

ISTRUZIONI

**Determinazione di
idrocarburi aromatici
policiclici nel suolo
mediante GC/MS**

Metodi raccomandati

Dicembre 2001



**Ufficio federale dell'ambiente,
delle foreste e del paesaggio
UFAPF**

ISTRUZIONI

**Determinazione di
idrocarburi aromatici
policiclici nel suolo
mediante GC/MS**

Metodi raccomandati

Dicembre 2001

Valenza giuridica della presente pubblicazione

La presente pubblicazione è uno strumento d'aiuto all'esecuzione proposto dall'UFARP in veste di autorità di vigilanza e destinato in primo luogo alle autorità esecutive. Nel testo viene data concretezza a concetti giuridici indeterminati, inclusi in leggi e ordinanze, nell'intento di uniformarne l'esecuzione nella prassi. L'UFARP pubblica i testi d'aiuto all'esecuzione, spesso designati con il nome di direttive, istruzioni, raccomandazioni, manuali, aiuti pratici, ecc., nella sua collana «Ambiente-Esecuzione».

Da un lato dette pubblicazioni assicurano in notevole misura l'uguaglianza giuridica e la certezza del diritto; dall'altro permettono l'adozione, se del caso, di soluzioni flessibili e adeguate. Quando le autorità esecutive tengono conto di un simile testo, si può partire dal presupposto che esse applicano la legislazione in modo conforme al diritto federale. Soluzioni alternative non sono escluse, purché – in ossequio alla prassi giudiziaria – ne venga dimostrata la conformità al diritto federale.

Rapporto	Allestito dall'Istituto di Chimica Analitica Organica dell'Università di Basilea, Neuhausstr. 31, CH-4057 Basilea
Autore	Michael Oehme, Università di Basilea
Gruppo aggiunto di esperti	Johannes Dettwiler, UFARP Satish Gupta, IUL Georg Karlaganis, UFARP Peter Schmid, EMPA/LPMR Jürg Zihler, UFARP
Traduzione	Dott. Pierclaudio Bernasconi, Meyrin
Copertina	Wolfgang Kunz/Bilderberg

Ottenibile presso Ufficio federale dell'ambiente, delle foreste e del paesaggio
Documentazione
3003 Berna
Fax + 41 (0)31 324 02 16
E-mail: docu@buwal.admin.ch
Internet: www.buwalshop.ch

Numero di ordinazione VU-4811-I
© UFARP 2001

INDICE

ABSTRACTS	5
PREFAZIONE	7
1 Principio della misurazione	9
11 Avvertenza preliminare	9
12 Indicazioni concernenti la sicurezza	9
2 Apparecchiature, prodotti chimici e strumenti	9
21 Apparecchiature di vetro e apparecchi	9
211 Apparecchi di vetro	9
212 Apparecchi per l'estrazione secondo Soxhlet	10
213 Flaconcini per campioni	10
214 Diversi apparecchi per la purificazione dell'estratto	10
215 Siringhe e pipette graduate	11
216 Altri utensili	11
217 Lavaggio degli apparecchi di vetro	11
218 Lavaggio delle cartucce per l'estrazione secondo Soxhlet	11
22 Prodotti chimici, adsorbenti e gas	11
221 Solventi	11
222 Prodotti chimici vari, coadiuvanti e preparazioni speciali	12
222.1 <i>Prodotti di base</i>	12
222.2 <i>Purificazione dell'ovatta</i>	12
222.3 <i>Pretrattamento del gel di silice</i>	12
222.4 <i>Pretrattamento del solfato di sodio</i>	12
223 I gas e la loro purificazione ulteriore	12
223.1 <i>Prodotti di base</i>	12
223.2 <i>Purificazione dell'elio</i>	13
223.3 <i>Purificazione dell'azoto</i>	13
223.4 <i>Rigenerazione del setaccio molecolare</i>	13
3 Soluzioni standard per la quantificazione	13
31 Standard di riferimento	13
32 Preparazione dello standard di base	14
33 Preparazione dello standard per la quantificazione	15
34 Preparazione degli standard interni	16
35 Preparazione dello standard per il calcolo del tasso di recupero	16
36 Preparazione dello standard di controllo	17
37 «Quality Assurance»	17

4	Preparazione dei campioni	17
41	Avvertenza preliminare	17
42	Essiccazione dei campioni e loro separazione in frazioni mediante setacciatura	18
43	Estrazione dei campioni	18
44	Eliminazione dello zolfo e dei derivati solforati	18
45	Quantità di standard interno aggiunta al campione	19
5	Purificazione dell'estratto	19
51	Avvertenza preliminare	19
52	Estrazione in controcorrente	19
53	Purificazione mediante gel di silice	20
531	Preparazione della colonna	20
532	Frazionamento degli estratti del campione	20
6	Analisi quantitativa	21
61	Avvertenza preliminare	21
62	Separazione mediante cromatografia in fase gassosa	21
621	Apparecchi	21
622	Siringhe per iniezioni	21
623	Colonne capillari	21
624	Condizioni d'iniezione e di separazione	22
63	Quantificazione mediante la spettrometria di massa	22
631	Apparecchi	22
632	Condizioni per l'ottimizzazione e di rivelazione	22
64	Esecuzione della quantificazione	23
7	«Quality Assurance»	25
71	Controllo delle soluzioni standard per la quantificazione	25
72	Frequenza d'iniezione dello standard per la quantificazione	25
73	Valori delle prove in bianco per l'estrazione e la purificazione dell'estratto	25
74	Analisi dei campioni di controllo	26
75	Archiviazione dell'informazione concernente la «Quality Assurance»	26
76	Accettazione dei risultati	27
8	Precisione e paragonabilità del metodo	27
9	Bibliografia	27

ABSTRACTS

A method is described for the determination of *polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH)* in soil, which fulfils the criteria of the *quality assurance concept* for the analysis of organic pollutants in soil published by Swiss Agency for the Environment, Forests and Landscape. The presented method has proven its comparability with other methods at intercomparisons and also fulfils the requirements of the quality assurance norm *EN 45'000*. It is based on soxhlet extraction of the dried soil samples followed by sample clean-up using liquid/liquid extraction and column chromatography. The addition of internal standards prior to extraction (so-called extraction standards) allows the automatic correction of compound losses which are calculated for each sample by addition of a recovery standard to the sample extract before quantification. The separation of PAH is carried out by high resolution gas chromatography. Quantification is based on the internal standard method and low resolution mass spectrometry. Detailed working procedures are given as well as information about quality control measures.

Viene descritto un metodo per la determinazione degli *idrocarburi aromatici policiclici (PAH)** nel suolo, che rispetta il concetto di «Quality Assurance» per l'analisi di sostanze organiche presenti nel suolo, pubblicato dall'UFAFP. Il metodo ha dimostrato la comparabilità con altre tecniche nelle calibrazioni interlaboratori e soddisfa le esigenze della norma di Quality Assurance *EN 45'000*. Esso è basato sull'estrazione secondo Soxhlet di campioni di suolo essiccati, cui fa seguito una purificazione del campione mediante estrazione in controcorrente e cromatografia su colonna. L'aggiunta di standard interni prima dell'estrazione del campione (i cosiddetti standard per l'estrazione) consente la correzione automatica di eventuali perdite che possono essere calcolate per ogni singolo campione grazie all'aggiunta all'estratto del campione, prima della quantificazione, di standard per il calcolo del tasso di recupero. La separazione dei PAH viene eseguita con la cromatografia in fase gassosa ad alta risoluzione. La quantificazione viene effettuata mediante spettrometria di massa a bassa risoluzione con riferimento agli standard interni. Vengono fornite sia prescrizioni dettagliate concernenti l'attività pratica in laboratorio sia informazioni sulle misure inerenti alla Quality Assurance.

*) Nella presente pubblicazione la sigla inglese PAH, diffusa a livello internazionale, sostituisce quella tedesca PAK, utilizzata sia nell'ordinanza del 1° luglio 1998 sul deterioramento del suolo che nelle istruzioni dell'UFAFP "Concetto di «Quality Assurance» - Analitica di PAK, PCB e diossine nel suolo" del 2000.

