

DETERMINAZIONE DELLA EPICLORIDRINA. METODO PER ESTRAZIONE IN FASE SOLIDA ED ANALISI MEDIANTE GASCROMATOGRAFIA ACCOPPIATA ALLA SPETTROMETRIA DI MASSA (GC- MS) E/O GASCROMATOGRAFIA CON RIVELAZIONE A CATTURA DI ELETTRONI (GC-ECD)

0. Generalità e definizioni

L'epicloridrina (1-cloro-2,3-epossipropano) è una molecola che appartiene alla classe degli epossidi e quindi possiede una elevata reattività generata dalla forte tensione presente all'interno dell'anello triatomico con conseguente attitudine al processo di apertura del medesimo.

Tale proprietà chimica giustifica l'impiego, tra l'altro, dell'epicloridrina quale molecola di partenza per la sintesi di polimeri utilizzati per il rivestimento di materiali a contatto con l'acqua destinata al consumo umano, di polielettroliti cationici destinati alla chiariflocculazione delle acque reflue e superficiali e, in misura minore, di resine a scambio ionico.

In base alle evidenze sperimentali fino ad oggi acquisite, l'epicloridrina è un liquido tossico ed è stato incluso dalla IARC nel Gruppo 2A in quanto considerato "probabile cancerogeno" per l'uomo.

La normativa nazionale vigente in attuazione della direttiva 98/83/CE relativa alla qualità delle acque destinate al consumo umano stabilisce per l'epicloridrina un valore di parametro pari a 0,10 µg/L.

Il metodo proposto per la determinazione dell'epicloridrina (Documento CEN/TC adattato) prevede la preliminare estrazione in fase solida dell'analita e la rivelazione mediante GC-MS oppure, in alternativa, mediante GC-ECD.

0.1. Definizioni

0.1.1. Standard interno (internal standard)

Lo standard interno è un composto che viene addizionato al campione, nel caso dell'analisi diretta, o all'estratto prima dell'analisi strumentale. Lo standard interno deve possedere un comportamento cromatografico molto simile a quello dell'analita da determinare, non deve essere interferito da alcuna specie chimica e deve essere rappresentato da una molecola, stabile nel tempo, con formula di struttura simile a quella dell'analita o da una molecola con comportamento chimico-fisico simile. L'impiego dello standard interno è utile ai fini dell'analisi quantitativa in quanto elimina gli errori generati dalle fluttuazioni di volume subito dalla soluzione in esame e dalla soluzione iniettata; esso consente di determinare, da una retta di taratura ottenuta da soluzioni primarie di riferimento esprimendo il segnale y come rapporto $\text{Area}_{\text{analita}}/\text{Area}_{\text{standard interno}}$ in funzione della concentrazione x dell'analita, il recupero analitico per un campione arricchito con l'analita.

0.1.2. Standard di processo (surrogate)

Lo standard di processo o standard surrogato è una specie chimica che viene aggiunta al campione prima di essere processato cioè prima di essere sottoposto al trattamento preliminare che precede l'analisi strumentale. Uno standard di processo deve possedere un comportamento cromatografico molto simile o identico a quello dell'analita da determinare e quindi sarà rappresentato da una molecola, stabile nel tempo, con formula di struttura simile (ma non necessariamente) o identica

(opzione preferibile) a quella dell'analita ma differente soltanto per la marcatura in uno o più siti della molecola con lo stesso isotopo stabile.

La presenza dello standard di processo è utile ai fini dell'analisi quantitativa in quanto ci dispensa dal calcolo del recupero analitico e consente di eliminare gli errori derivanti dalle fluttuazioni di volume della soluzione in esame e della soluzione iniettata, gli errori provocati dalla perdita di analita a causa di perdite di campione durante il suo pretrattamento e infine gli errori generati dalla perdita di analita dovuta all'effetto matrice in conseguenza della analogia di comportamento tra l'analita e lo standard di processo.

0.1.3. Limite di quantificazione (o di determinazione)

È la più bassa concentrazione di analita che può essere misurata con un accettabile valore di esattezza e precisione; pertanto, quando il valore di concentrazione di un analita in un campione risulti inferiore al limite di quantificazione, non possiamo assegnare alla misurazione effettuata il corrispondente grado di incertezza.

0.1.4. Intervallo lineare della curva di taratura

È un insieme di valori di concentrazione nel quale la curva di taratura risulta lineare.

