5	
Coumaphos	0,05	83	7	60	6	60	5	-50
	0,5	107	3	69	7	68	7	
Cyfluthrin I	0,05	NQ	-	NQ	-	NQ	-	-59
	0,5	105	7	67	12	72	11	
Cyfluthrin II	0,05	NQ	-	NQ	-	NQ	-	-57
	0,5	98	8	53	10	52	7	
Cypermethrin (somma di isomeri)	0,05	NQ	-	NQ	-	NQ	-	-59
	0,5	111	4	66	5	60	12	
Boscalid	0,05	98	8	56	11	57	9	4
	0,5	109	2	79	2	78	2	
Etofenprox	0,05	96	4	33	6	34	8	-64
	0,5	104	5	35	8	35	8	
Benzovindiflupyr	0,05	94	8	80	2	85	7	56
	0,5	99	5	80	8	81	8	
Fenvalerate	0,05	NQ	-	NQ	-	NQ	-	-57
	0,5	102	3	59	3	60	3	
Pyraclostrobin	0,05	114	2	23	5	22	6	-54
	0,5	102	5	28	7	29	9	
Deltamethrin	0,05	NQ	-	NQ	-	NQ	-	-69
	0,5	91	2	34	3	34	3	
Azoxyastrobin	0,05	90	5	92	7	96	8	57
	0,5	102	1	89	3	92	4	
Dimethomorph I	0,05	101	5	85	4	83	5	5
	0,5	98	9	84	8	84	10	
Dimethomorph II	0,05	106	1	86	7	83	7	3
	0,5	97	3	85	7	86	5	

NQ: non quantificabile.

La valutazione della *recovery* di estrazione è stata valutata sia *intra-day* che *inter-day* eseguendo rispettivamente cinque analisi nello stesso giorno e analisi in triplicato per tre giorni consecutivi. Gli studi sono stati condotti analizzando campioni fortificati a livelli di concentrazione di 0,05 mg kg⁻¹ e 0,5 mg kg⁻¹, ed in particolare confrontando le aree normalizzate degli analiti relative all'HSO fortificato ed estratto con i valori ottenuti a seguito di una fortificazione post-estrazione. Anche in questo caso, per i 21 pesticidi con un LoQ maggiore di 0,05 mg kg⁻¹, la *recovery* è stata calcolata solo a 0,5 mg kg⁻¹. Considerando la *recovery intra-day*, a 0,05 mg kg⁻¹ sono stati misurati valori compresi tra 11% (hexaclorobenzene) e 127% (MGK 264), mentre a 0,5 mg kg⁻¹, i valori variavano dal 14% (hexachlorobenzene) al 122% (MGK 264). Per quanto riguarda la valutazione *inter-day*, a 0,05 mg kg⁻¹ i valori erano compresi tra 11% (hexaclorobenzene) e 127% (MGK 264), mentre a 0,5 mg kg⁻¹ sono stati ottenuti valori contenuti nell'intervallo 15-123%. Come previsto, in base ai loro elevati valori di log k_{ow} , i pesticidi lipofili come, ad esempio, hexaclorobenzene (log k_{ow} : 5,7), chlordane (log k_{ow} : 6,1), chlorpyrifos (log k_{ow} : 4,9), bifenthrin (log k_{ow} : 6,0) ed etofenprox (log k_{ow} : 7,0) sono stati recuperati solo parzialmente dall'HSO (14-40% di *recovery*). Invece, per i pesticidi caratterizzati da bassi valori di log k_{ow} , come nel caso di metalaxyl (log k_{ow} : 1,6), acetamiprid (log k_{ow} : 0,8), thiametoxam (log k_{ow} : 0,1), propoxur (log k_{ow} : 1,5) e flonicamid (log k_{ow} : 0,3), i valori di *recovery* erano molto più elevati (90-96%). Va infine precisato che, nonostante per molti pesticidi i valori di *recovery* non rientrino nell'intervallo ottimale del 70-120%, secondo quanto previsto dalle linee guida SANTE/11312/2021 [23], i risultati ottenuti possono essere accettati in quanto caratterizzati da una RSD soddisfacente sempre inferiore al 20%.

L'effetto matrice è stato calcolato come differenza tra la pendenza della retta di calibrazione MM e quella costruita in solvente (S), dividendo poi il risultato per la pendenza della retta S ed esprimendo i valori in percentuale (%ME). I valori %ME, riportati nella Tabella 7.2.2, variavano dal 98% (4,4'-DDE) al 184% (4,4'-dichlorobenzophenone), con 59 pesticidi caratterizzati da un valore negativo e 38 da uno positivo. Eseguendo un'analisi in modalità scansione di un estratto HSO non fortificato è stato possibile osservare come i valori %ME fossero influenzati dalla matrice coestratta.

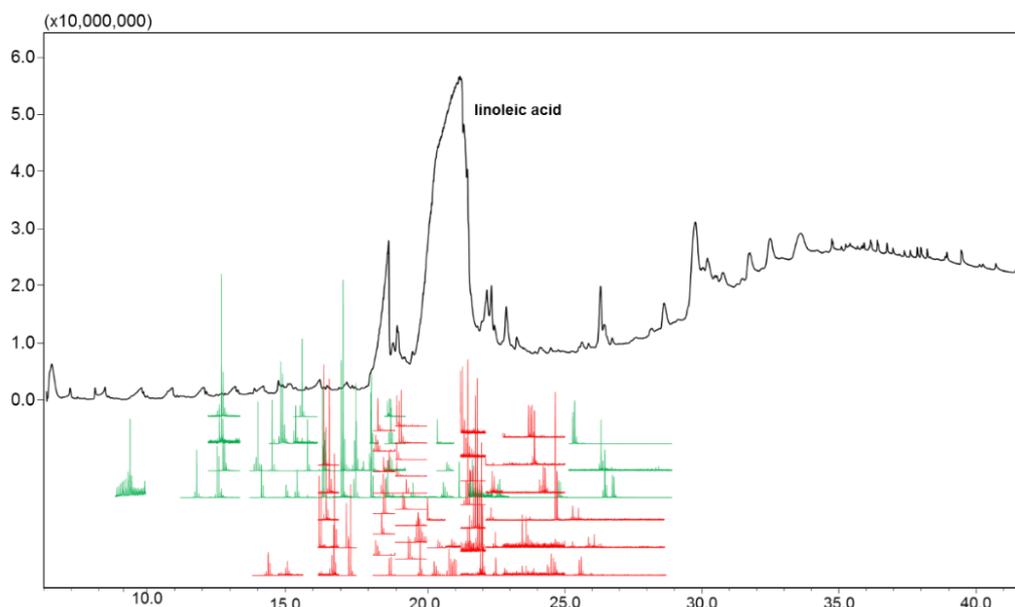


Figura 7.2.2. Confronto tra il cromatogramma a scansione di un HSO non fortificato e un cromatogramma nativo GCxGC-QqQMS (0.5 mg kg^{-1}), con i pesticidi caratterizzati da un %ME positivo e negativo, evidenziati rispettivamente in verde e rosso.

In particolare, come è possibile osservare in Figura 7.2.2, i pesticidi con valori %ME positivi (evidenziati in verde) sono stati rilevati principalmente nella parte iniziale del cromatogramma dove la presenza di interferenze coestratte dalla matrice era minore. Invece, durante l'eluizione della maggior parte degli analiti coestratti (circa 18-23 min) è stata osservata una intensa soppressione del segnale, con la maggior parte dei pesticidi (evidenziati in rosso) che mostravano un valore %ME negativo.

A questo punto, è stato effettuato un confronto tra i valori %ME ottenuti per l'HSO e quelli riportati nel paragrafo precedente relativi all'EVOO, impiegando la stessa tecnica estrattiva [20]. Osservando il cromatogramma acquisito in modalità scansione di un campione di EVOO (Figura 7.2.3), i segnali degli analiti coestratti, con una massima intensità di poco inferiore a 20.000.000 (squalene), risultano molto meno intensi rispetto a quelli del HSO, con una massima intensità di poco inferiore a 60.000.000 (acido linoleico). Confrontando i valori di %ME, per tutti i pesticidi presenti in comune tra i due studi si osserva sempre una soppressione del segnale. Ad esempio, nel caso del diazinon si è verificata una soppressione dal 132 al 16%, per il bromophos-ethyl dall'87 al -60% e per l'endosulfan-sulfate dal 103 al -96%. Va inoltre sottolineato che nel caso dell'EVOO i valori di %ME sono stati sempre positivi con un valore medio pari all'82%, mentre nel HSO il valore medio di %ME era pari a -4%.

