Università
Ca'Foscari
Venezia

Corso di Laurea Magistrale in

Chimica e Tecnologie Sostenibili

LM-54 (Scienze chimiche)

Tesi di Laurea Magistrale

MESSA A PUNTO DI UNA METODOLOGIA ANALITICA PER LA DETERMINAZIONE DI IDROCARBURI POLICICLICI AROMATICI E FTALATI IN TESSUTO ADIPOSO

Relatore
Prof. Marco Roman

Correlatrice
Dott.ssa Elena Gregoris (CNR-ISP)

Laureanda
Alice Franchin
Matricola 882465

Anno accademico
2023-2024

Sommario

Scopo della tesi 4
1. INTRODUZIONE 5
1.1. Inquinamento, effetti sulla salute e biomonitoraggio 5
1.2. Tessuto adiposo 7
1.3. Idrocarburi policiclici aromatici 10
Caratteristiche generali 10
Proprietà chimico-fisiche 12
Sorgenti e meccanismi di formazione 13
Normativa, tossicità ed esposizione umana 14
1.4. Esteri dell'acido ftalico (Ftalati) 16
Caratteristiche generali 16
Proprietà chimico-fisiche e utilizzi 17
Normative, tossicità ed esposizione umana 18
2. MATERIALI E METODI 20
2.1. Campioni 20
2.2. Reagenti, materiali e piccola strumentazione 20
Solventi 20
Soluzioni standard 20
Sali 21
Materiali e piccola strumentazione da laboratorio 21
2.3. Estrazione con metodo QuEChERS: principi teorici 22
2.4. Ottimizzazione della procedura preanalitica 24
Test esplorativi per la determinazione degli IPA 24
Procedura sperimentale 26
Test della preparativa congiunta IPA e ftalati 28
Valutazione della procedura di decontaminazione 28
2.5. Analisi di IPA e ftalati 31
Gascromatografia 31
Spettrometria di massa 33
Analisi strumentale degli IPA 36
Messa a punto del metodo di analisi degli ftalati 43
Validazione dei metodi 43
2.6. Test sui campioni reali di tessuto adiposo umano 46
3. RISULTATI E DISCUSSIONE 47
3.1. Messa a punto del metodo di analisi degli ftalati 47
3.2. Ottimizzazione della fase preparativa 56

Test esplorativi per la determinazione degli IPA.....56
Test della preparativa congiunta di IPA e ftalati.....61
Valutazione procedura di decontaminazione.....64
3.3. Validazione dei metodi 65
3.4. Test sui campioni reali di tessuto adiposo umano.....76
4. CONCLUSIONI 81
5. BIBLIOGRAFIA 84

Scopo della tesi

Il biomonitoraggio è un approccio fondamentale per la protezione della salute umana dall'esposizione a sostanze pericolose, e si basa sulla determinazione della presenza e concentrazione di inquinanti nel corpo umano. È sempre più applicato per tracciare su larga scala i rischi da esposizione ad inquinanti nella popolazione.

Il presente lavoro di tesi si inserisce nell'ambito di un progetto PRIN 2022 PNRR dal titolo "*Integrated systemic detection of pollutants in the human body*" (INSYDE-HU), che mira ad ottenere importanti dati diretti sull'esposizione ad inquinanti in individui non professionalmente esposti. Nell'ambito del progetto si stanno sviluppando e ottimizzando nuovi metodi analitici per la determinazione di un set di inquinanti selezionati in diversi organi bersaglio.

L'obiettivo di questo lavoro di tesi consiste nello sviluppare una metodologia analitica volta a determinare quantitativamente la presenza di idrocarburi policiclici aromatici e ftalati nel tessuto adiposo umano. Si tratta di una matrice complessa e poco indagata in ambito di biomonitoraggio. La novità di questo lavoro risiede proprio nel fatto che, anche a causa dell'invasività della procedura di raccolta dei campioni, ci sono pochissimi studi in letteratura che valutano la presenza di questi inquinanti nel tessuto adiposo o in altri organi umani. La maggior parte degli studi raccoglie e analizza componenti meno invasive, come sangue o urina, che però forniscono dati indiretti sui livelli interni di inquinanti.

Le sostanze indagate sono presenti in vari comparti ambientali, sono tossiche per l'uomo e hanno caratteristiche lipofile, che le rendono possibilmente bioaccumulabili nel tessuto adiposo.

In questo lavoro di tesi vengono messi a punto e ottimizzati sia la fase preanalitica, con metodo di estrazione e purificazione QuEChERS, che il metodo di analisi strumentale per gli ftalati, con l'utilizzo di una tecnica gascromatografica accoppiata a spettrometria di massa (GC-MS). I metodi proposti, e valutati adatti allo scopo, vengono testati su un set di campioni reali.

1. INTRODUZIONE

1.1. Inquinamento, effetti sulla salute e biomonitoraggio

L'inquinamento è un problema tipico dei paesi più industrializzati e coinvolge oggi tutto il pianeta. Può essere definito come l'introduzione nell'ambiente di sostanze e/o energia in grado di causare rischio per la salute umana, pericolo per esseri viventi o ecosistemi, danni a strutture o al paesaggio o che possono interferire con gli usi legittimi dell'ambiente [1]. Si tratta quindi di un'alterazione nei cicli biogeochimici e/o nei flussi energetici degli ecosistemi naturali [2]. Aggravato dall'intreccio di diversi fattori, che ne moltiplicano gli effetti, l'inquinamento colpisce anche le zone più lontane dalla civiltà moderna, perché si espande sia via aria che via acqua [1]. In particolare, l'inquinamento atmosferico costituisce uno dei principali fattori di rischio per la salute in Europa. Può provocare malattie cardiovascolari e respiratorie, cancro e costituisce la principale causa di morte prematura nell'Unione Europea legata all'ambiente. Alcuni inquinanti come l'arsenico, il cadmio, il nichel e gli idrocarburi policiclici aromatici sono agenti cancerogeni genotossici per l'uomo, in grado di provocare il cancro alterando direttamente il materiale genetico delle cellule bersaglio. L'inquinamento atmosferico ha inoltre effetti negativi sulla qualità dell'acqua e del suolo, danneggiando gli ecosistemi. Le fonti dell'inquinamento sono molteplici [3]. Possono contribuire sia eventi naturali (come incendi, eruzioni vulcaniche, erosioni, ecc) che eventi di origine antropica [2]. È causato principalmente dal settore industriale, dei trasporti, della produzione energetica e da quello agricolo [3].

Parallelamente alla crescita dell'urbanizzazione e dell'industrializzazione, si rileva sempre più frequentemente la presenza di gruppi di popolazione residenti in prossimità di siti caratterizzati da contaminazione ambientale. La contaminazione ambientale può riferirsi a emissioni da parte di sorgenti di tipo fisso e puntiforme (quali ad esempio centrali energetiche, raffinerie, industrie di vario tipo, inceneritori e discariche di rifiuti) ma anche da sorgenti non puntiformi, come l'uso intensivo di prodotti chimici in agricoltura (fertilizzanti, pesticidi) oppure da sorgenti multiple e mobili come i veicoli a motore. I gas di scarico dei veicoli rappresentano la più importante fonte di inquinamento atmosferico nelle aree urbane con elevato traffico su strada. Di conseguenza, l'ambiente urbano rappresenta un'entità territoriale particolarmente critica dal punto di vista di sanità pubblica, soprattutto per il suo potenziale impatto sulla salute. Circa il 48% della popolazione mondiale (75% nei paesi industrializzati e 42% nelle regioni in via di sviluppo) vive oggi negli agglomerati urbani dove, a causa delle elevate concentrazioni di

attività antropiche in spazi limitati, è esposta a miscele di agenti fisici e chimici potenzialmente dannosi [2].

I limiti di legge in materia di qualità dell'aria spesso non sono rispettati, soprattutto nelle aree urbane dove vive la maggior parte della popolazione. Il *briefing* dell'Agenzia Europea dell'Ambiente dal titolo "*Europe's air quality status* 2023" (Stato della qualità dell'aria in Europa 2023) [4] mostra che, in Europa, l'inquinamento atmosferico spesso supera i limiti imposti dell'Unione Europea (UE) e, le linee guida dell'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS). Il piano d'azione dell'UE per l'inquinamento zero entro il 2050 mira a ridurre l'inquinamento dell'aria, del suolo e dell'acqua, nonché l'inquinamento acustico e da plastica, a livelli non più considerati nocivi per la salute e per gli ecosistemi naturali [3].

Da qui nasce la necessità di svolgere delle azioni di biomonitoraggio. In particolare, l'iniziativa europea per il biomonitoraggio umano (HBM4EU) è stata lanciata nel 2017 per sviluppare e stabilire un approccio coordinato e armonizzato al biomonitoraggio umano (HBM) in tutta Europa. Con questa iniziativa sono state eseguite più di 40.000 analisi su campioni umani in diversi studi di biomonitoraggio, affrontando l'esposizione chimica della popolazione generale, gli sviluppi temporali e l'esposizione professionale. Le analisi effettuate hanno coperto 15 gruppi prioritari di sostanze chimiche organiche e metalliche e sono state eseguite da una rete di laboratori che soddisfacevano i requisiti di un sistema completo di controllo e garanzia della qualità. Tra le sfide di questo progetto vi era il coordinamento delle analisi chimiche, che includeva l'istituzione di contatti tra depositari dei campioni e laboratori qualificati, ma anche il monitoraggio dei progressi delle analisi chimiche durante la fase analitica, affrontando anche lo stato e le conseguenze delle misure Covid-19. Altre sfide erano legate alla novità e alla complessità di HBM4EU, tra cui questioni amministrative, finanziarie e l'implementazione di procedure standardizzate. Tra le sostanze prioritarie indagate ritroviamo bisfenoli, arsenico, ritardanti di fiamma, pesticidi, idrocarburi policiclici aromatici, ecc. Tra gli inquinanti emergenti, sono stati indagati anche gli ftalati. Le matrici studiate sono state principalmente urina, sangue, plasma, siero e capelli [5].

Nonostante l'implementazione di questo ambizioso progetto, rimangono scarsi dati sulla presenza degli stessi inquinanti in componenti più invasive come, ad esempio, il tessuto adiposo umano, in cui queste sostanze potrebbero accumularsi a causa delle loro caratteristiche chimico-fisiche.

Questo lavoro di tesi intende fornire uno strumento analitico con il quale indagare presenza e quantità di tali sostanze nel tessuto adiposo umano, contribuendo quindi alla compensazione di questa carenza.

1.2. Tessuto adiposo

Il tessuto adiposo è un tipo di tessuto connettivo vitale per l'organismo umano. È principalmente composto da adipociti, cellule specializzate che accumulano e immagazzinano energia sotto forma di lipidi. Il tessuto adiposo svolge molte funzioni importanti come:

- Riserva energetica;
- Isolamento dal calore;
- Protezione degli organi;
- Secrezione di ormoni;
- Sostegno della struttura corporea.

Tuttavia, il tessuto adiposo può essere coinvolto in diverse condizioni patologiche (come obesità e lipoedema) che comportano una serie di problemi di salute, tra cui malattie cardiovascolari, diabete, infiammazione cronica, dolori e problemi di mobilità.

Questo tessuto può essere suddiviso in due principali categorie: tessuto adiposo bianco e tessuto adiposo bruno.

- Tessuto adiposo bianco: è la tipologia di grasso più comune negli adulti e funge principalmente da riserva energetica. Si trova sotto la pelle (tessuto bianco sottocutaneo, scAT), intorno agli organi interni (viscerale, vAT) e nelle regioni profonde del corpo come il midollo osseo. È inoltre coinvolto nella produzione di ormoni che regolano l'appetito e il metabolismo.
- Tessuto adiposo bruno (più abbondante nei neonati): è specializzato nella produzione di calore. Negli adulti è presente in quantità minori, principalmente intorno al collo e alle spalle [6].

Il tessuto adiposo è un tessuto altamente attivo. È un organo endocrino, che secerne varie citochine e regola il metabolismo di altri organi. Le sostanze chimiche che si accumulano in zone ricche di lipidi hanno il potenziale di interruzione a lungo termine dei processi metabolici ed endocrini [7].

È stato dimostrato che i POPs (dall'inglese *Persistent Organic Pollutants*, un gruppo eterogeneo di inquinanti a diffusione ubiquitaria) [8] e altre sostanze dal comportamento ambientale e tossicologico simile, alterano le funzioni metaboliche, endocrine e immunitarie del tessuto adiposo. Sono inoltre delle sostanze chimiche altamente lipofile, che si bioaccumulano nei grassi animali e umani [9]. Nonostante la loro potenziale pericolosità, sono stati condotti pochi studi che misurano le concentrazioni di questi composti nel grasso intra-addominale umano. Di conseguenza, non è noto se si distribuiscano equamente in tutte le componenti adipose, incluso il grasso nel siero [7].

Tra i composti persistenti rientrano sostanze chimiche come pesticidi [8], diossine/furani, bifenili perclorurati (PCB), pesticidi clorurati, ritardanti di fiamma bromurati, composti perfluorurati [7] e idrocarburi policiclici aromatici [10]. Sebbene la produzione e l'utilizzo della maggior parte di queste sostanze chimiche siano stati proibiti negli Stati Uniti (grazie al *Toxic Substances Control Act* del 1976) e dalla Convenzione di Stoccolma delle Nazioni Unite (entrata in vigore nel 2004), tali sostanze chimiche rimangono presenti nell'organismo della maggior parte degli esseri umani. Molte di queste sostanze sono tossiche per la salute umana, in quanto sono possibili sostanze cancerogene per l'uomo e possiedono attività immunosoppressiva (causando neurotossicità, aumentando il rischio di diabete, malattie cardiovascolari e ipertensione) [7].

A causa della loro lipofilicità, POPs e sostanze con comportamento simile vengono immagazzinati nel tessuto adiposo e poiché i vari tessuti adiposi del corpo hanno funzioni endocrine leggermente diverse, è importante sapere se si distribuiscono equamente in tutti i tessuti adiposi. Inoltre, è importante determinare in che modo i livelli di queste sostanze chimiche influenzano il tessuto adiposo locale: alcuni studi hanno riportato, ad esempio, che il PCB 77 induce la differenziazione degli adipociti e l'espressione e il rilascio di citochine pro-infiammatorie, mentre il PCB 153 non produce lo stesso effetto [11].

Sebbene il corpo umano possa metabolizzare gli idrocarburi policiclici aromatici, l'esposizione frequente e prolungata ad essi determina un accumulo nei tessuti adiposi e negli organi viscerali come fegato e reni [12]. In uno studio sono stati confrontati i livelli di idrocarburi policiclici aromatici nei campioni di plasma e tessuto adiposo (Figura 1.2.1) [13]. I livelli riscontrati nel plasma erano 4.7 volte (pazienti bariatrici francesi) e 57.6 volte (pazienti bariatrici polacchi) inferiori ai livelli riscontrati nel tessuto adiposo [14]. Questo evidenzia la necessità di un maggior numero di studi di biomonitoraggio nel tessuto adiposo.

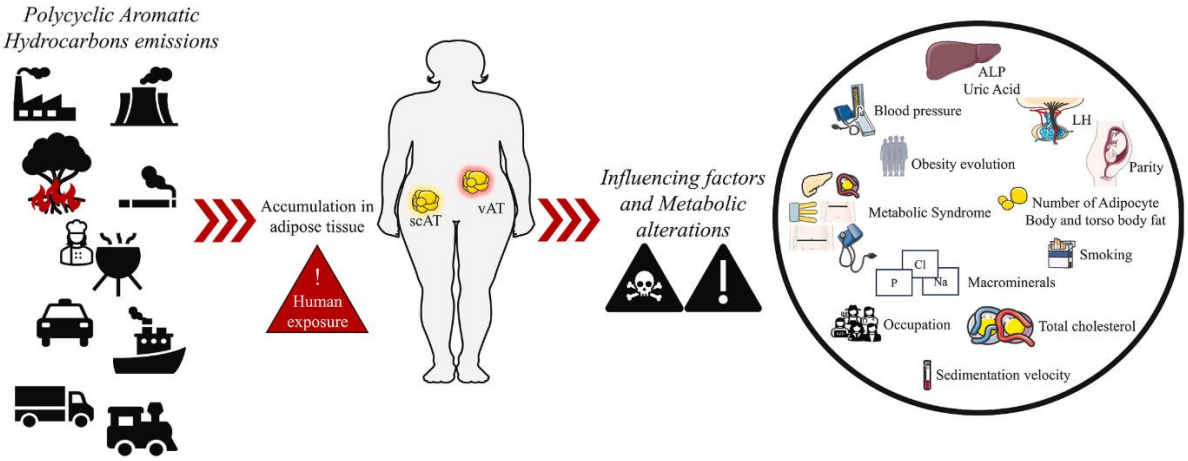


Figura 1.2.1 – Accumulo di IPA nel tessuto adiposo e conseguenti alterazioni metaboliche [13]

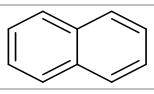
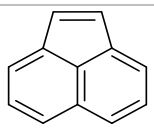
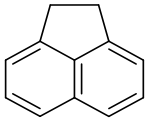
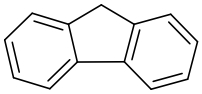
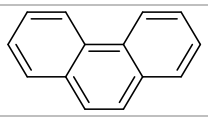
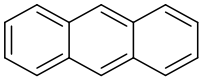
1.3. Idrocarburi policiclici aromatici

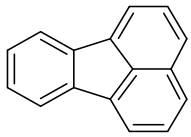
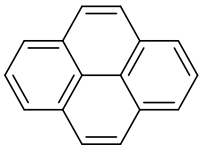
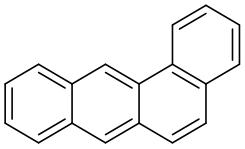
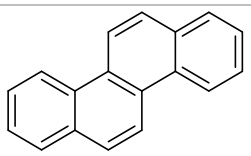
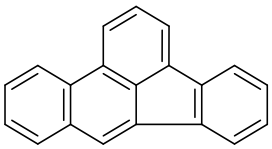
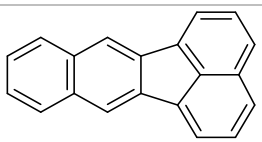
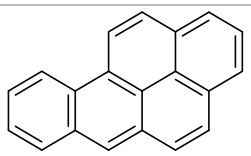
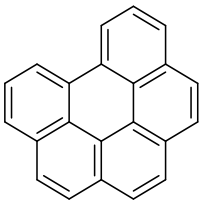
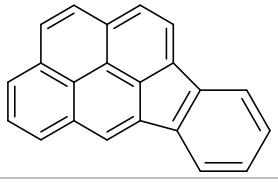
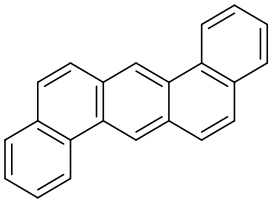
Caratteristiche generali

Gli idrocarburi policiclici aromatici (IPA o PAHs, dall'inglese *Polycyclic Aromatic Hydrocarbons*) costituiscono un ampio gruppo di composti organici affini, definiti congeneri, caratterizzati da una struttura chimica con due o più anelli benzenici fusi [15], che possono avere disposizione lineare, a grappolo o angolare e possono presentare gruppi sostitutivi (come anelli alchilici, arilici, nitro, amminici o eterociclici) [16]. Vengono suddivisi in funzione del loro peso molecolare e del numero di atomi che li caratterizzano, in IPA a basso peso molecolare (2-3 anelli condensati) e IPA ad alto peso molecolare (4-6 anelli). Gli IPA variano dal naftalene (il più semplice a basso peso molecolare) che presenta due anelli aromatici e in ambiente si ripartisce quasi esclusivamente nella fase vapore, fino a composti con sei o più anelli aromatici [17] che invece hanno maggiore affinità con quella particolata.

I nomi, le strutture, le formule brute, il peso molecolare e il numero CAS degli IPA studiati in questo lavoro di tesi sono riportati nella Tabella 1.3.1. Nella tabella è riportato anche il coefficiente ottanolo/acqua ($logK_{ow}$) che indica la capacità di un composto di ripartirsi tra una fase organica e una acquosa [18], [19].

Tabella 1.3.1 - Idrocarburi policiclici aromatici studiati in questo lavoro di tesi *[20]*

Nome e sigla	**Struttura**	**Formula bruta**	**Peso molecolare ($g \cdot mol^{-1}$)**	**CAS**	**$logK_{ow}$** [19]
Naftalene (NA)		$C_{10}H_8$	128.17	91-20-3	3.30
Acenaftilene (ACL)		$C_{12}H_8$	152.20	208-96-8	3.93
Acenaftene (AC)		$C_{12}H_{10}$	154.21	83-32-9	3.98
Fluorene (FL)		$C_{13}H_{10}$	166.22	86-73-7	4.18
Fenantrene (PHE)		$C_{14}H_{10}$	178.23	85-01-8	4.45
Antracene (AN)		$C_{14}H_{10}$	178.23	120-12-7	4.45

Nome e sigla	**Struttura**	**Formula bruta**	**Peso molecolare ($g \cdot mol^{-1}$)**	**CAS**	**logK_{ow}** [19]
Fluorantene (FA)		$C_{16}H_{10}$	202.26	206-44-0	5.16
Pirene (Y)		$C_{16}H_{10}$	202.26	129-00-0	4.88
Benzo[*a*]antracene (BaA)		$C_{18}H_{12}$	228.29	56-55-3	5.76
Crisene (CHR)		$C_{18}H_{12}$	228.29	218-01-9	5.73
Benzo[*b*]fluorantene (BbF)		$C_{20}H_{12}$	252.31	205-99-2	5.78
Benzo[*k*]fluorantene (BkF)		$C_{20}H_{12}$	252.31	207-08-9	6.11
Benzo[*a*]pirene (BaP)		$C_{20}H_{12}$	252.31	50-32-8	6.13
Benzo[*g,h,i*]perilene (BgP)		$C_{22}H_{12}$	276.34	191-24-2	6.63
Indeno[*1,2,3-cd*]pirene (IcP)		$C_{22}H_{12}$	276.34	193-39-5	6.70
Dibenzo[*a,h*]antracene (DhP)		$C_{22}H_{14}$	278.35	53-70-3	6.84

Proprietà chimico-fisiche

Gli IPA si presentano come solidi incolori, bianchi/giallo pallidi con bassa solubilità in acqua, punti di fusione ed ebollizione elevati e bassa pressione di vapore. All'aumentare del peso molecolare diminuisce la loro solubilità in acqua, aumentano i punti di fusione ed ebollizione e diminuisce la tensione di vapore [15]. Sono caratterizzati da stabilità chimica, scarsa degradazione per idrolisi e suscettibilità a ossidazione e fotodegradazione [16]. Sono definiti inquinanti organici persistenti (POPs, *Persistent Organic Pollutants*) per la loro resistenza a fenomeni di decomposizione in ambiente e per la loro tossicità. Sono lipofili e possono essere degradati solo nel suolo ad opera di alcuni microrganismi. In generale, è possibile riscontrare la loro presenza in acqua, suolo, vegetazione ed aria [10]. La lipofilicità è espressa dal coefficiente ottanolo/acqua $\log K_{ow}$ (riportato nella Tabella 1.3.1) un coefficiente adimensionale che viene utilizzato come indice della tendenza di un composto organico ad accumularsi nei tessuti grassi degli organismi viventi e quindi a ripartirsi tra una fase acquosa e una organica. Per elevati valori di $\log K_{ow}$ si ha una maggiore tendenza del composto a ripartirsi nelle fasi organiche [18].

