

**METODI ANALITICI PER LA  
DETERMINAZIONE DI MICROINQUINANTI  
ORGANICI NEI RIFIUTI:**

CARATTERIZZAZIONE DEL CONTENUTO DI  
IDROCARBURU POLICICLICI AROMATICI (IPA) NEL  
MATERIALE DI RIFERIMENTO RM-004 (COMPOST) E  
STUDIO COLLABORATIVO SULLA VERIFICA DEL  
METODO DI ANALISI.

**Dott.ssa Monica Potalivo**

**Tutor:**

**Dott.ssa Stefania Balzamo**

# Indice

## Capitolo 1: Il Progetto, legge 93/01

<b>1.1</b>	<b><i>Introduzione</i></b>	<b><i>pag. 1</i></b>
<b>1.2</b>	<b><i>I laboratori di riferimento</i></b>	<b><i>pag. 2</i></b>
<b>1.3</b>	<b><i>Obiettivi e fasi del progetto</i></b>	<b><i>pag. 3</i></b>

## Capitolo 2: Studio Collaborativo per la determinazione di IPA nel Compost

<b>2.1</b>	<b><i>Analisi dei diversi metodi presenti in letteratura per gli IPA</i></b>	<b><i>pag. 4</i></b>
<b>2.2</b>	<b><i>Procedura comune utilizzata per lo Studio Collaborativo</i></b>	<b><i>pag. 5</i></b>
<b>2.3</b>	<b><i>Materiale di riferimento: Compost</i></b>	<b><i>pag. 11</i></b>
<b>2.4</b>	<b><i>Metodo impiegato per la caratterizzazione del Compost RM-004</i></b>	<b><i>pag. 11</i></b>
2.4.1	<i>Scopo ed applicazione</i>	<i>pag 11</i>
2.4.2	<i>Riassunto del metodo</i>	<i>pag 11</i>
2.4.3	<i>Estrazione mediante Accelerated Solvent Extraction (ASE)</i>	<i>pag 12</i>
2.4.4	<i>Preparazione del campione estratto per analisi GC/MS</i>	<i>pag 13</i>
2.4.5	<i>Analisi al GC/MS</i>	<i>pag 14</i>
2.4.6	<i>Calcoli</i>	<i>pag 14</i>
2.4.7	<i>Esecuzione del bianco procedurale</i>	<i>pag 16</i>

## Capitolo 3: Risultati

<b>3.1</b>	<b><i>Omogeneità del Compost</i></b>	<b><i>pag 17</i></b>
<b>3.2</b>	<b><i>Studio Collaborativo sugli IPA nel Compost</i></b>	<b><i>pag 22</i></b>

## Capitolo 4: Conclusioni

<b><i>Riferimenti bibliografici</i></b>	<b><i>pag 26</i></b>
<b><i>Allegato A: Metodo ISTISAN</i></b>	<b><i>pag 27</i></b>
<b><i>Allegato B: Metodo APAT-IRSA</i></b>	<b><i>pag 47</i></b>
<b><i>Allegato C: Metodi US-EPA</i></b>	<b><i>pag 57</i></b>

# Capitolo 1

## **Il Progetto: “Avvio della realizzazione dei primi nodi della rete nazionale dei laboratori di riferimento: analisi di diossine, PCB e IPA, in tutte le matrici ambientali e alimentari”**

### **Legge 93/01**

#### **1.1. Introduzione**

Il presente lavoro di stage si inserisce all'interno del Progetto: “Avvio della realizzazione dei primi nodi della rete nazionale dei laboratori di riferimento: analisi di diossine (PCDD e PCDF), PCB e IPA, in tutte le matrici ambientali e alimentari”.

Le famiglie di sostanze quali Policlorodibenzodiossine (PCDD), Policlorodibenzofurani (PCDF), Policlorobifenili (PCB), e Idrocarburi Policiclici Aromatici (IPA) costituiscono alcune tra le principali categorie di contaminanti noti come “microinquinanti organici”.

Sia le diossine, che i PCB “diossine simili” sono ritenuti particolarmente tossici anche a bassissime concentrazioni, mentre ben 11 IPA, famiglia di composti organici con più anelli condensati, sono stati classificati dallo IARC (Agenzia Internazionale per la Ricerca sul Cancro) come probabili e possibili cancerogeni per l'uomo (rispettivamente classe 2A e 2B).

E' necessario disporre di laboratori molto ben attrezzati in strutture e strumentazioni e con personale specializzato che sia in grado non solo di individuare ma anche di dosare con precisione i suddetti microinquinanti, i cui ordini di grandezza delle concentrazioni attese sono dell'ordine dei picogrammi e di conseguenza ben al di sotto dei limiti determinabili dalle normali dotazioni delle analisi ambientali. La Commissione delle Comunità Europee con la Comunicazione al Consiglio, al Parlamento Europeo, al Comitato Economico ha

previsto che debbano esser svolti approfondimenti specifici ed analitici finalizzati alla redazione di nuove norme in questo settore.

L'Italia, come del resto anche gli altri paesi europei, è chiamata a fornire un quadro completo della contaminazione non solo delle matrici ambientali ma anche di quelle alimentari, nonché a disporre di laboratori che siano nelle condizioni di poter affrontare, qualora si presentassero, eventuali emergenze. Questa problematica è demandata al sistema delle Agenzie e l'APAT ha finanziato il Progetto per la realizzazione della rete nazionale dei laboratori di riferimento sulle analisi di microinquinanti organici in tutte le matrici ambientali e alimentari.

### ***1.2. I laboratori di riferimento***

Uno degli obiettivi principali del Progetto è quello di avviare la costituzione di una “rete” di laboratori di riferimento intesa come un sistema di strutture analitiche, “nodi”, distribuite sul territorio nazionale, in grado di fornire risposte affidabili (supportate da un sistema di gestione della qualità) sia alle domande provenienti dal territorio di appartenenza che, in caso di necessità, da aree diverse dal territorio nazionale, secondo procedure predefinite e coordinate. I “nodi” di questa rete di laboratori costituiranno la parte integrante del sistema ed opereranno in maniera coordinata con lo stesso approccio scientifico in modo da riprodurre risposte utilizzabili su tutto il territorio nazionale per le varie necessità di tutela dell'ambiente.

Nell'ambito del progetto si prevede, per tale rete la costituzione di due tipologie di nodo:

- **“nodo di tipo A”**, ovvero laboratorio in grado di garantire, al completamento del progetto, la capacità di effettuare analisi di tutti i microinquinanti organici considerati nelle varie matrici secondo metodiche di riferimento identificate nell'ambito del progetto, di fornire supporto analitico al sistema delle Agenzie in caso di necessità, di collaborare con le strutture di riferimento nella produzione e caratterizzazione dei materiali di riferimento, nonché di offrire percorsi formativi alle agenzie con minore esperienza e a quelle che devono completare la messa in opera dei loro percorsi analitici.
- **“nodo di tipo B”**, ovvero laboratorio in grado di garantire un supporto analitico di “routine” alla determinazione dei microinquinanti organici.

### ***1.3. Obiettivi e fasi del progetto***

Il Progetto, che tra l'altro, prevede la possibilità di estendere lo studio a nuove tipologie di famiglie di microcontaminanti come ad esempio i Polibromodifenileteri (PBDE), ha per obiettivo fondamentale il raggiungimento di tutti i presupposti necessari a realizzare l'implementazione delle capacità analitiche finalizzate alla quantificazione dei microinquinanti (nella prospettiva di garantire un'adeguata "copertura geografica") e si svolge nelle seguenti fasi:

- ❖ Identificazione di metodi e strumentazione di riferimento in relazione agli obiettivi delle indagini analitiche.
- ❖ Messa a punto dello schema tipo di un laboratorio dedicato alla determinazione dei microinquinanti.
- ❖ Percorsi di verifica attraverso esercizi interlaboratori assistiti ai fini di assicurare l'affidabilità della rete di laboratori e la confrontabilità dei risultati tra nodi della rete stessa.
- ❖ Organizzazione di circuiti interlaboratorio (estesi a tutte le agenzie regionali) in cui è previsto l'utilizzo di materiali di riferimento preparati ad hoc dal servizio di Metrologia Ambientale di APAT.

Alcuni tra i principali risultati attesi dalle fasi sopra illustrate sono:

- ❖ Rilevazione della situazione iniziale delle strutture laboratoristiche delle Agenzie Partecipanti.
- ❖ Identificazione dei metodi e delle strumentazioni di riferimento.
- ❖ Formazione del personale

## Capitolo 2

# Studio collaborativo per la determinazione degli IPA nel Compost

### 2.1. Analisi dei diversi metodi presenti in letteratura per gli IPA

E' stata pertanto svolta durante lo stage un'attività di ricerca bibliografica, volta all'individuazione dei metodi impiegati per il dosaggio degli IPA in matrici ambientali quali acque di scarico, rifiuti e fanghi e redatti da enti quali EPA, APAT-IRSA ed ISTISAN.

Sulla base dei metodi più significativi (e descritti nel dettaglio negli Allegati A, B e C) è in fase di valutazione lo schema tipo del laboratorio dedicato ai microinquinanti e la messa a punto del metodo migliore da impiegare per il dosaggio dei microinquinanti organici presenti in tutte le matrici ambientali ed alimentari.

Dallo studio dei metodi riportati in allegato è risultato evidente che l'intero processo di analisi degli IPA può essere riassunto nelle seguenti fasi:

- Trattamento e preparazione del campione
- Estrazione
- Purificazione
- Determinazione dei contaminanti
- Elaborazione dei risultati

Il metodo ISTISAN (Allegato A) è sicuramente un metodo chiaro e completo in quanto descrive molto dettagliatamente ciascuna delle fasi sopra elencate e fornisce tutte le precauzioni necessarie per evitare la contaminazione dei campioni e di conseguenza falsi positivi (pulizia della vetreria, bianco-reagente, bianco-procedurale...etc). Purtroppo tale metodo presenta "l'enorme" limitazione di essere applicabile esclusivamente per il dosaggio di soli 8 IPA. Prevede, inoltre, l'utilizzo "dell'antica" cromatografia su strato sottile (TLC) che pur essendo una tecnica di purificazione semplice, versatile ed

economica è caratterizzata da una riproducibilità ed efficienza di separazione molto inferiore rispetto ad altre tecniche moderne (come ad esempio cromatografia su colonna o su disco).

In base al metodo APAT-IRSA (Allegato B) la determinazione quantitativa degli IPA può ottenersi mediante analisi in gascromatografia/ spettrometria di massa (GC/MS) oppure in cromatografia ad alta pressione (HPLC) con rivelatore ultravioletto (UV) o a fluorescenza. La scelta tra le due tecniche è strettamente dipendente dalle caratteristiche del campione e dall'esperienza dell'operatore. Infatti per quanto riguarda la GC/MS oltre alle considerazioni legate alla complessità della procedura per la preparazione del campione, bisogna considerare il fatto che la strumentazione è costosa ed è necessaria una buona esperienza per una corretta interpretazione del risultato. Buone prospettive di maggior praticabilità vengono dagli studi sull'uso dell'HPLC. Questo tipo di separazione cromatografica, infatti, si sta diffondendo nei laboratori di analisi per la sua grande versatilità dal momento che permette anche la determinazione di sostanze tremolabili, non polari e non volatili.

Infine i metodi US-EPA (Allegato C) nel complesso possono considerarsi i più "flessibili". L'US-EPA, infatti, tende ad analizzare singolarmente ciascuna fase del processo di quantificazione degli IPA. Il risultato di un simile approccio è la formulazione di un Metodo per ogni tecnica analitica attualmente disponibile. L'operatore in questo modo ha la possibilità di scegliere volta per volta in funzione dello stato fisico del campione (liquido o solido) o della natura della sua matrice (rifiuto, alimentare o più in generale ambientale) la migliore metodica per effettuare l'estrazione (Soxhlet, ASE, ultrasuoni ...etc), la purificazione (TLC, cromatografia su disco o colonna, gel permeation...etc) e determinazione quantitativa (GC/FID, GC/MS e HPLC).

## **2.2. Procedura comune utilizzata per lo Studio Collaborativo**

Per lo studio collaborativo è stato messo a punto e, quindi, seguito un protocollo che è fedelmente specificato di seguito:

### **Studio Collaborativo per il dosaggio di "Idrocarburi Policiclici Aromatici (IPA) in matrici ambientali"**

Il Circuito che viene proposto costituisce il primo, delle due prove previste, nell'ambito della Linea Progettuale 4a della Legge 93/01 APAT, mirato alla standardizzazione di

procedure e metodi di prova eseguiti presso i Laboratori delle Agenzie per il dosaggio degli IPA in matrici ambientali

**- Lo Studio Collaborativo è esteso a tutte le Agenzie Nazionali -**

Il campione che viene proposto è costituito da un materiale derivante da un impianto di compostaggio, contenente IPA e fornito dal Servizio di Metrologia Ambientale dell'APAT.

Ciascun Laboratorio riceverà alcune decine di grammi di tale campione, che dovrà processare **in triplicato** seguendo il protocollo analitico qui riportato, e i materiali di riferimento, nativi e deuterati, che dovrà utilizzare nell'esecuzione delle prove analitiche.

La determinazione strumentale di ciascuna replica dovrà essere effettuata **in doppio**.

Ogni Laboratorio, in aggiunta, potrà determinare la quantità dei singoli IPA contenuti nel campione, applicando il metodo abitualmente adottato.

In entrambi i casi il metodo ed i dettagli del sistema GC/MS impiegati vanno indicati al momento dell'invio dei risultati.

