

Sviluppo e messa a punto di una metodica di determinazione di sostanze perfluoroalchiliche

Viene presentato lo sviluppo e la messa a punto di una metodica per la determinazione di sostanze perfluoroalchiliche (PFASs), composta dalla fase di estrazione in fase solida (SPE extraction) e dalla fase di analisi mediante cromatografia liquida ad alte prestazioni con rivelatore triplo quadrupolo (UHPLC-MS/MS). Oltre agli isomeri lineari, è possibile anche determinare gli isomeri ramificati mono e di-sostituiti del PFOS e del PFOA.

a cura di **Massimo Fant, Diego Cracco, Alessandro Pellizzaro**
Acque del Chiampo s.p.a. - Servizio Idrico Integrato, Arzignano (VI) - e-mail: fantm@acquedelchiampo.it



Figura 1- Il sistema analitico UHPLC-QQQ

I PFASs (perfluoro-alkyl substances) sono composti costituiti da catene di atomi di carbonio lineari o ramificate, a lunghezza variabile, che in genere va da C4 a C14. La loro forte stabilità è dovuta al legame C-F, il più forte tra i legami covalenti, con un'energia di dissociazione pari a $\sim 480 \text{ KJ mol}^{-1}$ che li rende particolarmente resistenti all'idrolisi, alla fotolisi e alla degradazione microbica. Presentano, inoltre, una debole tensione superficiale associata a caratteristiche anfifiliche (presenza di un gruppo idrofilo e di uno idrofobo) che conferisce loro una discreta tensioattività (Minoia et al., 2008). Sono prodotti ottenuti per via sintetica attraverso reazioni di fluorurazione elettrochimica, o mediante successiva degradazione, anche metabolica, di altri prodotti fluoroderivati (Russo et al., 2014).

Come categoria, i PFASs sono costituiti da migliaia di sostanze chimiche, ma gli studi disponibili si sono concentrati principalmente sugli acidi perfluoroalchilsolfonici (es. acido perfluorooctansolfonico - PFOS) e gli acidi perfluoroalchilcarbossilici (es. acido perfluorooctanoico - PFOA).

L'utilizzo dei PFASs, fin dal primo dopoguerra, è stato variegato e molteplice: emulsionanti e surfactanti in prodotti per la pulizia di svariati materiali, nonché componenti inerti di fitofarmaci.

Tali composti sono stati impiegati anche per produrre contenitori ad uso alimentare per fast-food, shampoo, schiume antincendio, dentifrici, pellicole fotografiche.

In particolare, il PFOA è un precursore nella produzione del politetrafluoroetilene (PTFE), comunemente noto come Teflon, largamente utilizzato grazie alle comprovate proprietà antiaderenti e inerzia chimica. Un altro utilizzo di largo impiego si ha nella produzione del Gore Tex, un materiale impermeabile, traspirante e resistente, largamente utilizzato nell'abbigliamento tecnico-sportivo, ma anche per articoli medico-sanitari (protesi, valvole cardiache) e per la filtrazione delle acque reflue in impianti di depurazione.

I PFASs non sono presenti naturalmente nell'ambiente; al massimo possono essere prodotti come composti monoflorurati da alcune piante e funghi o essere originati in bassissima quantità durante attività di origine vulcanica e geochimica (Russo et al., 2014). Lo SCHER (Comitato Scientifico dei Rischi Sanitari e Ambientali europeo) ha affermato che il PFOS ha un potenziale di propagazione a lunga distanza nell'ambiente, è altamente persistente e mostra un'elevata tendenza al bioaccumulo, risultando quindi molto tossico. Da ciò ne deriva il soddisfacimento di tutti i criteri per poter essere considerato come inquinante organico persistente ai sensi della convenzione di Stoccolma (Russo et al., 2014).

