Syndial S.p.A.

Centro Igiene e Protezione Ambiente
Piazzale G. Donegani, 12
44100 Ferrara
Telefono: 0532 598968
Telefax: 0532 597924

Società per Azioni
Sede Legale in San Donato Milanese (MI)
Piazza Boldrini 1
Capitale Sociale euro 429.622.708 i.v.
Codice Fiscale, Partita IVA e
Registro Imprese di Milano n. 09702540155
R.E.A. Milano n. 1309478

Società soggetta all'attività di direzione e
coordinamento dell'Eni S.p.A

LAFE/fv-127/09
Ferrara, 17/07/2009

Spett.le
ECOL STUDIO S.r.l
Via dei Bichi, 293
55100 Lucca

Oggetto: Segnalazione per trasmissione dati analitici errati su PCB 114

Egregi Signori,

a seguito della segnalazione del Vostro Dott. Burzagli relativamente ai campioni di emissione denominati "2902196-001" e "2902196-003" ricevuti dal nostro laboratorio "Centro Igiene e Protezione Ambiente" in data 19 maggio 2009 ed identificati con nostro protocollo n. 937/GC e con identificativo univoco (Sample ID) rispettivamente 200141036 e 200141037, abbiamo proceduto alla revisione del processo analitico per un'anomalia del dato di concentrazione del PCB 114.

L'anticipazione dei risultati analitici da parte del laboratorio è avvenuta con comunicazione via e-mail del 25 maggio 2009 attraverso l'invio di tabelle excel contenenti le informazioni relative alla quantificazione in "pg" dei campioni ed ai recuperi di campionamento, di estrazione e di siringa come previsto dal protocollo analitico specifico per queste determinazioni.

La preparazione del campione è stata condotta mediante estrazione accelerata e conseguente purificazione con colonne multistrato secondo i requisiti previsti nella norma EN 1948:2006. La procedura analitica si basa sull'analisi in spettrometria di massa ad alta risoluzione (HRGC/HRMS) e permette la quantificazione dei 17 isomeri 2,3,7,8 cloro-sostituiti di PCDD/PCDF e dei 12 congeneri PCB ad effetto diossina simile (DL).
In base alle loro proprietà tossicologiche i PCB possono essere suddivisi in due gruppi: uno, composto da 12 congeneri, con proprietà tossicologiche analoghe alle diossine e viene pertanto denominato gruppo di "PCB diossina-simili" (DL-PCB) tra i quali i PCB non-orto sostituiti sono i più tossici; l'altro, è composto dai rimanenti congeneri denominati "PCB non diossina-simili" (NDL-PCB). Per i congeneri diossina-simili è stato introdotto il concetto di TEF (Fattore di Tossicità Equivalente) che esprime il grado di tossicità di ciascun congenere assumendo, come valore di riferimento, la tossicità del 2,3,7,8-Tetraclorodibenzodiossina (TCDD).
Il riconoscimento e la quantificazione degli isomeri 2.3.7.8 cloro-sostituiti e dei congeneri PCB DL, conformemente a quanto indicato nella norma UNI EN 1948:2006 è basato sull'utilizzo della gascromatografia ad alta risoluzione abbinata alla spettrometria di massa ad alta risoluzione (HRGC/HRMS) per la separazione e l'identificazione dei PCDDs/PCDFs e dei PCBs DL .
Attualmente questa tecnica analitica è l'unica capace di fornire sufficiente sensibilità, selettività e specificità nella determinazione di quantità in tracce di PCDDs/PCDFs.e PCBs DL.