Il protocollo che viene suggerito, è applicabile utilizzando la tecnica strumentale GC/MS in quanto prevede l'esecuzione di una diluizione isotopica sul campione di prova; nel caso che un Laboratorio intenda partecipare ugualmente applicando un metodo GC/FID (gascromatografia con detector a ionizzazione di fiamma) o HPLC, può eseguire un'analisi nelle consuete condizioni adottate, sfruttando, come materiale di riferimento, la miscela "Standard Nativi" in dotazione.

❖ ***Marcatura ed estrazione***

Ad una quantità di campione compresa tra 1 e 10 g (peso consigliato 1-3 g), pesata esattamente con un'incertezza sulla terza cifra decimale (bilancia analitica), vengono aggiunti 50 µL della soluzione "Standard interno ovvero Standard Deuterati di Estrazione" (vedere **Tabella 2.1**), e, successivamente, si procede all'estrazione in soxhlet con 50 mL di una miscela n-esano/acetone 1:1. Dopo 100 cicli l'estratto ottenuto viene concentrato, con cautela, a piccolo volume con evaporatore rotante impostando, dove possibile, il bagno termostatico a 40 °C, ed una pressione di 350 mBar. Quando il volume dell'estratto è ridotto a circa 1÷2 mL si esegue la purificazione.

### ❖ *Purificazione*

L'estratto concentrato come al punto precedente, viene trasferito in una colonna di 1 cm di diametro, munita di rubinetto di teflon, contenente della lana di vetro sul fondo, 10 cm di gel di silice 70÷230 mesh, 1 cm di solfato di sodio anidro, e ancora della lana di vetro, preventivamente "attivata" facendo eluire 10 mL di n-esano. Una volta trasferito l'estratto sulla sommità di tale colonna, si eluisce con 10 mL di n-esano (Frazione 1, da scartare) e, successivamente, con 20 mL di una miscela n-esano/diclorometano 1:1(Frazione 2). Quest'ultima frazione viene portata a secchezza, con cautela, sotto flusso di azoto.

Se la quantità di campione estratta fosse maggiore di quella consigliata, è possibile che le quantità riportate (dimensioni della colonna, gel di silice, solventi, etc) non siano sufficienti per una purificazione soddisfacente; in tal caso eseguire una purificazione con colonne di silice di dimensioni superiori, adeguando proporzionalmente i volumi di solventi utilizzati per l'eluizione (le quantità indicate vanno bene per aliquote di prova di alcuni grammi e non eccessivamente cariche di sostanze organiche interferenti).

Esempio: Se per la colonna da 1 cm i due eluati sono di 10 mL e di 20 mL,  
per una colonna da 2 cm gli eluati saranno rispettivamente di 40 mL e di 80 mL .

All'estratto purificato portato a secco si aggiungono 50 µL della soluzione "Standard di Siringa" (vedere **Tabella 2.1**) e 1 µL della soluzione ottenuta viene iniettata in GC/MS acquisendo in SIM i vari frammenti in bassa risoluzione.

### ❖ *Calcoli*

Viene fornito un foglio elettronico per il dosaggio dei singoli IPA trovati nel campione di prova. Questo prevede un semplice inserimento delle aree degli analiti trovati (IPA nativi), di quelli deuterati aggiunti inizialmente al campione (Standard Deuterati di Estrazione) e di quelli deuterati aggiunti all'estratto purificato portato a secchezza (Standard Deuterati di Siringa).

### ❖ *Fattori di risposta relativi*

Per completare la quantificazione degli analiti tramite lo standard interno andranno inseriti anche i Fattori di Risposta Relativi (rrf) ottenibili dall'iniezione di una miscela di riferimento ottenuta miscelando tra loro volumi noti dei i tre standard forniti: Standard Nativi + Standard Deuterati di Estrazione + Standard Deuterati di Siringa.

Lo standard rrf è così costituito

20 µL di standard di Nativi+20 µL di standard di estrazione+20 µL di standard di siringa

❖ ***Esecuzione di un bianco***

La stessa procedura descritta, uguale per quantità e qualità dei materiali, viene effettuata partendo da 1 g (o 10 g) di solfato di sodio anidro. Le aree degli eventuali segnali osservati nella determinazione strumentale, in corrispondenza dei tempi di ritenzione dei singoli IPA, devono essere detratte dalle aree osservate per il campione. Questo costituisce il Bianco procedurale.

**Di seguito viene riportata (Tabella 2.2), a titolo di esempio, una applicazione utilizzata per la separazione gascromatografica degli IPA.**

Per la separazione cromatografica di tutti i 23 IPA riportati nella lista dei componenti della soluzione “Standard Nativi” (**Tabella 2.1**) si consiglia l’uso di una colonna avente una fase metil 50 % fenil silicone ed una lunghezza di almeno 30 metri, utilizzando una programmata di temperature tipo la seguente:

	Standard Nativi volume: 200 µL concentrazione: 200 pg/µL	Ioni di riferimento	Standard Deuterati di Estrazione volume: 200 µL concentrazione: 200 pg/µL	Ioni di riferimento	Standard Deuterati di Siringa volume: 200 µL concentrazione: 200 pg/µL	Ioni di riferimento
1	<a href="#">Naphthalene</a>	128				
2	<a href="#">Acenaphthylene</a>	152			<a href="#">Acenaphthylene-d8</a>	160
3	<a href="#">Acenaphthene</a>	154	<a href="#">Acenaphthene-d10</a>	164		
4	<a href="#">Fluorene</a>	166				
5	<a href="#">Phenanthrene</a>	178	<a href="#">Fenanthrene-d10</a>	188		
6	<a href="#">Anthracene</a>	178				
7	<a href="#">Fluoranthene</a>	202	<a href="#">Fluoranthene-d10</a>	212		
8	<a href="#">Pyrene</a>	202				
9	<a href="#">Benzo(a)anthracene</a>	228	<a href="#">Benzo(a)anthracene-d12</a>	240		
10	<a href="#">Chrysene</a>	228			<a href="#">Chrysene-d12</a>	240
11	<a href="#">Benzo(b)fluoranthene</a>	252				
12	<a href="#">Benzo(k)fluoranthene</a>	252				
13	<a href="#">Benzo(j)fluoranthene</a>	252				
14	<a href="#">Benzo(e)pyrene</a>	252				
15	<a href="#">Benzo(a)pyrene</a>	252	<a href="#">Benzo(a)pyrene-d12</a>	264		
16	<a href="#">Perilene</a>	252				
17	<a href="#">Indeno(1,2,3-cd)pyrene</a>	276			<a href="#">Indeno(1,2,3-cd)pyrene-d14</a>	290
18	<a href="#">Dibenzo(a,h)anthracene</a>	278	<a href="#">Dibenzo(a,h)anthracene-d14</a>	292		
19	<a href="#">Benzo(ghi)Perilene</a>	276				
20	<a href="#">Dibenzo(a,l)pyrene</a>	302				
21	<a href="#">Dibenzo(a,e)pyrene</a>	302				
22	<a href="#">Dibenzo(a,i)pyrene</a>	302	<a href="#">Dibenzo(a,i)pyrene-d14</a>	316		
23	<a href="#">Dibenzo(a,h)pyrene</a>	302				

**Tabella 2.1:** Composizione degli standards di IPA forniti per l’attuazione dello Studio Collaborativo

Tipo di iniezione	Splitless
Tempo di chiusura della valvola	1 minuto
Temperatura iniettore	250 °C
Pressione in testa alla colonna	4.0 psi (variabile a seconda delle caratteristiche della colonna al momento dell'utilizzo)
Flusso totale	25 mL/min
Flusso in colonna	2.2 mL/min
Colonna capillare	XXX- 50 % Fenilsilicone, lunghezza 30 m, diametro interno 0.25 mm, spessore del film 0.25 $\mu\text{m}$
Temperature interfaccia (Transfer Line)	280 °C
<i>Programma di temperature del forno</i>	
Temperatura iniziale	60 °C
Tempo di permanenza	1 minuto
Velocità 1 di riscaldamento	30 °C/minuto
Temperatura finale 1	130 °C
Tempo di permanenza	1 Minuto
Velocità 2 di riscaldamento	8 °C/minuto
Temperatura finale 2	190 °C
Tempo di permanenza	5 Minuti
Velocità 3 di riscaldamento	6 °C/minuto
Temperatura finale	310 °C
Tempo di permanenza	12 Minuti
Tempo complessivo	48 minuti

**Tabella 2.2:** Condizioni operative che possono essere impiegate per la determinazione dei 23 IPA riportati nella lista sovrastante. (**Tabella 2.1**).

### **2.3. Materiale di riferimento utilizzato: Compost**

Il servizio di Metrologia Ambientale dell'APAT di Roma ha prodotto e distribuito a tutte le Agenzie il materiale di riferimento impiegato per lo Studio Collaborativo. Tale materiale classificato come Compost RM-004 è stato preparato impiegando del compost prelevato da cumuli stabilizzati di un impianto di compostaggio dedicato al trattamento di rifiuti di origine vegetale e/o mercatale. Una volta essiccato il materiale è stato setacciato su vaglio a 2 mm. La frazione di compost inferiore a 2 mm è stata macinata meccanicamente fino ad una granulometria inferiore a 90 µm mentre è stata scartata quella superiore a 2 mm in quanto costituita da materiale ligneo o comunque di natura non ad esso riconducibile. Dopo aver omogeneizzato il materiale di riferimento mediante cilindro rotante per 4 settimane, sono state effettuate delle prove finalizzate a verificare l'omogeneità della sua massa complessiva. L'omogeneità della massa complessiva di materiale è stata determinata tramite misure di Carbonio e Azoto totale su dieci aliquote di campione (10-15 g), ognuna prelevata direttamente dall'omogenizzatore ad intervalli di 3 minuti. L'imbottigliamento è avvenuto in un'unica giornata di lavoro prestando delle particolari attenzioni per evitare fenomeni di stratificazione. Sono state effettuate sul materiale così prodotto tutte le analisi necessarie per realizzare le prove sia di omogeneità che di stabilità prima di provvedere alla sua distribuzione per lo Studio Collaborativo.

### **2.4. Metodo impiegato per la caratterizzazione del Compost RM-004**

#### ***2.4.1. Scopo ed applicazione***

Il presente Metodo consente di effettuare la determinazione di alcuni tra i principali IPA (il cui elenco è riportato nella **Tabella 2.3**) in matrici ambientali quali suoli e rifiuti.

#### ***2.4.2. Riassunto del metodo***

Gli Idrocarburi Policiclici Aromatici presenti nei campioni di Compost sono estratti tramite ASE. Gli estratti così ottenuti sono portati a secchezza mediante flusso laminare di N<sub>2</sub> (ultrapuro, 99%). I campioni vengono successivamente ripresi con 1 mL di una miscela di solventi organici opportunamente scelti ed analizzati tramite GC/MS.

N°	Nome comune
1	naftalene
2	acenaftene
3	acenaftilene
4	fluorene
5	fenantrene
6	antracene
7	fluorantene
8	pirene
9	benzo (a) antracene
10	crisene
11	benzo (b) fluorantene
12	benzo (k) fluorantene
13	benzo (a) pirene
14	indeno (1,2,3-c,d) pirene
15	dibenzo (a,h) antracene
16	Benzo (g,h,i) perilene

**Tabella 2.3:** Idrocarburi policiclici aromatici analizzati con il presente metodo.

#### 2.4.3. Estrazione mediante Accelerated Solvent Extraction (ASE)

Riempire la cella con la miscela campione-idromatrice (rispettivamente 3 e 5 grammi) attraverso l' apposito imbuto fornito dalla ditta costruttrice dello strumento.

Per garantire un impaccamento omogeneo ma non eccessivo è sufficiente percuotere la cella con piccoli colpi su una superficie piana senza pressare il campione. Nel caso si sia usato per le pesate un pesafiltro di vetro, il recupero del articolato più fine rimasto adeso alle pareti del contenitore può essere effettuato mediante aggiunta di 1 o 2 mL di acetone.

Dopo aver "collocato" la cella sul carosello dello strumento avviare l'estrazione.

Le condizioni ed i parametri operativi impostate nel programma di estrazione sono di seguito elencate (**Tabella 2.4.** Per maggiori dettagli ed eventuali chiarimenti vedere l'Istruzione Operativa IO.AMB-MET.14)

<b>Parametro</b>	
Pressione	10 Mpa (1500 psi)
Temperatura del forno	100°C
Peso del campione	3 g
Tempo di riscaldamento	5 minuti
Tempo del ciclo di statica	5 minuti
Solvente	Diclorometano/Acetone (1:1),(v/v)
Volume di lavaggio	60% del volume della cella di estrazione
Flussaggio con N <sub>2</sub>	1 MPa (150 psi) per 120 sec

**Tab 2.4:** Valori dei parametri impostati nel programma di estrazione (come descritto nel Metodo U.S EPA 3545)

#### **2.4.4. Preparazione del campione estratto per analisi GC/MS**

Portare a secco il campione tramite flusso laminare di N<sub>2</sub>.

Occorre precisare che la procedura sopra descritta non consente di portare a secco l'estratto ottenuto mediante ASE in tempi brevi e di fatto costituisce il vero step lento dell'intero processo. La limitazione deriva dal fatto che al termine dell'estrazione il volume della fase liquida, costituita sia dall'acqua estratta dal campione (in quanto caratterizzato da un suo contenuto di umidità residua) che dai solventi organici supera i 30 mL. E' evidente che per quanto possa risultare nettamente inferiore il contenuto di acqua rispetto a quello dei solventi organici volatili, sono necessarie almeno un paio d'ore per seccare ogni estratto. Tempi nettamente minori per evaporare volumi di liquidi simili potrebbero ottenersi utilizzando l'evaporatore centrifugo o il rotavapor. In mancanza di tali apparecchiature l'evaporazione dei solventi mediante flusso di N<sub>2</sub> costituisce tutt'ora una valida, economica nonché semplice alternativa.