Nell'estratto di HSO era presente una elevata quantità di acido linoleico. Infatti, in accordo con quanto riportato da Tura *et al.*, gli HSO sono caratterizzati da un elevato livello di acidità libera (circa 2,2%) rispetto a quanto previsto dalle normative europee per gli EVOO ($\leq 0.8\%$) [21,22].

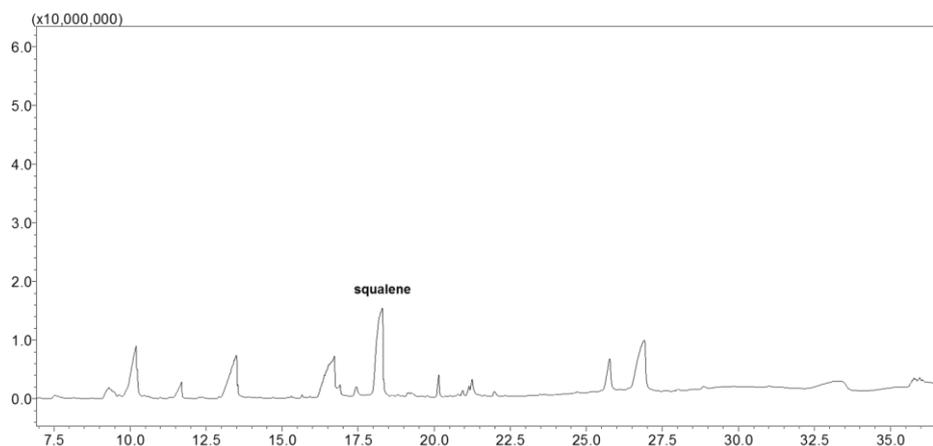


Figura 7.2.3. Cromatogramma acquisito in modalità a scansione di un EVOO non fortificato analizzato secondo il metodo cromatografico riportato in [21].

Il fenomeno della soppressione ionica, osservato nel presente studio, era stato già evidenziato da Rodriguez-Ramos *et al.* in una pubblicazione che presentava i vantaggi dell'utilizzo degli *analyte protectants* (AP) [23]. Essi vengono comunemente aggiunti alle soluzioni standard nel caso della costruzione di rette di calibrazione in solvente con lo scopo di preservare gli analiti sia da possibili degradazioni indotte durante il processo di iniezione sia da legami con eventuali siti attivi, presenti all'interno del sistema cromatografico, che altrimenti comprometterebbero la corretta rivelazione degli analiti stessi. Gli autori, tuttavia, osservarono che in corrispondenza della regione di eluizione della maggior parte degli AP coiniettati si verificava una riduzione dell'intensità di segnale degli analiti, presumibilmente a causa dell'elevata concentrazione di AP nella sorgente ionizzante con conseguente minore efficienza di ionizzazione e/o minore trasferimento degli analiti ionizzati all'analizzatore di massa.

A questo punto, utilizzando la preparazione del campione prevista dal metodo, è stata calcolata la quantità di matrice coestratta sia per l'HSO che per l'EVOO. Per ottenere una significativa quantità di estratto, 10 g di olio sono stati estratti con 10 mL di ACN. Nello specifico, dall'HSO sono stati estratti 0,188 g mentre per l'EVOO è stata ottenuta una quantità circa 5 volte inferiore (0,034 g). Considerando il volume di iniezione (4 μL), nella presente ricerca la matrice coestratta iniettata nel sistema era

pari a circa 107 µg, una quantità 70 volte superiore rispetto agli AP iniettati da Rodriguez-Ramos *et al.* (1,5 µg) giustificando, pertanto, la forte soppressione del segnale osservata.

7.2.3.2 Analisi di campioni commerciali

Dieci diversi campioni di HSO (S1-S10) sono stati analizzati utilizzando il metodo proposto. Come mostrato nella Tabella 7.2.3, quattro dei campioni analizzati erano contaminati da almeno tre pesticidi. Nello specifico, il methoprene è stato quantificato solo in S4, con una concentrazione di 0,15 mg kg⁻¹ (al di sotto del LMR europeo). Il pesticida tetramethrin è stato rilevato in quattro campioni nell'intervallo 0,13-0,24 mg kg⁻¹ (sempre al di sopra del LMR europeo). Solo il campione S1 era contaminato da bifenazate a una concentrazione di 0,98 mg kg⁻¹ (superiore al LMR europeo e a quello canadese). Il phenothrin è stato rilevato in quattro campioni nell'intervallo 0,37-0,77 mg kg⁻¹ (sempre al di sopra del LMR europeo). Il pyridaben è stato rilevato in S3, S4 e S7 a concentrazioni rispettivamente di 0,15, 0,16 e 0,18 mg kg⁻¹ (sopra il LMR europeo e quello canadese). Infine, il dimetomorph I è stato quantificato in S4 ad una concentrazione di 0,14 mg kg⁻¹ (sopra il LMR europeo), mentre il dimetomorph II era presente nei campioni S1 e S4 rispettivamente a 0,02 e 0,16 mg kg⁻¹ (superiore al LMR europeo).

Tabella 7.2.3. Pesticidi quantificati nei campioni analizzati (mg kg⁻¹), assieme a RSD (in parentesi) ed LMR (mg kg⁻¹).

Analita	LMR	S1	S3	S4	S7
Methoprene	ND ^{a,b} /0,17 ^c	-	-	0,15 (3)	-
Phenothrin somma di isomeri	ND ^{a,b} /0,03 ^c	0,61 (5)	0,60 (4)	0,77 (5)	0,37 (4)
Tetramethrin somma di isomeri	ND ^{a,b} /0,03 ^c	0,13 (4)	0,24 (4)	0,18 (3)	0,17 (3)
Bifenazate	5 ^a /0,01 ^b /0,17 ^c	0,98 (1)	-	-	-
Pyridaben	3 ^a /0,02 ^b /0,03 ^c	-	0,15 (2)	0,16 (1)	0,18 (2)
Dimethomorph I	20 ^a /ND ^b /0,07 ^c	-	-	0,14 (3)	-
Dimethomorph II	20 ^a /ND ^b /0,07 ^c	0,02 (1)	-	0,16 (2)	-

ND: non disponibile; ^a: California; ^b: Canada; ^c: Europa.

In conclusione, tutti i pesticidi rilevati (tranne due) superavano i limiti imposti dalla legislazione europea. In Figura 7.2.4 sono riportate le espansioni dei cinque pesticidi determinati nel campione maggiormente contaminato (S4).

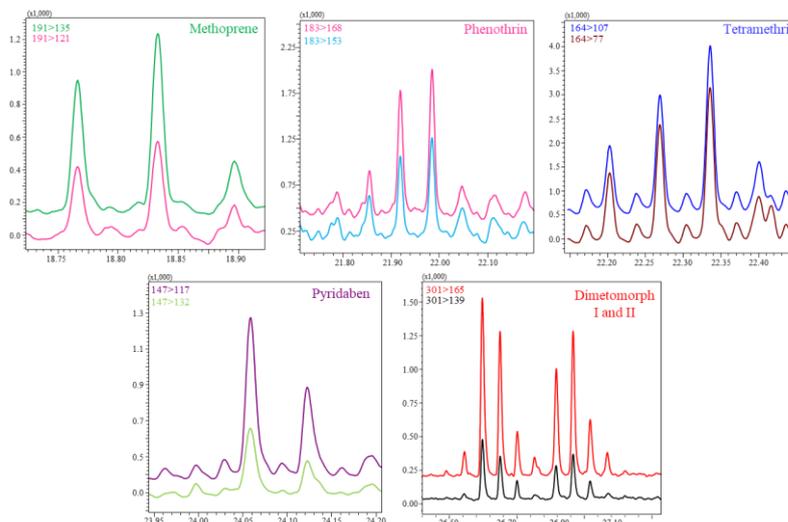


Figura 7.2.4. Espansioni del cromatogramma GC×GC-QqQMS relative ai pesticidi quantificati nel S4.

