

MATTEO VITELLI^{(1)(*)},
RAFFAELLA BOCCIOLINI⁽¹⁾,
FABRIZIO MANNELLI⁽²⁾

⁽¹⁾ ARPAT - U.O. CHIMICA II -
Settore Laboratorio - Area Vasta
Centro

⁽²⁾ ARPAT – Area Vasta Sud

^(*) m.vitelli@arpat.toscana.it

Applicazione della tecnica SPME-GC-MS/MS alla determinazione di IPA e PCB nelle acque: estensione del campo di applicazione di un metodo di riferimento

Riassunto - La microestrazione in fase solida (SPME) ha conosciuto negli ultimi 30 anni un notevole sviluppo ed un largo impiego come alternativa alla preparazione tradizionale del campione finalizzata alle analisi in tracce. Tuttavia non è ancora disponibile un metodo normato specifico per l'analisi di IPA e PCB nelle acque superficiali e sotterranee mediante SPME-GC/MS. Attraverso la messa a punto delle condizioni sperimentali, è stato possibile estendere il campo di applicazione della norma UNI EN ISO 27108:2013, prevista per la determinazione di alcuni fitofarmaci, a 16 IPA e a 29 congeneri di PCB (comprensivi dei 12 PCB "dioxin-like" e dei 6 PCB "marker") verificandone le prestazioni e l'idoneità al fine del monitoraggio dei corpi idrici superficiali e sotterranei, ai sensi della direttiva 2013/39/UE. Questo metodo consente l'eliminazione quasi completa dell'impiego di solventi ed un elevato grado di automazione, con una riduzione dei tempi di analisi.

Parole Chiave: IPA, PCB, SPME, GC/MS/MS, monitoraggio delle acque

Application of SPME-GC-MS/MS to IPA and PCB determination in water: an extension of the reference method scope.

Summary - In the last 30 years Solid Phase Microextraction (SPME) has been highly developed and widely applied in the field of analytical chemistry as an alternative method in trace analysis. However it is not yet available a specific standard method for IPA and PCB in surface and ground water by SPME-GC/MS. Optimizing experimental conditions, it was possible to extend the scope of the standard UNI EN ISO 27108:2013 (method for pesticides in water) to 16 PAHs and 29 PCBs congeners (including 12 PCB "dioxin-like" and 6 PCB "marker") in water, with a performance assessment and fitness for purpose verification for surface and ground water monitoring, according to the water framework directive 2013/39/UE. This method has the advantage of an almost complete elimination of organic solvents and an high level of automation, with a reduction of analysis time.

Keywords: PAHs, PCBs, SPME, GC/MS/MS, water monitoring

INTRODUZIONE

Sin dalla sua prima introduzione intorno alla fine degli anni '80 [1], la tecnica della microestrazione in fase solida (SPME) è stata ampiamente utilizzata in molti campi come un approccio alternativo alla preparazione tradizionale del campione per la rilevazione di composti organici in tracce. Mediante un rivestimento polimerico su una fibra in silice fusa, immersa opportunamente in un campione termostato e in continua agitazione, gli analiti presenti possono essere adsorbiti o assorbiti e successivamente desorbiti termicamente in un iniettore gascromatografico per la determinazione strumentale (es. GC-MS, GC-MS/MS). Rispetto alla estrazione convenzionale dei campioni (liquido/liquido) o estrazione in fase solida (SPE), questa tecnica elimina in modo quasi completo l'uso di solventi organici ed è di più semplice esecuzione in quanto automatizzabile, mantenendo al tempo stesso una soddisfacente riproducibilità. Si può quindi affermare che tale tecnica ha aperto un nuovo ambito di ricerca nel campo delle tecniche separative, sviluppandosi nel corso degli ultimi anni sia in ambito teorico che applicativo [2,3]. Con il perfezionamento dei sistemi di automazione, e in particolare degli autocampionatori, è stata fortemente migliorata la ripetibilità del metodo e ridotta la manipolazione del campione, rendendo fortemente attrattiva questa tecnica soprattutto nei laboratori con numeri elevati di campioni da analizzare.

Nell'ambito delle attività svolte dai laboratori Arpat, e più in generale dalla rete nazionale dei laboratori del SNPA, la necessità di processare un numero elevato di campioni, provenienti da una fitta rete di monitoraggio delle acque, ha reso opportuna l'applicazione di una tecnica, come la microestrazione in fase solida, che permette di favorire la produttività del laboratorio mantenendo contenuti i costi e al contempo elevata la qualità del dato analitico. Tra le numerose sostanze da monitorare, quelle individuate a livello

Europeo come "prioritarie", gli IPA sono inquinanti ben noti per le loro proprietà cancerogene e mutagene, e l'Unione Europea (2013/39/UE) li ha classificati come "pericolosi prioritari" (PP): ciò rende la loro determinazione nelle acque necessaria ai fini della classificazione dei corpi idrici, con riguardo particolare per il benzo[a]pirene, il cui standard di qualità ambientale è di 0,17 ng/L, livello di quantificazione che allo stato attuale non tutti i laboratori sono in grado di garantire.

