

# Determinazione dei policlorobifenili diossina-simili negli alimenti zootecnici e di origine animale mediante gascromatografia e spettrometria di massa ad alta risoluzione

Gianfranco Diletti, Roberta Ceci, Alfonso De Benedictis, Giacomo Migliorati & Giampiero Scortichini

## Riassunto

Il presente lavoro descrive un metodo per la determinazione dei dodici policlorobifenili diossina-simili (dl-PCB) in alimenti zootecnici e di origine animale mediante gas cromatografia e spettrometria di massa ad alta risoluzione (HRGC-HRMS). L'impiego di attrezzature semi-automatiche, quali un apparecchio di estrazione accelerata con solvente e del sistema di purificazione Power-Prep ha permesso di ridurre considerevolmente il tempo necessario per il trattamento del campione prima dell'analisi strumentale, rispetto all'estrazione con metodo Soxhlet ed alla purificazione manuale su colonne tradizionalmente utilizzati. La metodica in oggetto ha dimostrato di possedere una buona specificità (lievi interferenze limitate ai PCB 81 e 123 su matrici con elevati livelli di contaminazione, quali pesci e mangimi per pesci) ed i limiti di determinazione sono stati compresi tra 0,2 e 1,3 pg/g di grasso. I coefficienti di variazione relativi alle prove di ripetibilità sono risultati nell'intervallo 2,6-18,3%, con percentuali di recupero superiori all'80%. Il metodo è stato applicato con successo all'analisi di 177 campioni di varie tipologie di alimenti previsti dal Piano Nazionale Residui dell'anno 2005, che costituiscono i primi dati

sui livelli di contaminazione dei PCB diossina-simili rilevati in Italia nell'ambito di tale piano di monitoraggio.

## Parole chiave

Alimenti, Diossine, Gas-cromatografia ad alta risoluzione, Mangimi, Spettrometria di massa ad alta risoluzione.

## Introduzione

Le policlorodibenzo-*p*-diossine (PCDD) ed i policlorodibenzofurani (PCDF), comunemente indicati come "diossine", ed i policlorobifenili (PCB) costituiscono un gruppo di microinquinanti organici ubiquitari e persistenti nell'ambiente, dove possono essere trasportati per lunghe distanze (18). Tali sostanze tendono al bioaccumulo negli organismi animali ed alla biomagnificazione nella catena trofica, raggiungendo concentrazioni potenzialmente rilevanti sul piano tossicologico (11, 12, 13, 14, 19, 23). Le diossine e i PCB mostrano caratteristiche chimiche e di pericolosità analoghe, sebbene le loro fonti di origine siano spesso differenti. A differenza delle diossine, sottoprodotti indesiderati di processi chimici e di combustione, i PCB sono stati prodotti

Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise 'G. Caporale', Via Campo Boario, 64100 Teramo, Italia  
g.diletti@izs.it

deliberatamente quali componenti di vernici, plastificanti, isolanti, fluidi dielettrici, ecc. sino al 1985, anno in cui ne sono stati vietati la commercializzazione e l'uso, a causa dei loro comprovati effetti tossici sul sistema riproduttivo (6).

I PCB costituiscono un gruppo di 209 composti aromatici derivati dal bifenile per sostituzione degli atomi di idrogeno con atomi di cloro. Tra tutti i possibili congeneri, solo dodici composti, contenenti atomi di cloro in posizione non-orto (i cosiddetti PCB coplanari) o con un unico atomo di cloro in una delle quattro posizioni orto (PCB mono-orto clorurati), presentano un grado di tossicità comparabile a quello delle diossine, e sono pertanto denominati "PCB diossina-simili" (dl-PCB). Studi condotti in vari paesi europei hanno evidenziato come il contributo dei dl-PCB al valore complessivo degli equivalenti di tossicità (TEQ) negli alimenti sia predominante rispetto a quello delle diossine (7, 15). Di conseguenza, la normativa europea relativa ai tenori massimi di diossine nelle derrate alimentari e negli alimenti per animali è stata recentemente aggiornata, includendo i livelli massimi per i dl-PCB sommati ai PCDD e PCDF (3, 4). La determinazione dei dl-PCB nei prodotti alimentari è resa difficoltosa da una serie di fattori, quali le basse concentrazioni degli analiti da ricercare (tipicamente a livello di pg/g), la presenza di sostanze interferenti nelle matrici in esame ed il rischio di contaminazione del campione nel corso dell'analisi. I requisiti fondamentali di un protocollo analitico per la determinazione di tali sostanze devono essere, quindi, un'elevata sensibilità e specificità. Una combinazione di differenti tecniche di purificazione e l'utilizzo di spettrometri di massa ad alta risoluzione hanno reso possibile l'ottenimento di questi requisiti (21). La preparazione del campione è però caratterizzata da lunghi processi di estrazione e purificazione, poco compatibili con la necessità di esaminare un numero elevato di campioni in tempi contenuti da parte dei laboratori di routine. Il presente lavoro ha riguardato la messa a punto e validazione di un metodo analitico per la determinazione dei dl-PCB in prodotti

alimentari, basato sull'impiego di un processo di estrazione e di purificazione semi-automatizzato con la finalità di ridurre il tempo di preparazione del campione e l'impiego di manodopera. Il metodo è stato utilizzato per la determinazione dei dl-PCB su 177 campioni di alimenti prelevati nell'ambito del Piano Nazionale Residui (PNR) dell'anno 2005.

## Materiali e metodi

### Standard di riferimento

Tutte le soluzioni standard di riferimento, in nonano, sono state fornite dalla Wellington Laboratories (Toronto, Ontario) e conservate a 4°C. Per la taratura strumentale, sono state utilizzate le sei soluzioni standard riportate in Tabella I (da CS1 a CS6). Gli standard interni utilizzati, alla concentrazione di 50 ng/ml, sono stati i seguenti:  $^{13}\text{C}_{12}$ -PCB 77,  $^{13}\text{C}_{12}$ -PCB 81,  $^{13}\text{C}_{12}$ -PCB 126,  $^{13}\text{C}_{12}$ -PCB 169,  $^{13}\text{C}_{12}$ -PCB 105,  $^{13}\text{C}_{12}$ -PCB 114,  $^{13}\text{C}_{12}$ -PCB 118,  $^{13}\text{C}_{12}$ -PCB 123,  $^{13}\text{C}_{12}$ -PCB 156,  $^{13}\text{C}_{12}$ -PCB 157,  $^{13}\text{C}_{12}$ -PCB 167,  $^{13}\text{C}_{12}$ -PCB 189. Come standard di iniezione, è stata utilizzata una miscela dei composti  $^{13}\text{C}_{12}$ -PCB 70,  $^{13}\text{C}_{12}$ -PCB 111,  $^{13}\text{C}_{12}$ -PCB 138 e  $^{13}\text{C}_{12}$ -PCB 170, alla concentrazione di 50 ng/ml. La perfluorobutilammina (FC43), utilizzata per la calibrazione della scala di massa del rivelatore, è stata ottenuta dalla Fluka (Buchs).

### Materiali e reagenti

I solventi utilizzati (esano, etere etilico, etanolo assoluto, etere di petrolio, diclorometano e nonano) sono stati forniti, con grado di purezza per analisi di residui organici, da J.T. Baker (Deventer). L'acqua ultrapura è stata prodotta da un sistema Milli-RO/Milli-Q Millipore (Bedford, Massachusetts). Il solfato di sodio anidro, l'idrossido di potassio, l'acido solforico concentrato ed il cloruro di sodio, tutti con grado di purezza analitico, sono stati ottenuti dalla Carlo Erba (Milano). La terra di diatomee è stata acquistata dalla Varian (Walnut Creek, California). Per la purificazione dei campioni, sono state impiegate colonne cromatografiche "Silica" e "Alumina" (Fluid Management System Inc., Waltham, Massachusetts).