7.2.4 Conclusioni

Un totale di circa 300 analisi è stato eseguito durante l’ottimizzazione e la validazione del presente studio senza osservare alcun effetto negativo sulle capacità separative della colonna analitica né riduzioni dei valori *s/n*. Inoltre, è stato utilizzato lo stesso QqQMS impiegato in recenti pubblicazioni [20,24], senza effettuare nessuna manutenzione o pulizia della sorgente ionizzante o del sistema di lenti.

È importante evidenziare che, data l’assenza di fasi di purificazione durante la preparazione del campione, l’analisi multiresiduale di pesticidi in una matrice così estremamente complessa è risultata fortemente influenzata dall’elevata quantità di matrice coestratta e iniettata nel sistema a seguito del fenomeno della soppressione ionica. I risultati ottenuti dovrebbero, pertanto, portare la comunità scientifica a prestare una maggiore attenzione per le analisi in tracce. Tenendo conto di questo concetto, la calibrazione eseguita mediante costruzione di rette di calibrazione in solvente con l’aggiunta di AP potrebbe comportare degli errori di quantificazione.

L’analisi di dieci campioni commerciali ha mostrato la presenza di sette residui di pesticidi in quattro di essi, a livelli di concentrazione tra 0,02 e 0,98 mg kg⁻¹, la maggior parte dei quali oltre i limiti residuali previsti dal regolamento europeo.

Riferimenti Bibliografici

- [1] European Commission Agriculture and rural development. Available online: https://agriculture.ec.europa.eu/farming/crop-productions-and-plant-based-products/hemp_en#definitionandprovisions.
- [2] FDA Regulation of cannabis and cannabis-derived products, including cannabidiol (CBD). Available online: <https://www.fda.gov/news-events/public-health-focus/fda-regulation-cannabis-and-cannabis-derived-productsincluding-cannabidiol-cbd#whatare>.
- [3] T. Glivar, J. Erzen, S. Kreft, M. Zagozen, A. Cerenak, B. Ceh, E.T. Benkovic. Cannabinoid content in industrial hemp (*Cannabis sativa* L.) varieties grown in Slovenia. *Ind. Crop. Prod.*, 2020, 145, 112082,
- [4] G. Crini, E. Lichtfouse, G. Chanet, N. Morin-Crini. Applications of hemp in textiles, paper industry, insulation and building materials, horticulture, animal nutrition, food and beverages, nutraceuticals, cosmetics and hygiene, medicine, agrochemistry, energy production and environment: a review. *Environ. Chem. Lett.*, 2020, 18, 1451-1476.
- [5] European Commission EU novel foods. Available online: https://ec.europa.eu/food/safety/novel_food_en.
- [6] J.C. Callaway. Hempseed as a nutritional resource: an overview. *Euphytica*, 2004, 140, 65-72.
- [7] B. Matthaus, L. Brühl. Virgin hemp seed oil: an interesting niche product. *Eur. J. Lipid Sci. Tech.*, 2008, 110, 655-661.
- [8] A. Flynn, R. Marchelli, H. Przyrembel. Scientific Opinion of the panel on dietetic products, nutrition, and allergies on a request from the Commission related to labelling reference intake values for n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acid. *EFSA Journal*, 2009, 1176, 1-11.
- [9] Industrial hemp market size, share & trends analysis report by product (seeds, fiber, shivs), by application (animal care, textiles, personal care), by region (North America,

APAC), and segment forecasts, 2022-2030. Available online: <https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/industrial-hemp-market>.

[10] A. Taylor, J.W. Birkett. Pesticides in cannabis: a review of analytical and toxicological considerations. *Drug Test. Anal.*, 2020, 12, 180-190,

[11] Government of Canada. Mandatory cannabis testing for pesticide active ingredients: list and limits. Published: august 30, 2019. <https://www.canada.ca/en/public-health/services/publications/drugs-health-products/cannabis-testing-pesticide-requirements.html>.

[12] Bureau of cannabis control text of regulations California code of regulations title 16 division 42. Bureau of cannabis control. www.bcc.ca.gov.

[13] Pesticide residues Regulation (EC) No 396/200. <https://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticides-database/start/screen/mrls/latest>.

[14] Information note on Article 20 of Regulation (EC) No 396/2005 as regards processing factors, processed and composite food and feed. SANTE/10704/2021. Brussels, 22/02/2022.

[15] C. Da Porto, D. Decorti, A. Natolino. Potential oil yield, fatty acid composition, and oxidation stability of the hempseed oil from four *Cannabis sativa* L. cultivars. *J. Diet. Suppl.*, 2015, 12, 1-10.

[16] J.R. Moulins, M. Blais, K. Montsion, J. Tully, W. Mohan, M. Gagnon, T. Mcritchie, K. Kwong, N. Snider, D.R. Blais. Multiresidue method of analysis of pesticides in medical cannabis. *J. AOAC Int.*, 2018, 101, 1948-1960,

[17] N. Michlig, S.J. Lehotay, A.R. Lightfield, H. Beldomenico, M.R. Repetti, Validation of a high-throughput method for analysis of pesticide residues in hemp and hemp products, *J. Chromatogr. A*, 2021, 1645, 462097.

[18] A. Kasperkiewicz, J. Pawliszyn, Multi-class pesticide analysis in cannabis oil using coated blade spray and solid-phase microextraction with liquid chromatography coupled to mass spectrometry. *Talanta*, 2021, 225, 122036.

- [19] A. Mostafa, T. Gorecki. Sensitivity of comprehensive two-dimensional gaschromatography (GC×GC) versus one-dimensional gas chromatography (1D GC). *LC GC Eur.*, 2013, 26, 672-679.
- [20] A. Arena, M. Zoccali, L. Mondello, P.Q. Tranchida. A method for the determination of 70 pesticides in extra virgin olive oil based on a limited-volume solvent extraction step prior to comprehensive two-dimensional gas chromatography tandem mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.*, 2022, 415, 2459-2469,
- [21] M. Tura, M. Mandrioli, E. Valli, T. Gallina Toschi. Quality indexes and composition of 13 commercial hemp seed oils. *J. Food Compos. Anal.*, 2023, 117, 105112.
- [22] Commission implementing Regulation (EU) No 1348/2013 of 16 December 2013 amending Regulation (EEC) No 2568/91 on the characteristics of olive oil and olive-residue oil and on the relevant methods of analysis. *Off. J. Eur. Union L* (2013) 338/31.
- [23] R. Rodríguez-Ramos, S.J. Lehotay, N. Michlig, B. Socas-Rodríguez, M.A. Rodríguez-Delgado, Critical review and re-assessment of analyte protectants in gaschromatography. *J. Chromatogr. A*, 2020, 1632, 461596.
- [24] A. Arena, M. Zoccali, L. Mondello, P.Q. Tranchida. Direct analysis of phthalate esters in vegetable oils by means of comprehensive two-dimensional gaschromatography combined with triple quadrupole mass spectrometry. *Food Chem.*, 2022, 396, 133721.

CAPITOLO 8

Determinazione di idrocarburi policiclici aromatici in oli extra vergine di oliva mediante cromatografia multidimensionale LC-GC

8.1 Introduzione

Secondo quanto già riportato nel Capitolo 4, gli idrocarburi policiclici aromatici (IPA) sono un'ampia classe di composti organici formati da due o più anelli benzenici condensati, organizzati in diverse configurazioni strutturali [1]. Data la loro elevata tossicità, correlata principalmente agli effetti mutageni, immunosoppressori e cancerogeni, è necessario lo sviluppo di sistemi di sorveglianza per monitorare le fonti di esposizione umana, sia ambientali che alimentari. Per i non fumatori, queste ultime rappresentano la fonte principale pari a oltre il 70% [2].

A causa della natura lipofila degli IPA, la loro presenza negli oli vegetali è stata ampiamente studiata [3-5]. Tra questi l'olio extravergine di oliva (EVOO) rappresenta un prodotto di elevata qualità nutrizionale ampiamente consumato in tutto il mondo per le sue innumerevoli proprietà benefiche [6]. Negli EVOO può verificarsi una contaminazione diretta, durante la lavorazione al frantoio, o indiretta dovuta alla contaminazione superficiale delle olive per via dell'inquinamento atmosferico [7].