Riprendere il campione estratto e portato a secco con 1 mL di una miscela Acetone/Metanolo (1:1),(v/v) avendo cura di lavare accuratamente anche le pareti del recipiente di vetro (la vial di vetro scuro dell'ASE, nello specifico) che lo conteneva.

### 2.4.5. *Analisi al GC/MS*

Iniettare 1-2  $\mu\text{L}$  del campione ottenuto applicando la procedura sopra esposta. Ogni campione (ed i bianchi procedurali, vedere paragrafo 2.4.7) deve essere analizzato almeno due volte per avere modo di verificare la riproducibilità delle misure.

Le condizioni operative impostate sul GC/MS modello HP6890 sono elencate nella **Tabella 2.3**.

### 2.4.6. *Calcoli*

Effettuare la quantificazione del segnale cromatografico (area del picco) tramite la retta di taratura che si ottiene dalla regressione lineare delle aree dei picchi cromatografici registrati dall'analisi di almeno tre soluzioni multicomponenti di IPA a concentrazioni crescenti preparati diluendo opportunamente dei materiali di riferimento certificati.

E' bene precisare che la preparazione degli standards per diluizione dei materiali di riferimento certificati deve essere realizzata impiegando soluzioni di composizione uguale a quelle utilizzate per diluire i campioni portati a secco (vedere paragrafo 2.4.4.).

Calcolare la concentrazione effettiva degli IPA presenti all'interno del campione ricorrendo alle seguenti formule:

$$C_{GC/MS} = \frac{A - b}{a}$$

$$C_{effettiva} = \frac{C_{GC/MS}}{g \text{ campione secco}} \cdot V_f$$

$C_{GC/MS}$ : concentrazione (ppb) di analita osservata in GC/MS

$C_{effettiva}$  = concentrazione (ng/g) di analita;

$A$  = area del picco dell'analita nella miscela incognita;

$b$  = valore dell'intercetta della retta di taratura;

$a$  = valore del coefficiente angolare della retta di taratura;

$V_f$  = volume (L) dell'estratto finale.

---

<b><i>Oven:</i></b>	
Initial temp	70°C
Initial time	1 minuto
<b><i>Ramp:</i></b>	
Rate	10°C/minuto
Final Temp	290°C
Post temp	290°C
Post time	10 minuti
Run time	45 minuti
<b><i>Front inlet</i></b>	
Mode	Pulsed Splitless
Initial temp	290°C
Pressure	0.432 bar
Pulse Pressure	0.90 bar
Pulse time	1.00 min
Purge flow	40 mL/min
Purge time	2.50 min
Total flow	42.8 mL/min
Gas saver	on
Saver flow	40.0 mL/min
Saver time	2.00 min
Gas type	Helium
<b><i>Colonna</i></b>	
Colonna capillare	HP-5MS 5% Phenyl Methyl Siloxane
Nominal lenght	30.0 m
Nominal diamentere	0.25 mm
Nominal film thickness	0.25µm
Initial flow	0.8 mL/min
Nominal init pressure	0.433 bar
<b><i>Transfer Line</i></b>	
Temperature	285°C

---

**Tab 2.3:** Condizioni operative utilizzate per l'analisi in GC/MS.

**2.4.7. Esecuzione del bianco procedurale**

Effettuare la stessa procedura sopra descritta, uguale per quantità e qualità dei materiali, su almeno due campioni costituiti esclusivamente da circa 5 grammi di idromatrice. Alle concentrazioni di IPA ottenute nei campioni devono essere sottratte quelle eventualmente riscontrate nel Bianco procedurale.

## Capitolo 3

### Risultati

#### 3.1. Omogeneità del Compost

Il Servizio di Metrologia Ambientale dell'APAT ha fornito il Compost RM-004 come materiale di riferimento da impiegare nello Studio Collaborativo. Dato che lo Studio Collaborativo è mirato a valutare l'efficienza dei laboratori delle Agenzie Nazionali nella quantificazione degli IPA, sono state effettuate delle analisi preliminari con lo scopo di determinare la concentrazione degli IPA presenti nel Compost RM-004 e verificarne l'omogeneità rispetto a tali analiti posti sotto osservazione.

Per valutare l'omogeneità di tale materiale sono state condotte delle analisi sia intra- (all'interno di una singola bottiglia) che tra- (ponendo a confronto le concentrazioni di IPA osservate in bottiglie differenti) bottiglia.

Occorre precisare che per:

1. **Le analisi intra-bottiglia:** Sono state analizzate (per la metodica vedere Capitolo 2) 5 aliquote (3 grammi circa di peso secco di campione) prelevate da una singola bottiglia di RM-004 contenente Compost.
2. **Le analisi tra-bottiglia:** Gli IPA sono stati quantificati in 5 aliquote ottenute prelevando circa 3 grammi di peso secco da 5 bottiglie differenti di RM-004.

Nelle **Tabelle 3.1** e **3.2** sono riportati i risultati ottenute dalle analisi effettuate sul materiale RM-004 al netto del bianco procedurale.

E' rilevante notare che gli IPA più volatili (naftalene, acenaftilene e acenaftene) siano sempre presenti in minor concentrazione. Il metodo seguito, infatti, non consente un buon recupero della frazione più leggera di tali idrocarburi. E' pertanto in fase di studio un metodo alternativo che preveda la quantificazione dei 16 IPA riportati nelle **Tabelle 3.1** e **3.2** con recuperi confrontabili ma soprattutto accettabili. Il fatto poi che nel bianco le concentrazioni siano così elevate (in alcuni casi più del 30% di quelle osservate nei

campioni) dimostra la necessità di condurre ulteriori studi e approfondimenti mirati alla realizzazione di sistemi in cui sia effettivamente possibile minimizzare ogni eventuale fonte di contaminazione esterna (non attribuibile cioè al contenuto di IPA intrinseco del campione).

Dal momento che tali analisi erano finalizzate a verificare l'omogeneità del Compost RM-004, la trattazione statistica è stata condotta, sia per l'intra- che per il tra-bottiglia, considerando solamente il Fenantrene, Fluorantene, Pirene e Crisene in quanto tali composti presentavano nei campioni un livello di concentrazione maggiore rispetto a quello attribuibile ai restanti Idrocarburi Policiclici Aromatici quantificati ed aventi dei picchi cromatografici più facilmente individuabili sia per altezza che per risoluzione all'interno del complesso cromatogramma. I risultati ottenuti dall'elaborazione statistica sono riportati nelle **Tabelle 3.3 e 3.4**.

	<b>Bianco</b>	<b>RM004-336 1</b>	<b>RM004-336 2</b>	<b>RM004-336 3</b>	<b>RM004-336 4</b>	<b>RM004-336 5</b>					
	Conc. osservata in GC/MS (ppb)	Conc. osservata in GC/MS (ppb)	<b>Conc. effettiva (ng/g secco)</b>								
<i>Naftalene</i>	0.99	12.03	<b>4.44</b>	13.46	<b>4.98</b>	23.02	<b>8.49</b>	20.48	<b>7.49</b>	11.64	<b>4.29</b>
<i>Acenaftilene</i>	0.94	37.75	<b>13.92</b>	35.48	<b>13.13</b>	36.68	<b>13.53</b>	33.23	<b>12.16</b>	30.19	<b>11.12</b>
<i>Acenaftene</i>	0.86	3.26	<b>1.20</b>	3.30	<b>1.22</b>	4.17	<b>1.54</b>	6.72	<b>2.46</b>	7.32	<b>2.70</b>
<i>Fluorene</i>	4.72	15.48	<b>5.71</b>	12.02	<b>4.45</b>	9.70	<b>3.58</b>	14.09	<b>5.16</b>	17.16	<b>6.32</b>
<i>Fenantrene</i>	4.66	200.69	<b>74.00</b>	189.52	<b>70.13</b>	222.03	<b>81.88</b>	198.81	<b>72.75</b>	214.45	<b>79.00</b>
<i>Antracene</i>	2.31	12.89	<b>4.75</b>	12.59	<b>4.66</b>	14.58	<b>5.38</b>	15.84	<b>5.80</b>	15.88	<b>5.85</b>
<i>Fluorantene</i>	3.46	227.44	<b>83.87</b>	214.90	<b>79.52</b>	241.14	<b>88.93</b>	213.72	<b>78.21</b>	231.07	<b>85.12</b>
<i>Pirene</i>	4.17	186.49	<b>68.77</b>	171.13	<b>63.32</b>	196.42	<b>72.44</b>	177.40	<b>64.92</b>	191.11	<b>70.40</b>
<i>Benzo[a]antracene</i>	4.04	69.57	<b>25.65</b>	67.50	<b>24.97</b>	70.50	<b>26.00</b>	60.45	<b>22.12</b>	56.08	<b>20.66</b>
<i>Crisene</i>	5.76	114.91	<b>42.37</b>	111.63	<b>41.31</b>	119.97	<b>44.24</b>	109.77	<b>40.17</b>	113.68	<b>41.88</b>
<i>Benzo[b]fluorantene</i>	4.52	95.97	<b>35.39</b>	90.97	<b>33.66</b>	101.28	<b>37.35</b>	90.70	<b>33.19</b>	90.12	<b>33.20</b>
<i>Benzo[k]fluorantene</i>	5.17	69.26	<b>25.54</b>	61.71	<b>22.83</b>	55.15	<b>20.34</b>	61.44	<b>22.48</b>	57.23	<b>21.08</b>
<i>Benzo[a]pirene</i>	4.31	56.93	<b>20.99</b>	52.28	<b>19.34</b>	84.73	<b>31.25</b>	51.49	<b>18.84</b>	51.43	<b>18.95</b>
<i>Indeno[1,2,3-c,d]pirene</i>	5.52	74.14	<b>27.34</b>	62.51	<b>23.13</b>	70.56	<b>26.02</b>	67.76	<b>24.79</b>	63.65	<b>23.45</b>
<i>dibenzo[a,h]antracene</i>	6.47	30.04	<b>11.08</b>	23.64	<b>8.75</b>	21.89	<b>8.07</b>	23.89	<b>8.74</b>	27.07	<b>9.97</b>
<i>benzo[g,h,i]perilene</i>	5.62	74.33	<b>27.41</b>	65.43	<b>24.21</b>	67.16	<b>24.77</b>	65.97	<b>24.14</b>	62.93	<b>23.18</b>

**Tabella 3.1:** Risultati analisi condotte su 5 aliquote differenti prelevate da una bottiglia di Compost classificata come RM004-336.

	<b>Bianco</b>	<b>RM004-209</b>	<b>RM004-461</b>	<b>RM004-338</b>	<b>RM004-559</b>	<b>RM004-151</b>					
	Conc. osservata in GC/MS (ppb)	Conc. osservata in GC/MS (ppb)	<b>Conc. effettiva (ng/g secco)</b>								
<i>Naftalene</i>	0.99	7.29	<b>2.68</b>	9.58	<b>3.53</b>	13.14	<b>4.79</b>	10.18	<b>3.76</b>	11.59	<b>4.26</b>
<i>Acenaftilene</i>	0.94	25.40	<b>9.34</b>	14.28	<b>5.26</b>	11.14	<b>4.06</b>	7.89	<b>2.91</b>	4.95	<b>1.82</b>
<i>Acenaftene</i>	0.86	8.40	<b>3.09</b>	6.81	<b>2.51</b>	1.72	<b>0.63</b>	5.35	<b>1.97</b>	3.03	<b>1.11</b>
<i>Fluorene</i>	4.72	13.51	<b>4.97</b>	13.30	<b>4.90</b>	16.32	<b>5.95</b>	21.50	<b>7.93</b>	25.09	<b>9.21</b>
<i>Fenantrene</i>	4.66	226.92	<b>83.47</b>	209.96	<b>77.33</b>	233.51	<b>85.13</b>	192.16	<b>70.88</b>	204.07	<b>74.94</b>
<i>Antracene</i>	2.31	16.53	<b>6.08</b>	15.14	<b>5.57</b>	17.99	<b>6.56</b>	17.64	<b>6.50</b>	17.38	<b>6.38</b>
<i>Fluorantene</i>	3.46	258.56	<b>95.11</b>	227.92	<b>83.94</b>	257.24	<b>93.79</b>	207.08	<b>76.38</b>	216.47	<b>79.49</b>
<i>Pirene</i>	4.17	193.88	<b>71.32</b>	207.24	<b>76.33</b>	224.70	<b>81.92</b>	190.09	<b>70.11</b>	201.65	<b>74.05</b>
<i>Benzof[antracene</i>	4.04	69.89	<b>25.71</b>	66.26	<b>24.40</b>	71.12	<b>25.93</b>	67.00	<b>24.71</b>	73.85	<b>27.12</b>
<i>Crisene</i>	5.76	121.36	<b>44.64</b>	113.32	<b>41.74</b>	125.90	<b>45.90</b>	112.32	<b>41.43</b>	118.42	<b>43.48</b>
<i>Benzof[fluorantene</i>	4.52	105.29	<b>38.73</b>	97.00	<b>35.72</b>	107.83	<b>39.31</b>	87.23	<b>32.17</b>	84.68	<b>31.10</b>
<i>Benzof[k]fluorantene</i>	5.17	68.97	<b>25.37</b>	63.53	<b>23.40</b>	59.23	<b>21.59</b>	64.50	<b>23.79</b>	64.16	<b>23.56</b>
<i>Benzof[a]pirene</i>	4.31	68.92	<b>25.35</b>	55.49	<b>20.44</b>	59.30	<b>21.62</b>	58.16	<b>21.45</b>	50.89	<b>18.69</b>
<i>Indeno[1,2,3-c,d]pirene</i>	5.52	75.28	<b>27.69</b>	71.24	<b>26.24</b>	72.95	<b>26.60</b>	68.81	<b>25.38</b>	58.44	<b>21.46</b>
<i>dibenzof[a,h]antracene</i>	6.47	21.72	<b>7.99</b>	17.30	<b>6.37</b>	17.26	<b>6.29</b>	21.26	<b>7.84</b>	18.18	<b>6.68</b>
<i>benzof[g,h,i]perilene</i>	5.62	66.81	<b>24.58</b>	61.30	<b>22.58</b>	64.68	<b>23.58</b>	59.69	<b>22.01</b>	50.16	<b>18.42</b>