Tabella I  
Soluzioni di taratura  
(concentrazioni in ng/ml)

Analita	CS 1	CS 2	CS 3	CS 4	CS 5	CS 6
Standard naturali						
PCB 77	0,5	2	10	40	200	800
PCB 81	0,5	2	10	40	200	800
PCB 126	0,5	2	10	40	200	800
PCB 169	0,5	2	10	40	200	800
PCB 105	0,5	2	10	40	200	800
PCB 114	0,5	2	10	40	200	800
PCB 118	0,5	2	10	40	200	800
PCB 123	0,5	2	10	40	200	800
PCB 156	0,5	2	10	40	200	800
PCB 157	0,5	2	10	40	200	800
PCB 167	0,5	2	10	40	200	800
PCB 189	0,5	2	10	40	200	800
Standard interni						
<sup>13</sup> C <sub>12</sub> -PCB 77	50	50	50	50	50	50
<sup>13</sup> C <sub>12</sub> -PCB 81	50	50	50	50	50	50
<sup>13</sup> C <sub>12</sub> -PCB 126	50	50	50	50	50	50
<sup>13</sup> C <sub>12</sub> -PCB 169	50	50	50	50	50	50
<sup>13</sup> C <sub>12</sub> -PCB 105	50	50	50	50	50	50
<sup>13</sup> C <sub>12</sub> -PCB 114	50	50	50	50	50	50
<sup>13</sup> C <sub>12</sub> -PCB 118	50	50	50	50	50	50
<sup>13</sup> C <sub>12</sub> -PCB 123	50	50	50	50	50	50
<sup>13</sup> C <sub>12</sub> -PCB 156	50	50	50	50	50	50
<sup>13</sup> C <sub>12</sub> -PCB 157	50	50	50	50	50	50
<sup>13</sup> C <sub>12</sub> -PCB 167	50	50	50	50	50	50
<sup>13</sup> C <sub>12</sub> -PCB 189	50	50	50	50	50	50
Standard di iniezione						
<sup>13</sup> C <sub>12</sub> -PCB 70	50	50	50	50	50	50
<sup>13</sup> C <sub>12</sub> -PCB 111	50	50	50	50	50	50
<sup>13</sup> C <sub>12</sub> -PCB 138	50	50	50	50	50	50
<sup>13</sup> C <sub>12</sub> -PCB 170	50	50	50	50	50	50

## Preparazione ed estrazione dei campioni

Tutti i campioni sono stati omogeneizzati e un'aliquota rappresentativa del campione, in quantità sufficiente per poter ottenere dopo l'estrazione da 1 a 5 g di grasso, è stata fortificata con 20 µl di soluzione degli standard interni, alla concentrazione di 50 ng/ml. I campioni con elevato tenore di acqua (latte escluso) sono stati miscelati con terra di diatomee in rapporto da 1:3 a 1:2 (p/p), lasciando equilibrare per 6-12 ore.

Il campione è stato posto in cella per "accelerated solvent extraction" (ASE) e si è proceduto all'estrazione con esano/acetone 80:20 (v/v) su sistema ASE 200 (Dionex,

Sunnyvale, California) utilizzando il seguente programma operativo: temperatura 125°C, pressione 1500 psi, tempo di preriscaldamento 5 min, tempo di riscaldamento 6 min, tempo di mantenimento 6 min, volume di flush 60%, tempo di purge 60 s, cicli d'estrazione 3. Successivamente, l'estratto è stato filtrato su solfato di sodio anidro e raccolto in un pallone tarato, portando a secchezza su evaporatore rotante ad una temperatura di 45°C.

Per i campioni di latte, 200 ml di campione omogeneizzato sono stati addizionati con 200 ml di etanolo, 250 ml di etere etilico e 250 ml di etere di petrolio. Dopo energica agitazione della miscela in imbuto separatore, è stata recuperata la fase organica filtrandola su sodio solfato anidro in un pallone portando a secchezza su evaporatore rotante a 45°C.

Il grasso ottenuto dal processo di estrazione è stato pesato su bilancia analitica.

## Purificazione dei campioni

L'estratto grasso è stato solubilizzato con 40 ml di esano e trasferito in imbuto separatore. Sono stati aggiunti 40 ml di acido solforico concentrato, agitando per alcuni minuti. Dopo aver rimosso la fase acida, la partizione è stata ripetuta fino a scomparsa della colorazione dalla fase stessa.

Dopo lavaggio della fase organica con 40 ml di soluzione acquosa di sodio cloruro al 5% (p/v), è stata eseguita una seconda partizione con 40 ml di soluzione acquosa di potassio idrossido al 20% (p/v) e ulteriore lavaggio con soluzione di sodio cloruro. L'estratto è stato concentrato su evaporatore rotante a 45°C, fino al volume di circa 1 ml, e purificato per mezzo del sistema automatico Power Prep (Fluid Management System Inc., Waltham, Massachusetts). Il sistema è equipaggiato con due diversi tipi di colonne pre-impaccate con silice (colonna multistrato con silice acida, neutra e basica) e allumina. Le colonne di purificazione sono state attivate tramite passaggio di 155 ml di esano ad un flusso di 10 ml/min. Successivamente, l'estratto proveniente dalla partizione liquido-liquido è stato introdotto in testa alla colonna di silice ed eluito con 80 ml di esano, ad un flusso di 5 ml/min, sia attraverso la colonna di silice che

quella di allumina, collegata in serie alla prima. L'eluizione dei dl-PCB dalla colonna di allumina è stata effettuata con 140 ml di miscela diclorometano/esano (95:5, v/v) ad un flusso di 5 ml/min. L'eluato finale è stato concentrato su evaporatore rotante a 45°C fino ad un volume di circa 0,5 ml, trasferito in flacone da 1 ml a fondo conico e, dopo evaporazione completa del solvente, è stato immediatamente ripreso con 20 µl di soluzione dello standard di iniezione, alla concentrazione di 50 ng/ml.

### Strumentazione e condizioni cromatografiche

L'analisi strumentale è stata eseguita mediante gascromatografia capillare ad alta risoluzione/spettrometria di massa ad alta risoluzione (HRGC/HRMS), operando in modalità "single ion monitoring" ad una risoluzione di 10.000; le masse utilizzate per la determinazione dei dl-PCB sono riportate in Tabella II. Il sistema HRGC/HRMS utilizzato è costituito da uno spettrometro di massa MAT 95 XL (Finnigan, Brema) accoppiato ad un gas cromatografo capillare Trace Series 2000 (Thermoquest, Milano), dotato di autocampionatore A200S (Finnigan, Brema).

Il composto FC43 è stato utilizzato per la calibrazione dello spettrometro di massa. L'analisi è stata condotta su colonna capillare VF-5MS (60 m × 0,25 mm × 0,25 µm) Varian (Walnut Creek, California). Il programma di controllo della temperatura del forno è stato il seguente: isoterma iniziale a 140°C per 2 min, incremento fino a 230°C a 13°C/min, isoterma a 230°C per 20 min, incremento fino a 310°C a 6°C/min, isoterma a 310°C per 5 min. Come gas di trasporto è stato utilizzato elio, alla velocità di 1 ml/min. La temperatura dell'iniettore è stata impostata a 280°C. Le iniezioni sono state effettuate in modalità splitless (per un periodo di 1 min) con un volume di 1 µl e con flusso di splittaggio di 140 ml/min. La temperatura dell'interfaccia è stata regolata a 290°C. La ionizzazione in impatto elettronico (EI) è stata condotta fissando la temperatura della sorgente ionica a 270°C ed il voltaggio a 40-50 eV.