Da un punto di vista legislativo, il Regolamento 835 del 2011 ha stabilito un livello massimo pari a $2,0 \mu\text{g kg}^{-1}$ per il benzo[a]pirene (BaP) ed un limite di $10,0 \mu\text{g kg}^{-1}$ per la somma di BaP, benz[a]antracene, benzo[b]fluorantene e crisene, chiamati IPA4 [8].

Diversi metodi ufficiali per l'analisi degli IPA negli oli vegetali sono stati rilasciati nel corso degli ultimi anni. Per ulteriori informazioni, il lettore è indirizzato alla lettura della recente review [5]. In generale, tutti i metodi proposti (eccetto uno) richiedono almeno una fase *off-line* di preparazione del campione seguita da analisi mediante cromatografia liquida ad alte prestazioni (HPLC) o gascromatografia (GC). Ad esempio, la normativa ISO 22959 "*Animal and Vegetable Fats and Oils-Determination of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by on-Line Donor-Acceptor Complex Chromatography (DACC) and HPLC with Fluorescence Detection*" prevede un'analisi *on-line* LC-LC accoppiando una colonna DACC, utilizzata per trattenere gli IPA *target*, successivamente trasferiti in modalità *backflush* ad una seconda colonna HPLC [9]. Come noto, i metodi *on-line* presentano notevoli vantaggi rispetto a quelli *off-line*, in particolare riduzione del rischio di perdita o contaminazione accidentale del campione, capacità di effettuare analisi in *batch* migliorando così l'accuratezza e la precisione, minore quantità di solventi utilizzati e significativa riduzione dei tempi di analisi [10]. Nell'ambito dei metodi *on-line*, è certamente degno di nota

l'accoppiamento LC-GC, sebbene siano pochi i metodi presenti in letteratura. Il primo studio per l'analisi di 8 IPA in oli vegetali utilizzando la tecnica LC-GC accoppiata a spettrometria di massa (MS) è stato pubblicato nel 1991 [11]. Operando in fase normale, una colonna LC di silice è stata utilizzata per il pretrattamento dei campioni; quindi, la frazione contenente gli analiti *target* è stata trasferita al gascromatografo utilizzando un'interfaccia *loop-type*. Con il suddetto metodo furono raggiunti limiti di rilevabilità (LoD) di circa 20 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e circa 0,5 $\mu\text{g kg}^{-1}$ lavorando, rispettivamente, nelle modalità di acquisizione *scan* e *selected ion monitoring* (SIM).

Nel 2015, Nestola *et al.*, per l'analisi degli IPA negli alimenti, proposero un metodo bidimensionale LC-LC accoppiato a GC con rivelatore MS a tempo di volo [12]. La tecnica prevedeva l'accoppiamento di due diverse fasi stazionarie LC, un gel di silice e una silice modificata accettrice di elettroni π , raggiungendo limiti di quantificazione (LoQ) inferiori a 0,1 $\mu\text{g kg}^{-1}$ per gli IPA prioritari dell'UE.

Lo scopo della presente ricerca è stato lo sviluppo di un metodo LC-GC semplificato, caratterizzato da un ridotto consumo di solventi organici, accoppiato ad uno spettrometro di massa a triplo quadrupolo (QqQMS), sfruttando così la maggiore selettività della MS *tandem* ed evitando sia l'utilizzo di una seconda dimensione LC che di fasi *off-line* di purificazione del campione. Nello specifico, per un rilevamento selettivo dei 15+1 IPA prioritari dell'UE in campioni di EVOO è stata impiegata la modalità di acquisizione *pseudo-multiple reaction monitoring* (pseudo-MRM) [13].

8.2 Parte sperimentale

8.2.1 Reagenti

I solventi esano (per HPLC e GC, grado $\geq 97\%$), diclorometano (CH_2Cl_2 , grado $\geq 99,9\%$) e lo standard benzo[a]pirene- d_{12} sono stati acquistati da Merck Life Science (Merck KGaA, Darmstadt, Germania). La miscela certificata di IPA "EU 15+1", contenente 16 componenti, quali benz[a]antracene (BaA), benzo[a]pirene (BaP), benzo[b]fluorantene (BbFA), benzo[c]fluorene (BcFL), benzo[ghi]perilene (BghiP), benzo[j]fluorantene (BjFA), benzo[k]fluorantene (BkFA), crisene (CHR), ciclopenta[cd]pirene (CPP), dibenzo[a,e]pirene (DBaeP), dibenzo[a,h]antracene (DBahA), dibenzo[a,h]pirene (DBahP), dibenzo[a,i]pirene (DBaiP), dibenzo[a,l]pirene (DBalP), indeno[1,2,3-cd]pirene (IP), 5-metilcrisene (5-MCH)], è stata acquistata da Restek Corporation (Bellefonte, Stati Uniti).

Sono state preparate delle soluzioni madre in esano sia per la miscela di IPA (10 mg L⁻¹) che per lo standard interno (IS) benzo[a]pirene-d₁₂ (10000 mg L⁻¹). Le soluzioni sono state poi conservate in fiale di vetro ambrato a 4 °C fino all'utilizzo.

8.2.2 Preparazione del campione

La preparazione del campione ha previsto una singola fase di diluizione: 250 mg di EVOO sono stati pesati in un matraccio da 1 mL, a cui sono stati aggiunti 25 µL di IS (100 µg L⁻¹) ed entrambi sono stati diluiti fino ad un volume finale di 1 mL con esano. Dal momento che un EVOO certificato contenente IPA non era disponibile in commercio, per la costruzione delle rette di calibrazione in matrice (MM) è stato utilizzato un EVOO privo di IPA rilevabili. Per la valutazione dell'effetto matrice è stata invece eseguita una calibrazione in solvente preparando delle soluzioni in esano.

8.2.3 Strumentazione analitica

Lo strumento LC-GC impiegato per le analisi era composto da un sistema Shimadzu Prominence LC-20A (Kyoto, Giappone) equipaggiato con: un *degaser* DGU-20A5R, due pompe LC-20AD, un autocampionatore SIL-20AC, un forno CTO-20AC, un rilevatore a serie di fotodiodi (PDA) SPD-M30A e un modulo di comunicazione CBM-20A. Come interfaccia è stata utilizzata una valvola a sei porte e due posizioni (FCV-20AH₂, Shimadzu), controllata dal software LC. È stato utilizzato un gascromatografo GC2010 (Shimadzu), dotato di un iniettore *split/splitless* (per la fornitura del gas *carrier*) e di uno spettrometro di massa a triplo quadropolo (QqQ MS).

La colonna LC, una LiChrospher Si 60 Å (Merck Life Science), aveva le seguenti dimensioni: 25 cm × 2,1 mm ID × 5 µm d_p. È stato impiegato un flusso pari a 0,3 mL min⁻¹ (in fase normale) con il seguente gradiente: 100% esano da 0 a 0,2 min, aumentando fino al 30% di CH₂Cl₂ da 0,2 a 0,5 min. Dopo 8 minuti, la colonna è stata lavata in *backflush* con l'80% di CH₂Cl₂ (per 6 min ad un flusso di 0,5 mL min⁻¹) e ricondizionata per 6 min con esano. Il volume di iniezione era di 100 µL. La frazione contenente gli IPA target è stata trasferita da 5,30 a 7,00 min.

Il trasferimento LC-GC è stato eseguito utilizzando un'interfaccia Y precedentemente realizzata in laboratorio [14], accoppiando la tecnica della *retention gap* e l'approccio del *partially concurrent eluent evaporation*. Per l'eliminazione dei vapori di solvente è stata utilizzata una valvola *solvent vapor exit* (SVE) a tre porte e

due posizioni, controllata dal software GC. Per quanto riguarda le colonne GC, una pre-colonna disattivata priva di fase stazionaria (10 m × 0,53 mm ID) è stata anteposta alla colonna analitica, una SLB-PAHms [virtualmente equivalente in polarità al poli(50% difenil/50%metilsilossano)] di dimensioni 30 m × 0,25 mm ID × 0,10 µm di (Merck Life Science). La temperatura del forno GC è stata programmata come segue: da 60°C (5 min) a 200°C a 10 °C min⁻¹, aumentata a 350°C a 5 °C min⁻¹ (tempo di analisi totale: 49 min). Il gas *carrier*, l'elio, è stato fornito ad una pressione iniziale di 80,2 kPa (3,3 min) aumentata a 120 kPa a 24 kPa min⁻¹, quindi a 182 kPa a 4,4 kPa min⁻¹ e infine a 247,2 kPa a 2,2 kPa min⁻¹. La velocità lineare media era di 50 cm s⁻¹. Nel QqQMS è stata utilizzata una ionizzazione a impatto elettronico (70 eV), con le temperature dell'interfaccia e della sorgente rispettivamente a 280°C e 250°C. Come gas di collisione è stato utilizzato argon ad una pressione di 200 kPa. Per l'ottimizzazione delle transizioni pseudo-MRM sono state testate diverse energie di collisione (CE), quali 1, 3, 7 e 9 eV. La Tabella 8.1 riporta le transizioni pseudo-MRM ed MRM impiegate, le CE e gli ioni selezionati per il confronto con la modalità di acquisizione SIM.