Per questo motivo l'Unione Europea ha manifestato un crescente interesse nel limitarne, ove possibile, la produzione e l'utilizzo, con lo scopo principale di ridurne drasticamente le emissioni. La Direttiva Europea 2006/122/CE, emanata nel dicembre 2006, ha introdotto restrizioni all'immissione sul mercato di PFOS, non escludendo le stesse anche per il PFOA, lasciando però in vigore alcune deroghe. Sempre in quell'anno, l'U.S.EPA (United States – Environmental Protection Agency) ha richiesto alle aziende produttrici di PFOA di ridurne drasticamente (95%) le emissioni industriali entro il 2010, per arrivare alla totale eliminazione dal 2015, chiedendone la sostituzione con sostanze alternative, da ricercare soprattutto fra gli omologhi avente una catena alchilica più corta. Sempre negli Stati Uniti, l'agenzia per la protezione dell'ambiente, nel 2009, ha proposto come valori guida provvisori, per le acque potabili, 200 ng/L per il PFOS e 400 ng/L per il PFOA. Più recentemente, con la Direttiva 2013/39/UE, l'Unione Europea ha proposto di inserire il PFOS tra le sostanze pericolose prioritarie che devono essere monitorate nei corpi idrici dell'Unione, stabilendo per le acque dolci uno standard di qualità ambientale (EQS) pari a 0,65 ng/L (Valsecchi et al., 2013).

La contaminazione evidenziata da PFASs

In seguito ad uno studio condotto da IRSA-CNR nei principali bacini fluviali italiani (Valsecchi e Polesello, 2013), condotto tra Maggio 2011 e Febbraio 2013, nell'ambito di una specifica convenzione tra il Ministero dell'Ambiente e della Tutela del Territorio e del Mare (MATTM) e IRSA-CNR, la Regione Veneto, con lettera datata 11 giugno 2013, prot. 247377, oltre ad informare i gestori coinvolti della "presenza anomala di sostanze perfluoro – alchiliche (PFASs) in diversi corpi idrici superficiali ed in alcuni (peraltro non specificati) punti di erogazione pubblici delle acque potabili nella provincia di Vicenza e comuni limitrofi", invita "in particolare i Gestori del servizio idrico integrato e gli Enti di governo degli Ambiti territoriali Ottimali a fornire..., per quanto di competenza, ogni ulteriore informazione concernente il riscontro della presenza di tali sostanze nella risorsa idrica addotta, nonché le eventuali misure poste in essere per la salvaguardia della salute pubblica". A seguito delle Deliberazioni della Giunta Regionale n° 1490 del 12 Agosto 2013, viene istituita la Commissione Tecnica Interdisciplinare, costituita da rappresentanti della Regione e degli Enti coinvolti, con lo scopo di valutare la problematica e di formulare proposte alle Autorità competenti in ordine ai limiti da adottare per la tutela della salute pubblica.