Tabella II  
Ioni diagnostici (m/z) per gli standard di riferimento

Analita	m <sup>1</sup> /z	m <sup>2</sup> /z
Standard naturali		
PCB 77	289,9224	291,9194
PCB 81	289,9224	291,9194
PCB 126	325,8804	327,8775
PCB 169	359,8415	361,8385
PCB 105	325,8804	327,8775
PCB 114	325,8804	327,8775
PCB 118	325,8804	327,8775
PCB 123	325,8804	327,8775
PCB 156	359,8415	361,8385
PCB 157	359,8415	361,8385
PCB 167	359,8415	361,8385
PCB 189	393,8025	395,7995
Standard interni		
<sup>13</sup> C <sub>12</sub> -PCB 77	301,9626	303,9597
<sup>13</sup> C <sub>12</sub> -PCB 81	301,9626	303,9597
<sup>13</sup> C <sub>12</sub> -PCB 126	337,9207	339,9178
<sup>13</sup> C <sub>12</sub> -PCB 169	371,8817	373,8788
<sup>13</sup> C <sub>12</sub> -PCB 105	337,9207	339,9178
<sup>13</sup> C <sub>12</sub> -PCB 114	337,9207	339,9178
<sup>13</sup> C <sub>12</sub> -PCB 118	337,9207	339,9178
<sup>13</sup> C <sub>12</sub> -PCB 123	337,9207	339,9178
<sup>13</sup> C <sub>12</sub> -PCB 156	371,8817	373,8788
<sup>13</sup> C <sub>12</sub> -PCB 157	371,8817	373,8788
<sup>13</sup> C <sub>12</sub> -PCB 167	371,8817	373,8788
<sup>13</sup> C <sub>12</sub> -PCB 189	405,8428	407,8398
Standard di siringa		
<sup>13</sup> C <sub>12</sub> -PCB 70	301,9626	303,9597
<sup>13</sup> C <sub>12</sub> -PCB 111	337,9207	339,9178
<sup>13</sup> C <sub>12</sub> -PCB 138	371,8817	373,8788
<sup>13</sup> C <sub>12</sub> -PCB 170	405,8428	407,8398

### Taratura strumentale e criteri di identificazione degli analiti

Il composto FC43 è stato utilizzato per la calibrazione dello spettrometro di massa. L'analisi è stata condotta su colonna capillare VF-5MS (60 m × 0,25 mm × 0,25 µm) Varian (Walnut Creek, California). Il programma di controllo della temperatura del forno è stato il seguente: isoterma iniziale a 140°C per 2 min, incremento fino a 230°C a 13°C/min, isoterma a 230°C per 20 min, incremento fino a 310°C a 6°C/min, isoterma a 310°C per 5 min. Come gas di trasporto è stato utilizzato elio, alla

velocità di 1 ml/min. La temperatura dell'iniettore è stata impostata a 280°C. Le iniezioni sono state effettuate in modalità splitless (per un periodo di 1 min) con un volume di 1 µl e con flusso di splittaggio di 140 ml/min. La temperatura dell'interfaccia è stata regolata a 290°C. La ionizzazione in impatto elettronico (EI) è stata condotta fissando la temperatura della sorgente ionica a 270°C ed il voltaggio a 40-50 eV.

### Taratura strumentale e criteri di identificazione degli analiti

Le concentrazioni dei diversi congeneri sono state determinate sulla base di curve di taratura costruite su sei punti (soluzioni standard da CS1 a CS6, descritte in Tabella I), calcolando i fattori di risposta relativi per gli analiti non marcati (RFn) riferiti agli appropriati standard interni (Tabella III), in accordo con la formula di seguito riportata:

$$RF_n = \frac{(A_n^1 + A_n^2) \times Q_{is}}{(A_{is}^1 + A_{is}^2) \times Q_n}$$

dove:

$A_n^1$  e  $A_n^2$  = aree integrate dei due ioni di quantificazione del congenero naturale (Tabella II)

$A_{is}^1$  e  $A_{is}^2$  = aree integrate dei due ioni di quantificazione dello standard interno (Tabella II)

$Q_n$  = concentrazione in ng/ml del congenero naturale

$Q_{is}$  = concentrazione in ng/ml di standard interno.

Lo stesso procedimento è stato eseguito per calcolare i fattori di risposta relativi per gli standard interni marcati (RFis) riferiti agli appropriati standard di iniezione (Tabella III), secondo la seguente formula:

$$RF_{is} = \frac{(A_{is}^1 + A_{is}^2) \times Q_{rs}}{(A_{rs}^1 + A_{rs}^2) \times Q_{is}}$$

dove:

$A_{rs}^1$  e  $A_{rs}^2$  = aree integrate dei due ioni di quantificazione dello standard di iniezione (Tabella II)

$Q_{rs}$  = concentrazione in ng/ml di standard di iniezione.

È stato calcolato il valore medio del fattore di risposta ed il coefficiente di variazione (CV) per ciascun dl-PCB naturale e marcato, e la

taratura è stata considerata valida quando i valori di CV non superavano il 25%. Per l'identificazione dei dl-PCB sono stati adottati i seguenti criteri:

- tempi di ritenzione: massimo del picco dell'analita entro l'intervallo da -1 a +3 secondi del corrispondente standard marcato;
- rapporto segnale rumore (S/N): intensità del frammento ionico  $\geq 3$  volte del rumore di fondo;
- rapporti di abbondanza ionica: rispetto dei rapporti di abbondanza relativa elencati in Tabella IV.

Tabella III  
Relazioni degli analiti con gli standard interni e gli standard di iniezione

Analita	Standard interno	Standard iniezione
PCB 77	$^{13}C_{12}$ -PCB 77	$^{13}C_{12}$ -PCB 70
PCB 81	$^{13}C_{12}$ -PCB 81	$^{13}C_{12}$ -PCB 70
PCB 126	$^{13}C_{12}$ -PCB 126	$^{13}C_{12}$ -PCB 111
PCB 169	$^{13}C_{12}$ -PCB 169	$^{13}C_{12}$ -PCB 138
PCB 105	$^{13}C_{12}$ -PCB 105	$^{13}C_{12}$ -PCB 111
PCB 114	$^{13}C_{12}$ -PCB 114	$^{13}C_{12}$ -PCB 111
PCB 118	$^{13}C_{12}$ -PCB 118	$^{13}C_{12}$ -PCB 111
PCB 123	$^{13}C_{12}$ -PCB 123	$^{13}C_{12}$ -PCB 111
PCB 156	$^{13}C_{12}$ -PCB 156	$^{13}C_{12}$ -PCB 138
PCB 157	$^{13}C_{12}$ -PCB 157	$^{13}C_{12}$ -PCB 138
PCB 167	$^{13}C_{12}$ -PCB 167	$^{13}C_{12}$ -PCB 138
PCB 189	$^{13}C_{12}$ -PCB 189	$^{13}C_{12}$ -PCB 170

### Espressione dei risultati

La più recente metodologia di valutazione della tossicità degli isomeri dei dl-PCB si basa sul risultato dello studio di Van den Berg e collaboratori (22), che ha definito i fattori di tossicità equivalente (WHO-TEF= World Health Organization toxicity equivalency factors).

Il valore di WHO-TEF di ogni singolo congenero è stato assegnato mettendo in relazione il suo grado di tossicità con quello della 2,3,7,8-TCDD, la diossina più tossica.

Le concentrazioni dei singoli congeneri dei dl-PCB in un campione vengono dapprima moltiplicate per il corrispondente WHO-TEF e poi sommate per ottenere la concentrazione

totale dei composti diossina simili espressa in WHO-TEQ (concentrazione di tossicità equivalente).

