

DETERMINAZIONE DEGLI IDROCARBURI POLICICLICI AROMATICI (IPA). METODO PER GASCROMATOGRAFIA CON RIVELAZIONE A IONIZZAZIONE DI FIAMMA E GASCROMATOGRAFIA ACCOPPIATA ALLA SPETTROMETRIA DI MASSA

0. Generalità e definizioni

Gli idrocarburi policiclici aromatici (IPA) costituiscono un'ampia classe di composti organici, contenenti due o più anelli aromatici fusi, che si formano durante la combustione incompleta e la pirolisi di materiali organici. La fonte principale di un'eventuale contaminazione da IPA delle acque da bere è costituita dai rivestimenti a base di catrame delle tubazioni per la distribuzione dell'acqua.

La normativa nazionale sulla qualità delle acque destinate al consumo umano prevede attualmente la determinazione dei seguenti sei IPA (le abbreviazioni degli IPA sono riportate in Tabella 1): fluorantene, BbFA, BkFA, BaP, IP, BghiP (Gazzetta Ufficiale, 1988). Essa sarà tuttavia aggiornata sulla base della recente direttiva europea (Gazzetta ufficiale delle Comunità europee, 1998), la quale non richiede più la determinazione del fluorantene, mentre per i rimanenti cinque IPA fissa i seguenti valori limite ("valori di parametro"): 10 ng/L per il BaP; 100 ng/L per la somma di BbFA, BkFA, IP e BghiP. La direttiva richiede inoltre che il limite di rivelabilità del metodo d'analisi impiegato sia pari al 25% del valore limite. A tale normativa europea, di prossima adozione a livello nazionale, ci si riferisce nel testo quando viene citata la "normativa".

I campioni possono essere analizzati in GC/FID o GC/MS.

L'analisi in GC/FID, al livello del valore limite e del limite di rivelabilità richiesti dalla normativa per il BaP (10 e 2,5 ng/L, rispettivamente), è fattibile solo se: l'intera procedura di trattamento del campione viene condotta in condizioni di massima pulizia, la purificazione è tale da eliminare le interferenze e l'efficienza del sistema analitico è ottimale.

L'analisi deve essere condotta in GC/MS se:

il limite di rivelabilità del BaP in GC/FID è $> 2,5$ ng/L;

le concentrazioni di IPA trovate mediante GC/FID risultano uguali o superiori ad uno dei valori limite della normativa, ovvero se - pur essendo inferiori - comportano, in un eventuale calcolo della media relativa a più campioni, il raggiungimento o il superamento di tale valore limite. In questo caso, può essere sufficiente - a giudizio dell'analista - confermare in GC/MS l'identificazione e, in caso positivo, utilizzare per il dosaggio i risultati della GC/FID.

Vari IPA sono stati classificati dalla IARC (1987) come "probabilmente" o "possibilmente" cancerogeni per l'uomo. Tra quelli comunemente presenti nelle matrici ambientali, vi sono, oltre a quattro IPA la cui determinazione è richiesta dalla normativa (BaP, BbFA, BkFA e IP), anche il BaA, il BbFA ed il DBaA (Tabella 1).

Tabella 1. IPA selezionati (0.) a cui è applicabile il metodo.

(Parte I)

Nome comune ^a	Abbrev.	Nome CAS	Altro sinonimo
Benz[a]antracene	BaA	Benz[a]anthracene	1,2-Benzanthracene
Benzo[b]fluorantene	BbFA	Benzo[e]acephenanthrylene	3,4-Benzofluoranthene
Benzo[j]fluorantene	BjFA	Benzo[j]fluoranthene	10,11-Benzofluoranthene
Benzo[k]fluorantene	BkFA	Benzo[k]fluoranthene	11,12-Benzofluoranthene
Benzo[a]pirene	BaP	Benzo[a]pyrene	3,4-Benzopyrene
Indeno[1,2,3-cd]pirene	IP	Indeno[1,2,3-cd]pyrene	2,3-o-Phenylene pyrene
Dibenz[a,h]antracene	DBahA	Dibenz[a,h]anthracene	1,2:5,6-Dibenzanthracene
Benzo[ghi]perilene	BghiP	Benzo[ghi]perylene	1,12-Benzoperylene

(Parte II)

IPA	Formula molec.	Peso molec.	Numero CAS	P.f. °C	P.eb. °C	Solubilità in acqua µg/L (T)	Classif. IARC ^b	UE ^c
BaA	C ₁₈ H ₁₂	228,3	56-55-3	161	400	14 (25°C)	2A	
BbFA	C ₂₀ H ₁₂	252,3	205-99-2	168	481	1,2 (n.d.)	2B	X
BjFA	C ₂₀ H ₁₂	252,3	205-82-3	165	480	2,5 (n.d.)	2B	
BkFA	C ₂₀ H ₁₂	252,3	207-08-9	216	480	0,8 (25°C)	2B	X
BaP	C ₂₀ H ₁₂	252,3	50-32-8	178	496	3,8 (25°C)	2A	X
IP	C ₂₂ H ₁₂	276,3	193-39-5	164	536	62 (n.d.)	2B	X
DBahA	C ₂₂ H ₁₄	278,4	53-70-3	267	524	0,5 (27°C)	2A	
BghiP	C ₂₂ H ₁₂	276,3	191-24-2	278	545 ^d	0,3 (25°C)	3	X

(modificata da Menichini, 1994).

n.d.: temperatura non data.

^a n ordine di eluizione gascromatografica.

^b Cancerogenicità per l'uomo secondo IARC (1987). 2A: probabilmente cancerogeno, 2B: possibilmente cancerogeno, 3: non classificabile.

^c IPA la cui determinazione è richiesta dalla normativa europea (Gazzetta ufficiale delle Comunità europee, 1988).

^d Calcolato.

0.1. Definizioni

Si riportano di seguito alcune definizioni impiegate nel presente metodo, in ordine di citazione nel testo.

0.1.1. Standard surrogato

Una sostanza (IPA o altro composto poliaromatico) che si aggiunge ad ogni campione prima dell'estrazione, con funzione di "tracciante": conoscendone il recupero nelle condizioni del metodo (determinato in prove replicate sul bianco-reagenti (7.1.) o in occasione della prova "Recupero" (7.2), esso consente di tenere sotto controllo l'applicazione sostanzialmente corretta del metodo al singolo campione in esame e di verificare quindi l'assenza di errori grossolani nel trattamento del campione; non viene invece usato - come avverrebbe per uno standard interno - a fini di dosaggio.

Per l'analisi GC/FID, lo standard surrogato deve avere le seguenti caratteristiche:

Versione on-line su sito www.iss.it

recupero simile a quello degli IPA da determinare;
presenza in quantità non rivelabili o trascurabili nella matrice in esame e nel bianco-reagenti;
tR gascromatografico compreso nell'intervallo dei tR degli IPA da determinare;
tR gascromatografico tale che il picco esca in una zona quanto più possibile pulita del gascromatogramma.

A causa di tali limitazioni (in particolare, quelle esposte ai punti b e d), non c'è uno standard raccomandabile come valido per ogni tipo di campione e dunque va scelto caso per caso. Si segnalano le seguenti sostanze come possibili surrogati: benzo[a]crisene (o picene), benzo[b]crisene, indeno[1,2,3-cd]fluorantene.

Per l'analisi GC/MS, può essere impiegato un IPA deuterato (diverso dal PE-d12, usato come standard interno (6.6.1.)) che risponda al requisito di cui al suddetto punto c.

0.1.2. Campioni reali

Campioni prelevati sul campo nel corso dell'indagine.

0.1.3. Insieme omogeneo di campioni

Un insieme di campioni aventi la stessa origine e ritenuti contaminati per la stessa causa ed a livelli dello stesso ordine di grandezza. Si considera che, in queste condizioni, il profilo gascromatografico degli IPA (*nota 6*) nei campioni sia sostanzialmente costante, così come alcune prestazioni relative all'applicazione del metodo (ripetibilità, recupero, interferenze provenienti dalla matrice).