A tale scopo sono stati presi in esame i metodi EPA 8272:2007 [4] per l'analisi dell'acqua interstiziale dei sedimenti (sediment pore water) e la norma UNI EN ISO 27108:2013 [5], per la determinazione dei fitofarmaci nelle acque. Entrambi i metodi utilizzano la tecnica in esame, e in particolare la UNI EN ISO 27108:2013 permette l'estensione del campo di applicazione ad altre molecole oltre i fitofarmaci, purché venga effettuata una specifica validazione. La scelta della norma cui fare riferimento è ricaduta quindi sulla UNI EN ISO 27108:2013, con lo scopo di applicarla alla determinazione di IPA e PCB nelle acque superficiali e sotterranee in campi di concentrazione adeguati alla verifica del rispetto degli standard di qualità ambientale (SQA) e di altri limiti di riferimento previsti dalle normative vigenti per queste matrici (D.Lgs. 172/2015, D. Lgs. 152/2006, D.M. 6 luglio 2016). È stata quindi redatta una procedura di prova con estensione del campo di applicazione della norma, originariamente previsto per "agenti selezionati per il trattamento delle piante e prodotti biocidi", tale estensione è ammessa dalla stessa norma al punto 1 ("Scope. *This method may be applicable to other compounds not explicitly covered by this International Standard or to other types of water. However, it is necessary to verify the applicability of this method for these special cases*").

Attraverso l'esame dei dati di letteratura per gli analiti di interesse determinati per gli analiti di interesse determinati con SPME e prove eseguite in laboratorio, sono stati valutati in una fase preliminare numerosi parametri sperimentali,

come la temperatura di termostatazione e la durata dell'immersione della fibra durante la fase di adsorbimento degli analiti, i tempi di desorbimento della fibra all'interno dell'iniettore, gli effetti dell'aggiunta di NaCl al campione utilizzato per favorire il trasferimento degli analiti dall'acqua alla fase solida che riveste la fibra, così come gli effetti di variazione di spessore e natura chimica della stessa, nonché il volume ottimale di campione da analizzare [6].

Il metodo, di seguito descritto e validato in conformità alla norma UNI EN ISO 17025:2018 attraverso la partecipazione a circuiti interlaboratorio e l'esecuzione di repliche su matrici fortificate (acque superficiali e sotterranee) a diversi livelli di concentrazione, è stato infine applicato all'analisi di acque da bonifica e al monitoraggio dei corpi idrici superficiali e sotterranei in Toscana ai fini della classificazione dello stato chimico, applicando la sopra citata normativa nazionale ed europea.

MATERIALI E METODI

Standard e Reagenti

Gli Idrocarburi policiclici aromatici nativi certificati (Tab.1) sono stati utilizzati nella miscela commerciale "610 PAH solution" (*O2si Smart Solution*), ciascuno in concentrazione pari a 100 mg/L, mentre per i corrispondenti IPA deuterati (Tab. 2), da utilizzare per la quantificazione con il metodo dello standard interno, è stata utilizzata la miscela certificata commerciale "PAH-LCS-A" da 2000 ng/ml, fornita da Wellington Laboratories.

I 29 congeneri di policlorobifenili sono stati utilizzati in miscela commerciale "PCB Congener Solution 29-1" (Tab. 3), 10 mg/L fornita da O2si Smart Solution, mentre i corrispondenti marcati (Tab. 4) sono utilizzati nelle miscele commerciali PCB-DL (Dioxin Like) $^{13}\text{C}_{12}$ "P48-W-ES-STK" e PCB-Marker $^{13}\text{C}_{12}$ "P48-M-ES" entrambe fornite da Wellington Laboratories.

Tab. 1. Miscela nativi IPA "610 PAH Solution, 16-1, 100 mg/L, 1 mL" per taratura

Naftalene	Acenaftilene
Acenaftene	Fluorene
Fenantrene	Antracene
Fluorantene	Pirene
Benzo(a)antracene	Crisene
Benzo(b)fluorantene	Benzo(k)fluorantene
Benzo(a)pirene	Indeno(1,2,3-cd)pirene
DiBenzo(a,h)Antracene	Benzo(ghi)Perilene

Tab. 2. Standard IPA deuterati (standard interno) "PAH-LCS-A", 2000 ng/mL

Naftalene-d ₈	Acenaftene-d ₁₀
Fluorene d ₁₀	Fenantrene-d ₁₀
Antracene d ₁₀	Fluorantene-d ₁₀
Pirene-d ₁₀	Benzo(a)antracene-d ₁₂
Crisene-d ₁₂	Benzo(b)fluorantene-d ₁₂
Benzo(k)fluorantene-d ₁₂	Benzo(a)pirene-d ₁₂
Indeno(1,2,3-cd)pirene d ₁₂	DiBenzo(a,h)Antracene-d ₁₄
Benzo(ghi)Perilene d12	<i>DiBenzo(a,i)Pirene-d₁₄</i> (non utilizzato per la quantificazione nella presente procedura)

Gli standard di seconda fonte utilizzati per il controllo qualità e la verifica della taratura sono: "610 PAH solution second source" (*O2si Smart Solution*) per gli IPA e "PCB Congener Solution 29-1 second source" per i PCB, con analoghe composizioni e concentrazioni delle soluzioni riportate nelle tabelle 1 e 3.

L'acqua ultrapura è ottenuta mediante sistema MilliQ-plus (Millipore), mentre l'acetone di grado di purezza per analisi di pesticidi, utilizzato per le diluizioni delle soluzioni madre, è prodotto dalla Fluka Analytical.

