

ARPAM Regione Marche Dipartimento di Ascoli Piceno	METODI DI PROVA		GCI
	DETERMINAZIONE GASCROMATOGRAFICA DEGLI IDROCARBURI POLICICLICI AROMATICI		Rev. 10 Data 06/12/2007 Pagina 11 di 11

9	03/2006	7	Conservazione delle soluzioni standard (soluzioni madre)
		9.1	Inserimento modulistica per la carta di controllo
		9.4	Modifica criterio per accettabilità recupero Benzo(b)fluorantene
		10	Indicazione modulistica aggiornata
		10.2	Inserimento fattore di umidità del prodotto nel calcolo finale
		11, 11.2	Aggiornamento modulistica
10	08/11/2007	8.2	Le condizioni operative di analisi gascromatografica sono le seguenti:
		9	Criteri e/o requisiti per l'approvazione/rifiuto Adeguamento limite di determinazione alla vigente normativa

ARPAM Regione Marche Dipartimento di Ascoli Piceno	METODI DI PROVA	GCI
	DETERMINAZIONE GASCROMATOGRAFICA DEGLI IDROCARBURI POLICICLICI AROMATICI	Rev. 10 Data 06/12/2007 Pagina 10 di 11

- 3) Effettuazione di prove di ripetibilità su matrici alimentari di origine vegetale. E' stato calcolato un valore di CV% medio pari a 12,6. La documentazione relativa alla validazione del metodo di prova è conservata dal Responsabile del Servizio Aria.
- 4) All'esecuzione delle prove sono preposti gli analisti qualificati dei Servizi del Dipartimento ARPAM-AP.
- 5) I dati di validazione sono riportati nel modulo MD-DG-142.

LISTA DELLE REVISIONI			
Revisione Numero	Data	Modifica del punto	Descrizione delle modifiche
5	03/03	11	Modifica apportata a seguito aggiornamento calcolo incertezza di misura
6	06/2003	3,4,5,7,9, 10,11	Integrazione dettagli procedura Indicazione di dettaglio
7	01/2004	9	Inserimento carta di controllo, qualificazione del personale
8	10/2004	3,4 6 11	Eliminazione delle matrici carne, formaggi e latte. Inserimento dettagli procedue di preparazione delle soluzioni standard Inserimento dati della validazione dei metodi

ARPAM Regione Marche Dipartimento di Ascoli Piceno	METODI DI PROVA	GC1
	DETERMINAZIONE GASCROMATOGRAFICA DEGLI IDROCARBURI POLICICLICI AROMATICI	Rev. 10 Data 06/12/2007 Pagina 9 di 11

3) Limite di determinazione

Il limite di determinazione validato:

Metodo	Limite di determinazione validato
E1-P1-GC1	5 µg/Kg ss
E2-P1-GC1	1 µg/Kg
E3-P1-GC1	0,1 µg/Kg
E4-P1-GC1	0,01 µg/l
E5-P1-GC1	5 µg/Kg ss

Criterio di accettabilità: CV% < al 20% su 6 prove.

4) Linearità

Il campo di linearità dello strumento è stato valutato costruendo una curva di calibrazione con soluzioni standard 1, 2 e 4 mg/l.

Metodo E1-P1-GC1: 5 - 500 ug/Kg ss;
 E2-P1-GC1: 1 - 100 ug/Kg;
 E3-P1-GC1: ... 0,1 5,0 ug/Kg;
 E4-P1-GC1: 0,01 - 0,25 ug/l;
 E5-P1-GC1: 5 - 500 ug/Kg ss.

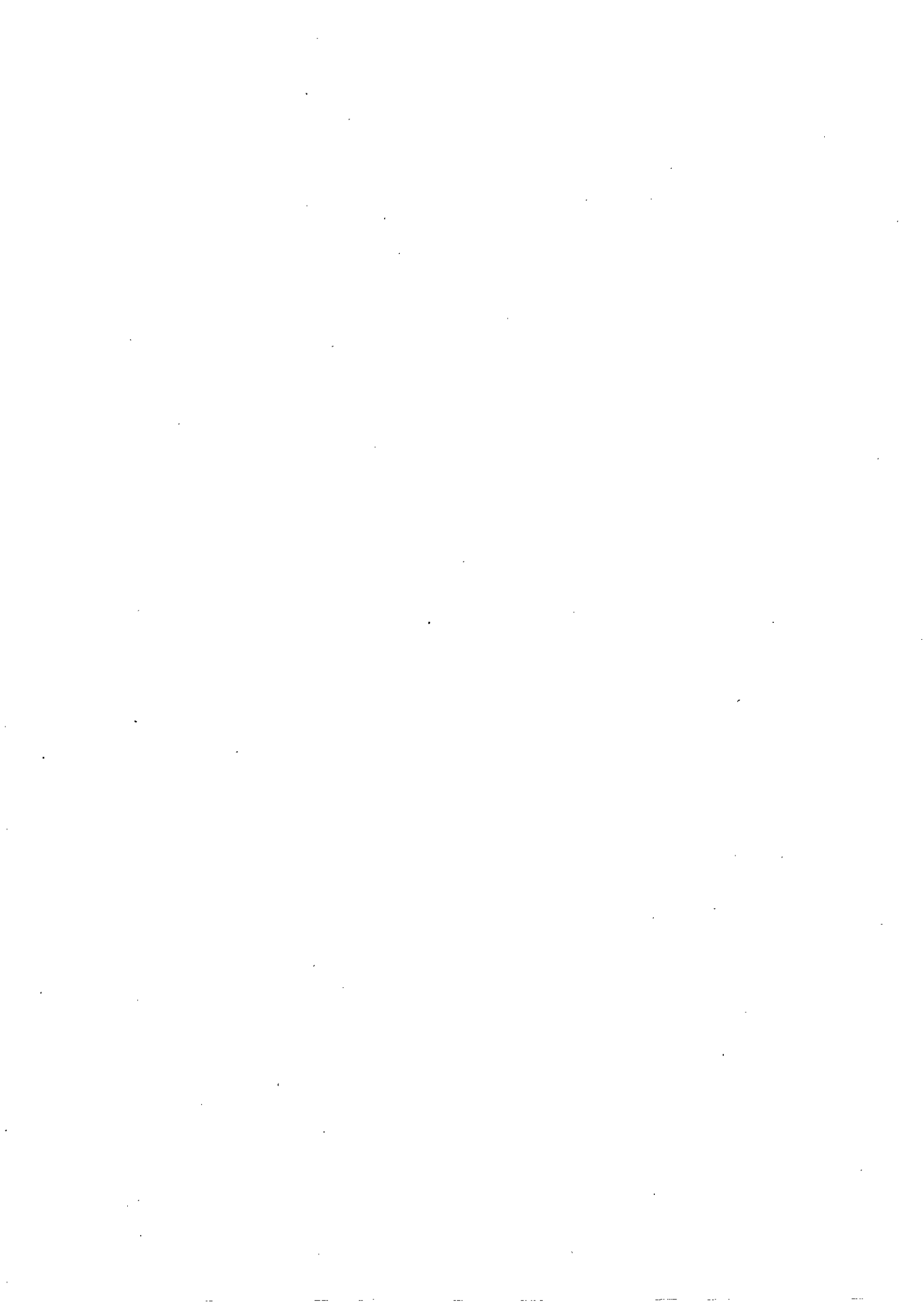
Criterio di accettabilità: coefficiente di correlazione $R^2 > 0.998$.