0.2. Abbreviazioni e acronimi

BFA	benzofluoranteni (isomeri "b", "k", "j")
CAS	Chemical Abstract Service
CV	coefficiente di variazione
DCM	diclorometano
d.i.	diametro interno
GC	gascromatografia
GC/FID	gascromatografia con rivelatore a ionizzazione di fiamma
GC/MS	gascromatografia accoppiata alla spettrometria di massa
HPLC	cromatografia liquida ad alta prestazione
IARC	International Agency for Research on Cancer
IPA	idrocarburi policiclici aromatici
PE-d ₁₂	perilene deuterato
RF	fattore di risposta
SIM	<i>single ion monitoring</i>
TLC	cromatografia su strato sottile
t _R	tempo di ritenzione

0.3. Misure di sicurezza

In considerazione dell'attività cancerogena associata a vari IPA (Tabella 1) nonché al DCM impiegato come solvente d'estrazione, occorre prestare la massima attenzione affinché la custodia, l'uso e lo smaltimento degli IPA, delle loro soluzioni e dei campioni estratti, oltreché del DCM, avvengano sempre con le dovute cautele e nel rispetto della normativa, per non causare danni agli operatori e all'ambiente.

1. Campo di applicazione

Il metodo è applicabile alla determinazione degli IPA nelle acque destinate al consumo umano. In particolare, il metodo è applicabile agli IPA richiesti dalla direttiva europea ed agli altri IPA cancerogeni già citati (0.). Esso consente di rivelare concentrazioni di singoli IPA comprese almeno nell'intervallo tra 2,5 ng/L (limite di rivelabilità del BaP richiesto dalla normativa) e 50 ng/L.

2. Principio del metodo

Il campione d'acqua, dopo aggiunta di tiosolfato di sodio nel caso l'acqua sia stata clorata, viene sottoposto ad estrazione in imbuto separatore con DCM. Quindi si adotta una delle seguenti procedure:

L'estratto viene purificato per TLC su gel di silice ed analizzato mediante GC/FID con colonna capillare. In caso di risultati uguali o superiori ai valori limite, questi devono essere confermati mediante GC/MS.

In alternativa o, comunque, se il limite di rivelabilità del BaP in GC/FID risulta $> 2,5$ ng/L, l'estratto - dopo eventuale purificazione per TLC - viene analizzato mediante GC/MS.

3. Interferenze e cause di errore

Nell'analisi GC/FID, interferisce qualunque composto che, presente nel campione dopo la purificazione, eluisca in GC con t_R approssimativamente uguale a quello degli IPA da determinare. Le interferenze possono essere costituite, oltre che da altri IPA presenti nel campione, anche da contaminanti presenti nei solventi, nei reagenti, nella vetreria ed in altra attrezzatura di laboratorio. L'uso, in particolare, di vetreria scrupolosamente pulita e di solventi ad elevata purezza aiuta a minimizzare i problemi dovuti alle interferenze; materiali a base di gomma e di plastiche devono essere evitati. E' particolarmente importante che tutta la vetreria, ed in particolare quella contenente soluzioni concentrate, venga lavata - subito dopo l'uso - con l'ultimo solvente che vi è stato usato e poi sciacquata abbondantemente con acetone ad elevata purezza. Subito prima dell'uso, la vetreria viene ulteriormente lavata con lo stesso solvente che dovrà esservi impiegato.

L'analisi del bianco-reagenti (7.1.) consente comunque di tenere sotto controllo eventuali interferenze provenienti dai materiali e dai reagenti.

Nelle condizioni del presente metodo, non è possibile identificare separatamente i tre benzofluoranteni isomeri, in quanto coeluenti come un unico picco in GC. Pertanto, nel dosaggio cumulativo di BbFA + BkFA, entrambi richiesti dalla normativa, è incluso anche il BjFA. Tutti e tre gli isomeri sono comunemente presenti nelle matrici ambientali.

Gli spettri di massa di alcuni IPA riportati in Tabella 1 sono difficilmente distinguibili (o anche praticamente indistinguibili) da quelli di altri IPA che eluiscono con t_R simile o che non sono completamente risolti rispetto ad essi: in particolare, il BaA è confondibile con il crisene ed il trifenilene (coeluenti, gli ultimi due); l'IP con il BghiP e con l'antantrene; il BaP con i tre BFA (tra di loro praticamente indistinguibili); il BaP è inoltre confondibile, ma tuttavia riconoscibile con qualche difficoltà, con il benzo[e]pirene ed il PE. Gli IPA interferenti qui menzionati sono comunemente presenti nelle matrici ambientali.

3.1. Illuminazione del laboratorio

Deve essere evitata l'esposizione a luce solare diretta dei campioni d'acqua prelevati, dei campioni a qualunque stadio della procedura, delle soluzioni di IPA. In laboratorio, deve essere usata illuminazione al tungsteno o lampade fluorescenti fornite di schermo per le radiazioni UV.

3.2. Conservazione dei materiali di riferimento

I materiali di riferimento puri e in soluzione, così come le miscele di riferimento sia concentrate che diluite, devono essere conservati in frigorifero.

4. Campionamento e conservazione dei campioni

Prelevare il campione in bottiglia di vetro. Nel caso l'acqua sia stata clorata, aggiungere 100 mg di tiosolfato di sodio e mescolare bene. Conservare la bottiglia al buio in ghiaccio o in frigorifero, fino all'estrazione che deve comunque avvenire entro 7 giorni dal prelievo. Ai fini della successiva determinazione del volume del campione (che può essere effettuata mediante analisi volumetrica o gravimetrica), marcare con un segno il menisco oppure pesare la bottiglia piena.

5. Apparecchiatura

- 5.1. Attrezzatura comune di laboratorio
- 5.2. Bottiglia in vetro scuro o coperta con foglio d'alluminio
Utilizzare una bottiglia con tappo a vite munito di guarnizione rivestita in teflon (o in foglio d'alluminio, se il campione non è corrosivo) da 1 L.
- 5.3. Imbuto separatore in vetro chiaro da 1 o 2 L con rubinetto in teflon
- 5.4. Pallone per evaporatore rotante da 500 mL in vetro scuro
- 5.5. Colonna cromatografica
Utilizzare una colonna in vetro (per l'essiccamento dell'estratto), senza rubinetto, d.i. circa 2 cm, lunghezza circa 30 cm, con setto in vetro sinterizzato sostituibile con un batuffolo di ovatta (sgrassata mediante estrazione in Soxhlet con n-esano per una notte e poi lavata con il solvente d'eluizione prima dell'uso). In alternativa (8.1.): imbuto di vetro di diametro di almeno 10 cm, con un batuffolo di ovatta (sgrassata e lavata come sopra) inserito nel gambo.
- 5.6. Microsiringhe in vetro da 50, 100, 250, 500 µL
Per la misura di volumi, deve essere impiegata la microsiringa di capacità immediatamente superiore al volume da misurare.
- 5.7. Vial (flaconcini) in vetro, con tappo a vite munito di guarnizione teflonata
A titolo indicativo, si suggeriscono i seguenti vial (capacità approssimate): 5 mL, in vetro chiaro, graduati e a fondo conico; 20 mL, in vetro chiaro; 40 mL, in vetro scuro (o da avvolgere accuratamente in foglio d'alluminio).
- 5.8. Attrezzatura per TLC preparativa
La seguente attrezzatura è suggerita a titolo indicativo:
 - 5.8.1. Lastre al gel di silice 70-230 mesh con indicatore di fluorescenza, spessore 0,25 mm (nota 1), su vetro 20 x 20 cm.
 - 5.8.2. Vasche in vetro con coperchio, per il lavaggio e lo sviluppo delle lastre.
 - 5.8.3. Micropipette monouso in vetro da 50 µL per la deposizione del campione.
 - 5.8.4. Lampada UV a 366 nm e occhiali per protezione UV.
 - 5.8.5. Spatola in acciaio inossidabile con bordo tagliato dritto e affilato.
 - 5.8.6. Colonna cromatografica in vetro, senza rubinetto, d.i. circa 1 cm, con setto in vetro sinterizzato.
- 5.9. Attrezzatura per GC
 - 5.9.1. Gascromatografo con rivelatore a ionizzazione di fiamma; sistema per l'acquisizione e l'elaborazione dei dati (computer con idoneo programma o integratore).
 - 5.9.2. Gascromatografo accoppiato ad uno spettrometro di massa; è raccomandabile che la colonna GC sia interfacciata direttamente alla sorgente ionica dello spettrometro di massa; computer con idoneo programma per l'acquisizione e l'elaborazione dei dati.

