



Istituto Zooprofilattico Sperimentale
dell'Umbria e delle Marche "Togo Rosati"

Determinazione mediante LC-HRMS di sostanze per- e poli-fluoroalchiliche (PFAS) in alimenti: sviluppo e validazione di metodi in conformità alla normativa europea

La ricerca chimica dell'IZSUM: stato dell'arte e prospettive future
Perugia, 18 marzo 2025

Carolina Barola

Collaboratore Professionale di Ricerca Sanitaria

UOC RS7- C7SVMETA

www.izsum.it



Il legame carbonio-fluoro conferisce a queste molecole proprietà peculiari; essi risultano essere resistenti ai maggiori processi di degradazione (idrolisi, fotolisi, termolisi, degradazione batterica) e di conseguenza particolarmente persistenti nell'ambiente, per questo motivo vengono definiti FOREVER CHEMICALS.

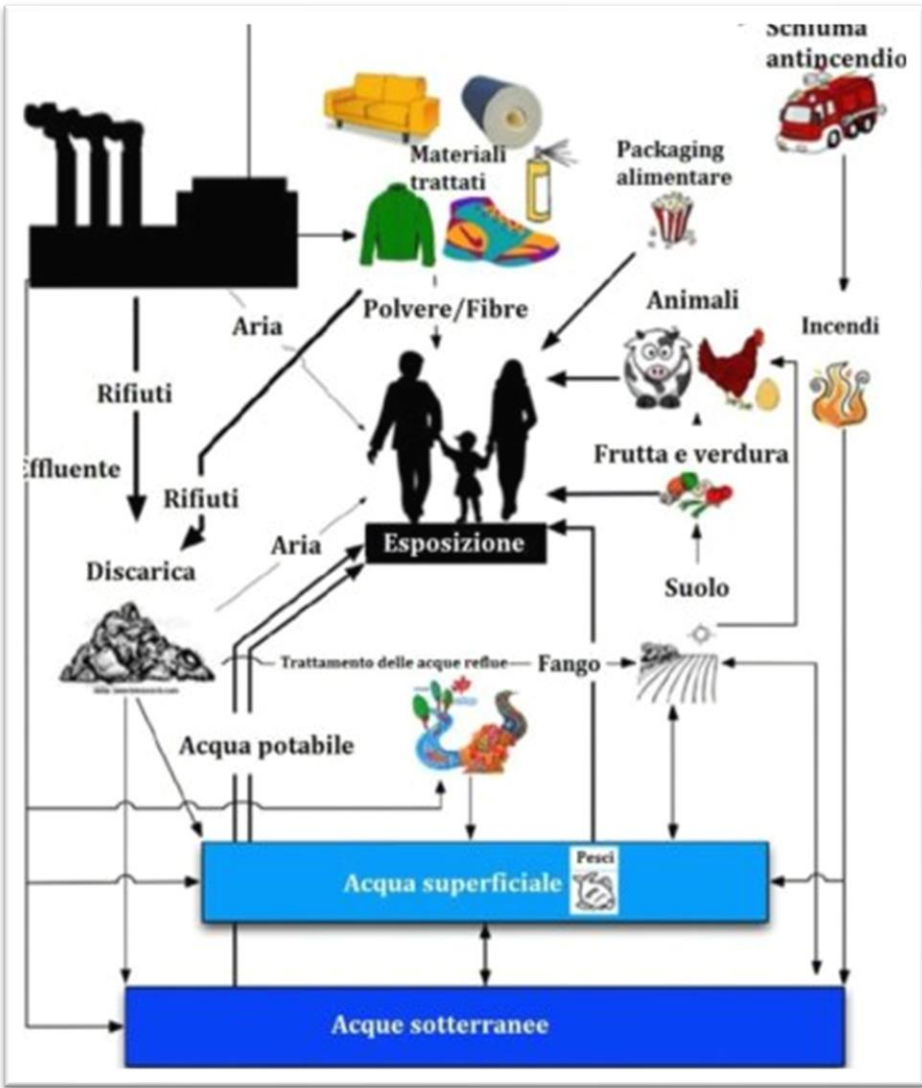
Queste sostanze sono ottimi repellenti per acqua e oli (idro-oleorepellenti) e proprio grazie alle loro caratteristiche e versatilità, sono state impiegate nei diversi settori industriali.



Nel **2018** l'OECD (organizzazione per la cooperazione e lo sviluppo economico) pubblica una lista contenente 4700 molecole classificate come PFAS. Ad oggi si parla di più di 10000 composti conosciuti.



Esposizione



International Agency for Research on Cancer

 World Health Organization

Group 1

Carcinogenic to humans

Sufficient evidence for cancer in animals and strong mechanistic evidence in exposed humans;



Epigenetics



Immunosuppression

Limited evidence for cancer in humans
(for renal cell carcinoma and testicular cancer)

Group 2B

Possibly carcinogenic
to humans

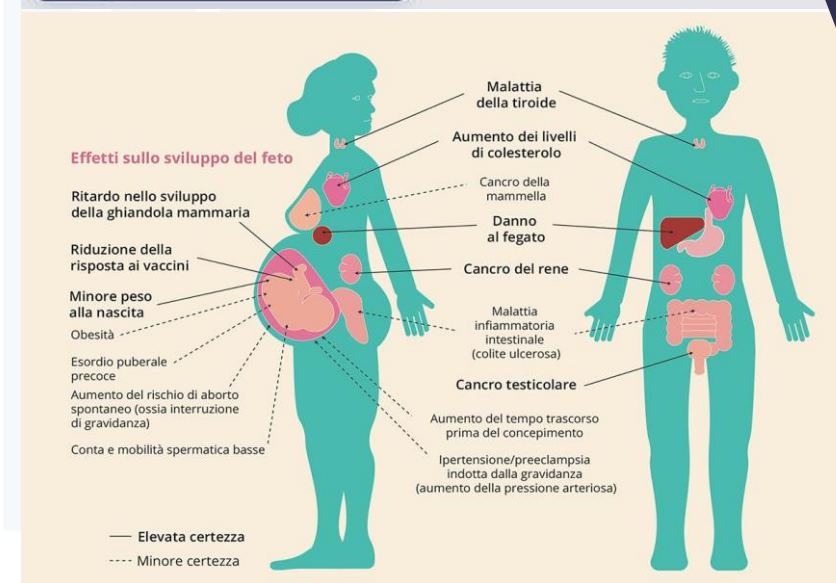
Strong mechanistic evidence in exposed humans:



Epigenetics



Immunosuppression



- ❖ Danno al sistema immunitario.
- ❖ Aumento del rischio di alcuni tumori.
- ❖ Effetti negativi sulla fertilità.
- ❖ Interferenza con gli ormoni e il metabolismo.

PFAS e salute umana 

Anno di emanazione	Tipologia documento	Titolo
2006	<u>REGOLAMENTO</u> (CE) DELLA COMMISSIONE 2006/1881	Definisce i tenori massimi di alcuni contaminanti nei prodotti alimentari
	<u>DIRETTIVA</u> (CE) DEL PARLAMENTO EUROPEO E DEL CONSIGLIO 2006/122	Modifica, per la trentesima volta, la direttiva 76/769/CEE del Consiglio concernente il ravvicinamento delle disposizioni legislative, regolamentari e amministrative degli Stati membri relative alle restrizioni in materia di immissione sul mercato e di uso di talune sostanze e preparati pericolosi (perfluorooottano sulfonati)
2010	<u>RACCOMANDAZIONE</u> DELLA COMMISSIONE 2010/161	Relativa al controllo della presenza di sostanze perfluoroalchiliche negli alimenti
	<u>REGOLAMENTO</u> (UE) DELLA COMMISSIONE 2010/757	Recante modifica del regolamento (CE) n. 850/2004 del Parlamento europeo e del Consiglio relativo agli inquinanti organici persistenti per quanto riguarda gli allegati I e III

3. Si raccomanda agli Stati membri di analizzare le sostanze perfluoroalchiliche al fine di individuare la presenza dei composti PFOS e PFOA e, se possibile, dei loro precursori, come perfluorooottano sulfonamide (PFOSA), N-etilperfluorooottano-sulfonamidetanolo (NEtFOSE) e 8:2 fluorotelomeri degli alcoli. Gli Stati membri dovranno, ove possibile, includere composti simili ai PFOS e PFOA, ma con catena di diversa lunghezza (C4 — C15), e tensioattivi a base di fosfati poliperfluoroalchilici (PAPS), come 8:2 diPAPS e 8:2 monoPAPS, al fine di stimare l'importanza della loro presenza negli alimenti.





Anno di emanazione	Tipologia documento	Titolo
2008	<u>OPINIONE EFSA</u>	Perfluorottano sulfonato (PFOS), acido perfluorottanoico (PFOA) e loro Sali: Parere scientifico del gruppo di esperti sui contaminanti presenti nella catena alimentare
2012	<u>REPORT EFSA</u>	Sostanze perfluoroalchiliche negli alimenti: presenza ed esposizione alimentare
2018	<u>OPINIONE EFSA</u>	Rischio per la salute umana connesso alla presenza di PFOS e PFOA negli alimenti
2020	<u>OPINIONE EFSA</u>	Rischio per la salute umana connesso alla presenza di Sostanze perfluoroalchiliche negli alimenti

*Negli ultimi 16 anni EFSA ha rivisto tre volte i **livelli tollerabili** di esposizione ai PFAS sulla base dei dati disponibili*

*«The most prominent PFAS for adults was PFOS (64%), followed by PFOA (16%), PFHxS (5,6%) and PFNA (5,1%)»
EFSA 2020 doi:10.2903/j.efsa.2020.6223*

Esposizione tollerata	PFOS	PFOA	PFNA	PFHxS
2008 (TDI ng/kg bw)	150	1500		
2018 (TWI ng/kg bw)	13	6		
2020 (TWI ng/kg bw)				4.4



 dal 2018 ad oggi...

PROGETTI DI RICERCA CORRENTE 2016

N. identificativo progetto: IZSSA 01/16 RC

Progetto presentato da:

ISTITUTO ZOOPROFILATTICO SPERIMENTALE
SARDEGNA

Area tematica: Sicurezza degli Alimenti

Titolo del progetto:

Sviluppo e validazione di metodi non- target/multi-target per la identificazione e determinazione di sostanze per- e poli-fluoroalchiliche (PFAS) nella catena alimentare, ai fini della valutazione del rischio.