Apparecchiature, materiali e parametri strumentali

Gascromatografo/spettrometro di massa

Per il presente lavoro è stato utilizzato uno spettrometro di massa a triplo quadrupolo Shimadzu TQ8050 munito di

Tab. 3. Miscela nativi PCB 29 congeneri "PCB Congener Solution" per taratura

	IUPAC	PCB		IUPAC	PCB	
TriCB	28	2,4,4' Triclorobifenile	EsaCB	128	2,2',3,3',4,4' Esaclorobifenile	
				138	2,2',3,4,4',5' Esaclorobifenile	
TetraCB	52	2,2',5,5' Tetraclorobifenile		146	2,2',3,4',5,5' Esaclorobifenile	
	77	3,3',4,4' Tetraclorobifenile		149	2,2',3,4',5,6 Esaclorobifenile	
	81	3,4,4',5 Tetraclorobifenile		151	2,2',3,5,5',6 Esaclorobifenile	
PentaCB	95	2,2',3,5',6 Pentaclorobifenile		153	2,2',4,4',5,5' Esaclorobifenile	
	99	2,2',4,4',5 Pentaclorobifenile		156	2,3,3',4,4',5 Esaclorobifenile	
	101	2,2',4,5,5' Pentaclorobifenile		157	2,3,3',4,4',5' Esaclorobifenile	
	105	2,3,3',4,4' Pentaclorobifenile		167	2,3',4,4',5,5' Esaclorobifenile	
	110	2,3,3',4',6 Pentaclorobifenile		169	3,3',4,4',5,5' Esaclorobifenile	
	114	2,3,4,4',5 Pentaclorobifenile		EptaCB	170	2,2',3,3',4,4',5 Eptaclorobifenile
	118	2,3',4,4',5 Pentaclorobifenile			177	2,2',3,3',4',5,6 Eptaclorobifenile
	123	2',3,4,4',5 Pentaclorobifenile			180	2,2',3,4,4',5,5' Eptaclorobifenile
	126	3,3',4,4',5 Pentaclorobifenile			183	2,2',3,4,4',5',6 Eptaclorobifenile
			187		2,2',3,4',5,5',6 Eptaclorobifenile	
		189	2,3,3',4,4',5,5' Eptaclorobifenile			

Tab. 4. Standard PCB marcati $^{13}\text{C}_{12}$ "PCB-DL + Marker"

	IUPAC	$^{13}\text{C}_{12}$ PCB		IUPAC	$^{13}\text{C}_{12}$ PCB
P48-W-ES-STK (PCB-DL)	77L	3,3',4,4' Tetracloro [$^{13}\text{C}_{12}$]bifenile	P48-M-ES (PCB Marker)	28L	2,4,4' Tricloro [$^{13}\text{C}_{12}$]bifenile
	81L	3,4,4',5 Tetracloro [$^{13}\text{C}_{12}$]bifenile		52L	2,2',5,5' Tetracloro [$^{13}\text{C}_{12}$]bifenile
	105L	2,3,3',4,4' Pentacloro [$^{13}\text{C}_{12}$]bifenile		101L	2,2',4,5,5' Pentacloro [$^{13}\text{C}_{12}$]bifenile
	114L	2,3,4,4',5 Pentacloro [$^{13}\text{C}_{12}$]bifenile		138L	2,2',3,4,4',5' Esacloro [$^{13}\text{C}_{12}$]bifenile
	118L	2,3',4,4',5 Pentacloro [$^{13}\text{C}_{12}$]bifenile		153L	2,2',4,4',5,5' Esacloro [$^{13}\text{C}_{12}$]bifenile
	123L	2',3,4,4',5 Pentacloro [$^{13}\text{C}_{12}$]bifenile		180L	2,2',3,4,4',5,5' Eptacloro [$^{13}\text{C}_{12}$]bifenile
	126L	3,3',4,4',5 Pentacloro [$^{13}\text{C}_{12}$]bifenile			
	156L	2,3,3',4,4',5 Esacloro [$^{13}\text{C}_{12}$]bifenile			
	157L	2,3,3',4,4',5' Esacloro [$^{13}\text{C}_{12}$]bifenile			
	167L	2,3',4,4',5,5' Esacloro [$^{13}\text{C}_{12}$]bifenile			
	169L	3,3',4,4',5,5' Esacloro [$^{13}\text{C}_{12}$]bifenile			
	189L	2,3,3',4,4',5,5' Eptacloro [$^{13}\text{C}_{12}$]bifenile			

un autocampionatore PAL System AOC 6000 controllato dal software della serie GCMS Solutions. Lo spettrometro di massa opera in modalità MRM (Multiple Reaction Monitoring) con un tune dello strumento effettuato in modalità "normale", ovvero con una corrente di emissione pari a 60 μA .

L'iniettore del gascromatografo è stato impostato alla temperatura di 280°C e utilizzato nella modalità splitless. È stata impiegata una colonna capillare per gascromatografia con fase stazionaria a media polarità ed a basso spurgo: Resteck Rxi-17 Sil 20 m, diametro interno 0,18 mm, spessore del film 0,18 μm .

Per la separazione degli IPA, la colonna viene mantenuta inizialmente a 40°C per 3 min, quindi portata a 120°C con gradiente 40°C/min e a 320°C a 8°C/min, per lo spurgo finale viene mantenuta a 320°C per 10 min.