**Tabella 3.2:** Risultati analisi condotte su 5 aliquote prelevate da 5 bottiglie differenti di Compost RM004

IPA				
	Fenantrene ng/g secco	Fluorantene ng/g secco	Pirene ng/g secco	Crisene ng/g secco
<i>RM004-209</i>	83.47	95.11	71.32	44.64
<i>RM004-461</i>	77.33	83.94	76.33	41.74
<i>RM004-338</i>	85.13	93.79	81.92	45.90
<i>RM004-559</i>	70.88	76.38	70.11	41.43
<i>RM004-151</i>	74.94	79.49	74.05	43.48
<b>media</b>	78.35	85.74	74.75	43.44
<b>Scarto tipo</b>	5.93	8.40	4.68	1.90
<b>Scarto tipo media</b>	2.65	3.76	2.09	0.85
<b>CV %</b>	7.57	9.80	6.26	4.37

**Tabella 3.3:** Valori dei parametri statistici calcolati sulla base delle concentrazioni di IPA osservate all'interno delle 5 bottiglie analizzate di Compost RM-004.

IPA				
	Fenantrene ng/g secco	Fluorantene ng/g secco	Pirene ng/g secco	Crisene ng/g secco
<i>RM004-336 1</i>	74.00	83.87	68.77	42.37
<i>RM004-336 2</i>	70.13	79.52	63.32	41.31
<i>RM004-336 3</i>	81.88	88.93	72.44	44.24
<i>RM004-336 4</i>	72.75	78.21	64.92	40.17
<i>RM004-336 5</i>	79.00	85.12	70.40	41.88
<b>media</b>	75.55	83.13	67.97	41.99
<b>Scarto tipo</b>	4.79	4.34	3.79	1.50
<b>Scarto tipo media</b>	2.14	1.94	1.69	0.67
<b>CV %</b>	6.33	5.22	5.58	3.58

**Tabella 3.4:** Valori dei parametri statistici calcolati sulla base delle concentrazioni di IPA osservate nelle 5 aliquote di Compost RM-004.

All'interno di una singola bottiglia i coefficienti di variazione (CV%) sono tutti inferiori ai corrispettivi osservati nelle 5 bottiglie differenti. Tale evidenza è giustificata dal fatto che normalmente l'omogeneità di un materiale di riferimento intra-bottiglia è sempre maggiore di quella tra-bottiglia non essendo affetta dall'errore associato alla fase di imbottigliamento. E' comunque significativo il fatto che il coefficiente di variazione dell'intra-bottiglia sia dello stesso ordine di grandezza di quello tra-bottiglia. Nel

complesso si può pertanto concludere che il materiale di riferimento prodotto e distribuito dal Servizio di Metrologia Ambientale sia omogeneo per gli analiti in esame.

### 3.2. Studio collaborativo sugli IPA nel Compost

Il primo esercizio interlaboratorio che è stato organizzato all'interno del progetto è stata la determinazione degli IPA in un materiale di riferimento preparato dal Servizio di Metrologia Ambientale.

I risultati ottenuti nell'ambito dello Studio Collaborativo sono sotto riportati (**Tabella 3.5**):

Risultati analitici							
Analiti	Unità di misura	1° replica		2° replica		3° replica	
		1° iniezione	2° iniezione	1° iniezione	2° iniezione	1° iniezione	2° iniezione
	µg/kg						
Naftalene	µg/kg	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Acenaphthylene	µg/kg	76.778	72.724	71.924	60.119	64.591	63.523
Acenaphthene	µg/kg	11.789	10.074	7.640	10.313	7.781	8.615
Fluorene	µg/kg	66.173	66.317	66.134	51.953	54.350	60.636
Phenantrene	µg/kg	66.127	70.734	66.280	64.939	71.467	68.449
Anthracene	µg/kg	9.541	7.763	11.334	6.695	9.307	8.480
Fluoranthene	µg/kg	112.408	108.556	113.342	117.587	103.754	102.722
Pyrene	µg/kg	32.830	30.948	74.192	80.722	38.226	37.412
Benzo(a)anthracene	µg/kg	31.059	31.843	27.222	29.731	32.612	30.755
Chrisene	µg/kg	65.815	63.615	60.096	58.030	63.986	59.797
Benzo(b)fluoranthene	µg/kg	35.610	35.052	33.100	35.460	38.489	37.966
Benzo(k)fluoranthene	µg/kg	16.639	19.513	15.424	19.244	23.449	22.729
Benzo(j)fluoranthene	µg/kg	15.966	14.117	16.434	16.114	18.356	18.719
Benzo(e)pyrene	µg/kg	29.776	31.000	28.267	29.949	33.578	33.871
Benzo(a)pyrene	µg/kg	20.746	21.084	20.214	20.961	24.344	25.304
Perilene	µg/kg	6.601	6.169	6.260	6.416	7.134	7.123
Indeno(1,2,3-cd)pyrene	µg/kg	15.064	15.120	15.536	15.772	15.851	17.466
Benzo(ghi)Perilene	µg/kg	21.045	19.940	21.842	22.150	22.840	22.794
DiBenzo(a,h)Anthracene	µg/kg	4.252	3.781	4.540	4.815	3.666	4.793
Dibenzo(a,l)Pyrene	µg/kg	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Dibenzo(a,e)Pyrene	µg/kg	4.759	4.252	4.076	4.630	4.868	4.945
Dibenzo(a,i)Pyrene	µg/kg	0.905	1.277	0.984	1.222	0.833	1.131
Dibenzo(a,h)Pyrene	µg/kg	0.714	0.548	0.602	0.899	0.604	0.508

**Tabella 3.5:** Risultati analitici ottenuti nell'ambito dello Studio Collaborativo da parte del Servizio di Metrologia Ambientale dell'APAT.

Risultati analitici				
Analiti	Unità di misura	Metodo impiegato per lo Studio Collaborativo	Metodo impiegato per l'omogeneità del compost	Differenza % tra i due metodi
Phenantrene	µg/kg	68.00	76.95	13.16
<b>Benzo(b)fluoranthene</b>	µg/kg	35.95	34.98	2.68
<b>Benzo(k)fluoranthene</b>	µg/kg	19.50	23.00	17.94
<b>Benzo(a)pyrene</b>	µg/kg	22.11	21.69	1.89
<b>Benzo(ghi)Perilene</b>	µg/kg	21.77	23.49	7.90

**Tabella 3.6:** Confronto tra le concentrazioni di alcuni IPA riscontrate nel Compost nell'ambito dello Studio Collaborativo con quelle osservate con le prove di omogeneità.

E' confortante verificare che, pur avendo impiegato due metodi (e cioè il Metodo relativo allo Studio Collaborativo ed il Metodo per la verifica dell'omogeneità del Compost) molto differenti tra loro perché basati su principi e strumentazioni diversi, si sia riscontrata per alcuni IPA (vedere **Tabella 3.6**) una buona accordanza tra i risultati. E' bene precisare che le maggiori differenze tra i risultati ottenuti sono state osservate per gli IPA a basso peso molecolare caratterizzati da una maggiore volatilità. Una simile evidenza sperimentale è giustificata dal fatto che entrambi i metodi sono stati ottimizzati per la quantificazione degli IPA più pesanti e meno volatili (come appunto il benzo[a]pirene) e risultano del tutto inadeguati e di conseguenza inattendibili per i composti più leggeri.

Inoltre è importante sottolineare che non è stato possibile reperire alcun dato di letteratura con cui confrontare i risultati ottenuti con le due metodiche fino adesso discusse. La completa assenza di lavori sulla caratterizzazione del Compost riportanti anche le concentrazioni di IPA in esso riscontrati può considerarsi una conseguenza di una inadeguata o quanto meno "non esaustiva" normativa. Infatti il D.M. 5/2/98 che regola il processo di compostaggio ed il successivo impiego del Compost, fissa i limiti di quantità di metalli addizionabili annualmente con la somministrazione del Compost ma non fornisce alcuna indicazione sui limiti di accettabilità per i microinquinanti organici.

Il fatto che non fossero previste delle restrizioni di concentrazione nel Compost per IPA, PCB e diossine ha condizionato la comunità scientifica che, perfettamente in linea con la normativa vigente, non ha reputato importante determinare tali composti nel suddetto materiale e di conseguenza non ha considerato che l'impiego di Compost, se effettuato senza controlli appropriati, può di fatto aumentare nell'ambiente il livello di contaminazione dei microinquinanti organici.

## Capitolo 4

### Conclusioni

Dagli studi condotti e dai risultati ottenuti durante il presente lavoro di stage è infine emerso che non è possibile la realizzazione di un metodo “universale” ovvero un metodo che sia in grado di garantire la quantificazione degli IPA indipendentemente dalla tipologia chimico-fisica della matrice del campione. E' inoltre evidente che la messa a punto di metodi con cui si possa dosare i suddetti microinquinanti organici risulta ancor più difficoltosa soprattutto nel caso in cui i campioni siano ambientali o alimentari.

In base alle ricerche effettuate durante il lavoro di stage si è giunti alla conclusione che per definire il metodo migliore, con cui determinare gli IPA, si deve procedere cautamente e seguire alcune considerazioni generali ma fondamentali:

**1.** Dal momento che presentano delle proprietà chimico-fisiche differenti (come ad esempio la volatilità) in funzione del loro peso molecolare, gli IPA possono suddividersi in IPA leggeri, intermedi e pesanti. Per ottimizzare l'identificazione, quantificazione e recupero degli IPA è consigliabile realizzare dei metodi specifici finalizzati cioè alla determinazione di tali contaminanti in relazione alla loro classe di appartenenza. Ricorrendo a questo tipo di approccio è infatti possibile considerare con le dovute attenzioni le eventuali differenze di tipo chimico-fisico esistenti tra gli IPA.

**2.** Per evitare falsi positivi, linee di fondo strumentali instabili ed ottenere un elevato rapporto segnale/rumore è necessario:

- Sottoporre tutti i materiali (reagenti e vetreria) impiegati per l'analisi ad accurati lavaggi in Soxhlet.
- Realizzare bianchi reagenti e procedurali per verificare di aver minimizzato la presenza di eventuali sostanze interferenti che potrebbero inficiare la determinazione degli IPA.

**3.** Per facilitare l'identificazione e quantificazione dei composti target è necessario considerare l'impiego di opportuni standard interni e deuterati (Rapporto ISTISAN 04/15).

4. La procedura adottata per eseguire l'estrazione degli IPA condiziona fortemente tutte le fasi successive dell'intero processo di quantificazione. Confrontando le prestazioni ottenute con i diversi sistemi di estrazione riportati in letteratura ed attualmente disponibili, si è giunti alla conclusione che la tecnica migliore è l'Accelerated Solvent Extraction (in sigla ASE). Tale tecnica infatti presenta notevoli vantaggi:

- Tempi di estrazione molto inferiori a quelli necessari a tutte le altre tecniche considerate (circa 30 minuti/campione rispetto ad esempio alle 6-12 ore/campione osservate con il Soxhlet).
- Basso consumo di solventi. Quest'ultimo è un aspetto di fondamentale importanza se si considera che uno dei solventi impiegati per estrarre gli IPA è proprio il diclorometano (DCM) che risulta essere una sostanza tossica e non tollerabile dal punto di vista ambientale.
- Predisposta per essere facilmente automatizzata.
- Semplice da usare.
- Non eccessivamente costosa.

Si potrebbe anche valutare l'utilizzo del metodo di purificazione su microcolonna (GPC) che anche se più costosa come strumentazione porterebbe ad una migliore separazione tra i diversi composti IPA e ad un utilizzo di DCM quasi irrisorio.

Questo sarebbe un notevole risparmio di solvente e quindi sarebbe un metodo più ambientalmente compatibile.

Una valutazione approfondita di queste altre tecniche potrebbe portare alla definizione di un metodo con le caratteristiche più idonee per la determinazione di questa categoria di microinquinanti organici.

# Riferimenti Bibliografici

**APAT-IRSA (2003)** “*Metodi analitici per le acque*” volume II, pag 697-705.

**ISTISAN (2004)** “*Trattamento dei dati inferiori al limite di rivelabilità nel calcolo dei risultati analitici*”.

**ISTISAN (2003)** “*Determinazione degli Idrocarburi Policiclici Aromatici (IPA). Metodo per gascromatografia con rivelazione a ionizzazione di fiamma e gascromatografia accoppiata alla spettrometria di massa*”.