Responsabile Scientifico: Cecilia Testa

Data inizio progetto: 01/02/2016

Data fine progetto: 30/04/2021

N°	Nome	Abbreviazione	IS	Massa esatta
1	Perfluoro-n-butanoic acid	PFBA	[13C4]PFBA	213,9865
2	Perfluoro-n-pentanoic acid	PFPeA	[13C5]PFPeA	263,9833
3	Perfluoro-n-hexanoic acid	PFHxA	[13C5]PFHxA	313,9801
4	Perfluoro-n-heptanoic acid	PFHpA	[13C4]PFHpA	363,9769
5	Acido perfluoro-n-ottanoico	PFOA	[13C8]PFOA	413,9737
6	Perfluoro-n-nonanoic acid	PFNA	[13C9]PFNA	463,9705
7	Perfluoro-n-decanoic acid	PFDA	[13C6]PFDA	513,9673
8	Perfluoro-n-undecanoic acid	PFUdA	[13C7]PFUdA	563,9641
9	Perfluoro-n-dodecanoic acid	PFDoA	[13C2]PFDoA	613,9609
10	Perfluoro-n-tridecanoic acid	PFTTrDA	[13C2]PFTTeDA	663,9577
11	Perfluoro-n-tetradecanoic acid	PFTeDA	[13C2]PFTeDA	713,9545
12	Perfluoro-n-hexadecanoic acid	PFHxDA	[13C2]PFHxDA	813,9482
13	Acido perfluoro-n-ottadecanoico	PFODA	[13C2]PFHxDA	913,9418
14	Potassio perfluoro-1-butanefosfonato	L-PFBS	[13C3]L-PFBS	337,9062
15	Sodio perfluoro-1-pentanesulfonato	L-PFPeS	[13C3]L-PFHxS	371,9290
16	Sodio perfluoro-1-esansulfonato	L-PFHxS	[13C3]L-PFHxS	421,9258
17	Sodio perfluoro-1-heptanesulfonato	L-PFHpS	[13C3]L-PFHxS	471,9232
18	Sodio perfluoro-1-octanesulfonato	L-PFOS	[13C3]L-PFOS	521,9194
19	Sodio perfluoro-1-nonanesulfonato	L-PFNS	[13C6]PFDA	571,9162
20	Sodio perfluoro-1-decansulfonato	L-PFDS	[13C7]PFUdA	621,9131
21	Sodio perfluoro-1-dodecansulfonato	L-PFDoS	[13C7]PFUdA	721,9067
22	Potassio 9-chlorohexadecafluoro-3-ossanonano-1-sulfonato	9Cl-PF3ONS	[13C7]PFUdA	569,8587
23	Potassio 11-chloroeicosafluoro-3-ossadecano-1-sulfonato	11Cl-PF3OUdS	[13C7]PFUdA	669,8524
24	Sodio 1H,1H,2H,2H-perfluorooctansulfonato	6:2FTS	[13C2]M2-6:2FTS	449,9571
25	Sodio 1H,1H,2H,2H-perfluorodecansulfonato	8:2FTS	[13C2]M2-8:2FTS	549,9507
26	3-Perfluoroetilpropanoico acido	FHpPA	d3-N-MeFOSAA	442,0050
27	2-Perfluoroottilethanoico acido	FOEA	[13C2]MFOEA	477,9862
28	2H-Perfluoro-2-decanoico acido	FOUEA	[13C2]MFOUEA	457,9799
29	Acido 2,3,3,3-tetrafluoro-2-(1,1,2,2,3,3,3 eptafluoropropossi)-propanoico	HFPO-DA (GenX)	[13C3]M3HFPO-DA	329,975
30	Sodio dodecafluoro-3H-4,8-dioxanonanoate	NaDONA	[13C5]PFHxA	399,9581
31	N-etilperfluoro-1-octanesulfonamidoacetico acido	N-EtFOSAA	d5-N-EtFOSAA	584,9903
32	N-metilperfluoro-1-octanesulfonamidoacetico acido	N-MeFOSAA	d3-N-MeFOSAA	570,9746
33	Potassio perfluoro-4-etilcicloesansulfonato	PFECBS	[13C5]PFHxA	499,8966



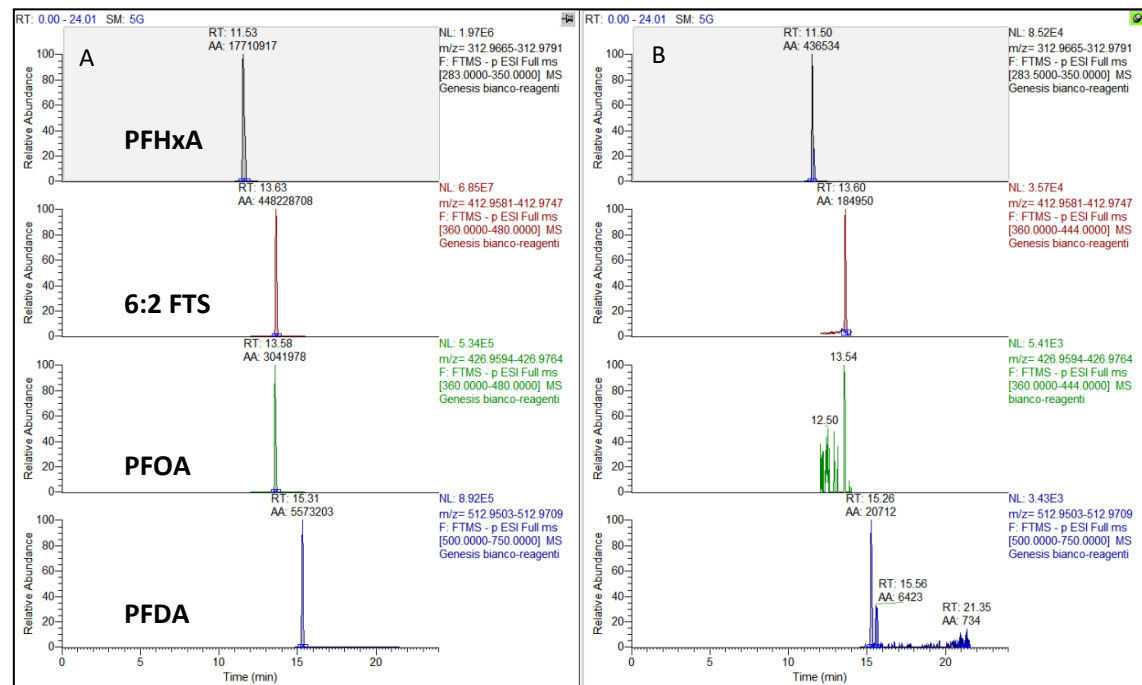
1. Contaminazione di laboratorio
2. Presenza e rilascio di PFAS nelle fasi mobili
3. Scelta della fase di ripresa adeguata al set di analiti
4. Perdite in fase di evaporazione
5. Fenomeno di soppressione ionica post-interfaccia



punti critici...contaminazione da laboratorio

Presenza di alcuni PFAS nelle colonnine SPE WAX utilizzate in fase di purificazione del campione. Le concentrazioni rilevate in diverse prove risultavano essere estremamente variabili, rappresentando quindi un problema ai fini della validazione e dell'analisi di campioni reali, soprattutto a bassi livelli. Per minimizzare il fenomeno, si è deciso di eseguire un lavaggio pre-analitico delle colonnine con il solvente di eluizione (idrossido di ammonio al 2% in MeOH).

Replica	Bianco reagenti (ppt)											
	PFPeA	L-PFBS	PFHxA	PFHpA	L-PFHxS	6:2FTS	PFOA	PFDA	L-PFDoS	PFTrDA	PFTeDA	PFHxDA
1	12	3	16	4	2	139	8	4	6	7	2	7
2	12	2	24	5	1	127	8	2	3	4	2	4
3	46	0	351	7	0	143	6168	124	0	1	0	0



Replica	Bianco reagenti dopo procedura lavaggio (ppt)											
	PFPeA	L-PFBS	PFHxA	PFHpA	L-PFHxS	6:2FTS	PFOA	PFDA	L-PFDoS	PFTrDA	PFTeDA	PFHxDA
1	8	0	18	1	0	0	3	1	1	0	0	0
2	11	1	22	4	0	0	6	3	2	3	0	0
3	11	0	20	3	0	6	5	1	0	2	1	0

Alcune SPE in commercio non risultavano adeguate a causa del rilascio di alcuni PFAS

2018

2025

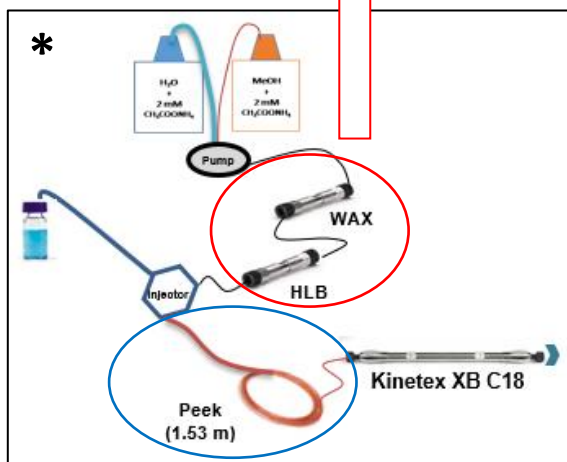
Ad oggi sono state messe in commercio SPE PFAS-free



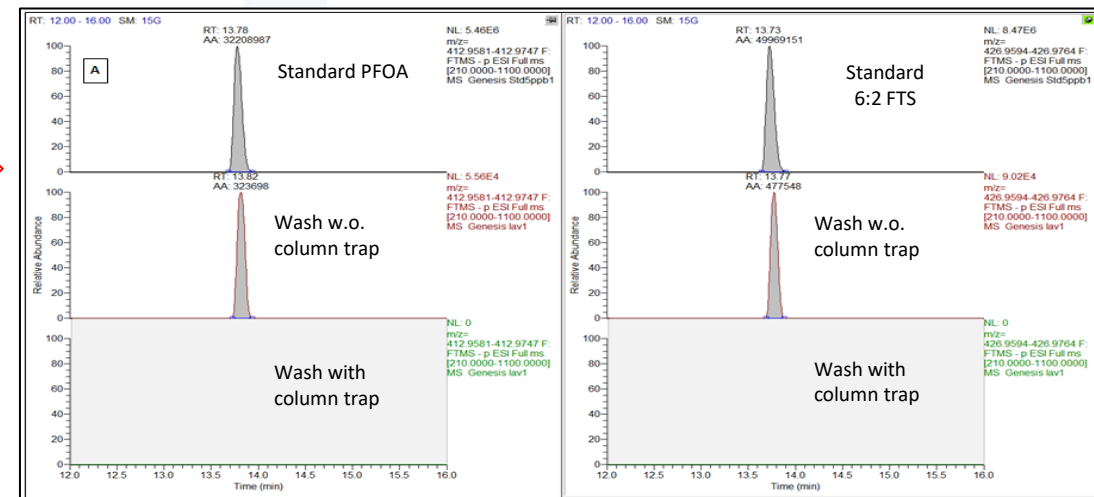
Cromatogramma rappresentativo di 4 analiti presenti nel bianco di laboratorio prima (A) e dopo la procedura di lavaggio (B)