I parametri gas-cromatografici permettono l'identificazione degli isomeri (posizione del Cl sostituente), mentre i parametri spettrometrici di massa permettono la differenziazione fra i congeneri omologhi di PCDDs/PCDFs e congeneri PCBs DL.
Per la quantificazione degli analiti in oggetto è stato utilizzato il metodo della diluizione isotopica.
La gascromatografia ad alta risoluzione abbinata alla spettrometria ad alta risoluzione (HRGC/HRMS) operata ad una risoluzione di 10.000 r.p. è stata necessaria per raggiungere una selettività adeguata e per permettere l'identificazione di tutti i riferimenti relativi agli standard marcati utilizzati nell'analisi.
Per ciascun isomero 2,3,7,8 sostituito o congenere DL sono stati registrati almeno due ioni del gruppo degli isotopi molecolari sia per i congeneri originari sia per quelli marcati $^{13}C_{12}$.
L'identificazione di un isomero è considerata positiva nel caso in cui vengano soddisfatti i requisiti legati alla separazione gascromatografica e legati ai parametri specifici del rivelatore di massa.
Il riconoscimento di un isomero è basato sul calcolo del rapporto isotopico tra gli ioni del cluster molecolare di appartenenza che deve corrispondere al valore teorico ± 20 %.
Nella separazione gascromatografica dei picchi riscontrati, il tempo di ritenzione di un isomero originario cloro sostituito nelle posizioni 2,3,7,8 e/o di un congenere PCB diossina simile, è stato considerato in una finestra temporale basata sul tempo di ritenzione del corrispondente isomero marcato nel campione.
Il rapporto segnale rumore dei dati non elaborati deve essere almeno 3:1 per il segnale usato per la quantificazione, mentre il rapporto segnale rumore per i congeneri marcati utilizzati per la quantificazione deve essere >10:1.
La taratura dello strumento HRGC/HRMS è stata eseguita con cinque soluzioni di materiali di riferimento certificati; la curva di taratura è stata utilizzata per calcolare i fattori di risposta relativi degli analiti sottoposti all'analisi quali quantitativa.
I fattori di risposta relativi sono stati utilizzati congiuntamente ai congeneri marcati aggiunti al campione in origine, per le determinazioni quantitative dei PCDDs/PCDFs e dei PCB (DL) originari mediante il metodo della diluizione isotopica.
Come riferimenti per la parte di estrazione e recupero / iniezione di alcuni congeneri nativi, sono stati usati i corrispondenti congeneri marcati $^{13}C_{12}$. Per tale ragione questi non possono essere utilizzati per il calcolo dei fattori di risposta relativi.
In questi casi si fa riferimento ad un congenere che abbia proprietà analoghe a quelle dei congeneri marcati $^{13}C_{12}$ previsti dal metodo specifico.

Masse congeneri PCB

standard marcati $^{13}C_{12}$

	massa di quantificazione (M+)	massa di identificazione (M)	rapporto isotopico teorico di riconoscimento	
70L (siringa- recovery)	303.9570	301.9626	0,77	(± 15 %)
111L siringa- recovery)	339.9178	337.9207	1,55	(± 15 %)
170L siringa- recovery)	407.8398	405.8428	1,05	(± 15 %)
60L (campionamento)	303.9570	301.9626	0,77	(± 15 %)
127L (campionamento	339.9178	337.9207	1,55	(± 15 %)
159L (campionamento)	373.8788	371.8817	1,24	(± 15 %)
77L (estrazione)	303.9597	301.9626	0,77	(± 15 %)
81L (estrazione)	303.9597	301.9626	0,77	(± 15 %)
105L (estrazione)	339.9178	337.9207	1,55	(± 15 %)
114L (estrazione)	339.9178	337.9207	1,55	(± 15 %)
123L (estrazione)	339.9178	337.9207	1,55	(± 15 %)
126L (estrazione)	339.9178	337.9207	1,55	(± 15 %)
118L (estrazione)	339.9178	337.9207	1,55	(± 15 %)
156L (estrazione)	373.8788	371.8817	1,24	(± 15 %)
157L (estrazione)	373.8788	371.8817	1,24	(± 15 %)
167L (estrazione)	373.8788	371.8817	1,24	(± 15 %)
169L (estrazione)	373.8788	371.8817	1,24	(± 15 %)
189L (estrazione)	407.8398	405.8428	1,05	(± 15 %)
congeneri PCB DL nativi				
77 (Dioxin-like)	291.9194	289.9224	0,77	(± 15 %)
81 (Dioxin-like)	291.9194	289.9224	0,77	(± 15 %)
105 (Dioxin-like)	327.8775	325.8804	1,55	(± 15 %)
114 (Dioxin-like)	327.8775	325.8804	1,55	(± 15 %)
123 (Dioxin-like)	327.8775	325.8804	1,55	(± 15 %)
126 (Dioxin-like)	327.8775	325.8804	1,55	(± 15 %)
118 (Dioxin-like)	327.8775	325.8804	1,55	(± 15 %)
156 (Dioxin-like)	361.8385	359.8415	1,24	(± 15 %)
157 (Dioxin-like)	361.8385	359.8415	1,24	(± 15 %)
167 (Dioxin-like)	361.8385	359.8415	1,24	(± 15 %)
169 (Dioxin-like)	361.8385	359.8415	1,24	(± 15 %)
189 (Dioxin-like)	395.7995	393.8025	1,05	(± 15 %)

L= labelled - marcati 13C12

Le analisi sono state condotte in spettrometria di massa ad alta risoluzione con lo strumento "MAT 95XP" della Thermo.

I due valori riportati nei rapporti di Prova emessi in data 29 maggio erano:
- per il campione 2902196-001 PCB 114 pari a 1151338 pg;
- per il campione 2902196-003 PCB 114 pari a 1764384 pg.

La riverifica dei passaggi che hanno generato i risultati comunicati inizialmente ivi compreso il dato anomalo per entrambi i campioni, ha evidenziato un errore nella formula del foglio di calcolo utilizzato dal laboratorio relativamente alla sola cella utilizzata nella quantificazione del congenere PCB 114 che ha comportato un fattore di moltiplicazione di 1000 volte per il solo analita in questione in entrambi i campioni analizzati.