### Prove di validazione

La specificità è stata valutata prendendo in considerazione fattori quali il tipo di matrice e l'interferenza da parte di alcuni congeneri appartenenti alle classi dei PCB non diossina-simili e delle diossine. La precisione del metodo è stata valutata analizzando diciotto campioni di grasso suino a tre livelli di aggiunta (sei ripetizioni per ciascun livello), corrispondenti a 10, 20 e 40 pg/g, dei congeneri PCB 77, 81, 126, 169, 114, 123, 157, 189. L'accuratezza del metodo è stata espressa in termini di percentuali di recupero dei dl-PCB rispetto alle quantità aggiunte. Data l'impossibilità di reperire un campione di grasso negativo per i PCB 118, 105, 167 e 156, la ripetibilità per tali congeneri è stata stimata attraverso l'analisi di tre campioni di grasso suino naturalmente contaminati, ripetuta per sei volte. Il limite di determinazione (LOD) non è un valore costante ma varia in funzione del procedimento utilizzato (diluizioni, peso del campione processato, recupero analitico). Per ogni congenero, quando la risposta per entrambi gli ioni di quantificazione del

naturale è inferiore a 3 volte il livello del segnale di fondo, il LOD è stato calcolato riportando il segnale del marcato con il segnale (rumore) del naturale. La linearità di risposta è stata valutata costruendo una curva di taratura a sei livelli di concentrazione (0,5-800 ng/ml) per ciascun dl-PCB e calcolando il coefficiente di determinazione. Per soddisfare i requisiti della norma ISO/IEC 17025, è stata stimata l'incertezza di misura in accordo con le linee guida dell'EURACHEM/CITAC (1).

### Campioni esaminati

Nell'anno 2005, il metodo validato è stato utilizzato per l'analisi di 177 campioni di alimenti di origine animale (62 campioni di carne e grasso, 55 di latte, 24 di uova e 36 di pesce) prelevati nell'ambito del PNR, allo scopo di determinare i livelli di contaminazione di fondo dei dl-PCB. I campioni, provenienti dall'intero territorio nazionale, sono stati prelevati presso mattatoi, allevamenti, aziende agricole e stabilimenti di produzione e trasformazione.

### Risultati

Nelle Figure 1-4 sono riportati i cromatogrammi di massa esemplificativi per uno

Tabella IV  
Criteri per le misure del rapporto isotopico dei dl-PCB

Analita	Ioni selezionati (masse approssimate)	Abbondanza ionica teorica	Limiti di controllo
TeCB <sup>(a)</sup>	290/292	0,77	0,62-0,92
PeCB <sup>(b)</sup>	326/328	1,55	1,24-1,86
HxCB <sup>(c)</sup>	360/362	1,24	0,99-1,49
HpCB <sup>(d)</sup>	394/396	1,05	0,84-1,26
<sup>13</sup> C <sub>12</sub> -TeCB	302/304	0,77	0,62-0,92
<sup>13</sup> C <sub>12</sub> -PeCB	338/340	1,55	1,24-1,86
<sup>13</sup> C <sub>12</sub> -HxCB	372/374	1,24	0,99-1,49
<sup>13</sup> C <sub>12</sub> -HpCB	406/408	1,05	0,84-1,26
<sup>13</sup> C <sub>12</sub> -PCB 70	302/304	0,77	0,62-0,92
<sup>13</sup> C <sub>12</sub> -PCB 111	338/340	1,55	1,24-1,86
<sup>13</sup> C <sub>12</sub> -PCB 138	372/374	1,24	0,99-1,49
<sup>13</sup> C <sub>12</sub> -PCB 170	406/408	1,05	0,84-1,26

a) TeCB: PCB 77, PCB 81

b) PeCB: PCB 105, PCB 114, PCB 118, PCB 123, PCB 126

c) HxCB: PCB 156, PCB 157, PCB 167, PCB 169

d) HpCB: PCB 189

standard di riferimento, un campione "negativo" ed un campione di olio di pesce naturalmente contaminato per tutti gli analiti in esame. Allo scopo di individuare la presenza di potenziali segnali interferenti da parte delle diossine, è stata iniettata in HRGC-HRMS una miscela standard contenente i diciassette congeneri 2,3,7,8 sostituiti dei PCDD e PCDF (concentrazione compresa tra 0,4 e 4 ng/ml) e i relativi sedici congeneri marcati (20 ng/ml) con il programma termico e di acquisizione masse dei dl-PCB. Non sono state individuate sovrapposizioni cromatografiche tra diossine e dl-PCB ad eccezione di una lieve interferenza di ioni frammento a bassa intensità della 1,2,3,7,8-PeCDD che coeluisce con il PCB-169. Su alcune tipologie di campioni con livelli di contaminazione relativamente elevati, quali pesci e mangimi per pesci, la presenza di due interferenti ha reso particolarmente difficoltosa la quantificazione dei PCB 81 e 123; tale problema è stato riscontrato anche da altri ricercatori (2, 9). Allo scopo di identificare la natura dei due segnali interferenti è stata iniettata in HRGC-HRMS una miscela standard contenente sedici PCB non diossina-simili (PCB 28, 52, 95, 99, 101, 110, 138, 146, 149, 151, 153, 170, 177, 180, 183, 187) alla concentrazione di 100 ng/ml con il programma termico e di acquisizione masse dei dl-PCB. In corrispondenza del picco cromatografico del PCB 123 è stata rilevata la presenza di un segnale che corrisponde ad uno degli ioni frammento minori dell'esaclorobifenile PCB 149, tipicamente presente a concentrazioni maggiori del PCB 123 nelle matrici alimentari con conseguente sovrapposizione dei due segnali. Per quanto riguarda il PCB 81 non è stato possibile identificare l'interferente anche se, con buona probabilità, si tratta di un pentaclorobifenile (8). Il problema di tali interferenze è stato parzialmente risolto con l'impiego di una fase stazionaria 5% fenil, 95% metil siliconica di spessore maggiore (0,25 µm) rispetto a quella inizialmente utilizzata (da 0,1 µm).

L'utilizzo di tale accorgimento permette una migliore identificazione del picco cromato-

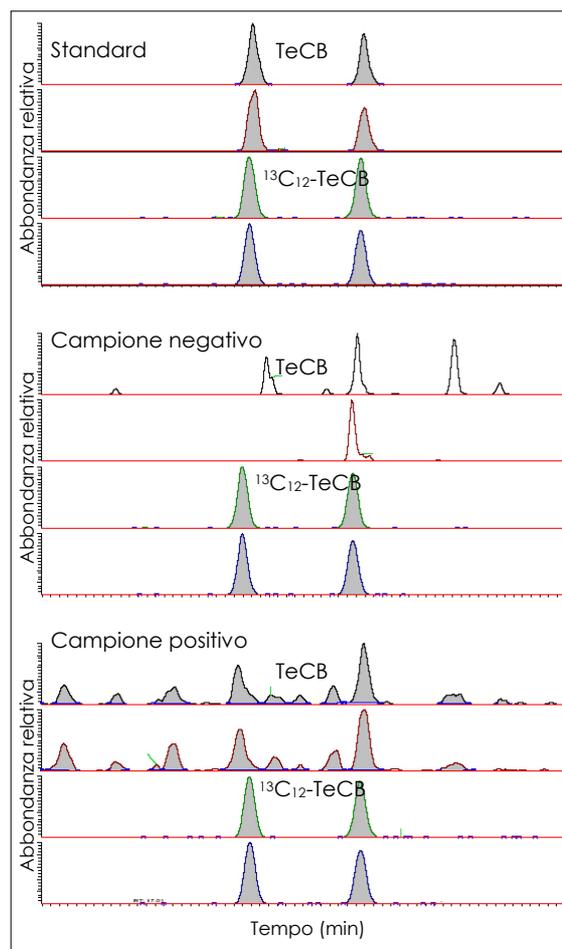


Figura 1  
Frammentogrammi relativi a miscela standard (2 ng/ml di ogni TeCB e 50 ng/ml di ogni <sup>13</sup>C<sub>12</sub>-TeCB), campione negativo (200 pg/g di ogni <sup>13</sup>C<sub>12</sub>-TeCB) e campione di olio di pesce naturalmente contaminato (0,5-3 pg/g di TeCB e 200 pg/g di ogni <sup>13</sup>C<sub>12</sub>-TeCB)

grafico a scapito della sensibilità strumentale che diminuisce di circa la metà.

Nelle figure 5 e 6 sono riportati i frammentogrammi relativi ad un estratto dello stesso campione (olio di pesce) iniettato in colonne differenti.