punti critici...contaminazione strumentale

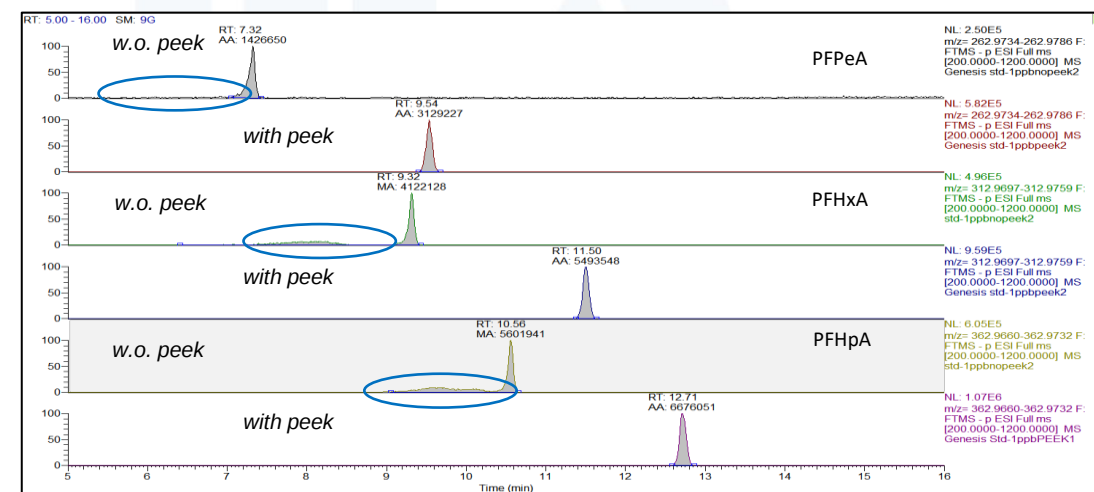
Presenza di PFOA e 6:2 FTS nelle fasi mobili prima dell'inserimento delle colonnine ritentive WAX e HLB (2.1 x 20 mm)



Miglioramento della forma del picco per gli analiti più polari e aumento del volume di iniezione 20 µL

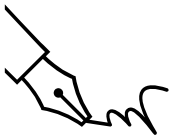


Fase di ripresa
MeOH/Ammonio Acetato 4mM 80/20 v/v



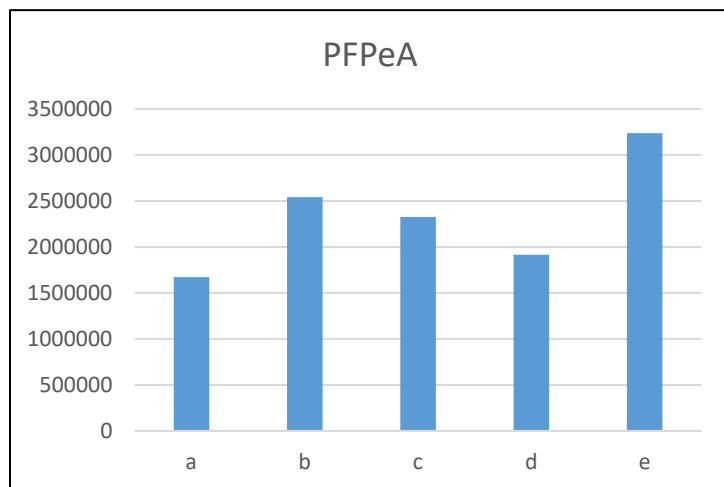
* Barola C. et al. Journal of Chromatography A, 1628, 461442, 2020 doi.org/10.1016/j.chroma.2020.461442





punti critici...perdita in fase di evaporazione & fenomeno di soppressione ionica post-interfaccia

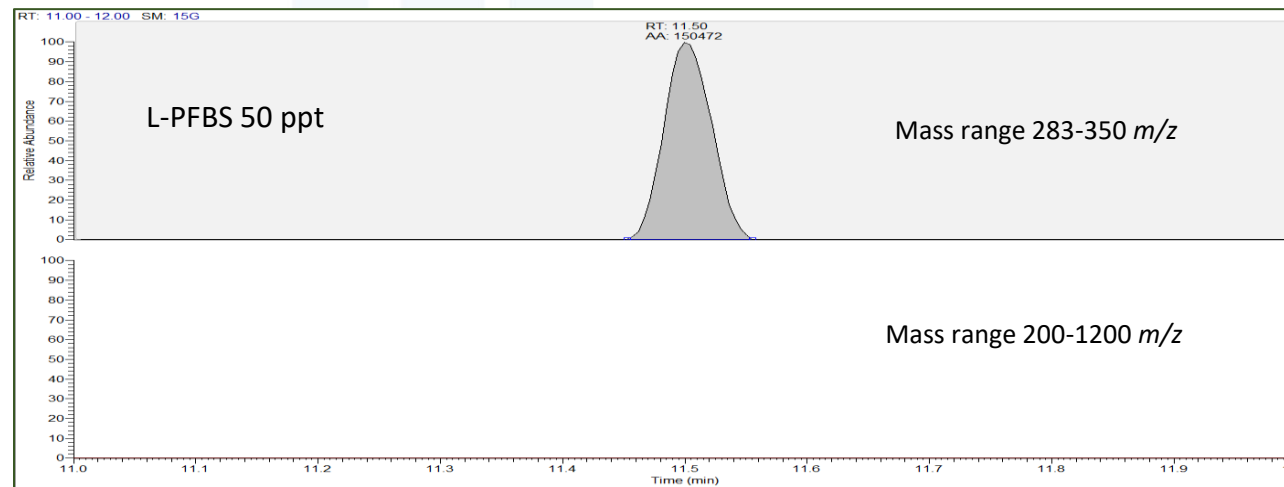
Prove di evaporazione



Sono stati testati 5 diversi keeper al fine di valutare l'eventuale perdita in fase di evaporazione.

Il N-nonano (e) è risultato il keeper migliore per gran parte degli analiti.

Soppressione ionica post-interfaccia



Metodo di acquisizione in Full Scan non idoneo per ottenere i migliori LOD possibili. Utilizzando intervalli di acquisizione ristretti ottimizzati per ciascun analita o gruppo di analiti, abbiamo evitato il fenomeno di soppressione ionica post-interfaccia ^{a-b} aumentando la sensibilità strumentale.

^a Kaufmann et al. Rapid Commun Mass Spectrom. 2010 Jul 30;24(14):2162-70. doi: 10.1002/rcm.4615.

^b Moretti et al. Journal of Mass Spectrometry 2016, 51, 792–804 doi:10.1002/jms.3834.

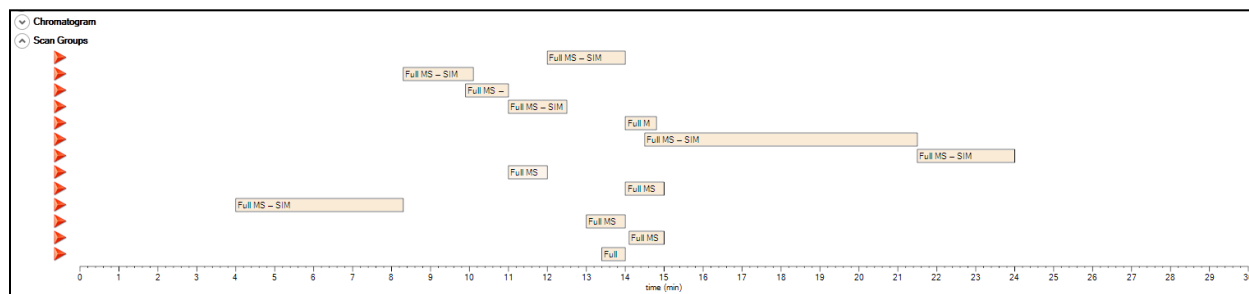


sviluppo metodo strumentale LC-HRMS

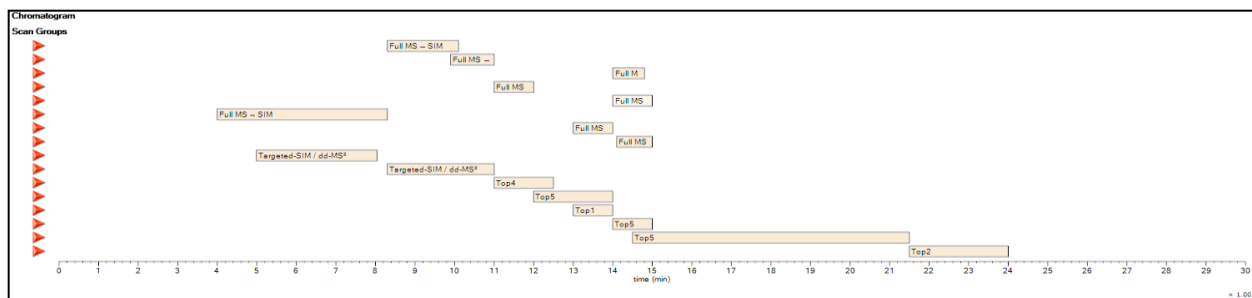
L'analisi strumentale viene effettuata tramite cromatografia liquida interfacciata ad un analizzatore di spettrometria di massa ibrido **in alta risoluzione (LC-Q-Exactive, ThermoScientific)** con acquisizione in modalità negativa (ESI-).

Metodi di acquisizione:

✓ Full scan- SIM (analisi quantitativa)



✓ Data dependent MS/MS scan (analisi qualitativa: 2 ioni*)



La messa a punto di quest'ultimo e' volta all'utilizzo di un singolo metodo che possa essere utilizzato sia in caso di "screening" che di "conferma". * **SANTE/11813/2017**

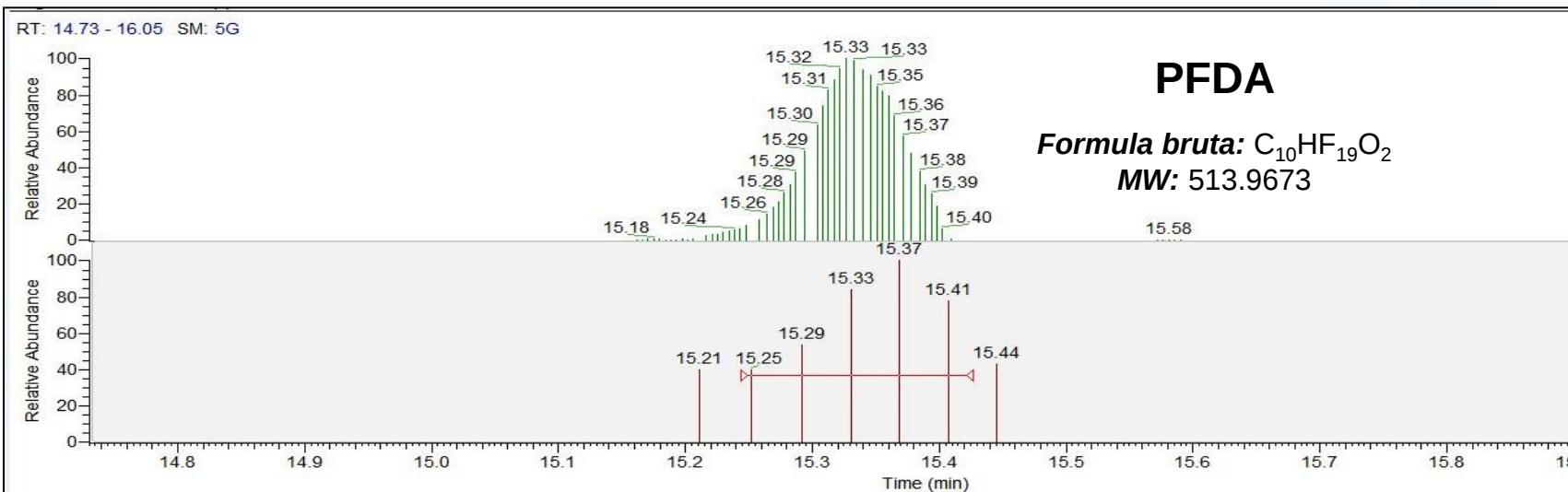
Dionex Chromatography
Q Exactive - Orbitrap MS