A supporto dell'errore di calcolo evidenziato, si inoltra la seguente documentazione:

1) Le stampe dei cromatogrammi relativi alla determinazione tramite spettrometria di massa ad alta risoluzione (HRGC-HRMS) dei Pentaclorobifenili.

- Allegato 1: riferito al campione 2902196-001
- Allegato 2: riferito al campione 2902196-003

2) Un'evidenza di dettaglio delle aree relative al congenere PCB 114 (ingrandite nella seconda pagina degli allegati 1 e 2).

Dal confronto delle due aree relative alle masse dello "standard interno" PCB 114 marcato con le due aree relative alle masse del PCB 114 nativo ricercato nel campione, è evidente un rapporto 1:2 fra l'area del congenere marcato e quella del congenere nativo.

Nel dettaglio:

- per il campione 2902196-001 l'area del marcato è di 20612, e considerando che erano stati aggiunti 1000 pg assoluti con un recupero del 51%, tale area equivale a 506 pg assoluti nel campione, mentre l'area del nativo è di 24045 equivalente a 1151 pg assoluti;

- per il campione 2902196-003 l'area del marcato è di 24131, equivalente a 679 pg assoluti nel campione (con un recupero del 68%); l'area del nativo è di 37153 equivalente a 1764 pg assoluti nel campione.

Pertanto è evidente che non esiste un rapporto di 1:1000 fra le aree dei picchi cromatografici dello standard di quantificazione e quelle dei campioni in analisi, da cui si evince che il valore trasmesso è effettivamente attribuibile al fattore di moltiplicazione 1000 inserito erroneamente nella cella del foglio dati excel relativa al congenere 114.

3) I risultati analitici ottenuti dal software dello spettrometro di massa MAT 95XP della Thermo, utilizzato in laboratorio, trasferiti per procedura interna in tabelle excel costruite e codificate per ottenere il dato finale: nel caso specifico viene utilizzato il modulo di registrazione Mod 18.024 rev 0 facente parte della documentazione del sistema di gestione per la qualità (in Allegato 3).

In data 25 maggio 2009, nel PC utilizzato dall'analista per la compilazione del modulo 18.024 e la quantificazione delle concentrazioni dei PCB, era presente una versione di file errata, non eliminata al momento della costruzione del foglio di calcolo definitivo, che conteneva alla riga relativa al congenere PCB 114 un errato fattore di moltiplicazione pari a mille.

E' stato erroneamente utilizzato il file sbagliato quantificando di conseguenza un valore non corretto di concentrazione sul PCB 114 (dato inizialmente riportato sul Rapporto di Prova emesso dal laboratorio).

A seguito dell'anomalia il laboratorio ha aperto la procedura di gestione dei reclami e delle non conformità ed ha attuato i trattamenti e le azioni correttive previste dal sistema di gestione per la qualità.
Il foglio di calcolo excel errato è stato corretto e rivalidato attraverso l'inserimento di dati prototipo verificando che gli output in uscita coincidessero con quelli previsti dalla validazione iniziale, come previsto dalla nostra istruzione operativa IO037 "Validazione delle formule e dei programmi sviluppati dal laboratorio".

I valori nuovamente calcolati sul foglio di calcolo corretto e rivalidato sono risultati i seguenti:
- per il campione 2902196-001 PCB 114 pari a 1151,3 pg;
- per il campione 2902196-003 PCB 114 pari a 1764,4 pg.

I nuovi valori sono stati sostituiti nei Rapporti di Prova sopra menzionati ed i documenti sono stati emessi nuovamente in data 14 luglio.

Qualora sia da Voi ritenuto opportuno, siamo a disposizione per qualsiasi verifica tecnica presso la nostra struttura, in merito alla tracciabilità dei dati grezzi e della documentazione prodotta.

Distinti saluti.