0.2. Abbreviazioni e acronimi

IARC	International Agency for Research On Cancer
GC-MS	gascromatografia accoppiata alla spettrometria di massa (ogascromatografia con rivelatore a selezione di massa)
GC-ECD	gascromatografia con rivelatore a cattura di elettroni
EI	Electron Impact
TIC	Total Ion Current
SIC	Selected Ion Current

0.3. Misure di sicurezza

La "probabile cancerogenicità" per l'uomo di questa sostanza impone tutta una serie di misure precauzionali da adottare da parte degli operatori ad essa esposti. Tali misure comprendono l'uso di equipaggiamento protettivo idoneo a prevenire il contatto di questa molecola con la cute e gli occhi e l'adozione di un sistema di aspirazione durante le operazioni analitiche per evitare l'inalazione della molecola stessa. Per la sua infiammabilità e possibilità di formare una miscela esplosiva con l'aria il liquido deve essere custodito in un locale isolato, fresco e bene aerato e deve essere conservato lontano da sostanze ossidanti, da acidi, da basi e da alogenuri. E' da evitare infine il contatto dell'epicloridrina, in quantità discreta, con l'acqua e lo smaltimento nelle fognature che potrebbe innescare un possibile incendio o un'esplosione oltre che contaminare l'ambiente.

1. Campo di applicazione

La procedura riportata è applicabile alla determinazione della epicloridrina nell'acqua destinata al consumo umano e consente di raggiungere un limite di quantificazione pari a 0,5 µg/L per l'analisi di routine, riducibile ulteriormente a 0,1 µg/L.

2. Principio del metodo

Con il metodo descritto, il campione di volume non superiore a 100 mL viene inizialmente sottoposto ad estrazione in fase solida utilizzando come materiale adsorbente un gruppo ionogeno fissato al copolimero stirene-divinilbenzene (5.4.) per la preconcentrazione dell'epicloridrina. L'analita viene

successivamente separato, rivelato e quantificato mediante GC-MS e, in alternativa, mediante GC-ECD.

3. Interferenze e cause di errori

3.1. Interferenze derivanti dalla procedura di campionamento

Al fine di minimizzare la contaminazione del campione da parte di eventuali interferenti introdotti durante la fase di campionamento, si raccomanda l'adozione di particolari accorgimenti consigliati in (4.) rispettando le indicazioni descritte nelle norme ISO 5667-1, ISO 5667-2 e ISO 5667-3.

3.2 Interferenze derivanti dalla spettrometria di massa

Nello spettro di massa dell'epicloridrina figurano due coppie di ioni una a m/z 49 e m/z 51 e l'altra a m/z 62 e m/z 64, ognuna con intensità relative nel rapporto 1:3 e corrispondenti alle forme isotopiche del ^{35}Cl e del ^{37}Cl . Ai fini della identificazione, la coppia di ioni a m/z 62 e m/z 64 viene esclusa in quanto interferita dalla coppia di ioni a m/z 64 e m/z 66 presente nello spettro di massa dello standard di processo $^{13}\text{C}_3$ -epicloridrina che possiede lo stesso tempo di ritenzione dell'epicloridrina. Ai fini dell'analisi quantitativa si utilizzano per la $^{13}\text{C}_3$ -epicloridrina gli ioni a m/z 50 e m/z 52 e per l'etil, 2-cloropropionato, se usato come standard di processo nettamente separato dall'epicloridrina, gli ioni a m/z 63, m/z 65, m/z 91 e m/z 93.

3.3. Perdita di analita derivante dalla instabilità della epicloridrina

L'emivita della epicloridrina in acqua a pH 7 e a 20°C è pari a 6,2 giorni e a valori di pH diversi da 7 si abbassa ulteriormente. Pertanto, per ridurre al minimo la perdita di analita, il campione, a prelievo avvenuto, deve essere trasportato e processato in laboratorio nel più breve tempo possibile. In caso contrario è necessario conservare il campione in un intervallo di temperature compreso tra +2°C e +5°C per un periodo limitato.

3.4. Perdita di analita derivante dalla procedura di estrazione in fase solida

La procedura di estrazione in fase solida si compone di due modalità che sono l'adsorbimento e l'eluizione dell'analita. Onde evitare perdite di analita è opportuno, conclusa la fase di adsorbimento, mantenere la quantità di acqua residua nell'adsorbente ad un livello definito e verificato visivamente (8.1.2.).

4. Campionamento e conservazione dei campioni

Il campionamento deve essere eseguito in accordo con le indicazioni previste dalle norme ISO 5667-1, ISO 5667-2, ISO 5667-3 e ISO 5667-5.

Si utilizzano – previo accurato lavaggio - bottiglie di vetro marrone (5.2.) del volume di 500 mL riempite completamente con il campione.

Qualora si sospetti o sia nota la presenza, nel campione in esame, di cloro libero o di altri agenti ossidanti usati per la disinfezione è opportuno aggiungere al contenitore, prima dell'operazione di prelievo, circa 100 mg/L di tiosolfato di sodio (6.3.) o di altro composto ad attività riducente.

A causa della instabilità idrolitica dell'epicloridrina, la conservazione del campione rappresenta una fase estremamente critica e decisiva che richiede il rigoroso rispetto delle condizioni indicate in (3.3.).

5. Apparecchiatura

5.1. Attrezzatura comune di laboratorio

Tutta la vetreria e i contenitori, prima del loro uso, devono essere accuratamente lavati con detergenti per vetreria e risciacquati in successione con acqua di rubinetto, acqua bidistillata (6.1.) e acetone (6.2.2.), allo scopo di allontanare i possibili interferenti che potrebbero alterare il risultato analitico.