Il metodo è stato validato, a seconda del tipo di matrice, per mezzo di:

- 1) Controllo qualità organizzato dall'Istituto Superiore di Sanità su matrici di origine alimentare. Gli esiti di tale controllo attestano la validità del metodo in quanto il laboratorio ha avuto un CV medio pari a 13%.
- 2) Partecipazione a studi collaborativi nazionali organizzati dall'Istituto Superiore di Sanità per le matrici ambientali ed acquose. Per quanto riguarda le matrici ambientali lo studio collaborativo è stato impostato in modo da permettere la massima confrontabilità dei risultati ed ottenere il maggior numero di informazioni (su affidabilità, fonti di errore, ecc.) con un numero limitato di determinazioni analitiche. Per questo motivo il protocollo prevedeva diverse prove (Ad esempio: utilizzo di standards forniti dal laboratorio coordinante e di standards propri, programmi termici diversi, due metodi di purificazione dei campioni, ...) a seconda delle quali il laboratorio ha avuto diversi valori di CV%. Nelle prove effettuate seguendo le procedure di purificazione e le condizioni gascromatografiche proprie, il laboratorio ha avuto un CV% medio pari a 6,3 (calcolo delle concentrazioni con il metodo dello standard esterno) e 10,8 (calcolo delle concentrazioni con il metodo dello standard interno).

Per validare l'estrazione ad ultrasuoni sono state effettuate prove di ripetibilità impiegando la tecnica di estrazione ad ultrasuoni e soxhlet: sono stati ottenuti valori di concentrazioni paragonabili e un CV% medio di circa 12% in entrambi i casi.

Per le matrici acquose lo studio collaborativo è stato finalizzato alla definizione del metodo analitico ufficiale per le acque destinate al consumo umano, pubblicato sul Rapporto ISTISAN 00/14 Vol.2° parte I anno 2000. E' stato calcolato un CV% medio pari a 23,1, aggiornato con i Rapporti ISTISAN 07/31



ARPAM Regione Marche Dipartimento di Ascoli Piceno	METODI DI PROVA				GCI
	DETERMINAZIONE GASCROMATOGRAFICA DEGLI IDROCARBURI POLICICLICI AROMATICI				Rev. 10 Data 06/12/2007 Pagina 8 di 11

prevista dal SINAL nel documento DT 0002, di riportare sul rapporto di prova l'incertezza estesa della misura, che definisce un intervallo intorno al risultato della misurazione che ci si aspetta comprendere una gran parte della distribuzione di valori che possono essere ragionevolmente attribuiti al misurando.

Il valore dell'incertezza da indicare nel rapporto di prova si ottiene applicando la seguente formula:

$$\text{Incertezza del dato} = \text{Incertezza del metodo} \times \sqrt{\frac{10}{N \text{ misure}}}$$

N misure = Numero di misure eseguite per la determinazione della conc. di IPA nel campione.

11.1 Qualità del metodo

1) Precisione

Per valutare la precisione dei metodi sono state eseguite 10 prove di ripetibilità. Viene calcolata la media su 10 repliche espressi come area di picchi, la deviazione standard e il CV%.

Criterio di accettabilità: CV% inferiore al 20 %

Metodo	E1-P1-GC1	E2-P1-GC1	E3-P1-GC1	E4-P1-GC1	E5-P1-GC1
	CV%	CV%	CV%	CV%	CV%
Benzo(a)antracene	5.9	16.7	6.1	6.0	17.1
Benzo(b)fluorantene	8.3	21.5	4.1	5.0	11.4
Benzo(j)fluorantene					
Benzo(k)fluorantene	8.5	14.0	6.1	8.0	13.7
Benzo(a)pirene	9.2	5.9	4.1	9.0	11.3
Indeno(1,2,3c,d)pirene	8.7	5.0	4.4	10.0	8.8
Dibenzo(a,h)antracene	9.0	6.0	4.6	9.5	10.7
Benzo(g,h,i)perilene					

2) Accuratezza

E' stata valutata con 6 prove di recupero.

Criterio di accettabilità: recupero deve essere compreso tra 70 e 110 %.

Metodo	E1-P1-GC1	E2-P1-GC1	E3-P1-GC1	E4-P1-GC1	E5-P1-GC1
	Recupero %	Recupero %	Recupero %	Recupero %	Recupero %
Benzo(a)antracene	80.0	123	80.0	103	100
Benzo(b)fluorantene	90.4	109	90.5	107	98.0
Benzo(j)fluorantene					
Benzo(k)fluorantene	87.9	91	95.0	102	89.0
Benzo(a)pirene	87.4	105	95.0	107	80.0
Indeno(1,2,3c,d)pirene	90.4	102	98.0	88	85.0
Dibenzo(a,h)antracene	87.0	107	97.0	113	85.0
Benzo(g,h,i)perilene					

ARPAM Regione Marche Dipartimento di Ascoli Piceno	METODI DI PROVA	GC1
	DETERMINAZIONE GASCROMATOGRAFICA DEGLI IDROCARBURI POLICICLICI AROMATICI	Rev. 10 Data 06/12/2007 Pagina 7 di 11

10. Dati da registrare e i metodi di analisi e di presentazione

All'esecuzione del metodo sono preposti gli operatori qualificati come riportati sul modulo MD-DG-86a "Piano Controllo Mantenimento Qualificazioni".

10.1 Dati grezzi ed elaborati.

I dati grezzi necessari per i calcoli sono relativi alle procedure di estrazione E1 ~ E5 (ad esempio la quantità di campione pesata), alla procedura di purificazione P1 (ad esempio la quantità di estratto grezzo purificata) ed alla determinazione gascromatografica GC1, vengono riportati su apposito registro, firmati dall'analista e validati dal responsabile addetto per la successiva stesura dei rapporti di prova. Gli elaborati, costituiti in questo caso dai report dei tracciati gascromatografici con eventuali diluizioni effettuate, vengono conservati in archivio.

10.2 Poiché la risposta dei diversi standard è lineare in tutto il campo di misura, si ritiene accettabile quantificare l'analita tramite standard a concentrazione più vicina.

Per il calcolo della concentrazione del singolo IPA nei mitili, nel terreno, nei fanghi di depurazione, nei rifiuti, nei sedimenti e nelle ceneri si applica la seguente formula:

$$\mu\text{g/Kg} = \frac{\text{Area Comp (o altezza).(i)} \times \mu\text{g/ml STD} \times 100 \times f \times u}{\text{Area STD(o altezza) (i)} \times \text{g Campione}}$$

10.3 Per il calcolo della concentrazione del singolo IPA nelle acque si applica la seguente formula:

$$\text{ng/l} = \frac{\text{Area Comp (o altezza).(i)} \times \text{ng/ml STD} \times 0,1 \times f}{\text{Area STD (o altezza) (i)} \times \text{ml Campione}}$$

Dove:

- Area Comp.(o altezza) (i) = Area o altezza del componente (i)
- Area STD (o altezza)(i) = Area o altezza del componente standard (i)
- $\mu\text{g/ml}$ = Concentrazione componente standard (i)
- g Campione = Grammi campione analizzato
- ml Campione = ml di campione analizzato
- f = Fattore che tiene conto del recupero valutato per mezzo dello S.I.=Standard interno
- u = Fattore che tiene conto del contenuto di acqua del campione qualora necessario
- ng/ml = Concentrazione componente standard (i)

11. Incertezza o le procedure di stima dell'incertezza

Il calcolo dell'incertezza di misura viene elaborato secondo le istruzioni contenute nella PG-16.