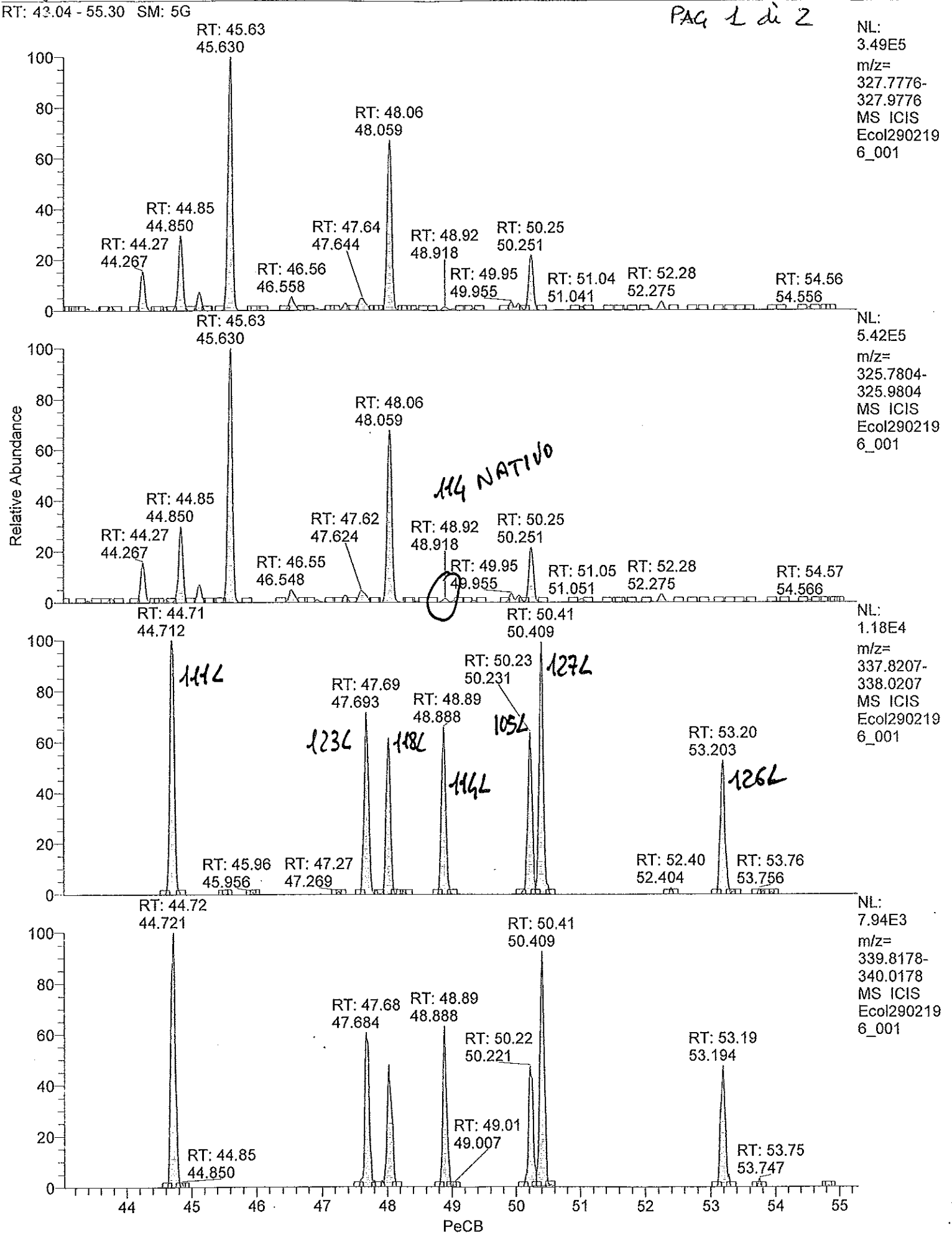
Dott.ssa Maria Cristina Cristofori (Responsabile Attività Analitiche)

Dott. Federico Villani (Responsabile Laboratorio e Garanzia Qualità)

