

ISTRUZIONI

Determinazione di bifenili policlorurati nel suolo mediante GC/MS

Metodi raccomandati



ISTRUZIONI

**Determinazione
di bifenili policlorurati
nel suolo mediante
GC/MS**

Metodi raccomandati

Valenza giuridica della presente pubblicazione

La presente pubblicazione è uno strumento d'aiuto all'esecuzione proposto dall'UFAPF 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'UFAPF 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.

Editore

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

L'UFAPF è un ufficio del Dipartimento federale dell'ambiente, dei trasporti, dell'energia e delle comunicazioni (DATEC)

Autore

Michael Oehme, Allestito dall'Istituto di Chimica Analitica Organica, Università di Basilea

Gruppo aggiunto di esperti

Thomas Bucheli, FAL
Johannes Dettwiler, UFAPF
Georg Karlaganis, UFAPF
Peter Schmid, EMPA
Jürg Zihler, UFAPF

Traduzione

Pierclaudio Bernasconi

Illustrazione in 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-4813-I

© UFAPF 2003

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 interno	15
34 Preparazione dello standard per il calcolo del tasso di recupero	15
35 Preparazione dello standard per la quantificazione	16
36 Deposito di soluzioni standard	16

4	Preparazione dei campioni	17
41	Avvertenza preliminare	17
42	Essiccazione dei campioni e loro separazione in frazioni mediante setacciatura	17
43	Estrazione dei campioni	17
44	Eliminazione dello zolfo e dei derivati solforati	17
45	Quantità di standard interno aggiunta al campione	17
5	Purificazione dell'estratto	18
51	Avvertenza preliminare	18
52	Cromatografia di permeazione su gel	18
521	Impaccamento della colonna per la cromatografia di permeazione su gel	18
522	Calibrazione della colonna per la cromatografia di permeazione su gel	18
523	Purificazione dell'estratto del campione mediante la cromatografia di permeazione su gel	19
53	Purificazione mediante gel di silice	19
531	Avvertenza preliminare	19
532	Purificazione mediante cromatografia su gel di silice	19
6	Analisi quantitativa	20
61	Avvertenza preliminare	20
62	Separazione mediante cromatografia in fase gassosa	20
621	Avvertenza preliminare	20
622	Apparecchi	20
623	Siringhe per iniezioni	20
624	Colonne capillari	21
625	Condizioni d'iniezione e di separazione	21
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 *polychlorinated biphenyls (PCB)* in soil, which fulfils the criteria of the *quality assurance concept* for the analysis of organic pollutants in soil published by the the Swiss Agency for the Environment, Forests and Landscape. The presented method also fulfils the requirements of the quality assurance norm *ISO/IEC 17'025*. It is based on soxhlet extraction of the dried soil samples followed by sample clean-up using 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 PCB is carried out by high resolution gas chromatography. Quantification is based on the internal standard method and low resolution mass spectrometry (MS). Detailed working procedures are given as well as information about quality control measures.

Es wird eine Methode zur Bestimmung von *polychlorierten Biphenylen (PCB)* in Böden beschrieben, welche das vom BUWAL veröffentlichte *Qualitätssicherungskonzept für die Analytik organischer Schadstoffe im Boden* erfüllt. Diese Methode erfüllt auch die Anforderungen der Qualitätssicherungsnorm *ISO/IEC 17'025*. Sie beruht auf Soxhletextraktion der getrockneten Bodenproben, gefolgt von einer Probenaufarbeitung mittels Säulenchromatografie. 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 PCB wird mit hochauflösender Gaschromatografie durchgeführt. Die Quantifizierung wird mit niedrigauflösender Massenspektrometrie (MS) 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 *biphényles polychlorés (PCB)* dans le sol, qui remplit les exigences posées par le *système d'assurance de la qualité* élaboré par l'OFEFP pour l'analyse des polluants organiques du sol. Cette méthode répond également aux exigences de la norme d'assurance de la qualité *ISO/IEC 17'025*. Elle se base sur une extraction Soxhlet des échantillons de sols séchés, suivie d'une préparation des échantillons réalisée au moyen 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 PCB 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 une méthode de travail détaillée ainsi que des informations sur les mesures de contrôle de la qualité.