Versione on-line su sito www.iss.it

5.9.3. Gas di trasporto UPP (>99,9995%): per GC/FID, elio ulteriormente purificato mediante setacci molecolari o con altro sistema equivalente, oppure - preferibilmente - idrogeno fornito da un generatore; per GC/MS, elio ulteriormente purificato come sopra.

Per entrambi i gascromatografi:

5.9.4. Iniettore on-column o split-splitless. Con l'iniettore split-splitless, si raccomanda di usare ferrule in Vespel® o Vespel® grafitato o equivalenti, e non in grafite, per evitare possibili adsorbimenti di IPA sulla grafite stessa.

5.9.5. Colonna capillare in silice fusa, con fase stazionaria "5% fenil, 1% vinilmetilpolisilossano" oppure "5% fenilmetilpolisilossano", "chimicamente legata" e (per la GC/MS) a basso spurgo, lunghezza 25-30 m, d.i. 0,20-0,32 mm, spessore 0,25 µm (nota 2).

5.9.6. Siringa per l'introduzione del campione, da 5 µL o, se non disponibile (in base all' iniettore montato ed a quanto riportato nella nota 2), da 10 µL.

5.10. Azoto ultrapuro

Purificare ulteriormente attraverso gel di silice e setacci molecolari.

6. Reagenti

La purezza deve essere comunque tale che l'analisi del bianco-reagenti soddisfi i criteri riportati in 7.1.

Tutti gli IPA forniti commercialmente come materiali di riferimento, puri o in soluzione o in miscela, devono avere una purezza o una concentrazione documentata dal fornitore.

6.1. Acqua "reagente"

Acqua di purezza tale che non contenga interferenze a livello del limite di rivelabilità degli IPA di interesse. Può essere acqua prodotta con sistemi di purificazione di laboratorio che incorporano carbone attivo o acqua distillata prodotta con un distillatore di elevata qualità. Deve essere conservata in bottiglia di vetro con tappo a vite munito di guarnizione teflonata.

6.2. Solfato di sodio (Na_2SO_4) anidro per analisi

Utilizzare preferibilmente un prodotto granulare (nota 14), purificato a 400°C per 4 h in un vassoio basso di vetro, e raffreddato prima dell'uso. Dopo purificazione, deve essere conservato in barattolo in vetro con tappo a vite munito di guarnizione teflonata.

6.3. Tiosolfato di sodio pentaidrato ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$) per analisi

6.4 . DCM, n-esano, metanolo e toluene

Utilizzare solventi a purezza "per HPLC" o equivalente, oppure ridistillati prima dell'uso.

6.5. IPA

6.5.1. BbFA, BkFA, BaP, IP, BghiP oltre ad eventuali altri IPA

Da determinare ognuno come materiale di riferimento puro o in soluzione, a titolo noto.

In alternativa, può essere impiegata una miscela commerciale contenente i suddetti IPA (oltre ad eventuali altri), in soluzione a titolo noto. Se la miscela contiene altri IPA e l'analisi è in GC/MS, si veda la nota 7 relativamente alla presenza di IPA interferenti tra loro.

6.5.2. Standard surrogato (0.1.1.), puro o in soluzione, a titolo noto.

6.6. IPA isotopicamente marcati

Utilizzare prodotti puri o in soluzione, a titolo noto.

6.6.1. Standard interno

Per la determinazione dei 5 IPA richiesti dalla normativa, lo standard idoneo è il PE-d₁₂.

6.6.2. Eventuali standard interni “di processo” (nota 26)

Considerare almeno un IPA marcato per ogni classe di analiti con un determinato numero di anelli (cioè, uno con 4 anelli, uno con 5, ecc.).

6.7. Miscela di riferimento degli IPA per l'analisi GC/FID

Contiene tutti gli ipa da determinare e lo standard surrogato.

6.7.1. Preparazione dai singoli materiali puri

Si pesano accuratamente circa 5,0 mg di sostanza dentro un vial di vetro chiaro da 20 mL e si aggiungono alcuni millilitri di toluene (nota 3).

A dissoluzione avvenuta (prestare particolare attenzione nel valutare visivamente la completa dissoluzione della sostanza), la soluzione viene trasferita quantitativamente in pallone tarato da 25 mL, con ripetuti lavaggi; è raccomandabile un controllo GC dell'ultimo lavaggio per verificare che siano assenti tracce rivelabili della sostanza e dunque che il trasferimento sia stato quantitativo. La soluzione viene portata a volume e costituisce la soluzione primaria di riferimento (concentrazione risultante: circa 0,2 mg/mL). Si analizzano in GC circa 0,5 µL di tale soluzione, al fine di verificare l'effettiva purezza della sostanza disciolta. Si trasferisce poi la soluzione in vial da 40 mL di vetro scuro, per la conservazione (nota 4).

Si prelevano volumi noti di ogni soluzione primaria di riferimento e si trasferiscono in pallone tarato. Si porta a volume con toluene e si trasferisce in vial di vetro scuro. Per diluizione di tale miscela con toluene, si prepara la miscela di riferimento a concentrazioni dell'ordine di grandezza di quelle attese nei campioni in esame concentrati, pronti per l'analisi (nota 5).

Si analizza in GC 1 µL della miscela di riferimento e si verifica l'assenza di picchi interferenti. Si trasferisce infine in vial di vetro scuro (note 4 e 6).

6.7.2. Preparazione dalle soluzioni commerciali dei singoli IPA

Le soluzioni commerciali vengono analizzate in GC per verificare la purezza della sostanza disciolta. Opportune aliquote di tali soluzioni vengono unite e, se necessario, la miscela risultante viene diluita con toluene in modo da ottenere la miscela di riferimento, come riportato in (6.7.1.).

6.7.3. Preparazione dalla miscela commerciale di IPA

La miscela, se necessario, viene opportunamente diluita con toluene in modo da ottenere la miscela di riferimento, come riportato in (6.7.1.).

6.8. Soluzioni di lavoro per l'analisi GC/MS

Servono per il calcolo degli RF relativi allo standard interno deuterato.

Si prepara dapprima una miscela concentrata di riferimento degli IPA da determinare, con una delle procedure riportate in (6.7.). I rapporti quantitativi tra i 5 IPA richiesti dalla normativa devono

risultare sull'ordine di grandezza dei corrispondenti rapporti relativi ai valori limite (si consideri al riguardo l'assunzione riportata nella nota 5) (nota 7).

Le soluzioni di lavoro vengono quindi preparate per opportune diluizioni della miscela concentrata di riferimento, in modo da ottenere, dopo aggiunta dello standard interno deuterato (si veda oltre), almeno quattro livelli di concentrazione di singoli IPA, in un intervallo corrispondente approssimativamente a concentrazioni nel campione originale d'acqua pari a 2,5-50 ng/L (nota 8).

L'intervallo delle concentrazioni delle soluzioni di lavoro definisce l'intervallo di lavoro.

Ad ogni soluzioni di lavoro si aggiunge un'aliquota della soluzione di lavoro dello standard interno deuterato (6.10.) in modo tale da ottenere una concentrazione finale di quest'ultimo intermedia rispetto al suddetto intervallo di lavoro (nota 9).

6.9. Soluzione di lavoro dello standard surrogato

La soluzione primaria di riferimento, preparata con la procedura riportata in (6.7.1.), ovvero l'eventuale soluzione commerciale del materiale di riferimento, viene diluita con metanolo in modo tale che l'aliquota da aggiungere al campione da estrarre (8.1.) contenga una quantità di surrogato sull'ordine di grandezza atteso degli IPA da determinare (nota 5).

6.10. Soluzione di lavoro dello standard interno deuterato PE-d₁₂

La soluzione primaria di riferimento, preparata con la procedura riportata in (6.7.1.), ovvero l'eventuale soluzione commerciale, viene opportunamente diluita ai fini della successiva aggiunta alle soluzioni di lavoro (6.8.) ed ai campioni estratti (8.5.4.).