Es wird eine Methode zur Bestimmung von *polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen (PAK)* in Böden beschrieben, welche das vom BUWAL veröffentlichte *Qualitätssicherungskonzept für die Analytik organischer Schadstoffe im Boden* erfüllt. Diese Methode hat in Ringversuchen die Vergleichbarkeit mit anderen Techniken bewiesen und erfüllt die Anforderungen der Qualitätssicherungsnorm *EN 45'000*. Sie beruht auf Soxhletextraktion der getrockneten Bodenproben - gefolgt von einer Probenaufarbeitung mittels Flüssig-/Flüssigextraktion und Säulenchromatographie. Der Zusatz von internen Standards vor der Probenextraktion (sogenannte Extraktionsstandards) erlaubt die automatische Korrektur von allfälligen Verlusten, die mit Hilfe der Zugabe von Wiederfindungsstandards zum Probenextrakt vor der Quantifizierung für jede einzelne Probe berechnet werden können. Die Trennung der PAK wird mit hochauflösender Gaschromatographie durchgeführt. Die Quantifizierung wird mit niedrigauflösender Massenspektrometrie in Bezug auf die internen Standards durchgeführt. Es werden sowohl detaillierte Arbeitsvorschriften als auch Informationen über Massnahmen der Qualitätskontrolle vermittelt.

Cette publication décrit une méthode de détection des *hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP)* dans le sol. La méthode remplit les conditions posées par le *système d'assurance de la qualité* élaboré par l'OFEFP pour l'analyse des polluants organiques du sol. Il a été démontré lors de divers tests interlaboratoires qu'elle était comparable à d'autres techniques; en outre, elle remplit les exigences de la norme d'assurance de la qualité *EN 45'000*. Elle se base sur une extraction Soxhlet des échantillons de sol séchés, suivie d'une préparation des échantillons réalisée au moyen d'une extraction de la phase liquide/liquide et d'une chromatographie sur colonne. L'addition d'étalons internes (appelés étalons d'extraction) avant l'extraction de l'échantillon permet de corriger automatiquement les éventuelles pertes, qui peuvent être calculées pour chaque échantillon grâce à l'adjonction d'étalons de récupération avant la quantification. La séparation des HAP est effectuée à l'aide d'une chromatographie en phase gazeuse à haute résolution. La quantification se fait par spectrométrie de masse à basse résolution, en se référant aux étalons internes. La publication présente des méthodes de travail détaillées ainsi que des informations sur les mesures de contrôle de la qualité.

PREFAZIONE

Gli idrocarburi aromatici policiclici (PAH) sono sostanze nocive che possono contaminare il suolo. Per queste sostanze nell'*Ordinanza del 1° luglio 1998 contro il deterioramento del suolo (O suolo)* sono stati perciò fissati dei valori indicativi, dei valori di guardia nonché dei valori di risanamento.

Per quanto attiene alla metodologia, l'analitica dei PAH è molto impegnativa. Nella prassi, le analisi vengono perciò effettuate per lo più soltanto nei casi in cui esistono indicazioni concrete di deterioramenti problematici, per esempio lungo le vie di comunicazione. Come per gli altri gruppi di sostanze organiche nocive, anche in questo caso è importante disporre di un metodo che fornisca valori di misura riproducibili e paragonabili fra loro.

Dopo aver proposto il concetto di «Quality Assurance» e lo strumento di ausilio all'esecuzione per la determinazione di diossine e di furani, il Prof. M. Oehme dell'Istituto di Chimica Analitica Organica dell'Università di Basilea presenta ora un metodo di riferimento per i PAH, conforme all'attuale stato della tecnica e da lui convalidato.

Mettiamo questo metodo a disposizione degli interessati, sperando con ciò di contribuire all'attendibilità e alla paragonabilità dei dati di misura. Ciò facendo, adempiamo nel contempo l'incarico conferitoci dall'O suolo.

Ringrazio molto cordialmente tutti coloro che hanno contribuito alla riuscita di questa pubblicazione.

Georg Karlaganis

Capo della sezione Sostanze,
suolo, biotecnologia

ABBREVIAZIONI E DEFINIZIONI

<i>CEN</i>	<i>Comité Européen de Normalisation</i> (Comitato Europeo di Normalizzazione) di Bruxelles.
<i>DIN</i>	Deutsches Institut für Normung (Istituto Tedesco per la Standardizzazione).
<i>EI</i>	Electron ionisation (ionizzazione per bombardamento di elettroni).
<i>EN</i>	Europäische Norm (norma europea).
<i>HRGC</i>	High Resolution Gas Chromatography (cromatografia in fase gassosa ad alta risoluzione).
<i>ISO</i>	International Standardisation Organisation (Organizzazione Internazionale per la Standardizzazione).
<i>Isomeri</i>	Composti con la stessa struttura (degli atomi di carbonio) e lo stesso numero di sostituenti identici in posizioni diverse.
<i>MS</i>	Mass Spectrometry (spettrometria di massa).
<i>O suolo</i>	Ordinanza del 1° luglio 1998 contro il deterioramento del suolo.
<i>PAH</i>	Idrocarburi aromatici policiclici.
<i>ppb</i>	" <i>parts-per-billion</i> ": indicazione di quantità in ng/g oppure µg/kg.
<i>SIM</i>	" <i>Selected ion monitoring</i> " (rivelazione selettiva di ioni).
<i>Standard per il calcolo del tasso di recupero</i>	Composto che si aggiunge all'estratto di suolo prima della sua quantificazione e che permette il calcolo delle perdite dovute all'estrazione nonché alla purificazione.
<i>Standard per l'estrazione</i>	Composto che si aggiunge al campione di suolo prima della sua estrazione e che permette la correzione delle perdite dovute all'estrazione nonché alla purificazione.
<i>STDI</i>	Standard interno.
<i>u</i>	Abbreviazione per <i>atomic mass unit</i> sulla base della massa dell'atomo di carbonio, $^{12}\text{C} = 12.00000 \text{ u}$

1 Principio della misurazione

11 Avvertenza preliminare

Gli idrocarburi aromatici policiclici (PAH) vengono estratti da campioni di suolo essiccati mediante un'estrazione secondo Soxhlet. Gli standard interni vengono aggiunti prima dell'estrazione. Le componenti della matrice del campione, che potrebbero interferire nell'analisi, vengono rimosse mediante un'estrazione in controcorrente combinata con la cromatografia in fase liquida. Dopo aver evaporato il solvente fino a ottenere un volume di 200-300 μL e avere aggiunto uno standard per il calcolo del tasso di recupero, tutti i composti PAH rilevanti vengono separati per mezzo della cromatografia in fase gassosa ad alta risoluzione e determinati quantitativamente mediante la spettrometria di massa a bassa risoluzione con ionizzazione per bombardamento di elettroni.

Questo metodo di misurazione è adatto per tutti i tipi di suolo, indipendentemente dal loro grado di contaminazione. Conformemente all'O suolo¹, per la somma di 16 PAH (cfr. *Tab. 1*) vige un valore indicativo di 1 mg/kg di sostanza secca e per il benzo(a)pirene un valore indicativo di 0.2 mg/kg. Quest'ultimo deve poter ancora essere misurato in modo sicuro con un sufficiente limite di rivelabilità. Per i singoli composti, a seconda della quantità di suolo utilizzata, il limite di rivelabilità si situa tra i 0.3 e i 3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (0.3-3 ppb), quindi due o tre ordini di grandezza al di sotto di queste esigenze.

I produttori sono menzionati con i nomi delle rispettive ditte soltanto se, secondo l'attuale stato della tecnica, grazie alle sue proprietà il prodotto da essi fornito risulta unico nel suo genere.

12 Indicazioni concernenti la sicurezza

I PAH sono composti molto tossici e cancerogeni. Tutte le manipolazioni di questa categoria di sostanze richiedono quindi la massima cura. Se si impiega il presente metodo, si devono rispettare rigorosamente tutte le norme di sicurezza attualmente vigenti in Svizzera per i composti tossici.

2 Apparecchiature, prodotti chimici e strumenti

21 Apparecchiature di vetro e apparecchi

211 Apparecchi di vetro

Occorrono i seguenti apparecchi di vetro (borosilicato di alta qualità):

- *Palloni a fondo rotondo*: volume 100 e 500 mL, collo smerigliato 24/29.
- *Palloni a fondo rotondo*: di 100 mL, con un tubetto per centrifuga di un volume di 5 mL fissato sul fondo, collo smerigliato 24/29.
- *Pipette Pasteur*: lunghezza 150 e 250 mm.

¹ Ordinanza del 1° luglio 1998 contro il deterioramento del suolo (O suolo, RS 814.12).