**US-EPA Method 8100 (1986)** “*Polynuclear Aromatic Hydrocarbon*”.

**US-EPA Method 3540 (1996)** “*Soxhlet Extraction*”.

**US-EPA Method 3630 (1996)** “*Silica gel Cleanup*”.

**US-EPA Method 3545 (1998)** “*Pressurized Fluid Extraction (PFE)*”.

# Allegato A

## Metodo ISTISAN

### 1. Generalità

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 BjFA ed il DBahA (**Tabella 1**).

Nome comune <sup>a</sup>	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-Phenilenpyrene
Dibenz[a,h]antracene	DBahA	Dibenz[a,h]anthracene	1,2:5,6-Dibenzanthracene
Benzo[ghi]perilene	BghiP	Benzo[ghi]perylene	1,12-Benzoperylene

**Tabella 1A:** IPA selezionati a cui è applicabile il metodo

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

**Tabella 1B:** Proprietà chimico-fisiche degli IPA selezionati (modificata da Meneghini, 1994)

n.d.: temperatura non data

<sup>a</sup>n ordine di eluizione gascromatografica

<sup>b</sup> Cancerogenicità per l’uomo secondo IARC (1987). 2A: probabilmente cancerogeno, 2B: possibilmente cancerogeno, 3: non classificabile.

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

<sup>d</sup> Calcolato.

Di seguito è riportato solamente un’estratto del Metodo illustrato nel Rapporto ISTISAN 2003. Si consiglia di consultare la rispettiva versione integrale per visionare una descrizione maggiormente dettagliata delle apparecchiature principali e dei reagenti.

## 1. Definizioni

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

**2.4.1. 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 o in occasione della prova "Recupero", 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:

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, 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).

**2.4.2. Campioni reali:** Campioni prelevati sul campo nel corso dell'indagine.

**2.4.3. 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 nei campioni sia sostanzialmente costante, così come alcune prestazioni relative all'applicazione del metodo (ripetibilità, recupero, interferenze provenienti dalla matrice).

## 2. *Misure di sicurezza*

In considerazione dell'attività cancerogena associata a vari IPA (**Tabella 1**) nonché al diclorometano (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.

## 3. *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. 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.

## 4. *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 (cromatografia su strato sottile) 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.

## 5. *Interferenze e cause d'errore*

Nell'analisi GC/FID, interferisce qualunque composto che, presente nel campione dopo la purificazione, eluisca in GC con un tempo di ritenzione 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 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 tR 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.

❖ **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.

❖ **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.

## 6. **Campionamento e conservazione del campione**

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.

#### 7. *Apparecchiature principali*

- Attrezzatura comune di laboratorio

- **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: imbuto di vetro di diametro di almeno 10 cm, con un batuffolo di ovatta (sgrassata e lavata come sopra) inserito nel gambo.

- **Attrezzatura per TLC preparativa**

- **Attrezzatura per GC:**

Gasromatografo con rivelatore a ionizzazione di fiamma; sistema per l'acquisizione e l'elaborazione dei dati.

Gasromatografo 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.

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 gasromatografi:

Iniettore on-column o split-splitless. 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.

## 8. *Reagenti*

La purezza deve essere comunque tale che l'analisi del bianco-reagenti soddisfi i criteri riportati nel paragrafo 15.

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.

**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.

**Solfato di sodio ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) anidro per analisi:** Utilizzare preferibilmente un prodotto granulare purificato a  $400^\circ\text{C}$  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.

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

**DCM, n-esano, metanolo e toluene:** Utilizzare solventi a purezza "per HPLC" o equivalente, oppure ridistillati prima dell'uso

**IPA (BbFA, BkFA, BaP, IP, Bghi 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.

**Standard interno:** Per la determinazione dei 5 IPA richiesti dalla normativa, lo standard idoneo è il PE- $\text{d}_{12}$  (perilene deuterato).

**Eventuali standard interni "di processo":** 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.).

## 9. *Miscela di riferimento degli IPA per l'analisi GC/FID*

Contiene tutti gli IPA da determinare e lo standard surrogato.

### **9.1. Preparazione dei 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.

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.

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.

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.

### **9.2. 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.

## **10. Soluzioni di lavoro per l'analisi GC/MS**

Servono per il calcolo degli RF (fattore di risposta) relativi allo standard interno deuterato.

Si prepara dapprima una miscela concentrata di riferimento degli IPA da determinare, con una delle procedure sopra riportate. I rapporti quantitativi tra i 5 IPA richiesti dalla normativa devono risultare sull'ordine di grandezza dei corrispondenti rapporti relativi ai valori limite.

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.

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 in modo tale da ottenere una concentrazione finale di quest'ultimo intermedia rispetto al suddetto intervallo di lavoro.

#### **11. Soluzioni di lavoro dello standard surrogato**

La soluzione primaria di riferimento, preparata a partire dall'eventuale soluzione commerciale del materiale di riferimento, viene diluita con metanolo in modo tale che l'aliquota da aggiungere al campione da estrarre contenga una quantità di surrogato sull'ordine di grandezza atteso degli IPA da determinare.

#### **12. Soluzioni di lavoro dello standard interno deuterato PE-d<sub>12</sub>**

La soluzione primaria di riferimento, preparata a partire dall'eventuale soluzione commerciale, viene opportunamente diluita ai fini della successiva aggiunta alle soluzioni di lavoro (vedi 2.6.11) ed ai campioni estratti.

#### **13. Soluzione di recupero**

Serve per la prova "Recupero" (paragrafo 15) e contiene tutti gli IPA da determinare e lo standard surrogato. Si prepara per diluizione con metanolo delle soluzioni concentrate disponibili: le soluzioni primarie di riferimento, ovvero le soluzioni commerciali dei singoli materiali di riferimento o una miscela commerciale dei vari IPA. 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.

#### **14. 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) opportunamente diluita o da altre miscele equivalenti.

#### **15. Controllo di qualità**

I controlli che seguono devono essere effettuati:

inizialmente, prima di effettuare il prelievo dei campioni reali;

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, ogniqualvolta si cambi marca, tipo o lotto di un qualunque materiale;

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.

❖ **Bianco reagenti:** Si sottopone un campione d’acqua “reagente” (paragrafo 8) 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.

❖ **Recupero:** Si sottopone un campione d’acqua “reagente” 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.

❖ **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, 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 (coefficiente di variazione) 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.

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.

## **16. Procedura di misura**

### **16.1. 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, in volume di almeno 500  $\mu\text{l}$ , al campione d'acqua, direttamente dentro l'imbuto separatore; agitare moderatamente e attendere circa 30 min (durante l'attesa, curare la protezione dalla luce).

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 (vedi metodo integrale per le specifiche) contenente circa 30 g di Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 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.

Determinare il volume originale del campione:

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.

### **16.2. 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).

### **16.3. 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.

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). 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. Come riferimento, viene depositata nel corridoio centrale un'opportuna aliquota di miscela di riferimento, tale che sia rivelabile sotto la lampada UV. 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, 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!).

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.

#### **16.4. Analisi GC/FID:**

Subito prima dell'analisi, il campione viene ulteriormente concentrato sotto flusso d'azoto a poco meno di 100  $\mu$ L e se ne misura accuratamente il volume mediante microsiringa da 100  $\mu$ L.

In alternativa, il campione può essere cautamente portato a secco e subito dopo ripreso con 100  $\mu$ L di toluene.

**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 (paragrafo 14). Le seguenti condizioni, con la colonna 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.

Volume da iniettare: on-column, 1,0  $\mu$ L; splitless: 1-2  $\mu$ L.

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

**Identificazione:** L'individuazione dei picchi di interesse viene provvisoriamente effettuata mediante confronto dei tempi di ritenzione con quelli della miscela di riferimento (9.2). Poi, viene confermata con il "metodo delle aggiunte", cioè analizzando il campione arricchito con la miscela di riferimento. Per un insieme omogeneo di campioni 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.

**Dosaggio:** L'analisi quantitativa viene effettuata con il metodo della calibrazione esterna, impiegando la miscela di riferimento.

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.

**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 (Può essere sufficiente anche una variazione di 1°C/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 "> ...".

### **16.5. Analisi GC/MS:**

Si raccomanda di effettuare preliminarmente:

- un controllo esplorativo del campione in GC/FID per:
  - 1) evitare di contaminare il sistema GC/MS con campioni inaspettatamente "sporchi";
  - 2) valutare, in caso di successivo dosaggio, le concentrazioni approssimate degli IPA;
  - 3) valutare il recupero dello standard surrogato.
- un'analisi della miscela (definita nel paragrafo 14) per verificare l'efficienza della colonna e del sistema GC/MS.

**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. 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.

**Impiego per l'identificazione ed il dosaggio:** L'analisi viene condotta con tecnica SIM (single ion monitoring). 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.

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

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

<sup>a</sup>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).

**Calcolo degli RF:** Si analizza in GC/MS/SIM ogni standard di calibrazione 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:

$A_{IPA}$  = area dello ione caratteristico per l'IPA da determinare

$A_{si}$  = area dello ione caratteristico per lo standard interno deuterato

$C_{IPA}$  = concentrazione dell'IPA da determinare (pg/μL)

$C_{si}$  = 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 ( $A_{IPA}/A_{si}$ ) contro l'RF. Per la scelta degli ioni caratteristici, si veda di seguito.

#### Condizioni operative:

Valgono le indicazioni già riportate per l'analisi GC/FID. 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, le concentrazioni degli IPA siano all'interno dell'intervallo di lavoro e la concentrazione di PE-d12 sia quella presente nelle soluzioni di lavoro.

Si verifica, all'inizio di ogni giornata di lavoro, l'RF o la curva di calibrazione, 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 riefettuare 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.

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.

#### **17. Calcolo ed espressione dei risultati ottenuti in 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/ $\mu$ L)

$V_{camp}$  = volume del campione prima dell'analisi ( $\mu$ L)

$V_{acqua}$  = volume del campione d'acqua estratto (L)

$Rec$  = recupero dell'IPA (%)

### 18. *Calcolo ed espressione dei risultati ottenuti in 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

$R_{IPA}$  = risposta dell'IPA misurata nel campione (abbondanza dello ione caratteristico)

$R_{si}$  = risposta dello standard interno misurata nel campione (abbondanza dello ione caratteristico)

$M_{si}$  = massa di standard interno iniettata (pg)

$RF$  = fattore di risposta per l'IPA

$V_{camp}$  = volume del campione prima dell'analisi ( $\mu$ L)

$V_{in}$  = volume di campione iniettato ( $\mu$ L)

$V_{acqua}$  = volume del campione d'acqua estratto (L)

$Rec$  = recupero dell'IPA (%)

### 19. *Limite di rilevabilità*

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

**20.     *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.

# Allegato B

## Metodo APAT-IRSA

### *1. Principio del metodo*

Il metodo prevede la determinazione quantitativa di alcuni tra i principali idrocarburi policiclici aromatici in campioni di acque potabili, di falda, superficiali e di scarico mediante estrazione liquido-liquido o su fase solida ed analisi in gascromatografia/spettrometria di massa (HRGC/LRMS) con detector a selezione di massa, oppure in cromatografia liquida (HPLC) con rivelatore ultravioletto (UV) e a fluorescenza.

Nel caso di matrici complesse l'analisi in HRGC/LRMS deve essere preceduta da una purificazione dell'estratto organico su gel di silice in modo da isolare la frazione contenente gli idrocarburi policiclici aromatici dagli interferenti idrocarburi alifatici.

Il riconoscimento e la quantificazione dei singoli IPA è basata sul confronto dei tempi di ritenzione dei picchi del cromatogramma ottenuto dall'analisi dell'estratto organico del campione acquoso con quelli ottenuti da idonee soluzioni di riferimento.

La determinazione quantitativa degli IPA viene effettuata con le aree dei rispettivi picchi cromatografici sulla base di opportune rette di taratura di soluzioni di riferimento.

### *2. Campo di applicazione*

Il metodo consente di dosare gli analiti riportati in **Tab. 1** ad una concentrazione non inferiore a 0,005 µg/L.

Oltre ai composti riportati in **Tab. 1**, il metodo consente la determinazione di altri idrocarburi con caratteristiche simili.

N°	Nome comune
1	naftalene
2	acenaftene
3	acenaftilene
4	fluorene
5	fenantrene
6	antracene
7	fluorantene
8	pirene
9	benzo (a) antracene
10	crisene
11	benzo (k) fluorantene
12	benzo (j) fluorantene
13	benzo (b) fluorantene
14	benzo (a) pirene
15	benzo (e) pirene
16	perilene
17	dibenzo (a,h) antracene
18	indeno (1,2,3-c,d) pirene
19	benzo (g,h,i) perilene

**Tabella 1:** Idrocarburi policiclici aromatici analizzati con il presente metodo

### **3. *Interferenze e cause di errore***

Tutti quei composti organici con tempi di ritenzione coincidenti a quelli dei composti in esame possono essere considerati interferenti; procedimenti di purificazione utilizzati per isolare gli IPA possono ridurre al minimo queste interferenze.

Solventi, reagenti, vetreria, contaminazione dell'ambiente di lavoro possono essere causa di artefatti ed elevate linee di base che possono determinare errori nell'interpretazione dei dati cromatografici. Si deve dimostrare che tutti i materiali non diano interferenze nelle condizioni

di analisi adottate con l'utilizzo di prove in bianco.