Gli IPA sono contaminanti ubiquitari tossici, mutageni e cancerogeni. Non si degradano facilmente in condizioni naturali e la persistenza aumenta con l'aumentare del peso molecolare. Hanno suscitato una notevole preoccupazione a causa della loro presenza in tutti i comparti ambientali per via della loro resistenza alla biodegradazione, del potenziale di bioaccumulo e dell'attività cancerogena. Sebbene siano tra i principali inquinanti dell'aria, il suolo funge da deposito finale di queste sostanze chimiche. Il loro destino nell'ambiente comprende la volatilizzazione, la foto-ossidazione, l'ossidazione chimica, l'adsorbimento sulle particelle del suolo, la liscivazione e la degradazione microbica [15].

Mentre per i congeneri a peso molecolare più basso è probabile che prevalgano le reazioni in fase gassosa, per quelli con quattro o più anelli aromatici è necessario considerare le reazioni in entrambe le fasi. Inoltre, se il contatto con il suolo non implica una reazione immediata, la semi-volatilità implica il potenziale di ri-volatilizzazione. Tali composti possono depositarsi nelle acque superficiali e nei suoli, dove hanno un elevato tempo di emivita, ma successivamente evaporano nuovamente nell'atmosfera [17].

Sorgenti e meccanismi di formazione

Tutti i composti organici possono essere ottimi precursori per gli IPA. Il meccanismo di formazione avviene principalmente mediante combustione incompleta o pirolisi, con formazione di specie radicaliche che si ricombinano per dare origine agli IPA. La formazione degli idrocarburi policiclici aromatici avviene prevalentemente tra i 500-700°C [16], ma può avvenire anche per esposizione di materiale organico a bassa temperatura (100-300°C) per lunghi periodi [15].

Gli IPA possono provenire da fonti naturali, come incendi boschivi ed emissioni vulcaniche, e da fonti associate all'attività umana (fonti artificiali o antropiche), come la combustione del carbone, le emissioni di scarico dei veicoli, gli oli lubrificanti dei motori e il fumo delle sigarette (Figura 1.3.1). Il processo pirolitico che genera IPA coinvolge tre fattori fondamentali: alte temperature, livelli ridotti di ossigeno e materia organica, con conseguente combustione incompleta. Questo processo generalmente produce una miscela complessa di IPA che può accumularsi nell'ambiente, inquinando l'acqua, l'aria, il suolo ed entrando così nella catena alimentare [21] [22].

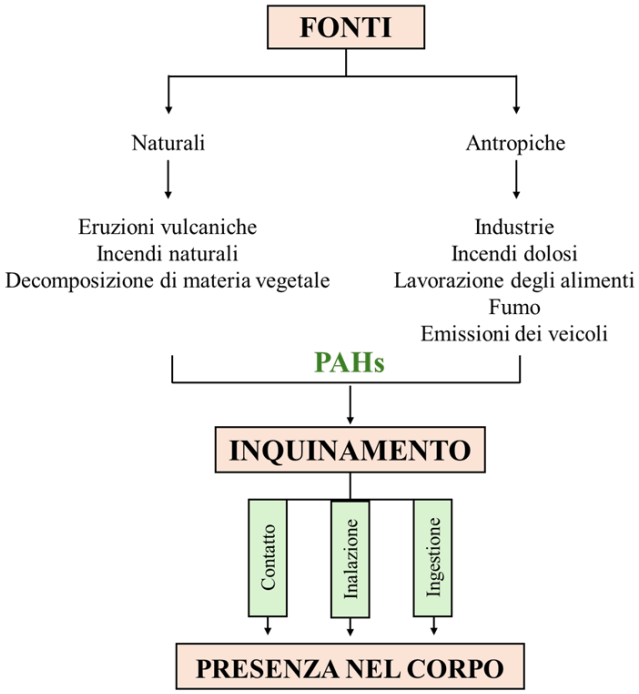


Figura 1.3.1 - Principali fonti di formazione degli IPA ed esposizione umana. Tradotto da [22]

Normativa, tossicità ed esposizione umana

Gli idrocarburi policiclici aromatici sono stati elencati dall'Agenzia Internazionale per la ricerca sul cancro (IARC) come possibili agenti cancerogeni. Numerosi studi sono stati mirati a valutare i rischi per la salute umana dovuti all'esposizione agli IPA, come cancro, malattie cardiovascolari, obesità, diabete e stress ossidativo. L'Agenzia per la Protezione dell'Ambiente degli Stati Uniti (US EPA) ha considerato gli IPA come inquinanti prioritari.

L'IPA più studiato è il benzo[*a*]pirene (BaP) a causa della sua attività genotossica a seguito dell'intercalazione diretta nel DNA, che causa interruzioni strutturali che portano a mutazioni. La IARC classifica il BaP come agente del Gruppo 1, ovvero cancerogeno per l'uomo, mentre BaA, BbF e CHR sono classificati come agenti del Gruppo 2B, ovvero probabilmente cancerogeni per l'uomo. Inoltre, anche l'Organizzazione congiunta per l'alimentazione e l'agricoltura (FAO), l'Organizzazione mondiale della sanità (OMS), il Comitato scientifico per l'alimentazione (SCF) e l'Autorità Europea per la Sicurezza Alimentare (EFSA) classificano e valutano la cancerogenicità degli IPA. Queste organizzazioni classificano BaA, CHR, BbF e BaP come composti mutageni, genotossici e cancerogeni [21].

Poiché gli IPA, pur essendo appartenenti alla stessa classe, hanno caratteristiche chimico-fisiche diverse tra loro, comprendere le loro differenze di struttura chimica aiuta a valutare accuratamente la loro tossicità. Inoltre, la scoperta delle dinamiche del metabolismo degli IPA e dei possibili effetti tossici aiuta a comprenderne meglio gli effetti e a controllarne le vie metaboliche negli esseri umani [23].

L'esposizione umana agli IPA è inevitabile e costante [13]. Gli IPA possono influenzare la salute umana attraverso vari effetti dannosi, legati per lo più alla carcinogenesi e alla mutagenesi oltre agli effetti immunosoppressori. Non tutti gli IPA sono considerati cancerogeni ma possono comunque influenzare sinergicamente la salute umana a causa del loro bioaccumulo e del ruolo di precursori di radicali liberi, che portano a danni cellulari [21]. Inoltre, poiché questi composti sono lipofili, solo una parte di essa viene metabolizzata ed escreta dal corpo umano [24], mentre il resto tende ad accumularsi nei tessuti adiposi [12], [13].

Gli esseri umani sono esposti agli IPA attraverso fonti alimentari e non alimentari (ad esempio, inalazione e contatto con la pelle). Tra queste, l'alimentazione rappresenta la principale via di esposizione. Attualmente l'UE regola i livelli di IPA nei prodotti alimentari ai sensi del regolamento UE 2023/915 [25]. In particolare riporta un tenore massimo di 2-10 μg/kg per BaP

e di 1-50 μg/kg per una somma di IPA (BaA, CHR, BbF, BaP), a seconda della tipologia di alimento [25].

La contaminazione degli alimenti da parte degli IPA può avere origine dall'inquinamento ambientale ma anche durante la preparazione e la lavorazione degli alimenti, come l'affumicatura o l'essiccazione, o durante le preparazioni che richiedono temperature elevate e/o fiamme libere (grigliare, arrostire, friggere) [21]. Per quanto riguarda la contaminazione ambientale, la maggior parte degli IPA leggeri in fase gassosa presenti nell'atmosfera possono essere adsorbiti sul particolato e, insieme a quelli leggeri e pesanti accumulati nel suolo e nell'acqua, possono entrare nella catena alimentare attraverso l'assorbimento da parte della vegetazione. Quando la vegetazione contaminata viene utilizzata in zootecnica, gli IPA possono accumularsi nei prodotti di origine animale e nei loro derivati.

L'assorbimento degli IPA è facilitato dalla loro maggiore solubilità nei grassi e la loro natura lipofila consente loro di legarsi alla membrana cellulare. Questo legame provoca cambiamenti strutturali, interferendo con le normali funzioni della cellula. Tra gli IPA, il BaP è quello che viene più facilmente solubilizzato dai lipidi [21].

La valutazione degli IPA viene generalmente eseguita nelle urine o nei campioni di plasma. Tuttavia, a causa della natura lipofila e delle proprietà di bioaccumulo degli IPA, le loro concentrazioni possono essere notevolmente più elevate nel tessuto adiposo [13].

1.4. Esteri dell'acido ftalico (Ftalati)

Caratteristiche generali

Gli esteri dell'acido ftalico (comunemente noti come ftalati o PAE, dall'inglese *Phthalic Acid Esters*) sono dei prodotti chimici introdotti per la prima volta negli anni '20 del novecento [26]. Costituiscono un gruppo di composti organici e sintetici [16]. Da un punto di vista chimico, gli ftalati sono composti che possono essere sintetizzati in diversi modi, ad esempio mediante doppia esterificazione dell'acido 1,2-benzendicarbossilico (acido ftalico) con alcoli lineari o ramificati [27], oppure per condensazione di anidride ftalica con alcoli [28]. La struttura generale è rappresentata nella Figura 1.4.1.

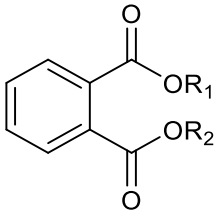
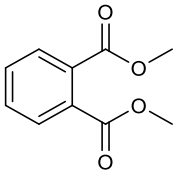
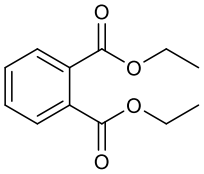


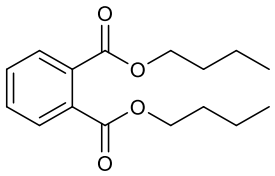
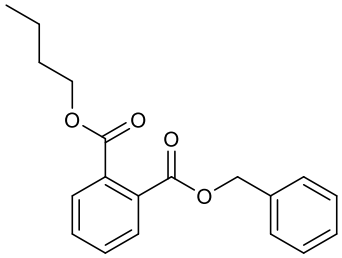
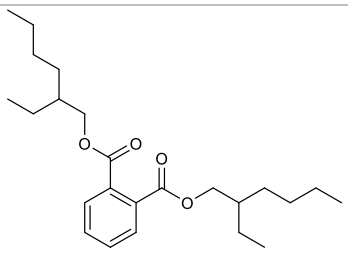
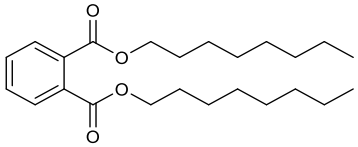
Figura 1.4.1 - Struttura chimica generale degli esteri ftalici [16]

I gruppi R_1 e R_2 possono essere gruppi alchilici lineari, ramificati o anelli aromatici [16].

I nomi, le strutture, le formule brute, il peso molecolare e il numero CAS degli ftalati studiati in questo lavoro di tesi vengono riportati nella Tabella 1.4.1. Nella tabella è riportato anche il coefficiente ottanolo/acqua ($logK_{ow}$) [19], [29].

Tabella 1.4.1 – Ftalati studiati in questo lavoro

Nome e sigla	**Struttura**	**Formula bruta**	**Peso molecolare ($g \cdot mol^{-1}$)**	**CAS**	**$logK_{ow}$** [19], [29]
Dimetil ftalato (DMP)		$C_{10}H_{10}O_4$	194.18	131-11-3	1.66
Dietil ftalato (DEP)		$C_{12}H_{14}O_4$	222.24	84-66-2	2.65

Nome e sigla	Struttura	Formula bruta	Peso molecolare ($g \cdot mol^{-1}$)	CAS	$logK_{ow}$ [19], [29]
Dibutil ftalato (DBP)		$C_{16}H_{22}O_4$	278.35	84-74-2	4.61
Benzilbutil ftalato (BBP)		$C_{19}H_{20}O_4$	312.36	85-68-7	4.84
Bis(2-etilesil) ftalato (DEHP)		$C_{24}H_{38}O_4$	390.56	117-81-7	7.60
Di-*n*-ottil ftalato (DNOP)		$C_{24}H_{38}O_4$	390.56	117-84-0	8.54

Proprietà chimico-fisiche e utilizzi

Gli ftalati sono ampiamente utilizzati come plastificanti per aumentare la flessibilità, trasparenza, stabilità e durata dei materiali plastici [30]. Permettono, inoltre, di ridurre le forze intermolecolari per facilitarne lo stampaggio. Alcuni di essi vengono anche utilizzati come solventi e fissatori di fragranze, prodotti per la casa, cosmetici e prodotti per la cura della persona [26].

Le caratteristiche chimico-fisiche degli ftalati, e di conseguenza le loro applicazioni e utilizzi, variano in base alla loro struttura chimica e alla lunghezza delle catene laterali. In funzione della lunghezza delle catene, possono essere classificati in ftalati a basso peso molecolare (catene laterali R_1 e R_2 fino a sei atomi di carbonio) e ftalati ad alto peso molecolare (catene laterali con più di sei atomi di carbonio) [16]. I primi vengono utilizzati nei prodotti a base di polivinilcloruro (PVC), nonché in dispositivi medici, adesivi, vernici e inchiostri da stampa.

Gli ftalati ad alto peso molecolare invece vengono utilizzati principalmente per aumentare la morbidezza, flessibilità e durata dei materiali plastici [27].

Il gruppo carbossilico polare contribuisce meno alle proprietà fisiche, a meno che le catene laterali non siano molto corte (come nel DMP e DEP). Nonostante in letteratura siano riportati valori di volatilità variabili (con differenze fino a un ordine di grandezza), sono sostanze scarsamente volatili e si può notare un andamento costante nella tensione di vapore dei composti: essa diminuisce all'aumentare della catena alchilica [16], passando da 1.1 mmHg per DBP a $5.4 \cdot 10^{-8}$ mmHg per DNOP [28].

La solubilità in acqua è un parametro molto importante che influenza la biodegradabilità e la capacità di accumulo di una sostanza chimica, nonché la sua dispersione nell'ambiente. La solubilità in acqua degli ftalati generalmente diminuisce all'aumentare del numero di atomi di carbonio della catena laterale [16]. Considerando ad esempio DBP e DNOP, la solubilità in acqua passa rispettivamente da un valore di 11.2 mg/L a $5.0 \cdot 10^{-4}$ mg/L [28].

Gli ftalati sono sostanze lipofile e la loro lipofilicità è espressa dal coefficiente $\log K_{ow}$ riportato nella Tabella 1.4.1.

Normative, tossicità ed esposizione umana

Un aspetto importante che riguarda gli ftalati presenti nelle plastiche è che non essendo legati covalentemente alla matrice polimerica, sono liberamente mobili [16] e di conseguenza possono migrare facilmente nell'ambiente circostante. Per questo sono considerate sostanze chimiche ubiquitarie [26] e contaminanti organici emergenti [31].

Gli ftalati e i loro metaboliti sono inoltre classificati come sostanze chimiche che alterano il sistema endocrino (Figura 1.4.2) e sono sospettati di causare il cancro nell'uomo. Sono ritenuti responsabili per alcuni effetti negativi sulla salute, in particolare in relazione alle esposizioni nei primi anni di vita. A causa della loro tossicità sono stati inseriti nell'elenco degli inquinanti prioritari in diversi Paesi. Inoltre, l'EFSA ha definito un'assunzione giornaliera tollerabile (TDI) per alcuni ftalati tra 0.03 e 0.20 mg/kg di peso corporeo. Il bis(2-etilesil)ftalato (DEHP) è lo ftalato più impiegato ed è ubiquitario, anche a causa del suo carattere persistente. Il DEHP, insieme a diisobutilftalato (DiBP) e dibutilftalato (DBP), sono i più comunemente rilevati nell'aria e negli alimenti [32].

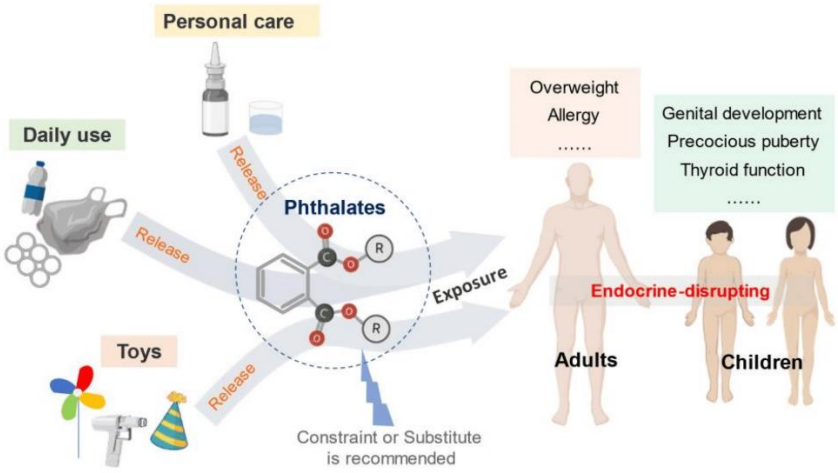


Figura 1.4.2 – Esposizione umana agli ftalati [33]

La lipofilicità degli ftalati influenza le loro caratteristiche di liscivazione e ripartizione ambientale, nonché l'affinità con prodotti e componenti lipidici [16].

Tra le diverse fonti di esposizione umana, gli alimenti svolgono un ruolo importante. In particolare, la migrazione diretta dai film di imballaggio è una delle principali fonti, soprattutto negli alimenti grassi a causa della natura lipofila degli ftalati. Le uniche normative in vigore oggi fanno riferimento alla migrazione degli ftalati dai materiali a contatto con gli alimenti [34].

Analisi tossicologiche hanno suggerito che gli ftalati, una volta trasformati in metaboliti primari e secondari, agirebbero come composti interferenti endocrini in grado di modulare negativamente le funzioni e i percorsi ormonali [27], [35]. Sono stati inoltre associati a diverse forme di cancro, come quello alla pelle, al fegato, alla prostata e al seno [27]. In uno studio, infatti, viene riportato che DBP, BBP e DEHP sono in grado di regolare i geni correlati al ciclo cellulare e possono promuovere la proliferazione delle cellule del cancro alla prostata [36]. Inoltre, DEHP e i suoi metaboliti sono stati correlati all'insorgenza e alla progressione del diabete di tipo 2 [27].

A causa della loro tossicità, alcuni ftalati sono stati limitati nei materiali a contatto alimentare dal Regolamento della Commissione Europea [37]. I limiti di migrazione specifica di DBP, BBP e DEHP sono rispettivamente 0.3 mg/kg, 30 mg/kg e 1.5 mg/kg [37]. Inoltre, l'EFSA nel 2019 ha aggiornato la TDI definita per cinque PAE (tra cui rientrano DBP, BBP e DEHP) a 50 µg/kg di peso corporeo al giorno [27], [38]. Tuttavia, il contenuto di ftalati negli alimenti non è ancora stato regolamentato.

2. MATERIALI E METODI

2.1. Campioni

I campioni di grasso animale utilizzati per la messa a punto del metodo provengono da una macelleria e sono stati mantenuti in un congelatore a circa -20°C fino al momento dell'esecuzione del test. I campioni di grasso umano, invece, sono stati forniti dall'Unità Operativa Complessa di Chirurgia Plastica dell'Ospedale Universitario di Padova e provengono da pazienti che hanno subito operazioni come addominoplastica, lipoaspirazione, rimozione di protesi, mastopessi e brachioplastica. Complessivamente sono stati analizzati 10 campioni (quando possibile in duplicato) di cui 7 sono di grasso proveniente dall'addome, 2 di quello proveniente dalle braccia e 1 di quello di mammella. Questi campioni sono stati conservati in un congelatore apposito mantenuto a -80°C.

Per lo svolgimento dei test i campioni sono stati rimossi dal congelatore e macinati con azoto liquido, utilizzando mortaio e pestello.

2.2. Reagenti, materiali e piccola strumentazione

Solventi

In questo lavoro sono stati utilizzati i seguenti solventi:

- Acetonitrile (ACN) HiPerSolv (grado per HPLC LC-MS), VWR Chemicals®;
- Etilacetato (EtAc) anidro 99.9%, Sigma-Aldrich;
- 2,2,4-Trimetilpentano, ROMIL-SpS™ Super Purity;
- H_2O ultrapura 18.2 MΩ·cm, TOC < 20 ppb, ottenuta con il sistema PURELAB® Pulse, ELGA Labwater.

Soluzioni standard

Le soluzioni madri di standard utilizzate per la quantificazione sono:

- PAH-Mix 9 da 10 µg/ml in acetonitrile, contenente NA, ACL, AC, FL, PHE, AN, FA, Y, BaA, CHR, BbF, BkF, BaP, DhP, BgP, IcP. Prodotta da LGC Dr Ehrenstorfer;
- PAH-Mix 9 da 100 µg/ml in cicloesano contenente NA, ACL, AC, FL, PHE, AN, FA, Y, BaA, CHR, BbF, BkF, BaP, DhP, BgP, IcP. Prodotta da LGC Dr Ehrenstorfer;

- $^{13}C_6$-ACL da 100 µg/ml (Cambridge Isotope Laboratories, cod CLM-2477-1.2,);
- $^{13}C_6$-PHE da 100 µg/ml (Cambridge Isotope Laboratories, cod. CLM-2451-1.2);
- $^{13}C_4$-BaP da 100 µg/ml (Cambridge Isotope Laboratories, cod. CLM-2722-1.2,);
- EPA Phthalates Esters Mix da 2000 µg/ml in Esano, contenente DMP, DEP, DBP, BBP, DEHP, DNOP. Prodotta da SUPELCO®;
- Diethyl Phthalate-d4 (DEP-d4), LGC Standards Ltd., cod. TRC-D444772;
- Bis(2-ethylexyl)phthalate-d4 (DEHP-d4), Sigma-Aldrich, cod. 34164.

Le soluzioni madri sono state utilizzate per preparare delle soluzioni intermedie di lavoro utilizzate nelle fasi successive:

- Soluzione PAH-Mix 9 a concentrazione 1 µg/ml;
- Soluzione EPA Phthalate Esters Mix 20 µg/ml;
- Soluzione PAE-d4 da 20 µg/ml.

Sali

Nella fase di preparativa QuEChERS (descritta nel paragrafo 2.4) sono stati impiegati i seguenti sali:

- $MgSO_4$ (VWR Life Science);
- NaCl (Sigma-Aldrich);
- NaAc (VWR Life Science);
- Sali di purificazione EMR-Lipid (Agilent);
- Sali di purificazione AOAC (Agilent);
- Sali di purificazione Z-Sep (Supel Que Z-Sep 55403-U).