6.11. Soluzione-recupero

Serve per la prova "Recupero" (7.2.) e contiene tutti gli IPA da determinare e lo standard surrogato (0.1.1.). Si prepara per diluizione con metanolo delle soluzioni concentrate disponibili: le soluzioni primarie di riferimento (6.7.1.), ovvero le soluzioni commerciali dei singoli materiali di riferimento o una miscela commerciale dei vari IPA (6.5.1.). Le concentrazioni devono essere tali per cui in 1 mL le quantità degli IPA siano sull'ordine di grandezza di quelle attese in 1 L dei campioni reali (nota 5).

6.12. Miscela per controllare le prestazioni della colonna e dei sistemi GC/FID e GC/MS

Deve includere coppie di IPA la cui risoluzione dipende dalle condizioni operative. Può essere costituita dalla miscela commerciale dei 16 IPA "prioritari" per l'US EPA (1984) (nota 10) opportunamente diluita o da altre miscele equivalenti.

7. Controllo di qualità

I controlli che seguono devono essere effettuati:

inizialmente, prima di effettuare il prelievo dei campioni reali (0.1.2.);

come controllo regolare, in linea di massima ogni 20 determinazioni od ogni tre mesi;

ogniquale volta si modifichi la procedura di trattamento dei campioni;

limitatamente al controllo del bianco-reagenti (7.1.), ogniqualvolta si cambi marca, tipo o lotto di un qualunque materiale (nota 11).

I controlli del bianco-reagenti e della ripetibilità, ma non del recupero, possono essere omessi se le concentrazioni nei campioni reali risultano inferiori al limite di rivelabilità previsto dalla normativa (0.1.).

7.1. Bianco-reagenti

Si sottopone un campione d'acqua "reagente" (6.1.) all'intero processo analitico, a partire dal prelievo nella bottiglia seguito dall'estrazione e dall'eventuale purificazione, nelle stesse condizioni e con gli stessi materiali impiegati per l'analisi dei campioni reali.

Nell'analisi del bianco-reagenti, picchi interferenti con gli IPA da determinare dovrebbero essere assenti oppure presenti a livelli trascurabili (con un segnale inferiore indicativamente al 10% di quello dell'IPA "interferito" nei campioni reali).

Nel calcolo dei risultati, occorre tener conto di un'eventuale presenza di picchi interferenti non eliminabili. In questo caso, la quantità dell'interferenza deve essere calcolata come media aritmetica - in linea di massima - di tre analisi replicate del bianco-reagenti. Ciò è necessario a causa della variabilità, generalmente elevata, del segnale delle interferenze provenienti dal bianco.

7.2. Recupero

La prova viene effettuata in triplicato su campioni d'acqua "reagente" (6.1.).

Si aggiunge ad 1 L d'acqua "reagente", direttamente nell'imbuto separatore, 1 mL di soluzione-recupero (6.11.), si agita moderatamente e si attendono circa 30 min prima di versare il solvente d'estrazione (durante l'attesa, curare la protezione dalla luce: si veda 3.1.). Si eseguono tutte le fasi della determinazione nelle stesse condizioni e con gli stessi materiali impiegati per i campioni reali.

Il recupero percentuale (valore medio delle tre determinazioni) viene determinato: in GC/FID, rapportando la risposta del campione a quella ottenuta, nello stesso giorno, con la miscela di riferimento (6.7.) usata per il dosaggio dei campioni reali; in GC/MS, con lo standard interno deuterato, analizzando i campioni secondo la procedura (8.5.) impiegata per i campioni reali. Ogni analisi (sia dei campioni che dell'eventuale miscela di riferimento) deve essere effettuata almeno in duplicato. Il recupero dovrebbe risultare $> 70\%$, con un CV relativo alle tre determinazioni $\leq 15\%$, per ogni IPA da determinare e per il surrogato. In particolari condizioni, il superamento di questi livelli può essere considerato accettabile (nota 12).

7.3. Ripetibilità

Deve essere valutata la ripetibilità ottenibile nell'applicazione del metodo da parte di un determinato operatore con una determinata apparecchiatura.

Per ogni insieme omogeneo di campioni (0.1.3.), la prova viene effettuata su almeno tre aliquote di uno dei campioni dell'insieme.

Nel caso di campioni singoli, si valuta la ripetibilità campione per campione, analizzando $n (\geq 3)$ aliquote del campione. In questo caso, il risultato per ogni campione è dato dalla media aritmetica delle n analisi.

In entrambi i casi suddetti, il CV relativo al campione sottoposto alla prova dovrebbe risultare $\leq 15\%$ per ogni IPA da determinare e per il surrogato. In particolari condizioni, il superamento di questi livelli può essere considerato accettabile (nota 12).

Una volta così determinati il recupero e la ripetibilità, tutte le misure relative all'insieme omogeneo di campioni devono essere effettuate senza modificare operatore ed apparecchiatura (nota 13).

8. Procedura di misura

8.1. Estrazione

Si raccomanda di effettuare le operazioni con DCM sotto cappa aspirante.

Versare il campione in imbuto separatore. Aggiungere la soluzione di lavoro dello standard surrogato (6.9.), in volume di almeno 500 μL , al campione d'acqua, direttamente dentro l'imbuto separatore;

agitare moderatamente e attendere circa 30 min (durante l'attesa, curare la protezione dalla luce: si veda 3.1.).

Aggiungere 50 mL di acetone nella bottiglia, lavare accuratamente la superficie interna e trasferire nell'imbuto separatore. Ripetere questa operazione con 60 mL di DCM. Estrarre il campione agitando per 2 min, e sfiatando di tanto in tanto. Lasciar separare gli strati per almeno 10 min. Un'eventuale emulsione può essere risolta (o ridotta) con una centrifugazione manuale dell'imbuto; un'eventuale emulsione residua viene per il momento lasciata nell'imbuto. Raccogliere l'estratto diclorometanico in una beuta ed essiccarlo attraverso una colonna (5.5.) contenente circa 30 g di Na₂SO₄, prelavata con DCM (o versare direttamente l'estratto dall'imbuto separatore nella colonna); raccogliere l'estratto essiccato in un pallone per evaporatore rotante da 500 mL. Ripetere altre due volte l'aggiunta del DCM nella bottiglia, l'estrazione e l'essiccamento. Depositare in colonna anche l'eventuale emulsione rimasta nell'imbuto separatore dopo la terza estrazione. Lavare infine la beuta e la colonna con 20-30 mL di DCM, raccogliendo il lavaggio nel pallone. (Nota 14)

Determinare il volume originale del campione (4.):

riempire la bottiglia con acqua fino al segno e trasferire l'acqua in un cilindro graduato da 1000 mL, approssimando il volume ai 5 mL (se il volume supera i 1000 mL, utilizzare un secondo cilindro di capacità minore);

oppure,

ripesare la bottiglia vuota, approssimando il peso del campione d'acqua al grammo.

8.2. Concentrazione dell'estratto

L'estratto viene concentrato in evaporatore rotante a circa 2 mL, sotto vuoto (mediante pompa ad acqua o sistema equivalente) e ad una temperatura del bagno inferiore a circa 35°C. Si trasferisce l'estratto concentrato, insieme ai lavaggi (prestare particolare attenzione al lavaggio quantitativo dell'intera superficie interna del pallone), in un vial di vetro chiaro, graduato e a fondo conico da 5 mL, e si concentra sotto leggero flusso d'azoto a circa 50 µL (questo volume può essere aumentato con l'uso di lastre TLC di spessore superiore a 0,25 mm).

8.3. Purificazione

La purificazione è necessaria per l'analisi GC/FID. Essa è opportuna anche per la GC/MS, per evitare il deterioramento dell'efficienza del sistema cromatografico.

Prima dell'uso, la lastra viene demarcata (nota 15).

La lastra viene quindi lavata con acetone, ponendola in una vasca per TLC e facendo correre il fronte del solvente per circa 19 cm (senza fargli raggiungere il bordo superiore della lastra) (nota 17). Si fa quindi asciugare sotto cappa aspirante (evitare la stufa di laboratorio) e si conserva in essiccatore con gel di silice fino al momento dell'uso. La lastra va utilizzata entro una settimana dal lavaggio.