Method editor — Inclusion List

	Mass [m/z]	Formula [M]	Species	CS [z]	Polarity	Start [min]	End [min]	(N)CE	MSX ID
1	212.97920				Negative	5.00	8.00		PFBA
2	262.97600				Negative	9.40	10.00		PFPeA
3	284.97690				Negative	11.80	12.10		HFPO-DA
4	298.94300				Negative	10.00	10.50		L-PFBS
5	312.97280				Negative	11.40	11.80		PFHxA
6	328.96770				Negative	11.80	12.10		HFPO-DA
7	348.93980				Negative	11.60	12.00		L-PFPeS
8	362.96960				Negative	12.60	12.90		PFHpA
9	376.96890				Negative	12.70	13.10		NaDONA
10	398.93660				Negative	12.60	13.00		L-PFHxS
11	412.96640				Negative	13.50	13.80		PFOA
12	426.96790				Negative	13.40	13.70		6:2FTS
13	440.99770				Negative	14.40	14.90		FHpPA
14	448.93340				Negative	13.30	14.90		L-PFHpS
15	456.97270				Negative	14.50	14.80		FOUEA
16	460.93340				Negative	13.30	13.80		PFECHS
17	462.96320				Negative	14.20	14.60		PFNA
18	476.97890				Negative	14.50	14.80		FOEA
19	498.93020				Negative	14.00	14.60		L-PFOS
20	512.96000				Negative	15.10	15.60		PFDA
21	526.96150				Negative	15.10	15.60		8:2FTS
22	530.89560				Negative	14.70	15.20		9CI-PF3ONS
23	542.96590				Negative	14.60	15.60		8:2PAP
24	548.92700				Negative	15.10	15.60		L-PFNS
25	562.95690				Negative	16.60	17.20		PFUdA
26	569.96730				Negative	15.80	16.40		N-MeFOSAA
27	583.98300				Negative	16.70	17.40		N-EtFOSAA
28	598.92380				Negative	16.50	17.10		L-PFDS
29	612.95370				Negative	18.80	19.40		PFDoA
30	630.88920				Negative	17.70	18.60		11CI-PF3OUdS
31	662.95050				Negative	20.10	20.50		PFTdA
32	698.91740				Negative	20.00	20.40		L-PFDoS
33	712.94730				Negative	20.80	21.20		PFTeDA
34	812.94090				Negative	21.70	22.20		PFHxDA
35	912.93450				Negative	22.40	22.90		PFODA



riconoscimento qualitativo... accuratezza di massa



MS detector/Characteristics	Typical systems (examples)	Acquisition	Requirements for identification	
			minimum number of ions	other
Unit mass resolution	Single MS quadrupole, ion trap, TOF	full scan, limited m/z range, SIM	3 ions	S/N $\geq 3^{(a)}$ Analyte peaks from both product ions in the extracted ion chromatograms must fully overlap.
	MS/MS triple quadrupole, ion trap, Q-trap, Q-TOF, Q-Orbitrap	selected or multiple reaction monitoring (SRM, MRM), mass resolution for precursor-ion isolation equal to or better than unit mass resolution	2 product ions	Ion ratio from sample extracts should be within ±30% (relative) of average of calibration standards from same sequence S/N $\geq 3^{(a)}$
Accurate mass measurement	High resolution MS: (Q-)TOF (Q-)Orbitrap FT-ICR-MS sector MS	full scan, limited m/z range, SIM, fragmentation with or without precursor-ion selection, or combinations thereof	2 ions with mass accuracy $\leq 5 \text{ ppm}^{(a, b, c)}$	Analyte peaks from precursor and/or product ion(s) in the extracted ion chromatograms must fully overlap. Ion ratio: see D12

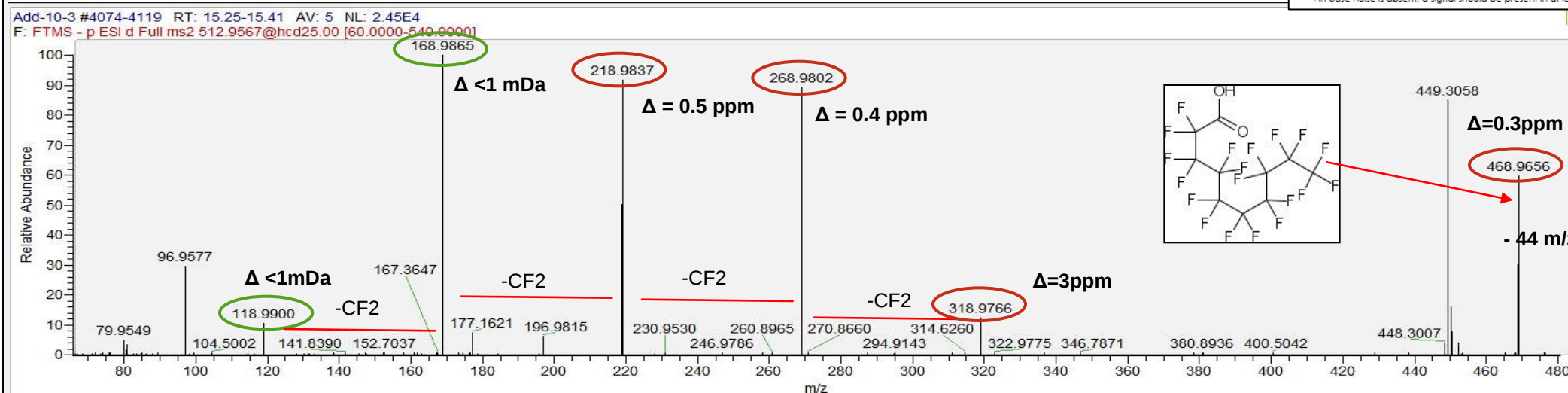
^(a) preferably including the molecular ion, (de)protonated molecule or adduct ion
^(b) including at least one fragment ion
^(c) $\leq 1 \text{ mDa}$ for $m/z < 200$
 In case noise is absent, a signal should be present in at least 5 subsequent scans

SANTE/11813/2017

Accurate mass measurement	High resolution MS: (Q-)TOF (Q-)Orbitrap	full scan, limited m/z range, SIM, fragmentation with or without precursor-ion selection, or combinations thereof	2 ions with mass accuracy $\leq 5 \text{ ppm}^{(a, b, c)}$	Analyte peaks from precursor and/or product ion(s) in the extracted ion chromatograms must fully overlap. Ion ratio: see D12
---------------------------	--	---	--	---

^(a) preferably including the molecular ion, (de)protonated molecule or adduct ion
^(b) including at least one fragment ion
^(c) $\leq 1 \text{ mDa}$ for $m/z < 200$
 In case noise is absent, a signal should be present in at least 5 subsequent scans