I risultati sono riportati nel modulo MD-T-100

Dal momento che nella maggior parte delle misure effettuate dai laboratori dell'ARPAM sono coinvolte la salute e la sicurezza pubbliche, l'ARPAM ha scelto, in conformità alla prescrizione

ARPAM Regione Marche Dipartimento di Ascoli Piceno	METODI DI PROVA	GCI
	DETERMINAZIONE GASCROMATOGRAFICA DEGLI IDROCARBURI POLICICLICI AROMATICI	Rev. 10 Data 06/12/2007 Pagina 6 di 11

On-Column: 90°C
 Velocità carta: 1 cm/min

8.2 Iniettare nel cromatografo volumi uguali di estratto purificato e di soluzione standard diluita. La quantificazione viene effettuata mediante la tecnica dello standard esterno. All'inizio di ogni ciclo di analisi si verifica il mantenimento della taratura iniettando lo standard (6.3).

8.3 Bianco reattivi (bianco della procedura).
 Iniettare l'estratto purificato del bianco preparato.
 Non debbono essere presenti picchi interferenti con i componenti degli IPA da determinare, ossia sul tracciato gascromatografico non debbono comparire picchi che abbiano tempo di ritenzione uguali agli IPA di interesse analitico.

9. Criteri e/o requisiti per l'approvazione/rifiuto

9.1 Le iniezioni della soluzione standard (6.3) consentono di verificare il buon funzionamento e il grado di prestazione analitica dell'apparecchiatura.
 L'area del picco del Benzo(a)Pirene deve rispettare i requisiti stabiliti nella carta di controllo (MD-DG-125) appositamente impostata (Calcolando la deviazione standard su una serie di prove e costruendo le fasce di accettabilità).

9.2 Qualificazione del personale

Per la qualificazione del personale, si considera accettabile la ripetibilità, effettuata con sei repliche di un campione, quando la media dei valori ottenuti espressa come CV% è inferiore a 20.

9.3 Nel tracciato gascromatografico dell'estratto purificato del bianco reagenti, non debbono essere presenti picchi interferenti con i componenti degli IPA da determinare, ossia sul tracciato gascromatografico non debbono comparire picchi che abbiano tempo di ritenzione uguali agli IPA di interesse analitico, oppure presenti a livello trascurabile (con segnale inferiore al 10 % di quello dell'IPA "interferito" nei campioni reali).

Nel calcolo del risultato, occorre tener conto dell'eventuale presenza di picchi interferenti non eliminabili. In questo caso la quantità dell'interferenza deve essere calcolata come media aritmetica di tre analisi replicate del bianco-reagenti.

9.4 Lo standard interno (surrogato o tracciante) (6.4) è un particolare composto aggiunto al campione prima dell'estrazione al fine di segnalare la presenza di errori grossolani verificatisi durante l'analisi di ogni campione; sono considerati accettabili recuperi maggiori o uguali al 70 %.

Lo standard interno utilizzato, il β - β' binaftile, normalmente presenta un recupero nell'analisi dell'olio vegetale e vegetali oleaginosi tra il 50 e il 70%; per recuperi superiori al 50 % indicano la corretta esecuzione della procedura analitica.

Per le analisi delle altre matrici viene utilizzato lo stesso standard tracciante, ma il recupero da considerare per valutare la corretta esecuzione della procedura è maggiore del 70%.

9.5 Al fine di verificare il recupero dei vari analiti su ciascuna matrice, verrà utilizzato un campione arricchito in ogni sessione di analisi e la % di recupero riportata su apposito modulo come carta di controllo MD-DG-125.

ARPAM Regione Marche Dipartimento di Ascoli Piceno	METODI DI PROVA	GCI
	DETERMINAZIONE GASCROMATOGRAFICA DEGLI IDROCARBURI POLICICLICI AROMATICI	Rev. 10 Data 06/12/2007 Pagina 5 di 11

7. Condizioni ambientali e periodo di stabilizzazione richiesto

Le soluzioni madre (6.1) vengono conservate in congelatore e sono stabili per due anni.

Deve essere evitata l'esposizione a luce solare diretta dei campioni a qualunque stadio della procedura, e delle soluzioni IPA.

In considerazione dell'attività cancerogena associata a vari IPA, usare gli accorgimenti necessari nella manipolazione dei reagenti e standard, affinché la custodia, l'uso e lo smaltimento degli IPA, delle loro soluzioni e dei campioni estratti, avvengano sempre con le dovute cautele e nel rispetto della normativa, per non causare danni agli operatori e all'ambiente.

8. Descrizione della procedura

L'estratto organico proveniente dalla procedura di estrazione, purificato secondo la procedura indicata nella fase P1, viene analizzato in gascromatografia.

8.1 Le condizioni operative di analisi gascromatografica sono le seguenti:

Colonna: 5% difenil – 95 % dimetilpolisilossano a fase legata, silice fusa, 30m; 0.25 ÷ 0.32mm; film: 0.25 µm.

La scelta della strumentazione primaria è a cura dell'operatore e viene effettuata tenendo conto della disponibilità della stessa.

Programma termico:

Sistema di Misura CH:

Programma termico: 80°C $\xrightarrow{25^\circ\text{C}/\text{min}}$ 180°C $\xrightarrow{8^\circ\text{C}/\text{min}}$ 300°C
 1' 1' 15'

Rivelatore: FID 305°C Iniezione 1µl, att: x 8 ; registratore: 2⁵

PTV: 85°C 340°C (6'')
 0' 1,2'

Velocità carta: 1 cm/min

Sistema di Misura CI:

Programma termico: 90°C $\xrightarrow{25^\circ\text{C}/\text{min}}$ 200°C $\xrightarrow{8^\circ\text{C}/\text{min}}$ 300°C
 1' 0' 15'

Rivelatore: FID 305°C Iniezione 1µl, att: 2⁵; range 2¹; Registratore: 2⁵.

On-Column: 90°C

Velocità carta: 1 cm/min

Sistema di Misura AT:

Programma termico: 90°C $\xrightarrow{25^\circ\text{C}/\text{min}}$ 170°C $\xrightarrow{8^\circ\text{C}/\text{min}}$ 300°C
 1' 0' 15'

Rivelatore: FID 305°C Iniezione 1µl, att: 2⁵; range 2¹; Registratore: 2⁵; 1 V f.s.