Subito prima di effettuare la cromatografia, si prepara la miscela eluente (n-esano-toluene 1:1 vol.), la si sversa in una vasca per TLC (contenente due fogli di carta da filtro prelavati con la stessa miscela di solventi, appoggiati contro le due pareti maggiori) imbibendo i due fogli in modo che aderiscano alle pareti, e si lascia equilibrare per almeno un'ora.

L'estratto concentrato viene depositato con capillare di vetro sulla lastra TLC, insieme ai lavaggi del vial, lungo una sottile striscia di circa 3-4 cm (nota 1). Come riferimento, viene depositata nel corridoio centrale un'opportuna aliquota di miscela di riferimento (6.7.), tale che sia rivelabile sotto la lampada UV (nota 18). Verificare in una prova preliminare che il bordo inferiore della striscia e della macchia siano sopra il livello del solvente presente nella vasca al momento dell'introduzione della lastra nella vasca stessa.

Lasciato evaporare il solvente (non impiegare aria sotto pressione!), la lastra viene posta nella vasca per TLC (la vasca e la faccia superiore del coperchio vanno accuratamente ricoperti con foglio d'alluminio) e sviluppata al buio, fino a 2 cm dal bordo superiore. Si lascia la lastra sotto cappa aspirante per 1-2 min, al buio. Osservando la lastra ancora umida sotto la lampada UV, per un tempo quanto più breve possibile, si delimita con una matita a mina dura e con tratto leggero un riquadro intorno alla macchia fluorescente dei due campioni (indossare guanti e occhiali per protezione dalle

radiazioni UV!). Nel caso la macchia non sia rivelabile (nota 19), si delimita un riquadro, della larghezza del corridoio di deposizione, sulla base della posizione della macchia corrispondente al riferimento. Dopo evaporazione del solvente, viene inciso con la spatola il primo riquadro: questo viene grattato, raccolto, frantumato e versato in colonna; successivamente, l'operazione viene ripetuta sull'eventuale secondo riquadro (effettuare queste operazioni sotto cappa aspirante!) (nota 20).

Gli IPA vengono eluiti con tre porzioni successive di toluene da circa 1,5 mL (corrispondenti approssimativamente ad una pipetta pasteur). Al termine, il gel di silice viene posto sotto pressione con azoto per raccogliere la maggior quantità possibile di solvente.

L'eluato viene raccolto in un vial di vetro chiaro, graduato e a fondo conico da 5 mL e concentrato a circa 1 mL sotto flusso d'azoto.

Se l'analisi non viene effettuata immediatamente, il campione viene conservato in frigorifero.

8.4. Analisi GC/FID

Subito prima dell'analisi, il campione viene ulteriormente concentrato sotto flusso d'azoto a poco meno di 100 μ L e se ne misura accuratamente il volume mediante microsiringa da 100 μ L (nota 21). In alternativa, il campione può essere cautamente portato a secco e subito dopo ripreso con 100 μ L di toluene.

8.4.1. Condizioni operative

Di volta in volta, in funzione della strumentazione e dei campioni in esame, devono essere definite le condizioni ottimali. Le prestazioni della colonna e del sistema GC devono essere controllate con regolarità mediante analisi della miscela (6.12.). Le seguenti condizioni, con la colonna (5.9.5.), vengono indicate a scopo orientativo:

Temperatura del rivelatore: 310°C.

Temperatura del forno: 1 min a 90°C, 90-190°C a 25°C/min, 190-300°C a 6°C/min, isoterma finale a 300°C per il tempo necessario all'uscita degli ultimi picchi (nota 22).

Volume da iniettare: on-column, 1,0 μ L; splitless: 1-2 μ L.

Dopo l'analisi, il campione - diluito a circa 1 mL con toluene - viene conservato in frigorifero.

8.4.2. Identificazione

L'individuazione dei picchi di interesse viene provvisoriamente effettuata mediante confronto dei tempi di ritenzione con quelli della miscela di riferimento (6.7.). Poi, viene confermata con il "metodo delle aggiunte", cioè analizzando il campione arricchito con la miscela di riferimento (nota 23). Per un insieme omogeneo di campioni (0.1.3.), l'arricchimento può essere effettuato *una tantum*.

Per un'eventuale conferma definitiva, ad es. per escludere possibili falsi positivi, si effettua l'analisi GC/MS.

8.4.3. Dosaggio

L'analisi quantitativa viene effettuata con il metodo della calibrazione esterna, impiegando la miscela di riferimento (6.7.).

La diluizione del campione da analizzare deve essere aggiustata in modo che, per ogni IPA da determinare, la risposta (area o altezza del picco) non sia superiore o inferiore di oltre 10 volte rispetto a quella ottenuta con la miscela di riferimento.

Le analisi del campione e della miscela di riferimento devono essere effettuate nello stesso giorno e nelle stesse condizioni operative, iniettando lo stesso volume di campione e di miscela di riferimento.

Al fine di poter valutare l'affidabilità della misura fornita dal sistema di acquisizione ed elaborazione dei dati, questo deve mostrare la linea di base costruita sotto il picco e (in caso di misura dell'area) deve consentire di individuare l'inizio e la fine di ogni integrazione. Occorre quindi controllare che la linea di base costruita (automaticamente o, con l'uso di un computer, manualmente) sia effettivamente la più idonea. L'integrazione manuale del picco (costruendo, cioè, manualmente la linea di base in

corrispondenza del picco), può essere conveniente, ai fini dell'accuratezza del dosaggio, particolarmente nel caso di picchi poco intensi e/o non risolti alla linea di base da interferenze.

Con l'uso degli integratori, se non è possibile attuare questo tipo di controllo, è preferibile dosare la sostanza misurando manualmente le altezze dei picchi. Inoltre, affinché siano evidenti eventuali picchi parzialmente sovrapposti, è opportuno che i picchi di interesse nel cromatogramma risultino tutti "in scala".

In caso di picchi parzialmente sovrapposti a picchi interferenti, è preferibile utilizzare le misure relative alle altezze piuttosto che alle aree, tranne che per i benzofluoranteni. Questi rappresentano infatti un caso particolare: non essendo risolti tra loro, il risultato viene riportato cumulativamente; dunque, è più accurata una loro misura mediante l'area del picco risultante (la somma delle aree, nel caso siano integrati separatamente).

Il risultato di ogni determinazione (sia del campione che della miscela di riferimento) è dato dalla media di 2 (o più) analisi replicate. La ripetibilità dell'analisi dovrebbe essere tale che la seconda misura sia contenuta entro $\pm 10\%$ del valore della prima, per ogni IPA (valgono anche in questo caso le indicazioni della nota 12). Si deve verificare che il recupero del surrogato sia simile a quello ottenuto nelle prove preliminari (7.2.) su campioni d'acqua "reagente".

8.4.4. Interferenze

Una volta adottato un programma termico per un insieme di campioni, se in un determinato campione si osservano picchi di IPA parzialmente sovrapposti a picchi interferenti (o si sospetta che siano coperti da questi), si può, in funzione dell'obiettivo dell'analisi:

- tentare di separare le interferenze modificando l'incremento di temperatura nella seconda rampa (si veda 8.4.1. Può essere sufficiente anche una variazione di $1^\circ\text{C}/\text{min}$; occorre ovviamente analizzare nelle condizioni modificate anche la miscela di riferimento);
- ricorrere all'analisi GC/MS, per confermare o escludere la presenza di un determinato IPA (ma non - in linea di principio - per determinare le quantità relative in GC/FID dei picchi dell'IPA e dell'interferenza: la loro sovrapposibilità varia al variare delle condizioni sperimentali e, in particolare, della colonna);
- stimare, se fattibile, la concentrazione e riportare il risultato come "approssimato" o, se del caso, come "< ..." o "> ...".

La possibilità di picchi interferenti, il cui segnale è di poche volte superiore a quello del rumore di fondo, è particolarmente elevata ai bassi livelli previsti per gli IPA in questa matrice. La presenza di un'interferenza viene generalmente evidenziata dalla forma del picco gascromatografico, a meno che non sia esattamente coeluyente con l'IPA (nota 24).