- *Flaconi di vetro a collo largo*: di vari volumi p.es. 0.5-1 L (tappi di polipropilene GL 45) utilizzati per la conservazione dei campioni.
- *Tubetti per centrifuga*: conici, volume 15-20 mL, graduati, con tappo di vetro.
- *Becher*: 50 mL.
- *Palloncini graduati con tappo di vetro*: 10 mL e 25 mL (vetro scuro), qualità A, precisione ± 0.025 mL risp. 0.04 mL a 20 °C.
- *Matracci conici*: da 250 mL, con tappo di vetro.
- *Essiccatore*: diametro 300 mm, con coperchio smerigliato (non utilizzare del grasso!) – senza essiccato.
- *Imbuti di vetro*: diametro 100 mm.
- *Colonne per cromatografia*: lunghezza 250 mm, diametro 12.5 mm.
- *Barchette di alluminio per la pesatura*.
- *Vetri d'orologio*: diametro 60 mm.

212 Apparecchi per l'estrazione secondo Soxhlet

- *Estrattore secondo Soxhlet*: volume 200 mL, lunghezza 250 mm, collo smerigliato 34/35, raccordo smerigliato 24/29.
- *Estrattore secondo Soxhlet*: 2'000 mL con piastra e raccordo smerigliati 34/35.
- *Condensatore a sfera*: lunghezza 330 mm, collo smerigliato 24/29.
- *Adattatore per colli smerigliati*: da 24/29 a 34/35.
- *Cartucce per l'estrazione Soxhlet*: cellulosa, diametro 28 mm, lunghezza 80 mm (per quanto concerne la loro preparazione, cfr. il capitolo 218).
- *Schiuma di poliuretano*: spessore 35 mm, 210x210 mm – per isolare gli estrattori secondo Soxhlet.

213 Flaconcini per campioni

- *Flaoncini per campioni*: 1.5 mL con inserto da 100 μ L e “septum cap”. Flaoncini per campioni da 1.5 mL, con tappo a vite (guarnizione di Teflon).
- *Flaoncini per campioni Certan[®]*: Promochem GmbH, 1.5 mL con apertura capillare e tappo a vite con guarnizione di Teflon.

214 Diversi apparecchi per la purificazione dell'estratto

- *Scodelline di porcellana*: 180 e 250 mm di diametro.
- *Riduttore di pressione*: con guarnizione metallica, fissato a 3-5 bar.
- *Evaporatore rotante*: con regolazione automatica della pressione.
- *Turbovap 500*: apparecchiatura per concentrare le soluzioni con i rispettivi recipienti (Zymark).
- *Camera d'essiccazione*: gamma di temperature 50-300 °C, precisione ± 3 °C.
- *Forno tubolare*: gamma di temperature 50-1'100 °C, precisione ± 5 °C.
- *Bilancia analitica*: campo di pesatura 0-160 g, precisione ± 0.001 g.
- *Bilancia a piatti*: 0-1'200 g, precisione ± 0.1 g.
- *Bilancia di precisione*: campo di pesatura 0-3'000 mg, precisione ± 1 μ g.
- *Millipore MilliQ*: impianto per la purificazione dell'acqua.
- *Forno per ceramica*: 200-1'030 °C, precisione ± 10 °C.

- *Bagno a ultrasuoni*: potenza 100 W.
- *Centrifuga*: capienza 8 tubetti da 10 mL, 6'000 giri/minuto al minimo.
- *Pompe per vuoto a diaframma*: resistenti ai solventi con membrane di Teflon, 4 o 8 m³/h, vuoto finale 8 kPa (80 mbar) per 8 m³/h, 1.5 kPa (15 mbar) per 4 m³/h.
- *Calotte elettriche*: per palloni a fondo rotondo da 500 mL.
- *Mortaio di porcellana*: diametro 130 mm, pestello 145x38 mm.
- *Scodelline di porcellana*: diametro 180 mm.
- *Setaccio*: di acciaio inossidabile, larghezza della maglia 2 mm (secondo la norma DIN 4188).

215 Siringhe e pipette graduate

- *Siringhe con ago fissato nel vetro e pistoncino di acciaio smerigliato*: 10, 25, e 1'000 µL.
- *Pipette volumetriche calibrate*: 1 mL, precisione ±0.01 mL.
- *Pipette graduate*: 5 e 10 mL, graduate, precisione ±0.03 mL.
- *Micropipette calibrate*: 10, 20, 50 e 100 µL, precisione ±0.25-1 %.

216 Altri utensili

- *Guanti resistenti ai solventi*.
- *Guanti monouso di polietilene*.
- *Anelli di sughero, come supporto per i palloni rotondi*.
- *Sassolini porosi per moderare l'ebollizione*: prelavati.
- *Fermagli per fissare i palloni ai vari apparecchi*: per colli smerigliati da 14 e 29.

217 Lavaggio degli apparecchi di vetro

Dopo ogni purificazione dell'estratto, tutti i tipi di palloni a fondo rotondo, di becher, di tubetti per centrifuga e di colonne per cromatografia vengono immersi per 24 h in una soluzione al 2.5 % (v/v) di RBS 25 (cfr. il capitolo 222) e poi risciacquati due volte con acqua di rubinetto e due volte con acqua deionizzata, preparata con un impianto Millipore MilliQ. Dopo essere stati seccati all'aria, gli apparecchi di vetro vengono seccati durante 6 h in un forno per ceramica riscaldato a 350-450 °C. Vengono così rimossi gli eventuali residui di sostanze organiche. Prima della loro utilizzazione, le pipette Pasteur vengono risciacquate brevemente con gli stessi solventi utilizzati in seguito.

218 Lavaggio delle cartucce per l'estrazione secondo Soxhlet

In un estrattore secondo Soxhlet da 2'000 mL vengono estratte con toluolo durante 8 h fino a un massimo di otto cartucce Soxhlet. Dopo essiccazione in un essiccatore sotto vuoto (80 kPa risp. 0.8 bar di depressione a 100 °C) queste ultime vengono avvolte in un foglio d'alluminio.

22 Prodotti chimici, adsorbenti e gas

221 Solventi

Tutti i solventi sono della qualità "per l'analisi di residui" e vengono utilizzati senza purificazione ulteriore:

- Cicloesano;
- n-Esano;
- Metanolo;
- Toluolo;
- Dimetilformammide (*eccezione*: qualità “per analisi”);
- Acqua, distillata dapprima in un contenitore di vetro e purificata successivamente con l’impianto Millipore MilliQ.

222 Prodotti chimici vari, coadiuvanti e preparazioni speciali

222.1 Prodotti di base

- *Ovatta*: chimicamente pura (purificazione; cfr. il capitolo 222.2)
- *Foglio d’alluminio*: spessore 0.018 mm, larghezza 450 mm
- *Gel di silice*: 0.063-0.20 mm (pretrattamento: cfr. il capitolo 222.3)
- *Mercurio*: purezza 99.99 %
- *Lana di vetro silanizzata*: pretrattata con dimetildiclorosilano
- *Solfato di sodio*: qualità “per analisi” (pretrattamento: cfr. il capitolo 222.4)
- *Detersivo per laboratorio RBS 25*: Chemical products, Bruxelles, Belgio

222.2 Purificazione dell’ovatta

50 g di ovatta vengono estratti dapprima secondo Soxhlet per 8 h con 600 mL di cloruro di metilene e successivamente seccati a temperatura ambiente in un essiccatore sotto vuoto. La procedura viene in seguito ripetuta con 600 mL di n-esano.

222.3 Pretrattamento del gel di silice

Circa 100 g di gel di silice vengono pesati in una scodella di porcellana di 180 mm di diametro e attivati durante 8 h a 130 °C in un armadio d’essiccazione. Il materiale viene in seguito conservato in un flacone di vetro chiuso ermeticamente con un tappo a vite con guarnizione di Teflon e può essere conservato per quattro settimane.

222.4 Pretrattamento del solfato di sodio

Circa 1'000 g di solfato di sodio vengono pesati in due scodelle di porcellana di 180 mm di diametro, disidratati durante 8 h a 600 °C e conservati in seguito nel flacone originale. Il solfato di sodio così pretrattato può essere conservato per tre mesi.

223 I gas e la loro purificazione ulteriore

223.1 Prodotti di base

Elio, 99.995 % (purificazione, cfr. il capitolo 223.2)	Azoto, 99.99 % (purificazione, cfr. il capitolo 223.3)
Filtro per l’O ₂ e filtro di carbone attivo	Filtro di setaccio molecolare
Eventualmente setaccio molecolare, 0.5-2.0 mm (pretrattamento, cfr. il capitolo 223.4)	Carbone attivo, dimensione delle particelle 1.5 mm
Cartucce metalliche vuote, Whitey 304L-HDF4-50 o 340L-HDF4-75, rispettivamente cartucce equivalenti di acciaio inossidabile.	