5.2. Bottiglia in vetro marrone

Utilizzare, per il campionamento, una bottiglia accuratamente pulita da 500 mL in vetro scuro con tappo a vite e controtappo in politetrafluoroetilene (Teflon).

5.3. Matraccio(i) tarato da 100 mL

In vetro a fondo piatto, munito di tappo

5.4 Materiale per l'estrazione in fase solida

Come fase solida vengono impiegati gruppi ionogeni fissati al copolimero prodotto per copolimerizzazione di stirene con divinilbenzene, disponibile in commercio in cartucce da 3mL e 6 mL (o in colonnine di vetro) riempite con una quantità minima di 200 mg di adsorbente. Viene richiesto un recupero minimo di analita dell'80%. Tale materiale deve essere sottoposto ad una procedura di condizionamento (8.1.1.) prima dell'uso.

5.5. Dispositivo per l'aspirazione sotto vuoto

Di corrente dotazione in laboratorio.

5.6. Dispositivo per l'evaporazione in corrente di azoto

Di corrente dotazione in laboratorio.

5.7. Flaconcini in vetro (vial) e

Muniti di setti in gomma siliconica rivestita di Teflon e ghiera metalliche per chiusura ermetica con pinza piegatrice.

5.8 Microsiringhe

Del tipo per iniezione manuale o automatica in colonna gascromatografica.

Per l'iniezione manuale o automatica dell'estratto in colonna gascromatografica si consigliano flaconcini (vial) in vetro scuro, a fondo conico e graduati, di volume idoneo, provvisti di setti in gomma siliconica monouso rivestiti da uno strato di Teflon e di ghiera metalliche da sigillare con una pinza piegatrice. I setti vengono estratti con aliquote successive di n-pentano (6.2.3) ed essiccati per una notte in termostato a 70-80°C. Per il prelievo di volumi noti di estratto da iniettare nella colonna gascromatografica, si impiegano microsiringhe in vetro di volume idoneo.

5.9. Strumentazione analitica ed accessori

5.9.1. Gas cromatografo con rivelatore selettivo del tipo a cattura di elettroni (GC-ECD)

5.9.1.1. Sistema analitico

Il sistema è costituito, in sequenza, da:

- a) autocampionatore: tale dispositivo per l'iniezione automatica è l'opzione preferibile. In alternativa si possono effettuare iniezioni manuali utilizzando microsiringhe come riportato in (5.7)
- b) Iniettore split/splitless, on-column o vaporizzatore a temperatura programmabile (PTV) gascromatografo
- c) colonna gas cromatografica in silice fusa di lunghezza 30 m, con diametro interno 0,25 mm e spessore di fase stazionaria (a base di polisilossano o glicolepolietilenico) 0,25 μ m, o altre equivalenti.
- d) rivelatore a cattura di elettroni

5.9.1.2. Operazioni preliminari per l'analisi GC-ECD

Attivare autocampionatore (se disponibile), gas cromatografo e rivelatore a cattura di elettroni predisponendoli al funzionamento secondo le specifiche indicate dal produttore. Dopo ripetute operazioni di condizionamento sotto flusso di gas della colonna capillare scollegata all'uscita dal rivelatore, ottimizzare ai fini della separazione le seguenti condizioni operative:

- temperatura dell'iniettore
 - programma di temperatura del forno
 - flusso del gas di trasporto e dell'eventuale gas ausiliario (make up)
- rapporto di splittaggio
- idoneo volume di analita da iniettare in colonna

5.9.2. Gas cromatografo con rivelatore a selezione di massa (spettrometro di massa) (GC-MS)

5.9.2.1. Sistema analitico

Il sistema è costituito, in sequenza, da:

- a) autocampionatore tale dispositivo per l'iniezione automatica è l'opzione preferibile. In alternativa si possono effettuare iniezioni manuali utilizzando microsiringhe come riportato in (5.7.)
- b) gascromatografo
- c) colonna gas cromatografica in silice fusa di lunghezza 30 m, con diametro interno 0,25 mm e spessore di fase stazionaria (a base di polisilossano o glicolepolietilenico) 0,25 μ m, o altre equivalenti
- d) rivelatore a selezione di massa

5.9.2.2. Operazioni preliminari per l'analisi GC-MS

Attivare autocampionatore (se disponibile), gas cromatografo e rivelatore a selezione di massa predisponendoli al funzionamento secondo le specifiche indicate dal produttore. Dopo ripetute operazioni di condizionamento sotto flusso di gas della colonna capillare scollegata all'uscita dal rivelatore, ottimizzare ai fini della separazione le seguenti condizioni operative:

- temperatura dell'iniettore

Versione on-line su sito www.iss.it

- programma di temperatura del forno
- flusso del gas di trasporto
- rapporto di splittaggio
- temperatura del transfer line
- idoneo volume di analita da iniettare in colonna

5.9.3. Gas di trasporto UPP (> 99,9995 %)

Per l'analisi in GC-MS e in GC-ECD impiegare elio ulteriormente purificato *on line* mediante setacci molecolari o con altro sistema equivalente.

