



EMANUELA FRAPICCINI^A, ANNA ANNIBALDI^B, MATTIA BETTIA, SILVIA ILLUMINATI^B, MAURO MARINI^A, MONICA PANFILI^A, GIUSEPPE SCARPONI^B, CRISTINA TRUZZI^B

^ANATIONAL RESEARCH COUNCIL (CNR), INSTITUTE OF MARINE SCIENCE (ISMAR), ANCONA

^BDEPARTMENT OF LIFE AND ENVIRONMENTAL SCIENCES, UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE
EMANUELA.FRAPICCINI@AN.ISMAR.CNR.IT

IPA IN *MULLUS BARBATUS*: ESTRAZIONE CON QuEChERS

*Scopo di questo studio è testare la tecnica di estrazione QuEChERS per la determinazione degli IPA (idrocarburi policiclici aromatici) nel filetto della triglia di fango, *Mullus barbatus*, del Mar Adriatico. Tale metodo di estrazione è stato applicato con successo (% di recupero $85 \pm 13,3\%$), risultando un'efficace alternativa ai metodi più tradizionali (MAE, microwave assisted extraction). Il benzo(a)pirene era al di sotto del LOD e pertanto, inferiore ai tenori massimi consentiti dalla legge (2 ng/g w.w., Reg. CE 1881/2006).*

Gli IPA (idrocarburi policiclici aromatici) sono contaminanti organici costituiti da due o più anelli aromatici. Le principali caratteristiche chimico-fisiche sono la bassa solubilità in acqua e l'elevata lipofilia, che permette loro di attraversare la membrana biologica e di bioaccumularsi negli organismi marini [1]. Valutare il livello di IPA in matrici complesse, quali il cibo, spesso richiede procedure di estrazione e purificazione complicate. Scopo di questo lavoro è testare e validare il metodo di estrazione dei QuEChERS, messo a punto per la determinazione degli IPA nel filetto di una specie demersale del Mar Adriatico: il *Mullus barbatus* (triglia di fango), largamente consumata dalla popolazione locale con un elevato interesse economico e commerciale e, pertanto, utilizzata come bioindicatore [2].

Materiali e metodi

Esemplari di *Mullus barbatus* (n=215) sono stati catturati con reti a strascico nella Geographical Sub Area (GSA) 17, Mar Adriatico Centro-Settentrionale (Fig. 1). Il campionamento è avvenuto mensilmente nel periodo tra agosto 2015 e marzo 2016, esclu-



Fig. 1 - Zona di campionamento di *Mullus barbatus* effettuato nella Geographical Sub Area (GSA) 17, Mar Adriatico Centro-Settentrionale

dendo il mese di settembre per fermo biologico. La parte edibile del pesce è stata sfilettata e resa omogenea. La tecnica QuEChERS utilizzata in questo studio, si è basata su lavori presenti in letteratura [3]. Essa è costituita da una fase di estrazione in cui avviene l'aggiunta dei sali (4 g $MgSO_4$ e 1 g NaCl) al filetto omogenato con acetonitrile (10 mL). È stato eseguito un vortex (3 min) e la centrifugazione del campione (3400 r.p.m. x 3 min). Nella seconda fase di purificazione il surnatante (3 mL) è stato inserito nel D-SPE Kit dei QuEChERS, costituito da 900 mg $MgSO_4$, 300 mg PSA e 150 mg C18. In seguito, il campione è stato shakerato (1 min) e messo in centrifuga (3400 r.p.m. x 1 min). Dopodiché tutto il surnatante è stato recuperato, fatto evaporare e risospeso con il solvente di analisi (acetonitrile, 0,4 mL). L'analisi chimica è stata effettuata in HPLC-FD. La separazione degli analiti è avvenuta su una colonna a fase inversa (Hypersil Green PAH, 2,1 mm X 150 mm, 1,8 μm) eluendo la fase mobile (acetonitrile:H₂O), secondo un programma a gradiente (3% min⁻¹). La retta di taratura è stata costruita diluendo lo standard EPA 610 PAH Mix (1:50, 1:100, 1:200, 1:400 v/v) (Tab. 1).

L'articolo è basato sul contributo presentato in occasione delle "Giornate di Chimica Analitica" dedicate alla memoria del prof. Francesco Dondi - Ferrara, 10-11 luglio 2017.