In questa pubblicazione viene descritto un metodo per la determinazione dei *bifenili policlorurati (PCB)* nel suolo, che soddisfa il *Concetto di "Quality Assurance"* elaborato dall'UFAFP per l'analisi di sostanze organiche inquinanti presenti nel suolo. Il metodo soddisfa pure le esigenze della norma di "*Quality Assurance*" *ISO/CEI 17'025*. Esso è basato sull'estrazione secondo Soxhlet di campioni di suolo essiccati, cui fa seguito una purificazione del campione mediante 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. La separazione dei PCB 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 il controllo della qualità.

PREFAZIONE

I bifenili policlorurati (PCB) sono – come le diossine, i furani o gli idrocarburi aromatici policiclici (ingl. PAH, ted. PAK) – sostanze nocive organiche 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 di guardia nonché dei valori di risanamento. Inoltre sono oggetto della *Convenzione di Stoccolma* sugli inquinanti organici persistenti (POP), firmata nel 2001 da 127 Paesi.

Per quanto attiene alla metodologia, l'analitica dei PCB 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 sul suolo di impianti industriali. 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 sistema di «Quality Assurance» e lo strumento di ausilio all'esecuzione per la determinazione di diossine e di furani nonché di PAH, il Prof. M. Oehme dell'Istituto di Chimica Analitica Organica dell'Università di Basilea presenta ora un metodo di riferimento per i PCB, conforme all'attuale stato della tecnica.

Mettiamo questo metodo a disposizione di tutti gli 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.

Ufficio federale dell'ambiente,
delle foreste e del paesaggio

Georg Karlaganis
Capo della divisione Sostanze,
suolo, biotecnologia

ABBREVIAZIONI E DEFINIZIONI

CEN	<i>Comité Européen de Normalisation</i> (Comitato Europeo di Normalizzazione), Bruxelles.
congeneri	Composti con la stessa struttura (degli atomi di carbonio), ma con un numero diverso di sostituenti, p. es. cloro.
DIN	Deutsches Institut für Normung (Istituto Tedesco per la Standardizzazione).
EI	Electron ionisation (ionizzazione per bombardamento di elettroni).
EN	Europäische Norm (norma europea).
GC-ECD	Cromatografia in fase gassosa – "Electron Capture Detection".
GC-MS	Cromatografia in fase gassosa – spettrometria di massa.
GPC	Gel permeation chromatography (cromatografia di permeazione su gel).
HRGC	High Resolution Gas Chromatography (cromatografia in fase gassosa ad alta risoluzione).
ISO	International Organization for Standardization (Organizzazione internazionale per la Standardizzazione).
isomeri	Composti con la stessa struttura (degli atomi di carbonio) e lo stesso numero di sostituenti (p. es. cloro) in diverse posizioni.
MS	Mass Spectrometry (spettrometria di massa).
O suolo	Ordinanza del 1°luglio 1998 contro il deterioramento del suolo.
PCB	Bifenili policlorurati.
ppb	"parts-per-billion": indicazione di quantità in ng/g oppure µg/kg.
SIM	"Selected ion monitoring" (rivelazione selettiva di ioni).
standard per l'estrazione	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.
standard per il calcolo del tasso di recupero	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.
STDI	Standard interno.
u	Abbreviazione per <i>atomic mass unit</i> sulla base della massa dell'atomo di carbonio, $^{12}\text{C} = 12.00000$ u.

1 Principio della misurazione

11 Avvertenza preliminare

I bifenili policlorurati (PCB) sono estratti secondo Soxhlet da campioni di suolo essiccati. PCB marcati con isotopo stabile ^{13}C vengono aggiunti quali standard interni prima dell'estrazione. Le componenti della matrice del campione che potrebbero interferire nell'analisi, vengono rimosse mediante l'applicazione di diverse cromatografie in fase liquida. Dopo aver evaporato il solvente e avere aggiunto uno standard per il calcolo del tasso di recupero, tutti i composti PCB rilevanti vengono separati per mezzo della cromatografia in fase gassosa ad alta risoluzione e determinati quantitativamente mediante la spettrometria di massa (MS) 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. Giusta l'O suolo¹ per la somma di 7 PCB (cfr. *Tab. 1*, pag. 13) vale un valore di guardia di 0.1–0.2 mg/kg di sostanza secca. 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 0.1–0.3 µg/kg (0.1–0.3 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 PCB 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):

- *Pallon* a fondo rotondo: 100, 250, 500 e 1'000 mL volume, collo smerigliato 24/29.
- *Pipette Pasteur*: lunghezza 150 e 250 mm.
- *Flaconi di vetro*: 500 e 1'000 mL (tappi di polipropilene GL 45) utilizzati per la conservazione dei campioni.