8.3 Risultati e discussioni

La presente ricerca ha avuto come obiettivo lo sviluppo di un metodo analitico *on-line* LC-GC per l'analisi dei 15+1 IPA dell'UE in oli EVO, senza far ricorso ad alcun tipo di pretrattamento del campione (a parte la diluizione), con lo scopo di soddisfare quanto più possibile le tendenze sostenibili della *green analytical chemistry* [15]. Considerando, inoltre, la totale automazione e la possibilità di eseguire analisi in *batch*, un ulteriore punto di forza del metodo è stato rappresentato dal considerevole risparmio di tempo rispetto alle classiche tecniche di preparazione del campione come, ad esempio, l'estrazione in fase solida.

8.3.1 Ottimizzazione del metodo

Considerando l'assenza di fasi di pretrattamento o purificazione del campione, la prima parte dello sviluppo del metodo ha previsto la valutazione della capacità di ritenzione della colonna LC, in modo da evitarne il sovraccarico di trigliceridi (principali componenti dell'EVOO) e consentire il trasferimento al GC di una frazione

quanto più pulita possibile contenente solo gli IPA *target* e priva di analiti che interferirebbero con l'analisi GC.

Tabella 8.1. Elenco degli analiti, transizioni *quantifier* (pseudo-MRM) e *qualifier* (MRM) [con energia di collisione - CE (eV)] e ioni impiegati per l'acquisizione *selected ion monitoring* (SIM).

Analita	Transizione <i>quantifier</i> pseudo-MRM (CE)	Transizione <i>qualifier</i> MRM (CE)	SIM 1	SIM 2	SIM 3
Benzo[<i>c</i>]fluorene	216>216 (3)	216>215 (22)	216	215	217
Benz[<i>a</i>]anthracene	228>228 (3)	228>226 (28)	228	226	229
Chrysene	228>228 (3)	228>226 (28)	228	226	229
Cyclopenta[<i>cd</i>]pyrene	226>226 (3)	226>224 (38)	226	224	227
5-Methylchrysene	242>242 (3)	242>239 (42)	242	239	241
Benzo[<i>b</i>]fluoranthene	252>252 (3)	252>250 (30)	252	250	253
Benzo[<i>j</i>]fluoranthene	252>252 (3)	252>250 (30)	252	250	253
Benzo[<i>k</i>]fluoranthene	252>252 (3)	252>250 (30)	252	250	253
Benzo[<i>a</i>]pyrene	252>252 (3)	252>250 (30)	252	250	253
Benzo[<i>a</i>]pyrene-d ₁₂ (IS)	264>264 (3)	264>262 (30)	264	262	274
Benzo[<i>ghi</i>]perylene	276>276 (3)	276>274 (34)	276	274	277
Dibenz[<i>a,h</i>]anthracene	278>278 (3)	278>276 (30)	278	276	279
Indeno[1,2,3- <i>cd</i>]pyrene	276>276 (3)	276>274 (34)	276	274	277
Dibenzo[<i>a,l</i>]pyrene	302>302 (3)	302>300 (36)	302	300	303
Dibenzo[<i>a,e</i>]pyrene	302>302 (3)	302>300 (36)	302	300	303
Dibenzo[<i>a,i</i>]pyrene	302>302 (3)	302>300 (36)	302	300	303
Dibenzo[<i>a,h</i>]pyrene	302>302 (3)	302>300 (36)	302	300	303

In base alla procedura di diluizione del campione e al volume di iniezione (100 µL di un EVOO diluito 1:4), una quantità assoluta di 25 mg di olio è stata iniettata. Scollegando il capillare in uscita dalla colonna LC, non è stata osservata perdita della capacità di ritenzione dei trigliceridi per almeno 8 minuti. Per ulteriore verifica, a seguito del trasferimento della frazione dall'LC al GC, è stato acquisito il cromatogramma *total ion current* di un campione di EVOO, che ha evidenziato come unico analita trasferito lo squalene, un idrocarburo lineare a 30 atomi di carbonio, pertanto, in grado di eluire nella stessa frazione degli IPA.

La fase successiva ha previsto l'ottimizzazione della finestra di eluizione degli IPA mediante l'iniezione di un campione di EVOO fortificato a 1000 µg kg⁻¹. L'eluizione è stata verificata monitorando la risposta del rivelatore PDA alla lunghezza

d'onda di 309 nm (Figura 8.1). La finestra di trasferimento è stata impostata da 5,3 minuti a 7,0 min, per un volume totale di 510 μL .

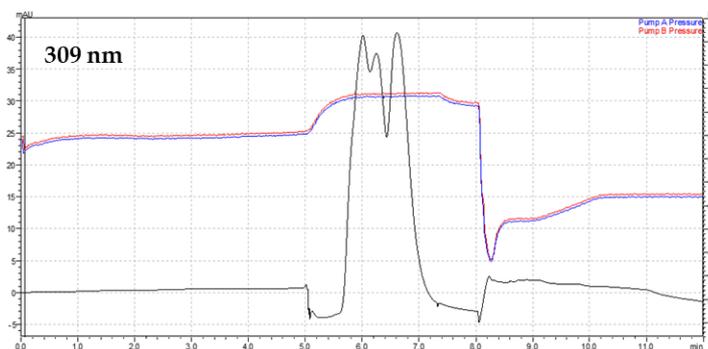


Figura 8.1. Cromatogramma LC acquisito al rivelatore PDA alla λ di 309 nm.

La frazione è stata trasferita al GC ad una temperatura del forno di 60 °C e una pressione del gas *carrier* di 80,2 kPa. La valvola SVE è stata lasciata aperta per 3,2 min per consentire la rimozione del solvente. In accordo con il *solvent trapping*, i vapori di solvente non devono essere completamente rimossi in modo tale che un sottile strato di liquido resti nella *retention gap*. Secondo il *phase soaking effect*, il conseguente rigonfiamento della fase stazionaria che avviene in testa alla colonna analitica ne determina un aumento del potere di ritenzione che favorisce la focalizzazione dei composti bassobollenti. Particolare attenzione è stata dedicata all'ottimizzazione di questa fase al fine di trovare il giusto compromesso tra il fenomeno di allargamento di banda (causato dall'elevato volume della frazione trasferita) e la parziale perdita dell'analita più volatile (BcFL).

Successivamente, testando diverse CE, sono state ottimizzate le transizioni pseudo-MRM. La modalità di acquisizione pseudo-MRM si basa sul monitoraggio di transizioni prive perdita di massa tra lo ione precursore e quello prodotto. Questo approccio si è dimostrato una valida alternativa alla classica modalità MRM per la determinazione degli IPA, strutture molto stabili costituite da anelli aromatici coniugati e, pertanto, prive di legami chimici labili che possano essere frammentati dall'energia applicata al gas di collisione [13]. Oltre all'assenza di frammentazione degli analiti *target*, la maggiore selettività della pseudo-MRM è dovuta alla riduzione delle interferenze isobare degli analiti coeluiti (aventi lo stesso m/z) che, invece, sono frammentati dalla CE. Inoltre, la selettività dell'approccio può essere “modulata”

modificando le CE. In particolare, aumentando la CE si può ottenere una maggiore selettività a scapito però della sensibilità.