5.9.4. Azoto

L'azoto da utilizzare per la rimozione dell'acqua al termine della fase di estrazione del campione (7.1.2.), deve possedere un grado di purezza minimo pari al 99,996 % (V/V).

6. Reagenti

I solventi ed i reagenti devono possedere un grado di purezza idoneo per l'analisi dei residui o comunque equivalente.

6.1. Acqua

Per la preparazione delle soluzioni di riferimento (6.4.) e per il risciacquo finale della vetreria deve essere usata acqua bidistillata o acqua di purezza equivalente e comunque esente da impurezze che potrebbero interferire e quindi alterare il risultato analitico finale.

6.2. Solventi

Tutti i solventi devono essere di grado analitico e possedere requisiti speciali che li rendano idonei all'impiego in gascromatografia

6.2.1. Metanolo, CH₃OH

6.2.2. Diisopropiletere, C₆H₁₄O

6.2.3. Acetone, C₃H₆O

6.2.4. n-Pentano, C₅H₁₂

6.3. Composti ad attività riducente, per es. sodio tiosolfato (Na₂S₂O₃)

6.4. Soluzioni di riferimento

6.4.1. Soluzioni primarie di riferimento

Sono soluzioni ottenute solubilizzando in un determinato volume di un adatto solvente una quantità esattamente pesata di un materiale di riferimento (analita, standard interno, standard di processo), ad elevato grado di purezza e preferibilmente "certificato" o comunque garantito. Possono essere

reperibili in commercio in concentrazione nota o si possono preparare direttamente in laboratorio. Le soluzioni primarie di riferimento sono molto concentrate e conseguentemente risultano stabili anche per molti mesi, a condizione che siano conservate al buio, a basse temperature e in appropriati contenitori di vetro muniti di tappo a tenuta perfetta.

6.4.1.1. Soluzione primaria di riferimento di epicloridrina (C_3H_5ClO)

Pesare circa 50 mg, esattamente pesati, di epicloridrina in un matraccio tarato da 100 mL e portare a volume con diisopropilene (6.2.2); la soluzione così ottenuta ha una concentrazione di epicloridrina pari a circa 0,5 mg/mL.

Se conservata in un intervallo di temperature compreso tra +2°C e +5°C, tale soluzione risulta stabile per circa 6 mesi e ne va verificata la concentrazione prima di ogni indagine analitica.

6.4.1.2. Soluzione primaria di riferimento di standard di processo $^{13}C_3$ -epicloridrina per l'analisi in GC-MS

Questa soluzione può essere reperibile in commercio in concentrazione certificata (per es. 100 µg/mL in nonano) oppure può essere preparata partendo dal corrispondente materiale di riferimento analogamente a quanto previsto per la soluzione primaria di riferimento di epicloridrina (6.4.1.1.).

6.4.1.3. Soluzione primaria di riferimento di standard di processo etil, 2-cloropropionato ($C_5H_9ClO_2$) per l'analisi in GC-ECD

Questa soluzione può essere preparata partendo dal corrispondente materiale di riferimento analogamente a quanto previsto per la soluzione primaria di riferimento di epicloridrina (6.4.1.1.).

6.4.2. Soluzioni secondarie di riferimento

Sono soluzioni che vengono preparate di recente diluendo opportunamente le soluzioni primarie di riferimento (6.4.1.); la loro concentrazione deve essere tale da permettere poi la realizzazione delle soluzioni acquose di taratura le cui concentrazioni devono essere comprese all'interno dell'intervallo lineare della curva di calibrazione (0.1.4.). Essendo soluzioni diluite, possiedono una stabilità più limitata nel tempo e quindi richiedono un periodo di conservazione a temperature refrigerate più ridotto.

6.4.2.1. Soluzioni secondarie di riferimento di epicloridrina

Partendo dalla soluzione primaria di riferimento di epicloridrina (6.4.1.1.) si preparano, di recente, per opportune diluizioni almeno 5 soluzioni del volume di 100 mL in diisopropilene (6.2.2.) a 5 diversi livelli di concentrazione (ISO 8466-1) conservate a temperature comprese tra +2°C e +5°C per un periodo non superiore ad un mese.

6.4.2.2. Soluzione secondaria di riferimento di standard di processo $^{13}C_3$ -epicloridrina per l'analisi in GC-MS

Per preparare questa soluzione, si supponga di disporre di una soluzione primaria di riferimento di $^{13}C_3$ -epicloridrina (6.4.1.2) in concentrazione pari a 100 µg/mL in nonano; prelevandone 100 µL e solubilizzandoli in 1 mL di diisopropilene (6.2.2.) otterremo la soluzione secondaria di riferimento in concentrazione pari a 10 µg/mL.