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

- *Pallonni graduati con tappo di vetro*: e 10 mL, qualità A, precisione ± 0.025 mL. 20° C.
- *Matracchi conici*: da 250 mL, con tappo di vetro.
- *Imbuti di vetro*: 30 e 150 mm di diametro.
- *Colonne per cromatografie*: lunghezza 200 mm, 15 mm diametro interno.
- *Colonne per cromatografie*: lunghezza 600 mm, 25 mm diametro interno, pistoncino con guarnizione (p. es. Omnifit).
- *Vibratore*: per l'impaccamento a secco di colonne per cromatografie.
- *Piastre di Petri*: diametro 150 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*: 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

- *Flaconcini per campioni*: 1.5 mL con inserto da 100 μ L e "septum cap", flaconcini per campioni da 1.5 mL tappo a vite (guarnizione di Teflon)
- *Flaconcini 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).
- *Sistema di cromatografia di permeazione su gel*: colonna per la cromatografia 600 mm lunghezza, 25 mm di diametro interno, riempita con 50 g BioBeads S-X3, 200–400 mesh, pompa HPLC con un flusso di 5 mL/min e una pressione contraria di ca. 6 bar, iniettore con regolatore del campione di 10 mL.
- *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.
- *Forno per ceramica*: 200–1'000 °C, precisione ± 10 °C.
- *Bagno a ultrasuoni*: potenza 100 W.

- *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 e 1'000 mL.
- *Mortaio di porcellana*: diametro 130 mm, pestello 145x38 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.
- *Siringa di vetro*: 5 mL, graduata, con raccordo Luer.
- *GC-Spritze*: 10 µL, con ago fissato nel vetro e pistoncino di acciaio smerigliato per auto-sampler.
- *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 p. es. 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 diclorometano durante 8 h fino a un massimo di otto cartucce Soxhlet. Dopo essiccazione in un essiccatore sotto vuoto (20 kPa risp. 0.2 bar 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

- diclorometano
- etere etilico
- acetato d'etile
- n-nonano
- isoottano

222 Prodotti chimici vari, coadiuvanti e preparazioni speciali

222.1 Prodotti di base

- *Cotone*: chimicamente puro (purificazione; cfr. il capitolo 222.2).
- *Foglio d'alluminio*: larghezza 450 mm.
- *Ossido di alluminio*: basico, pH 10 attività I, 50–200 μm .
- *Fase di gel permeazione*: Bio Beads S-X3, GPC-Gel, 200–400 mesh, Bio Rad.
- *Gel di silice*: 0.063–0.20 (pretrattamento; cfr. il capitolo 222.3).
- *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 del cotone

50 g di cotone 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 per 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 100 g di solfato di sodio vengono pesati in due scodelle di porcellana di 180 mm di diametro, disidratati per 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*.

Vengono trattati come gli standard di riferimento e conservati a 4–6 °C. In virtù della loro stabilità chimica i PCB 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 PCB impiegati e degli standard interni.

Composto	Abbreviazione e numerazione ai sensi dell'IUPAC
2,4,4'-Triclorbifenili	PCB 28*
2,2',5,5'-Tetraclorobifenili	PCB 52*
2,2',4,5,5'-Pentaclorobifenili	PCB 101
2,3',4,4',5-Pentaclorobifenili	PCB 118*
2,2',4,4',5,5'-Esaclorobifenili	PCB 153*
2,2',3,4,4',5'-Esaclorobifenili	PCB 138
2,2',3,4,4',5,5'-Eptaclorobifenili	PCB 180*
1,2,3,4-Tetracloronaftalina (standard per il calcolo del tasso di recupero)	TCN

Nota: * Utilizzato anche come composto marcato con isotopo stabile ^{13}C .

I composti di riferimento certificati possono essere ottenuti p.es. presso l'"*Institute for Reference Materials and Measurements, Geel, Belgio, IRMM*", dal "*Dr. Ehrenstorfer*" (Ausburgo, Germania) oppure dalla "*Promochem*" (Wesel, Germania).