La Figura 8.2 mostra l'ottimizzazione delle CE della transizione pseudo-MRM del BcFL (216>216). Considerando il rapporto segnale-rumore più elevato alla CE di 3 eV, ottenuto anche per il resto degli analiti, questa CE è stata scelta e applicata.

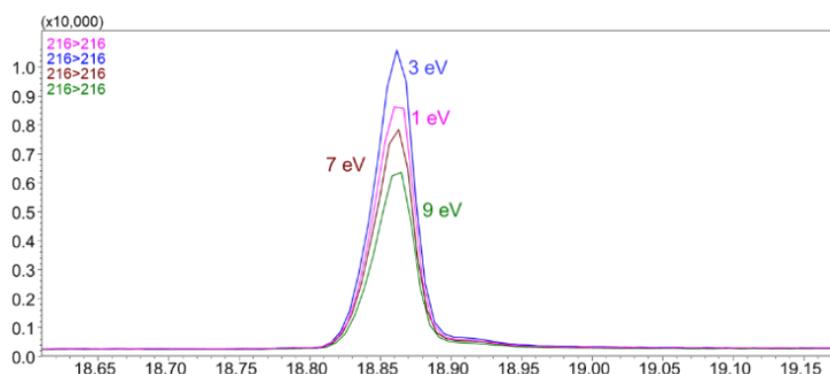


Figura 8.2. Espansione del cromatogramma relativo all'ottimizzazione della transizione pseudo-MRM del BcFL, alle CE di 1, 3, 7 e 9 eV.

Successivamente, considerando la selettività, è stato effettuato un confronto con la modalità di acquisizione SIM. La Figura 8.3 mostra due espansioni del cromatogramma di un EVOO fortificato ad una concentrazione di IPA di $20 \mu\text{g kg}^{-1}$. In particolare, la Figura 8.3A riporta l'espansione della regione di eluizione di BaA, CHR, CPP e 5-MCH (28,5-32,0 min). Come si può vedere, nella modalità di acquisizione SIM, BaA e CPP, monitorati dallo ione 228, risultavano caratterizzati da un'intensa deriva della linea di base rispetto alla modalità pseudo-MRM (transizione 228>228). Inoltre, la transizione pseudo-MRM del 5-MCH (242>242) appariva più "pulita" rispetto alla SIM, monitorata dallo ione 242. La maggiore selettività della pseudo-MRM appare evidente anche nella Figura 8.3B, che riporta l'espansione della regione di eluizione (39,0-41,25 min) di BghiP, DBahA e IP.

Il cromatogramma LC-GC di un campione di EVOO, fortificato ad un livello di concentrazione di $50 \mu\text{g kg}^{-1}$, è riportato nella Figura 8.4.

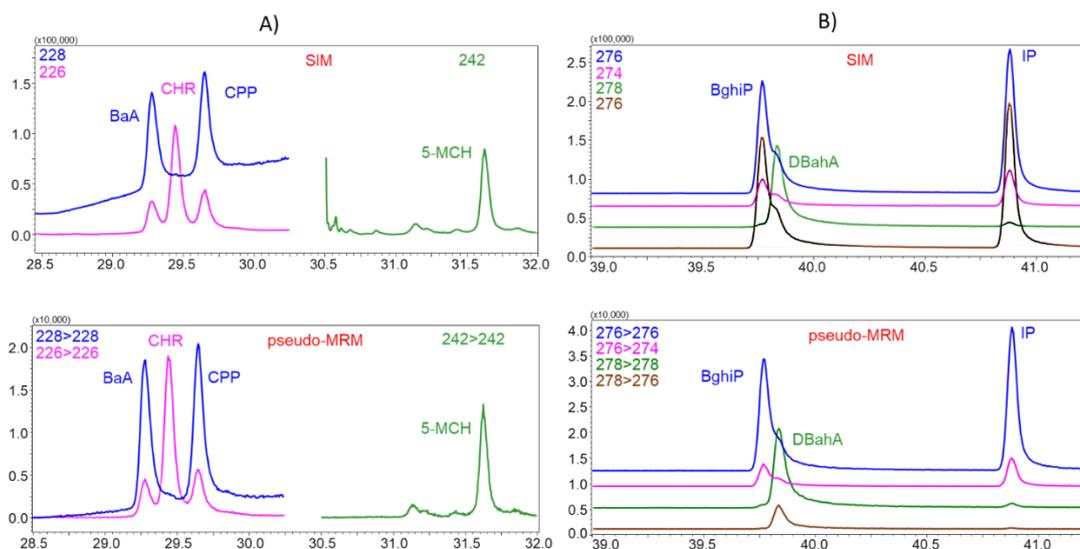


Figura 8.3. Confronto di due diverse espansioni del cromatogramma tra la modalità di acquisizione SIM (tracce superiori) e pseudo-MRM (tracce inferiori). Per i nomi dei composti fare riferimento alla Tabella 8.1.

8.3.2 *Figure di merito*

Il metodo sviluppato è stato valutato in termini di linearità dell'intervallo di calibrazione, LoD, LoQ, precisione *intra-day* ed *inter-day*, accuratezza ed effetto matrice. Sono state costruite curve di calibrazione MM da sei a otto punti ($n = 6$ al livello più basso). Gli intervalli di calibrazione, riportati in Tabella 8.2, sono stati scelti in relazione alla legislazione UE 835/2011, ovvero $2,0 \mu\text{g kg}^{-1}$ per BaP e $10,0 \mu\text{g kg}^{-1}$ per la somma di BaA, CHR e BbFA [8].

I valori LoD e LoQ sono stati calcolati moltiplicando la deviazione standard dell'area dell'analita normalizzata per l'area dell'IS deuterato, relativa all'EVOO fortificato al livello di concentrazione più basso, rispettivamente 3 e 10 volte, e quindi dividendo il risultato per la pendenza della curva di calibrazione MM. I valori LoD calcolati variavano da $0,107 \mu\text{g kg}^{-1}$ per BghiP a $1,180 \mu\text{g kg}^{-1}$ per BcFL ($0,146 \mu\text{g kg}^{-1}$, $0,185 \mu\text{g kg}^{-1}$, $0,188 \mu\text{g kg}^{-1}$ e $0,190 \mu\text{g kg}^{-1}$ rispettivamente per CHR, BaP, BbFA e BaA). I valori LoQ erano nell'intervallo $0,359$ - $3,934 \mu\text{g kg}^{-1}$, sempre per BghiP e BcFL ($0,488 \mu\text{g kg}^{-1}$, $0,619 \mu\text{g kg}^{-1}$, $0,627 \mu\text{g kg}^{-1}$ e $0,634 \mu\text{g kg}^{-1}$ rispettivamente per CHR, BaP, BbFA e BaA). Secondo il Regolamento della Commissione Europea 836/2011, i valori LoD per gli IPA4 dovrebbero essere $\leq 0,30 \mu\text{g kg}^{-1}$, mentre gli LoQ dovrebbero essere $\leq 0,90 \mu\text{g kg}^{-1}$ [16]. I valori ottenuti utilizzando il metodo proposto soddisfano questo criterio.

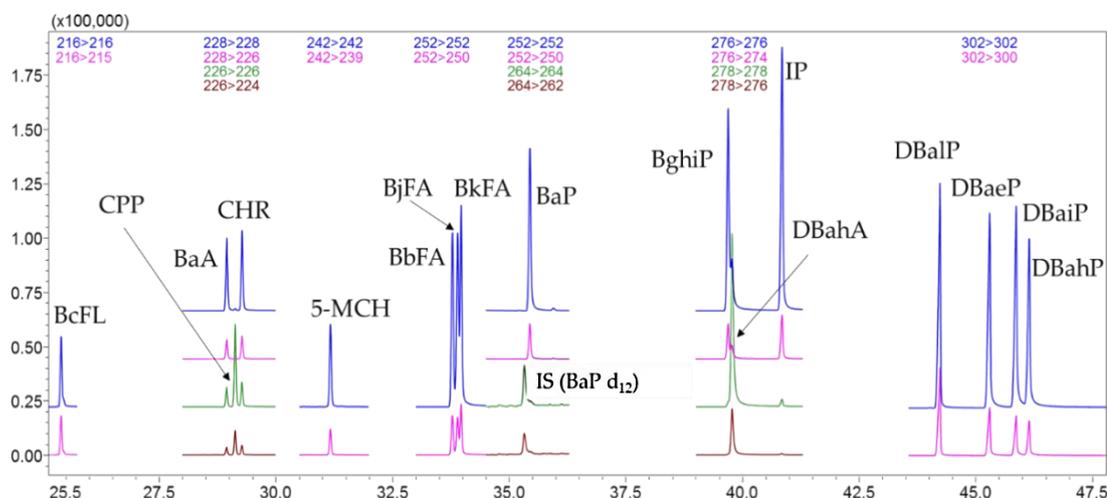


Figura 8.4. Cromatogramma LC-GC acquisito nella modalità pseudo-MRM/MRM di un campione di EVOO fortificato ad una concentrazione di $50 \mu\text{g kg}^{-1}$.