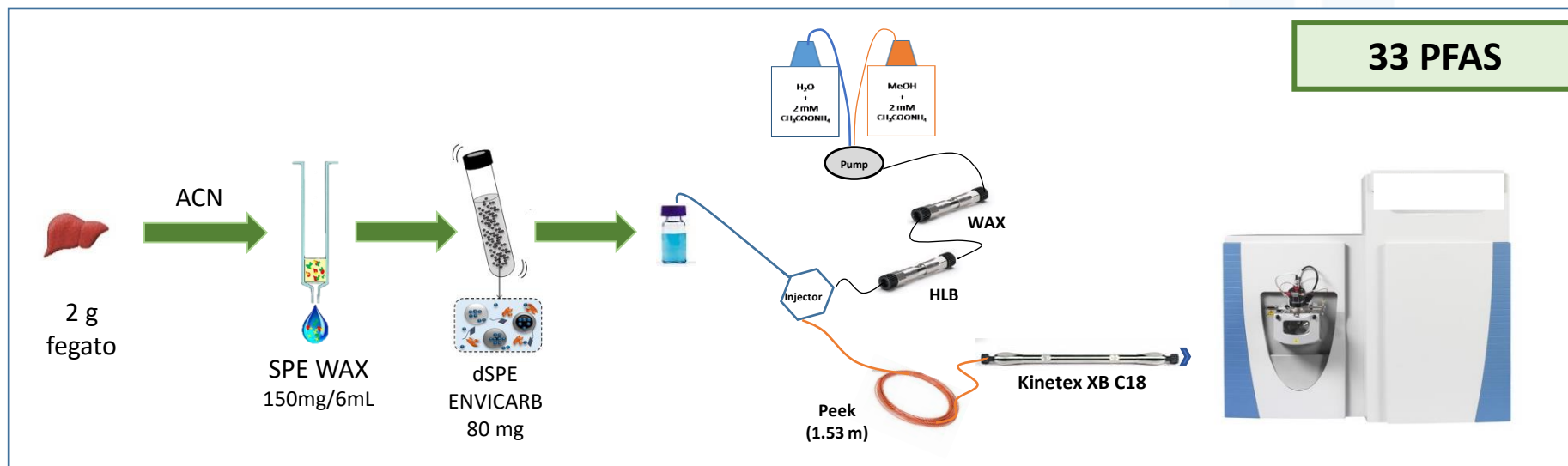
SANTE/11312/2021



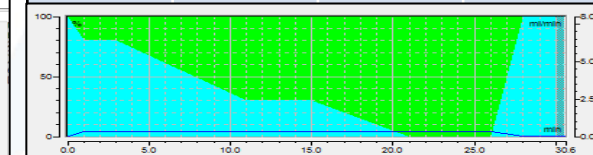
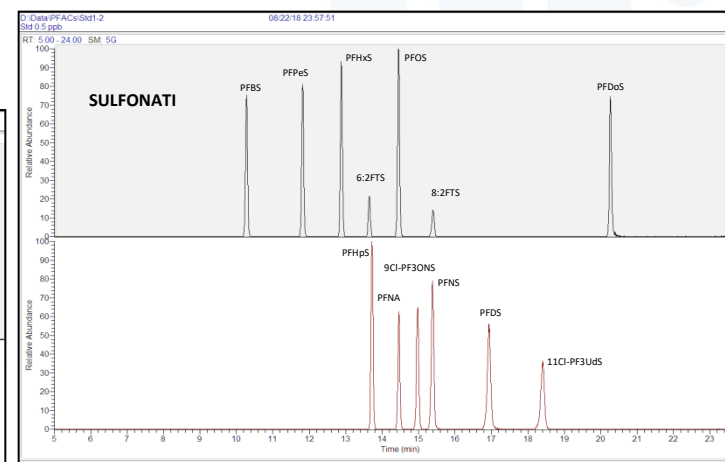
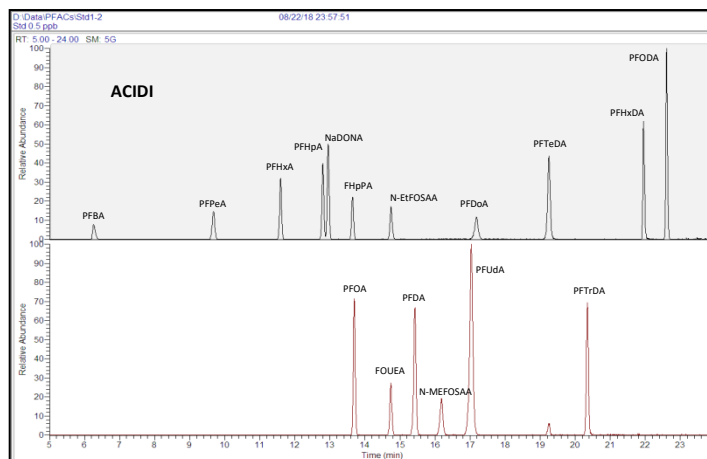
Accuratezza calcolata rispetto alle masse accurate dei frammenti misurate nello standard in matrice



sviluppo del metodo analitico... schema preparativa



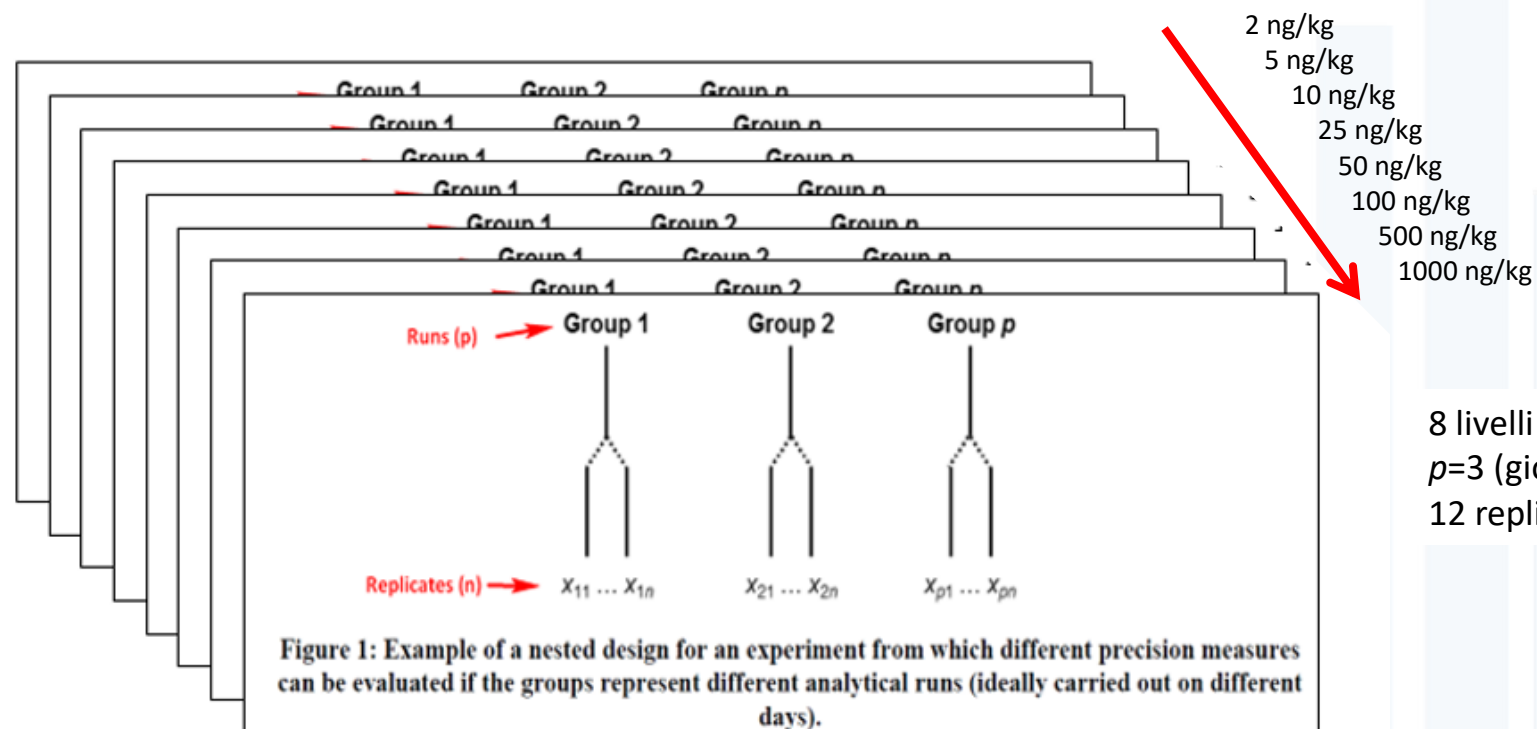
Time (min.)	% H ₂ O + 2mM A.A.	% MeOH + 2mM A.A.	Flow (mL/min.)
0	100	0	0.050
1	80	20	0.300
3	80	20	0.300
11	30	70	0.300
15	30	70	0.300
21	0	100	0.300
26	0	100	0.300
28	100	0	0.050
30	100	0	0.050



LC-HRMS (Q-EXACTIVE Thermo)
(Cromatografia Liquida – Spettrometria di Massa alta risoluzione)



schema di validazione



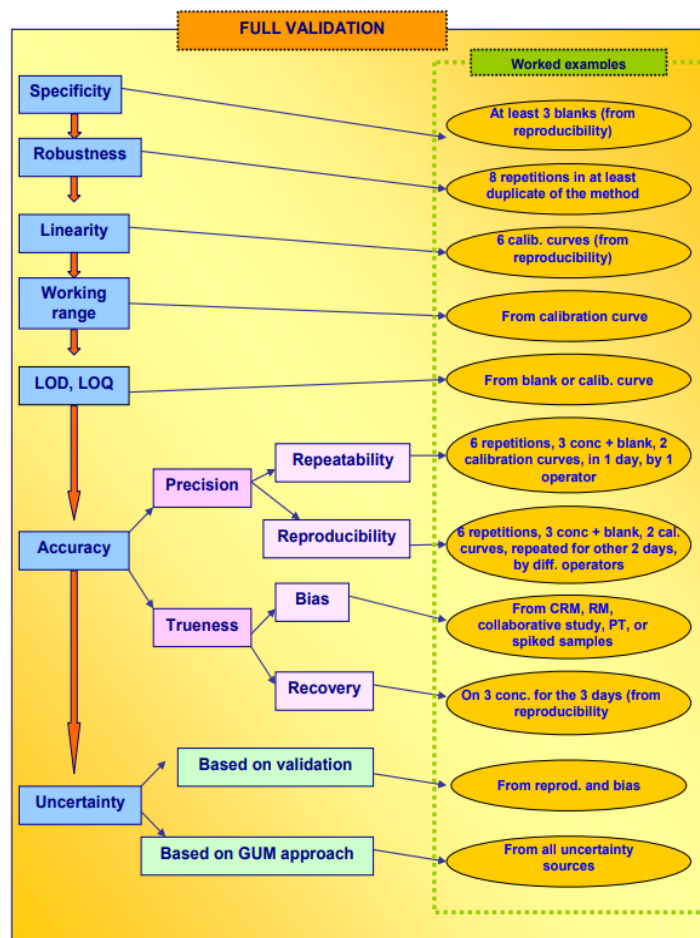
8 livelli di concentrazione (2-1000 ng/kg)
 $p=3$ (giornate); $n=4$ (replicati per giornata)
12 replicati per ogni concentrazione → 96 esperimenti

Eurachem. *Planning and Reporting Method Validation Studies. Supplement to Eurachem Guide on the Fitness for Purpose of Analytical Methods*. 1st Edition, 2019. www.eurachem.org





parametri di validazione valutati



Recuperi apparenti: 94% - 126%

LOQ: 0,002-0,100 µg/kg ad eccezione del Gen X 0,500 µg/kg

N°	Nome	Abbreviazione	LOQ µg/kg
1	Perfluoro-n-butanoic acid	PFBA	0.100
2	Perfluoro-n-pentanoic acid	PFPeA	0.045
3	Perfluoro-n-hexanoic acid	PFHxA	0.055
4	Perfluoro-n-heptanoic acid	PFHpA	0.020
5	Acido perfluoro-n-ottanoico	PFOA	0.005
6	Perfluoro-n-nonanoic acid	PFNA	0.002
7	Perfluoro-n-decanoic acid	PFDA	0.015
8	Perfluoro-n-undecanoic acid	PFUdA	0.100
9	Perfluoro-n-dodecanoic acid	PFDoA	0.010
10	Perfluoro-n-tridecanoic acid	PFTTrDA	0.005
11	Perfluoro-n-tetradecanoic acid	PFTeDA	0.005
12	Perfluoro-n-hexadecanoic acid	PFHxDA	0.002
13	Acido perfluoro-n-ottadecanoico	PFODA	0.010
14	Potassio perfluoro-1-butanefosfonato	L-PFBS	0.015
15	Sodio perfluoro-1-pentanefosfonato	L-PFPeS	0.002
16	Sodio perfluoro-1-esanfosfonato	L-PFHxS	0.002
17	Sodio perfluoro-1-heptanfosfonato	L-PFHpS	0.002
18	Sodio perfluoro-1-octanfosfonato	L-PFOS	0.002
19	Sodio perfluoro-1-nonanfosfonato	L-PFNs	0.002
20	Sodio perfluoro-1-decanfosfonato	L-PFDS	0.002
21	Sodio perfluoro-1-dodecanfosfonato	L-PFDoS	0.002
22	Potassio 9-cloroesadecafluoro-3-ossanonano-1-sulfonato	9Cl-PF3ONS	0.002
23	Potassio 11-cloroesadecafluoro-3-ossadecano-1-sulfonato	11Cl-PF3OUdS	0.002
24	Sodio 1H,1H,2H,2H-perfluorooctansulfonato	6:2FTS	0.090
25	Sodio 1H,1H,2H,2H-perfluorodecansulfonato	8:2FTS	0.020
26	3-Perfluoroetilpropanoico acido	FHpPA	0.010
27	2-Perfluorooctilethanoico acido	FOEA	0.050
28	2H-Perfluoro-2-decanoico acido	FOUEA	0.002
29	Acido 2,3,3,3-tetrafluoro-2-(1,1,2,2,3,3,3 eptafluoropropossi)-propanoico	HFPO-DA (GenX)	0.500
30	Sodio dodecafluoro-3H-4,8-diossazonanoato	NaDONA	0.002
31	N-etilperfluoro-1-octanfossamidacetico acido	N-EtFOSAA	0.002
32	N-metilperfluoro-1-octanfossamidacetico acido	N-MeFOSAA	0.002
33	Potassio perfluoro-4-etilcicloesansulfonato	PFECHS	0.002