32 Preparazione dello standard di base

Lo standard di base STD 1 comprende i composti elencati nella *Tabella 1* senza standard interni e standard per il calcolo del tasso di recupero. 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 n-esano nel bagno a ultrasuoni. Lo standard di base viene preparato in un pallone graduato da 10 mL facendo in modo che la concentrazione dei singoli composti elencati nella *Tabella 1* sia compresa nell'intervallo 100 ± 20 ng/ μL . Ciò equivale a pesare $1'000 \pm 200$ μg di ogni composto. Dato che i fattori di risposta dei singoli congeneri dei PCB possono variare a seconda dello spettrometro di massa, si devono eventualmente adattare le concentrazioni. Dopo la pesatura di ogni sostanza, la spatola viene risciacquata con dell'n-esano (utilizzando una pipetta Pasteur) e asciugata.

Il contenuto della barchetta di alluminio per la pesatura viene trasferito, risciacquando con del n-esano, 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 e pesato. Tutte le indicazioni vengono annotate nel registro degli standard.

33 Preparazione degli standard interni

Prima di essere utilizzate, la barchetta di alluminio per la pesatura e la spatola devono essere puliti accuratamente con dell'esano nel bagno a ultrasuoni. Lo standard interno viene preparato in un pallone graduato da 10 mL. La concentrazione dei PCB marcati con l'isotopo stabile ^{13}C e utilizzati come standard interni deve essere compresa nell'intervallo 100 ± 20 ng/ μL . Ciò equivale a pesare $1'000\pm 200$ μg di ogni composto. Dopo la pesatura della sostanza, la spatola viene risciacquata con dell'esano (utilizzando una pipetta Pasteur) e asciugata.

Il contenuto della barchetta di alluminio per la pesatura viene trasferito, risciacquando con isoottani, nel pallone graduato *da* 10 mL e quest'ultimo viene riempito fino quasi al segno. Poi viene 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 e pesato. Tutte le indicazioni e le perdite di massa sopravvenute al momento del prelievo vengono annotate nel registro degli standard.

Per stabilire lo standard di eluizione 1:10 risp. 1:100 si porta il pallone a temperatura ambiente e se ne controlla la massa. Le perdite di solvente vengono compensate fino all'ultima pesata di controllo. 1 mL o 0.1 mL sono trasferiti in un pallone graduato da 10 mL che viene diluito con isoottani. La concentrazione ammonta ora a 10 ± 2 ng/ μL risp. 1 ± 0.2 ng/ μL . La durata di conservazione è di 24 mesi. 1 mL viene trasferito ogniqualvolta in un flaconcino per campioni da 1.5 mL con apertura capillare (CERTAN®).

34 Preparazione dello standard per il calcolo del tasso di recupero

Quale standard per il calcolo del tasso di recupero si utilizza la 1,2,3,4-tetracloronaftalina.

Prima di essere utilizzati, la barchetta di alluminio per la pesatura e la spatola devono essere puliti accuratamente con del n-esano nel bagno a ultrasuoni. Lo standard interno viene preparato in un pallone graduato da 10 mL. La concentrazione dello standard per il calcolo del tasso di recupero deve essere situata nell'intervallo 100 ± 20 ng/ μL . Ciò equivale a pesare $1'000\pm 200$ μg di ogni composto. Dopo la pesatura della sostanza, la spatola viene risciacquata con dell'esano (utilizzando una pipetta Pasteur) e asciugata.

Il contenuto della barchetta di alluminio per la pesatura viene trasferito, risciacquando con isoottani, nel pallone graduato *da* 10 mL e quest'ultimo viene riempito fino quasi al segno. Poi viene 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 e pesato. Tutte le indicazioni e le perdite di massa sopravvenute al momento del prelievo vengono annotate nel registro degli standard.

Per stabilire lo standard di eluizione 1:10 risp. 1:100 si porta il pallone a temperatura ambiente e se ne controlla la massa. Le perdite di solvente vengono compensate fino all'ultima pesata di controllo. 1 mL o 0.1 mL sono trasferiti in un pallone graduato da 10 mL che viene diluito con isoottani. La concentrazione ammonta ora a 10 ± 2 ng/ μL risp. 1 ± 0.2 ng/ μL . 1 mL viene trasferito ogniqualvolta in un flaconcino per campioni da 1.5 mL con apertura capillare (CERTAN®).

35 Preparazione dello standard per la quantificazione

Il pallone graduato con lo standard di base STD 1 viene prelevato dal congelatore. Si porta il pallone a temperatura ambiente e se ne controlla la massa. 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. Le perdite di solvente vengono compensate fino all'ultima pesata di controllo.