F:\MAT95XP\...\Ecol2902196_001 141036 5/25/2009 12:06:20 PM ALLEGATO 1

PAG 1 di 2

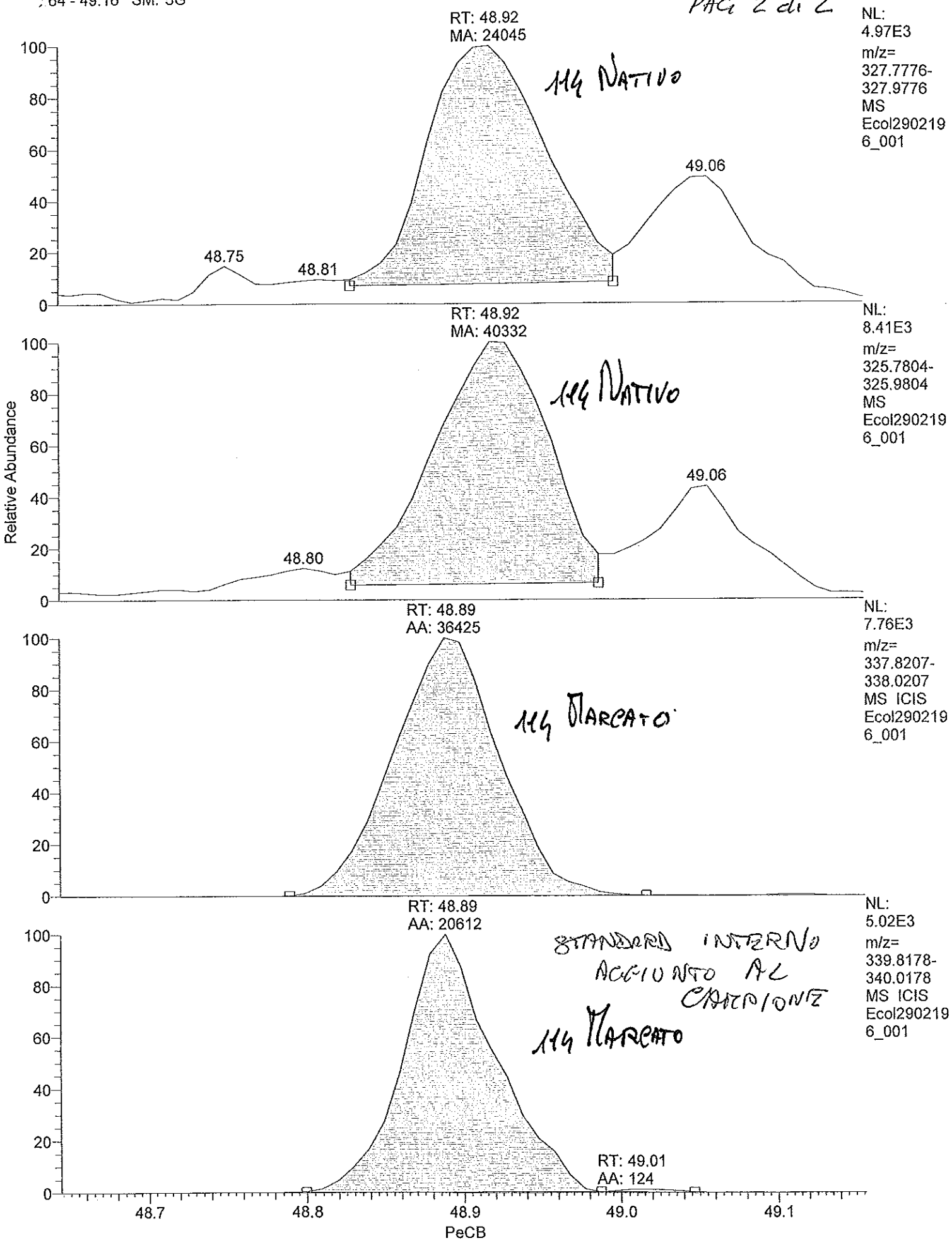
RT: 43.04 - 55.30 SM: 5G



ALLEGATO L

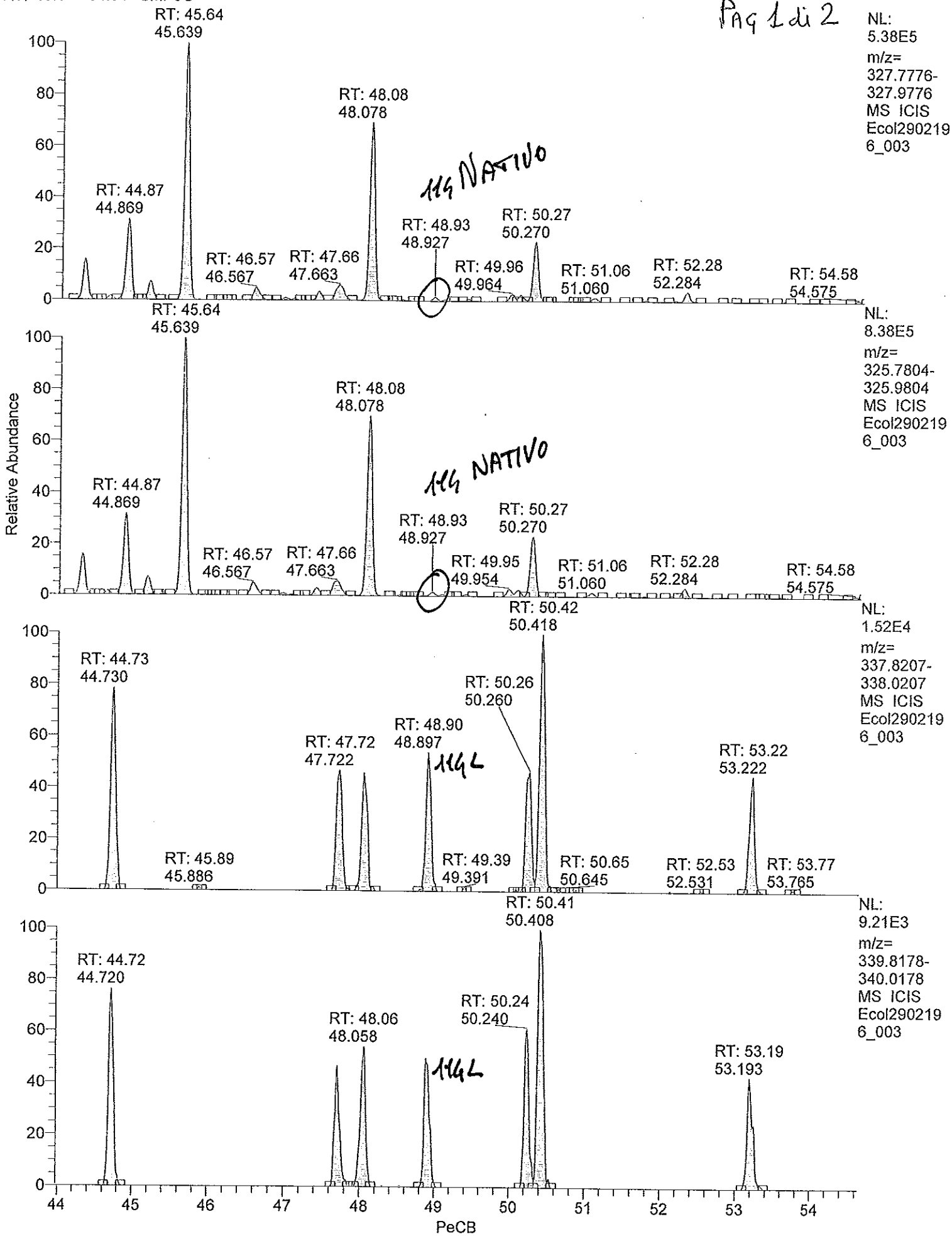
PAG 2 di 2

64 - 49.16 SM: 5G



F:\MAT95XP\...\Ecol2902196_003 141037 5/25/2009 10:38:49 AM ALLEGATO 2

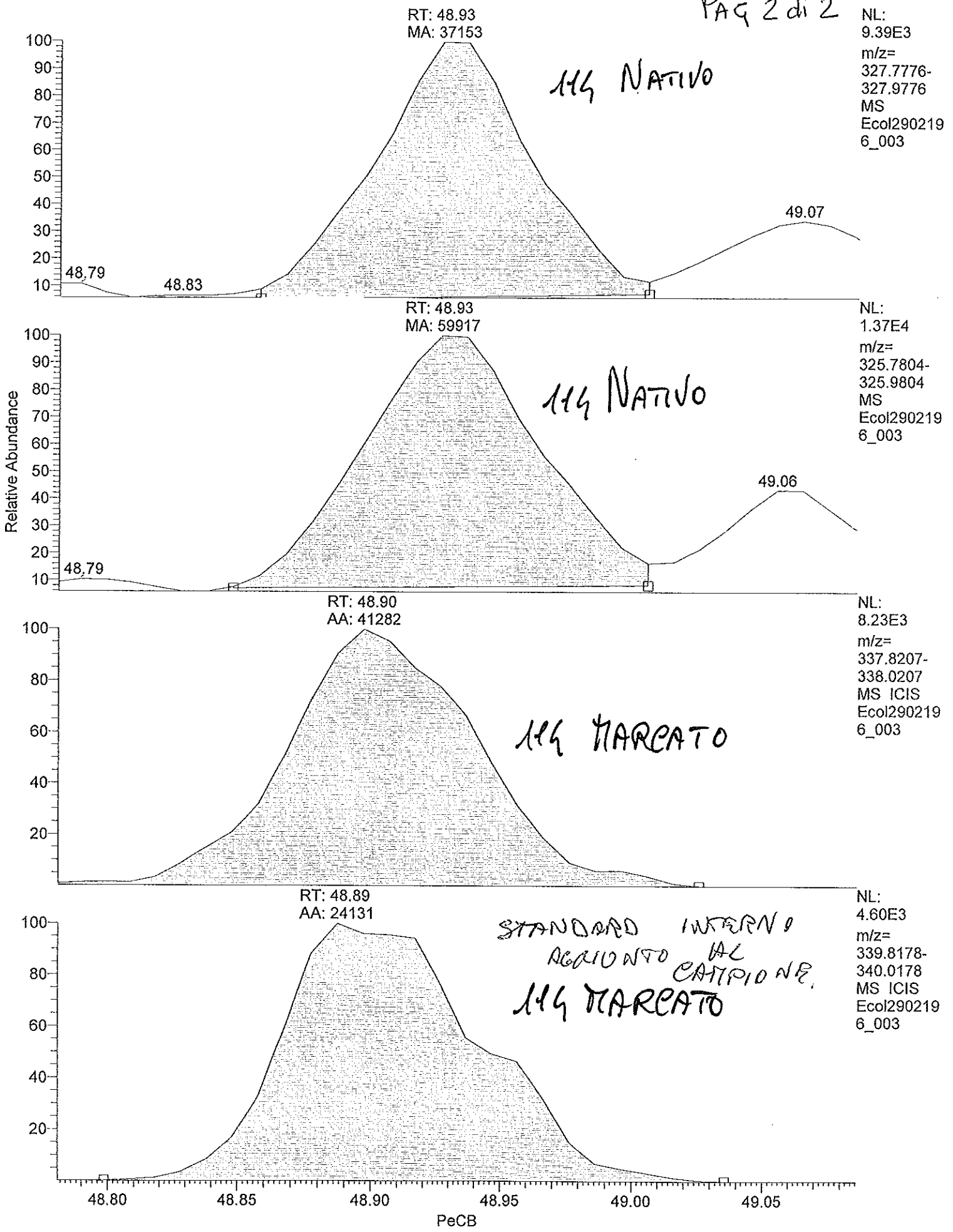
RT: 43.98 - 54.64 SM: 5G Pag 1 di 2



ALLEGATO 2

PAG 2 di 2

48.78 - 49.09 SM: 5G



ALLEGATO 3
PAG 1 di 2

Syndial
LABORATORIO CENTRO IGIENE E PROTEZIONE AMBIENTE

Quantificazione PCB metodo CEN 624 WG1 EN 1948-4 Dioxin-Like PCB (valore assoluto)

Campione Sid: 141036EcolEmiss
Volume in Nl : 1.000
Come volume finale dell'estratto 100 ul
Quan file:AA506:Xacalibur/data/PCBmaggio2009/141036EcolemissPCB
Data file:AA506:Xacalibur/data/PCBmaggio2009/ecolemisspcb29021196-001
Respons file:xcalibur/resp/en1948_4_WHOMaggio09
STD di siringa :
Extraction STD dioxin like :
Extraction STD Marker :
Std di campionamento:

QUESTI DATI VENGONO COPIATI DAL SOFTWARE — DATI ELABORATI TRAMITE FORMULE

	pg	Recovery %	Detectio Limit	pg assoluti	WHO	pgTE assoluti(WHO)	LR pg assoluti	LR/2 pg assoluti	LR pgWHO assoluti	LR/2 pgWHO assoluti