ARPAM Regione Marche Dipartimento di Ascoli Piceno	METODI DI PROVA	GCI
	DETERMINAZIONE GASCROMATOGRAFICA DEGLI IDROCARBURI POLICICLICI AROMATICI	Rev. 10 Data 06/12/2007 Pagina 4 di 11

Mix	Componenti	Soluzione di riferimento
A	Dibenzotiofene	11 B-1
	*Fenantrene	10 B-1
	*Antracene	1 B-1
	*Fluorantene	2 B-1
	*Pirene	3 B-1
B	*Benzo(b)fluorene	9 B-1
	*Benzonaftotiofene	12 B-1
	*Benzo (c)fenantrene	46 B-1
	Benzo (a)antracene	13 B-1
	*Crisene	5 B-1
C	*Trifenilene	6 B-1
	Benzo(b)fluorantene	15 B-1
	Benzo(J)fluorantene	7. B-1
	Benzo(k)fluorantene	16 B-1
	*Benzo(e)pirene	14 B-1
D	Benzo(a)pirene	4 B-1
	*Perilene	17 B-1
	Indeno(1,2,3,c,d)pirene	18 B-1
	Dibenzo(a,h)antracene	68 B-1
	Benzo(g,h,i)perilene	19 B-1
E	Ciclopenta(c,d)pirene	106000216
	Coronene	106000490
	Dibenzo(a,l)pirene	106000766
	Dibenzo(a,e)pirene	106000503
	Dibenzo(a,i)pirene	106000508
	Dibenzo(a,h)	106000507

6.3 Soluzioni diluite per la calibrazione (IPA 2 mg/l)

La soluzione diluita utilizzata per la calibrazione si ottiene diluendo opportunamente le soluzioni riportate al punto 6.2. utilizzando come solvente il cicloesano.

6.4 Soluzione di p-terfenile o β,β' -binaftile circa 150 mg/l in o *perilene deuterato* 5,0 mg/lcicloesano e/o toluene

Le soluzioni standard utilizzate come standard interno si preparano pesando in un matraccio tarato da 10 ml una quantità di circa 10 mg di idrocarburo e portando a volume con toluene (concentrazione di circa 1000 mg/l).

Successivamente si prepara la soluzione diluita (circa 100 mg/l) diluendo la soluzione madre (1000 mg/l).

6.5 soluzioni standard diluite (10 ug/l; 100 ug/l; 500 ug/l) diluendo la 6.3 con cicloesano.

ARPAM Regione Marche Dipartimento di Ascoli Piceno	METODI DI PROVA	GCI
	DETERMINAZIONE GASCROMATOGRAFICA DEGLI IDROCARBURI POLICICLICI AROMATICI	Rev. 10 Data 06/12/2007 Pagina 3 di 11

Oltre ai composti già citati, il metodo consente la determinazione di altri idrocarburi con caratteristiche simili. La presente metodica consente la determinazione dei seguenti IPA non oggetto di accreditamento SINAL:

- Dibenzotiofene
- Fenantrene
- Antracene
- Fluorantene
- Pirene
- Benzo(b)fluorene
- Benzonaftotiofene
- Benzo(c)fenantrene
- Crisene
- Trifenilene
- Ciclopenta(c,d)pirene
- Benzo(e)pirene
- Perilene
- Coronene
- Dibenzo(a,e)pirene
- Dibenzo(a,i)pirene
- Dibenzo(a,h)pirene
- Dibenzo(a,l)pirene

5. Attrezzature ed apparecchiature

5.1 Bilancia analitica con sensibilità di $\pm 0,00001$ g (ID 4546);

5.2 Vetreria di classe A

5.2 Gascromatografo dotato di colonna capillare e di uno dei seguenti sistemi di iniezione del campione:

- On column: Carlo Erba Mega sistema di misura CI e sistema di misura AT
- Iniettore a temperatura programmabile (PTV): DANI 8520 sistema di misura CH
- Iniettore con la tecnica dello *splitless gas cromatografo con rivelatore a selezione di massa*

6. Campioni e/o materiali di riferimento richiesti

6.1 Soluzioni standard concentrate di IPA (1000 mg/l)

Per la preparazione delle soluzioni di riferimento devono essere impiegati composti certificati di purezza superiore al 98%.

I riferimenti primari (le soluzioni madre) si preparano pesando esattamente in un matraccio tarato da 10 ml una quantità di 10 mg di ciascun idrocarburo e portando a volume con toluene.

6.2 Soluzioni standard diluite di IPA (circa 200 mg/l)

Partendo dalle soluzioni madre preparate al punto 6.1 (concentrazione circa 1000 mg/l), si preparano 5 soluzioni standard contenenti un mix di IPA, soluzione A, B, C, D ed E, a concentrazione di circa 200 mg/l secondo quanto indicato nella tabella, diluendo opportunamente le soluzioni madre preparate secondo il punto 6.1, con cicloesano.

ARPAM Regione Marche Dipartimento di Ascoli Piceno	METODI DI PROVA	GCI
	DETERMINAZIONE GASCROMATOGRAFICA DEGLI IDROCARBURI POLICICLICI AROMATICI	Rev. 10 Data 06/12/2007 Pagina 2 di 11

1. Determinazione gascromatografica degli idrocarburi policiclici aromatici (IPA)

2. Scopo e campo di applicazione

Il presente metodo gascromatografico viene utilizzato dal Laboratorio ARPAM-AP per la determinazione degli IPA nell'estratto purificato proveniente dalla fase P1 con l'impiego di colonne capillari e rivelatore FID o, se necessario, MSD. Il metodo prevede la determinazione quantitativa di alcuni tra i principali idrocarburi policiclici aromatici (IPA). Il riconoscimento e la quantizzazione dei singoli IPA è basata sul confronto dei tempi di ritenzione dei picchi del cromatogramma ottenuto dall'analisi dell'estratto organico purificato con quelli ottenuti da idonee soluzioni di riferimento.

La determinazione quantitativa degli IPA viene effettuata con le aree dei rispettivi picchi cromatografica sulla base di opportuna retta di taratura di soluzioni di riferimento.

3. Descrizione del tipo di materiale da provare

La metodica analitica risulta applicabile ad una larga varietà di prodotti alimentari ed alle principali matrici ambientali:

- Mitili;
- Vegetali acquosi (insalata, carciofi, cicoria, patate, pomodori, pere, mele, nespole, uva, rosmarino, fava, piselli, susine);
- Vegetali oleaginosi (olive, mandorle, noci, pinoli, cocco, girasole);
- Cereali (grano, granturco, orzo);
- Olio di oliva e di semi, burro, margarine;
- Acque di scarico;
- Fanghi di depurazione, terreno, sedimenti, rifiuti e ceneri;

4. Parametri o grandezze e campi di misura da determinare

Con la presente metodica analitica si è in grado di accertare la contaminazione degli alimenti da IPA a livelli di concentrazione compresi tra 5 µg/Kg e 100 µg/Kg di prodotto secco per singolo componente presente nei mitili (E1); tra 0,1 µg/Kg e 5,0 µg/Kg per vegetali acquosi e oleaginosi, cereali, olio di oliva, olio di semi e margarina (E2, E3).