Dato che l'area prodotta dalla $^{13}C_3$ -epicloridrina nella soluzione di taratura e nel campione deve essere equivalente all'area prodotta da 1 µg/L di epicloridrina, prelevando successivamente 10 µL (e non più di 100 µL onde prevenire l'ottenimento di bassi valori di recupero) di quest'ultima soluzione e addizionandoli a 100 mL di acqua (6.1.) (o 100 mL di un

campione di acqua), si realizza una soluzione acquosa in concentrazione pari a 1 µg/L di 13C3-epicloridrina.

6.4.2.3. Soluzione secondaria di riferimento di standard di processo etil, 2-cloropropionato per l'analisi in GC-ECD

Per preparare questa soluzione, si supponga di disporre di una soluzione primaria di riferimento di etil, 2-cloropropionato (6.4.1.3.) in concentrazione pari a 100 µg/mL in nonano; prelevandone 100 µL e solubilizzandoli in 1 mL di diisopropil etero (6.2.2.) otterremo la soluzione secondaria di riferimento in concentrazione pari a 10 µg/mL.

Dato che l'area prodotta dal etil, 2-cloropropionato nella soluzione di taratura e nel campione deve essere equivalente all'area prodotta da 1 µg/L di epicloridrina, prelevando successivamente 10 µL (e non più di 100 µL onde prevenire l'ottenimento di bassi valori di recupero) di quest'ultima soluzione e addizionandoli a 100 mL di acqua (6.1.) (o 100 mL di un campione di acqua), realizzeremo una soluzione acquosa in concentrazione pari a 1 µg/L di etil, 2-cloropropionato.

7. Taratura

7.1. Requisiti generali

Verificare che almeno 5 punti a diversi livelli equidistanti di concentrazione (ISO 8466-1) siano compresi nell'intervallo lineare (8.4. e 8.5.) della curva di taratura (0.1.4.). Data la variabilità conseguente alla dipendenza dalle condizioni gascromatografiche, verificare periodicamente la validità dell'equazione corrispondente alla retta di taratura, ricavata con il metodo dei minimi quadrati, processando ed analizzando due suoi punti.

7.1.1. Soluzioni di taratura

Sono soluzioni contenenti epicloridrina, ad almeno cinque diversi ma equamente spazati livelli di concentrazione (ISO 8466-1), e standard di processo in concentrazione identica a quella realizzata nel campione. La soluzione corrispondente al primo punto della retta di taratura deve possedere una concentrazione di analita molto prossima, ma leggermente superiore, al limite di quantificazione, le altre soluzioni devono possedere concentrazioni comprese nell'intorno della concentrazione del campione e all'interno dell'intervallo di linearità (0.1.4.) della curva di taratura.

Preparare le soluzioni di taratura, di recente, solubilizzando per es. 10 µL (e non più di 100 µL) di ognuna delle soluzioni secondarie di riferimento di epicloridrina e standard di processo in 100 mL di acqua (6.4.2.1., 6.4.2.2, 6.4.2.3).

In Tabella 1 viene rappresentato uno schema esemplificativo per la realizzazione di sei soluzioni di taratura da impiegare per l'analisi quantitativa nella modalità GC-MS, diluendo opportunamente la soluzione primaria di riferimento di epicloridrina (in concentrazione per es. pari a 0,5 mg/mL) fino ad ottenere sei soluzioni secondarie di riferimento di epicloridrina a concentrazione crescente; per successive diluizioni di uguali volumi delle stesse e della soluzione secondaria di riferimento di 13C3-epicloridrina (in concentrazione per es. pari a 0,01 mg/mL) si ottengono sei soluzioni di taratura contenenti l'epicloridrina in concentrazione crescente e lo standard di processo 13C3-epicloridrina in concentrazione costante (1 µg/L).

In Tabella 2 viene rappresentato uno schema esemplificativo per la realizzazione di sei soluzioni di taratura da impiegare per l'analisi quantitativa nella modalità GC-ECD, diluendo opportunamente la soluzione primaria di riferimento di epicloridrina (in concentrazione per es. pari a 0,5 mg/mL) fino ad ottenere sei soluzioni secondarie di riferimento di epicloridrina a concentrazione crescente; per successive diluizioni di uguali volumi delle stesse e della soluzione secondaria di riferimento di etil, 2-cloropropionato (in concentrazione per es. pari a 0,01 mg/mL) si ottengono sei soluzioni di taratura

contenenti l'epicloridrina in concentrazione crescente e lo standard di processo etil, 2-cloropropionato in concentrazione costante (1 µg/L).

Le soluzioni di taratura devono essere processate analogamente al campione di acqua e devono essere in numero non inferiore a cinque al fine di ottenere bassi valori del limite di confidenza al 95% per i valori della pendenza e dell'intercetta nella equazione della retta di taratura.