In riferimento agli otto congeneri (PCB 77, 81, 126, 169, 114, 123, 157, 189) per i quali sono stati preparati campioni fortificati a tre livelli di aggiunta (10, 20 e 40 pg/g), sono state ottenute percentuali di recupero comprese nell'intervallo tra un minimo di 84,4% per il PCB 157 ed un massimo di 111,8% per il PCB 126 (Tabella V). I coefficienti di variazione sono stati compresi tra il 4,7% per il PCB 81 ed il 18,3% per il PCB 157. Per i PCB 105, 118, 156

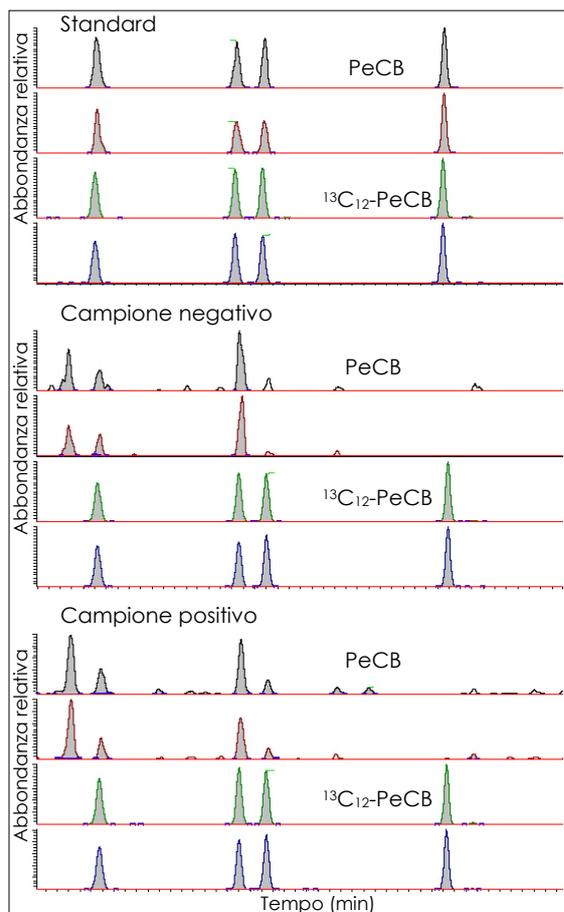


Figura 2 Frammentogrammi relativi a miscela standard (2 ng/ml di ogni PeCB e 50 ng/ml di ogni  $^{13}\text{C}_{12}$ -PeCB), campione "negativo" (presenza di PCB-118 e PCB-105 alle concentrazioni di 3 e 1 pg/g rispettivamente e 200 pg/g di ogni  $^{13}\text{C}_{12}$ -PeCB) e campione di olio di pesce naturalmente contaminato (1-60 pg/g di PeCB e 200 pg/g di ogni  $^{13}\text{C}_{12}$ -PeCB)

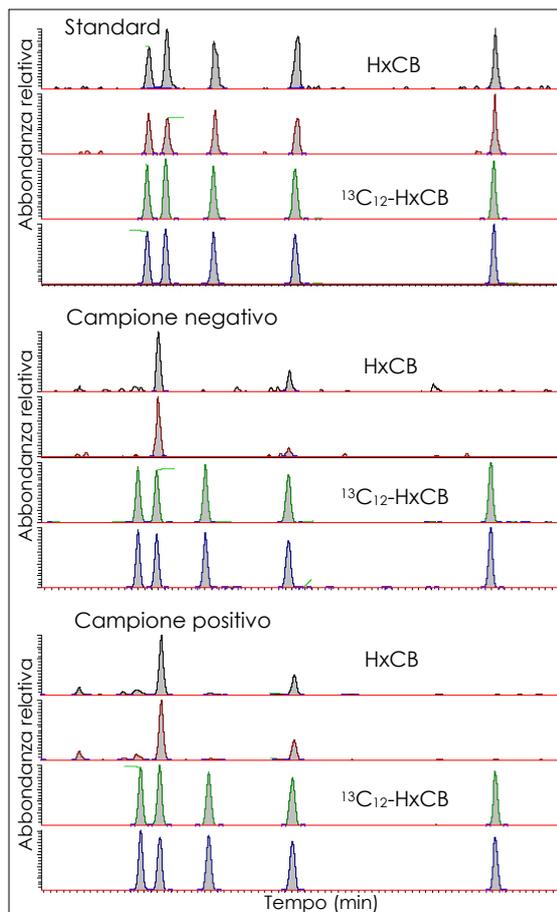


Figura 3 Frammentogrammi relativi a miscela standard (2 ng/ml di ogni HxCB e 50 ng/ml di ogni  $^{13}\text{C}_{12}$ -HxCB), campione "negativo" (presenza di PCB-167 e PCB-156 alle concentrazioni di 0,5 e 1,5 pg/g rispettivamente e 200 pg/g di ogni  $^{13}\text{C}_{12}$ -HxCB) e campione di olio di pesce naturalmente contaminato (0,3-4 pg/g di HxCB e 200 pg/g di ogni  $^{13}\text{C}_{12}$ -HxCB)

e 167, per i quali non è stato possibile reperire una matrice esente da tracce degli analiti stessi, le prove di ripetibilità eseguite attraverso l'analisi di tre differenti campioni naturalmente contaminati di grasso suino hanno fornito i risultati presentati in Tabella VI. Il valore massimo di CV è risultato pari a 12,1% per il PCB 118, al livello di concentrazione di 52,4 pg/g, mentre il valore minimo è stato del 2,6% per il PCB 105 sul campione con una concentrazione di 33,2 pg/g.

Le curve di taratura dei dodici congeneri hanno mostrato un'ottima linearità di risposta con coefficienti di determinazione maggiori di 0,9999 nell'intervallo di concentrazione di lavoro (0,5-800 ng/ml). I valori medi dei LOD

sono stati compresi tra 0,2 pg/g di grasso per il PCB 81 e 1,3 pg/g di grasso per il PCB 123.

La valutazione dell'incertezza di misura secondo le linee guida EURACHEM/CITAC, ha fornito i risultati presentati in Tabella VII. In termini percentuali, l'incertezza estesa al 95% di probabilità, è risultata compresa tra 8,8% e 12,4%.

I risultati dei livelli di contaminazione da di-PCB sui 177 campioni esaminati nell'ambito del PNR 2005 sono presentati in Tabella VIII. Tra le matrici esaminate il pesce è risultato il più contaminato. Su base lipidica, il latte ha presentato il valore medio di WHO-TEQ più alto (1,24 pg/g di grasso) seguito dalla carne e grasso (0,32 pg/g grasso) e infine dalle uova (0,16 pg/g grasso).

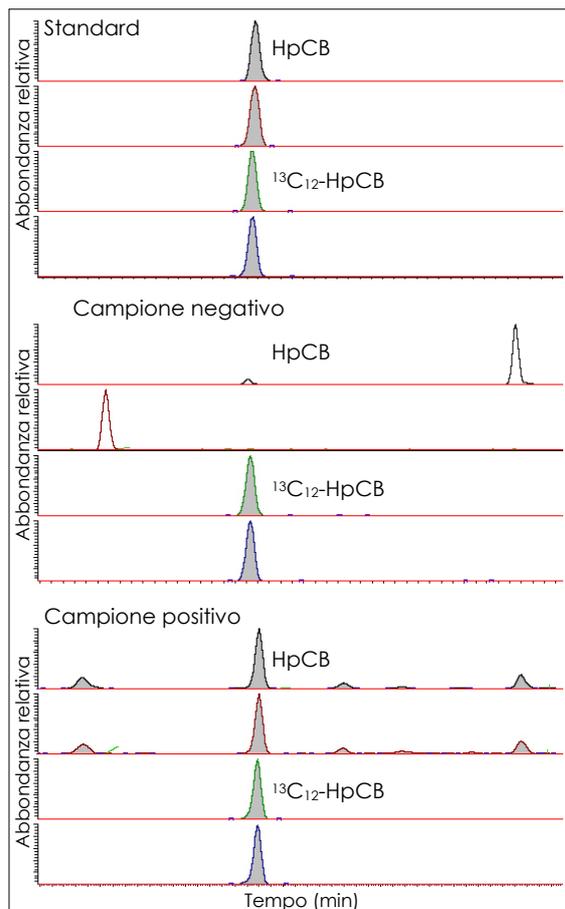


Figura 4  
Frammentogrammi relativi a miscela standard (2 ng/ml di HpCB e 50 ng/ml di <sup>13</sup>C<sub>12</sub>-HpCB), campione negativo (200 pg/g di <sup>13</sup>C<sub>12</sub>-HpCB) e campione di olio di pesce naturalmente contaminato (34 pg/g di HpCB e 200 pg/g di <sup>13</sup>C<sub>12</sub>-HpCB)