Tabella 8.2. Elenco degli analiti insieme alla rispettiva abbreviazione (Abbr.), LMR ($\mu\text{g kg}^{-1}$), intervallo di calibrazione ($\mu\text{g kg}^{-1}$) e valori LoD e LoQ ($\mu\text{g kg}^{-1}$).

Analita	Abbr.	LMR	Intervallo di calibrazione	LoD	LoQ
Benzo[c]fluorene	BcFL	ND	5-200	1,180	3,934
Benz[a]anthracene	BaA	10*	1-200	0,190	0,634
Cyclopenta[cd]pyrene	CPP	ND	1-200	0,290	0,989
Chrysene	CHR	10*	1-200	0,146	0,488
5-Methylchrysene	5-MCH	ND	1-200	0,276	0,920
Benzo[b]fluoranthene	BbFA	10*	1-200	0,188	0,627
Benzo[j]fluoranthene	BjFA	ND	1-200	0,296	0,980
Benzo[k]fluoranthene	BkFA	ND	1-200	0,290	0,969
Benzo[a]pyrene	BaP	2 (10*)	1-200	0,185	0,619
Benzo[ghi]perylene	BghiP	ND	1-200	0,107	0,359
Dibenz[a,h]anthracene	DBahA	ND	1-200	0,132	0,441
Indeno[1,2,3-cd]pyrene	IP	ND	1-200	0,149	0,498
Dibenzo[a,l]pyrene	DBalP	ND	1-200	0,160	0,540
Dibenzo[a,e]pyrene	DBaeP	ND	1-200	0,173	0,578
Dibenzo[a,i]pyrene	DBaiP	ND	5-200	0,647	2,157
Dibenzo[a,h]pyrene	DBahP	ND	5-200	0,697	2,323

*: in somma; ND: non disponibile

L'accuratezza del metodo è stata misurata fortificando un campione di EVOO, privo di IPA rilevabili, a due livelli di concentrazione (2 e $20 \mu\text{g kg}^{-1}$). Al livello di $2 \mu\text{g kg}^{-1}$, i valori di accuratezza, espressi come percentuale, erano compresi tra l'89,8% (BaP) e il 106,2% (DBaeP), con una deviazione standard relativa (RSD) compresa tra il 3,3% (BkFA) e il 9,7% (BaA). Al livello di concentrazione di $20 \mu\text{g kg}^{-1}$ i valori di accuratezza erano compresi tra l'86,9% (BaA) e il 109,3% (BkFA), con una RSD

compresa tra lo 0,6% (BaA) e il 7,4% (DBaeP). Va sottolineato che per i seguenti composti BcFL, DBaiP e DBahP, l'accuratezza è stata misurata solo al livello di 20 µg kg⁻¹, considerando che il loro LoQ era superiore a 2 µg kg⁻¹.

La precisione è stata valutata mediante iniezioni multiple di un campione di EVOO fortificato ai livelli di concentrazione di 2 µg kg⁻¹ e 20 µg kg⁻¹. Considerando la precisione *intra-day* (n = 6), a 2 µg kg⁻¹ i valori di precisione variavano dal 2,7% (DBalP) al 7,8% (BkFA), mentre, a 20 µg kg⁻¹, i valori variavano tra l'1,2% e il 9,7% rispettivamente per BaP e 5-MCH. Per il calcolo della precisione *inter-day*, sono state eseguite nove misurazioni indipendenti in tre giorni diversi (tre misurazioni al giorno). Al livello di concentrazione di 2 µg kg⁻¹, la precisione *inter-day* era compresa tra il 3,2% (BghiP) e il 9,3% (BaP), mentre aa 20 µg kg⁻¹, i valori erano compresi tra il 6,3 e il 10,8%, per BaP e 5-MCH.

Tabella 8.3. Figure di merito del metodo proposto.

Analita	Accuratezza 2 µg kg ⁻¹		Precisione <i>intra-day</i> 2 µg kg ⁻¹		Precisione <i>inter-day</i> 2 µg kg ⁻¹		Accuratezza 20 µg kg ⁻¹		Precisione <i>intra-day</i> 20 µg kg ⁻¹		Precisione <i>inter-day</i> 20 µg kg ⁻¹		Effetto matrice
	%	RSD	RSD	RSD	%	RSD	RSD	RSD	RSD	RSD	%		
BcFL	<LoQ	-	<LoQ	<LoQ	<LoQ	100,5	3,1	7,1	6,4	-63,2			
BaA	92,9	9,7	7,2	8,4	86,9	0,6	5,3	10,1	-62,6				
CPP	102,2	7,4	4,5	5,0	99,3	3,9	7,6	8,5	-67,9				
CHR	90,5	5,1	5,9	7,4	100,2	2,2	7,3	10,4	-61,5				
5-MCH	101,8	5,2	3,7	4,2	90,1	2,9	9,7	10,8	-65,1				
BbFA	94,8	5,7	5,9	6,0	92,2	6,6	7,3	7,2	-59,3				
BjFA	104,2	5,3	6,9	5,9	92,7	5,1	6,1	9,6	-61,5				
BkFA	96,3	3,3	7,8	5,8	109,3	2,9	7,2	7,1	-60,0				
BaP	89,8	9,4	4,8	9,3	93,5	5,1	1,2	6,3	-57,9				
BghiP	101,3	5,2	4,6	3,2	91,8	6,1	6,6	8,7	-37,6				
DBahA	95,6	3,8	5,0	5,3	92,2	7,4	5,1	10,4	-30,0				
IP	102,4	5,4	3,5	5,6	96,1	5,3	5,2	6,4	-50,0				
DBalP	105,6	4,1	2,7	4,3	95,5	4,5	6,7	8,6	-40,2				
DBaeP	106,2	8,8	6,3	7,8	98,1	7,4	8,8	9,9	-46,2				
DBaiP	<LoQ	-	<LoQ	<LoQ	107,8	0,9	7,8	8,6	-41,7				
DBahP	<LoQ	-	<LoQ	<LoQ	100,5	0,8	5,7	10,4	-42,3				

L'effetto matrice (ME) è stato calcolato come differenza tra la pendenza della curva di calibrazione MM e quella in solvente (SC) e dividendo poi il risultato per la pendenza della curva SC. il valore ottenuto è stato poi espresso in percentuale. Come è noto, la co-eluzione dei costituenti della matrice può interferire con la ionizzazione dei composti *target* nella sorgente ionizzante o col loro trasferimento all'analizzatore di massa, determinando un potenziamento o una soppressione degli ioni [17]. Come

precedentemente accennato, la finestra di trasferimento degli IPA era influenzata da un'intensa co-eluzione dello squalene. Per tutti gli analiti analizzati è stata osservata una soppressione del segnale, con valori di %ME compresi tra -67,9% per CPP e -30,0% per DBaHP, con un valore medio di -52,9%. Le figure di merito finora discusse sono riportate nelle Tabelle 8.2 e 8.3.

8.3.3 Analisi di campioni commerciali

Una volta completata la validazione del metodo, esso è stato applicato allo studio di 10 campioni di EVOO (S1-S10) acquistati nei supermercati locali.

Il composto BghiP è stato determinato in S4 e S7 ad una concentrazione di 1,86 e 1,83 $\mu\text{g kg}^{-1}$, rispettivamente. Il campione S7 è risultato contaminato da 2,04 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (RSD: 1,9) di IP. Il BaP è stato rilevati solo in un S3, sebbene ad una concentrazione inferiore al suo LoQ. Per quanto riguarda gli IPA4, in nessuno dei campioni analizzati non è mai stato superato il LMR definito dal Regolamento UE 835/2011.