Materiali e piccola strumentazione da laboratorio

In questo lavoro sono stati utilizzati i seguenti materiali:

- Mortaio e pestello in ceramica;
- Provette in PP e relativi tappi;
- Spatole e pinze in acciaio;
- Bilancia analitica con precisione 0.001g;
- Micropipette Transferpettor e puntali;
- Pipette in plastica;
- Pipetta in vetro con propipetta;
- Pipette Pasteur;

- Lavatrice ad ultrasuoni CP104, CEIA®;
- Siringa automatica eVol® SGE Analytical Science;
- Agitatore orbitale IKA-VIBRAX-VXR;
- Centrifuga OHAUS® FRONTIER™ 5916;
- *Vials* da GC in vetro e relativi tappi con setto in silicone.

2.3. Estrazione con metodo QuEChERS: principi teorici

In chimica analitica vi è una continua sfida nello sviluppare metodi più rapidi, *green*, precisi e accurati in grado di garantire la qualità, l'autenticità, la sicurezza e la tracciabilità dei prodotti attraverso l'analisi di inquinanti in una varietà di matrici campione. In questo contesto il metodo *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe* (QuEChERS) è una delle procedure di estrazione più promettenti, facili da usare e ad alta produttività, che prevede l'utilizzo di ridotte quantità di campione e solventi organici, oltre alla vetreria di laboratorio (in accordo coi principi della *Green Chemistry*) [39]. Tale metodo è stato ampiamente applicato da numerosi ricercatori. Può isolare efficacemente gli analiti da una matrice di campione, rimuovere efficacemente i co-estratti in massa dall'estratto grezzo e ridurre significativamente il rischio di contaminazione del campione, riducendo al minimo l'uso di solventi organici. Ha inoltre attirato grande attenzione per i suoi tempi di preparativa più brevi e l'elevato recupero di diversi analiti [40]. Ha dimostrato di essere efficace nell'estrazione di un'ampia varietà di analiti e matrici previa adeguati adattamenti. È considerato un metodo *green* grazie alle basse quantità di solventi, reagenti ed energia richiesti e per la loro bassa tossicità [26].

Il metodo QuEChERS è stato introdotto per la prima volta all'*European Pesticide Residue Workshop* (EPRW) del 2002 a Roma, pubblicato nel 2003 da Anastassiades et al. [41] e successivamente riutilizzato da Lehotay et al. [42]. L'approccio originale è stato sviluppato per recuperare residui di pesticidi da frutta e verdura [30], [41], coprendo un ampio spettro di analisi che va dai pesticidi non polari a quelli molto polari. In seguito a questi rapporti iniziali, il metodo è stato rapidamente e ampiamente adottato dalla comunità scientifica. Sulla base dei suoi vantaggi intrinseci e della sua grande versatilità, il metodo QuEChERS ha guadagnato una notevole popolarità e ha ampliato il suo campo di applicazione all'estrazione di diversi analiti (come polifenoli, ammine, antidepressivi, inquinanti ambientali) da diverse matrici tra cui alimenti [43], [44], [45], [46], fluidi biologici [47], [48], [49] e campioni ambientali [31].

È stato utilizzato anche nell'analisi di altre classi di composti, come micotossine, steroidi, farmaci veterinari [51] e per l'uomo. È stato applicato anche per l'estrazione di IPA [52] e ftalati [40] principalmente da alimenti ma anche da campioni ambientali e fluidi biologici [52].

Il metodo QuEChERS è un approccio efficace alla preparazione dei campioni, basato sulla dispersione di sali per estrarre (tramite effetto *salting-out*) e isolare un'ampia gamma di analiti da matrici molto complesse, oltre alla purificazione dell'estratto. Tale approccio di preparazione efficace e semplice prevede generalmente due passaggi:

- Estrazione basata sulla partizione tramite estrazione *salting-out,* in cui viene promosso un equilibrio tra una fase acquosa e una organica (solitamente ACN) [39]. In questo passaggio avviene il trasferimento degli analiti dai campioni (solidi o liquidi) al solvente di estrazione [53]. Le estrazioni QuEChERS utilizzano generalmente ACN anziché altri solventi più tossici, come acetone o diclorometano, anche per favorire una migliore separazione dell'acqua dopo l'aggiunta di sali [54].
- Estrazione dispersiva in fase solida (d-SPE, da *Dispersive Solid Phase Extraction*), ovvero una purificazione basata sull'utilizzo di diverse combinazioni di assorbenti porosi e sali per rimuovere le sostanze della matrice che interferiscono con la determinazione degli analiti [39], [53], come ad esempio zuccheri, acidi organici e grassi, pigmenti polari [54].

L'ultimo passaggio richiede una quantità minore di estratto e assorbente e consente di ridurre o eliminare ulteriori passaggi di centrifugazione, filtrazione e/o precipitazione.

L'efficienza del metodo QuEChERS deriva dalla sostituzione di tecniche analitiche più complesse, implementate nei comuni metodi analitici, con protocolli più semplici al fine di agevolare la gestione dei campioni [54]. L'efficacia del metodo dipende dalle proprietà dell'analita target, dalla composizione della matrice, dall'attrezzatura e dalle tecniche di analisi strumentale disponibili in laboratorio. Pertanto, durante lo sviluppo di un protocollo QuEChERS, diversi parametri che influenzano l'efficienza di estrazione dovrebbero essere considerati e ottimizzati [39]. Alcuni parametri che influiscono sull'efficienza dell'estrazione sono il tipo e il volume del solvente di estrazione, la quantità di campione, il pH e la selezione del sale [53].

2.4. Ottimizzazione della procedura preanalitica

Test esplorativi per la determinazione degli IPA

Come visto nel paragrafo precedente, il metodo di estrazione QuEChERS è utilizzato in diversi modi e con diversi parametri. Per l'ottimizzazione del metodo QuEChERS, in questo lavoro sono state testate una serie di variabili riportate in letteratura [55], [56], [57] e nello specifico tre diverse opzioni per ciascuno di questi quattro parametri: tipo di solvente, presenza e tipologia di sali di estrazione, substrato di purificazione e quantità di purificante, come riportato in Tabella 2.4.1.

I test hanno lo scopo di confrontare le *performance* delle possibili procedure e in particolare di verificare la capacità di produrre risultati esatti, ovvero concentrazioni vicine a quelle "reali". Non essendo presenti in commercio standard di riferimento certificati, in questo lavoro sono stati utilizzati dei campioni fortificati, ovvero nei quali viene addizionata una quantità nota di standard nativo (50 ng, per tutti gli analiti), che poi viene ri-quantificato a posteriori.

Queste prime prove esplorative sono state svolte unicamente con gli standard di IPA per fare un primo *screening*, selezionare i parametri più adeguati e scartare quelli che già da subito hanno dimostrato delle criticità. Questo ha permesso di identificare un set di variabili più piccolo su cui lavorare successivamente, valutando l'applicabilità del metodo per la determinazione congiunta di IPA e ftalati.

Tabella 2.4.1 – Parametri testati

Parametri	**Possibili scelte**
Solvente	ACN
	EtAc
	Mix (ACN:EtAc:i-ottano in rapporto 2:2:1 v/v)
Sali di estrazione	Nessuno
	AOAC
	Standard ($MgSO_4$:NaCl in rapporto 4:1 m/m)
Purificazione	Lipid
	Z-Sep
	AOAC
Quantità purificante	0.450 g
	0.075 g
	0.225 g

Per ottimizzare i test da effettuare, è stato utilizzato un approccio di disegno sperimentale denominato metodo di Taguchi [58]. Il metodo di Taguchi è stato sviluppato nel campo dell'ingegneria, nel quale vi è spesso la necessità di ottimizzare in modo snello e sinergico i molteplici parametri di un determinato processo. Applicando questo metodo, i parametri vengono selezionati in modo affidabile da un approccio statisticamente ingegnerizzato, utilizzando un numero limitato di esperimenti e in cui ogni singolo test viene accuratamente definito. Viene così definita la combinazione ottimale di parametro, allo scopo di ottenere la massima efficienza [59]. Il *design* applicato in questo lavoro è il P4L3, che corrisponde al test di quattro parametri (P) e tre livelli (L), che permette di ottenere informazioni sull'adeguatezza delle diverse opzioni eseguendo 9 test anziché gli 81 (3^4) previsti dal *full factorial design* [60], [61].

In Tabella 2.4.2 sono riportate le combinazioni di fattori applicate nei primi test esplorativi basati sul metodo Taguchi.

Tabella 2.4.2 – Test iniziali ottimizzati applicando il metodo Taguchi, design P4L3

# Test	Solvente	Sali di estrazione	Sali di purificazione	Quantità purificante
T1	ACN	Nessuno	Lipid	0.450 g
T2	ACN	AOAC	Z-Sep	0.075 g
T3	ACN	Standard	AOAC	0.225 g
T4	EtAC	Nessuno	Z-Sep	0.225 g
T5	EtAC	AOAC	AOAC	0.450 g
T6	EtAC	Standard	Lipid	0.075 g
T7	Mix	Nessuno	AOAC	0.075 g
T8	Mix	AOAC	Lipid	0.225 g
T9	Mix	Standard	Z-Sep	0.450 g

Procedura sperimentale

Per effettuare i test riportati nella Tabella 2.4.2 sono stati utilizzati campioni derivati da grasso animale (bovino), come surrogato del campione reale.

Le prove si sono differenziate a seconda che il test prevedesse l'utilizzo di sali di estrazione oppure no.

Nel caso della procedura sperimentale che prevede l'utilizzo di sali di estrazione, si è proceduto con i seguenti passaggi:

- Nella provetta da centrifuga sono stati inseriti 1 g di sali di estrazione (Tabella 2.4.2) e 1 g di campione di grasso bovino fortificato con 50 μL di standard nativi 1 ng/μL (50 ng);
- Sono stati aggiunti 50 μL di standard marcati 1 ng/μL (50 ng) (Paragrafo 2.2), 5 mL di solvente e 2 mL di H_2O (Tabella 2.4.2);
- Le provette sono state agitate a 400 rpm per 3 minuti e successivamente centrifugate per 5 minuti a 10.000 rpm (14.530 RCF);
- Il surnatante è stato prelevato e trasferito nelle provette per la fase di purificazione, nelle quali sono presenti quantità variabili di sali di purificazione (Tabella 2.4.2);
- Le provette di purificazione sono state agitate a 400 rpm per 3 minuti e successivamente centrifugate per 3 minuti a 10.000 rpm (14.530 RCF);
- Il surnatante viene trasferito nelle *vial* da GC e analizzato.

Nel caso in cui non sono stati utilizzati i sali di estrazione si è deciso di procedere con una fase di disidratazione a seguito della purificazione, come viene riportato nell'articolo [55]. I passaggi sono i seguenti:

- Nella provetta da centrifuga è stato inserito 1 g di campione di grasso bovino fortificato con 50 μL di standard nativi 1 ng/μL (50 ng);
- Sono stati aggiunti 50 μL di standard marcati 1 ng/μL (50 ng) (Paragrafo 2.2) e 5 mL di solvente (Tabella 2.4.2);
- Le provette sono state agitate a 400 rpm per 3 minuti e successivamente centrifugate per 5 minuti a 10.000 rpm (14.530 RCF);
- Il surnatante è stato prelevato e trasferito nelle provette per la fase di purificazione, nelle quali sono presenti quantità variabili di sali di purificazione (Tabella 2.4.2);

- Le provette di purificazione sono state agitate a 400 rpm per 3 minuti e successivamente centrifugate per 3 minuti a 10.000 rpm (14.530 RCF);
- Il surnatante è stato prelevato e trasferito nelle provette per la fase di disidratazione, in cui è presente 1 g di sali di disidratazione ($MgSO_4$ e NaCl in rapporto 4:1 m/m);
- Le provette di disidratazione sono state agitate a 400 rpm per 3 minuti e successivamente centrifugate per 3 minuti a 10.000 rpm (14.530 RCF);
- Il surnatante è stato inserito nelle *vial* da GC e analizzato.

Le procedure sperimentali sono schematizzate nella Figura 2.4.1.

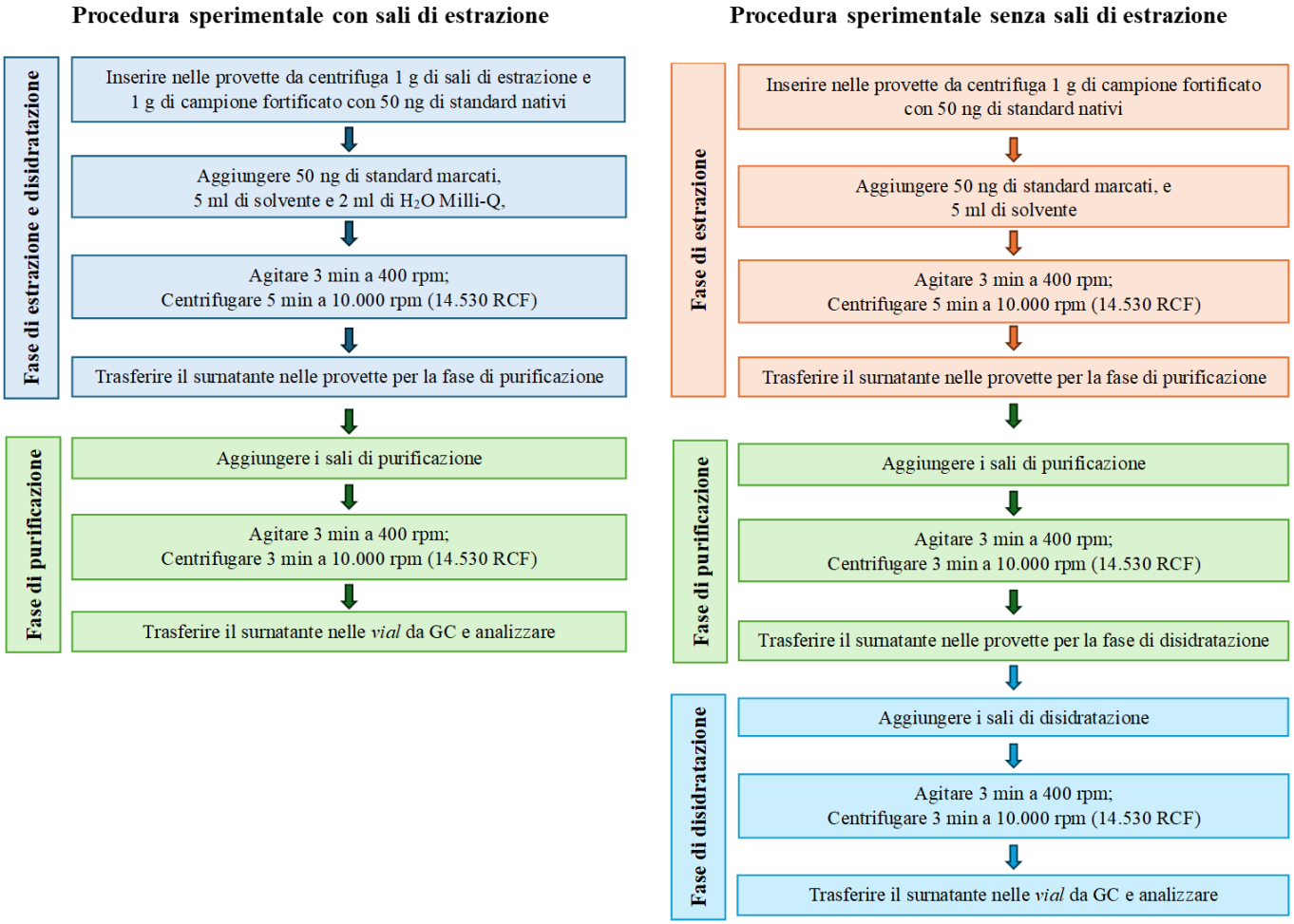


Figura 2.4.1 – Procedure sperimentali

Per i test T1, T4 e T7 (Tabella 2.4.2) è stata seguita la procedura riportata nello schema di destra, invece per i test T2, T3, T5, T6, T8 e T9 è stata seguita la procedura riportata nello schema di sinistra della Figura 2.4.1.

Per tutti i test le prove sono state ripetute in triplicato.

Per definire la tecnica di quantificazione da utilizzare per gli IPA, in alcune prove sono state testate diverse tecniche: quantificazione con fattore di risposta (FR) in soluzione, quantificazione con FR in matrice e quantificazione con curva di calibrazione in matrice. Queste tecniche sono spiegate in dettaglio nel paragrafo "Analisi strumentale degli IPA" del capitolo 2.5.

Test della preparativa congiunta IPA e ftalati

I test effettuati seguendo il metodo Taguchi hanno permesso di fare una selezione preliminare delle condizioni operative ipoteticamente migliori per la preparazione dei campioni. Tuttavia, è conveniente fare ulteriori prove di conferma e delle valutazioni su piccole variazioni nelle condizioni sperimentali, al fine di verificare le condizioni ottimali. Sulla base dei risultati ottenuti sono stati quindi condotti ulteriori test, valutando allo stesso tempo la *performance* dei metodi per la determinazione degli IPA e degli ftalati, allo scopo di valutare la possibilità di una preparativa comune per la determinazione delle due classi di composti.

Al termine delle classiche fasi della preparativa QuEChERS, tra le diverse opzioni testate è stata valutata la possibilità di effettuare una fase finale di concentrazione in flusso di N_2, per concentrare il surnatante fino a un volume di 150-200 µL. La concentrazione finale ha lo scopo di intensificare il segnale dell'analita, attraverso l'iniezione in GC di una soluzione più concentrata. I test eseguiti con la concentrazione finale hanno lo scopo di verificare come questo passaggio possa influire sull'accuratezza.

Valutazione della procedura di decontaminazione

Una volta stabilita la procedura preanalitica, sono state testate anche alcune possibili procedure di decontaminazione. Questo viene fatto soprattutto a causa delle problematiche riscontrate in letteratura nell'analisi di tracce di ftalati, che riportano un elevato livello di contaminazione di fondo nei bianchi procedurali di laboratorio. Alcuni studi, infatti, riportano che DEHP e DBP sono ubiquitari nei solventi di laboratorio, nei sali assorbenti (come $MgSO_4$ e gel di silice), nella vetreria e nell'aria presente nel laboratorio [40], [62].

Per valutare la procedura di decontaminazione migliore, è stato scelto di testare come parametri il luogo in cui si svolgono i test, i materiali utilizzati e il metodo di decontaminazione degli

stessi. I luoghi presi in esame sono il laboratorio di preparativa tradizionale e la camera bianca o *clean room*, ovvero un laboratorio in cui la concentrazione delle particelle sospese nell'aria è abbattuta e controllata entro limiti specifici. L'utilizzo della camera bianca permette, in genere, di limitare la possibile contaminazione dei campioni durante le fasi di manipolazione. La *clean room* è suddivisa in zone pulite distinte, nelle quali la concentrazione di particelle sospese nell'aria è controllata e classificata individualmente. I livelli di pulizia sono espressi in termini di Classe ISO (da ISO 1, meno pulita, a ISO 9, più pulita): la *clean room* utilizzata in questo lavoro è una ISO 7 (352.000 particelle ≥ 0.5 μm, 83.200 particelle ≥ 1 μm, 2.930 particelle ≥ 5 μm) caratterizzata da pareti, porte, controsoffitti e componenti infrastrutturali in acciaio inox, progettati e realizzati per ambienti sterili e/o a basso rilascio di particelle.

Come materiali dei consumabili da laboratorio sono stati presi in considerazione vetro e plastica. Infine, per la decontaminazione della vetreria è stato valutato il risciacquo con solvente (ACN) oppure l'utilizzo di muffola (quando possibile, a seconda del materiale, come riportato in letteratura [26], [40]). I Sali utilizzati nel metodo QuEChERS solitamente non vengono decontaminati. È stato valutato l'effetto di una decontaminazione dei Sali di disidratazione tramite trattamento in stufa a 150°C per 24 ore, seguito da tre lavaggi con diclorometano e tre con esano in ultrasuoni (ognuno da 10 minuti). I sali vengono conservati sotto esano per evitare la reidratazione.

Per determinare le prove da effettuare è stato applicato nuovamente il metodo di Taguchi, utilizzando il design P3L2 (3 parametri, 2 livelli). Le prove effettuate sono riportate nella Tabella 2.4.3.

Tabella 2.4.3 – Test per valutare la procedura di decontaminazione

Test	Luogo	Materiale delle provette	Decontaminazione
LPS	Laboratorio	Plastica	Solvente
LVM	Laboratorio	Vetro	Muffola+Stufa
CPM	*Clean Room*	Plastica	Muffola+Stufa
CVS	*Clean Room*	Vetro	Solvente

Per valutare l'efficacia della procedura di decontaminazione, è stata effettuata una valutazione dei bianchi procedurali, che permettono di misurare la contaminazione della procedura senza utilizzare il campione. I bianchi procedurali sono stati preparati utilizzando la procedura ottimizzata in precedenza, senza il campione e senza l'inserimento di standard nativi, ma con

l’aggiunta di una quantità nota di standard marcati (IPA e ftalati, 50 ng), allo scopo di quantificare il livello complessivo di contaminazione da specie native derivato da tutte le operazioni preanalitiche. Determinare il valore del bianco è molto importante perché influisce sul risultato delle analisi di tutti i campioni in esame.

La preparazione dei test è avvenuta secondo quanto riportato in precedenza nel paragrafo “Procedura sperimentale”, con opportune modifiche, quando necessario: nello specifico, per i test eseguiti con provette di vetro (Tabella 2.4.3) lo step di centrifugazione è stato eseguito a 3000 rpm (1310 RCF), ovvero il limite massimo consentito affinché non si danneggi il vetro delle provette.

2.5. Analisi di IPA e ftalati

Per analizzare e quantificare IPA e ftalati presenti nei campioni si utilizza un gas-cromatografo (Agilent Technologies 7890A GC System) accoppiato a uno spettrometro di massa (Agilent Technologies 5975C VL MSD).

Per alcuni test è stato possibile utilizzare un gas-cromatografo (Thermo Scientific Trace 1310) accoppiato a uno spettrometro di massa con triplo quadrupolo (Thermo Scientific TSQ 9000).

In questo *setup* strumentale i diversi analiti vengono in un primo momento separati nel gas-cromatografo e successivamente rilevati grazie allo spettrometro di massa.

Gascromatografia

La gascromatografia (GC) è una tecnica che permette la separazione di componenti strettamente correlati di miscele complesse.

In GC i componenti di un campione vengono iniettati nella parte superiore di una colonna cromatografica e vaporizzati in una fase mobile gassosa, formata da gas inerte quale idrogeno, elio o azoto. La fase mobile viene forzata attraverso una fase stazionaria, immobilizzata sulla superficie di un impaccamento solido inerte o sulle pareti di un tubo capillare. I componenti che vengono trattenuti più fortemente dalla fase stazionaria si muovono lentamente con il flusso della fase mobile. Al contrario, i componenti che vengono trattenuti debolmente dalla fase stazionaria viaggiano in modo più rapido [63].

Il tempo che trascorre prima che un determinato composto esca dalla colonna è definito tempo di ritenzione (t_R).

I composti si separano anche sulla base della loro temperatura di ebollizione. Infatti, nel forno in cui vengono vaporizzati è impostata una rampa di temperatura. I composti bassobollenti verranno eluiti per primi dalla colonna, seguiti dai composti altobollenti che verranno eluiti per ultimi e quindi avranno un tempo di ritenzione più elevato.