0.5 mL dello standard di base STD 1 vengono trasferiti in un pallone graduato da 10 mL che viene riempito fino al segno con n-esano (diluizione 20:1). La concentrazione del singolo composto ammonta ora a 5 ± 1 ng/L. Il pallone graduato viene contrassegnato con STD 2, pesato e conservato nel congelatore a -20 °C. La loro durata di conservazione è di 12 mesi. Tutte le indicazioni e le perdite di massa sopravvenute al momento del prelievo vengono annotate nel registro degli standard.

Per potere effettuare una calibrazione su parecchi punti, vengono preparati cinque standard per la quantificazione nell'intervallo di concentrazione 5–500 pg/ μ L; per es. 10, 20, 50, 200 e 500 pg/ μ L. La concentrazione degli standard interni e dello standard per il calcolo del tasso di recupero (cft. *capitoli 34 e 35*) è fissata a circa 100 pg/ μ L. Se si utilizza un pallone graduato da 10 mL per le concentrazioni 50, 200 e 500 pg/ μ L ciò corrisponde all'aggiunta di 0.1 mL, 0.4 mL o 1 mL dello standard STD 2. Per i rimanenti standard per la quantificazione lo standard 2 deve essere diluito ancora una volta di un fattore 10 (STD 3). Per lo standard interno e per quello per il calcolo del tasso di recupero si aggiunge 1 ng/mL a 1 mL della diluizione 1:100. 1 mL di questa soluzione di calibrazione viene trasferito ogniqualevolta in un flaconcino per campioni da 1.5 mL con apertura capillare (CERTAN®).

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

36 Deposito di soluzioni standard

Tutti gli standard di riferimento solidi, vengono conservati al buio a 4–6 °C e hanno un periodo di conservazione illimitato. 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. Tutti gli altri standard sono depositati a 4–6 °C. Il loro periodo di conservazione è limitato a un massimo di 12 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 per un periodo massimo di sei mesi.

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, e 10–50 μ L della soluzione dello standard interno vengono aggiunti nel mezzo del campione (cfr. i *capitoli 34 e 45*). Da ultimo viene messa nella cartuccia una piccola quantità di cotone purificato e il campione viene in seguito estratto per 24 h con 300 mL di n-esano in un estrattore Soxhlet da 200 mL 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 quantità minime di zolfo, il quale non interferisce in caso di rivelazione mediante la spettrometria di massa. Lo zolfo viene inoltre eliminato in modo efficace mediante la purificazione con la cromatografia di permeazione su gel (cfr. il *capitolo 52*). Se si tralascia l'esecuzione della GPC si deve eventualmente ricorrere a uno dei metodi di desolforazione, menzionati nel *capitolo 73* delle istruzioni "*Concetto di «Quality Assurance» – Analitica di PAK, PCB e diossine nel suolo*". Siccome il metodo qui descritto è stato convalidato con la GCP, l'operazione di desolforazione deve essere tutt'al più convalidata di nuovo.

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 PCB.

Valore guida per la quantità aggiunta di standard interno

- **Materiale non contaminato:** quantità di materiale del campione 40–50 g (procedere eventualmente a 2 estrazioni mediante Soxhlet), quantità aggiunta di standard interno 20 µL della diluizione 1:10 con 10 ng/µL (circa 200 ng per ogni PCB), quantità aggiunta per il calcolo del tasso di recupero 20 µL dell'eluizione 1:10 con 10 ng/µL (circa 200 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 20 µL della diluizione 1:10 con 10 ng/µL (circa 200 ng per ogni PCB), quantità aggiunta di standard per il calcolo del tasso di recupero 20 µL dell'eluizione 1:10 con 10 ng/µL (circa 200 ng).

5 Purificazione dell'estratto

51 Avvertenza preliminare

I campioni di suolo possono contenere componenti della matrice che possono interferire nella rivelazione dei PCB mediante GC-ECD o GC-MS. La maggior parte di queste componenti può essere eliminata mediante la cromatografia di permeazione su gel. Questo metodo elimina le componenti che interferiscono e che posseggono pesi molecolari che non corrispondono a quelli dei PCB, come per esempio lo zolfo elementare e le sostanze umiche.