Tabella 1. Soluzioni di taratura per l'analisi GC-MS

soluzione primaria di riferimento di epicloridrina (6.4.1.1) in c = 0,5 mg/mL da solubilizzare in 100 mL di diisopropiletere	soluzione secondaria di riferimento di epicloridrina concentrazione in mg/mL	soluzione secondaria di riferimento di epicloridrina mL da solubilizzare in 100 mL di acqua (6.1.)	soluzione secondaria di riferimento di ¹³ C ₃ -epicloridrina in c = 0,01 mg/mL mL da solubilizzare in 100 mL di acqua (6.1.)	Soluzioni di taratura	
				epicloridrina µg/L	¹³ C ₃ -epicloridrina µg/L
0,1	0,0005	0,01	0,01	0,05	1
0,2	0,001	0,01	0,01	0,1	1
0,6	0,003	0,01	0,01	0,3	1
1,0	0,005	0,01	0,01	0,5	1
1,4	0,007	0,01	0,01	0,7	1
1,8	0,009	0,01	0,01	0,9	1

Tabella 2. Soluzioni di taratura per l'analisi GC-ECD

mL di soluzione primaria di riferimento di epicloridrina (6.4.1.1) in c=0,5mg/mL da solubilizzare in 100 mL di diisopropiletere	soluzione secondaria di riferimento di epicloridrina concentrazione in mg/mL	soluzione secondaria di riferimento di epicloridrina mL da solubilizzare in 100 mL di acqua (6.1.)	soluzione secondaria di riferimento di etil, 2-cloropropionato in c=0,01 mg/mL mL da solubilizzare in 100 mL di acqua (6.1.)	Soluzioni di taratura	
				epicloridrina µg/L	etil, 2-cloropropionato µg/L
0,1	0,0005	0,01	0,01	0,05	1
0,2	0,001	0,01	0,01	0,1	1
0,6	0,003	0,01	0,01	0,3	1
1,0	0,005	0,01	0,01	0,5	1
1,4	0,007	0,01	0,01	0,7	1
1,8	0,009	0,01	0,01	0,9	1

7.1.2. Controllo del bianco

Prima di processare il campione, controllare almeno una aliquota di acqua (6.1.) pari a 100 mL sottoponendola alla stessa procedura. Individuare gli eventuali interferenti presenti nel tracciato cromatografico al tempo di ritenzione dell'epicloridrina e dello standard interno usato ed eliminare la causa della contaminazione.

8. Procedura di misura

8.1. Estrazione in fase solida

8.1.1. Condizionamento della fase solida

Questa procedura viene applicata a cartucce da 3 mL e 6 mL (5.4.) contenenti 200 mg di materiale adsorbente.

Riempire la cartuccia con 5 mL di diisopropilene (6.2.2) e, ad eluizione avvenuta, aggiungere 5 mL di metanolo (6.2.1.) , evitando scrupolosamente che la fase solida vada a secco. Nel caso si verificasse tale evento ripetere il passaggio con metanolo. Versare quindi nella cartuccia 5 mL di acqua (6.1.) ed eluire fino a parziale copertura della superficie dello strato superiore del materiale adsorbente, per conservarne l'attività.

8.1.2. Estrazione del campione

Al termine del condizionamento, dopo avere verificato l'assenza di bolle d'aria rimaste eventualmente intrappolate nell'adsorbente, si procede immediatamente con l'estrazione del campione.

Riempire parzialmente, con il campione, un matraccio tarato da 100 mL (5.3.), aggiungere con l'ausilio di una microsiringa (5.7.) l'idoneo standard di processo in quantità uguale a quella aggiunta alle soluzioni di taratura, solubilizzare e portare a volume con lo stesso campione.

Percolare, ad un valore di flusso compreso tra 1 mL/min e 3 mL/min e mantenuto costante da un dispositivo per l'aspirazione sotto vuoto (5.5.), tutto il volume di campione attraverso la fase solida contenuta nella cartuccia (5.4.). Ad operazione completata, rimuovere parzialmente l'acqua dalla fase solida con azoto (5.8.4.) mantenuto ad un valore costante di flusso compreso tra 1 mL/min e 2 mL/min per 5 minuti e comunque fino a comparsa di uno schiarimento da parte di un microspessore localizzato nella zona superiore dell'adsorbente (in questa condizione il residuo di acqua è di 250 – 350 mg e corrisponde ad una quantità che previene eventuali perdite di epicloridrina).

8.1.2. Eluizione

Aggiungere alla cartuccia 2 mL di diisopropilene (6.2.2), lasciare equilibrare per circa 10 minuti fino ad imbrunimento della fase solida, eluire e raccogliere l'estratto in un flaconcino (5.7.) di volume idoneo . (La comparsa di un doppio strato nell'eluato è da ricondurre alla presenza di acqua residua).

L'estratto è così pronto per essere sottoposto ad analisi mediante GC-MS e/o GC-ECD .

Nel caso in cui l'analisi non possa essere effettuata immediatamente, conservare l'estratto in un intervallo di temperature compreso tra +2°C e +5°C per un periodo limitato.