Grazie alla separazione cromatografica, gli analiti separati possono essere frammentati, ionizzati e identificati uno alla volta.

Alla fine della colonna è presente un rivelatore che ha la funzione di convertire il flusso di molecole degli analiti in un segnale elettrico poi amplificato e rappresentato in un

cromatogramma, ovvero un grafico che riporta in ascissa il tempo e in ordinata l'intensità di segnale. Idealmente, ogni specie eluita dal GC corrisponde ad un picco cromatografico di forma gaussiana.

La gascromatografia è una tecnica che permette di svolgere analisi sia qualitative che quantitative, grazie all'interpretazione del cromatogramma che ne deriva. Questo perché il tempo di ritenzione può essere utilizzato per identificare le specie chimiche, mentre le aree sottese ai picchi forniscono la misura quantitativa dell'ammontare di ciascun composto [63].

I rivelatori possono essere di diverse tipologie e selettività. I più comuni detector non selettivi in GC sono a ionizzazione di fiamma (FID), conducibilità termica (TCD) e cattura di elettroni (ECD);

In questo lavoro è stato utilizzato lo spettrometro di massa (MS), un rivelatore selettivo, collegato direttamente in linea con l'*outlet* del GC così da costituire un sistema accoppiato.

Lo schema a blocchi dello strumento GC-MS è rappresentato in Figura 2.5.1.

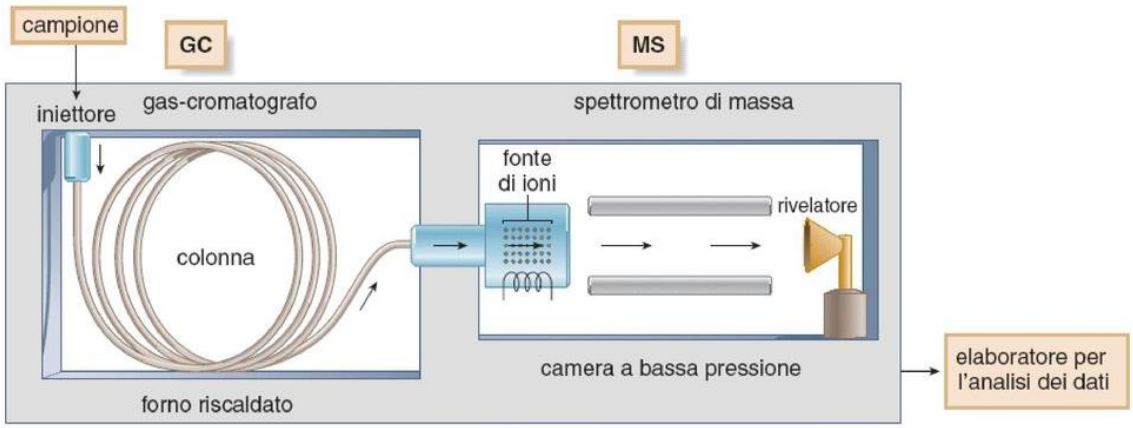


Figura 2.5.1 – Rappresentazione schematica di uno strumento GC-MS [64]

Spettrometria di massa

La spettrometria di massa è una tecnica analitica versatile ed ampiamente utilizzata sia per l'identificazione di specie elementari e composti presenti nel campione, che per la determinazione della loro concentrazione. È quindi una tecnica utilizzata sia per analisi qualitative che quantitative. Prevede l'utilizzo di una sorgente che converte le specie del campione (ad esempio eluite da un GC) in ioni, e da un filtro di massa che li separa in base al loro rapporto massa/carica (*m/z*).

Un'analisi MS consta delle seguenti fasi:

1) ionizzazione ed eventuale frammentazione degli analiti;
2) trasferimento e focalizzazione degli ioni in un fascio;
3) selezione degli ioni in base al loro rapporto *m/z*;
4) conversione del flusso di ioni in un segnale elettrico per interazione con un trasduttore e misura della corrente generata.

Lo spettrometro di massa è dotato di un sistema ad alto vuoto che mantiene bassi valori di pressione in tutte le componenti dello strumento. La bassa pressione assicura che le collisioni nello spettrometro di massa siano rare in modo da produrre e mantenere elettroni e ioni liberi [63]. Al termine dell'analisi, si ottiene uno spettro di massa che riporta in ascissa il rapporto *m/z* e in ordinata l'abbondanza.

Le principali componenti dello spettrometro di massa sono riportate in Figura 2.5.2.

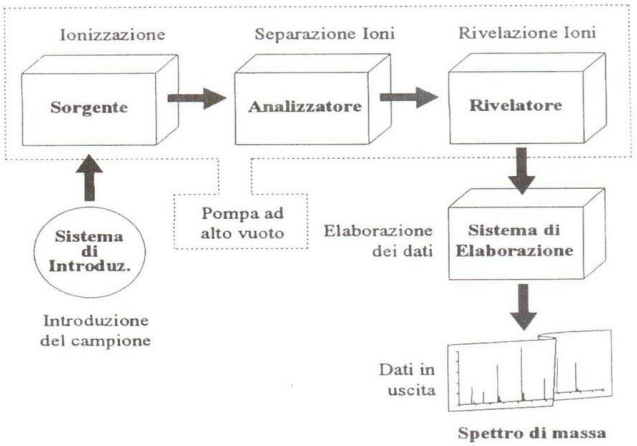


Figura 2.5.2 – Schema a blocchi di uno spettrometro di massa [64]

La ionizzazione avviene all'interno di una componente dello strumento denominata sorgente, che può essere di tipo *hard* o *soft* a seconda dell'energia trasferita alle molecole degli analiti

nel processo di ionizzazione. Lo spettrometro di massa utilizzato in questo lavoro è composto da una sorgente a impatto elettronico (EI), una sorgente adatta a ionizzare composti organici. Viene definita come sorgente *hard* perché trasferisce una quantità elevata di energia alle molecole analizzate e pertanto comporta un'elevata probabilità di frammentarle nel processo. È utilizzata per fasi gassose e per composti sufficientemente volatili e termo-stabili. Per questo viene solitamente accoppiata alla tecnica GC [65].

In questa tipologia di sorgente, gli analiti vengono convogliati in una camera di ionizzazione in alto vuoto dove vengono bombardati da un fascio perpendicolare di elettroni (generato da un filamento riscaldato dal passaggio di corrente elettrica). Il flusso degli elettroni viene sostenuto da un campo elettrico generato applicando una differenza di potenziale tipicamente di 70 eV.

La collisione delle molecole in ingresso con il fascio di elettroni innesca una gamma di reazioni in fase gas, tra cui predomina la ionizzazione con formazione di ioni molecolari eccitati, solitamente seguita da reazioni unimolecolari di dissociazione in frammenti a loro volta ionizzati. In uscita dalla sorgente si ottiene un fascio di ioni gassosi positivi (i più abbondanti) e negativi che vengono accelerati verso l'analizzatore [63], che li separa in funzione del loro rapporto *m/z*. Per far avvenire il trasferimento degli ioni dalla sorgente all'analizzatore, si utilizzano un campo elettrico e delle lenti focalizzatrici. Queste ultime sono delle piastre forate al centro, che presentano cariche opposte rispetto a quelle degli ioni. Il potenziale delle lenti è gradualmente sempre più negativo, per permettere il passaggio degli ioni ed evitare che questi impattino sulle lenti, neutralizzandosi. Nello strumento è presente anche un componente denominato *repeller*, ovvero una piastra carica positivamente (opposta alle lenti focalizzatrici) che ha il compito di spingere gli ioni positivi verso le lenti cariche negativamente.

Grazie alle lenti focalizzatrici, gli ioni arrivano all'analizzatore. Quest'ultimo può operare mediante applicazione di campi elettrici, magnetici o combinazione dei due. Nel caso del campo elettrico, questo separa gli ioni alterandone l'energia cinetica e quindi la traiettoria del moto all'interno del filtro di massa. Poiché (a parità di velocità) l'energia cinetica è una funzione diretta del rapporto *m/z* degli ioni, modificando il campo elettrico in modo controllato è possibile deviare selettivamente ioni con un dato valore *m/z* verso il rivelatore. Analizzatori che operano in questo modo sono ad esempio i quadrupoli, i più diffusi filtri di massa. L'analizzatore a quadrupolo è costituito da quattro barre metalliche di forma cilindrica disposte a croce e parallele tra loro, alle quali vengono applicati simultaneamente due potenziali (uno

continuo DC e uno variabile a radiofrequenza RF). In ogni istante di tempo, a ciascuna coppia di barre opposte è applicato lo stesso potenziale, uguale e di segno contrario a quello applicato all'altra coppia di barre. Quando uno ione positivo entra all'interno del quadrupolo lungo il suo asse centrale viene deviato verso la più vicina delle due barre cariche negativamente. È presente, tuttavia, una radiofrequenza che modifica il potenziale nel tempo invertendo la carica delle barre, evitando così che un determinato ione positivo vada ad impattare con la barra caricata negativamente e si neutralizzi. A causa del continuo cambiamento del potenziale applicato alle barre, lo ione assume una traiettoria a spirale, dirigendosi verso il rivelatore. Questo movimento a spirale è caratterizzato da un particolare raggio di rotazione, che a sua volta dipende dalla velocità di traslazione dello ione, dal suo rapporto *m/z*, dalla frequenza e dal valore dei due potenziali in corrente continua e alternata. Per questo motivo il potenziale e la radiofrequenza possono essere calibrati in modo da mantenere stabile la traiettoria di ioni con uno specifico *m/z*, che pertanto sono gli unici ad emergere dal quadrupolo raggiungendo il trasduttore, mentre gli altri colpiscono le barre del quadrupolo e vengono neutralizzati [63].

Il singolo quadrupolo consente di effettuare un'analisi sequenziale, cioè di scansionare in istanti di tempi successivi un intervallo di valori *m/z* quando si ha necessità di determinare molecole diverse. Questo analizzatore può lavorare in due diverse modalità: in scansione (SCAN) o in *Single Ion Monitoring* (SIM). La modalità SCAN effettua una scansione completa con passo costante dei rapporti *m/z* in un dato intervallo, e viene utilizzata nelle analisi di tipo qualitativo. La modalità S*ingle Ion Monitoring* (SIM), invece, monitora in modo discreto specifici valori impostati di *m/z* e per questo viene utilizzata nelle analisi di tipo quantitativo.

Il triplo quadrupolo è formato invece da tre quadrupoli disposti in serie (Q1, Q2 e Q3). Il primo quadrupolo (Q1) può operare da filtro di massa (permettendo il passaggio solo di specifiche *m/z*) o come dispositivo per la trasmissione totale degli ioni. Il secondo quadrupolo (Q2) può fungere da dispositivo di trasmissione degli ioni o da cella di collisione (che permette l'ulteriore frammentazione controllata degli ioni). Il terzo quadrupolo (Q3) opera come il primo, ovvero può fungere da filtro di massa o come dispositivo di trasmissione degli ioni.

Analisi strumentale degli IPA

Per l'analisi degli IPA al GC-MS è stato utilizzato un metodo cromatografico già messo a punto ed utilizzato dal gruppo di ricerca. Il metodo prevede l'utilizzo di un iniettore di tipo *split/splitless* che lavora in modalità *splitless* a una temperatura di 300°C. Il flusso di elio è impostato a 1.2 mL/min e si utilizza una colonna Agilent HP-5MS (60m x 250µm x 0.25µm). La programmata di temperatura è descritta in seguito:

1. La temperatura iniziale è di 75°C;
2. La temperatura viene aumentata di 15°C/min fino a 200°C;
3. Si aumenta ulteriormente la temperatura di 10°C/min fino a 280°C;
4. Si effettua un'ultima rampa di temperatura a 5°C/min fino a 310°C. Questa temperatura viene mantenuta per 10 min.

Si esegue una fase di *Post Run* a 310°C per 20 minuti.. La corsa cromatografica avviene in 32.3 minuti.

Lo spettrometro di massa è impostato nella modalità SIM, con temperatura della sorgente di 280° e temperatura del singolo quadrupolo di 150°C. Gli ioni monitorati per l'analisi degli IPA sono riportati nella Tabella 2.5.1.

Tabella 2.5.1 – Ioni degli IPA monitorati allo spettrometro di massa. * indica gli ioni dello standard marcato

IPA	**Ioni monitorati (*m/z*)**
NA	128
ACL	152
ACL*	158
AC	154
FL	166
PHE	178
PHE*	184
AN	178
FA	202
Y	202
BaA	228
CHR	228
BbF	252

IPA	Ioni monitorati (*m/z*)
BkF	252
BaP	252
BaP*	256
BgP	276
IcP	276
DhP	278

Nelle analisi eseguite con GC-MS a triplo quadrupolo si utilizza una colonna Agilent HP-5MS (60m x 250µm x 0.25µm) e la velocità di flusso di elio è impostata a 1 mL/min. In questo caso la programmata di temperatura prevede:

1. La temperatura iniziale è di 70°C, mantenuta per 2 minuti;
2. La temperatura viene aumentata di 10°C/min fino a 200°C, e mantenuta per 5 min,
3. La temperatura viene aumentata di 8°C/min fino a 280°C e mantenuta per 5 min;
4. La temperatura viene aumentata di 5°C/min fino a 310°C e mantenuta per 9 min.

La corsa cromatografica avviene in 50 minuti.
Lo spettrometro di massa con triplo quadrupolo è impostato nella modalità *Multiple Reaction Monitoring* (MRM), che corrisponde ad una SIM per il primo e il terzo quadrupolo, con ionizzazione EI. Le temperature della *transfer line* e della sorgente sono entrambe impostate a 300°C. Gli ioni precursori selezionati al Q1 e i frammenti (o ioni molecolari) monitorati al Q3 sono riportati nella Tabella 2.5.2.

Tabella 2.5.2 – Ioni monitorati al triplo quadrupolo

IPA	**Ione selezionato Q1 (*m/z*)**	**Ione monitorato Q3 (*m/z*)**
NA	128	77.7
NA	128	102
NA	128	126.9
ACL	151.9	101.9
ACL	151.9	125.8
ACL	151.9	150
ACL*	158	156
AC	152.8	152.2
AC	154.1	152.4
AC	154.1	153.1
FL	165	163
FL	166.1	115
FL	166.1	165.1
PHE	176	149.9
PHE	178	150.9
PHE	178	151.6
PHE*	184	157
PHE*	184	158
AN	176	149.9
AN	178	151
AN	178	151.7
FA	202	152.1
FA	202	200
FA	203.2	201.1
Y	202.1	198.6
Y	202.1	200
Y	203.3	201
BaA	225.9	224.1
BaA	228	226
BaA	229.2	227.1
CHR	225.9	200
CHR	225.9	223.9

IPA	**Ione selezionato Q1 (*m/z*)**	**Ione monitorato Q3 (*m/z*)**
CHR	229.2	227.1
BbF	126.1	113
BbF	250	248.3
BbF	252.1	250.1
BkF	250	248
BkF	252.1	226.1
BkF	252.1	250
BaP	250	248
BaP	252.1	250
BaP	253.3	251.1
BaP*	256	254
BaP*	257	255
BgP	137.7	136.8
BgP	276.1	274.1
BgP	276.1	274.6
IcP	138.1	124.6
IcP	274	272
IcP	276.1	274
DhP	276	274
DhP	276	275.1
DhP	278.1	276

Nel laboratorio di ricerca non era ancora stato ottimizzato un metodo di analisi strumentale GC-MS per la determinazione degli ftalati. Perciò, si è reso necessario metterlo a punto in questo lavoro di tesi, come descritto nel paragrafo successivo "Messa a punto del metodo di analisi degli ftalati".

Per la quantificazione degli analiti è stato utilizzato il metodo dello standard interno. Questo metodo permette di minimizzare le incertezze dovute all'introduzione del campione, alla velocità di flusso, alle variazioni delle condizioni della colonna e della ionizzazione in sorgente MS, ma anche di compensare eventuali perdite di analita durante tutta la fase preanalitica. In questa procedura, una quantità accuratamente nota di un particolare standard viene introdotta direttamente nel campione e, a termine dell'analisi, si utilizza il rapporto tra i segnali dell'analita e dello standard interno come parametro analitico. Nello specifico, avendo utilizzato una tecnica cromatografica per l'analisi, il segnale analitico preso in considerazione è il rapporto tra le aree dell'analita e dello standard interno. Buoni candidati come standard interni sono molecole molto simili all'analita, in modo che possano comportarsi nello stesso modo durante tutte le fasi della preparazione del campione e dell'analisi. Inoltre, naturalmente, lo standard interno dovrebbe essere assente nel campione da analizzare. Lavorare in spettrometria di massa fornisce il vantaggio di poter scegliere come standard interno delle molecole che vengono denominate come "marcate", che corrispondono agli analiti stessi, isotopicamente arricchiti. Nello specifico, per l'analisi degli IPA sono stati scelti $^{13}C_6$-ACL, $^{13}C_6$-PHE, $^{13}C_4$-BaP poiché si tratta di standard disponibili commercialmente che coprono tutto l'intervallo di peso molecolare dei congeneri *target* e, contenendo diversi atomi di 13C ciascuno, la loro presenza in ambiente risulta certamente inferiore alla precisione strumentale. Nell'elaborazione dei dati, il picco relativo all'analita e allo standard interno, che risultano sovrapposti allo stesso tempo di ritenzione, possono essere separati sulla base della diversa m/z dello ione molecolare [66].

A ciascun analita viene associato uno dei tre standard interni, come riportato in Tabella 2.5.3.

Tabella 2.5.3 – Standard interni degli IPA

IPA	**Standard interni utilizzati per la quantificazione**
NA	ACL*
ACL	
AC	
FL	
PHE	PHE*
AN	
FA	
Y	
BaA	
CHR	
BbF	BaP*
BkF	
BaP	
BgP	
IcP	
DhP	

Nella quantificazione con standard interno si possono adottare diverse tecniche.

La quantificazione con FR prevede il confronto del segnale analitico del campione con quello di una soluzione contenente tutti gli standard (nativi e marcati). In genere, si calcola il fattore di risposta dell'analita rispetto al suo standard interno di riferimento, a partire dai segnali analitici ottenuti analizzando la soluzione standard e si utilizza poi questo fattore correttivo nel calcolo della concentrazione del campione.

$$FR = \frac{A_{nat}}{A_{marc}} \cdot \frac{C_{marc}}{C_{nat}} \qquad (1)$$

$$Q_{ass} = \frac{A_{nat}}{A_{marc}} \cdot \frac{Q_{marc}}{FR} \qquad (2)$$

Nella formula (1) A_{nat} e A_{marc} sono rispettivamente i segnali analitici dei nativi e dei marcati ottenuti nell'analisi della soluzione del FR. C_{nat} e C_{marc} sono le concentrazioni di standard (rispettivamente nativi e marcati) aggiunte alla soluzione del fattore di risposta.

Con la formula (2) è possibile calcolare la quantità assoluta (Q_{ass}) di analita presente nel campione. In questo caso, A_{nat} e A_{marc} sono i segnali analitici di nativi e marcati misurati nell'analisi del campione. Nella formula compaiono poi Q_{marc}, ovvero la quantità di standard marcato aggiunta al campione, e FR calcolato con la formula (1).

Nella quantificazione con curva di calibrazione si costruisce una curva analizzando delle soluzioni a concentrazione diversa di analita. Le curve di calibrazione riportano il rapporto tra le aree di analita e standard interno (in ordinata), in funzione della quantità di analita (in ascissa), a parità di quantità di standard interno. Si utilizza l'equazione della retta per ricalcolare la concentrazione corrispondente al segnale analitico nel campione.

In entrambi i casi, la quantificazione può essere condotta utilizzando soluzioni preparate con solventi organici, oppure "in matrice", sostituendo il solvente organico con la matrice stessa del campione, preparata seguendo la stessa procedura utilizzata per i campioni. In questo caso, è indispensabile tenere in considerazione che tracce di analita potrebbero già essere presente nel campione e fare le opportune correzioni.

In questo lavoro di tesi vengono testate alcune di queste tecniche.

Messa a punto del metodo di analisi degli ftalati

Uno degli obiettivi di questo lavoro consiste nello sviluppare un metodo strumentale che permetta di identificare gli ftalati in GC-MS. Per mettere a punto il metodo di analisi vengono testate diverse condizioni, prendendo come riferimento dei metodi riportati in letteratura [26], [30], [67], [68], [69]. La scelta delle condizioni sperimentali per molte di queste prove è stata effettuata sulla base dei risultati ottenuti e discussi nel paragrafo 3.1. Tutti i test sono stati eseguiti utilizzando la stessa colonna impiegata anche per l'analisi degli IPA, ovvero la colonna Agilent HP-5MS (60m x 250µm x 0.25µm).

Validazione dei metodi

La validazione del metodo permette di valutare quanto i risultati ottenuti sono affidabili, riproducibili e se sono adatti per l'applicazione richiesta. Nella validazione dei metodi vengono calcolati una serie di parametri, ovvero:

- Limite di rivelabilità (LOD*, Limit Of Detection*) e limite di quantificazione (LOQ, *Limit Of Quantification*).

  Il LOD è definito come il più basso valore di concentrazione di un analita in un campione che può essere rilevato, ma non necessariamente quantificato. Il LOQ, invece, è il valore più basso di concentrazione di un analita presente nel campione che può essere quantificato con precisione e accuratezza accettabili in funzione di un dato livello di confidenza. Vengono calcolati rispettivamente come la media dei bianchi ($\bar{x}_{b_i}$) a cui viene sommato 3 volte (LOD) oppure 10 volte (LOQ) la deviazione standard dei bianchi (s_{b_i}) [70]. Le formule con cui vengono calcolati sono le seguenti:

$$LOD = \bar{x}_{b_i} + 3s_{b_i} \quad (3)$$

$$LOQ = \bar{x}_{b_i} + 10s_{b_i} \quad (4)$$

  Il limite di rivelabilità si può riferire al metodo strumentale o al metodo dell'intera procedura preparativa, a seconda che si considerino come bianchi quelli procedurali o strumentali. Il limite di rivelabilità del metodo (MDL da *Method Detection Limit*) e il limite di quantificazione del metodo (MQL da *Method Quantification Limit*) sono calcolati a partire dai bianchi procedurali e si riferiscono all'intero metodo (preparativa e analisi).

Il limite di rivelabilità strumentale (IDL, *Instrumental Detection Limit*) è calcolato a partire dal bianco strumentale (solvente puro) e consiste nella concentrazione di analita più bassa che può essere statisticamente distinta dal livello del rumore strumentale [71]. In questo lavoro di tesi IDL, MDL e MQL vengono calcolati in base alla misura di sei repliche di bianchi strumentali e procedurali.

- Intervallo di linearità.

  È l'intervallo all'interno del quale il metodo analitico fornisce risultati direttamente proporzionali alla concentrazione delle specie chimiche ricercate nei campioni. In questo lavoro, per valutare l'intervallo di linearità vengono preparate sette soluzioni standard a concentrazione diversa corrispondenti a 0, 10, 25, 50, 100, 250 e 500 ng/g.

- Sensibilità.