70L(Recovery)	1000	100	0.59064							
111L(recovery)	1000	100	1.20954							
170L(recovery)	1000	100	1.0641							
60L(Sampling)	1606.696	161	0.9774							
127L(Sampling)	1397.2001	140	1.97648							
159L(Sampling)	1586.9507	159	3.33227							
77L(Dioxin-like)	631.9345	63	0.6046							
81L(Dioxin-like)	683.3973	68	0.60001							
105L(Dioxin-like)	462.114	46	1.08374							
114L(Dioxin-like)	506.2204	51	1.14373							
123L(Dioxin-like)	594.9123	59	1.1931							
126L(Dioxin-like)	405.6139	41	0.97635							
118L(Dioxin-like)	507.0161	51	1.19319							
156L(Dioxin-like)	572.3645	57	1.92157							
157L(Dioxin-like)	556.1133	56	1.97165							
167L(Dioxin-like)	840.2928	84	1.9185							
169L(Dioxin-like)	673.8099	67	1.91148							
189L(Dioxin-like)	583.8988	58	0.69864							
77 (Dioxin-like)	0	---	5.77639	0	0.0001	0	5776.39	2888.195	0.577639	0.2888195
81 (Dioxin-like)	372.2823	---		372.2823	0.0001	0.03722823	0	0	0	0
105 (Dioxin-like)	15049.1666	---		15049.1666	0.0001	1.50491666	0	0	0	0
114 (Dioxin-like)	1151.338	---		1151.338	0.0005	0.575669	0	0	0	0
123 (Dioxin-like)	0	---	13.1562	0	0.0001	0	13156.2	6578.1	1.31562	0.65781