Relazione finale

IZS UM 06/20 RC

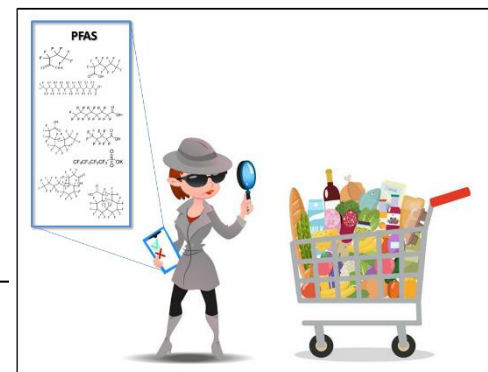
PROGETTO PRESENTATO DA:

ISTITUTO ZOOPROFILATTICO SPERIMENTALE
DELL'UMBRIA E DELLE MARCHE "TOGO ROSATI"

**DETERMINAZIONE DI PFAS INDICATORI DI CONTAMINAZIONE NEGLI ALIMENTI
MEDIANTE CROMATOGRAPHIA LIQUIDA INTERFACCIATA ALLA SPETTROMETRIA DI
MASSA**

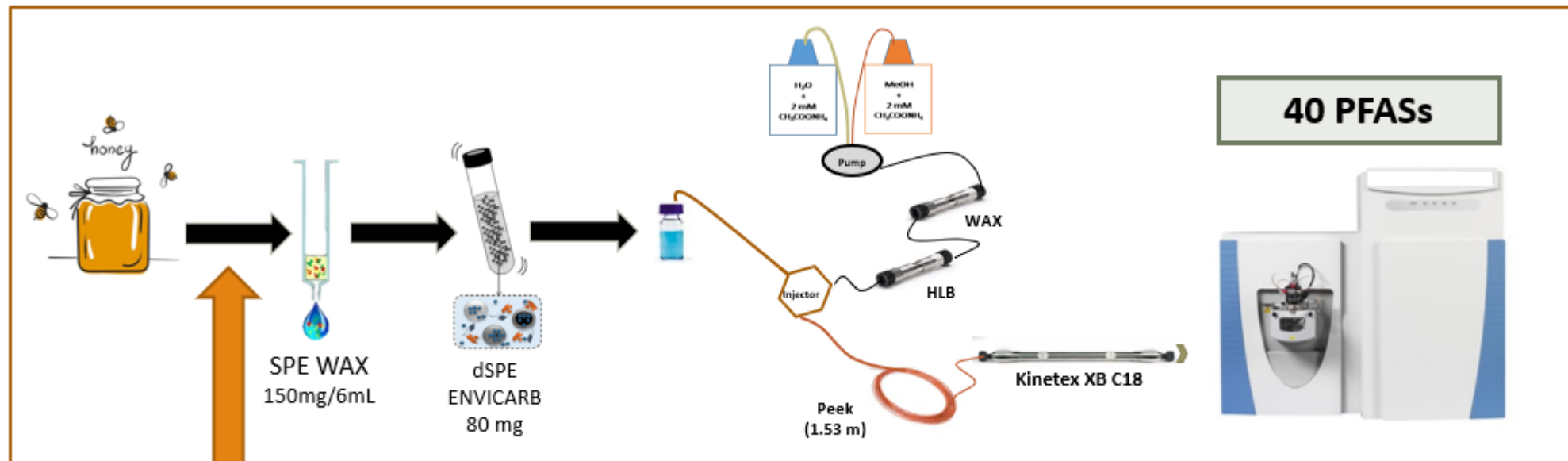
Responsabile Scientifico: ROBERTA GALARINI
Tel. 075.343272
Email r.galarini@izsum.it

Data inizio progetto 16/12/2020 - Data fine progetto 15/06/2023
data stampa relazione: 13/06/2023

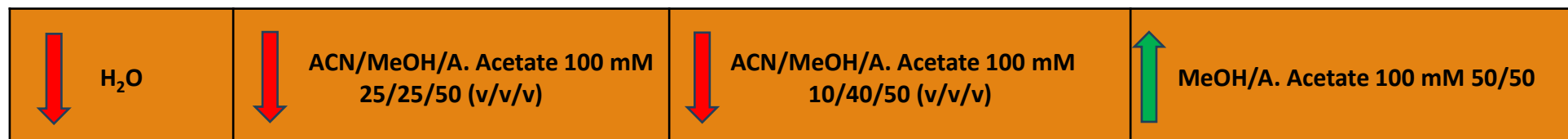




ottimizzazione del metodo nel miele

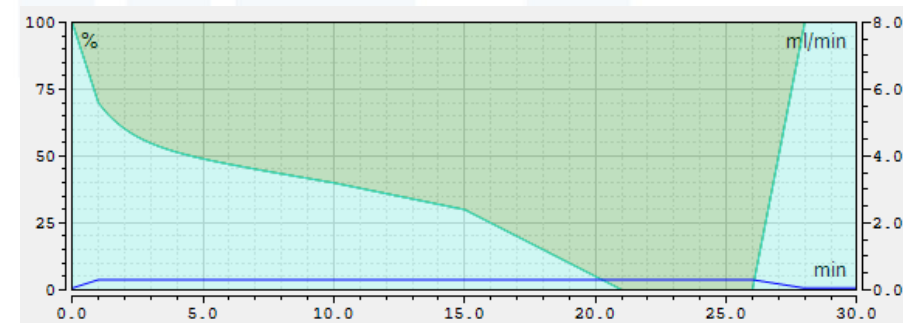


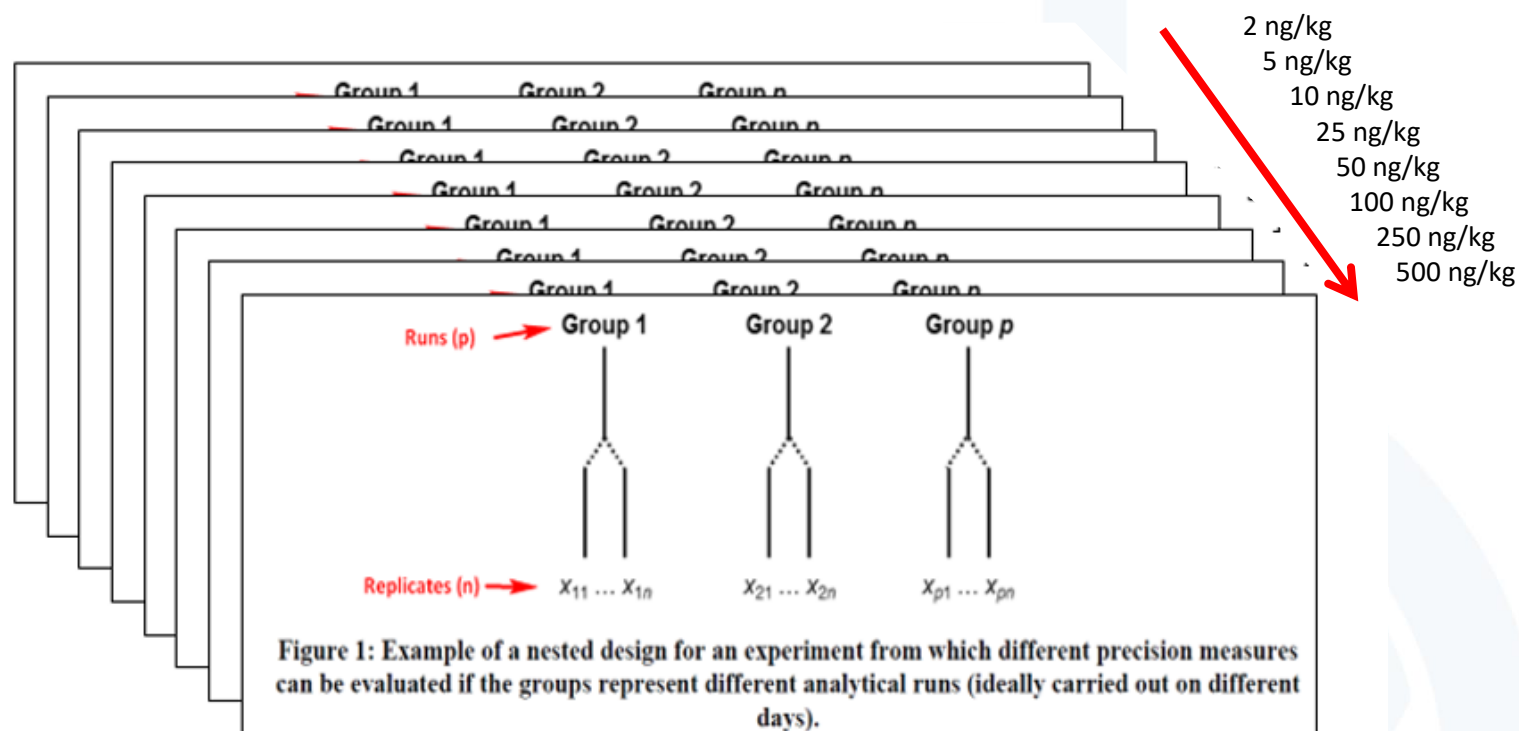
Ottimizzazione
dell'estrazione



Ottimizzazione della
cromatografia

Time (min.)	% H ₂ O + 5mM A.A.	% MeOH + 5mM A.A.	Flow (mL/min.)
0	100	0	0.050
1	80	20	0.300
3	80	20	0.300
11	30	70	0.300
15	30	70	0.300
21	0	100	0.300
26	0	100	0.300
28	100	0	0.050
30	100	0	0.050





8 livelli di concentrazione (2-500 ng/kg)
 $p=3$ (giornate); $n=4$ (replicati per giornata)
 12 replicati per ogni concentrazione → 96 esperimenti