223.2 Purificazione dell'elio

L'elio, utilizzato quale gas vettore per i gascromatografi, viene purificato nel modo seguente:

- un filtro riempito di setaccio molecolare, un filtro per l'O₂ e uno di carbone attivo vengono montati in serie direttamente dopo la valvola della bombola. Queste due unità vengono sostituite dopo avere vuotato due bombole da 50 L, oppure una volta all'anno;
- due cartucce metalliche vengono montate in serie su ogni gascromatografo, direttamente prima dell'entrata del gas vettore. La prima è riempita di setaccio molecolare (cfr. il capitolo 223.4) e la seconda di carbone attivo. Queste due cartucce vengono sostituite unicamente se sopravvengono irregolarità e inconvenienti tecnici (p. es. se la bombola è stata vuotata completamente), oppure al più tardi dopo tre anni. Non si devono mai vuotare le bombole al di sotto dei 1'500 kPa (15 bar). Il filtro per l'O₂ e quello di carbone attivo vengono gettati. Il contenuto del filtro di setaccio molecolare viene sostituito con del setaccio molecolare rigenerato (cfr. il capitolo 223.4). Il carbone attivo contenuto nelle cartucce metalliche viene sostituito con del carbone attivo nuovo.

223.3 Purificazione dell'azoto

L'azoto viene utilizzato per concentrare le soluzioni oppure per mettere sotto pressione. Viene purificato mediante una cartuccia metallica, riempita dapprima per metà con del setaccio molecolare e poi con del carbone attivo (nella direzione del flusso). Il contenuto della cartuccia va sostituito ogniqualvolta viene cambiata la bombola da 50 L; quest'ultima non deve mai essere vuotata al di sotto dei 1'500 kPa (15 bar).

223.4 Rigenerazione del setaccio molecolare

Il setaccio molecolare da rigenerare viene messo in una cartuccia metallica e attivato durante 3 h a 300 °C nel forno tubolare (cfr. il capitolo 214); durante questa operazione, attraverso la cartuccia si fa passare un flusso di 20 mL/min di azoto purificato. Dopo avere lasciato raffreddare la cartuccia (sempre sotto corrente d'azoto), quest'ultima può essere riutilizzata direttamente, oppure se ne può trasferire il contenuto in un'altra cartuccia (controllo della tenuta stagna!).

3 Soluzioni standard per la quantificazione

31 Standard di riferimento

Nella misura del possibile, i composti per la calibrazione e di riferimento devono essere acquistati sotto forma di solidi cristallini di qualità certificata. La loro purezza dovrebbe essere per lo meno del 99 %. Occorrono i composti elencati nella *Tabella 1*.

Gli standard di riferimento vengono conservati al buio, a 4-6 °C. In virtù della loro stabilità chimica, i PAH, che vengono conservati al buio nella forma solida, rimangono inalterati per un tempo illimitato. Prima della loro pesatura, tutti gli standard di riferimento necessari vengono mantenuti a temperatura ambiente per almeno quattro ore.

Tabella 1: Elenco dei PAH impiegati e degli standard interni.

Composti	
Naftalina	Benzo(a)antracene
Acenaftilene	Crisene
Acenaftene	Benzo(b)fluorantene
Fluorene	Benzo(k)fluorantene
Fenantrene	Benzo(a)pirene
Antracene	Indeno(1,2,3-cd)pirene
Fluorantene	Dibenzo(a,h)antracene
Pirene	Benzo(ghi)perilene
3,6-Dimetilfenantrene (standard interno I)	2,2'-Binaftile (standard interno II)
	Indeno(1,2,3-cd)fluorantene (standard per il calcolo del tasso di recupero)

Nota: I composti di riferimento certificati possono essere ottenuti p.es. presso l'"*Institute for Reference Materials and Measurements, Geel, Belgio, IRMM*" (sinora *Bureau of Reference, BCR*), dal "*Dr. Ehrenstorfer*" (Augsburg, Germania) oppure dalla "*Promochem*" (Wesel, Germania). Il 3,6-dimetilfenantrene è disponibile presso la "*Tokyo Kasei Kogyo Ltd.*" (Giappone).

32 Preparazione dello standard di base

Lo standard di base comprende i composti elencati nella *Tabella 2* secondo la loro sequenza di eluzione sulla colonna impiegata per la cromatografia in fase gassosa (cfr. il *capitolo 623*).

Tabella 2: Composti PAH nello standard di base.

N°	Composto	<i>Osservazioni</i>
1	Naftalina	
2	Acenaftilene	
3	Acenaftene	
4	Fluorene	
5	Fenantrene	
6	Antracene	
7	3,6-Dimetilfenantrene	<i>Standard interno I</i>
8	Fluorantene	
9	Pirene	
10	Benzo(a)antracene	
11	Crisene	<i>Co-eluzione con il trifenilene</i>
12	2,2'-Binaftile	<i>Standard interno II</i>
13	Benzo(b)fluorantene	<i>Co-eluzione con il benzo(j)fluorantene</i>
14	Benzo(k)fluorantene	
15	Benzo(a)pirene	
16	Indeno(1,2,3-cd)fluorantene	<i>Standard per il calcolo del tasso di recupero</i>
17	Indeno(1,2,3-cd)pirene	
18	Dibenzo(a,h)antracene	<i>Co-eluzione con il dibenzo(a,c)antracene</i>
19	Benzo(ghi)perilene	

Alcuni dei composti standard sono cancerogeni. La loro pesatura va quindi effettuata con la massima cautela. Le prescrizioni per l'utilizzazione della bilancia analitica devono essere rispettate. Si devono inoltre usare guanti monouso e la zona attorno alla bilancia va ricoperta con carta o con un foglio d'alluminio.

Prima di essere utilizzati, la barchetta di alluminio per la pesatura e la spatola devono essere puliti accuratamente con del cicloesano nel bagno a ultrasuoni. Lo standard di base, senza gli standard interni, viene preparato in un pallone graduato da 10 mL (vetro bruno, oppure protetto dalla luce). Nella fattispecie, la concentrazione dei singoli composti elencati nella *Tabella 2*, deve essere compresa nell'intervallo 50 ± 20 ng/ μ L. Ciò equivale a pesare 500 ± 200 μ g di ogni composto. Dopo la pesatura di ogni sostanza, la spatola viene risciacquata con del cicloesano (utilizzando una pipetta Pasteur) e asciugata con un pezzo di carta.

Il contenuto della barchetta di alluminio per la pesatura viene trasferito, risciacquando con del cicloesano, nel pallone graduato da 10 mL e quest'ultimo viene riempito fino quasi al segno. Il pallone graduato viene poi immerso in un bagno a ultrasuoni fino a dissoluzione completa. Dopo averlo portato a temperatura ambiente, se necessario, viene aggiunto del solvente. Il pallone graduato viene contrassegnato, pesato e conservato nel congelatore a -20 °C. La durata di conservazione è di 24 mesi. Tutte le indicazioni vengono annotate nel registro degli standard.

33 Preparazione dello standard per la quantificazione

Il pallone graduato contenente la soluzione di base viene tolto dal congelatore e il cicloesano viene lasciato scongelare. Il pallone viene poi immerso per 5 minuti nel bagno a ultrasuoni assicurandosi che tutto si sia sciolto. In caso contrario si deve ripetere il trattamento agli ultrasuoni. Si porta il pallone a temperatura ambiente e se ne controlla il peso. Le perdite di solvente vengono compensate fino all'ultima pesata di controllo.

Si trasferiscono volumi variabili dello standard di base in un pallone graduato da 10 mL che viene riempito fino al segno con del cicloesano. Cinque soluzioni per la calibratura devono coprire un intervallo di concentrazione dei singoli composti da circa 0.1 a 20 ng/ μ L. Tutt'al più si diluisce di nuovo. I palloni graduati vengono contrassegnati, pesati e conservati nel congelatore a -20 °C. La loro durata di conservazione è di 12 mesi. Tutte le indicazioni e le perdite di peso sopravvenute al momento del prelievo vengono annotate nel registro degli standard.

I palloni graduati vengono portati a temperatura ambiente e il loro peso viene controllato. Le perdite di solvente vengono compensate fino all'ultima pesata di controllo. 1 mL di questa soluzione viene trasferito ogniqualvolta in un flaconcino per campioni da 1.5 mL con apertura capillare (CERTAN®) e utilizzato quale standard d'impiego frequente. Gli standard d'impiego frequente così ottenuti vengono conservati nel frigorifero a 4-6 °C e sostituiti ogni sei mesi.

Si può effettuare una quantificazione mediante una calibratura basata su un'unica misurazione, soltanto se la linearità dello spettrometro di massa soddisfa le condizioni poste nel capitolo 4 delle istruzioni dell'UFAFP "Concetto di «Quality Assurance» - Analitica di PAK, PCB e diossine nel suolo"².