Per quanto riguarda la programmazione dei PCB, la colonna viene mantenuta

Tab. 5a. RETTA IPA (basse concentrazioni) Soluzioni standard IPA per la costruzione della retta di taratura

Soluzioni IPA, ng/L	1	2	3	4	5	6	7
Benzo(a)pirene	0,1	0,5	1	5	10	15	20
Naftalene	-	-	-	5	10	15	20
Altri IPA (composti Tab.1, eccetto Benzo(a)pirene e Naftalene)	-	-	1	5	10	15	20
IPA deuterati (standard interno-Tab. 2)	10	10	10	10	10	10	10

Tab. 5b. RETTA IPA (alte concentrazioni) Soluzioni standard IPA per la costruzione della retta di taratura

Soluzioni IPA, ng/L	1	2	3	4	5	6	7
IPA (composti Tab. 1)	5	10	20	50	100	150	200
IPA deuterati (standard interno-Tab. 2)	10	10	10	10	10	10	10

Tab. 5c. RETTA PCB (basse concentrazioni) Soluzioni standard PCB per la costruzione della retta di taratura

Soluzioni PCB, ng/L	1	2	3	4	5
PCB nativi (congeneri Tab.3)	0,5	1	2	10	20
¹³ C ₁₂ PCB (standard interno-Tab.4)	2	2	2	2	2

Tab. 5d. RETTA PCB (alte concentrazioni) Soluzioni standard PCB per la costruzione della retta di taratura

Soluzioni PCB, ng/L	1	2	3	4	5	6
PCB nativi (congeneri Tab.3)	5	10	20	50	100	250
¹³ C ₁₂ PCB (standard interno-Tab.4)	10	10	10	10	10	10

inizialmente a 40°C per 3 min, quindi portata a 120°C con gradiente 40°C/min, successivamente a 274°C a 8°C/min ed infine portata a 310°C a 50°C/min, dove viene tenuta per 5 min per lo spurgo finale.

Sistema per microestrazione in fase solida (SPME)

Il pretrattamento del campione, una volta fortificato con gli standard marcati, viene effettuato mediante autocampionatore PAL System AOC 6000 in maniera completamente automatizzata. La fibra commerciale utilizzata è la Resteck® PAL SPME Fiber, una fibra apolare in PDMS (Polidimetilsilossano) per SPME di spessore 30 µm, lunghezza 10 mm, alloggiata su di un ago di diametro Gauge 23 per autocampionatori di tipo PAL System (o equivalenti).

Prima dell'utilizzo di una nuova fibra, è necessario un suo condizionamento termico iniziale, secondo le specifiche tecniche fornite dalla ditta produttrice.

Questo viene effettuato tramite apposito metodo gascromatografico, posizionando la fibra direttamente nell'iniettore, mantenuto in modalità split, a 280°C per 60 min.

La fibra viene poi immersa nella vial contenente il campione in analisi, in volume pari a 20,0 mL, termostata e tenuta sotto agitazione, e quindi desorbita nell'iniettore del GC-MS/MS in modalità splittless. Finito il tempo di desorbimento, con trasferimento quantitativo degli analiti nella colonna gascromatografica, la fibra viene ulteriormente lasciata nell'iniettore con un alto flusso di splittaggio per consentire il suo spurgo.

La velocità di agitazione della vial (500 rpm), la temperatura (40°C) e i tempi di incubazione del campione (10 min), i tempi di immersione della fibra nel campione (30 min) e il desorbimento nell'iniettore (17 min) sono stati ottimizzati per favorire la massima sensibilità per il benzo[a]pirene (dovendo garantire un limite di quantificazione pari almeno a 0,10 ng/L) e applicati alla determinazione di tutti i parametri ricercati, e controllati dal programma strumentale: poiché tali parametri determinano l'equilibrio di ripartizione dell'analita sulla fibra, questi devono essere costanti e riproducibili in tutta la sequenza analitica. Le condizioni strumentali, così ottimizzate, vengono utilizzate per l'estrazione di tutti gli analiti ricercati.

Taratura e campo di misura

La taratura prevede l'esecuzione di almeno 5 punti nel campo di misura del metodo che, con l'eccezione del benzo[a]pirene e del naftalene, è compreso tra 0,001 µg/L - 0,200 µg/L. Nel caso specifico del benzo[a]pirene, il campo di misura è stato esteso al campo di concentrazioni 0,00010 µg/L - 0,200 µg/L, ai fini del confronto con il corrispondente Standard di Qualità ambientale (0,17 ng/L). Per i PCB il campo di misura è fra 0,0005 µg/L e 0,250 µg/L. Nelle tabelle 5 sono riportati in dettaglio i punti di taratura scelti per due intervalli di linearità ("bassa" e "alta" concentrazione sia per IPA che per PCB).

RISULTATI E DISCUSSIONE

Grazie alla sua natura apolare, il polidimetilsilossano (PDMS) è la fase adsorbente più ampiamente utilizzata per la SPME, ed è stata scelta per la determinazione di IPA e PCB. Poiché il PDMS estrae gli analiti attraverso il meccanismo dell'assorbimento, quest'ultimo principalmente dipenderà dai vari coefficienti di diffusione degli analiti all'interno del PDMS, e dallo spessore della fase che ricopre la fibra in silice fusa, ove si stabilisce

un equilibrio di ripartizione con la fase acquosa. Questo dipende anche dallo spessore della fase, che nel caso del presente lavoro è stato scelto pari a 30 µm, in modo da ottenere un'adeguata sensibilità e mantenere al tempo stesso contenuto l'effetto memoria della fibra.

Con questo materiale è stato possibile ottimizzare le condizioni strumentali, in modo da ottenere la massima sensibilità ai fini del confronto con gli standard di qualità ambientale.