Figura 2 – La sorgente ESI dello spettrometro

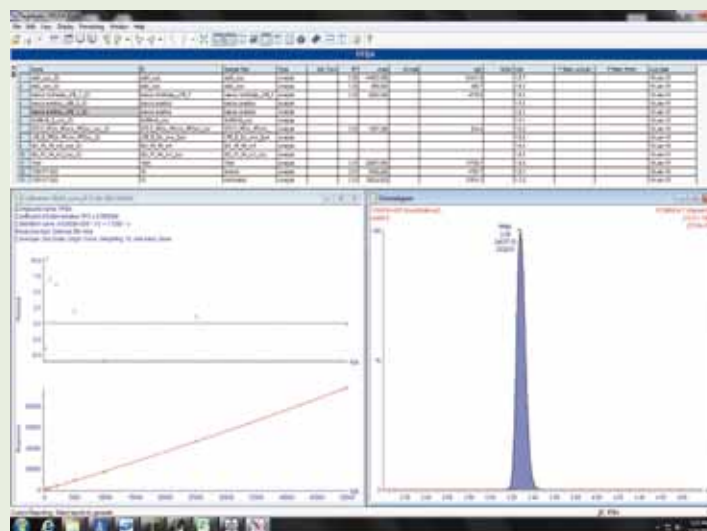


Figura 3 - Picco relativo alla transizione per la quantificazione del PFBA

Tabella 1 – Configurazione strumentale del UPLC H-class Waters

Configurazione strumentale

Sistema	UPLC H-class Waters con pressione operativa fino a 15000 psi
Kit PFASs	Pre-colonna 2,1x50 mm (d.p. 1,7 µm) Acquity BEH Waters per ritardare le sostanze perfluorurate rilasciate dal sistema, tubi eluenti in peek
Analizzatore	Quadrupolo tandem Xevo TQD Waters operante con acquisizione MRM
Sorgente	ESI ionizzazione elettrospray in modalità negativa
Colonna	2,1x150 mm (d.p. 1,7 µm) Acquity BEH Waters
Fase mobile	Eluente A: CH ₃ COONH ₄ 20mM; Eluente B: Metanolo
Temperatura colonna	35°C
Volume di iniezione	10 µL
Flusso	0,2 mL/min
Gradiente	H ₂ O-Metanolo 60-40 % ->10-90 % in 27 min + tempo ricondizionamento colonna

OBIETTIVO SU Acque sotterranee e superficiali

Tabella 2 - Per ogni analita, i recuperi e gli scarti tipo nel campo di misura dopo la fase estrattiva

Analita	RECUPERO	RSD%	CAMPO DI MISURA STRUMENTALE (ppt)
	n = 4 - 7		
PFFA	71 - 101%	3 - 18%	200 - 50000
PFBA	95 - 101%	4 - 10%	200 - 50000
PFFeA	97 - 115%	3 - 8%	200 - 50000
PFHpS	70 - 122 %	4 - 11%	200 - 50000
PFOS	75 - 123 %	6 - 20%	200 - 50000
PFBS	85 - 122 %	3 - 7%	200 - 50000
PFDA	76 - 125 %	10 - 20%	200 - 2000
PFNA	84 - 106 %	7 - 19%	200 - 50000
PFDaA	97 - 121 %	5 - 13%	500 - 2000
PFHpA	97 - 127 %	4 - 14%	200 - 50000
PFHxA	99 - 128 %	2 - 7%	200 - 50000
PFUnA	76 - 129 %	3 - 14%	200 - 2000
PFOA	91 - 102 %	2 - 14%	200 - 50000
PFHxS	92 - 129 %	2 - 13%	200 - 50000
P4MHPa	88 - 101 %	6 - 15%	1000 - 10000
P5MHPa	104 - 129 %	5 - 6%	200 - 10000
P6MHPa	86 - 107 %	6 - 7%	500 - 15000
P6MHPs	108 -117 %	7 - 15%	200 - 5000

Tabella 3 - Esempi di valori riscontrati in acque di pozzo

	Pozzo A (ng/L)	Pozzo B (ng/L)	Pozzo C (ng/L)
PFFA	2420	265	400
PFBA	2714	223	656
PFPeA	4487	126	410
PFHpS	<2	<2	2,3
PFOS	22	14	49
PFBS	1955	241	464
PFDA	26	<2	<2
PFNA	<2	<2	<2
PFDaA	<2	<2	<2
PFHpA	469	25	82
PFHxA	1339	109	357
PFUnA	<2	<2	<2
PFOA	3344	553	1311
PFHxS	39	6,4	32
P1MHPs	< 2	< 2	< 2
P3MHPA	< 10	< 10	< 10
P3MHPs	< 5	< 5	6,9
P4MHPA	< 10	31	80
P4MHPs	< 5	< 5	< 5
P5MHPA	304	32	106
P5MHPs	< 5	< 5	< 5
P6MHPA	596	60	186
P6MHPs	< 2	< 2	7,6
P55DMHxA	23	3,2	< 2
P35DMHxS	< 2	< 2	< 2