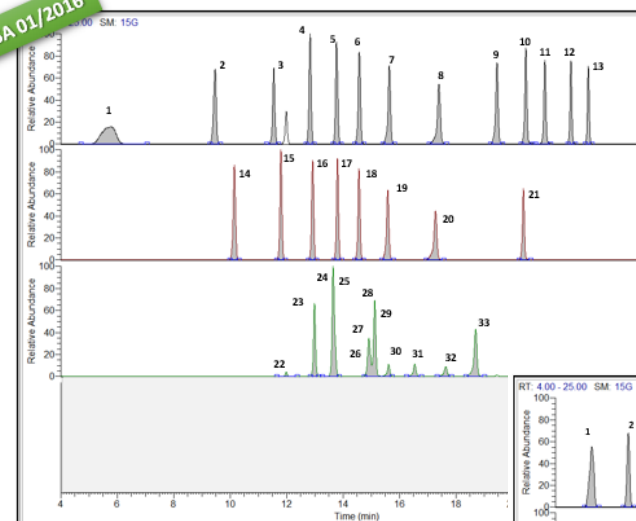


N°	Nome	Abbreviazione	LOQ miele µg/kg
1	Perfluoro-n-butanoic acid	PFBA	0.25
2	Perfluoro-n-pentanoic acid	PFPeA	0.01
3	Perfluoro-n-hexanoic acid	PFHxA	0.025
4	Perfluoro-n-heptanoic acid	PFHpA	0.01
5	Acido perfluoro-n-ottanoico	PFOA	0.01
6	Perfluoro-n-nonanoic acid	PFNA	0.002
7	Perfluoro-n-decanoic acid	PFDA	0.002
8	Perfluoro-n-undecanoic acid	PFUDa	0.002
9	Perfluoro-n-dodecanoic acid	PFDoA	0.002
10	Perfluoro-n-tridecanoic acid	PFTrDA	0.002
11	Perfluoro-n-tetradecanoic acid	PFTeDA	0.002
12	Perfluoro-n-hexadecanoic acid	PFHxDA	0.002
13	Acido perfluoro-n-ottadecanoico	PFODA	0.002
14	Potassio perfluoro-1-butanefosfonato	L-PFBS	0.01
15	Sodio perfluoro-1-pentanesulfonato	L-PFPeS	0.01
16	Sodio perfluoro-1-esansulfonato	L-PFHxS	0.002
17	Sodio perfluoro-1-heptanesulfonato	L-PFHpS	0.005
18	Sodio perfluoro-1-octanesulfonato	L-PFOS	0.002
19	Sodio perfluoro-1-nonanesulfonato	L-PFNS	0.002
20	Sodio perfluoro-1-decansulfonato	L-PFDS	0.002
21	Sodio perfluoro-1-dodecansulfonato	L-PFDoS	0.002
22	Potassio 9-clorohexadecafluoro-3-ossanone-1-sulfonato	9Cl-PF3ONS	0.002
23	Potassio 11-cloroeicosafluoro-3-ossadecan-1-sulfonato	11Cl-PF3OUDS	0.002
24	Sodio 1H,1H,2H,2H-perfluorooctansulfonato	6:2FTS	0.002
25	Sodio 1H,1H,2H,2H-perfluorodecansulfonato	8:2FTS	0.002
26	3-Perfluorooctilpropanoico acido	FHpPA	0.025
27	2-Perfluorooctilethanoico acido	FOEA	0.1
28	2H-Perfluoro-2-decanoico acido	FOUEA	0.002
29	Acido 2,3,3,3-tetrafluoro-2-(1,1,2,2,3,3,3 eptafluoropropossi)-propanoico	HFPO-DA (GenX)	0.25
30	Sodio dodecafluoro-3H,4,8-dioxananoato	NaDONA	0.005
31	N-etilperfluoro-1-octanesulfonamidoacetico acido	N-EtFOSAA	0.002
32	N-metilperfluoro-1-octanesulfonamidoacetico acido	N-MeFOSAA	0.002
33	Potassio perfluoro-4-etilcicloesansulfonato	PFECHS	0.01

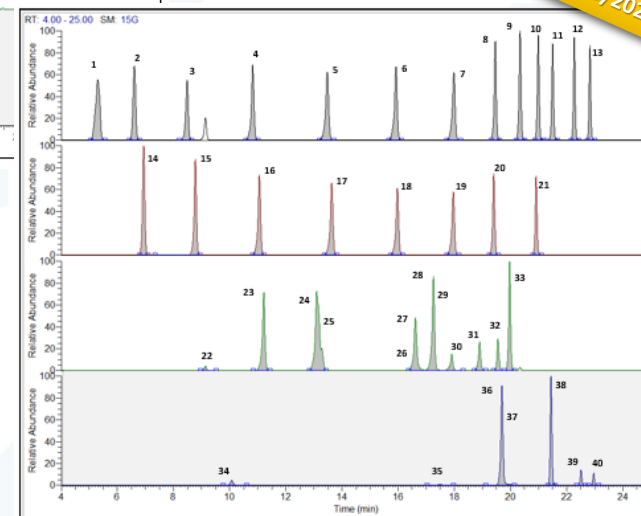
N°	Nome	Abbreviazione	LOQ miele µg/kg
34	Perfluorooctilfosfonico acido	PFOPA	0.01
35	Sodio 1H,1H,2H,2H-perfluorodecylfosfato	8:2 PAP	0.25
36	Sodio bis(1H, 1H, 2H, 2H-perfluorodecyl)fosfato	8:2diPAP	0.005
37	Sodio [2-(N-etilperfluorooctano-1-sulfonamido)etil] fosfato	SAmPAP	0.005
38	Sodio bis-[2-(N-etilperfluorooctano-1-sulfonamido)etil] fosfato	diSAmPAP	0.005
39	Sodio perfluorohesilperfluoro-octilfosfonato	6:8PFPI	0.01
40	Perfluoro-1-octanesulfonamido	FOSA	0.005

RC 006/2020

RC IZSSA 01/2016



RC 006/2020



RC IZSSA 01/2016

Guidance Document on Analytical Parameters for the Determination of Per- and Polyfluoroalkyl Substances (PFAS) in Food and Feed

Version 1.2

11 May 2022

2022

Table 6: Validation parameters and criteria

Parameter	Description	Criterion	Cross ref.
Linearity	Linearity check from five calibration levels	Deviation of back-calculated concentration from true concentration $\leq 20\%$	-
Trueness	Average apparent recovery for each fortification level tested; expressed as 'bias'	Table 3	Section 2.1
Precision	Within-laboratory reproducibility for each fortification level tested	Table 3	Section 2.1
LOQ	Lowest fortification level meeting the identification requirements and analytical performance criteria for recovery and precision	-	Section 2.1.4
Ion ratio, retention time	Check compliance with identification requirements for MS techniques	Table 9	Section 2.4.3

Guidance Document on Analytical Parameters for the Determination of Per- and Polyfluoroalkyl Substances (PFAS) in Food and Feed

Version 2.0

10 September 2024

Aggiornata nel
2024

2.1.4: LOQ

Table 4: Required limits of quantification (LOQ) in $\mu\text{g/kg}$ w.w. for the four individual PFAS (PFOS, PFOA, PFNA, PFHxS) [26]

Matrix	PFOS	PFOA	PFNA	PFHxS	other PFAS ^{d)}
Eggs, crustaceans and molluscs	≤ 0.30	≤ 0.30	≤ 0.30	≤ 0.30	
Fish meat and meat of terrestrial animals	≤ 0.10	≤ 0.10	≤ 0.10	≤ 0.10	
Edible offal of terrestrial animals	≤ 0.50	≤ 0.50	≤ 0.50	≤ 0.50	
Fish oil	≤ 0.50	≤ 0.50	≤ 0.50	≤ 0.50	
Fruits	≤ 0.010	≤ 0.010	≤ 0.005	≤ 0.015	
Vegetables (except wild fungi)	≤ 0.010	≤ 0.010	≤ 0.005	≤ 0.015	
Wild fungi	≤ 1.5	≤ 0.010	≤ 0.005	≤ 0.015	
Food for infants and young children sold as ready to eat	≤ 0.010	≤ 0.010	≤ 0.005	≤ 0.015	
Milk	≤ 0.020	≤ 0.010	≤ 0.050	≤ 0.060	
Feed ^{d)}					

^{d)} Will be specified when regulations/decisions on elevated levels are established.

Table 3: Typical validation parameters and performance characteristics for PFAS analysed in samples for compliance testing of maximum levels or monitoring purposes

Parameter	Compliance testing of maximum levels ^{a)}	Monitoring purposes ^{b)}
Trueness ^{c)}	$\pm 20\%$	$\pm 35\%$
Within-laboratory reproducibility (intermediate precision)	$\leq 20\%$	$\leq 25\%$
LOQ	See section 2.1.4, Table 4 and Table 5	

^{a)} only for substance/matrix combinations with legally required maximum levels

^{b)} for substance/matrix combinations without legally required maximum levels and for substance/matrix combinations with legally required maximum levels in order to achieve the LOQs in Table 4 and Table 5 for collecting occurrence data

^{c)} or expressed as apparent recovery (80-120% for compliance testing and 65-135% for monitoring purposes)



Il metodo è adatto allo scopo (PFOS)?

Parameter	Trueness (%)	Precision ^a (%)	Expanded measurement uncertainty (%)	LOQ ^c (ng/kg w.w.)
Required	80-120	≤ 20	≤ 44 ^b	≤ 10
Obtained	86-119	≤ 15	< 25	2.7
Fit for purpose?	✓	✓	✓	✓

^aWithin laboratory reproducibility (CV); ^bBased on Thompson-Horwitz equation; ^cMinimum required LOQ among the listed matrices (Table 4 of Guidance Document);

Selettività

analisi dei campioni bianchi (studio di validazione) e conformità ai criteri di identificazione vigenti



Arancio



Melata



Acacia



Millefiori



Castagno

Criteri di identificazione

Table 9 (continued)

(U)HPLC-HRMS	Accurate mass resolution
Typical systems (examples)	High resolution MS: (Q-)TOF, (Q-)Orbitrap
Mass resolution	≥ 10 000 at 10 % valley (for the entire mass range)
Acquisition	Full scan, all ion fragmentation (AIF)/MS ^E , (variable) data-independent acquisition (vDIA)
Minimum number of ions	2 ions with mass accuracy ≤ 5 ppm ^{f), g)}
Signal to noise (S/N) ratio	≥ 3
Retention time (RT)	The ratio of the chromatographic RT of the analyte to that of the IS (i.e. relative RT of the analyte) shall correspond to that of the calibration standard with a maximum deviation of 1 %.
Other	Analyte peaks from precursor and/or product ion(s) in the extracted ion chromatograms must fully overlap.