  La sensibilità è la variazione di segnale per unità di variazione della concentrazione dell'analita. È rappresentata dalla pendenza della curva di calibrazione ottenuta per ciascun analita. In generale, maggiore è la sensibilità, meglio sarà possibile distinguere tra loro i segnali relativi a quantità di analita molto vicine al bianco.

- Coefficiente di correlazione R^2.

  Il coefficiente di correlazione R^2 è una misura specifica utilizzata per misurare la relazione tra due variabili. Può assumere al massimo un valore pari a 1. Una correlazione pari a 0 indica che non vi è alcuna relazione tra le variabili. Valori vicini a 1 indicano una minore dispersione dei dati attorno alla curva di calibrazione.

- Accuratezza.

  L'accuratezza è il parametro che permette di verificare la concordanza tra la quantità misurata e quella "vera". Dal momento che non esiste un materiale certificato di riferimento da analizzare che abbia una concentrazione nota di IPA o ftalati, si è deciso di preparare dei campioni "fortificati", in cui viene aggiunta artificialmente una quantità nota di standard nativo. Per valutare la *performance* del metodo, la quantità aggiunta viene ri-quantificata a posteriori.

  In generale, l'accuratezza si calcola considerando la quantità di analita misurata (Q_m) rispetto alla quantità di standard aggiunto (Q_{agg}), secondo la formula:

$$Accuratezza\ \% = \frac{Q_m}{Q_{agg}} \times 100 \qquad (5)$$

Nella validazione del metodo, la quantità di analita viene misurata utilizzando la curva di calibrazione.

- Scostamento.

  Lo scostamento è il parametro che permette di verificare la deviazione dei valori ottenuti da un'accuratezza del 100%. Nella validazione del metodo viene calcolato a partire dai valori di accuratezza ottenuti per ogni analita, secondo la formula:

$$Scostamento\ \% = |Accuratezza\% - 1| \qquad (6)$$

  Infine, si ricava il valore medio di scostamento per tutti gli analiti.

- Effetto matrice.

  Nel caso dell'analisi di matrici complesse (come il tessuto adiposo umano) può essere opportuno utilizzare la curva di calibrazione in matrice (CM) anziché quella in soluzione (CS). Lo stesso analita potrebbe infatti fornire una risposta molto diversa quando è incluso nella matrice rispetto a quando è sciolto in solvente puro. La valutazione di questa differenza viene condotta attraverso la quantificazione dell'effetto matrice (ME%), che permette di stimare in che modo la matrice influisca sulla sensibilità del metodo. Il calcolo di ME% si effettua secondo la formula (7), in cui m_{CM} rappresenta la pendenza della curva in matrice e m_{CS} quella della curva in soluzione.

$$ME\% = \frac{(m_{CM} - m_{CS})}{m_{CS}} \qquad (7)$$

- Ripetibilità.

  La precisione della misura viene stabilita in termini di ripetibilità, ovvero in funzione della convergenza tra risultati di prove indipendenti, effettuate nelle medesime condizioni di analisi. Per valutare la ripetibilità si utilizza la deviazione standard relativa percentuale (RSD%), ovvero, si divide la deviazione standard delle quantità assolute dei campioni (s_{camp}) per il valore medio delle stesse quantità ($\bar{x}_{camp}$), secondo la formula:

$$Ripetibilità\ \% = RSD\% = \frac{s_{camp}}{\bar{x}_{camp}} \times 100 \qquad (8)$$

2.6. Test sui campioni reali di tessuto adiposo umano

Per lo svolgimento dei test con tessuto adiposo umano viene utilizzata la procedura preparativa risultata migliore nei test effettuati con grasso bovino.

Le analisi vengono eseguite al GC-MS (singolo quadrupolo) con standard interno. La selezione degli analiti da determinare nei campioni è stata effettuata sulla base dei risultati della validazione dei metodi.

Per quantificare gli analiti presenti nel campione vengono effettuati i seguenti calcoli:

- Il valore medio dei segnali dei sei bianchi procedurali ($\bar{x}_{b_i,pr}$) viene sottratto al valore del segnale analitico nel campione (A/A_{is});

$$S_{(area)} = \frac{A}{A_{is}} - \bar{x}_{b_i,pr} \qquad (9)$$

- Il valore così ottenuto viene poi convertito in quantità (ng) sulla base della sensibilità del metodo (m_{CM});

$$Q_{(ng)} = \frac{S_{(area)}}{m_{CM}} \qquad (10)$$

- Viene calcolata la concentrazione ($C_{(ng/g)}$), dividendo il valore ottenuto per la quantità di campione inserita nella provetta all'inizio del test ($Q_{ins\,(g)}$);

$$C_{(ng/g)} = \frac{Q_{(ng)}}{Q_{ins\,(g)}} \qquad (11)$$

- Infine, sulla base dei risultati della validazione, si è deciso di effettuare una correzione rispetto al valore di accuratezza (Acc%) calcolato.

$$C_{corr} = \frac{C_{(ng/g)}}{Acc\%} \qquad (12)$$

3. RISULTATI E DISCUSSIONE

3.1. Messa a punto del metodo di analisi degli ftalati

Per la messa a punto del metodo di analisi degli ftalati mediante analisi GC-MS si utilizzano soluzioni commerciali di ftalati nativi e marcati. In particolare, per la quantificazione degli ftalati si utilizzano gli standard interni deuterati DEP-d4 e DEHP-d4. L'associazione tra analiti e il corrispondente standard marcato per la quantificazione viene riportata nella Tabella 3.1.1.

Tabella 3.1.1 – Standard interni utilizzati per la quantificazione degli ftalati

Ftalati	**Standard interni utilizzati per la quantificazione**
DMP	DEP-d4
DEP	
DBP	
BBP	DEHP-d4
DEHP	
DNOP	

Gli ioni da monitorare sono scelti sulla base di valori riportati in letteratura e sono riportati nella Tabella 3.1.2. I rapporti *m/z* in grassetto vengono utilizzati per la quantificazione, gli altri come controllo, per confermare la presenza dell'analita cercato.

Tabella 3.1.2 – Ioni degli ftalati monitorati allo spettrometro di massa. Il termine d4 indica gli ftalati deuterati

Ftalati	**Ioni monitorati (*m/z*)**
DMP	**163**, 194
DEP	**149**, 177
DEP-d4	**153**, 181
DBP	104, **149**, 223
BBP	**149**, 206, 238
DEHP	**149**, 167, 279
DEHP-d4	**153**
DNOP	**149**, 150, 279

Le prove effettuate per la messa a punto del metodo analitico, gli articoli di riferimento e le condizioni utilizzate sono riportati nella Tabella 3.1.3.

Tabella 3.1.3 – Prove effettuate per mettere a punto il metodo di analisi degli ftalati

Prova	**Programmata di temperatura**	**Temperatura della sorgente**	***Liner***	**Articolo di riferimento**
1	- 40°C per 1 min; - 30°C/min fino a 130°C; - 5°C/min fino a 250°C; - 10°C/min fino a 300°C, per 10 min	230°C	Agilent, Inlet liner, Standard deactivation 5062-3587	[67]
2	- 60°C per 1 min; - 40°C/min fino a 170°C; - 10°C/min fino a 310°C, per 15 min	230°C	Agilent, Inlet liner, Standard deactivation 5062-3587	[26]
3	- 40°C per 1 min; - 30°C/min fino a 130°C; - 5°C/min fino a 250°C; - 10°C/min fino a 300°C, per 10 min	280°C	Agilent, Inlet liner, Ultra Inert 5190-4007	[67]
4	- 50°C per 0 min; - 30°C/min fino a 130°C; - 10°C/min fino a 300°C, per 12 min	280°C	Agilent, Inlet liner, Ultra Inert 5190-4007	Abbiamo modificato i metodi precedenti
5	- 80°C per 1 min; - 15°C/min fino a 180°C, per 2 min; - 5°C/min fino a 280°C, per 10.33 min	280°C	Agilent, Inlet liner, Ultra Inert 5190-4007	[68]
6	- 70°C per 0 min; - 25°C/min fino a 150°C, per 2 min; - 3°C/min fino a 200°C, per 0 min; - 8°C/min fino a 280°C, per 10 min.	280°C	Agilent, Inlet liner, Ultra Inert 5190-4007	[30]
7	- 150°C per 0.8 min; - 5°C/min fino a 200°C, per 0 min;	280°C	Agilent, Inlet liner, Ultra Inert 5190-4007	[69]

Prova	Programmata di temperatura	Temperatura della sorgente	*Liner*	Articolo di riferimento
	- 3°C/min fino a 275°C, per 2 min			
8	- 100°C per 1.5 min; - 10°C/min fino a 200°C, per 0 min; - 7°C/min fino a 275°C, per 5 min	280°C	Agilent, Inlet liner, Ultra Inert 5190-4007	-
9	- 100°C per 1.5 min; - 15°C/min fino a 200°C; - 10°C/min fino a 275°C, per 10 min	280°C	Agilent, Inlet liner, Ultra Inert 5190-4007	-
10	- 100°C per 1.5 min; - 15°C/min fino a 300°C, per 6.5 min;	280°C	Agilent, Inlet liner, Ultra Inert 5190-4007	-

Nei primi due metodi testati si è utilizzato un liner con disattivazione standard, e le rampe di temperatura erano impostate rispettivamente a 40°C e 60°C. Nei cromatogrammi ottenuti per il metodo 1 e il metodo 2 non si riescono a distinguere bene, rispetto alla linea di base, tutti i picchi relativi agli ftalati in esame, in quanto poco intensi. Inoltre alcuni congeneri (DMP e DEP) non sono risolti. Il cromatogramma del metodo 2 è riportato nella Figura 3.1.1.

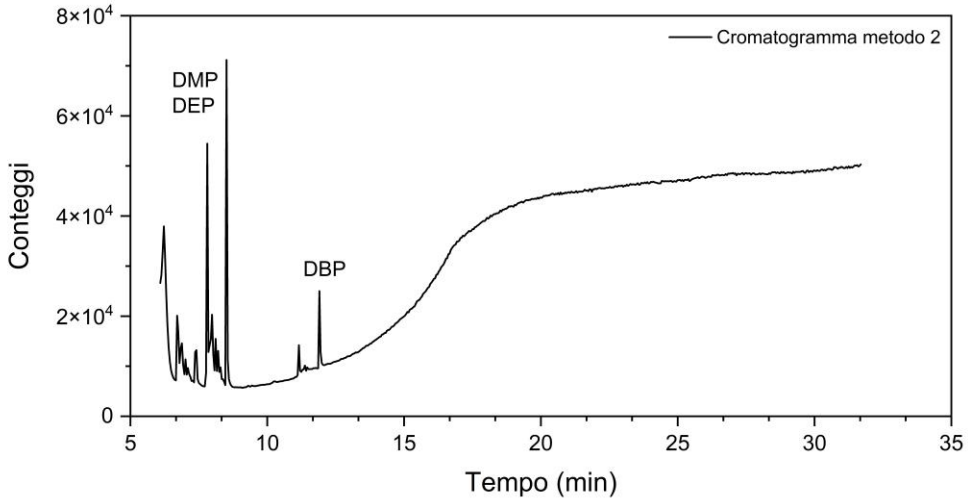


Figura 3.1.1 – Cromatogramma metodo 2, analisi ftalati

Nei metodi eseguiti in seguito si è scelto di testare un liner con disattivazione Ultra Inert, mantenendo la temperatura iniziale della rampa intorno ai 40-50°C. I liner Ultra Inert sono dotati di un processo di disattivazione concepito per eliminare potenziali siti attivi situati all'interno del liner, garantendo una bassa attività superficiale e una volatilizzazione controllata del campione. Questo facilita e rende più affidabile l'analisi di tracce e analiti attivi senza discriminazione involontaria all'ingresso, garantendo una maggior sensibilità, accuratezza e riproducibilità [72]. Con queste modifiche migliora la visualizzazione degli ftalati con peso molecolare elevato, ma non è ancora ottimale la visualizzazione degli ftalati leggeri (come DMP e DEP). Il cromatogramma del metodo 4 è riportato in Figura 3.1.2.

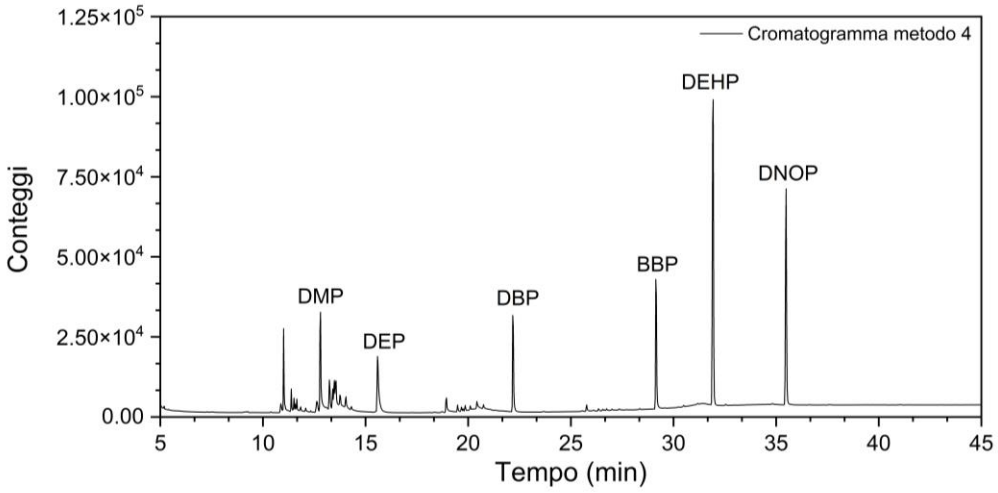


Figura 3.1.2 – Cromatogramma metodo 4, analisi ftalati

Nelle prove successive si aumenta la temperatura della rampa, passando da 70, a 80 e a 150°C. Si ottiene, con il metodo 8, un cromatogramma in cui è possibile distinguere tutti i picchi relativi agli ftalati in esame (Figura 3.1.3).

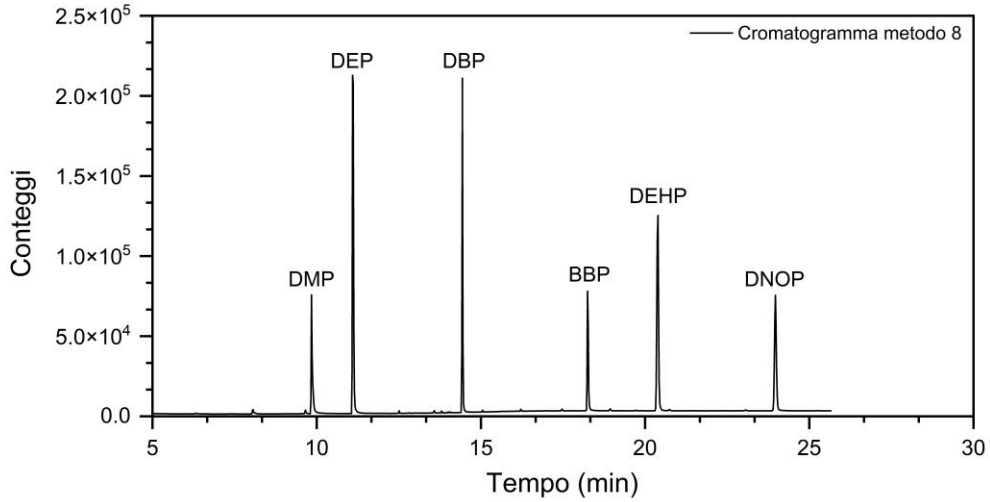


Figura 3.1.3 – Cromatogramma metodo 8, analisi ftalati

I miglioramenti successivi sono volti alla diminuzione del tempo di analisi, fino ad arrivare al metodo definitivo (Figura 3.1.4).

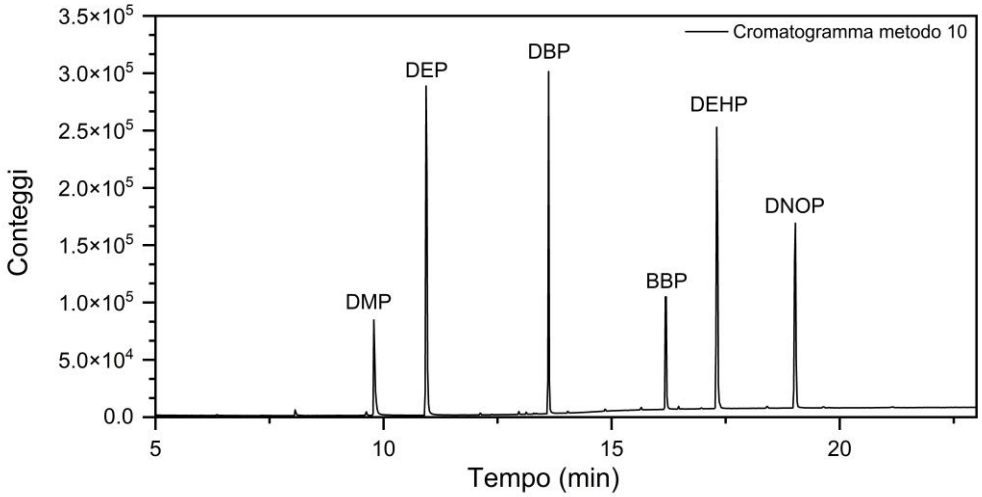


Figura 3.1.4 – Cromatogramma metodo 10, analisi ftalati

Come si evince dai test effettuati, per ottenere una buona separazione ed intensità dei picchi degli ftalati è necessario aumentare la temperatura iniziale della rampa, aumentare la temperatura della sorgente ed utilizzare un liner con una disattivazione più accurata rispetto a quella normalmente utilizzata.

Sulla base del tempo di ritenzione degli ftalati, il metodo di acquisizione GC-MS è stato suddiviso in quattro finestre temporali. In ogni finestra temporale vengono monitorati solo alcuni ioni (scelti sulla base dei tempi di ritenzione previsti) e ciò consente di massimizzare il loro segnale (Tabella 3.1.4).

Tabella 3.1.4 – Ftalati, tempi di ritenzione e finestre di acquisizione

Ftalati	Ioni monitorati (*m/z*)	Tempi di ritenzione	Finestra di acquisizione
DMP	163, 194	9.80 min	8-12 min
DEP	149, 177	10.95 min	
DEP-d4	153, 181	10.95 min	
DBP	104, 149, 223	13.63 min	12-14.5 min
BBP	149, 206, 238	16.20 min	14.5-18 min
DEHP	149, 167, 279	17.32 min	
DEHP-d4	153	17.32 min	
DNOP	149, 150, 279	19.04 min	18-21 min

Il metodo definitivo per l'analisi al GC degli ftalati prevede l'utilizzo di un iniettore di tipo *split/splitless* che lavora in modalità *splitless* a una temperatura di 280°C. Si utilizza, come nell'analisi degli IPA, una colonna Agilent HP-5MS (60m x 250µm x 0.25µm) e il flusso di elio è impostato a 1.2 mL/min. La programmata di temperatura prevede le seguenti condizioni:

1. La temperatura iniziale è di 100°C, mantenuta per 1.5 minuti;
2. La temperatura viene aumentata di 15°C/min fino a 300°C e mantenuta per 6.5 minuti.

Si esegue una fase di *Post Run* a 315°C per 4 minuti. La corsa cromatografica avviene in 21.3 minuti.

Lo spettrometro di massa è impostato nella modalità SIM, con temperatura della sorgente di 280° e temperatura del quadrupolo di 150°C.

L’IDL viene calcolato sulla base dei livelli dei bianchi strumentali (ACN), per confronto con il fattore di risposta degli ftalati. I valori di IDL per gli ftalati sono riportati nella Tabella 3.1.5.

Tabella 3.1.5 – IDL ftalati

Ftalati	**IDL (ng)**
DMP	0.0021
DEP	1.4
DBP	0.17
BBP	0.0081
DEHP	0.030
DNOP	0.0001

I valori di IDL calcolati nell’analisi degli ftalati sono compresi tra 0.0001 e 1.4 ng; variano quindi da frazioni di pg fino a poco più di 1 ng. È possibile osservare che DEP presenta un valore di IDL significativamente più elevato rispetto ai suoi congeneri (1.4 ng contro valori compresi tra frazioni di pg e 170 pg). Il confronto con la letteratura risulta difficoltoso perché raramente vengono forniti i valori di IDL, preferendo i valori di MDL.

3.2. Ottimizzazione della fase preparativa

Test esplorativi per la determinazione degli IPA

Per valutare la *performance* dei diversi test esplorativi viene utilizzata principalmente l'accuratezza, in quanto rappresenta la capacità del metodo in esame di ri-quantificare la quantità di standard nativi aggiunta al campione.

Il primo aspetto da definire riguarda la scelta della tecnica da utilizzare per la quantificazione dell'accuratezza e dello scostamento in questa serie di test. Per alcune delle prove di Tabella 2.4.2 (test 1, 2 e 6) lo scostamento è stato calcolato utilizzando diverse tecniche di quantificazione già descritte nel paragrafo "Analisi strumentale degli IPA" del capitolo 2.5:

- Fattore di risposta in soluzione;
- Fattore di risposta in matrice;
- Curva di calibrazione in matrice.

Per questioni di opportunità, le analisi sono state svolte utilizzando il triplo quadrupolo. Vengono confrontati tra loro i valori di scostamento medio di tutti i congeneri.

Nei test 1 e 6 si è visto un grande miglioramento utilizzando tecniche in matrice rispetto che in soluzione. In particolare, nel caso del test 1 si passa da un valore di scostamento medio con FR in soluzione di 66% a valori di scostamento medi con FR in matrice e con curva di calibrazione in matrice rispettivamente di 17% e 15%. Nel caso del test 6, si passa da un valore di 84% a valori di 17% e 16%. Nel test 2 non si verificano particolari differenze tra i risultati: infatti si ottengono valori di scostamento di 37%, 38% e 39% rispettivamente per le tecniche di FR in soluzione, FR in matrice e curva in matrice.

Dai valori di scostamento ottenuti è possibile verificare che, in generale, la tecnica di quantificazione meno preferibile risulti quella con FR in soluzione, perché mostra dei valori nettamente più elevati di scostamento rispetto a quelli ottenuti con le tecniche che prevedono l'utilizzo della matrice. Tra le tecniche di quantificazione con FR in matrice o con curva di calibrazione in matrice non si evidenziano differenze significative. Viene scelta dunque la quantificazione con FR in matrice, perché tale tecnica permette di limitare il numero di test da effettuare rispetto alla curva di calibrazione, diminuendo il tempo di analisi e la quantità di standard, portando anche a un vantaggio dai punti di vista pratico ed economico.

Questa scelta viene mantenuta per tutte le prove con diverse procedure, svolte per la messa a punto della preanalitica. La selezione della tecnica di quantificazione per l'analisi dei campioni reali è stata invece condotta sulla base dei risultati della validazione dei metodi.

Tutti i test esplorativi di Tabella 2.4.2 vengono analizzati mediante l'utilizzo del singolo quadrupolo.

I risultati di accuratezza dei diversi congeneri, come media delle ripetizioni di ogni combinazione di parametri, vengono riportati nella Tabella 3.2.1.