La società Acque del Chiampo s.p.a. Servizio Idrico Integrato di Arzignano (VI), coinvolta in quanto Gestore del Servizio Idrico di alcuni dei comuni interessati dalla problematica, si è subito attivata in tal senso e, tra le iniziative messe in atto, c'è stata l'immediata acquisizione, da parte del Laboratorio di analisi interno, dell'idonea strumentazione volta all'implementazione della metodica per il successivo monitoraggio relativo al territorio di competenza, nonché per l'analisi di campioni di origine esterna (Mazzola et al., 2013; Russo et al., 2014).

La possibile fonte di pressione della contaminazione delle acque sotterranee da PFASs, comprendente un'estesa porzione di territorio che si estende dalla media valle del torrente Agno (Monti Lessini orientali, Trissino) fino ad est della città di Vicenza, per poi contornare i Colli Berici verso sud, lambendo il margine orientale della provincia di Verona, per arrivare fino alla provincia di Padova nel comune di Montagnana, è stata individuata presso un'area di pertinenza di uno stabilimento chimico nel comune di Trissino (Mazzola et al., 2013).

L'esperimento condotto

Il campionamento è stato effettuato secondo quanto previsto dal metodo EPA (Shoemaker et al., 2009) in contenitori in polipropilene.

Al momento del prelievo è stato aggiunto Trizma Hydrochloride (CAS 1185-53-1) come stabilizzante in modo da portare il pH tra 6 e 7.

Tale campione può essere conservato ad una temperatura inferiore ai 6°C per 14 giorni.

All'arrivo in laboratorio il campione è stato fortificato con una soluzione standard contenente un mix di surrogati.

Per l'estrazione inizialmente sono state utilizzate colonnine SPE con una fase costituita da un rapporto bilanciato di due monomeri, n-vinilpirrolidone idrofilo e divinilbenzene lipofilo, per poi passare a colonnine con una fase a scambio anionico debole che hanno permesso di ottimizzare il recupero anche per le molecole da 3 a 5 atomi di carbonio.

Le colonnine individuate (Strata-X-AW 33 um 200 mg/6mL Phenomenex) sono costituite da una fase polimerica ideale per composti acidi con pKa <5.



La società Acque del Chiampo

Acque del Chiampo S.p.A. è l'azienda che si occupa del servizio idrico integrato nel bacino Valle del Chiampo, il primo polo italiano per l'industria conciaria, il quale racchiude i comuni di Arzignano, San Pietro Mussolino, Chiampo, Nogarole Vicentino, Crespadoro, Altissimo, Montorso Vicentino, Lonigo, Brendola e Montebelluna Maggiore. La società, suddivisa in tre macro aree comprende l'area tecnica, che gestisce acquedotto, fognature e discariche; l'area depurazione che gestisce i processi di trattamento dei reflui civili e industriali affluenti ai tre impianti di Arzignano, Montebelluna e Lonigo, dei relativi fanghi di risulta e dei rifiuti; l'area amministrativa, comprendente fra gli altri l'ufficio comunicazione con relativo ufficio stampa, il servizio clienti, la contabilità, l'ufficio acquisti e l'information technology. La Società, nel corso degli anni, ha implementato il proprio sistema integrato qualità ambiente e sicurezza, ottenendo i certificati ISO 9001, ISO 14001, OSHAS 18001 e il certificato di eccellenza. In questo contesto si inserisce il laboratorio di analisi interno, accreditato dal 2005 secondo la norma UNI CEI EN ISO/IEC 17025