IPA	Tempo di ritenzione (min)	R ²	pendenza (b)	$\lambda_{ex/em}$ (nm)	LOD* (ppb)	LOQ* (ppb)
Naftalene	10,17	0,997	1,6373	270-360	0,3	0,9
Acenaftene + fluorene	13,05	0,999	1,4567	270-360	0,2	0,5
Fenantrene	14,37	0,992	8,2981	270-360	0,1	0,2
Antracene	15,12	0,993	29,3243	250-406	0,3	0,9
Fluorantene	16,17	0,993	7,8025	280-450	0,4	0,9
Pirene	16,86	0,995	40,8134	270-390	0,2	0,8
Benzo[a]antracene	18,88	0,992	29,0732	265-380	0,2	0,5
Crisene	19,10	0,993	31,412	265-380	0,2	0,5
Benzo[b]fluorantene	20,91	0,991	13,3407	290-430	0,2	0,7
Benzo[k]fluorantene	21,43	0,996	63,478	290-430	0,2	0,7
Benzo[a]pirene	22,23	0,999	32,8034	290-430	0,2	0,6
Dibenz[a,h]antracene	23,11	0,999	18,5948	290-410	0,2	0,6
Benzo[ghi]perilene + Indeno[1,2,3-cd]pirene	24,15	0,996	19,6476	290-410	0,2	0,6

*LOD = 3,3 Sa/b
 *LOQ = 10 Sa/b; Sa, deviazione standard dell'intercetta della retta di regressione, ICH Q2B (ICH, 2005)

Tab. 1 - Tempo di ritenzione degli IPA, R2 della retta di taratura, pendenza della retta di taratura (b), $\lambda_{ex/em}$ (nm), LOQ e LOD degli IPA indagati

Risultati e discussioni

La metodologia utilizzata nell'estrazione QuEChERS è stata validata calcolando, secondo la metodica ICH Q2B [4], il LOQ (limite di rivelabilità) e LOD (limite di quantificazione) di ogni analita (Tab. 1). Inoltre, la tecnica QuEChERS è stata confrontata con un metodo di estrazione più tradizionale: il MAE, microwave assisted extraction. Sono state calcolate le percentuali di recupero delle due metodiche utilizzando un materiale certificato (NIST 1974C). I risultati ottenuti hanno dimostrato che i due metodi di estrazione sono confrontabili, pertanto, la tecnica QuEChERS ha rappresentato una valida alternativa rispetto al metodo più tradizionale del MAE, con percentuali di recupero del materiale certificato di $85 \pm 13,3\%$ (Fig. 2). Inoltre, è stata valutata la precisione del metodo analitico calcolando l'inter-day ($\leq 5\%$) e intra-day ($\leq 8\%$), mentre la ripetibilità della tecnica di estrazione dei QuEChERS è risultata $\leq 9\%$ (n=5).

Le concentrazioni degli IPA totali determinate con la metodica QuEChERS-HPLC variavano da 8 a 45 ng/g w.w. (peso umido) e, pertanto, erano confrontabili

con altri studi di letteratura [5]. Dei 16 inquinanti prioritari estratti dai campioni di filetto di *Mullus barbatus*, solamente tre IPA (naftalene, fenantrene e fluorantene) sono stati riscontrati al di sopra dei valori del LOD (Tab. 1). Tutti gli altri IPA ad alto peso

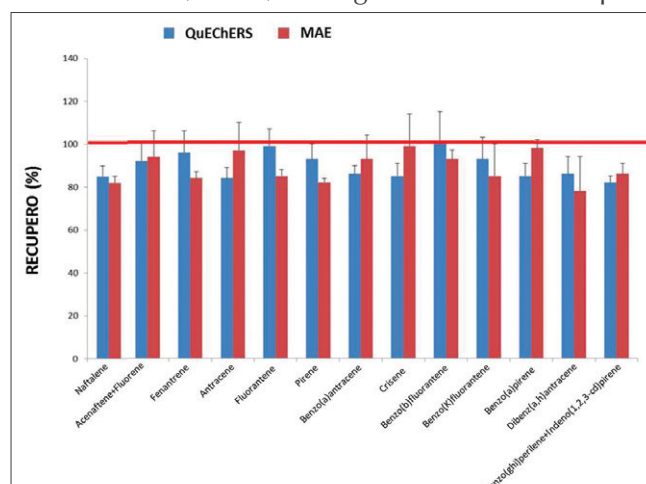


Fig. 2 - Confronto tra le percentuali di recupero dei metodi di estrazione QuEChERS e MAE (microwave assisted extraction) utilizzando materiale certificato (NIST 1974C)