Controllo qualità ed effetti matrice

Le sostanze umiche (acidi umici e fulvici) costituiscono la componente principale della sostanza organica disciolta nelle acque superficiali: esse possono influire sull'equilibrio di ripartizione degli analiti tra il campione e la fibra, riducendo l'efficienza di estrazione degli analiti. Per verificare che tale effetto non comprometta la qualità del dato analitico, e al tempo stesso sia verificata la stabilità delle soluzioni standard utilizzate per la taratura, sono state preparate soluzioni di controllo qualità di seconda fonte (QC) da additivare alla matrice in esame (acqua superficiale o sotterranea esente da contaminazioni) ed analizzare in ogni sequenza analitica. I dati così ottenuti nel tempo, riportati in una carta di controllo, dimostrano il rispetto dei criteri di accettabilità, fissati a $\pm 30\%$ del valore atteso.

È importante considerare che, nel caso in cui si presenti una elevata concentrazione in acqua di solidi sospesi o materiale organico colloidale, la concentrazione di IPA presente nella fase solida potrebbe rappresentare una quota significativa rispetto alla frazione disciolta: in questo caso l'effetto matrice diventa significativo e la concentrazione misurata va riferita alla sola frazione di IPA in soluzione. In questa situazione particolare può essere appropriato effettuare un'analisi di conferma mediante estrazione con solvente (es. diclorometano), in quanto la quantità assorbita su fibra potrebbe comportare una sottostima della reale concentrazione nel campione.

Tab. 6. Ripetibilità al limite di quantificazione del benzo[a]pirene 0,10 ng/L

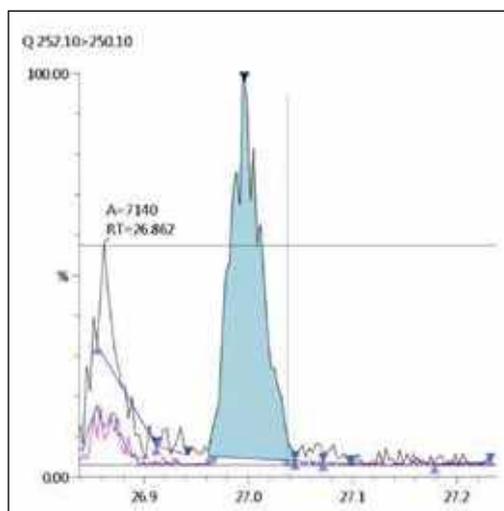
RISULTATI ELABORAZIONE		
Valori inseriti	10	
Media	0.11	
Mediana	0.11	
Scarto QM	0.03	
CV%	30.1	
Valore t di student	2.262	
Limite di ripetibilità	0.10	
Limite inferiore	0.085	
Limite superiore	0.131	
Analisi sulla normalità della distribuzione con il Test di Shapiro Wilks: la distribuzione è normale?	Livello di confidenza	
	95%	99%
	SI	SI
La ricerca dei dati anomali è condotta con il Test di Huber	AI 95%	AI 99%
	Nessun dato anomalo	Nessun dato anomalo

Limiti di quantificazione, esattezza e ripetibilità

I limiti di quantificazione sono stati valutati attraverso prove replicate su aliquote di campioni d'acqua superficiale esente da contaminazioni, fortificati a concentrazioni corrispondenti al primo punto della retta di taratura (1,0 ng/L).

Di particolare rilievo inoltre è lo studio del benzo[a]pirene (il suo Standard di Qualità Ambientale è tra i più bassi tra i composti ricercati: $1,7 \cdot 10^{-4}$ µg/L), effettuato attraverso 10 prove replicate a 0,10 ng/L, i cui risultati sono riportati in tabella 6, con analisi della normalità della distribuzione con il test di Shapiro-Wilk, e la ricerca di eventuali dati anomali con il test di Huber effettuata mediante modulo agenziale ARPA Toscana numero 30. Dalle prove effettuate si è ritenuto quindi di poter quantificare in modo affidabile concentrazioni pari almeno a 0,10 ng/L di benzo[a]pirene.

Fig. 1. Picco cromatografico del benzo[a]pirene da un campione reale di acqua superficiale addizionato alla concentrazione di 0,10 ng/L.



In Fig. 1 è riportato il segnale cromatografico corrispondente, il cui rapporto segnale/rumore deve risultare sempre > 10 per soddisfare i requisiti di accettabilità.

Tutti i rimanenti congeneri IPA sono stati valutati al livello di 1,0 ng/L (5,0

Tab. 7. Prestazioni della procedura analitica per la determinazione degli IPA; CV% : Coefficiente di variazione percentuale; n: numero di repliche.

Composto	LOQ			CV% 0,10 ng/L n = 8
	CV% 10 ng/L n = 10	CV% 1,0 ng/L n = 10	CV% 5,0 ng/L n = 10	
Naftalene	-	-	10,1	14,9
Acenaftilene	-	16,2	-	14,0
Acenaftene	-	11,6	-	14,6
Fluorene	-	20,8	-	14,5
Fenantrene	-	18,19	-	14,9
Antracene	-	10,9	-	14,4
Fluorantene	-	9,1	-	11,7
Pirene	-	13,4	-	11,1
Benzo[a]antracene	-	7,9	-	9,6
Crisene	-	10,3	-	10,6
Benzo[b]fluorantene	-	11,2	-	11,9
Benzo[k]fluorantene	-	15,9	-	12,0
Benzo[a]pirene	30,1	11,0	-	9,8
Indeno[1,2,3-cd]pirene	-	10,1	-	12,6
Dibenzo[a,h]antracene	-	14,9	-	14,0
Benzo[g,h,i]perilene	-	9,6	-	11,1

ng/L per il naftalene), corrispondente al loro limite di quantificazione, e al livello di 10 ng/L. In Tab. 7 sono riassunte le prestazioni della procedura analitica per tali livelli di concentrazione.