Queste ultime, dopo essere state condizionate con metanolo e acqua leggermente acida, sono state caricate col campione, fatto eluire a 2-3 mL/minuto attraverso la pompa peristaltica a 8 canali Minipuls 3 Gilson configurata per lavorare in pressione negativa: questo permette di limitare al minimo il contatto con il campione e di automatizzare l'estrazione, garantendo così un flusso costante di carico. Si è proceduto quindi con le seguenti fasi: essiccazione sotto vuoto per 10 minuti, eluizione con metanolo basico con raccolta dell'estratto in provette in polipropilene, concentrazione fino a 0,2 mL circa in concentratore centrifugo, ricostituzione dell'estratto al volume finale di circa 1 mL con una soluzione H₂O-Metanolo 70-30%, aggiunta dello standard interno, omogeneizzazione con agitatore Vortex per circa 1 minuto e trasferimento in vial da autocampionatore in polipropilene. L'estratto è stato analizzato entro 15 giorni.

La determinazione analitica

La metodica implementata si basa sul metodo EPA 537:2009 (Shoemaker et al., 2009) che prevede l'applicazione della tecnica analitica UPLC/MS-MS, consentendo al momento la determinazione di 25 sostanze perfluoroalchiliche da 3 a 12 atomi di carbonio: 15 acidi perfluoroalchilcarbossilici e 10 acidi perfluoroalchilsolfonici; 14 sono isomeri lineari, 11 sono isomeri ramificati mono e di sostituiti di PFOA e PFOS.

La quantificazione avviene mediante l'utilizzo dello standard interno ¹³C-PFHxA, mentre il controllo del processo di estrazione viene effettuato con l'ausilio dei seguenti surrogati: ¹³C-PFBA, ¹³C-PFOA, ¹³C-PFOS, ¹³C-PFDA. In breve è stato utilizzato per la quantificazione un UPLC H-class Waters con pre-colonna 2,1x50 mm (d.p. 1,7 µm) e colonna 2,1x150 mm (d.p. 1,7 µm), entrambe Acquity BEH Waters. Lo spettrometro era un quadrupolo tandem Xevo TQD Waters operante con acquisizione MRM e sorgente ESI ionizzazione elettrospray in modalità negativa. Ulteriori dettagli sono riportati in **Tabella 1** e **figura 3**.

In queste condizioni il campo di misura strumentale massimo è: 200 - 50000 ng/L. L'efficienza della fase di estrazione e la riproducibilità del sistema cromatografico hanno garantito un recupero degli analiti compreso tra il 71% ed il 129% (n. campioni 4-7) e uno scarto tipo di ripetibilità relativo inferiore al 20% in tutto il campo di misura (**Tabella 2**).

Come si evince dalla tabella, i recuperi e gli scarti tipo relativi sono tutti compresi nelle specifiche previste dal metodo di riferimento: rispettivamente ± 30% e ≤ 20% (Shoemaker et al., 2009).

Tenendo conto della concentrazione del campione, i limiti di quantificazione sono risultati compresi nell'intervallo 2 - 10 ng/L.

Il metodo EPA di riferimento prevede la sola determinazione degli isomeri lineari, citando comunque l'eventuale presenza dei ramificati. La tecnica applicata ha permesso di individuare le transizioni MRM opportune e quindi di risolvere e quantificare tali isomeri: la concentrazione riscontrata in alcuni campioni (**Tabella 3**) è risultata arrivare fino al 20 % rispetto alla concentrazione dell'isomero lineare per quanto riguarda il PFOS e fino al 40% per il PFOA.

A conferma di studi più approfonditi già effettuati e pubblicati (Valsecchi et al., 2013; Russo et al., 2014), tra tutte le analisi effettuate, nei campioni dove sono stati trovati PFASs, si è notata principalmente la presenza di quelli a catena corta (da C3 a C8) e quasi mai di quelli a catena lunga (da C9 in poi); inoltre l'incidenza degli isomeri ramificati, se e quando presenti, risulta maggiore per il PFOA rispetto al PFOS, in virtù della preponderanza generalmente riscontrata del primo rispetto al secondo.