52 Cromatografia di permeazione su gel

521 Impaccamento della colonna per la cromatografia di permeazione su gel

50 g di Bio Beads S-X3 (cfr. il capitolo 222) vengono pesati in un Erlenmeyer da 250 mL e l'adsorbente viene ricoperto completamente con una miscela di cicloesano/acetato d'etile 1:1 e lasciato gonfiare durante 24 ore. Con la sospensione risultante si riempie una colonna di 600 mm di lunghezza e di 25 mm di diametro interno, in cui è stato inserito il pistone inferiore con guarnizione. Dopo che la fase stazionaria si è sedimentata, il solvente superfluo viene lasciato fuoriuscire attraverso il tubo di teflon e la procedura viene ripetuta finché la colonna è completamente riempita. Terminato l'impaccamento della colonna, viene inserito il pistone superiore con guarnizione e quest'ultimo viene premuto verso il basso fino all'esaurimento del volume morto tra il materiale per l'impaccamento e il pistone. La fase stazionaria non può mai rimanere senza solvente! La colonna viene condizionata pompandovi per 2 ore una miscela di cicloesano/acetato d'etile 1+1 con un flusso di circa 2 mL/min. In seguito, la fase stazionaria può essere in genere ricompresa con il pistone.

522 Calibrazione della colonna GPC

Si devono controllare le proprietà di separazione, la capacità a separare la matrice dal campione nonché il tasso di recupero dei PCB di ogni nuova colonna. A tale scopo 500 mg di un campione contenente grandi quantità di matrice, quale l'olio di pesce (p. es. l'olio di fegato di merluzzo) vengono disciolti in 5 mL di una miscela di cicloesano/acetato d'etile 1+1.

L'intero campione viene poi iniettato con una siringa di vetro da 5 mL con raccordo Luer e in seguito eluito con una miscela di cicloesano/acetato d'etile 1+1 con un flusso di 5 mL/min. Vengono raccolte 20 frazioni da 10 mL (vale a dire circa 2 minuti per ogni frazione) in provette tarate. Tutte le frazioni vengono evaporate a 50 °C e quindi pesate. Dopo 20 minuti oltre il 90 % del grasso dovrebbe essere stato eluito. Altrimenti il potere separatore della colonna è troppo piccolo e quest'ultima deve essere impaccata di nuovo.

Il tasso di recupero dei PCB viene controllato utilizzando una quantità totale di circa 10–50 ng per ogni singolo congenere dei PCB (ciò corrisponde all'incirca a 1–5 ng/g per una quantità di 10 g di campione di suolo) e una quantità corrispondente di standard interno. Nella fattispecie vengono raccolte quattro frazioni di 5 minuti ciascuna. La loro raccolta inizia dopo 20 minuti. Prima di quantificarla a ogni frazione viene aggiunto lo standard per il calcolo del tasso di recupero (10–50 ng). La somma dei tassi di recupero totali delle singole frazioni dovrebbe essere superiore al 90 %. L'intervallo di tempo in cui viene raccolta la frazione definitiva viene determinato in base alla distribuzione dei congeneri dei PCB nelle singole frazioni e viene controllato mediante una nuova verifica del tasso di recupero.

523 Purificazione dell'estratto del campione mediante la cromatografia di permeazione su gel

Dopo averlo concentrato a circa 1 mL mediante il Turbovap, all'estratto greggio vengono aggiunti 5 mL di una miscela di cicloesano/acetato d'etile 1+1. L'estratto greggio viene in seguito purificato utilizzando i parametri per la purificazione stabiliti mediante la calibrazione.

53 Purificazione mediante gel di silice

531 Avvertenza preliminare

Dopo la purificazione preliminare mediante GPC, l'estratto del campione viene purificato ancora una volta con la cromatografia su gel di silice. Se si tratta di campioni contenenti soltanto piccoli quantitativi di matrice del campione e di zolfo, questa fase di purificazione può essere effettuata immediatamente dopo l'estrazione.

L'estratto ottenuto mediante l'estrazione con la miscela di cicloesano/acetato d'etile viene trasferito in un pallone a fondo rotondo. In seguito vengono aggiunti 50 µL di n-nonano quale "keeper" e l'estratto viene concentrato a circa 0.5–1 mL mediante il Turbovap. Non deve più sentire di acetato d'etile. In caso contrario si deve ripetere il trattamento.

532 Purificazione mediante cromatografia su gel di silice

Sul fondo di una colonna di vetro di 200 mm di lunghezza e di 15 mm di diametro interno viene deposto un batuffolo di ovatta. La colonna viene poi riempita per circa metà con n-esano e vengono aggiunti 4 g di gel di silice (cfr. il capitolo 222.3). Il gel di silice viene impaccato con un vibratore e viene aggiunto 1 g di Na₂SO₄. In seguito la fase stazionaria viene lavata con 30 mL di una miscela di etere dietilico/n-esano 10 %. La fase stazionaria non può mai rimanere senza solvente! L'estratto del campione viene ora trasferito sulla colonna. Il pallone contenente il campione viene sciacquato con 2–3 mL della miscela di etere dietilico/n-esano 10 % e anche questo volume viene trasferito sulla colonna.