^{e)} applying identical MS/MS conditions, in particular collision energy and collision gas pressure, for each transition of an analyte

^{f)} preferably including the molecular ion, (de)protonated molecule or adduct ion and at least one fragment ion

^{g)} <1 mDa for m/z <200





Anno di emanazione	Tipologia documento	Titolo
2022	<u>REGOLAMENTO</u> DI ESECUZIONE (UE) DELLA COMMISSIONE 2022/1428	Stabilisce metodi di campionamento e di analisi per il controllo delle sostanze perfluoroalchiliche in alcuni prodotti alimentari
	<u>RACCOMANDAZIONE</u> (UE) DELLA COMMISSIONE 2022/1431	Relativa al monitoraggio delle sostanze perfluoroalchiliche negli alimenti
	<u>REGOLAMENTO</u> (UE) DELLA COMMISSIONE 2022/2388	Modifica il regolamento (CE) n. 1881/2006 per quanto riguarda i tenori massimi di sostanze perfluoroalchiliche in alcuni prodotti alimentari
2023	REGOLAMENTO (UE) DELLA COMMISSIONE 2023/915	Relativo ai tenori massimi di alcuni contaminanti negli alimenti e che abroga il regolamento (CE) n. 1881/2006

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

µg/kg	Carne bovina, suina e pollame	Carne ovina	Frattaglie di bovini, ovini, suini e pollame	Carne di selvaggina ad eccezione della carne di orso	Frattaglie di selvaggina, ad eccezione delle frattaglie di orso	Muscolo di pesce ad alto consumo o destinati a prodotti per l'infanzia	Muscolo di pesce a medio consumo	Muscolo di pesce a ridotto consumo	Crostacei e molluschi bivalvi	Uova
PFOS	0.3	1	6	5	50	2	7	35	3	1
PFOA	0.8	0.2	0.7	3.5	25	0.2	1	8	0.7	0.3
PFNA	0.2	0.2	0.4	1.5	45	0.5	2.5	8	1	0.7
PFHxS	0.2	0.2	0.5	0.6	3	0.2	0.2	1.5	1.5	0.3
Somma di PFOS, PFOA, PFNA e PFHxS	1.3	1.6	8	9	50	2	8	45	5	1.7



del 24 agosto 2022

relativa al monitoraggio delle sostanze perfluoroalchiliche negli alimenti

RACCOMANDA:

1. Gli Stati membri, in collaborazione con gli operatori del settore alimentare, dovrebbero monitorare la presenza di PFAS negli alimenti nel corso degli anni 2022, 2023, 2024 e 2025.

Gli Stati membri dovrebbero effettuare prove per rilevare la presenza negli alimenti delle seguenti PFAS:

-  acido perfluorooctansulfonico (PFOS);
-  acido perfluorooctanoico (PFOA);
-  acido perfluorononanoico (PFNA);
-  acido perfluoroesansulfonico (PFHxS).

Gli Stati membri dovrebbero inoltre, se possibile, effettuare prove per rilevare la presenza di composti simili a PFOS, PFOA, PFNA e PFHxS, ma con una catena alchilica diversa e con un'occorrenza rilevante negli alimenti, nell'acqua potabile e/o nel siero umano, quali:

-  acido perfluorobutanoico (PFBA);
-  acido perfluoropentanoico (PFPeA);
-  acido perfluoroesanoico (PFHxA);
-  acido perfluoroeptanoico (PFHpA);
-  acido perfluorodecanoico (PFDA);
-  acido perfluorundecanoico (PFUnDA);
-  acido perfluorododecanoico (PFDoDA);
-  acido perfluorotridecanoico (PFTrDA);
-  acido perfluorotetradecanoico (PFTeDA);

-  acido perfluorobutansulfonico (PFBS);
-  acido perfluoropentansulfonico (PFPS);
-  acido perfluoroeptansulfonico (PFHpS);
-  acido perfluorononansulfonico (PFNS);
-  acido perfluorodecansulfonico (PFDS);
-  acido perfluoroundecansulfonico (PFUnDS);
-  acido perfluorododecansulfonico (PFDoDS);
-  acido perfluorotridecansulfonico (PFTrDS);
-  perfluorooctansulfonamide (FOSA).

Gli Stati membri dovrebbero inoltre considerare la possibilità di effettuare prove per rilevare la presenza negli alimenti di PFAS emergenti, quali:

-  acido 2-[(6-clor-1,1,2,2,3,3,4,4,5,5,6,6-dodecafluoresil)ossi]-1,1,2,2-tetrafluoretansulfonico (forma acida di F53B);
-  acido 2,3,3,3-tetrafluor-2-(eptfluorpropossi)-propanoico (forma acida di GenX);
-  acido 2,2,3-trifluor-3-[1,1,2,2,3,3-esfluor-3-(trifluormetossi)propossi]-propionico (forma acida di ADONA);
-  idrossido di N,N-dimetil-N-ossido-3-[(3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,8-tridecafluoroottil)sulfonyl]ammino]-1-propanamminio (Capstone A);
-  idrossido di N-(carbossimetil)-N,N-dimetil-3-[(3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,8-tridecafluoroottil)sulfonyl]ammino]-1-propanamminio (Capstone B);
-  alcoli e solfonati di fluorotelomeri.



Risultati Circuiti interlaboratorio 2021-2024

Circuito interlaboratorio 1		2021		2022		2023	2024		
		FAPAS 2021-0696	FAPAS DWC074	FAPAS 2022-06107	FAPAS DWC1907	FAPAS 2023-06142	FAPAS 2024-06137	FAPAS 2024-06162	FAPAS 2024-06153
Analiti	Matrici	Muscolo di pesce	Acqua potabile	Muscolo di pesce	Acqua potabile	Uovo	Muscolo di pesce	Latte	Uovo
	PFOA	-0.5	0.4	-0.3	0.4	0.7	0.7	0,1	-2
	PFNA	-0.4	-	0.5	-	0.7	0.3	0,2	-0,1
	PFHxS	-0.5	-	0.2	-	0.4	0.4	0,4	0,1
	PFOS	0.5	-0.8	0	-0.5	0.5	0.6	0,7	0,2

Circuito interlaboratorio 2		2021	2022	2023		2024	
		EURL-PT-PF_2102-LWE	EURL-PT-POP_2203-FM	EURL-PT-POP_2302-CF	EURL-PT-POP_2301-MP	EURL-PT-POP_2401-BM	EURL-PT-POP_2403-PIM
Analiti	Matrici	Uovo	Muscolo di pesce	Mangime	Latte	Muscolo bovino	Latte
	PFOA	0.6	0	0.6	0.4	-	0
	PFNA	0.6	1	0.4	0.6	0,3	0,1
	PFHxS	0.3	-0.1	-	0.9	0.3	0,2
	PFOS	0.6	0.5	0.6	1	0.4	0,3



$$|z\text{-score}| \leq 2$$



A liquid chromatography-high resolution mass spectrometry method for the determination of thirty-three per- and polyfluoroalkyl substances in animal liver



Carolina Barola^{a,1}, Simone Moretti^{a,1}, Danilo Giusepponi^a, Fabiola Paoletti³, Giorgio Saluti³, Gabriele Cruciani^b, Gianfranco Brambilla^c, Roberta Galarini^{a,*}

^a Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche "Togo Rosati", Via G. Salvemini 1, 06126 - Perugia, Italy

^b Department of Chemistry, Biology and Biotechnology, University of Perugia, via Elce di Sotto, 8 - 06123 Perugia, Italy

^c Istituto Superiore di Sanità, Viale Regina Elena, 299, 00161 - Rome, Italy

Occurrence and pattern of legacy and emerging per- and Poly-FluoroAlkyl substances (PFAS) in eggs of loggerhead turtle *Caretta caretta* from western Mediterranean^{*}



Simone Moretti^a, Gianfranco Brambilla^{b,*}, Fulvio Maffucci^c, Carolina Barola^a, Elisabetta Bualetti^a, Sandra Hochscheid^c, Silvia Canzanella^d, Roberta Galarini^a, Mauro Esposito^c

^a Istituto Zooprofilattico Sperimentale Dell'Umbria e Delle Marche, Via G. Salvemini, 1 06126, Perugia, Italy

^b Istituto Superiore di Sanità, Viale Regina Elena 299, 00161, Roma, Italy

^c Marine Turtle Research Group, Department of Marine Animal Conservation and Public Engagement, Stazione Zoologica Anton Dohrn, Via Nuova Macello 16, 80055, Portici, Italy

^d Centro di Riferenza Nazionale per l'Analisi e Studio di Correlazione Tra Ambiente, Animale e Uomo, IZS Mezzogiorno, Via Salute 2, 80055 Portici Italy

Target determination and suspect screening of legacy and emerging per- and poly-fluoro poly-ethers in wild boar liver, in Italy



Simone Moretti^{a,1}, Carolina Barola^{a,1}, Danilo Giusepponi^a, Fabiola Paoletti^a, Arianna Piersanti^b, Olga Tcheremenskaia^c, Gianfranco Brambilla^{d,*}, Roberta Galarini^a

^a Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche, Centro Sviluppo e Validazione Metodi, Via Salvemini 1, 06126, Perugia, Italy

^b Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche, UOS Lab. Contaminanti Organici, Inorganici e Biotossine Algali, Via Cupa di Posatora 3, 60100, Ancona, Italy

^c Dipartimento Ambiente e Salute, Istituto Superiore di Sanità, Viale Regina Elena 299, 00161, Roma, Italy

^d Dipartimento Alimentazione Nutrizione e Sanità Pubblica Veterinaria, Istituto Superiore di Sanità, Viale Regina Elena 299, 00161, Roma, Italy

Article

Untargeted Screening of Per- and Polyfluoroalkyl Substances (PFASs) in Airborne Particulate of Three Italian E-Waste Recycling Facilities

Carolina Barola¹, Elisabetta Bualetti¹, Simone Moretti¹, Francesca Buiarelli², Giulia Simonetti², Franco Lucarelli³, Laura Goracci⁴, Stefano Lorenzetti⁵, Patrizia Di Filippo⁶, Donatella Pomata⁶, Carmela Riccardi⁶ and Roberta Galarini^{1,*}

Article

Determination of Perfluorinated and Polyfluorinated Alkyl Substances (PFASs) in PM₁₀ Samples: Analytical Method, Seasonal Trends, and Implications for Urban Air Quality in the City of Terni (Central Italy)

Simone Moretti¹, Silvia Castellini², Carolina Barola¹, Elisabetta Bualetti¹, Chiara Petroselli², Roberta Selvaggi², Mara Galletti³, David Cappelletti^{2,*} and Roberta Galarini¹

Chloroperfluoropolyether carboxylate compounds: A review



Elisabetta Bualetti, Carolina Barola, Roberta Galarini^{*}

Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche "Togo Rosati", Via G. Salvemini, 1, 06126, Perugia, Italy





Conclusioni

- I metodi sviluppati nelle diverse matrici alimentari sono conformi alla linea guida EURL
- L'attenzione della comunità scientifica e dei regolamenti europei si sta spostando su un pacchetto di analiti e matrici più ampio (PFAS emergenti e PFAS a catena corta e ultracorta, alimenti vegetali)



Work in progress

- Sviluppo di metodi per PFAS “emergenti”
- Sviluppo di metodi per PFAS a catena corta e ultracorta (C1-C4)





GRAZIE PER
L'ATTENZIONE

C7SVMETA

- *Dr.ssa Roberta Galarini*
- *Dr. Simone Moretti*
- *Dr.ssa Elisabetta Bucaletti*
- *Dr. Stefano Sdogati*

S8CONTAN

- *Dr.ssa Arianna Piersanti*
- *Dr.ssa Tamara Tavoloni*
- *Dr.ssa Arianna Stramenga*