126 (Dioxin-like)	0	---	18.00007	0	0.1000	0	18000.07	9000.035	1800.007	900.0035
118 (Dioxin-like)	50054.8741	---		50054.8741	0.0001	5.00548741	0	0	0	0
156 (Dioxin-like)	16989.3937	---		16989.3937	0.0005	8.49469685	0	0	0	0
157 (Dioxin-like)	2372.1631	---		2372.1631	0.0005	1.18608155	0	0	0	0
167 (Dioxin-like)	403.6068	---		403.6068	0.0001	0.04036068	0	0	0	0
169 (Dioxin-like)	1694.0376	---		1694.0376	0.0100	16.940376	0	0	0	0
189 (Dioxin-like)	2432.7658	---		2432.7658	0.0001	0.24327658	0	0	0	0
Total PCB 4 Cl	68958.9035	---		68958.9035						
Total PCB 5 Cl	335818.88	---		335818.88						
Total PCB 6 Cl	667564.1906	---		667564.1906						
Total PCb 7 Cl	305230.1503	---		305230.1503						
Sommatorie				1377572.12		34.02809	36932.6600	18466.3300	1801.9003	900.9501

Sommatoria PCB Dioxin like totali espressi in pgWHO assoluti (LR)	1835.928
Sommatoria PCB Dioxin like espressi in pgWHO assoluti (LR/2)	934.978
Sommatoria PCB Dioxin like totali espressi in pg assoluti (LR)	1414504.784
Sommatoria PCB Dioxin like totali espressi in pg assoluti (LR/2)	1396038.454

IN QUESTA CELLA ERA PRESENTE IN DATA 25/05/09 UN FATTORE SPURIO MOLTIPLICATIVO DI MILLE NON PREVISTO.