² UFAFP, Ambiente - Esecuzione, 27 pagine, (gennaio 2000) - in lingua tedesca, francese, italiana e inglese.

34 Preparazione degli standard interni

Prima di essere utilizzati, la barchetta di alluminio per la pesatura e la spatola devono essere puliti accuratamente con del cicloesano nel bagno a ultrasuoni. Lo standard interno viene preparato in un pallone graduato da 25 mL. La concentrazione di entrambi gli standard interni 3,6-dimetilfenantrene e 2,2'-binaftile deve essere situata all'interno dell'intervallo 320 ± 30 ng/ μ L. Ciò equivale a pesare 8 ± 0.8 mg di ogni composto utilizzando un pallone graduato da 25 mL. Dopo la pesatura di ogni sostanza, la spatola viene risciacquata con del cicloesano (utilizzando una pipetta Pasteur) e asciugata con un pezzo di carta.

Il contenuto della barchetta di alluminio per la pesatura viene trasferito, risciacquando con del cicloesano, nel pallone graduato da 25 mL e quest'ultimo viene riempito fino quasi al segno. Il pallone graduato viene poi immerso in un bagno a ultrasuoni fino a dissoluzione completa. Dopo avere portato il pallone a temperatura ambiente, se necessario, si aggiunge del solvente. Il pallone graduato viene contrassegnato, pesato e conservato nel congelatore a -20 °C. La durata di conservazione è di 24 mesi. Tutte le indicazioni e le perdite di peso sopravvenute al momento del prelievo vengono annotate nel registro degli standard per la calibrazione.

Il pallone graduato viene portato a temperatura ambiente e il suo peso è controllato. Le perdite di solvente vengono compensate fino all'ultima pesata di controllo. 1 mL di questa soluzione viene trasferito ogniqualvolta in un flaconcino per campioni da 1.5 mL con apertura capillare (CERTAN®) e utilizzato quale standard d'impiego frequente. Gli standard d'impiego frequente così ottenuti vengono conservati nel frigorifero a $4-6$ °C e sostituiti ogni sei mesi.

35 Preparazione dello standard per il calcolo del tasso di recupero

Prima di essere utilizzati, la barchetta di alluminio per la pesatura e la spatola devono essere puliti accuratamente con del cicloesano nel bagno a ultrasuoni. Lo standard per il calcolo del tasso di recupero viene preparato in un pallone graduato da 25 mL. La concentrazione dello standard per il calcolo del tasso di recupero indeno(1,2,3-cd)fluorantene deve essere situata nell'intervallo 320 ± 30 ng/ μ L. Ciò equivale a pesare 8 ± 0.8 mg di ogni composto utilizzando un pallone graduato da 25 mL. Dopo la pesatura di ogni sostanza, la spatola viene risciacquata con del cicloesano (utilizzando una pipetta Pasteur) e asciugata con un pezzo di carta.

Il contenuto della barchetta di alluminio per la pesatura viene trasferito, risciacquando con del cicloesano, nel pallone graduato da 25 mL e quest'ultimo viene riempito fino quasi al segno. Il pallone graduato viene poi immerso in un bagno a ultrasuoni fino a dissoluzione completa. Dopo avere portato il pallone a temperatura ambiente, se necessario, si aggiunge del solvente. Il pallone graduato viene contrassegnato, pesato e conservato nel congelatore a -20 °C. La durata di conservazione è di 24 mesi. Tutte le indicazioni e le perdite di peso sopravvenute al momento del prelievo vengono annotate nel registro degli standard per la calibrazione.

Il pallone graduato viene portato a temperatura ambiente e il suo peso viene controllato. Le perdite di solvente vengono compensate fino all'ultima pesata di controllo. 1 mL di questa soluzione viene trasferito ogniqualvolta in un flaconcino per campioni da 1.5 mL con apertura capillare (CERTAN®) e utilizzato quale standard d'impiego frequente. Gli standard d'impiego frequente così ottenuti vengono conservati nel frigorifero a $4-6$ °C e sostituiti ogni sei mesi.

36 Preparazione dello standard di controllo

Questo standard viene utilizzato per controllare l'imprecisione della misura e la riproducibilità della quantificazione (cfr. il *capitolo 74*). Viene quantificato regolarmente confrontandolo, quale soluzione sconosciuta, con lo standard per la quantificazione e contiene i composti seguenti:

2,2'-Binaftile (STDI I)	3,6-Dimetilfenantrene (STDI II)
Benzo(a)antracene	Benzo(a)pirene
Fenantrene	Fluorantene

Una soluzione dello standard di controllo con una concentrazione di 5 ± 2 ng/ μ L viene preparata e conservata come descritto nel *capitolo 33*.

37 «Quality Assurance»

Tutti gli standard di base, gli standard interni e quelli per il calcolo del tasso di recupero vengono conservati a 4-6 °C. Possono essere conservati per 24 mesi. Non si deve controllare il peso degli standard d'impiego frequente, i quali vengono conservati in flaconcini per campioni dotati di apertura capillare (CERTAN[®]), con una perdita dovuta all'evaporazione <1 mg in sei mesi. Possono essere utilizzati durante al massimo sei mesi.

Prima di poter essere impiegati, tutti gli standard di riferimento e tutti gli standard d'impiego frequente appena preparati devono essere paragonati con gli standard utilizzati in precedenza. Differenze che si situano entro i limiti della riproducibilità del metodo di quantificazione (± 10 %), sono accettabili. Gli standard di base devono essere controllati almeno una volta all'anno e confrontati con uno standard di riferimento certificato o con lo standard di riferimento utilizzato in una calibrazione interlaboratori approvata. Vengono trattati come gli standard di riferimento e conservati a -20 °C.

4 Preparazione dei campioni

41 Avvertenza preliminare

I campioni di suolo non devono contenere materiale biologico (radici, residui di erba). I campioni vengono conservati in flaconi di vetro a collo largo del volume di 0.5-1 L (cfr. il *capitolo 211*). I flaconi già usati vanno puliti secondo quanto indicato al *capitolo 217*. I flaconi nuovi invece, devono soltanto essere seccati nel forno a 350-450 °C.

42 Essiccazione dei campioni e loro separazione in frazioni mediante setacciatura

Tutti i campioni vengono depositati su una piastra di Petri e seccati nell'armadio d'essiccazione a 40 °C fino a peso costante (24-72 h). Si può quindi calcolare il tenore d'acqua dei campioni. I campioni pieni di grumi vengono sminuzzati con il pestello nel mortaio di porcellana. Tutti i campioni vengono successivamente setacciati per ottenere grani di dimensioni non superiori ai 2 mm.

43 Estrazione del campione

10-25 g della frazione ≤ 2 mm vengono pesati in una cartuccia per Soxhlet (28x80 mm, cfr. il capitolo 211) e 10-50 μL della soluzione dello standard interno vengono aggiunti nel mezzo del campione (cfr. il capitolo 34 e 45). Da ultimo viene messa nella cartuccia una piccola quantità di ovatta purificata e il campione viene in seguito estratto durante 24 h con 300 mL di cicloesano in un estrattore Soxhlet da 200 mL (≥ 6 cicli all'ora). L'estrattore viene isolato termicamente e avvolto in un panno di schiuma di poliuretano.

44 Eliminazione dello zolfo e dei derivati solforati

Spesso il suolo contiene solo poco zolfo, il quale non interferisce in caso di rivelazione mediante la spettrometria di massa. L'operazione descritta qui appresso è necessaria soltanto se la presenza di zolfo causa interferenze durante la separazione mediante cromatografia in fase gassosa. Il metodo proposto è molto efficace.

Nella misura del possibile, nel laboratorio si deve evitare di utilizzare il mercurio. Si deve dare quindi la preferenza alle tecniche alternative menzionate al capitolo 73 delle istruzioni dell'UFAFP "Concetto di «Quality Assurance» - Analitica di PAH, PCB e diossine nel suolo". Siccome il metodo qui descritto è stato convalidato con il mercurio, l'operazione di separazione dello zolfo (senza l'impiego di mercurio) deve essere tutt'al più convalidata di nuovo.

Usando il Rotavapor, l'estratto del campione viene concentrato a circa 15 mL in un pallone a fondo rotondo (temperatura del bagnomaria 37 °C, pressione 10 kPa risp. 100 mbar) e trasferito in becher da 50 mL. Si aggiunge del mercurio metallico finché circa il 10 % del fondo del becher sia coperto. Si pone un vetro d'orologio sul becher e si immerge quest'ultimo per 20 minuti nel bagno a ultrasuoni. Nel caso in cui, muovendo il campione, la superficie metallica del mercurio non dovesse più essere visibile, si deve ripetere la procedura con del mercurio supplementare.