#### **4. *Campionamento e conservazione del campione***

Il campionamento e la conservazione del campione vengono eseguiti conformemente alle norme generali riportate nella Sezione 1030 “Metodi campionamento”. Il campionamento deve essere effettuato in bottiglie di vetro della capacità 1-2 L. Le bottiglie e i tappi (possibilmente con sottotappi in teflon) devono essere risciacquati con acetone e seccati prima dell'uso. I campioni vanno conservati al buio ed in frigorifero a 4°C (è consigliabile effettuare le operazioni di estrazione il più presto possibile e comunque non oltre 48 ore).

#### **5. *Reattivi***

Acqua bidistillata esente da sostanze interferenti.

Solventi (esano, cicloesano, diclorometano, etilacetato, metanolo, acetonitrile, pentano, acetone) per uso pesticidi.

Sodio solfato anidro

Sodio cloruro RPE per analisi

Gel di silice 70/230 mesh

Cartucce per estrazione in fase solida (es. Empore disc C8 47 mm).

Lana di vetro silanizzata

Riferimenti interni deuterati: naftalene D8, acenaftene D10, fenentrene D10, risene D12, perilene D12.

#### **6. *Soluzioni di riferimento***

##### **6.1. *Soluzione di riferimento concentrate di IPA (1000 mg/L):***

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

I riferimenti primari si preparano pesando esattamente in un matraccio tarato da 25 mL una quantità di 25 mg di ciascun idrocarburo e portando a volume con metanolo.

Queste soluzioni madri possono essere conservate in congelatore e sono stabili per sei mesi se conservate in congelatore, per due mesi se conservate in frigorifero a 4°C. In modo

analogo vengono preparate le soluzioni concentrate per i riferimenti interni ad una concentrazione nominale di 500 mg/L.

Possono essere utilizzate soluzioni di riferimento multicomponente ad una concentrazione di 2000 mg/L purchè vendute con certificato di analisi.

### **6.2. Soluzione di riferimento diluita di IPA (20 mg/L):**

In un matraccio tarato da 25 mL introdurre 0,5 mL di ciascuna delle soluzioni da 1000 mg/L ad esclusione dei riferimenti interni e portare a volume con metanolo. Nel caso si utilizzino soluzioni di riferimento multicomponente già preparate queste vengono diluite in modo da ottenere una soluzione a 20 mg/L.

La soluzione dei riferimenti interni (SI metanolo) da utilizzare per le soluzioni di riferimento diluite viene preparata prelevando 1 mL delle soluzioni concentrate di ciascun componente e portando a volume in un matraccio tarato da 50 mL con metanolo.

La soluzione dei riferimenti interni da aggiungere al campione (SI acetone) viene preparata prelevando 0,1 mL delle soluzioni concentrate di ciascun componente e portando a volume in un matraccio tarato da 50 mL con acetone. La soluzione conservata in fiale silanizzate e in congelatore è stabile per due mesi.

### **6.3. Soluzioni diluite per taratura**

Le soluzioni diluite utilizzate per la taratura sono ottenute diluendo opportunamente con metanolo la soluzione di riferimento diluita di IPA.

- a. *Soluzione di riferimento IPA a 2 mg/L (Stdipa2):* In un matraccio tarato da 10 mL introdurre 1,0 mL della soluzione diluita e 1,0 mL della soluzione SI metanolo e portare a volume con metanolo.
- b. *Soluzione di riferimento IPA a 0,2 mg/L (Stdipa02):* In un matraccio tarato da 10 mL introdurre 0,1 mL della soluzione diluita e 1,0 mL della soluzione SI metanolo e portare a volume con metanolo.

## **7. Estrazione liquido/liquido**

Trasferire quantitativamente il campione di acqua in un imbuto separatore da 2 L. Risciacquare accuratamente la bottiglia con 50 mL di diclorometano.

Aggiungere il riferimento interno 0,1 mL (SI acetone) agitando per una accurata distribuzione.

Aggiungere il solvente di estrazione diclorometano (50 mL), agitare vigorosamente per 2 minuti.

Lasciare decantare e trasferire l'estratto ottenuto in un pallone da 250 mL. Ripetere l'estrazione altre due volte con uguali aliquote di solvente (50÷60 mL). Riunire gli estratti e anidrificarli con solfato di sodio anidro.

Concentrare a piccolo volume (circa 5 mL) l'estratto organico con evaporatore rotante; la temperatura del bagno termostatico non deve essere superiore a 40°C.

Dopo aver concentrato l'estratto a circa 1 mL sotto flusso di azoto trasferirlo quantitativamente in una fiala da 4 mL con diclorometano.

Fare attenzione durante le fasi di concentrazione a non andare a secco con l'estratto per non perdere gli IPA più volatili.

## **8. Estrazione su fase solida**

Gli analiti vengono estratti tramite estrazione su fase solida (SPE) utilizzando Empore disk C18 (o cartuccia C18). Lavare il disco con 10 mL di diclorometano e condizionarlo aggiungendo metanolo (10 mL) sotto vuoto. Rimuovere l'eccesso di solvente con acqua esente da contaminanti organici (10 mL). Far passare 2 litri di campione contenente 10 mL di metanolo attraverso il disco sotto un vuoto di 10 cm di Hg.

Durante questa operazione è necessario prevenire che il disco vada a secco controllando il vuoto e chiudendolo al momento opportuno.

Alla fine della filtrazione, far passare aria attraverso la membrana per alcuni minuti per rimuovere l'eccesso di acqua.

Eluire gli analiti facendo passare diclorometano (10 mL) con un vuoto moderato (circa 0,5 cm di Hg). Raccogliere l'eluato in provetta graduata e concentrare sotto flusso di azoto a temperatura ambiente a piccolo volume (esattamente misurato).

## **9. Purificazione dell'estratto su colonna di gel di silice**

### **9.1. Preparazione della fase stazionaria**

Purificare il gel di silice con diclorometano in Soxhlet per 12 ore. Evaporare il solvente residuo con evaporatore rotante e successivamente in stufa a 35°C. Attivare il gel di silice in stufa a 250°C per 16 ore e raffreddarlo in essiccatore sotto vuoto.

Attivare il sodio solfato a 400°C per 8 ore e raffreddarlo in essiccatore sotto vuoto. Le fasi stazionarie, conservate in essiccatore sotto vuoto, sono attive per 5 giorni.

### **9.2. Preparazione della colonna cromatografica**

Pesare in una beuta da 50 mL, munita di tappo smeriglio, 6,0 g di gel di silice, aggiungere 5 mL di una miscela esano/acetone 8:2 (v:v) e chiudere la beuta. Agitare e lasciare la beuta immersa in un bagno ad ultrasuoni per 5 minuti.

Introdurre nella colonna cromatografica pochi millilitri di esano. Trasferire nella colonna parzialmente riempita con esano, il gel di silice avendo cura che non si formino bolle d'aria. Aggiungere 2,0 g di solfato di sodio mantenendo la colonna sempre bagnata da esano. Condizionare la colonna con 10 mL di esano degasato mediante ultrasuoni.

### **9.3. Eluizione cromatografica**

Portare l'estratto del campione proveniente dal trattamento ad un volume di 0,5 mL in esano mediante leggero flusso di azoto (prepurificato per passaggio su setacci molecolari) e caricare quantitativamente il campione aiutandosi se necessario con una piccola quantità di esano. Eluire per gravità in successione con:

- 30 mL di esano (prima frazione di scarto contenente gli alifatici);
- 20 mL acetone/esano 1:1 (v/v) (seconda frazione contenente gli IPA).

Concentrare lentamente la seconda frazione in evaporatore rotante fino a 0,5 mL (evitando di andare a secco), quindi trasferirla in una fiala da 1,8 mL aiutandosi con esano. Aggiustare il volume fino ad una quantità nota compresa tra 0,5-1 mL (con esano o mediante leggero flusso di azoto, prepurificato per passaggio su setacci molecolari) a seconda delle concentrazioni attese. Fino al momento dell'analisi conservare l'estratto a 4°C al buio.

## **10. Analisi dell'estratto**

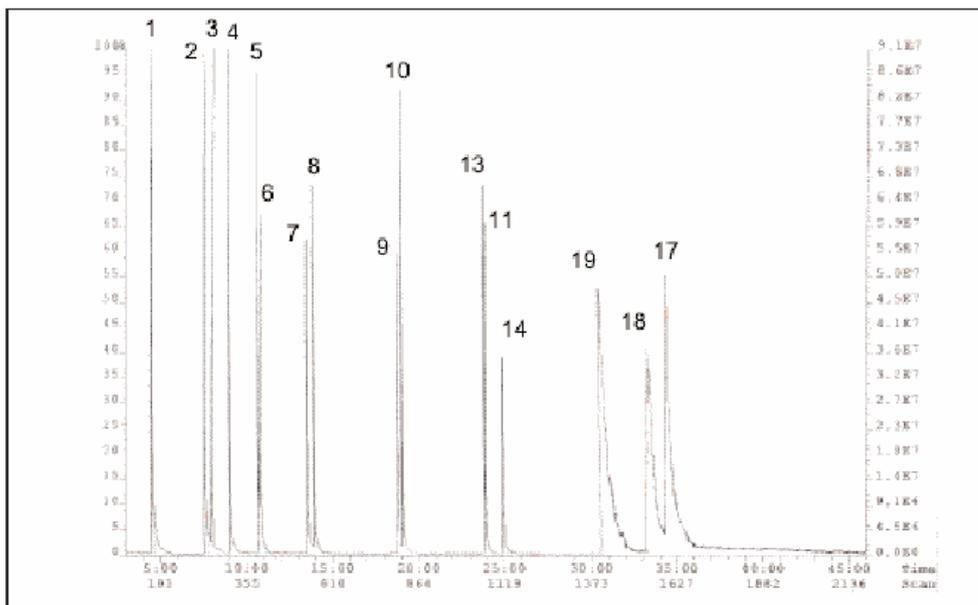
### **10.1. Analisi in HRGC/LRMS**

L'estratto organico proveniente dalla procedura di estrazione può essere analizzato direttamente in HRGC/LRMS oppure, nel caso di matrici complesse, sottoposto a purificazione su colonna di gel di silice come descritto in e poi analizzato.

È opportuno prima di iniziare l'analisi porre il forno alla massima temperatura raggiunta dall'analisi e monitorare la linea di base fino a che questa resti costante.

L'acquisizione di dati viene eseguita sui soli ioni caratteristici dei composti da analizzare. Qui di seguito viene riportata a titolo di esempio la tabella con gli ioni di quantificazione e conferma di una serie di IPA. È compito dell'operatore valutare la necessità di inserire altri ioni a seconda delle richieste (vedere **Tabella 2**).

In **Figura 1** è riportato un tipico cromatogramma ottenuto analizzando l'estratto in HRGC/LRMS



**Figura 1:** Cromatogramma di un campione di acqua di falda contaminata con 20 ppb di alcuni IPA ottenuto analizzando l'estratto in HRGC/LRMS. Condizioni gas-cromatografiche: iniettore “splitless” (“liner” silanizzato da 800 $\mu$ L); T=295, “purge” time=45 sec; linea di trasferimento MS a 300°C; temperatura forno 60°C per 1 minuto, rampa a 25°C/min fino a 295°C, isoterma per 12 minuti; gas di trasporto elio a 10 psi, flusso di “split” 60 mL/min. Condizioni operative dello spettrometro di massa: temperatura sorgente= 260°C, sorgente ad impatto elettronico (EI), potenziale di ionizzazione 70 eV.

<b>Analita</b>	<b>Massa M1 Quantificazione</b>	<b>Massa M2 Conferma</b>	<b>% M2/M1</b>	<b>Calcoli con riferimento interno</b>
Naftalene	128	64	6	Naftalene D8
Acenatilene	152	76	13	Naftalene D8
Acenaftene	154	152	51	Acenaftene D10
Fluorene	166	164	12	Acenaftene D10
Fenantrene	178	89	8	Fenantrene D10
Antracene	178	89	9	Fenantrene D10
2-fenilnaftalene	204	101	11	Fenantrene D10
Fluorantene	202	101	9	Fenantrene D10
Pirene	216	101	12	Fenantrene D10
Benzo(a)fluorene	216	215	74	Fenantrene D10
Benzo(b)fluorene	228	215	74	Fenantrene D10
Benzo(a)antracene	228	114	7	Fenantrene D10
Crisene	252	114	7	Crisene D12
Benzo(b)fluoranteni (b+k+j)	252	126	8	Crisene D12
benzo(e)pirene	252	126	6	Crisene D12
benzo(a)pirene	252	126	6	Crisene D12
Perilene	276	126	8	Perilene D12
indeno(1, 2, 3-cd) pirene	278	138	3	Perilene D12
Dibenzo(a,h) antracene	276	139	3	Perilene D12
Coronene	300	138	6	Perilene D12
<b>Riferimento interno</b>	<b>Massa M1 Quantificazione</b>			<b>Recupero medio % ± scarto tipo</b>
Naftalene D8	136			85,2 ± 3,1
Acenaftene D10	164			91,4 ± 2,1
Fenantrene D10	188			93,1 ± 2,2
Crisene D12	240			89,8 ± 2,9
Perilene D12	364			88,4 ± 3,3

**Tabella 2:** Elenco degli ioni di quantificazione e conferma di alcuni tra i principali IPA.

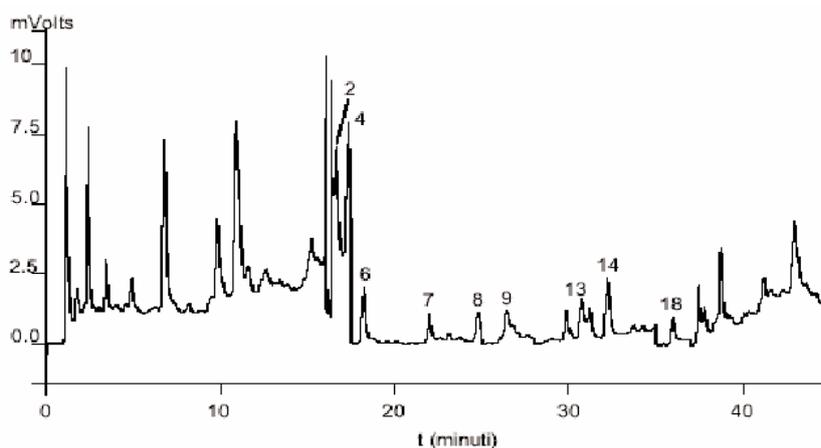
### 10.2. Analisi in HPLC/fluorescenza:

Per effettuare l'analisi in HPLC/fluorescenza l'estratto organico proveniente dalla procedura di estrazione deve essere reso compatibile con la fase mobile impiegata. Ciò viene realizzato concentrando a 100 mL l'estratto in diclorometano e aggiungendo acetonitrile fino ad un volume finale di 1 mL.