## Discussione

Il punto di partenza nella messa a punto di un metodo per la determinazione dei dl-PCB nei prodotti alimentari è stato rappresentato dal metodo EPA 1668 rev. A, sviluppato principalmente per rilevazioni di carattere ambientale e che prende in considerazione solo marginalmente le matrici oggetto di studio (21). Un ulteriore limite del metodo sopra menzionato è costituito dai tempi di esecuzione piuttosto lunghi relativi alle fasi di estrazione e purificazione del campione ed il considerevole grado di manualità richiesto per lo svolgimento delle fasi stesse. L'utilizzo di apparecchiature automatiche (estrattore ASE e sistema di purificazione Power Prep), presentato in questo lavoro, ha permesso di

diminuire sensibilmente i tempi di analisi, di ridurre il grado di intervento dell'operatore nel corso del processo analitico e di ottenere una ripetibilità dei risultati soddisfacente. In particolare l'impiego dell'ASE nella fase di estrazione dei campioni ha consentito di ridurre i tempi di processo e la quantità di solvente impiegata per l'estrazione della componente lipidica dalle matrici alimentari. Infatti, nell'estrazione tradizionale con il metodo Soxhlet il campione viene estratto per 16-18 ore impiegando 250-500 ml di solvente, mentre con l'ASE i tempi di estrazione si

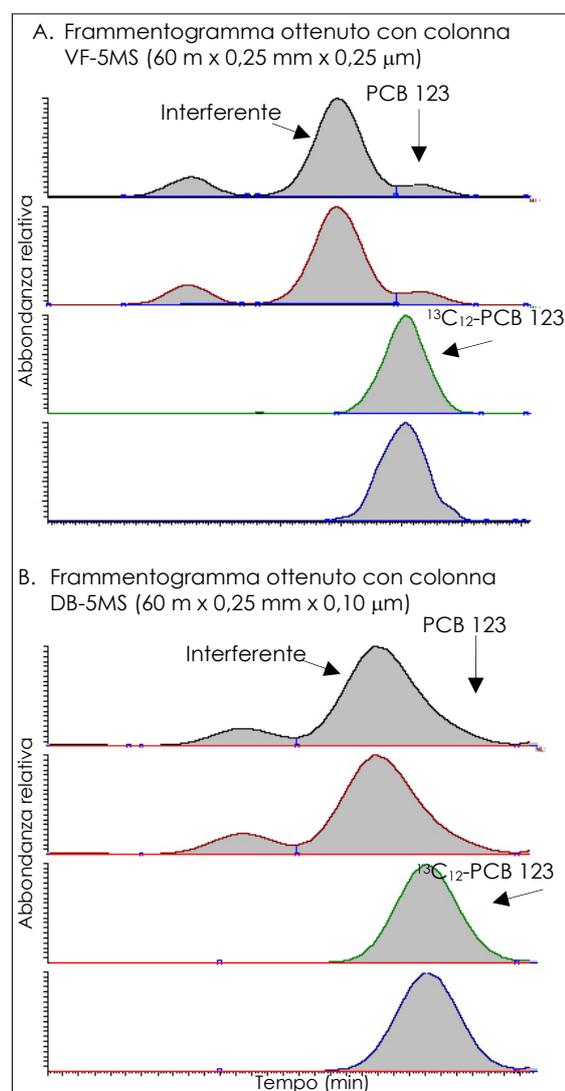


Figure 5  
Frammentogrammi dei congeneri PCB 123 e <sup>13</sup>C<sub>12</sub>-PCB 123 relativi ad un estratto di olio di pesce naturalmente contaminato e iniettato in diverse colonne cromatografiche

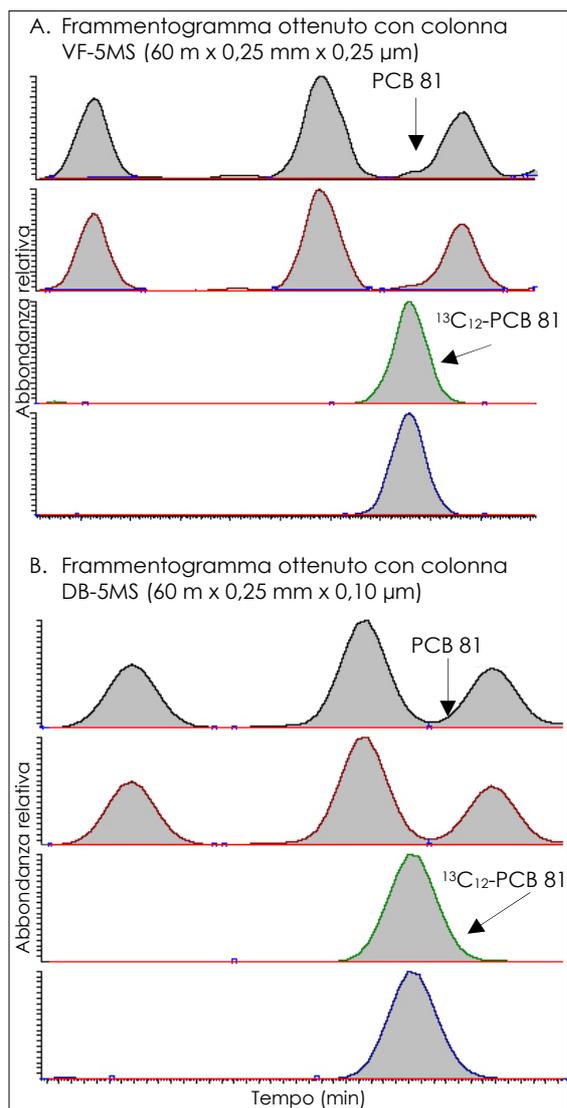


Figure 6  
Frammentogrammi dei congeneri PCB 81 e <sup>13</sup>C<sub>12</sub>-PCB 81 relativi ad un estratto di olio di pesce naturalmente contaminato e iniettato in diverse colonne cromatografiche

riducono a circa 45 min impiegando 30-40 ml di miscela acetone/esano (20:80, v/v). Tale miscela ha garantito una resa di estrazione maggiore rispetto all'utilizzo di solventi con spiccate caratteristiche apolari grazie alla presenza dell'acetone, in grado di penetrare in matrici contenenti acqua come i tessuti animali (10).