La fase stazionaria viene poi eluita con 30 mL della miscela di etere dietilico/n-esano 10 %. Questa frazione viene raccolta in un recipiente per il Turbovap e dopo l'aggiunta di 20 µL di n-nonano quale "keeper" viene concentrata a circa 0.5 mL mediante il Turbovap. Successivamente l'estratto viene trasferito in un flaconcino per campioni. Il recipiente per il Turbovap viene sciaquato tre volte con un volume di circa 0.15 mL di n-esano, che viene pure trasferito nel flaconcino per campioni. Successivamente il volume può essere ridotto al volume finale desiderato (circa 200 µL) mediante una corrente di azoto. Nella fattispecie, la corrente di azoto non deve increspare la superficie del solvente. Il campione è ora pronto per la quantificazione.

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 circa 200 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*.

62 Separazione mediante cromatografia in fase gassosa

621 Avvertenza preliminare

Le separazioni dei PCB 28 da 31 nonché dei PCB 138 da 163 sono particolarmente critiche. L'ultima separazione riesce unicamente se si utilizzano delle fasi stazionarie speciali. (cfr. commenti e bibliografia nelle istruzioni *Concetto di «Quality Assurance» – Analitica di PAK, PCB e diossine nel suolo*).

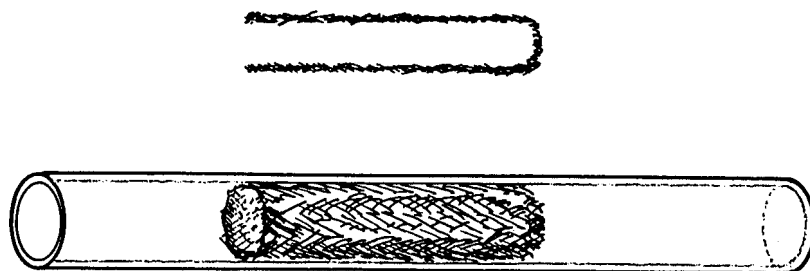
622 Apparecchi

- Gascromatografo.
- Iniettore per l'iniezione splitless oppure "on-column", 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*).

623 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.

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



624 Colonne capillari

Si possono utilizzare le seguenti colonne capillari:

- *5%-Fenil-95%-metilpolisilossano*: z.B. DB5, Ultra 2, CP-Sil 8, RTx5 o equivalenti, immobilizzate, spessore della pellicola 0.1 μm .
- *14%-Cianopropilfenil-86%-metilpolisilossano*: z.B. DB1701, HP-1701, CP-Sil 19, RTx1701 o equivalenti, immobilizzate, spessore della pellicola 0.1 μm .
- *90%-Biscianopropil-10%-fenilcianopropilpolisilossano*: z.B. RTx2330, SP-2330, CP-Sil 84 o equivalenti, immobilizzate, spessore della pellicola
- *Dimensioni del capillare*: capillari di quarzo rivestiti di poliimmide, lunghezza 25 o 30 m, diametro 0.20 oppure 0.25 mm.

625 Condizioni d'iniezione e di separazione

- *Gas vettore*: He, velocità del flusso 35–45 cm/s.
- *Flusso di gas all'uscita dello split*: 50 \pm 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: soltanto informativo, deve essere adeguato a seconda della dimensione e della fase del capillare. 60 °C, 2 minuti di attesa, da 60 °C a 150–190 °C a 30 °C/minuto, da 150 °C a 190 °C/minuto, 230–280 °C isothermico (6.5–15 minuti).

Iniezione manuale con ago caldo, con questa tecnica persino i PCB molto poco volatili vengono trasferiti nella colonna capillare in modo praticamente quantitativo:

- 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 510 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 PCB 118.

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 iniezione di 1 µL dell'estratto del campione approssimativamente 10–20 pg. Per un volume di campione di p.es. 200 µL, ciò equivale circa a una quantità totale di 2–4 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 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 $[M+2]^+$ rispettivamente dello ione $[M+2]^+$ e $[M+4]^+$. Lo spettrometro di massa viene impiegato nella modalità SIM ("Selected Ion Monitoring"), tempo di misurazione ("dwell time") 50 ms/Ion o almeno 10–12 punti di misurazione per segnale cromatografico – totale ≤ 11 ioni per gruppo.