8.2. Analisi GC-MS

8.2.1. Spettrometria di massa

Questa tecnica, quando opera in Impatto elettronico (EI), produce l'espulsione primaria di un elettrone da ognuna delle molecole di analita in fase gassosa emergenti dalla colonna gascromatografica. Tale espulsione è indotta dal transito ravvicinato di un fascio di elettroni emessi da un filamento riscaldato di renio o tungsteno e accelerati da una differenza di potenziale di 70 eV applicato tra il filamento e l'anodo. Il prodotto di questo evento iniziale è la trasformazione di ogni molecola in uno ione positivo a carica unitaria e massa (m/z) identica alla massa della molecola da cui proviene detto ione molecolare; successivamente per instabilità questo ione si decompone in una serie di ioni positivi a carica unitaria e massa decrescente. Operando in corrente ionica totale (TIC), dopo avere sottratto opportunamente il fondo, il complesso di tutti questi ioni presenti in quantità caratteristica, espressa

come intensità relativa o abbondanza relativa (in % rispetto allo ione più intenso detto picco base), rappresenta lo spettro di massa dell'analita. Lo spettro di massa consente di dedurre informazioni utili alla identificazione dell'analita in un campione quali, per es., la massa molare (peso molecolare) del composto dalla massa dello ione molecolare se presente e la possibilità di selezionare alcuni ioni specifici detti ioni diagnostici da impiegare quando si operi in corrente di ioni selezionati (SIC) per l'identificazione dell'analita e la sua quantificazione.

8.2.2. Identificazione in GC-MS

8.2.2.1. Utilizzo del tempo di ritenzione

Identificare l'analita per confronto, a parità di condizioni sperimentali, tra il suo tempo di ritenzione relativo (allo standard di processo) cromatografico ottenuto per il campione in esame in corrente ionica totale (TIC) o in corrente di ioni selezionati (SIC) e il suo tempo di ritenzione relativo (allo stesso standard di processo) cromatografico riferito all'ultima soluzione di taratura processata (7.1.1.). Il campione si considera positivo quando il tempo di ritenzione relativo dell'analita nel campione corrisponde a quello dell'analita nell'ultima soluzione di taratura (7.1.1.) con una tolleranza massima di $\pm 0,08$ minuti.

Tale informazione qualitativa non dà la certezza ai fini della individuazione.

8.2.2.2. Conferma basata sullo spettro di massa ottenuto in corrente ionica totale (TIC)

Acquisire, dopo avere sottratto il fondo, lo spettro di massa in corrispondenza del tempo di ritenzione dell'epicloridrina. Considerare nello spettro di massa dell'epicloridrina presente nel campione e in quello dell'epicloridrina presente in una soluzione secondaria di riferimento non processata (6.4.2.1.) in concentrazione equivalente a quella dell'epicloridrina presente nel campione, soltanto gli ioni con intensità media superiore al 10 %.

Il campione risulta positivo quando tutti gli ioni considerati, presenti nello spettro di massa dell'epicloridrina nel campione, possiedono una intensità media che coincide con quella degli stessi ioni presenti nello spettro di massa della soluzione secondaria di riferimento di epicloridrina non processata (6.4.2.1.) con una tolleranza massima del ± 20 %.

Nello spettro di massa dell'epicloridrina, per motivi di instabilità, non è presente lo ione molecolare e il picco base a m/z 57 non è specifico in quanto comune a molti altri composti.

8.2.2.3. Conferma basata sull'utilizzo di ioni diagnostici ottenuti in corrente di ioni selezionati (SIC)

Operare con lo spettrometro di massa focalizzato sui due ioni a m/z 49 e m/z 51 (nella modalità SIC). Dopo avere sottratto il fondo, il campione si considera positivo quando le intensità relative medie dei due ioni diagnostici a m/z 49 e m/z 51 presenti nel campione coincidono con le intensità relative medie degli stessi ioni presenti nella soluzione secondaria di riferimento di epicloridrina non processata (6.4.2.1.), possibilmente in concentrazione equivalente a quella del campione, con una tolleranza massima del ± 13 %.

8.3. Analisi GC-ECD

8.3.1. Identificazione in GC-ECD

8.3.1.1. Utilizzo del tempo di ritenzione relativo

Identificare l'analita per confronto, a parità di condizioni sperimentali, tra il suo tempo di ritenzione relativo (allo standard di processo) cromatografico riferito al campione in esame e il suo tempo di ritenzione relativo (allo stesso standard di processo) riferito all'ultima soluzione di taratura (7.1.1.). Il campione si considera positivo quando il tempo di ritenzione relativo dell'analita nel campione corrisponde a quello dell'analita nell'ultima soluzione di taratura (7.1.1.) con una tolleranza massima di $\pm 0,08$ minuti e contemporaneamente venga rispettato lo stesso criterio per un'altra colonna con polarità diversa che riduce il rischio dei falsi positivi.