Il rivelatore a fluorescenza viene usato per la determinazione simultanea dei differenti composti. Le lunghezze d'onda di eccitazione e di emissione vengono variate in dipendenza del tipo di colonna e delle condizioni cromatografiche utilizzate. A titolo di esempio, nella **Tabella. 3** sono riportate le lunghezze d'onda di eccitazione e di emissione utilizzate nel cromatogramma di **Figura 2**.

Tempo di ritenzione (min)	Eccitazione (nm)	Emissione (nm)
0	250	360
17,9	375	425
20,5	335	440
24,8	350	430
33,5	305	500

**Tab. 3:** Tempi di ritenzione e lunghezza d'onda utilizzate nel cromatogramma di **Fig. 2.2**.



**Figura 2:** Cromatogramma di un campione di acqua superficiale contaminata con 0,1 ppb di alcuni IPA ottenuto analizzando l'estratto in HPLC/fluorescenza. Condizioni operative: colonna C<sub>18</sub> (Analytical Technology) (250 x 4 mm, 5 µm), flusso=1 mL/min, 50/50 acqua/acetonitrile (isocratica per 6 min), gradiente a 30/70 in 24 min, gradiente a 20/80 in 10 min, gradiente a 0/100 in 10 min; volume iniettato=10µL. *Calcoli*

Iniettare nel cromatografo volumi uguali di estratto e di soluzioni di riferimento diluite per taratura (paragrafo 6.3).

Costruire quindi le rette di taratura per i singoli IPA, accertandosi di operare nel campo di linearità dello strumento. La quantificazione viene effettuata mediante la tecnica del riferimento interno.

Riportare in grafico il rapporto area picco componente/area picco riferimento interno ( $A/A_{si}$ ) in funzione della concentrazione del componente stesso.

La concentrazione incognita di ogni componente è data dalla relazione:

$$C = \frac{A/A_{si} - b}{a} \cdot \frac{V_f}{V_i}$$

$C$  = concentrazione ( $\mu\text{g/L}$ ) di analita;

$A$  = area del picco dell'analita nella miscela incognita;

$A_{si}$  = area del picco del riferimento interno nella miscela incognita;

$b$  = valore dell'intercetta della retta di taratura;

$a$  = valore del coefficiente angolare della retta di taratura;

$V_f$  = volume (mL) dell'estratto finale;

$V_i$  = volume (mL) del campione acquoso.

## **11. Qualità del dato**

Le iniezioni del campione e dei riferimenti interni vanno ripetute almeno due volte al fine di migliorare l'accuratezza delle misure sperimentali. Per verificare la ripetibilità della risposta strumentale si consiglia di effettuare 10 iniezioni di una delle soluzioni di riferimento.

Valutare il recupero dei riferimenti interni effettuando cinque determinazioni su una matrice reale.

Il recupero di ogni riferimento interno calcolato rispetto alla soluzione di lavoro deve essere maggiore del 50%. Si raccomanda di riestrarre e rianalizzare i campioni, i cui recuperi sono inferiori al 40% o maggiori del 120%.

# Allegato C

## Metodi US-EPA

### **1. Metodo US EPA 3540: Estrazione mediante SOXHLET**

#### ***1.1. Scopo ed applicazione***

Il Metodo US EPA 3540 fornisce una procedura mediante la quale è possibile estrarre composti organici volatili e semivolatili da matrici solide quali suoli, fanghi e rifiuti. L'estrazione dei composti di interesse in base a tale metodo può essere realizzata con successo grazie all'intimo contatto che si viene ad instaurare all'interno del SOXHLET tra matrice ed il campione.

Questo metodo è applicabile ogni qual volta si voglia isolare e concentrare composti organici insolubili o poco solubili in acqua. L'estratto così ottenuto può essere successivamente analizzato mediante tecniche cromatografiche (previa purificazione del campione là dove ve ne fosse la necessità).

#### ***1.2. Riassunto del metodo***

Il campione solido è miscelato con sodio solfato anidro, collocato all'interno del ditale (di cellulosa o di lana di vetro) ed estratto mediante SOXHLET con una soluzione di solventi appropriati.

L'estratto è seccato e, a seconda delle necessità, portato a piccolo volume. Il solvente di estrazione può essere sostituito con un altro solvente organico più idoneo alla purificazione o alla procedura di quantificazione.

#### ***1.3. Reagenti***

Il grado di purezza dei reagenti inorganici impiegati in tutti i tests deve essere quello analitico. Possono utilizzarsi reagenti di purezza di grado diverso da quello sopra indicato purché si accerti che il loro impiego non infici l'accuratezza della quantificazione dei contaminanti che il metodo si prefigge di determinare.

Sodio solfato (granulare, anidro),  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ : Può essere purificato mantenendolo a  $400^\circ\text{C}$  per 4 ore o lavandolo con diclorometano.

Solventi di estrazione o destinati a qualsiasi altro uso: Tutti i solventi devono essere di purezza “per pesticidi” o equivalente

Suoli/sedimenti e campioni di fanghi devono essere estratti impiegando uno dei seguenti sistemi estrattivi:

- 1) Acetone/Esano (1:1)(v/v),  $\text{CH}_3\text{COOCH}_3/\text{C}_6\text{H}_{14}$
- 2) Cloruro di metilene/Acetone (1:1)(v/v),  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{COOCH}_3$

N.B: La prima soluzione estraente non solo ha nel complesso una minore tossicità ma anche un costo di smaltimento inferiore rispetto alla seconda.

I campioni di rifiuti o di qualsiasi altra provenienza diversa da quella già indicata devono essere estratti impiegando uno dei seguenti sistemi estrattivi:

- 3) Cloruro di metilene,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$
- 4) Toluene/Metanolo (10:1) (v/v),  $\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_3/\text{CH}_3\text{OH}$

In ogni caso è bene realizzare dei Bianchi procedurali per escludere che i reagenti usati (in particolare il solfato di sodio dato che subisce diverse manipolazioni durante il suo processo di attivazione e purificazione) possano introdurre delle fonti di interferenze aggiuntive.

#### **1.4. Procedura di misura**

##### **❖ Preparazione del campione**

Dopo averlo macinato setacciare il campione su vaglio a 1 mm. Il presente metodo, infatti, è applicabile alla frazione di campione con granulometria minore di 1 mm.

Gli eventuali materiali presenti nel campione (gomma, fibre o materiali oleosi) non sottoponibili a vagliatura, devono essere tagliati finemente non solo per facilitare il loro mescolamento con il resto del campione, ma anche per garantire un intimo contatto con tutta la superficie del campione durante l'estrazione.

### ❖ *Determinazione del peso secco percentuale*

Quando i risultati devono essere espressi sulla base del peso secco, è opportuno seguire la seguente procedura. Immediatamente dopo aver pesato l'aliquota di campione destinata all'estrazione, se ne deve pesare un'altra (dai 5-10 g) in un crogiuolo e lasciarla per una notte in stufa a 105°C. Il giorno seguente il crogiuolo viene portato a temperatura ambiente all'interno di un essiccatore e pesato nuovamente.

Calcolare il peso secco percentuale mediante la seguente espressione:

$$\% \text{ peso secco} = \frac{\text{g di campione secco}}{\text{g di campione}}$$

Dal momento l'aliquota di campione seccata in stufa non è impiegata per l'estrazione è opportuno smaltirla non appena è stato determinato il suo peso secco percentuale.

### ❖ *Estrazione in SOXHLET*

Miscelare 10 g della frazione del campione con granulometria minore di 1 mm con 10 g di solfato di sodio ed introdurre il tutto all'interno del ditale di estrazione.

Aggiungere al campione 1 mL della soluzione dello "standard surrogato"

Aggiungere in ciascuno dei campioni scelti 1 mL della soluzione "standard di matrice"

Si consiglia di consultare il Metodo 3500 per maggiori dettagli sulla composizione e concentrazioni delle soluzioni sia dello standard surrogato che dello standard di matrice.

Aggiungere circa 300 mL di solvente di estrazione in un pallone da 500 mL.

Collegare il pallone all'estrattore ed estrarre il campione per 16-24 ore con 4-6 cicli/ora.

Lasciar raffreddare l'estratto dopo aver verificato che l'estrazione sia stata completata.

Seccare l'estratto lasciandolo fluire attraverso una colonna contenente circa 10 cm di solfato di sodio anidro. Raccogliere l'estratto così anidrificato nel pallone del concentratore di Kuderna-Danish (K-D) precedentemente assemblato. Lavare il pallone di estrazione e la colonna di solfato di sodio con 100-125 mL di solvente di estrazione per garantire un trasferimento quantitativo.

Collegare il pallone contenente l'estratto anidrificato ad una colonna di Snyder ("Three-Ball macro, Kontes K-503000-121" o equivalente). Pretrattare la colonna lasciando eluire 1 mL di diclorometano. Posizionare il sistema di K-D nel bagno termostatico (15-20°C

sopra al punto di ebollizione del solvente) in modo tale da avere il tubo impiegato per concentrare il campione parzialmente immerso nell'acqua calda e l'intera superficie inferiore del pallone circondata da vapore caldo. Sistemare verticalmente l'intero apparato descritto e la temperatura dell'acqua in modo tale da ottenere la completa concentrazione in 10-20 minuti. Quando il volume apparente del liquido raggiunge 1-2 mL, rimuovere il sistema K-D dal bagno termostatico e lasciar raffreddare per almeno 10 minuti.

Se è necessario portare l'estratto in un solvente diverso da quello di estrazione, rimuovere, in un primo momento, la colonna di Snyder, ed aggiungere approssimativamente 50 mL di solvente fresco e ricollegarla successivamente al sistema. Ripetere i punti precedenti.

Nel caso si reputi necessario, dopo aver eseguito la procedura sopra descritta, concentrare ulteriormente l'estratto, si può impiegare a tal fine una seconda colonna di Snyder ("Two-Ball micro, Kontes K-569001-0219" od equivalente) o flussare l'estratto, dopo averlo posto in un bagno termostatico (mantenuto ad una temperatura non superiore ai 35°C) con N<sub>2</sub> ultra puro.

Per ulteriori chiarimenti, si rinvia alla lettura del testo integrale del Metodo consultabile anche dal sito ([www.epa.gov](http://www.epa.gov)).

## **2. Metodo US EPA 3630: Purificazione mediante colonna di silice**

### ***2.1. Scopo ed applicazione***

Il gel di silice (acido silicico) è un adsorbente derivante dalla silice ed avente proprietà debolmente acide. E' prodotto dalla reazione del silicato di sodio con acido solfidrico. Tale adsorbente può essere usato come riempimento di colonne cromatografiche di purificazione nel caso in cui gli analiti che si desidera quantificare abbiano polarità chimiche differenti dai composti interferenti che la tecnica mira al contrario ad eliminare. Può essere usato sia nella forma "attiva" (il gel di silice si attiva averla portandolo ad una temperatura compresa tra 150-160°C), o "inattiva" (contenente, cioè, circa 10% di acqua).

Questo metodo riporta la procedura che si deve seguire per effettuare una corretta purificazione di estratti contenenti idrocarburi policiclici aromatici, composti fenolici e loro derivati, pesticidi organoclorurati e PCBs (come gli Aroclors) mediante colonna di gel di silice.

Di seguito è descritta la parte del metodo inerente alla purificazione dei soli IPA. Per maggiori informazioni o ulteriori chiarimenti si consiglia di consultare il metodo integrale.

## **2.2. Riassunto del metodo**

La colonna è impaccata con una quantità di adsorbente appropriata, ricoperta con un disidratante e, solo dopo aver completato il suo riempimento, caricata con il campione che deve essere analizzato. L'eluizione degli analiti è ottenuta da uno o più solventi scelti ad hoc che al contrario lasciano ancorati sulla fase stazionaria della colonna solo i composti interferenti. L'eluato, una volta raccolto, può essere concentrato (se necessario).

## **2.3. Reagenti necessari per la purificazione di estratti contenenti idrocarburi policiclici aromatici**

In tutti i test, i reagenti impiegati devono essere di grado analitico. Possono utilizzarsi reagenti di grado diverso da quello indicato purché si dimostri che il loro uso non infici l'accuratezza della quantificazione degli analiti.

Gel di silice per colonne cromatografiche: Gel di silice per Fenoli e Idrocarburi Policiclici Aromatici (100/200 mesh, Davison Chemical grade 923 o equivalente). Prima di impiegarlo, è opportuno attivarlo per almeno 16 ore a 130°C in un vassoio di vetro ricoperto con un foglio di alluminio.