8.4 Conclusioni

I risultati ottenuti hanno dimostrato che il metodo sviluppato consente il corretto rilevamento e la quantificazione dei 15+1 IPA prioritari dell'UE, fino a valori di LOD e LOQ di 0,107 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e 0,359 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Rispetto ai metodi presenti in letteratura, sono stati ottenuti risparmi significativi sia in termini di tempo di preparazione del campione che di consumo di solventi organici. In particolare, rispetto al metodo LC-LC-GC precedentemente pubblicato [12], considerando sia la preparazione del campione che le fasi mobili, sono stati consumati solo 7,2 mL di solventi (contro 17,8 mL).

La struttura altamente condensata e stabile degli IPA non risulta facilmente suscettibile all'analisi MRM a causa del numero limitato degli ioni figli e della loro bassa risposta. A tal proposito, è stato condotto un confronto tra le modalità di acquisizione SIM e pseudo-MRM, e quest'ultima è stata, infine, preferita ed utilizzata in questo studio per la sua maggiore selettività.

Riferimenti Bibliografici

- [1] Opinion of the Scientific Committee on Food on the risks to human health of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Food; SCF/CS/CNTM/PAH/29 ADD1 Final; European Commission: Brussels, Belgium, 2002.
- [2] T. Rengarajan, P. Rajendran, N. Nandakumar, B. Lokeshkumar, P. Rajendran, Nishigaki, Assessing Approaches of Human Inhalation Exposure to Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: A Review. *I. Asian Pac. J. Trop. Biomed.*, 2008, 42 (13), 2895-2921.
- [3] Z. Zelinkova, T. Wenzl. The Occurrence of 16 EPA PAHs in Food - A Review. *Polycycl. Aromat. Compd.*, 2015, 35, 248-284.
- [4] C.M. Sánchez-Arévalo, L. Olmo-Garcia. Polycyclic aromatic hydrocarbons in edible oils: An overview on sample preparation, determination strategies, and relative abundance of prevalent compounds. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.*, 2020, 19 (6), 3528-3573.
- [5] V. Bertoz, G. Purcaro, G. Conchione, S. Moret. A Review on the Occurrence and Analytical Determination of PAHs in Olive Oils. *Foods*, 2021, 10 (2), 324.
- [6] L. Dugo, M. Russo, F. Cacciola, F. Mandolfino, F. Salafia, A. Vilmercati, C. Fanali, M. Casale, L. De Gara, P. Dugo, L. Mondello, F. Rigano. Comparison of lipid profile of Italian Extra Virgin Olive Oils by using rapid chromatographic approaches. *F. Food Anal. Method.*, 2020, 13 (5), 1027-1041.
- [7] I. Mafra, J.S. Amaral, M.B.P.P. Oliveira. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in olive oils and other vegetable oils; potential for carcinogenesis. *Olives and Olive Oil in Health and Disease Prevention*; Academic Press, 2010; 489-498.
- [8] European Commission. Commission Regulation (EU) No 835/2011 of 19 August 2011 amending Regulation (EC) No 1881/2006 as regards maximum levels for polycyclic aromatic hydrocarbons in foodstuffs. *Off. J. Eur. Union* 2011, L215, 4-8.
- [9] International Organization for Standardization (ISO). *Animal and Vegetable Fats and Oils-Determination of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by On-Line Donor-Acceptor Complex Chromatography and HPLC with Fluorescence Detection*; ISO 22959:2009; ISO: Geneva, Switzerland, 2009.

- [10] M. Zoccali, P.Q. Tranchida, L. Mondello. On-Line Combination of High-Performance Liquid Chromatography with Comprehensive Two-Dimensional Gas Chromatography-Triple Quadrupole Mass Spectrometry: A Proof of Principle Study. *Anal. Chem.*, 2015, 87 (3), 1911-1918.
- [11] J.J. Vreuls, G.I. de Jong, U.A.T. Brinkman. On-line coupling of liquid chromatography, capillary gas chromatography and mass spectrometry for the determination and identification of polycyclic aromatic hydrocarbons in vegetable oils. *Chromatographia*. 1991, 31, 113-118.
- [12] M. Nestola, R. Friedrich, P. Bluhme, T.C. Schmidt. Universal Route to Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Analysis in Foodstuff: Two-Dimensional Heart-Cut Liquid Chromatography-Gas Chromatography-Mass Spectrometry. *Anal. Chem.*, 2015, 87, 6195-6203.
- [13] D. Shang, M. Kim, M. Haberl. Rapid and sensitive method for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in soils using pseudo multiple reaction monitoring gas chromatography/tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A.*, 2014, 1334, 118-125.
- [14] M. Zoccali, T.M.G Salerno, P.Q Tranchida, L. Mondello. Use of a low-cost, lab-made Y-interface for liquid-gas chromatography coupling for the analysis of mineral oils in food samples. *J. Chromatogr. A*, 2021, 1648, 462191.
- [15] A. Gałuszka, Z. Migaszewski, J. Namieśnik. The 12 principles of green analytical chemistry and the SIGNIFICANCE mnemonic of green analytical practices. *TrAC-Trends Anal. Chem.*, 2013, 50, 78-84.
- [16] Official Journal of the European Union L 215/9. COMMISSION REGULATION (EU) No 836/2011 of 19 August 2011 amending Regulation (EC) No 333/2007 laying down the methods of sampling and analysis for the official control of the levels of lead, cadmium, mercury, inorganic tin, 3-MCPD and benzo(a)pyrene in foodstuffs.
- [17] A. Arena, A. Ferracane, M. Zoccali, M. Obkircher, H. Sprecher, P.Q. Tranchida, L. Mondello. *J. Chromatogr. A.*, 2023, 1710, 464432.

Elenco delle pubblicazioni

[1] Alessia Arena, Mariosimone Zoccali, Alessandra Trozzi, Peter Quinto Tranchida, Luigi Mondello. Occurrence of mineral oil hydrocarbons in omega-3 fatty acid dietary supplements. *Foods*, 2021, 10, 2424. <https://doi.org/10.3390/foods10102424>.

[2] Alessia Arena, Mariosimone Zoccali, Luigi Mondello, Peter Quinto Tranchida. Direct analysis of phthalate esters in vegetable oils by means of comprehensive two-dimensional gas chromatography combined with triple quadrupole mass spectrometry. *Food Chemistry*, 2022, 396, 133721. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.133721>.

[3] Alessia Arena, Mariosimone Zoccali, Luigi Mondello, Peter Quinto Tranchida. A method for the determination of 70 pesticides in extra virgin olive oil based on a limited-volume solvent extraction step prior to comprehensive two-dimensional gas chromatography-tandem mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2023, 415, 2459-2469. <https://doi.org/10.1007/s00216-022-04494-6>.

[4] Danilo Donnarumma, Alessia Arena, Emanuela Trovato, Francesca Rigano, Mariosimone Zoccali, Luigi Mondello. A miniaturized comprehensive approach for total lipidome analysis and vitamin D metabolite quantification in human serum. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2023, 415(18), pp. 4579-4590 <https://doi.org/10.1007/s00216-023-04756-x>.

[5] Antonio Ferracane, Mariosimone Zoccali, Alessia Arena, Monica Mondello, Peter Q. Tranchida, Luigi Mondello. A dilute-and-inject low-pressure gas chromatography-tandem mass spectrometry method for phthalate determination in extra virgin olive oil. *Journal of Separation Science*, 2023, 46(18), 2300529. <https://doi.org/10.1002/jssc.202300529>.

[6] Alessia Arena, Antonio Ferracane, Mariosimone Zoccali, Markus Obkircher, Hanspeter Sprecher, Peter Q. Tranchida, Luigi Mondello. Direct extraction with acetonitrile of hemp seed oil for the analysis of pesticides by using comprehensive two-dimensional gas chromatography-triple quadrupole mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 2023, 464432. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2023.464432>.

[7] Alessia Arena, Mariosimone Zoccali, Ivana Bonaccorsi, Monica Mondello, Peter Q. Tranchida, Luigi Mondello. Determination of mineral oil hydrocarbon contamination in Citrus essential oils by using on-line liquid-gas chromatography: critical aspects. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2024, 416(3), pp. 801-808. <https://doi.org/10.1007/s00216-023-04873-7>.