Tabella V  
Prove di ripetibilità per i PCB 77, 81, 126, 169, 114, 123, 157 e 189 (campioni di grasso suino negativi fortificati, n=6 per ciascun livello di aggiunta)

Analita	Livelli di aggiunta (pg/g)			Recupero (%)	SD	CV (%)
PCB 77	10	20	40	105,6	7,7	7,3
PCB 81	10	20	40	111,3	5,2	4,7
PCB 126	10	20	40	111,8	7,5	6,7
PCB 169	10	20	40	106,6	7,4	6,9
PCB 114	10	20	40	104,8	5,6	5,4
PCB 123	10	20	40	94,7	8,8	9,3
PCB 157	10	20	40	84,4	15,5	18,3
PCB 189	10	20	40	94,8	9,9	10,5

SD deviazione standard  
CV coefficiente di variazione

I punti di ebollizione relativamente bassi dei due solventi hanno inoltre consentito una rapida concentrazione degli estratti per evaporazione a 45°C sotto vuoto. Per minimizzare gli effetti negativi dovuti alla presenza di acqua, i campioni con alto contenuto di umidità (>20%) sono stati miscelati con terra di diatomee per rimuovere l'acqua e rendere il campione omogeneo, con conseguente incremento dell'efficienza di estrazione della componente lipidica e degli

Tabella VI  
Prove di ripetibilità per i PCB 105, 118, 156 e 167 (analisi in triplicato di tre campioni di grasso suino naturalmente contaminati)

Analita	Campione 1			Campione 2			Campione 3		
	C (pg/g)	SD	CV (%)	C (pg/g)	SD	CV (%)	C (pg/g)	SD	CV (%)
PCB 105	71,7	3,40	4,7	33,2	0,85	2,6	22,1	2,38	10,7
PCB 118	154,0	14,8	9,6	63,9	4,92	7,7	52,4	6,35	12,1
PCB 156	57,0	3,84	6,7	32,2	1,47	4,6	19,5	1,38	7,1
PCB 167	40,1	3,46	8,6	23,9	1,13	4,7	12,8	0,59	4,6

C concentrazione  
SD deviazione standard  
CV coefficiente di variazione

Tabella VII  
Quantificazioni delle componenti dell'incertezza di misura, espresse in termini relativi  
( $\rho=0,05$ ;  $k=2$ )

Analita	Incertezza ripetibilità	Incertezza volumi	Incertezza curva taratura	Incertezza combinata	Incertezza estesa (%)
PCB 77	0,0171	0,0276	0,0177	0,0470	9,4
PCB 81	0,0110	0,0276	0,0245	0,0482	9,6
PCB 114	0,0127	0,0276	0,0220	0,0474	9,4
PCB 123	0,0219	0,0276	0,0056	0,0459	9,2
PCB 126	0,0159	0,0276	0,0108	0,0443	8,8
PCB 157	0,0432	0,0276	0,0203	0,0622	12,4
PCB 169	0,0163	0,0276	0,0091	0,0441	8,8
PCB 189	0,0247	0,0276	0,0080	0,0476	9,6

Tabella VIII  
Livelli di contaminazione di dl-PCB nelle varie tipologie di alimenti  
Le concentrazioni sono espresse in pg WHO-TEQ/g di grasso per carne e grasso, latte e uova,  
in pg WHO-TEQ/g per il pesce

Matrice	Numero campioni	Media	Mediana	Minimo	Massimo	95° percentile
Carne e grasso	62	0,32	0,12	0,01	2,21	0,87
Latte	55	1,24	0,61	0,09	11,17	3,53
Uova	24	0,16	0,13	0,03	0,38	0,36
Pesce	36	0,52	0,33	0,05	3,13	1,62

analiti in essa presenti. Nella successiva partizione liquido-liquido, i campioni sono stati trattati con acido solforico concentrato e di seguito con idrossido di potassio al 20% (p/v). Gli acidi e le basi forti hanno permesso di rimuovere gran parte della componente lipidica idrolizzabile e saponificabile, che migra nella fase acquosa e viene eliminata, mentre gli analiti idrofobi rimangono nella fase apolare (esano). L'aggiunta di una soluzione di sodio cloruro al 5% (p/v) ha consentito di rimuovere le eventuali emulsioni formatesi. In alternativa sono state utilizzate colonne di vetro impaccate con gel di silice ed Extrelut® imbibito con acido solforico. I tempi di processo con tale procedura sono risultati maggiori rispetto alla partizione liquido-liquido e pertanto si è proceduto alla validazione del metodo applicando quest'ultima. La purificazione automatica su colonne cromatografiche mediante sistema Power Prep ha consentito di ridurre i tempi di analisi e di aumentare il numero di campioni processati simultaneamente rispetto alla purificazione manuale su colonne prevista dal

metodo EPA 1668. Infatti, la purificazione manuale richiede 8-10 ore contro circa 1 ora necessaria per quella automatica. Le miscele eluenti prescelte hanno consentito di rimuovere parte delle sostanze interferenti coestrate (diossine e difenileteri policlorurati), con la possibilità di raccogliere in differenti eluati i diversi gruppi di analiti (17).

La bontà della separazione gascromatografica è stata valutata rispetto a due coppie critiche, PCB 123 – PCB 118 e PCB 156 – PCB 157. Le separazioni sopra menzionate hanno mostrato una separazione valle-valle  $\leq 2\%$ .

Le sostanze interferenti coestrate possono variare in relazione al tipo di campione e alla sua provenienza. I dl-PCB sono spesso associati ad altri composti clorurati come i PCB non diossina-simili, le diossine (PCDD e PCDF), i pesticidi organoclorurati ed i difenileteri polibromurati (PBDE), i quali a volte possono essere presenti a livelli di concentrazione più alti rispetto a quelli degli analiti di interesse. L'utilizzo della spettrometria di massa ad alta risoluzione ( $R \geq 10000$ ) e l'impiego di reagenti e solventi di

elevata purezza hanno permesso di minimizzare tali problemi di interferenza. Agendo inoltre sui parametri gascromatografici, quali la rampa delle temperature e il tipo di colonna impiegata, si è avuto un netto miglioramento della separazione dei picchi che coeluiscono insieme al PCB 81 e al PCB 123.

In alcuni campioni, dove l'interferenza sul PCB 81 è particolarmente marcata, si è reso necessario un ulteriore passaggio di purificazione su colonna di carbone (16). Con tale procedura i quattro dl-PCB coplanari vengono separati dagli altri PCB e quindi anche dall'interferente.

Ciò comporta però un'analisi più lunga e una doppia iniezione in HRGC-HRMS senza ottenere una variazione sensibile nella stima della tossicità equivalente data la bassa tossicità dei congeneri PCB 81 e PCB 123.

Per quanto concerne i parametri di lavoro dello spettrometro di massa, la sorgente di ionizzazione è stata impostata un'alta temperatura operativa, pari a 270°C, al fine di minimizzare l'effetto della matrice sulla sorgente di ionizzazione. Sono state eseguite acquisizioni in "multiple ion detection" (MID) a diverso voltaggio di ionizzazione, pari a 40 e 70 eV, per ottimizzare la risposta strumentale. La tensione di ionizzazione di 40 eV ha determinato una risposta strumentale dei dl-PCB di circa 3 volte superiore.

Le prove di ripetibilità sono state soddisfacenti per tutti i dodici dl-PCB. I livelli di concentrazione studiati sono stati comparabili con quelli presenti nei campioni reali, sia per gli otto PCB (77, 81, 126, 169, 114, 123, 157, 189) per i quali sono stati preparati campioni negativi fortificati a livelli complessivi di

tossicità equivalente pari a 1,12, 2,24 e 4,48 pg WHO-TEQ/g di grasso, sia per i PCB 105, 118, 156 e 167, esaminati su campioni naturalmente contaminati contenenti livelli di tali congeneri compresi nell'intervallo tra 12,8 e 154 pg/g di grasso.

I valori dell'incertezza di misura estesa, calcolati ad un livello di probabilità del 95%, ottenuti identificando e quantificando le potenziali fonti di incertezza del metodo secondo le linee guida adottate a livello internazionale, sono risultati appropriati per la quantificazione dei residui oggetto di studio in rapporto ai livelli di concentrazione esaminati.

Il metodo è stato applicato su varie tipologie di matrici con risultati soddisfacenti, confermati dagli esiti della partecipazione a prove valutative interlaboratorio (FAPAS® UK Series 6, Round 20/2004-23/2005), i cui risultati sono stati entro  $\pm 2$  z-score rispetto ai valori di consenso per tutte le molecole considerate.