8.5. Analisi GC/MS

Si raccomanda di effettuare preliminarmente:

- un controllo esplorativo del campione in GC/FID per:
 - a) evitare di contaminare il sistema GC/MS con campioni inaspettatamente "sporchi";
 - b) valutare, in caso di successivo dosaggio (8.5.2.), le concentrazioni approssimate degli IPA;
 - c) valutare il recupero dello standard surrogato (8.4.3.).
- un'analisi della miscela (6.12.) per verificare l'efficienza della colonna e del sistema GC/MS.

8.5.1. Impiego per la conferma dell'identificazione. La conferma dell'identificazione

ottenuta mediante GC/FID può essere effettuata, a giudizio dell'analista, una tantum per ogni insieme omogeneo di campioni (0.1.3.). Essa va quindi ripetuta, in particolare:

- quando si è a conoscenza di (o si suppongono) variazioni nella fonte della contaminazione;
- ogniqualvolta si abbia motivo di ritenere che il profilo gascromatografico possa essere cambiato.

Se le concentrazioni e la sensibilità strumentale lo consentono, l'identificazione può essere effettuata in "acquisizione", mediante esame dello spettro di massa e confronto con lo spettro del materiale di

riferimento puro (nota 25). Tale spettro dovrebbe essere ottenuto nel proprio laboratorio, con lo strumento in uso, piuttosto che far ricorso alle librerie disponibili in commercio.
In caso contrario, occorre operare con la tecnica SIM.

8.5.2. Impiego per l'identificazione e il dosaggio.

L'analisi viene condotta con tecnica SIM. Il dosaggio è basato sull'abbondanza dello ione caratteristico primario (Tabella 2) e viene effettuato con il metodo dello standard interno, aggiunto al campione prima dell'analisi (nota 26).

Tabella 2. Ioni caratteristici tipici di alcuni IPA di interesse normativo, analitico o tossicologico. Strumentazione usata: spettrometri di massa quadrupolari (70 eV).

IPA	Ione primario	Ioni secondari
BaA	228	229, 226, 114
BbFA, BkFA, BjFA, BeP, BaP	252	253, 250, 125, 126
PE-d ₁₂	264	260, 265, 132
IP, BghiP	276	277, 274, 138
DBahA	278	279, 276, 139

^a Oltre agli IPA richiesti dalla normativa e allo standard interno, sono inclusi altri IPA in quanto (possibili) interferenti (BjFA, BeP, DBahA) o in quanto utili a fini di stima del rischio cancerogeno (BaA, BjFA, DBahA; si veda 0.1.).

L'integrazione manuale del picco (costruendo, cioè, manualmente la linea di base in corrispondenza del picco) può essere conveniente, ai fini dell'accuratezza del dosaggio, particolarmente nel caso di picchi poco intensi e/o non risolti alla linea di base da interferenze. Occorre comunque controllare che la linea di base costruita (automaticamente o manualmente) sia effettivamente la più idonea.

8.5.3. Calcolo degli RF

Si analizza in GC/MS/SIM ogni standard di calibrazione (6.8.) e si tabulano le aree dello ione primario caratteristico contro le concentrazioni, per ogni IPA e lo standard interno. Si calcolano gli RF di ogni analita con la seguente equazione:

$$RF = \frac{A_{IPA} \cdot C_{si}}{A_{si} \cdot C_{IPA}}$$

dove:

- AIPA = area dello ione caratteristico per l'IPA da determinare
- Asi = area dello ione caratteristico per lo standard interno deuterato
- CIPA = concentrazione dell'IPA da determinare (pg/μL)
- Csi = concentrazione dello standard interno deuterato (pg/μL)

Se, per il singolo IPA, l'RF nell'intervallo di lavoro è costante (CV <20%), l'RF medio viene usato nei successivi calcoli. Altrimenti, i risultati vengono usati per costruire una curva di calibrazione dei rapporti tra le risposte (AIPA/Asi) contro l'RF. Per la scelta degli ioni caratteristici, si veda (8.5.4.).

8.5.4 Condizioni operative

Valgono le indicazioni già riportate per l'analisi GC/FID (8.4.1.). Inoltre:

- Temperatura della sorgente: secondo le indicazioni del costruttore.
- Condizioni di impatto elettronico: 70 eV.
- Intervallo di massa in "acquisizione": da 35 a ≥ 350 amu.

Si raccomanda di effettuare l'operazione di tuning all'inizio di ogni giornata di lavoro, secondo le istruzioni dello strumento.

Si aggiusta il volume del campione estratto in modo tale che, dopo aver aggiunto un'aliquota accuratamente nota della soluzione di lavoro dello standard interno PE-d12 (6.10.), le concentrazioni degli IPA siano all'interno dell'intervallo di lavoro e la concentrazione di PE-d12 sia quella presente nelle soluzioni di lavoro (6.8.; note 8 e 9).

Si verifica, all'inizio di ogni giornata di lavoro, l'RF o la curva di calibrazione (8.5.3.), analizzando almeno uno delle soluzioni di lavoro (a concentrazione intermedia). Per ogni IPA, la risposta deve variare da quella attesa (sulla base degli RF originariamente calcolati) di meno del $\pm 20\%$. In caso contrario, occorre rieffettuare la curva di calibrazione.

Per il dosaggio, si utilizza lo ione molecolare (ione primario). Se si notano interferenze, vengono utilizzati, come ioni secondari, i due successivi ioni più intensi. In Tabella 2 sono riportati ioni caratteristici tipici di IPA selezionati, da spettri ottenuti con spettrometri quadrupolari (70 eV); l'intensità relativa degli ioni va comunque verificata con la propria strumentazione e sotto specifiche condizioni operative. I picchi corrispondenti agli IPA da determinare vengono individuati mediante confronto dei tR con la soluzione di lavoro (nota 27).

L'analisi di un campione con basse concentrazioni di IPA, dopo un campione o una miscela di riferimento con alte concentrazioni, può risentire di un effetto "memoria"; pertanto, in questi casi, è raccomandabile un'iniezione intermedia di solvente per verificare l'assenza di tale effetto.

Per valutare la ripetibilità analitica nelle proprie condizioni strumentali (e dunque l'opportunità di più analisi replicate per determinare il risultato), si confrontano i rapporti tra le risposte dell'analita e dello standard interno, piuttosto che le risposte assolute dell'analita.

9. Calcolo ed espressione dei risultati

Per calcolare la concentrazione C del singolo IPA nel campione d'acqua, si applicano le seguenti formule:

9.1. Procedura con analisi GC/FID

$$C = \frac{R_{camp} \cdot C_{st} \cdot V_{camp}}{R_{st} \cdot V_{acqua} \cdot Rec \cdot 10}$$

dove:

- C = concentrazione espressa in ng/L
- R_{camp} = risposta dell'IPA misurata nel campione (area o altezza)
- R_{st} = risposta dell'IPA misurata nella miscela di riferimento (volume iniettato pari a quello del campione)
- C_{st} = concentrazione dell'IPA nella miscela di riferimento (pg/ μ L)
- V_{camp} = volume del campione prima dell'analisi (μ L)
- V_{acqua} = volume del campione d'acqua estratto (L)
- Rec = recupero dell'IPA (%; nota 28)

9.2. Procedura con analisi GC/MS

$$C = \frac{R_{IPA} \cdot M_{si} \cdot V_{camp}}{R_{si} \cdot RF \cdot V_{in} \cdot V_{acqua} \cdot Rec \cdot 10}$$

dove:

C	=	concentrazione espressa in ng/L
RIPA	=	risposta dell'IPA misurata nel campione (abbondanza dello ione caratteristico)
Rsi	=	risposta dello standard interno misurata nel campione (abbondanza dello ione caratteristico)
Msi	=	massa di standard interno iniettata (pg)
RF	=	fattore di risposta per l'IPA
Vcamp	=	volume del campione prima dell'analisi (µL)
Vin	=	volume di campione iniettato (µL)
Vacqua	=	volume del campione d'acqua estratto (L)
Rec	=	recupero dell'IPA (%; nota 28)

9.3. Limite di rivelabilità

Nel resoconto della determinazione, i risultati “non rivelabile” devono essere accompagnati dall'indicazione del limite di rivelabilità del metodo nelle condizioni usate. Tale limite deve essere stimato sul campione reale e non sulla miscela di riferimento (*nota 29*).