Tabella 3.2.1 – Accuratezza, totale IPA quantificati e scostamento medio ottenuti nei test esplorativi del metodo Taguchi con singolo quadrupolo

IPA	**T1**	**T2**	**T3**	**T4**	**T5**	**T6**	**T7**	**T8**	**T9**
NA	178%	82%	94%	72%	74%	76%	89%	27%	57%
ACL	95%	-	84%	82%	78%	100%	98%	65%	85%
AC	85%	-	42%	74%	77%	78%	321%	114%	41%
FL	113%	77%	71%	74%	72%	72%	225%	37%	80%
PHE	101%	584%	98%	73%	68%	91%	71%	36%	61%
AN	73%	80%	77%	81%	74%	113%	107%	68%	92%
FA	82%	474%	79%	102%	70%	91%	83%	49%	76%
Y	75%	290%	73%	80%	75%	92%	92%	66%	82%
BaA	81%	59%	0%	81%	65%	109%	85%	77%	81%
CHR	76%	82%	0%	85%	67%	172%	87%	76%	76%
BbF	78%	121%	42%	85%	95%	118%	86%	305%	222%
BkF	72%	143%	43%	90%	86%	135%	111%	184%	261%
BaP	75%	23%	54%	79%	76%	131%	83%	440%	113%
BgP	72%	-	74%	83%	89%	110%	94%	355%	269%
IcP	63%	-	58%	76%	103%	78%	41%	181%	235%
DhP	94%	-	59%	88%	106%	20%	41%	626%	253%
Totale IPA quantificati	16	11	16	16	16	16	16	16	16
Scostamento medio	23%	118%	41%	19%	22%	24%	38%	119%	64%

Dai valori di accuratezza riportati nella Tabella 3.2.1 è possibile verificare per ogni test il numero di analiti identificati e in che intervallo di accuratezza (Figura 3.2.1).

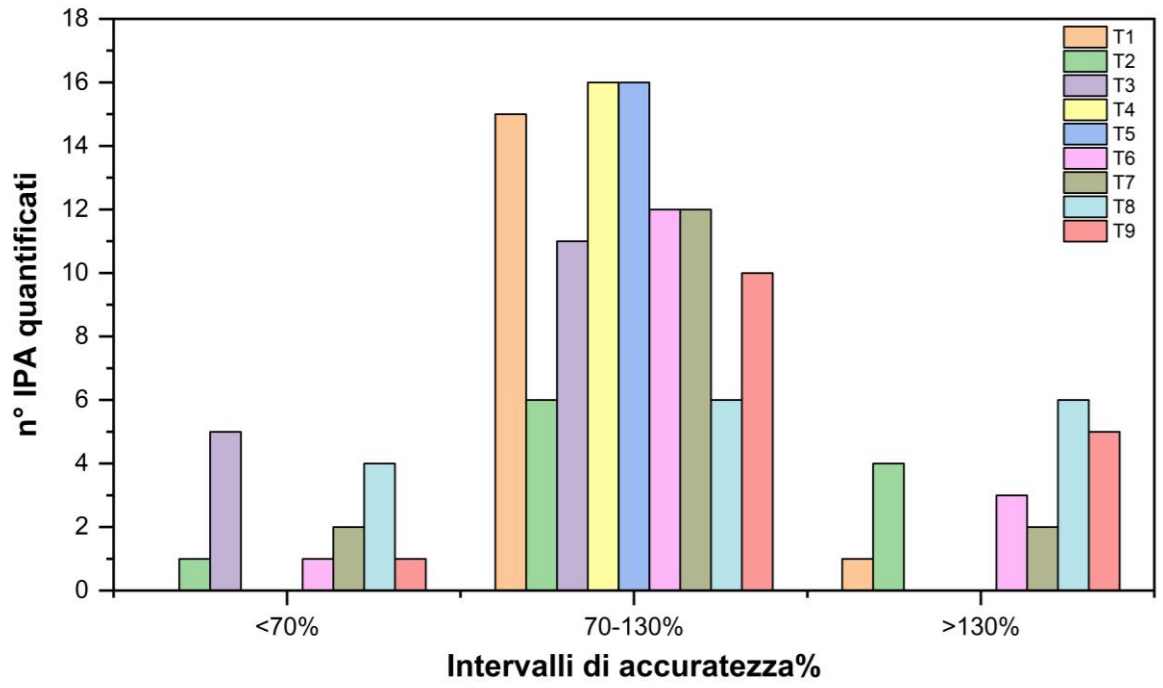


Figura 3.2.1 – IPA quantificati e loro intervallo di accuratezza

Dai valori di scostamento ottenuti è possibile verificare che i test T2 e T8 deviano molto dall'accuratezza del 100% (scostamento medio del 118% per test 2 e 119% per test 8), inoltre con T2 non è stato possibile identificare tutti i 16 congeneri ricercati a causa dell'elevato rumore di fondo, che ha impedito la determinazione dello standard marcato.

I test che riportano un valore di scostamento tra 30-50% sono T3 e T7, rispettivamente con valori di 41% e 38%. In particolare, per T3 è possibile notare, in Figura 3.2.1, che tutti gli analiti sono stati individuati in un intervallo di accuratezza inferiore al 130%.

Nei test T1, T5 e T6 sono stati ottenuti valori di scostamento medio compresi tra 20-30%, rispettivamente di 23%, 22% e 24%. Il test che ha riportato il valore di scostamento inferiore, e quindi una minore deviazione dall'accuratezza del 100%, è T4 che riporta un valore di 19%.

Dal grafico di Figura 3.2.1 è possibile notare che gli unici test in cui sono stati identificati tutti i 16 analiti nell'intervallo di accuratezza tra 70-130% sono T4 e T5.

Un'importante osservazione che permette di fare una prima selezione dei parametri da utilizzare per la preanalitica, riguarda la presenza di residui solidi bianchi nei test eseguiti con solventi di estrazione diversi da ACN, che si depositavano nel corso del tempo nelle *vial* da GC. Ne consegue una ridotta riproducibilità dell'analisi, se condotta in giorni successivi alla preparazione del campione. Inoltre, una ridotta separazione degli analiti dalla matrice comporta una non desiderata introduzione della matrice stessa nel sistema GC-MS, con conseguenze come una precoce riduzione della vita della colonna cromatografica o una più frequente pulizia dello spettrometro di massa. Di conseguenza si è preferito utilizzare ACN come solvente di estrazione, a prescindere dai risultati ottenuti nei test.

I risultati ottenuti nei test vengono valutati secondo il metodo di Taguchi, per verificare quale opzione sia preferibile per i sali di estrazione, il materiale purificante e la sua quantità. Come suggerito dal metodo di Taguchi, è stata fatta la media degli scostamenti ottenuti in tutti i test con la stessa opzione e confrontata con gli stessi valori ottenuti con le altre opzioni. Ad esempio, nella scelta del purificante, la media dei test con Lipid (T1, T6 e T8) è stata confrontata con la media dei test con Z-Sep (T2, T4 e T9) e con la media dei test con AOAC (T3, T5 e T7). I risultati sono visualizzati nella Figura 3.2.2.

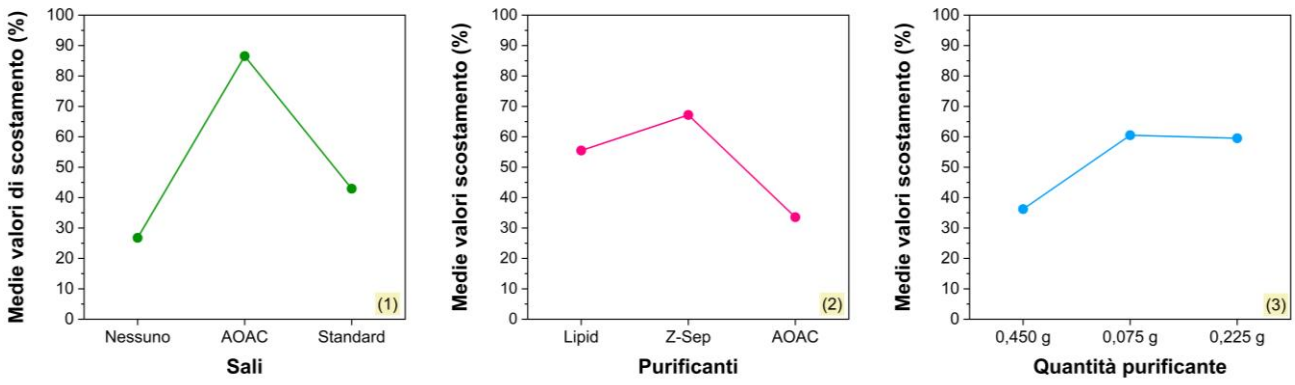


Figura 3.2.2 – Confronti parametri con metodo Taguchi. (1) Sali di estrazione; (2) purificanti; (3) quantità di purificante

In generale, i risultati preferibili sono quelli che riportano valori di scostamento più bassi.

Dal grafico (3) di Figura 3.2.2 è possibile notare che nella scelta della quantità di purificante da utilizzare si ottengono i risultati migliori con 0.450 g; invece, tra l'utilizzo di 0.075 g e 0.225 g non si evidenziano particolari differenze nei valori di scostamento. La scelta di utilizzare una maggiore quantità di purificante permetterebbe inoltre di ridurre la quantità di matrice che

potrebbe entrare nello strumento, danneggiare la colonna e/o sporcare sorgente e quadrupolo. Di conseguenza, si sceglie di utilizzare 0.450 g come quantità di purificante.

Per la scelta di sali di estrazione e tipologia di purificante si è deciso di scartare rispettivamente l'opzione con sali AOAC e l'opzione con purificante Z-Sep, che presentavano valori più alti di scostamento, mantenendo per i test successivi le due migliori opzioni per ciascun parametro. La scelta di adottare questo approccio dipende dal fatto che il metodo di Taguchi, non testando tutte le possibili combinazioni, non indaga dettagliatamente gli effetti sinergici che potrebbero esserci tra le diverse variabili. Inoltre, si è ritenuto opportuno avere diverse opzioni da testare per la determinazione degli ftalati.

Le opzioni scelte per i test con la fase preparativa congiunta di IPA e ftalati vengono riassunte nella Tabella 3.2.2.

Tabella 3.2.2 – Parametri selezionati per test di determinazione congiunta di IPA e ftalati

Parametri	**Opzioni scelte**
Solvente	ACN
Sali di estrazione	Nessuno o standard
Substrato di purificazione	Lipid o AOAC
Quantità di purificante	0.450 g

Test della preparativa congiunta di IPA e ftalati

Partendo dalle variabili risultate migliori nei test precedenti (Tabella 3.2.2), vengono effettuate ulteriori prove per definire in maniera più specifica la preparativa dell'estrazione QuEChERS. Questi test vengono eseguiti valutando allo stesso tempo le *performance* dei metodi nella determinazione di IPA e ftalati, per valutare la possibilità di una preparativa comune. I test eseguiti sono riportati nella Tabella 3.2.3.

Tabella 3.2.3 – Test per valutare la preparativa QuEChERS, con IPA e ftalati

# **Test**	**Solvente**	**Sali di disidratazione**	**Sali di purificazione**	**Quantità purificante**	**Concentrazione**
T1	ACN	Nessuno	Lipid	0.450 g	No
T10	ACN	Nessuno	AOAC	0.450 g	No
T10C	ACN	Nessuno	AOAC	0.450 g	Si
T11	ACN	Standard	AOAC	0.450 g	No

Come detto in precedenza, i parametri che vengono mantenuti costanti sono ACN come solvente e 0.450 g come quantità di purificante. I test vengono eseguiti utilizzando la procedura preparativa riportata nel paragrafo 2.4. Nel caso del test T10C si effettua una fase di concentrazione finale in flusso di N_2 per concentrare il surnatante fino a un volume di 150-200 µL. Questa procedura aggiuntiva ha lo scopo di intensificare il segnale dell'analita, grazie all'iniezione di una soluzione più concentrata nello strumento.

L'andamento dei valori medi di scostamento ottenuti nell'analisi dei test congiunti di IPA e ftalati è riportato nella Figura 3.2.3.

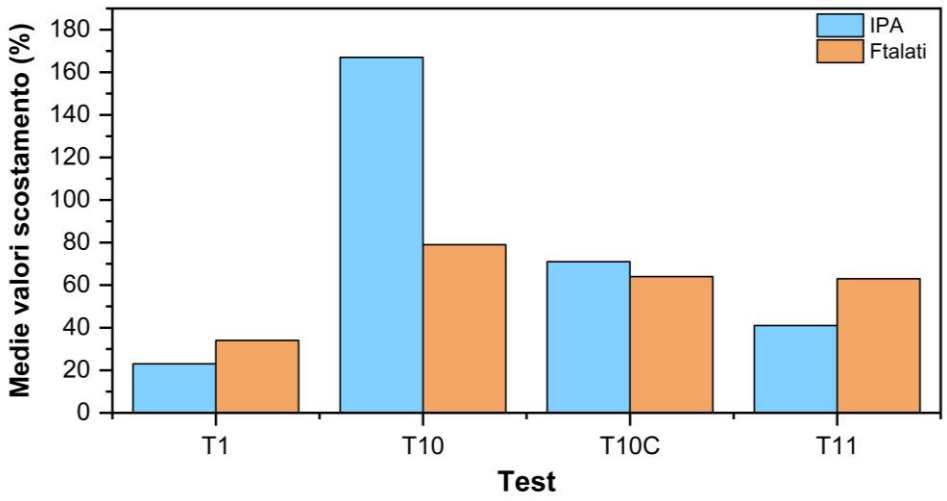


Figura 3.2.3 – Andamento valori medi dello scostamento nei test congiunti IPA e ftalati

Nel test T1 il valore di scostamento medio per gli IPA è quello calcolato in precedenza nel paragrafo "Test esplorativi per la determinazione degli IPA".

Tra i test eseguiti per valutare la preparativa congiunta di IPA e ftalati, sono stati effettuati due test (T10 e T10C) identici a livello di preparazione, con l'unica differenza nella fase di concentrazione finale (assente in T10 e presente in T10C), allo scopo di verificare se ci fossero controindicazioni, ad esempio, perdita di accuratezza, aggiungendo questo *step*. Con la concentrazione, infatti, la soluzione resta a contatto maggiormente con l'aria e questo potrebbe aumentare la contaminazione oppure la presenza del flusso di N_2 potrebbe allontanare gli analiti più leggeri. Confrontando i valori ottenuti nei test T10 e T10C è possibile notare che, per entrambe le classi di analiti, non si osserva un aumento di scostamento a causa della concentrazione: anzi, si passa da un valore per gli IPA di 167% per il T10 a 71% per il T10C. I valori ottenuti per gli ftalati, invece, non si differenziano di molto, passando rispettivamente da 79% a 64%.

Il test T11, eseguito con sali di disidratazione "standard", ha riportato per gli IPA dei valori di scostamento inferiori rispetto al test T10C (41% rispetto a 71%). Nei valori ottenuti per gli ftalati non si evidenziano particolari differenze (63% per T11 rispetto a 64% per T10C).

Confrontando tutti i valori di scostamento ottenuti nelle diverse prove è possibile verificare che il test migliore, ossia quello con valori di scostamento più bassi sia per gli IPA che per gli ftalati, è il test 1, che si esegue senza sali di estrazione e con purificante Lipid, riportando infatti dei valori di scostamento di 23% per gli IPA e 34% per gli ftalati.

Di conseguenza, la procedura preparativa utilizzata per il test 1 viene scelta per eseguire i test sui campioni di tessuto adiposo umano.

Valutazione procedura di decontaminazione

I risultati della valutazione dei bianchi procedurali, per definire le migliori tecniche di decontaminazione, sono riportati nella Tabella 2.4.3.

Per il confronto dei livelli di bianco è stato calcolato il rapporto tra le aree dei nativi e dei marcati, confrontato con il rapporto tra aree misurato nel FR. Il grafico di Figura 3.2.4 mostra l'area normalizzata (A_{norm}) ottenuta a seconda delle condizioni utilizzate.

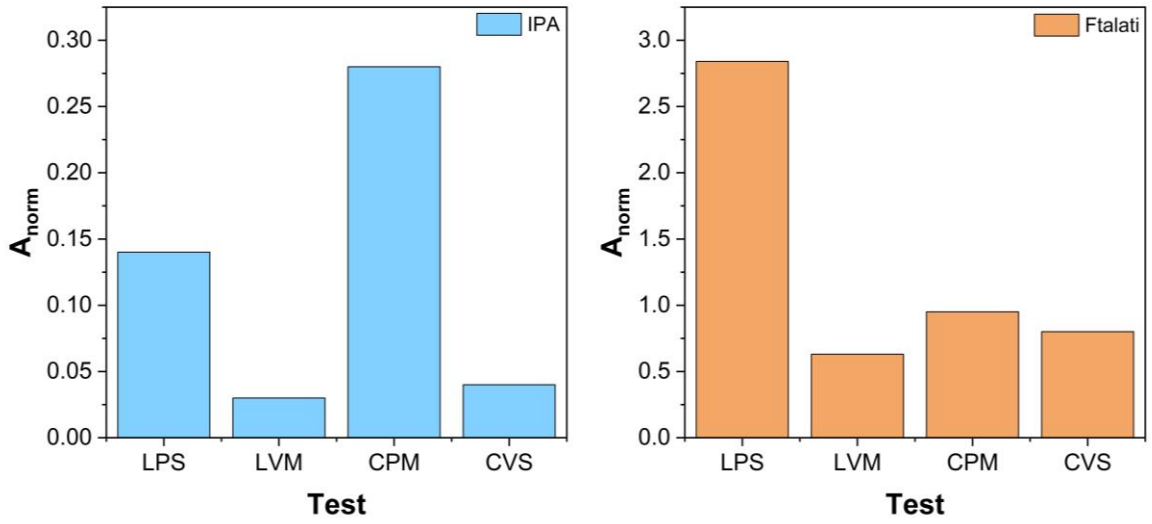


Figura 3.2.4 – Aree normalizzate degli analiti ottenute nei bianchi procedurali, secondo le quattro procedure di decontaminazione codificate in Tabella 2.4.3

Dal grafico di Figura 3.2.4 è possibile osservare che, in generale, i valori di A_{norm} sono molto più elevati per gli ftalati rispetto agli IPA. I livelli di contaminazione dei bianchi degli ftalati diminuiscono quando si presta maggiore attenzione alla procedura di decontaminazione, in particolare utilizzando materiali di vetro muffolati e reagenti decontaminati in stufa e lavati con solventi. Per quanto riguarda i livelli di bianco degli IPA, è possibile notare come l'opzione di decontaminazione meno preferibile sia l'utilizzo della *clean room* invece del normale laboratorio chimico. Infatti, si ottengono valori di bianchi più elevati per gli IPA proprio nella *clean room*.

Il test che ha prodotto valori di contaminazione minore sia per gli IPA che per gli ftalati è il test LVM che viene eseguito in laboratorio con materiale di vetro muffolato e sali di disidratazione riscaldati in stufa e conservati sotto esano. Di conseguenza è stato scelto di utilizzare questa

procedura preparativa per ridurre la contaminazione anche nell'analisi del tessuto adiposo umano.

3.3. Validazione dei metodi

Il primo parametro che si è deciso di valutare è l'effetto matrice, per determinare se la presenza di una matrice così complessa possa influenzare la risposta dell'analita.

Sia per gli IPA che per gli ftalati sono state costruite delle curve di calibrazione in soluzione e in matrice, costituite da sette punti di concentrazione corrispondente ad una quantità di analita da 0 a 500 ng (0, 10, 25, 50, 100, 250, 500 ng) e una quantità costante di standard interno di 50 ng per ogni grammo di campione.

Nelle curve di calibrazione, rappresentate nelle figure seguenti (Figura 3.3.1 e Figura 3.3.2), vengono già esclusi i punti di concentrazione che fuoriescono dalla linearità.

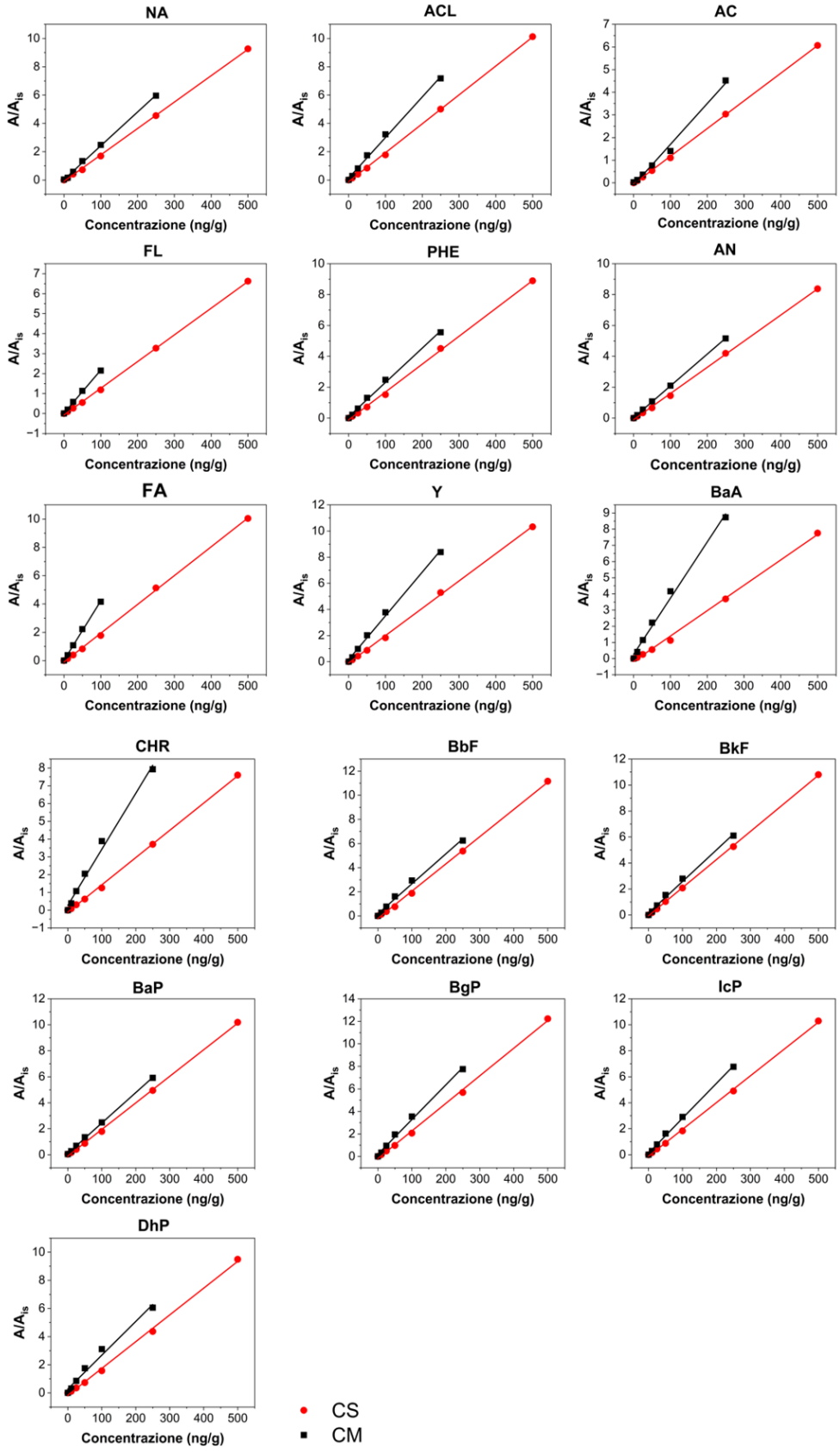


Figura 3.3.1 – Curve di calibrazione IPA realizzate in soluzione (CS, rosso) e in matrice (CM, nero)

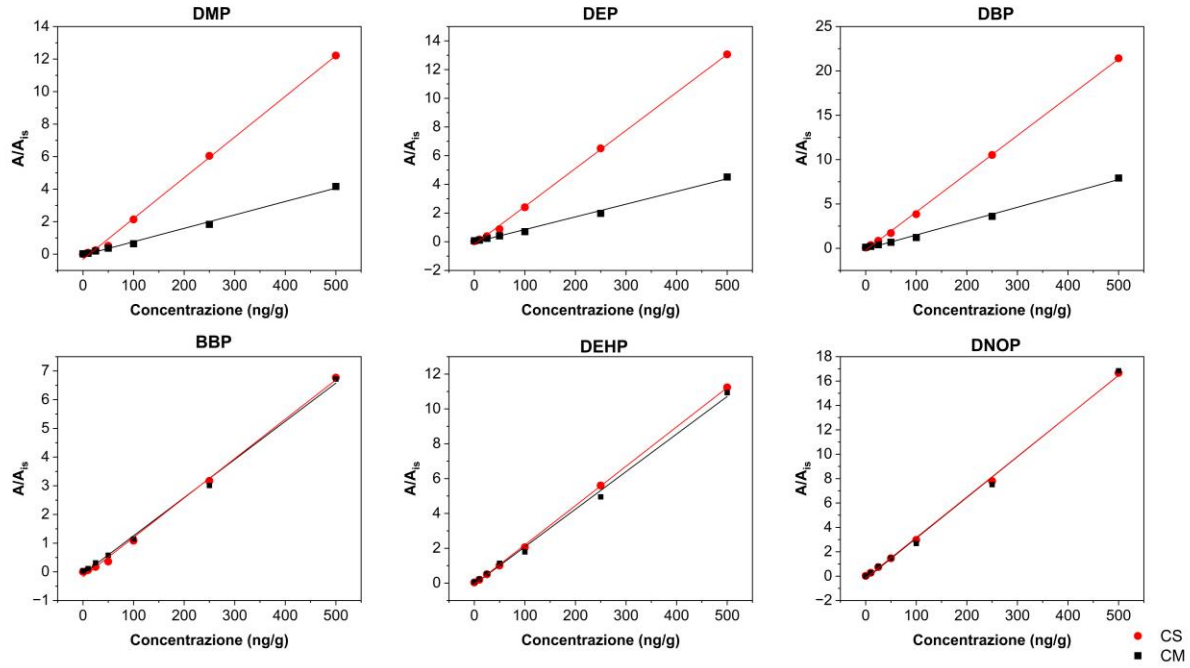


Figura 3.3.2 – Curve di calibrazione ftalati realizzate in soluzione (CS, rosso) e in matrice (CM, nero)

Dal confronto delle curve è possibile osservare una differenza apprezzabile di pendenza per la maggior parte degli analiti indagati, che viene quantificata utilizzando ME% (Tabella 3.3.1).