Per le matrici acquose (acque di scarico) il metodo consente di rilevare concentrazioni dei singoli IPA comprese nell'intervallo tra 0,01 µg/l e 1 µg/l (E4)

Per i fanghi di depurazione, i terreni, sedimenti, i rifiuti e le ceneri il metodo consente di rilevare concentrazioni dei singoli IPA comprese tra 5 µg/Kg e 50 µg/Kg sul prodotto secco (E5).

Sono oggetto di accreditamento SINAL i seguenti IPA:

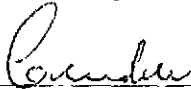
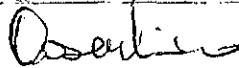

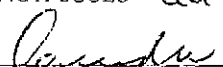
- Benzo(a)antracene
- Benzo(b)fluorantene
- Benzo(j)fluorantene
- Benzo(k)fluorantene
- Benzo(a)pirene
- Benzo(g,h,i)perilene
- Indeno(1,2,3,c,d)pirene
- Dibenzo(a,h)antracene.

ARPAM Regione Marche Dipartimento di Ascoli Piceno	METODI DI PROVA DETERMINAZIONE GASCROMATOGRAFICA DEGLI IDROCARBURI POLICICLICI AROMATICI	GC1 Rev. 10 Data 06/12/2007 Pagina 1 di 11
--	---	--

Indice

1. Determinazione gascromatografica degli Idrocarburi Policiclici Aromatici (IPA)
2. Scopo e campo di applicazione
3. Descrizione del tipo di materiale da provare
4. Parametri o grandezze e campi di misura da determinare
5. Attrezzature e apparecchiature
6. Campioni e/o materiali di riferimento richiesti
7. Condizioni ambientali e periodo di stabilizzazione richiesto
8. Descrizione della procedura
9. Criteri e/o requisiti per l'approvazione / rifiuto
10. Dati da registrare e i metodi di analisi e di presentazione
11. Incertezza e procedure di stima dell'incertezza

LISTA DI DISTRIBUZIONE:	
RS ACQUE RUO MARE	SINAL ISS-ORL

PREPARATO DA:	VERIFICATO DA:	APPROVATO DA:
RESPONSABILE ATTIVITA' CHIMICA ALIMENTI 	RQ 	RS ACQUE, ARIA E RIFIUTI-SUOLO  

ARPAM Regione Marche Dipartimento di Ascoli Piceno	METODI DI PROVA	P1
	PURIFICAZIONE DELL'ESTRATTO GREZZO DEGLI IDROCARBURI POLICICLICI AROMATICI	Rev. 10 Data 31/10/2007 Pagina 7 di 7

LISTA DELLE REVISIONI			
Revisio ne Numero	Data	Modific a del punto	Descrizione delle modifiche
5	03/03	8 10 11	Modifiche apportate a seguito aggiornamento calcolo incertezza di misura su GC1
6	06/03	2, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10	Integrazioni dettagli procedura
7	01/04	3	Eliminazione delle seguenti matrici: carni, formaggi e latte
8	10/04	2	Il metodo interessa solo la matrice acque di scarico.
9	03/06	8.3	Purificazione mediante TLC
10	08/11/2007	8.2	Purificazione degli IPA secondo la procedura analitica DMSO



ARPAM Regione Marche	METODI DI PROVA	PI
Dipartimento di Ascoli Piceno	PURIFICAZIONE DELL'ESTRATTO GREZZO DEGLI IDROCARBURI POLICICLICI AROMATICI	Rev. 10 Data 31/10/2007 Pagina 6 di 7

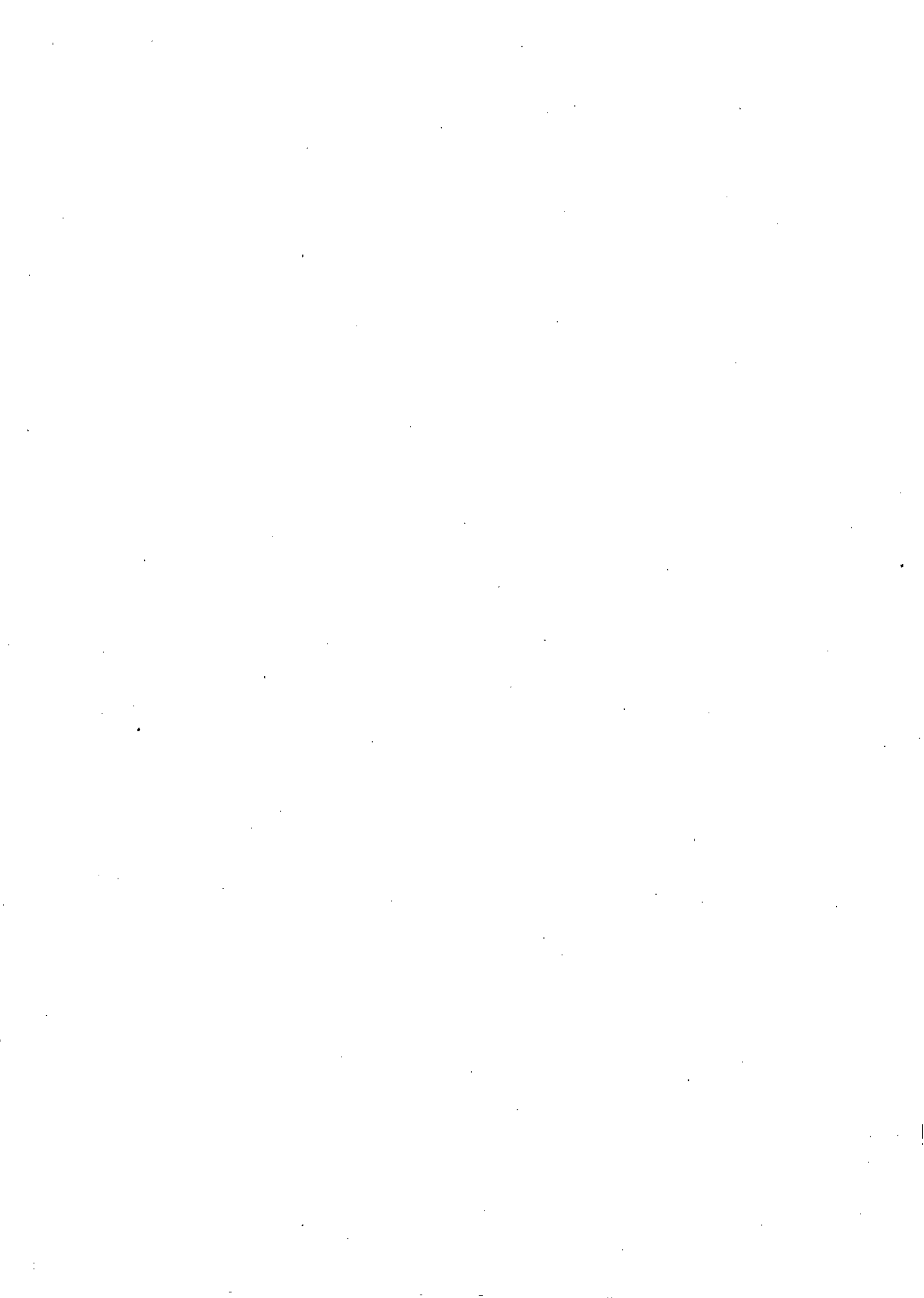
10. Dati da registrare e i metodi di analisi e di presentazione

All'esecuzione del metodo sono preposti gli analisti qualificati dei Servizi del Dipartimento ARPAM-AP, essi riportano le annotazioni relative sul registro dei dati grezzi (esempio fase di lavoro, firma, data).