L'estratto trattato esaustivamente (come menzionato qui sopra) e la soluzione di risciacquo (3x3 mL di cicloesano) vengono trasferiti in tubetti per centrifuga e centrifugati per 15 minuti a 2'000 giri al minuto. Usando una pipetta Pasteur, la fase cicloesano viene trasferita in un recipiente per il Turbovap e concentrata a circa 1 mL mediante il sistema Turbovap 500. L'estratto del campione è ora pronto per essere purificato.

45 Quantità di standard interno aggiunta al campione

La quantità di standard interno, che deve essere aggiunta al materiale del campione, dipende sia dalla quantità di campione da purificare sia dalla concentrazione prevista. La quantità menzionata qui appresso corrisponde a un valore indicativo, che va tutt'al più adeguato ai requisiti del campione. In linea di massima, vale la regola secondo cui la quantità di standard interno aggiunta al campione dovrebbe corrispondere approssimativamente alla media delle quantità dei singoli PAH.

Valori indicativi

- **Materiale non contaminato:** quantità di materiale del campione 40-50 g (procedere eventualmente a 2 estrazioni mediante Soxhlet), quantità aggiunta di standard interno 30 μL (circa 10'000 ng per ogni PAH), quantità aggiunta di standard per il calcolo del tasso di recupero 20 μL (circa 6'400 ng).
- **Materiale contaminato:** quantità di materiale del campione 5-10 g (tutt'al più quantità maggiori, purificare però soltanto un'aliquota dell'estratto), quantità aggiunta di standard interno 30 μL (circa 10'000 ng per ogni PAH), quantità aggiunta di standard per il calcolo del tasso di recupero 20 μL (circa 6'400 ng).

5 Purificazione dell'estratto

51 Avvertenza preliminare

A seconda del grado di contaminazione del campione con residui della matrice, le singole operazioni di purificazione dell'estratto descritte qui appresso vanno eseguite soltanto in parte. L'operazione di estrazione in controcorrente deve però essere effettuata in ogni caso.

52 Estrazione in controcorrente

La prima operazione di purificazione dell'estratto consiste in un'estrazione in controcorrente, onde separare gli idrocarburi e gli altri composti apolari. Queste due classi di composti non possiedono la capacità di interagire con il dimetilformammide per formare dei complessi deboli del tipo "charge transfer", come avviene invece per i PAH grazie alla presenza di elettroni π .

Si prepara una miscela costituita da dimetilformammide (DMF)/acqua 9+1 (p. es. 180 mL DMF e 20 mL d'acqua MilliQ) e si procede in seguito come descritto qui appresso:

- l'estratto del campione (circa 4 mL) viene trasferito in un tubetto per centrifuga da 15 mL. Con una pipetta graduata da 5 mL vengono aggiunti 3.2 \pm 0.1 mL di DMF/H₂O 9+1. Dopo aver chiuso il tubetto con il tappo di vetro, la miscela viene agitata energicamente (30 s);
- il tubetto per centrifuga viene collocato nella centrifuga e centrifugato per 5 minuti a 2'500 giri al minuto. La fase cicloesano viene prelevata con una pipetta e trasferita in un nuovo tubetto per centrifuga. Con una pipetta graduata vengono aggiunti 1.2 \pm 0.1 mL di DMF/-

H₂O 9+1. Le operazioni “agitare” e “centrifugare” vengono ripetute. La fase DMF/H₂O viene poi trasferita nel primo tubetto per centrifuga;

- nel tubetto per centrifuga con la fase DMF/H₂O vengono aggiunti 5.2±0.2 mL d’acqua (pipetta graduata da 10 mL) e 3.2±0.1 mL di cicloesano (volume complessivo circa 13 mL). Dopo aver chiuso il tubetto con il tappo di vetro, la miscela viene agitata energicamente (30 s). La fase cicloesano viene prelevata con una pipetta Pasteur e trasferita in un tubetto per centrifuga;
- alla fase DMF/H₂O rimanente vengono aggiunti 1.0±0.1 mL di cicloesano e il tutto viene di nuovo agitato come descritto qui sopra (cfr. paragrafo precedente);
- le fasi cicloesano riunite vengono lavate con 2 mL d’acqua e, dopo essere state trasferite in un nuovo recipiente, vengono seccate con 1 g di Na₂SO₄;
- l’estratto del campione viene trasferito in seguito in un recipiente per il Turbovap e il Na₂SO₄ viene lavato con 1 mL di cicloesano;
- l’estratto del campione viene ora concentrato al volume desiderato (valore indicativo 1 mL) mediante il Turbovap e tutt’al più purificato ulteriormente mediante cromatografia su colonna di gel di silice.

53 Purificazione mediante gel di silice

531 Preparazione della colonna

La colonna per cromatografia menzionata al *capitolo 211* viene riempita a secco mettendovi nell’ordine, dal basso verso l’alto, quanto elencato qui appresso e in seguito costipata con un vibratore:

- un poco di ovatta purificata (cfr. il *capitolo 222.2*);
- 2 g di Na₂SO₄ (cfr. il *capitolo 222.4*);
- 5 g di gel di silice (cfr. il *capitolo 222.3*);
- 2 g di Na₂SO₄ (cfr. il *capitolo 222.4*).

La colonna viene in seguito riempita due volte con n-esano e sciacquata.

532 Frazionamento degli estratti del campione

La totalità dell’estratto del campione (in caso di suolo fortemente contaminato un’aliquota corrispondente a circa 2 g di suolo) viene applicata sulla colonna utilizzando una pipetta Pasteur. Per poter correggere i tassi di recupero corrispondenti, nel secondo caso il volume del campione deve essere misurato in modo preciso. Dopo aver applicato la totalità dell’estratto sulla colonna, quest’ultima viene sciacquata due volte con 1 mL di n-esano.

La frazione contenente i PAH viene successivamente eluita con 40 mL di n-esano/toluolo 7+3 e trasferita in un recipiente per il Turbovap. Utilizzando un sistema Turbovap 500, l’estratto viene concentrato a circa 1 mL. Con una corrente di azoto questo volume può essere ridotto ulteriormente fino a un minimo di 200-300 µL. Nella fattispecie, la corrente di azoto non deve increspare la superficie del solvente. Il campione è ora pronto per la quantificazione.

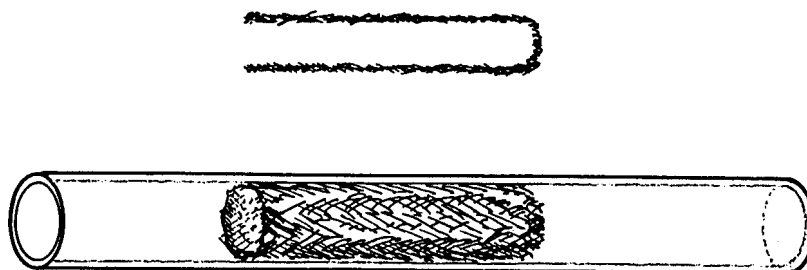
Se, a causa della presenza di residui troppo rilevanti di toluolo, nel cromatogramma i segnali dovessero essere disturbati da interferenze (spalle, segnali doppi ecc.), si deve sostituire il solvente con del cicloesano. Per fare ciò, si aggiungono 5-10 mL di cicloesano in 2-3 porzioni, riducendo ogniquilvolta il volume a 1 mL.

6 Analisi quantitativa

61 Avvertenza preliminare

Prima dell'analisi quantitativa, mediante una siringa dosatrice o una micropipetta monouso, a tutti gli estratti del campione si deve aggiungere la quantità di standard per il calcolo del tasso di recupero indicata nel *capitolo 45*. Se necessario, il volume del campione viene ridotto a 200-300 μL , facendo evaporare con cautela il solvente con una corrente di azoto purificato. Successivamente possono essere iniettate le quantità di campione menzionate al *capitolo 624*.

Figura 1: Posizionamento e struttura della lana di vetro in caso di utilizzazione dell'iniettore automatico.



62 Separazione mediante cromatografia in fase gassosa

621 Apparecchi

- Gascromatografo.
- Iniettore per l'iniezione splitless, tutt'al più un iniettore automatico. Il volume del tubicino di vaporizzazione deve essere di almeno 1 mL. Se si utilizza un iniettore automatico, il tubicino deve essere riempito con della lana di vetro silanizzata; a quest'ultima viene data la forma di una piccola cartuccia per estrazioni secondo Soxhlet (cfr. *Fig. 1*).