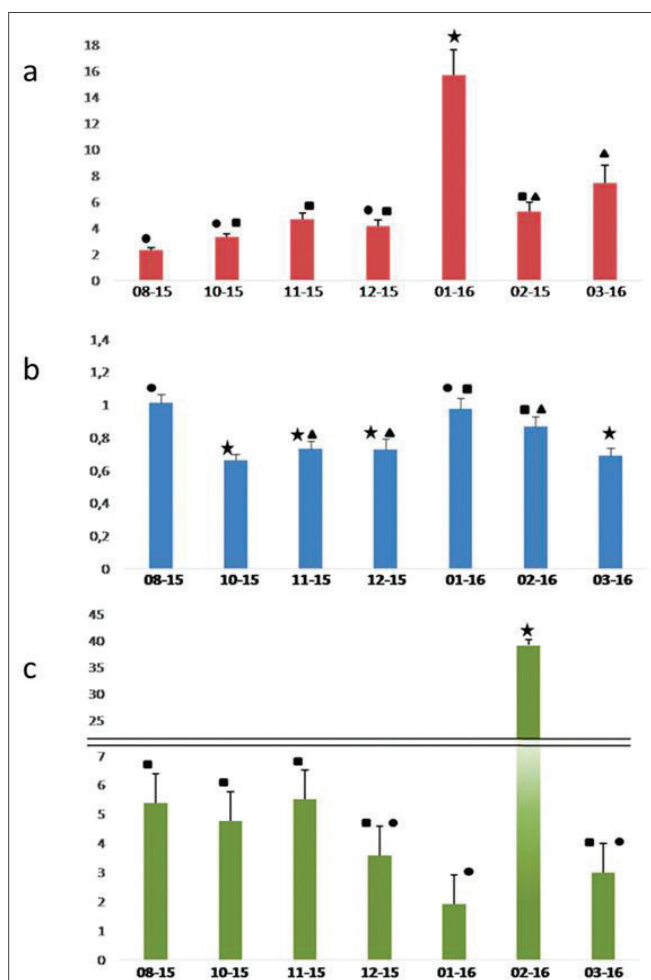


Fig. 3 - Concentrazioni (ng/g w.w.) di naftalene (a), fenantrene (b) e fluorantene (c) riscontrate nei campioni di filetto di *Mullus barbatus* campionati mensilmente (agosto 2015 - marzo 2016) nella GSA 17

molecolare (≥ 4 anelli) sono risultati al di sotto del LOD e, pertanto, ben lontani dai tenori massimi stabiliti per quanto riguarda la sicurezza dei prodotti ittici alimentari, in particolare il benzo(a)pirene (2 ng/g w.w., Reg. CE 1881/2006). In questo studio è stata riscontrata una maggior presenza di IPA a basso peso molecolare (2-3 anelli) rispetto a quelli ad alto peso molecolare (≥ 4 anelli). Questo risultato è stato spesso ritrovato in letteratura sia su filetti che in altre matrici biologiche di organismi marini [6]. Ciò accade perché gli IPA ad alto peso molecolare sono maggiormente soggetti a meccanismi di detossificazione da parte dell'animale [7]. In Fig. 3 sono rappresentate le medie delle concentrazioni di nafta-