10. Precisione del metodo

Nel corso di prove effettuate presso alcuni laboratori, è stata riscontrata una ripetibilità (precisione intralaboratorio, espressa come CV %) contenuta entro il 10%. Tale precisione è stata ottenuta con entrambi i metodi (GC/FID e GC/MS) e su campioni d'acqua di rubinetto arricchiti a livelli di concentrazione (10 ng/L per il BaP; 25 ng/L per BbFA, BkFA, IP e BghiP) corrispondenti ai valori limite normativi.

11. Bibliografia

Gazzetta Ufficiale. DPR 24/5/1988, n. 236. Attuazione della direttiva CEE n. 80/778 concernente la qualità delle acque destinate al consumo umano, ai sensi dell'art. 15 della legge 16 aprile 1987, n. 183. Suppl. ord. Gazz. Uff. n. 152 del 30/6/1988.

Gazzetta ufficiale delle Comunità europee. Direttiva 98/83/CE del Consiglio del 3 novembre 1998 concernente la qualità delle acque destinate al consumo umano. GU L 330/32 del 5/12/1998.

IARC. Overall Evaluations of Carcinogenicity: An Updating of IARC Monographs Volumes 1 to 42. Mon. Eval. Carcin. Risk Hum., 1987, Suppl. 7. IARC, Lyon.

Menichini, E. Polycyclic aromatic hydrocarbons: identity, physical and chemical properties, analytical methods. Istituto Superiore di Sanità, Roma, 1994. (Rapporti Istituzionali; 94/5).

US EPA. Method 610-Polynuclear Aromatic Hydrocarbons. In: Guidelines Establishing Test Procedures for the Analysis of Pollutants Under the Clean Water Act. Environmental Protection Agency, US Federal Register 49, No. 209, October 26, 1984, 43344-43352.

12. Note

Nota 1. Nel caso di campioni particolarmente carichi, può risultare opportuno l'uso di lastre con spessore 0,5 mm; alternativamente, è possibile depositare il campione sulla lastra lungo una striscia più lunga (8.3.).

Nota 2. Qualora non sia disponibile una siringa con ago di diametro esterno compatibile con la colonna in uso, si può utilizzare una pre-colonna disattivata da 0,32 mm, lunga almeno 1 m, con connettore in vetro o in acciaio. In questo caso, si raccomanda di verificare accuratamente la tenuta del connettore e, se in vetro, di scaldarlo quando viene montato.

Nota 3. A fini di sicurezza, per ridurre la manipolazione degli IPA puri e dunque il rischio di contaminazione, si raccomanda di prelevare la sostanza possibilmente con un'unica operazione (si consideri che generalmente 5 mg di IPA corrispondono approssimativamente ad una punta di spatola). Se la quantità di 5 mg dovesse essere largamente superata, potrebbero esserci problemi nel solubilizzare completamente la polvere, particolarmente con i composti a maggior peso molecolare: in questo caso, dopo decantazione, la soluzione surnatante limpida viene travasata nel pallone tarato (se necessario, di capacità superiore ai 25 mL indicati) e si aggiunge toluene fresco nel *vial*.

Nota 4. Al fine di poter verificare nel tempo che non ci sia stata evaporazione significativa di solvente, si marca il livello della soluzione in occasione della preparazione e poi ad ogni prelievo; in alternativa, si può registrare il peso del *vial* misurato prima e dopo ogni prelievo. Si suggerisce di preparare nuovamente le soluzioni primarie di riferimento dopo circa un anno.

Nota 5. In alternativa, in funzione dell'obiettivo dell'analisi (e particolarmente in assenza di indicazioni sulle concentrazioni attese nell'acqua prelevata o in caso di concentrazioni variabili in un ampio intervallo), può essere conveniente considerare come concentrazioni di riferimento nell'acqua quelle corrispondenti ai valori limite della normativa (per BbFA, BkFA, IP e BghiP: si assume circa $\frac{1}{4}$ del loro valore limite cumulativo). In questo caso, per campioni concentrati (pronti per l'analisi) a circa 100 μL , la miscela di riferimento avrà dunque concentrazioni approssimativamente pari a 100 e 250 $\text{pg}/\mu\text{L}$, rispettivamente, per il BaP e gli altri IPA.

Nota 6. Controllare con regolarità che non ci sia stata degradazione a carico di uno o più IPA, verificando la costanza del "profilo" GC della miscela (cioè, l'insieme dei rapporti quantitativi tra i vari IPA). Poiché i t_R dei singoli IPA possono variare (al variare delle condizioni operative, della lunghezza della colonna, ecc.), si raccomanda di effettuare tale verifica mediante le aree (piuttosto che le altezze) dei picchi. Preparare nuovamente la miscela di riferimento appena si constata o si sospetta una modifica nel titolo.

Nota 7. Se, oltre ai 5 IPA richiesti dalla normativa, vengono determinati altri IPA, occorre verificare preliminarmente che, nelle condizioni analitiche impiegate, non ci siano picchi interferenti tra di loro e con i 5 richiesti dalla normativa. In questo caso, è opportuno preparare due miscele concentrate di riferimento, ognuna delle quali contenga IPA non interferenti tra di loro. (Si ricorda che i due BFA sono solo parzialmente risolti tra loro e, nelle matrici ambientali, danno luogo ad un unico picco per la presenza del terzo isomero BjFA coeluyente; si veda (3.))

Nota 8. A titolo d'esempio, per un estratto concentrato a 200 μL prima dell'analisi, proveniente da un campione d'acqua di 1 L e assumendo un recupero quantitativo, le concentrazioni delle soluzioni di lavoro dovrebbero essere approssimativamente nell'intervallo 12,5-250 $\text{pg}/\mu\text{L}$. Tale intervallo è selezionato per un'analisi il cui obiettivo è il controllo della conformità ai valori limite normativi. Poiché concentrazioni inferiori a tale intervallo sono comunemente attese nei campioni reali, se si intendono dosare livelli di IPA $\leq 1 \text{ ng/L}$ si può estendere l'intervallo a livelli $< 12,5 \text{ pg}/\mu\text{L}$ oppure concentrare maggiormente il campione finale.

Nota 9. A titolo d'esempio, nel caso riportato nella *nota 8*, la concentrazione dello standard interno deuterato dovrebbe essere intorno a 100 $\text{pg}/\mu\text{L}$.

Nota 10. Tale miscela è costituita da: naftalene, acenaftilene, acenaftene, fluorene, fenantrene, antracene, fluorantene, pirene, BaA, crisene, BbFA, BkFA, BaP, IP, DBahA, BghiP.

Nota 11. Si raccomanda di programmare l'approvvigionamento di ogni materiale di consumo (filtri, reagenti, materiali di riferimento, lastre TLC, ecc.) in modo da effettuare un insieme quanto più numeroso possibile di determinazioni senza modificare marca, tipo e lotto di alcun materiale.

Nota 12. L'accettabilità dei risultati ottenuti nei controlli del recupero e della ripetibilità è legata alla valutazione di fattori quali l'obiettivo dell'indagine o il rapporto tra le concentrazioni misurate ed i valori di riferimento. In particolare, a giudizio del responsabile dell'analisi, una ripetibilità relativamente scarsa può essere accettata se la conseguente imprecisione non inficia la conformità o meno del risultato al valore limite. Scarse prestazioni, nel recupero e nella ripetibilità, sono possibili a concentrazioni intorno o

Versione on-line su sito www.iss.it

poco superiori al limite di rivelabilità. Qualora non siano raggiunti i livelli di qualità indicati nel testo, i risultati delle analisi devono essere considerati come “concentrazione approssimata”.

Nota 13. L'esigenza che non cambi l'operatore deriva, in particolare, dall'elevata manualità insita nella procedura di purificazione per TLC.