Per la quantificazione si utilizza il programma SIM elencato nella Tabella 2. 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).

Tabella 2: massa dei gruppi di ioni per la quantificazione dei PCB con GC/MS. Lo ione con la massa più alta viene utilizzato per la quantificazione. I gruppi devono essere eventualmente modificati a seconda della fase stazionaria.

N. Gruppo	PCB N.	M ⁺	[M+2] ⁺
1	PCB 28, PCB 31	255,9	257,9
	1,2,3,4-TCN	263,9	265,9
	¹³ C-PCB 28	267,9	269,9
2	PCB 52	289,9	291,9
	¹³ C-PCB 52	301,9	303,9
	1,2,3,4-TCN	263,9	265,9
3	PCB 101, PCB 118	325,8*)	327,8*)
	¹³ C-PCB 118	337,9*)	339,9*)
4	PCB 138, PCB 153	359,8*)	361,8*)
	¹³ C-PCB 153	371,8*)	373,8*)
5	PCB 180	393,8*)	395,8*)
	¹³ C-PCB 180	405,7*)	407,7*)

*) Ione [M+2]⁺ risp. ione [M+4]⁺

64 Esecuzione della quantificazione

Ad analisi terminata, per i singoli PCB vengono stampati tutte le superfici e i frammentogrammi di massa integrati. La qualità dell'analisi viene in seguito valutata visualmente in base ai criteri seguenti (cfr. il capitolo 7, quality assurance):

- Nei frammentogrammi di massa vi sono segnali che interferiscono? Mancano dei composti della classe PCB, 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 PCB sono esatti (cfr. il capitolo 76)?
- 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?
- I rapporti delle intensità dei frammentogrammi di massa corrispondono, entro i limiti di errore di ±15%, alle rispettive distribuzioni isotopiche che sono state determinate per le soluzioni per la calibrazione?

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 menzionati. 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 PCB 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:

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

rf_i : fattore di risposta riferito a PCB_i e allo standard interno STDI
 conc.: concentrazione nello standard per la quantificazione

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

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

M_i : quantità totale del PCB 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:

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

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

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

$W(\%)_i$: 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

Prima di poter essere impiegati, tutti gli standard di riferimento e tutti gli standard d'impiego frequente appena preparati devono essere paragonati con lo standard utilizzato in precedenza. Differenze che si situano entro i limiti della ripetibilità del metodo di quantificazione ($\pm 10\%$) sono accettabili. Gli standard di base devono essere controllati almeno una volta all'anno confrontandoli con uno standard di riferimento certificato (p.es. NIST SRM 1492 "Chlorinated pesticides in hexane" o BCR CRM 365 "Polychlorinated biphenyls in iso-octane") oppure con lo standard di riferimento utilizzato in una calibrazione interlaboratorio approvata. Questi vengono trattati come gli standard di riferimento e conservati a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Quali standard di riferimento certificati si possono acquistare sia sostanze cristalline con una purezza superiore al 99.5 % sia soluzioni con una precisione di circa $\pm 5\%$.

Differenze di concentrazione fino a un massimo del 10 % tra standard di diversi laboratori sono quindi 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 calibrazione 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 PCB 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 PCB 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 PCB 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 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 PCB. Per ogni composto PCB 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 certificato, p.es. BCR 481 PCB nei suoli industriali, BCR-536 PCB nei sedimenti di porti lacustri (entrambi possono essere ottenuti presso l'*Institute for Reference Materials and Measurements, IRMM, Geel, Belgio*), RT 910 PCB nel suolo, RT 912 composti organici nel suolo contaminato o SRM 1939 PCB nei sedimenti fluviali (gli ultimi tre e altri composti di riferimento possono essere ottenuti presso *LGC-Promochem, Wesel, Germania*). 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 interlaboratorio relative ai PCB sono molto elevati, si organizzano soltanto poche calibrazioni interlaboratorio per i PCB in campioni con matrici diverse. Ci si deve prefiggere di partecipare per lo meno una volta all'anno a una calibrazione interlaboratorio concernente i PCB.

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 PCB 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 PCB 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 circa ± 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'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. Contiene inoltre indicazioni concernenti le tecniche alternative e i punti critici che potrebbero causare problemi.