8.4. Analisi quantitativa in GC-MS

Ai fini dell'analisi quantitativa, condotta nella modalità SIC, utilizzare per l'epicloridrina gli ioni a m/z 49 e m/z 51, per la 13C3-epicloridrina (standard di processo) gli ioni a m/z 50 e m/z 52 (per l'etil, 2-cloropropionato, se usato come standard di processo nettamente separato dall'epicloridrina, selezionare gli ioni a m/z 63, m/z 65, m/z 91 e m/z 93).

La curva di taratura serve per determinare la concentrazione di un analita in almeno tre repliche di campione processato al fine di ottenere un basso valore del limite di confidenza al 95% per il risultato finale. Analizzare le soluzioni di taratura processate (7.1.1.) e tabulare il valore del rapporto tra l'area prodotta dallo ione selezionato per l'epicloridrina e l'area prodotta dallo ione selezionato per lo standard di processo (A epicloridrina / Astandard di processo) in corrispondenza di ogni livello di concentrazione di epicloridrina. Con l'ausilio di un programma dedicato (o di idonee espressioni matematiche) individuare l'intervallo lineare della curva di taratura, per es. con il metodo dei residui, e determinare per questo intervallo l'equazione della retta di taratura con il metodo dei minimi quadrati:

$$Y = aX + b$$

Dove:

Y = rapporto Area epicloridrina / Areastandard di processo

X = concentrazione di epicloridrina espressa in $\mu\text{g/L}$

a = coefficiente angolare, a valore noto

b = intercetta sull'asse delle Y, a valore noto

Dedurre il valore incognito della concentrazione X della epicloridrina nel campione sostituendo il valore della Y (media di tre repliche), ottenuto sperimentalmente per il campione processato, nella equazione della retta di taratura. Il valore della concentrazione x di epicloridrina nel campione deve sempre cadere all'interno dell'intervallo lineare della curva di taratura o essere riportato in esso per opportuna diluizione del campione.

8.5. Analisi quantitativa in GC-ECD

La curva di taratura serve per determinare la concentrazione di un analita in una serie di almeno tre replicati di campione processato al fine di ottenere un basso valore del limite di confidenza al 95% per il risultato finale. Analizzare le soluzioni di taratura (7.1.1.) processate e tabulare il valore del rapporto tra l'area prodotta dal picco cromatografico dell'epicloridrina e l'area prodotta dal picco cromatografico dello standard di processo etil, 2-cloropropionato (Aepicloridrina / Aetil, 2-cloropropionato) in corrispondenza di ogni livello di concentrazione di epicloridrina. Con l'ausilio di

Versione on-line su sito www.iss.it

un programma dedicato (o di idonee espressioni matematiche) individuare l'intervallo lineare della curva di calibrazione, per es. con il metodo dei *residui*, e determinare per questo intervallo l'equazione della retta di calibrazione con il metodo dei minimi quadrati:

$$Y = aX + b$$

dove

Y = rapporto $\text{Area}_{\text{epicloridrina}} / \text{Area}_{\text{etil, 2-cloropropionato}}$

X = concentrazione di epicloridrina espressa in $\mu\text{g/L}$

a = coefficiente angolare, a valore noto

b = intercetta sull'asse delle Y, a valore noto

Dedurre il valore incognito della concentrazione X della epicloridrina nel campione sostituendo il valore della Y (media di tre repliche), ottenuto sperimentalmente per il campione processato, nella equazione della retta di taratura. Il valore della concentrazione x di epicloridrina nel campione deve sempre cadere all'interno dell'intervallo lineare della curva di taratura o essere riportato in esso per opportuna diluizione del campione.

8.6. Espressione dei risultati

I risultati, espressi in microgrammi per litro ($\mu\text{g/L}$), vengono riportati con due cifre significative per concentrazioni $\geq 0,10 \mu\text{g/L}$ (per es. $0,54 \mu\text{g/L}$ e $1,8 \mu\text{g/L}$) e con una cifra significativa per concentrazioni $< 0,10 \mu\text{g/L}$ (per es. $0,08 \mu\text{g/L}$).

8.7. Prestazioni del metodo

La conformità delle caratteristiche di prestazione del metodo (esattezza, precisione e limite di rivelabilità) ai valori di riferimento richiesti dalla normativa nazionale vigente sarà verificata dalla applicazione di un opportuno protocollo da parte di laboratori diversi.

BIBLIOGRAFIA

IARC MONOGRAPHS ON THE EVALUATION OF CARCINOGENIC RISKS TO HUMANS. VOLUME 71. Parte 2^a, pag. 619. 1999.

DECRETO LEGISLATIVO 2 febbraio 2001, n. 31. *Attuazione della direttiva 98/83/CE relativa alla qualità delle acque destinate al consumo umano*, successivamente modificato dal DECRETO LEGISLATIVO 2 febbraio 2002, n.27.

DOCUMENTO CEN/TC 230 prEN 00230129. *Water quality – Determination of epichlorhydrin*. 2001.