Nota 14. Avendo disponibile, invece del solfato granulare, quello in polvere (che comporta un eccessivo impaccamento della colonna), si può effettuare l'essiccamento facendo percolare l'estratto su Na_2SO_4 (circa 30 g) contenuto in un imbuto di vetro (5.5.) oppure aggiungendo Na_2SO_4 agli estratti combinati in una beuta e lasciando a riposare per almeno 30 min (avvolgere la beuta con foglio d'alluminio). Al termine, lavare comunque il solfato di sodio con DCM.

Nota 15. A titolo indicativo, si riporta la seguente procedura operativa per il trattamento contemporaneo di due campioni. Con una matita a mina dura (*nota 16*), vengono segnate con tratto leggero sulla lastra: la linea di deposizione, a 2 cm da un bordo; l'arrivo del fronte del solvente, a 2 cm dal bordo opposto; le demarcazioni, sulla linea di deposizione, per i campioni ed il riferimento: bordo esterno di 2 cm - corridoio di 4 cm per il primo campione - corridoio di separazione di 2 cm - corridoio centrale di 4 cm per il riferimento - corridoio di separazione di 2 cm - corridoio di 4 cm per il secondo campione - bordo esterno di 2 cm (le demarcazioni risultano dunque a 2, 6, 8, 12, 14, 18 cm da un bordo laterale).

Nota 16. Non risulta la presenza di IPA nel bianco-reagenti conseguenti all'uso della matita. Si tenga comunque presente questa potenziale fonte di interferenze nel valutare i risultati del bianco-reagenti. E' stato segnalato un caso di contaminazione da paraffine.

Nota 17. Se necessario (a seguito dei risultati ottenuti con il bianco-reagenti), la lastra viene ulteriormente lavata con la miscela di solventi impiegata come eluente.

Nota 18. Si tenga presente che, su una lastra da 0,25 mm di spessore e sotto la luce a 366 nm, è visibile una macchia fluorescente conseguente al deposito di una soluzione contenente 2,5 ng di BaP e 10 ng di BbFA, BkFA, IP e BghiP (corrispondenti ai limiti di rivelabilità richiesti dalla normativa, per 1 L d'acqua). La macchia è ancora visibile (pur se non nettamente) se le quantità sono pari a 2,5 ng per tutti e cinque gli IPA.

E' preferibile che il riferimento sia depositato prima del campione, per minimizzare il tempo di esposizione all'aria (e dunque di possibile degradazione) del campione.

Nota 19. Sulla base di quanto riportato nella *nota 18*, e dopo verifica della rivelabilità - sotto la luce UV - della miscela dei cinque IPA nelle proprie condizioni sperimentali, l'assenza di macchia fluorescente costituisce un'utile indicazione sui bassi livelli di concentrazione degli IPA e, dunque, sull'opportunità di proseguire o meno la determinazione, in funzione dell'obiettivo dell'analisi.

Nota 20. Durante la delimitazione e l'asportazione della macchia, prestare la massima attenzione ad evitare contaminazione incrociata, attraverso la punta della matita e la spatola, sia tra i campioni che tra questi ed il riferimento. La matita per questa operazione deve essere differente da quella usata per le demarcazioni iniziali sulle lastre pulite. Lavare con acetone la spatola dopo aver asportato ogni singolo campione.

Il gel di silice può essere raccolto, ad esempio, sopra un foglio di carta formato protocollo aperto, e poi frantumato per compressione dopo aver chiuso il foglio su se stesso.

Curare che la superficie interna della colonna sia asciutta prima di sversarvi il gel di silice.

Nota 21. Il volume finale di circa 100 μL è indicativo ai fini di un dosaggio del BaP a livelli intorno a 2,5-10 ng/L. Se necessario, il campione può essere ulteriormente concentrato fino a circa 50 μL . Tuttavia, se compatibile con i livelli di IPA nel campione e con gli obiettivi dell'analisi, un volume finale maggiore è preferibile in quanto consente una maggiore accuratezza nella misura del volume stesso e minimizza il rischio di effetti indesiderati sul campione (precipitati, corpo di fondo, doppia fase, ecc.), cui comunque occorre fare attenzione nell'analisi di campioni molto concentrati.

Nota 22. Il programma termico deve essere comunque tale da consentire:

- la migliore separazione degli IPA da eventuali interferenze;

- tempi di analisi relativamente brevi per evitare eccessivi allargamenti dei picchi degli IPA a maggior peso molecolare.

Nota 23. Iniettare il campione tal quale e poi il campione arricchito, ed individuare i picchi che presentano un incremento a seguito dell'arricchimento. A titolo indicativo, il campione arricchito può essere ottenuto prelevando con la siringa, in sequenza, circa 0,2 µL della miscela di riferimento, aria ed infine (dopo aver immerso la punta dell'ago in toluene di lavaggio) 1,0 µL di campione. L'arricchimento deve essere tale da provocare un incremento dei picchi chiaramente individuabile ma non eccessivo (al punto da mascherare un eventuale sdoppiamento del picco arricchito). Iniezioni *on-column* di volumi superiori sono sconsigliate in quanto possono dar luogo a peggioramento della risoluzione.

Nota 24. Nel caso di identificazione positiva di IPA in un campione, un utile criterio per valutare la plausibilità dei risultati consiste nel confrontare il profilo gascromatografico degli IPA con quello di altri campioni appartenenti allo stesso insieme omogeneo (0.1.3.) e/o con quelli comunemente riportati in letteratura per matrici possibilmente equivalenti o, in mancanza, per altre matrici ambientali. Marcate difformità nei profili dovrebbero essere fonte di sospetto e comportare opportune verifiche; ciò vale soprattutto nel caso vengano identificati apparentemente solo uno o pochi IPA, in particolare tra quelli riportati in Tabella 1, e risultino assenti gli altri.

Nota 25. Si tenga presente, tuttavia, che la spettrometria di massa non consente la differenziazione di alcuni IPA isomeri, la quale va dunque effettuata mediante l'uso dei t_R gascromatografici. Tale rivelatore consente quindi di confermare la presenza di un IPA con un determinato peso molecolare, il cui spettro può corrispondere - in linea generale - a più isomeri e, solo in particolari casi, ad uno specifico isomero. Si consideri inoltre che, nell'elenco - fornito automaticamente dalle librerie (incluse quelle ottenute con il proprio strumento) - delle sostanze assegnabili allo spettro in esame, quella effettivamente presente non compare sovente come la più probabile (secondo il parametro *match* o equivalente).

Nota 26. La procedura di aggiungere lo standard interno ("di processo") al campione d'acqua prima dell'estrazione (ottenendo così delle risposte analitiche già corrette per l'efficienza di recupero) non è raccomandabile in quanto il recupero percentuale di IPA differenti non è, in linea di massima, lo stesso. Essa può essere tuttavia adottata, in alternativa a quella qui descritta, impiegando - quali standard interni - vari IPA isotopicamente marcati, con diversi numeri di anelli (6.6.2.).

Nota 27. Particolare cura va posta in questa operazione, per la presenza di possibili IPA interferenti, con gli stessi ioni caratteristici e t_R vicini (si veda anche (3.)). In particolare: il crisene e il trifenilene (coeluenti) eluiscono subito dopo il BaA; il benzo[e]pirene subito prima del BaP. Inoltre, si tenga presente che una variazione tra i t_R di un IPA nel campione e nella soluzione di lavoro può essere dovuta ai differenti tempi trascorsi, nelle due analisi, tra l'iniezione e l'attivazione dell'acquisizione dei dati (*start*): in questo caso, occorre verificare che tale variazione sia la stessa per tutti gli IPA. In caso di dubbio sull'assegnazione del picco, si può ricorrere all'impiego del "metodo delle aggiunte" (8.4.2.).

Nota 28. Ad es., "73" nel caso di un recupero del 73%.

Nota 29. Il limite di rivelabilità può essere stimato, per un insieme omogeneo di campioni (0.1.3.):

- dall'analisi di un campione nel quale gli IPA siano presenti poco sopra il limite di rivelabilità;
- aggiungendo opportune quantità crescenti di una miscela di riferimento di IPA ad un campione ove non siano rivelabili, fino ad ottenimento di un picco rivelabile.