Solfato di sodio (granulare, anidro), Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. E' consigliabile purificare tale reagente prima del suo uso. A tal fine, si può scaldarlo in stufa e lasciarlo a 400°C per 4 ore o eseguire un lavaggio accurato con diclorometano. In ogni caso è opportuno realizzare e successivamente analizzare almeno un bianco del metodo, per verificare che il solfato di sodio così pretrattato non introduca dei composti interferenti aggiuntivi.

Solventi eluenti:

Cicloesano, C<sub>6</sub>H<sub>12</sub> –Purezza pesticidi o equivalente.

Diclorometano, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> –Purezza pesticidi o equivalente.

Pentano, C<sub>5</sub>H<sub>12</sub> –Purezza pesticidi o equivalente

## **2.4. Procedura di misura**

### **2.4.1. Indicazioni generali**

La purificazione del campione può essere condotta anche mediante dischi adsorbenti costituiti sempre da gel di silice. Dal momento che indicativamente 1 g di adsorbente può rimuovere dai 10 ai 30 mg totali di composti interferenti (anche se il range sopra espresso è soggetto a fluttuazioni in quanto è fortemente dipendente dalla capacità che l'adsorbente ha di trattenere gli interferenti) ed essendo le colonne cromatografiche dimensionate in modo tale da essere impaccate con una quantità di adsorbente molto maggiore rispetto a quella presente nei dischi commerciali, si consiglia di purificare i campioni caratterizzati da un'elevata concentrazione di interferenti mediante colonne cromatografiche. Comunque è bene ricordare che, indipendentemente dalla tecnica di purificazione a cui il campione è sottoposto, la quantità di interferenti che può rimuoversi non può mai essere illimitata. Nel caso in cui si sospetti che le interferenze siano causate da composti alto-bollenti, allora è necessario pretrattare il campione seguendo la procedura descritta nel Metodo 3640, prima di applicare il presente metodo. Se i composti interferenti risultano essere debolmente polari, allora per ottenere la loro rimozione è necessario ricorrere a colonne multistrato. Se nell'estratto è presente un corpo di fondo imputabile a solfuri di varia natura, allora il campione deve essere sottoposto al trattamento descritto nel Metodo 3660 prima di ricorrere alla sua purificazione.

Consentire all'estratto di raggiungere la temperatura ambiente qualora fosse stato conservato in freezer o in frigorifero. Controllare che negli estratti non siano presenti né delle separazioni di fase né del particolato e che il volume sia quello corrispondente a quello riportato nei documenti di accompagnamento del campione. Verificare che il solvente dell'estratto sia compatibile con quello impiegato nella procedura di purificazione.

Nel caso in cui il diclorometano risultasse il solvente di estrazione, allora per attuare la maggior parte delle tecniche di purificazione, è necessario realizzare la sua sostituzione con cicloesano (quest'ultimo solvente è quello impiegato comunemente nelle tecniche di purificazione quando si ha la necessità di quantificare gli IPA). Si consiglia di seguire a tal fine, una delle tecniche standard di concentrazione riportate in tutti i metodi della serie 3500. Il volume di diclorometano deve essere ridotto al massimo ad 1-2 mL. Per effettuare correttamente la purificazione il volume ottimale dell'estratto è pari a 2 mL.

N.B. Quando il volume dell'estratto è stato concentrato fino ad ottenere un volume inferiore ad 1 mL, si può verificare la perdita dei composti semivolatili. Se l'estratto è stato portato a secchezza, allora l'estrazione deve essere ripetuta.

#### **2.4.2. Eluizione cromatografica**

Riempire una colonna cromatografica di 10 mm di diametro interno con una sospensione costituita da 10 g di gel di silice attivato e diclorometano. Battere leggermente la colonna per favorirne sia il riempimento omogeneo che l'eluizione del diclorometano. Ricoprire l'estremità superiore del gel di silice con 1-2 cm di solfato di sodio anidro.

Pre-eluire la colonna con 40 mL di pentano. La velocità media di tutte le eluizioni deve essere circa pari a 2 mL/min. Scartare il pre-eluito, e prima che lo strato di solfato di sodio venga esposto all'aria, trasferire in testa alla colonna i 2 mL di campione (si ricorda che l'estratto deve essere stato portato in cicloesano). Per recuperare quantitativamente il campione, effettuare il suo recupero impiegando all'occorrenza 2 mL di cicloesano. Prima che lo strato di sodio venga esposto all'aria, aggiungere 25 mL di pentano e continuare l'eluizione della colonna. Scartare anche questo primo eluito in pentano.

Successivamente, eluire la colonna con 25 mL di diclorometano/pentano (2:3)(v/v). Raccogliere questo secondo eluito in un pallone e concentrarlo fino al volume richiesto (1-10 mL) dalla tecnica (successiva) con cui si vuole analizzarlo. Processarlo mediante analisi HPLC (Metodo 8310) o analisi GC (Metodo 8100). I composti accertati che eluiscono in questa frazione sono riportate nell'elenco sottostante:

Acenaftene	Crisene
Acenaftilene	Dibenzo(a,h)antracene
Antracene	Fluorantene
Benzo(a)antracene	Fluorene
Benzo(a)pirene	Indeno(1,2,3-cd)pirene
Benzo(b)fluorantene	Naftalene
Benzo(g,h,i)perilene	Fenantrene
Benzo(k)fluorantene	Pirene

### 2.4.3. *Qualità del dato*

Prima di applicare il metodo descritto è necessario processare un bianco reagente (risultante dall'eluizione dei solventi attraverso la colonna cromatografia preparata) e verificare che l'ordine di grandezza delle interferenze sia inferiore al "detection limit" del metodo stesso.

E' inoltre necessario dimostrare che il recupero dei composti di interesse sia stato quantitativo (o quantomeno superiore al 85%) prima di applicare il metodo ai campioni.

## 3. *Metodo US EPA 8100: Analisi mediante GC/FID*

### 3.1. *Scopo ed applicazione*

Il Metodo 8100 (Polynuclear Aromatic Hydrocarbons) descrive la procedura mediante cui è possibile effettuare la determinazione in GC/FID di alcuni tra i principali idrocarburi policiclici aromatici (IPA), il cui elenco è riportato in **Tabella 3.1**.

Il metodo gas-cromatografico con colonna impaccata, purtroppo non può risolvere completamente 4 coppie di composti: antracene e fenantrene; crisene e benzo[a]antracene; benzo[b]fluorantene e benzo[k]fluorantene; antracene e indeno[1,2,3-cd]pirene. L'impiego di una colonna capillare, al posto di una colonna impaccata, descritto sempre nel presente metodo, potrebbe separare adeguatamente questi IPA.

### 3.2. *Riassunto del metodo*

Il Metodo 8100 fornisce le condizioni gas cromatografiche necessarie per l'individuazione, nonché quantificazione degli IPA presenti nel campione. Un' aliquota (dai 2-5 µL) dell'estratto purificato, ed eventualmente diluito con il Metodo 3580, è analizzata mediante gas cromatografo avente un FID per detector.

N°	Nome comune
1	naftalene
2	acenaftene
3	acenaftilene
4	fluorene
5	fenantrene
6	antracene
7	fluorantene
8	pirene
9	benzo (a) antracene
10	crisene
11	benzo (k) fluorantene
12	benzo (j) fluorantene
13	benzo (b) fluorantene
14	benzo (a) pirene
15	dibenzo (a,h) acridine
16	dibenzo (a,h) acridine
17	dibenzo (a,h) antracene
18	indeno (1,2,3-c,d) pirene
19	benzo (g,h,i) perilene
20	dibenzo (a,e) pirene
21	dibenzo (a,h) pirene
22	dibenzo (a,i) pirene
23	7H-dibenzo (c,g) carbazolo
24	3-metilcolantrene

**Tabella 1:** Idrocarburi policiclici aromatici determinabili con il presente metodo

Gli estratti devono subire un processo di purificazione (Metodo 3630) nel caso in cui i microinquinanti interferenti siano presenti in concentrazioni tali da inficiare significativamente le analisi.

### 3.3. *Apparecchiature e reagenti*

- **Gas cromatografo:** sistema analitico completo dotato di un gas-cromatografo su cui sia possibile adattare un “iniettore on-column” e

provvisto di tutti gli accessori necessari (detector, colonne, gas e siringhe ..etc).

➤ **Colonne per il gas cromatografo**

a. **Colonna 1:** 1,8 m x 2 mm I.D colonna di vetro impaccata con 3% OV-17 Cromosorb W-AW-DCMS (100/120) mesh o equivalente.

b. **Colonna 2:** 30 m x 0,25 mm I.D SE-54 colonna capillare di gel di silice fusa.

c. **Colonna 3:** 30 m x 0,32 mm ID SE-54 colonna capillare di gel di silice fusa.

➤ **Reagenti**

Esano, C<sub>6</sub>H<sub>14</sub> –Purezza pesticidi o equivalente

Isoottano, CH<sub>3</sub>C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub> –Purezza pesticidi o equivalente

### 3.4. *Soluzioni di riferimento*

**Soluzione dello standard concentrato multiplo:** Preparare una soluzione di uno standard multiplo di concentrazione pari a 1,00 µg/µL sciogliendo 0,0100 g di un materiale di riferimento certificato e portando a volume con isoottano in matraccio da 10 mL. Possono impiegarsi soluzioni commerciali multi-componenti purché accompagnati da certificato redatto dalla stessa ditta fornitrice o da un altro ente indipendente.

Trasferire la soluzione così ottenuta in una bottiglia provvista di tappo rivestito in teflon. Conservare a 4°C e proteggere dalla luce.

Le soluzioni devono essere sostituite entro un anno o comunque ogni qual volta che le analisi rivelino un problema ad esse riconducibile.

**Soluzioni diluite per taratura:** Preparare almeno 5 standards a concentrazioni crescenti diluendo le soluzioni multicomponente concentrate con isoottano. Uno standard deve avere una concentrazione di poco superiore al detection limit del metodo. Le rimanenti 4 concentrazioni devono coprire un intervallo di concentrazione che si ipotizza si possa riscontrare nei campioni. Le soluzioni di calibrazione devono essere ripreparate dopo 6 mesi o comunque ogni qual volta si riscontri un problema.

**Soluzione dello/degli standards interno/i (nel caso in cui si ricorra alla calibrazione con standard interno):** Scegliere uno o più standards che abbiano un comportamento analitico simile a quello dei composti di interesse. A tal fine è necessario prima dimostrare che la misura dello standard interno non risenta né del metodo né della composizione della matrice. A causa di queste limitazioni, non può suggerirsi uno standard interno che sia applicabile a tutti i campioni.

Per ciascun analita di interesse preparare almeno 5 soluzioni di calibrazione a concentrazione crescenti come già descritto.

Ad ognuna delle soluzioni di calibrazione, aggiungere una quantità nota di uno o più standards interni, e portare a piccolo volume con isottano.

Analizzare tutti gli standards di calibrazione

**Soluzione degli standards surrogati:** L'analista deve essere in grado di poter monitorare l'efficienza dell'estrazione, della purificazione (quando effettuata), e di tutti gli strumenti analitici impiegati nel metodo. A tal fine è necessario realizzare un'aggiunta di uno o più surrogati in tutti i campioni, gli standards e bianchi reagenti o di processo (e.g., 2-fluorobifenile e 1-fluoronaftalene). Nel Metodo 3500 è riportata la procedura che deve seguirsi per preparare in modo adeguato dei surrogati basici o neutrali.

### 3.5. *Condizioni gas cromatografiche*

- a. **Colonna 1:** Portare il flusso di N<sub>2</sub> (carrier) a 40 mL/min. Temperatura iniziale del forno 100°C per 4 min, poi 8°C/min fino a 280°C.
- b. **Colonna 2:** Portare il flusso di He (il carrier) a 20 cm/sec. Temperatura iniziale 35°C per 2 minuti, poi rampa a 10°C/min fino al raggiungimento della temperatura finale pari a 265°C. Mantenere detta temperatura per 12 minuti.
- c. **Colonna 3:** Portare il flusso di He (il carrier) a 60 cm/sec. Temperatura iniziale 35°C per 2 minuti; poi rampa a 10°C fino a 265°C. Mantenere la temperatura finale (265°C) per 3 minuti.

### **3.6. Calibrazione**

La procedura per eseguire una corretta calibrazione mediante metodo dello standard interno o esterno, è ampiamente descritta nel Metodo US EPA 8000.

E' consigliabile sottoporre un set di standards all'eventuale medesimo trattamento di purificazione del campione. In questo modo si ha la possibilità di verificare sia i tempi di ritenzione che l'assenza di interferenti dovuti ai reagenti impiegati nel pretrattamento dei campioni.

### **3.7. Analisi gas cromatografiche**

Vedere Metodo 8000 e versione integrale del presente metodo. Nel caso in cui si ricorra alla calibrazione tramite standard interno, aggiungere 10 µL di standard interno a ciascun campione prima di iniettarlo nel GC.

Seguire le indicazioni della Sezione 7.6 del Metodo 8000 concernenti la sequenza delle analisi, appropriate diluizioni e i criteri di identificazione. Includere uno standard di media concentrazione all'interno della sequenza ogni qual volta sono stati analizzati 10 campioni.

Annotare il volume di campione iniettato con la corrispondente misura del picco (in termini di area o di altezza).

Identificare ciascun composto target presente nel campione confrontando i tempi di ritenzione dei picchi in esso osservati con quelli riscontrati analizzando le soluzioni impiegate per la calibrazione. Vedere il Metodo 8000 (sezione 7.8) per i calcoli.