622 Siringhe per iniezioni

Per l'iniezione manuale vengono utilizzate siringhe da 5 o 10 μL con ago fisso (non sostituibile), e pistone metallico. Lo stesso vale per l'iniettore automatico.

623 Colonne capillari

Vengono impiegate le colonne capillari seguenti:

- *5%-Fenil-95%-metilpolisilossano*: p. es. DB5, Ultra 2, CP-Sil 8, RTx5 o equivalenti, immobilizzate, spessore della pellicola 0.1 μm .
- *Dimensioni del capillare*: capillari di quarzo rivestiti di poliimmide, lunghezza 25 m, diametro interno 0.25 mm.

624 Condizioni d'iniezione e di separazione

- *Gas vettore*: He, velocità del flusso 35-45 cm/s.
- *Flusso di gas all'uscita dello split*: 50±10 mL He/minuto.
- *Pulitura del septum*: 0.8-1.0 mL He/minuto.
- *Temperatura dell'iniettore*: 280 °C.
- *Temperatura dell'interfaccia GC/MS*: 260 °C.

Condizioni d'iniezione: iniezione splitless (iniettore automatico o iniezione con ago caldo) di campioni da 1-3 µL, 2 minuti di attesa prima dell'apertura della valvola dello split.

Programma di temperatura: 40 °C, 2 minuti di attesa, 40-100 °C a 30 °C/minuto, 100-300 °C a 10 °C/minuto, 300 °C isothermico (5-10 minuti).

Iniezione manuale con ago caldo, con questa tecnica persino i PAH molto poco volatili vengono trasferiti nella colonna capillare in modo praticamente quantitativo (>90 %):

- aspirare il campione nella siringa finché l'ago è vuoto (un volume d'aria di 2-3 mm è visibile);
- introdurre l'ago vuoto e aspettare 5-10 secondi (l'ago viene riscaldato);
- iniettare il campione, la sovrappressione causata dall'evaporazione dei solventi fa fuoriuscire dall'ago il campione sotto forma di goccioline di aerosol.

Come alternativa si può utilizzare l'iniezione "*on-column*" in una precolonna disattivata, ma non riempita ("*retention gap*") di circa 2 m di lunghezza e 0.32-0.53 mm di diametro interno.

Per ogni gruppo di ioni, l'esatta gamma dei tempi di misurazione (cfr. il capitolo 632) deve essere controllata con un campione trattato con la tecnica dell'aggiunta oppure con una miscela standard. Un controllo esatto di tutte le gamme dei tempi di misurazione è necessario soltanto se si impiega una nuova colonna capillare per la prima volta oppure se i tempi di ritenzione si sono considerevolmente modificati (>30 s). Normalmente è sufficiente correggere le gamme dei tempi di ritenzione dei singoli gruppi, in corrispondenza alla differenza del tempo di ritenzione per il fluorantene.

63 Quantificazione mediante la spettrometria di massa

631 Apparecchi

Viene impiegato uno spettrometro di massa con ionizzazione per bombardamento di elettroni (EI). Nelle condizioni di rivelazione descritte nel capitolo 632, per la quantità totale di campione devono essere raggiunti i seguenti limiti tipici di rivelabilità (rapporto segnale/rumore di fondo 3:1 per il segnale GC: per un'iniezione di 1 µL dell'estratto del campione ciò equivale a circa 10-100 pg. Per un volume di campione di p. es. 50 µL ciò corrisponde a una quantità totale di circa 0.5-5 ng per campione.

632 Condizioni per l'ottimizzazione e di rivelazione

- Ottimizzazione manuale della resa ionica della sorgente di ioni e della trasmissione del filtro di massa (quadrupolo) con la perfluorotributilammina (PFTBA) per mezzo delle masse dei frammenti m/z 119.0, 219.0, 264.0 o 414.0. La larghezza del segnale viene

regolata a mezza altezza a 0.55 ± 0.03 u e la scala delle masse viene calibrata con una precisione di ± 0.05 u.

Energia degli elettroni: 70 eV (EI), temperatura della fonte di ioni 200 °C.

- rivelazione dello ione M^+ e del frammento $[M-2H]^+$ - rispettivamente $[M-26]^+$ per i PAH non sostituiti oppure degli ioni M^{++} - e $[M-15]$ per i PAH sostituiti con gruppi metile. Lo spettrometro di massa viene impiegato nella modalità SIM ("*Selected Ion Monitoring*"). Tempo di misurazione ("*dwell time*") 50 ms/ione, oppure per lo meno 10-12 punti di misura per ogni segnale - in totale ≤ 11 ioni per ogni gruppo.

Per la quantificazione si utilizza il programma SIM elencato nella *Tabella 3*. La massa esatta, che dà il migliore rapporto segnale/rumore di fondo, deve essere determinata mediante una calibrazione dinamica di massa (rapporti segnale/rumore di fondo a circa -0.2 fino a +0.2 u della massa nominale). Il tempo di misurazione totale per ogni gruppo dovrebbe essere scelto in modo che ogni segnale gascromatografico sia definito per lo meno da 10-12 punti di misura.

Tabella 3: Masse arrotondate per difetto dei gruppi di ioni per la quantificazione dei PAH mediante GC/MS. Le masse esatte sono al massimo superiori di 0.1 u. Lo ione con la massa più alta viene utilizzato per la quantificazione.

Gruppo 1 m/z	Gruppo 2 M/z	Gruppo 3 m/z
128/126 risp. 102	178/176 risp. 152	254/252 risp. 226
142/141 risp. 127	202/200 risp. 176	276/274 risp. 250
152/150 risp. 126	216/201	278/276 risp. 252
154/152 risp. 128	228/226 risp. 202	
166/164 risp. 140		

64 Esecuzione della quantificazione

Ad analisi terminata, per i singoli PAH vengono stampati tutte le superfici e i frammento-grammi di massa integrati. La qualità dell'analisi viene in seguito valutata visualmente in base ai criteri seguenti (cfr. anche il *capitolo 7*, «Quality Assurance»):

- Nei frammentogrammi di massa vi sono segnali che interferiscono? Mancano dei composti della classe PAH, che dovrebbero essere presenti nei campioni, oppure vi sono dei segnali supplementari, che non dovrebbero essere presenti?
- Relativamente a quelli dello standard di riferimento, i tempi di ritenzione dei composti PAH sono esatti (cfr. il *capitolo 7*)?
- La separazione gascromatografica è sufficiente (cfr. le istruzioni "*Concetto di «Quality Assurance» - Analitica di PAK, PCB e diossine nel suolo*")?
- Il rapporto segnale/rumore di fondo è sufficiente per una determinazione quantitativa?

Devono essere inoltre soddisfatti tutti i requisiti corrispondenti, menzionati nelle istruzioni "*Concetto di «Quality Assurance» - Analitica di PAK, PCB e diossine nel suolo*".

Le concentrazioni nel campione vengono calcolate soltanto dopo aver verificato che siano soddisfatti tutti i criteri summenzionati. A questo scopo si utilizza un programma per il calcolo di tabelle, che si basa su un corrispondente programma disponibile sul mercato; oppure si impiega il programma di quantificazione fornito dal fabbricante dello spettrometro di massa.

Tutti i calcoli vengono eseguiti secondo il principio seguente:

- I fattori di risposta relativi rf_i dei singoli composti PAH "i" vengono calcolati con riferimento agli standard interni (STDI) corrispondenti. A questo scopo vengono utilizzate le singole superfici integrate e le concentrazioni dello standard per la quantificazione:

$$rf_i = \frac{\text{conc. PAH}_i \times \text{superficie STDI}}{\text{conc. STDI} \times \text{superficie PAH}_i}$$

rf_i : fattore di risposta riferito al PAH_i e allo standard interno STDI
 conc.: Concentrazione nello standard per la quantificazione

- Viene calcolata la quantità totale del composto PAH "i" nel campione. A questo scopo occorrono le superfici integrate del PAH_i e dello standard interno STDI nonché la quantità totale di STDI aggiunta al campione:

$$M_i = \frac{\text{quantità STDI} \times \text{superficie PAH}_i \times rf_i}{\text{superficie STDI}}$$

M_i : Quantità totale del PAH_i nel campione
 quantità STDI: Quantità totale di STDI aggiunta al campione