11. Incertezza o le procedure di stima dell'incertezza

Il metodo è stato validato, a seconda del tipo di matrice, per mezzo di partecipazioni a circuiti interlaboratorio e controlli di qualità coordinati dall'Istituto Superiore di Sanità e mediante l'effettuazione di prove per definirne la ripetibilità.

Maggiori indicazioni sono riportate nella procedura GC1 al punto 11.



ARPAM Regione Marche	METODI DI PROVA	P1
Dipartimento di Ascoli Piceno	PURIFICAZIONE DELL'ESTRATTO GREZZO DEGLI IDROCARBURI POLICICLICI AROMATICI	Rev. 10 Data 31/10/2007 Pagina 5 di 7

8.3 Purificazione mediante TLC

Si semina totalmente il campione sulla linea di partenza di una lastra di silice (8.1.9) lo spessore dello strato di silice può variare a seconda della consistenza del residuo: per gli estratti di acqua minerale è sufficiente uno strato di 0,25 mm di spessore; per le altre matrici si utilizzano lastre di 0,5 o 1 mm di spessore. Tanto più consistente e carico risulta il residuo da seminare, tanto più spesso deve essere lo strato di silice della lastra. Se il residuo si presenta carico di pigmenti tipo clorofilla, derivanti dai prodotti vegetali come la cicoria, l'insalata, i carciofi, le olive non mature, ecc., è necessario procedere ad una purificazione preliminare su colonnina preconfezionata di florisil (8.1.10). Si semina il campione sulla linea di partenza per una *altezza* di 2 ÷ 3 cm avendo cura di aggiungere sopra di esso anche i liquidi di lavaggio della fiala eseguiti con 50 ÷ 100 µl di DCM.

Si eluisce con toluene-esano (50:50) fino a coprire la distanza di 10 cm o 12 cm, dopodiché si osserva velocemente la lastra alla luce di Wood per delimitare la macchia celeste corrispondente agli IPA.

Si gratta la porzione di silice corrispondente agli IPA con una spatola di acciaio flessibile su foglio di carta o di alluminio. Si trasferisce la silice su un tubo con setto di vetro sinterizzato e si eluisce con porzioni da 1 ml di DCM (8.1.4) fino ad ottenere circa 3.0 ml di eluato.

Si evapora cautamente a secco sotto flusso di azoto, si riprende con 0.1 ml di cicloesano e si procede alla determinazione gascromatografica secondo il metodo GC1.

8.4 Purificazione dei campioni ricchi di pigmenti su cartucce di Florisil

Si porta cautamente a secco il campione sotto flusso di azoto, si riprende con 1 ml di cicloesano e si carica sulla cartuccia di florisil raccogliendo l'eluato su una beuta da 50 ml, collo S.N. Si caricano quindi le due porzioni cicloesamiche di lavaggio della fiala (massimo 2 ml) lasciando ogni volta assorbire tutta la soluzione nella fase stazionaria.

Si eluisce, quindi, prima con 6 ml di cicloesano (volume della cartuccia) e poi con 6 ml di cicloesano-cloruro di metilene (70:30) (8.1.8).

Si evapora a circa 1 ml con evaporatore rotante, si trasferisce in fiala da 3,7 ml lavando la beuta con due porzioni di circa 1 ml di DCM e si purifica per TLC come indicato al punto nel metodo P1 al punto 8.3.

8.5 Prova bianco reattivi

Si esegue la determinazione seguendo la stessa procedura analitica indicata nel metodo E1, E2, E3, E4 e E5, impiegando gli stessi reagenti e gli stessi materiali omettendo ovviamente il campione.

9. Criteri e/o requisiti per l'approvazione/rifiuto

I criteri sono indicati nella procedura GC1 al punto 9.

ARPAM Regione Marche	METODI DI PROVA	P1
Dipartimento di Ascoli Piceno	PURIFICAZIONE DELL'ESTRATTO GREZZO DEGLI IDROCARBURI POLICICLICI AROMATICI	Rev. 10 Data 31/10/2007 Pagina 4 di 7

8.1.8 Soluzione di cicloesano-cloruro di metilene distillati (70 : 30);

8.1.9 Lastra di gel di silice, di spessore 0,25 - 0,5 mm o 1,0 mm. lavata con acetone come segue:

Con una matita si tracciano due linee parallele distanti dal bordo 1,5 cm (linea di partenza o di semina del campione) e 13,5 cm (linea di arrivo del solvente a fine corsa cromatografica). Si pone la lastra in una vasca per cromatografia contenente acetone (8.1.5) in quantità tale che la linea di partenza tracciata sulla lastra risulti almeno 0,5 cm sopra al livello del solvente. Si lascia correre il solvente fino a quanto il fronte, generalmente colorato, non arrivi a circa 1 cm dal bordo superiore della lastra. Si estrae la lastra dalla vasca e si lascia asciugare all'aria almeno 1 ora.

8.1.10 Colonnine da 6 ml preconfezionate con Florisil (1g).

8.2 Purificazione degli IPA estratti secondo la procedura analitica al DMSO

Le soluzioni in cloruro di metilene derivanti dall'estrazione degli IPA secondo quanto indicato nei metodi di estrazione E4 ed E5, subiscono direttamente la purificazione su TLC.

La soluzione pentanica derivante dal metodo di estrazione E3 o dal metodo di estrazione E2 o quella isotanica derivante dal metodo di estrazione E1 (saponificazione etanolica), viene, viene estratta per tre volte con DMSO (8.1.1) in imbuto separatore da 100 ml.

La prima estrazione con 15 ml, le altre due con 10 ml ciascuna.

Le soluzioni di DMSO stratificate nella parte inferiore si drenano in imbuto separatore da 250 ml facendo attenzione che esse siano limpide, soprattutto nel caso si tratti di prodotti oleaginosi (eventuali emulsioni nella fase del DMSO possono essere risolte agitando cautamente con una sottile bacchetta di vetro

Si aggiungono 75 ml di acqua distillata e si estrae per tre volte con 50 ml ciascuna di cicloesano (8.1.3). Le soluzioni cicloesamiche riunite si lavano con 100 ml di acqua distillata agitando blandamente per evitare la formazione di emulsione.

La soluzione acquosa sottostante viene eliminata e quella cicloesamica filtrata su sodio solfato anidro (8.1.6) (circa 25 grammi) posto in imbuto con lana di vetro silanizzata e raccolta in beuta o palloncino da 250 ml a collo smerigliato SN. L'eventuale emulsione formatasi nella fase acquosa va risolta con l'ausilio di una sottile bacchetta.