La qualità del metodo è stata valutata anche attraverso la partecipazione a circuiti interlaboratorio (AGLAE, anni 2019 e 2020) per IPA e PCB, effettuando le prove di ripetibilità sui materiali forniti dai circuiti e valutando lo scostamento rispetto al valore assegnato a ciascun parametro.

Nelle tabelle 8a e 8b sono riportati in sintesi i risultati del circuito del 1° semestre 2020 (Aglae 20M64.1), sia per IPA che per PCB, i cui risultati sono accettabili sia per quanto riguarda gli z-score (< 2 per tutti i parametri) che per quanto riguarda la ripetibilità e l'esattezza.

Stima dell'incertezza di misura

La stima dell'incertezza di misura costituisce elemento fondamentale del processo di validazione di un metodo, e può

rivelarsi particolarmente critica in prossimità del limite di riferimento, o limite di conformità, per quanto riguarda gli effetti decisionali sia sulla classificazione dei corpi idrici (buono/non buono), sia sulla valutazione della eventuale contaminazione delle acque sotterranee presso i siti da bonificare (concentrazioni soglia di contaminazione).

A tale scopo è stata valutata l'incertezza del metodo per gli IPA in corrispondenza delle concentrazioni ritenute più significative, per tutti i composti di interesse. Il laboratorio ha quantificato l'incertezza del metodo in esame mediante approccio cosiddetto ibrido [7]. Questa tipologia di calcolo prevede la valutazione di due contributi: il bias e la ripetibilità intermedia. Sono stati analizzati due serie di campioni a due concentrazioni diverse: la prima pari a 10 ng/L per tutti gli analiti (soglia di contaminazione nelle acque sotterranee dei siti di bonifica per alcuni analiti (D.Lgs. 152/2006 Parte IV - Titolo V Allegato 5 tab 2), questa serie è stata

Tab. 8a. Prove replicate su materiale da circuito interlaboratorio (AGLAE: Proficiency testing schemes 20M64.1 1° semestre 2020) – Idrocarburi policiclici aromatici

Composto	Media valori misurati, ng/L	X _{ass} [†] concentrazione assegnata, ng/L	esattezza (scostamento rispetto al valore assegnato, %)	CV% n = 8	z-score
Naftalene	81,90	88,78	-8,4	13,24	-0,27
Acenaftilene	71,95	79,93	-11,1	3,71	-0,16
Acenaftene	47,91	48,47	-1,2	11,56	-0,04
Fluorene	100,58	100,99	-0,4	8,28	-0,08
Fenantrene	70,88	74,57	-5,2	4,07	-0,32
Antracene	11,86	12,25	-3,3	6,93	-0,14
Fluorantene	16,81	18,72	-11,4	4,11	-0,68
Pirene	73,31	84,91	-15,8	1,63	-0,97
Benzo[a]antracene	22,64	25,18	-11,2	2,53	-0,72
Crisene	90,16	95,56	-6,0	1,16	-0,38
Benzo[b]fluorantene	16,83	18,85	-12,0	3,10	-0,83
Benzo[k]fluorantene	20,72	23,92	-15,4	5,18	-0,95
Benzo[a]pirene	15,65	18,86	-20,5	2,99	-1,48
Indeno[1,2,3-cd]pirene	9,75	11,46	-17,5	4,60	-0,61
Dibenzo[a,h]antracene	16,65	21,77	-30,8	7,75	-1,51
Benzo[g,h,i]perilene	7,49	10,19	-36	3,07	-1,38

Tab. 8b. Prove replicate su materiale da circuito interlaboratorio (AGLAE: Proficiency testing schemes 20M64.1 1° semestre 2020) – Policlorobifenili (i 7 congeneri esaminati sono ritenuti rappresentativi dei 29 congeneri previsti dal metodo).

Composto	media valori misurati, ng/L	X _{ass} concentrazione assegnata, ng/L	esattezza (scostamento rispetto a valore assegnato, %)	CV% n = 8	z-score
PCB-28	27,50	34,55	-20,4	18,7	-0,83
PCB-52	81,50	88,67	-8,1	10,3	-0,36
PCB-101	74,50	80,13	-7	10	-0,29
PCB-118	64,50	56,79	13,6	9,6	+0,61
PCB-138	116,0	100,54	15,4	10,1	+0,62
PCB-153	17,65	149,71	17,9	8,4	+0,66
PCB-180	12,85	98,83	30	14,7	+1,11

prodotta tramite spike su matrice esente; la seconda serie è stata ottenuta utilizzando i campioni del circuito AGLAE 1° Semestre del 2020 (codice 20M64.1) dove gli analiti presentavano concentrazioni tra loro differenti comprese nel range 10-100 ng/L.

Dai valori determinati è stata calcolata la ripetibilità (sono state eseguite almeno 6 prove per ogni congenere per ogni concentrazione) e il bias (la differenza

espressa come scarto tipo tra i risultati e il valore di riferimento).