ALLEGATO 3
PAG 2 di 2

Syndial
LABORATORIO CENTRO IGIENE E PROTEZIONE AMBIENTE

Quantificazione PCB metodo CEN 624 WG1 EN 1948-4 Dioxin-Like PCB (valore assoluto)

Campione Sid: 141037EcolEmiss
Volume in Nl : 1.000
Come volume finale dell'estratto 100 ul
Quan file:AA506:Xacalibur/data/PCBmaggio2009/141037EcolemissPCB
Data file:AA506:Xacalibur/data/PCBmaggio2009/ecolemisspcb29021196-003
Respons file:xcalibur/resp/en1948_4_WHOMaggio09
STD di siringa :
Extraction STD dioxin like :
Extraction STD Marker :
Std di campionamento:

	pg	Recovery %	Detectio Limit	pg assoluiti	WHO	pgTE assoluti(WHO)	LR pg assoluti	LR/2 pg assoluti	LR pgWHO assoluti	LR/2 pgWHO assoluti
70L(Recovery)	1000	100	0.47448							
111L(recovery)	1000	100	1.61301							
170L(recovery)	1000	100	1.15452							
60L(Sampling)	1003.0774	100	0.76999							
127L(Sampling)	1676.323	168	1.78493							
159L(Sampling)	1708.6929	171	3.11981							
77L(Dioxin-like)	630.8612	63	0.4857							
81L(Dioxin-like)	593.066	59	0.48201							
105L(Dioxin-like)	617.0763	62	1.44525							
114L(Dioxin-like)	678.9243	68	1.52525							
123L(Dioxin-like)	588.5502	59	1.59109							
126L(Dioxin-like)	484.3898	48	1.30204							
118L(Dioxin-like)	701.9396	70	1.59121							
156L(Dioxin-like)	715.5809	72	2.55939							
157L(Dioxin-like)	692.2835	69	2.62609							
167L(Dioxin-like)	808.8369	81	2.55529							
169L(Dioxin-like)	643.8458	64	2.54595							
189L(Dioxin-like)	700.985	70	0.758							
77 (Dioxin-like)	0	---	5.17846	0	0.0001	0	5178.46	2589.23	0.517846	0.258923
81 (Dioxin-like)	101.0753	---		101.0753	0.0001	0.01010753	0	0	0	0
105 (Dioxin-like)	20748.6499	---		20748.6499	0.0001	2.07486499	0	0	0	0
114 (Dioxin-like)	1764.3848	---		1764.3848	0.0005	0.8821924	0	0	0	0
123 (Dioxin-like)	2713.0799	---		2713.0799	0.0001	0.27130799	0	0	0	0
126 (Dioxin-like)	101.2246	---		101.2246	0.1000	10.12246	0	0	0	0
118 (Dioxin-like)	66637.3436	---		66637.3436	0.0001	6.66373436	0	0	0	0
156 (Dioxin-like)	17858.5067	---		17858.5067	0.0005	8.92925335	0	0	0	0
157 (Dioxin-like)	2646.4674	---		2646.4674	0.0005	1.3232337	0	0	0	0
167 (Dioxin-like)	7155.3604	---		7155.3604	0.0001	0.71553604	0	0	0	0
169 (Dioxin-like)	20.5828	---		20.5828	0.0100	0.205828	0	0	0	0
189 (Dioxin-like)	2730.1616	---		2730.1616	0.0001	0.27301616	0	0	0	0
Total PCB 4 Cl	76953.2932	---		76953.2932						
Total PCB 5 Cl	451094.1097	---		451094.1097						
Total PCB 6 Cl	820030.7573	---		820030.7573						
Total PCb 7 Cl	350095.2942	---		350095.2942						
Sommatorie				1698173.45		31.47153	5178.4600	2589.2300	0.5178	0.2589

Sommatoria PCB Dioxin like totali espressi in pgWHO assoluti (LR)	31.989
Sommatoria PCB Dioxin like espressi in pgWHO assoluti (LR/2)	31.730
Sommatoria PCB Dioxin like totali espressi in pg assoluti (LR)	1703351.914
Sommatoria PCB Dioxin like totali espressi in pg assoluti (LR/2)	1700762.684

IN QUESTA CELLA ERA PRESENTE IN DATA 25/05/2009 UN FATTORE SPURIO MOLTIPLICATIVO DI MILLE NON PREVISTO