Conclusioni

In fase di validazione del metodo, si è riscontrato che le cartucce per l'estrazione in fase solida proposte dal metodo EPA non consentivano recuperi soddisfacenti per i composti da 3 a 5 atomi di carbonio. Dovendo fornire dati utili anche per una valutazione sull'efficienza di abbattimento di sistemi di filtrazione, sono state individuate colonnine con una fase adsorbente che ha permesso recuperi soddisfacenti anche per i composti a basso peso molecolare.

Nei campioni dove sono stati trovati i composti PFASs, si è notata principalmente la presenza di quelli a catena corta (da C3 a C8). La tecnica applicata ha permesso inoltre individuare le transizioni MRM opportune e quindi di risolvere e quantificare anche gli isomeri ramificati la cui concentrazione in alcuni campioni di acqua di pozzo è risultata arrivare fino al 20 % rispetto alla concentrazione dell'isomero lineare per quanto riguarda il PFOS e fino al 40% per il PFOA.



Massimo Fant

Massimo Fant si è laureato in Chimica nel 2003 presso la Facoltà di Scienze Matematiche, Fisiche e Naturali dell'Università di Padova, indirizzo inorganico - chimico-fisico, con tesi dal titolo "Ottimizzazione e validazione di metodologie di analisi per la determinazione di micro-inquinanti atmosferici", riguardante la messa a punto di metodiche per la determinazione di un'ampia gamma di composti tramite l'utilizzo di un campionario passivo (Radiello) con successivo desorbimento termico e/o chimico (solvente) e analisi gas-cromatografica. L'intero lavoro è stato svolto presso il Laboratorio Regionale Italiano Sanpellegrino della Nestlé Waters (stabilimento di Acqua Vera). Dopo una prima esperienza tra il 2003 e il 2004 presso lo stabilimento di Recoaro Terme della Nestlé Waters come addetto al laboratorio chimico - assicurazione qualità, ha avuto un'esperienza lavorativa di due anni presso SGS Italia, laboratorio di Villafranca Padovana (PD). Da ottobre 2006 entra a far parte di Acque del Chiampo - Servizio Idrico Integrato come assistente tecnico, per poi assumere la direzione del laboratorio analisi dall'aprile 2013.

Bibliografia

- Mazzola M., Saccardo I., Cappellin R. 2013. Stato dell'inquinamento da sostanze perfluoroalchiliche (PFAS) in provincia di Vicenza, Padova, Verona - Aspetti geologici e idrogeologici, la rete idrografica, il sito potenzialmente inquinato e prima delimitazione dell'inquinamento al 30.09.2013. Rapporto ARPAV.
- Minoia C., Sottani C., Leoni E., Biamonti G., Signorini S., Imbriani M. 2008. PFOS e PFOA. G. Ital. Med. Lav. Erg. 2008.
- Russo F., Vazzoler M., Tagliapietra L., Simion M., Verizzi E. 2014. Contaminazione da sostanze perfluoroalchiliche (PFAS) nelle acque ad uso umano - Documento di sintesi. Regione Veneto, 2014.
- Shoemaker J.A., Grimmett P.E., Boutin B.K. 2009. EPA 537:2009 - Determination of selected perfluorinated alkyl acids in drinking water by solid phase extraction and liquid chromatography / tandem mass spectrometry (LC/MS/MS).
- Valsecchi S., Mazzoni M., Polesello S. 2013. Analisi multiresiduale LC-MS mediante arricchimento in linea del campione (on-line SPE/UHPLC-ESI-MS/MS) per la determinazione di acidi perfluoroalchilcarbossilati e perfluoroalchilsolfonati nelle acque dolci naturali. Notiziario dei metodi analitici IRSA-CNR, vol. 1.
- Valsecchi S., Polesello S. 2013. Rischio associato alla presenza di sostanze perfluoro-alchiliche (PFAS) nelle acque potabili e nei corpi idrici recettori di aree industriali nella Provincia di Vicenza e aree limitrofe. IRSA-CNR 25 marzo 2013