Sommando i due contributi in quadratura (tenendo conto anche dell'incertezza, dello standard utilizzato per lo spike o del materiale utilizzato nel circuito) è stata calcolata l'incertezza estesa con un fattore di copertura pari a due.

Per i calcoli numerici il laboratorio si è avvalso del modulo agenziale ARPA Toscana n. 56. In tabella 9 è riportato il

Tab. 9. Quadro riassuntivo della stima dell'incertezza estesa di misura mediante spike a 10 ng/L, calcolata mediante Mod. 56 di Arpat

	dati ripetibilità a 10 ng/L					
	matrix spike, ng/L	MOD 30 (su 8 dati)			incertezza estesa dello standard, %	MOD 56 incertezza estesa, %
		media, ng/L	mediana, ng/L	CV%		
Naftalene	10	9.20	9.31	14.87	1.62	43.70
Acenaftilene	10	10.03	9.62	14.05	1.31	39.71
Acenaftene	10	9.51	8.92	14.55	1.37	41.49
Fluorene	10	9.61	9.04	14.51	1.62	41.12
Fenantrene	10	9.87	9.32	14.91	1.62	42.04
Antracene	10	10.05	9.99	14.45	1.63	40.99
Fluorantene	10	10.06	9.75	11.69	1.28	33.18
Pirene	10	10.25	9.96	11.14	1.28	32.27
Benzo[a]antracene	10	10.31	10.42	9.57	1.28	28.15
Crisene	10	10.21	10.11	10.59	1.63	30.56
Benzo[b]fluorantene	10	10.07	9.81	11.87	1.62	33.74
Benzo[k]fluorantene	10	10.46	10.24	12.00	1.62	35.90
Benzo[a]pirene	10	10.87	11.11	9.80	1.63	33.73
Indeno[1,2,3-cd]pirene	10	10.23	10.15	12.64	1.62	36.46
Dibenzo[a,h]antracene	10	10.73	10.70	14.02	1.37	43.46
Benzo[g,h,i]perilene	10	10.34	10.45	11.09	1.62	32.56

quadro riassuntivo dei valori ottenuti a 10 ng/L mediante spike per tutti gli analiti.

In Tab. 10 si riporta la stima dell'incertezza effettuata con i valori ottenuti dal circuito AGLAE 1° semestre 2020 (20M64.1)

Le incertezze percentuali sopra calcolate, derivanti sia dall'elaborazione dei dati dello spike che dal circuito interlaboratorio, sono state processate con il modulo agenziale ARPA Toscana numero 30 che garantisce sia la distribuzione normale che l'assenza di dati anomali. Per razionalizzare ulteriormente la notevole quantità di dati a disposizione, questi sono stati divisi in classi di frequenza di ampiezza 5. Anche in questo caso, il modulo 30 ha confermato la distribuzione normale e l'assenza di outlier.

È stato quindi creato un istogramma della distribuzione di tali classi di frequenza per un immediato approccio visivo (Fig 2).

I valori delle incertezze determinate

per tutti i congeneri ai due livelli di concentrazione coprono un range che va dal 12% al 52 %.

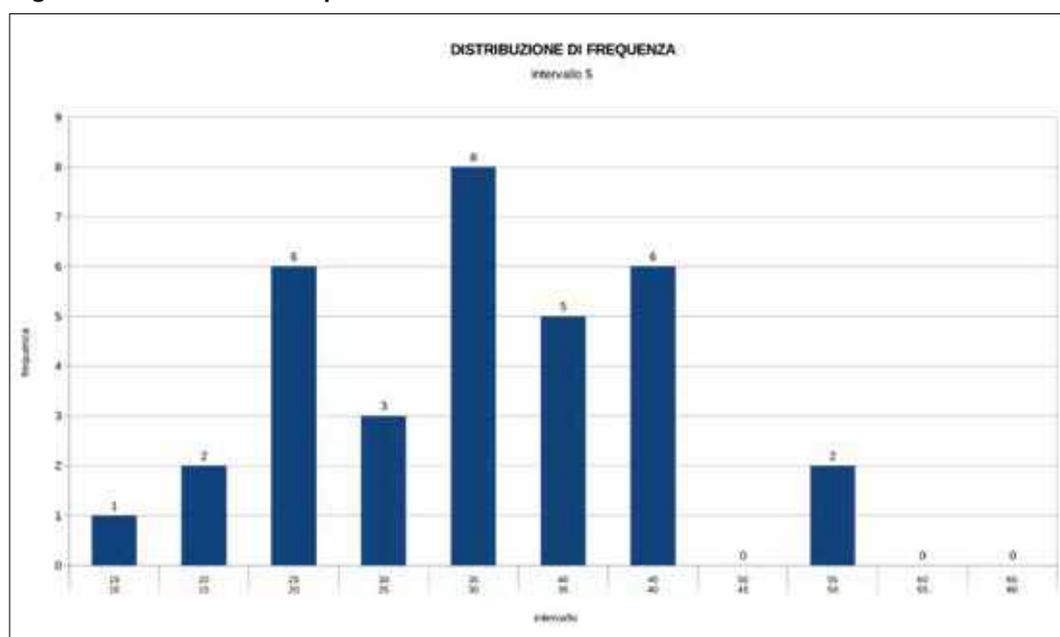
La media delle incertezze estese ottenuta nella distribuzione è pari a 33,0 % mentre lo scarto tipo è pari a 9,5 %. Tutti i dati ottenuti ricadono nell'intervallo 33,0 +/- 2 (9,5), la distribuzione delle incertezze può essere pertanto interpretata come una distribuzione normale con media 33 e scarto tipo 9,5.