- La concentrazione del campione viene calcolata dividendo la quantità totale M_i per la quantità di campione purificata.
- Il tasso di recupero W_i dello STDI (aggiunto quale standard interno prima della purificazione dell'estratto) viene calcolato in % sulla base dello standard per il calcolo del tasso di recupero (STD tasso di recupero). Quest'ultimo viene aggiunto al campione immediatamente prima della quantificazione:

$$rf_w = \frac{\text{conc. STDI} \times \text{superficie STD tasso di recupero}}{\text{conc. STD tasso di recupero} \times \text{superficie STDI}}$$

rf_w : fattore di risposta dello STDI riferito allo standard per il calcolo del tasso di recupero

$$W(\%)_i = \frac{\text{quantità STD tasso di recupero} \times \text{superficie STDI} \times rf_w \times 100}{\text{quantità totale STDI aggiunta} \times \text{superficie STD tasso di recupero}}$$

$W(\%)_i$: tasso di recupero in % dello STDI aggiunto
 quantità di STD tasso di recupero: quantità totale dello standard per il calcolo del tasso di recupero aggiunta al campione
 quantità totale di STDI aggiunta: quantità totale di STDI aggiunta al campione

7 «Quality Assurance»

71 Controllo delle soluzioni standard per la quantificazione

Tutti gli standard di riferimento solidi, gli standard di base nonché gli standard per la quantificazione vengono conservati al buio a 4-6 °C; essi possiedono una stabilità illimitata. Gli standard d'impiego conservati a 4-6 °C in flaconcini per campioni con apertura capillare, dopo sei mesi esibiscono perdite dovute all'evaporazione <1 mg e sono conservabili per sei mesi. Gli standard d'impiego conservati in normali flaconcini per campioni possono essere utilizzati al massimo durante due mesi.

Prima di poter essere impiegati, tutti gli standard di base appena preparati devono essere paragonati con gli standard utilizzati in precedenza. Differenze che si situano entro i limiti della riproducibilità del metodo di quantificazione ($\pm 10\%$) sono accettabili. Gli standard di base devono essere controllati almeno una volta all'anno e confrontati con uno standard di riferimento certificato o con lo standard di riferimento utilizzato in una calibrazione interlaboratori approvata.

Attualmente sono disponibili unicamente soluzioni standard preparate da ditte commerciali riconosciute e specializzate in questo genere di attività. Queste ultime garantiscono una precisione del $\pm 5\%$.

Differenze di concentrazione fino a un massimo del 10 % tra standard di diversi laboratori sono considerate accettabili e nella norma.

72 Frequenza d'iniezione dello standard per la quantificazione

Lo standard per la quantificazione (in caso di linearità sufficiente) o la serie per la calibratura devono essere iniettati prima di ogni serie di campioni e per lo meno dopo ogni decimo campione. Se la serie conta meno di 10 campioni, dopo aver iniettato l'ultimo campione si deve iniettare nuovamente uno degli standard per la quantificazione oppure lo standard per la quantificazione.

73 Valori delle prove in bianco per l'estrazione e la purificazione dell'estratto

Una panoramica corrispondente si trova nelle istruzioni "*Concetto di «Quality Assurance» - Analitica di PAK, PCB e diossine nel suolo*". Per un metodo completo (preparazione dei campioni/estrazione/purificazione/quantificazione) i valori delle prove in bianco di tutti i PAH misurati devono essere controllati nelle situazioni seguenti:

- quando si analizzano campioni con differenze di concentrazione <20, al più tardi dopo il decimo campione trattato con lo stesso sistema di purificazione;
- quando si passa da un tipo di matrice del campione a un altro, se il livello di concentrazione atteso è per lo meno inferiore di dieci volte;
- dopo una pulizia completa/revisione del sistema di separazione;
- dopo un'analisi di un campione che conteneva concentrazioni inaspettatamente elevate (un fattore >100 al di sopra delle concentrazioni "normali");

- in caso di campioni molto importanti il cui livello di concentrazione non è noto, il valore della prova in bianco dell'unità di purificazione utilizzata va sempre controllato prima.

Affinché i risultati di una prova in bianco vengano accettati, devono essere soddisfatte le condizioni seguenti:

- i valori delle prove in bianco di tutti i PAH corrispondono ai limiti di rivelabilità per un rapporto segnale/rumore di fondo di 3:1, oppure sono inferiori, per lo meno di un fattore 10, alle concentrazioni più basse misurate;
- il tasso di recupero degli standard interni aggiunti deve essere compreso tra il 70 % e il 110 %.

74 Analisi dei campioni di controllo

Il metodo di analisi e di quantificazione dei PAH si basa sull'utilizzazione di standard interni come standard per la purificazione dell'estratto e per il calcolo del tasso di recupero. Il vantaggio di questa tecnica risiede nel fatto che per ogni campione analizzato si ha a disposizione una «quality assurance» completa sotto forma di calcolo dei tassi di recupero degli standard interni aggiunti. La «quality assurance» qui descritta esige inoltre un controllo relativamente frequente del valore delle prove in bianco (all'incirca ogni dieci campioni). Il metodo di analisi utilizzato per le prove in bianco è identico a quello di un campione reale. L'unica differenza risiede nel fatto che nelle prove in bianco manca la matrice del campione.

La riproducibilità della quantificazione viene controllata analizzando lo standard di controllo a intervalli regolari. Quest'ultimo viene iniettato dopo ogni ventesimo campione oppure dopo l'ultimo campione contenente dei PAH. Per ogni composto PAH i risultati vengono registrati in un diagramma di controllo.

Quale conseguenza delle misure per il controllo della qualità summenzionate, soltanto in casi limitati è necessario effettuare un controllo supplementare del metodo di analisi. Quattro volte all'anno viene inoltre analizzato un campione di riferimento, p. es. lo SRM 1941 PAH in sedimenti (NIST), il CRM 524 PAH in suoli contaminati oppure il CRM 535 PAH in sedimenti lacustri contaminati (quest'ultimo materiale di riferimento proviene dall'*Institute for Reference Materials and Measurements, IRMM*, Geel, Belgio). La differenza tra il risultato delle analisi e i valori certificati non può superare il ± 10 %.

Siccome i costi e il dispendio di tempo per effettuare delle calibrazioni interlaboratori relative ai PAH sono molto elevati, si organizzano soltanto poche calibrazioni interlaboratori per i PAH in campioni con matrici diverse. Ci si deve prefiggere di partecipare per lo meno una volta all'anno a una calibrazione interlaboratori concernente i PAH.

75 Archiviazione dell'informazione concernente la «Quality Assurance»

I dettagli sono elencati nelle istruzioni "*Concetto di «Quality Assurance» - Analitica di PAK, PCB e diossine nel suolo*".

76 Accettazione dei risultati

Una panoramica figura nelle istruzioni "*Concetto di «Quality Assurance» - Analitica di PAK, PCB e diossine nel suolo*". Valgono soprattutto i criteri seguenti:

- il tempo di ritenzione di un composto PAH deve essere situato all'interno di un intervallo di ± 3 s con riferimento al tempo di ritenzione dello standard per la quantificazione;
- il rapporto delle superfici dei due ioni misurati di un composto PAH non deve scostarsi di più del ± 20 % dal valore che è stato trovato per lo standard per la quantificazione;
- il rapporto segnale/rumore di fondo deve essere per lo meno 3:1 per una rivelazione e 10:1 per una quantificazione;
- il tasso di recupero degli standard interni aggiunti deve essere compreso tra il 50 e il 110 % con riferimento allo standard aggiunto per il calcolo del tasso di recupero.

8 Precisione e paragonabilità del metodo

- La precisione della concentrazione degli standard di riferimento disponibili sul mercato è del ± 5 %.
- La deviazione standard di almeno cinque analisi parallele di un campione omogeneo deve essere del ± 10 %. Se si tratta di campioni difficili da omogeneizzare, è ammessa una deviazione standard del ± 20 %.
- L'intero metodo è stato inoltre convalidato per mezzo di calibrazioni interlaboratori. Ciò è avvenuto l'ultima volta nel 1995 mediante la partecipazione alla calibrazione interlaboratori della "*International Atomic Energy Agency*" (a dire il vero, organizzata per la matrice "sedimenti", più difficile da analizzare)³. La deviazione tipica dalla media dei 22 laboratori che vi hanno partecipato è stata di circa il 15 %.
- L'analisi di serie di lunga durata di campioni di controllo ha fornito un intervallo d'imprecisione della misura del ± 10 -25 %.

9 Bibliografia

Il capitolo 74 delle istruzioni "*Concetto di «Quality Assurance» - Analitica di PAK, PCB e diossine nel suolo*" contiene un'ampia bibliografia relativa ai metodi utilizzati nella presente raccomandazione di metodi. Contiene inoltre indicazioni concernenti le tecniche alternative e i punti critici che potrebbero causare problemi.

³ International Atomic Energy Agency, Marine Environment Laboratory, MC 98012 Monaco, Report of December 11, 1995.