lene, fenantrene e fluorantene, durante il periodo di campionamento. È stato possibile notare come la presenza di naftalene e fenantrene (2-3 anelli aromatici) è risultata piuttosto costante nel periodo di indagine. Al contrario, il fluorantene (4 anelli aromatici), che è considerato l'IPA maggiormente presente nei sedimenti marini [8], ha presentato concentrazioni che variano molto durante il periodo di campionamento, con un valore massimo nel mese di febbraio (39 \pm 1 ng/g d. w.). Ciò potrebbe essere legato a contaminazioni di carattere ambientale, maggiormente presenti durante il periodo invernale (risospensione del sedimento, mareggiate, aumento degli apporti fluviali) [9]. È stato osservato come la stagionalità si è dimostrata essere una variabile che ha influenzato, in maniera statisticamente significativa, l'accumulo dei tre IPA nel filetto di *Mullus barbatus*, in accordo con alcuni lavori presenti in letteratura [10]. Inoltre, è stato osservato che gli esemplari di *Mullus barbatus* campionati nel periodo estivo-autunnale (agosto - settembre - ottobre - novembre), mostravano concentrazioni IPA più basse rispetto a quelli campionati nel periodo invernale (dicembre - gennaio - febbraio - marzo). Questo è stato osservato per il naftalene, il fenantrene e il fluorantene (Fig. 4).

Alcuni parametri biologici del pesce (età, sesso, peso) sono stati studiati e messi a confronto con le concentrazioni dei tre IPA riscontrate nel filetto (Fig. 5). Tranne alcune eccezioni, non si sono apprezzate differenze statisticamente significative tra il livello di IPA, il sesso e l'età degli individui di *Mullus barbatus*. Anche per quanto riguarda il peso dell'animale, non è stata apprezzata alcuna relazione statisticamente significativa tra le concentrazioni di naftalene e fe-

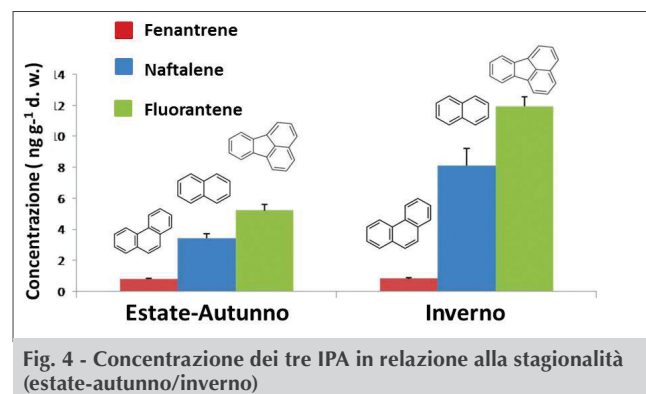


Fig. 4 - Concentrazione dei tre IPA in relazione alla stagionalità (estate-autunno/inverno)