Il laboratorio, alla luce dei risultati ottenuti, ha definito come incertezza target il valore del 44% per tutti gli analiti, (in letteratura il valore del 44% come incertezza estesa è derivato dalla relazione di Horwitz mutuata dalla correzione di Thompson per concentrazioni inferiori ai 120 ppb). In questo caso il 44% è prossimo alla somma della media (33%) più uno scarto tipo (9,5%) ovvero racchiude il 84 % dei valori della ipotetica gaussiana rappresentante la distribuzione delle incertezze. Sperimentalmente solo 2

Tab. 10. Quadro riassuntivo della stima dell'incertezza estesa di misura mediante dati del circuito di intercalibrazione AGLAE 20M64.1, calcolata mediante Mod. 56 di Arpat

	dati intercalibrazione AGLAE 20M64.1						
	dati inviati al circuito		MOD 30 10 repliche	valore assegnato dal circuito	incertezza estesa materiale circuito	Z-score	MOD 56
	A, ng/L	B, ng/L	CV%	ng/L	ng/L		incertezza estesa, %
Naftalene	74.8	91.8	13.24	88.78	4.32	-0.27	39.64
Acenaftilene	70.5	84.8	3.71	79.93	3.26	-0.16	22.72
Acenaftene	43.4	52.9	11.56	48.47	1.87	-0.04	32.84
Fluorene	93.9	105.6	8.28	100.99	3.24	-0.08	23.60
Fenantrene	70.3	71.0	4.07	74.57	2.62	-0.32	15.39
Antracene	11.6	12.2	6.93	12.25	0.51	-0.14	20.77
Fluorantene	17.1	16.9	4.11	18.72	0.52	-0.68	23.37
Pirene	73.3	73.5	1.63	84.91	2.52	-0.97	26.95
Benzo[a]antracene	22.9	22.5	2.53	25.18	0.72	-0.72	21.52
Crisene	91.4	89.9	1.16	95.56	2.71	-0.38	12.08
Benzo[b]fluorantene	16.4	16.8	3.10	18.85	0.55	-0.83	23.23
Benzo[k]fluorantene	20.8	20.7	5.18	23.92	0.67	-0.95	30.25
Benzo[a]pirene	15.5	15.7	2.99	18.86	0.45	-1.48	35.05
Indeno[1,2,3-cd]pirene	9.7	10.1	4.60	11.46	0.52	-0.61	27.42
Dibenzo[a,h]antracene	15.6	17.0	7.75	21.77	0.76	-1.51	51.16
Benzo[g,h,i]perilene	7.5	7.6	3.07	10.19	0.39	-1.38	52.69

Fig. 2. Distribuzione di frequenza delle incertezze.



valori (51% del Dibenzo(a,h)antracene e 52% del Benzo(g,h,i)perilene) superano il 44% di incertezza estesa prefissato dal laboratorio, ovvero una percentuale pari solo al 6% del totale, ben inferiore al 16% teorico.

CONCLUSIONI

L'applicazione della tecnica SPME si è rivelata particolarmente vantaggiosa sia in termini di tempi di analisi che di riduzione dei quantitativi di reagenti impiegati e dei volumi di campione necessari ed eliminazione di rifiuti di laboratorio prodotti. L'alta sensibilità raggiunta dalla spettrometria di massa tandem consente oggi di effettuare una verifica di conformità rispetto agli Standard di Qualità Ambientale ai fini della classificazione dei corpi idrici superficiali previsti dalla direttiva Acque per IPA e PCB.

La riproducibilità dei risultati ottenuti in termini di ripetibilità e accuratezza ha permesso di stimare una incertezza che possa essere associata a tutti i congeneri con un'affidabilità più che adeguata.

NOTE BIBLIOGRAFICHE

- [1] Belardi, R.G., Pawliszyn, L., The application of chemically modified fused silica in the extraction of organics from water matrix samples and their rapid transfer to capillary columns - *Water Pollution Research Journal of Canada*, 224, 179-185 (1989).
- [2] Gõrecki, T., Yu, X.-M., Pawliszyn, J., Theory of analyte extraction by selected porous polymer SPME fibers - *Analyst*, 124, 643-649 (1999).
- [3] Mullet, W.M., Pawliszyn, J., The development of selective and biocompatible coatings for solid phase microextraction - *Journal of Separation Science* 26, 251 - 260 (2003).
- [4] EPA METHOD 8272, Parent and alkyl polycyclic aromatics in sediment pore water by solid-phase microextraction and gas chromatography/mass spectrometry in selected ion monitoring mode (2007).
- [5] UNI EN ISO 27108:2013 Qualità dell'acqua - Determinazione di agenti selezionati per il trattamento delle piante e prodotti biocidi - Metodo che utilizza la microestrazione in fase solida (SPME) seguita da gascromatografia-spettrometria di massa (2013).
- [6] Cheng, X., Forsythe, J., Peterkin, E., Some factors affecting SPME analysis and PAHs in Philadelphia's urban waterways - *Water Research* 47, 2331 - 2340 (2013).
- [7] NT TECHNICAL REPORT 537, Bertil Magnusson, Teemu Näykki, Håvard Hovind, Mikael Krysell, Handbook for Calculation of Measurement Uncertainty in Environmental Laboratories, Edition 3.1 - 11/2012.