Tabella 3.3.1 – Effetto matrice per IPA e ftalati

IPA	Effetto matrice (ME%)
NA	28%
ACL	40%
AC	47%
FL	61%
PHE	23%
AN	22%
FA	106%
Y	60%
BaA	121%

IPA	Effetto matrice (ME%)
CHR	106%
BbF	10%
BkF	13%
BaP	15%
BgP	26%
IcP	30%
DhP	26%
FTALATI	
DMP	-67%
DEP	-67%
DBP	-64%
BBP	-3%
DEHP	-4%
DNOP	1%

Nel caso degli IPA si evidenzia, nella maggior parte dei casi, un valore di ME% superiore al 20%. Ciò significa che la matrice ha un effetto sul segnale analitico che non può essere trascurato. Di conseguenza, si sceglie di utilizzare come tecnica di quantificazione la curva di calibrazione in matrice. Nel caso degli ftalati, si osserva che i congeneri a più alto peso molecolare (BBP, DEHP e DNOP) presentano valori di ME% inferiori al 5% in termini assoluti: per questi, non sarebbe necessario utilizzare la curva di calibrazione in matrice. Tuttavia, dal momento che per gli ftalati leggeri è presente un forte effetto matrice, si stabilisce anche per questa classe di composti l'utilizzo della curva di calibrazione in matrice.

Dai parametri delle curve di calibrazione in matrice sono stati valutati l'intervallo di linearità, la sensibilità e il valore del coefficiente di correlazione R^2 per ogni analita. I valori di questi parametri sono riportati nella Tabella 3.3.2.

Tabella 3.3.2 – Intervallo linearità, sensibilità, R^2 di IPA e ftalati

IPA	Intervallo di linearità	Sensibilità	R^2
NA	0-250 ng/g	0.0239	0.9987
ACL	0-250 ng/g	0.0287	0.9964
AC	0-250 ng/g	0.0180	0.9917
FL	0-100 ng/g	0.0216	0.9985
PHE	0-250 ng/g	0.0222	0.9970
AN	0-250 ng/g	0.0206	0.9998
FA	0-100 ng/g	0.0419	0.9983
Y	0-250 ng/g	0.0335	0.9964
BaA	0-250 ng/g	0.0347	0.9929
CHR	0-250 ng/g	0.0315	0.9906
BbF	0-250 ng/g	0.0249	0.9930
BkF	0-250 ng/g	0.0243	0.9950
BaP	0-250 ng/g	0.0234	0.9994
BgP	0-250 ng/g	0.0308	0.9952
IcP	0-250 ng/g	0.0269	0.9979
DhP	0-250 ng/g	0.0240	0.9835

FTALATI			
DMP	0-500 ng/g	0.0082	0.9952
DEP	0-500 ng/g	0.0088	0.9941
DBP	0-500 ng/g	0.0156	0.9954
BBP	0-500 ng/g	0.0133	0.9969
DEHP	0-500 ng/g	0.0216	0.9966
DNOP	0-500 ng/g	0.0334	0.9963

L'intervallo di linearità per gli IPA è di 0-250 ng/g per tutti i congeneri, ad eccezione di FL e FA (0-100 ng/g); quello degli ftalati è di 0-500 ng/g per tutti i congeneri. La sensibilità è mediamente più alta per gli IPA rispetto agli ftalati, con valori da 0.02 a 0.04 per gli IPA e valori tra 0.008 e 0.03 per gli ftalati. In particolare, si osservano sensibilità particolarmente basse per DMP (0.0082) e DEP (0.0088). I valori di R^2 sono tutti superiori a 0.99, tranne che per il DhP (0.9835).

È opportuno tenere presente che, utilizzando la curva di calibrazione in matrice, la quantità di analita presente in ascissa non corrisponde alla quantità effettivamente presente, ma alla quantità di standard nativo aggiunto al campione di grasso bovino, nel quale potrebbero esserci quantità non trascurabili di analita. Per il successivo calcolo della concentrazione nei campioni, di MDL e MQL, perciò, si utilizza la sensibilità del metodo (ovvero, la pendenza della curva di calibrazione), considerando che tale pendenza si estenda anche a valori inferiori al primo punto della curva (corrispondente a nessuna aggiunta). Viceversa, nel calcolo dell'accuratezza, l'obiettivo è quello di ricalcolare proprio la quantità di standard nativo aggiunto al grasso bovino, perciò, è stata utilizzata l'equazione completa della retta.

Accuratezza e precisione sono state calcolate su sei ripetizioni di campioni di grasso bovino a cui sono stati aggiunti 50 ng di analiti nativi e 50 ng di standard marcati. I valori ottenuti sono riportati nella Tabella 3.3.3.

Tabella 3.3.3 – Valori di accuratezza e precisione di IPA e ftalati

IPA	Accuratezza %	Precisione%
NA	34%	36%
ACL	49%	21%
AC	60%	18%
FL	60%	14%
PHE	69%	18%
AN	66%	13%
FA	53%	11%
Y	55%	14%
BaA	69%	19%
CHR	75%	17%
BbF	78%	14%
BkF	73%	13%
BaP	72%	11%
BgP	64%	13%
IcP	64%	11%
DhP	68%	17%

FTALATI		
DMP	209%	38%
DEP	664%	55%
DBP	2440%	95%
BBP	76%	38%
DEHP	133%	40%
DNOP	49%	13%

Considerando i valori di accuratezza ottenuti nell'analisi degli IPA, è possibile osservare che l'analita che riporta un valore più elevato è BbF, con 78%. Invece, gli analiti con valori di accuratezza più bassi risultano NA e ACL, rispettivamente con accuratezze di 34% e 49%. Considerando invece i valori di precisione ottenuti per gli IPA, è possibile notare che per la maggior parte dei congeneri si ottengono valori inferiori al 20% (in particolare compresi tra 11 e 18%). Gli unici valori di precisione superiori al 20% si ritrovano per NA e ACL, rispettivamente di 36% e 21%. Di conseguenza, NA e ACL sono gli analiti che riportano valori di accuratezza più bassi e precisione più alti, rispetto ai loro congeneri.

Nelle accuratezze ottenute per gli ftalati è possibile evidenziare una maggiore distribuzione dei valori rispetto a quanto osservato per gli IPA: si passa dal valore più basso di 49%, per DNOP, a quello più elevato di 2440% per DMP. Rispetto ai valori di precisione ottenuti negli IPA, per gli ftalati si ottengono dei valori di RSD% più elevati (superiori al 38% per la maggior parte dei congeneri). L'unica eccezione è data da DNOP che riporta un valore del 13%.

Il tessuto adiposo è scarsamente studiato, di conseguenza non esistono delle indicazioni precise che aiutino nella valutazione dei risultati ottenuti e non si può fare riferimento a metodi standard, come ad esempio accade per le matrici ambientali. In generale, a causa della complessità della matrice, ci si aspetta dei valori di scostamento superiori rispetto ad altre matrici più semplici. Sousa *et al.* in un recente articolo [73] riportano per il tessuto adiposo umano valori di accuratezza per gli IPA che considerano non ottimali (compresi tra 18-113%) in quanto esterni all'intervallo 70-120%. Nonostante la scarsa accuratezza, scelgono di non scartare a priori tali analiti, ma definiscono delle condizioni per determinare se la

quantificazione sia accettabile o meno: valore di accuratezza compreso tra 30 e 140% e precisione inferiore al 20%. Definiscono inoltre la necessità di correggere il risultato finale, sulla base dell'accuratezza misurata.

In questo lavoro viene adottata la stessa strategia per valutare l'accettabilità della quantificazione. Nel caso degli IPA , NA e ACL rientrano nell'intervallo definito accettabile per l'accuratezza, ma la precisione delle misure ripetute risulta superiore al 20%. Di conseguenza, tali analiti vengono scartati per la quantificazione nel campione reale.

Per quanto riguarda gli ftalati, solo DNOP rientra nelle condizioni per l'accettabilità (accuratezza 49%, precisione 13%). Si evidenzia quindi la necessità di ulteriori studi per completare la messa a punto del metodo per la determinazione degli ftalati nel tessuto adiposo e si definisce di quantificare solo gli IPA nei campioni reali.

Vengono calcolati i valori di MDL e MQL attraverso l'analisi dei bianchi procedurali che vengono sottoposti alla procedura preparativa stabilita. I valori sono riportati nella Tabella 3.3.4.

Tabella 3.3.4 – MDL e MQL di IPA e ftalati

IPA	**MDL (ng/g)**	**MQL (ng/g)**
NA	5.86	12.38
ACL	14.58	16.92
AC	12.94	22.58
FL	2.13	4.33
PHE	2.93	6.41
AN	0.38	0.84
FA	0.64	1.34
Y	0.63	1.34
BaA	0.27	0.53
CHR	0.29	0.60

IPA	MDL (ng/g)	MQL (ng/g)
BbF	0.60	1.42
BkF	0.61	1.41
BaP	2.62	3.38
BgP	0.50	1.20
IcP	0.56	1.29
DhP	0.57	1.38
FTALATI		
DMP	129.33	342.07
DEP	115.68	287.65
DBP	429.45	1094.40
BBP	9.66	25.08
DEHP	61.82	154.40
DNOP	14.83	34.95

Per gli IPA è possibile notare che i valori di MDL sono compresi in un intervallo che va da 0.27 a 14.58 ng/g, mentre quelli di MQL sono compresi tra 0.53 e 22.58 ng/g. In particolare, il valore più elevato di MDL si ritrova per ACL, invece il valore più elevato di MQL si trova per AC. Nell'articolo di Sousa *et al.* [73] presente in letteratura vengono riportati valori di MDL compresi tra 0.04 e 12 ng/g e di MQL compresi tra 0.1 e 39 ng/g. È possibile osservare che i valori ottenuti in questo lavoro sono in linea con gli intervalli riportati in letteratura, ad eccezione dei valori di MDL di ACL e AC che sono rispettivamente 14.58 e 12.94 ng/g.

Nel caso dell'analisi degli ftalati, i valori di MDL sono compresi tra 9.66 e 429.45 ng/g, mentre i valori di MQL sono compresi tra 25.08 e 1094.40 ng/g. Da quanto osservato, in letteratura

non vengono riportati valori di MDL e MQL degli ftalati indagati nel tessuto adiposo umano, ma sono presenti degli studi che riportano tali valori nell'analisi di olio vegetale. In questo studio [74] sono riportati valori di MDL compresi tra 0.43-1.67 μg/L e di MQL compresi tra 1.50-5.80 μg/L.

3.4. Test sui campioni reali di tessuto adiposo umano

I test con i campioni reali vengono eseguiti utilizzando la procedura preparativa risultata preferibile, a seguito delle valutazioni descritte nei paragrafi precedenti. Come anticipato, a causa dei valori di accuratezza e precisione ottenuti nell'analisi degli ftalati è stato deciso di escluderli dalla quantificazione nel campione reale. Nei campioni di tessuto adiposo umano viene indagata unicamente la presenza degli IPA, con l'esclusione di NA e ACL.

La tecnica di quantificazione selezionata è la curva di calibrazione in matrice, a seguito delle valutazioni fatte nei test di validazione del metodo.

Nella seguente tabella (Tabella 3.4.1) sono riassunte le condizioni utilizzate per l'analisi dei campioni, la tecnica di quantificazione scelta e gli analiti determinati.

Tabella 3.4.1 – Condizioni utilizzate nei test su tessuto adiposo umano

Tecnica di decontaminazione scelta	Come test LVM: - Laboratorio classico di preparativa; - Materiali di vetro muffolati a 400°C per 4 ore; - Sali di disidratazione scaldati in stufa a 150°C per 24 ore, sonicati sotto diclorometano ed esano (3 volte, 10 minuti per ciascun solvente) e conservati sotto esano
Parametri utilizzati	Come test 1: - Solvente: ACN; - Sali di purificazione: Lipid; - Quantità di purificante: 0.450 g; - Sali di disidratazione: $MgSO_4$ e NaCl in rapporto 4:1 m/m
Procedura preparativa	- Inserire nella provetta 1 g di campione di grasso umano; - Aggiungere 5 mL di ACN e 50 µL di standard marcati di IPA; - Agitare le provette a 400 rpm per 3 minuti e successivamente centrifugarle per 5 minuti a 3000 rpm (1310 RCF); - Prelevare il surnatante e trasferirlo nelle provette di purificazione contenenti 1 g di sali Lipid; - Agitare le provette a 400 rpm per 3 minuti e successivamente centrifugarle per 3 minuti a 3000 rpm (1310 RCF);

	- Prelevare il surnatante e trasferirlo nelle provette di disidratazione in cui è presente 1 g di sali di disidratazione (MgSO4 e NaCl in rapporto 4:1 m/m); - Agitare le provette a 400 rpm per 3 minuti e successivamente centrifugarle per 3 minuti a 3000 rpm (1310 RCF); Trasferire il surnatante nelle *vial* da GC e analizzarlo.
Tecnica di quantificazione	Quantificazione con curva di calibrazione in matrice
Analiti determinati	AC, FL, PHE, AN, FA, Y, BaA, CHR, BbF, BkF, BaP, BgP, IcP, DhP

I campioni così ottenuti vengono analizzati al GC-MS utilizzando il metodo per l'analisi degli IPA riportato nella sezione "Analisi strumentale degli IPA" del paragrafo 2.5.

Per definire la presenza di un analita, il segnale analitico (rapporto tra area dell'analita e area dello standard marcato di riferimento) viene confrontato con il valore di MDL (nella stessa unità di misura); per definire se l'analita, oltre che presente, sia anche quantificabile, viene confrontato con il valore di MQL. Gli analiti che presentano segnali sotto MDL vengono considerati non determinati (nd); quelli che presentano segnali tra MDL e MQL vengono considerati determinati (DET); quelli con segnali superiori a MQL vengono quantificati. I risultati ottenuti sono riportati nella Tabella 3.4.2.

La denominazione dei campioni (anonimizzati) è quella codificata fornita dall'Unità Operativa Complessa di Chirurgia Plastica dell'Ospedale Universitario di Padova. Nella Tabella 3.4.2 vengono anche riportate le zone del corpo da cui sono stati prelevati i campioni. Alcuni test sono stati eseguiti in duplicato, quando la quantità di campione disponibile lo ha permesso.

Tabella 3.4.2 – Quantificazione IPA su campioni reali. Valori in ng/g

		IPA													
Campioni	**Test**	**AC**	**FL**	**PHE**	**AN**	**FA**	**Y**	**BaA**	**CHR**	**BbF**	**BkF**	**BaP**	**BgP**	**IcP**	**DhP**
9030 (addome)	1	nd	nd	nd	nd	nd	DET	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	2	nd	nd	nd	nd	nd	DET	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
9038 (braccio)	1	nd	nd	DET	DET	nd	4.88	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	2	nd	nd	nd	DET	nd	4.81	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
9039 (addome)	1	nd	nd	nd	nd	nd	DET	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	2	nd	nd	nd	nd	nd	DET	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
9041 (addome)	1	nd	nd	nd	nd	nd	3.05	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
9042 (braccio)	1	nd	nd	DET	DET	nd	4.73	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	2	nd	nd	DET	nd	nd	3.20	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
9043 (mammella)	1	nd	nd	DET	nd	nd	3.61	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
9060 (addome)	1	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	2	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
9066 (addome)	1	nd	nd	nd	nd	nd	2.34	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	2	nd	nd	nd	nd	nd	2.80	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
9067 (addome)	1	nd	nd	nd	nd	nd	DET	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	2	nd	nd	nd	nd	nd	2.74	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
9068 (addome)	1	nd	nd	nd	nd	nd	DET	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	2	nd	nd	DET	DET	nd	2.46	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd

Nei campioni reali è stato possibile confermare la presenza di tre analiti: PHE, AN, Y.

PHE è stato determinato in tre campioni differenti. Tuttavia, nel caso del campione 9038 non è stato determinato in entrambi i duplicati.

AN è stato determinato in due campioni, in almeno una delle repliche.

Y è stato determinato in 9 campioni su 10 analizzati ed è l'unico IPA per il quale è stato anche possibile quantificarne la presenza. L'unico campione in cui non è stato determinato è il campione 9060. Nei campioni 9030, 9039 e 9068 è stato possibile determinarlo. Nei campioni 9038, 9041, 9042, 9043, 9067 è stato possibile quantificarlo con concentrazioni comprese tra 2.34 e 4.88 ng/g.

4. CONCLUSIONI

In questo lavoro di tesi è stata messa a punto una metodologia analitica in grado di determinare quantitativamente la presenza di idrocarburi policiclici aromatici nel tessuto adiposo umano, in gascromatografia-spettrometria di massa con singolo quadrupolo. È stata inoltre indagata la possibilità di determinare anche gli ftalati, utilizzando lo stesso metodo.

Questa matrice è molto complessa e scarsamente studiata. Infatti in letteratura si ritrovano principalmente studi condotti su componenti come sangue e urine oppure negli alimenti (come pesci e molluschi). Per questo motivo non ci sono, al momento, metodi di riferimento. Data, però, la lipoficilità dei composti indagati, si è ritenuto importante svolgere degli studi mirati alla determinazione di questi inquinanti nel tessuto adiposo, per contribuire alla ricerca sul biomonitoraggio.

La fase più complessa è stata la preparazione del campione per l'analisi, che necessitava di un'attenta purificazione. Come tecnica preanalitica è stato testato il metodo di estrazione QuEChERS, una tecnica *green*, ad alta produttività, che consente di ridurre le tempistiche della preparativa e permette di utilizzare ridotte quantità di campioni e di solventi organici.

Per raggiungere l'obiettivo, è stato messo a punto con successo un metodo strumentale per l'analisi di 6 ftalati. Il metodo cromatografico ottimizzato permette di separare in modo efficace i diversi analiti e di quantificarli utilizzando come standard interno degli ftalati deuterati.

Come tecnica preparativa sono state studiate diverse opzioni di estrazione e purificazione su campioni surrogati di tessuto adiposo animale, oltre che diverse tecniche mirate alla riduzione della contaminazione ambientale, utili soprattutto per la determinazione degli ftalati. Come riportato anche in letteratura, la presenza di ftalati è ubiquitaria: questi composti sono presenti anche nell'ambiente di laboratorio e nei materiali utilizzati. In questo lavoro di tesi viene confermato l'elevato livello di contaminazione da ftalati, attraverso la valutazione dei bianchi procedurali, nonostante le tecniche di decontaminazione applicate. Questo ha probabilmente avuto un ruolo nella scarsa accuratezza ottenuta nella quantificazione di questi analiti. Sviluppi futuri di questo lavoro dovrebbero focalizzarsi sul miglioramento del metodo di analisi di tali composti, soprattutto al fine di ridurre la contaminazione, ad esempio attraverso l'utilizzo di solventi di purezza diversa e materiali specifici per questo tipo di analisi.

I test di preparativa effettuati hanno permesso comunque di mettere a punto un efficace metodo di preparazione del campione per la determinazione di 14 IPA in tessuto adiposo umano. Si tratta di uno dei pochi metodi per la determinazione di questi composti in una matrice così complessa e l'unico, da quel che è stato osservato in letteratura, che utilizza il metodo QuEChERS e la GC-MS. Ulteriori test potrebbero essere condotti per valutare se ci sia margine nel miglioramento dell'accuratezza di quantificazione, che comunque, nel metodo attuale, è stata compensata a posteriori grazie all'impiego degli standard interni. Una buona possibilità, emersa durante questo lavoro, è l'utilizzo del GC-MS con triplo quadrupolo, che, nei pochi test effettuati con entrambe le tecniche, ha mostrato livelli di accuratezza migliori rispetto al singolo quadrupolo.

Il metodo è stato applicato su 10 campioni di tessuto adiposo umano, verificando così la fattibilità di questo tipo di analisi anche su campioni reali. Nonostante la bassa concentrazione di questi composti nei tessuti umani, l'applicazione di questo metodo ha permesso di determinare e quantificare alcuni IPA, in particolare il pirene con una concentrazione compresa tra 2.34 e 4.88 ng/g.