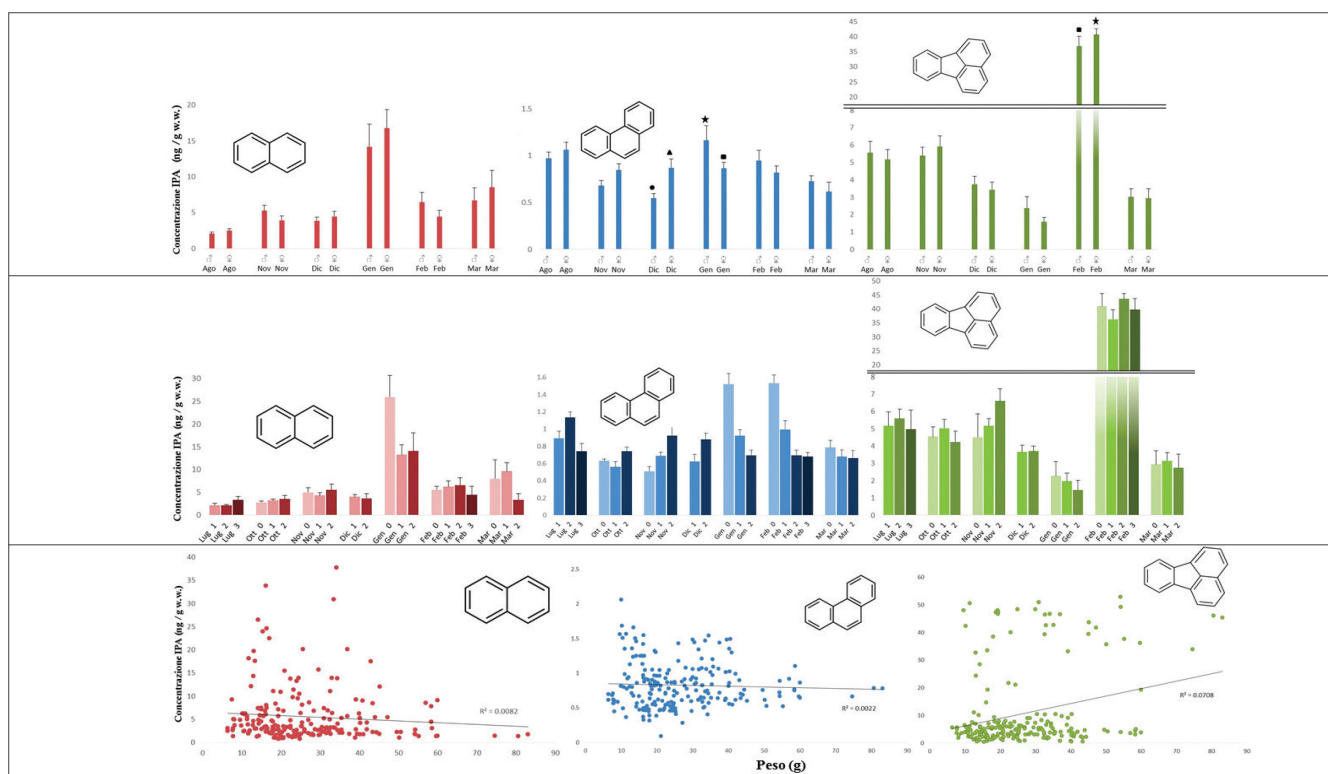


Fig. 5 - Concentrazione (ng/g w.w.) di naftalene, fenantrene e fluorantene rispetto ad alcune variabili biologiche di *Mullus barbatus*: sesso (M e F), età (0, 1, 2, 3 anni) e peso (g) dell'animale

nantrene con il peso (g) della specie. È stata invece riscontrata una leggera correlazione lineare positiva tra la concentrazione del fluorantene e il peso dell'animale (Fig. 5).

In conclusione, è possibile affermare che la metodica QuEChERS-HPLC, studiata e validata nel presente lavoro, può essere considerata una valida alternativa ai metodi di estrazione più tradizionali (MAE), per quanto riguarda l'estrazione degli IPA dal filetto di pesce. Tra le variabili ambientali e biologiche indagate, solamente la stagionalità ha presentato una relazione statisticamente significativa con l'accumulo degli IPA nel filetto, presentando valori di concentrazione maggiori nel periodo invernale. Poiché la stagionalità è legata al ciclo biologico di questa specie, sarebbe opportuno estendere tale ricerca andando ad esaminare l'intero ciclo biologico di *Mullus barbatus*, in particolare il periodo di riproduzione.

BIBLIOGRAFIA

- [1] B.A. Musa Bandowe *et al.*, *Environment International*, 2014, **65**, 135.
- [2] C. Porte *et al.*, *Marine Ecology Progress series*, 2002, **235**, 205.
- [3] M.J. Ramalhosa *et al.*, *Journal of Separation Science*, 2009, **32**, 3529.
- [4] C. Truzzi *et al.*, *Analytical Letters*, 2014, **47**, 1118.

- [5] M. Perugini *et al.* *Chemosphere*, 2007, **66**, 1904
- [6] C.-L. Ke *et al.*, *Marine Pollution Bulletin*, 2017, **117**, 507.
- [7] M. Tiwari *et al.*, *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 2017, **50**, 58.
- [8] M. Perugini *et al.*, *Environmental Pollution*, 2001, **119**, 91.
- [9] H.M. Hwang *et al.*, *Environmental Pollution*, 2006, **146**, 416.
- [10] V.M. León *et al.*, *Marine Pollution Bulletin*, 2014, **87**, 352.

PAHs in *Mullus barbatus*: Extraction by QuEChERS

The purpose of this study was to test QuEChERS extraction method for the PAHs (polycyclic aromatic hydrocarbons) determination in the red mullet fillet, *Mullus barbatus*, of the Adriatic Sea. QuEChERS method was successfully applied (percentage of recovery was 85±13.3%) becoming an effective alternative to more traditional methods (MAE, microwave assisted extraction). Benzo(a)pyrene was below the LOD and, therefore, lower than maximum levels permitted by law (2 ng/g w.w., Reg. CE 1881/2006).