Si eseguono due lavaggi del sodio solfato anidro con 10 ml ciascuna di cicloesano e si evapora la soluzione cicloesamica ottenuta (circa 170 ml) a circa 1 ml tramite evaporatore rotante ($T \leq 40^\circ \text{C}$; $p \leq 60 \text{ cm Hg}$), senza andare a secco. Si trasferisce in fiala da 3,7 ml lavando le pareti della beuta due volte con circa 1.0 ml di CDM e si evapora la soluzione ottenuta a pochi microlitri sotto flusso di azoto.



ARPAM Regione Marche Dipartimento di Ascoli Piceno	METODI DI PROVA	PI
	PURIFICAZIONE DELL'ESTRATTO GREZZO DEGLI IDROCARBURI POLICICLICI AROMATICI	Rev. 10 Data 31/10/2007 Pagina 3 di 7

5. Attrezzature e apparecchiature

- 5.1 Lampada a raggi ultravioletti a 365 nm;
- 5.2 Vetreria di laboratorio di classe A;
- 5.3 Tubo con setto di vetro sinterizzato (diametro interno $\Phi = 2.0$ cm);
- 5.4 Evaporatore rotante.

6. Campioni e/o materiali di riferimento richiesti

Non applicabile.

7. Condizioni ambientali e periodo di stabilizzazione richiesto

Operare sotto aspirazione localizzata ogni qualvolta si adoperi cloruro di metilene, esano, toluene e dimetilsolfossido.

Il recupero degli IPA può risentire sensibilmente delle condizioni operative, nel senso che l'esposizione alla luce solare durante le fasi critiche della procedura analitica, come la saponificazione o la cromatografia su lastra di gel di silice, può determinare una perdita dei componenti più labili come il benzo(a)pirene, pertanto deve essere evitata l'esposizione a luce solare diretta dei campioni a qualunque stadio della procedura.

Utilizzare vetreria dedicata, lavata separatamente per evitare eventuale presenza di tracce di sostanze che possono interferire nella determinazione;

In considerazione dell'attività cancerogena associata a vari IPA nonché al cloruro di metilene, usare gli accorgimenti necessari nella manipolazione dei reagenti e standard, affinché la conservazione, l'uso e lo smaltimento degli IPA, delle loro soluzioni e dei campioni estratti, oltrechè del cloruro di metilene, avvengano sempre con le dovute cautele e nel rispetto della normativa, per non causare danni agli operatori e all'ambiente.

8. Descrizione della procedura

8.1 Reagenti

Nell'esecuzione dell'analisi viene utilizzata acqua distillata e reagenti di grado analitico

- 8.1.1 Dimetilsolfossido RS (DMSO);
- 8.1.2 Pentano di grado analitico;
- 8.1.3 Cicloesano distillato con apparecchio di vetro;
- 8.1.4 Cloruro di metilene distillato con apparecchio di vetro (DCM);
- 8.1.5 Acetone RP distillato con app. di vetro;
- 8.1.6 Solfato di sodio anidro purificato dalle sostanze volatili a 400 °C in stufa per 4 ore;
- 8.1.7 Soluzione di toluene-esano (50:50) per HPLC o distillato;

ARPAM Regione Marche	METODI DI PROVA	P1
Dipartimento di Ascoli Piceno	PURIFICAZIONE DELL'ESTRATTO GREZZO DEGLI IDROCARBURI POLICICLICI AROMATICI	Rev. 10 Data 06/12/07 Pagina 2 di 7

1. Purificazione dell'estratto grezzo degli IPA

2. Scopo

La presente tecnica eseguita per mezzo della ripartizione liquido-liquido e della cromatografia su strato sottile e consente di purificare gli estratti grezzi degli IPA.

3. Descrizione del tipo di materiale da provare

La presente tecnica di purificazione si applica agli estratti grezzi degli IPA ottenuti dalle estrazioni E1, E2, E3, E4 ed E5 valide per una larga varietà di prodotti alimentari e per le principali matrici ambientali.

In particolare:

- E1 Miti.
- E2 Vegetali acquosi (insalata, carciofi, cicoria, patate, pomodori, pere, mele, nespole, uva, rosmarino, fava, piselli, susine, ecc.).
Vegetali oleaginosi (olive, mandorle, noci, pinoli, cocco, girasole).
Cereali (grano, granturco, orzo).
- E3 Olio di oliva e di semi, burro, margarine
- E4 Acque reflue urbane ed industriali
- E5 Fanghi di depurazione, terreni, sedimenti, rifiuti e ceneri

4. Parametri o grandezze e campi di misura da determinare

In particolare gli IPA che vengono determinati sono:

- Benzo(a)antracene,
- Benzo(b+j+k)fluoranteni,
- Benzo(a)pirene,
- Benzo(ghi)perilene,
- Indeno(1.2.3 cd)pirene,
- Dibenzo(ah)antracene.

ARPAM Regione Marche Dipartimento di Ascoli Piceno	METODI DI PROVA	P1
	PURIFICAZIONE DELL'ESTRATTO GREZZO DEGLI IDROCARBURI POLICICLICI AROMATICI	Rev. 10 Data 06/12/2007 Pagina 1 di 7

Indice

- 1 Purificazione dell'estratto grezzo degli Idrocarburi Policiclici Aromatici(IPA)
- 2 Scopo e campo di applicazione
- 3 Descrizione del tipo di materiale da provare
- 4 Parametri o grandezze e campi di misura da determinare
- 5 Attrezzature e apparecchiature
- 6 Campioni e/o materiali di riferimento richiesti
- 7 Condizioni ambientali e periodo di stabilizzazione richiesto
- 8 Descrizione della procedura
- 9 Criteri e/o requisiti per l'approvazione / rifiuto
- 10 Dati da registrare e i metodi di analisi e di presentazione
- 11 Incertezza o le procedure di stima dell'incertezza

LISTA DI DISTRIBUZIONE:	
RS ACQUE RUO MARE	SINAL ISS-ORL

PREPARATO DA: RESPONSABILE ATTIVITÀ CHIMICA/ALIMENTI <i>[Signature]</i>	VERIFICATO DA: RQ <i>[Signature]</i>	APPROVATO DA: RS ACQUE, ARIA E RIFIUTI-SUOLO <i>[Signature]</i>
--	---	---

ARPAM Regione Marche Dipartimento di Ascoli Piceno	METODI DI PROVA	E3
	ESTRAZIONE DI IDROCARBURI POLICICLICI AROMATICI DAI GRASSI DI ORIGINE VEGETALE	Rev. 10 Data 06/12/2007 Pagina 4 di 4

LISTA DELLE REVISIONI			
Revisi one Nume ro	Data	Modifica del punto	Descrizione delle modifiche
5	03/2003	1 9 11 12	Per revisione delle fasi P1 e GC1
6	06/03	4 7 3,6,8,10	Inserimento del limite di rivelabilità e campo di applicazione Modalità di conservazione dei campioni da analizzare Integrazioni dettagli procedura.
7	01/04		Eliminazione della matrice "grassi di origine animale"
8	10/04	10	Conservazione dei report strumentali
9	03/06		Modifiche effettuate sulle sezioni P1 e GC1
10	08/11/2007	2	Riferimenti normativi di settore

ARPAM Regione Marche	METODI DI PROVA	E3
Dipartimento di Ascoli Piceno	ESTRAZIONE DI IDROCARBURI POLICICLICI AROMATICI DAI GRASSI DI ORIGINE VEGETALE	Rev. 10 Data 06/12/2007 Pagina 3 di 4

7.1 Modalità di conservazione dei campioni

I campioni da analizzare vengono stoccati nella stanza 307 (dispensa ID 6610) se non deperibili, altrimenti vengono conservati ad una temperatura di circa 4 °C (ID 6400-corridoio 301) oppure a in congelatore (ID 6389 -corridoio 301).