Il metodo messo a punto in questo lavoro di tesi per analizzare gli ftalati potrebbe essere utilizzato per studi su diverse tipologie di matrici. Nella matrice grassa sono state riscontrate delle difficoltà legate alla contaminazione, ma si potrebbe approfondire lo studio di altre matrici per ulteriori riscontri. Inoltre, il metodo può fungere da base di partenza per la determinazione di un set più esteso di ftalati oppure altri additivi plastici.

In questo lavoro, il metodo di preparativa per la determinazione degli IPA è stato messo a punto allo scopo di valutare la presenza di inquinanti nei tessuti umani, in accordo con l'obiettivo del progetto INSYDE-HU. Successivamente, potrebbe essere applicato su campioni di tessuti adiposi animali, per eseguire studi di bioaccumulo ed ecotossicità.

Inoltre, la stessa preparativa potrebbe essere testata, sia nell'ambito del biomonitoraggio che in studi di ecotossicità, per l'estrazione di altri inquinanti prioritari o emergenti da matrici adipose.

In contesto ecologico è importante citare anche la potenzialità di estensione e applicazione delle metodiche messe a punto in questo lavoro per lo studio dei processi di bioaccumulo di

inquinanti lipofili nella fauna polare, che è particolarmente sensibile ai fenomeno di contaminazione globale.

5. BIBLIOGRAFIA

[1] A. S. Sergi, *Ambiente e inquinamento*. Youcanprint, 2021.

[2] Bianchi, Fabrizio e Comba, Pietro, «Indagini epidemiologiche nei siti inquinati: basi scientifiche, procedure metodologiche e gestionali, prospettive di equità». Istituto Superiore di Sanità, 2006.

[3] «Inquinamento atmosferico e acustico | Note tematiche sull'Unione europea | Parlamento Europeo». Consultato: 9 settembre 2024. [Online]. Disponibile su: https://www.europarl.europa.eu/factsheets/it/sheet/75/inquinamento-atmosferico-e-acustico

[4] «Europe's air quality status 2023», European Environment Agency. Consultato: 9 settembre 2024. [Online]. Disponibile su: https://www.eea.europa.eu/publications/europes-air-quality-status-2023/europes-air-quality-status2023

[5] K. Vorkamp *et al.*, «Coordination of chemical analyses under the European Human Biomonitoring Initiative (HBM4EU): Concepts, procedures and lessons learnt», *Int. J. Hyg. Environ. Health*, vol. 251, p. 114183, giu. 2023, doi: 10.1016/j.ijheh.2023.114183.

[6] biscotti, «Tessuto Adiposo - patologie cutanee annesse e terapie - IDE Milano», Istituto IDE. Consultato: 28 agosto 2024. [Online]. Disponibile su: https://www.ide.it/patologie/tessuto-adiposo/

[7] G. W. Yu, J. Laseter, e C. Mylander, «Persistent Organic Pollutants in Serum and Several Different Fat Compartments in Humans», *J. Environ. Public Health*, vol. 2011, fasc. 1, p. 417980, 2011, doi: 10.1155/2011/417980.

[8] P. Comba, F. Bianchi, I. Iavarone, e R. Pirastu, «Impatto sulla salute dei siti inquinanti: metodi e strumenti per la ricerca e le valutazioni», Istituto Superiore di Sanità, Roma, 2007. Consultato: 2 settembre 2024. [Online]. Disponibile su: https://www.iss.it/documents/20126/45616/07-50.1204799444.pdf/27301283-e0b1-e741-2539-6f7eb1349852?t=1581098476498#page=107

[9] D. Mullerova e J. Kopecký, «White adipose tissue: Storage and effector site for environmental pollutants», *Physiol. Res. Acad. Sci. Bohemoslov.*, vol. 56, pp. 375–81, feb. 2007, doi: 10.33549/physiolres.931022.

[10] B. R. Gurjar, L. T. Molina, e C. S. P. Ojha, A c. di, *Air Pollution: Health and Environmental Impacts*. Boca Raton: CRC Press, 2010. doi: 10.1201/EBK1439809624.

[11] V. Arsenescu, R. I. Arsenescu, V. King, H. Swanson, e L. A. Cassis, «Polychlorinated Biphenyl-77 Induces Adipocyte Differentiation and Proinflammatory Adipokines and Promotes Obesity and Atherosclerosis», *Environ. Health Perspect.*, vol. 116, fasc. 6, pp. 761–768, giu. 2008, doi: 10.1289/ehp.10554.

[12] N. Acharya, B. Gautam, S. Subbiah, M. M. Rogge, T. A. Anderson, e W. Gao, «Polycyclic aromatic hydrocarbons in breast milk of obese vs normal women: Infant exposure and risk assessment», *Sci. Total Environ.*, vol. 668, pp. 658–667, giu. 2019, doi: 10.1016/j.scitotenv.2019.02.381.

[13] S. Sousa *et al.*, «Evaluating the impact of polycyclic aromatic hydrocarbon bioaccumulation in adipose tissue of obese women», *Chemosphere*, vol. 353, p. 141673, apr. 2024, doi: 10.1016/j.chemosphere.2024.141673.

[14] E. Mlyczyńska *et al.*, «Concentration of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in Human Serum and Adipose Tissues and Stimulatory Effect of Naphthalene in Adipogenesis in 3T3-L1 Cells», *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 24, fasc. 2, Art. fasc. 2, gen. 2023, doi: 10.3390/ijms24021455.

[15] A. K. Haritash e C. P. Kaushik, «Biodegradation aspects of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs): A review», *J. Hazard. Mater.*, vol. 169, fasc. 1–3, pp. 1–15, set. 2009, doi: 10.1016/j.jhazmat.2009.03.137.

[16] S. Moret, «4.14 – Sample Preparation Techniques for the Determination of Some Food Contaminants (Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, Mineral Oils and Phthalates)».

[17] I. J. Keyte, R. M. Harrison, e G. Lammel, «Chemical reactivity and long-range transport potential of polycyclic aromatic hydrocarbons – a review», *Chem. Soc. Rev.*, vol. 42, fasc. 24, pp. 9333–9391, nov. 2013, doi: 10.1039/C3CS60147A.

[18] «Coefficiente di ripartizione ottanolo/acqua - Enciclopediambiente». Consultato: 24 settembre 2024. [Online]. Disponibile su: https://www.enciclopediambiente.com/definizioni/coefficiente-di-ripartizione-ottanoloacqua/

[19] PubChem, «PubChem». Consultato: 24 settembre 2024. [Online]. Disponibile su: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/

[20] I. Manciulea e L. Dumitrescu, «IDROCARBURI POLICICLICI AROMATICI (IPA)».

[21] G. R. Sampaio *et al.*, «Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Foods: Biological Effects, Legislation, Occurrence, Analytical Methods, and Strategies to Reduce Their Formation», *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 22, fasc. 11, p. 6010, giu. 2021, doi: 10.3390/ijms22116010.

[22] P. M. Santos, M. del Nogal Sánchez, J. L. P. Pavón, e B. M. Cordero, «Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in human biological samples: A critical review», *TrAC Trends Anal. Chem.*, vol. 113, pp. 194–209, apr. 2019, doi: 10.1016/j.trac.2019.02.010.

[23] P. Gao, E. Da Silva, L. Hou, N. D. Denslow, P. Xiang, e L. Q. Ma, «Human exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons: Metabolomics perspective», *Environ. Int.*, vol. 119, pp. 466–477, ott. 2018, doi: 10.1016/j.envint.2018.07.017.

[24] S. Sun *et al.*, «Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and the Risk of Kidney Stones in US Adults: An Exposure-Response Analysis of NHANES 2007–2012», *Int. J. Gen. Med.*, vol. Volume 14, pp. 2665–2676, giu. 2021, doi: 10.2147/IJGM.S319779.

[25] «Regolamento (UE) 2023/915 della commissione del 25 aprile 2023 relativo ai tenori massimi di alcuni contaminanti negli alimenti e che abroga il regolamento (CE) n. 1881/2006», Gazzetta ufficiale dell'Unione europea, Regolamento, apr. 2023. Consultato: 27 agosto 2024. [Online]. Disponibile su: https://eur-lex.europa.eu/legal-content/IT/TXT/PDF/?uri=CELEX:32023R0915

[26] A. Sambolino *et al.*, «Determination of phthalic acid esters and di(2-ethylhexyl) adipate in fish and squid using the ammonium formate version of the QuEChERS method combined with gas chromatography mass spectrometry», *Food Chem.*, vol. 380, p. 132174, giu. 2022, doi: 10.1016/j.foodchem.2022.132174.

[27] A. Arena, M. Zoccali, L. Mondello, e 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.*, vol. 396, p. 133721, dic. 2022, doi: 10.1016/j.foodchem.2022.133721.

[28] E. Ranucci, «FTALATI: PROPRIETÀ CHIMICO FISICHE E TOSSICITÀ», *Ist. Lomb. - Accad. Sci. E Lett. • Incontri Studio*, dic. 2022, doi: 10.4081/incontri.2022.800.

[29] K. Ding *et al.*, «*In vitro* and *in silico* investigations of the binary-mixture toxicity of phthalate esters and cadmium (II) to *Vibrio qinghaiensis sp.-Q67*», *Sci. Total Environ.*, vol. 580, pp. 1078–1084, feb. 2017, doi: 10.1016/j.scitotenv.2016.12.062.

[30] N. Stojić *et al.*, «Prediction of the Impact of Land Use and Soil Type on Concentrations of Heavy Metals and Phthalates in Soil Based on Model Simulation», *Toxics*, vol. 11, fasc. 3, p. 269, mar. 2023, doi: 10.3390/toxics11030269.

[31] M. Song, C. Chi, M. Guo, X. Wang, L. Cheng, e X. Shen, «Pollution levels and characteristics of phthalate esters in indoor air of offices», *J. Environ. Sci.*, vol. 28, pp. 157–162, feb. 2015, doi: 10.1016/j.jes.2014.05.051.

[32] L. Barp *et al.*, «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*, vol. 887, pp. 237–244, ago. 2015, doi: 10.1016/j.aca.2015.06.039.

[33] Y. Wang e H. Qian, «Phthalates and Their Impacts on Human Health», *Healthcare*, vol. 9, fasc. 5, Art. fasc. 5, mag. 2021, doi: 10.3390/healthcare9050603.

[34] *Direttiva 2007/19/CE della Commissione, del 30 marzo 2007 , che modifica la direttiva 2002/72/CE relativa ai materiali e agli oggetti di materia plastica destinati a venire a contatto con i prodotti alimentari e la direttiva 85/572/CEE del Consiglio che fissa l'elenco dei simulanti da impiegare per la verifica della migrazione dei costituenti dei materiali e degli oggetti di materia plastica destinati a venire a contatto con i prodotti alimentari (Testo rilevante ai fini del SEE)*, vol. 091. 2007. Consultato: 10 luglio 2024. [Online]. Disponibile su: http://data.europa.eu/eli/dir/2007/19/oj/ita

[35] L. Caporossi *et al.*, «Cross Sectional Study on Exposure to BPA and Phthalates and Semen Parameters in Men Attending a Fertility Center», *Int. J. Environ. Res. Public. Health*, vol. 17, fasc. 2, p. 489, gen. 2020, doi: 10.3390/ijerph17020489.

[36] M. Zhu *et al.*, «Phthalates promote prostate cancer cell proliferation through activation of ERK5 and p38», *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, vol. 63, pp. 29–33, ott. 2018, doi: 10.1016/j.etap.2018.08.007.

[37] «Commission Regulation (EU) No 10/2011 of 14 January 2011 on plastic materials and articles intended to come into contact with food».

[38] EFSA Panel on Food Contact Materials, Enzymes and Processing Aids (CEP) *et al.*, «Update of the risk assessment of di-butylphthalate (DBP), butyl-benzyl-phthalate (BBP), bis(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP), di-isononylphthalate (DINP) and di-isodecylphthalate (DIDP) for use in food contact materials», *EFSA J.*, vol. 17, fasc. 12, p. e05838, 2019, doi: 10.2903/j.efsa.2019.5838.

[39] R. Perestrelo *et al.*, «QuEChERS - Fundamentals, relevant improvements, applications and future trends», *Anal. Chim. Acta*, vol. 1070, pp. 1–28, set. 2019, doi: 10.1016/j.aca.2019.02.036.

[40] W. Dong *et al.*, «Matrix Effects in Detection of Phthalate Esters from Wheat by a Modified QuEChERS Method with GC/MS», *Food Anal. Methods*, vol. 10, fasc. 9, pp. 3166–3180, set. 2017, doi: 10.1007/s12161-017-0892-4.

[41] M. Anastassiades, S. J. Lehotay, D. Štajnbaher, e 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.*, vol. 86, fasc. 2, pp. 412–431, mar. 2003, doi: 10.1093/jaoac/86.2.412.

[42] S. J. Lehotay, A. D. Kok, M. Hiemstra, e P. V. Bodegraven, «Validation of a Fast and Easy Method for the Determination of Residues from 229 Pesticides in Fruits and Vegetables Using Gas and Liquid Chromatography and Mass Spectrometric Detection», *J. AOAC Int.*, vol. 88, fasc. 2, pp. 595–614, mar. 2005, doi: 10.1093/jaoac/88.2.595.

[43] B. Reichert, A. de Kok, I. R. Pizzutti, J. Scholten, C. D. Cardoso, e M. Spanjer, «Simultaneous determination of 117 pesticides and 30 mycotoxins in raw coffee, without clean-up, by LC-ESI-MS/MS analysis», *Anal. Chim. Acta*, vol. 1004, pp. 40–50, apr. 2018, doi: 10.1016/j.aca.2017.11.077.

[44] P. Kaczyński e B. Łozowicka, «One-Step QuEChERS-Based Approach to Extraction and Cleanup in Multiresidue Analysis of Sulfonylurea Herbicides in Cereals by Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry», *Food Anal. Methods*, vol. 10, fasc. 1, pp. 147–160, gen. 2017, doi: 10.1007/s12161-016-0564-9.

[45] M. M. Melough *et al.*, «Identification and Quantitation of Furocoumarins in Popularly Consumed Foods in the U.S. Using QuEChERS Extraction Coupled with UPLC-MS/MS Analysis», *J. Agric. Food Chem.*, vol. 65, fasc. 24, pp. 5049–5055, giu. 2017, doi: 10.1021/acs.jafc.7b01279.

[46] M. Faraji e M. Adeli, «Sensitive determination of melamine in milk and powdered infant formula samples by high-performance liquid chromatography using dabsyl chloride derivatization followed by dispersive liquid–liquid microextraction», *Food Chem.*, vol. 221, pp. 139–146, apr. 2017, doi: 10.1016/j.foodchem.2016.10.002.

[47] L. Correia-Sá, S. Norberto, C. Delerue-Matos, C. Calhau, e V. F. Domingues, «Micro-QuEChERS extraction coupled to GC–MS for a fast determination of Bisphenol A in human urine», *J. Chromatogr. B*, vol. 1072, pp. 9–16, gen. 2018, doi: 10.1016/j.jchromb.2017.10.060.

[48] S. Dulaurent, S. El Balkhi, L. Poncelet, J.-M. Gaulier, P. Marquet, e F. Saint-Marcoux, «QuEChERS sample preparation prior to LC-MS/MS determination of opiates, amphetamines, and cocaine metabolites in whole blood», *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 408, fasc. 5, pp. 1467–1474, feb. 2016, doi: 10.1007/s00216-015-9248-3.

[49] A. Wurita *et al.*, «Identification and quantification of metabolites of AB-CHMINACA in a urine specimen of an abuser», *Leg. Med.*, vol. 19, pp. 113–118, mar. 2016, doi: 10.1016/j.legalmed.2015.07.011.

[50] P. Kaczyński, B. Łozowicka, M. Jankowska, e I. Hrynko, «Rapid determination of acid herbicides in soil by liquid chromatography with tandem mass spectrometric detection based on dispersive solid phase extraction», *Talanta*, vol. 152, pp. 127–136, mag. 2016, doi: 10.1016/j.talanta.2016.02.001.

[51] G. Islas, I. S. Ibarra, P. Hernandez, J. M. Miranda, e A. Cepeda, «Dispersive Solid Phase Extraction for the Analysis of Veterinary Drugs Applied to Food Samples: A Review», *Int. J. Anal. Chem.*, vol. 2017, fasc. 1, p. 8215271, 2017, doi: 10.1155/2017/8215271.

[52] M. Hidalgo-Serrano, F. Borrull, R. M. Marcé, e E. Pocurull, «Simple method for determining phthalate diesters and their metabolites in seafood species using QuEChERS extraction and liquid chromatography-high resolution mass spectrometry», *Food Chem.*, vol. 336, p. 127722, gen. 2021, doi: 10.1016/j.foodchem.2020.127722.

[53] J. Verma, R. R. Jha, N. Gupta, R. Singh Thakur, N. G. Ansari, e D. K. Patel, «QuEChERS based analysis of multiple pesticides and phthalates in packaged food products», *Microchem. J.*, vol. 171, p. 106882, dic. 2021, doi: 10.1016/j.microc.2021.106882.

[54] S. A. Morrison, K. K. Sieve, R. E. Ratajczak, R. B. Bringolf, e J. B. Belden, «Simultaneous extraction and cleanup of high-lipid organs from white sturgeon (Acipenser transmontanus) for multiple legacy and emerging organic contaminants using QuEChERS sample preparation», *Talanta*, vol. 146, pp. 16–22, gen. 2016, doi: 10.1016/j.talanta.2015.08.021.

[55] D. Lucas e L. Zhao, «PAH Analysis in Salmon with Enhanced Matrix Removal».

[56] K. K. Stenerson, «Extraction and Analysis of PAHs from Grilled Hamburger».

[57] N. D. Forsberg, G. R. Wilson, e K. A. Anderson, «Determination of Parent and Substituted Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in High-Fat Salmon Using a Modified QuEChERS Extraction,

Dispersive SPE and GC–MS», *J. Agric. Food Chem.*, vol. 59, fasc. 15, pp. 8108–8116, ago. 2011, doi: 10.1021/jf201745a.

[58] C. St, *Applied Design of Experiment and Taguchi Metods*. 2022.

[59] Z. Fereshteh, M. Fathi, S. Kargozar, e A. Samadikuchaksaraei, «Implementing Taguchi method to analyze electrospinning parameters influence on Mg-doped fluorapatite nanoparticles-poly (ε-caprolactone) nanocomposite scaffold (Mg-FA NPs/PCL) properties», *Polym. Adv. Technol.*, vol. 31, fasc. 12, pp. 3114–3125, 2020, doi: 10.1002/pat.5036.

[60] E. Alibakhshi, E. Ghasemi, e M. Mahdavian, «Optimization of potassium zinc phosphate anticorrosion pigment by Taguchi experimental design», *Prog. Org. Coat.*, vol. 76, fasc. 1, pp. 224–230, gen. 2013, doi: 10.1016/j.porgcoat.2012.09.009.

[61] X. Dong *et al.*, «Enhancing real-time cell culture monitoring: Automated Raman model optimization with Taguchi method», *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 121, fasc. 6, pp. 1831–1845, 2024, doi: 10.1002/bit.28688.

[62] Y. Guo e K. Kannan, «Challenges encountered in the analysis of phthalate esters in foodstuffs and other biological matrices», *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 404, fasc. 9, pp. 2539–2554, nov. 2012, doi: 10.1007/s00216-012-5999-2.

[63] D. A. Skoog, S. R. Crouch, F. J. Holler, M. Manzari, J. Monterisi, e L. Sabbatini, *Chimica analitica strumentale*, 2. ed. Napoli: EdiSES, 2009.

[64] S. Propionato McLafferty, Quadrupole, «SPETTROMETRIA di MASSA. - ppt scaricare». Consultato: 11 settembre 2024. [Online]. Disponibile su: https://slideplayer.it/slide/11992073/

[65] E. de Hoffmann e V. Stroobant, *Mass Spectrometry: Principles and Applications*. John Wiley & Sons, 2007.

[66] S. R. Crouch, F. J. Holler, D. A. Skoog, D. M. West, e L. Sabbatini, *Fondamenti di chimica analitica di Skoog e West*, 3. ed. Napoli: EdiSES, 2015.

[67] N. Wang *et al.*, «Simultaneous determination of pesticides, polycyclic aromatic hydrocarbons, polychlorinated biphenyls and phthalate esters in human adipose tissue by gas chromatography–tandem mass spectrometry», *J. Chromatogr. B*, vol. 898, pp. 38–52, giu. 2012, doi: 10.1016/j.jchromb.2012.04.012.

[68] P. Yin, X. Liu, H. Chen, R. Pan, e G. Ma, «Determination of 16 phthalate esters in tea samples using a modified QuEChERS sample preparation method combined with GC-MS/MS», *Food Addit. Contam. Part A*, vol. 31, fasc. 8, pp. 1406–1413, ago. 2014, doi: 10.1080/19440049.2014.933490.

[69] D. Li, R. Stevens, e C. English, «GC-MS Analysis of Phthalates: Comparison of GC Stationary Phase Performance».

[70] M. M. Sanagi, S. L. Ling, Z. Nasir, D. Hermawan, W. A. Wan Ibrahim, e A. A. Naim, «Comparison of Signal-to-Noise, Blank Determination, and Linear Regression Methods for the

Estimation of Detection and Quantification Limits for Volatile Organic Compounds by Gas Chromatography», *J. AOAC Int.*, vol. 92, fasc. 6, pp. 1833–1838, nov. 2009, doi: 10.1093/jaoac/92.6.1833.

[71] S. di Granite, «Instrument Detection Limit (IDL) for the Scion SQ GC-MS», SCION Instruments. Consultato: 28 agosto 2024. [Online]. Disponibile su: https://scioninstruments.com/us/instrument-detection-limit-idl-for-the-scion-sq-gc-ms/

[72] «Liner ultra inerti per GC, Liner disattivati | Agilent». Consultato: 27 agosto 2024. [Online]. Disponibile su: https://www.agilent.com/en/product/gas-chromatography/gc-supplies-accessories/inlet-liners-seals-o-rings-for-gc/ultra-inert-liners-for-gc?gad_source=1&gclid=Cj0KCQjwz7C2BhDkARIsAA_SZKbdprhJ8xkeXr3JVzbi9Odc1vQZqKp6gbfRofvXYCz2iG2xl0AgV-saAhwvEALw_wcB&gclsrc=aw.ds

[73] S. Sousa *et al.*, «Optimization of a simple, effective, and greener methodology for polycyclic aromatic hydrocarbon extraction from human adipose tissue», *Anal. Methods*, vol. 15, fasc. 13, pp. 1722–1733, 2023, doi: 10.1039/D2AY02075K.

[74] Y. Xiao *et al.*, «Simultaneous Determination of Nine Phthalates in Vegetable Oil by Atmospheric Pressure Gas Chromatography with Tandem Mass Spectrometry (APGC-MS/MS)», *Toxics*, vol. 11, fasc. 3, Art. fasc. 3, mar. 2023, doi: 10.3390/toxics11030200.