I valori medi di contaminazione dei 177 campioni esaminati nell'ambito del PNR sono stati espressi su base lipidica, ad eccezione dei campioni di pesce i cui risultati sono stati riportati su prodotto intero in accordo alla normativa vigente (5). Nell'analisi statistica dei dati sono stati esclusi dei campioni provenienti da un'area geografica particolarmente contaminata da PCB, in quanto avrebbero alterato il quadro della contaminazione di fondo che costituiva l'obiettivo principale del monitoraggio.

In generale, i livelli di contaminazione sono risultati in linea con quelli riscontrati in altri paesi europei per latte, carne e grassi, mentre per le uova ed il pesce le concentrazioni rilevate sono state inferiori (8, 20, 24).

## Bibliografia

1. Ellison S.L.R., Rosslein M. & Williams A. (eds). 2000. EURACHEM/CITAC Guide CG4: Quantifying uncertainty in analytical measurement, Second Ed. EURACHEM, QUAM:2000.1, 120 pp ([www.eurachem.ul.pt/guides/QUAM2000-1.pdf](http://www.eurachem.ul.pt/guides/QUAM2000-1.pdf) ultimo accesso 22 giugno 2006).
2. Eppe G., Cofino W.P. & De Pauw E. 2004. Performances and limitations of the HRMS method for dioxins, furans and dioxin-like PCBs analysis in animal feedingstuffs Part I: results of an interlaboratory study. *Anal Chim Acta*, **519**, 231-242.
3. Consiglio europeo (CE) 2001. Regolamento N. 2375/2001 del Consiglio del 29 novembre 2001 recante modifica del regolamento (CE) n. 446/2001 che definisce i tenori massimi di taluni

- contaminanti presenti nelle derrate alimentari. *Gazz Uff*, **L 321**, 06/12/2001, 1-5 ([europa.eu.int/eur-lex/pri/it/oj/dat/2001/L\\_321/L\\_32120011206it00010005.pdf](http://europa.eu.int/eur-lex/pri/it/oj/dat/2001/L_321/L_32120011206it00010005.pdf) ultimo accesso 22 giugno 2006).
4. Commissione Europea (CE) 2006. Direttiva 2006/13/CE della Commissione, del 3 febbraio 2006, che modifica gli allegati I e II della direttiva 2002/32/CE del Parlamento europeo e del Consiglio relativa alle sostanze indesiderabili nell'alimentazione degli animali per quanto riguarda le diossine e i PCB diossina-simili. *Gazz Uff*, **L 32**, 44-53 ([eur-lex.europa.eu/LexUriServ/site/it/oj/2006/L\\_032/L\\_03220060204it00440053.pdf](http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/site/it/oj/2006/L_032/L_03220060204it00440053.pdf) ultimo accesso 22 giugno 2006).
  5. Commissione europea (CE) 2006. Regolamento N. 199/2006 della Commissione del 3 febbraio 2006 che modifica il regolamento (CE) n. 466/2001 che definisce i tenori massimi di taluni contaminanti presenti nelle derrate alimentari per quanto riguarda le diossine e i PCB diossina-simili. *Gazz Uff*, **L 32**, 06/12/2001, 34-38 ([eur-lex.europa.eu/LexUriServ/site/en/oj/2006/L\\_032/L\\_03220060204it00340038.pdf](http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/site/en/oj/2006/L_032/L_03220060204it00340038.pdf) ultimo accesso 22 giugno 2006).
  6. Feeley M. & Brouwer A. 2000. Health risk to infants from exposure to PCBs, PCDDs and PCDFs. *Food Addit Contam*, **17**, 325-333.
  7. Furst P. 2001. Contribution of dioxin-like PCB to total toxic equivalents of dairy products. *Organohalogen Compounds*, **51**, 279-282.
  8. Hamm S., Grümping R. & Schwietering J. 2005. Levels of polychlorinated dibenzo(p)dioxins, dibenzofurans and dioxin-like PCBs in milk, milk products and eggs from west European countries. *Organohalogen Compounds*, **67**, 1406-1408.
  9. Hamilton C.M., Fisher T., Hoover D. & Kennedy S. 2003. Application of EPA method 1668A to the analysis of dioxin-like PCBs and to total PCBs in human tissue and environmental samples. *Organohalogen Compounds*, **60**, 199-202.
  10. Huwe J.K. 2002. Comparison of soxhlet and accelerated solvent extractions in the analysis of dioxins and furans from liver samples. *Organohalogen Compounds*, **55**, 61-63.
  11. Karl H., Ruoff U. & Bluthgen A. 2002. Levels of dioxins in fish and fishery products on the German market. *Chemosphere*, **49** (7), 765-773.
  12. Kogevinas M. 2000. Studies of cancer in humans. *Food Addit Contam*, **17** (4), 317-324.
  13. Lundgren K., Tysklind M. & Ishaq R. 2004. Biomagnification of mono-ortho and non-ortho PCBs in a benthic food chain in the Baltic Sea. *Organohalogen Compounds*, **66**, 2327-2334.
  14. McGregor D.B., Partenski C. & Wilbourn J. 1997. International Agency for Research on Cancer (IARC) Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans: polychlorinated dibenzo-p-dioxins and polychlorinated dibenzofurans. IARC Press, Lyons, France, **69**, 666.
  15. Malisch R. 2001. PCDDs/PCDFs and dioxin-like PCBs in feedingstuffs for fish. *Organohalogen Compounds*, **51**, 287-290.
  16. Matsukami H., Hayashi A., Takasuga T., Ohi E. & Senthilkumar K. 2003. Separation conditions and percentage recovery of dioxin-like PCBs, PCDDs and PCDFs through Power-Prep by fluid management systems. *Organohalogen Compounds*, **60**, 72-75.
  17. Pirard C., Douny C., Eppe G. & De Pauw E. 2002. Cleanup and determination of organochlorine and organobromine compounds. *Organohalogen Compounds*, **55**, 29-32.
  18. Secretariat for the Stockholm Convention (SSC) 1997. Stockholm Convention on persistent organic pollutants. SSC, Geneva, 34 pp ([www.pops.int/documents/convtext/convtext\\_en.pdf](http://www.pops.int/documents/convtext/convtext_en.pdf) ultimo accesso 21 giugno 2006).
  19. Shin S.K., Kim G. & Kim K.K. 2001. Bioaccumulation of PCDDs/PCDFs in meat sample. *Organohalogen Compounds*, **51**, 388-391.
  20. Tlustos C, Pratt I., White S., Fernandes A. & Rose M. 2005. Investigation into levels of PCDD/Fs, PCBs and PBDEs in Irish produce. *Organohalogen Compounds*, **67**, 1474-1477.
  21. United States Environmental Protection Agency (USEPA) 1994. Method 1668 Rev. A: Chlorinated biphenyl congeners in water, soil, sediment, and tissue by HRGC/HRMS. USEPA, Washington DC.

22. Van den Berg M., Birnbaum L., Bosveld A.T.C., Brunstrom B., Cook P., Feely M., Giesy J.P., Hanberg A., Hasegawa R., Kennedy S.W., Kubiak T., Larsen J.C., van Leeuwen F.X.R., Liem A.K.D., Nolt C., Peterson R.E., Poellinger L., Safe S., Schrenk D., Tillit D., Tysklind M., Younes M., Waern F. & Zacharewski T. 1998. Toxic equivalency factors (TEFs) for PCBs, PCDDs, PCDFs for humans and wildlife. *Environ Health Perspect*, **106** (12), 775-792.
23. Vega M., Pablos M.V., Navas J.M. & Tarazona J.V. 2002. A metabolism-based biomagnification model for the prediction of concentration and effects of dioxins in high trophic levels. *Organohalogen Compounds*, **59**, 187-190.
24. Verstraete F. 2005. EU-strategy to reduce the presence of dioxins, furans and dioxin-like PCBs in feed and food – existing measures. *Organohalogen Compounds*, **67**, 1421-1423.