8. Descrizione della procedura

Il presente metodo prevede la semplice dissoluzione dell'olio o grasso in pentano senza alcun trattamento preliminare del campione.

8.1 Reagenti per l'estrazione degli IPA

8.1.1 Pentano

8.1.2 S.I. - Soluzione di p-terfenile o β , β' -binaftile 150 mg/l e perilene 12 deuterat 5 mg/l in cicloesano e/o toluene.

8.2 Procedimento operativo

10 g di prodotto vengono addizionati di 5 μ l di S.I.(8.1.2), dissolti in 25 ml di pentano (8.1.1) e purificati secondo la procedura indicata nel metodo P1 al punto 9.1.

9 Criteri e/o requisiti per l'approvazione / rifiuto

I criteri sono indicati nella procedura GC1 al punto 9.

10 Dati da registrare e i metodi di analisi e di presentazione

All'esecuzione del metodo sono preposti gli operatori qualificati come da "Tabella metodi prova – Personale qualificato". I dati grezzi vengono riportati da tali operatori su apposito registro "Dati grezzi Alimenti", firmati dall'analista e validati dal responsabile addetto per la successiva stesura dei rapporti di prova. I reports strumentali vengono conservati in archivio.

11 Incertezza o le procedure di stima dell'incertezza

Le indicazioni sono riportate nel modello MD-T-100

ARPAM Regione Marche	METODI DI PROVA	E3
Dipartimento di Ascoli Piceno	ESTRAZIONE DI IDROCARBURI POLICICLICI AROMATICI DAI GRASSI DI ORIGINE VEGETALE	Rev. 10 Data 06/12/2007 Pagina 2 di 4

1 Estrazione degli IPA dai grassi di origine animale e vegetale

2 Scopo

La presente metodica si applica agli olii di oliva e di semi, al burro e alla margarina per ottenere gli estratti grezzi degli IPA da sottoporre alle successive fasi di purificazione (P1) e analisi gascromatografica (GC1).

2.1 Riferimenti bibliografici e normativi:

- *Direttiva 2005/01/CE della commissione del 04/02/2005 recante definizioni dei metodi di campionamento e di analisi per il controlli ufficiale del tenore di benzo(a)pirene nelle derrate alimentari*

3 Descrizione del tipo di materiale da provare

Si applica a matrici grasse di origine vegetale (olio di oliva, di semi, di cocco, ecc.).

Lo smaltimento dei campioni e dei prodotti analizzati avviene secondo quanto indicato nella PG 18.

4 Parametri o grandezze e campi di misura da determinare

In particolare gli IPA che vengono determinati sono:

Benzo(a)antracene, benzo(b)fluorantene, benzo(k)fluorantene benzo(a)pirene, benzo(ghi)perilene, indeno(1.2.3 cd)pirene, dibenzo(ah)antracene.

Il campo di applicazione ed il limite di determinazione del metodo consentono la quantificazione degli IPA con un limite di determinazione per matrici grasse di 0,1 µg/Kg per ogni IPA (campo di misura da 0,1 a 5 µg/Kg)

5 Attrezzature e apparecchiature

- 5.1 Vetreria di laboratorio di classe A;
- 5.2 Bilancia tecnica con sensibilità di ± 0,01 g. (ID 4419, ID 4524).

6 Campioni e/o materiali di riferimento richiesti

Non applicabile

7 Condizioni ambientali e periodo di stabilizzazione richiesto

Il recupero degli IPA può risentire sensibilmente delle condizioni operative, nel senso che l'esposizione alla luce solare durante le fasi critiche della procedura analitica, come la cromatografia su lastra di gel di silice può determinare una perdita dei componenti più labili come il benzo(a)pirene. Deve essere evitata l'esposizione a luce solare diretta dei campioni a qualunque stadio della procedura.

Utilizzare vetreria dedicata, lavata separatamente per evitare eventuale presenza di tracce di sostanze che possono interferire nella determinazione;

Usare gli accorgimenti necessari nella manipolazione dei reagenti e standard, osservando le eventuali indicazioni fornite dal produttore nell'etichetta del contenitore.

06ARPAM Regione Marche	METODI DI PROVA	E3
Dipartimento di Ascoli Piceno	ESTRAZIONE DI IDROCARBURI POLICICLICI AROMATICI (IPA) DAI GRASSI DI ORIGINE VEGETALE	Rev. 10 Data 06/12/2007 Pagina 1 di 4

Indice

- 1 Estrazione degli Idrocarburi Policiclici Aromatici (IPA) dai grassi di origine vegetale
- 2 Scopo e campo di applicazione
- 3 Descrizione del tipo di materiale da provare
- 4 Parametri o grandezze e campi di misura da determinare
- 5 Attrezzature e apparecchiature
- 6 Campioni e/o materiali di riferimento richiesti
- 7 Condizioni ambientali e periodo di stabilizzazione richiesto
- 8 Descrizione della procedura
- 9 Criteri e/o requisiti per l'approvazione / rifiuto
- 10 Dati da registrare e i metodi di analisi e di presentazione
- 11 Incertezza o le procedure di stima dell'incertezza

LISTA DI DISTRIBUZIONE:	
RS ACQUA, ARIA Responsabile attività chimica alimenti	SINAL ISS-ORL

PREPARATO DA: RESPONSABILE ATTIVITÀ CHIMICA ALIMENTI <i>Casadei</i>	VERIFICATO DA: RQ <i>Osse</i>	APPROVATO DA: RS ACQUE <i>Casadei</i>
--	----------------------------------	---

ARPAM REGIONE MARCHE	METODI DI PROVA	E3-P1-GC1
DIPARTIMENTO DI ASCOLI PICENO	DETERMINAZIONE DI IDROCARBURI POLICICLICI AROMATICI NEI GRASSI DI ORIGINE VEGETALE	REV 10 DATA 06/12/07 PAGINA 1 DI 1

INDICE

**E3: ESTRAZIONE DEGLI IDROCARBURI POLICICLICI AROMATICI DAI
 PRODOTTI GRASSI VEGETALE**

**P1: PURIFICAZIONE DELL'ESTRATTO GREZZO DEGLI IDROCARBURI
 POLICICLICI AROMATICI**

**GC1: DETERMINAZIONE GASCROMATOGRAFICA DEGLI IDROCARBURI
 POLICICLICI AROMATICI**

Lista di distribuzione come da MD-DG-152	

PREPARATO DA: Responsabile attività chimica alimenti <i>Candace</i>	VERIFICATO DA: RQ <i>Oschi</i>	APPROVATO DA: RS Acque <i>Candace</i>
--	--------------------------------------	---